

Das Aktinzytoskelett-Protein Myotilin: Analyse speziesspezifischer Isoformen, Lokalisation in Nicht-Muskelzellen und Phosphorylierung

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andrea Katharina Günther

aus

Köln

Bonn, 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dieter O. Fürst

2. Gutachter: Herr PD Dr. Gregor Kirfel

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.
Erscheinungsjahr: 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abkürzungen für Aminosäuren.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Muskulatur.....	1
1.1.1 Quergestreifte Muskulatur.....	2
1.1.1.1 Skelettmuskulatur.....	2
1.1.1.2 Herzmuskulatur.....	3
1.1.2 Glatte Muskulatur.....	5
1.2 Das Zytoskelett.....	6
1.2.1 Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte.....	7
1.2.2 Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte der Muskelzellen.....	10
1.3 Genetische Erkrankungen der Muskulatur.....	12
1.3.1 Gliedergürtelmuskeldystrophien.....	12
1.3.1.1 LGMD1a.....	13
1.3.2 Myofibrilläre Myopathien.....	14
1.4 Myotilin.....	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	17
2 Material.....	19
2.1 Chemikalien.....	19
2.2 Kulturmedien und Antibiotika.....	20
2.2.1 Bakterienkulturmedien und Antibiotika.....	20
2.2.2 Zellkulturmedien und Antibiotika.....	21
2.3 Komponentensysteme („Kits“).....	21
2.4 Plasmide und Primer.....	22
2.4.1 Plasmide.....	22
2.4.1.1 pET23aT7.....	22
2.4.1.2 pET23aEEF.....	22
2.4.1.3 pMypG.....	22
2.4.1.4 pEGFP-Cpd.....	23
2.4.1.5 pGEM-T.....	23
2.4.1.6 pUC18.....	23
2.4.2 Primer.....	23
2.4.2.1 Klonierungsprimer.....	23
2.4.2.2 Mutagenese-Primer.....	24
2.5 Enzyme.....	25
2.5.1 Restriktionsendonukleasen.....	25
2.5.2 Andere Enzyme.....	25
2.6 Bakterienstämme, Zelllinien und Gewebe.....	25
2.6.1 Bakterienstämme.....	25
2.6.1.1 <i>E. coli</i> JM109 (DNA-Klonierung).....	25
2.6.1.2 <i>E. coli</i> XL1-blue (Mutagenese).....	26
2.6.1.3 <i>E. coli</i> BL21(DE3)CodonPlus(DE3)-RP (Proteinexpression).....	26
2.6.1.4 <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS (Proteinexpression).....	26
2.6.2 Zelllinien.....	26
2.6.2.1 Humane Skelettmuskelzellen (HSkM-Zellen).....	26
2.6.2.2 C2C12-Zellen.....	26

2.6.2.3	A7r5-Zellen	26
2.6.2.4	HEK-293-Zellen.....	26
2.6.3	Gewebe und isolierte Kardiomyozyten	27
2.7	Antikörper und Blockierungsseren.....	27
2.7.1	Primäre Antikörper.....	27
2.7.2	Sekundäre Antikörper	27
2.7.3	Blockierungsseren	27
2.8	Standards	29
2.8.1	DNA-Standards	29
2.8.2	Proteinstandards	29
2.9	Geräte und sonstiges Material	29
2.9.1	Arbeiten mit Zellkulturen und Bakterien	29
2.9.2	Arbeiten mit Proteinen und DNA.....	30
2.9.3	Radioaktive Arbeiten.....	31
2.9.4	Mikroskopie	31
2.9.5	Computer und Software	32
2.9.6	Sonstiges.....	32
3	Methoden.....	33
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.1.1	Polymerasekettenreaktion	33
3.1.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	34
3.1.3	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
3.1.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	35
3.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten	35
3.1.6	T/A-Klonierung.....	36
3.1.7	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen.....	36
3.1.8	Test der Transformationskompetenz von Bakterienzellen.....	37
3.1.9	Transformation von DNA in kompetente Bakterienzellen	37
3.1.10	Aufreinigung von Plasmid-DNA	37
3.1.10.1	„Mini-Präparation“ mit TELT-Puffer	37
3.1.10.2	„Mini-Präparation“ mit Kit	38
3.1.10.3	„Midi-Präparation“	39
3.1.11	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	39
3.1.11.1	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	39
3.1.11.2	DNA-Konzentrationsmessung mit Hilfe des „MassRuler DNA Ladder, Mix“	40
3.1.12	Sequenzierung	40
3.1.13	Mutagenese.....	40
3.1.14	Herstellung von Glyzerolbakterienkulturen	41
3.1.15	Isolierung von RNA	41
3.2	Zellkulturen	42
3.2.1	Auftauen, Passagieren und Einfrieren von Zellen.....	42
3.2.2	Myogene Differenzierung von C2C12-Zellen	43
3.2.3	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA	43
3.3	Proteinchemische und immunologische Methoden.....	44
3.3.1	Expression rekombinanter Proteine in Bakterien.....	44
3.3.1.1	Mini-Expressionsanalyse	44
3.3.1.2	Präparative Proteinexpression	44
3.3.2	Reinigung rekombinanter Proteine.....	45
3.3.3	Präparation von Proteinextrakten aus Zellkulturen und Geweben.....	46

3.3.3.1	Präparation von fraktionierten Proteinextrakten aus Zellkulturen mit Triton-Lysepuffer	46
3.3.3.2	Präparation von Proteinextrakten aus Geweben mit Triton-Lysepuffer	47
3.3.3.3	Präparation von Proteinextrakten aus Geweben mit RIPA-Lysepuffer	47
3.3.3.4	Präparation von Proteinextrakten aus Geweben mit SDS-Probenpuffer	47
3.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	48
3.3.5	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung gereinigter rekombinanter Proteine	48
3.3.6	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	49
3.3.7	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	51
3.3.8	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen und immunchemischer Nachweis („Western Blotting“)	51
3.3.9	Immunpräzipitation	53
3.4	Indirekte Immunfluoreszenz	54
3.4.1	Herstellung von Gefrierschnitten	54
3.4.2	Herstellung isolierter Kardiomyozyten	54
3.4.3	Fixierung von Gefrierschnitten und Zellen	56
3.4.3.1	Methanol-Azeton-Fixierung	56
3.4.3.2	Paraformaldehyd-Fixierung	56
3.4.4	Blockierung und Immunmarkierung	56
3.4.5	Eindeckeln, Fluoreszenzmikroskopie und elektronische Bildbearbeitung	57
4	Ergebnisse	58
4.1	Vergleichende Analyse des Myotilingens des Menschen und der Maus	58
4.2	Expression von Myotilin	62
4.2.1	Kontrolle der Spezifität verschiedener Antikörper gegen Myotilin	62
4.2.2	Expression von Myotilin in unterschiedlichen Geweben der Maus	63
4.2.3	Expression von Myotilin in unterschiedlichen Geweben der Ratte	65
4.2.4	Expression von Myotilin in unterschiedlichen Geweben des Krallenfrosches	67
4.2.5	Immunpräzipitation des 100 kDa-Proteins	68
4.2.6	Myotilinisoformentypen auf mRNA-Ebene: RT-PCR	69
4.2.7	Zusammenfassung der Untersuchungen zur Expression von Myotilin	70
4.3	Lokalisierung von Myotilin	71
4.3.1	Lokalisierung von Myotilin in Darm und Lunge der Maus	71
4.3.2	Lokalisierung von Myotilin im Bereich von Zell-Zell-Kontakten	74
4.3.3	Lokalisierung von Myotilin in isolierten murinen Kardiomyozyten	76
4.3.4	Zusammenfassung der Lokalisierungsstudien	77
4.4	Lokalisierung von Myotilin in transienten Expressionsstudien	87
4.4.1	Klonierung der Myotilinisoformentypen in die Plasmide pEGFP-Cpd und pMypG zur Generierung von Myotilin-EGFP-Fusionsproteinen	87
4.4.2	Kontrolle der Expression der Myotilin-EGFP-Fusionsproteine in HEK-293-Zellen	87
4.4.3	Lokalisierung der transient exprimierten Myotilinisoformentypen in A7r5-Zellen	90
4.5	Phosphorylierung von Myotilin	92
4.5.1	Phosphorylierung von MyotS durch PKA	94
4.5.2	Vergleich der Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch PKA	96
4.5.3	Phosphorylierung von MyotS durch PKC α	98
4.5.4	Vergleich der Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch PKC α	100
4.5.5	Phosphorylierung von MyotS durch MAPK	101
4.5.6	Vergleich der Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch MAPK	102

4.5.7	Zusammenfassung der Phosphorylierungsstudien	103
5	Diskussion	105
5.1	Myotilinisformen und Expressionsmuster	105
5.2	Subzelluläre Lokalisation von Myotilin	115
5.3	Myotilin spielt eine Rolle beim Aufbau von Zell-Zell- und Zell-Matrix- Kontakten	117
5.4	Myotilin wird von den Proteinkinasen PKA, PKC α und MAPK phosphoryliert..	119
5.5	Ausblick	121
6	Zusammenfassung	124
7	Literatur	126
	Anhang A	139
	Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen	139
	Anhang B	158
	Vektorkarten	158

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1	Muskulatur.....	1
Abbildung 1.2	Struktur eines Skelettmuskels.....	4
Abbildung 1.3	Kontraktion von Glattmuskelzellen.....	5
Abbildung 1.4	Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte.....	9
Abbildung 1.5	Glanzstreifen.....	11
Abbildung 1.6	Costamere.....	11
Tabelle 1.1	Dominant und rezessiv vererbte LGMD-Formen.....	13
Tabelle 1.2	Myotilinmutationen in Myopathien.....	14
Abbildung 1.7	Die Myotilin/Palladin/Myopalladin-Familie.....	15
Tabelle 2.1	Antibiotika.....	20
Tabelle 2.2	Zellkulturmedien.....	21
Tabelle 2.3	Primäre Antikörper.....	28
Tabelle 2.4	Sekundäre Antikörper.....	29
Abbildung 3.1	Prinzip der Proteindetektion mit Hilfe von ECL.....	53
Tabelle 4.1	Ergebnisse der PCR-Experimente.....	59
Abbildung 4.1	Humane und murine Myotilinisoforment.....	60
Abbildung 4.2	Expression von Myotilin in Mausgeweben.....	64
Abbildung 4.3	Expression von Myotilin in Rattengeweben.....	66
Abbildung 4.4	Expression von Myotilin in Geweben des Krallenfrosches.....	67
Abbildung 4.5	Immunpräzipitation aus Darm- und Skelettmuskelproteinextrakten...	68
Abbildung 4.6	Identifikation von Myotilinisoformenten auf mRNA-Ebene.....	70
Abbildung 4.7	Lokalisierung von Myotilin in der Lunge.....	72
Abbildung 4.8	Lokalisierung von Myotilin im Darm.....	73
Abbildung 4.9	Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und ZO-1.....	78
Abbildung 4.10	Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Occludin.....	79
Abbildung 4.11	Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Villin.....	80
Abbildung 4.12	Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Cadherin.....	81
Abbildung 4.13	Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und α -Catenin.....	82
Abbildung 4.14	Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und β -Catenin.....	83
Abbildung 4.15	Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Vinculin.....	84
Abbildung 4.16	Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und α -Aktinin.....	85

Abbildung 4.17	Lokalisierung von Myotilin in murinen Kardiomyozyten.....	86
Abbildung 4.18	Lokalisierung der EGFP-Myotilin-Fusionsproteine.....	89
Abbildung 4.19	Lokalisierung der Myotilin-EGFP-Fusionsproteine.....	91
Abbildung 4.20	Lokalisierung der Myotilin-Fusionsproteine in „dense bodies“ und „adhesion plaques“.....	92
Abbildung 4.21	Potentielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen im Myotilinprotein.....	93
Abbildung 4.22	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung von MyotS durch PKA.....	95
Abbildung 4.23	Vergleich der <i>in vitro</i> -Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch PKA.....	96
Abbildung 4.24	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch Proteinextrakte differenzierter C2C12-Zellen und Inhibierung durch PKI und H-89.....	98
Abbildung 4.25	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung von MyotS durch PKC α	99
Abbildung 4.26	Vergleich der <i>in vitro</i> -Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch PKC α	101
Abbildung 4.27	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung von MyotS durch MAPK.....	102
Abbildung 4.28	Vergleich der <i>in vitro</i> -Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch MAPK.....	103
Tabelle 5.1	Vergleich der Myotilinsequenzen verschiedener Spezies.....	109
Tabelle 5.2	Expression der Myotilinisoforamen.....	111
Tabelle 5.3	Vergleich von Daten der Myotilinexpression.....	114

Abkürzungsverzeichnis

A, a	Adenin
A	Österreich
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintri-phosphat
BA	Bandpassfilter
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“)
bzw.	beziehungsweise
C, c	Cytosin
°C	Temperatur in Grad Celsius
ca.	zirka
Ca	Kalzium
cAMP	Adenosin-3',5'-cyclophosphat
cDNA	„copy“-DNA
CH	Schweiz
CHO-Zellen	Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CPITC	Coumarin-Phenyl-Isothiocyanat
D	Deutschland
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DM	dichroischer Spiegel („dichroic mirror“)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium („Dulbecco's modified Eagle medium“)
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DTT	D,L-Dithiothreitol
E9, E13	neunter bzw. 13. Tag der embryonalen Entwicklung
ECACC	European Collection of Animal Cell Cultures
ECL	verstärkte Chemilumineszenz („enhanced chemiluminescence“)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein („enhanced green fluorescent protein“)
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EM	extrazelluläre Matrix
EST	exprimierter Sequenzbereich („expressed sequence tag“)
et al.	und andere („et alii“)
EX	Anregungsfilter („excitation filter“)

Abkürzungsverzeichnis

FATZ	<u>F</u> ilamin-, α - <u>A</u> ktinin- und <u>T</u> elethonin-bindendes Protein der <u>Z</u> -Scheibe
FCS	Fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
FIN	Finnland
g	Gramm
G, g	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n) („hour(s)“)
HEK-Zellen	„human embryonic kidney cells“
H ₂ O	Reinstwasser (Millipore-Qualität)
HRPO	Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“)
HskM-Zellen	Humane Skelettmuskelzellen
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ISH	in situ Hybridisierung
J	Japan
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LGMD	Gliedergürtelmuskeldystrophie („limb girdle muscular dystrophy“)
LSM	Konfokales Laser-Rastermikroskop („Laser scanning microscope“)
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1
μ Ci	Mikrocurie
MCS	Klonierungskassette („multiple cloning site“)
MDa	Megadalton
MFM	Myofibrilläre Myopathie
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
μ g	Mikrogramm
min	Minute(n)
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mm	Millimeter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
mM	Millimolar
mRNA	„messenger RNA“
MURF	<u>M</u> uskel- <u>R</u> ING- <u>F</u> inger-Protein
Mut.	Mutante
Myot	Myotilin
Na	Natrium
NDS	Eselserum („normal donkey serum“)
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren („non essential amino acids“)
ng	Nanogramm
NGS	Ziegenserum („normal goat serum“)
NL	Niederlande
nm	Nanometer
nmol	Nanomol

OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster („open reading frame“)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC α	Proteinkinase C α
PKI	Proteinkinaseinhibitor
PL	Polen
PMA	Phorbol-12-myristat-13-azetat
pmol	Picomol
PO	Peroxidase
PtK2-Zellen	Zellen aus dem Nierenepithel der Känguruhratte
RACE-PCR	„rapid amplification of cDNA ends“-PCR
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SBM	„speroid body myopathy“
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodiumdodecylsulfate“)
sec	Sekunde(n)
T, t	Thymin
T _A	Anlagerungstemperatur („annealing temperature“)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung („Tris buffered saline“)
TBST	TBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
U	Einheit(en) („unit(s)“)
u. a.	unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich („United Kingdom“)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
% v/v	Volumenprozent
wt	Wildtyp
% w/v	Gewichtsprozent
1x, 2x, ...	einfach, zweifach, ...
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosidase
z. B.	zum Beispiel

Abkürzungen für Aminosäuren

Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
Cys, C	Zystein
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glyzin
His, H	Histidin
Ile, I	Isoleuzin
Leu, L	Leuzin
Lys, K	Lysin
Met, M	Methionin
Phe, F	Phenylalanin
Pro, P	Prolin
Ser, S	Serin
Thr, T	Threonin
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin
Val, V	Valin

1 Einleitung

1.1 Muskulatur

Vorgänge der zielgerichteten Bewegung sowie Herzschlag, Atmung und Verdauung sind für höhere Tiere lebenswichtig und erfordern den Einsatz von Muskeln. Im Lauf der Evolution haben sich unterschiedliche Arten von Muskulatur entwickelt (Abbildung 1.1), die auf unterschiedliche Vorgänge spezialisiert sind. Die quergestreifte Skelettmuskulatur kann willkürlich kontrolliert werden und dient der Krafterzeugung. Auch der Herzmuskel zählt zur quergestreiften Muskulatur, kann jedoch nicht willentlich gesteuert werden. Er gewährleistet den Blutstrom durch den Körper und damit die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Die glatte Muskulatur unterliegt der Kontrolle des vegetativen Nervensystems. Sie umgibt viele Hohlorgane wie Darm, Magen und Blutgefäße und ist z. B. für die Peristaltik verantwortlich. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Muskulaturarten näher beschrieben.

Abbildung 1.1: Muskulatur

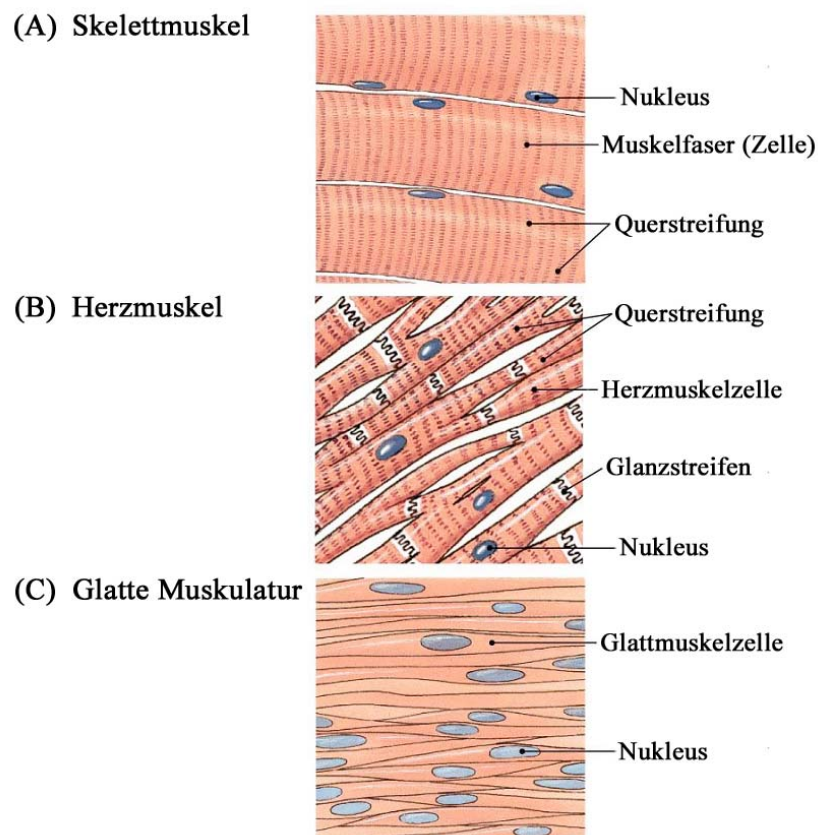


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Muskulaturarten (Cummings, 2007). Skelett- und Herzmuskeln zählen zur quergestreiften Muskulatur. Skelettmuskulatur ist willentlich steuerbar während Herz- und Glattmuskulatur durch das vegetative Nervensystem kontrolliert werden.

1.1.1 Quergestreifte Muskulatur

Die quergestreifte Skelett- bzw. Herzmuskulatur offenbart – unter einem Mikroskop in polarisiertem Licht betrachtet – im Längsschnitt eine alternierende Abfolge von hellen und dunklen Banden, die als isotrope und anisotrope bzw. I- und A-Banden bezeichnet werden und namensgebend sind (Abbildung 1.2 A, B und C). Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Skellett- und Herzmuskulatur sollen im Folgenden dargestellt werden.

1.1.1.1 Skelettmuskulatur

Ein Skelettmuskel besteht aus longitudinal angeordneten Muskelfasern, die aus parallelen Myofibrillen aufgebaut sind (Abbildung 1.2 A). Jede Muskelfaser stellt eine einzige Zelle mit mehreren Zellkernen dar und ist durch Fusion mehrerer Vorläuferzellen (Myoblasten) zu einem Synzytium entstanden. Die Myofibrillen werden aus mehreren Filamentsystemen gebildet.

Die dünnen Filamente bestehen aus Aktinsträngen (Durchmesser 7 nm) sowie assoziierten Proteinen (Tropomyosin, Troponinkomplex) und die dicken Filamente aus Myosinmolekülen (Durchmesser 15 nm) und assoziierten Proteinen (Abbildung 1.2 D und E). Die Filamente sind in regelmäßigen repetitiven Einheiten angeordnet, wodurch im Mikroskop die I- und A-Banden entstehen (Abbildung 1.2 A, B und C). In den hellen I-Banden befinden sich Aktinfilamente, während die sich in den A-Banden zum Teil überlagernden Aktin- und Myosinfilamente dunkler erscheinen. Jede der repetitiven Einheiten zwischen zwei Z-Scheiben stellt die funktionelle Grundeinheit des Muskels dar und wird als Sarkomer bezeichnet (Abbildung 1.2 A, B und C).

Die dünnen Aktinfilamente werden an der Z-Scheibe verankert, die als dunkle Linie innerhalb der I-Bande sichtbar wird. Die Quervernetzung erfolgt hauptsächlich durch α -Aktinin. Die Plus-Enden der Aktinfilamente befinden sich in der Z-Scheibe und werden über das Protein CapZ stabilisiert.

In der Mitte der A-Bande befindet sich die hellere H-Zone, die ausschließlich von dem helikalen Schaftbereich („bare zone“) der Myosinmoleküle gebildet wird (Clark et al., 2002; Luther et al., 1981). Diese Zone, in der keine globulären Myosinkopfdomänen vorkommen, entsteht durch antiparallele Anordnung der Myosinfilamente (Abbildung 1.2 E). In der dunklen M-Bande innerhalb der H-Zone wird durch M-Banden-Proteine wahrscheinlich die Verbindung zwischen den antiparallelen Myosinfilamenten hergestellt.

Ein drittes Filamentsystem, das Titinfilament, besteht hauptsächlich aus dem Protein Titin und ist wahrscheinlich für die elastische Verknüpfung von Z-Scheibe und M-Bande sowie für den Aufbau und Erhalt der Sarkomere verantwortlich. Mit 3 bis 3,7 MDa ist Titin das bisher größte identifizierte Protein. Ein Titinmolekül erstreckt sich von der Z-Scheibe bis hin zur M-

Bande (Fürst et al., 1988) und interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen wie Myosin und α -Aktinin.

Das Nebulinfilamentsystem stellt das vierte Filamentsystem dar. Es erstreckt sich vom Minus-Ende der Aktinfilamente bis zur Z-Scheibe und reguliert wahrscheinlich die Länge der dünnen Filamente (Clark et al., 2002).

Bei der Kontraktion des Muskels verkürzen sich die Sarkomere unter Verbrauch von Energie in Form von ATP. Die Verkürzung wird dadurch erreicht, dass die dünnen und dicken Filamente in Längsrichtung aneinander vorbeigleiten (Gleitfilamenttheorie; (Huxley und Niedergerke, 1954); (Huxley und Hanson, 1954). Die Länge der dünnen und dicken Filamente bleibt dabei bestehen. Bei der Kontraktion verkürzen sich ausschließlich die I-Banden während die Länge der A-Banden unverändert bleibt. Die H-Zone verschwindet im vollständig kontrahierten Muskel.

Die Kraftgenerierung erfolgt durch Wechselwirkungen zwischen den dünnen und dicken Filamenten. Die globulären Kopfdomänen der Myosinmoleküle können ATP binden und durch ihre ATPase-Aktivität zu ADP und anorganischem Phosphat hydrolysieren. Daraus resultiert eine Konformationsänderung im Myosinmolekül, und die globuläre Domäne kann an Aktin binden und eine so genannte Querbrücke bilden. Durch Freisetzung von ADP und anorganischem Phosphat gelangt das Myosin in seine ursprüngliche Konformation zurück, wodurch eine Kraft auf das Aktinfilament ausgeübt wird, das dadurch ein Stück weit zur Mitte des Sarkomers bewegt wird. Die Kopfdomäne kann anschließend ein neues ATP-Molekül binden. Dadurch wird die Bindung zwischen Myosin und Aktin gelöst, und der Querbrückenzyklus kann erneut beginnen (Lymn und Taylor, 1971).

Um die in den Sarkomeren generierte Kraft auf den gesamten Muskel zu übertragen, ist der kontraktile Apparat der Myofibrillen über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte mit den benachbarten Zellen bzw. der extrazellulären Matrix verbunden.

1.1.1.2 Herzmuskulatur

Der Herzmuskel besteht aus zylindrischen oder Y-förmigen Zellen mit ein oder zwei Zellkernen. Die Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) sind über spezielle Zell-Zell-Kontakte, den Glanzstreifen („intercalated discs“), miteinander verbunden. Die Glanzstreifen enthalten u. a. „gap junctions“ zur elektrischen Kopplung und Desmosomen zur mechanischen Verbindung der Kardiomyozyten. Die Erregung erfolgt durch Schrittmacherzellen im Sinusknoten, die spontan Aktionspotentiale auslösen können, die über die „Gap Junctions“ weitergeleitet werden. Durch die elektrische Kopplung wird eine koordinierte, nahezu gleichzeitige Kontraktion der Kardiomyozyten gewährleistet. Der Mechanismus der Kontraktion entspricht dem der Skelettmuskulatur.

Abbildung 1.2: Struktur eines Skelettmuskels

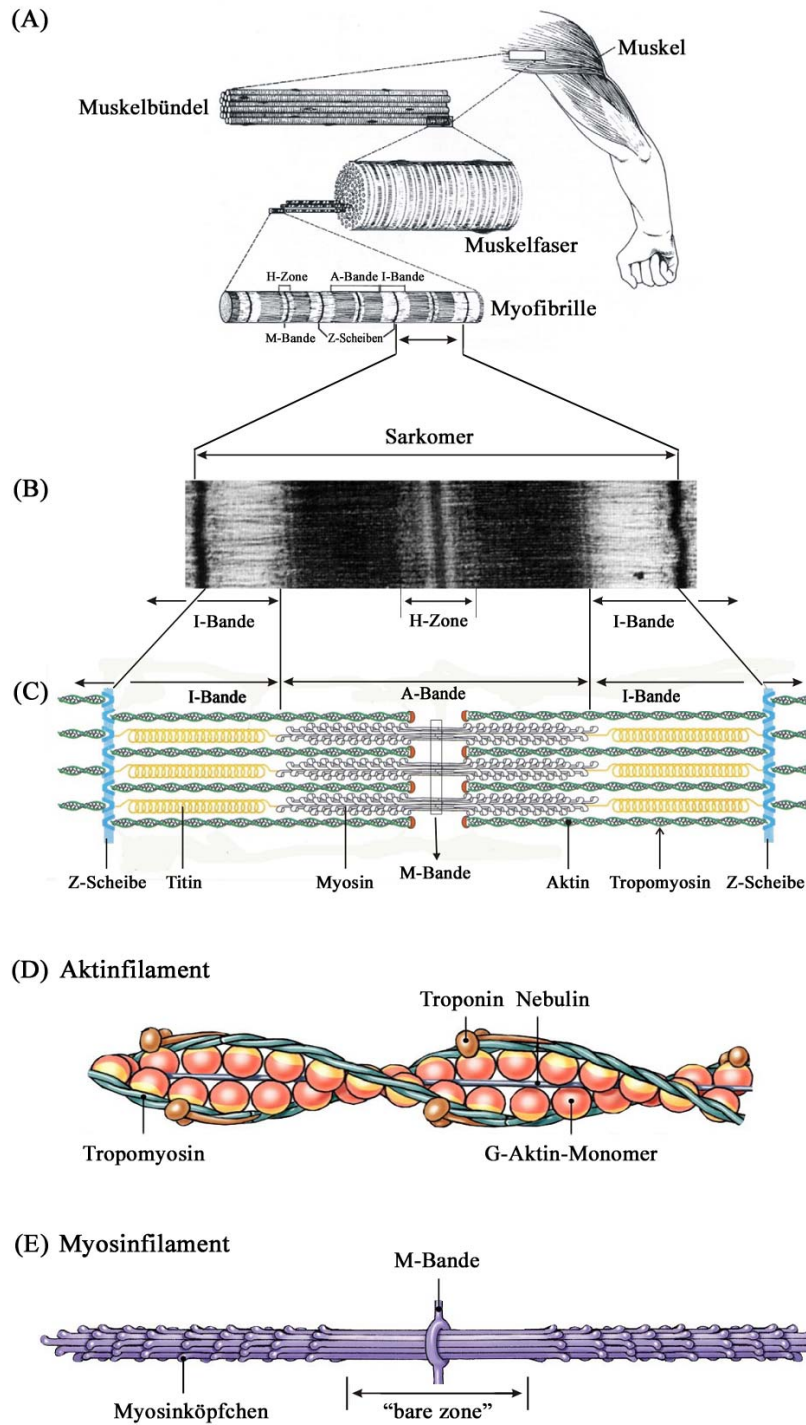


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Struktur eines Skelettmuskels. (A) Aufbau eines Skelettmuskels aus Muskelbündeln, Muskelfasern und Myofibrillen (Bloom und Fawcett, 1975). (B) Das elektronenmikroskopische Bild eines Sarkomers offenbart die alternierende Abfolge der hellen I- und dunklen A-Banden (Fürst et al., 1988). In der Mitte der I-Bande liegt die Z-Scheibe, an der die dünnen Aktinfilamente verankert sind. Die dicken Myosinfilamente werden an der M-Bande verankert, die in der Mitte der A-Bande in der H-Zone liegt. (C) Schematische Darstellung des Sarkomers (Alberts et al., 2002). (D) Schematische Darstellung eines Aktinfilaments (Cummings, 2007). (E) Schematische Darstellung eines Myosinfilaments (Cummings, 2007).

1.1.2 Glatte Muskulatur

Glatte Muskulatur besteht aus spindelförmigen Zellen und zeigt keine Querstreifung. Der Nukleus liegt im Zentrum der Zellen. Die Filamente sind in Bündeln organisiert, zeigen jedoch keine regelmäßige Anordnung. An aus verschiedenen Proteinen gebildeten Verdichtungspunkten („dense bodies“) und Anheftungsplaques („adhesion plaques“) sind die Aktinfilamente aneinander bzw. am Sarkolemma befestigt (Abbildung 1.3). Die Zusammensetzung der „dense bodies“ in glatter Muskulatur ist mit der der Z-Scheiben in quergestreiften Muskeln vergleichbar.

Glatte Muskelzellen exprimieren zum Teil spezifische Proteinisoformen. Dies gilt z. B. für Glattmuskelaktin, eine Isoform des Aktins, die nur in Glattmuskelzellen vorkommt. Troponin hingegen wird nicht exprimiert.

Abbildung 1.3: Kontraktion von Glattmuskelzellen

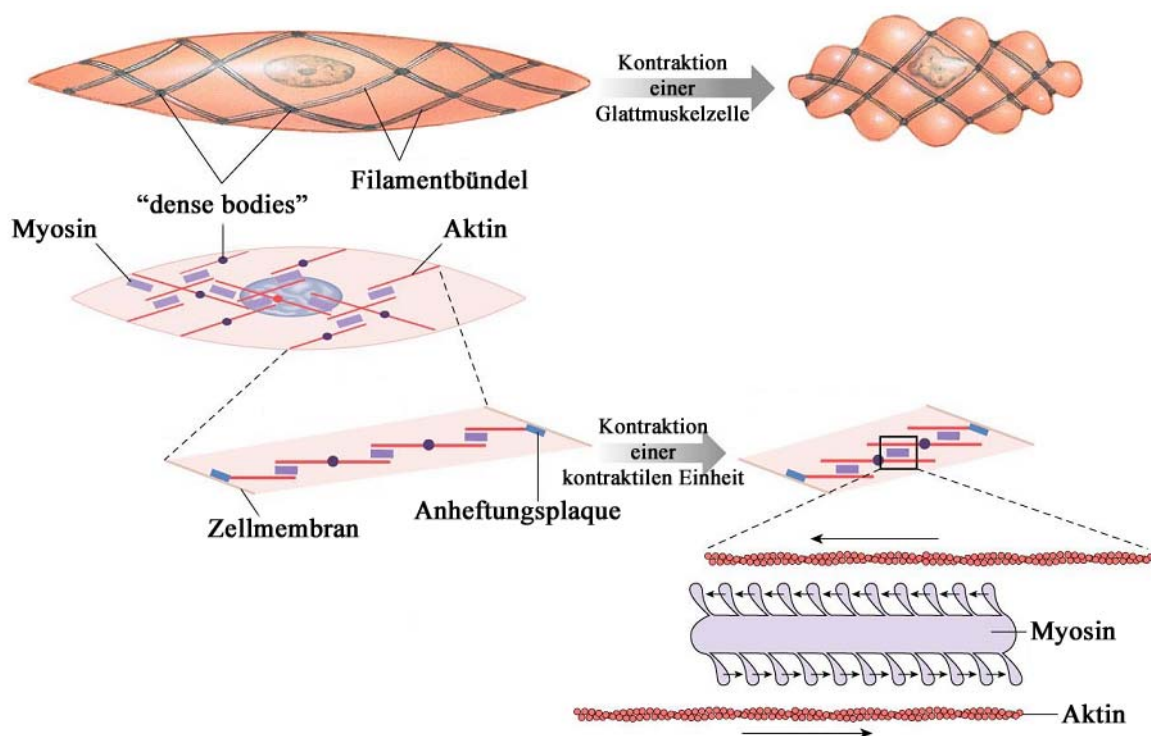


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Kontraktion einer Glattmuskelzelle (Cummings, 2007). Aktin und Myosin sind in Glattmuskelzellen in unregelmäßigen Bündeln angeordnet und werden durch „dense bodies“ und Anheftungsplaques aneinander und an der Zellmembran befestigt. Die kontraktiven Einheiten können aufgrund des parallelen Aufbaus der Myosinfilamente und des Fehlens der Sarkomerstruktur stärker kontrahieren als quergestreifte Muskelzellen, deren maximale Kontraktionsfähigkeit durch die konstante Länge der Filamente und die Z-Scheiben begrenzt wird.

Es gibt zwei Arten glatter Muskelzellen, „single unit“- und „multi unit“-Typen. Der „single unit“-Typ ist durch „gap junctions“ miteinander gekoppelt, wodurch eine synchrone Kontraktion ermöglicht wird. Beim „multi unit“-Typ kontrahieren einzelne Zellen. Jede Zelle wird durch ein Neuron innerviert, und die Erregung bleibt lokal begrenzt.

Glatte Muskulatur kontrahiert im Vergleich zu quergestreifter Muskulatur langsamer, ermüdet jedoch weniger und ist daher darauf ausgelegt, lange zu kontrahieren und starke Kräfte zu erzeugen. Durch das Fehlen der Sarkomerstruktur und der Z-Scheiben, die in quergestreiften Muskelzellen die Kontraktionsfähigkeit begrenzen, und durch parallele (im Gegensatz zur antiparallelen) Anordnung der Myosinfilamente, können sich Glattmuskelzellen stärker kontrahieren. Die Fähigkeit zur ausdauernden Kontraktion ist notwendig für die Funktion der glatten Muskulatur z. B. bei der stetigen Bewegung der Gefäßwände. Die Befähigung zu hoher Kraftgenerierung ist beim Vorgang der Geburtswehen erforderlich.

1.2 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen ist ein Netzwerk unterschiedlicher Proteine, das sich dynamisch verändern kann und für die äußere Form der Zelle, die Zellmobilität sowie für Bewegungs- und Transportvorgänge innerhalb der Zelle verantwortlich ist. Es gibt drei Arten von Zytoskelettsystemen, Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen (Ayscough und Drubin, 1996; Gavin, 1997; Herrmann und Aebi, 2000).

Mikrotubuli sind hohle, zylinderförmige, polare Polymere aus α - und β -Tubulin und haben einen Durchmesser von etwa 25 nm. Ihr Minusende entspringt dem mikrotubuliorganisierenden Zentrum („microtubule organizing center“, MTOC) in der Nähe des Zellzentrums. Das Plusende erstreckt sich in Richtung Zellperipherie. Zusammen mit Motorproteinen (Dyneine und Kinesine) sind sie z. B. für den Transport von Vesikeln zuständig. Während der Mitose werden Mikrotubuli zum Spindelapparat organisiert.

Intermediärfilamente sind unpolar und haben einen Durchmesser um die 10 nm. Sie sind u. a. für die mechanische Stabilisierung von Zellorganellen und der gesamten Zelle zuständig. Intermediärfilamente bestehen aus zu Strängen aufgewundenen Faserproteinen wie Keratin, Lamin, Desmin oder Vimentin (Kim und Coulombe, 2007). Über Adapterproteine können Intermediärfilamente an Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte (Desmosomen bzw. Hemidesmosomen) gekoppelt werden.

Aktinfilamente werden auch Mikrofilamente genannt und bestehen aus G-Aktinmolekülen, die zu F-Aktin polymerisieren, wodurch eine polare, helikale Struktur entsteht. Aktinfilamente haben einen Durchmesser von etwa 8 nm und besitzen die Fähigkeit zur

Selbstaggregation („self-assembly“). Das Aktinzytoskelett stellt eine äußerst dynamische Struktur dar und ist an Bewegungsvorgängen der Zelle maßgeblich beteiligt. Mit Hilfe aktinbindender Proteine (z. B. α -Aktinin und Filamin) kann F-Aktin in unterschiedlichen Strukturen wie Stressfasern oder Netzwerken angeordnet werden (Schmidt und Hall, 1998). In den Mikrovilli der Darmepithelzellen sind mehrere Aktinfilamente durch Villin und andere aktinbindende Proteine parallel gebündelt (Athman et al., 2002). Aktinbindende Proteine sind auch bei der Entstehung der Aktinfilamente beteiligt. Der Aufbau der Filamente beginnt mit der Entstehung eines Polymerisationskeims („nucleation“) aus einigen wenigen G-Aktinmolekülen. Dabei kann unter anderem der Arp2/3-Komplex durch Verkürzung der Zeit der Keimbildung helfen (Pollard und Borisy, 2003). Das Wachstum der Filamente wird durch Anlagerung weiterer Aktinmonomere an das Plusende („barbed end“) erreicht. Zur Kontrolle des Wachstums binden „Capping“-Proteine an die Enden des Filaments und verhindern so die Anlagerung weiterer G-Aktinmoleküle an das Plusende (z. B. Gelsolin) oder beschleunigen (z. B. Cofilin) oder verzögern (z. B. Tropomodulin) den Abbau am Minusende („pointed end“) des Filaments (Gregorio et al., 1995; Sarmiere und Bamburg, 2004; Silacci et al., 2004). Durch Proteine wie Spektrin, Tau oder Plektin kann das Aktinfilamentsystem mit dem Intermediärfilamentsystem oder den Mikrotubuli verbunden werden (Winder und Ayscough, 2005). Über Adapterproteine wie Dystrophin oder Vinculin (Winder und Ayscough, 2005) bindet das Aktinfilamentsystem an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte (Gürteldesmosomen bzw. Fokalkontakte).

1.2.1 Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte

Zell-Zell-Kontakte sind spezialisierte Verbindungen zwischen den Plasmamembranen benachbarter Zellen. Sie bestehen im Wesentlichen aus Proteinen und lassen sich in mehrere Typen unterteilen (Abbildung 1.4): Verschlusskontakte (Zonula occludens, „tight junctions“), die Barrierefunktion haben, Desmosomen (Macula adhaerens) und Gürteldesmosomen (Zonula adhaerens, „adherens junctions“), die eine mechanische Verbindung zwischen den Zellen herstellen, und Kommunikationskontakte (Nexus, „gap junctions“), die durch chemische oder elektrische Signale eine Kommunikation zwischen den Zellen ermöglichen (Niessen, 2007; Söhl und Willecke, 2004; Stokes, 2007).

In polaren, einschichtigen Epithelien wie dem Darmepithel sind die verschiedenen Zell-Zell-Kontakte im so genannten Schlussleistenkomplex in spezifischer Reihenfolge angeordnet (Abbildung 1.4). Am weitesten apikal liegen dabei die „tight junctions“, weiter basal die Gürteldesmosomen und anschließend die Desmosomen.

„Tight junctions“ verhindern, dass Stoffe unkontrolliert parazellulär transportiert werden und dass Membranproteine innerhalb der Membran frei diffundieren können. Sie sind Ca^{2+} -

abhängig und werden von Occludinen und Claudinen gebildet, die über ZO-1, -2 oder -3 mit dem Aktinzytoskelett interagieren (Hartsock und Nelson, 2008; Mitic et al., 2000).

Desmosomen und Gürteldesmosomen werden aus Transmembranproteinen der Cadherinfamilie aufgebaut und sind Ca^{2+} -abhängig. Desmosomen sind intrazellulär mit Intermediärfilamenten, Gürteldesmosomen mit Aktinfilamenten assoziiert. Bis zum Jahre 2005 wurde die These vertreten, dass die Verbindung von Cadherinen zum Aktinzytoskelett durch Catenine gewährleistet wird, die direkt (Nagafuchi, 2001; Rimm et al., 1995) oder indirekt über Vinculin, α -Aktinin oder ZO-1 (Angst et al., 2001; Gumbiner, 2005; Steinberg und McNutt, 1999) an F-Aktin binden. Dann wurde jedoch gezeigt, dass α -Catenin nicht simultan an Aktin und den Cadherin- β -Catenin-Komplex binden kann, auch nicht in Anwesenheit von Vinculin oder α -Aktinin (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005). Die Verbindung von desmosomalen Cadherinen (Desmocollin, Desmoglein) zum Zytoskelett wird nach bisherigem Wissen durch die Proteine Plakoglobin, β -Catenin bzw. Plakophilin gebildet, die über Desmoplakin an Intermediärfilamente gekoppelt werden (Angst et al., 2001; Gumbiner, 2005).

„Gap junctions“ werden aus Connexinen aufgebaut, die einen verschließbaren hexagonalen Hohlzylinder (Connexon) bilden. Zwei Connexone benachbarter Zellen bilden eine „gap junction“. Moleküle, die eine molekulare Masse von 1 kDa nicht überschreiten, z. B. Ionen, cAMP und Wasser, können den Kanal passieren, größere Moleküle nicht (Kumar und Gilula, 1996; Söhl und Willecke, 2004). Durch „gap junctions“ wird z. B. die Synchronisation der Kontraktion der Kardiomyozyten erreicht. Die Regulation erfolgt durch pH-Wert und Ca^{2+} -Ionen.

Zell-Matrix-Kontakte sind Verbindungen von Zellen zur extrazellulären Matrix. Es werden Fokalkontakte und Hemidesmosomen unterschieden. Beide Formen bestehen aus Transmembranproteinen der Integrinfamilie, die mit dem Zytoskelett verbunden sind. Fokalkontakte sind intrazellulär über Adapterproteine wie Filamin, α -Aktinin oder Vinculin (Liu et al., 2000; Loo et al., 1998; Otey et al., 1990; Wachsstock et al., 1987) mit dem Aktinzytoskelett und extrazellulär mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin oder Kollagen assoziiert. Hemidesmosomen sind innerhalb der Zelle mit Intermediärfilamenten verbunden (Litjens et al., 2006). Zu den Zell-Matrix-Kontakten zählt auch der Dystroglykankomplex. Er besteht unter anderem aus α - und β -Dystroglykan, Sarkoglykanen, Dystrophin und Utrophin (Clark et al., 2002; Winder, 2001) und ist mit dem Aktinzytoskelett assoziiert. Störungen des Komplexes führen zur Duchenne-Muskeldystrophie (Ervasti et al., 1990).

Abbildung 1.4: Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte

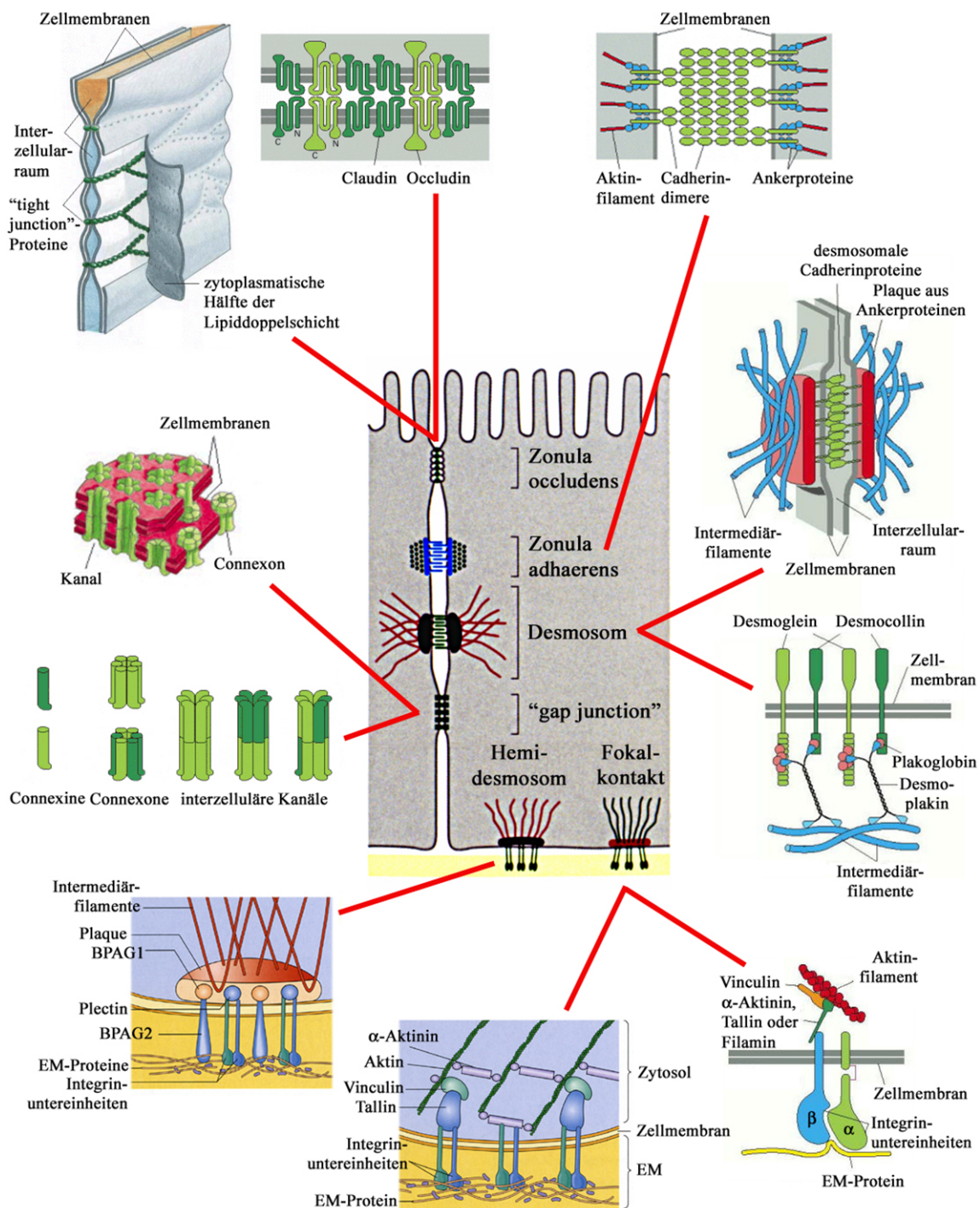


Abbildung 1.4: Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte in Epithelzellen (Alberts et al., 2002; Becker et al., 2005; Gumbiner, 2005). Die Zonula occludens („tight junctions“) wird aus Claudinen und Occludinen gebildet und verhindert unkontrollierten parazellulären Transport. Die Zonula adhaerens (Gürteldesmosom) wird aus Cadherinen aufgebaut und interagiert mit dem Aktinzytoskelett. Desmosomen bestehen aus den desmosomalen Cadherinen Desmoglein und Desmocollin, die über Adapterproteine an Intermediärfilamente binden. „Gap junctions“ werden aus Connexinen aufgebaut und stellen Kanäle für kleine Moleküle dar. Hemidesmosomen und Fokalkontakte sind Zell-Matrix-Kontakte und werden von Integrinen gebildet. Hemidesmosomen interagieren mit Intermediärfilamenten und Fokalkontakte mit dem Aktinzytoskelett. EM = Extrazelluläre Matrix, BPAG = „bullous pemphigoid antigen“.

1.2.2 Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte der Muskelzellen

Quergestreifte Muskulatur verfügt über spezialisierte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte zur Verankerung der Sarkomere, Kraftübertragung auf den gesamten Muskel und elektrischen Signalübertragung.

Im Herzmuskel werden diese Aufgaben durch die Glanzstreifen („intercalated discs“, *Disci intercalares*) übernommen, die stufenförmig zwischen den Kardiomyozyten verlaufen (Abbildung 1.5) (Leonhardt, 1990) und verschiedene Arten von Zell-Zell-Kontakten enthalten (Clark et al., 2002; Forbes und Sperelakis, 1985). Morphologisch ähneln die Zell-Zell-Kontakte den Desmosomen und Gürteldesmosomen von Epithelzellen, jedoch variiert ihre Proteinzusammensetzung (Borrmann et al., 2006; Franke et al., 2006). Daher werden diese Zell-Zell-Verbindungen im Herzmuskel auch „Area composita“ genannt. Zum Beispiel kann Desmoplakin nicht nur in den Zell-Zell-Kontakten mit Desmosomenmorphologie nachgewiesen werden, sondern auch in solchen mit Gürteldesmosomenmorphologie. Zwischen den Zell-Zell-Verbindungen der „Area composita“ befinden sich „gap junctions“, mit deren Hilfe die koordinierte Kontraktion des Herzmuskels bewirkt wird. Möglicherweise gibt es in den Glanzstreifen zusätzlich zur „Area composita“ auch „klassische“, wie in Epithelzellen aufgebaute Desmosomen und Gürteldesmosomen.

Muskel-Sehnen-Verbindungen („myotendinous junctions“) bilden den Abschluss der Myofibrillen im Skelettmuskel und übertragen die erzeugte Kraft auf die Sehnen und damit auf das Skelett (Clark et al., 2002). Die terminalen Aktinfilamente einer Myofibrille sind u. a. über den Dystroglykankomplex mit der Basalmembran verbunden. Der Aufbau der Muskel-Sehnen-Verbindungen ähnelt dem der Glanzstreifen, jedoch enthalten sie im Gegensatz zu diesen z. B. kein α -Aktinin (Akster et al., 1995; Atsuta et al., 1993; Tidball, 1987).

Costamere sind Orte der Kraftübertragung in Herz- und Skelettmuskelzellen. Sie verankern die Z-Scheiben peripherer Myofibrillen lateral mit dem Sarkolemma und übertragen die Kraft auf die extrazelluläre Matrix (Danowski et al., 1992). Sie wurden zunächst als vinculinhaltige, rippenförmige Objekte beschrieben. Ihr Name leitet sich von dem lateinischen Wort für Rippe („costa“) ab. Costamere setzen sich neben Vinculin aus Talin, β 1-Integrin, Dystrophin, Filamin c, Ponsin und anderen Proteinen zusammen (Byers et al., 1991; Mandai et al., 1999; Masuda et al., 1992; Small et al., 1992; Thompson et al., 2000). Costamere werden auch als Mechanosensor diskutiert, der unterschiedliche Belastungen wahrnehmen kann (Knöll et al., 2002).

Abbildung 1.5: Glanzstreifen

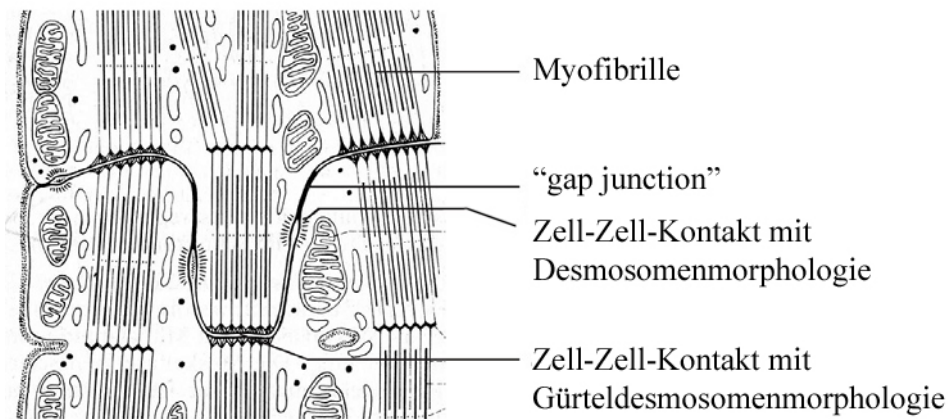


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Glanzstreifen im Herzmuskel (Leonhardt, 1990). Durch Zell-Zell-Kontakte in den Glanzstreifen werden benachbarte Herzmuskelzellen chemisch und mechanisch miteinander gekoppelt.

Abbildung 1.6: Costamere

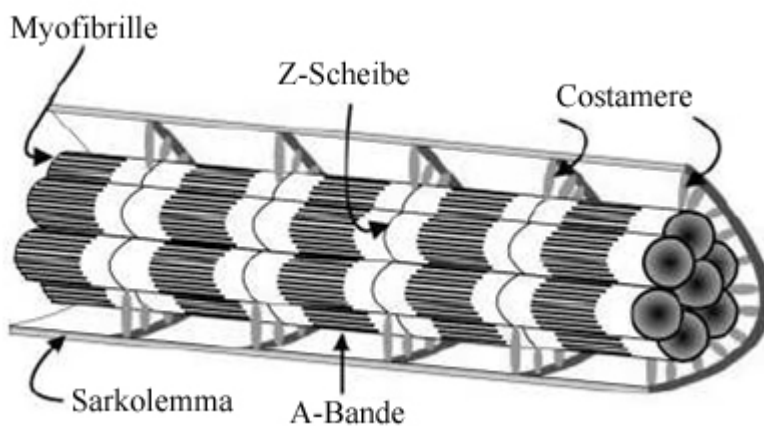


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Lokalisation von Costameren in Muskelzellen (Ervasti, 2003). Costamere verankern die Z-Scheiben peripherer Myofibrillen lateral mit dem Sarkolemma und übertragen die Kraft auf die extrazelluläre Matrix.

1.3 Genetische Erkrankungen der Muskulatur

Erkrankungen der Muskulatur (Myopathien) können die unterschiedlichsten Ursachen haben. Bereits 1868 wurde die X-chromosomal rezessiv vererbte Duchenne-Muskeldystrophie beschrieben, jedoch konnten erst 1986 Mutationen im Dystrophingen als Ursache dieser Erbkrankheit identifiziert werden (Monaco et al., 1986). Unter dem Begriff Muskeldystrophie werden erbliche Muskelerkrankungen zusammengefasst, deren Hauptsymptom die progrediente Degeneration von Muskelmasse ist, wobei vor allem die Skelettmuskulatur betroffen ist. Schätzungen sprechen von bis zu 40000 Muskeldystrophie-Patienten in Deutschland. Die Verläufe der Krankheiten und das Alter, in dem die ersten Symptome auftreten, sind sehr unterschiedlich. Mittlerweile konnten viele der verantwortlichen Gene auf sarkolemmaler, zytoplasmatischer und nukleärer Ebene identifiziert werden. Durch die Identifizierung der Krankheitsgene können Rückschlüsse auf Funktionen der einzelnen Gene gezogen werden.

Im Folgenden sollen Myopathien vorgestellt werden, die auf Mutationen im Myotilingen (*MYOT*; ehemals *TTID*) zurückzuführen sind. Als Oberbegriff für solche Myopathien wird in einigen Veröffentlichungen der Begriff Myotilinopathie verwendet (Garvey et al., 2006; Olivé et al., 2005). In anderen Veröffentlichungen wird der Begriff Myotilinopathie als eine Unterform der Myofibrillären Myopathien (MFM) definiert (Janué et al., 2007; Karpati und Sinnreich, 2004; Kley et al., 2007; Olivé et al., 2008). Zu den Myopathien, in denen Myotilin mutiert oder in einer noch unbekanntem Weise involviert ist, zählen die Gliedergürtelmuskeldystrophie 1a (Hauser et al., 2002; Hauser et al., 2000), die MFM/MYOT (Selcen und Engel, 2004) sowie Formen der Nemalinen Myopathie (Schröder et al., 2003), der „Spheroid body“-Myopathie (SBM) (Foroud et al., 2005) und der Distalen Myopathie mit spätem Krankheitsausbruch („late onset distal myopathy“) (Berciano et al., 2008; Carlsson et al., 2007; Pénisson-Besnier et al., 2006).

1.3.1 Gliedergürtelmuskeldystrophien

Mit dem Begriff Gliedergürtelmuskeldystrophie („limb-girdle muscular dystrophy“, LGMD) wird eine heterogene Gruppe von Muskeldystrophien zusammengefasst, die vor allem die Muskulatur des Schulter- und Beckengürtels betrifft. Es gibt autosomal dominant (LGMD1) und rezessiv (LGMD2) vererbte Formen, die durch Mutationen in verschiedenen Genen ausgelöst werden (Tabelle 1.1) (Guglieri et al., 2005; Laval und Bushby, 2004; Vainzof und Zatz, 2003; Zatz et al., 2003). Als Symptome können unter anderem erhöhte Serum-Kreatinkinasekonzentrationen (Hauser et al., 2000) und zentral gelegene Zellkerne auftreten.

Tabelle 1.1: Dominant und rezessiv vererbte LGMD-Formen

LGMD-Form	Genprodukt	Referenzen
1A	Myotilin	(Hauser et al., 2000; Salmikangas et al., 2003)
1B	Lamin A/C	(Muchir et al., 2000; van der Kooi et al., 1997)
1C	Caveolin-3	(Minetti et al., 1998)
1D	unbekannt	(Messina et al., 1997)
1E	unbekannt	(Speer et al., 1999)
1F	unbekannt	(Palenzuela et al., 2003)
1G	unbekannt	(Starling et al., 2004)
2A	Calpain-3	(Baghdiguian et al., 1999; Richard et al., 1995)
2B	Dysferlin	(Bansal et al., 2003; Bashir et al., 1998)
2C	γ -Sarkoglykan	(McNally et al., 1996; Noguchi et al., 1995)
2D	α -Sarkoglykan	(Piccolo et al., 1995; Roberds et al., 1994)
2E	β -Sarkoglykan	(Bönnemann et al., 1995; Lim et al., 1995)
2F	δ -Sarkoglykan	(Nigro et al., 1996; Passos-Bueno et al., 1996)
2G	Telethonin	(Moreira et al., 2000)
2H	TRIM32 („tripartite motif-containing protein 32“)	(Frosk et al., 2002; Weiler et al., 1998)
2I	FKRP („Fukutin-related protein“)	(Brockington et al., 2001)
2J	Titin	(Hackman et al., 2002)
2K	POMT1 (Protein-O-Mannosyltransferase 1)	(Balci et al., 2005)
2L	Fukutin	(Godfrey et al., 2006)
2M	POMGnT1 („protein O-linked mannose β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase“)	(Clement et al., 2008)

1.3.1.1 LGMD1a

Die mit Mutationen im Myotilingen verknüpfte autosomal dominante Form 1a der LGMDs wurde bisher in zwei verschiedenen Familien beschrieben (Hauser et al., 2002; Hauser et al., 2000). Das Durchschnittsalter bei Ausbruch der Krankheit liegt bei 27 Jahren. Als Symptome treten neben proximalen Beinmuskelschwächen, die sich im Verlauf der Krankheit auf die distalen Beinmuskeln sowie proximale und distale Armmuskeln ausweiten, bei vielen Patienten auch Sprachstörungen auf, die in anderen LGMD-Formen nicht beschrieben wurden (Hauser et al., 2000; Laval und Bushby, 2004). Auf molekularer Ebene sind u. a. erhöhte Variabilitäten im Muskelfaserdurchmesser, starke Z-Scheiben-Unregelmäßigkeiten sowie

eine hohe Anzahl zentral gelegener Zellkerne und umrandeter („rimmed“) Vakuolen (autophagische Vesikel) zu beobachten (Hauser et al., 2000).

Bisher wurden zwei verschiedene Mutationen im Myotilingen mit LGMD1A in Verbindung gebracht (Tabelle 1.2). In beiden Fällen sind Aminosäuren in der von Exon 2 kodierten serinreichen Region des Myotilings mutiert (Ser55Phe und Thr57Ile). Weitere fünf Mutationen sind Auslöser der zu den Myofibrillären Myopathien zählenden Krankheit MFM/MYOT (Kapitel 1.3.2). Auffällig ist, dass alle identifizierten Mutationen im Exon 2 liegen und meist einen potentiell phosphorylierbaren Serin- oder Threoninrest betreffen.

Tabelle 1.2: Myotilinmutationen in Myopathien

Aminosäure-Mutation	Wildtyp-kodon	Mutiertes Kodon	Krankheit	Referenzen
Lys36Glu	AAA	GAA	Phänotyp zwischen LGMD1A und MFM	(Olivé et al., 2005)
Ser39Phe	TCC	TTC	SBM	(Foroud et al., 2005)
Ser55Phe	TCC	TTC	LGMD1A und MFM	(Hauser et al., 2002; Selcen und Engel, 2004)
Thr57Ile	ACA	ATA	LGMD1A	(Hauser et al., 2000)
Ser60Cys	TCT	TGT	MFM	(Selcen und Engel, 2004)
Ser60Phe	TCT	TTT	MFM	(Selcen und Engel, 2004)
Gln74Lys	CAG	AAG	Phänotyp zwischen LGMD1A und MFM	(Olivé et al., 2005)
Ser95Ile	AGC	ATC	MFM	(Selcen und Engel, 2004)

1.3.2 Myofibrilläre Myopathien

Myofibrilläre Myopathien (MFMs) stellen eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von vererbaren oder sporadischen Muskelkrankheiten dar und gehen mit veränderter Myofibrillenstruktur, veränderten Proteinexpressionmustern und unlöslichen Proteinaggregaten einher. In mehreren Genen wurden bereits Mutationen identifiziert, die eine MFM auslösen: u. a. Myotilin, Desmin, ZASP („Z band alternatively spliced PDZ-motif protein“) und Filamin c (Goldfarb et al., 1998; Goldfarb et al., 2004; Munoz-Mármol et al., 1998; Selcen und Engel, 2004; Selcen und Engel, 2005; Vorgerd et al., 2005). Die Proteinaggregate enthalten nicht nur das mutierte Protein sondern auch eine große Anzahl anderer Proteine wie Proteine des Zyoskeletts und der Myofibrillen sowie Chaperone, Tau und weitere.

Die MFM/MYOT ist eine Untergruppe der myofibrillären Myopathien und wird durch Mutationen im Myotilingen verursacht (Tabelle 1.2). Die Krankheit äußert sich durch distale Muskelschwäche. Auch der Herzmuskel sowie periphere Nerven können betroffen sein. Es können Aggregate aus Zytoskelettproteinen und Ubiquitin nachgewiesen werden. Die Symptome treten in einem Lebensalter zwischen 50 und 70 Jahren auf (Karpati und Sinnreich, 2004; Olivé et al., 2005; Selcen und Engel, 2004).

1.4 Myotilin

Myotilin bildet zusammen mit Palladin und Myopalladin eine Familie von intrazellulären Proteinen mit Immunglobulin-(Ig)-ähnlichen Domänen vom Typ C2 (Abbildung 1.7) (Bang et al., 2001; Goicoechea et al., 2008; Mykkänen et al., 2001; Parast und Otey, 2000). Diese Art von Ig-ähnlichen Domänen kommt auch bei anderen Proteinen, hauptsächlich Muskelproteinen (z. B. Titin, C-Protein und Myomesin) (Fürst und Gautel, 1995), vor und hat unterschiedliche Funktionen (z. B. Dimerisierung und Bindung an andere Proteinmoleküle (Gilbert et al., 1999)). Alle drei Mitglieder der Familie können α -Aktinin binden (Otey et al., 2005). Palladin bindet außerdem Ezrin und VASP („vasodilator-stimulated phosphoprotein“) und Myopalladin bindet Nebulin und CARP („cardiac ankyrin repeat protein“) (Otey et al., 2005).

Abbildung 1.7: Die Myotilin/Palladin/Myopalladin-Familie

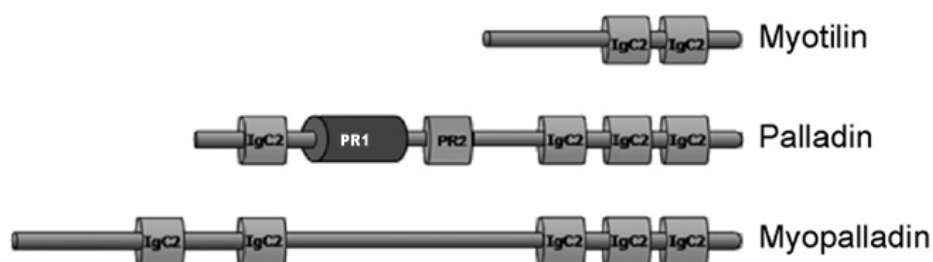


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Proteine der Myotilin/Palladin/Myopalladin-Familie (Goicoechea et al., 2008). IgC2 = Immunglobulin-ähnliche Domäne des Typs C2; PR = prolinreiche Region.

Das humane Protein Myotilin wird von einem ca. 20000 bp großen Gen auf Chromosom 5 (5q31) kodiert, das zehn Exons beinhaltet. Exon 1 liegt vollständig im untranslatierten Bereich. Das erste Startkodon (ATG) liegt im Exon 2 und das Stopkodon (TAA) im Exon 10

(Salmikangas et al., 1999). Das offene Leseraster umfasst 1494 Basenpaare, die für ein Protein mit 498 Aminosäuren kodieren. Der N-Terminus weist eine serinreiche Region (AS-Reste 29 bis 124) auf, in der eine hydrophobe Region (AS-Reste 57 bis 79) enthalten ist. Der C-Terminus enthält zwei Ig-ähnliche Domänen, die von den Exons 6 und 7 bzw. 8 und 9 kodiert werden. Die Ig-ähnlichen Domänen weisen eine hohe Homologie zu den Ig-Domänen 7 und 8 des Titins auf, die mit der Z-Scheibe assoziiert sind (Gautel et al., 1996; Yajima et al., 1996). Dieser Homologie verdankt Myotilin seinen Namen: myofibrilläres Protein mit Titin-ähnlichen Ig-Domänen („myofibrillar protein with titin-like Ig domains“).

Myotilin wird hauptsächlich im Skelettmuskel, aber auch im Herzen und peripheren Nerven exprimiert (Mologni et al., 2001; Salmikangas et al., 1999). In Skelettmuskeln lokalisiert Myotilin in den Z-Scheiben, am Sarkolemma und in intramuskulären Nervenfasern (Salmikangas et al., 1999). Im Verlauf der Embryonalentwicklung verändert sich das Expressionsmuster sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Mologni et al., 2001). Erst ab dem 9. Tag ist Myotilin-mRNA überhaupt nachweisbar, und zwar im Herzen. An den Tagen 10 und 11 wird ein mRNA- und Proteinsignal in den Somiten sichtbar. Damit wird Myotilin dort später als die meisten anderen Sarkomerproteine exprimiert (Fürst et al., 1989). Am 13. Tag ist Myotilin in Geweben wie Muskeln, Lunge und Leber nachweisbar, am Tag 16 jedoch fast nur noch in quergestreiften Muskeln und peripheren Nerven. In allen anderen Organen wird die Expression stark herunterreguliert.

Als Bindungspartner von Myotilin konnten bisher α -Aktinin, Filamin c, F- und G-Aktin, FATZ-1 und -2 sowie MURF-1 und -2 identifiziert werden, die an unterschiedlichen Stellen von Myotilin binden. Die α -Aktinin-Bindungsstelle liegt innerhalb der ersten 215 N-terminalen Aminosäureresten (Salmikangas et al., 1999). Im Bereich der Ig-ähnlichen Domänen erfolgen die Filamin c- und die Aktinbindung sowie die Dimerisierung zweier Myotilinmoleküle (Salmikangas et al., 2003; van der Ven et al., 2000; von Nandelstadh et al., 2005). Durch die Fähigkeit zur Dimerisierung kann Myotilin Aktinfilamente nicht nur binden sondern auch bündeln (Salmikangas et al., 2003). Die genaue Bindungsstelle für FATZ-1 und FATZ-2 (Filamin-, α -Aktinin- und Telethonin-bindende Proteine der Z-Scheibe) konnte noch nicht eingegrenzt werden. Studien zeigen, dass sowohl N- als auch C-terminal trunke Myotilinkonstrukte FATZ-1 nicht binden können (Gontier et al., 2005). Aus Ergebnissen von FRET- („Fluorescence Resonance Energy Transfer“)-Analysen wurde gefolgert, dass die Bindung wahrscheinlich am N-Terminus von Myotilin erfolgt (Stout et al., 2008). Die Interaktion von Myotilin und den Muskel-RING-Finger-Proteinen MURF-1 und -2 wurde in „Yeast Two-Hybrid“-Experimenten nachgewiesen (Witt et al., 2005).

Das murine und humane Myotilingen sind im Bereich des ORFs zu 86 % identisch (Mologni et al., 2005). Auf Proteinebene sind die Sequenzen zu 89 %, im Bereich der Ig-ähnlichen Domänen sogar zu 93,7 % gleich. Der hohe Homologiegrad legt eine evolutionär konservierte

Funktion nahe. Myotilin spielt wahrscheinlich eine Rolle beim Aufbau und bei der Erhaltung der Z-Scheiben. Es hilft zusammen mit seinen Bindungspartnern und anderen Z-Scheibenproteinen bei der Verankerung der dünnen Filamente und trägt somit zur Stabilisierung und Festigkeit der Z-Scheibe bei, so dass diese mechanischem Stress bei der Muskelkontraktion standhalten kann. Die Bindung von Myotilin an Aktinfilamente reduziert die Dissoziation von Aktinmonomeren und schützt die Filamente vor Depolymerisierung (Salmikangas et al., 2003). Auch eine Funktion als Tumorsuppressor wurde vorgeschlagen (Godley et al., 1999).

In transient transfizierten, differenzierten C2C12-Zellen führen N- oder C-terminal trunke Myotilinfragmente zu Proteinaggregaten und gestörtem Myofibrillenaufbau (Salmikangas et al., 2003). Bei transgenen Mäusen, die mutiertes Myotilin (Thr57Ile) exprimieren, zeigen sich Symptome wie bei LGMD1a, MFM/MYOT und SBM (Garvey et al., 2006). Knock-out-Mäuse hingegen zeigen weder gestörte Myofibrillenstrukturen noch Krankheitssymptome (Moza et al., 2007). Sie entwickeln sich normal und haben die gleiche Lebensdauer wie Wildtypmäuse. Ihre Muskelfunktion ist nicht beeinträchtigt. Der fehlende Phänotyp in Myotilin-Knock-out-Mäusen könnte darauf hinweisen, dass die Aufgaben von Myotilin mit denen anderer Proteine, z. B. Palladin und/oder Myopalladin, überlappen und von diesen übernommen werden. Interessanterweise ist in Myotilin-Knock-out-Mäusen die Expression von Telethonin im Vergleich zum Wildtyp sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erhöht. Da Telethonin mit dem kardialen Dehnungssensor in Verbindung gebracht wird (Furukawa et al., 2001; Knöll et al., 2002), wird auch eine Beteiligung von Myotilin in dieser Funktion diskutiert (Moza et al., 2007). In doppelt transgenen Mäusen, die sowohl Wildtyp- als auch mutiertes Myotilin (Thr57Ile) exprimieren, hat die Überexpression des Wildtypproteins eine Verstärkung des Krankheitsphänotyps zur Folge (Garvey et al., 2008). So nimmt z. B. die Bildung von Proteinaggregaten im Vergleich zu einfach transgenen Mäusen, die ausschließlich die Myotilinmutante exprimieren, zu. Ein Modell ist, dass mutiertes Myotilin die Aggregatbildung initiiert, indem es die Aktinbindung an die Z-Scheibe schwächt. An diesen Stellen würde dann das Wachstum der Aggregate beginnen, welches allerdings von der Gesamtmenge an Myotilin, inklusive Wildtyp-Myotilin, abhängig ist.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die erblichen Muskelkrankheiten LGMD1a und MFM/MYOT werden durch Mutationen im Bereich eines Gens ausgelöst, das für das Protein Myotilin kodiert. Sowohl der muskuläre Phänotyp der Erkrankungen, als auch die dominant negativen Effekte transfizierter Teilkonstrukte des Myotilins auf die Sarkomerstruktur deuten darauf hin, dass Myotilin eine

wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Myofibrillen spielt. Da alle bisher bekannten Mutationen in der serinreichen Region des zweiten Exons liegen und meist Serin- oder Threoninreste betreffen, liegt die Vermutung nahe, dass potentielle Phosphorylierungsstellen durch die Mutationen beeinflusst werden. Ein Ziel dieser Arbeit war daher zu untersuchen, ob und wenn ja, von welchen Kinasen Myotilin phosphoryliert wird. Potentielle Phosphorylierungsstellen sollten durch Punktmutagenesen näher analysiert werden. Mögliche regulatorische Funktionen von Phosphorylierungen könnten Hinweise auf die Signalwege innerhalb des Protein-Netzwerkes im Muskel geben und helfen, die Entstehung der Krankheiten LGMD1a und MFM/MYOT zu verstehen.

EST-Datenbanken geben Hinweise, dass mehrere Isoformen von Myotilin exprimiert werden. Daher sollten Genanalysen durchgeführt werden, um mögliche Isoformen von Myotilin zu identifizieren. Im nächsten Schritt sollte das Expressionsmuster von Myotilin unter Verwendung von Antikörpern gegen verschiedene Myotilinepitope im Immunoblot untersucht und so die Expression potentieller Isoformen in verschiedenen Geweben und Organen unterschiedlicher Spezies ermittelt werden. Durch Klonierung der Isoformen und transiente Transfektionen kultivierter Zellen sollte das Verhalten der Isoformen *in vivo* untersucht werden.

Die Expression von Myotilin wurde neben der Herz- und Skelettmuskulatur auch in anderen Organen nachgewiesen. Durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie sollte die Lokalisation von Myotilin in verschiedenen Organen untersucht werden. Diese Studien sollten außerdem Hinweise auf mögliche weitere Funktionen von Myotilin in anderen Organen als der Herz- und Skelettmuskulatur geben.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid Rotiphorese Gel 40 (19:1)	Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe, D
Agarose (SeaKem LE)	Biozym, Hess. Oldendorf, D
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth, Karlsruhe, D
ATP (Adenosinriphosphat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
[γ - ³³ P]ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig, D
Azeton	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Bromphenolblau	Bio-Rad, München, D
BSA („Bovine serum albumin“, Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
cAMP (Adenosin-3',5'-cyclophosphat)	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Coomassie Blue G250	Fisher Scientific, Schwerte, D
di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DMF (N,N'-Dimethylformamid)	OptiChem, Inzlingen, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
dNTPs (Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DTT (D,L-Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe, D
EDTA·2Na (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Di-natrium)	Roth, Karlsruhe, D
Desoxycholsäure-Natriumsalz	Serva, Heidelberg, D
EGTA (Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure)	
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt, D
γ -Globulin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glukose (D(+))	AppliChem, Darmstadt, D
Glyzerin	Roth, Karlsruhe, D
Glyzin	OptiChem, Inzlingen, D
H-89 (PKA-Inhibitor)	Invitrogen, Karlsruhe, D
HEPES	Roth, Karlsruhe, D
Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol (2-Propanol)	Fisher Scientific, Schwerte, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kalium-Glutamat	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe, D
Manganchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg, D
Methanol	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Mowiol (Polyvinylalkohol 4-88)	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Natriumazetat	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumchlorid	OptiChem, Inzlingen, D
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, D
PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, „phosphate buffered saline“, steril, für Zellkultur)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
L- α -Phosphatidyl-L-Serin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
PIPES (1,4-Piperazindiethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe, D
PKI (Proteinkinase-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
PMA (Phorbol-12-myristat-13-azetat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ponceau	Serva, Heidelberg, D
Proteasehemmer „Complete“ (EDTA-frei)	Roche, Mannheim, D
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, D
SDS (Natrium(„Sodium“-)-Dodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe, D
Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol)	Roth, Karlsruhe, D
Triton-X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Serva, Heidelberg, D
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween-20 („Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate“)	Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, USA
Wasser für PCR	Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, USA
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosidase)	Roth, Karlsruhe, D

2.2 Kulturmedien und Antibiotika

2.2.1 Bakterienkulturmedien und Antibiotika

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, D
LB-Medium (Lennox)	Roth, Karlsruhe, D
LB-Agar (für Agarplatten)	15 g Agar in 1 l LB-Medium autoklaviert

Antibiotika wurden dem autoklavierten LB-Medium stets kurz vor Gebrauch in den in Tabelle 2.1 aufgeführten Endkonzentrationen zugesetzt.

Tabelle 2.1: Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration	Hersteller
Carbenicillin	100 μ g/ml	Roth, Karlsruhe, D
Chloramphenicol	34 μ g/ml	Roth, Karlsruhe, D
Kanamycin	50 μ g/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

2.2.2 Zellkulturmedien und Antibiotika

Aminosäuren, nicht essentiell („non essential amino acids“, NEAA)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
DMEM Glutamax („Dulbecco`s modified eagle medium“)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
DMEM ohne Phenolrot	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
Kälberserum, fötal (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D und PAA, Pasching, A
Natriumpyruvat (Na-Pyruvat)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
Pferdeserum	Biochrom, Berlin, D

Tabelle 2.2: Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
Proliferationsmedium für C2C12	15 % (v/v) FCS (Sigma), 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 % Na-Pyruvat, 1 % NEAA in DMEM
Differenzierungsmedium für C2C12	2 % Pferdeserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % NEAA in DMEM
Proliferationsmedium für HSkM	2 % (v/v) FCS (Sigma), 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 % Ultrosor G, 2 % Na-Pyruvat, 1 % NEAA in DMEM
Differenzierungsmedium für HSkM	1 % Penicillin/Streptomycin, 0,4 % Ultrosor G, 1 % NEAA in DMEM
Medium für A7r5	10 % (v/v) FCS (PAA), 1 % Penicillin/Streptomycin in DMEM ohne Phenolrot
Medium für HEK-293	10 % (v/v) FCS (Sigma), 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 % Na-Pyruvat, 1 % NEAA in DMEM

2.3 Komponentensysteme („Kits“)

ECL-Detektionskit („SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate“)	Pierce, Rockford, USA
Mutagenese-Kit (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit)	Stratagene, Amsterdam, NL
QIAGEN Plasmid Midi Kit (zur DNA-Präparation)	Qiagen, Hilden, D
QIAshredder-Kit	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Mini-Kit (zur RNA-Präparation)	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Fibrous Tissue Mini-Kit (zur RNA-Präparation)	Qiagen, Hilden, D
T/A-Klonierungskit (pGEM-T Vector System I)	Promega, Madison, USA
Transfektionsreagenz (FuGENE 6)	Roche, Mannheim, D
Wizard <i>Plus</i> SV Minipreps DNA Purification System (zur DNA-Präparation)	Promega, Madison, USA
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen)	Promega, Madison, USA

2.4 Plasmide und Primer

2.4.1 Plasmide

Die meisten der verwendeten Plasmide sind modifizierte, käuflich erworbene Standardplasmide. Herkunft und Art der Veränderung sind im Folgenden kurz beschrieben. Die Vektorkarten befinden sich im Anhang der Arbeit.

2.4.1.1 pET23aT7

Für Proteine oder Proteinfragmente, die rekombinant in Bakterien exprimiert werden sollten, wurde ein auf dem pET23a-Plasmid (Novagen) basierender Vektor mit einer veränderten Klonierungskassette verwendet. Als Restriktionsschnittstellen für die Klonierung wurden die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Mlu I* (5'-Ende) und *Sal I* (3'-Ende) genutzt. Zum immunologischen Nachweis besitzt dieser Vektor am N-Terminus des exprimierten Proteins einen sogenannten T7-Tag mit der Aminosäuresequenz MASMTGGQQMGR, die dem Capsidprotein des T7-Phagen entstammt und das Epitop des T7-Antikörpers bildet (siehe Tabelle 2.3). Diesem Immuntag voranstehend befindet sich eine Hexahistidinsequenz, über die das Protein gereinigt werden konnte (Kapitel 3.3.1).

2.4.1.2 pET23aEEF

Wie pET23aT7 leitet sich auch pET23aEEF von dem pET23a-Plasmid der Firma Novagen ab und wurde ebenfalls zur Expression von rekombinanten Proteinen und Proteinfragmenten in Bakterien verwendet. Zur Klonierung wurden die gleichen Restriktionsschnittstellen genutzt. Der immunologische Nachweis erfolgte über den am C-Terminus des exprimierten Proteins angehängten EEF-Tag mit der Aminosäuresequenz Glutamat, Glutamat und Phenylalanin, der durch den Antikörper YL $\frac{1}{2}$ erkannt wurde (Tabelle 2.3). N-terminal vom Immuntag befindet sich eine Hexahistidinsequenz, über die die Aufreinigung des Proteins erfolgen konnte (siehe Kapitel 3.3.1).

2.4.1.3 pMypG

Mit Hilfe des Vektors pMypG kann ein rekombinantes Protein oder Proteinfragment unter der Kontrolle eines sehr aktiven Fragmentes des Myomesin-Promotors in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Die Promotorregion umfasst – vom Transkriptionsstartpunkt aus gerechnet – die Basenpaare -569 bis +122 des Myomesingens (Steiner, 1997). Das exprimierte Protein stellt ein Fusionsprotein dar, an dessen C-Terminus EGFP („enhanced green fluorescent protein“) gekoppelt ist. Die EGFP-Sequenz im Vektor pMypG stammt aus dem Vektor pEGFP-N3 der Firma Clontech (Pacholsky, 2003). Das Grundgerüst wird durch den Vektor pCAT3-Enhancer (Promega) gebildet.

2.4.1.4 pEGFP-Cpd

Der Vektor basiert auf dem Vektor pEGFP-C1, der von der Firma Clontech bezogen wurde. Der Ausgangsvektor wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Xho I* und *BamH I* geschnitten, und es wurde eine veränderte Klonierungskassette eingesetzt, die Schnittstellen für *Mlu I* und *Sal I* enthielt. Mit Hilfe des Vektors pEGFP-Cpd kann ein rekombinantes Protein oder Proteinfragment unter der Kontrolle des „immediate early“-Promotors des Zytomegalovirus in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. An den N-Terminus des exprimierten Fusionsproteins ist EGFP gekoppelt.

2.4.1.5 pGEM-T

Der Vektor pGEM-T (Promega) wurde hergestellt, indem der Vektor pGEM-5Zf(+) (Promega) mit *EcoRV* geschnitten und an beide 3'-Enden je ein Thymidin angehängt wurde. Er wird verwendet, um DNA-Fragmente, die mit Taq-Polymerase amplifiziert wurden und dadurch 3'-dA-Überhänge besitzen, zu klonieren und zu transformieren (Kapitel 3.1.6). Im Vektor flankieren T7- und SP6-RNA-Polymerase-Promotoren die Klonierungskassette sowie ein β -Galaktosidasegen. Durch Insertion eines DNA-Fragmentes wird das β -Galaktosidasegen inaktiviert. Positive Klone können über Blau-Weiß-Selektion auf IPTG- und X-Gal-enthaltenden Agarplatten identifiziert werden.

2.4.1.6 pUC18

Das *E. coli*-Plasmid pUC18 wurde bei der Herstellung kompetenter Zellen verwendet, um die Transformationseffizienz zu untersuchen (Kapitel 3.1.8). Es wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

2.4.2 Primer

Alle Primer einschließlich „Random Hexamer Primer“ wurden von der Firma TIB MolBiol, Berlin, D, bezogen.

2.4.2.1 Klonierungsprimer

Die Schnittstellen der Restriktionendonukleasen *Mlu I* und *Sal I* sind unterstrichen und die Startkodons eingerahmt.

Vorwärtsprimer „TTID1f“:

5'-tttacgcgatgtttaactacgaacgtcc-3'

Vorwärtsprimer „Myot_M116f“:

5'-tttacgcgatggattccaactatcaacag-3'

Vorwärtsprimer „Myot_M185f“:

5'-tttacgcgatggctcgcagattgctagg-3'

Rückwärtsprimer „Myot_228r_Sal“:

5'-ttgtcgacccttactgtgatgtagaac-3'

Rückwärtsprimer „TTID498r“:

5'-ttgtcgacaagttcttcactttcatagag-3'

Vorwärtsprimer „MYOTex1f“:

5'-gtctgtgaggggaaggagatgcctc-3'

Vorwärtsprimer „MYOTgex2af“:

5'-caaggaagagcagaccaagca-3'

Vorwärtsprimer „MYOTex6f“:

5'-cacaactcagaacatgcgcgactg-3'

Rückwärtsprimer „MYOTex4r“:

5'-ggatggctttgcattataggttg-3'

Rückwärtsprimer „MYOTdgex6r“:

5'-ctggcagtcactcaccttac-3'

Vorwärtsprimer „MyotInt4f“ (Maus):

5'-tttacgcgtgacctacgaggagaagatgg-3'

Rückwärtsprimer „MyotInt9r“ (Maus):

5'-ttgtcgacgttcttcactttcgtagag-3'

2.4.2.2 Mutagenese-Primer

Mutationen sind **fettgedruckt**.

Vorwärtsprimer „MyotS_t163g_c165g_f“:

5'-gagcaaagattttctgcccgcgtcaaacactgagctctcac-3'

Rückwärtsprimer „MyotS_t163g_c165g_r“:

5'-gtgagagctcagtggtgaccgggcagaaaatctttgctc-3'

Vorwärtsprimer „MyotS_t274g_c276g_f“:

5'-caaccacctataaccaggcccagccagcttcctc-3'

Rückwärtsprimer „MyotS_t274g_c276g_r“:

5'-gaggaagctggctggcgccctggttataggtggtg-3'

Vorwärtsprimer „MyotS_a433g_f“:

5'-gctaagccataccaagagctcctgatcatgaaatac-3'

Rückwärtsprimer „MyotS_a433g_r“:

5'-gtatttcgatcaggagctcttggtatgggcttagc-3'

Vorwärtsprimer „MyotS_a106g_f“:

5'-gcttctctagccagaccgaacagttcttcattatc-3'

Rückwärtsprimer „MyotS_a106g_r“:

5'-gataatggaagactgttcggtctggcttagagaagc-3'

2.5 Enzyme

2.5.1 Restriktionsendonukleasen

Für die Reaktionen mit Restriktionsendonukleasen wurden die von den Firmen mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Bei gleichzeitiger DNA-Spaltung durch zwei Enzyme (Doppelrestriktion) wurden die jeweils empfohlenen Puffer eingesetzt.

<i>ApaI</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>BsaHI</i> = <i>HinI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, D
<i>HincII</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, D
<i>MluI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, D
<i>NdeI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, D
<i>SacI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, D
<i>SalI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.5.2 Andere Enzyme

DNase (RNase-freies DNase Set)	Qiagen, Hilden, D
Lysozym	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
MAPK1 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1)	Invitrogen, Karlsruhe, D
M-MLV Reverse Transkriptase (RNase H minus, Point Mutant)	Promega, Madison, USA
<i>Pfu</i> -Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase)	Invitrogen, Karlsruhe, D
PKC α (Proteinkinase C α)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Proteinase K	Roche, Mannheim, D
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
<i>Taq</i> -Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

2.6 Bakterienstämme, Zelllinien und Gewebe

2.6.1 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden in dieser Arbeit zur DNA-Klonierung, Mutagenese bzw. Expression rekombinanter Proteine eingesetzt.

2.6.1.1 *E. coli* JM109 (DNA-Klonierung)

Genotyp: e14⁻(McrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) supE44 relA1 Δ (lacproAB) [F' traD36 proAB lacI^qZ Δ M15]

(Stratagene, Amsterdam, NL)

2.6.1.2 *E. coli* XL1-blue (Mutagenese)

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

(Stratagene, Amsterdam, NL)

2.6.1.3 *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus(DE3)-RP (Proteinexpression)

Genotyp: B F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r]

(Stratagene, Amsterdam, NL)

2.6.1.4 *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Proteinexpression)

Genotyp: F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3) [pLysS Cam^r]^a

(Novagen, Merck, Darmstadt, D)

2.6.2 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien zur Herstellung von Proteinextrakten und bei transienten Transfektionen verwendet.

2.6.2.1 Humane Skelettmuskelzellen (HSkM-Zellen)

Die humanen Skelettmuskelzellen Herkunft stammten von adulten Satellitenzellen ab, die nach einer Rückenmuskelbiopsie isoliert und kultiviert wurden (van der Ven et al., 1992). Üblicherweise wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:6 passagiert.

2.6.2.2 C2C12-Zellen

Die Skelettmuskelfibroblastenzelllinie C2C12 stammt aus dem Beinmuskel einer Maus (*Mus musculus*). Die Passagierung erfolgte in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5. (European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, #91031101)

2.6.2.3 A7r5-Zellen

A7r5-Zellen sind Glattmuskelzellen, die aus der Aorta von Rattenembryonen (*Rattus norvegicus*) gewonnen wurden (Firulli et al., 1998). Sie wurden in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:3 passagiert. (American Type Culture Collection, ATCC, CRL-1444)

2.6.2.4 HEK-293-Zellen

Die epitheliale Zelllinie HEK-293 („Human embryonic kidney cells“) entstammt einer humanen Niere. Die Umsetzung erfolgte in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:4.

2.6.3 Gewebe und isolierte Kardiomyozyten

Die verschiedenen Gewebe der Maus (*Mus musculus*, Stamm SV129 BL/6) sowie die Gewebe der Ratte (*Rattus norvegicus*) wurden von Julia Rübsteck präpariert. Die Muskelgewebe des Frosches (*Xenopus laevis*) wurden von Hanne Bock (Institut für Physiologie II, Universität Bonn) vorbereitet. Die Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Gewebe in Einbettmedium eingefroren. Die Gewebe wurden entweder für Western Blot-Analysen zu Proteinextrakten weiterverarbeitet (Kapitel 3.3.3), oder es wurden Gefrierschnitte für Immunfluoreszenzstudien angefertigt (Kapitel 3.4.1).

2.7 Antikörper und Blockierungsseren

2.7.1 Primäre Antikörper

In Western Blot-Analysen, indirekten Immunfluoreszenzstudien und Immunpräzipitationsversuchen wurden die in Tabelle 2.3 aufgeführten primären Antikörper verwendet.

2.7.2 Sekundäre Antikörper

In Western Blot-Analysen, indirekten Immunfluoreszenzstudien und Immunpräzipitationsversuchen wurden die in Tabelle 2.4 aufgeführten sekundären Antikörper verwendet.

2.7.3 Blockierungsseren

Ziegenserum (NGS)
Esenserum (NDS)

Jackson (Dianova), West Grove, USA
Jackson (Dianova), West Grove, USA

Tabelle 2.3: Primäre Antikörper

Name	Epitop	Donor, Typ	Herkunft
Myotilin (gesamt)	Myotilin (Gesamtprotein)	Meerschweinchen	H. Herrmann, DKFZ, Heidelberg, D
Myotilin (Exon 3/4)	Myotilin (Aminosäuren 120-211)	Meerschweinchen	H. Herrmann, DKFZ, Heidelberg, D
Myotilin (Exon 2)	Myotilin (Aminosäuren 1-119)	Meerschweinchen	H. Herrmann, DKFZ, Heidelberg, D
Myotilin (Exon 6)	Myotilin (Aminosäuren 229-272)	Meerschweinchen	H. Herrmann, DKFZ, Heidelberg, D
9F4.5.15	Myotilin (Aminosäuren 80-100)	Maus	O. Carpén, Biomedicum, Helsinki, FIN
T12	Titin Z-Bandenepitop	Maus, IgG1	Fürst et al., 1988
C-11	Pan-Zytokeratin	Maus, IgG1	Sigma-Aldrich, Steinheim, D (#C2931)
Rabbit anti-ZO-1	Humanes ZO-1	Kaninchen	Zymed, Invitrogen, Karlsruhe, D (#61-7300)
Rabbit anti-Occludin	Humanes Occludin	Kaninchen	Zymed, Invitrogen, Karlsruhe, D (#71-1500)
hVin-1	Humanes Vinculin	Maus, IgG1	Sigma-Aldrich, Steinheim, D (#V9131)
Anti- α -Catenin	α -Catenin	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim, D (#C2081)
Anti- β -Catenin	β -Catenin	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim, D (#C2206)
Anti-Pan Cadherin	Pan-Cadherin	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim, D (#C3678)
BM75.2	Pan- α -Aktinin	Maus, IgM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D (#A5044)
Anti-Villin	Humanes Villin	Maus, IgG1	Beckman Coulter, Krefeld, D (#IM0258)
Anti-GFP	GFP	Maus, IgG1	Roche, Mannheim, D (#11 814 460 001)
T7	T7-Immuntag	Maus, IgG2b	Novagen, Merck, Darmstadt, D (#69522)
YL $\frac{1}{2}$	EEF-Immuntag	Ratte	Wehland und Willingham, 1983

Tabelle 2.4: Sekundäre Antikörper

Name	Donor	gegen	Konjugat	Hersteller
GAM-PO	Ziege	Maus	HRPO	Jackson, West Grove, USA (Dianova #115-035-068)
GARat-PO	Ziege	Ratte	HRPO	Jackson, West Grove, USA (Dianova #112-035-143)
DAGP-PO	Esel	Meerschweinchen	HRPO	Jackson, West Grove, USA (Dianova #706-035-148)
DAGP-AP	Esel	Meerschweinchen	AP	Jackson, West Grove, USA (Dianova #706-055-148)
GAM-IgG1-488	Ziege	Maus IgG1	Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, D (#A21121)
GAR-Cy2	Ziege	Kaninchen	Carbocyanin	Jackson, West Grove, USA (Dianova #111-225-045)
DAGP-Cy2	Esel	Meerschweinchen	Carbocyanin	Jackson, West Grove, USA (Dianova #706-225-148)
GAGP-Cy3	Ziege	Meerschweinchen	Indocarbocyanin	Jackson, West Grove, USA (Dianova #106-165-003)
GAM-IgM-Cy3	Ziege	Maus IgM	Indocarbocyanin	Jackson, West Grove, USA (Dianova #115-166-075)
DAM-TXR	Esel	Maus IgG	Texas Red	Jackson, West Grove, USA (Dianova #715-075-151)

2.8 Standards

2.8.1 DNA-Standards

GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
MassRuler DNA Ladder, Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.8.2 Proteinstandards

PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot, D
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.9 Geräte und sonstiges Material

2.9.1 Arbeiten mit Zellkulturen und Bakterien

Einmal-Pipetten	Starlab, Ahrensburg, D
Inkubator für Säugerzellkulturen	Heraeus, Hanau, D
Inkubator für Bakterienplatten	Memmert, Schwabach, D

Kryoröhrchen	TPP, Trasadingen, CH
6-Loch-Platten	TPP, Trasadingen, CH
Pipettierhilfe	PZ HTL, Warschau, PL
Rundbodenröhrchen für Bakterienkulturen	Falcon, BD, Franklin Lakes, USA
Schüttelinkubator (Certomat BS-1)	Sartorius, Göttingen, D
Sterilbank	Heraeus, Hanau, D
Wasserbad	Julabo, Seelbach, D
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturschalen (100 mm x 20 mm)	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturschalen (60 mm x 15 mm)	TPP, Trasadingen, CH
Zellschaber	TPP, Trasadingen, CH

2.9.2 Arbeiten mit Proteinen und DNA

Bradford-Reagenz (Protein Assay)	Bio-Rad, München, D
Chromatographiesäulen „Mini-colums“	Evergreen Scientific, Los Angeles, USA
Combitips für Multipette	Eppendorf, Hamburg, D
DNA-Probenpuffer („6x Loading Dye Solution“)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Drehrad („Mixing Rotor Variospeed“)	Renner, Dannstadt
Dynabeads Protein G	Dynal, Invitrogen, Karlsruhe, D
Elektro-Blot-Gerät (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell)	Bio-Rad, München, D
Entwicklermaschine (Curix 60)	AGFA, Köln, D
Filme (Amersham Hyperfilm ECL, 18 x 24 cm ²)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Filterpapier	Whatman, Schleicher&Schuell, Dassel, D
Geldokumentationsgerät (GelDoc XR)	Bio-Rad Laboratories, München, D
Gelkammer (Mini Protean II, für SDS-PAGE)	Bio-Rad, München, D
Kanülen	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, D
Kapillarspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Küvetten (Halb-Mikro)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
96-Loch-Platten	TPP, Trasadingen, CH
Magnetständer („Magnetic Particle Concentrator“)	Dynal, Invitrogen, Karlsruhe, D
Mikropistill	Eppendorf, Hamburg, D
Mikrowelle	Micromaxx, Medion, Essen, D
Minicycler PTC-150 (für PCR)	MJ Research Inc., Watertown, USA
Netzgerät PowerPac 200	Bio-Rad, München, D
Ni-NTA Agarose Beads	Qiagen, Hilden, D
Nitrozellulosemembran (Protran)	Whatman, Schleicher&Schuell, Dassel, D
Photometer („Cary 50 Scan“)	Varian, Palo Alto, USA
Pipette Multipette	Eppendorf, Hamburg, D
Quarzküvette	Hellma Optik, Jena, D
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Starlab, Ahrensburg, D
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D und Sarstedt, Nümbrecht, D
Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen, D
Spritzen	BD, Franklin Lakes, USA
Ultraschallstab UP100H	Hielscher, Teltow, D
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wipptisch („see-saw rocker SSL4“)	Stuart, Barloworld Scientific, Staffordshire, UK

2.9.3 Radioaktive Arbeiten

Messflaschen für Szintillationszähler
 Phosphormessgerät
 („Cyclone Storage Phosphor Screen“)
 Plexiglasschutz
 Szintillationsflüssigkeit (Opti-Fluor O)
 Szintillationszähler
 („1600 TR Liquid Scintillation Analyzer“)

Roth, Karlsruhe, D
 Packard, Meriden, USA

Scotlab, Anachem, Luton, UK
 Perkin Elmer, Shelton, USA
 Packard, Meriden, USA

2.9.4 Mikroskopie

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)
 Deckgläser (24 x 50 mm)
 Deckgläser (Durchmesser 12 mm)
 Einbettmedium
 Epifluoreszenzmikroskop
 (Eclipse TE-2000-E;
 Objektive:
 Plan Apo 100fach/1,4 Öl, Plan Apo 60fach/1,4 Öl
 Filter:
 UV-2E/C: EX 340-380, DM 400, BA 435-485,
 B-2E/C: EX 465-495, DM 505, BA 515-555,
 G-2E/C: EX 528-553, DM 556, BA 578-633)

Invitrogen, Karlsruhe, D
 Menzel, Braunschweig, D
 Menzel, Braunschweig, D
 Leica, Wetzlar, D
 Nikon, Tokio, J

Hydrophober Stift
 („Liquid Blocker“, Super PAP-Pen)

Science Services, München, D

Immersionsöl
 Kamera am Epifluoreszenzmikroskop
 (1412AM-FW-TE)

Zeiss, Jena, D
 DVC, Austin, USA

Konfokales Laser-Rastermikroskop
 (LSM, „Laser scanning microscope“
 Axiovert 100 M;
 Objektiv: Plan-Apochromat 63fach/1,4 Öl)

Zeiss, Jena, D

Mikroskop (Eclipse TS100)

Nikon, Tokio, J

Mikrotom (CM3050S)

Leica, Wetzlar, D

Objektträger (76 x 26 mm)

Menzel, Braunschweig, D

Phalloidin-CPITC

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

(Coumarin-Phenyl-Isothiocyant)

TOTO-3-Jodid

Invitrogen, Karlsruhe, D

2.9.5 Computer und Software

Computer (TravelMate 290LMi)

Maus

Software

Acer, Taipeh, Taiwan

Logitech, Fremont, USA

Microsoft Windows XP

Microsoft Office 2003

Adobe Acrobat 6.0

Adobe Photoshop CS

BioEdit

Cary WinUV (Photometer)

ImageJ

ImagePro MC 6.0 (Nikon Eclipse TE-2000-E)

LSM510 (Laser Rastermikroskop)

OptiQuant (Detektion von Radioaktivität)

Quantity One 4.6 (GelDoc)

Vector NTI Advance 10

2.9.6 Sonstiges

Desinfektionsmittel Fermacidal D2

Desinfektionsmittel Sterilium

Eismaschine

Feinwaage

Handschuhe (Semperguard, Latex)

Handschuhe (Dermatril, Nitril)

Heizblock

(Dry Block Heating Thermostat Bio TDB-100)

Indikatorklebeband (Stericlin)

Kühl-/Gefrierschrank

Magnetrührer mit Heizplatte (Ikamag RCT)

Parafilm M

pH-Meter

Pinzetten

Pipette (10 µl)

Pipetten

(Labmate L2, L20, L100, L200, L1000, L5000)

Pipettenspitzen

Schüttler (Mini Shaker 3D)

Sterilfilter-Einmalfilter (0,2 µm und 0,45 µm)

Waage

Wasserreinigungsanlage (Milli-QUF Plus)

Zentrifuge Allegra X-15R Centrifuge

(Rotor SX4750A)

Zentrifuge Biofuge fresco (Rotor #3325)

Zentrifuge Biofuge pico (Rotor #3328)

Zentrifuge Labofuge 400R (Rotor #8179)

Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)

IC Products, Minusio, CH

Bode Chemie, Hamburg, D

Ziegra, Isernhagen, D

Denver Instrument, Denver, USA

Semperit, Wien, A

Kächele-Cama Latex, Eichenzell, D

Lab4you, Berlin, D

Vereinigte Papierwarenfabriken,

Feuchtwangen, D

Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, D

IKA-Werke, Staufen, D

American Can Comp., Greenwich, USA

Knick, Berlin, D

Dumont, Montignez, CH

Eppendorf, Hamburg, D

PZ HTL, Warschau, PL

Starlab, Ahrensburg, D

SK Laborbedarf, Würzburg, D

Schleicher & Schuell, Dassel, D

Sartorius, Göttingen, D

Millipore, Billerica, USA

Beckman Coulter, Krefeld, D

Heraeus, Hanau, D

Heraeus, Hanau, D

Heraeus, Hanau, D

TPP, Trasadingen, C

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerasekettenreaktion

(Saiki et al., 1988; Saiki et al., 1985)

Die Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) diente der Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Voraussetzung war, dass die flankierenden Sequenzen der Zielsequenzen bekannt waren, mit denen kurze komplementäre Fragmente mit einer freien 3`-Hydroxylgruppe („Primer“) hybridisieren konnten.

Die Methode bestand aus einer Abfolge dreier Schritte, die bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt wurden. Im ersten Schritt wurden die Doppelstränge der Ziel-DNA durch Erhitzen voneinander getrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt wurde die Temperatur gesenkt, um die Anlagerung („Annealing“) der Primer an die flankierenden Sequenzen zu ermöglichen. Die Anlagerungstemperatur T_A ließ sich mit dem GC- und AT-Gehalt der Primer (ohne Schnittstelle für Restriktionsenzyme) annähernd nach folgender Formel bestimmen:

$$T_A [^{\circ}\text{C}] = 2 \cdot \sum(A+T) + 4 \cdot \sum(G+C)$$

Da die Primer im Überschuss zugegeben wurden, wurde eine Rehybridisierung des DNA-Doppelstrangs praktisch verhindert. Der dritte Schritt der PCR, der bei etwa 72 °C durchgeführt wurde, war die Neu-Synthese von DNA durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (z. B. *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*), die die freien 3`-Hydroxylgruppen der Primer als Ansatzpunkt, alle vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), und Mg^{2+} -Ionen benötigte. Durch mehrfache Wiederholung der drei Schritte wurde das Zielfragment, das zwischen den beiden Primern liegt, exponentiell amplifiziert.

Es wurden 0,1 bis 1 µg DNA als Matrize für die DNA-Amplifikation eingesetzt. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, in denen PCR- H_2O , 10 nmol jedes dNTPs, 20 pmol jedes Primers, 5 µl 10 x Reaktionspuffer und 5 U *Taq*- bzw. 2,5 U *Pfu*-Polymerase sowie bei *Taq*-Polymerase zusätzlich 1,5 mM MgCl_2 enthalten waren. Die Reaktion erfolgte in einem 0,2 ml-Reaktionsgefäß in einem Minicycler, der folgende Schritte ausführte:

1. Denaturierung der DNA: 95 °C, 2 min
2. Denaturierung der DNA: 95 °C, 30-60 sec
3. Anlagerung der Primer: T_A , 1 min
4. Elongation: 74 °C, 1 min/kb bei *Taq*, 2 min/kb bei *Pfu*
5. 30 bis 35fache Wiederholung der Schritte 2 bis 4

6. DNA-Synthese: 74 °C, 10 min
7. Aufbewahrung: 4 °C

Schritt 6 diente der Beendigung unvollständiger Elongationsreaktionen. Zur Kontrolle des Erfolgs der Amplifikation wurde die Größe der DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Kapitel 3.1.2).

3.1.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten (Sambrook et al., 1989)

TAE-Puffer	40 mM	Tris-Azetat
	1 mM	EDTA
	in H ₂ O	

DNA-Fragmente konnten in Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Nukleinsäuren sind wegen ihrer Phosphatreste negativ geladen und wandern daher in einem elektrischen Feld zur Anode. Der Molekularsiebeffekt der Agarose bewirkt, dass große DNA-Fragmente in demselben Zeitraum eine geringere Strecke zurücklegen als kleine Fragmente. Die elektrophoretische Beweglichkeit eines Fragments ist bis zu einer gewissen Grenze umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Zur Ermittlung der Fragmentgrößen wurden DNA-Fragmente mit bekannter Größe (DNA-Größenmarker) als Vergleich auf das Gel aufgetragen. Die DNA wurde mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht, das in die DNA interkalierte. Der Komplex aus Nukleinsäure und Ethidiumbromid wurde bei Anregung mit UV-Licht als rot-orange leuchtende Bande erkennbar und konnte fotografiert oder ausgeschnitten werden (Kapitel 3.1.3).

Zur Herstellung von 1%igen (w/v) Agarosegelen wurde 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach kurzer Abkühlung und Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid wurde die Agaroselösung in eine Gelkammer gegossen und mit einem Kamm versehen, der Taschen zum Auftragen der Proben erzeugte. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Kammer gelegt, und die DNA zusammen mit DNA-Probenpuffer aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 80 bis 150 Volt. Das Ergebnis wurde mit dem Geldokumentationsgerät „GelDoc XR“ dokumentiert.

3.1.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das „Wizard SV Gel and PCR Clean-up System“ der Firma Promega verwendet, das auf dem Prinzip beruht, dass DNA bei hoher Salzkonzentration an eine Silica-Gel-Membran bindet und sich bei niedriger Salzkonzentration wieder von ihr löst.

Zunächst wurde das unter UV-Licht identifizierte DNA-Fragment mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Vermeidung von Beschädigungen der DNA durch

das energiereiche UV-Licht lag das Gel auf einer Glasscheibe, und die Belichtung erfolgte möglichst kurz. Das ausgeschnittene Gelstück mit der enthaltenen DNA wurde gewogen und mit der „Membrane Binding Solution“ (10 µl Puffer pro 10 mg Gel) bei 50-65 °C inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde während der Inkubation alle 2 bis 3 min geschüttelt („Vortex“). Nach vollständiger Auflösung des Gelstücks wurde das Gemisch auf eine Mini-Säule aufgetragen, 1 min bei RT inkubiert und 1 min bei 13000 rpm (Biofuge pico, Rotor #3328) zentrifugiert. Die DNA wurde dadurch an die Silica-Gel-Membran gebunden. Zum Waschen wurden nacheinander 700 µl und 500 µl „Membrane Wash Solution“ auf die Säule aufgetragen und jeweils 1 min bzw. 5 min wie oben zentrifugiert. Anschließend wurde ein weiteres Mal für 1 min zentrifugiert, um Reste des Puffers zu entfernen. Die Säule wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Die Membran wurde 1 min mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser inkubiert, und die DNA durch einminütige Zentrifugation wie oben aus der Säule gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.1.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

(Nathans und Smith, 1975)

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte unter den vom Hersteller der Enzyme angegebenen Bedingungen. Der Reaktionsansatz für die analytische DNA-Spaltung hatte ein Gesamtvolumen von 10 µl und enthielt H₂O, etwa 200 ng DNA, 1 µl 10 x Puffer (bei Puffer „Tango“ 1 oder 2 µl) und je 2 U der Enzyme. Die Spaltung wurde in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß für 30 bis 60 min bei der für die Enzyme optimalen Temperatur (37 °C) durchgeführt. Einige Enzyme benötigten zur Spaltung der DNA BSA, das bei manchen Reaktionspuffern bereits enthalten war. Bei gleichzeitiger Spaltung mit zwei Restriktionsendonukleasen wurde der Reaktionspuffer so gewählt, dass für beide Enzyme möglichst optimale Bedingungen herrschten. Die Zugabe von DNA-Probenpuffer brach die Enzymreaktion ab. Zur Kontrolle des Erfolgs der DNA-Spaltung wurde die Größe der DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Kapitel 3.1.2).

Für die präparative DNA-Spaltung mit anschließender Elution der DNA-Fragmente aus einem Agarosegel wurde das Reaktionsvolumen auf 50 µl erhöht. Pro Ansatz wurden 1 µg PCR-Fragment bzw. 10 µg Plasmid-DNA und 5 U Enzym eingesetzt. Die Inkubation bei 37 °C erfolgte über Nacht.

3.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

(Dugaiczyk et al., 1975)

Zu ligierende DNA-Fragmente und Vektoren wurden mit denselben Restriktionsendonukleasen geschnitten (Kapitel 3.1.4), so dass kohäsive Enden entstanden, die durch die T4-DNA-Ligase verknüpft werden konnten. Vektor und Fragment wurden in

einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:4 eingesetzt. Die einzusetzende Masse konnte mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Masse Insert [ng]} = \frac{\text{Masse Vektor [ng]} \cdot \text{Größe Insert [kb]}}{\text{Größe Vektor [kb]}} \cdot \text{gewünschtes molares Verhältnis}$$

Der Ligationsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl und enthielt H₂O, Vektor-DNA, das zu klonierende DNA-Fragment, 2 µl 10 x Ligase-Puffer (Fermentas) und 2,5 U T4-DNA-Ligase (Fermentas). Die Ligation wurde in einem 0,2 ml-Reaktionsgefäß 10 Stunden bei 16 °C inkubiert. Die Hälfte des Reaktionsansatzes wurde zur Transformation kompetenter Zellen verwendet (Kapitel 3.1.9).

3.1.6 T/A-Klonierung

Mit Hilfe des „pGEM-T Vector System I“-Kit (Promega) konnten PCR-Produkte in den Vektor pGEM-T kloniert werden. Voraussetzung war, dass die PCR-Produkte mit der *Taq*-Polymerase amplifiziert worden waren, die 3'-dA-Überhänge erzeugt. Der Vektor pGEM-T wurde hergestellt, indem der Vektor pGEM-5Zf(+) mit *EcoRV* geschnitten und an beide 3'-Enden je ein Thymidin angehängt wurde. Für die Ligation des PCR-Produktes in den Vektor wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl 50 ng pGEM-T, 5 µl 2x Puffer, PCR-Produkt (Massenberechnung siehe Kapitel 3.1.5), 3 U T4-DNA-Ligase (Promega) und H₂O angesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine Transformation in *E. coli* JM109 (Kapitel 3.1.9), die auf LB-Agarplatten mit Carbenicillin, 2,5 µl 1 M IPTG und 75 µl X-Gal-DMF-Lösung (25 mg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Bei negativen Kolonien war das *lacZ*-Gen des Vektors intakt, so dass die β-Galaktosidase X-Gal in einen blauen Farbstoff (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-Indigo) umwandeln konnte. Positive Klone, bei denen das PCR-Produkt in das *lacZ*-Gen inseriert worden war, waren weiß und konnten zur DNA-Präparation (Kapitel 3.1.10) vorbereitet werden.

3.1.7 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen

(Inoue et al., 1990)

TB-Puffer	10 mM	PIPES
	15 mM	CaCl ₂
	250 mM	KCl
	pH 6,7	
	55 mM	MnCl ₂
	in H ₂ O	
	steril filtriert	

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen wurden Bakterien eines Glycerolstocks auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit fünf Einzelkolonien wurden 250 ml LB-Medium angeimpft und bei 18 °C (bei BL21(DE3)CodonPlus(DE3)-RP

und BL21(DE3)pLysS bei 37 °C) auf einem Schüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von fast 0,6 erreicht wurde. Es folgten eine Inkubation für 10 min auf Eis und eine Zentrifugation für 10 min bei 4500 rpm (Allegra X-15R Centrifuge, Rotor SX4750A) und 4 °C. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem Puffer TB gewaschen, 10 min auf Eis inkubiert und wie vorher zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskaltem Puffer TB aufgenommen. Unter Rühren wurden 1,5 ml DMSO zugefügt. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

3.1.8 Test der Transformationskompetenz von Bakterienzellen

Um die Transformationskompetenz von Bakterienzellen zu testen, wurden 1 pg und 10 pg des Vektors pUC18 in je 50 µl Bakterien transformiert (Kapitel 3.1.9). Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit Carbenicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei einer Anzahl von 100 gewachsenen Einzelkolonien bei 10 pg eingesetzter Plasmid-DNA betrug die Kompetenz $1 \cdot 10^7$ Kolonien/µg Plasmid-DNA.

3.1.9 Transformation von DNA in kompetente Bakterienzellen

Zur Vervielfältigung von Plasmiden bzw. zur Expression von rekombinanten Proteinen und Proteinfragmenten wurde Plasmid-DNA in chemisch-kompetente Zellen transformiert. Dazu wurde die DNA eines Ligationsansatzes oder 1 µg einer Plasmid-DNA-Präparation zu 50-100 µl kompetenten Zellen gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C und eine anschließend Inkubation für 1 min auf Eis. Nach der Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Zellen eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Plasmide enthielten ein Antibiotikumresistenzgen, das während der einstündigen Inkubation exprimiert werden konnte. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm für 1 min (Biofuge pico, Rotor #3328). Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet im Restmedium (ca. 100 µl) resuspendiert. Die Zellen wurden auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und zur Selektion positiv transformierter Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.10 Aufreinigung von Plasmid-DNA

3.1.10.1 „Mini-Präparation“ mit TELT-Puffer

TELT-Puffer	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	62,5 mM	EDTA
	0,4 %	Triton-X-100
	2,5 M	LiCl
	in H ₂ O	

TE-Puffer	10 mM 1 mM in H ₂ O	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA
-----------	--------------------------------------	--------------------------

Die Aufreinigung kleinerer Mengen Plasmid-DNA wurde mittels schneller Lyse in TELT-Puffer, der 1 mg/ml Lysozym enthielt, durchgeführt. Dazu wurden 2-5 ml LB-Medium inklusive entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzel-Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Über-Nacht-Kultur wurde bei 4750 rpm 5 min zentrifugiert (Allegra X-15R Centrifuge, Rotor SX4750A), und das Pellet in 150 µl TELT-Puffer mit Lysozym resuspendiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch zweiminütiges Erhitzen auf 95 °C wurden die freigesetzten bakteriellen Proteine denaturiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 5 min. Die ausgefallenen Proteine und Zellreste wurden von der löslichen Fraktion, die die Plasmid-DNA enthielt, durch Zentrifugieren für 15 min bei 13000 rpm (Biofuge pico, Rotor #3328) und Entfernung des Pellets mit einem Zahnstocher getrennt. Es wurde das 0,8fache Volumen Isopropanol hinzugegeben, wodurch die DNA gefällt wurde. Durch eine fünfminütige Zentrifugation wie im vorherigen Schritt wurde die DNA pelletiert, die anschließend mit dem doppelten Volumen 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen wurde, um Salze und Verunreinigungen zu entfernen. Nach einer weiteren Zentrifugation wie vorher wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl TE-Puffer mit 2 mg/ml RNase-A, die RNA aus der Probe entfernte, aufgenommen. Nach 10 min bei Raumtemperatur und weiteren 10 min bei 65 °C war die DNA RNA-frei und vollständig gelöst. Die aufgereinigten Plasmide wurden zur Kontrolle mit Restriktionsenzymen gespalten. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.1.10.2 „Mini-Präparation“ mit Kit

Sollte die aufgereinigte Plasmid-DNA anschließend sequenziert werden, erfolgte die „Mini-Präparation“ von Plasmid-DNA mit dem „Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification System“ der Firma Promega. Es wurden 2-5 ml LB-Medium inklusive entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzel-Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei 4750 rpm (Allegra X-15R Centrifuge, Rotor SX4750A) pelletiert. Das Pellet wurde in 250 µl „Cell Resuspension Solution“ resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 250 µl „Cell Lysis Suspension“ hinzugegeben, gründlich gemischt und 3 min inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Alkalische Protease zugegeben, gemischt und 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl „Neutralization Solution“ folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge pico, Rotor #3328). Der Überstand wurde in eine Säule transferiert. Alle folgenden Zentrifugationen wurden wie im vorherigen Schritt durchgeführt. Durch Zentrifugation für 1 min wurde die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial gebunden. Es folgten zwei

Zentrifugationen mit 0,75 ml bzw. 0,25 ml „Column Wash Solution“, die dem Waschen der DNA dienen. Um den Waschpuffer restlos zu entfernen, wurde eine weitere Zentrifugation durchgeführt. Zur Elution der DNA wurden 50 µl Nuklease-freies Wasser auf die Säule gegeben und 1 min zentrifugiert. Die aufgereinigten Plasmide wurden zur Kontrolle mit Restriktionsenzymen gespalten und sequenziert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.1.10.3 „Midi-Präparation“

Die „Midi-Präparation“ von Plasmid-DNA erfolgte mit dem „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen. Zur Vervielfältigung der durch Hitzeschock in chemisch-kompetente Zellen transformierten Plasmide wurden 25 ml (für „high-copy“-Plasmide) oder 100 ml (für „low-copy“-Plasmide) LB-Medium inklusive entsprechendem Antibiotikum mit einer Bakterieneinzelkolonie oder mit Bakterien aus einem Glycerolstock angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden bei 4750 rpm und 4 °C für 15 min sedimentiert (Allegra X-15R Centrifuge, Rotor SX4750A). Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Es wurden 4 ml Puffer P2, durch den die Bakterien lysiert wurden, zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 ml Puffer P3 für 15 min auf Eis neutralisiert. Zur Entfernung der Zelltrümmer, Proteine und genomischen DNA erfolgte eine Zentrifugation für 30 min wie oben. Der Überstand wurde nochmals 15 min wie oben zentrifugiert. Eine „QIAGEN-tip 100“-Säule wurde mit 4 ml des Puffers QBT äquilibriert. Nach den Zentrifugationen wurde der Überstand auf die äquilibrierte Säule geladen. Die Plasmid-DNA bindet bei diesem Schritt an das Säulenmaterial. Mit jeweils 10 ml des Puffers QC wurden zwei Waschschriffe durchgeführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert und durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt. Nach einer Zentrifugation für 30 min wie oben wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 ml 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min wie oben zentrifugiert. Nach der Überführung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde ein weiterer Waschschriff mit 70%igem (v/v) Ethanol durchgeführt, auf den eine Zentrifugation für 2 min bei 13000 rpm und 4 °C folgte (Biofuge fresco, Rotor #3325). Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert. Die vollständige Lösung der DNA erfolgte über Nacht bei 4 °C, die langfristige Lagerung bei -20 °C.

3.1.11 DNA-Konzentrationsbestimmung

3.1.11.1 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

(Kaiser und Hogness, 1960)

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀). Bei dieser

Wellenlänge besitzt DNA ein Absorptionsmaximum. 1 ml einer 1:1000 in H₂O oder TE-Puffer verdünnten DNA-Probe wurde in eine Quarzküvette überführt und in einem Photometer vermessen. Die Berechnung der Konzentration mit Hilfe des Computerprogramms „Cary WinUV“ basierte auf der Annahme, dass bei einer Lösung doppelsträngiger DNA mit einer Konzentration von 50 µg/ml die Extinktion bei 1,0 liegt. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt, konnte der Reinheitsgrad der DNA-Lösung mit Hilfe des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt werden. Bei reinen DNA-Lösungen liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0.

3.1.11.2 DNA-Konzentrationsmessung mit Hilfe des „MassRuler DNA Ladder, Mix“

Die DNA-Konzentrationsmessung mit Hilfe des Markers „MassRuler DNA Ladder, Mix“ (Fermentas) erfolgte durch Vergleich der Bandenstärken der zu untersuchenden DNA und des Markers auf einem Agarosegel mit Hilfe der Software „Quantity One 4.6“ und den Angaben der Firma Fermentas.

3.1.12 Sequenzierung

(Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierung wurde im Servicelabor der Agowa GmbH, Berlin, durchgeführt. In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 800 ng Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl zum Sequenzieren geschickt. Die Sequenzierungsprimer wurden von der Firma gestellt.

Die Sequenzierung der pET23aT7-Plasmide mit mutagenisierten MyotS-Inserts erfolgte mit dem Sequenzierungsprimer T7prom (Sequenz: TAATACGACTCACTATAGGG), der komplementär zur T7-Promotorsequenz war. Die Sequenzierung ergab, dass in allen Fällen die Mutagenese der MyotS-Inserts erfolgreich war.

3.1.13 Mutagenese

Zur Erzeugung gezielter Punktmutationen in DNA-Sequenzen wurde das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene verwendet. Dazu wurden Plasmid-DNA mit dem zu mutierenden Genkonstrukt und Primer mit der oder den gewünschten Punktmutation(en) benötigt. Die Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms „QuikChange Primer Design“ auf der Internetseite der Firma Stratagene erstellt. Wenn möglich entstand durch die Mutation eine neue Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease, um bereits ohne Sequenzierung positive Klone zu erkennen. Zunächst wurde in einem 0,2 ml-Reaktionsgefäß eine PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt, in dem 5 µl 10x Reaktionspuffer, 50 ng Plasmid-DNA, jeweils 125 ng Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 1 µl dNTP-Mix, H₂O sowie 2,5 U PfuUltra HF DNA-Polymerase enthalten waren. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

1. Denaturierung der DNA: 95 °C, 30 sec

2. Denaturierung der DNA: 95 °C, 30 sec
3. Anlagerung der Primer: 55 °C, 1min
4. Elongation: 68 °C, 1 min pro 1 kb Plasmidgröße
5. 15fache Wiederholung der Schritte 2 bis 4

Zur Abkühlung auf eine Temperatur von ≤ 37 °C wurde das Reaktionsgefäß 2 min auf Eis gestellt. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit 10 U *Dpn I* bei 37 °C. Das Restriktionsenzym *Dpn I* degradierte methylierte Ausgangsplasmid-DNA, während die neusynthetisierte unmethylierte Plasmid-DNA mit der gewünschten Mutation nicht abgebaut wurde. Voraussetzung war, dass die Ausgangsplasmid-DNA aus einem *dam*⁺-*E. coli*-Stamm isoliert worden war. Das Protokoll für die Transformation wich von dem in Kapitel 3.1.9 beschriebenen wie folgt ab. 1 µl der behandelten DNA wurde zu 50 µl *E. coli* XL1-Blue in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben, 30 min auf Eis und 50 sec bei 42 °C inkubiert. Die transformierten Zellen wurden 2 min auf Eis abgekühlt und mit 500 µl LB-Medium eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Jeweils die Hälfte des Ansatzes wurde auf eine Agarplatte mit Carbenicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus mehreren der gewachsenen Kolonien wurden Mini-DNA-Präparationen durchgeführt (Kapitel 3.1.10.2), deren Sequenzen durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (Kapitel 3.1.4) und Sequenzierung (Kapitel 3.1.12) auf erfolgreiche Mutagenese überprüft wurden.

3.1.14 Herstellung von Glyzerolbakterienkulturen

Zur langfristigen Lagerung von transformierten Bakterien wurde eine Glyzerolkultur hergestellt. Dazu wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt, bei der 4 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit einer Einzelbakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttler inkubiert wurden. 850 µl dieser Vorkultur wurden mit 150 µl Glyzerol in Kryoröhrchen gut vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zur erneuten Verwendung einer Glyzerolkultur wurde mit einer Pipettenspitze ein wenig aus dem Kryoröhrchen gekratzt und in LB-Medium inklusive Antibiotika angezogen.

3.1.15 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Mausgeweben erfolgte mit Hilfe des „RNeasy Mini-Kit“ oder des „RNeasy Fibrous Tissue Mini-Kit“. Zunächst wurden bis zu 30 mg Mausgewebe mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff zu Pulver zermahlen und nach Herstellerangaben in RLT-Puffer inklusive β -Mercaptoethanol homogenisiert.

Beim „RNeasy Mini-Kit“ wurde das Lysat 3 min bei 13000 rpm (Biofuge pico, Rotor #3328) zentrifugiert. Zum Überstand wurde das gleiche Volumen 70 %iges (v/v) Ethanol gegeben, alles auf eine „RNeasy Mini Spin Column“ gegeben und 15 sec bei 11000 rpm zentrifugiert.

Mit 700 µl Puffer RW1 und erneuter Zentrifugation wie vorher wurde die Säule gewaschen. Anschließend wurden zweimal je 500 µl Puffer RPE auf die Säule gegeben und 15 s bzw. 2 min zentrifugiert. Mit 30 µl RNase-freiem Wasser wurde die RNA durch einminütige Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß eluiert.

Beim „RNeasy Fibrous Tissue Mini-Kit“ wurden durch Zugabe von Proteinase K gefolgt von einer Inkubation bei 55 °C für 10 min sowie einer dreiminütigen Zentrifugation bei 10000 rpm (Biofuge pico, Rotor #3328) Proteine abgebaut. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5fachem Volumen 96 %igem (v/v) Ethanol versetzt und durch eine „RNeasy Mini Spin Column“ zentrifugiert (15 sec wie oben). Es wurden 350 µl Puffer RW1 auf die Säule gegeben, die erneut wie im vorherigen Schritt zentrifugiert wurde. Mit 80 µl Puffer RDD mit DNase I (aus „RNase-freie DNase“-Set) wurde die DNA auf der Säulenmembran während einer 15minütigen Inkubation aus der Probe entfernt. Nach Zugabe von 350 µl Puffer RW1 folgte erneut eine Zentrifugation wie vorher. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit zweimal 500 µl Puffer RPE 15 sec und 2 min zentrifugiert. Nach diesen Waschschrritten wurde die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser durch einminütige Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß eluiert.

3.2 Zellkulturen

3.2.1 Auftauen, Passagieren und Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden zur langfristigen Lagerung in Kryoröhrchen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem 37 °C warmen Wasserbad. Die aufgetauten Zellen wurden mit 10 ml Medium vermischt und 5 min bei 1000 rpm (Labofuge 400R, Rotor #8179) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem Medium aufgelöst. Jeweils die Hälfte der Zellsuspension wurde in eine Kulturschale mit einem Durchmesser von 6 cm überführt, die 5 ml Medium enthielt. Die Prozedur sollte zügig vonstatten gehen, um das Toxid DMSO möglichst schnell zu verdünnen.

Die Haltung der Zellen erfolgte als Adhäsionskultur in Kulturschalen oder -flaschen mit Gasaustauschkappen mit unterschiedlich großen Grundflächen. Zum optimalen Wachstum wurden die Zellen in Inkubatoren bei einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO₂ und in mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre in dem Medium DMEM („Dulbecco's modified eagle medium“) kultiviert, das weitere Zusätze (siehe Tabelle 2.2) enthielt.

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte unter einer Sterilbank. Die benötigten Lösungen und Zellkulturmedien wurden auf 37 °C vorgewärmt. Es wurden autoklavierte Glasgefäße und sterile Plastikpipetten verwendet.

Bei Erreichen von 70-100 % Konfluenz (abhängig von der Zelllinie) wurde das Medium in den Kulturflaschen oder -schalen entfernt. Die Zellen wurden mit sterilem PBS mit 0,5 mM EDTA gewaschen, um tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Das EDTA band Kalzium, das bei der Zelladhäsion eine Rolle spielte. Anschließend wurden die Zellen in einer 0,1 %igen Trypsin-PBS-Lösung einige Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Enzym Trypsin spaltete die Verbindungen der Zellen untereinander und zum Boden, wodurch die Zellen in Suspension gebracht wurden. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurde frisches Medium zu den Zellen gegeben. Der gewünschte Anteil der Zellsuspension wurde in neue Kulturflaschen oder -schalen mit frischem Medium überführt.

Zum Einfrieren wurde 1 ml der Zellsuspension in 10 ml Medium wie beim Auftauen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und das Zellpellet in 1 ml 10 % (v/v) DMSO in FCS resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt, das zunächst für einen Tag bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren wurde.

3.2.2 Myogene Differenzierung von C2C12-Zellen

Die Entwicklung der Myoblasten zu Myofibrillen wurde bei 100 % Konfluenz durch den Austausch des Proliferationsmediums zu Differenzierungsmedium (siehe Tabelle 2.2) erreicht. Die ersten Myotuben waren nach zwei bis drei Tagen und teils kontraktile Myofibrillen nach vier bis sieben Tagen zu beobachten. Alle zwei Tage wurde das Medium zur Hälfte ausgetauscht.

3.2.3 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA

Bei einer Transfektion wird fremde DNA in eine eukaryotische Zelle eingeführt. Die Transfektion von HEK-293-, A7r5- und C2C12-Zellen mit Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des „FuGENE 6“-Reagenzes (Roche) lipidvermittelt durchgeführt. Das Multikomponentenreagenz bildete mit der DNA einen Komplex, der in die Zelle transportiert wurde.

Die für eine Transfektion bestimmten Zellen wurden in die Vertiefungen einer 6-Loch-Platte ausgesät, auf deren Boden sterile runde Deckgläser (Durchmesser 12 mm) lagen. Bei Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen folgendermaßen transfiziert. Bei HEK-293- und A7r5-Zellen wurden 3 µl bei C2C12-Zellen 4 µl FuGENE-Reagenz mit serumfreiem DMEM auf 100 µl ergänzt und 5 min inkubiert. Dieser Mischung wurde 1-1,5 µg Plasmid-DNA hinzugefügt, vorsichtig gemischt und eine Stunde inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach Inkubation von 24–96 Stunden wurden die transfizierten Zellen für eine Immunfluoreszenzfärbung (Kapitel 3.4) vorbereitet. Die Transfektionseffizienz lag bei etwa 5-10 %.

3.3 Proteinchemische und immunologische Methoden

3.3.1 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden die zugehörigen DNA-Fragmente in einen der beiden pET-Vektoren (Kapitel 2.4.1) kloniert und in Bakterien des Stammes *E. coli* BL21cp oder BL21pLysS (Kapitel 2.6.1) transformiert. Die pET-Vektoren haben Vorteile bei der Expression zytotoxischer Proteinfragmente und erreichen eine hohe Ausbeute (Novagen, 2003). Von einer transformierten Bakterienkolonie einer Agarplatte oder einer Glyzerolkultur wurde eine Vorkultur in 3 ml LB-Medium mit Carbenicillin und Chloramphenicol angesetzt und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C geschüttelt.

Die Vorkultur wurde am nächsten Tag entweder zur Mini-Expressionsanalyse oder zur präparativen Proteinexpression eingesetzt.

3.3.1.1 Mini-Expressionsanalyse

5 x SDS-PAGE-Probenpuffer	5 mM	EDTA
	60 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	30 % (v/v)	Glyzerin
	15 % (w/v)	SDS
	7,5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	in H ₂ O	

Zur Kontrolle der Expression des rekombinanten Proteins wurde eine Mini-Expressionsanalyse durchgeführt. Dazu wurde 1 ml der Vorkultur in 4 ml frischem LB-Medium mit Carbenicillin und Chloramphenicol verdünnt und eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Vor der Induktion der Expression mit 1 µl 1 M IPTG wurden 500 µl der Kultur als Negativkontrolle in ein Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (5 min, 6000 rpm, Biofuge pico, Rotor #3328), und das Pellet in 50 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die verbliebene Kultur inklusive IPTG wurde weitere drei Stunden wie oben geschüttelt, bevor weitere 500 µl als Positivkontrolle entnommen und wie die Negativkontrolle präpariert wurden. 3 µl der Kontrollen wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Kapitel 3.3.6). Bei erfolgreicher Expression wurde eine Glyzerolkultur (Kapitel 3.1.14) hergestellt.

3.3.1.2 Präparative Proteinexpression

Für eine präparative Proteinexpression wurden 1,5 ml einer Vorkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 150 ml LB-Medium inklusive Carbenicillin und Chloramphenicol verdünnt und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert bis eine optische Dichte zwischen 0,5 und 0,8 erreicht wurde (nach etwa drei Stunden). Die Expression wurde mit 150 µl 1 M IPTG

induziert. Es folgte eine dreistündige Inkubation bei 30 °C oder Raumtemperatur und 200 rpm. Wie bei der Mini-Expressionsanalyse wurden vor und nach der Induktion Kontrollen entnommen und wie dort behandelt. Die Bakterienkultur wurde bei 4 °C und 4750 rpm (Allegra X-15R Centrifuge, Rotor SX4750A) für 10 min zentrifugiert, und das Pellet bis zur Proteinreinigung bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Reinigung rekombinanter Proteine

Imidazol-Lysepuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
	in H ₂ O pH 8,0	
Imidazol-Waschpuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
	in H ₂ O pH 8,0	
Imidazol-Elutionspuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
	in H ₂ O pH 8,0	

Zur Reinigung rekombinanter Proteine mit einem Hexahistidintag wurden Nickel-NTA-Agarosekügelchen der Firma Qiagen verwendet. Die durch NTA immobilisierten Nickelionen konnten den Hexahistidintag binden (Qiagen, 2003), wodurch die Proteine von Interesse von den bakteriellen Proteinen getrennt werden konnten. Dazu wurde zunächst das eingefrorene Pellet einer großen Expressionskultur auf Eis aufgetaut, in 4 ml kaltem Imidazol-Lysepuffer mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde mehrfach mit Ultraschall behandelt und bei 4 °C und 4750 rpm für 45 min zentrifugiert (Allegra X-15R Centrifuge, Rotor SX4750A). Jeweils 20 µl des Überstandes und des Pellets wurden mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese präpariert. Der restliche Überstand wurde über Nacht mit 0,5 ml Nickel-NTA-Agarosesuspension bei 4 °C auf einem Wipptisch inkubiert. Anschließend wurden die Agarosekügelchen mit dem gebundenen Protein 3 min bei 4 °C und 1500 rpm zentrifugiert (Allegra X-15R Centrifuge, Rotor SX4750A). Der Überstand wurde verworfen, und die Kügelchen mit kaltem Imidazol-Waschpuffer zweimal gewaschen, wie im vorherigen Schritt abzentrifugiert und in eine mit Imidazol-Waschpuffer äquilibrierte Säule gefüllt. Die Elution der Proteine erfolgte mit fünfmal 200 µl Imidazol-Elutionspuffer. Die fünf Fraktionen wurden in Reaktionsgefäßen

aufgefangen. 1 μ l jeder Fraktion wurde auf eine Nitrozellulosemembran getropft, die getrocknet und mit Ponceau gefärbt wurde, um die Proteinkonzentration der Fraktionen vergleichen zu können. Je 20 μ l der Fraktionen wurden für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese vorbereitet, durch die der Erfolg der Reinigung analysiert werden konnte.

3.3.3 Präparation von Proteinextrakten aus Zellkulturen und Geweben

3.3.3.1 Präparation von fraktionierten Proteinextrakten aus Zellkulturen mit Triton-Lysepuffer

2x Triton-Lysepuffer	40 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	276 mM	NaCl
	10 % (v/v)	Glyzerol
	4 mM	EDTA
	2 % (v/v)	Triton-X-100
	10 mM	DTT
	in H ₂ O	
PBS	137 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	8 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	in H ₂ O	
	pH 7,4	

Zur Präparation von fraktionierten Proteinextrakten aus Zellkulturen mit Triton-Lysepuffer wurde eine Kulturschale (100 mm Durchmesser) mit C2C12-Zellen auf Eis gestellt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. In 10 ml PBS mit Proteaseinhibitoren („Complete“) und 500 μ M Na₃VO₄ wurden die Zellen mit einem Gummischaber abgeschabt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 2 min bei 5000 rpm (Labofuge 400R, Rotor #8179) und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet zur Lyse der Zellmembran in 100 μ l Triton-Lysepuffer inklusive Proteaseinhibitoren, 100 mM KCl und 500 μ M Na₃VO₄ resuspendiert. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 20 min bei 13000 rpm (Biofuge fresco, Rotor #3325) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und stellte die lösliche Fraktion der Proteinextrakte dar. Das Pellet wurde in 100 μ l Triton-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren, 100 mM KCl und 500 μ M Na₃VO₄ aufgenommen und bildete die unlösliche Fraktion. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Für Kinaseassays wurde die lösliche Fraktion als Kinasequelle verwendet.

3.3.3.2 Präparation von Proteinextrakten aus Geweben mit Triton-Lysepuffer

Zur Präparation von Proteinextrakten aus Geweben mit Triton-Lysepuffer wurden Mausgewebe in tiefgefrorenem Zustand in flüssigem Stickstoff mit Hilfe von Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zermahlen. Das Pulver wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 30 min mit Triton-Lysepuffer inklusive Proteaseinhibitoren („Complete“), 100 mM KCl und 500 μ M Na_3VO_4 auf Eis inkubiert. Um Gewebeklumpen aufzulösen wurden ein Mikropistill und ein Ultraschallstab verwendet. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei -80 °C. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde SDS-Probenpuffer hinzugegeben, und die Extrakte wurden sonifiziert und 3 min bei 95 °C inkubiert.

3.3.3.3 Präparation von Proteinextrakten aus Geweben mit RIPA-Lysepuffer

2x RIPA-Lysepuffer	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	300 mM	NaCl
	1 % (w/v)	Natrium-Desoxycholat
	2 % (v/v)	Triton-X-100
	10 mM	EDTA, pH 8,0
	in H_2O	

Zur Präparation von Proteinextrakten aus Geweben mit RIPA-Lysepuffer wurden Mausgewebe in tiefgefrorenem Zustand in flüssigem Stickstoff mit Hilfe von Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zermahlen. Das Pulver wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 15 min mit RIPA-Lysepuffer inklusive Proteaseinhibitoren („Complete“) und 1 % (w/v) SDS auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge fresco, Rotor #3325) und 4 °C für 20 min. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und stellte die lösliche Fraktion der Proteinextrakte dar. Das Pellet wurde in RIPA-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren und 1 % (w/v) SDS aufgenommen und bildete die unlösliche Fraktion. Um Gewebeklumpen aufzulösen wurden ein Mikropistill und ein Ultraschallstab verwendet. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei -80 °C. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde SDS-Probenpuffer hinzugegeben, und die Extrakte wurden sonifiziert und 3 min bei 95 °C inkubiert.

3.3.3.4 Präparation von Proteinextrakten aus Geweben mit SDS-Probenpuffer

Zur Präparation von Proteinextrakten mit SDS-Probenpuffer wurden Maus-, Ratten- oder Froschgewebe in tiefgefrorenem Zustand in flüssigem Stickstoff mit Hilfe von Mörser und Pistill pulverisiert. Das Pulver wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und in auf 65 °C vorgewärmten 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Es folgte eine 15minütige Inkubation bei 65 °C. Anschließend wurden die Proben mehrfach sonifiziert und 20 min bei 13000 rpm (Biofuge pico, Rotor #3328) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

(Bradford, 1976)

Das Prinzip der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford beruht auf der Bildung von Komplexen des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit kationischen und hydrophoben Seitenketten der Proteine in saurer Lösung sowie der daraus resultierenden Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 470 auf 595 nm.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurde ein Bradford-Assay mit dem *Protein Assay Kit* der Firma Biorad durchgeführt. Die zu messenden Proben wurden 1:100 bis 1:1000 in PBS verdünnt. Von jeder Probe wurden drei Ansätze mit je 50 µl in die Löcher einer 96-Loch-Platte pipettiert. Zur Erstellung einer Standardgeraden wurden gleichzeitig γ -Globulin-PBS-Lösungen mit Konzentrationen von 0 bis 200 µg/ml ebenfalls mit je drei Ansätzen aufgetragen. 200 µl der 1:4-verdünnten Lösung des *Protein Assay Kit* wurden in jedes Loch hinzugegeben und die Platte 5 min inkubiert. Mit einem ELISA-Reader wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Absorption war proportional zur Proteinkonzentration, die mit Hilfe der Standardgeraden berechnet werden konnte.

3.3.5 *In vitro*-Phosphorylierung gereinigter rekombinanter Proteine

5x MAP-Kinasepuffer	250 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	10 mM	DTT
	50 mM	MgCl ₂
	2,5 mM	Na ₃ VO ₄
	0,5 mM	ATP
	1,25 µg/ml in H ₂ O	Pepstatin A
5x PKA-Kinasepuffer	100 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	25 mM	DTT
	25 mM	MgCl ₂
	2,5 mM	CaCl ₂
	2,5 mM	Na ₃ VO ₄
	0,5 mM	ATP
	1,25 µg/ml	Pepstatin A
	0,05 mM in H ₂ O	cAMP
5x PKC-Kinasepuffer	100 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	25 mM	DTT
	50 mM	MgCl ₂
	2 mM	CaCl ₂
	2,5 mM	Na ₃ VO ₄
	0,5 mM	ATP
	1,25 µg/ml	Pepstatin A
	0,4 mg/ml	Phosphatidyl-Serin
	20 µg/ml	PMA

Für *in vitro*-Phosphorylierungen wurden 5 µg rekombinantes Proteinfragment (MyotS-Wildtyp und –Mutanten) und rekombinante Kinase (21 ng MAPK1, 37 ng PKA oder 11 ng PKCα) oder 20 µg Triton-Proteinextrakt von 8 Tage differenzierten C2C12-Zellen als Kinasequelle eingesetzt. Proteinfragment und Kinase bzw. Proteinextrakt wurden mit entsprechendem Kinasepuffer, Proteaseinhibitoren („Complete“) und 1 µCi [γ - 33 P]ATP in einem Gesamtvolumen von 25 µl 30 bis 45 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und anschließender Denaturierung (95 °C, 2 min) gestoppt. Nach Auftrennung der Proben durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde ein Semidry-Western Blot durchgeführt. Die Nitrozellulosemembranen wurden getrocknet, und der Größenmarker mit einer Pipettenspitze und [γ - 33 P]ATP markiert. Die Membranen wurden 20 bis 60 Stunden autoradiographiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Phosphormessgerätes und der Software „OptiQuant“.

3.3.6 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970)

4 x Sammelgelpuffer	0,5 M 0,8 % (w/v) in H ₂ O pH 6,8	Tris SDS
4 x Trenngelpuffer	1,5 M 0,8 % (w/v) in H ₂ O pH 8,8	Tris SDS
SDS-PAGE-Sammelgel (3 %)	0,16 ml 0,5 ml 2,5 µl 20 µl 1,34 ml	40 % Acrylamid Rotiphorese Gel 40 (19:1) Sammelgelpuffer TEMED 10 % (w/v) APS H ₂ O
SDS-PAGE-Trenngel (12 %)	1,5 ml 1,25 ml 8 µl 30 µl 2,25 ml	40 % Acrylamid Rotiphorese Gel 40 (37,5:1) Trenngelpuffer TEMED 10 % (w/v) APS H ₂ O
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM 192 mM 0,1 % (w/v) in H ₂ O	Tris Glyzin SDS

Eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das ionische Detergenz SDS (Natrium-/„Sodium“-Dodecylsulfat), lagert sich an die Aminosäurereste der Proteine an und zerstört alle nichtkovalenten Bindungen. Durch SDS werden die Proteine also denaturiert und stark negativ geladen, da die Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt. Die Wanderungsstrecke eines Proteins im Gel wird durch sein Molekulargewicht und durch die Porengröße des Gels bestimmt, die wiederum von der Acrylamidkonzentration abhängig ist.

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem, in dem die Proteine zunächst in einem großporigen Sammelgel bei niedrigem pH fokussiert und anschließend in einem hochprozentigen Trenngel bei hohem pH aufgetrennt wurden. Sammel- und Trenngele wurden nach den Angaben in (Sambrook et al., 1989) aus den Komponenten Acrylamid/Bisacrylamid, SDS, Tris, APS, TEMED und H₂O hergestellt. Die Polymerisation des Gels verlief radikalisch und wurde durch das Initiator-Redoxsystem aus APS und TEMED gestartet. Durch Variation der Konzentration von Acrylamid/Bisacrylamid in den Trenngelen konnte eine optimale Auftrennung der Proteine erreicht werden. So empfahl sich für Proteine mit großem Molekulargewicht ein niederprozentiges und für kleine Proteine ein hochprozentiges Gel. Wenn nicht anders vermerkt, wurde in den Experimenten ein 12%iges Trenngel verwendet. Das Gießen der Gele erfolgte zwischen zwei Glasplatten, die in eine Gießvorrichtung gespannt wurden. Das Trenngel wurde während der Polymerisation mit 70%igem (v/v) Ethanol überschichtet, um eine glatte Trennschicht zu erhalten. Nach der Polymerisation wurde das Ethanol entfernt, und ein 3%iges Sammelgel über das Trenngel gegossen. Zur Bildung der Geltaschen wurde ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in eine Gelkammer mit SDS-PAGE-Laufpuffer eingesetzt und der Kamm entfernt. Die Proteinproben wurden 3 min bei 95 °C inkubiert und mit Kapillarspitzen in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 80 bis 180 V. Aufgrund der negativen Ladung wanderten die Proteine im Gel zur Anode. Jedes Protein wanderte mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichts war, durch das Gel. Gleichzeitig lief ein Molekulargewichtsmarker mit Proteinen bekannter Größe mit, wodurch anschließend die Größen der zu untersuchenden Proteine ermittelt werden konnten. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt oder die Proteine auf Nitrozellulosemembranen überführt.

3.3.7 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v)	Coomassie Blue G250
	50 % (v/v)	Methanol
	20 % (v/v)	Essigsäure
	in H ₂ O filtriert	
Entfärbelösung	7 % (v/v)	Essigsäure
	10 % (v/v)	Methanol
	in H ₂ O	

Zum Anfärben von Proteinbanden wurden SDS-Polyacrylamidgele mehrere Stunden in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele in Entfärbelösung entfärbt bis die Banden sichtbar wurden.

3.3.8 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen und immunchemischer Nachweis („Western Blotting“)

(Towbin et al., 1979)

Semidry Blot-Puffer	20 % (v/v)	Methanol
	in SDS-PAGE-Laufpuffer	
TBST	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	0,05 % (v/v)	Tween-20
	in H ₂ O pH 7,9	

Nach der Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamid-Gel konnten die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran überführt werden. Der Transfer wurde nach der „Semidry-Methode“ in einer entsprechenden Apparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) durchgeführt.

Das SDS-Polyacrylamid-Gel wurde auf eine Membran gelegt. Die Membran und das Gel wurden zwischen vorher zurechtgeschnittene Stücke von „Whatman“-Filterpapier gelegt. Dieses Paket wurde in der Blotapparatur eingeklemmt. Sowohl „Whatman“-Papier als auch die Membran wurden vorher in Semidry Blot-Puffer eingelegt. Das Gel musste zur Kathode zeigen und daher über der Membran liegen, die zur Anode zeigen musste, damit die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern konnten. Der Proteintransfer erfolgte für 90 min bei 1 mA pro cm² Gel. Der vollständige Transfer der Proteine konnte sowohl anhand des aufgetrennten und bereits mit Farbstoff markierten Proteingrößenmarkers, als auch durch eine Färbung der Proteine auf der Membran kontrolliert werden. Dazu wurde die Membran mit Ponceau-Lösung etwa 10 min auf einem Wipptisch inkubiert, in H₂O

gewaschen und eingescannt. Der Farbstoff wurde mit TBST (0,1 % (v/v) Tween in TBS) wieder abgewaschen. Die Membran wurde entweder über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei RT auf einem Wipptisch in 4%iger (w/v) Milchpulver-TBST-Lösung inkubiert. Diese Inkubation diente dem Abblocken unspezifischer Bindungsstellen, bevor ein immunchemischer Nachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern erfolgte. Die primären Antikörper wurden in 4%iger (w/v) Milchpulver-TBST-Lösung verdünnt. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membran in der Antikörperlösung auf einem Wipptisch. Anschließend wurde die Membran dreimal 15 min in TBST gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die sekundären Antikörper waren gegen die primären Antikörper gerichtet und wurden ebenfalls in 4%iger (w/v) Milchpulver-TBST-Lösung verdünnt. Die Membran wurde 1 h bei RT auf dem Wipptisch in der sekundären Antikörperlösung inkubiert.

Diese Methode, mit zwei Antikörpern zu arbeiten, hatte den Vorteil der Signalverstärkung, da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden konnten. Der Sekundärantikörper war an ein Enzym, die Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“), gekoppelt, das NH₂-Gruppen bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd oxidieren konnte. Das Prinzip des Nachweises von Proteinen mit ECL („Enhanced chemiluminescence“, verstärkte Chemilumineszenz, Abbildung 3.1.) beruhte auf der Oxidation von Luminol durch die Peroxidase, wodurch dieses angeregt wurde und Licht emittierte, das auf Röntgenfilme aufgenommen werden konnte. Diese Reaktion fand an den Stellen statt, an denen die Meerrettich-Peroxidase anwesend war, das heißt dort, wo das gesuchte Protein durch die Antikörper erkannt wurde. Um die Reaktion zu starten wurde die Membran, nachdem sie auf einem Wipptisch viermal 15 min in TBST gewaschen wurde, möglichst unter Lichtausschluss für 2 min Minuten in ECL-Lösung (Pierce) inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschlagen und mit Klebestreifen in eine Filmkassette geklebt. Unter Variierung der Belichtungszeiten wurden die Lichtemissionen auf Röntgenfilme aufgenommen, die in einer Entwicklermaschine entwickelt wurden.

Abbildung 3.1.: Prinzip der Proteindetektion mit Hilfe von ECL

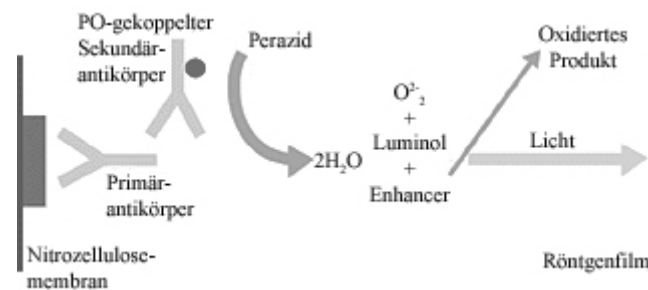


Abbildung 3.1.: Prinzip der Proteindetektion mit Hilfe von ECL („Enhanced chemiluminescence“, verstärkte Chemilumineszenz) (Amersham/GE-Lifesciences, 2008). Die Proteine auf der Membran wurden durch primäre und sekundäre Antikörper markiert. Die Nitrozellulosemembran wurde mit der aus zwei Komponenten bestehenden ECL-Lösung inkubiert. Die Peroxidase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt war und bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid H_2O_2 oxidieren konnte. Luminol wurde durch die Peroxidase oxidiert, wodurch Licht emittiert wurde, das auf Röntgenfilme aufgenommen werden konnte.

3.3.9 Immunpräzipitation

IP-Puffer	1 % (w/v)	BSA
	0,05 % (v/v)	Triton-X-100
	in PBS	

Proteine konnten mit Hilfe eines spezifisch gegen das Protein gerichteten Antikörpers und magnetischen „Beads“, an die Protein G gekoppelt war, das Immunglobuline band, aus Proteinextrakten präzipitiert werden. Zur Präzipitation von Proteinen aus RIPA-Proteinextrakten mit Antikörpern wurden in einem Gesamtvolumen von 100 μl etwa 500 μg RIPA-Proteinextrakt, IP-Puffer inklusive Proteaseinhibitoren („Complete“) mit 20 μl Antikörper 30 min inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Antikörper. Pro Ansatz wurden 25 μl „Dynabeads“ (gewaschen in PBS) zugegeben und über Nacht bei 4 $^{\circ}\text{C}$ auf einem Drehrad gedreht. Mit Hilfe eines Magnetständers wurden die „Beads“ dreimal mit 500 μl 0,05 % (v/v) Triton in PBS gewaschen. Die Elution der an die „Beads“ gekoppelten Proteine erfolgte durch Zugabe von 20 μl 2x SDS-Probenpuffer und zweiminütiger Inkubation bei 95 $^{\circ}\text{C}$. Die Proben wurden bei einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht.

3.4 Indirekte Immunfluoreszenz

(Harlow und Lane, 1988)

Mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenzstudien können Antigene nachgewiesen und ihre Lokalisierung innerhalb einer Zelle oder eines Gewebes untersucht werden. Dazu wurden transfizierte Zellen, Gefrierschnitte von Mausgewebe oder isolierte Kardiomyozyten fixiert, permeabilisiert und anschließend mit einer 1%igen (w/v) BSA-PBS-Lösung mit 10 % (v/v) NGS oder NDS inkubiert, die unspezifische Bindungsstellen blockierte. Der Nachweis des Antigens erfolgte mit einem primären Antikörper, der das Antigen spezifisch erkannte, und einem sekundären Antikörper, der gegen ein Epitop des primären Antikörpers gerichtet und mit einem Fluorochrom gekoppelt war. Nach Anregung mit Fluoreszenzlicht emittierte das Fluorochrom Licht einer bestimmten Wellenlänge, das mit Hilfe eines Mikroskops sichtbar wurde.

Mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz war es möglich, die Lokalisierung zweier Antigene simultan zu vergleichen. Für eine solche Doppelfärbung wurden primäre Antikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet (z. B. Meerschweinchen und Kaninchen). Es wurden zwei sekundäre Antikörper eingesetzt, die jeweils spezifisch gegen einen der primären Antikörper gerichtet waren und unterschiedliche Fluorochrome (z. B. Cy3 und Alexa Fluor 488) trugen.

3.4.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Gefrierschnitte präparierter Mausorgane wurden bei -20 °C mit Hilfe eines Mikrotoms hergestellt. Die 6-8 µm dicken Gewebeschnitte wurden auf Objektträger überführt, bei RT getrocknet und bis zur Fixierung bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Herstellung isolierter Kardiomyozyten

Hochkaliumlösung	10 mM	KCl
	4 mM	NaCl
	0,02 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
	4 mM	HEPES
	9 mM	Glukose
	130 mM	Kalium-Glutamat
	in H ₂ O	
	pH 7,4	

Messtyrode	4 mM	KCl
	135 mM	NaCl
	1,8 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
	2 mM	HEPES
	1 mg/ml	BSA
	0,017 mg/ml	Trypsininhibitor
	9 mM	Glukose
	in H ₂ O	
	pH 7,4	
EGTA-Tyrode	4 mM	KCl
	135 mM	NaCl
	1 mM	MgCl ₂
	2 mM	HEPES
	2,6 mM	EGTA
	in H ₂ O	
	pH 7,4	

Isolierte Kardiomyozyten aus Mausherzen wurden von Julia Rübsteck mit Hilfe einer modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage durch retrograde Perfusion im Institut für Physiologie II hergestellt. Einer Maus wurde das Herz entnommen und in EGTA-Tyrode überführt. Diese Lösung diente dazu, extrazelluläres Kalzium abzufangen, wodurch die Kalziumkonzentration soweit gesenkt wurde, dass eine weitere Kontraktion des Herzens verhindert wurde. Unter einer Stereolupe wurde der Aortenstumpf freipräpariert und auf eine Glaskanüle gezogen, die mit dem Ende der Langendorff-Perfusionsanlage verbunden wurde. Die Anlage diente dazu, die Perfusionslösungen mit Sauerstoff anzureichern, sie auf 36 °C zu erwärmen und den nötigen Perfusionsdruck zu erzeugen. Das Herz wurde zunächst 5 min mit EGTA-Tyrode und anschließend 5 min mit Hochkaliumlösung perfundiert, die zu einer erhöhten Membranleitfähigkeit für Kaliumionen und einer Depolarisierung der Zellmembranen auf 0 mV führte. Dadurch wurden die schnellen Na⁺- und Ca²⁺-Kanäle inaktiviert und das Herz unfähig zu kontrahieren, wodurch wiederum der Energieverbrauch der Herzzellen minimiert und ihre Überlebensfähigkeit gesteigert wurde. Anschließend wurden die Zell-Zell-Verbindungen enzymatisch aufgespalten. Dazu wurde das Herz 10 min mit Trypsinlösung (0,4 mg/ml Trypsin in Hochkaliumlösung) und anschließend 2-3 min mit Hochkaliumlösung und 10-15 min mit Kollagenaselösung (0,6 mg/ml Kollagenase in Hochkaliumlösung) perfundiert.

Die Zellen wurden in Messtyrode homogenisiert, gefiltert und kurz abzentrifugiert (10 sec). Nach 10-15 min Inkubation wurde der Überstand abgenommen, und die Zellen mit frischer Messtyrode gewaschen und mit Sauerstoff begast. Die isolierten Kardiomyozyten wurden in PBS aufgenommen und auf mit Laminin behandelte Objektträger aufgebracht. Nach 30 min

hatten sich die Zellen abgesetzt, und der Überstand konnte abgesaugt werden. Die Zellen wurden auf den Objektträgern mit Methanol und Azeton fixiert und bis zur Färbung bei -80°C gelagert.

3.4.3 Fixierung von Gefrierschnitten und Zellen

Die Fixierung von Gefrierschnitten und Zellen diente der Immobilisierung der Antigene ohne Zerstörung ihrer Struktur und subzellulären Lokalisierung.

3.4.3.1 Methanol-Azeton-Fixierung

Für Gefrierschnitte und isolierte Kardiomyozyten wurde die Fixierungsmethode mit Methanol und Azeton gewählt. Die Objektträger wurden 2-5 min bei -20°C in Methanol fixiert und anschließend 30 s bei -20°C in Azeton permeabilisiert. Die Schnitte wurden luftgetrocknet, mit einem hydrophoben Stift umrandet und 10 min in PBS gewaschen.

3.4.3.2 Paraformaldehyd-Fixierung

Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert. Bei dieser Methode wurden intermolekulare Brücken zwischen freien Aminogruppen gebildet, und die Proteine dadurch vernetzt.

Zur Fixierung wurden die Zellen, die auf Deckgläsern in einer 12-Loch-Platte wuchsen, zweimal mit PBS gewaschen, 10 min in einer 4%igen (w/v) Paraformaldehyd-PBS-Lösung inkubiert und erneut zweimal in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen 10 bis 15 min in 0,5 %igem (v/v) Triton-X-100 in PBS inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen.

3.4.4 Blockierung und Immunmarkierung

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die fixierten Gefrierschnitte und isolierten Kardiomyozyten in einer 1%igen (w/v) BSA-PBS-Lösung mit 10 % (v/v) NGS oder NDS 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht mit dem primären Antikörper, der in einer 1%igen (w/v) BSA-PBS-Lösung verdünnt wurde. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde zweimal 5 min mit 0,05 % (v/v) Triton in PBS und einmal 5 min mit PBS gewaschen. Die folgende zweistündige Inkubation mit dem sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörper sowie mit TOTO-3-Jodid (jeweils in 1%igen (w/v) BSA-PBS verdünnt) erfolgte unter Lichtausschluss bei 37°C . Es folgten drei fünfminütige Waschschrte mit PBS.

PFA-fixierte und permeabilisierte Zellen wurden je 45 min erst mit dem primären und anschließend mit dem sekundären Antikörper und Phalloidin-CPITC inkubiert und zwischen den Inkubationen und danach je zweimal mit PBS gewaschen.

3.4.5 Eindeckeln, Fluoreszenzmikroskopie und elektronische Bildbearbeitung

Mowiol	21,8 % (w/v)	Mowiol
	43 % (v/v)	Glyzerol
	3,6 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	in H ₂ O	

Zum Eindeckeln wurde das Eindeckelmedium Mowiol verwendet. Gefärbte Gefrierschnitte und isolierte Kardiomyozyten wurden eingedeckelt, indem ein Tropfen des Mediums auf ein Deckglas gegeben wurde. Das Deckglas wurde möglichst ohne Luftblasen auf den Objektträger gelegt und leicht angedrückt. Transient transfizierte Zellen auf Deckgläsern wurden eingedeckelt, indem Mowiol auf den Objektträger gegeben wurde. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger über Nacht bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die gefärbten Präparate wurden mit einem konfokalen Laser-Rastermikroskop (Zeiss) oder einem Epifluoreszenzmikroskop (Nikon) ausgewertet.

Beim Epifluoreszenzmikroskop erfolgte die Dokumentation mit Hilfe einer monochromen Kamera, die das durch die Filtersätze kommende Licht aufnahm. Um Licht eines entsprechenden Wellenlängenbereichs zu erzeugen, wurde ein Anregungsfilter („excitation filter“, EX) eingesetzt, der Licht mit allen anderen Wellenlängen herausfilterte. Um die an die sekundären Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffmoleküle anzuregen, wurde das Licht durch einen dichroischen Spiegel („dichroic mirror“, DM) auf das Präparat gelenkt. Der angeregte Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht, das langwelliger war als das Anregungslicht und den dichroischen Spiegel daher ohne Ablenkung durchlaufen und durch den Bandpassfilter (BA) an die Kamera weitergeleitet werden konnte. Da der Bandpassfilter ebenfalls nur für Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs durchlässig war, wurde verhindert, dass emittiertes Licht eventuell kreuzangeregter anderer Fluoreszenzfarbstoffe weitergegeben wurde.

Beim LSM rasterte ein Laserstrahl das Objekt punktweise ab. Es wurden nur die Signale der angeregten Fluoreszenzfarbstoffmoleküle in der Fokusebene des Laserstrahles aufgenommen. Die Signalanteile, die aus Ebenen oberhalb oder unterhalb der Fokusebene stammten, wurden ausgeblendet. Ein lichtempfindlicher Empfänger setzte aus den Signalen ein Bild zusammen. Die Abbildungen wurden mit Hilfe der Computerprogramme Adobe Photoshop 7.0, ImageJ und LSM Image Browser bearbeitet.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleichende Analyse des Myotilings des Menschen und der Maus

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse des Myotilings. Um mögliche Isoformen des Myotilins zu finden, wurden Internetdatenbanken nach exprimierten Sequenzbereichen (ESTs, „expressed sequence tags“) und potentiellen Spleißstellen durchsucht.

Das Myotilingen liegt beim Menschen auf Chromosom 5, bei der Maus dagegen auf Chromosom 18. Sowohl das humane als auch das murine Gen bestehen aus zehn Exons, die durch unterschiedlich lange Introns voneinander getrennt sind (Mologni et al., 2005; Salmikangas et al., 1999). Exon 1 liegt vollständig im 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR, „untranslated region“). Etwa 25 Basenpaare „upstream“ von Exon 1 liegt eine nicht konventionelle TATA-Box mit der Sequenz TATAAT (konventionell: TATAAA). Es gibt drei potentielle Startkodons (ATG), die alle im selben Leseraster liegen und von denen im humanen Myotilingen zwei im Exon 2 und das dritte im Exon 4 liegen (Abbildung 4.1). Im Mausgen ist das zweite ATG in das Exon 3 verschoben. Das dritte ATG wurde bisher nicht näher beschrieben, es wird jedoch durch einen EST gestützt (BF670354). Das Stopkodon (TAA) sowie das Polyadenylierungssignal liegen im Exon 10. Das längste offene Leseraster (ORF, „open reading frame“) bei Expression aller zehn Exons hat 1494 (Mensch) bzw. 1488 (Maus) Basenpaare. Die ORF-Sequenzen des humanen und murinen Myotilings sind zu 86 % identisch (Mologni et al., 2005) und kodieren für ein etwa 55 kDa großes Protein.

In EST-Datenbanken (<http://genome.ucsc.edu>) gibt es Hinweise auf zwei intraexonische Spleißstellen im humanen Exon 2, das dadurch in die Exons 2a, 2b und 2c eingeteilt werden kann (Abbildung 4.1 A und B). Das Exon 2a umfasst die ersten 85 Basenpaare und Exon 2c die letzten 131 Basenpaare des Exons 2. Exon 2c beinhaltet außerdem das zweite potentielle Startkodon. Das 351 bp große Exon 2b liegt zwischen 2a und 2c und enthält das erste Startkodon. Die serinreiche Region im Myotilinprotein projiziert sich auf DNA-Ebene auf die Exons 2b bis 3, die hydrophobe Region hauptsächlich auf Exon 2b zuzüglich vier Aminosäuren, die von Exon 2c kodiert werden. In der Datenbank sind ESTs zu finden, die (1) alle drei Exonteile (BF694660), (2) Exons 2a und 2c (z. B. BF672999), (3) nur Exon 2a (z. B. BF670312) oder (4) nur Exon 2c (z. B. BF670603) enthalten. Der Transkriptionsstart wäre im Fall (1) beim ersten ATG im Exon 2b, in den Fällen (2) und (4) beim zweiten ATG im Exon 2c und (3) beim dritten ATG im Exon 4. Aus den Varianten (2) und (4) würde auf Proteinebene dasselbe Protein translatiert werden. Für das Mausgen gibt es keine ESTs, die auf die Unterteilung des zweiten Exons hindeuten.

Um diese aus Datenbankanalysen gewonnenen Ergebnisse experimentell zu belegen, wurden PCR-Experimenten durchgeführt. Mit den Primern „MYOTgex2af“ und „MYOTdges6r“, die

in Exon 2a bzw. 5 liegen, konnten in Skelettmuskel-cDNA-Bibliotheken ein DNA-Fragment mit etwa 840 bp und ein weiteres mit etwa 490 bp nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die 840 bp entsprachen der erwarteten Fragmentgröße. Bei dem um etwa 350 bp kleineren Fragment wurde vermutet, dass im Skelettmuskel RNA ohne Exon 2b, das 351 bp umfasst, exprimiert wird. Das Fehlen von Exon 2b bei dem kleineren Fragment ließ sich durch Klonierung dieses PCR-Produkts in pGEM-T-Vektoren und nachfolgende Sequenzierung verifizieren.

In adulten Herz-cDNA-Bibliotheken konnte mit den Primern „MYOTex1f“ und „MYOTex4r“, die in Exon 1 bzw. 3 lagen, im Gegensatz zu fötalen Herz-cDNA-Bibliotheken kein DNA-Fragment amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine Myotilin-Isoform im adulten Herzen ohne Exon 1 oder ohne Exon 3 hin. Da mit den Primern „MYOTgex2af“ und „MYOTex4r“, die in Exon 2a bzw. Exon 3 banden, DNA-Fragmente mit etwa 550 bp (mit Exon 2b) sowie 200 bp (ohne Exon 2b) amplifiziert werden konnten, konnte das Fehlen von Exon 3, in dem der Primer „MYOTex4r“ lag, ausgeschlossen werden. Das Fehlen von Exon 1 in adulten Herz-cDNA-Bibliotheken konnte damit indirekt gezeigt werden. Ein alternativer Promotor vor Exon 2 könnte daher notwendig werden, um die Isoform(en) ohne Exon 1 zu exprimieren. Tatsächlich finden sich im Intron vor Exon 2 mehrere putative Promotorelemente wie MEF-Bindungsstellen („myocyte-specific enhancer-binding factor 2“; Konsensussequenz: CTA(T/A)₄TAG/A) oder E-Boxen (Konsensussequenz: CANNTG).

Mit den Primern „MYOTex6f“ und „TTID498r“, die in Exon 5 bzw. 10 binden, konnte in adulten und fötalen Herz-cDNA-Bibliotheken neben dem erwarteten 858 bp-Fragment auch ein Fragment mit etwa 725 bp amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Durch Klonierung dieses Fragments in den Vektor pGEM-T und anschließende Sequenzierung konnte das Fehlen von Exon 6 (133 bp) nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der PCR-Experimente sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

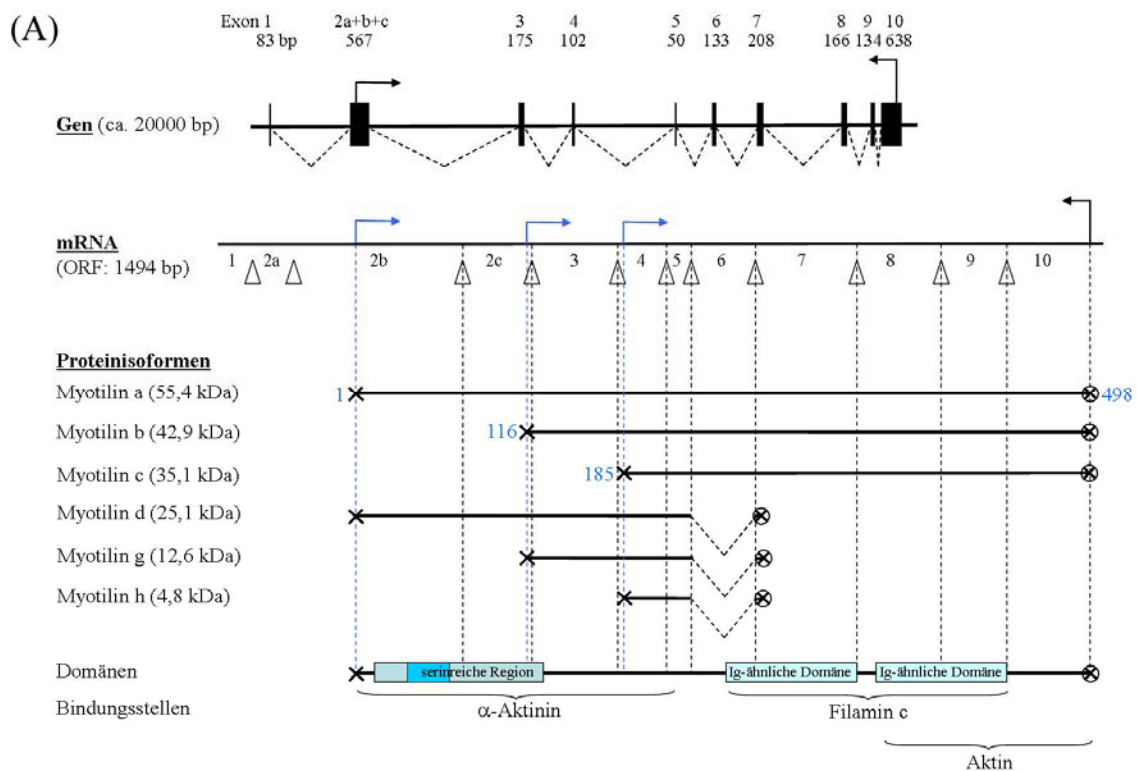
Tabelle 4.1: Ergebnisse der PCR-Experimente

	Skelettmuskel	Herz (adult)	Herz (fötal)
Exon 1	+	-	+
Exon 2b	+/-	+/-	
Exon 6	+	+/-	+/-

Tabelle 4.1: Ergebnisse der PCR-Experimente. Nachweis der Exons 1, 2b und 6 in cDNA-Bibliotheken des Skelettmuskels und des adulten und fötalen Herzens. + = Exon konnte amplifiziert werden; - = Exon konnte nicht amplifiziert werden; +/- = es konnte sowohl ein DNA-Fragment mit als auch ohne Exon amplifiziert werden.

Mit verschiedenen Antikörpern gegen Myotilin konnten unbekannte Proteine nachgewiesen werden, die mit etwa 100 kDa (diese Arbeit, Kapitel 4.2.2, Abbildung 4.2) bzw. 110 kDa (Salmikangas et al., 1999) wesentlich größer als die mit 55 kDa vorhergesagte größte Myotilinisoform waren. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich um Dimere zweier Myotilinmoleküle handeln könnte. Die Fähigkeit von Myotilin, Dimere zu bilden, konnte bereits in einer früheren Studie gezeigt werden (Salmikangas et al., 2003). Es besteht jedoch theoretisch auch die Möglichkeit, dass es sich bei der 100 kDa-Bande um eine neue Isoform handelt, die durch alternatives Spleißen entsteht. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die als Introns definierten Sequenzen des Myotilingens (Abbildung 4.1) auf offene Leseraster untersucht. Um potentiell in den Introns enthaltene Exonsequenzen zu amplifizieren, wurden die Primer jeweils am Anfang des vorhergehenden und am Ende des nachfolgenden Exons gewählt. Mit dieser Methode konnten außer den erwarteten keine weiteren DNA-Fragmente amplifiziert werden, die auf die Existenz weiterer Exons innerhalb der Intronsequenzen hindeuten.

Abbildung 4.1: Humane und murine Myotilinisoformen



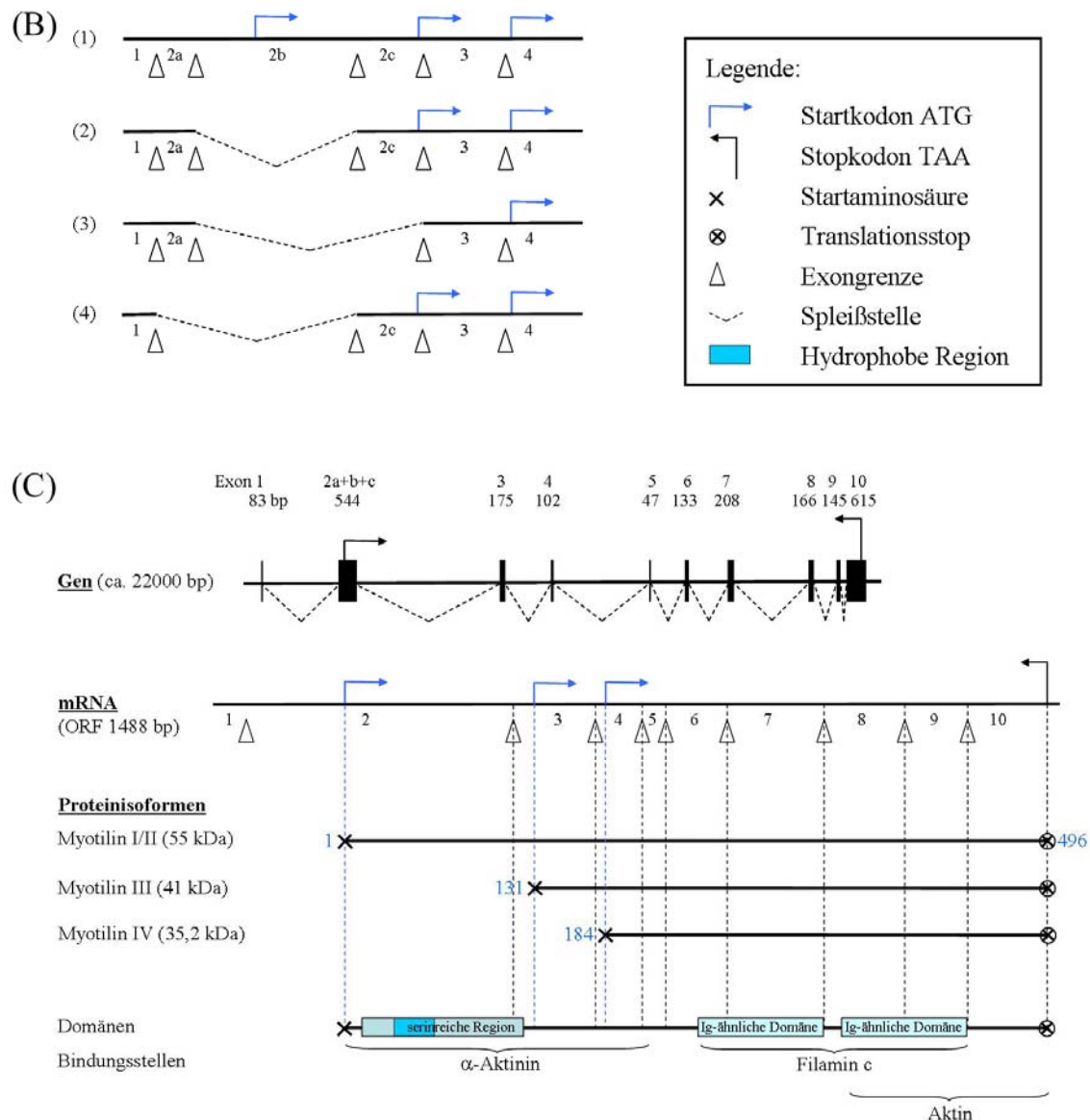


Abbildung 4.1: Humane und murine Myotilinisformen. (A) Humanes Myotilin. Das humane Myotilingen besteht aus etwa 20000 bp und enthält 10 Exons unterschiedlicher Länge. Der vollständige ORF besteht aus 1494 bp und enthält drei potentiellen Startkodons in den Exons 2b, 2c und 4 (blaue Pfeile). Daraus ergeben sich mehrere mögliche humane Proteinisoformen (Myotilin a, b, c, d, g und h), die mit den Aminosäuren 1, 116 oder 185 beginnen (blaue Zahlen). Durch das Herausspleißen von Exon 6 ergeben sich weitere Kombinationsmöglichkeiten. Proteindomänen und Bindungsstellen für α -Aktinin, Filamin c und Aktin sind markiert. (B) Spleißvarianten des humanen Exons 2. EST-Datenbanken geben Hinweise auf zwei intraexonische Spleißstellen im humanen Exon 2, welches dadurch in die Exons 2a, 2b und 2c aufgeteilt werden kann. In den Datenbanken sind ESTs zu finden, die (1) alle drei Exonteile, (2) Exons 2a und 2c, (3) nur Exon 2a oder (4) nur Exon 2c enthalten. Das Herausspleißen von Exon 2b konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit verifiziert werden (Kapitel 4.1). (C) Murines Myotilin. Das Myotilingen der Maus besteht aus etwa 22000 bp und enthält 10 Exons unterschiedlicher Länge. Der vollständige ORF besteht aus 1488 bp und enthält drei potentiellen Startkodons in den Exons 2, 3 und 4 (blaue Pfeile). Daraus ergeben sich mehrere mögliche humane Proteinisoformen (Myotilin I/II, III und IV), die mit den Aminosäuren 1, 131 oder 184 beginnen (blaue Zahlen). Proteindomänen und Bindungsstellen für α -Aktinin, Filamin c und Aktin sind markiert.

4.2 Expression von Myotilin

4.2.1 Kontrolle der Spezifität verschiedener Antikörper gegen Myotilin

In Meerschweinchen wurden mehrere neue Antikörper gegen humanes Myotilin generiert, deren Spezifität im Rahmen der vorliegenden Arbeit kontrolliert wurde. Der Antikörper Myotilin (Exon 3/4) erkennt ein Epitop in dem Bereich, der durch die Exons 3 und 4 kodiert wird, während der Antikörper Myotilin (gesamt) durch die Immunisierung eines Meerschweinchens mit dem gesamten Myotilin-Protein hergestellt wurde. Die Antikörper Myotilin (Exon 2) und Myotilin (Exon 6) sind jeweils gegen Epitope in der von Exon 2 bzw. Exon 6 kodierten Region gerichtet. Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper wurden auf Nitrozellulosemembranen überführte Proteinextrakte muriner Skelettmuskelproben mit den Antikörpern immungefärbt. Als Vergleich diente eine Färbung mit dem monoklonalen Antikörper 9F4.5.15 aus Maus, dessen Epitop im Bereich der Aminosäuren 80 bis 100 liegt, die von Exon 2 kodiert werden. Die molekularen Massen der mit den zu testenden Antikörpern nachgewiesenen Proteine wurden jeweils mit den aus der Literatur bekannten Molekularmassen verglichen.

Die Antikörper Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) erkannten in Skelettmuskelproteinextrakten Proteine mit molekularen Massen von ca. 57 bzw. 42 kDa sowie mehrere weitere Banden zwischen diesen, bei denen es sich um proteolysebedingte Abbauprodukte handeln könnte (Abbildung 4.2 A und B, Spur Skelettmuskel). Ein ähnliches Bandenmuster ergab sich mit dem zum Vergleich eingesetzten monoklonalen Antikörper 9F4.5.15 (Abbildung 4.2 C, Spur Skelettmuskel). Jedoch fehlte hier die 42 kDa-Bande, die die Myotilinisoform III repräsentiert. Dies ist damit zu erklären, dass bei dieser Isoform das Exon 2 und damit das Epitop des Antikörpers 9F4.5.15 fehlt. Die Antikörper Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) zeigten auch in indirekten Immunfluoreszenzstudien an Skelettmuskelschnitten eine spezifische Lokalisierung in der Z-Scheibe (Daten nicht gezeigt). Der Antikörper Myotilin (Exon 6) zeigte zwei schwache, aber distinkte Banden bei ca. 57 kDa bzw. ca. 42 kDa (Daten nicht gezeigt). In indirekten Immunfluoreszenzstudien konnte mit diesem Antikörper jedoch kein spezifisches Signal nachgewiesen werden. Mit dem Antikörper Myotilin (Exon 2) war neben starken Hintergrundreaktionen nur eine sehr schwache Bande bei ca. 57 kDa nachweisbar. In indirekten Immunfluoreszenzstudien zeigte auch dieser Antikörper kein spezifisches Signal.

Die Banden bei 57 kDa stellen die murinen Isoformen I bzw. II des Myotilins und die 42 kDa-Banden die murine Isoform III dar (Abbildung 4.1 C). Daher sind die getesteten Antikörper Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) als spezifisch für das Protein Myotilin anzusehen. Die starken Hintergrundreaktionen im Western Blot bzw. die unspezifischen Signale in indirekten Immunfluoreszenzstudien machen die Antikörper Myotilin (Exon 6) und Myotilin

(Exon 2) unbrauchbar. Aus diesen Gründen wurden beide Antikörper nicht für weitere Experimente verwendet.

4.2.2 Expression von Myotilin in unterschiedlichen Geweben der Maus

Um die Expression von Myotilin in unterschiedlichen Geweben der Maus (*Mus musculus*) zu untersuchen, wurden Proteinextrakte hergestellt, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit den polyklonalen Antikörpern aus Meerschweinchen sowie dem monoklonalen Antikörper aus Maus inkubiert wurden.

Die Antikörper Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) erkannten im murinen Herzextrakten Proteine mit einer molekularen Masse von ca. 57 kDa sowie schwächere Banden bei etwa 42 kDa und 25 kDa (Abbildung 4.2 A und B, Spur Herz). Der Antikörper 9F4.5.15 erkannte ebenfalls die Bande bei 57 kDa sowie zusätzliche Banden bei ca. 25, 45 und 90 kDa (Abbildung 4.2 C, Spur Herz).

In Proteinextrakten der Zunge erkannte der Antikörper gegen gesamtes Myotilin Banden bei etwa 40 und 25 kDa und mehrere schwächere Banden u. a. bei ca. 57 kDa (Abbildung 4.2 A, Spur Zunge). Mit dem Antikörper Myotilin (Exon 3/4) wurden ebenfalls Banden bei ca. 57 und 40 kDa sichtbar (Abbildung 4.2 A, Spur Zunge). Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers wurden in Zungenextrakten Proteine mit den Molekularmassen von ca. 25, 45, 57 und 90 kDa nachgewiesen (Abbildung 4.2 C, Spur Zunge). Ein Vergleich mit der Detektion in Zungenextrakten der Ratte, bei der die kleineren Banden nicht auftraten (Abbildung 4.3 A und B, Spur Zunge), wies darauf hin, dass es sich dabei um proteolysebedingte Abbauprodukte von Myotilin in den murinen Zungenextrakten handeln könnte.

In Uterusproteinextrakten konnte mit dem Antikörper Myotilin (gesamt) ein Protein mit der molekularen Masse von etwa 100 kDa nachgewiesen werden. Zusätzlich waren eine schwächere Bande bei ca. 57 kDa sowie eine 150 kDa-Bande sichtbar (Abbildung 4.2 A, Spur Uterus). Der Antikörper Myotilin (Exon 3/4) erkannte lediglich die Bande bei 100 kDa (Abbildung 4.2 B, Spur Uterus), während der Antikörper 9F4.5.15 hauptsächlich ein Protein bei ca. 57 kDa sowie eine schwächere Bande bei etwa 90 kDa erkannte (Abbildung 4.2 C, Spur Uterus).

In Proteinextrakten der Blase erkannten die Antikörper Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) ein Protein mit einer Molekularmasse von etwa 100 kDa sowie ganz schwach ein Protein bei ca. 57 kDa (Abbildung 4.2 A und B, Spur Blase). Mit dem Antikörper 9F4.5.15 wurde lediglich eine Bande bei etwa 57 kDa sichtbar (Abbildung 4.2 C, Spur Blase).

In Proteinextrakten des Darms konnte mit den beiden polyklonalen Antikörpern jeweils ein Protein mit der molekularen Masse von etwa 100 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 4.2 A und B, Spur Darm). Der monoklonale Antikörper hingegen erkannte Proteine bei ca. 57 und 37 kDa.

Abbildung 4.2: Expression von Myotilin in Mausgeweben

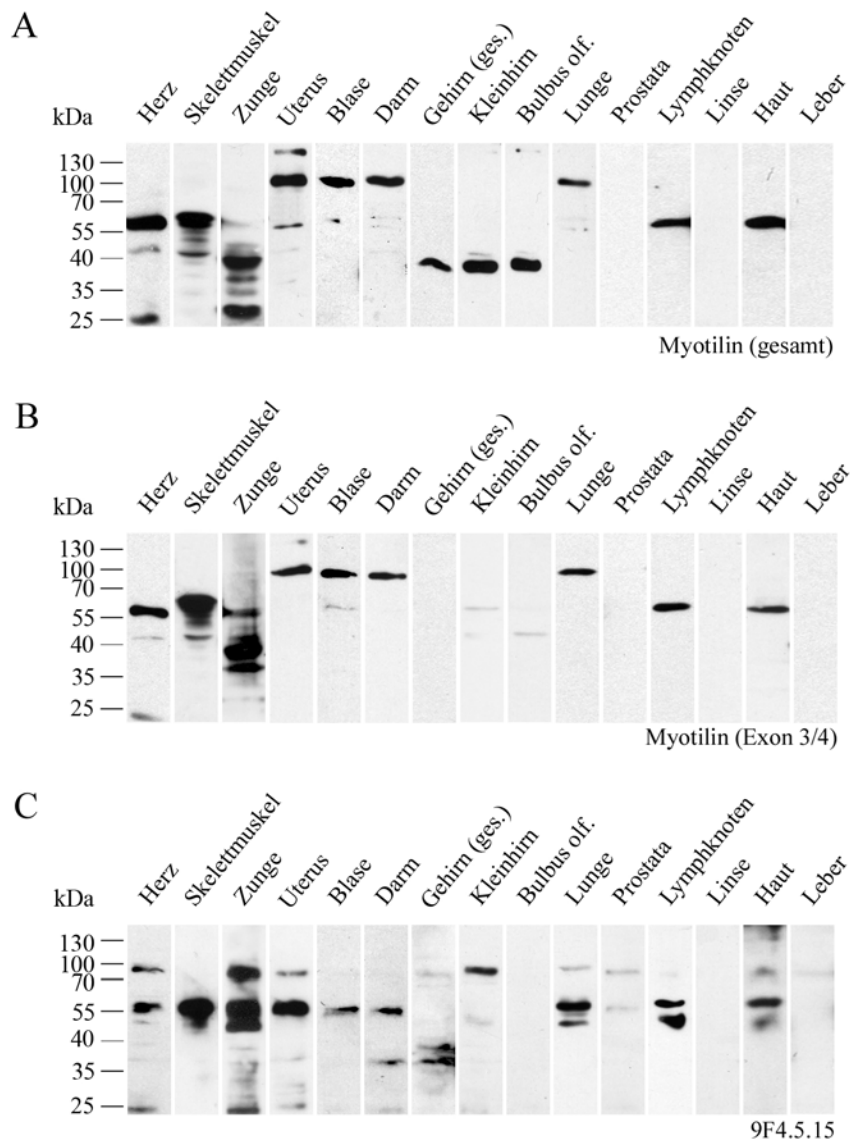


Abbildung 4.2: Nachweis der Expression von Myotilin in unterschiedlichen Geweben der Maus (*Mus musculus*) durch Western Blot-Analysen. Der Nachweis von Myotilin erfolgte mit den Antikörpern (A) Myotilin (gesamt), (B) Myotilin (Exon 3/4) und (C) 9F4.5.15.

In Proteinextrakten von Gesamtgehirn, Kleinhirn und Bulbus olfactorius erkannte der Antikörper Myotilin (gesamt) ein Protein mit einer Molekularmasse von etwa 38 kDa, das von dem Antikörper Myotilin (Exon 3/4) nicht erkannt wurde (Abbildung 4.2 A und B, Spuren Gehirn (ges.), Kleinhirn und Bulbus olf.). Mit dem Antikörper 9F4.5.15 wurden in Gesamtgehirnextrakten Banden bei ca. 37 und 38 kDa sowie sehr schwach bei ca. 90 kDa nachgewiesen. In Kleinhirnproteinextrakten wurde eine Bande bei ca. 90 kDa erkannt, während in Extrakten des Bulbus olfactorius keine Bande sichtbar war.

In Proteinextrakten der Lunge erkannten die Antikörper Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) ein Protein mit einer Molekularmasse von ca. 100 kDa (Abbildung 4.2 A und B, Spur Lunge). Mit dem monoklonalen Antikörper konnten Proteine bei etwa 45, 57 und 90 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 4.2 C, Spur Lunge).

In Extrakten aus Prostatagewebe konnte mit den polyklonalen Antikörpern keine und mit dem monoklonalen Antikörper lediglich zwei schwache Proteinbanden bei etwa 57 und 90 kDa angefärbt werden (Abbildung 4.2 A, B und C, Spur Prostata).

In Lymphknoten- sowie in Hautextrakten erkannten alle drei Antikörper jeweils ein Protein mit der molekularen Masse von etwa 57 kDa (Abbildung 4.2 A, B und C, Spuren Lymphknoten und Haut). Mit dem Antikörper 9F4.5.15 wurde in Lymphknotenproteinextrakten zusätzlich eine Bande bei etwa 45 kDa sichtbar.

Weder in Linsen- noch in Leberproteinextrakten konnte mit den drei Antikörpern ein Protein nachgewiesen werden (Abbildung 4.2 A, B und C, Spuren Linse und Leber).

4.2.3 Expression von Myotilin in unterschiedlichen Geweben der Ratte

Um vergleichende Untersuchungen der Expression von Myotilin und seiner Isoformen in unterschiedlichen Spezies durchzuführen, wurden Proteinextrakte aus verschiedenen Geweben der Ratte (*Rattus norvegicus*) auf Nitrozellulosemembranen überführt und mit den Antikörpern Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) inkubiert.

Die Expression von Myotilin in den unterschiedlichen Geweben der Ratte ähnelte der Expression in Mausgeweben, jedoch traten stärkere Hintergrundreaktionen auf.

In Herzproteinextrakten war mit beiden Antikörpern eine 57 kDa-Bande nachweisbar. Der Antikörper Myotilin (gesamt) erkannte zusätzlich ein Protein bei ca. 100 kDa (Abbildung 4.3 A und B, Spur Herz).

In Proteinextrakten des Skelettmuskels erkannten beide Antikörper ein Protein bei ca. 57 kDa. Es waren weniger der potentiell proteolysebedingten Abbauprodukte zu sehen als in Mausextrakten (Abbildung 4.3 A und B, Spur Skelettmuskel).

In Proteinextrakten der Zunge wiesen beide Antikörper ein Protein mit der Molekularmasse von etwa 57 kDa und einige schwächere, kleinere Banden nach (Abbildung 4.3 A und B, Spur Zunge).

In Extrakten der Organe Uterus, Blase, Darm und Lunge war mit beiden Antikörpern eine Proteinbande bei ca. 100 kDa nachweisbar (Abbildung 4.3 A und B, Spuren Uterus, Blase, Darm und Lunge). Außer im Fall der Uterusproteinextrakte, die mit dem Antikörper Myotilin (gesamt) untersucht wurden, glichen die Expressionsmuster in diesen Organen der Ratte dem Muster in den jeweiligen Organen der Maus (vgl. Abbildung 4.2 A und B, Spuren Uterus, Blase, Darm und Lunge).

Trotz stärkerer Hintergrundreaktionen war die Expression von Myotilin in Proteinextrakten verschiedener Gehirnprouben der Ratte vergleichbar mit der der Maus: ausschließlich mit dem Antikörper Myotilin (gesamt) waren Proteine mit einer molekularen Masse von etwa 38 kDa nachweisbar (Abbildung 4.3 A und B, Spuren Großhirn, Kleinhirn, Bulbus olf.).

In Proteinextrakten der Prostata und der Linse erkannten die Antikörper im Gegensatz zu den Mausextrakten Proteine bei etwa 100 kDa (Abbildung 4.3 A und B, Spuren Prostata und Linsen).

In Leberproteinextrakten war mit dem Antikörper Myotilin (gesamt) eine schwache Bande bei etwa 100 kDa nachweisbar, die bei Extrakten der Maus nicht sichtbar war (Abbildung 4.3 A und B, Spur Leber).

Abbildung 4.3: Expression von Myotilin in Rattengeweben

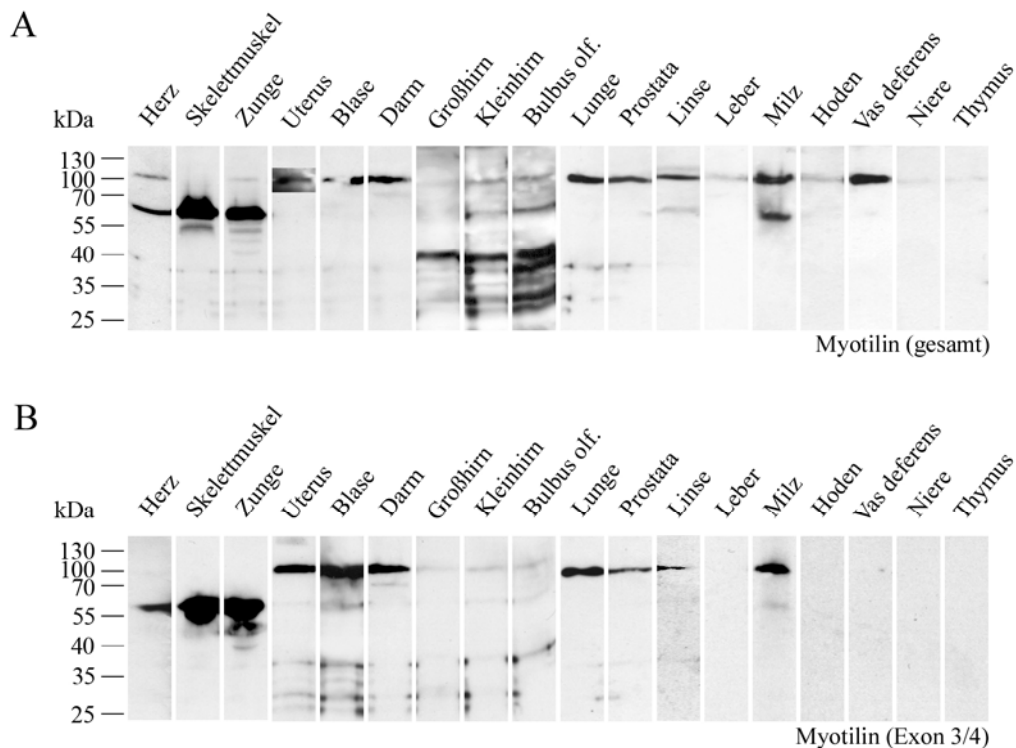


Abbildung 4.3: Nachweis der Expression von Myotilin in unterschiedlichen Geweben der Ratte (*Rattus norvegicus*) durch Western Blot-Analysen. Der Nachweis von Myotilin erfolgte mit den Antikörpern (A) Myotilin (gesamt) und (B) Myotilin (Exon 3/4).

In Extrakten der Milz erkannten beide Antikörper ein Protein mit der Molekularmasse von ca. 100 kDa. Der Antikörper Myotilin (gesamt) erkannte zusätzlich eine Bande bei etwa 57 kDa, die mit dem Antikörper Myotilin (Exon 3/4) nur schwach erkennbar war (Abbildung 4.3 A und B, Spur Milz).

In Hoden- und Vas deferens-Proteinextrakten war ausschließlich mit dem Antikörper Myotilin (gesamt) eine Bande bei ca. 100 kDa nachweisbar (Abbildung 4.3 A und B, Spuren Hoden und Vas deferens).

In Proteinextrakten der Niere und des Thymus erkannte keiner der Antikörper ein Protein (Abbildung 4.3 A und B, Spuren Niere und Thymus).

4.2.4 Expression von Myotilin in unterschiedlichen Geweben des Krallenfrosches

Als weitere Spezies zur vergleichenden Untersuchung der Expression von Myotilin wurde der Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) gewählt. Aus Herz- und Skelettmuskelproben wurden Proteinextrakte hergestellt, die auf Nitrozellulosemembranen überführt und mit den Antikörpern Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) inkubiert wurden.

Der Antikörper Myotilin (gesamt) erkannte in Herzproteinextrakten Proteine mit einer molekularen Masse von etwa 57 und 35 kDa (Abbildung 4.4 A, Spur Herz). In Skelettmuskelextrakten war eine starke Bande bei ca. 35 kDa sowie weitere schwächere Banden bei höheren Molekularmassen nachweisbar (Abbildung 4.4 A, Spur Skelettmuskel).

Der Antikörper Myotilin (Exon 3/4) erkannte lediglich in Skelettmuskelextrakten eine schwache Bande bei ca. 35 kDa (Abbildung 4.4 B).

Abbildung 4.4: Expression von Myotilin in Geweben des Krallenfrosches

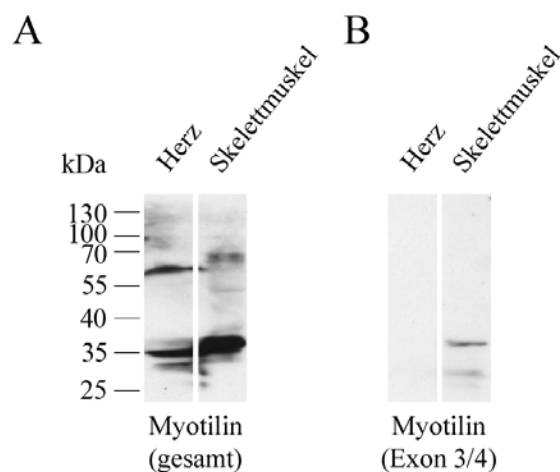


Abbildung 4.4: Nachweis der Expression von Myotilin im Herz und Skelettmuskel des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) durch Western Blot-Analysen. Der Nachweis von Myotilin erfolgte mit den Antikörpern (A) Myotilin (gesamt) und (B) Myotilin (Exon 3/4).

4.2.5 Immunpräzipitation des 100 kDa-Proteins

Um die Identität des Proteins mit einer Molekularmasse von etwa 100 kDa aufzuklären, das von den Antikörpern Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) z. B. in Proteinextrakten des Darms erkannt worden war, wurden als Vorbereitung für massenspektrometrische Untersuchungen Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurde das Protein mit einem der beiden Antikörper aus RIPA-Proteinextrakten muriner Darmproben immunpräzipitiert. Als Kontrolle der Immunpräzipitierbarkeit wurde das Experiment auch mit Proteinextrakten von Skelettmuskel durchgeführt.

Die 100 kDa-Bande konnte mit dem Antikörper Myotilin (gesamt) in beiden IP-Ansätzen nachgewiesen werden. Beide Antikörper sind also in der Lage das 100 kDa-Protein aus Darmproteinextrakten immunpräzipitieren (Abbildung 4.5, Spuren 2 und 3). Die anderen Banden, die in der ECL-Reaktion sichtbar werden, sind auf die leichten und schweren Antikörperketten der zur Immunpräzipitation eingesetzten Myotilin-Antikörper zurückzuführen. In der Negativkontrolle war kein Protein nachweisbar (Abbildung 4.5, Spur 4). Aus Triton-Proteinextrakten des Skelettmuskels konnte das 57 kDa-Protein immunpräzipitiert werden (Abbildung 4.5, Spur 6).

Abbildung 4.5: Immunpräzipitation aus Darm- und Skelettmuskelproteinextrakten

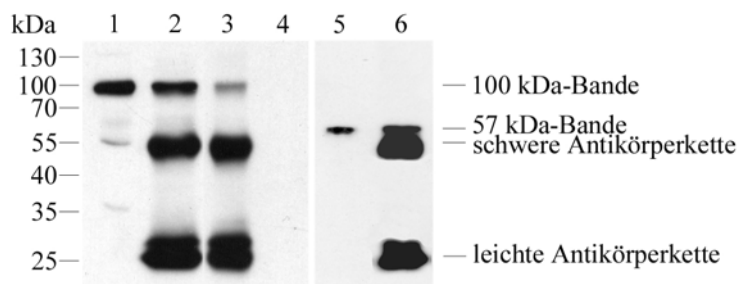


Abbildung 4.5: Immunpräzipitation (IP) aus murinen Darm- und Skelettmuskelproteinextrakten mit den Antikörpern Myotilin (gesamt) bzw. Myotilin (Exon 3/4) und anschließender Western Blot-Analyse. Der Nachweis von Myotilin erfolgte mit dem Antikörper Myotilin (gesamt). Spur 1: Proteinextrakt Darm, 2: IP-Ansatz mit Darmproteinextrakt und dem Antikörper Myotilin (gesamt), 3: IP-Ansatz mit Darmproteinextrakt und dem Antikörper Myotilin (Exon 3/4), 4: IP-Ansatz mit Darmproteinextrakt und ohne Antikörper, 5: Proteinextrakt Skelettmuskel, 6: IP-Ansatz mit Skelettmuskelproteinextrakt und dem Antikörper Myotilin (gesamt).

4.2.6 Myotilinisformen auf mRNA-Ebene: RT-PCR

Um die mit dem Antikörper Myotilin (gesamt), jedoch nicht mit dem Antikörper Myotilin (Exon 3/4), in Gehirnproteinextrakten detektierte Myotilinisform auch auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde RNA aus Kleinhirn und Bulbus olfactorius sowie zur Kontrolle aus Skelettmuskel der Maus isoliert und mit reverser Transkriptase in cDNA transkribiert. Mit den Primern „MyotInt4f“ und „MyotInt9r“, die in Exon 4 respektive 10 binden, sowie Taq-Polymerase wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel inklusive Ethidiumbromid aufgetrennt und mit UV-Licht sichtbar gemacht. Mit den Primern sollte ein Fragment zwischen Base 534 in Exon 4 (vom ersten Transkriptionsstart gezählt) und Base 1486 in Exon 10 amplifiziert werden. Die erwartete Fragmentgröße lag also bei 953 bp.

Aus Skelettmuskel-cDNA wurde ein DNA-Fragment mit etwa der erwarteten Größe von 953 bp amplifiziert (Abbildung 4.6, Spur Skelettmuskel). In cDNA aus Kleinhirn oder Bulbus olfactorius wurde jedoch ein Fragment von nur etwa 700 bp amplifiziert (Abbildung 4.6, Spuren Kleinhirn und Bulbus olf.). Die fehlenden ca. 250 bp deuten darauf hin, dass ein oder mehrere Exons im Gehirn der Maus herausgespleißt worden sein könnten. Auf Proteinebene würden diese 250 bp etwa 10 kDa ausmachen (Berechnungsgrundlage: ca. 110 Da pro Aminosäure). Zu den 55 kDa großen Isoformen I bzw. II fehlen der mit dem Antikörper Myotilin (gesamt) im Gehirn detektierten Isoform jedoch ca. 20 kDa. Das deutet darauf hin, dass auch im Bereich vor dem Primer „MyotInt4f“ ein weiterer Teil (z. B. Exon 3 mit 175 bp bzw. 6 kDa auf Proteinebene) herausgespleißt werden könnte. Ein fehlendes Exon 3 wäre im Einklang mit dem Befund, dass der Antikörper Myotilin (Exon 3/4), dessen Epitop im von den Exons 3 und 4 kodierten Bereich liegt, im Gehirn kein Protein erkannte.

Der Versuch, die 700 bp-Fragmente über T/A-Klonierung in den Vektor pGEM-T zu klonieren und zu sequenzieren, blieb erfolglos. Zur näheren Untersuchung, welche Exons fehlen könnten, wären höher aufgelöste PCRs notwendig, bei denen Primer eingesetzt werden, die kleinere Fragmente zwischen den Exons 4 und 10 bzw. im Bereich vor dem Primer „MyotInt4f“ amplifizieren.

Abbildung 4.6: Identifikation von Myotilinisformen auf mRNA-Ebene

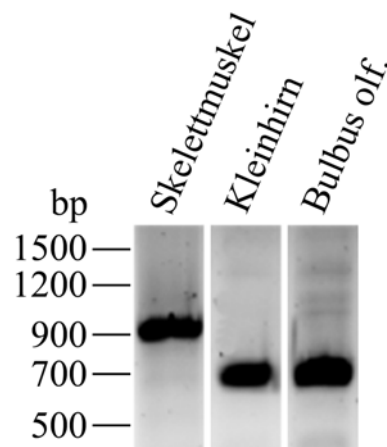


Abbildung 4.6: Identifikation von Myotilinisformen auf mRNA-Ebene. Aus Skelettmuskel, Kleinhirn oder Bulbus olfactorius isolierte RNA wurde mit reverser Transkriptase in cDNA übersetzt. Mit den Primern „MyotInt4f“ und „MyotInt9r“ sowie Taq-Polymerase wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt.

4.2.7 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Expression von Myotilin

Die Untersuchungen zur Spezifität der Myotilin-Antikörper in Proteinextrakten von Skelettmuskelproben der Maus und der Vergleich zum monoklonalen Antikörper 9F4.5.15 machten deutlich, dass die Antikörper Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) die 55 kDa-Isoformen I bzw. II des Myotilins (Abbildung 4.1 C), die sich nur im 3'-UTR, nicht jedoch in der Proteinsequenz unterscheiden, spezifisch erkennen. In indirekten Immunfluoreszenzstudien mit murinen Skelettmuskelschnitten zeigten beide Antikörper ein spezifisches Signal in der Z-Scheibe.

Das Expressionsmuster von Myotilin variiert in unterschiedlichen Geweben der Maus (Abbildung 4.2). Die Isoformen I bzw. II konnten mit allen drei Antikörpern hauptsächlich in Herz-, Skelettmuskel-, Zungen-, Lymphknoten- und Hautproteinextrakten nachgewiesen werden.

Bei der von den Antikörpern Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) in Herz- und Skelettmuskelextrakten erkannten 42 kDa-Bande handelt es sich wahrscheinlich um die Isoform III.

In verschiedenen Gehirnextrakten wurde von dem Antikörper Myotilin (gesamt) nicht jedoch von dem Antikörper Myotilin (Exon 3/4) eine Bande von etwa 38 kDa nachgewiesen. Diese Bande ist mit den Isoformen I, II und II nicht zu erklären. Da sich – wie im humanen Gen – in Exon 4 ein drittes Startkodon im selben Leseraster wie die beiden ersten befindet, könnte die 38 kDa-Bande ein Hinweis auf diese vierte Isoform sein. Auch auf mRNA-Ebene wurden mit

Hilfe von RT-PCRs im Kleinhirn und im Bulbus olfactorius kleinere Fragmente amplifiziert als im Skelettmuskel.

Die Expression von Myotilin in Geweben der Ratte entsprach größtenteils der Expression in Mausextrakten (Abbildung 4.3). Beim Krallenfrosch dagegen war die 57 kDa-Bande von Myotilin lediglich in Herzproteinextrakten mit dem Antikörper Myotilin (gesamt) nachweisbar (Abbildung 4.4). Die Spezies *Xenopus laevis* ist jedoch phylogenetisch zu weit von Maus und Ratte entfernt, so dass die Epitope der Antikörper wahrscheinlich zu stark verändert sind.

Die 100 kDa-Bande in Proteinextrakten verschiedener Organe wie Darm und Lunge kann bisher nicht erklärt werden. Eventuell könnte es sich um Dimere der 55 kDa-Isoformen handeln. Aus RIPA-Darmproteinextrakten konnte die 100 kDa-Bande immunpräzipitiert werden. Über diesen Ansatz sollten massenspektrometrische Untersuchungen initiiert werden, die die Identität der 100 kDa-Bande klären könnten.

4.3 Lokalisierung von Myotilin

4.3.1 Lokalisierung von Myotilin in Darm und Lunge der Maus

Die Antikörper Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) erkannten in murinen Proteinextrakten glattmuskelhaltiger Organe wie Lunge und Darm ein Protein mit einer molekularen Masse von etwa 100 kDa (Abbildung 4.2 A und B, Spuren Lunge und Darm). Um diesem Signal der Western Blot-Analysen weiter nachzugehen und die Lokalisierung von Myotilin in diesen Organen zu untersuchen, wurden indirekte Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Dazu wurden fixierte Gefrierschnitte mit den Myotilin-Antikörpern sowie fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpern angefärbt. Als Epithelzellmarker wurde Zytokeratin verwendet.

In Gefrierschnitten der Lunge wurden mit beiden Myotilin-Antikörpern die Glattmuskelzellen um die Bronchioli herum angefärbt (Abbildung 4.7 A und B, Myotilin: rot). Bronchioli sind kleine Äste der Bronchien und sind von einem einschichtigen Flimmerepithel ausgekleidet und von einer Schicht glatter Muskulatur umgeben. Myotilin wurde auch in den Wänden der Blutgefäße angefärbt (Abbildung 4.7 A und B). Wahrscheinlich lokalisiert Myotilin in der Glattmuskelzellen enthaltenden Schicht (Tunica media) der Gefäßwände, die insgesamt aus drei Schichten bestehen. Die äußere Schicht wird Tunica externa oder Tunica adventitia und die innere Tunica intima genannt. Dazwischen liegt die Tunica media, deren Dicke in den unterschiedlichen Gefäßarten variieren kann.

Die Keratinfärbung in den Gefrierschnitten der Lunge war spezifisch in den Epithelzellen der Bronchioli zu sehen (Abbildung 4.7 A und B, Keratin: rot). Als Negativkontrolle dienten Schnitte, die nicht mit den Primärantikörpern sondern ausschließlich mit den Sekundärantikörpern inkubiert wurden. In diesen Kontrollen war kein Fluoreszenzsignal nachweisbar (Abbildung 4.7 C).

In Gefrierschnitten von Darmgewebe war mit beiden Myotilin-Antikörpern eine Lokalisation von Myotilin in den Längs- und Ringmuskulatursschichten zu erkennen (Abbildung 4.8 A und C, Myotilin: rot). Zum Teil war eine punktförmige Färbung wie bei α -Aktinin in den „dense bodies“ zu sehen (Abbildung 4.8 A und C, Pfeilspitzen), größtenteils war die Färbung jedoch eher diffus. Zwischen den quer angeschnittenen Darmzotten war Myotilin auch in den Myofibroblasten nachweisbar (Abbildung 4.8 A und B).

Abbildung 4.7: Lokalisierung von Myotilin in der Lunge

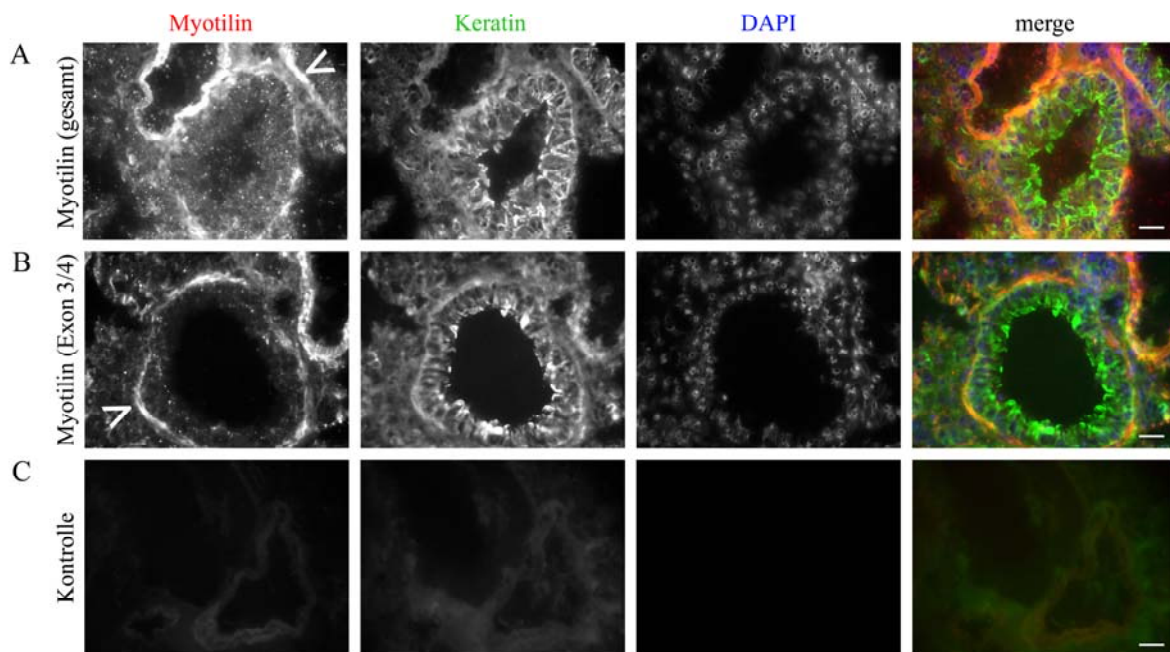


Abbildung 4.7: Lokalisierung von Myotilin in der Lunge der Maus. Die Markierung von Myotilin (rot) erfolgte mit den Antikörpern gegen (A) Myotilin (gesamt) bzw. (B) Myotilin (Exon 3/4). Zytokeratin (grün) wurde mit Hilfe des Antikörpers C-11 markiert. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt. Zur Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit den eingesetzten Sekundärantikörpern inkubiert wurden (C).

Die Pfeilspitzen (>) zeigen Myotilin in den Glattmuskelzellen um die Bronchioli herum. Messbalken: 20 μ m.

Abbildung 4.8: Lokalisierung von Myotilin im Darm

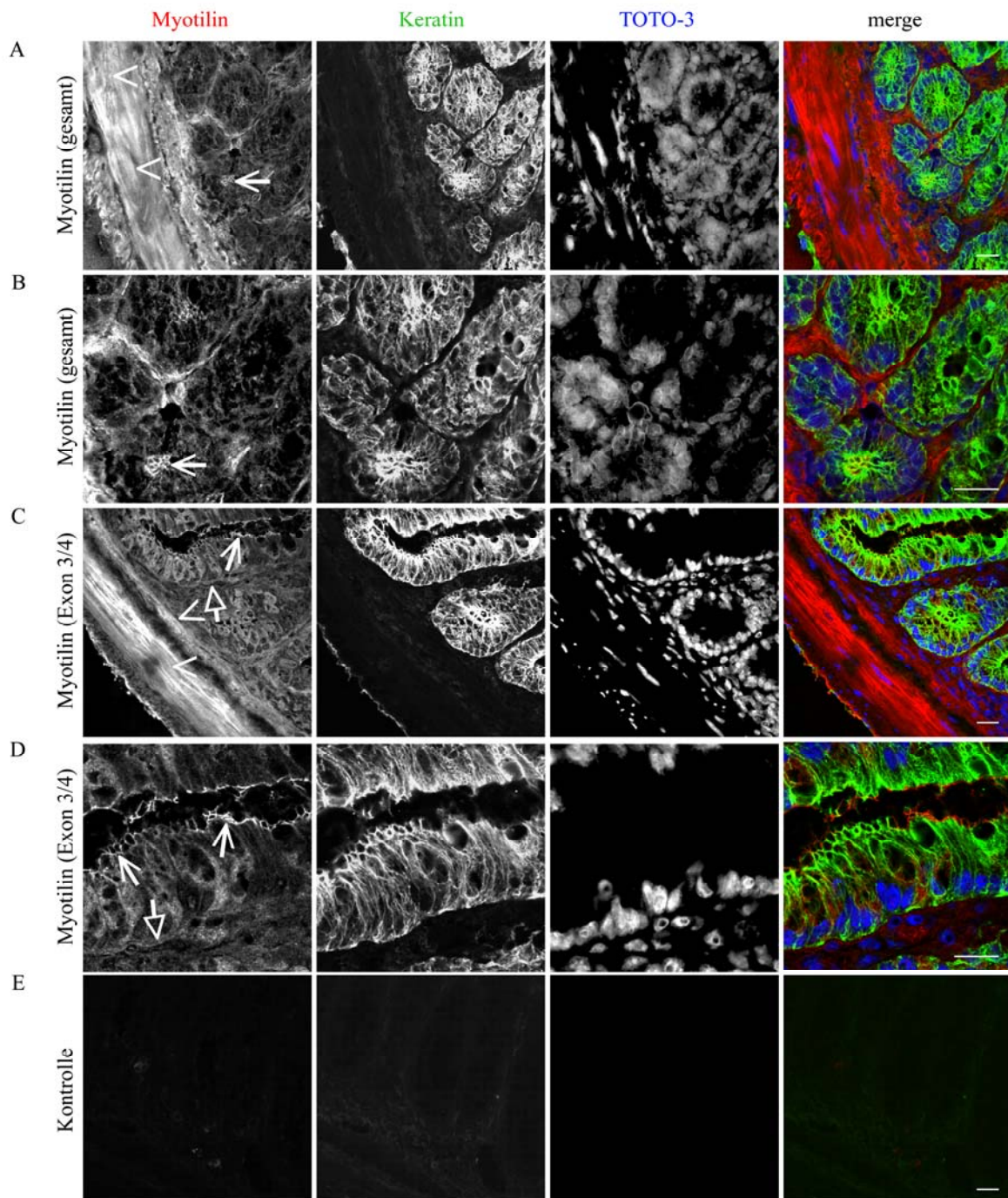


Abbildung 4.8: Lokalisierung von Myotilin im Darm der Maus. Die Markierung von Myotilin (rot) erfolgte mit den Antikörpern gegen (A, B) Myotilin (gesamt) bzw. (C, D) Myotilin (Exon 3/4). Zytokeratin (grün) wurde mit Hilfe des Antikörpers C-11 markiert. Die Zellkerne (blau) wurden mit TOTO-3-Jodid angefärbt. Zur Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit den eingesetzten Sekundärantikörpern inkubiert wurden (E).

Die Pfeilspitzen (>) markieren punktförmige Färbung von Myotilin in den Glattmuskelzellen. Die Pfeile mit geöffneter Spitze zeigen Myotilin an Zell-Zell-Grenzen von Epithelzellen. Die Pfeile mit geschlossener Spitze markieren die Epithelzellbasis. Messbalken: 20 µm.

Die Lokalisierung von Myotilin in den Glattmuskelzellen des Darms konnte aufgrund des Vorkommens von Myotilin in quergestreiften Muskelzellen erwartet werden. Überraschenderweise war jedoch außerdem eine Färbung der Zellgrenzen der Darmepithelzellen zu erkennen (Abbildung 4.8 A bis D, Myotilin: rot; Keratin: grün; Pfeile mit geöffneter Spitze). Die Myotilinfärbung trat an den Längsseiten zwischen den Epithelzellen sowie an der apikalen Seite auf. Dies deutete auf eine Beteiligung von Myotilin am Aufbau der Zell-Zell-Kontakte hin und wurde daher eingehender untersucht (Kapitel 4.3.2). An den basalen Zellseiten ist nur ein schwaches Myotilinsignal nachweisbar (Abbildung 4.8 C und D, Pfeile mit geschlossener Spitze), was eine Beteiligung von Myotilin beim Aufbau von Zell-Matrix-Kontakten eher unwahrscheinlich macht.

4.3.2 Lokalisierung von Myotilin im Bereich von Zell-Zell-Kontakten

Um die genaue Lokalisierung von Myotilin im Bereich von Zell-Zell-Kontakten zu untersuchen, wurden Gefrierschnitte des Darms mit den Antikörpern Myotilin (gesamt) bzw. Myotilin (Exon 3/4) sowie Antikörpern gegen verschiedene Markerproteine für Zell-Zell-Kontakte gefärbt.

Beim Darmepithel handelt es sich um ein polares, einschichtiges, hochprismatisches Epithel mit unterschiedlichen Arten von Zell-Zell-Kontakten. Die verschiedenen Zell-Zell-Kontakte sind im so genannten Schlussleistenkomplex in spezifischer Reihenfolge angeordnet (Abbildung 1.4). Am weitesten apikal liegen dabei die „tight junctions“, weiter basal die Gürteldesmosomen und anschließend die Desmosomen.

„Tight junctions“ werden von Transmembranproteinen, den Occludinen und Claudinen, die zytosolisch z. B. über ZO-1 mit dem Aktinzytoskelett interagieren, aufgebaut (Hartsock und Nelson, 2008; Mitic et al., 2000). Als Marker für die Zonula occludens („tight junctions“) wurden hier ZO-1 und Occludin gewählt.

Gürteldesmosomen werden unter anderem von Transmembranproteinen der Cadherinfamilie aufgebaut. Die zytosolische Verbindung von Cadherinen zum Aktinzytoskelett wird durch Adapterproteine gewährleistet. Die Zonula adhaerens (Gürteldesmosomen) wurde hier mit Antikörpern gegen Cadherin bzw. intrazellulär mit α -Catenin, β -Catenin, Vinculin und α -Aktinin markiert.

Das Protein ZO-1 als Marker für die Zonula occludens konnte entlang der Zell-Zell-Grenzen im apikalen Bereich der Epithelzellen der Darmzotten lokalisiert werden (Abbildung 4.9 A bis D, ZO-1: grün). Myotilin wurde mit den beiden Antikörpern Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) ebenfalls in diesen Bereichen nachgewiesen (Abbildung 4.9 A bis D, Myotilin: rot). Jedoch kolokalisierten die beiden Proteine Myotilin und ZO-1 nicht an allen Stellen vollständig. Teils war die Myotilinfärbung im Vergleich zur ZO-1-Färbung leicht in basale oder apikale Richtung versetzt (Abbildung 4.9 B, Pfeile). Die Verschiebung in basale

Richtung war besonders an Stellen auffällig, an denen die Schnittebene senkrecht zur apikalen Seite der Zellen verlief (Abbildung 4.9 A und C, Pfeilspitzen). Dort war im apikalen Bereich der Zell-Zell-Grenze eine Kolokalisation sichtbar, weiter basal wurde jedoch ausschließlich Myotilin angefärbt. Außerdem war teils eine Mikrovillisaum-ähnliche Färbung an der apikalen Seite der Epithelzellen zu beobachten. In den Kontrollen, die nur mit den Sekundärantikörpern inkubiert wurden, war kein Fluoreszenzsignal detektierbar (Abbildung 4.9 E).

Auch der „tight junctions“-Marker Occludin kolokalisierte partiell mit Myotilin (Abbildung 4.10 A bis D, Myotilin: rot; Occludin: grün). Die Färbemuster von Occludin ähnelten wie erwartet denen von ZO-1. Die Myotilinfärbung überlagerte sich wie schon bei ZO-1 zum Teil mit dem Occludinsignal, war jedoch auch hier an einigen Stellen etwas versetzt. Myotilin lokalisierte in den Zell-Zell-Grenzen zusätzlich weiter basal von Occludin (Abbildung 4.10 A) und war auch an der apikalen Seite der Zellen zu sehen (Abbildung 4.10 A und C, Pfeilspitzen).

Der Vergleich der Myotilinfärbung mit den Markern ZO-1 und Occludin gibt einen Hinweis darauf, dass Myotilin sowohl eine Rolle in „tight junctions“ als auch in weiter basal gelegenen Zell-Zell-Kontakten der Darmepithelzellen spielen könnte.

Die Myotilinfärbung an der apikalen Seite der Zellen deutete darauf hin, dass Myotilin im Mikrovillisaum lokalisieren könnte. Eine Gegenfärbung mit Antikörpern gegen das aktinbündelnde Protein Villin, das einen Marker für den Mikrovillisaum darstellt, zeigte jedoch nur eine partielle Kolokalisation der beiden Proteine (Abbildung 4.11 A bis D, Myotilin: rot; Villin: grün). Myotilin war zum Teil weiter basal bzw. weiter Richtung Zellzentrum nachweisbar als Villin (Abbildung 4.11, Pfeile). Dies könnte auf eine Lokalisation im Terminalgeflecht („terminal web“) hindeuten. In Bereichen der Gefrierschnitte, in denen die Mikrovilli quer angeschnitten wurden, war eine punktförmige Färbung von Villin zu sehen, die zum Teil auch mit Myotilin zu erkennen war (Abbildung 4.11 B und D, Pfeilspitzen). Die Punkte überlagerten jedoch nur in seltenen Fällen.

Auch die Zonula adhaerens-Marker Cadherin, α -Catenin, β -Catenin, Vinculin und α -Aktinin zeigten in indirekten Immunfluoreszenzstudien eine partielle Kolokalisation mit Myotilin. Mit dem Antikörper gegen Pan-Cadherin konnte eine Färbung der Epithelzellgrenzen nachgewiesen werden, die auch mit den beiden Myotilin-Antikörpern angefärbt wurden (Abbildung 4.12 A und B, Myotilin: rot; Cadherin: grün). Die Myotilin-Färbung war insgesamt stärker und zudem im Gegensatz zur Cadherin-Färbung weiter basal an den Zell-Zell-Grenzen zu beobachten (Abbildung 4.12 A, Pfeilspitze). An einigen Stellen war die Myotilinfärbung verglichen mit dem Cadherinsignal jedoch auch weiter in apikale Richtung verschoben (Abbildung 4.12 A und B, Pfeile).

Mit α -Catenin kolokalisierte Myotilin an den Zell-Zell-Grenzen (Abbildung 4.13 A und B, Myotilin: rot; α -Catenin: grün). An einigen Stellen war die Myotilinfärbung im Vergleich zur α -Catenin-Färbung in apikale Richtung verschoben (Abbildung 4.13 A und B, Pfeile). Myotilin konnte auch wieder an den apikalen Seiten der Epithelzellen nachgewiesen werden. Bei der Färbung mit dem Antikörper gegen β -Catenin wurden im Wesentlichen dieselben Beobachtungen gemacht (Abbildung 4.14 A und B, Myotilin: rot; α - und β -Catenin: grün).

Mit dem Antikörper hVin-1 konnte in Darm-Gefrierschnitten das Protein Vinculin in den Zell-Zell-Kontakten der Epithelzellen der Darmzotten nachgewiesen werden (Abbildung 4.15 A und B, Vinculin: grün). Myotilin kolokalisierte partiell mit Vinculin (Abbildung 4.15 A und B, Myotilin: rot). Das Fluoreszenzsignal von Myotilin war jedoch wie bei der Vergleichsfärbung mit Cadherin an einigen Stellen in apikale Richtung verschoben (Abbildung 4.15 A und B, Pfeile). Myotilin war im Gegensatz zu Vinculin zudem an der apikalen Seite der Epithelzellen nachweisbar.

Mit α -Aktinin kolokalisierte Myotilin partiell sowohl in den Zell-Zell-Kontakten der Epithelzellen als auch in den Glattmuskelzellen des Darms (Abbildung 4.16 A bis D, Myotilin: rot; α -Aktinin: grün). Da bekannt ist, dass α -Aktinin und Myotilin interagieren können (Salmikangas et al., 1999), war diese Kolokalisation zu erwarten. In den Glattmuskelzellen zeigte α -Aktinin eine punktförmige Färbung, die bei Myotilin nur an einigen Stellen zu sehen war (Abbildung 4.16 B und D). Die Myotilinfärbung war in den Glattmuskelzellen größtenteils diffus und ohne erkennbare Strukturen.

In allen durchgeführten Färbungen ähnelten sich die Färbemuster der beiden Myotilin-Antikörper, und in keiner Kontrolle waren Fluoreszenzsignale nachweisbar (Abbildungen 4.9 bis 4.16 E).

4.3.3 Lokalisierung von Myotilin in isolierten murinen Kardiomyozyten

Es ist bekannt, dass Myotilin in den Z-Scheiben und an der sarkolemmalen Membran von Skelettmuskelzellen lokalisiert (Salmikangas et al., 1999). Zur Untersuchung der Lokalisation von Myotilin in Herzmuskelzellen wurden murine Kardiomyozyten isoliert, fixiert und mit den Antikörpern Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) sowie fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt. Die Z-Scheiben wurden mit dem Titin-spezifischen Antikörper T12 markiert.

Erwartungsgemäß konnte Myotilin mit beiden Antikörpern in den Z-Scheiben der Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Abbildung 4.17 A und B, Myotilin: rot; Titin: grün), was sich durch Kolokalisation mit dem Z-Scheiben-Epitop von Titin zeigen ließ. Eine zusätzliche diffuse Myofibrillenfärbung war zwischen den Z-Scheiben erkennbar. Die Lokalisation von Myotilin am Sarkolemma wurde beim Durchfokussieren des Präparates am

Mikroskop deutlich. In der Negativkontrolle ohne Primärantikörper war kein Fluoreszenzsignal sichtbar (Abbildung 4.17 C).

Interessanterweise ließ sich Myotilin außerdem in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten nachgewiesen. Die Glanzstreifen („intercalated discs“, Disci intercalares) enthalten mehrere Arten von Zell-Zell-Kontakten und verlaufen stufenförmig zwischen den Kardiomyozyten (Abbildung 1.5). Morphologisch ähneln die Zell-Zell-Kontakte den Desmosomen und Gürteldesmosomen von Epithelzellen, jedoch variiert ihre Proteinzusammensetzung (Borrmann et al., 2006; Franke et al., 2006). Myotilin war überwiegend in den transversalen Abschnitten der Glanzstreifen (Abbildung 4.17 A, Pfeilspitze und B, untere Pfeilspitze), zudem jedoch auch in den longitudinalen Teilabschnitten nachweisbar (Abbildung 4.17 B, obere Pfeilspitze).

4.3.4 Zusammenfassung der Lokalisierungsstudien

Die indirekten Immunfluoreszenzuntersuchungen an murinem Lungen- und Darmgewebe zeigten eine Lokalisation von Myotilin in Glattmuskelzellen. In der Lunge war Myotilin mit den beiden Antikörpern Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) in den Glattmuskelzellen um die Bronchioli herum und in der Tunica media der Blutgefäßwände nachweisbar (Abbildung 4.7). Im Darm wurde Myotilin mit beiden Antikörpern in der Ring- und Längsmuskulatur zum Teil punktförmig wie α -Aktinin in den „dense bodies“ angefärbt (Abbildungen 4.8 und 4.16).

Überraschenderweise war Myotilin auch in den Zell-Zell-Kontakten der Epithelzellen der Darmzotten nachweisbar. Dort zeigte es eine partielle Kolokalisation mit den „tight junction“-Konstituenten ZO-1 und Occludin (Abbildungen 4.9 und 4.10). An einigen Zell-Zell-Grenzen war Myotilin auch weiter basal von der Zonula occludens nachweisbar. Außerdem war teils eine Mikrovillisaum-ähnliche Färbung an der apikalen Seite der Zellen zu beobachten. Auch mit Villin kolokalisierte Myotilin allerdings nur partiell (Abbildung 4.11).

Auch die Zonula adhaerens-Bestandteile Cadherin, α -Catenin, β -Catenin, Vinculin und α -Aktinin zeigten in indirekten Immunfluoreszenzstudien von Darmschnitten lediglich eine partielle Kolokalisation mit Myotilin (Abbildungen 4.12 bis 4.16).

In Kardiomyozyten wurde Myotilin in den Z-Scheiben sowie in den Glanzstreifen nachgewiesen (Abbildung 4.17).

Abbildung 4.9: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und ZO-1

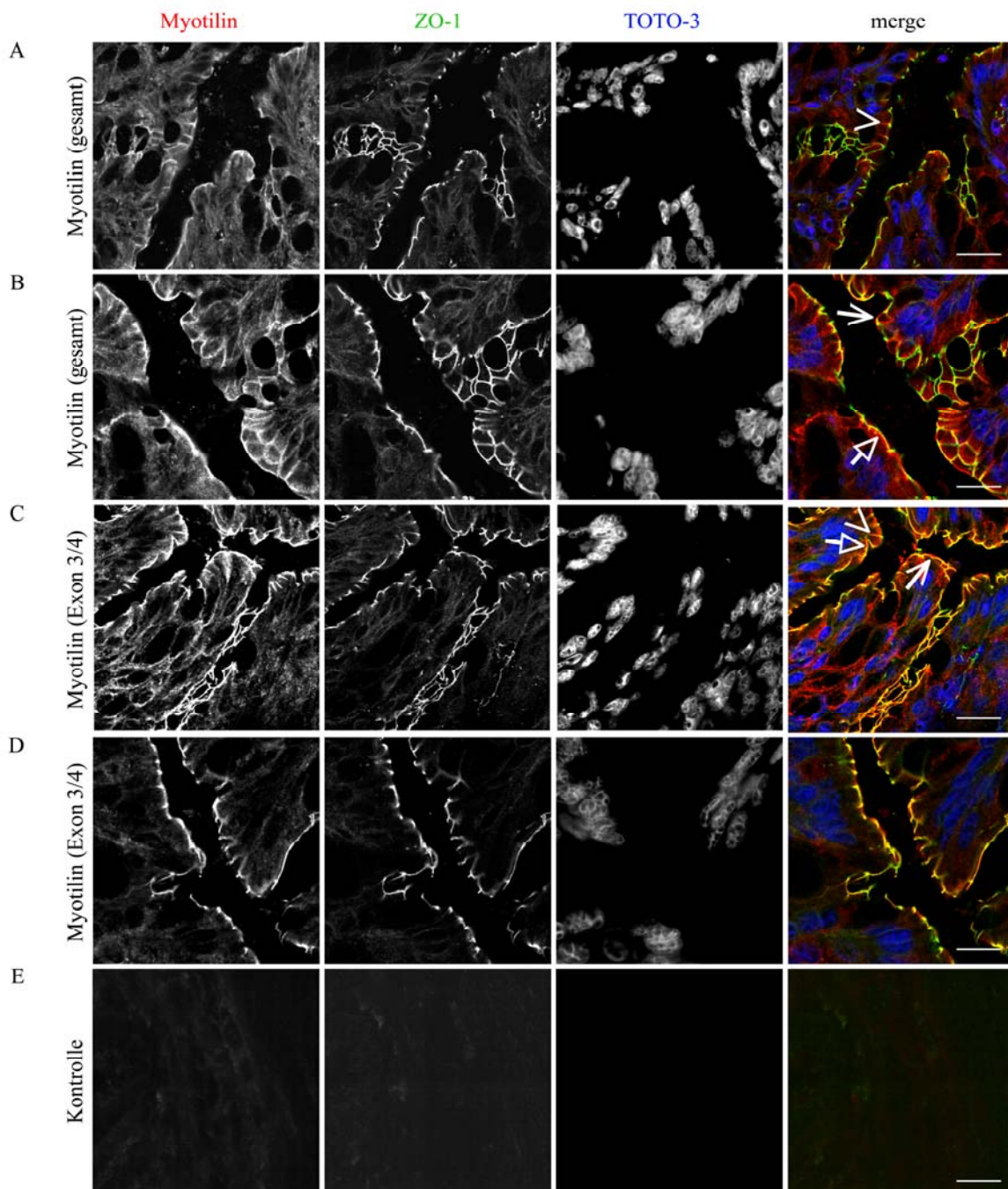


Abbildung 4.9: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und ZO-1 im Darm der Maus. Die Markierung von Myotilin (rot) erfolgte mit den Antikörpern gegen (A, B) Myotilin (gesamt) bzw. (C, D) Myotilin (Exon 3/4). ZO-1 (grün) ist ein Marker für die Zonula occludens. Die Zellkerne (blau) wurden mit TOTO-3-Jodid angefärbt. Zur Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit den eingesetzten Sekundärantikörpern inkubiert wurden (E). Myotilin und ZO-1 kolokalisieren partiell. Die Pfeilspitzen (>) markieren Myotilin in Zell-Zell-Grenzen basal von ZO-1. Die Pfeile mit geschlossener bzw. geöffneter Spitze zeigen – verglichen mit dem ZO-1-Signal – eine Verschiebung der Myotilinfärbung in basale respektive apikale Richtung. Messbalken: 20 µm.

Abbildung 4.10: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Occludin

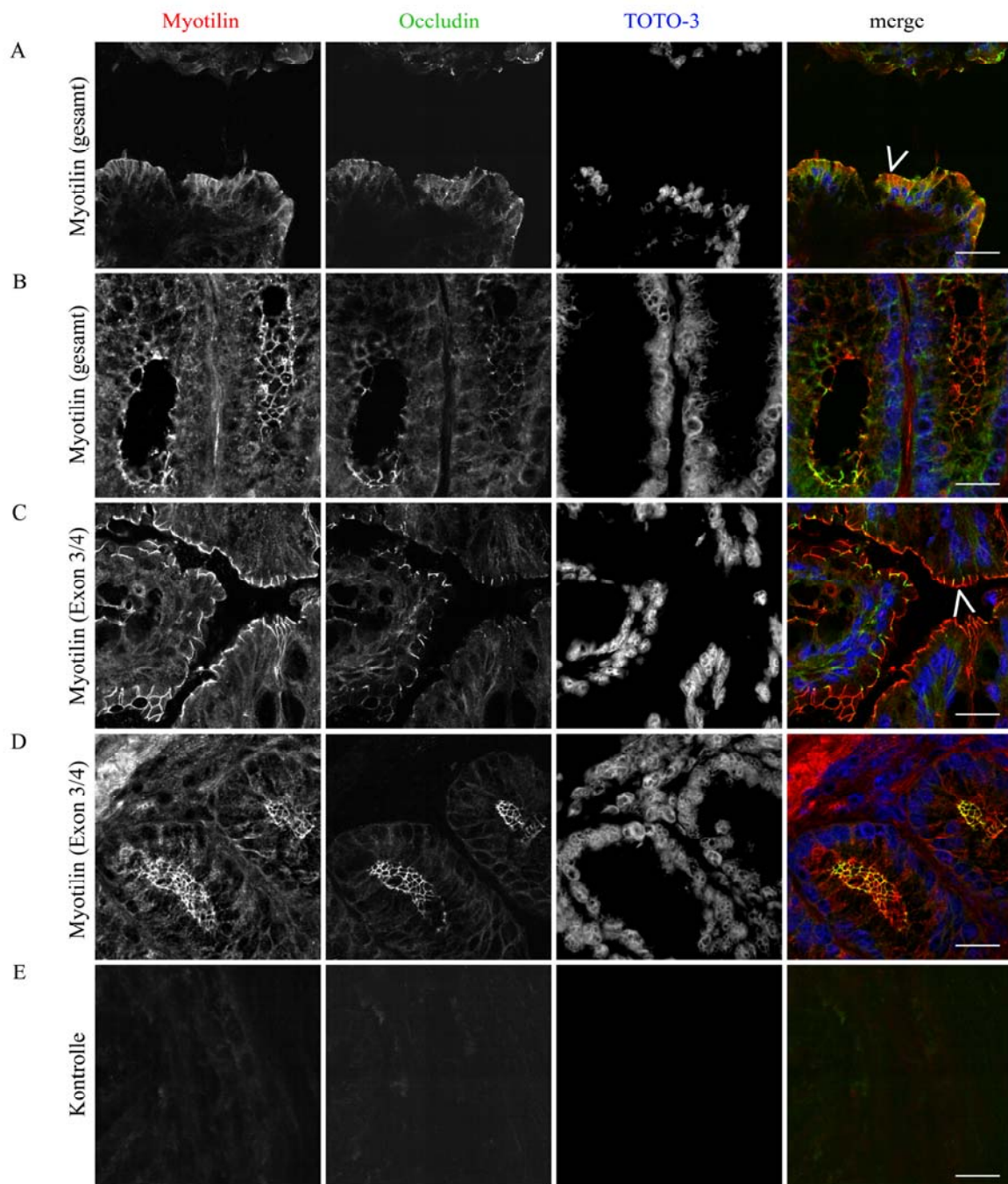


Abbildung 4.10: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Occludin im Darm der Maus. Die Markierung von Myotilin (rot) erfolgte mit den Antikörpern gegen (A, B) Myotilin (gesamt) bzw. (C, D) Myotilin (Exon 3/4). Occludin (grün) ist ein Marker für die Zonula occludens. Die Zellkerne (blau) wurden mit TOTO-3-Jodid angefärbt. Zur Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit den eingesetzten Sekundärantikörpern inkubiert wurden (E). Myotilin und Occludin kolokalisieren partiell. Die Pfeilspitzen (>) zeigen Myotilin an der apikalen Seite der Epithelzellen. Messbalken: 20 µm.

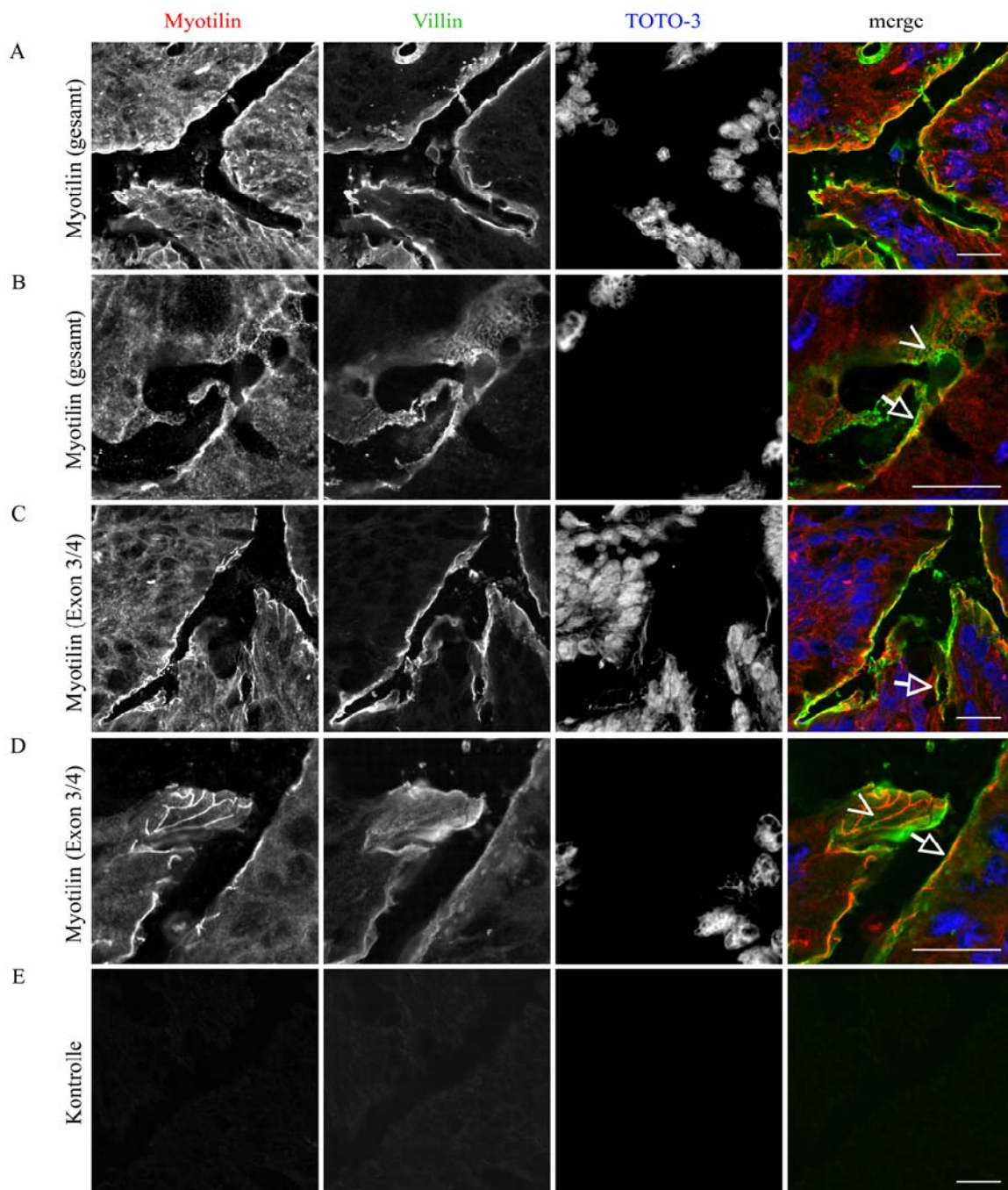
Abbildung 4.11: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Villin

Abbildung 4.11: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Villin im Darm der Maus. Die Markierung von Myotilin (rot) erfolgte mit den Antikörpern gegen (A, B) Myotilin (gesamt) bzw. (C, D) Myotilin (Exon 3/4). Villin (grün) ist ein Marker für den Mikrovillisaum. Die Zellkerne (blau) wurden mit TOTO-3-Jodid angefärbt. Zur Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit den eingesetzten Sekundärantikörpern inkubiert wurden (E). Myotilin und Villin kolokalisieren partiell. Die Pfeile markieren Stellen, an denen die Myotilinfärbung im Vergleich zum Villinsignal in basale Richtung verschoben ist. Die Pfeilspitzen (>) zeigen quer angeschnittene Mikrovilli. Messbalken: 20 μm .

Abbildung 4.12: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Cadherin

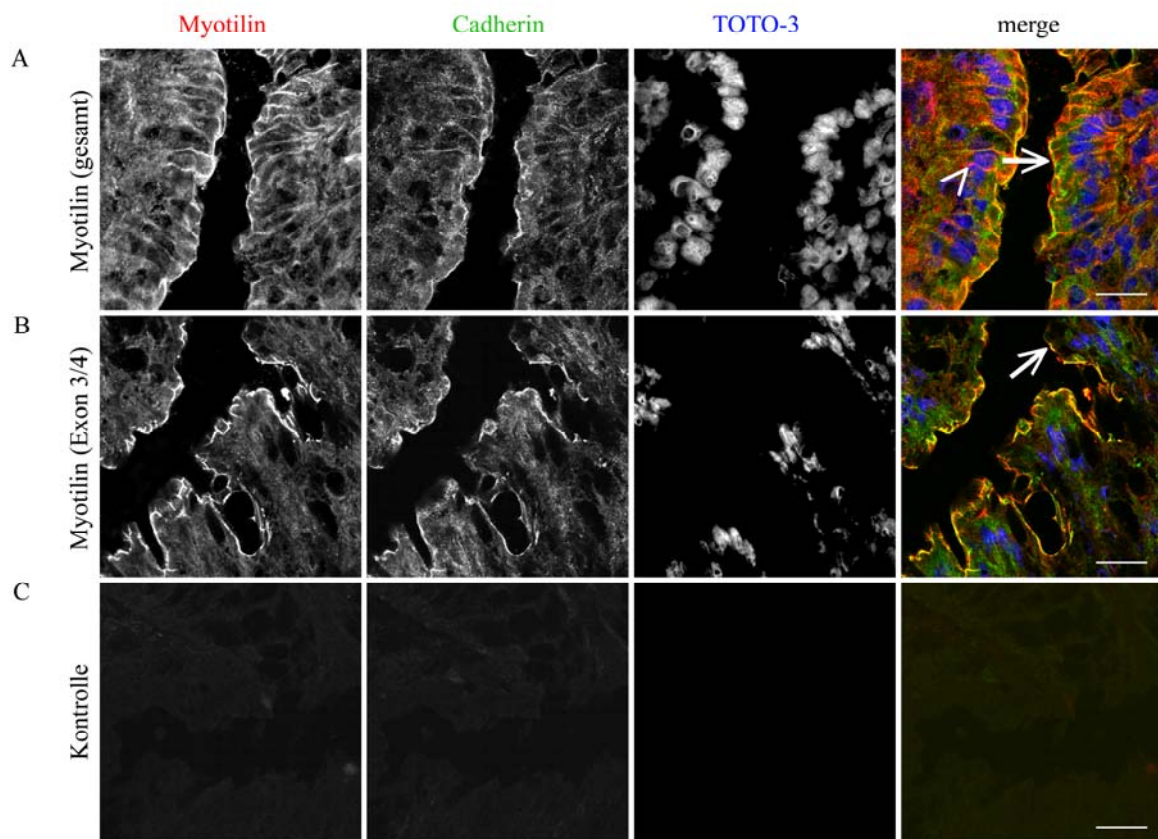


Abbildung 4.12: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Cadherin im Darm der Maus. Die Markierung von Myotilin (rot) erfolgte mit den Antikörpern gegen (A) Myotilin (gesamt) bzw. (B) Myotilin (Exon 3/4). Cadherin (grün) wurde mit Hilfe des Antikörpers gegen Pan-Cadherin markiert. Die Zellkerne (blau) wurden mit TOTO-3-Jodid angefärbt. Zur Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit den eingesetzten Sekundärantikörpern inkubiert wurden (C). Myotilin kolokalisiert partiell mit Cadherin. Die Pfeile zeigen – verglichen mit dem Cadherin-Signal – eine Verschiebung der Myotilinfärbung in apikale Richtung. Die Pfeilspitze (>) markiert Myotilin in Zell-Zell-Grenzen basal von Cadherin. Messbalken: 20 μm .

Abbildung 4.13: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und α -Catenin

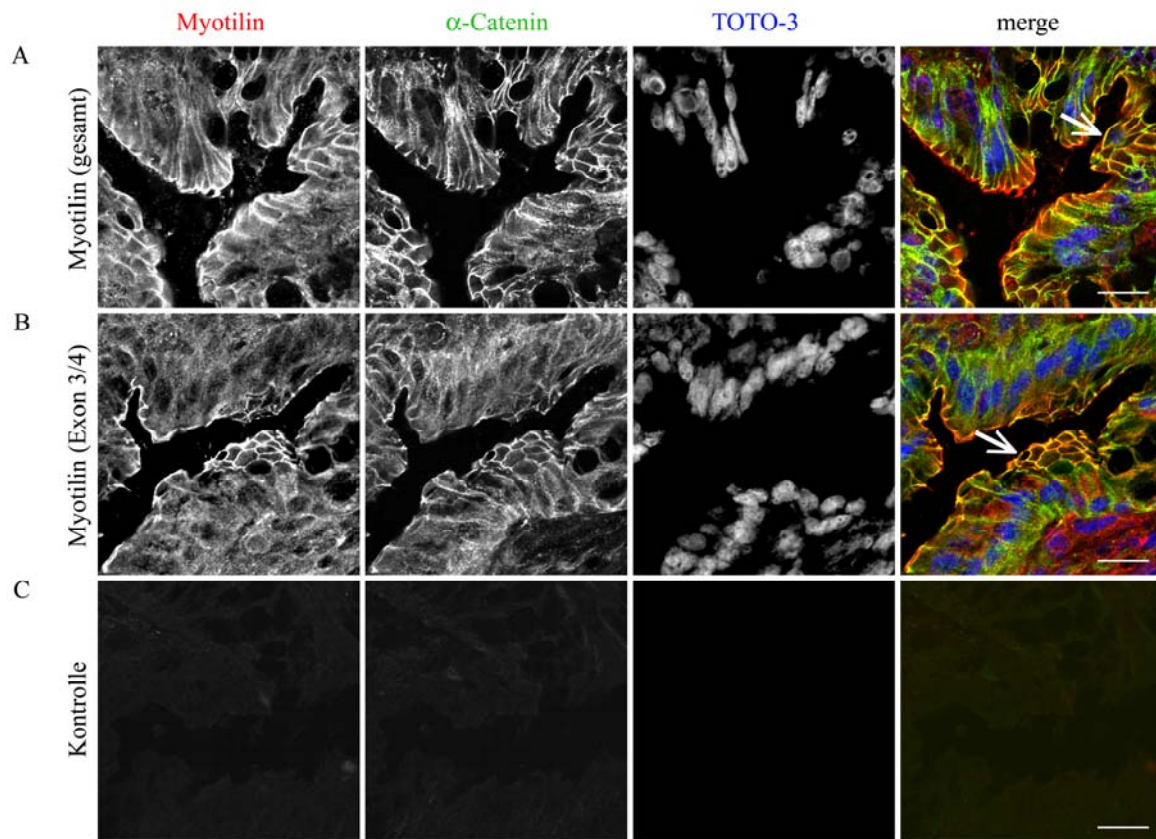


Abbildung 4.13: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und α -Catenin im Darm der Maus. Die Markierung von Myotilin (rot) erfolgte mit den Antikörpern gegen (A) Myotilin (gesamt) bzw. (B) Myotilin (Exon 3/4). α -Catenin (grün) ist ein Marker für die Zonula adhaerens. Die Zellkerne (blau) wurden mit TOTO-3-Jodid angefärbt. Zur Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit den eingesetzten Sekundärantikörpern inkubiert wurden (C). Myotilin kolokalisiert partiell mit α -Catenin. Die Pfeile zeigen – verglichen mit dem α -Catenin-Signal – eine Verschiebung der Myotilinfärbung in apikale Richtung. Messbalken: 20 μ m.

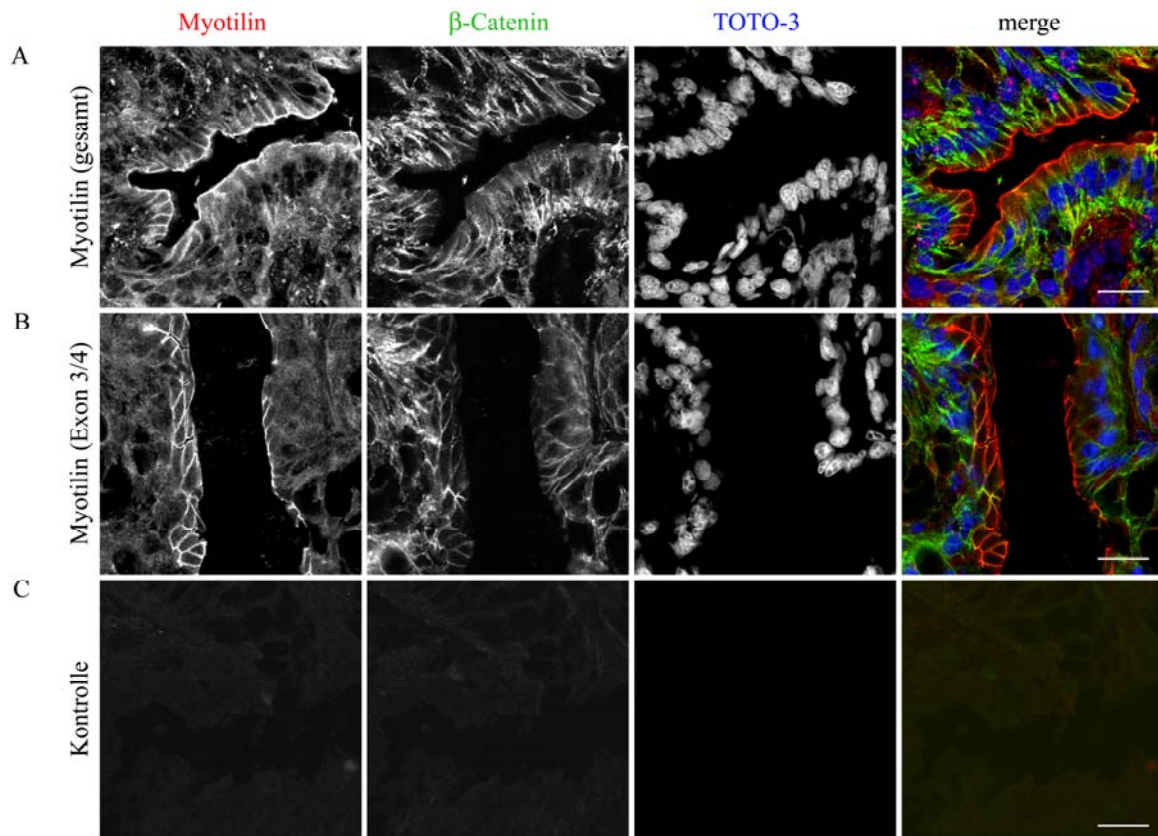
Abbildung 4.14: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und β -Catenin

Abbildung 4.14: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und β -Catenin im Darm der Maus. Die Markierung von Myotilin (rot) erfolgte mit den Antikörpern gegen (A) Myotilin (gesamt) bzw. (B) Myotilin (Exon 3/4). β -Catenin (grün) ist ein Marker für die Zonula adhaerens. Die Zellkerne (blau) wurden mit TOTO-3-Jodid angefärbt. Zur Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit den eingesetzten Sekundärantikörpern inkubiert wurden (C). Messbalken: 20 μ m.

Abbildung 4.15: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Vinculin

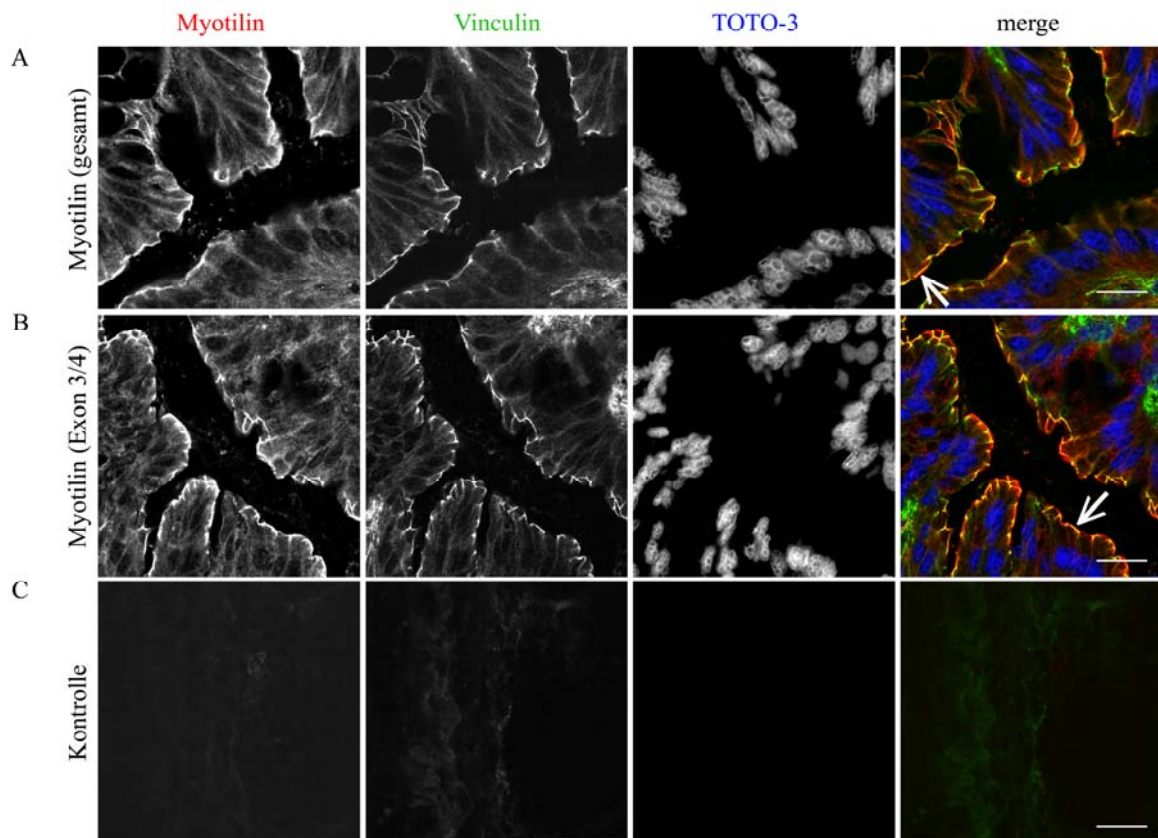


Abbildung 4.15: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und Vinculin im Darm der Maus. Die Markierung von Myotilin (rot) erfolgte mit den Antikörpern gegen (A) Myotilin (gesamt) bzw. (B) Myotilin (Exon 3/4). Der Zonula adhaerens-Marker Vinculin (grün) wurde mit Hilfe des Antikörpers hVin-1 markiert. Die Zellkerne (blau) wurden mit TOTO-3-Jodid angefärbt. Zur Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit den eingesetzten Sekundärantikörpern inkubiert wurden (C).

Myotilin kolokalisiert partiell mit Vinculin. Die Pfeile zeigen – verglichen mit dem Vinculin-Signal – eine Verschiebung der Myotilinfärbung in apikale Richtung. Messbalken: 20 μm .

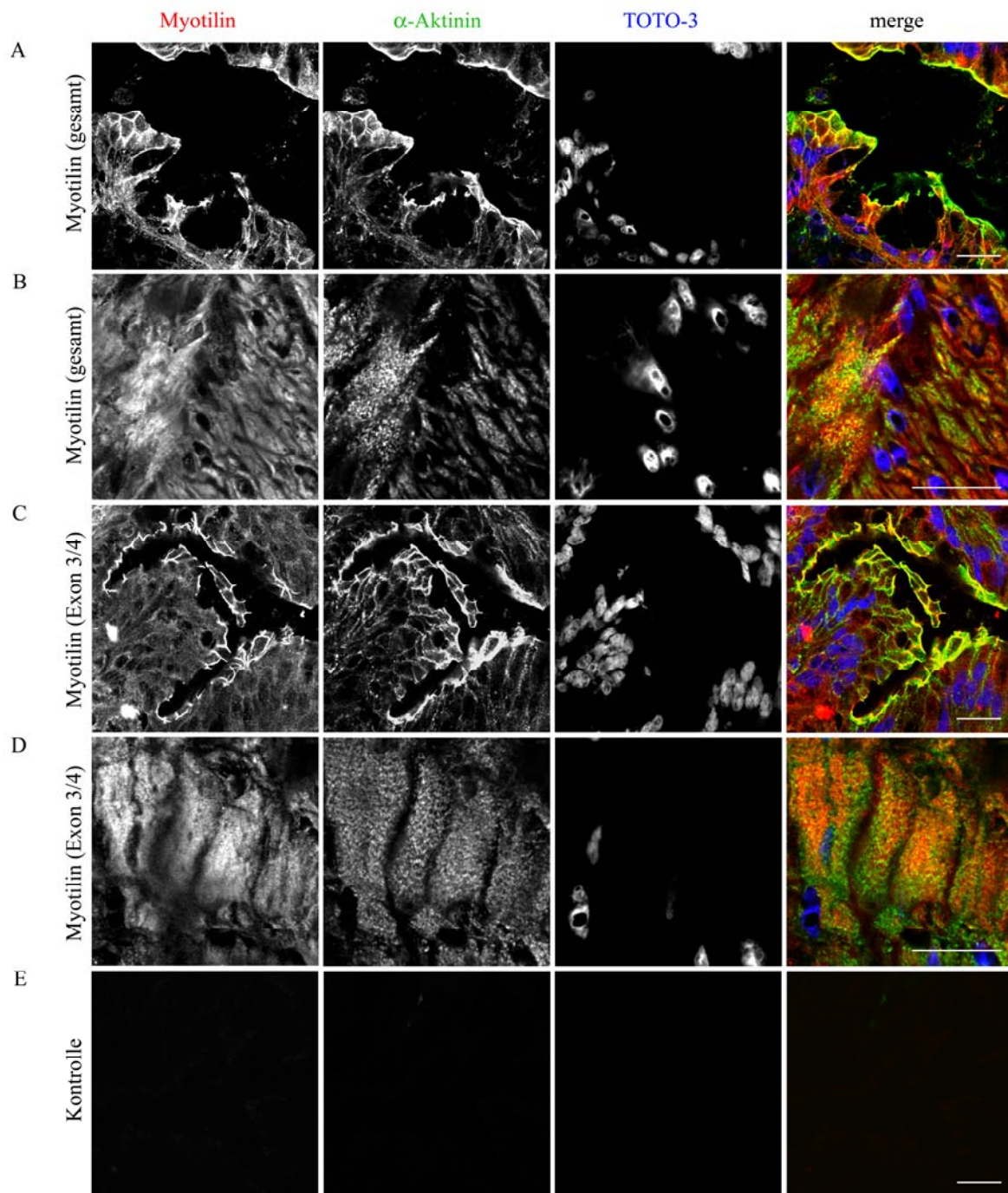
Abbildung 4.16: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und α -Aktinin

Abbildung 4.16: Vergleich der Lokalisierung von Myotilin und α -Aktinin im Darm der Maus. Die Markierung von Myotilin (rot) erfolgte mit den Antikörpern gegen (A, B) Myotilin (gesamt) bzw. (C, D) Myotilin (Exon 3/4). α -Aktinin (grün) wurde mit Hilfe des Antikörpers BM75.2 gegen Pan- α -Aktinin markiert. Die Zellkerne (blau) wurden mit TOTO-3-Jodid angefärbt. Zur Kontrolle dienten Schnitte, die nur mit den eingesetzten Sekundärantikörpern inkubiert wurden (E).

(A) und (C) zeigen Ausschnitte der Darmzotten. Myotilin kolokalisiert partiell mit α -Aktinin an den Zell-Zell-Grenzen der Epithelzellen. In (B) und (D) sind Ausschnitte der Glattmuskelzellschichten des Darms zu sehen. α -Aktinin zeigt eine punktförmige Färbung, die bei Myotilin nur an einigen Stellen zu sehen ist. Die Myotilinfärbung ist in den Glattmuskelzellen größtenteils diffus und ohne erkennbare Strukturen. Messbalken: 20 μ m.

Abbildung 4.17: Lokalisierung von Myotilin in murinen Kardiomyozyten

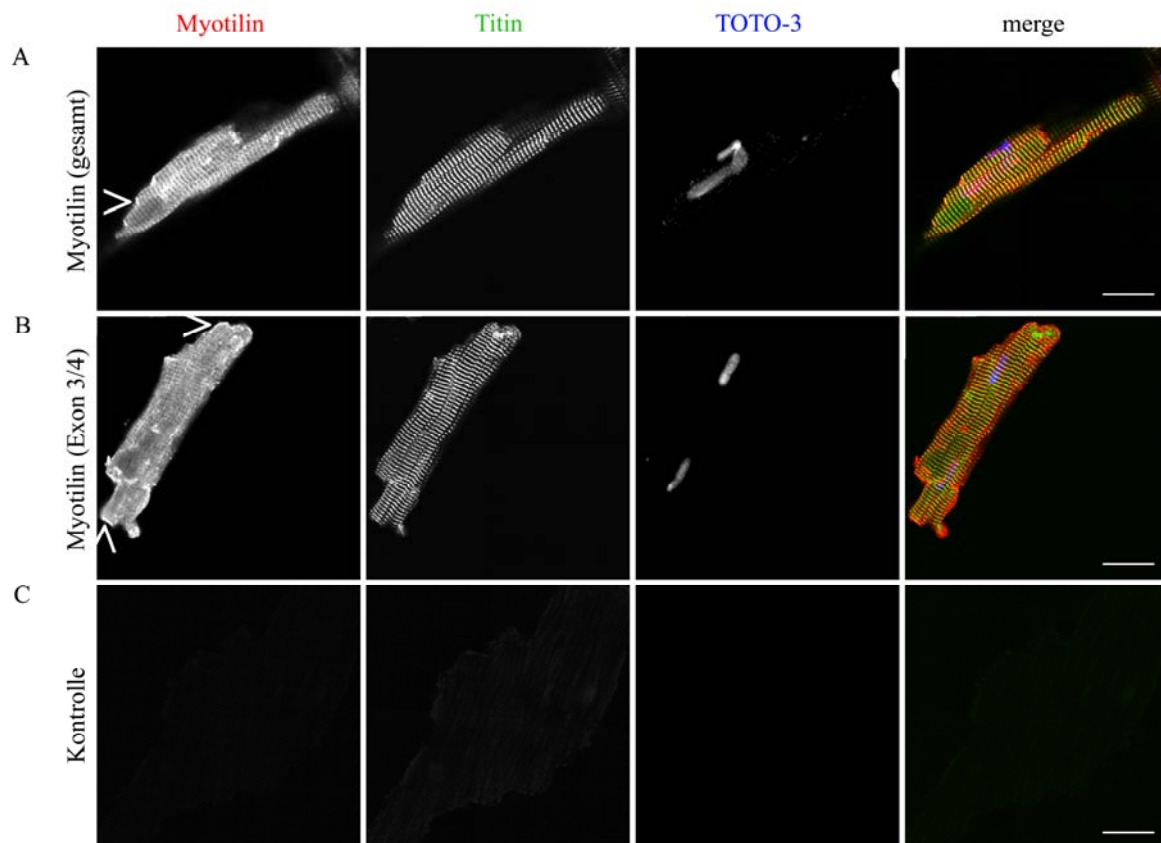


Abbildung 4.17: Lokalisierung von Myotilin in murinen Kardiomyozyten. Die Markierung von Myotilin (rot) erfolgte mit den Antikörpern gegen (A) Myotilin (gesamt) bzw. (B) Myotilin (Exon 3/4). Titin (Z-Bande) wurde mit Hilfe des T12-Antikörpers markiert (grün). Die Zellkerne (blau) wurden mit TOTO-3-Jodid angefärbt. Zur Kontrolle dienen Schnitte, die nur mit den eingesetzten Sekundärantikörpern inkubiert wurden (C). Myotilin kolokalisiert mit Titin in den Z-Scheiben. Die Pfeilspitzen (>) zeigen Myotilin in den Glanzstreifen. Messbalken: 20 μm .

4.4 Lokalisierung von Myotilin in transienten Expressionsstudien

Mit Hilfe der Genanalysen und RT-PCRs (Kapitel 4.1 und 4.2.6) konnten mehrere humane Isoformen des Myotilins ausgemacht werden. Um Einblick in die möglicherweise unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der verschiedenen Isoformen zu erhalten, wurden diese in die Expressionsplasmide pMypG und pEGFP-Cpd kloniert, transiente Expressionen durchgeführt und anschließende indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen unternommen.

4.4.1 Klonierung der Myotilinisofomen in die Plasmide pEGFP-Cpd und pMypG zur Generierung von Myotilin-EGFP-Fusionsproteinen

Zur Generierung von Myotilin-EGFP-Fusionsproteinen dienten die Plasmide pEGFP-Cpd und pMypG als Ausgangsplasmide. Beide Plasmide enthielten eine Sequenz für EGFP („enhanced green fluorescent protein“), das als Fusionsprotein mit der jeweiligen humanen Myotilin-Isoform exprimiert wurde. Mit dem Vektor pEGFP-Cpd wurde die EGFP-Sequenz an den N-Terminus der über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Mlu I* und *Sal I* in den Vektor klonierten Myotilin-Isoform fusioniert, während mit dem Vektor pMypG die EGFP-Sequenz C-terminal angehängt wurde. Beide Vektoren enthielten einen eukaryotischen Promotor, der für die Expression der Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen notwendig ist.

Mit Hilfe der PCR-Technik wurden die Myotilinisofomen amplifiziert. Für die Amplifikation wurden Vorwärtsprimer verwendet, die neben den zur Myotilin-Sequenz komplementären Nukleotiden auch die Sequenz für eine *Mlu I*-Restriktionsschnittstelle enthielten. Die Rückwärtsprimer enthielten eine *Sal I*-Schnittstelle. Die Isoform a wurde mit den Primern „TTID1f“ und „TTID498r“ amplifiziert, Isoform b mit „Myot_M116f“ und „TTID498r“, Isoform c mit „Myot_M185f“ und „TTID498r“, Isoform d mit „TTID1f“ und „Myot_228r_Sal“ und Isoform g mit „Myot_M116f“ und „Myot_M185f“. Die PCR-Produkte und die Plasmide wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Mlu I* und *Sal I* geschnitten, aufgereinigt und ligiert. Die entstandenen Plasmide wurden nach dem Ausgangsvektor und der Myotilin-Isoform (Abbildung 4.1 A) benannt (z. B. pEGFP-Cpd-Myotilin a, pMypG-Myotilin b usw.).

4.4.2 Kontrolle der Expression der Myotilin-EGFP-Fusionsproteine in HEK-293-Zellen

Zur Kontrolle der Expression der Myotilin-EGFP-Fusionsproteine wurden die Myotilin-EGFP-Vektoren in HEK-293-Zellen transient transfiziert. Aus den transfizierten Zellen wurden Triton-Proteinextrakte hergestellt, die auf Nitrozellulosemembranen überführt wurden. Der Nachweis der Expression der Fusionsproteine erfolgte mit dem Antikörper Anti-GFP. Die erwarteten Molekularmassen der Fusionsproteine wurden aus den in der Abbildung

4.1 angegebenen Werten sowie der molekularen Masse von EGFP, die bei 26,9 kDa liegt, berechnet.

In Proteinextrakten der HEK-293-Zellen, die mit den verschiedenen pEGFP-Cpd-Myotilin-Vektoren transfiziert worden waren, konnten bei allen fünf Konstrukten Banden mit der erwarteten molekularen Masse nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In Proteinextrakten aus mit pEGFP-Cpd-Myotilin a transfizierten Zellen konnte die erwartete Bande von 82,3 kDa nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die Fusionsproteine aus pEGFP-Cpd-Myotilin b (69,8 kDa), pEGFP-Cpd-Myotilin c (62 kDa), pEGFP-Cpd-Myotilin d (52 kDa) und pEGFP-Cpd-Myotilin g (39,5 kDa). Es wurde also in allen transfizierten Zellen das vollständige Fusionsprotein exprimiert.

Da im Vektor pMypG die EGFP-Sequenz C-terminal von der Myotilinsequenz liegt, kann aufgrund der Vektorkonstruktion davon ausgegangen werden, dass das gesamte Fusionsprotein exprimiert wurde, wenn EGFP in den Zellen sichtbar war.

Abbildung 4.18: Lokalisierung der EGFP-Myotilin-Fusionsproteine

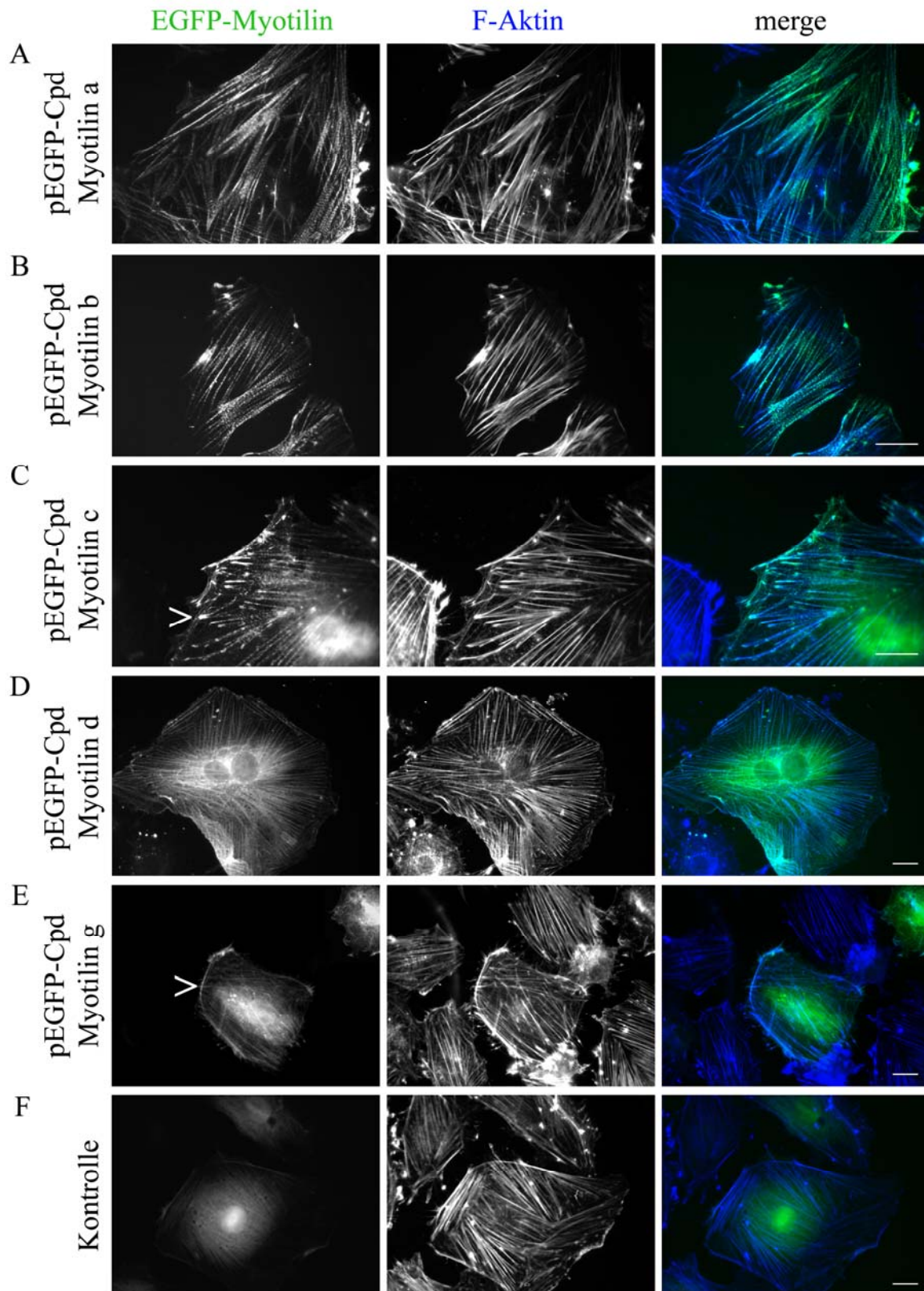


Abbildung 4.18: Lokalisierung der EGFP-Myotilin-Fusionsproteine. A7r5-Zellen wurden mit den Plasmiden pEGFP-Cpd/Myot a (**A**), pEGFP-Cpd/Myot b (**B**), pEGFP-Cpd/Myot c (**C**), pEGFP-Cpd/Myot d (**D**) oder pEGFP-Cpd/Myot g (**E**) transient transfiziert. Zur Kontrolle dienten Zellen, die mit EGFP-Vektoren ohne Myotilinsequenz transfiziert wurden (**F**). F-Aktin (blau) wurde mit Phalloidin-CPITC angefärbt. Messbalken: 20 μm .

4.4.3 Lokalisierung der transient exprimierten Myotilinisofomen in A7r5-Zellen

Um die subzelluläre Lokalisation der Myotilinisofomen in Glattmuskelzellen zu analysieren, wurden die Vektoren mit den Isoformkonstrukten in A7r5-Zellen transient transfiziert. In indirekten Fluoreszenz-Färbungen wurde zusätzlich F-Aktin mit Phalloidin-CPITC angefärbt. Es ist bekannt, dass Myotilin F-Aktin binden kann (Salmikangas et al., 2003). Die Aktin-Bindungsstelle von Myotilin liegt im Bereich der Immunglobulin-ähnlichen Domänen (von Nandelstadh et al., 2005), der in den Konstrukten a, b und c vorhanden ist. Zur Kontrolle dienten Zellen, die mit EGFP-Vektoren ohne Myotilinsequenz transfiziert wurden.

In Zellen, die mit den Konstrukten pEGFP-Cpd-Myotilin a, b, c oder d bzw. pMypG-Myotilin a, b, c oder d transfiziert wurden, war eine perlenschnurartige Färbung der Myotilin-EGFP-Fusionsproteine entlang der Stressfasern zu sehen (Abbildungen 4.18 und 4.19, je A, B und C). Das Färbemuster erinnert an das des α -Aktinin, das in den „dense bodies“ glatter Muskelzellen lokalisiert ist und Myotilin binden kann (Salmikangas et al., 1999). Die Bindung von α -Aktinin an Myotilin erfolgt zwischen den Aminosäuren 79 und 150 (Hauser et al., 2000). Dieser Bereich ist bei den Konstrukten a und d sowie teilweise bei den Konstrukten b und g vorhanden. Abbildung 4.20 A zeigt beispielhaft für pMypG-Myotilin b, dass α -Aktinin mit Myotilin-EGFP in den „dense bodies“ genannten Proteinkomplexen kolokalisiert. Weiterhin wurde Myotilin-EGFP in den Anheftungsplaques („adhesion plaques“) nachgewiesen (Abbildung 4.20 B).

Die Konstrukte pEGFP-Cpd-Myotilin g bzw. pMypG-Myotilin g zeigten keine Lokalisierung entlang der Aktinfilamente. Vielmehr war eine diffuse Färbung, hauptsächlich im Bereich des Zellkerns, zu sehen (Abbildungen 4.18 und 4.19 E), die der der Kontrolle ähnelte. Zum Teil war Myotilin g auch im Bereich des kortikalen Aktinzytoskeletts nachweisbar (Abbildung 4.18 E).

Die transfizierten Kontrollplasmide verursachten eine diffuse Färbung vorwiegend im Zellkern (Abbildungen 4.18 und 4.19 F).

Abbildung 4.19: Lokalisierung der Myotilin-EGFP-Fusionsproteine

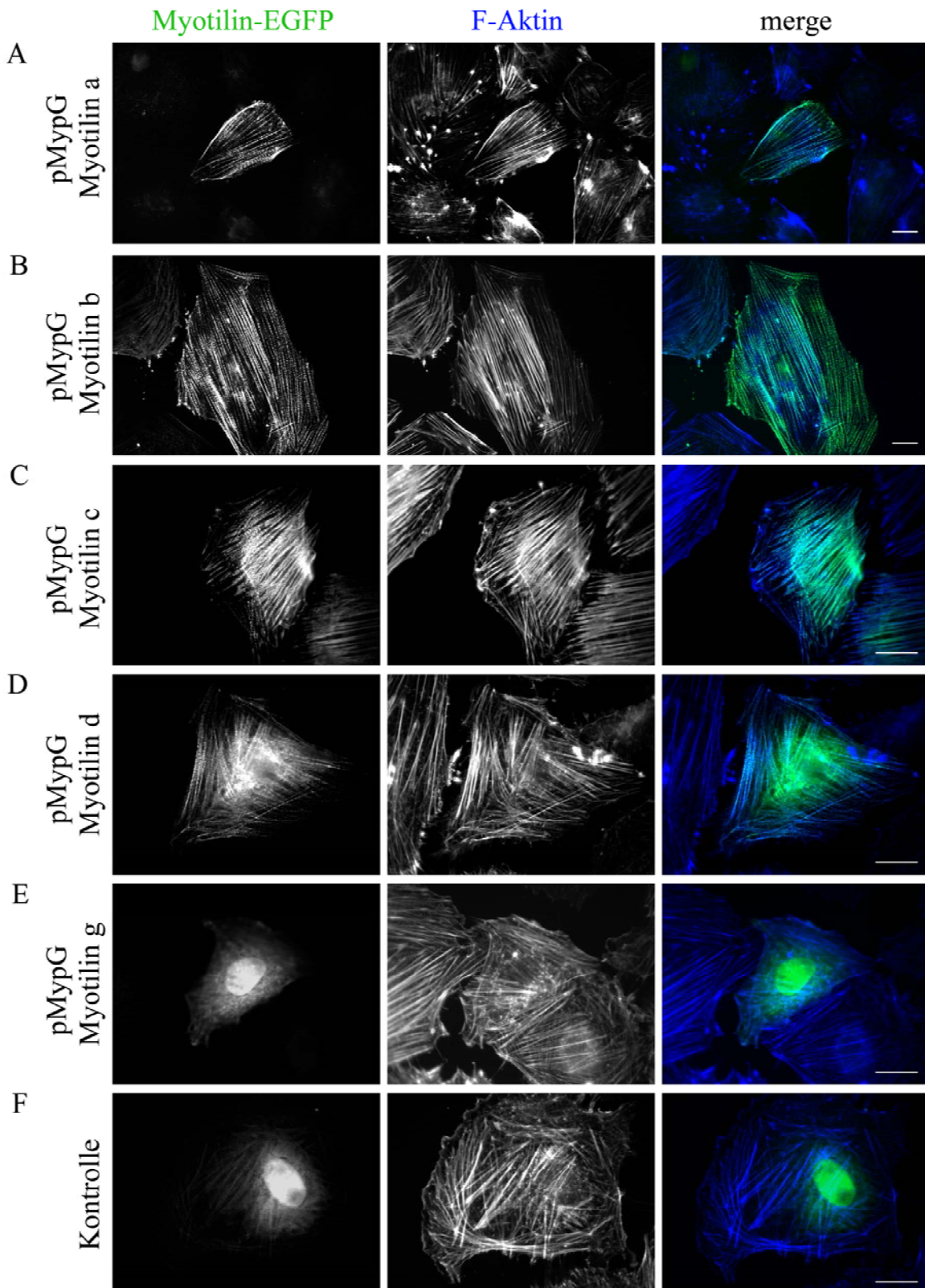


Abbildung 4.19: Lokalisierung der Myotilin-EGFP-Fusionsproteine. A7r5-Zellen wurden mit den Plasmiden pMypG/Myot a (**A**), pMypG/Myot b (**B**), pMypG/Myot c (**C**), pMypG/Myot d (**D**) oder pMypG/Myot g (**E**) transient transfiziert. Zur Kontrolle dienten Zellen, die mit EGFP-Vektoren ohne Myotilinsequenz transfiziert wurden (**F**). F-Aktin (blau) wurde mit Phalloidin-CPITC angefärbt. Messbalken: 20 μ m.

Abbildung 4.20: Lokalisierung der Myotilin-Fusionsproteine in „dense bodies“ und „adhesion plaques“

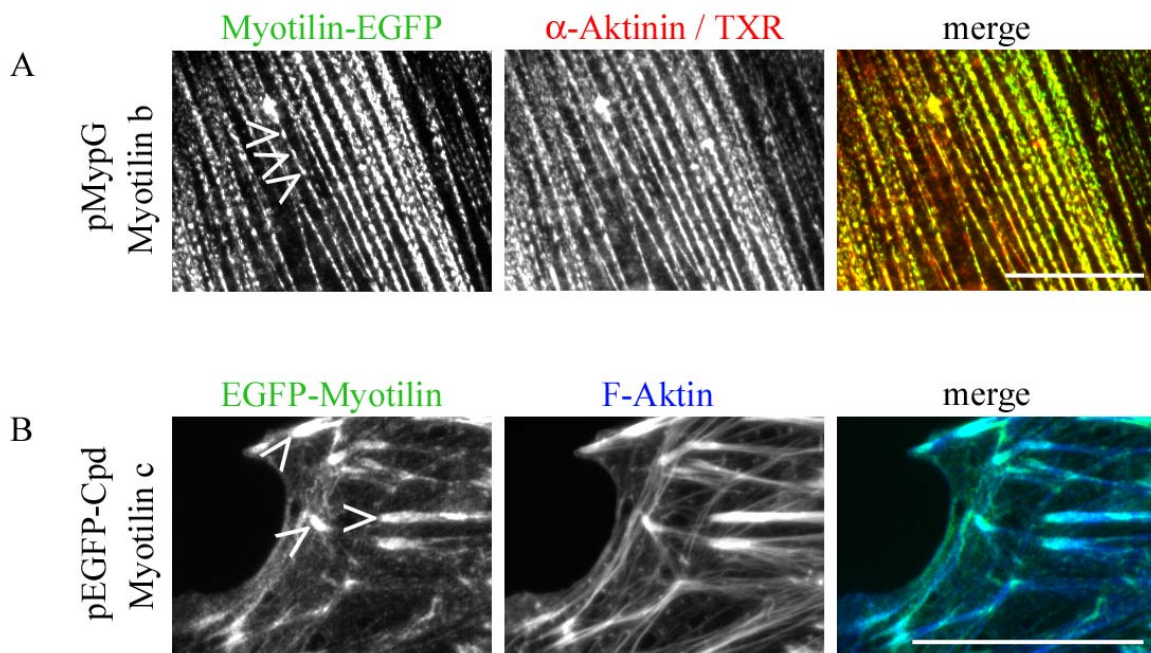


Abbildung 4.20: Lokalisierung der Myotilin-Fusionsproteine in „dense bodies“ und „adhesion plaques“. A7r5-Zellen wurden mit den Plasmiden pMypG/Myotilin b (**A**) und pEGFP-Cpd/Myotilin c (**B**) transient transfiziert. (**A**) Vergrößerung eines Ausschnitts der Abbildung 4.19 B. Markierung der „dense bodies“ mit Pfeilspitzen. (**B**) Vergrößerung eines Ausschnitts der Abbildung 4.18 C. Markierung der „adhesion plaques“ mit Pfeilspitzen. Messbalken: 20 µm.

4.5 Phosphorylierung von Myotilin

Myotilin besitzt am N-Terminus eine serinreiche Region. Einige dieser Serinreste liegen in Konsensus-Phosphorylierungsmotiven (Abbildung 4.21). Außerdem befinden sich in derselben Region alle bisher identifizierten Mutationen des Myotilins. Um zu untersuchen, ob und wenn ja, von welchen Kinasen Myotilin phosphoryliert wird, wurden Phosphorylierungsexperimente mit dem Myotilinkonstrukt MyotS, das die Aminosäuren 1 bis 248 umfasst und eine berechnete molekulare Masse von etwa 30 kDa hat, durchgeführt. Dazu wurde aus Expressionsbakterien aufgereinigtes, T7-markiertes MyotS mit rekombinanten Proteinkinasen oder Proteinextrakt aus differenzierten C2C12-Zellen als Kinasequelle in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Der Ansatz wurde in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen überführt und autoradiographiert.

Um die Phosphorylierungsstellen im MyotS-Konstrukt genauer zu untersuchen, wurden mit Hilfe der internetbasierten Software KinasePhos (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>)

potentielle Konsensus-Phosphorylierungsmotive identifiziert (Abbildung 4.21). Durch Punktmutagenesen wurden einige dieser potentiellen Motive zerstört. Für die Mutagenese wurden Motive in der serinreichen Region des Myotilings ausgewählt, in der alle bisher identifizierten Mutationen des Menschen liegen. Die generierten MyotS-Mutanten wurden in Phosphorylierungsexperimenten untersucht.

Abbildung 4.21: Potentielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen im Myotilinprotein

Human Myot	<u>M</u> FNYERP ^K KHF IQSQNPCGSR LQPPGPETSS FSSQT ^K <u>SS</u> I IIQPRQC ^T EQ RF ^S <u>AS</u> TLSS	* *
Maus Myot	<u>M</u> FNYERP ^K KHF IQPQNPCGSR LQPPGPEVSG FPSQT ^K <u>SS</u> I VIQPRQC ^T EQ RF ^S <u>AS</u> STVSS	* * *
Human Myot	HITMSSSAFP A ^S <u>P</u> QQHAGSN PGQRV ^T <u>T</u> TYN Q ^S <u>P</u> ASFLSSI LPSQPDYN ^S KIP ^S <u>S</u> AMDSNY	* *
Maus Myot	HITVSSSAYP A-PQQLAGPN PGQKV ^T <u>T</u> ATYN Q ^S <u>P</u> ASFLSSI LPSQPDYCNS KIP ^S <u>S</u> TVDSNY	
Human Myot	QQSSAGQPIN AKP ^S <u>S</u> QTANAK PIPR ^T <u>P</u> DHEI QGSKEALIQD LERK ^L KCKD ^T LLHNGNQR ^L <u>T</u>	
Maus Myot	QQSSVNQPVN <u>A</u> MSSQAANAR P ^T <u>T</u> PK ^T <u>P</u> DHEI QGSKEALIQD LERK ^L KCKD ^T LLHNGNQR ^L <u>T</u>	
Human Myot	YEEK <u>M</u> ARRLL GPQNAAAVFQ AQDDSGAQDS QQHNSEHARL QVPTSQVRSR S ^T <u>S</u> RGDVNDQ	
Maus Myot	YEEK <u>M</u> ARRLL GPQNAAAVFQ AQN-SDVQD ^S <u>P</u> QHNPEQARL HVPTSQVRSR S ^S <u>S</u> RAEANDQ	
Human Myot	DAIQEKFYPP RFIQVPENMS IDEGRFCRMD FKV ^S <u>S</u> GLPAPD VSWYLN ^G RTV QSDDLHKMIV	
Maus Myot	DAIQEKFYPP RFIQVPENMS IEEGRFCRMD FKV ^S <u>S</u> GLPAPD VSWYLN ^G RPV QSDELHKMIV	
Human Myot	<u>S</u> EKGLHSLIF EVVRA ^S <u>S</u> DAGA YACVAKNRAG EATFTVQLDV LAKEHKRAPM FIYK ^P <u>S</u> KKV	
Maus Myot	<u>S</u> EKG ^F HSLIF EVVRA ^S <u>S</u> DAGP YACVARNRAG EATFTVQLDV LAKEHKRAPM FIFK ^P <u>S</u> KKV	
Human Myot	LEGD ^S <u>V</u> KLEC QISAI ^P PKL FWKRNEMVQ FNT ^T <u>D</u> RI ^S <u>L</u> YQ DNT ^T <u>G</u> RV ^T <u>L</u> LI KDVNKKDAGW	
Maus Myot	FEGET ^T <u>V</u> KLEC QISAI ^P PKL FWKRNEMVQ FNT ^T <u>D</u> RI ^S <u>L</u> YH DNAGRV ^T <u>L</u> LI KDVNKKDAGW	
Human Myot	YTVSAVNEAG VTCNTRL ^L DV <u>T</u> ARP ^N QTLPA PKQLRVRP ^T <u>F</u> SKYLALNGKG LNVKQAFNPE	
Maus Myot	YTVSAVNEAG VTCNTRL ^L DV <u>T</u> AR ^P IQTLP ^A PKQLRVRP ^T <u>F</u> SKYLALNGRG LDVKQAFNPE	
Human Myot	GEFQRLAAQS GLYESEEL	
Maus Myot	GEFQRLAAQS GLYESEEL	
Konsensussequenzen für PKA:		R-X- <u>S/T</u> R-R-X- <u>S/T</u> R-X-X- <u>S/T</u> K-R-X-X- <u>S/T</u>
Konsensussequenz für MAPK:		P-Xaa- <u>S/T-P</u>
Konsensussequenzen für PKC:		<u>S/T</u> -X-K/R K/R-X-X- <u>S/T</u> K/R-X- <u>S/T</u>

Abbildung 4.21: Potentielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen im Myotilinprotein. Die Myotilinsequenzen von Mensch (Referenz: NM006790) und Maus (Referenz: AF230979) sind untereinander gestellt. Mit der internetbasierten Software KinasePhos wurden potentielle Konsensus-Phosphorylierungsmotive identifiziert. Die Aminosäuren, die potentiell von der PKA phosphoryliert werden, sind blau und die von MAPK gelb markiert und die von PKC sind umrandet. Mutagenisierte Aminosäuren sind rosafarben markiert (K36E, S55A, S92A, T145A). Start-Methioninreste sind kursiv geschrieben und unterstrichen (M). Bekannte Myotilinmutationen in Myopathien (vergleiche Tabelle 1.2) sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

4.5.1 Phosphorylierung von MyotS durch PKA

Um zu untersuchen, ob das Myotilin-Konstrukt MyotS von der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert wird, wurden Phosphorylierungsexperimente mit unterschiedlichen Mengen des Enzyms durchgeführt. Als Positivkontrolle diente das 28 kDa große My4-5-Konstrukt des Proteins Myomesin, von dem gezeigt wurde, dass es *in vitro* durch PKA phosphoryliert werden kann (Himmel, 2004).

Abbildung 4.22 A zeigt das Autoradiogramm des MyotS-Konstrukts. Bei etwa 37 kDa war ein radioaktives Signal nachweisbar, das mit steigender Verdünnung stetig abnahm. In Ansätzen ohne Proteinkonstrukt oder ohne Kinase war kein Signal sichtbar. In *in vitro*-Phosphorylierungsexperimenten war die Serin-/Threoninkinase PKA also in der Lage das radioaktive [γ - ^{33}P]ATP an Serin- oder Threoninreste des MyotS anzuheften. Um zu zeigen, dass es sich bei den im Autoradiogramm sichtbaren Banden um MyotS handelte, wurde die Nitrozellulosemembran mit einem Antikörper gegen die T7-Markierung immungefärbt, und die Proteine mit Hilfe einer ECL-Reaktion sichtbar gemacht (Abbildung 4.22 A, ECL). Durch Überlagerung des Autoradiogramms mit der immungefärbten Membran konnte die Identität der Banden verifiziert werden. Die Qualität der Proteinreinigung wurde durch Coomassiefärbung der in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Elutionsfraktion überprüft (Abbildung 4.22 A, Coom.). Neben der 37 kDa-Bande waren im Coomassiegefärbten Gel weitere, kleinere Banden erkennbar, die auch im Autoradiogramm nachweisbar waren und bei denen es sich um proteolysebedingte Abbauprodukte des MyotS-Konstrukts handeln könnte. Die größeren Banden waren wahrscheinlich auf bakterielle Proteine der Expressionsbakterien zurückzuführen.

Die Phosphorylierung des als Positivkontrolle eingesetzten Proteinkonstrukts My4-5 konnte – ebenfalls abhängig von der eingesetzten Kinasemenge – belegt werden (Abbildung 4.22 B, Radiogramm). Auch hier wurde die Identität der Banden im Autoradiogramm durch Überlagerung mit den ECL-Signalen auf dem Röntgenfilm dem Proteinkonstrukt My4-5 zugewiesen (Abbildung 4.22 B, ECL). Die Qualität der Proteinreinigung wurde durch Coomassiefärbung belegt (Abbildung 4.22 B, Coom.).

Bei Verwendung von Proteinextrakten differenzierter C2C12-Zellen als Kinasequelle war die Phosphorylierung des MyotS-Konstrukts ebenfalls nachweisbar (Abbildung 4.24 A, Spur 3). Dabei war eine Abhängigkeit von der cAMP-Konzentration zu beobachten. Ohne cAMP war fast kein Signal im Autoradiogramm detektierbar, während mit 1 μM cAMP ein Signal nachweisbar war, dessen Intensität bei 10 μM anstieg und bei 50 μM leicht abnahm (Abbildung 4.24 A, Spuren 1 bis 4).

Durch Einsatz der PKA-Inhibitoren PKI und H-89 konnte die *in vitro*-Phosphorylierung des MyotS-Konstrukts schon bei geringen Konzentrationen inhibiert werden (Abbildung 4.24 A, Spuren 5 bis 10). Der für die PKA spezifische Inhibitor PKI war bereits bei 5 $\mu\text{g/ml}$ wirksam.

Der Inhibitor H-89 zeigte bei einer Konzentration von 0,5 μM eine starke Inhibierung der MyotS-Phosphorylierung. Bei 5 bzw. 50 μM H-89 war fast kein radioaktives Signal mehr nachweisbar.

Abbildung 4.22: *In vitro*-Phosphorylierung von MyotS durch PKA

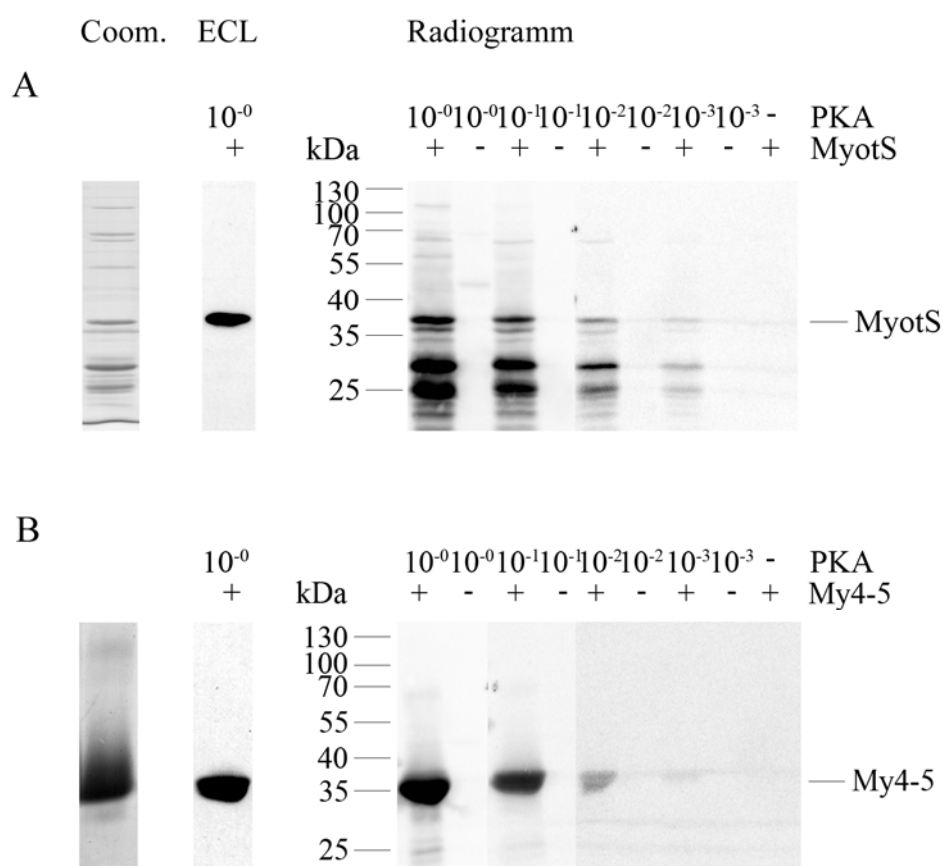


Abbildung 4.22: *In vitro*-Phosphorylierung von MyotS durch die Proteinkinase A (PKA). T7-markiertes MyotS (**A**) bzw. EEF-markiertes My4-5 als Positivkontrolle (**B**) wurden mit unterschiedlichen Mengen rekombinanter PKA (10^{-0} = 370 ng) in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne PKA und/oder ohne rekombinantes Proteinfragment. Die Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und autoradiographiert (**Radiogramm**). Zur Demonstration des Reinheitsgrades der aufgereinigten Proteine diente ein coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (**Coom.**). Zur Überprüfung der Identität der in den Autoradiogrammen sichtbaren Banden, wurden die Membranen mit Antikörpern gegen T7 bzw. EEF immungefärbt. Durch Überlagerung der Radiogramme mit dem ECL-Signal konnte die Identität der Banden MyotS bzw. My4-5 zugewiesen werden (hier beispielhaft jeweils für die erste Spur gezeigt, **ECL**).

4.5.2 Vergleich der Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch PKA

Die generierten Mutanten (Abbildung 4.21) wurden auf ihre Phosphorylierbarkeit untersucht und ihre Phosphorylierungsintensität mit der des Wildtyps verglichen. Als Negativkontrollen dienten Versuchsansätze ohne Kinase oder ohne MyotS (Abbildung 4.23).

Bei der Mutante 1 wurden auf DNA-Ebene die Punktmutationen t163g und c165g erzeugt, woraus auf Proteinebene die Mutation Ser55Ala entstand (Abbildung 4.21). Der Aminosäurerest Serin 55 ist bei einigen LGMD1a- und MFM/MYOT-Patienten zu Phenylalanin mutiert (Hauser et al., 2002; Selcen und Engel, 2004). Mutante 1 zeigte in Phosphorylierungsexperimenten mit rekombinanter PKA im Vergleich zum MyotS-Wildtyp ein leicht stärkeres radioaktives Signal (Abbildung 4.23, Spuren 1 und 3). Die Phosphorylierung der MyotS-Mutante 1 durch Proteinextrakte differenzierter C2C12-Zellen als Kinasequelle zeigte dasselbe Ergebnis (Abbildung 4.24 B). Wie beim MyotS-Wildtyp war eine Abhängigkeit von der cAMP-Konzentration erkennbar (vgl. Kapitel 4.5.1). Die PKA-Inhibitoren PKI und H-89 hemmten die Phosphorylierung der Mutante 1.

Abbildung 4.23: Vergleich der *in vitro*-Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch PKA

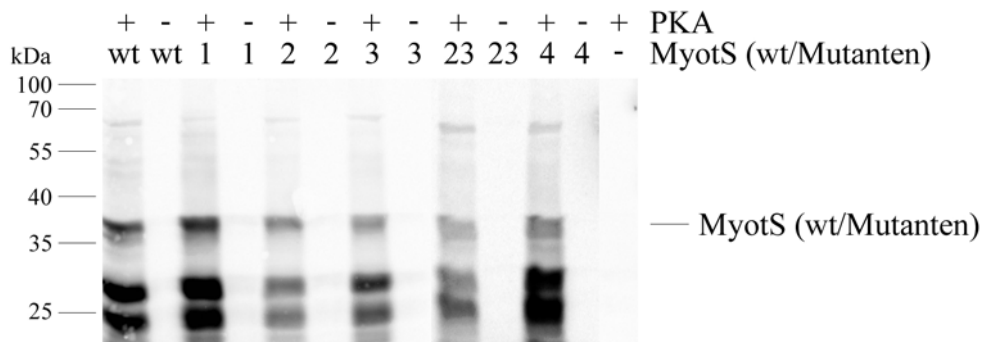


Abbildung 4.23: Vergleich der *in vitro*-Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp (wt) und -Mutanten (1, 2, 3, 23, 4) durch die Proteinkinase A (PKA). T7-markiertes Proteinfragment wurde mit 37 ng rekombinanter PKA in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Die Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und autoradiographiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne PKA und/oder ohne rekombinantes Proteinfragment.

Zur Überprüfung der Identität der in den Autoradiogrammen sichtbaren Banden, wurden die Membranen mit dem Antikörper gegen T7 immungefärbt. Durch Überlagerung der Radiogramme mit dem ECL-Signal konnte die Identität der Banden MyotS zugewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der Mutante 2 führten die Mutagenesen t274g und c276g zur Mutation Ser92Ala (Abbildung 4.21). Durch diese Mutation wurde die Substrat-Aminosäure für die MAPK ausgetauscht. Bei der Mutante 2 war mit rekombinanter PKA ein schwächeres Phosphorylierungssignal nachweisbar als beim MyotS-Wildtyp (Abbildung 4.23, Spuren 1 und 5). Das konnte ebenso mit Proteinextrakten differenzierter C2C12-Zellen als Kinasequelle gezeigt werden (Abbildung 4.24 C).

Auch bei der Mutante 3 wurde eine MAPK-Substrat-Aminosäure ausgetauscht. Hier wurde die Mutagenese a433g erzeugt, so dass der Threoninrest 154 durch Alanin ersetzt wurde (Abbildung 4.21). Die Bande im Autoradiogramm mit rekombinanter PKA war von ähnlicher Intensität wie bei der Mutante 2 (Abbildung 4.23, Spuren 5 und 7). Bei Phosphorylierungsexperimenten mit Proteinextrakten differenzierter C2C12-Zellen war die Intensität etwas schwächer als bei Mutante 2 (Abbildung 4.24 C und D, Spur 3).

Die Doppelmutante 23 war eine Kombination der Mutanten 2 und 3 und zeigte bei Phosphorylierung mit rekombinanter PKA ein schwächeres radioaktives Signal als die beiden Einzelmutanten (Abbildung 4.23, Spuren 5, 7 und 9). Mit Proteinextrakten differenzierter C2C12-Zellen konnte im Vergleich zu den Einzelmutanten ebenfalls eine reduzierte Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abbildung 4.24 E, Spur 3).

Bei der Mutante 4 wurde die Punktmutation a106g erzeugt, aus der der Austausch des Lysinrests 36 gegen Glutaminsäure resultierte (Abbildung 4.21). Diese Mutation ist bei einigen Patienten zu finden (Olive et al., 2005) und zerstört eine Erkennungssequenz sowohl für die PKA als auch für die PKC. In den mit rekombinanter PKA durchgeführten Phosphorylierungsexperimenten lag die Intensität der Bande im Autoradiogramm zwischen der des Wildtyps und den Mutanten 2 und 3 (Abbildung 4.23, Spuren 1, 5, 7 und 11). Dies war auch – etwas weniger deutlich – in Experimenten mit C2C12-Proteinextrakten als Kinasequelle zu erkennen (Abbildung 4.24, Vergleich der 3. Spur in A, C, D und F).

Die Abhängigkeit der Phosphorylierungsintensität von der cAMP-Konzentration war bei allen Mutanten sowie beim Wildtyp nachweisbar (Abbildung 4.24, Spuren 1 bis 4). Ohne cAMP war keine bzw. bei Mutante 1 eine nur sehr schwache Phosphorylierung detektierbar. Die Intensität stieg bei Erhöhung auf 1 und 10 μM cAMP stetig an und fiel bei 50 μM leicht ab. Bei allen Mutanten sowie beim MyotS-Wildtyp wurde die Phosphorylierung bereits bei einer PKI-Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ inhibiert (Abbildung 4.24, Spuren 5 bis 7). Auch mit dem Inhibitor H-89 wurde beim Wildtyp und bei allen Mutanten die Phosphorylierung gehemmt (Abbildung 4.24, Spuren 8 bis 10). Bereits bei 0,5 μM H-89 war das radioaktive Signal sehr schwach und verschwand bei höheren Konzentrationen fast vollständig.

Abbildung 4.24: *In vitro*-Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch Proteinextrakte differenzierter C2C12-Zellen und Inhibierung durch PKI und H-89

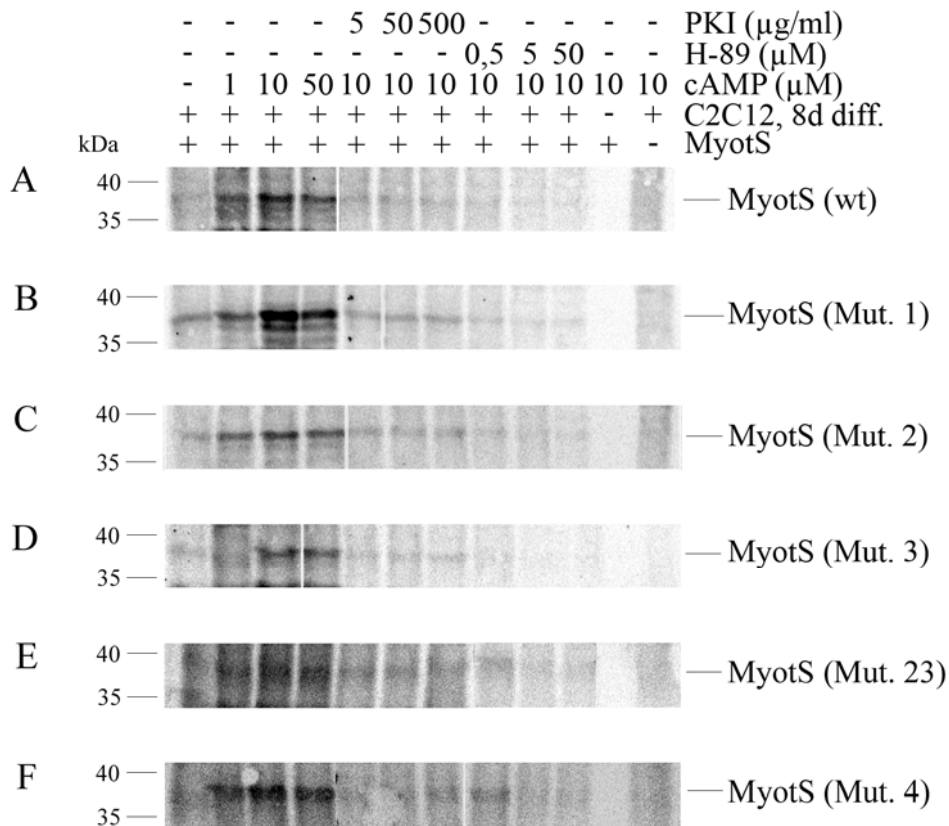


Abbildung 4.24: *In vitro*-Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp (wt) und -Mutanten (Mut. 1, 2, 23 und 4) durch die lösliche Fraktion von Triton-Proteinextrakten acht Tage differenzierter C2C12-Zellen (C2C12, 8d diff.) und Inhibierung der Phosphorylierung durch PKI und H-89. T7-markierte Proteinfragmente wurden mit C2C12-Proteinextrakt in Gegenwart von [γ - 33 P]ATP inkubiert. Die cAMP-Konzentration sowie die Konzentrationen der Kinaseinhibitoren wurden variiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne Proteinextrakt oder ohne rekombinantes Proteinfragment. Die Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und autoradiographiert. Zur Überprüfung der Identität der in den Autoradiogrammen sichtbaren Banden, wurden die Membranen mit Antikörpern gegen T7 immungefärbt. Durch Überlagerung der Radiogramme mit dem ECL-Signal konnte die Identität der Banden MyotS zugewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.5.3 Phosphorylierung von MyotS durch PKC α

Die ubiquitär exprimierte Proteinkinase C α (PKC α) gehört zur Familie der klassischen PKCs, die Ca $^{2+}$ - und Diacylglycerol-abhängig sind. Um zu untersuchen, ob MyotS von dieser Proteinkinase phosphoryliert wird, wurden *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente mit

rekombinanter PKC α durchgeführt. Als Positivkontrolle diente das T7-markierte Proteinfragment FLNc d23-24 von Filamin c (27 kDa), von dem gezeigt wurde, dass es von PKC α phosphoryliert werden kann (Tigges et al., 2003).

Abbildung 4.25: *In vitro*-Phosphorylierung von MyotS durch PKC α

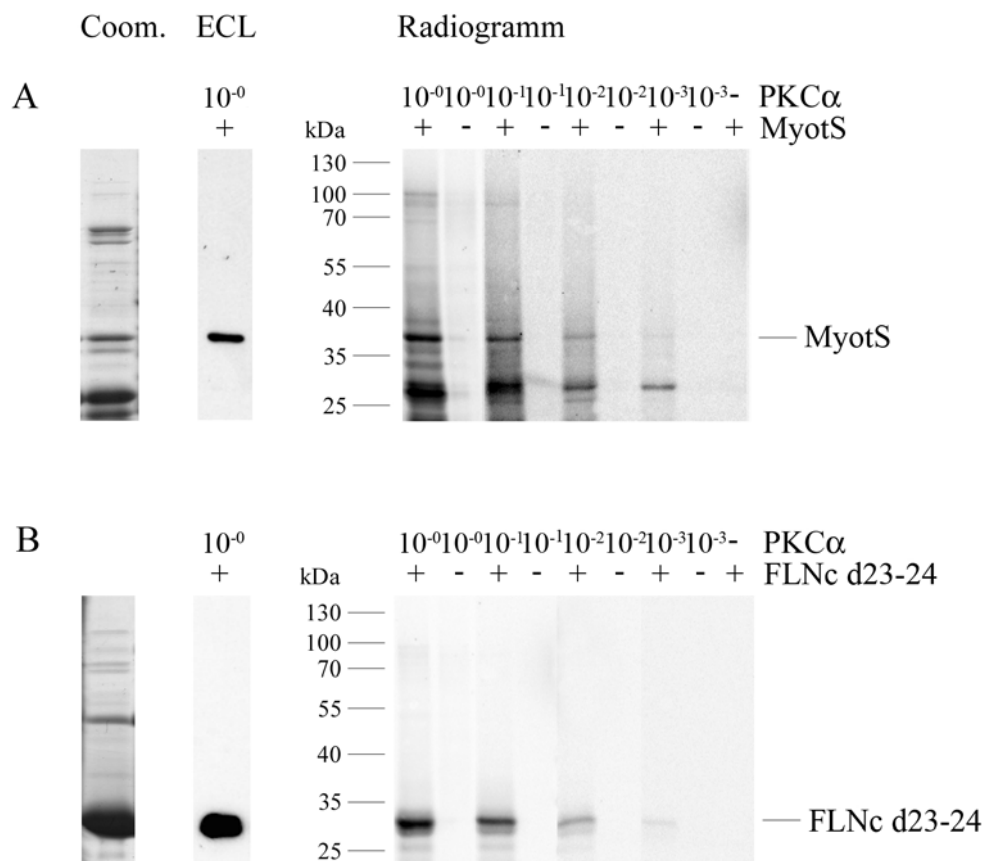


Abbildung 4.25: *In vitro*-Phosphorylierung von MyotS durch die Proteinkinase C α (PKC α). T7-markiertes MyotS (A) bzw. FLNc d23-24 als Positivkontrolle (B) wurden mit unterschiedlichen Mengen rekombinanter PKC α ($10^0 = 110$ ng) in Gegenwart von [γ - 33 P]ATP inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne PKC α und/oder ohne rekombinantes Proteinfragment. Die Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und autoradiographiert (Radiogramm). Zur Demonstration des Reinheitsgrades der aufgereinigten Proteine diente ein coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (Coom.).

Zur Überprüfung der Identität der in den Autoradiogrammen sichtbaren Banden, wurden die Membranen mit Antikörpern gegen T7 immungefärbt. Durch Überlagerung der Radiogramme mit dem ECL-Signal konnte die Identität der Banden MyotS bzw. FLNc d23-24 zugewiesen werden (hier beispielhaft jeweils für die erste Spur gezeigt, ECL).

Das Konstrukt MyotS war im Autoradiogramm als Bande bei ca. 37 kDa nachweisbar (Abbildung 4.25 A). Dabei war eine Abnahme der Intensität des radioaktiven Signals mit zunehmender Verdünnung der Kinase zu beobachten. In den Negativkontrollen ohne Proteinkonstrukt bzw. ohne Kinase war kein Signal nachweisbar. *In vitro* ist die PKC α also in der Lage, MyotS zu phosphorylieren. Mit Proteinextrakten differenzierter C2C12-Zellen und Diacylglycerol-enthaltendem PKC-Puffer konnte ebenfalls ein Phosphorylierungssignal des MyotS-Konstrukts nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Phosphorylierung der Positivkontrolle FLNc d23-24 konnte – ebenfalls abhängig von der eingesetzten Kinasemenge – belegt werden (Abbildung 4.25 B, Radiogramm).

4.5.4 Vergleich der Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch PKC α

Um die Phosphorylierungsstellen im MyotS-Konstrukt zu untersuchen, wurden die MyotS-Mutanten (Kapitel 4.5.2) in Phosphorylierungsexperimenten untersucht, und die Phosphorylierungsintensität mit der des MyotS-Wildtyps verglichen (Abbildung 4.26).

In vitro konnten alle MyotS-Mutanten von PKC α phosphoryliert werden. Die Phosphorylierungsintensität war bei allen Mutanten schwächer als die des MyotS-Wildtyps.

Die MyotS-Mutante 4, bei der die Erkennungssequenz der PKC mutiert wurde, zeigte im Autoradiogramm ein schwächeres Signal als der MyotS-Wildtyp (Abbildung 4.26, Spuren 1 und 11). Die Signalintensitäten der Ser55-Mutante 1 und der Mutante 3, bei der eine MAPK-Substrat-Aminosäure ausgetauscht wurde, waren in etwa gleich und jeweils leicht schwächer als bei Mutante 4 (Abbildung 4.26, Spuren 3, 7 und 11). Noch geringer war die Signalstärke bei der Mutante 2, bei der eine MAPK-Substrat-Aminosäure mutiert wurde (Abbildung 4.26, Spur 5). Die Doppelmutante 23 zeigte das schwächste Phosphorylierungssignal (Abbildung 4.26, Spur 9). In den Negativkontrollen ohne Proteinkonstrukt oder ohne Enzym konnten keine radioaktiven Signale nachgewiesen werden.

Abbildung 4.26: Vergleich der *in vitro*-Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch PKC α

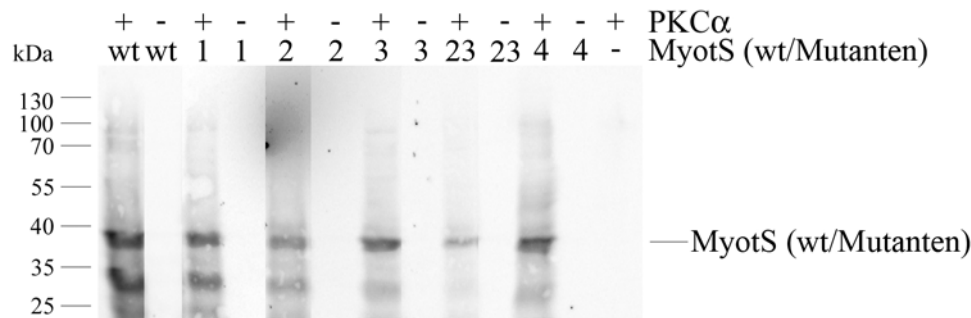


Abbildung 4.26: Vergleich der *in vitro*-Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp (wt) und -Mutanten (1, 2, 3, 23, 4) durch die Proteinkinase C α (PKC α). T7-markiertes Proteinfragment wurde mit 11 ng rekombinanter PKC α in Gegenwart von [γ - 33 P]ATP inkubiert. Die Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und autoradiographiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne PKC α und/oder ohne rekombinantes Proteinfragment.

Zur Überprüfung der Identität der in den Autoradiogrammen sichtbaren Banden, wurden die Membranen mit dem Antikörper gegen T7 immungefärbt. Durch Überlagerung der Radiogramme mit dem ECL-Signal konnte die Identität der Banden MyotS zugewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.5.5 Phosphorylierung von MyotS durch MAPK

Um zu untersuchen, ob MyotS von der Mitogen-aktivierten Proteinkinase 1 (MAPK) phosphoryliert wird, wurden *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente mit rekombinanter und aktivierter MAPK durchgeführt. Als Positivkontrolle diente das Ponsinfragment PsD (53 kDa), von dem gezeigt wurde, dass es von MAPK phosphoryliert werden kann (Gehmlich, 2004).

Das Konstrukt MyotS war im Autoradiogramm als Bande bei ca. 37 kDa nachweisbar (Abbildung 4.27 A). Dabei war eine starke Abnahme der Intensität des radioaktiven Signals mit zunehmender Verdünnung der Kinase zu beobachten. In den Negativkontrollen ohne Proteinkonstrukt bzw. ohne Kinase war kein Signal nachweisbar. *In vitro* ist die MAPK also in der Lage, MyotS zu phosphorylieren. Mit Proteinextrakten differenzierter C2C12-Zellen und MAPK-Puffer konnte ebenfalls ein Phosphorylierungssignal des MyotS-Konstrukts nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Phosphorylierung der Positivkontrolle PsD durch MAPK konnte – ebenfalls abhängig von der eingesetzten Kinasemenge – belegt werden (Abbildung 4.27 B, Radiogramm).

Abbildung 4.27: *In vitro*-Phosphorylierung von MyotS durch MAPK

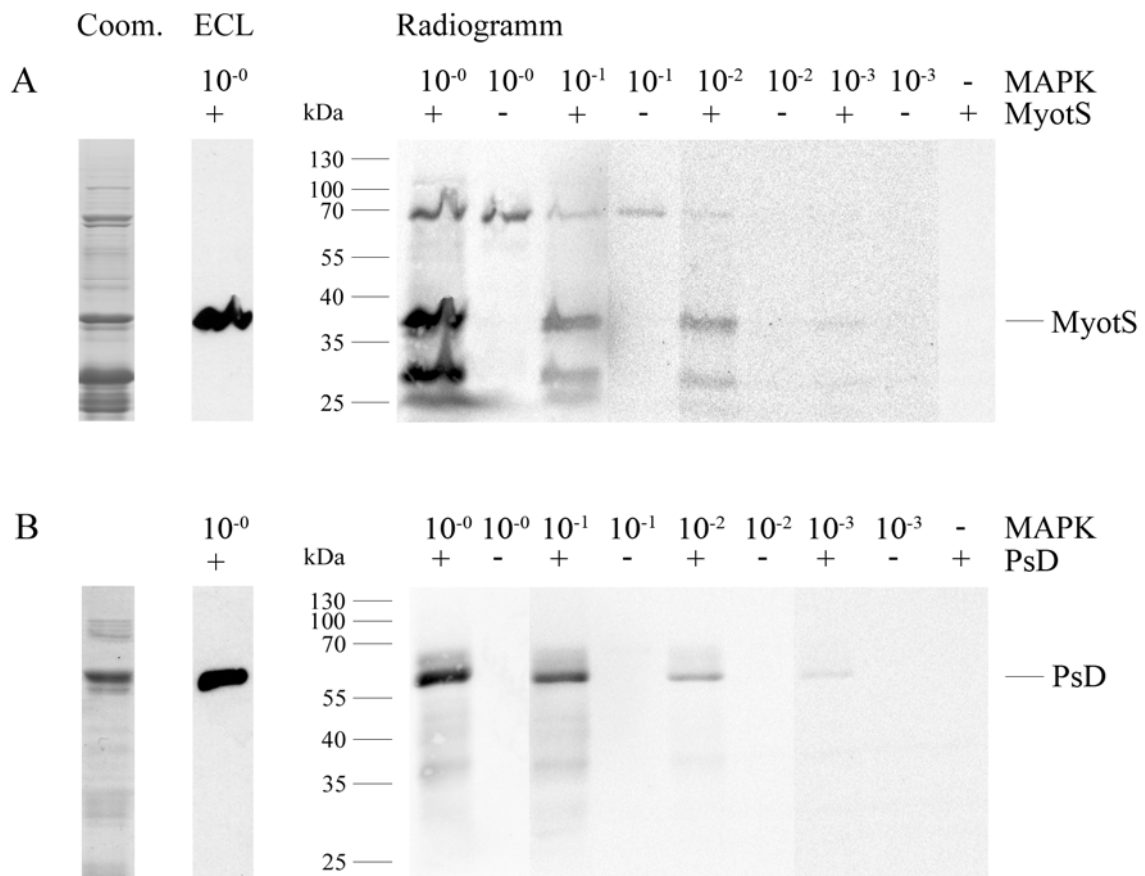


Abbildung 4.27: *In vitro*-Phosphorylierung von MyotS durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1 (MAPK). T7-markiertes MyotS (A) bzw. PsD als Positivkontrolle (B) wurden mit unterschiedlichen Mengen rekombinanter MAPK ($10^0 = 210$ ng) in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne MAPK und/oder ohne rekombinantes Proteinfragment. Die Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und autoradiographiert (**Radiogramm**). Zur Demonstration des Reinheitsgrades der aufgereinigten Proteine diente ein coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (**Coom.**).

Zur Überprüfung der Identität der in den Autoradiogrammen sichtbaren Banden, wurden die Membranen mit Antikörpern gegen T7 immungefärbt. Durch Überlagerung der Radiogramme mit dem ECL-Signal konnte die Identität der Banden MyotS bzw. FLNc d23-24 zugewiesen werden (hier beispielhaft jeweils für die erste Spur gezeigt, **ECL**).

4.5.6 Vergleich der Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch MAPK

Um die Phosphorylierungsstellen im MyotS-Konstrukt zu untersuchen, wurden die MyotS-Mutanten (Kapitel 4.5.2) in Phosphorylierungsexperimenten mit der MAPK untersucht, und die Phosphorylierungsintensität mit der des MyotS-Wildtyps verglichen. Als

Negativkontrollen dienten Versuchsansätze ohne Kinase oder ohne Proteinkonstrukt (Abbildung 4.28).

In vitro konnten alle MyotS-Mutanten von MAPK phosphoryliert werden. Die MyotS-Mutante 1 zeigte im Autoradiogramm ein leicht stärkeres Signal als der MyotS-Wildtyp (Abbildung 4.28, Spuren 1 und 3). Die Signalintensitäten der Mutanten 2 und 3, bei denen jeweils eine MAPK-Substrat-Aminosäure ausgetauscht worden waren, waren in etwa gleich und jeweils schwächer als beim MyotS-Wildtyp (Abbildung 4.28, Spuren 1, 5 und 7). Kaum nachweisbar war die Signalstärke bei der Doppelmutante 23 (Abbildung 4.28, Spur 9). Die Mutante 4 zeigte ein Phosphorylierungssignal mit einer Intensität zwischen der der Mutanten 2 bzw. 3 und der des Wildtyps (Abbildung 4.28, Spur 11).

Abbildung 4.28: Vergleich der *in vitro*-Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp und -Mutanten durch MAPK

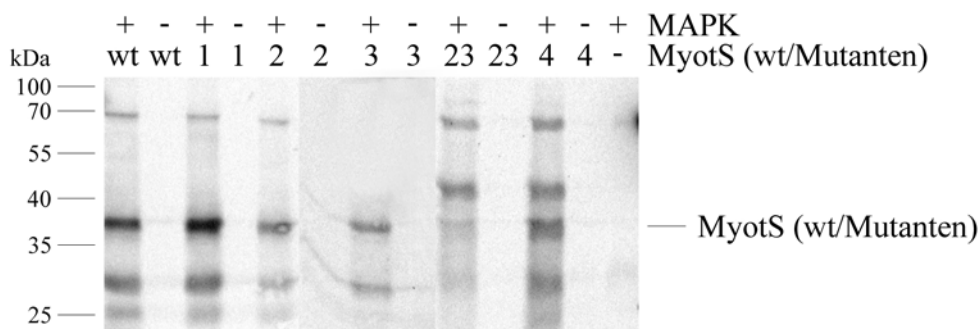


Abbildung 4.28: Vergleich der *in vitro*-Phosphorylierung von MyotS-Wildtyp (wt) und -Mutanten (1, 2, 3, 23, 4) durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1 (MAPK). T7-markiertes Proteinfragment wurde mit 21 ng rekombinanter MAPK in Gegenwart von [γ - 33 P]ATP inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne MAPK und/oder ohne rekombinantes Proteinfragment. Die Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und autoradiographiert.

Zur Überprüfung der Identität der in den Autoradiogrammen sichtbaren Banden, wurden die Membranen mit dem Antikörper gegen T7 immungefärbt. Durch Überlagerung der Radiogramme mit dem ECL-Signal konnte die Identität der Banden MyotS zugewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.5.7 Zusammenfassung der Phosphorylierungsstudien

Die durchgeführten Phosphorylierungsstudien zeigen, dass das Myotilin-Konstrukt MyotS *in vitro* von den Serin-/Threonin-Proteinkinasen PKA, PKC α und MAPK phosphoryliert werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass in Proteinextrakten kultivierter, differenzierter C2C12-Zellen Kinasen aktiv sind, die in der Lage sind, das MyotS-Konstrukt zu phosphorylieren (Abbildung 4.24). Die Intensität der Phosphorylierung war abhängig von der cAMP-Konzentration im PKA-Puffer. Ohne cAMP konnte fast keine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Mit einer Konzentration von 1 μM cAMP war ein schwaches Signal im Autoradiogramm zu erkennen, das bei einer Erhöhung der Konzentration auf 10 μM cAMP zunahm. Mit den PKA-Inhibitoren PKI und H-89 wurde die Phosphorylierung stark inhibiert. Die Abhängigkeit von der cAMP-Konzentration sowie die Inhibierung durch PKA-Inhibitoren unterstreicht die Involvierung der cAMP-abhängigen PKA bei der Phosphorylierung des MyotS-Konstrukts. Auch in PKC- und MAPK-Puffer konnten mit Proteinextrakten kultivierter, differenzierter C2C12-Zellen Phosphorylierungssignale von MyotS nachgewiesen werden.

Die Punktmutationen des MyotS-Konstrukts hatten Einfluss auf die Intensität des Phosphorylierungssignals (Abbildungen 4.23, 4.26 und 4.28). So war das autoradiographierte Signal bei z. B. den Mutanten 2 und 3, bei denen eine Substrat-Aminosäure für die MAPK mutiert ist, im MAPK-Phosphorylierungsexperiment schwächer als beim MyotS-Wildtyp. Bei der Doppelmutante 23 war kaum noch ein Signal nachweisbar.

5 Diskussion

Myotilin ist ein Protein des Aktinzytoskeletts, das zuerst in Muskelzellen beschrieben wurde. Sein unikaler N-Terminus weist eine serinreiche Region unbekannter Funktion auf. Interessanterweise liegen alle bisher bekannten humanen Mutationen, die zu Krankheiten wie der Gliedergürtelmuskeldystrophie-Variante 1a (LGMD1a) und der Myofibrillären Myopathie MFM/MYOT führen, in dieser serinreichen Region. Eine tiefgehende Untersuchung des Myotilins auf molekularer Ebene kann daher helfen, die Entstehung dieser Erkrankungen zu verstehen. Ein derartiges Verständnis ist von fundamentaler Wichtigkeit für neue Konzepte zur Behandlung dieser Krankheiten.

5.1 Myotilinisformen und Expressionsmuster

Die DNA-Sequenzen der kodierenden Regionen des humanen und murinen Myotilingens sind zu 86 % identisch (Mologni et al., 2005) und kodieren für ein etwa 55 kDa großes Protein. Das Myotilingen besteht aus 10 Exons, die durch unterschiedlich große Introns voneinander getrennt sind (Mologni et al., 2005; Salmikangas et al., 1999). Es gibt drei potentielle Startkodons (ATG), die alle im selben Leseraster liegen und von denen im humanen Myotilingen zwei im Exon 2 und das dritte im Exon 4 liegen. Im Gen der Maus (*Mus musculus*) ist das zweite ATG dagegen in das Exon 3 verschoben. Die Funktionalität des dritten ATG wurde bisher nicht näher beschrieben, es wird jedoch durch einen humanen EST gestützt (BF670354). Auch im Genom der Ratte (*Rattus norvegicus*) und des Krallenfrosches (*Xenopus tropicalis*) ist dieses dritte Startkodon konserviert, was dafür spricht, dass es tatsächlich verwendet wird.

Bei der Maus konnten bisher drei Isoformen des Myotilins identifiziert werden (Mologni et al., 2005). Die Isoformen I und II unterscheiden sich ausschließlich im 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR). Die Isoform III, die mit dem zweiten ATG (Methioninrest an Position 131 der Isoformen I/II) beginnt, hat eine vorhergesagte Molekularmasse von etwa 41 kDa (Mologni et al., 2005). In den Studien von Mologni et al. (2005) wurde der polyklonale Antikörper 151 gegen die ersten 150 Aminosäuren der murinen Myotilinisformen I bzw. II verwendet, mit dem die Isoform III, die mit Aminosäurerest 131 der Myotilinisformen I bzw. II beginnt, *in vivo* nicht nachgewiesen werden konnte. Auch der von Salmikangas et al. (1999) verwendete Antikörper, dessen Epitop im Bereich der zweiten Ig-ähnlichen Domäne lag, erkannte diese Isoform *in vivo* nicht. Mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörpern, die gegen das gesamte Myotilinprotein bzw. gegen die von Exon 3 und 4

kodierten Regionen gerichtet waren, konnte die Isoform III dagegen in Herz- und Skelettmuskelzellextrakten der Maus zum ersten Mal detektiert werden (Kapitel 4.2.1, Abbildung 4.2 A und B). Der zum Vergleich eingesetzte monoklonale Antikörper 9F4.5.15 erkannte diese Isoform nicht, da sein Epitop im vom Exon 2 kodierten Bereich liegt, der bei Myotilin III fehlt.

In humanen EST-Datenbanken finden sich Hinweise auf zwei intraexonische Spleißstellen im zweiten Exon, das dadurch in die Abschnitte 2a, 2b und 2c eingeteilt werden kann. (Abbildung 4.1 A und B). Bei der Maus sind ESTs dieser Art jedoch bisher nicht gefunden worden. Das Exon 2a umfasst die ersten 85, Exon 2b die mittleren 351 und Exon 2c die letzten 131 Basenpaare des Exons 2. Die serinreiche Region (Aminosäuren 29 bis 124) im humanen Myotilinprotein projiziert sich auf DNA-Ebene auf die Exons 2b bis 3, die hydrophobe Region (Aminosäuren 57 bis 79) hauptsächlich auf Exon 2b zuzüglich vier Aminosäuren, die von Exon 2c kodiert werden. In den Datenbanken sind ESTs zu finden, die (1) alle drei Exontteile (BF694660), (2) die Exons 2a und 2c (z. B. BF672999), (3) nur Exon 2a (z. B. BF670312) oder (4) nur Exon 2c (z. B. BF670603) enthalten. Der Transkriptionsstart läge im Fall (1) beim ersten ATG im Exon 2b, in den Fällen (2) und (4) beim zweiten ATG im Exon 2c und bei Variante (3) beim dritten ATG im Exon 4. Mit Hilfe von PCR-Experimenten konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Herausspleißen des Exons 2b in humanen Herz-cDNA-Bibliotheken verifiziert werden (Kapitel 4.1). Daraus lässt sich schließen, dass mindestens eines der alternativen Startkodons *in vivo* genutzt wird, woraus weitere Isoformen entstünden. Verglichen mit den Mausisoformen, entspräche der Start beim zweiten ATG der Isoform III. Im Menschen resultierte daraus die hier Myotilin b genannte Isoform mit einer vorhergesagten molekularen Masse von etwa 42,9 kDa (Abbildung 4.1 A).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten auch weitere potentielle Isoformen gefunden werden. So konnte in humanen cDNA-Bibliotheken des adulten Herzens das Fehlen von Exon 1 gezeigt werden (Kapitel 4.1), was auch durch ESTs gestützt wird. Auf Proteinebene entsteht dadurch zwar keine neue Isoform, jedoch deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass in unterschiedlichen Organen unterschiedliche Promotoren verwendet werden könnten. Ein alternativer Promotor vor Exon 2 könnte daher notwendig werden, um die Isoformen ohne Exon 1 zu exprimieren. Tatsächlich finden sich im Intron vor Exon 2 mehrere putative Promotorelemente wie MEF-Bindungsstellen („myocyte-specific enhancer-binding factor 2“; Konsensussequenz: CTA(T/A)₄TAG/A) oder E-Boxen (Konsensussequenz: CANNTG).

In humanen cDNA-Bibliotheken des fötalen Herzens konnte das Exon 1 hingegen nachgewiesen werden. Das weist darauf hin, dass während der embryonalen Entwicklung eine

Veränderung in der Expression der Myotilinisofomen und eine Nutzung alternativer Promotoren auftreten. In Mausgeweben wurde bereits eine von der Stufe der embryonalen Entwicklung abhängige Expression von Myotilin auf RNA- und Proteinebene durch in situ Hybridisierungsstudien (ISH) respektive Western Blot-Analysen gezeigt (Mologni et al., 2001). Erst ab Tag 9 der embryonalen Entwicklung (E9) war Myotilin überhaupt nachweisbar. Die Myotilinoxpression begann im Herzen und weitete sich bis E13 auf weitere sich entwickelnde Organe wie Muskeln, Lungen, Leber, Nerven und Darmepithel aus. Nach dem höchsten Expressionslevel an E13 wird Myotilin in allen Geweben außer in quergestreiften Muskeln und peripheren Neuronen herunterreguliert. In dieser Studie wurden jedoch in den ISHs keine isoformspezifischen Sonden sowie in den Western Blot-Analysen keine isoformspezifischen Antikörper verwendet, so dass zur Expression unterschiedlicher Isoformen im Laufe der Embryonalentwicklung der Maus keine Aussagen getroffen werden konnten.

Ein weiterer alternativer Spleißvorgang im humanen Myotilingen konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden: durch PCR-Experimente und Klonierung sowie Sequenzierung wurde das gleichzeitige Vorkommen von Isoformen mit und ohne Exon 6 in adulten und fötalen Herz-cDNA-Bibliotheken gezeigt (Kapitel 4.1, Tabelle 4.1). Aus Skelettmuskel-cDNA konnten hingegen ausschließlich Isoformen mit Exon 6 amplifiziert werden. Das Vorkommen von Isoformen ohne Exon 6 wird auch durch ESTs unterstützt (z. B. BF576158). Durch Kombination der verschiedenen Spleißvorgänge werden mehrere potentielle humane Isoformen möglich, die in Abbildung 4.1 A dargestellt sind. In dieser Abbildung sind die Isoformen mit fehlendem Exon 1 nicht aufgeführt, da sie auf Proteinebene keinen Einfluss haben. Vorstellbar sind die Kombinationen der drei alternativen Startkodons mit oder ohne Exon 6. Daraus resultieren sechs potentielle Isoformen mit einer Molekularmasse zwischen 55,4 (Myotilin a) und 4,8 kDa (Myotilin h). Die kleinste Isoform h ist aufgrund fehlender ESTs, der geringen Größe und des Fehlens der Ig-ähnlichen Domänen, der serinreichen Region sowie der Bindungsstellen der Bindungspartner Aktin, α -Aktinin und Filamin c und der Dimerisierungsdomäne die unwahrscheinlichste Variante. Auch bei Myotilin g fehlen die Bindungsstellen für Aktin und Filamin c. Die α -Aktinin-Bindungsstelle ist wie auch bei Myotilin b nur zum Teil vorhanden und reicht für eine Bindung wahrscheinlich nicht aus. Die Fähigkeit zur Filamin c- und Aktin-Bindung sowie zur Dimerisierung besteht nach heutigem Kenntnisstand ausschließlich bei den Isoformen a, b und c, die die Ig-ähnlichen Domänen enthalten. Die serinreiche Region, in der die für die Muskelkrankheiten LGMD1a, MFM/MYOT sowie SBM verantwortlichen Mutationen liegen, kommt in den Isoformen a

und d vor, die auch die Bindungsstelle für α -Aktinin enthalten. Das Verhalten der aufgeführten Isoformen in transienten Transfektionsstudien wird in Kapitel 5.2 ausführlicher diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Myotilin auf Proteinebene in unterschiedlichen Geweben der Maus (*Mus musculus*), der Ratte (*Rattus norvegicus*) und des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) mit verschiedenen Antikörpern untersucht (Kapitel 4.2.2). Viele Muskelproteine besitzen eine spezifische Isoform in Nichtmuskelzellen; darunter auch Proteine, die mit Muskeldystrophien in Verbindung gebracht werden, wie Titin, Fukutin und Dysferlin (Ahn und Kunkel, 1993; Bashir et al., 1998; Keller et al., 2000; Saito et al., 2000). Die Isoformen I bzw. II von Myotilin konnten in der vorliegenden Arbeit in murinen Proteinextrakten von Herz, Skelettmuskel, Zunge, Lymphknoten und Haut mit den Antikörpern Myotilin (gesamt), Myotilin (Exon 3/4) und 9F4.5.15 nachgewiesen werden (Abbildung 4.2). Da diese Isoformen von allen 10 Exons kodiert werden, können sie auch von den drei Antikörpern erkannt werden. Bei der Ratte konnten die Isoformen I und II in Extrakten des Herzens, des Skelettmuskels, der Zunge und der Milz nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.3, Abbildung 4.3). Die Expression von Myotilin in verschiedenen Organen impliziert, dass dieses Protein neben dem Erhalt der Z-Scheibe im Muskel auch in Nichtmuskelzellen Funktionen übernehmen muss.

Beim Krallenfrosch waren die Isoformen I und II ausschließlich mit dem Antikörper Myotilin (gesamt) in Herzproteinextrakten detektierbar (Kapitel 4.2.4, Abbildung 4.4). Die Spezies *Xenopus laevis* ist phylogenetisch zu weit von Maus und Ratte entfernt, so dass die Epitope des Myotilins wahrscheinlich zu stark verändert sind und nicht mehr von den Antikörpern erkannt werden. Die Proteinsequenzen der Gattung *Xenopus* weichen entsprechend stark von der Sequenz von Mensch, Maus und Ratte ab (Tabelle 5.1). Verglichen mit der humanen Sequenz sind lediglich 47 Prozent der Aminosäurereste identisch, im Vergleich zu Maus und Ratte nur 48,4 respektive 48,6 Prozent. Die Ig-ähnlichen Domänen sind dagegen mit Werten zwischen 61,1 und 65,8 Prozent Identität wesentlich stärker konserviert als das Gesamtprotein. Interessanterweise ist die serinreiche Region mit 20,4 bis 23,4 Prozent bei *Xenopus* jedoch erheblich weniger konserviert. Wie erwartet zeigen die Myotilinsequenzen der Spezies *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* mit 95,8 bis 98,4 Prozent die größte Konservierung der Aminosäurereste. Interessanterweise liegen die Vergleichswerte des Gesamtproteins von Mensch und Ratte mit 90,6 Prozent über denen von Mensch und Maus mit 89 Prozent. Auffällig ist, dass die Ig-ähnlichen Domänen bei allen Spezies erheblich stärker und die serinreiche Region wesentlich weniger konserviert sind als das Gesamtprotein.

Das erste Startkodon scheint bei *Xenopus* verschoben zu sein. Fünf bzw. 16 Kodons „upstream“ vom ersten ATG in der Sequenz von Mensch, Maus und Ratte gelegen sind in der Krallenfroschsequenz zwei Methioninreste kodiert, die als Startmethionin genutzt werden könnten (siehe Sequenzen im Anhang).

Tabelle 5.1: Vergleich der Myotilinsequenzen verschiedener Spezies

Vergleich der Spezies ...	Serinreiche Region	Ig-ähnliche Domänen	Gesamt
<i>H. sapiens</i> – <i>M. musculus</i>	83,3	93,7	89,0
<i>H. sapiens</i> – <i>R. norvegicus</i>	83,3	94,7	90,6
<i>H. sapiens</i> – <i>X. tropicalis</i>	20,4	65,8	47,0
<i>H. sapiens</i> – <i>X. laevis</i>	–	61,1	–
<i>M. musculus</i> – <i>R. norvegicus</i>	95,8	98,4	95,8
<i>M. musculus</i> – <i>X. tropicalis</i>	23,4	65,8	48,4
<i>M. musculus</i> – <i>X. laevis</i>	–	61,1	–
<i>R. norvegicus</i> – <i>X. tropicalis</i>	23,4	65,8	48,6
<i>R. norvegicus</i> – <i>X. laevis</i>	–	61,1	–
<i>X. tropicalis</i> – <i>X. laevis</i>	–	86,3	–

Tabelle 5.1: Vergleich der Proteinsequenzen von Myotilin der Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus tropicalis* und *Xenopus laevis*. Zahlen in Prozent identischer Aminosäurereste.

Die 41 kDa-große Isoform III konnte in dieser Arbeit mit den Antikörpern Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) in murinen Herz- und Skelettmuskelproteinextrakten nachgewiesen werden (Abbildung 4.2, A und B). Die Isoform III, bei der Exon 2 fehlt, konnte jedoch von dem Antikörper 9F4.5.15, dessen Epitop im Bereich der von Exon 2 kodierten Aminosäuren 80 bis 100 liegt, nicht erkannt werden. Bei Extrakten der Ratte und des Krallenfrosches war diese Isoform mit den eingesetzten Antikörpern nicht nachweisbar. Bei *Xenopus* ist unklar, ob eine Isoform existiert, die ähnlich wie beim Menschen am Ende des von Exon 2 bzw. wie bei der Maus am Anfang des von Exon 3 kodierten Bereiches beginnt. In der Proteinsequenz von *Xenopus* ist ein Methioninrest zu finden, der potentiell als alternativer Startpunkt dienen könnte (Position 129 im Alignment im Anhang). In der Sequenz von *Rattus norvegicus* liegt jedoch kein Methionin in der Nähe, so dass die Isoform III (Nomenklatur der Maus) bei dieser Spezies wahrscheinlich nicht vorkommt.

In Proteinextrakten von Uterus, Blase, Darm und Lunge wurde in der vorliegenden Arbeit in den Spezies *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* mit den beiden Antikörpern Myotilin (gesamt) und Myotilin (Exon 3/4) ein Protein mit einer molekularen Masse von etwa 100 kDa nachgewiesen (Abbildungen 4.2 und 4.3, je A und B). Bei der Ratte erschien diese Bande auch bei Extrakten der Prostata, Linse, Milz und des Vas deferens. Auch in anderen Studien wurden größere Proteine mit einer molekularen Masse von ca. 75 (Hauser et al., 2000) bzw. 110 kDa (Salmikangas et al., 1999) mit unterschiedlichen myotilinspezifischen Antikörpern in Western Blot-Analysen detektiert. Diese können mit der bisher bekannten Genstruktur nicht erklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die als Introns definierten Sequenzen des Myotilings (Abbildung 4.1) auf offene Leseraster untersucht. Um potentiell in den Introns enthaltene Exonsequenzen zu amplifizieren, wurden die Primer jeweils am Anfang des vorhergehenden und am Ende des nachfolgenden Exons gewählt. Mit dieser Methode konnten allerdings keine DNA-Fragmente amplifiziert werden, die auf die Existenz weiterer Exons innerhalb der Intronsequenzen hindeuten. Eventuell könnte es sich bei den detektierten Proteinen um Dimere handeln. Eine weitere Möglichkeit wäre ein auf alternativem Spleißen basierendes Anhängen weiterer Exons 5' oder 3' vom bisher identifizierten Myotilingen. Dies könnte durch RACE-(„rapid amplification of cDNA ends“-)PCR überprüft werden. Auf Proteinebene könnte das 100 kDa-Protein untersucht werden, indem es immunpräzipitiert und massenspektrometrisch untersucht würde. Die Vorarbeiten dazu wurden bereits in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, indem gezeigt wurde, dass das 100 kDa-Protein aus RIPA-Darmproteinextrakten immunpräzipitierbar ist (Kapitel 4.2.5, Abbildung 4.5).

In Gehirnproteinextrakten der Maus und der Ratte konnte mit dem Antikörper Myotilin (gesamt) ein Protein mit einer molekularen Masse von etwa 38 kDa nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.2 und 4.2.3, Abbildungen 4.2 und 4.3) und zwar sowohl in Gesamtgehirn- als auch in Kleinhirn- und Bulbus olfactorius-Proteinextrakten. Mit dem Antikörper Myotilin (Exon 3/4) konnte das 38 kDa-Protein dagegen in keiner der beiden Spezies detektiert werden. Das 38 kDa-Protein ist mit den Isoformen I, II und III nicht zu erklären. Da sich – wie im humanen Gen – in Exon 4 ein drittes Startkodon im selben Leseraster wie die beiden ersten befindet, könnte die 38 kDa-Bande auf diese vierte Isoform zurückzuführen sein, deren molekulare Masse mit 35,2 kDa berechnet wurde. Das dritte Startmethionin sowie die 13 N-terminal und die sechs C-terminal davon gelegenen Aminosäurereste von Mensch und Maus sind sowohl bei der Ratte als auch beim Krallenfrosch konserviert. Dies spricht stark für das Vorkommen von Isoformen, die bei diesem dritten Startpunkt beginnen. Auch auf mRNA-Ebene wurden mit Hilfe von RT-PCRs und Primern im Exon 4 bzw. 10 im Kleinhirn und im

Bulbus olfactorius kleinere Fragmente amplifiziert als im Skelettmuskel (Abbildung 4.6). Hier fehlen allerdings Basenpaare zwischen Exon 4 und 10, die in der Isoform IV vorhanden sind. Es könnte sich also auch um eine weitere, bisher noch nicht charakterisierte Isoform handeln.

Tabelle 5.2: Expression der Myotilinisformen

Organ	Isoform I/II 55 kDa	Isoform III 41 kDa	Isoform IV 35,2 kDa	Unbekanntes Protein 100 kDa
Herz	+	+	–	–
Skelettmuskel	+	+	–	–
Zunge	+	+	–	–
Uterus	+	–	–	+
Blase	+	–	–	+
Darm	+	–	–	+
Gehirn (ges.)	–	–	+	–
Kleinhirn	–	–	+	–
Bulbus olf.	–	–	+	–
Lunge	+	–	–	+
Prostata	–	–	–	–/+ ^R
Lymphknoten	+	–	–	–
Linse	–	–	–	–
Haut	+	–	–	–
Leber	–	–	–	–
Milz	+ ^R	– ^R	– ^R	+ ^R
Hoden	– ^R	– ^R	– ^R	– ^R
Vas deferens	– ^R	– ^R	– ^R	+ ^R
Niere	– ^R	– ^R	– ^R	– ^R
Thymus	– ^R	– ^R	– ^R	– ^R

Tabelle 5.2: Proteinexpression der Myotilinisformen I, II, III und IV sowie des 100 kDa-Proteins in unterschiedlichen Geweben der Maus und der Ratte (R) (siehe Abbildungen 4.2 und 4.3). +=Expression; –=keine Expression.

Vergleicht man das Expressionsmuster in den unterschiedlichen Organen mit dem anderer Studien (Godley et al., 1999; Mologni et al., 2005; Salmikangas et al., 1999), werden viele

Ergebnisse bestätigt (Tabelle 5.3). Im Herzen und Skelettmuskel konnte mit verschiedenen Methoden eine Expression von Myotilin belegt werden. Auf RNA-Ebene wurde sie mit Northern Blot- und RNA-Dot Blot-Analysen sowie in situ Hybridisierungen und auf Proteinebene mit Western Blot-Analysen gezeigt. Auf Proteinebene wurden bisher mit unterschiedlichen myotilinspezifischen Antikörpern nur die 55 kDa-Isoformen nachgewiesen. Zum ersten Mal konnte in der vorliegenden Arbeit auch die 41 kDa-Isoform III detektiert werden.

Zur Expression von Myotilin im Gehirn gibt es widersprüchliche Daten (Tabelle 5.3). In Northern Blot-Analysen konnte Myotilin in den meisten Studien im Gehirn nicht nachgewiesen werden (Godley et al., 1999; Mologni et al., 2005; Salmikangas et al., 1999). In der Internetdatenbank www.genecards.org wird die Expression im Gehirn jedoch aufgeführt. Auch in ISH-Studien wurde Myotilin auf RNA-Ebene in einigen Teilen des Gehirns sowie in peripheren Nerven nachgewiesen (Mologni et al., 2005). Unterschiedliche Antikörper gegen Myotilin erkannten in Western Blot-Analysen bisher kein Protein. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen erstmals ein Antikörper, der gegen das Gesamtprotein gerichtet war, eingesetzt. Mit diesem Antikörper ließ sich ein etwa 38 kDa großes Protein in Gehirnproteinextrakten der Maus und der Ratte detektieren. Auch durch Einsatz des monoklonalen Antikörpers 9F4.5.15 konnte in murinen Gesamtgehirnproteinextrakten die 38 kDa-Isoform von Myotilin nachgewiesen werden. In RT-PCR-Experimenten wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine kleinere Isoform als im Skelettmuskel amplifiziert.

Auch zur Expression von Myotilin in der Lunge gibt es in der Literatur diskrepante Daten. So wurde Myotilin in Northern Blot-Analysen oder ISHs in manchen Studien in der Lunge nachgewiesen (Mologni et al., 2005; Mologni et al., 2001), in anderen jedoch nicht (Godley et al., 1999; Salmikangas et al., 1999). In Western Blot-Analysen wurde Myotilin bisher nicht detektiert (Mologni et al., 2005). Mit allen drei in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Antikörpern wurden jedoch Proteine in murinen Lungenproteinextrakten erkannt (Kapitel 4.2.2, Abbildung 4.2). Auch in den hier durchgeführten Immunfluoreszenzstudien konnte Myotilin in der Lunge nachgewiesen werden (Kapitel 4.3.1, Abbildung 4.7).

Ähnliche Diskrepanzen lassen sich auch bei vielen anderen Organen finden (Tabelle 5.3). In der Leber und der Niere konnte in der vorliegenden Arbeit mit keinem der verwendeten Antikörper Proteinexpression nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.2 und 4.2.3, Abbildung 4.2). Das bestätigt die Ergebnisse aus Mologni et al., (2005). Für die Myotilinexpression auf RNA-Ebene zeigen einige Studien negative (Godley et al., 1999; Salmikangas et al., 1999), andere positive Ergebnisse (Mologni et al., 2005). Eine Erklärung für das Phänomen, dass

Expression zwar auf RNA-, nicht jedoch auf Proteinebene stattfindet, könnten die so genannten microRNAs (miRNAs) sein, die Regulatoren der Genexpression auf mRNA-Ebene darstellen (Hobert, 2008; Lee et al., 1993). miRNAs sind einzelsträngige nicht-kodierende RNA-Moleküle aus etwa 21 bis 25 Nukleotiden, die teilweise komplementär zu exprimierten mRNA-Molekülen sind. Die Anlagerung einer miRNA an mRNA verhindert deren Translation. Eine Reihe von Ribonukleoproteinen, die miRNPs, wirken bei diesem Vorgang wahrscheinlich unterstützend (Schwarz und Zamore, 2002). miRNAs spielen auch eine Rolle bei der Entwicklung von Organen wie dem Herzen und können bei veränderter Expression Herzkrankheiten hervorrufen (Zhang, 2008). Für Myotilin wurden bisher bereits 35 miRNAs beim Menschen und 42 miRNAs bei der Maus vorhergesagt (<http://microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/targets/v5/search.pl>).

In der Studie von Mologni et al. (2005) konnte Myotilin-mRNA in ISH-Experimenten in der Glattmuskelschicht um die Blutgefäße der Lunge sowie die Bronchien nicht oder nur schwach angefärbt werden. Einzige Ausnahme bildeten dabei die hilären Regionen der Lunge, also die Austrittsstellen der großen Gefäße. In der vorliegenden Arbeit konnte Myotilin in Western Blot-Analysen und Immunfluoreszenzstudien auf Proteinebene in Glattmuskelgeweben nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.2, Abbildung 4.2). In den Immunfluoreszenzstudien wurden hier die Tunica media der Gefäße sowie die Glattmuskelzellen um die Bronchioli herum mit den myotilinspezifischen Antikörpern angefärbt (Kapitel 4.3.1, Abbildung 4.7). In der Studie von Salmikangas et al. (1999) konnte Myotilin dagegen weder auf mRNA- noch auf Proteinebene in Glattmuskelgeweben detektiert werden. Das könnte an der Wahl der Sonde bzw. des Antikörperepitops liegen. Mologni et al. haben zwei verschiedene Sonden hergestellt, die am N-Terminus bzw. im 3'-UTR binden, während die Sonde von Salmikangas et al. komplementär zu einem cDNA-Bereich ist, der für den C-Terminus von Myotilin kodiert. Die Wahl der ISH-Sonden muss – ebenso wie die des Antikörpers – beim Vergleichen der Ergebnisse mehrerer Studien also immer sorgfältig berücksichtigt werden. Das Epitop des Antikörpers, der von Salmikangas et al. verwendet wurde, liegt innerhalb der zweiten Ig-ähnlichen Domäne. Dies könnte darauf hindeuten, dass in Glattmuskelzellen eine oder mehrere Myotilinisoformentypen ohne Ig-ähnliche Domänen, z. B. Isoformen d und/oder g, exprimiert werden.

Mit Hilfe von In situ-Hybridisierungsstudien konnte Myotilin auf RNA-Ebene unter anderem in den Epithelzellen des Darms von Mäuseembryonen (E13) nachgewiesen werden (Mologni et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden Immunfluoreszenzstudien mit adulten murinen Darmgefrierschnitten durchgeführt. Myotilin konnte hier auf Proteinebene sowohl in

den Epithelzellen als auch in den Glattmuskelzellen der Ring- und Längsmuskulatursschichten angefärbt werden (Kapitel 4.3.1, Abbildung 4.8). In letzteren war zum Teil eine punktförmige Färbung von Myotilin zu sehen, die an α -Aktininfärbungen erinnerte. Die subzelluläre Lokalisation von Myotilin in Glattmuskelzellen sowie in Darmepithelzellen wird in den folgenden Kapiteln ausführlich diskutiert.

Tabelle 5.3: Vergleich von Daten der Myotilinexpression

Organ	Salmikangas et al., 1999	Godley et al., 1999	Mologni et al., 2005	www.genecards.org	diese Arbeit
Herz	+ ^N	+ ^N	+ ^{N,P,I,W}	+ ^{N,S,A}	+ ^W
Skelettmuskel	+ ^{N,W}	+ ^{D,N}	+ ^{N,P,I,W}	+ ^{N,S,A}	+ ^W
Zunge					+ ^W
Uterus					+ ^W
Blase					+ ^W
Darm					+ ^W
Gehirn (ges.)	- ^{N,W}	- ^N	- ^{N,W/+^{P,I}}	+ ^{N,S,A}	+ ^W / _{-^W}
Kleinhirn					+ ^W / _{-^W}
Bulbus olf.					+ ^W / _{-^W}
Lunge	- ^N	- ^N	+ ^N / _{-^W}	+ ^{N,A}	+ ^W
Prostata		+ ^D		+ ^{N,A}	- ^W / _{+^{WR}}
Lymphknoten	- ^W	- ^N			+ ^W
Linse					- ^W
Haut					+ ^W
Leber	- ^N	- ^N	+ ^{N,P,I} / _{-^W}	+ ^{N,S,A}	- ^W
Milz	- ^W	- ^N	- ^{N,I,W}	+ ^A	+ ^{WR}
Hoden			- ^N		- ^{WR}
Vas deferens					+ ^{WR} / _{-^{WR}}
Niere	- ^N	- ^N	- ^{N,W/+^{P,I}}	+ ^A	- ^{WR}
Thymus		- ^N		+ ^A	- ^{WR}
Glattmuskel	- ^{N,W}		+ ^I		+ ^F

Tabelle 5.3: Vergleich von Daten der Myotilinexpression unterschiedlicher Studien (Godley et al., 1999; Mologni et al., 2005; Salmikangas et al., 1999). +=Nachweis von Myotilin; -=kein Nachweis von Myotilin; N=Northern Blot; D=RNA-Dot Blot; W=Western Blot, R=Ratte; P=RT-PCR; I=ISH; S=SAGE („Serial analysis of gene expression“); A=Mircoarray; F=Immunfluoreszenzfärbung

5.2 Subzelluläre Lokalisation von Myotilin

In bovinen Myofibrillenbündeln sowie in differenzierten humanen Skelettmuskelzellen (HSkM-Zellen) und transient transfizierten differenzierenden C2C12-Zellen lokalisiert Myotilin in den Z-Scheiben (Salmikangas et al., 1999; Salmikangas et al., 2003). Außerdem konnte Myotilin am Sarkolemma und in intramuskulären Nervenfasern detektiert werden (Salmikangas et al., 1999). Hauser et al. (2002) postulierten, dass die hydrophobe Region des Myotilinproteins (Aminosäuren 57 bis 79) zur Lokalisierung am Sarkolemma beiträgt. Mit α -Aktinin kolokalisiert Myotilin in den Z-Scheiben der Myofibrillen und in transient transfizierten CHO-Zellen punktförmig entlang von Stressfasern (Mologni et al., 2005; Salmikangas et al., 2003; von Nandelstadh et al., 2005). Auch mit den in der vorliegenden Arbeit getesteten Antikörpern konnte Myotilin in indirekten Immunfluoreszenzstudien in den Z-Scheiben von Skelettmuskelschnitten sowie von isolierten Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.1 und 4.3.3, Abbildung 4.17). Myotilin kolokalisierte dabei mit dem Z-Scheibenepitop von Titin.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden A7r5-Glattmuskelzellen mit Myotilinplasmiden transient transfiziert (Kapitel 4.4). Die dazu eingesetzten Plasmide, pEGFP-Cpd und pMypG, enthielten die Sequenz verschiedener Myotilinisofomen sowie von EGFP (Kapitel 4.4.1). Bei den Fusionsproteinen wurde EGFP bei den pEGFP-Cpd-Vektoren N-terminal bzw. bei den pMypG-Vektoren C-terminal von Myotilin exprimiert. Wie in CHO-Zellen (Salmikangas et al., 2003) lokalisierte die Isoform Myotilin a auch in A7r5-Zellen perlenschnurartig entlang der Aktinfilamente. Das Färbemuster ähnelte dabei dem des α -Aktinin, das in den „dense bodies“ glatter Muskelzellen lokalisiert. Da Myotilin a an α -Aktinin binden kann (Salmikangas et al., 1999), ist die Kolokalisation der beiden Proteine in den „dense bodies“ (Kapitel 4.4.3, Abbildung 4.20 A) konsequent.

Transiente Transfektionen mit verschiedenen Myotilinkonstrukten zeigten zum Teil unterschiedliche Verteilungsmuster. Überexpression von Myotilin a in CHO- und COS-1-Zellen hatte eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts zur Folge (Salmikangas et al., 2003). Ein C-terminales Konstrukt (Aminosäuren 215 bis 498) kolokalisierte mit dem kortikalen Aktinzytoskelett. Eine Überexpression hatte im Gegensatz zum Konstrukt mit der vollständigen Sequenz keine Auswirkungen. In differenzierenden C2C12-Zellen bildeten transfizierte N- und C-terminale Konstrukte (Aminosäuren 1-251 bzw. 252-498) Aggregate, in denen auch Titin nachweisbar war (Salmikangas et al., 2003). Auch Doppeltransfektionen mit Myotilin und einem Filamin c-Konstrukt (d19-21) in Ptk2-Zellen hatten Aggregate zur

Folge (van der Ven et al., 2000). Die in der vorliegenden Arbeit zur transienten Transfektion benutzten Myotilinkonstrukte, die Isoformen a, b, c, d und g, lösten dagegen keine Aggregatbildungen aus (Kapitel 4.4.3, Abbildungen 4.18 und 4.19). Eine Kollokalisierung mit dem kortikalen Aktinzytoskelett war jedoch z. B. bei dem Konstrukt pEGFP-Cpd-Myotilin g zu sehen. Bei diesem Konstrukt, das am zweiten ATG beginnt, fehlt das Exon 6, so dass sich das Leseraster verschiebt und am Anfang von Exon 7 ein Stopkodon entsteht (Abbildung 4.1 A). Auf Proteinebene beinhaltet Myotilin g daher weder die serinreiche Region noch die Ig-ähnlichen Domänen. Dadurch fehlen die Bindungsstellen für Filamin c und Aktin vollständig, sowie die für α -Aktinin vorhergesagte teilweise. Dass Myotilin g trotz fehlender Aktinbindungsstelle mit dem kortikalen Aktinzytoskelett kollokalisiert (Abbildung 4.18 E), zeigt, dass Myotilin auch indirekt über andere Proteine an Aktin binden kann oder dass es eine zweite Aktinbindungsstelle besitzen könnte. Die Möglichkeit einer zweiten Aktinbindungsstelle wurde auch von von Nandelstadh et al. (2005) diskutiert, die zeigen konnten, dass deletierte Myotilinkonstrukte zwar die Aktinbündelung nicht jedoch die Dimerisierung zweier Myotilinmoleküle inhibierten.

Konstrukte, die nur die Aminosäuren im Bereich der zweiten oder beider Ig-ähnlichen Domänen beinhalteten (Aminosäuren 248-442 bzw. 345-442), lokalisierten in transfizierten CHO-Zellen nicht in den Stressfasern (von Nandelstadh et al., 2005). Überexprimierte Myotilin-Konstrukte, die beide Ig-ähnlichen Domänen, nicht jedoch die α -Aktinin-Bindungsstelle enthielten, konnten zwar in Vorläuferstadien der Z-Scheiben, nicht jedoch in Z-Scheiben ausdifferenzierter Myotuben nachgewiesen werden (van der Ven et al., 2000). Diese Myotuben konnten keine Myofibrillen aufbauen, sondern entwickelten lediglich irreguläre filamentöse, stressfaserartige Strukturen oder Aggregate. Van der Ven et al. (2000) schlossen daraus, dass der bei diesem Konstrukt fehlende N-terminale, α -Aktinin-bindende Teil von Myotilin eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Myofibrillenaufbaus spielt. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Myotilinkonstrukte ohne die Ig-ähnlichen Domänen erzeugt (Kapitel 4.4.1). Dabei handelte es sich um EGFP-Konstrukte der Isoformen d und g, bei denen das Exon 6 fehlte und dadurch ein Stopkodon am Anfang von Exon 7 entstand, so dass im Protein die Ig-ähnlichen Domänen fehlten (Abbildung 4.1). Während Myotilin d, das mit dem ersten ATG beginnt, in transfizierten A7r5-Zellen ähnlich wie die Isoformen a, b und c entlang der Aktinfilamente in den „dense bodies“ lokalisierte, war die Verteilung von Myotilin g meist diffuser Natur und hauptsächlich im und um den Zellkern sowie am kortikalen Aktinzytoskelett zu erkennen (Abbildungen 4.18 und 4.19 D und E). Dies zeigt, dass die Aminosäuren 1 bis 115, die bei Myotilin g fehlen, offensichtlich Einfluss auf die

Lokalisierung von Myotilin in den „dense bodies“ haben. Zusätzlich gibt es starke Anzeichen, dass die Aminosäuren 229 bis 498 bei dieser Aufgabe ebenfalls eine Rolle spielen. Denn bei Myotilin b fehlen zwar wie bei Myotilin g die Aminosäuren 1 bis 115, dennoch lokalisiert Myotilin b, das die Aminosäuren 229 bis 498 enthält, in den „dense bodies“ (Abbildungen 4.18 und 4.19 B). So kann aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit spekuliert werden, dass Myotilin eventuell zwei Bindungsstellen für Aktin besitzt oder aber Myotilin über weitere Adapterproteine am Aktinzytoskelett verankert wird.

5.3 Myotilin spielt eine Rolle beim Aufbau von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten

Sowohl auf mRNA-Ebene (Mologni et al., 2001) als auch auf Proteinebene (diese Arbeit, Kapitel 4.3.1) konnte Myotilin in den Epithelzellen des Maudarms nachgewiesen werden. Abbildung 4.8 zeigt die Lokalisation von Myotilin an den Zell-Zell-Grenzen der Epithelzellen. Aufgrund dieser Daten und der Fähigkeiten von Myotilin, Aktin und α -Aktinin zu binden und das Zytoskelett in Muskelzellen zu verankern, liegt die Vermutung nahe, dass Myotilin auch in Epithelzellen bei der Verankerung des Zytoskeletts, z. B. an Zell-Zell-Kontakten, eine Rolle spielen könnte. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Immunfluoreszenzuntersuchungen die subzelluläre Lokalisation von Myotilin innerhalb von Darmepithelzellen mit der von Markerproteinen für Zell-Zell-Kontakte verglichen (Kapitel 4.3.2).

Beim Darmepithel handelt es sich um ein polares, einschichtiges, hochprismatisches Epithel, das verschiedene Arten von Zell-Zell-Kontakten ausbildet. Die unterschiedlichen Zell-Zell-Kontakte sind im so genannten Schlussleistenkomplex in spezifischer Reihenfolge angeordnet (Abbildung 1.4). Am weitesten apikal liegen dabei die „tight junctions“, weiter basal die Kontaktstrukturen der Zonula adhaerens und anschließend die Desmosomen. „Tight junctions“ werden von Transmembranproteinen, den Occludinen und Claudinen, die zytosolisch z. B. über ZO-1 mit dem Aktinzytoskelett interagieren (Hartsock und Nelson, 2008; Mitic et al., 2000), aufgebaut. Als Marker für die „tight junctions“ wurden in der vorliegenden Arbeit ZO-1 und Occludin gewählt. Kontakte im Bereich der Zonula adhaerens werden von Transmembranproteinen der Cadherinfamilie sowie assoziierten Adapterproteinen vermittelt. Die Zonula adhaerens wurde hier mit Antikörpern gegen Cadherin bzw. intrazellulär mit α -Catenin, β -Catenin, Vinculin und α -Aktinin markiert.

In den Zell-Zell-Kontakten der Darmepithelzellen zeigte Myotilin eine partielle Kolokalisierung mit den „tight junction“-Konstituenten ZO-1 und Occludin (Abbildungen 4.9

und 4.10). An einigen Zell-Zell-Grenzen war Myotilin allerdings auch weiter basal nachweisbar. Außerdem war teilweise eine Färbung an der apikalen Oberfläche der Zellen zu beobachten, die an Mikrovilli erinnerte. Auch mit dem Mikrovillimarker Villin kolokalisierte Myotilin jedoch nur partiell (Abbildung 4.11). Auch die Zonula adhaerens-Marker Cadherin, α -Catenin, β -Catenin, Vinculin und α -Aktinin zeigten in indirekten Immunfluoreszenzstudien in Darmschnitten lediglich eine partielle Kolokalisation mit Myotilin (Abbildungen 4.12 bis 4.16).

Myotilin kolokalisierte also partiell sowohl mit Konstituenten der „tight junctions“ als auch der Zonula adhaerens. Myotilin konnte zudem basal von der Zonula occludens und apikal von der Zonula adhaerens nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass es eine Rolle bei mehreren Arten von Zell-Zell-Kontakten spielen könnte oder Aufgaben im kortikalen Zytoskelett insgesamt übernimmt.

In Kardiomyozyten wurde Myotilin in den Z-Scheiben und in den Glanzstreifen, die stufenförmig zwischen den Kardiomyozyten verlaufen und zahlreiche Zell-Zell-Kontakte enthalten, nachgewiesen (Abbildung 4.17). Myotilin war sowohl in den transversalen Abschnitten der Glanzstreifen (Abbildung 4.17 A, Pfeilspitze und B, untere Pfeilspitze) als auch in den longitudinalen Teilabschnitten nachweisbar (Abbildung 4.17 B, obere Pfeilspitze). Dies deutet auf eine Beteiligung von Myotilin am Aufbau mehrerer Zell-Zell-Kontakte hin und deckt sich mit den Ergebnissen der Färbungen des Darmepithels, bei denen eine partielle Kolokalisation von Myotilin mit Bestandteilen der Zonula adhaerens sowie eine Lokalisation weiter basal dieser Zone gezeigt werden konnte. Da bei MFM/MYOT-Patienten auch der Herzmuskel betroffen sein kann, wäre eine Beteiligung von Myotilin bei Zell-Zell-Kontakten, die der Erregungsleitung dienen, denkbar.

Neben einer Beteiligung von Myotilin beim Aufbau von Zell-Zell-Kontakten wurden auch Hinweise auf eine Beteiligung beim Aufbau von Zell-Matrix-Kontakten gefunden. Dies wird in transienten Transfektionen von A7r5-Glattmuskelzellen deutlich (Kapitel 4.4). Wie α -Aktinin (Mooseker und Tilney, 1975; Otey et al., 1990) war auch Myotilin in diesen Studien in den „adhesion plaques“ nachweisbar (Abbildung 4.20 B).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass Myotilin nicht nur zur Erhaltung der Z-Scheiben im Muskel dient, sondern – vergleichbar mit Filamin oder α -Aktinin – eine versatile Rolle auch in Glattmuskel- und Nichtmuskelzellen spielt. Myotilin könnte demnach Funktionen beim Aufbau von Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Kontakten übernehmen und zusammen mit anderen Proteinen für die Verankerung des Aktinzytoskeletts verantwortlich sein.

5.4 Myotilin wird von den Proteinkinasen PKA, PKC α und MAPK phosphoryliert

Proteinkinasen sind Enzyme, die Phosphatreste von ATP- oder GTP-Molekülen auf spezifische Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste von Proteinen übertragen, wodurch deren Eigenschaften und Funktionen moduliert werden können. So kann die Phosphorylierung eines Enzyms z. B. seine Aktivierung, aber auch seinen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System bewirken. Der Vorgang der Phosphorylierung wird meist durch intra- oder extrazelluläre Stimuli ausgelöst und ist ein wichtiger Regulationsmechanismus bei einer Vielzahl von Proteinen in eukaryotischen Zellen.

Auch die Phosphorylierung von Proteinen in Skelett- oder Herzmuskelzellen hat vielfache Auswirkungen. So wird durch die Phosphorylierung von Troponin I die Ca²⁺-Sensitivität der Myofibrillen reduziert (Kentish et al., 2001; Zhang et al., 1995). Phosphoryliertes Myosin-Bindeprotein C erhöht die Flexibilität des Myosinköpfchens (Gruen et al., 1999; Kunst et al., 2000), während die Phosphorylierung der elastischen Region von Titin Effekte auf die passive Spannung von Kardiomyozyten zeigte (Yamasaki et al., 2002).

Für Myotilin konnten in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der internetbasierten Software KinasePhos (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>) mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für unterschiedliche Proteinkinasen wie PKA, PKC und MAPK vorhergesagt werden. Viele der vorhergesagten Aminosäurereste liegen in der serinreichen Region am N-Terminus von Myotilin, die auch alle bisher bekannten Mutationen enthält (Abbildung 4.21). Die Phosphorylierung dieser Reste könnte wichtige regulatorische Funktionen haben, die sich durch Mutationen auf Aminosäureebene verändern könnten. Die Identifizierung der Signalwege, die die Aktivität von Myotilin regulieren, kann einen Beitrag zum Verständnis der Entstehung von Muskelkrankheiten wie LGMD1A oder MFM/MYOT leisten. Phosphorylierungen von Myotilin könnten auch Auswirkungen auf die Gesamtorganisation der Z-Scheibe im quergestreiften Muskel oder der „dense bodies“ in Glattmuskelzellen haben. So wurde von Himmel (2004) postuliert, dass eine Phosphorylierung des M-Bandenproteins Myomesin Eigenschaften der M-Bande, z. B. deren Flexibilität, modulieren könnte, indem die Bindung von Myomesin an Titin destabilisiert wird. Auf diese Weise könnten auch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Myotilin als Antwort auf extrazelluläre Signale die Eigenschaften des Sarkomers auf veränderte Anforderungen anpassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Phosphorylierungsstudien mit aufgereinigten rekombinanten Kinasen und radioaktiv markiertem [γ -³³P]ATP gezeigt, dass Myotilin *in vitro*

von den Serin-/Threonin-Proteinkinasen PKA (Kapitel 4.5.1), PKC α (Kapitel 4.5.3) und MAPK (Kapitel 4.5.5) phosphoryliert wird. Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) konnte durch unterschiedliche Experimente eindeutig als eine der Kinasen identifiziert werden, die Myotilin auch in differenzierten C2C12-Zellen phosphorylieren (Abbildung 4.24 A). Dazu wurden die cAMP-Konzentrationen in den Versuchsansätzen variiert sowie die PKA-Inhibitoren PKI und H-89 eingesetzt. Auch in PKC- und MAPK-Puffer konnten mit Proteinextrakten kultivierter, differenzierter C2C12-Zellen Phosphorylierungssignale von Myotilin nachgewiesen werden.

Zur genaueren Lokalisation der Phosphorylierungsstellen wurden in der vorliegenden Arbeit einige der mit der Software KinasePhos identifizierten Motive durch Punktmutagenese gezielt zerstört. Die meisten der so generierten Mutationen hatten Einfluss auf die Intensität des Phosphorylierungssignals (Abbildungen 4.23, 4.26 und 4.28). So war das autoradiographierte Signal bei den Mutanten 2 und 3, bei denen eine Substrat-Aminosäure der MAPK mutiert ist, im MAPK-Phosphorylierungsexperiment deutlich schwächer als beim Wildtyp. Bei der Doppelmutante 23 war ein Signal kaum noch nachweisbar. Beide Aminosäuren spielen also offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung von Myotilin durch MAPK. Die Mutante 4, bei der eine potentielle Erkennungssequenz für die PKC α mutiert wurde, konnte von der PKC α *in vitro* mit einem nur wenig abgeschwächten Signal phosphoryliert werden. Dies deutet darauf hin, dass andere Stellen des Proteins bei der Phosphorylierung durch die PKC α bevorzugt werden. Die schwächeren Signale bei den anderen Mutanten legen den Schluss nahe, dass es sich um eine konsekutive Phosphorylierungskaskade handeln könnte, bei der die Phosphorylierung der einen Aminosäure durch eine Proteinkinase Voraussetzung für die Phosphorylierung weiterer Aminosäuren durch dieselbe oder eine andere Proteinkinase ist. Zum Beispiel ist bei der Phosphorylierung von β -Catenin durch Glykogen-Synthase-Kinase 3 eine vorherige Phosphorylierung von β -Catenin durch Casein-Kinase 1 notwendig (Daugherty und Gottardi, 2007; Liu et al., 2002). Die vorliegenden Phosphorylierungsexperimente mit der PKA zeigen, dass die Phosphorylierungsintensität bei der Mutante 4, bei der eine vorhergesagte Erkennungssequenz für die PKA mutiert wurde, schwächer als beim Wildtyp war. Noch schwächer waren die Signale bei den anderen Mutanten, was wieder auf eine konsekutive Phosphorylierung schließen lässt.

Die Phosphorylierungen von Myotilin durch mehrere Kinasen haben wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen. Wie bei β -Catenin könnte eine bestimmte Abfolge von Phosphorylierungsereignissen einen Abbau des Proteins durch das Ubiquitin-Proteasom-System zur Folge haben. Durch die Mutation eines bestimmten Serin- oder Threoninrestes

könnte die Phosphorylierung verhindert oder erschwert werden, so dass der Abbau von Myotilin gehemmt würde. Das wäre eine mögliche Erklärung für die Bildung von myotilinhaltigen Proteinaggregaten bei der Muskelkrankheit MFM/MYOT.

Durch fehlende Phosphorylierungen aufgrund von Punktmutationen von Serin- oder Threoninresten könnte auch die Konformation des Myotilinproteins verändert sein, so dass eine Wechselwirkung mit anderen Proteinen wie Filamin c verhindert oder erschwert würde. Myotilin würde in diesem Fall eine oder mehrere Funktionen verlieren („loss of function“). Im Fall der Myotilinmutation T57I, die bei LGMD1a-Patienten gefunden wurde, konnte eine Verhinderung der α -Aktinin-Bindung jedoch nicht belegt werden (Hauser et al., 2000). Dennoch ist eine Schwächung der Bindung zwischen mutiertem Myotilin und α -Aktinin denkbar. In Transfektionstudien die von Nandelstadh et al. (2005) mit der Einzelmutante S95I und den Mehrfachmutanten S55F/T57I/S60C und S55F/T57I/S60C/S95I durchführten, konnten im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen in der Lokalisation von Myotilin und Aktin gefunden werden. Daher scheint der pathologische Effekt dieser Mutanten in den Muskelkrankheiten von den aktinmodulierenden Eigenschaften von Myotilin unabhängig zu sein (von Nandelstadh et al., 2005).

Durch Mutationen potentieller Phosphorylierungsstellen oder anderer Aminosäurereste wäre auch ein Hinzukommen einer weiteren, bisher von Myotilin nicht erfüllten Funktion („gain of function“) denkbar. Hieraus könnten zum Beispiel auch die bei MFM/MYOT beobachteten Aggregate resultieren. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass nicht nur mutiertes sondern vor allem Wildtyp-Myotilin für die Aggregate verantwortlich ist (Garvey et al., 2008). Dies konnte mit Hilfe von doppelt transgenen Mäusen gezeigt werden, die sowohl T57I-mutiertes als auch Wildtyp-Myotilin exprimieren und die einen stärkeren Phänotyp ausbilden als einfach transgene Mäuse, die ausschließlich das mutierte Protein exprimieren. Ein Modell ist, dass mutiertes Myotilin die Aggregatbildung initiiert, indem es die Aktinbindung an die Z-Scheibe schwächt. An diesen Stellen würde dann das Wachstum der Aggregate beginnen, welches allerdings von der Gesamtmenge an Myotilin, inklusive Wildtyp-Myotilin, abhängig ist. Eine denkbare Therapiemethode bei MFM/MYOT-Patienten wäre daher, die Myotilinexpression herunterzuregulieren, um die Aggregatbildung zu verzögern.

5.5 Ausblick

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern gegen Gesamtmyotilin bzw. gegen die von Exon 3/4 kodierten Bereiche des Myotilinproteins konnten in Proteinextrakten verschiedener muriner Organe unterschiedliche Myotilinisoformentypen detektiert werden. Zum Vergleich sollten

humane Proben auf die Expression der Isoformen untersucht werden. Um die Isoformen spezifischer unterscheiden zu können, wäre die Generierung weiterer Antikörper notwendig. Ein Antikörper gegen den von Exon 2b kodierten Bereich würde die Isoformen a und d spezifisch erkennen und ließe Schlüsse auf die Expression dieser Isoformen zu. Auf der anderen Seite würde ein Antikörper, der gegen die von Exon 6 kodierte Region von Myotilin gerichtet wäre, ausschließlich die Isoformen a, b und c erkennen.

Zur näheren Untersuchung der bei MFM/MYOT auftretenden Proteinaggregate könnten Mikrodissektionen („Laser capture microdissections“) an Gefrierschnitten von Biopsiematerial von Patienten durchgeführt werden. Durch anschließende Massenspektrometrie könnten die Myotilinisoformentypen identifiziert werden, die in den Aggregaten vorkommen. Mit dieser Methode konnte zum Beispiel FHL1 als das Gen identifiziert werden, das bei der humanen „Reducing body“-Myopathie mutiert ist (Schessl et al., 2008).

Auch auf RNA-Ebene wäre eine Untersuchung der Expression verschiedener Myotilinisoformentypen interessant. Dazu wären unterschiedliche Sonden notwendig, die eine oder zwei Isoformen spezifisch binden und die in in situ Hybridisierungsstudien eingesetzt werden könnten.

Um die Identität des Proteins, das in Western Blot-Analysen mit der molekularen Masse von 100 kDa detektiert wurde, aufzuklären, sollten massenspektrometrische Untersuchungen initiiert werden. Die Vorarbeiten – der Beweis der Immunpräzipitierbarkeit – wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits durchgeführt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für diese große Isoform wäre ein auf alternativem Spleißen basierendes Anhängen weiterer Exons an das 5'- oder 3'-Ende des bisher identifizierten Myotilins. Dies müsste durch RACE- („rapid amplification of cDNA ends“)-PCR überprüft werden.

Zur Aufklärung der Regulationsmechanismen von Myotilin auf mRNA-Ebene in unterschiedlichen Organen wäre eine Untersuchung des Vorkommens von microRNAs interessant. Die z. B. in der Leber nicht nachweisbare Expression von Myotilin auf Proteinebene (vorliegende Arbeit) gibt – im Vergleich mit anderen Studien, die Expression auf mRNA-Ebene nachweisen – Hinweise auf die Regulation durch miRNAs, die die Translation von mRNA regulieren. Außerdem ist bekannt, dass eine gestörte Expression von miRNAs Krankheiten auslösen kann. Dies ist ein weiterer interessanter Ansatz zur Erforschung von Muskelkrankheiten mit Beteiligung von Myotilin.

Um die Lokalisation von Myotilin im Bereich von Zell-Zell-Kontakten weitergehend zu untersuchen, sollten in isolierten Kardiomyozyten Doppelfärbungen mit Markern für

Gürteldesmosomen und Desmosomen durchgeführt werden. Erste Färbungen in Kardiomyozyten wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits initiiert.

Zur Untersuchung der Lokalisation der mit dem Antikörper gegen Gesamtmyotilin im Gehirn detektierten Isoform sind Immunfluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten des Gehirns notwendig. Zur Eingrenzung der genauen Lokalisation sollten Doppelfärbungen mit Markern für bestimmte Zelltypen durchgeführt werden.

Zur Eingrenzung der Phosphorylierungsstellen von Myotilin und zur Untersuchung möglicher konsekutiver Phosphorylierungskaskaden sollten weitergehende Phosphorylierungsstudien durchgeführt werden. Dazu könnten Teilkonstrukte von Myotilin generiert und ihre Phosphorylierung untersucht werden. Auch die Herstellung eines oder mehrerer Antikörper, die spezifisch phosphoryliertes Myotilin erkennen, wäre interessant, um phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Formen unterscheiden zu können. Denkbar wäre, dass die Phosphorylierungen gewebsspezifisch vorkommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Myotilin g trotz fehlender Aktinbindungsstelle mit dem kortikalen Aktinzytoskelett kolokalisiert. Das deutet darauf hin, dass Myotilin auch indirekt über andere Proteine an Aktin binden oder dass es eine zweite Aktinbindungsstelle besitzen könnte. Die Möglichkeit der zweiten Aktinbindungsstelle sollte weitergehend untersucht werden, indem Bindungsstudien mit unterschiedlichen Myotilinkonstrukten durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Das Aktinzytoskelett-Protein Myotilin wurde zuerst in Muskelzellen beschrieben und spielt dort wahrscheinlich eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Funktion der Z-Scheiben. Sein unikaler N-Terminus, über den es eine Bindung mit α -Aktinin eingehen kann, weist eine serinreiche Region unbekannter Funktion auf, in der eine hydrophobe Region enthalten ist. In der C-terminalen Hälfte, über die eine Dimerisierung sowie eine Interaktion mit Aktin und Filamin c möglich ist, befinden sich zwei Ig-ähnliche Domänen. Bei den Muskelkrankheiten LGMD1a und MFM/MYOT wurden mehrere Myotilinmutationen identifiziert, die alle in der serinreichen Region liegen und hauptsächlich Serin- und Threoninreste betreffen. Daher lag die Vermutung nahe, dass potentielle Phosphorylierungsstellen durch die Mutationen beeinflusst werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Myotilin von den Serin-/Threonin-Proteinkinasen PKA, PKC α und MAPK *in vitro* phosphoryliert werden kann. Zudem konnte gezeigt werden, dass in Proteinextrakten kultivierter, differenzierter C2C12-Zellen Kinasen aktiv sind, die in der Lage sind, Myotilin zu phosphorylieren. Die hier gezeigte Abhängigkeit der Phosphorylierung von der cAMP-Konzentration sowie deren Inhibierbarkeit durch PKA-Inhibitoren unterstreicht die Involvierung der cAMP-abhängigen PKA bei der Phosphorylierung von Myotilin. In der vorliegenden Arbeit wurden einige der potentiellen Phosphorylierungsstellen durch Punktmutagenesen modifiziert. Die meisten der generierten Mutanten zeigten dabei im Vergleich zum Wildtyp ein reduziertes Phosphorylierungsniveau.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem Genanalysen zur Identifizierung von Myotilinisoformen durchgeführt. Bei den untersuchten Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* und *Xenopus laevis* bzw. *tropicalis* enthält das Myotilingen zwei bzw. drei potentielle Startkodons (ATG), die alle im selben Leseraster liegen. Das dritte Startkodon im humanen Myotilingen ist bei allen untersuchten Spezies konserviert. Humane ESTs deuten darauf hin, dass sich im Exon 2 intraexonische Spleißstellen befinden, die es in die Exons 2a, b und c aufteilen. Für murines Myotilin existieren solche ESTs jedoch nicht, was Anzeichen für eine größere Komplexität der humanen Variante sein könnte. Durch PCR-Experimente konnte im Zuge der vorliegenden Dissertation in humanen cDNA-Bibliotheken des Skelettmuskels eine Isoform nachgewiesen werden, der das Exon 2b fehlt. Zudem wurde gezeigt, dass in adulten jedoch nicht in fötalen Herz-cDNA-Bibliotheken eine Isoform ohne Exon 1 exprimiert wird. Schließlich ließ sich auch das Fehlen von Exon 6 bei einigen Isoformen nachweisen.

Bei Untersuchungen des Expressionsmusters von Myotilin in unterschiedlichen Geweben von Maus, Ratte und Krallenfrosch konnte neben den bereits in anderen Studien nachgewiesenen Isoformen mit den hier getesteten Antikörpern zum ersten Mal auch die Isoform III detektiert werden. Zudem wurde im Gehirn der Maus und der Ratte ein kleineres Protein von etwa 38 kDa nachgewiesen, bei dem es sich wahrscheinlich um die Isoform IV handelt. Auch auf mRNA-Ebene wurde in cDNA-Bibliotheken des Gehirns eine kleinere Isoform als im Skelettmuskel detektiert.

Die subzelluläre Lokalisation verschiedener humaner Isoformen wurde durch transiente Transfektion untersucht. Dabei lokalisierten die generierten EGFP-Fusionsproteine der Isoformen a, b, c und d perlenschnurartig entlang der Stressfasern und kolokalisierten mit α -Aktinin in den „dense bodies“. Weiterhin wurde Myotilin in den Anheftungsplaques („adhesion plaques“) nachgewiesen. Bei Myotilin g war dagegen jedoch eine Lokalisation im Bereich des kortikalen Aktinzytoskeletts zu erkennen. Da diese Isoform weder die serinreiche Region noch die Ig-ähnlichen Domänen enthält, fehlen ihr die Bindungsstellen für Filamin c und Aktin vollständig, sowie die für α -Aktinin teilweise. Dass Myotilin g trotz fehlender Aktinbindungsstelle mit dem kortikalen Aktinzytoskelett assoziiert ist, deutet darauf hin, dass Myotilin auch indirekt über andere Proteine an Aktin binden kann oder dass es eine zweite Aktinbindungsstelle besitzt.

Durch indirekte Immunfluoreszenzstudien konnte Myotilin in der Lunge in den Glattmuskelzellen um die Bronchioli herum und in der Tunica media der Blutgefäßwände nachgewiesen werden. Im Darm wurde Myotilin in der Ring- und Längsmuskulatur zum Teil analog zu α -Aktinin punktförmig in den „dense bodies“ detektiert. Überraschenderweise war Myotilin jedoch auch an den Zell-Zell-Grenzen der Epithelzellen der Darmzotten nachweisbar, wo es eine partielle Kolokalisation mit Markern für die Zonula occludens sowie Zonula adherens zeigte. Außerdem war Myotilin zum Teil im apikalen Bereich der Zellen, vermutlich in den Mikrovilli oder im Terminalgeflecht, zu beobachten. Auch mit Villin kolokalisierte Myotilin allerdings nur partiell. In Kardiomyozyten wurde Myotilin in den Z-Scheiben sowie in den Glanzstreifen nachgewiesen.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass Myotilin nicht nur zum Aufbau und zur Erhaltung der Z-Scheiben im Muskel dient, sondern – vergleichbar mit anderen aktinbindenden Proteinen wie Filamin oder α -Aktinin – eine versatile Rolle auch in Glattmuskel- und Nichtmuskelzellen spielt. Myotilin könnte demnach Funktionen beim Aufbau von Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Kontakten übernehmen und zusammen mit anderen Proteinen für deren Verankerung am Aktinzytoskeletts verantwortlich sein.

7 Literatur

- 1 Ahn, A. H. und Kunkel, L. M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genetics* 3, 283-291.
- 2 Akster, H. A., Wal, J.-W. und Veenendaal, T. (1995). Interaction of force transmission and sarcomere assembly at the muscle-tendon junctions of carp (*Cyprinus carpio*): ultrastructure and distribution of titin (connectin) and alpha-actinin. *Cell and Tissue Research* 281, 517-524.
- 3 Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4. edn (New York und London, Garland Publishing, Inc.).
- 4 Amersham/GE-Lifesciences (2008). Technical information (<http://www1.gelifesciences.com/apatrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=800633&moduleid=46852>).
- 5 Angst, B., Marcozzi, C. und Magee, A. (2001). The cadherin superfamily. *Journal of Cell Science* 114, 625-626.
- 6 Athman, R., Louvard, D. und Robine, S. (2002). The Epithelial Cell Cytoskeleton and Intracellular Trafficking: III. How is villin involved in the actin cytoskeleton dynamics in intestinal cells? *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 283, G496-502.
- 7 Atsuta, F., Sato, K., Maruyama, K. und Shimada, Y. (1993). Distribution of connectin (titin), nebulin and alpha-actinin at myotendinous junctions of chicken pectoralis muscles: an immunofluorescence and immunoelectron microscopic study. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 14, 511-517.
- 8 Ayscough, K. R. und Drubin, D. G. (1996). ACTIN: General Principles from Studies in Yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12, 129-160.
- 9 Baghdiguian, S., Martin, M., Richard, I., Pons, F., Astier, C., Bourg, N., Hay, R. T., Chemaly, R., Halaby, G., Loiselet, J., Anderson, L. V. B., Munain, A. L. d., Fardeau, M., Mangeat, P., Beckmann, J. S. und Lefranc, G. (1999). Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I-kappa-B-alpha/NF-kappa-B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nature Medicine* 5, 503-511.
- 10 Balci, B., Uyanik, G., Dincer, P., Gross, C., Willer, T., Talim, B., Haliloglu, G., Kale, G., Hehr, U., Winkler, J. und Topaloglu, H. (2005). An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscular Disorders* 15, 271-275.
- 11 Bang, M.-L., Mudry, R. E., McElhinny, A. S., Trombitas, K., Geach, A. J., Yamasaki, R., Sorimachi, H., Granzier, H., Gregorio, C. C. und Labeit, S. (2001). Myopalladin, a Novel 145-Kilodalton Sarcomeric Protein with Multiple Roles in Z-Disc and I-Band Protein Assemblies. *Journal of Cell Biology* 153, 413-428.

- 12 Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., Groh, S., Chen, C.-C., Williamson, R., McNeil, P. L. und Campbell, K. P. (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* *423*, 168-172.
- 13 Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., Richard, I., Marchand, S., Bourg, N., Argov, Z., Sadeh, M., Mahjneh, I., Marconi, G., Passos-Bueno, M. R., Moreira, E. d. S., Zatz, M., Beckmann, J. S. und Bushby, K. (1998). A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nature Genetics* *20*, 37-42.
- 14 Becker, W., Kleinsmith, L. und Hardin, J. (2005). *The world of the cell*, 6. edn, Benjamin Cummings).
- 15 Berciano, J., Gallardo, E., Dominguez-Perles, R., Garcia, A., Garcia-Barredo, R., Combarros, O., Infante, J. und Illa, I. (2008). Autosomal-dominant distal myopathy with a myotilin S55F mutation: sorting out the phenotype. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* *79*, 205-208.
- 16 Bloom, W. und Fawcett, D. (1975). *A textbook of histology*, W. B. Saunders Comp.).
- 17 Bönemann, C. G., Modi, R., Noguchi, S., Mizuno, Y., Yoshida, M., Gussoni, E., McNally, E. M., Duggan, D. J., Angelini, C., Hoffman, E. P., Ozawa, E. und Kunkel, L. M. (1995). beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nature Genetics* *11*, 266-273.
- 18 Borrmann, C. M., Grund, C., Kuhn, C., Hofmann, I., Pieperhoff, S. und Franke, W. W. (2006). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk. *European Journal of Cell Biology* *85*, 469-485.
- 19 Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* *7*, 248-254.
- 20 Brockington, M., Yuva, Y., Prandini, P., Brown, S. C., Torelli, S., Benson, M. A., Herrmann, R., Anderson, L. V. B., Bashir, R., Burgunder, J.-M., Fallet, S., Romero, N., Fardeau, M., Straub, V., Storey, G., Pollitt, C., Richard, I., Sewry, C. A., Bushby, K., Voit, T., Blake, D. J. und Muntoni, F. (2001). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Human Molecular Genetics* *10*, 2851-2859.
- 21 Byers, T., Kunkel, L. und Watkins, S. (1991). The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *Journal of Cell Biology* *115*, 411-421.
- 22 Carlsson, L., Yu, J.-G., Moza, M., Carpén, O. und Thornell, L.-E. (2007). Myotilin - a prominent marker of myofibrillar remodelling. *Neuromuscular Disorders* *17*, 61-68.
- 23 Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C. und Gregorio, C. C. (2002). STRIATED MUSCLE CYTOARCHITECTURE: An Intricate Web of Form and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *18*, 637-706.
- 24 Clement, E. M., Godfrey, C., Tan, J., Brockington, M., Torelli, S., Feng, L., Brown, S. C., Jimenez-Mallebrera, C., Sewry, C. A., Longman, C., Mein, R., Abbs, S., Vajsar, J.,

- Schachter, H. und Muntoni, F. (2008). Mild POMGnT1 Mutations Underlie a Novel Limb-Girdle Muscular Dystrophy Variant. *Archives of Neurology* 65, 137-141.
- 25 Cummings, B. (2007). Pearson Education).
- 26 Danowski, B., Imanaka-Yoshida, K., Sanger, J. und Sanger, J. (1992). Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *Journal of Cell Biology* 118, 1411-1420.
- 27 Daugherty, R. L. und Gottardi, C. J. (2007). Phospho-regulation of beta-Catenin Adhesion and Signaling Functions. *Physiology* 22, 303-309.
- 28 Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J. und Weis, W. I. (2005). alpha-Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin-beta-Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. *Cell* 123, 903-915.
- 29 Dugaiczky, A., Boyer, H. W. und Goodman, H. M. (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *Journal of Molecular Biology* 96, 171-178.
- 30 Ervasti, J. M. (2003). Costameres: the Achilles' Heel of Herculean Muscle. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 13591-13594.
- 31 Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G. und Campbell, K. P. (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345, 315-319.
- 32 Firulli, A., Han, D., Kelly-Roloff, L., Koteliansky, V., Schwartz, S., Olson, E. und Miano, J. (1998). A comparative molecular analysis of four rat smooth muscle cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 34, 217-226.
- 33 Forbes, M. S. und Sperelakis, N. (1985). Intercalated discs of mammalian heart: A review of structure and function. *Tissue and Cell* 17, 605-648.
- 34 Foroud, T., Pankratz, N., Batchman, A. P., Pauciulo, M. W., Vidal, R., Miravalle, L., Goebel, H. H., Cushman, L. J., Azzarelli, B., Horak, H., Farlow, M. und Nichols, W. C. (2005). A mutation in myotilin causes spheroid body myopathy. *Neurology* 65, 1936-1940.
- 35 Franke, W. W., Borrmann, C. M., Grund, C. und Pieperhoff, S. (2006). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *European Journal of Cell Biology* 85, 69-82.
- 36 Frosk, P., Weiler, T., Nylen, E., Sudha, T., Greenberg, C. R., Morgan, K., Fujiwara, T. M. und Wrogemann, K. (2002). Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2H Associated with Mutation in TRIM32, a Putative E3-Ubiquitin-Ligase Gene. *The American Journal of Human Genetics* 70, 663-672.
- 37 Fürst, D., Osborn, M., Nave, R. und Weber, K. (1988). The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *Journal of Cell Biology* 106, 1563-1572.

- 38 Fürst, D., Osborn, M. und Weber, K. (1989). Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *Journal of Cell Biology* *109*, 517-527.
- 39 Fürst, D. O. und Gautel, M. (1995). The anatomy of a molecular giant: How the sarcomere cytoskeleton is assembled from immunoglobulin superfamily molecules. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* *27*, 951-959.
- 40 Furukawa, T., Ono, Y., Tsuchiya, H., Katayama, Y., Bang, M.-L., Labeit, D., Labeit, S., Inagaki, N. und Gregorio, C. C. (2001). Specific interaction of the potassium channel beta-subunit minK with the sarcomeric protein T-cap suggests a T-tubule-myofibril linking system. *Journal of Molecular Biology* *313*, 775-784.
- 41 Garvey, S. M., Liu, Y., Miller, S. E. und Hauser, M. A. (2008). Myotilin overexpression enhances myopathology in the LGMD1A mouse model. *Muscle & Nerve* *37*, 663-667.
- 42 Garvey, S. M., Miller, S. E., Clafin, D. R., Faulkner, J. A. und Hauser, M. A. (2006). Transgenic mice expressing the myotilin T57I mutation unite the pathology associated with LGMD1A and MFM. *Human Molecular Genetics* *15*, 2348-2362.
- 43 Gautel, M., Goulding, D., Bullard, B., Weber, K. und Fürst, D. (1996). The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *Journal of Cell Science* *109*, 2747-2754.
- 44 Gavin, R. H. (1997). Microtubule-Microfilament Synergy in the Cytoskeleton International Review of Cytology. In A Survey of Cell Biology, K. W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 207-242.
- 45 Gehmlich, K. (2004) Strukturen der Kraftübertragung im quergestreiften Muskel: Protein-Protein-Wechselwirkungen und Regulationsmechanismen, Dissertation.
- 46 Gilbert, R., Cohen, J., Pardo, S., Basu, A. und Fischman, D. (1999). Identification of the A-band localization domain of myosin binding proteins C and H (MyBP-C, MyBP-H) in skeletal muscle. *Journal of Cell Science* *112*, 69-79.
- 47 Godfrey, C., Escolar, D., Brockington, M., Clement, E. M., Mein, R., Jimenez-Mallebrera, C., Torelli, S., Feng, L., Brown, S. C., Sewry, C. A., Rutherford, M., Shapira, Y., Abbs, S. und Muntoni, F. (2006). Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Annals of Neurology* *60*, 603-610.
- 48 Godley, L. A., Lai, F., Liu, J., Zhao, N. und Le Beau, M. M. (1999). TTID: A Novel Gene at 5q31 Encoding a Protein with Titin-like Features. *Genomics* *60*, 226-233.
- 49 Goicoechea, S. M., Arneman, D. und Otey, C. A. (2008). The role of palladin in actin organization and cell motility. *European Journal of Cell Biology* *In Press, Corrected Proof*.
- 50 Goldfarb, L. G., Park, K.-Y., Cervenakova, L., Gorokhova, S., Lee, H.-S., Vasconcelos, O., Nagle, J. W., Semino-Mora, C., Sivakumar, K. und Dalakas, M. C. (1998). Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nature Genetics* *19*, 402-403.
- 51 Goldfarb, L. G., Vicart, P., Goebel, H. H. und Dalakas, M. C. (2004). Desmin myopathy. *Brain* *127*, 723-734.

- 52 Gontier, Y., Taivainen, A., Fontao, L., Sonnenberg, A., van der Flier, A., Carpen, O., Faulkner, G. und Borradori, L. (2005). The Z-disc proteins myotilin and FATZ-1 interact with each other and are connected to the sarcolemma via muscle-specific filamins. *Journal of Cell Science* 118, 3739-3749.
- 53 Gregorio, C. C., Weber, A., Bondad, M., Pennise, C. R. und Fowler, V. M. (1995). Requirement of pointed-end capping by tropomodulin to maintain actin filament length in embryonic chick cardiac myocytes. *Nature* 377, 83-86.
- 54 Gruen, M., Prinz, H. und Gautel, M. (1999). cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on-off fashion. *FEBS Letters* 453, 254-259.
- 55 Guglieri, M., Magri, F. und Comi, G. P. (2005). Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: Boundaries and contiguities. *Clinica Chimica Acta* 361, 54-79.
- 56 Gumbiner, B. M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 622-634.
- 57 Hackman, P., Vihola, A., Haravuori, H., Marchand, S., Sarparanta, J., de Seze, J., Labeit, S., Witt, C., Peltonen, L., Richard, I. und Udd, B. (2002). Tibial Muscular Dystrophy Is a Titinopathy Caused by Mutations in TTN, the Gene Encoding the Giant Skeletal-Muscle Protein Titin. *The American Journal of Human Genetics* 71, 492-500.
- 58 Harlow, E. und Lane, D. (1988). *Antibodies: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory).
- 59 Hartsock, A. und Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 660-669.
- 60 Hauser, M. A., Conde, C. B., Kowaljow, V., Zeppa, G., Taratuto, A. L., Torian, U. M., Vance, J., Pericak-Vance, M. A., Speer, M. C. und Rosa, A. L. (2002). *myotilin* Mutation Found in Second Pedigree with LGMD1A. *The American Journal of Human Genetics* 71, 1428-1432.
- 61 Hauser, M. A., Horrigan, S. K., Salmikangas, P., Torian, U. M., Viles, K. D., Dancel, R., Tim, R. W., Taivainen, A., Bartoloni, L., Gilchrist, J. M., Stajich, J. M., Gaskell, P. C., Gilbert, J. R., Vance, J. M., Pericak-Vance, M. A., Carpen, O., Westbrook, C. A. und Speer, M. C. (2000). *Myotilin* is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Human Molecular Genetics* 9, 2141-2147.
- 62 Herrmann, H. und Aebi, U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 79-90.
- 63 Himmel, M. (2004) Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen und der in vivo Phosphorylierung des Sarkomerproteins Myomesin, Dissertation.
- 64 Hobert, O. (2008). Gene Regulation by Transcription Factors and MicroRNAs. *Science* 319, 1785-1786.

- 65 Huxley, A. und Niedergerke, R. (1954). Structural changes in muscle during contraction: interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* *173*, 973--976.
- 66 Huxley, H. und Hanson, J. (1954). Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation. *Nature* *173*, 973-976.
- 67 Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* *96*, 23-28.
- 68 Janué, A., Olivé, M. und Ferrer, I. (2007). Oxidative Stress in Desminopathies and Myotilinopathies: A Link between Oxidative Damage and Abnormal Protein Aggregation. *Brain Pathology* *17*, 377-388.
- 69 Kaiser, A. und Hogness, D. (1960). The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. *Journal of Molecular Biology* *2*, 392-415.
- 70 Karpati, G. und Sinnreich, M. (2004). A clever road from myopathology to genes: The myotilin story. *Neurology* *62*, 1248-1249.
- 71 Keller, T., Eilertsen, K., Higginbotham, M., Kazmierski, S., Kim, K. und Velichkova, M. (2000). Role of titin in nonmuscle and smooth muscle cells. *Advances in experimental medicine and biology* *481*, 265-277.
- 72 Kentish, J. C., McCloskey, D. T., Layland, J., Palmer, S., Leiden, J. M., Martin, A. F. und Solaro, R. J. (2001). Phosphorylation of Troponin I by Protein Kinase A Accelerates Relaxation and Crossbridge Cycle Kinetics in Mouse Ventricular Muscle. *Circulation Research* *88*, 1059-1065.
- 73 Kim, S. und Coulombe, P. A. (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes & Development* *21*, 1581-1597.
- 74 Kley, R. A., Hellenbroich, Y., van der Ven, P. F. M., Furst, D. O., Huebner, A., Bruchertseifer, V., Peters, S. A., Heyer, C. M., Kirschner, J., Schroder, R., Fischer, D., Muller, K., Tolksdorf, K., Eger, K., Germing, A., Brodherr, T., Reum, C., Walter, M. C., Lochmuller, H., Ketelsen, U.-P. und Vorgerd, M. (2007). Clinical and morphological phenotype of the filamin myopathy: a study of 31 German patients. *Brain* *130*, 3250-3264.
- 75 Knöll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H. M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M.-L., Hayashi, T., Shiga, N., Yasukawa, H., Schaper, W., McKenna, W., Yokoyama, M., Schork, N. J., Omens, J. H., McCulloch, A. D., Kimura, A., Gregorio, C. C., Poller, W., Schaper, J., Schultheiss, H. P. und Chien, K. R. (2002). The Cardiac Mechanical Stretch Sensor Machinery Involves a Z Disc Complex that Is Defective in a Subset of Human Dilated Cardiomyopathy. *Cell* *111*, 943-955.
- 76 Kumar, N. M. und Gilula, N. B. (1996). The Gap Junction Communication Channel. *Cell* *84*, 381-388.
- 77 Kunst, G., Kress, K. R., Gruen, M., Uttenweiler, D., Gautel, M. und Fink, R. H. A. (2000). Myosin Binding Protein C, a Phosphorylation-Dependent Force Regulator in Muscle That Controls the Attachment of Myosin Heads by Its Interaction With Myosin S2. *Circulation Research* *86*, 51-58.

- 78 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 79 Laval, S. H. und Bushby, K. M. D. (2004). Limb-girdle muscular dystrophies - from genetics to molecular pathology. *Neuropathology & Applied Neurobiology* 30, 91-105.
- 80 Lee, R. C., Feinbaum, R. L. und Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- 81 Leonhardt, H. (1990). *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen* (Stuttgart, Thieme Verlag).
- 82 Lim, L. E., Duclos, F., Broux, O., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., Meyer, J., Richard, I., Moomaw, C., Slaughter, C., Tome, F. M. S., Fardeau, M., Jackson, C. E., Beckmann, J. S. und Campbell, K. P. (1995). beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nature Genetics* 11, 257-265.
- 83 Litjens, S. H. M., de Pereda, J. M. und Sonnenberg, A. (2006). Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends in Cell Biology* 16, 376-383.
- 84 Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.-H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. und He, X. (2002). Control of beta-Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* 108, 837-847.
- 85 Liu, S., Calderwood, D. und Ginsberg, M. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of Cell Science* 113, 3563-3571.
- 86 Loo, D. T., Kanner, S. B. und Aruffo, A. (1998). Filamin Binds to the Cytoplasmic Domain of the beta 1-Integrin. IDENTIFICATION OF AMINO ACIDS RESPONSIBLE FOR THIS INTERACTION. *Journal of Biological Chemistry* 273, 23304-23312.
- 87 Luther, P. K., Munro, P. M. G. und Squire, J. M. (1981). Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band : III. M-region structure and myosin filament symmetry. *Journal of Molecular Biology* 151, 703-730.
- 88 Lynn, R. W. und Taylor, E. W. (1971). Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* 10, 4617-4624.
- 89 Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Takahashi, K., Satoh, K., Nishioka, H., Mizoguchi, A. und Takai, Y. (1999). Ponsin/SH3P12: An I-Afadin- and Vinculin-binding Protein Localized at Cell-Cell and Cell-Matrix Adherens Junctions. *Journal of Cell Biology* 144, 1001-1018.
- 90 Masuda, T., Fujimaki, N., Ozawa, E. und Ishikawa, H. (1992). Confocal laser microscopy of dystrophin localization in guinea pig skeletal muscle fibers. *Journal of Cell Biology* 119, 543-548.
- 91 McNally, E., Duggan, D., Gorospe, J., Bönnemann, C., Fanin, M., Pegoraro, E., Lidov, H., Noguchi, S., Ozawa, E., Finkel, R., Cruse, R., Angelini, C., Kunkel, L. und Hoffman, E. (1996). Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 5, 1841-1847.

- 92 Messina, D. N., Speer, M. C., Pericak-Vance, M. A. und McNally, E. M. (1997). Linkage of Familial Dilated Cardiomyopathy with Conduction Defect and Muscular Dystrophy to Chromosome 6q23. *The American Journal of Human Genetics* 61, 909-917.
- 93 Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M. A., Volonte, D., Galbiati, F., Cordone, G., Bricarelli, F. D., Lisanti, M. P. und Zara, F. (1998). Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics* 18, 365-368.
- 94 Mitic, L. L., Van Itallie, C. M. und Anderson, J. M. (2000). Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 279, G250-254.
- 95 Mologni, L., Moza, M., Lalowski, M. M. und Carpen, O. (2005). Characterization of mouse myotilin and its promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329, 1001-1009.
- 96 Mologni, L., Salmikangas, P., Fougereuse, F., Beckmann, J. S. und Carpen, O. (2001). Developmental expression of myotilin, a gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 1A. *Mechanisms of Development* 103, 121-125.
- 97 Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M. und Kunkel, L. M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323, 646-650.
- 98 Mooseker, M. und Tilney, L. (1975). Organization of an actin filament-membrane complex. Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. *Journal of Cell Biology* 67, 725-743.
- 99 Moreira, E. S., Wiltshire, T. J., Faulkner, G., Nilforoushan, A., Vainzof, M., Suzuki, O. T., Valle, G., Reeves, R., Zatz, M., Passos-Bueno, M. R. und Jenne, D. E. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nature Genetics* 24, 163-166.
- 100 Moza, M., Mologni, L., Trokovic, R., Faulkner, G., Partanen, J. und Carpen, O. (2007). Targeted Deletion of the Muscular Dystrophy Gene myotilin Does Not Perturb Muscle Structure or Function in Mice. *Molecular and Cellular Biology* 27, 244-252.
- 101 Muchir, A., Bonne, G., van der Kooi, A. J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P. A., de Visser, M. und Schwartz, K. (2000). Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Human Molecular Genetics* 9, 1453-1459.
- 102 Munoz-Mármol, A. M., Strasser, G., Isamat, M., Coulombe, P. A., Yang, Y., Roca, X., Vela, E., Mate, J. L., Coll, J., Fernández-Figueras, M. T., Navas-Palacios, J. J., Ariza, A. und Fuchs, E. (1998). A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 11312-11317.
- 103 Mykkänen, O.-M., Grönholm, M., Rönty, M., Lalowski, M., Salmikangas, P., Suila, H. und Carpen, O. (2001). Characterization of Human Palladin, a Microfilament-associated Protein. *Molecular Biology of the Cell* 12, 3060-3073.

- 104 Nagafuchi, A. (2001). Molecular architecture of adherens junctions. *Current Opinion in Cell Biology* *13*, 600-603.
- 105 Nathans, D. und Smith, H. O. (1975). Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA Molecules. *Annual Review of Biochemistry* *44*, 273-293.
- 106 Niessen, C. M. (2007). Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *The Journal of Investigative Dermatology* *127*, 2525-2532.
- 107 Nigro, V., Moreira, E. d. S., Piluso, G., Vainzof, M., Belsito, A., Politano, L., Puca, A. A., Passos-Bueno, M. R. und Zatz, M. (1996). Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nature Genetics* *14*, 195-198.
- 108 Noguchi, S., McNally, E. M., Othmane, K. B., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamoto, H., Bönnemann, C. G., Gussoni, E., Denton, P. H., Kyriakides, T., Middleton, L., Hentati, F., Hamida, M. B., Nonaka, I., Vance, J. M., Kunkel, L. M. und Ozawa, E. (1995). Mutations in the Dystrophin-Associated Protein gamma-Sarcoglycan in Chromosome 13 Muscular Dystrophy. *Science* *270*, 819-822.
- 109 Novagen (2003). pET System Manual, 10 edn, <http://www.novagen.com>).
- 110 Olive, M., Goldfarb, L. G., Shatunov, A., Fischer, D. und Ferrer, I. (2005). Myotilinopathy: refining the clinical and myopathological phenotype [10.1093/brain/awh576](https://doi.org/10.1093/brain/awh576). *Brain* *128*, 2315-2326.
- 111 Olivé, M., Goldfarb, L. G., Shatunov, A., Fischer, D. und Ferrer, I. (2005). Myotilinopathy: refining the clinical and myopathological phenotype. *Brain* *128*, 2315-2326.
- 112 Olivé, M., van Leeuwen, F., Janué, A., Moreno, D., Torrejón-Escribano, B. und Ferrer, I. (2008). Expression of mutant ubiquitin (UBB+1) and p62 in myotilinopathies and desminopathies. *Neuropathology and Applied Neurobiology* *34*, 76-87.
- 113 Otey, C., Pavalko, F. und Burridge, K. (1990). An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *Journal of Cell Biology* *111*, 721-729.
- 114 Otey, C. A., Rachlin, A., Moza, M., Arneman, D. und Carpen, O. (2005). The Palladin/Myotilin/Myopalladin Family of Actin-Associated Scaffolds International Review of Cytology. In *A Survey of Cell Biology*, K. W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 31-58.
- 115 Pacholsky, D. (2003) Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte während der Muskelentwicklung, Dissertation, Universität Potsdam, Potsdam.
- 116 Palenzuela, L., Andreu, A. L., Gamez, J., Vila, M. R., Kunitatsu, T., Meseguer, A., Cervera, C., Fernandez Cadenas, I., van der Ven, P. F. M., Nygaard, T. G., Bonilla, E. und Hirano, M. (2003). A novel autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 1F) maps to 7q32.1-32.2. *Neurology* *61*, 404-406.
- 117 Parast, M. M. und Otey, C. A. (2000). Characterization of Palladin, a Novel Protein Localized to Stress Fibers and Cell Adhesions. *Journal of Cell Biology* *150*, 643-656.

- 118 Passos-Bueno, M., Moreira, E., Vainzof, M., Marie, S. und Zatz, M. (1996). Linkage analysis in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (AR LGMD) maps a sixth form to 5q33-34 (LGMD2F) and indicates that there is at least one more subtype of AR LGMD. *Human Molecular Genetics* 5, 815-820.
- 119 Péniisson-Besnier, I., Talvinen, K., Dumez, C., Vihola, A., Dubas, F., Fardeau, M., Hackman, P., Carpén, O. und Udd, B. (2006). Myotilinopathy in a family with late onset myopathy. *Neuromuscular Disorders* 16, 427-431.
- 120 Piccolo, F., Roberds, S. L., Jeanpierre, M., Leturcq, F., Azibi, K., Beldjord, C., Carrie, A., Recan, D., Chaouch, M., Reghis, A., El Kerch, F., Sefiani, A., Voit, T., Merlini, L., Collin, H., Eymard, B., Beckmann, J. S., Romero, N. B., Tome, F. M. S., Fardeau, M., Campbell, K. P. und Kaplan, J.-C. (1995). Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nature Genetics* 10, 243-245.
- 121 Pollard, T. D. und Borisy, G. G. (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* 112, 453-465.
- 122 Qiagen (2003). The QIAexpressionist, <http://www.qiagen.com>).
- 123 Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., Hillaire, D., Passos-Bueno, M.-R., Zatz, M., Tischfield, J. A., Fardeau, M., Jackson, C. E., Cohen, D. und Beckmann, J. S. (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81, 27-40.
- 124 Rimm, D., Koslov, E., Kebriaei, P., Cianci, C. und Morrow, J. (1995). α 1(E)-Catenin is an Actin-Binding and -Bundling Protein Mediating the Attachment of F-Actin to the Membrane Adhesion Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 8813-8817.
- 125 Roberds, S. L., Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R. D., Lim, L. E., Lee, J. C., Tomé, F. M. S., Romero, N. B., Fardeau, M., Beckmann, J. S., Kaplan, J.-C. und Campbell, K. P. (1994). Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78, 625-633.
- 126 Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. und Erlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- 127 Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- 128 Saito, Y., Mizuguchi, M., Oka, A. und Takashima, S. (2000). Fukutin protein is expressed in neurons of the normal developing human brain but is reduced in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy brain. *Annals of Neurology* 47, 756-764.
- 129 Salmikangas, P., Mykkänen, O.-M., Grönholm, M., Heiska, L., Kere, J. und Carpén, O. (1999). Myotilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 8, 1329-1336.

- 130 Salmikangas, P., van der Ven, P. F. M., Lalowski, M., Taivainen, A., Zhao, F., Suila, H., Schröder, R., Lappalainen, P., Fürst, D. O. und Carpén, O. (2003). Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Human Molecular Genetics* *12*, 189-203.
- 131 Sambrook, J., Fritsch, E. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2 edn (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 132 Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *74*, 5463-5467.
- 133 Sarmiere und Bamburg, J. (2004). Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *Journal of Neurobiology* *58*, 103-117.
- 134 Schessl, J., Zou, Y., McGrath, M., Cowling, B., Maiti, B., Chin, S., Sewry, C., Battini, R., Hu, Y., Cottle, D., Rosenblatt, M., Spruce, L., Ganguly, A., Kirschner, J., Judkins, A., Golden, J., Goebel, H., Muntoni, F., Flanigan, K., Mitchell, C. und Bönnemann, C. (2008). Proteomic identification of FHL1 as the protein mutated in human reducing body myopathy. *The Journal of Clinical Investigation* *118*, 904-912.
- 135 Schmidt, A. und Hall, M. N. (1998). SIGNALING TO THE ACTIN CYTOSKELETON. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *14*, 305-338.
- 136 Schröder, R., Reimann, J., Salmikangas, P., Clemen, C. S., Hayashi, Y. K., Nonaka, I., Arahata, K. und Carpén, O. (2003). Beyond LGMD1A: myotilin is a component of central core lesions and nemaline rods. *Neuromuscular Disorders* *13*, 451-455.
- 137 Schwarz, D. S. und Zamore, P. D. (2002). Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes & Development* *16*, 1025-1031.
- 138 Selcen, D. und Engel, A. G. (2004). Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology* *62*, 1363-1371.
- 139 Selcen, D. und Engel, A. G. (2005). Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Annals of Neurology* *57*, 269-276.
- 140 Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopoulos, N., Yin, H. L. und Hayoz, D. (2004). Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* *61*, 2614-2623.
- 141 Small, J. V., Fürst, D. O. und Thornell, L. E. (1992). The cytoskeletal lattice of muscle cells. *European Journal of Biochemistry* *208*, 559-572.
- 142 Söhl, G. und Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research* *62*, 228-232.
- 143 Speer, M. C., Vance, J. M., Grubber, J. M., Lennon Graham, F., Stajich, J. M., Viles, K. D., Rogala, A., McMichael, R., Chutkow, J., Goldsmith, C., Tim, R. W. und Pericak-Vance, M. A. (1999). Identification of a New Autosomal Dominant Limb-Girdle Muscular Dystrophy Locus on Chromosome 7. *The American Journal of Human Genetics* *64*, 556-562.
- 144 Starling, A., Kok, F., Passos-Bueno, M. R., Vainzof, M. und Zatz, M. (2004). A new form of autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD1G) with progressive

- fingers and toes flexion limitation maps to chromosome 4p21. *European Journal of Human Genetics* 12, 1033-1040.
- 145 Steinberg, M. S. und McNutt, P. M. (1999). Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 554-560.
- 146 Steiner, F. (1997) Vergleichende Analyse der Gene der M-Banden-Proteine Myomesin und M-Protein sowie Bindungseigenschaften und Lokalisation von M-Protein, Dissertation, Universität Göttingen, Göttingen.
- 147 Stokes, D. L. (2007). Desmosomes from a structural perspective. *Current Opinion in Cell Biology* 19, 565-571.
- 148 Stout, A. L., Wang, J., Sanger, J. M. und Sanger, J. W. (2008). Tracking changes in Z-band organization during myofibrillogenesis with FRET imaging. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 65, 353-367.
- 149 Thompson, T. G., Chan, Y.-M., Hack, A. A., Brosius, M., Rajala, M., Lidov, H. G. W., McNally, E. M., Watkins, S. und Kunkel, L. M. (2000). Filamin 2 (FLN2): A Muscle-specific Sarcoglycan Interacting Protein. *Journal of Cell Biology* 148, 115-126.
- 150 Tidball, J. G. (1987). Alpha-actinin is absent from the terminal segments of myofibrils and from subsarcolemmal densities in frog skeletal muscle. *Experimental Cell Research* 170, 469-482.
- 151 Tigges, U., Koch, B., Wissing, J., Jockusch, B. M. und Ziegler, W. H. (2003). The F-actin Cross-linking and Focal Adhesion Protein Filamin A Is a Ligand and in Vivo Substrate for Protein Kinase Calpha. *Journal of Biological Chemistry* 278, 23561-23569.
- 152 Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 4350-4354.
- 153 Vainzof, M. und Zatz, M. (2003). Protein defects in neuromuscular diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36, 543-555.
- 154 van der Kooi, A. J., van Meegen, M., Ledderhof, T. M., M., M. E., de Visser, M. und Bolhuis, P. A. (1997). Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11-21. *American journal of human genetics* 60, 891-895.
- 155 van der Ven, P. F. M., Schaart, G., Jap, P. H. K., Sengers, R. C. A., Stadhouders, A. M. und Ramaekers, F. C. S. (1992). Differentiation of human skeletal muscle cells in culture: maturation as indicated by titin and desmin striation. *Cell and Tissue Research* 270, 189-198.
- 156 van der Ven, P. F. M., Wiesner, S., Salmikangas, P., Auerbach, D., Himmel, M., Kempa, S., Haye{beta}, K., Pacholsky, D., Taivainen, A., Schroder, R., Carpen, O. und Furst, D. O. (2000). Indications for a Novel Muscular Dystrophy Pathway: {gamma}-Filamin, the Muscle-specific Filamin Isoform, Interacts with Myotilin. *Journal of Cell Biology* 151, 235-248.

- 157 von Nandelstadh, P., Grönholm, M., Moza, M., Lamberg, A., Savilahti, H. und Carpén, O. (2005). Actin-organising properties of the muscular dystrophy protein myotilin. *Experimental Cell Research* 310, 131-139.
- 158 Vorgerd, M., van der Ven, P. F. M., Bruchertseifer, V., Löwe, T., Kley, R. A., Schröder, R., Lochmüller, H., Himmel, M., Koehler, K., Fürst, D. O. und Huebner, A. (2005). A Mutation in the Dimerization Domain of Filamin C Causes a Novel Type of Autosomal Dominant Myofibrillar Myopathy. *American journal of human genetics* 77, 297-304.
- 159 Wachsstock, D. H., Wilkins, J. A. und Lin, S. (1987). Specific interaction of vinculin with alpha-actinin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 146, 554-560.
- 160 Weiler, T., Greenberg, C. R., Zelinski, T., Nylén, E., Coghlan, G., Crumley, M. J., Fujiwara, T. M., Morgan, K. und Wrogemann, K. (1998). A Gene for Autosomal Recessive Limb-Girdle Muscular Dystrophy in Manitoba Hutterites Maps to Chromosome Region 9q31-q33: Evidence for Another Limb-Girdle Muscular Dystrophy Locus. *The American Journal of Human Genetics* 63, 140-147.
- 161 Winder, S. J. (2001). The complexities of dystroglycan. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 118-124.
- 162 Winder, S. J. und Ayscough, K. R. (2005). Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science* 118, 651-654.
- 163 Witt, S. H., Granzier, H., Witt, C. C. und Labeit, S. (2005). MURF-1 and MURF-2 Target a Specific Subset of Myofibrillar Proteins Redundantly: Towards Understanding MURF-dependent Muscle Ubiquitination. *Journal of Molecular Biology* 350, 713-722.
- 164 Yajima, H., Ohtsuka, H., Kawamura, Y., Kume, H., Murayama, T., Abe, H., Kimura, S. und Maruyama, K. (1996). A 11.5-kb 5'-Terminal cDNA Sequence of Chicken Breast Muscle Connectin/Titin Reveals Its Z Line Binding Region. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 223, 160-164.
- 165 Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I. und Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex. *Cell* 123, 889-901.
- 166 Yamasaki, R., Wu, Y., McNabb, M., Greaser, M., Labeit, S. und Granzier, H. (2002). Protein Kinase A Phosphorylates Titin's Cardiac-Specific N2B Domain and Reduces Passive Tension in Rat Cardiac Myocytes. *Circulation Research* 90, 1181-1188.
- 167 Zatz, M., de Paula, F., Starling, A. und Vainzof, M. (2003). The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders* 13, 532-544.
- 168 Zhang, C. (2008). MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clinical Science* 114, 699-706.
- 169 Zhang, R., Zhao, J., Mandveno, A. und Potter, J. D. (1995). Cardiac Troponin I Phosphorylation Increases the Rate of Cardiac Muscle Relaxation. *Circulation Research* 76, 1028-1035.

Anhang A

Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

Alignment:
Nukleinsäuresequenzen humaner Myotilinisoformen

	Start 1 (in Exon 2b)					

	10	20	30	40	50	60
Myotilin a	ATGTTTAACT	ACGAACGTCC	AAAACACTTC	ATCCAGTCCC	AAAACCCATG	TGGCTCCAGA
Myotilin b	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin c	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin d	ATGTTTAACT	ACGAACGTCC	AAAACACTTC	ATCCAGTCCC	AAAACCCATG	TGGCTCCAGA
Myotilin g	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin h	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	70	80	90	100	110	120
Myotilin a	TTGCAGCCTC	CTGGACCAGA	AACCTCCAGC	TTCTCTAGCC	AGACCAAACA	GTCTTCCATT
Myotilin b	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin c	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin d	TTGCAGCCTC	CTGGACCAGA	AACCTCCAGC	TTCTCTAGCC	AGACCAAACA	GTCTTCCATT
Myotilin g	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin h	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	130	140	150	160	170	180
Myotilin a	ATCATCCAGC	CCCGCCAGTG	TACAGAGCAA	AGATTTTCTG	CCTCCTCAAC	ACTGAGCTCT
Myotilin b	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin c	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin d	ATCATCCAGC	CCCGCCAGTG	TACAGAGCAA	AGATTTTCTG	CCTCCTCAAC	ACTGAGCTCT
Myotilin g	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin h	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Exon 2c					

	190	200	210	220	230	240
Myotilin a	CACATCACCA	TGTCCTCCTC	TGCTTTCCCT	GCTTCTCCCA	AGCAGCATGC	TGGCTCCAAC
Myotilin b	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin c	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin d	CACATCACCA	TGTCCTCCTC	TGCTTTCCCT	GCTTCTCCCA	AGCAGCATGC	TGGCTCCAAC
Myotilin g	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin h	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	250	260	270	280	290	300
Myotilin a	CCAGGCCAAA	GGGTTACAAC	CACCTATAAC	CAGTCCCCAG	CCAGCTTCCT	CAGCTCCATA
Myotilin b	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin c	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin d	CCAGGCCAAA	GGGTTACAAC	CACCTATAAC	CAGTCCCCAG	CCAGCTTCCT	CAGCTCCATA
Myotilin g	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin h	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Start 2		Exon 3			

	310	320	330	340	350	360
Myotilin a	TTACCATCAC	AGCCTGATTA	CAATAGCAGT	AAAATCCCTT	CCGCTATGGA	TTCCAACCTAT
Myotilin b	-----	-----	-----	-----	-----ATGGA	TTCCAACCTAT
Myotilin c	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin d	TTACCATCAC	AGCCTGATTA	CAATAGCAGT	AAAATCCCTT	CCGCTATGGA	TTCCAACCTAT
Myotilin g	-----	-----	-----	-----	-----ATGGA	TTCCAACCTAT
Myotilin h	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Anhang A: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      370      380      390      400      410      420
Myotilin a CAACAGTCCT CAGCTGGCCA ACCTATAAAT GCAAAGCCAT CCCAAACTGC AAATGCTAAG
Myotilin b CAACAGTCCT CAGCTGGCCA ACCTATAAAT GCAAAGCCAT CCCAAACTGC AAATGCTAAG
Myotilin c -----
Myotilin d CAACAGTCCT CAGCTGGCCA ACCTATAAAT GCAAAGCCAT CCCAAACTGC AAATGCTAAG
Myotilin g CAACAGTCCT CAGCTGGCCA ACCTATAAAT GCAAAGCCAT CCCAAACTGC AAATGCTAAG
Myotilin h -----

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      430      440      450      460      470      480
Myotilin a CCCATACCAA GAACTCCTGA TCATGAAATA CAAGGATCAA AAGAAGCTTT GATTCAAGAT
Myotilin b CCCATACCAA GAACTCCTGA TCATGAAATA CAAGGATCAA AAGAAGCTTT GATTCAAGAT
Myotilin c -----
Myotilin d CCCATACCAA GAACTCCTGA TCATGAAATA CAAGGATCAA AAGAAGCTTT GATTCAAGAT
Myotilin g CCCATACCAA GAACTCCTGA TCATGAAATA CAAGGATCAA AAGAAGCTTT GATTCAAGAT
Myotilin h -----

```

Exon 4

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      490      500      510      520      530      540
Myotilin a TTGGAAGAA AGCTGAAATG CAAGGACACC CTTCTTCATA ATGGAATCA ACGTCTAACA
Myotilin b TTGGAAGAA AGCTGAAATG CAAGGACACC CTTCTTCATA ATGGAATCA ACGTCTAACA
Myotilin c -----
Myotilin d TTGGAAGAA AGCTGAAATG CAAGGACACC CTTCTTCATA ATGGAATCA ACGTCTAACA
Myotilin g TTGGAAGAA AGCTGAAATG CAAGGACACC CTTCTTCATA ATGGAATCA ACGTCTAACA
Myotilin h -----

```

Start 3

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      550      560      570      580      590      600
Myotilin a TATGAAGAGA AGATGGCTCG CAGATTGCTA GGACCACAGA ATGCAGCTGC TGTGTTTCAA
Myotilin b TATGAAGAGA AGATGGCTCG CAGATTGCTA GGACCACAGA ATGCAGCTGC TGTGTTTCAA
Myotilin c ----- --ATGGCTCG CAGATTGCTA GGACCACAGA ATGCAGCTGC TGTGTTTCAA
Myotilin d TATGAAGAGA AGATGGCTCG CAGATTGCTA GGACCACAGA ATGCAGCTGC TGTGTTTCAA
Myotilin g TATGAAGAGA AGATGGCTCG CAGATTGCTA GGACCACAGA ATGCAGCTGC TGTGTTTCAA
Myotilin h ----- --ATGGCTCG CAGATTGCTA GGACCACAGA ATGCAGCTGC TGTGTTTCAA

```

Exon 5

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      610      620      630      640      650      660
Myotilin a GCTCAGGATG ACAGTGGTGC ACAAGACTCG CAGCAACACA ACTCAGAACA TGCGCGACTG
Myotilin b GCTCAGGATG ACAGTGGTGC ACAAGACTCG CAGCAACACA ACTCAGAACA TGCGCGACTG
Myotilin c GCTCAGGATG ACAGTGGTGC ACAAGACTCG CAGCAACACA ACTCAGAACA TGCGCGACTG
Myotilin d GCTCAGGATG ACAGTGGTGC ACAAGACTCG CAGCAACACA ACTCAGAACA TGCGCGACTG
Myotilin g GCTCAGGATG ACAGTGGTGC ACAAGACTCG CAGCAACACA ACTCAGAACA TGCGCGACTG
Myotilin h GCTCAGGATG ACAGTGGTGC ACAAGACTCG CAGCAACACA ACTCAGAACA TGCGCGACTG

```

Exon 6

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      670      680      690      700      710      720
Myotilin a CAAGTTCCTA CATCACAAGT AAGAAGTAGA TCAACCTCAA GGGGAGATGT GAATGATCAG
Myotilin b CAAGTTCCTA CATCACAAGT AAGAAGTAGA TCAACCTCAA GGGGAGATGT GAATGATCAG
Myotilin c CAAGTTCCTA CATCACAAGT AAGAAGTAGA TCAACCTCAA GGGGAGATGT GAATGATCAG
Myotilin d CAAGTTCCTA CATCACAAGT AAG-----
Myotilin g CAAGTTCCTA CATCACAAGT AAG-----
Myotilin h CAAGTTCCTA CATCACAAGT AAG-----

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      730      740      750      760      770      780
Myotilin a GATGCAATCC AGGAGAAATT TTACCCACCA CGTTTCATTC AAGTGCCAGA GAACATGTCCG
Myotilin b GATGCAATCC AGGAGAAATT TTACCCACCA CGTTTCATTC AAGTGCCAGA GAACATGTCCG
Myotilin c GATGCAATCC AGGAGAAATT TTACCCACCA CGTTTCATTC AAGTGCCAGA GAACATGTCCG
Myotilin d -----
Myotilin g -----
Myotilin h -----

```

Anhang A: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

Exon 7 Stop (Isoformen d, g und h)

	790	800	810	820	830	840	
Myotilin a	ATTGATGAAG	GAAGATTCTG	CAGAATGGAC	TTCAAA <u>G</u> TGA	GTGGACTGCC	AGCTCCTGAT	
Myotilin b	ATTGATGAAG	GAAGATTCTG	CAGAATGGAC	TTCAAA <u>G</u> TGA	GTGGACTGCC	AGCTCCTGAT	
Myotilin c	ATTGATGAAG	GAAGATTCTG	CAGAATGGAC	TTCAAA <u>G</u> TGA	GTGGACTGCC	AGCTCCTGAT	
Myotilin d	-----	-----	-----	----- <u>G</u> TGA	
Myotilin g	-----	-----	-----	----- <u>G</u> TGA	
Myotilin h	-----	-----	-----	----- <u>G</u> TGA	

	850	860	870	880	890	900
Myotilin a	GTGTCATGGT	ATCTAAATGG	AAGAACAGTT	CAATCAGATG	ATTTGCACAA	AATGATAGTG
Myotilin b	GTGTCATGGT	ATCTAAATGG	AAGAACAGTT	CAATCAGATG	ATTTGCACAA	AATGATAGTG
Myotilin c	GTGTCATGGT	ATCTAAATGG	AAGAACAGTT	CAATCAGATG	ATTTGCACAA	AATGATAGTG
Myotilin d
Myotilin g
Myotilin h

	910	920	930	940	950	960
Myotilin a	TCTGAGAAGG	GTCTTCATTC	ACTCATCTTT	GAAGTAGTCA	GAGCTTCAGA	TGCAGGGGCT
Myotilin b	TCTGAGAAGG	GTCTTCATTC	ACTCATCTTT	GAAGTAGTCA	GAGCTTCAGA	TGCAGGGGCT
Myotilin c	TCTGAGAAGG	GTCTTCATTC	ACTCATCTTT	GAAGTAGTCA	GAGCTTCAGA	TGCAGGGGCT
Myotilin d
Myotilin g
Myotilin h

	970	980	990	1000	1010	1020
Myotilin a	TATGCATGTG	TTGCCAAGAA	TAGAGCAGGA	GAAGCCACCT	TCACTGTGCA	GCTGGATGTC
Myotilin b	TATGCATGTG	TTGCCAAGAA	TAGAGCAGGA	GAAGCCACCT	TCACTGTGCA	GCTGGATGTC
Myotilin c	TATGCATGTG	TTGCCAAGAA	TAGAGCAGGA	GAAGCCACCT	TCACTGTGCA	GCTGGATGTC
Myotilin d
Myotilin g
Myotilin h

Exon 8

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Myotilin a	CTTG <u>C</u> AAAAG	AACATAAAAG	AGCACCAATG	TTTATCTACA	AACCACAGAG	CAAAAAAGTT
Myotilin b	CTTG <u>C</u> AAAAG	AACATAAAAG	AGCACCAATG	TTTATCTACA	AACCACAGAG	CAAAAAAGTT
Myotilin c	CTTG <u>C</u> AAAAG	AACATAAAAG	AGCACCAATG	TTTATCTACA	AACCACAGAG	CAAAAAAGTT
Myotilin d
Myotilin g
Myotilin h

	1090	1100	1110	1120	1130	1140
Myotilin a	TTAGAGGGAG	ATTCAGTGAA	ACTAGAATGC	CAGATCTCGG	CTATACCTCC	ACCAAAGCTT
Myotilin b	TTAGAGGGAG	ATTCAGTGAA	ACTAGAATGC	CAGATCTCGG	CTATACCTCC	ACCAAAGCTT
Myotilin c	TTAGAGGGAG	ATTCAGTGAA	ACTAGAATGC	CAGATCTCGG	CTATACCTCC	ACCAAAGCTT
Myotilin d
Myotilin g
Myotilin h

Exon 9

	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Myotilin a	TTCTGAAAA	GAAATAATGA	AATGGTACAA	TTCAACACTG	ACCGAATAAG	<u>C</u> TTATATCAA
Myotilin b	TTCTGAAAA	GAAATAATGA	AATGGTACAA	TTCAACACTG	ACCGAATAAG	<u>C</u> TTATATCAA
Myotilin c	TTCTGAAAA	GAAATAATGA	AATGGTACAA	TTCAACACTG	ACCGAATAAG	<u>C</u> TTATATCAA
Myotilin d
Myotilin g
Myotilin h

Anhang A: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1210      1220      1230      1240      1250      1260
Myotilin a GATAACACTG GAAGAGTTAC TTTACTGATA AAAGATGTAA ACAAGAAAAGA TGCTGGGTGG
Myotilin b GATAACACTG GAAGAGTTAC TTTACTGATA AAAGATGTAA ACAAGAAAAGA TGCTGGGTGG
Myotilin c GATAACACTG GAAGAGTTAC TTTACTGATA AAAGATGTAA ACAAGAAAAGA TGCTGGGTGG
Myotilin d .....
Myotilin g .....
Myotilin h .....

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1270      1280      1290      1300      1310      1320
Myotilin a TATACTGTGT CAGCAGTTAA TGAAGCTGGA GTGACTACAT GTAACACAAG ATTAGACGTT
Myotilin b TATACTGTGT CAGCAGTTAA TGAAGCTGGA GTGACTACAT GTAACACAAG ATTAGACGTT
Myotilin c TATACTGTGT CAGCAGTTAA TGAAGCTGGA GTGACTACAT GTAACACAAG ATTAGACGTT
Myotilin d .....
Myotilin g .....
Myotilin h .....

```

Exon 10

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
Myotilin a ACGGCACGTC CAAACCAAAC TCTTCCAGCT CCTAAGCAGT TACGGGTTTCG ACCAACATTC
Myotilin b ACGGCACGTC CAAACCAAAC TCTTCCAGCT CCTAAGCAGT TACGGGTTTCG ACCAACATTC
Myotilin c ACGGCACGTC CAAACCAAAC TCTTCCAGCT CCTAAGCAGT TACGGGTTTCG ACCAACATTC
Myotilin d .....
Myotilin g .....
Myotilin h .....

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
Myotilin a AGCAAATATT TAGCACTTAA TGGGAAAGGT TTGAATGTAA AACAAGCTTT TAACCCAGAA
Myotilin b AGCAAATATT TAGCACTTAA TGGGAAAGGT TTGAATGTAA AACAAGCTTT TAACCCAGAA
Myotilin c AGCAAATATT TAGCACTTAA TGGGAAAGGT TTGAATGTAA AACAAGCTTT TAACCCAGAA
Myotilin d .....
Myotilin g .....
Myotilin h .....

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1450      1460      1470      1480      1490      Stop
Myotilin a GGAGAATTTT AGCGTTTGGC AGCTCAATCT GGACTCTATG AAAGTGAAGA ACTTTAA
Myotilin b GGAGAATTTT AGCGTTTGGC AGCTCAATCT GGACTCTATG AAAGTGAAGA ACTTTAA
Myotilin c GGAGAATTTT AGCGTTTGGC AGCTCAATCT GGACTCTATG AAAGTGAAGA ACTTTAA
Myotilin d .....
Myotilin g .....
Myotilin h .....

```

Alignment:

Aminosäuresequenzen humaner Myotilinisoformen

		Start 1											
							
			10	20	30	40	50	60					
Myotilin a		MFNYERP	KHF IQSQ	NPCGSR	LQPPG	PETSS	FSSQTK	QSSI IIQ	PRQCTEQ	RFSAS	STLSS		
Myotilin b		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
Myotilin c		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
Myotilin d		MFNYERP	KHF IQSQ	NPCGSR	LQPPG	PETSS	FSSQTK	QSSI IIQ	PRQCTEQ	RFSAS	STLSS		
Myotilin g		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
Myotilin h		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
		Start 2											
						
			70	80	90	100	110	120					
Myotilin a		HITMSS	SAFP	ASPKQ	HAGSN	PGQRV	TTTYN	QSPAS	FLSSI	LPSQP	DYNSS	KIPSA	MDSNY
Myotilin b		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MDSNY
Myotilin c		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin d		HITMSS	SAFP	ASPKQ	HAGSN	PGQRV	TTTYN	QSPAS	FLSSI	LPSQP	DYNSS	KIPSA	MDSNY
Myotilin g		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MDSNY
Myotilin h		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
			130	140	150	160	170	180					
Myotilin a		QQSSA	GQPIN	AKPSQ	TANAK	PIPRTP	DHEI	QGSKE	ALIQD	LERKL	KCKDT	LLHNG	NQRLT
Myotilin b		QQSSA	GQPIN	AKPSQ	TANAK	PIPRTP	DHEI	QGSKE	ALIQD	LERKL	KCKDT	LLHNG	NQRLT
Myotilin c		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin d		QQSSA	GQPIN	AKPSQ	TANAK	PIPRTP	DHEI	QGSKE	ALIQD	LERKL	KCKDT	LLHNG	NQRLT
Myotilin g		QQSSA	GQPIN	AKPSQ	TANAK	PIPRTP	DHEI	QGSKE	ALIQD	LERKL	KCKDT	LLHNG	NQRLT
Myotilin h		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		Start 3											
						
			190	200	210	220	230	240					
Myotilin a		YEEKM	MARRLL	GPQNA	AAVFQ	AQDD	SGAQDS	QQHN	SEHARL	QVPTS	QVRSR	STSRG	DVNDQ
Myotilin b		YEEKM	MARRLL	GPQNA	AAVFQ	AQDD	SGAQDS	QQHN	SEHARL	QVPTS	QVRSR	STSRG	DVNDQ
Myotilin c		---M	MARRLL	GPQNA	AAVFQ	AQDD	SGAQDS	QQHN	SEHARL	QVPTS	QVRSR	STSRG	DVNDQ
Myotilin d		YEEKM	MARRLL	GPQNA	AAVFQ	AQDD	SGAQDS	QQHN	SEHARL	QVPTS	QVR--	-----	-----
Myotilin g		YEEKM	MARRLL	GPQNA	AAVFQ	AQDD	SGAQDS	QQHN	SEHARL	QVPTS	QVR--	-----	-----
Myotilin h		---M	MARRLL	GPQNA	AAVFQ	AQDD	SGAQDS	QQHN	SEHARL	QVPTS	QVR--	-----	-----
		Stop (Isoformen d, g und h)											
						
			250	260	270	280	290	300					
Myotilin a		DAIQE	KFYPP	RFIQV	PENMS	IDEGR	FCRMD	FKVSG	LPAPD	VSWYL	NGRTV	QSDDL	LHKMIV
Myotilin b		DAIQE	KFYPP	RFIQV	PENMS	IDEGR	FCRMD	FKVSG	LPAPD	VSWYL	NGRTV	QSDDL	LHKMIV
Myotilin c		DAIQE	KFYPP	RFIQV	PENMS	IDEGR	FCRMD	FKVSG	LPAPD	VSWYL	NGRTV	QSDDL	LHKMIV
Myotilin d		-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	*	-----	-----	-----	-----
Myotilin g		-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	*	-----	-----	-----	-----
Myotilin h		-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	*	-----	-----	-----	-----
						
			310	320	330	340	350	360					
Myotilin a		SEKGL	HSLIF	EVVRAS	DAGA	YACVA	KNRAG	EATFT	VQLDV	LAKEH	KRAPM	FIYKP	QSKKV
Myotilin b		SEKGL	HSLIF	EVVRAS	DAGA	YACVA	KNRAG	EATFT	VQLDV	LAKEH	KRAPM	FIYKP	QSKKV
Myotilin c		SEKGL	HSLIF	EVVRAS	DAGA	YACVA	KNRAG	EATFT	VQLDV	LAKEH	KRAPM	FIYKP	QSKKV
Myotilin d		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin g		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myotilin h		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Anhang A: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      370      380      390      400      410      420
Myotilin a  LEGDSVKLEC QISAIPPPKL FWKRNNEMVQ FNTDRISLYQ DNTGRVTLII KDVNKKDAGW
Myotilin b  LEGDSVKLEC QISAIPPPKL FWKRNNEMVQ FNTDRISLYQ DNTGRVTLII KDVNKKDAGW
Myotilin c  LEGDSVKLEC QISAIPPPKL FWKRNNEMVQ FNTDRISLYQ DNTGRVTLII KDVNKKDAGW
Myotilin d  .....
Myotilin g  .....
Myotilin h  .....

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      430      440      450      460      470      480
Myotilin a  YTVSAVNEAG VTTCNTRLDV TARPNOQLPA PKQLRVRPTF SKYLALNGKG LNVKQAFNPE
Myotilin b  YTVSAVNEAG VTTCNTRLDV TARPNOQLPA PKQLRVRPTF SKYLALNGKG LNVKQAFNPE
Myotilin c  YTVSAVNEAG VTTCNTRLDV TARPNOQLPA PKQLRVRPTF SKYLALNGKG LNVKQAFNPE
Myotilin d  .....
Myotilin g  .....
Myotilin h  .....

```

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      490
      Stop
Myotilin a  GEFQRLAAQS GLYESEEL*
Myotilin b  GEFQRLAAQS GLYESEEL*
Myotilin c  GEFQRLAAQS GLYESEEL*
Myotilin d  .....
Myotilin g  .....
Myotilin h  .....

```

Alignment:
Nukleinsäuresequenzen muriner Myotilinisoformen

```

Start 1
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10      20      30      40      50      60
Myotilin I/II ATGTTTAACT ACGAACGTCC AAAACACTTC ATCCAGCCGC AAAATCCGTG TGGCTCCAGA
Myotilin III  -----
Myotilin IV   -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          70      80      90     100     110     120
Myotilin I/II CTGCAGCCTC CAGGACCGGA AGTCTCCGGC TTCCCGAGCC AGACCAAACA GTCTTCCATC
Myotilin III  -----
Myotilin IV   -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          130     140     150     160     170     180
Myotilin I/II GTCATACAGC CTCGCCAGTG CACAGAGCAG AGATTTTCTG CCTCCTCCAC AGTGAGTCTT
Myotilin III  -----
Myotilin IV   -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          190     200     210     220     230     240
Myotilin I/II CACATCACCG TGTCTTCCTC TGCTTATCCT GCTCCCCAGC AGCTTGCTGG CCCCAACCCC
Myotilin III  -----
Myotilin IV   -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          250     260     270     280     290     300
Myotilin I/II GGCCAAAAGG TTAAGTGTAC CTATAACCAG TCCCCAGCCA GCTTCCTCAG TTCTATATTA
Myotilin III  -----
Myotilin IV   -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310     320     330     340     350     360
Myotilin I/II CCGTCTCAAC CCGATTACTG TAACAGTAAA ATCCCATCCA CTGTGGACTC CAACTATCAA
Myotilin III  -----
Myotilin IV   -----

Start 2
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          370     380     390     400     410     420
Myotilin I/II CAATCCTCAG TTAACCAACC TGTAATGCC ATGTCATCCC AAGCTGCAA TGCTAGGCC
Myotilin III  -----
Myotilin IV   -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          430     440     450     460     470     480
Myotilin I/II ACTCCAAAGA CTCCTGACCA TGAGATCCAA GGATCGAAAG AAGCGTTGAT TCAAGATTTG
Myotilin III  -----
Myotilin IV   -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          490     500     510     520     530     540
Myotilin I/II GAAAGAAAGC TGAAATGCAA AGACACCCTT CTTCATAATG GAAATCAAAG ACTGACCTAC
Myotilin III  -----
Myotilin IV   -----

```

Anhang A: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

```

                                Start 3
                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                550      560      570      580      590      600
Myotilin I/II  GAGGAGAAGA TGGCTCGCAG GTTGTTAGGA CCGCAGAATG CTGCTGCTGT GTTTCAGGCG
Myotilin III  GAGGAGAAGA TGGCTCGCAG GTTGTTAGGA CCGCAGAATG CTGCTGCTGT GTTTCAGGCG
Myotilin IV   -----A TGGCTCGCAG GTTGTTAGGA CCGCAGAATG CTGCTGCTGT GTTTCAGGCG

                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                610      620      630      640      650      660
Myotilin I/II  CAAAACAGTG ATGTCCAAGA TTCACCACAG CATAACCCAG AGCAAGCACG GCTGCACGTT
Myotilin III  CAAAACAGTG ATGTCCAAGA TTCACCACAG CATAACCCAG AGCAAGCACG GCTGCACGTT
Myotilin IV   CAAAACAGTG ATGTCCAAGA TTCACCACAG CATAACCCAG AGCAAGCACG GCTGCACGTT

                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                670      680      690      700      710      720
Myotilin I/II  CCCACATCAC AAGTAAGAAG TAGATCGTCC TCCAGAGCAG AGGCCAATGA TCAGGATGCC
Myotilin III  CCCACATCAC AAGTAAGAAG TAGATCGTCC TCCAGAGCAG AGGCCAATGA TCAGGATGCC
Myotilin IV   CCCACATCAC AAGTAAGAAG TAGATCGTCC TCCAGAGCAG AGGCCAATGA TCAGGATGCC

                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                730      740      750      760      770      780
Myotilin I/II  ATCCAGGAGA AGTTTTACCC ACCACGCTTC ATTCAAGTGC CAGAAAACAT GTCGATCGAA
Myotilin III  ATCCAGGAGA AGTTTTACCC ACCACGCTTC ATTCAAGTGC CAGAAAACAT GTCGATCGAA
Myotilin IV   ATCCAGGAGA AGTTTTACCC ACCACGCTTC ATTCAAGTGC CAGAAAACAT GTCGATCGAA

                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                790      800      810      820      830      840
Myotilin I/II  GAGGGGAGGT TCTGCCGAAT GGACTTTAAA GTAAGTGGAC TGCCAGCCCC TGATGTGTCA
Myotilin III  GAGGGGAGGT TCTGCCGAAT GGACTTTAAA GTAAGTGGAC TGCCAGCCCC TGATGTGTCA
Myotilin IV   GAGGGGAGGT TCTGCCGAAT GGACTTTAAA GTAAGTGGAC TGCCAGCCCC TGATGTGTCA

                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                850      860      870      880      890      900
Myotilin I/II  TGGTATCTAA ACGGGAGACC AGTGCAATCA GATGAGTTGC ACAAATGAT  AGTGTCTGAG
Myotilin III  TGGTATCTAA ACGGGAGACC AGTGCAATCA GATGAGTTGC ACAAATGAT  AGTGTCTGAG
Myotilin IV   TGGTATCTAA ACGGGAGACC AGTGCAATCA GATGAGTTGC ACAAATGAT  AGTGTCTGAG

                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                910      920      930      940      950      960
Myotilin I/II  AAGGGTTTCC ACTCCCTCAT CTTCGAAGTG GTCAGAGCAT CAGATGCAGG GCCATATGCA
Myotilin III  AAGGGTTTCC ACTCCCTCAT CTTCGAAGTG GTCAGAGCAT CAGATGCAGG GCCATATGCA
Myotilin IV   AAGGGTTTCC ACTCCCTCAT CTTCGAAGTG GTCAGAGCAT CAGATGCAGG GCCATATGCA

                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                970      980      990      1000     1010     1020
Myotilin I/II  TCGTGGCCA  GGAACAGAGC TGGAGAAGCC ACCTTCACAG TGCAGCTGGA TGTTCTGGCA
Myotilin III  TCGTGGCCA  GGAACAGAGC TGGAGAAGCC ACCTTCACAG TGCAGCTGGA TGTTCTGGCA
Myotilin IV   TCGTGGCCA  GGAACAGAGC TGGAGAAGCC ACCTTCACAG TGCAGCTGGA TGTTCTGGCA

                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                1030     1040     1050     1060     1070     1080
Myotilin I/II  AAAGAGCATA AAAGAGCACC GATGTTTATC TTCAAACCAC AGAGTAAGAA AGTTTTTGAG
Myotilin III  AAAGAGCATA AAAGAGCACC GATGTTTATC TTCAAACCAC AGAGTAAGAA AGTTTTTGAG
Myotilin IV   AAAGAGCATA AAAGAGCACC GATGTTTATC TTCAAACCAC AGAGTAAGAA AGTTTTTGAG

                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                1090     1100     1110     1120     1130     1140
Myotilin I/II  GGAGAGACCG TGAAGCTGGA GTGCCAGATC TCAGCTATCC CTCCACCAA  GCTGTTCTGG
Myotilin III  GGAGAGACCG TGAAGCTGGA GTGCCAGATC TCAGCTATCC CTCCACCAA  GCTGTTCTGG
Myotilin IV   GGAGAGACCG TGAAGCTGGA GTGCCAGATC TCAGCTATCC CTCCACCAA  GCTGTTCTGG

```

Anhang A: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1150          1160          1170          1180          1190          1200
Myotilin I/II AAAAGAAACA ATGAAATGGT CCAGTTCAAC ACTGATCGGA TAAGCTTATA TCATGACAAC
Myotilin III AAAAGAAACA ATGAAATGGT CCAGTTCAAC ACTGATCGGA TAAGCTTATA TCATGACAAC
Myotilin IV AAAAGAAACA ATGAAATGGT CCAGTTCAAC ACTGATCGGA TAAGCTTATA TCATGACAAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1210          1220          1230          1240          1250          1260
Myotilin I/II GCCGGAAGAG TAACTTTACT GATAAAAGAT GTAAACAAGA AGGACGCTGG GTGGTATACA
Myotilin III GCCGGAAGAG TAACTTTACT GATAAAAGAT GTAAACAAGA AGGACGCTGG GTGGTATACA
Myotilin IV GCCGGAAGAG TAACTTTACT GATAAAAGAT GTAAACAAGA AGGACGCTGG GTGGTATACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1270          1280          1290          1300          1310          1320
Myotilin I/II GTGTCAGCAG TCAATGAAGC TGGTGTGACC ACGTGTAACA CACGATTAGA TGTCACAGCC
Myotilin III GTGTCAGCAG TCAATGAAGC TGGTGTGACC ACGTGTAACA CACGATTAGA TGTCACAGCC
Myotilin IV GTGTCAGCAG TCAATGAAGC TGGTGTGACC ACGTGTAACA CACGATTAGA TGTCACAGCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1330          1340          1350          1360          1370          1380
Myotilin I/II CGTCCAATCC AA ACTCTCCC AGCTCCTAAG CAGCTGCGTG TTCGACCAAC ATTCAGCAAA
Myotilin III CGTCCAATCC AA ACTCTCCC AGCTCCTAAG CAGCTGCGTG TTCGACCAAC ATTCAGCAAA
Myotilin IV CGTCCAATCC AA ACTCTCCC AGCTCCTAAG CAGCTGCGTG TTCGACCAAC ATTCAGCAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1390          1400          1410          1420          1430          1440
Myotilin I/II TATTTAGCGC TCAATGGGAG AGGTTTGGAT GTGAAACAAG CTTTTAACCC TGAAGGAGAA
Myotilin III TATTTAGCGC TCAATGGGAG AGGTTTGGAT GTGAAACAAG CTTTTAACCC TGAAGGAGAA
Myotilin IV TATTTAGCGC TCAATGGGAG AGGTTTGGAT GTGAAACAAG CTTTTAACCC TGAAGGAGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1450          1460          1470          1480          1490          Stop
Myotilin I/II TTTCAGCGCC TGGCAGCTCA ATCCGGACTC TACGAAAGTG AAGAACTTTA A
Myotilin III TTTCAGCGCC TGGCAGCTCA ATCCGGACTC TACGAAAGTG AAGAACTTTA A
Myotilin IV TTTCAGCGCC TGGCAGCTCA ATCCGGACTC TACGAAAGTG AAGAACTTTA A

```

Alignment:
Aminosäuresequenzen muriner Myotilinisoformen

```

      Start 1
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60
Myotilin I/II MFNYERPKHF IQPQNPCGSR LQPPGPEVSG FPSQTKQSSI VIQPRQCTEQ RFSASSTVSS
Myotilin III  -----
Myotilin IV   -----

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      70      80      90     100     110     120
Myotilin I/II HITVSSSSAYP APQQLAGPNP GQKVTATYNQ SPASFLSSIL PSQPDYCNSK IPSTVDSNYQ
Myotilin III  -----
Myotilin IV   -----

      Start 2
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      130     140     150     160     170     180
Myotilin I/II QSSVNQPVNA MSSQAANARP TPKTPDHEIQ GSKEALIQDL ERKLKCKDTL LHNGNQRLTY
Myotilin III  ----- MSSQAANARP TPKTPDHEIQ GSKEALIQDL ERKLKCKDTL LHNGNQRLTY
Myotilin IV   -----

      Start 3
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      190     200     210     220     230     240
Myotilin I/II EEKMARRLLG PQNAAAVFQA QNSDVQDSPQ HNPEQARLHV PTSQVRSRSS SRAEANDQDA
Myotilin III  EEKMARRLLG PQNAAAVFQA QNSDVQDSPQ HNPEQARLHV PTSQVRSRSS SRAEANDQDA
Myotilin IV   ---MARRLLG PQNAAAVFQA QNSDVQDSPQ HNPEQARLHV PTSQVRSRSS SRAEANDQDA

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      250     260     270     280     290     300
Myotilin I/II IQEKFYPPPRF IQVPENMSIE EGRFCRMDFK VSGLPAPDVS WYLNGRPVQS DELHKMIVSE
Myotilin III  IQEKFYPPPRF IQVPENMSIE EGRFCRMDFK VSGLPAPDVS WYLNGRPVQS DELHKMIVSE
Myotilin IV   IQEKFYPPPRF IQVPENMSIE EGRFCRMDFK VSGLPAPDVS WYLNGRPVQS DELHKMIVSE

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350     360
Myotilin I/II KGFHSLIFEV VRASDAGPYA CVARNRAGEA TFTVQLDVLA KEHKRAPMFI FKPQSKKVFE
Myotilin III  KGFHSLIFEV VRASDAGPYA CVARNRAGEA TFTVQLDVLA KEHKRAPMFI FKPQSKKVFE
Myotilin IV   KGFHSLIFEV VRASDAGPYA CVARNRAGEA TFTVQLDVLA KEHKRAPMFI FKPQSKKVFE

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      370     380     390     400     410     420
Myotilin I/II GETVKLECQI SAIPPPKLFW KRNNEMVQFN TDRISLYHDN AGRVTLLLIKD VNKKDAGWYT
Myotilin III  GETVKLECQI SAIPPPKLFW KRNNEMVQFN TDRISLYHDN AGRVTLLLIKD VNKKDAGWYT
Myotilin IV   GETVKLECQI SAIPPPKLFW KRNNEMVQFN TDRISLYHDN AGRVTLLLIKD VNKKDAGWYT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      430     440     450     460     470     480
Myotilin I/II VSAVNEAGVT TCNTRLDVTA RPIQTLPAPK QLRVRPTFSK YLALNGRGLD VKQAFNPEGE
Myotilin III  VSAVNEAGVT TCNTRLDVTA RPIQTLPAPK QLRVRPTFSK YLALNGRGLD VKQAFNPEGE
Myotilin IV   VSAVNEAGVT TCNTRLDVTA RPIQTLPAPK QLRVRPTFSK YLALNGRGLD VKQAFNPEGE

      Stop
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      490
Myotilin I/II FQRLAAQSGL YESEEL*
Myotilin III  FQRLAAQSGL YESEEL*
Myotilin IV   FQRLAAQSGL YESEEL*

```

Alignment:

Myotilin-Nukleinsäuresequenzen verschiedener Spezies

Exon 1

	10 20 30 40 50 60
H. sapiens	TGGACAGGCA AGCACATCAG ATGTCACGTG TTGGCAGCTG ATAAAAGTCA GTGGTGCAT
M. musculus	-----
R. norvegicus	-----
X. tropicalis	-----
X. laevis	-----

	70 80 90 100 110 120
H. sapiens	AATACTAAGC ACAGAGCCAC TAGATTAGTC TGTGAGGGAA GGAGATGCCT CTTCTTCCC
M. musculus	----- --AGAGCCAC GGA---GCC TG---AGCAA GGAAATGCTT CTCCCTTCTC
R. norvegicus	----- --AGAGCCAC ACGA---TCC TG---AGCAA GGAGATGCTT CTTCTTCTC
X. tropicalis	-----
X. laevis	-----

Exon 2a

	130 140 150 160 170 180
H. sapiens	TTCAATAGTG GGTAAACCC AGCTGGCACC CTCTGGAACT ACGGGAACAA TATTCTTCAA
M. musculus	TTCAGTAGTG GGTGAGAC- -GCTGGCCCC CTCTG-AGCT AAGGAAACAA TATTCTTCAA
R. norvegicus	TTCAGTAGTG GGTGAGACA AGCTGGCCCC TTCTG-AGCT AAGGAAACAA TATCCTTCAA
X. tropicalis	-----
X. laevis	-----

	190 200 210 220 230 240
H. sapiens	GAGAAGGTCA CTCTACCAA GGCAGGAGCA CAGTAT---T CTCAGGATCT CAACAAGGAA
M. musculus	GAGAAA---- -CCCACCAAC ATCAGGAGTA CAGTGGTGGT CTAGAGATCT CAGCAAAGAG
R. norvegicus	GAGAAA---- -CCCACCAAC ATCAGGAGTA CAGTGT---T CTAGAGATCT CAGCAAGGAG
X. tropicalis	-----
X. laevis	-----

Exon 2b

	250 260 270 280 290 300
H. sapiens	GAGCAGACCA AGGTTGCTTC TGATTCTTCA CAACCTTCCG T--AATTCCA GGCTTGTGG-
M. musculus	GGCCAGACTA AAGTTGCTTC TGACTTGCTG CAACCTTCTG TGTAATTCCA GGCTTGCCAA
R. norvegicus	GGCCAGACTA AAGTTTCTTC TGACTTGCTG CAACCTTCTG T--AATTCCA GGCTTGCCA-
X. tropicalis	AAAGGTACCA ATGTGGATTA TTTCCAGCA TACAACATTG GCAAACCAAT AACCTGTAC-
X. laevis	-----

	310 320 330 340 350 360
H. sapiens	CCCCAAATTC AGGGCCCCAC CCTTCCAGGA ACAAATCATT ATAGTAATAA TTTGCCTTCA
M. musculus	CCCCACGGTC AGGATTCTAT CCTTCTGTGA GCAAATC--- -----TG
R. norvegicus	CCCCACGGTC AGGAGTCTAT CCTTCTGGGA GCAAATC--- -----CA
X. tropicalis	CTTAAGGGTC AACCGCAAGT GTCTGAAAAT ATGGACCTCT CGTCCCTG-- -CCATCTGTT
X. laevis	-----

Start 1

	370 380 390 400 410 420
H. sapiens	TCTTCCATAT ACCAACTAAG CATGTTTAAAC TACGAACGTC CAAAACACTT CATCCAGTC-
M. musculus	TCTTCCATAT ACCAGCTAAG CATGTTTAAAC TACGAACGTC CAAAACACTT CATCCAGCC-
R. norvegicus	TCTTCCATAT ACCAGCTAAG CATGTTTAAAC TACGAACGTC CAAAACACTT CATCCAGTC-
X. tropicalis	TCTGCAATGT ATCAACCAAC AACATTTAAT TATGAGCGCC CTAAACATTT TATACAATCA
X. laevis	-----

Anhang A: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          430          440          450          460          470          480
H. sapiens    ---CCAAAAC -CCATGTGGC -TCCAGATTG CAGCCTCCTG GACCAGAAAC CTCCAGCTTC
M. musculus   ---GCAAAAT -CCGTGTGGC -TCCAGACTG CAGCCTCCAG GACCGGAAGT CTCCGGCTTC
R. norvegicus ---CCAAAAT -CCATGTGGC -TCCGGGCTG CAGCCTCCAG GACCTGAAGT CTCCAGCTTC
X. tropicalis AAACCGAAAT GTCAAGTGGG ATCCACGTCT CAGTCTACCA A---TGAAGC TGTACATACA
X. laevis     -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          490          500          510          520          530          540
H. sapiens    TCTAGCCAGA CCAAACAGTC TTCCATTATC ATCCAGCCCC GCCAGTGTAC AGAGCAAAGA
M. musculus   CCGAGCCAGA CCAAACAGTC TTCCATCGTC ATACAGCCTC GCCAGTGCAC AGAGCAGAGA
R. norvegicus CCTAACCAGA CCAAACAGTC TTCCATCGTC ATCCAGCCTC GCCAATGCAC CGAGCAGAGA
X. tropicalis AGCAGGTCAC CTAAGAAAAT TTCTATTTCA ATTCAGCCTC AGCCATGTC --ATCATATA
X. laevis     -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          550          560          570          580          590          600
H. sapiens    TTTTCTGCCT CCTCAACACT GAGCTCTCAC ATCACCATGT CCTCCTCTGC TTTCCCTGCT
M. musculus   TTTTCTGCCT CCTCCACAGT GAGCTCTCAC ATCACCGTGT CTTCTCTGCT TTATCCTGCT
R. norvegicus TTTTCTGCTT CCTCCACAGT GAGCTCTCAC ATCACCGTGT CTTCTCTGCT TTATCCTGCT
X. tropicalis ACATGAGC-T CTGCAGCACC G-GTTGCACC ATCAAAGTGT -----AG TAAAACAGAA
X. laevis     -----

```

Exon 2c

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          610          620          630          640          650          660
H. sapiens    TCTCCCAAGC AGCATGCTGG CTCCAACCCA GGCCAAAGGG TTACAACCA CTATAACCA
M. musculus   CCCC---AGC AGCTTGCTGG CCCCACCCC GGCCAAAAGG TTACTGCTAC CTATAACCA
R. norvegicus TCCC---AGC AGCTGGCTGG CCCCACCCC GGTCAGAAGG TTACTGCTAC CTATAACCA
X. tropicalis GTTC----- -ATTTACAGC CCCAGTCTTC AAACATTGCA TTATCTGGAC AAGAAAATGA
X. laevis     -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          670          680          690          700          710          720
H. sapiens    TCCCCAGCCA GCTTCTCAG CTCCATAT-T ACCATCACAG CCTGATTACA ATAGCAGTAA
M. musculus   TCCCCAGCCA GCTTCTCAG TTCTATAT-T ACCGTCCTAA CCCGATTACT GTAACAGTAA
R. norvegicus TCCCCAGCCA GCTTCTCAG TTCTATAT-T ACCGTCCTAG CCTGATTACA GTAACAGTAA
X. tropicalis TCAGAGCAAA AATACATCCA CTGCATTTCT AACAAATTTCA CCTTCCAAGA GTCAAAGTAA
X. laevis     -----

```

Start 2

Exon 3

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          730          740          750          760          770          780
H. sapiens    AATCCCTTCC GCTATGGATT CCAACTATCA ACAGTCCTCA GCTGGCCAAC CTATAAATGC
M. musculus   AATCCCATCC ACTGTGGACT CCAACTATCA ACAATCCTCA GTTAACCAAC CTGTAATATGC
R. norvegicus AATCCCATCC ACTGTGGACT CCAACTATCA ACAATCCTCA GTTCACCAAC CTGTAATATGC
X. tropicalis A----- -CCAAGATG ATCAATACTG GTACATCAA CTTGCCCAAT GCATCAGTAA
X. laevis     -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          790          800          810          820          830          840
H. sapiens    AAAGCCATCC CAAACTGCAA ATGCTAAGCC CATAACCAAGA ACTCCTGATC ATGAAATACA
M. musculus   CATGTCATCC CAAGCTGCAA ATGCTAGGCC CACTCCAAAG ACTCCTGACC ATGAGATCCA
R. norvegicus CGTGTATCC CAAGCTGCAG GTGCTAAGCC CACTCCAAGG ACTCCTGACC ACGAAATCCA
X. tropicalis AGA----- CAGACTTAAG AC---AAGAT CAGCACGAAT A---TGAAA GAGGGATACA
X. laevis     -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          850          860          870          880          890          900
H. sapiens    AGGATCAAAA GAAGCTTTGA TTCAAGATTT GGAAAGAAAG CTGAAATGCA AGGACACCCT
M. musculus   AGGATCGAAA GAAGCGTTGA TTCAAGATTT GGAAAGAAAG CTGAAATGCA AAGACACCCT
R. norvegicus AGGATCAAAA GAAGCATTTGA TTCAAGATTT GGAAAGAAAG CTGAAATGCA AAGACACCCT
X. tropicalis AGGAACAAA GATGCTTTGA TTCAGGACCT TGAAAGGAAG CTGAAATGCA AAGACAGTAT
X. laevis     -----

```

Anhang A: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

		<u>Exon 4</u>			<u>Start 3</u>			
		
		910	920	930	940	950	960	
H. sapiens		TCTTCATAAT	GGAAATCAAC	GTCTAACATA	TGAAGAGAAG	ATGGCTCGCA	GATTGCTAGG	
M. musculus		TCTTCATAAT	GGAAATCAAA	GACTGACCTA	CGAGGAGAAG	ATGGCTCGCA	GGTTGTTAGG	
R. norvegicus		TCTTCATAAT	GGAAACCAAA	GACTGACCTA	TGAGGAGAAG	ATGGCTCGCA	GGTTGTTAGG	
X. tropicalis		TCTGCACAAT	GGAAACCAAC	GCTTAACATA	TGAAGAAAAG	ATGGCTCGCA	GGCTTCTTGG	
X. laevis		-----	-----	-----	-----	-----	-----	
		
		970	980	990	1000	1010	1020	
H. sapiens		ACCACAGAAT	GCAGCTGCTG	TGTTTCAAGC	TCAGGATGAC	AGTGGTGCAC	AAGACTCGCA	
M. musculus		ACCGCAGAAT	GCTGCTGCTG	TGTTTCAGGC	GCAAAA---C	AGTGATGTCC	AAGATTCACC	
R. norvegicus		ACCGCAGAAT	GCTGCTGCTG	TGTTTCAAGC	TCAAAA---C	AGTGACGTCC	AAGATTCGTC	
X. tropicalis		AGCAGAAAAT	GCTGCATCAG	TATTTGAAGA	TCACATGGCA	GACAGCGTTC	AGGATTC---	
X. laevis		-----	-----	-----	-----	-----	-----	
		<u>Exon 5</u>			<u>Exon 6</u>			
		
		1030	1040	1050	1060	1070	1080	
H. sapiens		GCAACACAAC	TCAGAACATG	CGCGACTGCA	AGTTCCTACA	TCACAAGTAA	GAAAGTAGATC	
M. musculus		ACAGCATAAC	CCAGAGCAAG	CACGGCTGCA	CGTTCCCACA	TCACAAGTAA	GAAAGTAGATC	
R. norvegicus		ACAGCATAAC	CCAGAACATG	CACGGCTGCA	AGTTCCCACA	TCACAAGTAA	GAAGTAGATC	
X. tropicalis		--AAAGCAAA	TCAGAG---A	CAGTGTTACA	A-TGCCTA-G	CCTCCAACAA	CACGAAAAAC	
X. laevis		-----	-----	-----	-----	-----	-----	
		
		1090	1100	1110	1120	1130	1140	
H. sapiens		AACCTCAAGG	GGAGATGTGA	ATGATCAGGA	TGCAATCCAG	GAGAAATTTT	ACCCACCACG	
M. musculus		GTCCTCCAGA	GCAGAGGCCA	ATGATCAGGA	TGCCATCCAG	GAGAAGTTT	ACCCACCACG	
R. norvegicus		GTCCTCCAGA	GCAGACGCAA	ATGACCAGGA	TGCCATCCAG	GAGAAGTTT	ACCCACCACG	
X. tropicalis		A-CTCAAGGA	ATAGAGAGTC	AACATCAGGA	T-CCATACAG	GAAAAATATT	TTCCACCAAG	
X. laevis		-----	-----	-----	----ATACAG	GAAAAATATT	TTCCACCAAG	
		
		1150	1160	1170	1180	1190	1200	
H. sapiens		TTTCATTCAA	GTGCCAGAGA	ACATGTCGAT	TGATGAAGGA	AGATTCTGCA	GAATGGACTT	
M. musculus		CTTCATTCAA	GTGCCAGAAA	ACATGTCGAT	CGAAGAGGGG	AGTTTCTGCC	GAATGGACTT	
R. norvegicus		CTTCATTCAA	GTGCCAGAAA	ATATGTCCAT	CGAAGAAGGA	AGATTCTGCA	GAATGGACTT	
X. tropicalis		ATTTTGTCAA	GTTCCAGAAG	ACCTAACTGT	GGAAGAAGGA	CATTTCTGTC	GAATAGACTT	
X. laevis		ATTTTGTCAA	GTTCCAGAAG	ATTTAACTGT	GGAAGAAGGA	CATTTCTGTC	GAATAGACTT	
		<u>Exon 7</u>						
		
		1210	1220	1230	1240	1250	1260	
H. sapiens		CAAAGTGAGT	GGACTGCCAG	CTCCTGATGT	GTCATGGTAT	CTAAATGGAA	GAACAGTTCA	
M. musculus		TAAAGTAAGT	GGACTGCCAG	CCCCTGATGT	GTCATGGTAT	CTAAACGGGA	GACCAGTGCA	
R. norvegicus		TAAAGTGAGT	GGACTGCCAG	CCCCTGATGT	GTCATGGTAT	CTAAACGGGA	GACTGGTGCA	
X. tropicalis		TAAAGTGGCA	GGTGTGCCTG	TCCCAGATGT	TTCATGGTAT	TTAAATGGGA	AAGCTGTCCA	
X. laevis		TAAAGTGACT	GCTGTGCCTG	CTCCAGATGT	TTCATGGTAT	TTAAATGGGA	AAGTGGTTCA	
		
		1270	1280	1290	1300	1310	1320	
H. sapiens		ATCAGATGAT	TTGCACAAAA	TGATAGTGTC	TGAGAAGGGT	CTTCATTAC	TCATCTTTGA	
M. musculus		ATCAGATGAG	TTGCACAAAA	TGATAGTGTC	TGAGAAGGGT	TTCCACTCCC	TCATCTTCGA	
R. norvegicus		ATCAGATGAG	TTGCACAAAA	TGATAGTGTC	AGAGAAGGGT	TTCCACTCCC	TCATCTTTGA	
X. tropicalis		AGCCGATGAC	TTCCACAAAT	TCATAGTGTC	TGAGAAAGGT	GTTTATTTCAT	TTATATTTGA	
X. laevis		AGCTGATGAT	TTCCACAAAA	TCATAGTGTC	TGGGAAAGGT	GTTTATTTCAT	TCATATTTGA	

Anhang A: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1330          1340          1350          1360          1370          1380
H. sapiens    AGTAGTCAGA GCTTCAGATG CAGGGGCTTA TGCATGTGTT GCCAAGAATA GAGCAGGAGA
M. musculus   AGTGGTCAGA GCATCAGATG CAGGGCCATA TGCATGCGTG GCCAGGAACA GAGCTGGAGA
R. norvegicus AGTGGTCAGA GCATCAGATG CAGGGCCATA TGCATGTGTA GCCAGAAACA GAGCTGGAGA
X. tropicalis AGTAGTAAA  ACCTATGATG CTGGATTGTA TAAATGTGTG GCATCTAACC GTGCTGGAAA
X. laevis     AGTAGTAAA  ACTTGTGATG CCGGATTGTA TGAATGTGTG GCATCTAACC GTGCTGGAAA

```

Exon 8

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1390          1400          1410          1420          1430          1440
H. sapiens    AGCCACCTTC ACTGTGCAGC TGGATGTCCT TGCAAAGAGAA CATAAAAGAG CACCAATGTT
M. musculus   AGCCACCTTC ACAGTGCAGC TGGATGTTCT GGCAAAGAGAG CATAAAAGAG CACCGATGTT
R. norvegicus AGCCACCTTC ACAGTGCAGC TGGATGTTCT GGCAAAGAGAG CACAAAGAGAG CACCGATGTT
X. tropicalis ATCAACATTT ACATTGCAAC TAGATGTACT AGCACAGGAA CGCAAAGGC  CTCCATGCTT
X. laevis     ATCAACATTT ACTTTGCAAC TTACTGTACT TGCACAGGAA CTCAAAAGGC  CTCCAAGCTT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1450          1460          1470          1480          1490          1500
H. sapiens    TATCTACAAA CCACAGAGCA AAAAAGTTTT AGAGGGAGAT TCAGTGAAC  TAGAATGCCA
M. musculus   TATCTTCAAA CCACAGAGTA AGAAAGTTTT TGAGGGAGAG ACCGTGAAGC TGGAGTGCCA
R. norvegicus TATCTACAAA CCACAGAGCA AAAAGGTTTT TGAGGGAGAA TCAGTGAAGT TAGAATGCCA
X. tropicalis TATTCAAAAG CCAGCAGCAA TAAAAGCAAT TGAAGGAGAG AATATAAAAA TAGAATGTCT
X. laevis     TATTCAAAAG CCACCAGCAA TAAAAGCAAT TGAAGGAGAA AATGTAAAAA TAGAATGTCT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1510          1520          1530          1540          1550          1560
H. sapiens    GATCTCGGCT ATACCTCCAC CAAAGCTTTT CTGGAAAAGA AATAATGAAA TGGTACAATT
M. musculus   GATCTCAGCT ATCCCTCCAC CAAAGCTGTT CTGGAAAAGA AACAATGAAA TGGTCCAGTT
R. norvegicus GATCTCAGCT ATCCCTCCAC CAAAGCTTTT CTGGAAAAGA AACAACGAAA TGGTTCAGTT
X. tropicalis GATCTCCGCC ATTCCACAAC CACAGATATT GCTGAAAAAA AACAATGAGA TGCTACGTTA
X. laevis     TGTCTCCGCC ATGCCACAAC CAAAGATATT GCTGAAAAAA AATAATGAGA TGCTACGTTA

```

Exon 9

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1570          1580          1590          1600          1610          1620
H. sapiens    CAACACTGAC CGAATAAGCT TATATCAAGA TAACACTGGA AGAGTTACTT TACTGATAAA
M. musculus   CAACACTGAT CCGATAAGCT TATATCATGA CAACGCCGGA AGAGTAACTT TACTGATAAA
R. norvegicus CAACACTGAC CCGATAAGCT TATATCATGA TAATGCTGGA AGAGTAACTT TACTGATAAA
X. tropicalis TAATACTGAC CCGATAAGGT TATACCAAGA TGATAGTGGG AGAGTTTCCC TTGTGATATA
X. laevis     TAATACTGAC CCGATAAGGT TATACCAGGA TGATAGTGGG AGAGTTTCCC TTGTGATATA

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1630          1640          1650          1660          1670          1680
H. sapiens    AGATGTAAAC AAGAAAGATG CTGGGTGGTA TACTGTGTCA GCAGTTAATG AAGCTGGAGT
M. musculus   AGATGTAAAC AAGAAGGACG CTGGGTGGTA TACAGTGTCA GCAGTCAATG AAGCTGGTGT
R. norvegicus AGATGTAAAC AAGAAGGATG CTGGGTGGTA TACAGTGTCA GCAGTCAATG AAGCTGGCGT
X. tropicalis CAATGTAAAC AAAACAGATG CCGGATGGTA CACCATATCA GCAGTAAATG AAGCAGGCGT
X. laevis     CAACGTAAAA AAAACAGATG ATGGATGGTA CACCATATCG GCAGTAAACG AAGCTGGCGT

```

Exon 10

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1690          1700          1710          1720          1730          1740
H. sapiens    GACTA-CATG TAACACAAGA TTAGACGTTA CGGCACGTCC AAACCAAAC  CTTCCAGCTC
M. musculus   GACCA-CGTG TAACACACGA TTAGATGTCA CAGCCCCTCC AATCCAAAC  CTCCAGCTC
R. norvegicus GACCA-CGTG TAACACAAGA TTAGATGTCA CAGCCCCTCC AAACCAAAC  CCCCAGCTC
X. tropicalis TGCAA-CTTG CCATGCACGT CTTGATGTTG CAACTATTGT CAACAAACAG ATGCCAAGTG
X. laevis     TGCAAACCTG CCATGCACGT CTTGATGTTG CAGCTCTTGT C-----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1750          1760          1770          1780          1790          1800
H. sapiens    CTAAGCAGTT ACGGGTTTCA CCAACATTCA GCAAATATTT AGCACTTAAT GGGAAAGGTT
M. musculus   CTAAGCAGCT GCGTGTTCGA CCAACATTCA GCAAATATTT AGCGCTCAAT GGGAGAGGTT
R. norvegicus CTAAGCAACT GCGTGTTCGA CCAACTTTCA GCAAATATTT AGCCCTAAAT GGGAAAGGTT
X. tropicalis TGAACAACCT TAAGGTCAAA CCAACTTTTA GCAGGTACTC AGCACTCAAT ATGAAAGGTT
X. laevis     -----

```


Anhang A: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          2290          2300          2310          2320          2330          2340
H. sapiens      CATGGTATAG ATTATCTGAG TGTTCCACAG TTGTATGTCA AAAGAAAATA AAA-TTCAAA
M. musculus    CATGATATAG ATTATCTGAG TGTTCCACAA CTTCATGTCA AAAGAGAATA AAAATTTGAA
R. norvegicus  CATGGTATAG ATTATCTGAG TGTTCCACAA TTTCATGTCA AAAGAGAATA AAA-TTCAAG
X. tropicalis  -----
X. laevis      -----

```

```

.....|.....| ...
          2350
H. sapiens      TATTTAAAAC GGA
M. musculus    TAACT----- ---
R. norvegicus  TAGTT----- ---
X. tropicalis  ----- ---
X. laevis      ----- ---

```

Alignment:
Myotilin-Proteinsequenzen verschiedener Spezies

	Start 1										serinreiche Region													
	10		20		30		40		50		60		70		80		90		100		110		120	
H. sapiens	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M. musculus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R. norvegicus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
X. tropicalis	MDLSSLPSVS	AMYQPTTFNY	ERP	KHFIQSQ	NPCGSRLQPP	GP-ETSSSFSS	QTKQSSIIIQ																	
X. laevis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	hydrophobe Region											
	70		80		90		100		110		120	
H. sapiens	PRQCTEQRF	ASSTLSSHIT	MSSSAFPASP	KQHAGSNPGQ	RVTTTYNQSP	ASFLSSILPS						
M. musculus	PRQCTEQRF	ASSTVSSHIT	VSSSAYPAP-	QQLAGPNPGQ	KVTATYNQSP	ASFLSSILPS						
R. norvegicus	PRQCTEQRF	ASSTVSSHIT	VSSSAYPAS-	QQLAGPNPGQ	KVTATYNQSP	ASFLSSILPS						
X. tropicalis	PQPCSSYNMS	SAAPVAPSKC	SKTEVHLQP-	QSSNIALSGQ	ENDQSKNTS-	TAFLT-ISP						
X. laevis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	Start 2											
	130		140		150		160		170		180	
H. sapiens	QPDYNSSKIP	SAMDSNYQQS	SAGQPINAKP	SQTANAKPIP	RTPDHEIQGS	KEALIQDLER						
M. musculus	QPDYCNISKIP	STVDSNYQQS	SVNQPVNAMS	SQAANARPTP	KTPDHEIQGS	KEALIQDLER						
R. norvegicus	QPDYNSKIP	STVDSNYQQS	SVHQPVNAVS	SQAAGAKPTP	RTPDHEIQGS	KEALIQDLER						
X. tropicalis	KS-QSKPKMI	NTGTSNLPNA	SVKT-----	----DLRQDQ	HEYERGIQGT	KDALIQDLER						
X. laevis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	Start 3											
	190		200		210		220		230		240	
H. sapiens	KLKCKDTRLH	NGNQRLTYEE	KMARRLLGPQ	NAAAVFQAQD	DSGAQDSQQH	NSEHARLQVP						
M. musculus	KLKCKDTRLH	NGNQRLTYEE	KMARRLLGPQ	NAAAVFQAQN	-SDVQDSPQH	NPEQARLHVP						
R. norvegicus	KLKCKDTRLH	NGNQRLTYEE	KMARRLLGPQ	NAAAVFQAQN	-SDVQDSSQH	NPEHARLQVP						
X. tropicalis	KLKCKDSILH	NGNQRLTYEE	KMARRLLGAE	NAASVFEDHM	ADSVQDSKQI	RDS---VTMP						
X. laevis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	Ig-ähnliche Domäne 1											
	250		260		270		280		290		300	
H. sapiens	TSQVRSRSTS	RGDVNDQDAI	QEKFYPPRFI	QVPENMSIDE	GRFCRMDFKV	SGLPAPDVSW						
M. musculus	TSQVRSRSTS	RAEANDQDAI	QEKFYPPRFI	QVPENMSIEE	GRFCRMDFKV	SGLPAPDVSW						
R. norvegicus	TSQVRSRSTS	RADANDQDAI	QEKFYPPRFI	QVPENMSIEE	GRFCRMDFKV	SGLPAPDVSW						
X. tropicalis	SLOQHEK-HS	RNRESTSGSI	QEKFYPPRFI	QVPEDLTVEE	GHFCEIDFKV	AGVVPVDVSW						
X. laevis	-----	-----I	QEKFYPPRFI	QVPEDLTVEE	GHFCEIDFKV	TAVPAPDVSW						

	Ig-ähnliche Domäne 1 (cont.)											
	310		320		330		340		350		360	
H. sapiens	YLNQRTVQSD	DLHKMIVSEK	GLHSLIFEV	RASDAGAYAC	VAKNRAGEAT	FTVQLDVLAK						
M. musculus	YLNQRPVQSD	ELHKMIVSEK	GFHSLIFEV	RASDAGPYAC	VARNRAGEAT	FTVQLDVLAK						
R. norvegicus	YLNQRLVQSD	ELHKMIVSEK	GFHSLIFEV	RASDAGPYAC	VARNRAGEAT	FTVQLDVLAK						
X. tropicalis	YLNQKAVQAD	DFHKFIVSEK	GVHSFIFEV	KTYDAGLYKC	VASNRAKST	FTLQLDVLAK						
X. laevis	YLNQKVVQAD	DFHKIIVSGK	GVHSFIFEV	KTC DAGLYEC	VASNRAKST	FTLQLTVLAK						

	Ig-ähnliche Domäne 2											
	370		380		390		400		410		420	
H. sapiens	EHKRAPMFIY	KPQSKKVL	DSVKLEQIS	AIPPKLFWK	RNNEMVQFNT	DRISLYQDNT						
M. musculus	EHKRAPMFIY	KPQSKKVFE	ETVKLEQIS	AIPPKLFWK	RNNEMVQFNT	DRISLYHDNA						
R. norvegicus	EHKRAPMFIY	KPQSKKVFE	ESVKLEQIS	AIPPKLFWK	RNNEMVQFNT	DRISLYHDNA						
X. tropicalis	ERKRPPCFIQ	KPAAIKAI	ENIKIECLIS	AIPQPQILK	KNNEMLRNT	DRIRLYQDDS						
X. laevis	ELKRPPSFIQ	KPPAIKAI	ENVKIECLVS	AMPQPKILLK	KNNEMLRNT	DRIRLYQDDS						

	430 440 450 460 470 480
H. sapiens	GRVTLLIKDV NKKDAGWYTV SAVNEAGVTT CNTRLDVTAR PNQTLPPAPKQ LRVPTFSKY
M. musculus	GRVTLLIKDV NKKDAGWYTV SAVNEAGVTT CNTRLDVTAR PIQTLPPAPKQ LRVPTFSKY
R. norvegicus	GRVTLLIKDV NKKDAGWYTV SAVNEAGVTT CNTRLDVTAR PNQTPPPAPKQ LRVPTFSKY
X. tropicalis	GRVSLVIYNV NKTDDGWYTI SAVNEAGVAT CHARLDVATI VNKQMPQSVKQ LKVKPTFSRY
X. laevis	GRVSLVIYNV KKTDDGWYTI SAVNEAGVAN -LPCTSCCSS C-----

	<u>Stop</u>
	490 500 510	
H. sapiens	LALNGKGLNV KQAFNPEGEF QRLAAQSGLY ESEEL*	
M. musculus	LALNGRGLDV KQAFNPEGEF QRLAAQSGLY ESEEL*	
R. norvegicus	LALNGKGLDV KQAFNPEGEF QRLAAQSGLY ESEEL*	
X. tropicalis	SALNMKGLDV QEAYSPEKDQ NSOPTYPELL ESEEL*	
X. laevis	-----	

Anhang B

Vektorkarten

Name des Plasmids: **pET23aT7**
 Länge: 3,7 kb
 Herkunft: Novagen

His6-Tag
 T7-Immuntag
 T7-Promotor
 Ampicillin-Resistenzgen
 F1-Origin

```

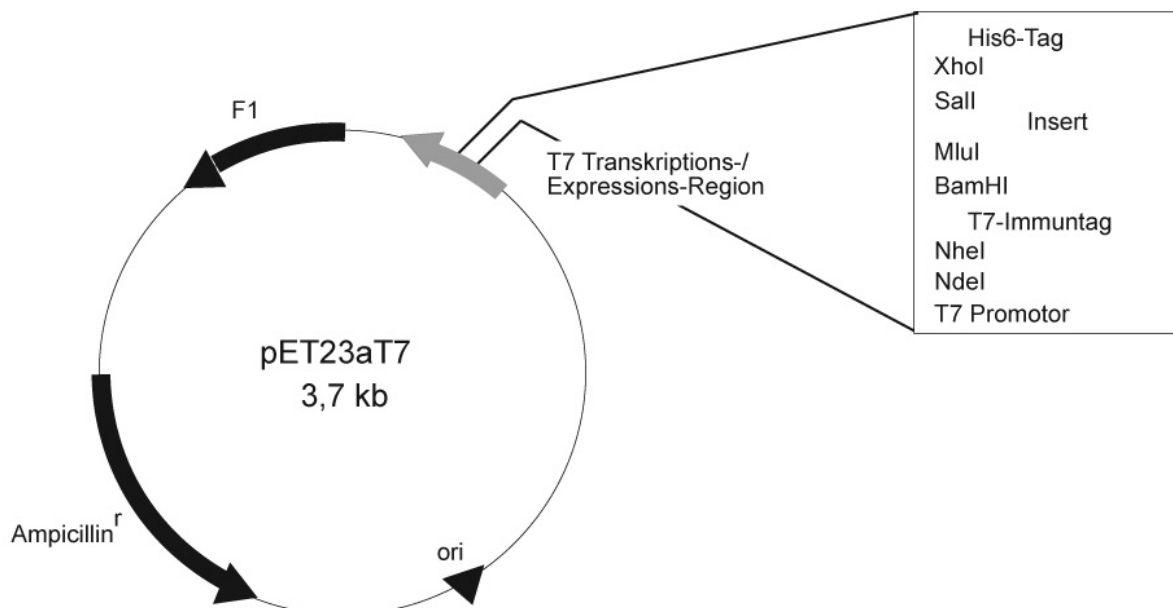
                                T7 Promotor
                                →
BglIII
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC

XbaI                               rbs           NdeI  NheI
TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACT
                                M  A  S  M  T

      T7-Immuntag      BamHI MluI      Insert      SalI
GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCACGCGT      GTCGAC
G  G  Q  Q  M  G  R  G  S  T  R      V  D

XhoI      His6-Tag
CTCGAGCACCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAG
L  E  H  H  H  H  H  H  Stop

                                T7-Terminator
CTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAA
ACGGGTCTTGAGGGGT
    
```



Erklärung

Name des Plasmids: **pET23aEEF**
 Länge: 3,6 kb
 Herkunft: Novagen

His6-Tag
 EEF-Immuntag
 T7-Promotor
 Ampicillin-Resistenzgen
 F1-Origin

```

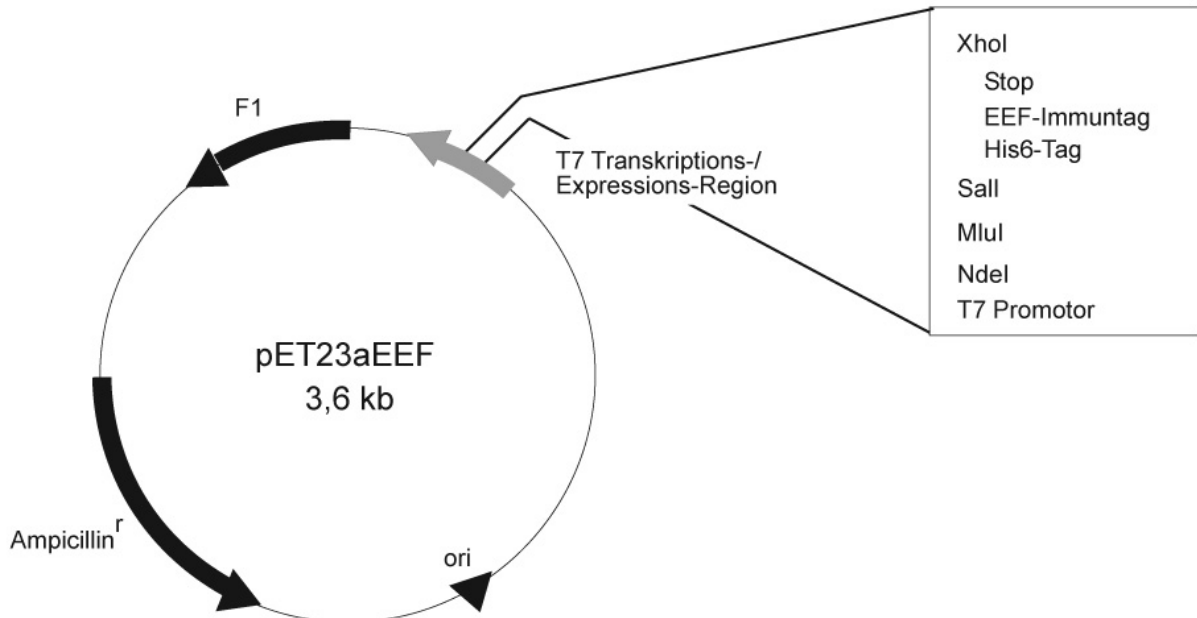
                T7 Promotor
                ────────────────────────────────────▶
BglIII
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC

XbaI                               rbs              NdeI  MluI          SalI
TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACGCGTTTTGTTCGAC

        His6-Tag      Immuno-Tag      XhoI
CACCACCACCACCACCACGAGGAGTTCTGACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGAT
 H H H H H H E E F Stop

CCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAA

                T7-Terminator
CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT
  
```

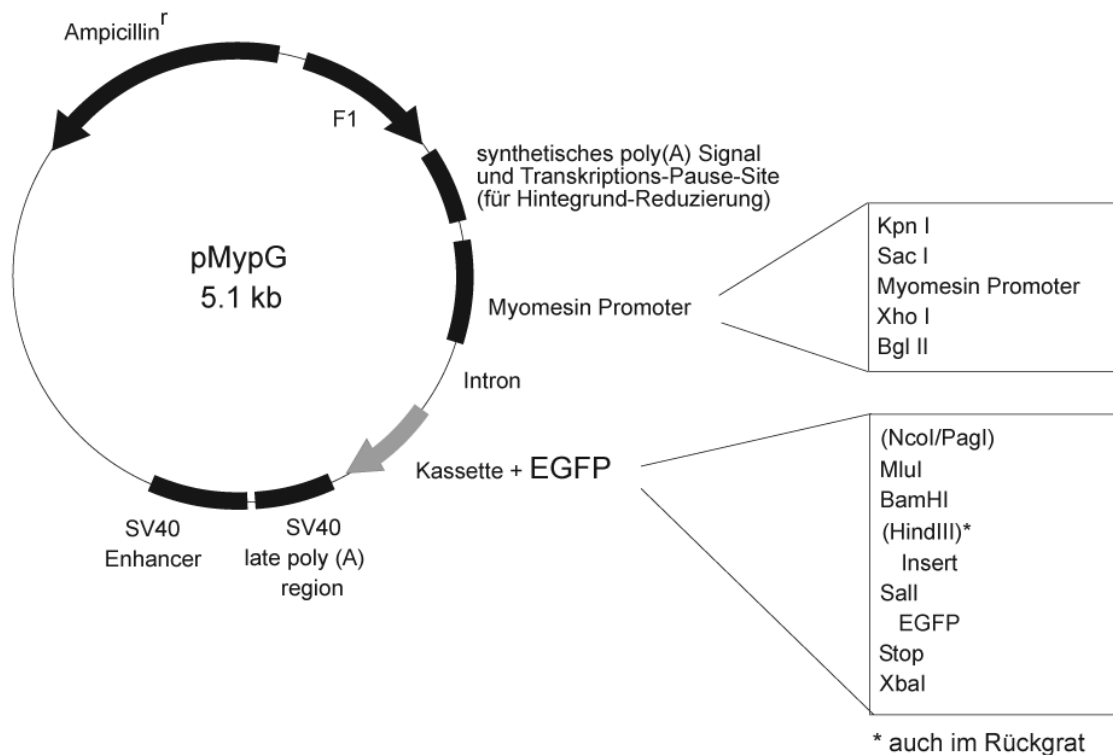


Name des Plasmids: **pMypG**
 Länge: 5,1 kb
 Herkunft: Promega (pCAT3-Enhancer)

Synthetisches poly(A)-Signal und Transkriptionspause-Site
 SV40-Enhancer
 SV40-late poly(A)-Region
 Myomesin-Promotor
 EGFP-Gen
 Ampicillin-Resistenzgen
 F1-Origin

PagI cloned into NcoI

	(HindIII)			
MluI	BamHI	SalI		XbaI
ACCATGACGCGTGGATCCAAGCTTGTTCGAC	-	EGFP	-	TCTAGA
TGGTACTGCGCACCTAGGTTTCAACAGCTG				AGATCT
M T R G S		V D		



Erklärung

Name des Plasmids: **pEGFP-Cpd** (basierend auf pEGFP-C1)

Länge: 4,7 kb

Herkunft: Clontech

„immediate early“-Promotor des Zytomegalovirus

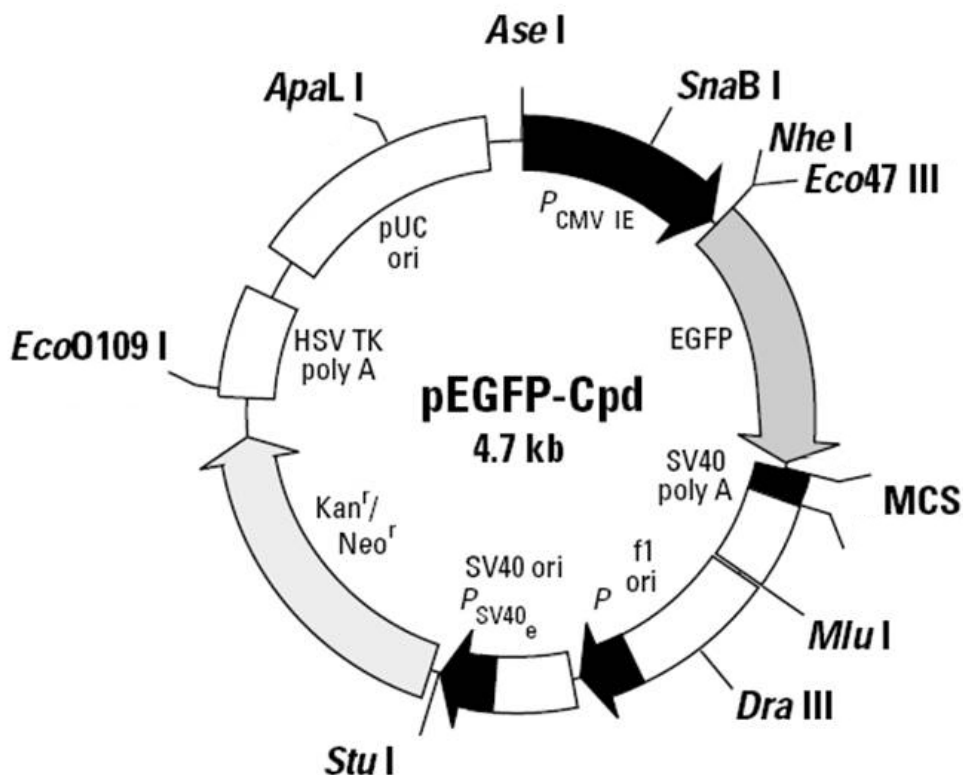
EGFP-Gen

Kanamycin-Resistenzgen

F1-Origin

pEGFP-C1 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BamHI* geschnitten. Und anschließend mit folgender Klonierungskassette (MCS) zum pEGFP-Cpd ligiert (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Peter van der Ven).

BglII MluI BamHI HindIII SalI
GGACTCAGATCTCGAACGCGTGGATCCAAGCTTGTTCGACCGATCCA



Name des Plasmids: **pGEM-T**

Länge: 3 kb

Herkunft: Promega

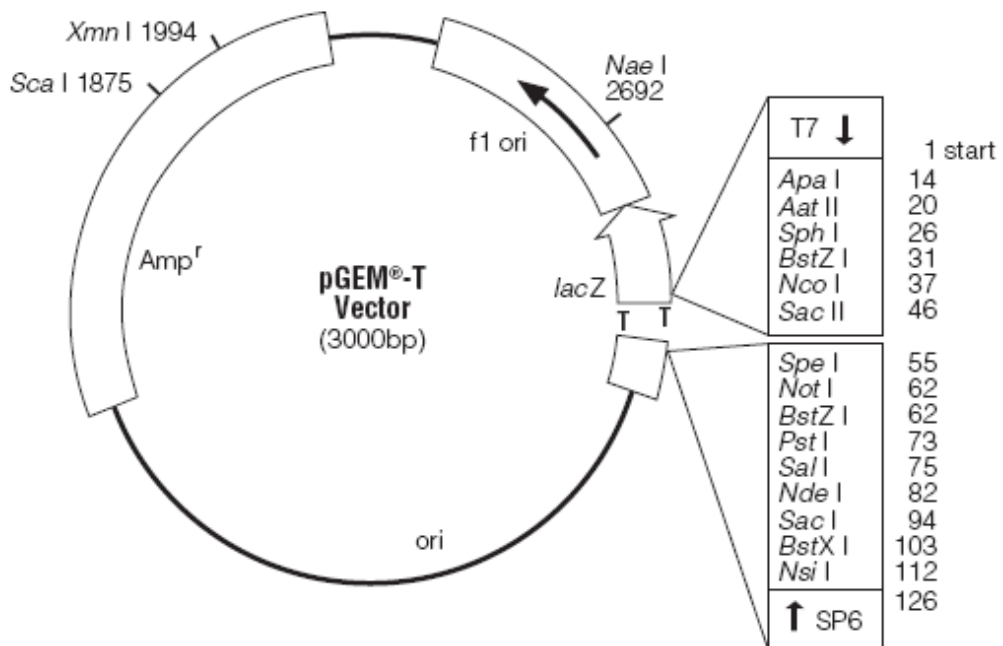
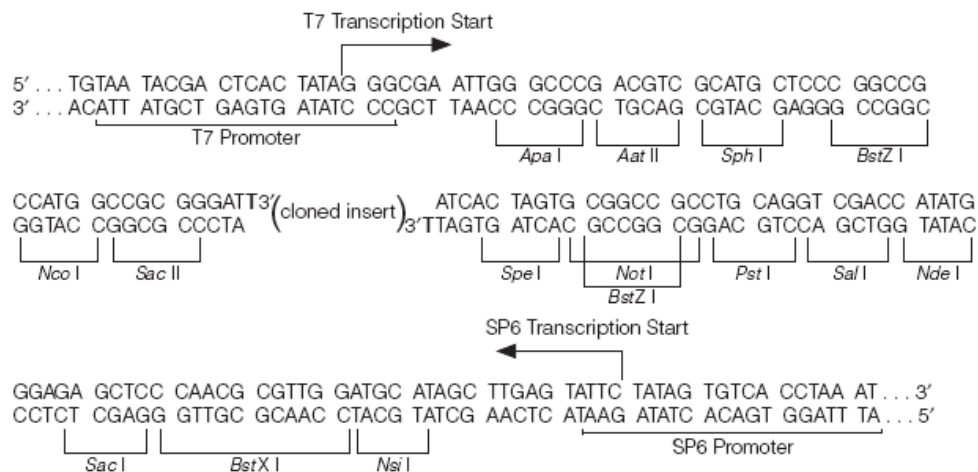
T7-Promotor

SP6-Promotor

LacZ-Gen

Ampicillin-Resistenzgen

F1-Origin



Erklärung

Name des Plasmids: **pUC-18**
 Länge: 2,7 kb
 Herkunft: Invitrogen

LacZ-Gen
 Lac-Promoter
 Ampicillin-Resistenzgen

	<u>SacI</u>		<u>SmaI</u>		<u>XbaI</u>		<u>PstI</u>		<u>HindIII</u>
<u>EcoRI</u>		<u>KpnI</u>		<u>BamHI</u>		<u>SalI</u>		<u>SphI</u>	
G AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGG CAT GCA AGC TT									
N S S S V P G D P L E S T C R H A S									

