

Charakterisierung einer Interaktion von monomerem Aktin mit Vinculin

**Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld

Vorgelegt von
Alexander Schäfer

Bielefeld, Januar 2012

Fakultät für Biologie
Abteilung für Biochemische Zellbiologie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Cytoskelett.....	3
2.2 Aktin	4
2.2.1 Monomeres Aktin	5
2.2.2 Aktin-Polymerisation.....	5
2.2.3 Aktinfilamente: Capping und Vernetzung zu F-Aktinbündeln	8
2.3 Vinculin	8
2.3.1 Molekulare Struktur des Vinculins	11
2.3.1.1 Der Vinculin-Kopf	12
2.3.1.2 Der Vinculin-Schwanz	12
2.3.1.3 Die Vinculin Linker-Region	13
2.3.2 Regulation der Aktivierung des Vinculins	13
2.3.2.1 Aktivierung des globulären Vinculins durch ein Protein	14
2.3.2.2 Aktivierung des globulären Vinculins durch mehrere Proteine	15
2.3.3 Vinculin und Zellkontakte	16
2.3.3.1 Vinculin in Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Matrix-Adhäsion	16
2.3.4 F-Aktin-Bündelung durch Vinculin.....	17
3 Problemstellung	18
4 Material und Methoden.....	19
4.1 Material und Geräte	19
4.1.1 Materialien.....	19
4.1.2 Reagenziensätze.....	19
4.1.3 Chromatographie-Säulen	19
4.1.4 Chemikalien.....	20
4.1.5 Protein-Molekularmassenstandards	20
4.1.6 DNA-Molekularmassenstandards.....	20
4.1.7 Puffer, Medien und andere Lösungen.....	20
4.1.8 Antibiotika	21
4.1.9 Enzyme	21
4.1.10 Bezugsquellen von Probenmaterial	21
4.1.10.1 Biologisches Material	21
4.1.10.2 Monomeres Aktin	21

4.1.10.3	Pyren-Aktin	22
4.1.10.4	Nativer Vinculin-Schwanz.....	22
4.1.10.5	Rekombinante Vinculin-Kopf-Konstrukte des Schweins	22
4.1.11	Antikörper.....	22
4.1.12	Bakterienstämme	23
4.1.13	Zelllinien.....	23
4.1.14	Vektoren	23
4.1.15	Oligonukleotide	24
4.1.16	Computersoftware.....	26
4.2	Molekularbiologische Methoden	26
4.2.1	Isolierung von mRNA aus Gewebe	26
4.2.1.1	RNA-Isolierung durch Fällung.....	26
4.2.1.2	Total RNA-Isolierung durch Affinitätssäulen	27
4.2.1.3	mRNA-Isolierung durch Affinitätssäulen	27
4.2.2	Reverse Transkription.....	27
4.2.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	28
4.2.4	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	30
4.2.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	31
4.2.5.1	Isolierung durch Glaswolle	31
4.2.5.2	Isolierung mit Kits.....	31
4.2.6	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	31
4.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
4.2.8	Herstellen chemisch-kompetenter XL1-Blue <i>E.coli</i> -Zellen	32
4.2.9	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien	32
4.2.10	Blau-Weiss Selektion.....	33
4.2.11	Isolierung von Plasmid-DNA	33
4.2.11.1	Plasmid-Isolierung.....	33
4.2.11.2	Plasmidpräparation über Ionenaustauscher-Säulen.....	34
4.2.12	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	34
4.2.13	Agarose-Gelelektrophorese	35
4.2.14	Anzucht und Lagerung von Bakterien.....	35
4.2.15	Bakterielle Proteinexpression	35
4.3	Zellbiologische Methoden	36
4.3.1	Kulturbedingungen	36
4.3.2	Nährmedien und Zellkultur.....	36

4.3.3	Auftauen und Einfrieren von Zellkulturen	37
4.3.4	Passagieren von adhärent wachsenden Zellen.....	37
4.3.5	Bestimmung der Zellzahl.....	37
4.3.6	Transfektion von NIH/3T3 Zellen.....	38
4.4	Proteinbiochemische Standardmethoden.....	38
4.4.1	Konzentrierung von Protein-Lösungen.....	38
4.4.2	Dialyse von Lösungen	38
4.4.3	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
4.4.3.1	Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	39
4.4.3.2	Vorbereitung von SDS-Proben	40
4.4.3.3	Elektrophorese	40
4.4.3.4	Trocknen eines Polyacrylamidgels	40
4.4.3.5	Proteintransfer	40
4.4.4	Immunblot mit AP-konjugierten Antikörpern.....	41
4.4.5	Bildung von F-Aktin Bündeln	42
4.4.6	Protein-Protein-Interaktion durch „Pulldown“	42
4.4.7	Cosedimentation mit F-Aktin	43
4.4.8	Chemische Quervernetzung „Cross-Link“	43
4.4.9	Nukleation von monomeren Aktin	44
4.4.9.1	Fluorometrie	45
4.4.9.2	Oswald Viskosimetrie	45
4.4.10	Oberflächenplasmonresonanz Effekte (BIAcore).....	46
4.4.10.1	Kopplung an einem CM5-Chip	46
4.4.10.2	Interaktionsmessungen.....	47
4.4.11	CD-Spektroskopie.....	47
4.4.12	Kopplung von NHS-Sepharose.....	48
4.4.13	Limitierende Proteolyse von Vinculin.....	48
4.4.13.1	Analytische Spaltung.....	48
4.4.13.2	Präparative Spaltung.....	49
4.4.14	Bakterien-Lyse.....	49
4.4.15	Präparative Methoden der Proteinreinigung.....	49
4.4.15.1	Präparation von nativem Vinculin.....	50
4.4.15.2	Präparation von nativen Vinculin-Kopf	52
4.4.15.3	Präparation von rekombinanten Vinculin-Konstrukten	52

4.4.15.4	Präparation von rekombinanten Vinculin-Konstrukten als GST-Fusionsproteine	52
4.4.15.5	Präparation von rekombinanten Vinculin-Konstrukten als His-Fusionsprotein	53
5	Ergebnisse.....	54
5.1	Herstellung von nativen und rekombinanten Vinculin.....	54
5.1.1	Präparation von nativen Vinculin und Spaltprodukte.....	54
5.1.1.1	Präparation von nativen Vinculin (Pute)	54
5.1.1.2	Präparation des nativen Vinculin-Kopfes (Pute)	56
5.1.2	Klonierung des Vinculins aus Huhn.....	57
5.1.3	Klonierung und Expression von Vinculin aus Pute.....	59
5.1.3.1	Identifizierung der Vinculin Puten cDNA Sequenz	59
5.1.3.2	Sequenzanalyse des Puten-Vinculins	60
5.1.3.3	Klonierung des Puten-Vinculins.....	61
5.1.3.4	Aufreinigung des rekombinanten Puten-Vinculins.....	61
5.1.4	Klonierung und Expression verschiedener Vinculin-Konstrukte	62
5.1.4.1	Vinculin-Kopf-Konstrukte unter Einbeziehung der Linker-Regionen	64
5.1.4.2	Konstrukte der Domäne 4 unter Einbeziehung der Linker-Region...	65
5.1.4.3	Konstrukte der Domäne D5 unter Einbeziehung der Linker-Region (Vinculin-Schwanz)	66
5.1.4.4	Vinculin-Modell-Konstrukte („geöffnetes“ Vinculin)	66
5.1.4.5	Aufreinigung des rekombinanten Vinculin-Kopfes mit Ni-NTA....	67
5.2	Vergleichende Charakterisierung des nativen und rekombinanten Vinculins	68
5.2.1	CD-Spektroskopie von Vinculinen.....	68
5.2.2	Der Effekt von Vinculin und Vinculin-Konstrukten auf die Aktinpolymerisation	70
5.3	Detaillierte Charakterisierung der Effekte verschiedener Vinculin-Konstrukte auf die Aktinpolymerisation	71
5.3.1	Qualitative Nukleationsaktivität der Vinculin-Konstrukten.....	72
5.3.1.1	Vinculin-Kopf-Konstrukte	72
5.3.1.2	Vinculin-Konstrukte der Domäne 4.....	74
5.3.1.3	Vinculin-Schwanz-Konstrukte.....	75
5.3.1.4	Vinculin-Modellkonstrukte.....	76
5.3.1.5	Übersicht über die Nukleationsaktivität der verschiedenen Konstrukte	76

5.3.2	Dosis-Abhängigkeit des Effektes von Vinculin-Konstrukten auf die Nukleation der Aktinpolymerisation	78
5.3.2.1	Qualitative Analyse der rekombinanten Vinculin-Kopf-Konstrukte	78
5.3.2.2	Quantitative Analyse des nativen Vinculin-Kopfes.....	81
5.3.2.3	Quantitative Analyse der Konstrukte der Domäne 4	82
5.3.2.4	Analyse der Vinculin-Schwanz-Konstrukte	83
5.3.2.5	Quantitative Analyse der Vinculin-Modellkonstrukte	83
5.3.2.6	Vergleich zwischen den Vinculin-Konstrukten	84
5.3.3	Aktinnukleation und die Vinculin-Kopf-Schwanz-Interaktion	86
5.4	Capping von F-Aktin durch die geöffneten Vinculin Modell-Konstrukte	87
5.5	Proteinwechselwirkung zwischen G-Aktin und den Vinculin-Konstrukten ..	89
5.5.1	Pulldown mit Vinculin-Kopf-Konstrukten	89
5.5.2	Pulldown mit Vinculin Domäne 4 Konstrukten	89
5.5.3	Zusammenfassung der Pulldown-Ergebnisse	91
5.5.4	Chemische-Quervernetzung mit NHS/EDC	92
5.6	G-Aktin Interaktionsstudien durch Biacore.....	94
5.6.1	Interaktionsmessungen von G-Aktin mit unterschiedlichen Vinculin-Konstrukten	94
5.6.2	Bestimmung der Bindekonstanten des Vinculin-Kopf-Konstruktes V_h^{1-857}	95
5.6.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	96
5.7	Proteinwechselwirkung zwischen F-Aktin und den Vinculin- Konstrukten durch Cosedimentation	96
5.8	F-Aktin-Bündelung durch die Domäne 5 des Vinculins	98
5.9	Zelllokalisierung von GPF-Vinculin Konstrukten.....	99
6	Diskussion.....	102
6.1	Herstellung der nativen und rekombinanten Proteine	102
6.2	Charakterisierung der Proteine	103
6.3	Lokalisationsstudien des Vinculins in Fibroblasten	103
6.4	Vinculin und die G-Aktin Interaktion.....	104
6.5	Aktinpolymerisation und die Basisaktivität.....	106
6.6	Aktinpolymerisation des Vinculin-Kopfes und der Einfluss des Vinculin-Schwanzes auf die Aktivität	107
6.7	Aktivitäten der Modellkonstrukte.....	107
6.8	Charakterisierung des Aktinpolymerisierenden Effektes der Konstrukte	108

6.9	Aktinpolymerisation und Interaktion des Vinculin-Schwanzes	110
6.10	Aktinnukleation und Interaktion des Vinculin-Kopfes.....	110
6.11	G-Aktin Bindestelle im Vinculin.....	112
6.12	Schlussfolgerung.....	115
7	Ausblick.....	116
8	Literaturverzeichnis	117
9	Anhang.....	138
9.1	Allgemeine Abkürzungen.....	138
9.2	Vergleich der Vinculinsequenz zwischen Huhn und Pute.....	141
9.2.1	Vergleich der Aminosäure Sequenz	141
9.2.2	Vergleich der DNA-Sequenz.....	142
9.2.3	Sequenz mit gekennzeichneten Domänen	144
9.3	Klonierungsschema von Tags.....	147
9.3.1	Klonierungsschema des gesamten Vinculins.....	147
9.3.2	Klonierungsschema des N-terminalen GST-Tags	147
9.3.3	Klonierungsschema des N-terminalen GFP-Tags	148
9.4	Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Vinculin.....	148
9.4.1	cDNA Huhn (<i>Gallus g. d.</i>) nach Genbank Nr.: NM_205441	148
9.4.2	cDNA Pute (<i>Meleagris g. d.</i>) nach Genbank Nr.: GQ327928.....	150

1 Zusammenfassung

Vinculin ist ein multiadhäsives Protein des Cytoskeletts und ein zentraler Bestandteil von Zell-Matrix-Verbindungen [Geiger, 1980; 1981]. Das Vinculin-Molekül besitzt eine typische Kopf-Schwanz-Struktur, wobei die beiden Bereiche über eine flexible Linker-Region miteinander verbunden sind. Die Tertiärstruktur besteht aus vier Kopfdomänen und einer Schwanzdomäne mit jeweils mehreren Bündeln von α -Helices als dominantem Strukturmerkmal. In seiner inaktiven Form liegt Vinculin in einer globulären, geschlossenen Konformation vor, in welcher die Schwanzdomäne auf den Kopf zurückgeklappt ist. Dadurch werden einige der Proteinbindungsstellen maskiert [Weekes et al., 1996; Bakolitsa et al., 2004; Cohen et al., 2005]. Die Aktivierung kann durch PIP₂ und Talin erfolgen, wobei Vinculin mit dem Kopf an Talin und mit dem Schwanz an ein Aktinfilament binden kann [Chen et al., 2006]. Es wurden zwei F-Aktin Bindestellen im Vinculin-Schwanz identifiziert [Menkel et al., 1994; Hüttelmeier et al., 1997]. Außerdem zeigt der Vinculin-Schwanz eine schwache Nukleationsaktivität für die Aktinpolymerisation [Wen et al., 2009].

Aktinfilamente haben eine strukturgebende Funktion in der Zelle und entstehen durch Polymerisation von Aktinmonomeren. Initialer Prozess der Aktinpolymerisation ist die Bildung eines trimeren-Komplexes als Nukleus. Weitere Anlagerungen von Monomeren führen zur einer Bildung filamentöser Polymere [Cooper et al., 1983]. Es wurde bereits gezeigt, dass der isolierte Vinculin-Kopf den Nukleationsprozess erheblich beschleunigt [Neumann, 2004]. Zur weitergehenden funktionellen und topologischen Charakterisierung dieser Vinculin-Aktivität wurden in dieser Arbeit verschiedene Konstrukte des Vinculin-Kopfes und -Schwanzes mit unterschiedlich langen Teilbereichen der prolinreichen Linker-Region hergestellt, exprimiert und im Hinblick auf die Interaktion mit monomerem und filamentösem Aktin untersucht. Für die Analyse der Interaktion wurden Methoden wie Viskosimetrie, Spektralfluorometrie, chemische Quervernetzung und Sedimentationsanalysen eingesetzt, die weitreichende Schlussfolgerungen ermöglichten. Vinculin-Kopf-Konstrukte, die die Domäne 4 mit unterschiedlich langen Linker-Regionen enthielten, zeigten eine charakteristische Interaktion mit monomerem Aktin, die zu einer verstärkten Nukleation führten. Eine Bindung an F-Aktin war nicht nachweisbar.

Diese Wechselwirkung konnte durch mehrere Methoden bestätigt werden und wurde mit einer Dissoziationskonstante von $5,3 \cdot 10^{-9}$ M bestimmt. Im Vergleich dazu zeigte der Vinculin-Schwanz (Domäne 5) eine ausgeprägte Interaktion mit F-Aktin, die sich auch in einer lichtmikroskopisch zu beobachtenden Bildung von Filamentbündeln äußerte, jedoch nur eine sehr geringe Bindung an monomeres Aktin. Für die Domänen 1-3 war keinerlei Aktinbindung nachweisbar. Das Konstrukt des gesamten Vinculins zeigte - genau wie das native Vinculin - eine sehr schwache Aktinbindung, als Folge der geschlossenen Konformation, die durch eine Bindung zwischen Domäne 1 und 5 erzeugt wird und die Aktinbindungsstellen offenbar maskiert. Konstrukte, bei denen die Domäne 1 deletiert war, hatten dagegen die Aktin-Bindungscharakteristika sowohl des Kopfes als auch des Schwanzes. Die in dieser Arbeit nachgewiesene G-Aktinbindungsstelle konnte im Vinculin-Kopf Bereich der Aminosäuren 719-875 lokalisiert werden. Ferner wurde geöffnetes Vinculin, als ein Aktin nukleationsförderndes Protein identifiziert. Durch die hier nachgewiesenen Nukleationseigenschaften des Vinculins in Bezug auf die Aktinpolymerisation kann dem Vinculin eine Funktion bei der Bildung neuer Aktinfilamente *in vivo* im Bereich, der an der Zell-Matrix-Adhäsion beteiligten Fokalkontakte, zugeordnet werden.

2 Einleitung

Die Gewebe tierischer Organismen werden durch Ansammlungen von Zellen gebildet, die durch Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte stabilisiert werden. Motile Zellen wie Leukozyten, interagieren bei der Zellmigration über sogenannte Fokalkontakte (engl. *focal contacts* oder *focal adhesion*) der extrazellulären Matrix. In der Abbildung 1 ist vereinfacht ein Fokalkontakt dargestellt. Diese Fokalkontakte interagieren mit einer Vielzahl von Cytoskelett-Proteinen. Das Protein Vinculin stellt eine dynamische Verbindung zwischen dem Aktin-Cytoskelett und der extrazellulären Matrix über die Membran-assoziierten Integrine her. Diese Verbindungen sind unabdingbar für die Zell-Adhäsion und Regulation der Motilität und Zellform [Balaban et al., 2001; Galbraith et al., 2002; Ridley et al., 2003].

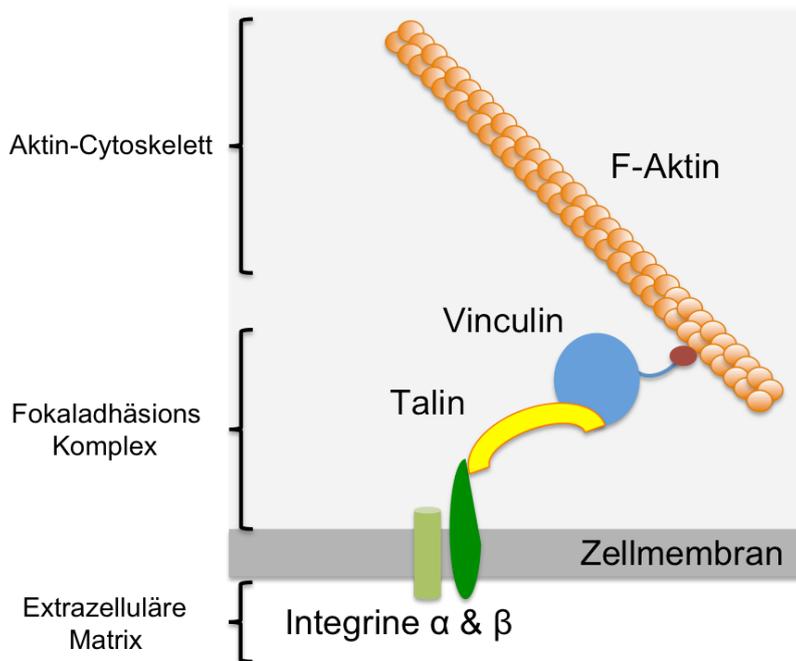


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Fokalkontaktes

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Fokalkontaktes zwischen dem Cytoskelett und der extrazellulären Matrix [modifiziert Mierke et al., 2009].

2.1 Cytoskelett

Das Cytoskelett, ein komplexes Netzwerk aus Proteinfasern (Filamenten) im Cytoplasma eukaryontischer Zellen, ist neben anderen Funktionen essentiell verantwortlich für die Strukturgebung, d.h. die mechanische Stabilisierung der Zelle und für die zelluläre Bewegung. Jedoch handelt es sich hierbei nicht um eine

festgelegte starre Struktur, sondern um die räumliche Anordnung vieler einzelner Filamente, die im Verlauf des Wachstums, der Bewegung, der Teilung und Differenzierung der Zelle stark variieren kann. Dieses komplexe Netzwerk setzt sich aus drei verschiedenen Filamenttypen zusammen. Zu diesen gehören die Mikrotubuli und Mikrofilamente, die neben der Strukturgebung auch an der Lokomotion von Zellen und an intrazellulären Transportvorgängen beteiligt sind, und die Intermediärfilamente, die einen strukturgebenden Charakter haben [Dustin, 1980]. Mikrofilamente sind fadenförmige Strukturproteine mit einem Durchmesser von nur 6-8nm, bei denen es sich um Polymere des Proteins Aktin handelt und die deshalb auch als Aktinfilamente bezeichnet werden [Schliwa, 1981].

2.2 Aktin

Aktin macht den Hauptbestandteil an Protein in fast allen eukaryotischen Zellen aus. Es bildet eine stark konservierte und multifunktionale Proteinfamilie, die eine große Rolle beim Aufbau des Cytoskeletts, bei der Zell-Lokomotion und bei der Kontraktion von Muskelzellen spielt [Zechel & Weber, 1978; Vandekerckhove & Weber, 1978].

Zum ersten Mal wurde Aktin aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens isoliert [Straub, 1942]. Die Existenz von Aktin in Nicht-Muskelzellen wurde zuerst bei den azellulären Schleimpilzen *Physarum polycephalum* nachgewiesen [Hatano & Oosawa, 1966a; 1966b; Jockusch et al., 1971; Nachmias & Ingram 1970]. In den verschiedenen Geweben werden unterschiedliche Isoformen von Aktin exprimiert [Herman, 1993; Rubenstein, 1990], wobei Sequenzen und Struktur der Aktine stark konserviert sind. Die Aktine zeigen eine sowohl übergreifende als auch spezifische zelluläre Funktionen [Vandekerckhove & Weber, 1978]. So können Aktin-Isoformen in zwei Gruppen unterteilt werden, muskuläre α -Aktine und cytoplasmatischen β - und γ -Aktine. Von dem muskulären α -Aktin sind drei Isoformen charakterisiert, das α -Aktin des Skelettmuskels, Herzmuskels und der Glattmuskulatur [Perrin & Ervasti, 2010; Wagner et al., 2002; Rubenstein, 1990].

Ein Knockout von α -Aktin des Skelettmuskels ist bei Mäusen wenige Tage nach der Geburt letal [Crawford et al., 2002]. Ein Knockout des Herzmuskel α -Aktins führt zu einer Desorganisation des Herzmuskels [Kumar et al., 1997]. Das letzte dieser Gruppe ist das α -Aktin der Glattmuskulatur. Hier führt ein Knockout zu einer eingeschränkten

Kontraktionsfähigkeit von Blutgefäßen [Schildmeyer et al., 2000]. Die cytoplasmatischen Isoformen, das β - und γ -Aktin, unterscheiden sich nur in vier Aminosäuren am N-terminalen Ende [Oda et al., 2009].

2.2.1 Monomeres Aktin

Das globuläre Aktinmonomer (G-Aktin) besitzt eine molekulare Masse von 42kDa und besteht aus 375 Aminosäuren (AS) in Muskelzellen und 374 AS in Nicht-Muskelzellen. Die Aminosäuresequenz aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens wurde 1973 aufgeklärt [Elzinga et al., 1973]. Das G-Aktin besteht aus zwei annähernd gleich großen Domänen, die sich weiterhin in jeweils zwei Subdomänen aufgliedern lassen, die aus α -Helix und β -Faltblatt Strukturen aufgebaut sind und eine Art Hufeisenform bilden. Dieses bildet die ATPase-Falte, wo ATP oder ADP gebunden wird [Kuhel et al., 1975; Kabsch et al., 1990; Kabsch & Vandekerckhove, 1992]. Des Weiteren sind in der ATPase-Falte Bindestellen für bivalente Ionen, wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} vorhanden. Die Struktur und die Funktion des monomeren Aktins wird durch diese Ionen beeinflusst [Carlier, 1991].

Eine Bindung dieser Ionen erfolgt sowohl durch Seitengruppen von Aminosäuren, als auch durch die Phosphatgruppen des ATPs, wodurch die Struktur des gesamten monomeren Aktins stabilisiert wird [Valentin-Ranc & Carlier, 1989]. Eine Interaktion mit mono- oder bivalenten Kationen aktiviert das Protein [Barden et al., 1983; Hegyi & Venyaminov, 1980]. Eine Aktin-Aktin-Wechselwirkung erfolgt über die Aktin Subdomänen 2 (AS 33-69) und 4 (AS 181-269), die mit einem weiteren Aktin über die Subdomäne 1 und 3 interagieren [Kabsch et al., 1990; Kabsch & Vandekerckhove, 1992].

2.2.2 Aktin-Polymerisation

Unter physiologischen Bedingungen liegt Aktin *in vitro* hauptsächlich als filamentöses Aktin (F-Aktin) vor [Korn, 1982; Pollard & Cooper, 1986]. Monomeres Aktin (G-Aktin) kann durch Zugabe von Ionen, wie Mg^{2+} oder K^+ , zu Filamenten (F-Aktin) polymerisiert werden. [Barden et al., 1983; Hegyi & Venyaminov, 1980; Oosawa et al., 1972]. Die F-Aktine werden aus ATP-G-Aktinen des Cytosol gebildet [Samstag et al., 2003; Aktionson et al., 2004]. Diese Aggregationsreaktion verläuft

über drei Phasen, Nukleationsphase, Elongationsphase und stationäre Phase (*steady state*). Durch Anlagerung von Ionen an G-Aktin in der Nukleationsphase erfährt das Aktin eine Konformationsänderung und aggregiert zu einem Aktin-Trimer-Komplex, der als Nukleationskeim dient [Pring et al., 2003; Otomo et al., 2005; Goode & Eck, 2007]. Die Affinität der Monomere füreinander ist sehr gering, so dass die Nukleation entsprechend langsam verläuft. Während der Filament-Verlängerung in der Elongationsphase, werden weitere G-Aktine an beiden Enden des entstehenden Filaments angelagert [Cooper et al., 1983; Frieden et al., 1983], bis ein Gleichgewichtszustand der stationären Phase zwischen Aufbau und Abbau des Filaments erreicht wird [Pollard & Cooper, 1986]. In dieser Phase findet nur noch ein Austausch von G-Aktin an den Filamentenden statt und es kommt zu keiner weiteren Verlängerung des Filaments. In vitro kann ein solches Aktinfilament im Gleichgewichtszustand eine Länge von 5-10 μm erreichen [Rickard & Sheterline, 1988, Milligan et al., 1990]. Dieses Filament besitzt zwei verschiedene Enden mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften, einen schnell wachsendes (+)-Ende (*barbed end*) und ein langsam wachsendes (-)-Ende (*pointed end*) [Welch & Mullins 2002; Huxley, 1963; Bremer & Aebi, 1992]. Die beiden Enden unterscheiden sich in der kritischen Konzentration an freiem G-Aktin, ab welcher ein Filamentaufbau stattfindet [Wegner, 1976]. Beim *pointed end* findet eine Polymerisation nur ab einer kritischen Konzentration von 0,7 μM statt. Somit liegt die Konzentration höher als beim *barbed end* mit 0,1 μM . Wenn die Konzentration an Monomeren unter 0,1 μM fällt, kommt es nicht zu einer Polymerisation. Bei Überschreitung der Konzentration von 0,7 μM findet an beiden Enden eine Filamentverlängerung statt [Amann & Pollard, 2000]. Nur wenn die Konzentration im Bereich zwischen den jeweiligen kritischen Konzentrationen liegt, entsteht ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau, zwischen dem *barbed end* und *pointed end* des Aktinfilaments [Pollard & Cooper, 1986]. Die Anlagerung eines G-Aktins erfolgt unter ATP-Hydrolyse am *barbed end*. Im Gegenzug wird die Konfiguration am *pointed end* destabilisiert, indem ein Aktin aus dem Filament unter Freisetzung eines anorganischen Phosphates (P_i) die Konfiguration dissoziiert [Pollard & Cooper, 1986; Carlier, 1989; Goode & Eck, 2007; Pollard et al., 2000].

Die Bildung eines Nukleus (Aktinnukleationskomplex) kann durch bestimmte Proteine des Cytoskeletts, wie Formin, den Arp2/3-Komplex und Spire ausgelöst werden, wie in Abbildung 2 schematisch gezeigt. Der Arp2/3-Komplex besteht aus sieben verschiedenen Untereinheiten und ist mit weiteren Nukleations-Aktivatoren verbunden [Welch & Mullins, 2002]. Der Arp2/3-Komplex bindet an ein bestehendes F-Aktin, wobei dieser in einem Winkel von 70° ein neues Aktinfilament bildet. Dabei ähneln die Untereinheiten Apr2 und Apr3 dem komplexen G-Aktin [Kreishman-Deitrick et al., 2005; Rodal et al., 2005]. Durch diese Gleichartigkeit interagiert ein G-Aktin, das mit Hilfe des Proteins WASp angelagert wird, mit diesem Komplex und eine Nukleation startet [Goley et al., 2004].

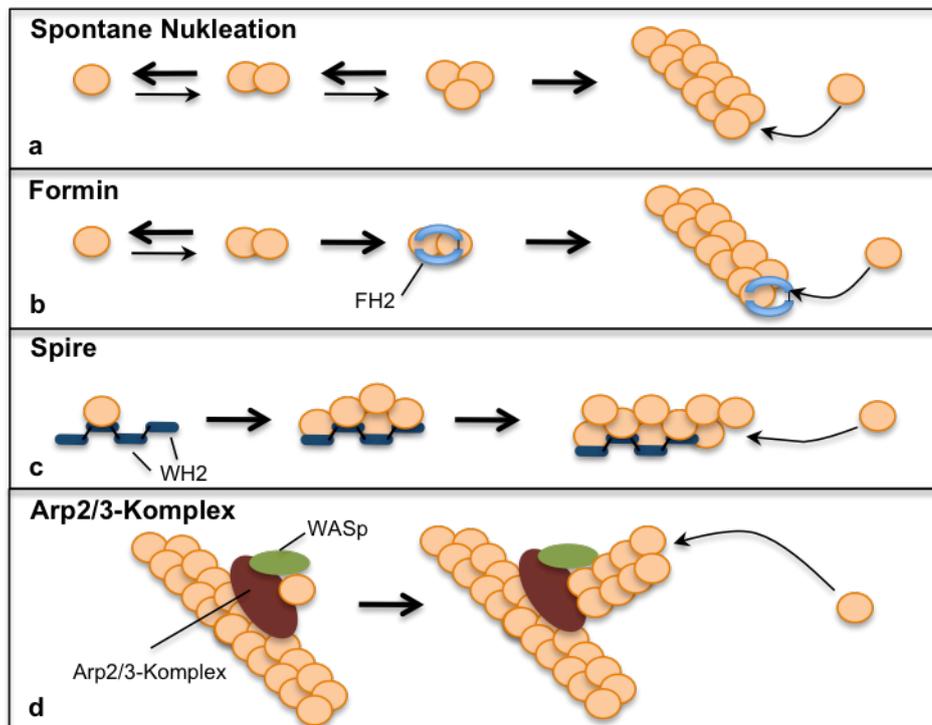


Abbildung 2: Bildung eines Aktin-Nukleationskomplexes (modifiziert nach Goode & Eck, 2007)

In der Abbildung ist schematisch der Aktin-Nukleationskomplex dargestellt. Im Abschnitt **a**) ist die spontane Nukleation des G-Aktins (braun), in **b**) wird die Aktinnukleation mit Formin, in **c**) die Bildung des Nukleationskomplexes mit Spire und in **d**) die Nukleation von G-Aktin durch den Arp2/3-Komplex gezeigt.

Das Formin nukleiert G-Aktine zu linearen F-Aktinen [Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002]. Formin besteht aus sieben Untereinheiten [Moseley & Goode, 2005], wobei die Untereinheit FH2 eine gleichartige Struktur wie G-Aktin aufweist und an dieses bindet [Goode & Eck, 2007; Lu et al., 2007]. Die FH2 Untereinheit stabilisiert den dimeren G-Aktin-Komplex und fördert so die Aktinnukleation [Pring et al., 2003;

Shimada et al., 2004; Xu et al., 2004]. Das Protein Spire stabilisiert die Bildung eines Nukleus auf einem anderen Weg, indem es gemeinsam mit vier WH2 Untereinheiten mit G-Aktin interagiert und diese zu einen vorläufigen Nukleations-Komplex aneinander reiht, woraus letztlich ein *pointed end* gebildet wird [Quinlan et al., 2005; Goode & Eck, 2007].

2.2.3 Aktinfilamente: Capping und Vernetzung zu F-Aktinbündeln

Die gebildeten F-Aktine können untereinander durch aktinbindende Proteine, wie Fimbrin [Bretscher et al., 1981], Formin [Esus et al., 2008], Filamin [Tseng et al., 2004], α -Aktinin [Xu et al., 2000], Villin [Khurana & George, 2008] und auch Vinculin [Shen et al., 2011], vernetzt werden, wodurch Aktinbündel entstehen.

F-Aktin kann durch sogenannte Capping-Proteine, wie beispielsweise Gelsolin oder CapZ, stabilisiert werden, wodurch die Motilität von Zellen reguliert wird [Weeds & Maciver, 1993; Hug et al., 1995]. Indem diese Capping-Proteine an das *barbed end* binden, können diese den Aufbau und Abbau des F-Aktins beeinflussen [Pantaloni et al., 2001; Wear & Cooper, 2004; Disanza et al., 2005]. Auch Vinculin konnte als ein Capping-Protein identifiziert werden [Clainche et al., 2010].

2.3 Vinculin

Ein Protein des Cytoskeletts, das besonders an der Verbindung zwischen Cytoskelett und extrazellulärer Matrix beteiligt ist, ist das multiadhäsive Vinculin. Es interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen und wurde 1980 von Geiger et al. als ein bedeutendes Verbindungselement zwischen Proteinen der Plasmamembran und dem Aktinfilament beschrieben [Geiger et al., 1980] und wurde im Cytoplasma [Geiger, 1982] als globuläres Protein nachgewiesen [Isenberg et al., 1982]. Vinculin wurde ein Jahr zuvor bei einer nativen Proteinpräparation aus dem Putenkaumagen als ein Nebenprodukt einer eigentlichen α -Actinin-Präparation isoliert [Geiger, 1979]. Bis heute konnte Vinculin in den unterschiedlichsten Zelltypen und Organismen nachgewiesen werden [Otto, 1990]. Es wurde sowohl in ungebundener Form im Cytoplasma gefunden [Burrige & Feramisco, 1980], als auch in der Adhärenz-Verbindung (engl.: *adherens junction*) zwischen Epithelzellen und Herzmuskelzellen nachgewiesen [Geiger et al., 1980].

Vinculin besteht aus 1066 Aminosäuren. Die relative molare Masse beträgt 117 kDa [Geiger et al., 1980]. Die erste Aminosäuresequenz des Vinculins wurde neun Jahre nach der Entdeckung aufgeklärt [Price et al., 1989]. Das Hühner-Vinculin hat einen isoelektrischen Punkt (P_i) von 6,0 [Coutu & Craig, 1988]. Das komplette Vinculin liegt im Cytosol als ein inaktives kompaktes globuläres Molekül vor, welches durch eine Kopf-Schwanz-Interaktion gebildet wird [Isenberg et al., 1982; Bakolitsa et al., 2004; Cohen et al., 2005].

Vinculin kommt in den verschiedensten Muskelgeweben vor. Hauptsächlich kommt Vinculin jedoch in der glatten Muskulatur vor, in Form der Membran-assoziierten „dense plaques“ [Small, 1985]. Des Weiteren wurde Vinculin in den Costameren der Skelettmuskulatur [Craig & Paro, 1983; Pardo et al., 1983a/b; Shear & Bloch, 1985; Belkin et al., 1988a/b; Danowski et al., 1992], im Sehnenansatz der Skelettmuskeln [Yorifuji & Hirokawa, 1989], sowie in Herzmuskelzellen nachgewiesen [Koteliansky & Gneushev, 1983]. Im Skelett- und Herzmuskel wird Vinculin an der transmembranen Verbindung der Muskelzelle lokalisiert und ist an den Costameren mit den Myofibrillen verbunden [Pierobon-Bormioli, 1981; Craig & Pardo, 1983; Pardo et al., 1983b; Shear & Bloch, 1985]. Des Weiteren ist Vinculin essentiell für die Entwicklung des Gehirns und des Herzens bei Mäusen [Xu et al., 1998]. Vinculin defiziente Mäuse zeigten eine Veranlagung unter Stress eine Kardiomyopathie zu entwickeln [Zemljic-Harpe et al., 2004]. Vinculin wurde auch in Lymphozyten [Marchision et al., 1988], sowie Trombozyten [Koteliansky et al., 1984], welche nicht in Geweben organisiert sind, nachgewiesen [Rosenfeld et al., 1985; Horvath et al., 1992]. Sogar in Nematoden konnten Vinculin-ähnliche Proteine im Hautmuskelschlauch nachgewiesen werden [Barstead & Waterston, 1989; 1991].

Vinculin hat auch einen Einfluss auf die Apoptosekaskade von Caspase-3, indem Paxillin über eine Interaktion mit Vinculin um FAK (engl.: *focal adhesion kinase*) konkurriert. Die Vinculin-defizienten F9-Zellen zeigen eine Apoptoseresistenz, welche über die Caspase-3 ausgelöst wird [DeMali et al., 2002; Goldmann & Ingber, 2002; Subauste et al., 2004].

Da Vinculin eine wichtige Bedeutung bei einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen aufweist, wie der Fokal-Adhäsion, Migration und Invasion, gibt es einen Zusammenhang zwischen der Tumorgenese und dem Fehlen von Vinculin [Sadano et

al., 1992; Lifschitz-Mercer et al., 1997; Meyer & Brinck, 1997; Kawahara et al., 1999; Somiari et al., 2003; Ziegler et al., 2006; Mierke et al., 2009; 2010]. So zeigen Vinculin defiziente Zellen eingeschränkte Fokal-Kontakte und ein schnelleres Zellwachstum [Rodriguez Fernandez et al., 1992a; 1992b; 1993].

Für das multiadaptive Vinculin wurden viele Bindungspartner beschrieben, wie F-Aktin [Hüttelmaier et al., 1997], Talin [Burrige & Mangeat, 1984], α -Actinin [Geiger, 1979; Drenckhahn & Franz, 1986], α -Catenin [Weiss et al., 1998], Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) [Johnson & Craig 1995], Vinexin [Kioka et al., 1999], VASP [Brindle et al., 1996], Ponsin [Mandai et al., 1999], Arp2/3-Komplex [DeMali et al., 2002], Raver-1 [Hüttelmaier et al., 2001], Proteinkinase C (PKC) [Tigges et al., 2003] und Paxillin [Wood et al., 1994; Critchley, 2000; Zamir & Geiger, 2001]. In der Abbildung 3 werden das Vinculin und dessen Interaktionspartner schematisch dargestellt. Als multiadhäsives Verbindungselement stellt Vinculin eine wichtige Komponente bei der Fokaladhäsion dar und ist neben Talin ein bedeutender Interaktionspartner [Geiger, 1979; Burrige & Feramisco, 1980; Burrige & Connel, 1983].

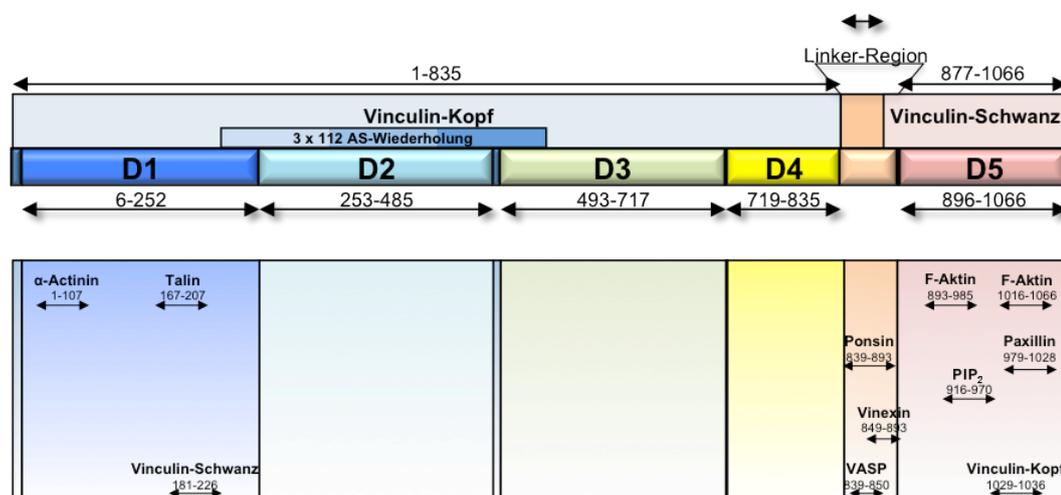


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Vinculin [modifiziert nach Zamir & Geiger, 2001]

In der Abbildung wird die schematische Darstellung des Vinculins gezeigt. In dieser Darstellung sind die Größen der einzelnen Domänen, sowie die Protein-Untereinheiten dargestellt [Bakolitsa et al., 2004]. Des Weiteren sind Interaktionspartner des Vinculins angegeben und die Bindebereiche werden gezeigt.

2.3.1 Molekulare Struktur des Vinculins

Die Struktur des Vinculins kann in eine Kopf-, Schwanz- und eine Linker-Region unterteilt werden, wie in der Abbildung 3 gezeigt. Vinculin besteht zu hohen Anteilen aus Bündeln von α -Helices [Bakolitsa et al., 2004]. Das globuläre Protein wird durch eine Kopf-Schwanz-Interaktion gebildet. Diese Vinculin-Kopf- und Vinculin-Schwanz-Bindung zeigen eine starke Bindung ($K_d < 10^{-9}$) [Bakolitsa et al., 2004; Cohen et al., 2005], so dass in vitro meist nur eine geschlossene Konformation vorliegt. Die Abbildung 4 zeigt die geschlossene Vinculin-Konformation. Der Vinculin-Kopf besitzt in der Domäne 1 eine Bindestelle (AS 181-226) für den Schwanz [Weekes et al., 1996]. Diese Bindestelle, die eine hydrophile Umgebung mit einem hydrophoben Mittelpunkt enthält, weist eine Dissoziationskonstante von 10^{-5} M auf [Borgon et al., 2004; Pagrigoriou et al., 2004]. Der interagierende Bereich des Vinculin-Schwanzes befindet sich am C-terminalen Ende der Domäne 5 auf einer α -Helix (AS 1029-1036) und bindet den Vinculin-Kopf über polare Wechselwirkungen [Bakolitsa et al., 2004].

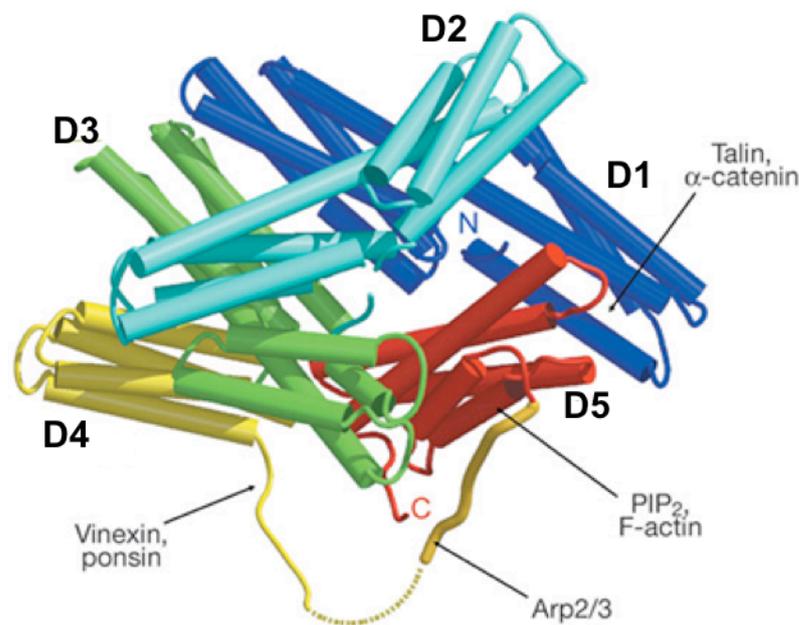


Abbildung 4: Struktur des Vinculins (Huhn) [modifiziert nach Bakolitsa et al., 2004]

In der Abbildung ist die Kristallstruktur des Vinculinmoleküls dargestellt. Die einzelnen Domänen sind farblich gekennzeichnet, die D1 (blau), D2 (hellblau), D3 (grün), D4 (gelb) und D5 (rot). Es wurden Bindungsstellen für Talin, PIP_2 und weitere Bindungspartner des Vinculins markiert.

2.3.1.1 Der Vinculin-Kopf

Der Kopf des Vinculins besteht aus den Domänen 1-4, umfasst 835 Aminosäuren und weist in einigen Regionen Homologien zu α -Catenin auf [Bakolitsa et al., 2004]. Eine Vielzahl von Proteinen des Cytoskeletts, wie beispielsweise Talin, bindet an den Vinculin-Kopf, wobei dieses nur bindet, wenn der Kopf bei einer Zell-Matrix-Adhäsion assoziiert ist [Burrige & Mangeat, 1984]. Eine Interaktion mit α -Catenin [Weiss et al., 1998] oder β -Catenin [Hazan et al., 1997] erfolgt, wenn der Vinculin-Kopf in einer Adherens-Junction gebunden ist [Geiger, 1979; Hazan et al., 1997; Watabe-Uchida et al., 1998]. Des Weiteren interagiert auch α -Actinin [Geiger, 1979; Drenckhahn & Franz, 1986] und IpaA [Nhieu et al., 1997] mit dem Vinculin-Kopf. Die Bindungsstellen für einige dieser Interaktionspartner sind in der Abbildung 3 angezeigt.

2.3.1.2 Der Vinculin-Schwanz

Der Vinculin-Schwanz besteht aus der Domäne 5 und umfasst 189 AS [Zamir & Geiger, 2001; Bakolitsa et al., 2004]. Die Vinculin-Schwanz Domäne besteht ebenfalls überwiegend aus α -Helices: fünf antiparallel orientierte α -Helices sind durch Schleifen von 3-8 Aminosäuren verbunden [Bakolitsa et al., 1999; Bakolitsa et al., 2004; Borgon et al., 2004]. Es wurden zwei Serine, S¹⁰³³ und S¹⁰⁴⁵, in der letzten α -Helix identifiziert. Diese können durch die Proteinkinase-C phosphoryliert werden [Schwienbacher et al., 1996; Weekes et al., 1996; Ziegler et al., 2002; 2006].

Für den Vinculin-Schwanz wurden mehrere Interaktionspartner beschrieben, wie beispielsweise Paxillin [Turner et al., 1990; Wood et al., 1994] und F-Aktin [Johnson & Craig 1995; Hüttelmaier et al., 1997]. Es wurden zwei F-Aktin-Bindestellen im Vinculin-Schwanz identifiziert. Diese liegen in den Aminosäure-Abschnitten 893-985 und 1016-1066 [Cohen et al., 2005, Gilmore & Burrige, 1996, Hüttelmaier et al., 1997; Menkel et al., 1994]. Des Weiteren interagieren Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) [Johnson & Craig, 1995], die Proteinekinase-C (PKC) [Weekes et al., 1996] und Raver-1 [Hüttelmaier et al., 2001] mit dem Vinculin-Schwanz (siehe Abbildung 3). Aktiviertes Vinculin, insbesondere der Vinculin-Schwanz, zeigt einen Capping-Effekt gegenüber dem *barbed end* des F-Aktins [Clainche et al., 2010].

2.3.1.3 Die Vinculin Linker-Region

Durch Röntgenstrukturanalyse des gesamten Vinculins vom Huhn wurde der Regionsbereich von AS 837-878 als eine prolinreiche Linker-Region beschrieben [Bakolitsa et al., 2004].

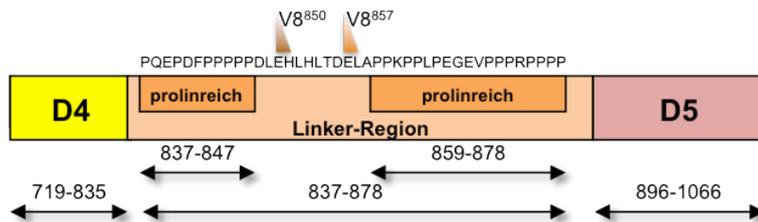


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Linker-Region [modifiziert nach Gimona et al., 1988; Coutu & Carig, 1988].

In der Abbildung wird schematisch die Linker-Region des Vinculins mit den prolinreichen Regionen und den Spaltstellen der Endoprotease Glu-C (V8-Protease) gezeigt. Die dargestellte Aminosäuresequenz stammt vom Huhn.

Als Interaktionspartner der prolinreichen Linker-Region wurde VASP (engl.: *vasodilator-stimulated phosphoprotein*) beschrieben [Brindle et al., 1996]. Dabei bindet VASP an das Sequenzmotiv FPPPP (AS 842-847) der Linker-Region [Brindle et al., 1996; Hüttelmaier et al., 1998; Reinhard et al., 1996]. Des Weiteren binden die Proteine Vinexin [Kioka et al., 1999] und Ponsin [Mandai et al., 1999] an dieses Sequenzmotiv. Der Arp2/3-Komplex [DeMali et al., 2002] wird durch das Sequenzmotiv PPPP (AS 875-878) an die prolinreiche Linker-Region rekrutiert. Des Weiteren bindet das Protein ArgBP2, ein Vertreter der Protein-Tyrosinkinasen, ebenfalls an die prolinreiche Linker-Region [Kawabe et al., 1999; Robinson & Turbedsky, 2001; Rodal et al., 2005].

2.3.2 Regulation der Aktivierung des Vinculins

Eine Vielzahl von Bindestellen, zum Beispiel für Talin, α -Actinin und F-Aktin, werden in der inaktiven Vinculin-Konformation durch die Kopf-Schwanz-Interaktion maskiert [Chen et al., 2006; Groesch & Otto, 1990; Gilmore & Burridge, 1996; Johnson & Craig, 1994; Kroemker et al., 1994; McGregor et al., 1994; Wood et al., 1994]. Die prolinreiche Linker-Region zwischen Vinculin-Kopf und Schwanz ermöglicht wahrscheinlich die Aktivierung des Vinculins, indem diese Region als ein flexibles Gelenk dient, wodurch der Vinculin-Schwanz vom Vinculin-Kopf abklappen kann [Miller et al., 2001]. Für die Aktivierung des Vinculins wurden unterschiedliche

Theorien postuliert, zum einen kann der Aktivierungsschritt über eine Protein-Interaktionen verlaufen oder zum anderen werden mehrere Interaktionspartner zur Aktivierung benötigt [Chen et al., 2006].

2.3.2.1 Aktivierung des globulären Vinculins durch ein Protein

Die Aktivierung durch nur eine Protein-Interaktion wurde modellhaft durch unterschiedlichste Kombination zwischen Vinculin-Kopf und -Schwanz Fragmenten, mit Proteinfragmenten des Talins (VBS1: AS 607-636, VBS2: AS 852-875, VBS3: AS 945-970) und des α -Actinins (α VBS: AS 731-760) dargestellt [Bois et al., 2005, 2006]. Die Fragmente des Talins (VBS1, VBS2 und VBS3) binden an das geschlossene inaktive Vinculin, kompetitiv zum Vinculin-Schwanz [Bois et al., 2005; 2006]. Die Bindungskonstante zwischen α VBS und Vinculin, sowie die Vinculin Kopf-Schwanz-Bindung zeigen die gleiche Größenordnung und ermöglichen so das Öffnen des geschlossenen Vinculins [Bois et al., 2005]. Diese konkurrierende Interaktion zwischen VBS und dem Vinculin-Kopf in Kombination mit dem Vinculin-Schwanz führt zur Dissoziation des Schwanzes und zur Öffnung des Vinculins [Izard & Vornrhein, 2004].

Vinculin kann auch durch IpaA, ein virulenter-Faktor des Bakteriums *Shigella flexneri*, aktiviert werden [Hamiaux et al., 2006; Nhieu et al., 1997]. Das Bakterium infiltriert Epitelzellen durch eine Vakuolenbildung [Parsot, 2005], die durch 25 Proteine induziert wird, wovon eines das IpaA ist [Menard et al., 1993; Nhieu et al., 1997; 2000; Nhieu & Sansonetti, 1999]. Bei der Bindung von IpaA an den N-Terminus des Vinculins kommt es zu einer Aktivierung von F-Aktin [Bourdet-Sicard et al., 1999]. Es wurde ein mögliches Vinculin-Bindemotiv in IpaA (AS 560-633) vorgeschlagen. Das IpaA enthält zwei VBS-Bindemotive am C-Terminus und bindet gleichzeitig an die Vinculin Domäne 1 (AS 1-250). Die Übereinstimmung des Bindemotivs zwischen dem virulenten Protein IpaA und den VBS-Regionen des Talins, sowie des α -Actinins zeigen, dass inaktives Vinculin durch eine Mimikry-Struktur des IpaAs aktiviert wird [Hamiaux et al., 2006; Park et al., 2011].

2.3.2.2 Aktivierung des globulären Vinculins durch mehrere Proteine

Eine Aktivierung des Vinculins durch Talin ist wegen der starken Interaktion zwischen Kopf und Schwanz mit einer K_d von $10^{-9}M$ nur bedingt möglich. Nur ein geringer Anteil des Vinculins bindet deshalb an Talin und bildet einen Komplex mit einer Affinität von $10^{-7}M$. Somit kommt es zu keiner signifikanten Aktivierung des Vinculins durch Talin allein. Wie in der Abbildung 6 gezeigt, wird der Vinculin-Talin-Komplex erst durch die Anwesenheit von F-Aktin aktiviert [Chen et al., 2006].

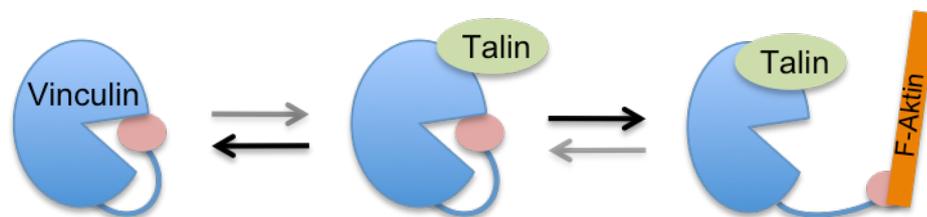


Abbildung 6: Schema der Aktivierung des globulären inaktiven Vinculins durch mehrere Interaktoren [modifiziert nach Chen et al., 2006]

In dieser Abbildung ist die Aktivierung des globalen inaktiven Vinculins durch zwei Proteine dargestellt.

Inaktives Vinculin kann durch PIP_2 aktiviert werden, das regulatorisch auf Vinculin wirkt [Gilmore & Burridge, 1996; Johnson & Craig, 1995; Weekes et al., 1996]. Es unterbindet die Wechselwirkung zwischen Vinculin-Kopf und Vinculin-Schwanz [Schwienbacher et al., 1996; Zhang et al., 2004]. Die geöffnete Konformation des Vinculins kann durch Phosphorylierung stabilisiert werden, indem die nun für die Proteinkinase-C zugänglichen Aminosäuren S^{1033} und S^{1045} phosphorylieren [Schwienbacher et al., 1996; Ziegler et al., 2002; Weekes et al., 1996]. PIP_2 selbst bindet im Bereich (AS 916-970), einer F-Aktin Bindestelle, wodurch die Interaktion mit F-Aktin inhibiert wird. Dabei kann Vinculin nur über eine zweite Bindestelle mit F-Aktin interagieren und vorübergehend geöffnet werden. In der offenen Konformation können nun weitere Proteine, wie Talin, mit Vinculin interagieren und den offenen Zustand stabilisieren [Bass et al., 2002; Gilmore et al., 1992, 1993; Miller et al., 2001; Jones et al., 1989]. Die Regulation des Vinculins durch PIP_2 wurde durch Mutanten (K952Q, K956Q, R963Q, K966Q, R1060Q, K1061Q) bestätigt, die PIP_2 nicht binden konnten [Chandrasekar et al., 2005].

2.3.3 Vinculin und Zellkontakte

Eine Adhäsionsverbindung, etwa bei der Zell-Matrix-Adhäsion, ist für die Organisation von Geweben hochgradig essentiell. Durch diese Adhäsionen interagiert die Zelle mit der extrazellulären Matrix, was für zelluläre Prozesse, wie Zellproliferation und Wundheilung, von entscheidender Bedeutung ist. Die Zell-Matrix-Adhäsion wird über ein transmembranes Adhäsionsprotein vermittelt und stellt einen Kontakt zwischen Zelle und extrazellulären Matrix her. Die Funktion des Vinculins in der Zell-Matrix-Adhäsion reguliert eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Zellproliferation, Zellmigration und Differenzierung [Rodriguez Fernandez et al., 1993; Xu et al., 1998; DeMali et al., 2002; Berrier & Yamada, 2007; Schwartz & DeSimone, 2008; Huveneers & Danen, 2009].

2.3.3.1 Vinculin in Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Matrix-Adhäsion

Bei der Modulation der Zell-Zell-Adhäsion oder Zell-Matrix-Adhäsion dient Vinculin als ein indirektes Kopplungsmolekül zwischen Cytoskelett und Intergrinen oder Cadherinen [Pokutta & Weis, 2002; Mierke, 2009]. Die Fokal-Adhäsion wird durch Bindung von Talin an die cytoplasmatische Domäne der Integrine α_{IIb} , $\beta 1$ und $\beta 3$ ermöglicht. Vinculin stellt das Bindeglied zwischen Cytoskelett und Fokal-Adhäsion dar, indem der Vinculin-Kopf an Talin bindet [Calderwood et al., 2002; Nayal et al., 2004]. Vinculin hat einen Einfluss auf die Regulierung des Turnovers der Fokal-Adhäsion. So reguliert die Vinculin-Talin-Interaktion die Ausbildung des Integrin-Komplexes. Nach derzeitiger Vorstellung bindet Talin bei der Ausbildung eines Fokal-Kontaktes an ein Integrin, und so entsteht zunächst eine schwache Fokal-Adhäsion. Das Vinculin wird durch Talin und F-Aktin aktiviert und rekrutiert, wodurch ein multimolekularer Integrin-Komplex entsteht. Die Fokal-Adhäsion wird durch Intergrin-Clustering des Vinculins verstärkt. Durch Interaktion zwischen PIP_2 und Vinculin wird die Fokal-Adhäsion reguliert, indem Vinculin vom F-Aktin des multimolekularen Integrin-Komplexes durch PIP_2 verdrängt wird. Die Ausbildung eines Fokalkontaktes kann durch PIP_2 mithilfe von Vinculin reguliert werden [Chandrasekar et al., 2005; Saunders et al., 2006]. Die Interaktionen von PIP_2 mit Vinculin wurden in einem vorangegangenen Abschnitt (2.3.2.2) beschrieben.

Die Zell-Zell-Adhäsion wird durch Calcium-abhängigen Cadherine ermöglicht. Dieses transmembrane Glykoprotein besteht aus einem extrazellulären, einem transmembranen und einem intrazellulären Bereich. Die Cadherine sind an den sogenannten *Adhärenz Junctions* assoziiert und bilden Zellkontakte zwischen Geweben aus [Geiger et al., 1985]. Im cytoplasmatischen Bereich dieser Cadherine sind verschiedene Ankerproteine gebunden, wie α -, β - und γ -Catenin, die wiederum mit dem Cytoskelett interagieren [Barth et al., 1997; Geiger & Ginsberg, 1991; Geiger et al., 1985; Cowin et al., 1986]. Für α -Catenin wurden Interaktionen mit Aktinfilamenten, sowie mit α -Actinin nachgewiesen [Rimm et al., 1995; Nieset et al., 1997]. Ein Aminosäuresequenzvergleich zwischen Vinculin und α -Catenin zeigt drei homologe Bereiche mit einer Sequenzübereinstimmung. Die Homologien im Vinculin liegen in den Bereichen AS 6-208, AS 582-796 und AS 905-1053 [Herrenknecht et al., 1991; Nagafuchi et al., 1991]. Des Weiteren wurden Interaktionen zwischen den beiden Proteinen nachgewiesen, so bindet der Vinculin-Kopf an den α -Catenin-Schwanz [Watabe-Uchida et al., 1998; Weiss et al., 1998]. Durch diese Interaktion ist das Vinculin indirekt auch an Zell-Zell-Adhäsionen beteiligt [Rüdiger, 1998].

2.3.4 F-Aktin-Bündelung durch Vinculin

Eine F-Aktin-Bündelung kann durch Polykationen, bivalente Metallionen und basische Polypeptide erfolgen [Tang & Janmey, 1998]. Das gesamte Vinculin interagiert mit F-Aktin und induziert Aktinbündel, indem das F-Aktin dreidimensional vernetzt wird [Jockusch & Isenberg, 1981].

Des Weiteren wurde beobachtet, dass geöffnetes Vinculin, vor allem aber der Vinculin-Schwanz, die Fähigkeit besitzt F-Aktin zu vernetzen und Aktinbündel zu bilden [Menkel et al., 1994; Hüttelmaier et al., 1997; Johnson et al., 2000; Janssen et al., 2006; Clainche et al., 2010; Shen et al., 2011]. Hier bindet F-Aktin an zwei unterschiedlichen Bindestellen des Vinculin-Schwanzes. Diese Bindung ermöglicht eine Vernetzung des F-Aktins [Johnson et al., 2000; Janssen et al., 2006; Shen et al., 2011]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Vinculin-Schwanz auch Aktinbündel aus G-Aktin erzeugt. Diese Aktinbündel bilden sich schließlich aus F-Aktinen, die durch Nukleation von G-Aktin entstehen [Wen et al., 2009].

3 Problemstellung

Eine Bindung von Aktin an den Vinculin-Kopf ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Aus den Ergebnissen der Arbeitsgruppe war aber bekannt, dass nativ aus Putenmagen gereinigtes Vinculin die Bildung von Oligomeren aus monomerem Aktin (G-Aktin) induziert und damit die Polymerisation des G-Aktins beschleunigt [Neumann, 2004]. Somit muss das Protein eine G-Aktin-Bindestelle besitzen. Zudem zeigt nur die offene Vinculin-Konformation eine Aktivität gegenüber Aktin. In der geschlossenen Konformation ist offenbar die Bindestelle maskiert, denn es findet keine Beschleunigung der Aktinpolymerisation statt.

Die proteolytische Spaltung des Vinculins in Kopf- und Schwanz zeigt, dass eine G-Aktin-Bindestelle im Vinculin-Kopf vorhanden sein muss, da nur die Kopfdomäne die Nukleation des G-Aktins fördert und damit die Polymerisation beschleunigt, während der isolierte Schwanzteil nur an bereits polymerisiertes Aktin bindet, nicht aber an G-Aktin [Neumann, 2004; Oberlack, 2009]. Eine Aktin-Bindestelle dieses Typs im Vinculin-Kopf war bisher unbekannt. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass der Vinculin-Kopf keine Bindung an Aktin zeigt. Der Vinculin-Schwanz zeigt einen inhibierenden Einfluss (Capping-Effekt) auf die Depolymerisation von Aktinfilamenten (F-Aktin). Diese Capping-Funktion stabilisiert das F-Aktin. Im Gegensatz dazu zeigt der Vinculin-Kopf keinen Capping-Effekt, sondern ausschließlich eine nukleationsfördernde Aktivität von G-Aktin [Neumann, 2004]. Die Region der Interaktion, nukleationsfördernder Effekt von G-Aktin, im Vinculin-Kopf ist noch nicht charakterisiert. In dieser Arbeit wurde diese Region der G-Aktin-Wechselwirkung und die Aspekte der schwachen Aktinpolymerisation durch Vinculin und eine Bindung von G-Aktin an Vinculin charakterisiert. Dazu wurden insbesondere Konstrukte des Vinculin-Kopfes, als auch des Vinculin-Schwanzes durch die Interaktion mit Aktin näher charakterisiert. Durch gezieltes Verkürzen des Vinculin-Kopfes wurden Konstrukte hergestellt, die eine Bindung zwischen G-Aktin und Vinculin, sowie eine Aktinpolymerisation zeigen. Durch diese Charakterisierung soll die Aktin-Wechselwirkung auf eine Region des Vinculinmoleküls eingeschränkt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Geräte

4.1.1 Materialien

Verbrauchsmaterialien für Pipettenspitzen, Zentrifugenröhrchen, Kulturröhrchen und Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Brand, Eppendorf, Nunc, Greiner, TPP, Apogent, Millipore, Roth bezogen.

4.1.2 Reagenziensätze

Produkte	Firma
Gel Extraktionskit	Macherey-Nagel, Qiagen®
Topo-Klonierung	Invitrogen
Präparationskit für Plasmid-DNA	Macherey-Nagel
Präparationskit für RNA	Macherey-Nagel
pGEM Easy	Operon
Transfektionskit Loranza	Loranza

4.1.3 Chromatographie-Säulen

Produkte	Firma
DEAE-Sepharose® CL-6B	Pharmacia-GE Healthcare
Mono Q™ HR5/5	Pharmacia-GE Healthcare
Mono S™ HR5/5	Pharmacia-GE Healthcare
Sephadex G-200	Pharmacia-GE Healthcare
Q-Sepharose	Pharmacia-GE Healthcare
Ni-NTA	Invitrogen, Roth
Ni-TED	Macherey-Nagel
Glutathion-Sepharose	Macherey-Nagel, Roth

4.1.4 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, AppliChem, Biomol, Fluka, Gerbu, Roche, Roth, Merck, Sigma, Fermentas und Stratagene bezogen.

4.1.5 Protein-Molekularmassenstandards

Als Molekularmassenstandards wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Markertypen verwendet. Es wurde ein Proteinmarker Roti[®]-Mark Standard (Roth) mit einem Größenbereich von 212 bis 14kDa, ein *low molekular weight* (LMW)-Marker (Sigma) von 66 bis 14kDa und ein Protein-Marker I (AppliChem) von 116 bis 14kDa, sowie ein laboreigener *high molekular weight* (HMW)-Marker mit einer Größe von 280 bis 29kDa verwendet.

4.1.6 DNA-Molekularmassenstandards

Als Molekularmassenstandard wurde der Generuler Ladder-Mix (MBI Fermentas) mit einem Molekularbereich von 10kbp bis 0,1kbp verwendet.

4.1.7 Puffer, Medien und andere Lösungen

Falls nicht anders angegeben, wurden die Puffer, Medien und Lösungen mit deionisiertem Wasser angesetzt. Die verwendeten Medien und Lösungen für die genetischen und Zellkultur-Arbeiten wurden für 20min bei 121°C autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Lagerung der angesetzten Lösungen erfolgte, wenn nichts anders angegeben, bei Raumtemperatur.

Puffer	Zusammensetzung
B-10 Puffer:	20mM Tris/HCl; 10mM NaCl; 0,3mM DTT; 0,5mM EDTA; 0,2mM PMSF; pH 7,5
BI-10 Puffer:	20mM Imidazol; 10mM NaCl; 0,3mM DTT; 0,5mM EDTA; 0,2mM PMSF; pH 7,5
5-G-Puffer:	1mM ATP; 5mM Tris/HCl; 0,2mM CaCl ₂ ; 2mM NaN ₃ ; 1mM β-ME
10x ABP-Puffer :	100mM KCl; 2mM MgCl ₂ ; 1mM PMSF; 1mM ATP; 10mM Imidazol; pH 7,5
PBS-Puffer	1,5mM KH ₂ PO ₄ ; 2,7mM KCl; 8,1mM Na ₂ HPO ₄ ; 137mM NaCl

4.1.8 Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Stammlösung	Arbeitslösung
Ampicillin	Amp	100mg/ml in H ₂ O	50-100 µg/ml
Chloramphenicol	Cm	50mg/ml in EtOH	50-100 µg/ml
Kanamycin	Kan	30mg/ml in H ₂ O	30µg/ml
Tetracyclin	Tet	12,5mg/ml in EtOH	12,5µg/ml

4.1.9 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, die T4-Ligase und die alkalische Phosphatase wurden von der Firma New England Biolabs bezogen. Die eingesetzte Revers Transkriptase (OmniScript) und die DNA-Polymerase (Taq-Master-Mix), sowie die DNA-Polymerase Pfu wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Sämtliche Enzyme wurden entsprechend den von den Herstellern angegebenen Vorschriften verwendet.

4.1.10 Bezugsquellen von Probenmaterial

Für die native Vinculin-Präparation und Proben für die RNA-Isolierung wurden Putenmägen verwendet, die aus der Geflügelschlachterei Reinhard Buschsieweke GmbH (Rietberg) bezogen wurden.

4.1.10.1 Biologisches Material

Die biologischen Materialien, Aktin und Pyren-Aktin, wurden durch die Arbeitsgruppe Biochemische Zellbiologie bereitgestellt und konnten für die Experimente als Substrat eingesetzt werden.

4.1.10.2 Monomeres Aktin

Monomeres Aktin wurde nach der Methode von Spudich und Watt modifiziert und aus acetontrocknetem Skelettmuskelpulver von Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) hergestellt [Spudich & Watt 1971]. Die weitere Aufreinigung erfolgte über eine Gelfiltration, wie von MacLean-Fletcher und Pollard beschrieben [MacLean-Fletcher & Pollard 1980].

Das aufgereinigte G-Aktin wurde in einem 5x G-Puffer bei 4°C gelagert und innerhalb von 2 Wochen verwendet oder mit 4mg/ml Saccharose lyophilisiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Das lyophilisierte Aktin wurde vor Gebrauch in 5xG-Puffer resuspendiert und gegen den selbigen Puffer über Nacht bei 4°C dialysiert.

4.1.10.3 Pyren-Aktin

Das Pyren-Aktin wurde nach Vorschrift von Kouyama und Mihashi hergestellt. Über eine Thiolgruppe des Cys³⁷⁴ wurde ein fluoreszierendes Reagenz N-(1-pyrenyl)Iodacetamid an das monomere Kaninchenskelettmuskel Aktin gekoppelt und mit 4mg/ml Saccharose lyophilisiert [Kouyama & Mihashi 1981]. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Das Pyren-Aktin wurde vor Gebrauch in 5x G-Puffer resuspendiert und gegen den selbigen Puffer über Nacht bei 4°C im Dunkeln dialysiert.

4.1.10.4 Nativer Vinculin-Schwanz

Der native Vinculin-Schwanz wurde durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Dieser wurde durch eine limitierende Spaltung des Vinculins erhalten und durch einen Anionenaustauscher vom Vinculin-Kopf getrennt.

4.1.10.5 Rekombinante Vinculin-Kopf-Konstrukte des Schweins

Die rekombinanten Vinculin-Kopf-Konstrukte des Schweins, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden selbst hergestellt und wie die nativen Vinculine aufgereinigt, da diese keinen Tag besaßen. Diese Konstrukte wurde in erster Linie für vorab Versuche verwendet.

4.1.11 Antikörper

Name	Spezies	Typ	Spezifität	Hersteller
hVin1	Maus	mk	Vinculin N-Terminus, human	Sigma
Ziege-anti-Maus AP	Ziege	pk	Maus IgG	Sigma

4.1.12 Bakterienstämme

Name	Eigenschaft	Hersteller
Für die Klonierung wurden folgende Bakterienstämme verwendet:		
TOP-10	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen™
DH5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Invitrogen™
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)].</i>	Promega
Für die Expression wurden folgende Bakterienstämme verwendet:		
BL21(DE) CodonPlus RIPL	<i>E. coli B F- ompT hsdS(r- m -) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU proL BB Camr] [argU ileY leuW Strep/Specr]</i>	Stratagen
BL21(DE)	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--TetS) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	Invitrogen™

4.1.13 Zelllinien

Name	Eigenschaft
NHI/3T3 Fibroblasten	Adhärent wachsende Zelllinie aus Maus-Fibroblasten
Fibroblasten	Adhärent wachsende embryonale Huhn-Fibroblasten

4.1.14 Vektoren

Name	Eigenschaft	Referenz
Klonierungsvektoren		
pCR®2.1-TOPO®	Amp ^R , Kan ^R ; lac-Promotor	Invitrogen™
pGEM®-T Easy Vector	Amp ^R , Kan ^R ; lac-Promotor	Promega

Name	Eigenschaft	Referenz
Prokaryotische Expressionsvektoren		
pET21a(+)	Amp ^R ; T7-Promotor	Novagen
pET100	Amp ^R ; T7-Promotor	Invitrogen TM
pGEX-4T(2)	Amp ^R ; Ptac-Promotor	GE Healthcare
Eukaryotische Expressionsvektoren		
pEGFP-C1	Kan ^R , Neo ^R ; CMV-Promotor	Clontech

4.1.15 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von den Herstellern Operon, metabion und eurofins MWG GmbH synthetisiert.

Sonstige Primer:

Name	Sequenz
β-Aktin-F	5`-ACC AAC TGG GAC GAC ATG GA-3`
β-Aktin-R	5`-GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC-3`
Oligo dT	5`-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3`
GST-F	5`-GGT GGT CAT ATG TCC CCT ATA-3`
GST-R	5`-GGT GGT GCT AGC ACG CGG AAC-3`
GFP-F	5`-TAC AAG TCC GGA ACT ATG ATG CCC GTC TTC CAC ACG CGC ACC-3`

Klonierung des Hühner-Vinculins:

Name	Sequenz
VHK5-F	5`-CAT ATG CCC GTC TTC CAC ACG C-3`
VHK5-R	5`-CAA GGA GCG AAG GAT ATC ATC-3`
VHKM-F	5`-GTG TCA CAA GGC CTG GAT TTG C-3`
VHKM-R	5`-GGA GGA GCA AGC TCA TCA GTC AG-3`
VHK3-F	5`-GCA GGA AAT ATC TCT GAT CCT GG-3`
VHK3-R	5`-GAG CTA CTG ATA CCA TGG GGT C-3`

Klonierung des Puten-Vinculins:

Name	Sequenz
XhoI-F	5`-CTC CTG ACC TCG AGC ATC TTC ATC-3
XhoI-R	5`-GAT GAA GAT GCT CGA GGT CAG GAG-3`
VP_1-F	5`-GGT GGT GCT AGC ATC GAA GGT CGT ATG CCC GTC TTC CAC ACG CGC-3`
VP_757-F	5`-TGG TGG GCT AGC TGG GAT GAA GAT GC-3`
VP_1467-F	5`-TGG TGG GCT AGC TTG GAG GGC AAG ATT-3`
VP_2155-F	5`-TGG TGG GCT AGC ACC AAG TCT CTG TTG-3`
VP_2221-F	5`-GAA TTC GCT AGC ATC GAA GGT CGT ATG GCC AAT ATG CAA CCT-3`
VP_2320-F	5`-GAA TTC GCT AGC ATC GAA GGT CGT TCA GAA GAC CCG AAA TTC-3`
VP_2506-F	5`-TGG TGG GCT AGC CAG CCT CAG GAA CCA-3`
VP_2561-F	5`-TGG TGG GCT AGC CAT CTT CAT CTG ACT GAT-3`
VP_2582-F	5`-TGG TGG GCT AGC CTT GCT CCT CCA AAA C-3`
VP_2686-F	5`-TGG TGG GCT AGC CAG CCT ATG ATG ATG-3`
VP_1455-R	5`-TGG TGG GAG CTC TAC CTA GTA TTT GCT AC-3`
VP_2151-R	5`-TGG TGG GAG CTC TAA TGG CTT CAT CCA C-3`
VP_2229-R	5`-TGG TGG GAG CTC TAA TTG GCC ATT GCA ACT TT-3`
VP_2328-R	5`-TGG TGG GAG CTC TAG TCT TCT GAA TTT TCA AC-3`
VP_2505-R	5`-TGG TGG GAG CTC TAG AAG GCT TCT CTG AC-3`
VP_2550-R	5`-TGG TGG GAG CTC TAC TCA AGG TCA GGA GG-3`
VP_2581-R	5`-TGG TGG GAG CTC TAC TCA TCA GTC AGA TG-3`
VP_2685-R	5`-TGG TGG GAG CTC TAA TTA ATA GCT TCT CC-3`
VP_3201-R	5`-TGG TGG GAG CTC TAC TGA TAC CAT GGG GTC-3`

4.1.16 Computersoftware

Programm	Hersteller
Adobe Reader	Adobe System Incorporated
BIAevaluation	GE Healthcare
BioEdit	Tom Hallllsis Pharmaceuticals
Mac OS 10.6.7	Appel
MS Office	Microsoft GmbH
MS-Dos 6.2	Microsoft GmbH
pDraw32 1.1.87	Acaclone Software
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research
Rasmol	National Science Foundation
Windows 3.11/95/98/2000	Microsoft GmbH
WinGene 2.31	Lars Henning, 2000
WinPep 3.01	Lars Henning, 2000

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolierung von mRNA aus Gewebe

Die Isolierung von RNA aus Gewebe der Glattnuskulatur wurde durch einen hohen Anteil an Proteinen und durch die Anwesenheit von RNasen erschwert, da es zu einem schnellen Abbau von RNA kommt.

4.2.1.1 RNA-Isolierung durch Fällung

Für die RNA-Isolierung wurden 100mg Gewebe in 1ml GTC-Lösung gegeben und im Ultraturrax für 60sec bei maximaler Drehzahl zerkleinert. Zu dem Homogenisat wurden 100µl einer 2M Natriumacetat-Lösung mit einem pH-Wert von 4,0 und 1ml mit Wasser gesättigtem Phenol, sowie 200µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) gegeben. Das Gemisch wurde 30sec lang geschüttelt, anschließend für 10min auf Eis inkubiert und für 20min bei 4°C mit 10.000rpm in einer Eppendorffzentrifuge

zentrifugiert. Die obere Phase wurde entnommen und mit dem gleichen Volumen kaltem Isopropanol (0°C) vermischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Darauf wurde das Gemisch für 15min bei 4°C mit 10.000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300µl GTC-Lösung resuspendiert und mit 300µl Propanol erneut über Nacht bei -20°C gefällt. Dieses Gemisch wurde wiederum für 15min bei 4°C mit 10.000rpm zentrifugiert und das Sediment zweimal mit 500µl und 0°C kaltem 75% Ethanol gewaschen. Das gewaschene Sediment wurde für 15min getrocknet und in 100µl DEPC-Wasser aufgenommen. Mit der gewonnenen RNA wurde weitergearbeitet oder diese wurde bei -80°C gelagert.

GTC-Lösung: 4M GTC; 1% N-Lauroylsarcosine; 25mM Na-Acetat pH7,0; 1mM Na-EDTA; 1M β-Mercaptoethanol

4.2.1.2 Total RNA-Isolierung durch Affinitätssäulen

Es wurden 50mg Gewebe für die RNA-Isolierung verwendet und mit dem RNA-Kit des Herstellers Macherey-Nagel gemäß deren Herstellerangaben verwendet. Die gewonnene RNA wurde weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

4.2.1.3 mRNA-Isolierung durch Affinitätssäulen

Die mRNA-Isolierung und Konzentrierung erfolgte mit einem mRNA-Kit des Herstellers Macherey-Nagel und wurde gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Aufreinigung erfolgte über oligo-dT beads, an die die mRNAs über den polyA-Schwanz gebunden und somit aus der Total-RNA isoliert wurden.

4.2.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde im Jahr 1970 beschrieben und bezeichnet das Umschreiben von Information von RNA in DNA [Baltimore, 1970].

Die cDNA-Synthese (engl.: *complementary DNA*) wurde unter Anwendung des Kits OmniScript Reserve-Transkription des Herstellers MWG durchgeführt. Dazu wurden 2µg mRNA mit 2µl eines 10uM oligo-dT Primers geprimt, indem die Mischung für 10min auf 70°C erwärmt und anschließend in Eiswasser abgekühlt wurde. Für die eigentliche reverse Transkription wurde die Probe mit 0,2mM dNTP-Mix und 4 Units der RT-OmniScript in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem für 60min bei 37°C inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR (engl.: *Polymerase Chain Reaction*) ist ein in vitro Verfahren zur gezielten Anreicherung von Nukleinsäuren einer definierten Länge, sowie einer bestimmten Sequenz. Das Verfahren wird ebenfalls für die Modifikationen von Nukleinsäuren verwendet. Die eigentliche Amplifikation der PCR benötigt zwei Oligonukleotide (engl.: *primer*), die zu der Zielsequenz komplementär sind. Das Verfahren wurde 1983 durch Kary Mullis entwickelt. Ein PCR Zyklus besteht aus drei Schritten der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, die Anlagerung (eng. *Annealing*) der Oligonukleotide und die Zweitstrangsynthese durch die DNA-Polymerase wird als *Elongation* beschrieben [Bartlett & Stirling, 2003].

Für die Amplifikation der Konstrukte wurden eine Mischung von Taq-Polymerase mit einem Zusatz Pfu-Polymerase verwendet. Die Taq-Polymerase wurde von dem Hersteller Qiagen als einen fertigen Master-Mix namens Taq-Master-Mix bezogen und die Pfu-Polymerase stammt von der Firma Invitrogen. Für die Amplifikation von langen PCR Produkten wurde eine Elongationstemperatur von 68°C, laut des Herstellers, verwendet.

Die PCR wird im Umfang dieser Arbeit für die Herstellung der Vinculin-Konstrukte verwendet. Des Weiteren wurde die PCR für die Kolonie-PCR Analysen angewandt.

Der Temperaturbereich zur Anlagerung eines Primers an die komplementär-DNA ist abhängig von der Basenzusammensetzung und der Länge dieses Primers. Die optimale *Annealing*temperatur sollte 5°C unterhalb des *TM*-Wert (engl. *temperature meltingpoint*) liegen, wie in der Formel 1 beschrieben.

$$T_M = (A+T) 2^{\circ}\text{C} + (G+C) 4^{\circ}\text{C}$$

Formel 1: Schmelzpunkt Ermittlung des Primers

Konstrukte	Primerpaar	Temperatur-Zeit-Profil
HK_5	VHK5-F – VHK5-R	30s 94°C; 60s 54°C; 180s 68°C 30x
HK_M	VHKM-F – VHKM-R	30s 94°C; 60s 55°C; 180s 68°C 30x
HK_3	VHK3-F – VHK3-R	30s 94°C; 60s 54°C; 180s 68°C 30x
PK_5	VHK5-F – VHK5-R	30s 94°C; 160s 53°C; 180s 68°C 30x

Konstrukte	Primerpaar	Temperatur-Zeit-Profil
PK_M	VHKM-F – VHKM-R	30s 94°C; 180s 55°C; 180s 68°C 30x
PK_3	VHK3-F – VHK3-R	30s 94°C; 260s 53°C; 180s 68°C 30x
GST-Tag	GST-F – GST-R	30s 94°C; 60s 55°C; 120s 68°C 30x
Konstrukte	vgl. Tabelle 2	30s 94°C; 60s 55°C; 120-240s 68°C 30x
GFP-Markierung	GFP-F – 3201-R	30s 94°C; 60s 55°C; 240s 68°C 30x

Tabelle 1: PCR-Bedingungen der Vinculin-Fragmente

In der Tabelle sind die jeweiligen Primer Kombinationen für die Amplifikate und Konstrukte gelistet. Des Weiteren sind die Temperatur-Zeit-Profile, sowie die Zyklenanzahl des PCR-Programms aufgeführt.

Konstrukt	Primerpaar	Konstrukt	Primerpaar
D1-D5 (1-1066)	VP_1-F - VP_3201-R	D4 ⁷¹⁹⁻⁸⁵⁷	VP_2155 - VP_2581-R
D2-D5 (253-1066)	VP_757-F - VP_3201-R	D4 ⁷¹⁹⁻⁸⁵⁰	VP_2155 - VP_2550-R
D3-D5 (493-1066)	VP_1467-F - VP_3201-R	D4 ⁷¹⁹⁻⁸³⁵	VP_2155 - VP_2505-R
Vh ¹⁻⁸⁹⁵	VP_1-F - VP_2685-R	D4 ^{G719-776}	VP_2155 - VP_2328-R
Vh ¹⁻⁸⁵⁷	VP_1 F - VP_2581-R	D4 ^{G719-743}	VP_2155 - VP_2229-R
Vh ¹⁻⁸⁵⁰	VP_1-F - VP_2550-R	D4 ^{G741-857}	VP_2221-F - VP_2581-R
Vh ¹⁻⁸³⁵	VP_1-F - VP_2505-R	D4 ^{G774-857}	VP_2320-F - VP_2581-R
Vh ¹⁻⁷⁷⁶	VP_1-F - VP_2328-R	Vt ⁸³⁶⁻¹⁰⁶⁶	VP_2506-F - VP_3201-R
Vh ¹⁻⁷¹⁷	VP_1-F - VP_2151-R	Vt ⁸⁵¹⁻¹⁰⁶⁶	VP_2561-F - VP_3201-R
Vh ²⁵³⁻⁸⁵⁷	VP_757-F - VP_2581-R	Vt ⁸⁵⁸⁻¹⁰⁶⁶	VP_2582-F - VP_3201-R
Vh ⁴⁹³⁻⁸⁵⁷	VP_1467-F - VP_2581-R	Vt ⁸⁹⁶⁻¹⁰⁶⁶	VP_2686-F - VP_3201-R

Tabelle 2: PCR-Bedingungen der Konstrukte

In der Tabelle sind die jeweiligen Primer-Kombinationen der Konstrukte gelistet. Alle Konstrukte wurden nach dem PCR-Reaktionsansatz zwei (siehe Tabelle 3) und einem PCR-Programm „Konstrukte“ (siehe Tabelle 1) amplifiziert.

Je nach Anwendungen wurden unterschiedliche Volumina zwischen 25 bis 50µl verwendet. Für die Amplifikation der Konstrukte, sowie für die analytische PCR wurden unterschiedliche PCR-Reaktionsansätze verwendet, die in der Tabelle 3 gelistet sind. Die Primer-Kombinationen und das entsprechende PCR-Programm sind

für die jeweiligen Vinculin-Fragmente in Tabelle 1 und die Primer-Kombination der Konstrukte sind in der Tabelle 2 gelistet.

Nr.	Amplifikation	PCR-Reaktionsansatz
1	Vinculin-Fragmente:	12,5 µl Taq-Mastermix 1µl Pfu 5 µl Q-Solution 2µl 20pmol Primer-Paar (vgl. Tabelle 1) 100pg bis 10ng cDNA add 25µl MPW
2	Deletionsmutanten und Konstrukte:	12,5 µl Taq-Mastermix 1µl Pfu 2µl 20pmol Primer-Paar (vgl. Tabelle 2) 100pg bis 10ng cDNA add 25µl MPW
3	Analytische-PCR:	6,25 µl Taq-Mastermix 1µl 20pmol Primer-Paar 100pg bis 10ng cDNA add 12,5 µl MPW

Tabelle 3: PCR-Reaktionsansätze

In der Tabelle sind verschiedene PCR Reaktionsansätze gelistet.

Bei allen durchgeführten PCRs wurde ein einmaliger Denaturierungsschritt für 1min bei 94°C, bei der analytischen PCR für 4min bei 94°C durchgeführt, bevor der eigentliche PCR Zyklus startet. Im Anschluss des letzten Zyklus wurden alle PCRs für 10min bei der Elongationstemperatur von 68°C inkubiert und bis zur Entnahme der Probe auf 10°C gekühlt. Das fertige Amplifikat kann in einem Agarosegel analysiert werden (4.2.13) oder es kann direkt mit diesem weitergearbeitet werden.

4.2.4 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Es wurden 250ng bis 1µg Plasmid-DNA oder Amplifikate mit 2-3U einer Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 20µl für 120min inkubiert. Die Pufferbedingungen sowie die Inkubationstemperatur der Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt.

4.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Plasmid-DNA oder PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt, und konnten durch Zugabe von Ethidiumbromid unter einem UV-Illuminator sichtbar gemacht werden, die dann mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel isoliert und gereinigt wurden.

4.2.5.1 Isolierung durch Glaswolle

Die isolierte DNA-Bande wurde durch gepresste Glaswolle mit 2.000xg zentrifugiert und die Flüssigkeit separiert. Mit der isolierten DNA, konnte sofort weitergearbeitet oder bei -20°C gelagert werden.

4.2.5.2 Isolierung mit Kits

Die DNA-Bande wurde mit Hilfe eines Gel-Extraktions-Kits der Firma Macherey & Nagel nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Isolierung der DNA erfolgte bei dem Gel-Extraktions-Kit durch eine Ionenaustauschersäule.

4.2.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Durch das dephosphorylieren von linearisierter Vektor-DNA wurde eine Religation vermieden. Eine alkalische Phosphatase spaltet den Phosphatrest vom 5`-Ende der DNA ab. Für eine Ligation durch T4-Ligase reichen die vorhandenen Phosphatreste des Inserts aus. Der entstehende Einzelstrangbruch wird durch das Reparatursystem der Bakterien wiederhergestellt.

Die Reaktion wurde mit 1U alkalischer Phosphatase für 45min bei 37°C inkubiert und anschließend wird das Enzym Hitze inaktiviert für 15min bei 65°C.

4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurde eine T4-Ligase und ein Puffersystem des Hersteller NEB verwendet. Die Ligation von DNA-Fragmenten und linearisierten Vektoren erfolgte über Nacht bei 16°C unter der Verwendung von 1U T4 DNA Ligase in 20µl Ansätzen.

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 5 \cdot \frac{\text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \cdot \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]}$$

Formel 2: Berechnung der molaren Verhältnisse bei der Ligation

Für eine Ligation wurden 10 bis 15ng Vektor-DNA verwendet und das zu ligierende DNA-Fragment in 5fachen molaren Überschuss eingesetzt. Mit Hilfe der Formel 2 kann die einzusetzende Menge an Fragment-DNA berechnet werden.

4.2.8 Herstellen chemisch-kompetenter XL1-Blue *E.coli*-Zellen

Für die Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien wurden 500ml LB-Medium, sowie das entsprechende Antibiotikum mit 5ml einer frisch gewachsenen Übernachtskultur angeimpft und diese bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 schüttelnd inkubiert. Die Bakterienlösung wurde für 15min auf Eis gekühlt. Die vorgekühlte Bakterienlösung wurde mit 2.000xg bei 4°C für 10min pelletiert und das Pellet wurde in 50ml einer gekühlten Tfb1-Lösung gewaschen und erneut mit 2000xg zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10ml gekühlter Tfb2-Lösung resuspendiert, zu 50µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die chemisch-kompetenten Bakterien konnten gleich verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

Tfb1-Puffer: 30 mM Kaliumchlorid; 100 mM Rubidiumchlorid; 10 mM Calciumchlorid; 50 mM Magnesiumchlorid; pH 5,8

Tfb2-Puffer: 10 mM MOPS; 75 mM Calciumchlorid; 10 mM Rubidiumchlorid; 15 % Glycerin; pH 6,5

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

4.2.9 Transformation chemisch kompetenter *E.coli*-Bakterien

Die Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien erfolgte durch einen Hitzeschock. Dazu wurden 50µl der kompetenten Bakterien-Lösung auf Eis aufgetaut und mit Vektor-DNA für 30min auf Eis inkubiert. Darauf erfolgte der Hitzeschock, dazu wurde der Ansatz für 2min bei 42°C und anschließend sofort für 2min wieder auf Eis inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden in 1ml LB-Medium für 60min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert und der Überstand auf 150µl reduziert. Die resuspendierten Bakterien wurden nun auf ein Selektionsmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.10 Blau-Weiss Selektion

Die Blau-Weiss Selektion wird durch das LacZa-Gen ermöglicht. Für die Verwendung dieser Selektionsmethode benötigen die Bakterien den Genotyp *lacZAM15*. Beide Genprodukte allein haben keine β -Galactosidase Aktivität, nur in der Kombination beider Gene. Durch das LacZa-Gen des Vektors wird die β -Galactosidase exprimiert. Diese spaltet X-Gal zu Galactose und 5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindole, der Blaufarbstoff entsteht letztlich durch eine oxidative Dimerisation des Spaltproduktes 5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindole zu 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-indigo. Wird ein Insert in die Vektoren TOPO oder pGEM eingefügt, so wird das LacZa-Gen unterbrochen und X-Gal kann nicht mehr durch die β -Galactosidase gespalten werden, somit bleiben die transformierten Bakterien-Kolonien weiß. Diese Methode ermöglicht eine schnelle Selektion der Bakterien-Kolonien von transformierten Bakterien.

Für die Anwendung wurde eine LB-Agarplatte, mit entsprechenden Selektionsmedium, 50 μ g Ampicillin oder 50 μ g Kanamycin, mit 40 μ l einer 40mg/ml X-Gal-Lösung, sowie mit 40 μ l einer 1M IPTG-Lösung bestrichen. Die transformierten Bakterien wurden nach dem Trocken der LB-Agarplatten aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.11 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA ist für die Klonierung, sowie die Sequenzierung von Vektoren oder die Gewinnung von DNA eine wichtige präparative Methode.

4.2.11.1 Plasmid-Isolierung

Für die Plasmid-Isolierung wurden 1,5ml einer Übernachtskultur für 2min bei 13.000rpm in einer Eppendorffzentrifuge pelletiert, der Überstand abgesaugt und das Bakterienpellet in 200 μ l TELT-Puffer, sowie in 20 μ l Lysozymlösung resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden für 10min auf einem Schüttelblock belassen. Das Gemisch wurde für 3min auf 95°C erhitzt und sofort für 5min auf Eis gelagert und für 15min bei 4°C mit 13.000rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde aus der Lösung entfernt und die Plasmid-DNA mit 100 μ l Isopropanol für 5min gefällt. Die Lösung wurde für 15min bei 4°C mit 13.000rpm zentrifugiert, das Pellet mit

200µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5min mit 13.000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30µl TE-Puffer aufgenommen.

TELT-Puffer: 50mM Tris/HCl pH7,5; 62,5mM EDTA; 2,5mM Litiumchlorid; 0,4% Triton-X-100

TE-Puffer: 10mM Tris/HCl pH7,5; 0,1mM EDTA

4.2.11.2 Plasmidpräparation über Ionenaustauscher-Säulen

Für die Präparation von reiner Plasmid-DNA wurden Kits der Hersteller Macerey & Nagel und QiagenTM verwendet. Für Sequenzierungen wurde die Plasmid-DNA immer mit Hilfe eines Mini-Prep-Kits isoliert. Für eukaryotische Transfektionen wurden größere Mengen an Plasmid-DNA über ein Maxi-Präparations-Kit aufgereinigt.

4.2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt bei einer Wellenlänge von 260nm. Bei einer OD_{260} von 1 und einer Küvettentiefe von 1cm entspricht die Konzentration von doppelsträngiger DNA 50ug/ml oder einer Konzentration von 40ug/ml RNA. Die Reinheit wird durch den Quotienten zwischen der OD_{260}/OD_{280} bestimmt, das entspricht einem Wertebereich von 1,8 bis 2 einer proteinfreien Lösung.

4.2.13 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA Fragmente nach Ihrer Größe zu trennen, wurden die DNA-Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und durch ein elektrisches Feld getrennt. Dazu wurden je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente eine Agarosekonzentration zwischen 0,8% bis zu 2% (w/v) gewählt, um eine geeignete Auftrennung zu erreichen.

Für die Herstellung eines Agarosegels wird die benötigte Menge an Agarose in TAE-Puffer aufgekocht. Die abgekühlte aber noch flüssige Lösung wird mit 0,5% (v/v) Ethidiumbromidlösung versetzt und das Agarosegel gegossen. Zum Auftragen der DNA-Proben werden diese mit einem 6x DNA-Probenpuffer versetzt und elektrisch in einem Agarosegel bei einer Spannung von 5V pro cm Elektrodenabstand getrennt.

TAE-Puffer: 40 mM Tris; 1% Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8,0

6x DNA-Probenpuffer: 0,025%(w/v) Bromphenolblau; 0,25%(w/v) Xylencyanol;
40%(w/v) Saccharose

4.2.14 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Alle *E.coli*. Bakterienstämme werden in einem Schüttelinkubator bei 37°C angezüchtet. Je nach Anzugsbedingung der Bakterien werden diese unter Selektionsdruck mit dem entsprechenden Antibiotikum gehalten.

Für eine Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurde die Bakterienlösung mit 1/3 Glycerin des Volumens versehen, gemischt und in flüssigen Stickstoff gefroren. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgte bei -80°C.

4.2.15 Bakterielle Proteinexpression

Für die bakterielle Proteinexpression wurde der *E.coli* Stamm BL21 verwendet, der zuvor mit dem gewünschten Konstrukt transformiert wurde. Der *E.coli* Stamm BL21 enthält eine T7-Polymerase, die über IPTG induziert wird. Da die T7-Polymerase einen speziellen T7-Promotor benötigt um DNA abzulesen, weist dieses Expressionssystem geringe Hintergrundexpression auf und eignet sich gut für eine Überexpression eines Proteins.

Bei den BL21-Stamm gibt es Unterschiede in den Genotypen, wie zusätzliche eukaryotische tRNA-Codons bei dem BL21(DE) CodonPlus RIPL Stamm. Mit diesem BL21(DE) Stamm können Proteine, die einen eukaryotischen Ursprung haben, eine

größere Ausbeute erzielen, da es nahezu zu keinem Proteinbiosyntheseabbruch kommt. Für die Proteinexpression wurde jeweils eine Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher in 5ml LB-Medium mit doppelter Amp/Cm Konzentration überführt und über Nacht bei 37°C und 200rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur zu 250ml auf 37°C vortemperierten Expressionsmedium gegeben, die bei 37°C und 200rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 inkubiert wird. Nun erfolgte die Induktion mit IPTG, worauf die Proteinexpression einsetzte und noch 3h bei 37°C und 200rpm inkubiert wurde. Danach wurden die Bakterien bei 4000xg pelletiert und auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

LB-Medium: 1L Medium enthalten: 10g Natriumchlorid; 5g Hefeextrakt; 10g Trypton; pH7

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Reinraumwerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37°C, mit einer Atmosphäre von 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 90%.

4.3.2 Nährmedien und Zellkultur

Die NIH/3T3-Zelllinie wurde in dem Nährmedium DMEM gehalten. Diese NIH/3T3 Zellen sind adhärent wachsende Fibroblasten und stammen aus embryonalem Mausegewebe [Todaro et al., 1963].

Das DMEM (engl.: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) wurde als Pulver von dem Hersteller Sigma bezogen. Für Herstellung von 1l DMEM-Nährmedium werden 10g DMEM Pulver, 3,7g Natriumdicarbonat, 50ml fötales Kälberserum und 30ml Goodies-F verwendet. Das Nährmedium enthält eine Gesamtkonzentration von 2mM L-Glutamin, sowie 20µg Pentamycin und 20µg Streptomycin. Für eine Selektion der transfizierten NIH/3T3-Zellen wurde 1mg/ml Neomycin (G418) verwendet.

4.3.3 Auftauen und Einfrieren von Zellkulturen

Die Zellkulturen werden möglichst rasch in 37°C Wasser aufgetaut und in dem entsprechenden Nährmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 200xg für 5min pelletiert und in neues Nährmedium resuspendiert und darauf in eine Kulturschale überführt.

Um die adhärent wachsende NIH/3T3-Zellkur einzufrieren, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst. Dazu werden diese Zellen mit Trypsin-EDTA (1:10 Volumen der Lösung) für 5min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden bei 200xg für 5min pelletiert und in kaltem Einfriermedium bestehend aus DMEM mit 10 %(v/v) DMSO resuspendiert und über Nacht langsam bei -80°C eingefroren. Für eine längere Aufbewahrung wurden die NIH/3T3-Zellen in flüssigen Stickstoff gelagert.

4.3.4 Passagieren von adhärent wachsenden Zellen

Die Teilung der adhärent wachsenden NIH/3T3-Zellen erfolgte alle 2-3 Tage. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin gelöst. Dazu werden diese Zellen mit Trypsin-EDTA (1:10 Volumen der Lösung) für 5min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Nährmedium aufgenommen und nach Bedarf auf Zellkulturschalen aufgeteilt.

4.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hemozytometers, einer Neubauer Zählkammer, durchgeführt. Hierzu werden die Zellen mit Trypsin abgelöst, pelletiert und in 1ml Nährmedium resuspendiert. Nach Erstellung einer Verdünnungsreihe, wurden die Zellen unter einem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt und nach der Formel 3 wurde die Zellzahl pro ml ermittelt.

$$\text{Zellen/ml} = \text{Anzahl der Zellen} \cdot 1 \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsstufe}$$

Formel 3: Bestimmung der Zellzahl

4.3.6 Transfektion von NIH/3T3 Zellen

Für die Transfektion von NIH/3T3 Zellen wurde das Cell-Line Nucleofector® Kit-R des Herstellers Lonza verwendet. Die Zellen sollten 3 Tage vor der Transfektion nicht umgesetzt werden und eine Konfluenz von 70-80% aufweisen. Pro Transfektion wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen pelletiert, in 100µl Nucleofector Solution-R vorsichtig resuspendiert und mit 2,5µg reiner Plasmid-DNA gemischt. Danach erfolgte die Elektroporation der Zellen nach dem Programm U-30 des Elektroporators Nucleofector von Amaxa. Die elektroporierten Zellen wurden in ein auf 37°C vorgewärmtes Nährmedium aufgenommen und anschließend in eine Zellkulturschale überführt. Nach einem Tag wurde das Nährmedium gewechselt.

4.4 Proteinbiochemische Standardmethoden

4.4.1 Konzentrierung von Protein-Lösungen

Für die Ankonzentrierung von Protein-Lösungen wurden Ultrafiltrationszellen der Firma Amicon verwendet. Je nach einzuengendem Volumen wurde eine entsprechend große Ultrafiltrationszelle mit einem Membranfilter (Millipore) der Ausschlussgrenze von 10kDa verwendet. Die eigentliche Konzentrierung erfolgt in einer Ultrafiltrationszelle unter ständigem Rühren von 100 bis 200rpm mit einem Druck von 0,5 bis 1bar in einem entsprechenden Puffersystem bei 4°C.

4.4.2 Dialyse von Lösungen

Um die Salzkonzentration in Proteinlösungen zu verringern, wurden diese dialysiert. Dazu wurden die Proteinlösungen in einem Dialyseschlauch oder einer Dialysezelle mit entsprechender Porengröße zwischen 5 und 10kDa gefüllt und gegen den gewünschten Puffer mit 100fachem Überschuss dialysiert. Die Dialyse einer Proteinlösung findet bei 4°C unter ständigem Rühren je nach Probengröße 1-12h statt.

4.4.3 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Methode, um Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer relativen molaren Masse in einem elektrischen Feld zu trennen. Dazu wird die Struktur des Proteins durch β -Mercaptoethanol und durch das Detergens SDS aufgelöst und die

Nettoladung durch das vorhandene SDS maskiert. Durch das SDS wird das gesamte Protein negativ geladen und bewegt sich im elektrischen Feld zur Anode. Somit können Proteine nach ihrer molaren Masse, unabhängig von ihrer Ladung und Struktur aufgetrennt werden.

4.4.3.1 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die verwendeten SDS-Polyacrylamidgele wurden in einem Batch von bis zu 10 SDS-Polyacrylamidgelen gleichzeitig hergestellt. Dazu wurden die Glasplatten mit Spacer in einen Gießstand gepackt und die Polymerisationslösung wurde blasenfrei eingelassen. Dann wurde die Polymerisationslösung mit Wasser-gesättigtem Butanol überschichtet und bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Die auspolymerisierten SDS-Polyacrylamidgele wurden anschließend bei 4°C gelagert.

Das 5%igen Sammelgel wurden erst kurz vor der Verwendung des SDS-PAGEs gegossen. Um eine optimale Auftrennung von Proteinen zu erreichen wurden verschieden prozentige Polyacrylamidgele von 12% bis 15% hergestellt. Des Weiteren wurde die Vernetzung des Polyacrylamidgels durch das Verhältnis von Bisacrylamid zu Acrylamid (1:80) verändert. Die Tabelle 4 zeigt das Mischungsverhältnis der verschieden prozentigen SDS-Polyacrylamidgele.

Tabelle 4: In der Tabelle sind die Mischungsverhältnisse der Trenngele und Sammelgel angegeben.

Trenngel				Sammelgel	
Gelkomponenten	8%	10%	12%	Gelkomponenten	5%
MPW	81ml	71ml	56ml	MPW	775µl
1M Tris (pH 8,8)	75ml	75ml	75ml	1M Tris (pH 6,8)	1250µl
40% Acrylamid-Mix	20ml	25ml	30ml	40% Acrylamid-Mix	425µl
40% Acrylamid	20ml	25ml	30ml		
5% SDS	2ml	2ml	2ml	5% SDS	50µl
TEMED	0,2ml	0,2ml	0,2ml	TEMED	3µl
10% APS	2ml	2ml	2ml	10% APS	35µl

4.4.3.2 Vorbereitung von SDS-Proben

Die SDS-Proben wurden mit einem 5x Probenpuffer gemischt und für 5min bei 95°C erhitzt. Um größere Aggregate aus der Lösung zu entfernen wurde diese für 2min bei 2000xg zentrifugiert.

5x SDS-Probenpuffer: 320mM Tris/HCl pH 6,8; 25mM EDTA; 10% SDS; 20% Glycerol; 40% β -Mercaptoethanol; 0,05% Bromphenolblau

4.4.3.3 Elektrophorese

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde in die Elektrophorese-Apparatur gespannt und mit einem 5%igen Sammelgel versehen. Darauf wurde die Apparatur mit 1x SDS Laufpuffer geflutet. Die Probe wurde auf das Sammelgel aufgetragen und die elektrophoretische Trennung mit 20mA und 80V gestartet. Nachdem die Lauffront das Sammelgel verlassen hat, wurde die Stromstärke auf 25mA erhöht.

Im Anschluss wurden die Proteine durch eine Coomassie-Färbung nachgewiesen. Dazu wurde das SDS-Polyacrylamidgel für 30sec mit der Coomassie-Färbelösung in der Mikrowelle erhitzt. Durch die enthaltene Essigsäure wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel fixiert und für 20min auf dem Schüttler gefärbt. Durch die Entfärberlösung wurden überschüssige Farbstoffe entfernt und das entwickelte SDS-Polyacrylamidgel dokumentiert. Die Dokumentation eines Polyacrylamidgels erfolgte durch Trocknung oder Scannen des Gels.

SDS-Laufpuffer: 25mM Tris-Glycin; 0,1% SDS; pH8,35

Coomassie-Blau-Färbung: 10% Essigsäure; 25% Isopropanol; 0,5% Coomassie Brilliant Blau R-250

Entfärberlösung: 10% Essigsäure; 10% Isopropanol

4.4.3.4 Trocknen eines Polyacrylamidgels

Um ein Polyacrylamidgel zu dokumentieren wurde das SDS-Polyacrylamidgel zwischen zwei mit Wasser getränkte Cellophan-Folien gespannt und getrocknet.

4.4.3.5 Proteintransfer

Der Immunblot ermöglicht es, die zuvor in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine mittels immunologischer Methoden zu charakterisieren. Hierzu

wurden die zuvor in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Membran gebracht, wie z.B. Nitrocellulose.

Der Transfer wurde wie folgt durchgeführt. Das gerade gelaufene SDS-Polyacrylamidgel wurde auf einen Stapel von drei Whatmanpapieren gelegt, wobei das erste Whatmanpapier mit der Blotlösung A und die zwei weiteren mit der Blotlösung B getränkt waren.

Auf das SDS-Polyacrylamidgel wurde anschließend eine mit Methanol aktivierte Nitrocellulose möglichst blasenfrei gelegt, um einen optimalen Transfer zu erzielen, gefolgt von drei mit Blotlösung C getränkten Whatmanpapieren. Dieser Stapel wurde zwischen zwei Graphitplatten gespannt und mit Eis gekühlt. Der Proteintransfer erfolgte in Richtung der Anode für 120min bei $1,5\text{mA}/\text{cm}^2$.

Blotlösung A: 300mM Tris/HCl; 20% MeOH

Blotlösung B: 30mM Tris/HCl; 20% MeOH

Blotlösung C: 40mM Aminocaprinsäure; 25mM Tris/HCl; 20% MeOH

Phosphat-Puffer: 50mM MgCl_2 ; 50mM Tris-HCl pH 9,5

4.4.4 Immunblot mit AP-konjugierten Antikörpern

Bei der Immundetektion werden Substanzen, meistens Proteine, durch Antikörper nachgewiesen und mittels Farbnachweis visualisiert.

Für die Immundetektion wurde die Nitrocellulosemembran zuerst für 60min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit 3% MP-TTBS (w/v) inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Die Nitrocellulosemembran wurde darauf 3mal mit 1x TTBS gewaschen und der primäre Antikörper wurde in einer entsprechenden Verdünnung in 1x TTBS für 180min bei Raumtemperatur mit der Nitrocellulosemembran inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit 1x TTBS wurde der zweite Antikörper für 60min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einem erneuten Waschschrift mit 1x TTBS wurde die Nitrocellulosemembran zweimal im Phosphatpuffer für 10min inkubiert. Zur Visualisierung wurde zu dem Phosphatpuffer die Entwicklerlösung gegeben und nach einer ausreichenden Entwicklung die Reaktion der Alkalischen-Phosphatase durch einige Tropfen 1%iger Essigsäure gestoppt.

Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler mouse-anti-Vinculin hVin1 in einer Verdünnung von 1:7000 (v/v) verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit Alkalischer-Phosphatase gekoppelter Antikörper goat-anti-mouse in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Die Antikörper wurden von der Firma Sigma bezogen.

<i>TTBS:</i>	500mM Natriumchlorid; 0,05% Tween 20; 20mM Tris-HCl pH 7,5
<i>MP-TTBS:</i>	Milchpulver in TTBS
<i>Phosphatpuffer:</i>	50mM Magnesiumchlorid; 50mM Tris-HCl; pH 9,5
<i>Entwicklerlösung:</i>	10ml Phosphatpuffer; 0,1ml NBT-Lösung; 0,1ml BCIP-Lösung
<i>NBT-Lösung:</i>	30mg Nitroblautetrazolium in 1ml 70% Dimethylformamid
<i>BCIP-Lösung:</i>	15mg 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat in 1ml Dimethylformamid

4.4.5 Bildung von F-Aktin Bündeln

Das Strukturprotein F-Aktin bildet unter bestimmten Voraussetzungen Bündel aus mehreren F-Aktinen. Diese können durch bivalent geladene Metallionen, wie Magnesiumionen und durch Proteine, wie den Vinculin-Schwanz entstehen.

Für die Durchführung des F-Aktin Bündelungsnachweises wurde zuerst monomeres Aktin zu F-Aktin polymerisiert. Dazu wurde 1mg monomeres Aktin in 1ml ABP-Puffer in Gegenwart von 0,1M KCl für 60min polymerisiert. Für den Nachweis wurden 50µl des frisch polymerisierten F-Aktins mit 0,01mg des zu untersuchenden Proteins für 5min inkubiert und mit Rhodamin/Phalloidin gefärbt. Die gefärbten F-Aktin Bündel wurden im Fluoreszenzmikroskop bildtechnisch nachgewiesen.

4.4.6 Protein-Protein-Interaktion durch „Pull-down“

Durch einen Pull-down werden Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen. Das erste Protein auch als Köder bezeichnet (engl. *bait*), z.B. ein GST-Fusionsprotein wird an Glutathion-Sepharose gebunden. Das zweite Protein, die Beute (engl. *prey*) wird dem Gemisch zugefügt. Falls eine Interaktion vorliegt pelletieren die beiden Proteine nach einer Zentrifugation.

Für die Durchführung werden 10µl aufgeschlämmte Affinitätsmatrix mit 1ml 2x G-Puffer gewaschen und anschließend in 1ml 2x G-Puffer aufgenommen. Zu dieser Lösung werden die zwei Proteine, in diesem Fall ein Vinculin-Konstrukt als Köder-Protein und G-Aktin als Beute-Protein in einem molaren Verhältnis von 1:10 zugegeben. Nach zwei Waschstritten mit 2x G-Puffer wurde das Pellet in SDS-Probenpuffer für 5min bei 95°C gekocht in einem SDS-PAGE (4.4.3) analysiert.

5x G-Puffer: 1mM ATP; 5mM Tris/HCl; 0,2mM CaCl₂; 2mM NaN₃; 1mM β-Mercaptoethanol; pH-Wert 8,2

4.4.7 Cosedimentation mit F-Aktin

F-Aktin kann durch Zentrifugation bei > 100.000xg vollständig sedimentiert werden. Die Proteinwechselwirkung zwischen F-Aktin und den Konstrukten wurde durch Cosedimentation gezeigt. Durch eine Sedimentation des F-Aktins zusammen mit dem allein nicht sedimentierenden Liganden kann der Nachweis einer Bindung erbracht werden. Hierbei wurde durch Sedimentierung der Vinculin-Konstrukte und des F-Aktins gezeigt, dass eine Proteinwechselwirkung zwischen den Proteinen besteht.

Für die Durchführung der Cosedimentation wurde zuerst G-Aktin zu F-Aktin polymerisiert. Hierzu wurden 1mg monomeres Aktin in 1ml 1x ABP-Puffer in Gegenwart von 0,1M KCl für 60min polymerisiert.

Für den Nachweis wurden 0,5mg frisch polymerisiertes F-Aktin, sowie die zu charakterisierenden Proteine oder Vinculin-Konstrukte, in einem molaren Verhältnis von 1:20 in einem 1ml Ansatz gemischt und für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden zuvor bei 150.000xg zentrifugiert, um störende Aggregate abzutrennen. Dieses Gemisch wurde durch 150.000xg sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Sediment wurde mit Wasser im selben Volumen aufgenommen. Zur Analyse wurden SDS-Proben vom Überstand und dem resuspendierten Sediment genommen und in 5x SDS-Probenpuffer (4.4.3) für 5min bei 95°C aufgekocht.

4.4.8 Chemische Quervernetzung „Cross-Link“

Protein-Protein-Wechselwirkungen könnten durch eine Quervernetzung, wie mit dem wasserlöslichen Cross-Linker EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) identifiziert

werden. Die Quervernetzungsprodukte werden durch SDS-PAGE (4.4.3) oder durch einen Immundetektion (4.4.4) nachgewiesen.

Das EDC ist ein zero-length Cross-Linker und gehört zu der Gruppe der Carbodiimide. Die Proteifixierung wird durch die Bildung einer Amidbindung zwischen einer Carboxylgruppe oder einer Aminogruppe gebildet. Durch Verwendung von EDC und Sulfo-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimide) wurde ein stabiles Intermediat zwischen zwei Proteinen gebildet, die durch eine Proteinwechselwirkung in räumliche Nähe gebracht wurden.

Für den Nachweis wurde ein molares Verhältnis von 1:5 von Konstrukt zu G-Aktin in einem 2x G-Puffer eingesetzt und die Reaktion mit insgesamt 4mM EDC, 5mM Sulfo-NHS und 70mM KCl gestartet. Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 5min verfolgt, indem in gewissen Zeitabständen Proben entnommen wurden. Diese wurden sofort in 5x SDS-Puffer aufgenommen und für 5min bei 95°C inkubiert. Dadurch wurde die Reaktion des Cross-Linkers gestoppt. Die Proben wurden auf ein SDS-PAGE (4.4.3) aufgetragen, geblottet und das Cross-Link Produkt wurde immunologisch nachgewiesen (4.4.4).

4.4.9 Nukleation von monomeren Aktin

Bei der Nukleation werden G-Aktine zu längeren polymerisierten Aktinen, den sogenannten filamentösen-Aktin (F-Aktin) umgewandelt.

Die Bildung des F-Aktins verläuft über die Aneinanderlagerung von zwei monomeren Aktinen bis zu einem ternären Komplex von drei Aktinen. Dieser Prozess wird bei der Aktinpolymerisation als Keimbildung bezeichnet. Die Zusammenlagerung zweier monomerer Aktinen ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Polymerisation, da der sich bildende sekundäre Komplex eine schwache Interaktion zeigt. Erst durch die Anlagerung eines weiteren G-Aktins wird ein stabiler Übergangskomplex erreicht, an den sich spontan weitere monomere Aktine anlagern.

Die Nukleation von G-Aktin kann durch das Oswald-Viskosimeter, als auch mit einem Spektralfluorometer untersucht werden.

Die beiden Verfahren unterschieden sich in der Art des Nachweises des F-Aktins. Bei der Viskosimetrie geschieht dieses durch die sich verändernde spezifische Viskosität der Lösung, bei der Fluorometrie wird eine zunehmende Fluoreszenzintensität

gemessen, die durch ein an Aktin gekoppeltes Fluorochrom (in diesem Fall Pyren) entsteht.

4.4.9.1 Fluorometrie

Für die fluorometrische Messung der Nukleation von G-Aktin in einem Spektralfluorometer wurde ein Polymerisationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 1,1ml bei einer Temperatur von 25°C mit einer Wellenlänge von 365nm angeregt. Das emittierte Licht einer Wellenlänge von 407nm wurde detektiert und über einen Zeitraum von 5 bis 30min verfolgt. Der Polymerisationsansatz besteht aus 0,44mg G-Aktin mit einem 10%igen Anteil Pyren-G-Aktin, 110µl 10x ABP-Puffer und einem zu charakterisierenden Protein oder Vinculin-Konstrukt, was in einem molaren Verhältnis von 1:10 bis 1:80 zugegeben wurde. Der gesamte Polymerisationsansatz wurde mit 40mM KCl gestartet und die Messung am Spektralfluorometer verfolgt. Alle Proteine wurden zuvor bei 150.000xg zentrifugiert, um störende Aggregate abzutrennen.

4.4.9.2 Oswald Viskosimetrie

Für die viskosimetrische Messung der Nukleation von G-Aktin in einem Oswald-Viskosimeter wurde ein Polymerisationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 1ml bei einer Temperatur von 25°C die Viskosität über einen Zeitraum von 20min verfolgt. Der Polymerisationsansatz besteht aus 1mg G-Aktin, 100µl 10x ABP-Puffer und einem zu charakterisierenden Protein oder Vinculin-Konstrukt, was in einem molaren Verhältnis von 1:20 bis 1:60 zugegeben wurde. Der gesamte Polymerisationsansatz wurde mit 40mM KCl gestartet und die Viskosität gemessen.

$$\eta = \left(\frac{T_1}{T_2} \right) - 1$$

Formel 3: Spezifische Viskosimetrie

Hier bei steht $[\eta]$ für die spezifische Viskosimetrie, T_1 beschreibt die Durchflusszeit der Probe [s], T_2 die Durchflusszeit von Wasser [s]

Für die spezifische Viskosimetrie-Bestimmung einer Lösung mit dem Oswald Viskosimeter wird eine Zeitdifferenz gemessen, die eine Lösung braucht, um einen definierten Bereich zu passieren. Die spezifische Viskosimetrie berechnet sich nach

der Formel 3. Alle Proteine wurden zuvor bei 150.000xg zentrifugiert, um störende Aggregate abzutrennen.

4.4.10 Oberflächenplasmonresonanz Effekte (BIAcore)

Im direkten Nachweis der Interaktion zwischen Vinculin und Aktin wurde die Oberflächenplasmonresonanz (Biacore-Gerät) verwendet. Diese Technik erlaubt den Nachweis auch von schwachen Wechselwirkungen zwischen Proteinen. Das Prinzip beruht auf der Analyse von Interaktionen zwischen Biomolekülen unter Nutzung des Oberflächenplasmonresonanzeffektes. Dabei wird polarisiertes, monochromatisches Licht auf eine dünne Goldschicht eingestrahlt, wo es reflektiert wird. Das Licht interagiert nun mit den freien Elektronen des Goldes. Kommt es zu einer Bindung zwischen Rezeptorprotein (gekoppelt an der Goldschicht) und einem potentiellen Liganden, so erhöht sich der Beladungsgrad der Goldoberfläche, welcher durch die Ablenkung des Lichtes gemessen wird. Die Wirkungen zwischen G-Aktin und den verschiedenen Vinculin-Konstrukten wurden mit dem Biacore 3000 analysiert.

4.4.10.1 Kopplung an einem CM5-Chip

Hierzu wurde G-Aktin über eine Thiol-Kupplung an einen CM5-Chip kovalent gekoppelt. Die Thiol-Kupplung wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 5µl/min durchgeführt, wobei MPW als Flussmedium diente.

Im ersten Schritt der Thiol-Kopplung wurden zwei Flusszellen des CM5-Chips angesteuert und 40µl EDC/NHS-Lösung, gefolgt von 30µl PDEA-Lösung injiziert. Im zweiten Schritt wurde 50µg G-Aktin in Natriumacetat-Puffer aufgenommen und auf die erste Flusszelle injiziert, bis eine RU-Differenz von 10.000 erzielt wurde. Im dritten Schritt wurden beide Flusszellen angesteuert und 50µl Cystein/Natriumacetat-Puffer injiziert, um freien Bindestellen abzusättigen.

Natriumacetat-Puffer: 1M NaCl; 0,1M Natriumacetat; pH4,0

PDEA-Lösung: 80mM PDEA; 100mM Natriumborat

EDC/NHS-Lösung: 200mM EDC; 50mM NHS

Cystein/Natriumacetat-Puffer: 1M NaCl; 0,1M Natriumacetat; 50mM Cystein
pH4,0

4.4.10.2 Interaktionsmessungen

Das Protein wurde zuvor für 60min bei 25°C gegen Biacore L-Puffer dialysiert und anschließend 30min bei 150.000xg zentrifugiert, um mögliche Aggregate zu sedimentieren. Das Protein, welches bei dieser Methode als Ligand bezeichnet wird, wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 20µl/min über den zuvor mit G-Aktin gekoppelten CM5-Chip bei einer konstanten Temperatur von 25°C analysiert. Die Liganden wurden mit einer Konzentration von $2,0 \cdot 10^{-3}$ mmol/l verwendet. Für die Analysen der Vinculin-Konstrukte wurden diese als Liganden injiziert.

Die Assimilationszeiten des Liganden wurden über die Injektionszeit festgelegt und lagen meist in einem Bereich von 120sec. Nach Erreichen des Reportpunktes, folgt die Dissoziation des Liganden, die über einen längeren Zeitbereich verfolgt wird, welcher meist doppelt so lange war. Eine Regeneration des Biacore CM5-Chips wurde mit 0,01M HCl in Biacore L-Puffer erzielt.

Für eine Bestimmung der Dissoziations-Konstante wurden Verdünnungsreihen der Liganden erstellt, die nacheinander in die Flusszellen injiziert wurden.

Die Proteininteraktion wurde graphisch als ein Sensogramm dargestellt. Dabei wurden die RU (Refraction Units) gegen die Zeit aufgetragen.

Biacore L-Puffer: 2mM ATP, 30mM Tris/HCl pH 7,5, 0,2mM CaCl₂

4.4.11 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie (engl.: circular dichroism) ist eine spektroskopische Methode, um bei optisch aktiven Molekülen, die ein Chiralitätszentrum besitzen, die Struktur aufzuklären. Zu den optisch aktiven Molekülen zählen auch biologische Substanzen, wie Proteine, die durch ihre Größe Sekundärstrukturen, wie β -Faltblatt und α -Helix ausbilden. Durch den Circular dichroismus werden diese Strukturmerkmale des Proteins identifiziert und können mit anderen Proteinen verglichen werden.

Für diese Strukturaufklärung wird zirkular polarisiertes Licht verwendet, welches durch chirale Verbindungen unterschiedlich stark absorbiert wurde. Durch diese Absorptionsunterschiede, welche außerdem noch bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen wurden, ergibt sich das CD-Spektrum.

Die Proteine wurden zuvor für 60min bei 4°C gegen den CD-Puffer dialysiert und anschließend für 30min bei 150.000xg zentrifugiert. Die Probe wurde mit einer Konzentration zwischen 0,15 bis 0,35mM in einem CD-Spektrometer in einem Wellenbereich von 190 bis 260nm vermessen.

CD-Puffer: 10mM Na₂HPO₄; 5mM NaCl; pH7,4

4.4.12 Kopplung von NHS-Sepharose

Für die Kopplung der Endoproteinase Glu-C (V8-Protease) aus *Staphylococcus aureus* an die NHS-Sepharose wurden 2mg der V8-Protease in 1ml CP-Puffer aufgenommen und gegen 100ml CP-Puffer für 60min bei 4°C inkubiert. Die NHS-Sepharose wurde 3mal 30min mit 1mM HCl gewaschen und es wurden 2ml NHS mit 2mg V8-Protease unter ständigem Invertieren auf einem Roller für 180min bei RT gekoppelt. Durch die Zugabe von 20ml des BP-Puffers wurde die Reaktion über Nacht unter ständigem Invertieren bei 4°C geblockt. Nach der Kopplung wurde NHS-Sepharose 3mal mit jeweils 20ml BP-Puffer und 20ml W-Puffer gewaschen. Die gekoppelte V8-NHS-Sepharose wurde sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

CP-Puffer: 0,2M NaHCO₃; 0,5M NaCl; pH 8,3

BP-Puffer: 0,1M Tris/HCl; pH 8,5

W-Puffer: 0,1M Natriumacetat; 0,5M NaCl; pH 4,5

4.4.13 Limitierende Proteolyse von Vinculin

Unter der Verwendung der Endoproteinase Glu-C (V8-Protease) aus *Staphylococcus aureus* konnte das gesamte Puten-Vinculin innerhalb der prolinreichen Bereiche in Vinculin-Kopf und Vinculin-Schwanz gespalten werden.

4.4.13.1 Analytische Spaltung

Für eine analytische Spaltung wurden 0,5mg Vinculin mit einer NHS-gekoppelten V8-Protease in einem Verhältnis von 1:50 (w/w) bei 25°C inkubiert. Die enzymatische Spaltung wurde zeitabhängig mittels SDS-PAGE analysiert und verfolgt.

4.4.13.2 Präparative Spaltung

Nachdem die optimale Spaltungszeit über eine analytische Spaltung ermittelt worden war, wurde für eine präparative Spaltung Vinculin mit NHS-gekoppelter V8-Protease in einem Verhältnis von 1:50 (w/w) unter ständigem Invertieren bei 25°C für 50min inkubiert. Zuvor wurde das Vinculin gegen einen proteinase-freien B10-Puffer über Nacht bei 4°C dialysiert. Die proteolytische Spaltung wurde durch Sedimentieren der NHS-V8-Protease gestoppt und der Überstand mit den Spaltprodukten entnommen.

4.4.14 Bakterien-Lyse

Die pelletierten Bakterien wurden in einen entsprechenden Puffer, der abhängig von der Weiterverarbeitung des Proteinextraktes ist, aufgenommen. Die resuspendierten Bakterien wurden mit 0,5mg/ml Lysozym in einem möglichst kleinen Volumen für 30min auf Eis lysiert. Die lysierten Bakterien wurden durch eine Spritzenkanüle gepresst und durch diese Scherkräfte aufgeschlossen. Größere Mengen Bakterienlysat wurden 3mal für 30sec mit einem Ultraschallgerät auf mittlere Stufe aufgeschlossen. In einem letzten Schritt wurde das Lysat mit einem Homogenisator homogenisiert. Das Bakterienlysat wurde bei 30.000xg zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert. Mit dem Bakterienlysat wurde sofort weitergearbeitet und mit Hilfe von chromatographischen Methoden gereinigt.

4.4.15 Präparative Methoden der Proteinreinigung

Für die Proteinreinigung wurden unterschiedliche Strategien verfolgt. Zum einen wurden einige rekombinante Proteine tag-frei über Anionenaustauschersäulen und getaggten Proteinen über Affinitäts-Chromatographiesäulen gereinigt. Des Weiteren wurden nativ isolierte Proteine über Anionenaustauscher und Gelfiltrationssäulen gereinigt. Die verwendeten Chromatographiesäulen und Affinitäts-Chromatographiesäulen wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Der Säulenlauf wurde photometrisch bei 280nm verfolgt und fraktioniert gesammelt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (4.4.3) ausgewertet und die positiven Fraktionen vereint. Die Proteinlösung kann durch Ultrafiltration konzentriert werden und gegebenenfalls in einer 50%igen Glycerin-Lösung, bei -80°C eingelagert werden.

Für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen können über zusätzlich angefügte Aminosäuren oder Proteine, die eine reversible affine Bindung zu einer geeigneten Matrix haben, markiert werden. Dieses auch als Affinitätsmarkierung (engl. *tag*) bezeichnet, ermöglicht eine schnelle und meist spezifische Reinigung des Proteins.

Für die Präparation von rekombinanten Vinculin-Konstrukten wurden durch zwei verschiedene Systeme einen GST-Tag und His-Tag gereinigt. Der GST-Tag besteht aus dem Protein Glutathion-S-transferase und zeigt eine reversible Bindung mit Glutathion-Agarose, mit der Molarenmasse von 26kDa ist diese Affinitätsmarkierung sehr groß. Der His-Tag besteht aus einer Polyhistidinsequenz, die mit Nickel-Chelat eine reversible Bindung herstellt.

4.4.15.1 Präparation von nativem Vinculin

Für die Vinculin-Präparation modifiziert nach Siliciano & Carig wird Putenmagen verwendet, der wenn möglich frei von Bindegewebe sein sollte, um die Menge von Proteasen zu reduzieren [Siliciano & Carig 1986]. Der so zubereitete Putenmagen konnte sofort für die Präparation genutzt werden, oder dieser wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Um Vinculin aus dem Gewebe des Glattmuskels zu gewinnen, wurde dieser homogenisiert und gewaschen, dazu wurden 300g Putenmagen, aufgetaut und in einem Fleischwolf zerkleinert.

Das zerkleinerte Fleisch wurde mit 2L kaltem Homogenisierung-Puffer in einem Mixer homogenisiert, anschließend für 30min bei 4000rpm pelletiert, danach wird dieser Schritt erneut mit dem Pellet wiederholt. Das Pellet wurde zweimal mit dem Homogenisierung-Puffer gewaschen und für 40min bei 9000rpm zentrifugiert.

Um Vinculin aus dem Pellet zu extrahieren, wurde das Pellet in 1,5L Extraktionspuffer aufgenommen und für 30min bei 37° inkubiert. Nach der Extraktion wurde die Lösung für 60min bei 13.000rpm pelletiert und der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Um α -Actinin aus dem Überstand zu entfernen wurde die Lösung mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 7,0 und dann auf eine finale Konzentration von 10mM MgCl₂ eingestellt und für 15min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung für 30min bei 13.000rpm pelletiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Um Vinculin spezifisch aus der Lösung zu fällen, wurde eine finale Ammoniumsulfatsättigung von 35% eingestellt und die Lösung für 60min bei 4°C gerührt. Die Lösung wurde anschließend für 120min bei 35.000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50ml B-10 Puffer aufgenommen und über Nacht gegen 2L B-10 Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde nochmals für 60min bei 35.000rpm klarzentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Gefäß übernommen.

Die grob gereinigte Proteinlösung wurde über Q-Sepharose gereinigt. Als Elutionspuffer wurde ein linearer Gradient von 10-400mM NaCl aus dem B-10 Puffer System mit einer Flussgeschwindigkeit von 4ml/min verwendet. Die Elution der Q-Sepharose wurde photometrisch bei 280nm detektiert. Das Elutionsvolumen wurde auf mehrere Fraktionen aufgeteilt und mittels SDS-PAGE (4.4.3) ausgewertet. Nach Vereinigung der Vinculin enthaltenden Fraktionen, wurden die Lösungen in einer Amiconzelle (50ml) konzentriert (4.4.1) und anschließend über Nacht gegen B-10 Puffer bei 4°C dialysiert (4.4.2).

Das Protein-Konzentrat wurde auf die Gelfiltrationssäule SuperdexTM-200 appliziert und als Laufpuffer wurde der B-10 Puffer verwendet. Bei einer Gelfiltration werden Proteine nach deren Größe getrennt, wobei die kleineren Proteine länger in der Säulen-Matrix verweilen als größere Proteine. Der Säulenlauf wurde ebenfalls photometrisch bei 280nm verfolgt, auf Fraktionen aufgeteilt und mittels SDS-PAGE (4.4.3) ausgewertet. Nach Vereinigung der Vinculin enthaltenen Fraktionen, wurden diese über Nacht gegen den B-10 Puffer dialysiert (4.4.2).

Im finalen Reinigungsschritt wurde die Proteinlösung auf eine Mono-QTM-Säule appliziert. Als Elutionspuffer wurde ein linearer Gradient von 10-300mM NaCl aus dem B-10 Puffer System mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5ml/min verwendet. Der Säulenlauf wurde photometrisch bei 280nm detektiert und Fraktionen wurden gesammelt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (4.4.3) ausgewertet und die Vinculin-enthaltenden Fraktionen wurden vereint. Gegebenenfalls kann die Proteinlösung durch Ultrafiltration konzentriert werden und das Vinculin kann in 50%iger Glycerin-Lösung bei -80°C gelagert werden.

Homogenisierung-Puffer: 100mM PMSF; 1mM Benzamidin; 0,5M EGTA; pH7

Extraktionspuffer: 2mM Tris; 1 mM EGTA; 0,5mM PMSF; 0,5mM EDTA; pH 9,0

4.4.15.2 Präparation von nativen Vinculin-Kopf

Für die Präparation des nativen Vinculin-Kopfes wurde das gesamte Puten-Vinculin mit Hilfe einer V8-Protease in Vinculin-Kopf und Vinculin-Schwanz gespalten. Die Spaltprodukte wurden über eine mit Puffer-A äquilibrierte MonoQTM-Säule mit einer Flussgeschwindigkeit von 1ml/min appliziert und nach Erreichen einer Basislinie wurde der lineare Gradient von 10-400mM NaCl gestartet. Die Elution wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280nm verfolgt, fraktioniert gesammelt und durch SDS-PAGE (4.4.3) analysiert.

Puffer-A: 10mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 1,5 mM β -Mercaptoethanol; 20 mM Natriumacetat

4.4.15.3 Präparation von rekombinanten Vinculin-Konstrukten

Für eine tagfreie Aufreinigung wurde das Bakterienlysat über eine DEAE-Säule mit einem linearen NaCl-Gradienten getrennt. Dazu wurde die DEAE-Säule zuvor mit B10-Puffer äquilibriert und mit einer Flussgeschwindigkeit von 4ml/min das Lysat auf die Säule appliziert. Nach Erreichen einer Basislinie wurde der Gradient gestartet und die Elution photometrisch bei einer Wellenlänge von 280nm verfolgt und das Eluat fraktioniert gesammelt. Eine weitere Auswertung erfolgte durch ein SDS-PAGE (4.4.3).

4.4.15.4 Präparation von rekombinanten Vinculin-Konstrukten als GST-Fusionsproteine

Für die Affinitätschromatographie wurde eine Protino[®] Glutathion-Agarose 4B des Herstellers Macherey & Nagel verwendet. Das Bakterienpellet wurde in GSTW-Puffer resuspendiert und aufgeschlossen. Die Glutathion-Agarose wurde mit 1ml/min GSTW-Puffer äquilibriert und den Proteinextrakt appliziert. Die Glutathion-Agarose wurde mit 1ml/min GSTW-Puffer gewaschen, bis eine konstante Basislinie erreicht wurde. Danach erfolgt die Elution mit 1ml/min GSTE-Puffer und das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt und mit einem SDS-PAGE analysiert (4.4.3).

GSTW-Puffer: 10mM Na₂HPO₄; 1,8mM KH₂PO₄; 2,7mM KCl; 140mM NaCl; pH-Wert 7,3

GSTE-Puffer: 50mM Tris/HCl; 10mM Glutathion; pH-Wert 8,0

4.4.15.5 Präparation von rekombinanten Vinculin-Konstrukten als His-Fusionsprotein

Für die Affinitätschromatographie wurden unterschiedliche Säulenmatrizes, eine Ni-NTA Agarose des Herstellers Roth und Invitrogen sowie Ni-TED (Protino[®]) des Herstellers Macherey & Nagel verwendet. Bei der Verwendung der Ni-TED wurde ein anderes Puffer-System, bei gleicher Durchführung, verwendet.

Das Bakterienpellet wurde in HisW-Puffer resuspendiert und aufgeschlossen. Die Ni-NTA Agarose wurde mit 1ml/min HisW-Puffer äquilibriert und der Proteinextrakt appliziert. Die Ni-NTA Agarose wurde mit 1ml/min HisW-Puffer gewaschen, bis eine konstante Basislinie erreicht wurde. Danach erfolgt die Elution mit 1ml/min HisE-Puffer, das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt und mit einem SDS-PAGE analysiert (4.4.3).

HisW-Puffer: 50mM Tris/HCl; 500mM NaCl; pH-Wert 8,0

HisE-Puffer: 50mM Tris/HCl; 500mM NaCl; 50mM Imidazol; pH-Wert 8,0

His^W_{TED}-Puffer: 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; pH-Wert 8,0 mit NaOH

His^E_{TED}-Puffer: 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 250mM Imidazol; pH-Wert 8,0

5 Ergebnisse

5.1 Herstellung von nativen und rekombinanten Vinculin

5.1.1 Präparation von nativen Vinculin und Spaltprodukte

Natives Vinculin und Spaltprodukte dienten als Referenz für die rekombinant hergestellten Vinculin-Konstrukte.

5.1.1.1 Präparation von nativen Vinculin (Pute)

Natives Vinculin wurde nach Siliciano & Carig (1986) aus Glattmuskulatur des Putenmagens isoliert. Dazu wurde das Protein über drei sequentielle Chromatographieschritte über Q-Sepharose, SuperdexTM-200 und MonoQTM gereinigt.

Die Abbildung 7 zeigt das Elutionsprofil des Q-Sepharose-Säulenlaufes. Die Elution des gewünschten Proteins Vinculin mit einer molaren Masse von 117kDa liegt in einem Bereich von 0,2-0,25mM NaCl. Abbildung 7b zeigt, dass bereits in diesem Stadium eine relativ hohe Anreicherung erzielt wurde.

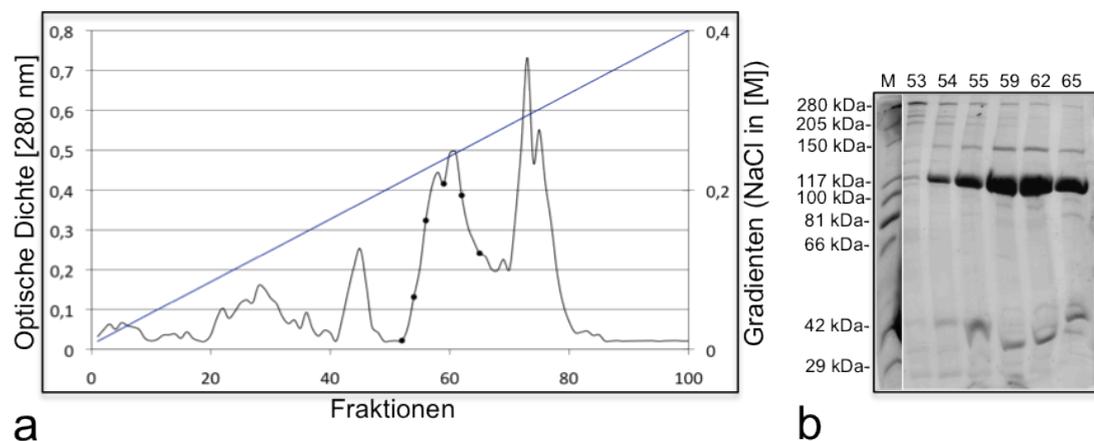


Abbildung 7: Elutionsprofil und SDS-Gel der nativen Vinculin Präparation (Q-Sepharose)

a) (Elutionsprofil, Anionenaustauscher: Q-Sepharose) Die Abbildung zeigt das Elutionsprofil der nativen Vinculin Präparation und gibt den Gradienten im Elutionsprofil an. Aufgetragen wurde eine optische Dichte von 280nm gegen die einzelnen Fraktionen. Die gesamte auftragende Proteinmenge betrug 380mg. Der Säulenlauf wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten von 10-400mM mit einer Flussrate von 4ml/min gestartet. **b)** (12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Zeigt einige ausgewählte Fraktionen des Säulenlaufes. Die Spuren sind mit den Fraktionsnummern versehen, die auch als Punkt in Elutionsprofil a) eingezeichnet sind. Die Spur M zeigt den Marker.

Wie in der Abbildung 8 gezeigt, wurde Vinculin bei einem Elutionsvolumen zwischen 40 und 50ml relativ rein von der Gelfiltrationssäule SuperdexTM-200 eluiert. Nun fand der Finale Säulenlauf statt, bei welchem ein Anionenaustauscher (MonoQTM)

verwendet wurde. Dieses Elutionsprofil ist in der Abbildung 9 gezeigt. Die Elution des gesamten Vinculins liegt in einem Bereich von 160-180mM NaCl.

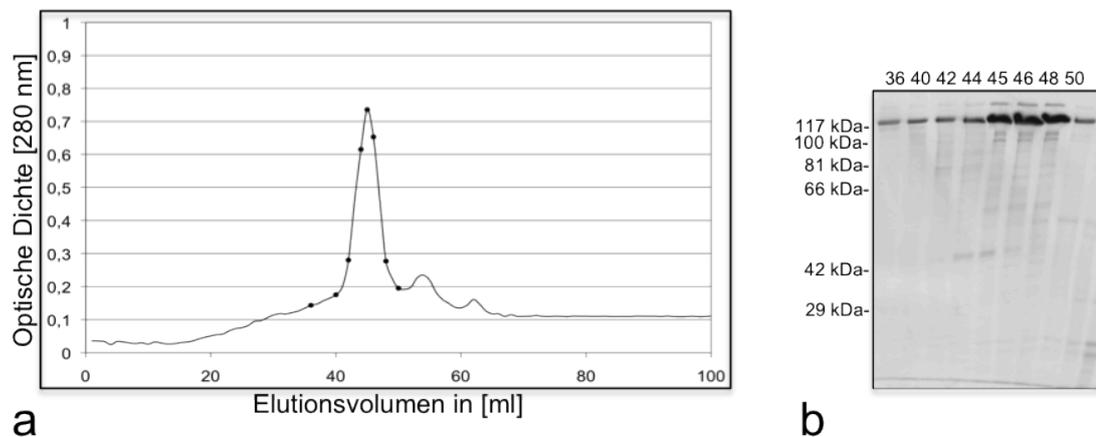


Abbildung 8: Elutionsprofil und SDS-Gel der nativen Vinculin Präparation (Superdex™-200)

a) (Elutionsprofil, Gelfiltration: Superdex™-200) Die Abbildung zeigt das Elutionsprofil der nativen Vinculin Präparation. Aufgetragen ist die optische Dichte von 280nm gegen das Elutionsvolumen. Die applizierte Proteinmenge betrug 28mg mit einer Flussrate von 0,5ml/min. **b)** (12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Zeigt einige ausgewählte Fraktionen des Säulenlaufes. Die Spuren sind mit den Fraktionsnummern versehen, die auch als Punkt in Elutionsprofil a) eingezeichnet sind.

Das gewonnene Vinculin wurde entweder gleich für die Weiterverarbeitung genutzt oder es wurde gegen einen 50% Glycerin B10-Puffer dialysiert und bei -80°C gelagert. Bei der nativen Aufreinigung wurden 300g Ausgangsmaterial eingesetzt und insgesamt ca. 11mg Vinculin in SDS-Gel reiner Form erzielt.

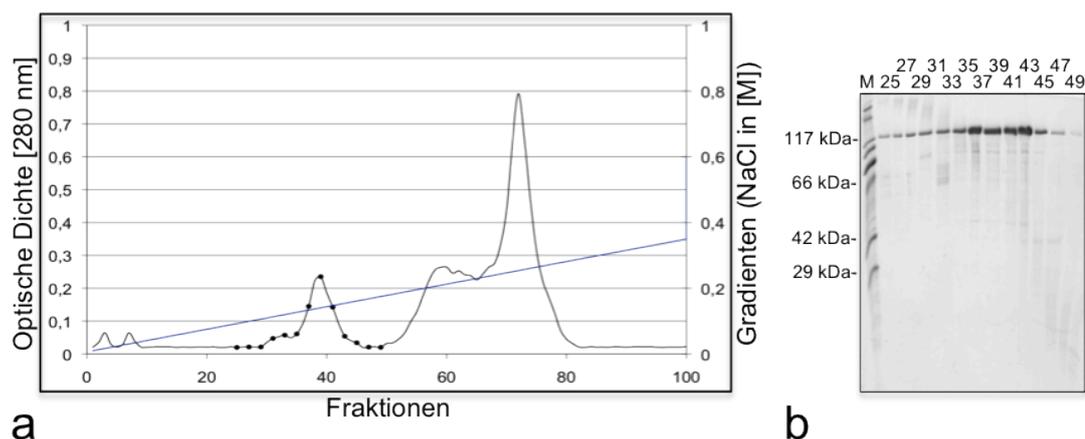


Abbildung 9: Elutionsprofil und SDS-Gel der nativen Vinculin Präparation (MonoQ™-Säule)

a) (Elutionsprofil, Anionenaustauscher: MonoQ™-Säule) Die Abbildung zeigt das Elutionsprofil der nativen Vinculin Präparation. Aufgetragen ist die optische Dichte von 280nm gegen die einzelnen Fraktionen. Des Weiteren wurde der Gradient im Elutionsprofil angegeben. Die gesamt auftragende Proteinmenge betrug 5mg. Der Säulenlauf wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0-350mM mit einer Flussrate von 0,5ml/min gestartet. **b)** (12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Zeigt einige ausgewählte Fraktionen des Säulenlaufes. Die Spuren sind mit den Fraktionsnummern versehen, die auch als Punkt in Elutionsprofil a) eingezeichnet sind. Die Spur M zeigt den Marker.

5.1.1.2 Präparation des nativen Vinculin-Kopfes (Pute)

Der native Vinculin-Kopf wird durch eine limitierte proteolytische Spaltung des gesamten Vinculins erzielt. Vinculin besteht aus einer Kopf- und Schwanz-Region, die mit Hilfe der V8-Protease (aus *Staphylococcus aureus*) in die Spaltprodukte des Vinculin-Kopfes mit 95kDa und des Vinculin-Schwanzes mit 25kDa gespalten werden kann [Price et al., 1989].

Die Trennung der Spaltprodukte erfolgte durch einen Anionenaustauscher (MonoQ™). Dieser wurde mit Puffer-A äquilibriert und mit dem gesamten Spaltansatz appliziert. Der Vinculin-Kopf eluiert bei 100-150mM NaCl vollständig von dem Anionenaustauscher (Abbildung 10). Der gewonnene Vinculin-Kopf wurde gegen einen 50% Glycerin B10-Puffer dialysiert und bei -80°C gelagert.

Bei der nativen Aufreinigung wurden 300g Ausgangsmaterial eingesetzt und man erhielt insgesamt theoretisch ca. 3,3mg Vinculin-Kopf. Eventuell konnte eine größere Ausbeute durch einen größeren Ansatz der limitierten Proteolyse erzielt werden.

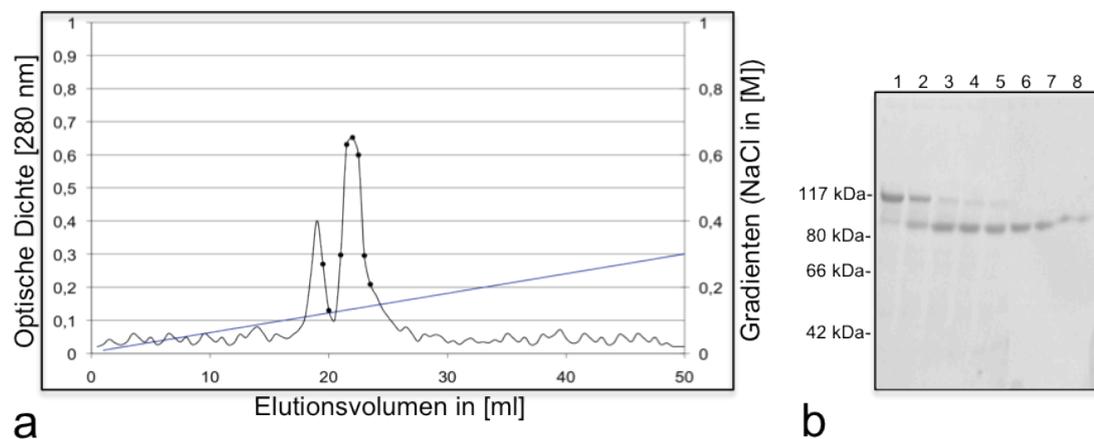


Abbildung 10: Elutionsprofil und SDS-Gel der Aufreinigung des nativen Vinculin-Kopfes

a) (Elutionsprofil, Anionenaustauscher: MonoQ™-Säule) Die Abbildung zeigt das Elutionsprofil der nativen Vinculin-Kopf Präparation. Aufgetragen ist eine optische Dichte von 280nm gegen das Elutionsvolumen. Die applizierte Proteinmenge betrug 3mg, mit einer Flussrate von 0,5ml/min und einem linearen Gradienten von 10-300mM NaCl. **b)** (12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Zeigt einige ausgewählte Fraktionen des Säulenlaufes. Die Spuren sind mit den Fraktionsnummern versehen, die auch als Punkt in Elutionsprofil a) eingezeichnet sind.

5.1.2 Klonierung des Vinculins aus Huhn

Das Hühner-Vinculin wurde kloniert, um eine Klonierungsstrategie für die Amplifikation des Puten-Vinculins zu etablieren. Des Weiteren wurde dieses auch zur Protein-Charakterisierung verwendet.

Für die Klonierung des gesamten Vinculins aus Huhn, standen als Ausgangsmaterial embryonale Hühner-Fibroblasten zur Verfügung. Die RNA wurde mittels eines Kits isoliert und durch die reverse Transkriptase (OmniScript) in cDNA umgeschrieben und diese diente als Template. Die Primer wurden nach der bekannten Sequenz des Huhnes (Nr.: NM_205441, siehe Anhang 9.4.1) gestaltet.

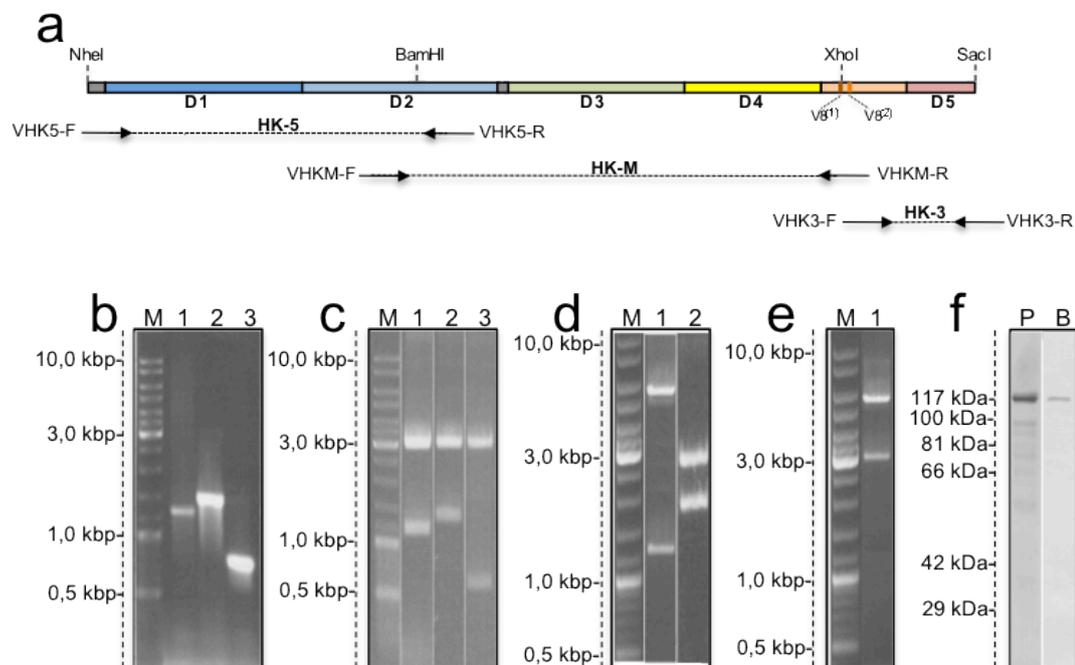


Abbildung 11: Klonierung von Vinculin (Huhn).

Auf der Spur M von b), c), d) und e) ist der Marker GenRuler Ladder Mix aufgetragen. a) Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung des Vinculins, sowie die Klonierungsstrategie. b) (1%iges Agarosegel, Ethidiumbromid-Färbung) Dieses Agarosegel zeigt die Amplifikate. Die Spur 1 zeigt das Amplifikat HK-5, Spur 2 zeigt das Amplifikat HK-M und Spur 3 zeigt das Amplifikat HK-3 des Vinculins. c) (1%iges Agarosegel, Ethidiumbromid-Färbung) Dieses Agarosegel zeigt den Restriktionsanalysen der ligierten Amplifikate des pGEM[®]T-Easy Vektors mit EcoRI. Die Spur 1 zeigt den pGEM[®]T-Easy/HK-5 Vektor, Spur 2 zeigt den pGEM[®]T-Easy/HK-M Vektor und Spur 3 den Restriktionsverdau von pGEM[®]T-Easy/HK-3 Vektor. d) (0,8%iges Agarosegel, Ethidiumbromid-Färbung) Das Agarosegel zeigt einen analytischen Restriktionsverdau. Die Spur 1 zeigt den Restriktionsverdau mit NheI/SacI vom pET100/HK-5 Vektor, Spur 2 zeigt den Restriktionsverdau mit EcoRI vom pGEM[®]T-Easy/HK-M3 Vektor. e) (0,8%iges Agarosegel, Ethidiumbromid-Färbung) In diesem Agarosegel ist die analytische Spaltung von pET100/HK mit NheI/SacI gezeigt. f) In der Spur P (12% SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt) zeigt das gereinigte Vinculin. In der Spur B (Western-Blot-Analyse, Antikörper hVin1, kontinuierliches 12%iges SDS-Polyacrylamidgel) zeigt ein Western-Blot des Vinculins.

Durch den Primer VHK5-F wurde am 5`-Ende eine NheI Restriktionsschnittstelle und mit Primer VHK3-R am 3`-Ende eine SacI Restriktionsschnittstelle eingefügt. In der Abbildung 11b sind die drei verschiedenen Amplifikate dargestellt, die in den pGEM[®]T-Easy-Vektor ligiert wurden. Die Amplifikate wurden für die Ermittlung der cDNA Sequenz im pGEM[®]T-Easy-Vektor sequenziert und entsprechen der Originalsequenz. Zur Klonierung des gesamten Vinculin-Konstruktes wurden die einzelnen Fragmente nacheinander ligiert (Abbildung 11d-e). Hierzu wurde das Fragment HK-5 über NheI/SacI in den pET100-Vektor ligiert. Das Fragment HK-3 wurde über XhoI/SacI in den pGEM[®]T-Easy/HK-M-Vektor ligiert. Abschließend wurde das Fragment HK-M3 über BamHI/SacI in den pET100/HK-5-Vektor ligiert.

Das Vinculin wurde dahingehend kloniert, dass es N-Terminal einen His-Tag trägt. Nach einer Affinitätsaufreinigung wurde das Vinculin (rHV) SDS-Polyacrylamidgel rein gewonnen und konnte durch den Antikörper hVin1 detektiert werden (Abbildung 11f).

5.1.3 Klonierung und Expression von Vinculin aus Pute

Für die Charakterisierung des rekombinanten mit dem nativen Vinculin und für weiterführende Protein-Protein-Wechselwirkungsstudien zwischen Vinculin und Aktin wurde rekombinantes Puten-Vinculin benötigt.

5.1.3.1 Identifizierung der Vinculin Puten cDNA Sequenz

Für die Klonierung des gesamten Vinculins, stand als Ausgangsmaterial Glattmuskelgewebe des Putenkaumagens zur Verfügung. Die isolierte mRNA (4.2.1) wurde durch die reverse Transkriptase (OmniScript) in cDNA umgeschrieben (4.2.2). Die transkribierte cDNA wurde zur Klonierung des Vinculins verwendet. Hierzu wurden drei separate PCRs (vgl. Abbildung 11a) amplifiziert, wofür die etablierten Primer des Huhnes verwendet wurden. In der Abbildung 12a sind die drei verschiedenen Amplifikate dargestellt. Die Amplifikate wurden wie bei der Klonierung des Hühner-Vinculins in den pGEM[®]T-Easy-Vektor ligiert und sequenziert.

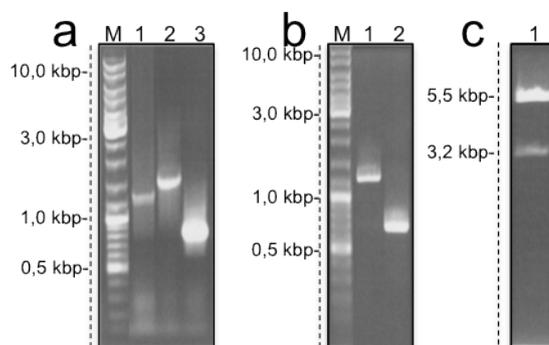


Abbildung 12: Amplifikate von Puten-Vinculin.

a) (1%iges Agarosegel, Ethidiumbromid-Färbung) Dieses Agarosegel zeigt die Amplifikate. Auf der Spur M ist der Marker GenRuler Ladder Mix aufgetragen. Die Spur 1 zeigt das Amplifikat PK-5, Spur 2 zeigt das Amplifikat PK-M und Spur 3 zeigt das Amplifikat PK-3 des Vinculins. **b)** (1%iges Agarosegel, Ethidiumbromid-Färbung) Dieses Agarosegel zeigt die Amplifikate der Basen-veränderten Puten-Fragmente. Auf der Spur M ist der Marker GenRuler Ladder Mix aufgetragen. Die Spur 1 zeigt das Amplifikat PK-M und Spur 2 zeigt das Amplifikat PK-3 des Vinculins. **c)** (1%iges Agarosegel, Ethidiumbromid-Färbung) Dieses Agarosegel zeigt einen Restriktionsanalysen mit NheI/SacI von pET100/PV-Vektor des fertig klonierten Puten-Vinculins.

5.1.3.3 Klonierung des Puten-Vinculins

Zur Klonierung des gesamten Vinculin-Konstruktes wurde die Base T²⁵⁴⁷→C ausgetauscht, um eine XhoI-Restriktionsschnittstelle zu erhalten. Dieser Austausch erfolgte über Primer (vgl. 4.2.3). Die Amplifikate wurden in den pGEM[®]T-Easy-Vektor ligiert (Abbildung 12b) und die gesamte cDNA wurde, wie in der Klonierung zuvor beschrieben (Klonierung des Huhnes 5.1.2), aus den einzelnen Fragmenten in den Vektor pET100 ligiert. Das Vinculin wurde dahingehend kloniert, dass es N-terminal einen His-Tag trägt, um die Aufreinigung des Proteins zu erleichtern (vgl. Abbildung 14a). Der Expressionsstamm BL21(DE) wurde mit dem Vektor pET100/PV transfiziert (4.2.9) und das Protein exprimiert, wie in den Methoden (4.2.15) beschrieben.

5.1.3.4 Aufreinigung des rekombinanten Puten-Vinculins

Um das rekombinante Vinculin zu reinigen wurde eine Ni-TED-Matrix verwendet. Durch diese Affinitätschromatographie-Säule konnte das Protein SDS-Gel rein mit einer apparenten Molmasse von 120kDa isoliert werden.

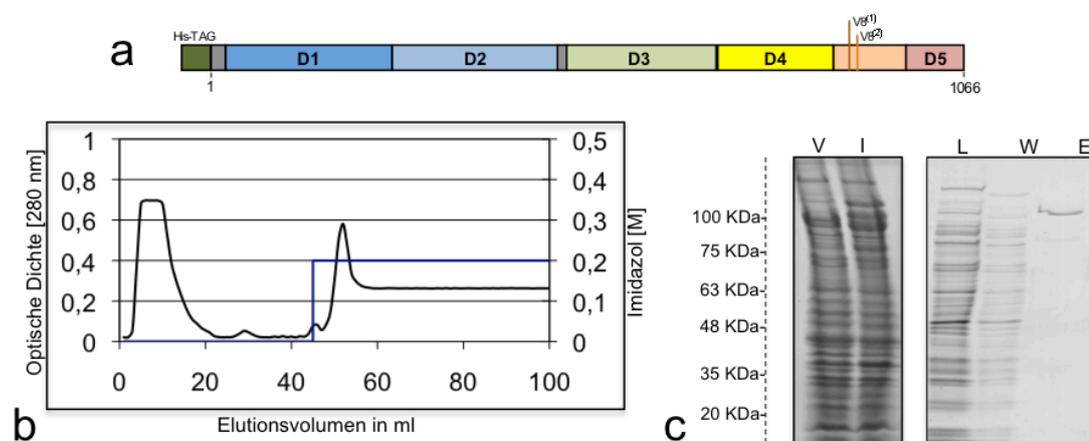


Abbildung 14: Expression und Reinigung von Puten-Vinculin

a) Schematische Darstellung des Vinculin-Konstruktes rPV (D1-D5 / AS 1-1066). **b)** (Elutionsprofil, Affinitätsmatrix: Ni-TED) Zeigt das Elutionsprofil der rekombinanten Vinculin-Präparation. Aufgetragen ist die optische Dichte gegen das Elutionsvolumen. Des Weiteren ist die Konzentration von Imidazol angegeben. Es wurde eine 4ml Ni-TED Säule, mit einer Flussgeschwindigkeit von 1ml/min verwendet. **c)** (12% SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt) Das SDS-Gel zeigt in Spur V das Bakterienlysate vor und die Spur I das Bakterienlysate nach der Induktion. In der Spur L ist die aufgetragene Probe, Spur W zeigt den Wasch-Puffer und in Spur E ist die Elution der Säule mit 200mM Imidazol aufgetragen.

5.1.4 Klonierung und Expression verschiedener Vinculin-Konstrukte

Zur Charakterisierung einer Wechselwirkung zwischen G-Aktin und Vinculin-Kopf, sowie einer verstärkenden G-Aktinpolymerisation wurden gezielt Konstrukte von Vinculin-Kopf und Vinculin-Schwanz hergestellt, die vom C-Terminus oder vom N-Terminus in unterschiedlichem Maß verkürzt wurden. Durch diese Deletionsmutanten wurde die Wechselwirkung mit Aktin untersucht. Es wurden gezielt Vinculin-Kopf-Konstrukte hergestellt, die sich in der Länge der Linker-Region, insbesondere der V8-Spaltstellen unterschieden. Des Weiteren wurden Modellkonstrukte des aktivierten Vinculins hergestellt, in dem die Domänen 1 und 1-2 deletiert wurden. In der Abbildung 15 ist eine Übersicht der verwendeten Fragmente dargestellt.

Für die Amplifikation dieser Konstrukte wurde der pET100/PV-Vektor als Template verwendet. Für diese Aufgabe wurden Primer gestaltet, die eine NheI Restriktionsschnittstelle und ein Startcodon am 5`-Ende, sowie ein Stopcodon gefolgt von einer SacI Restriktionsschnittstelle einfügen (vgl. 4.2.3). Die rekombinanten Konstrukte wurden in löslicher Form in den Expressionsbakterien BL21(DE) CodonPlus angereichert (vgl. 4.2.15), und wurden aus dem Überstand des Bakterienlysates isoliert (vgl. 4.4.14). Die chromatographische Aufreinigung der Konstrukte erfolgt über eine Ni-NTA- (vgl. 4.4.15.5) oder einer GST-Agarose-Affinitätssäule (vgl. 4.4.15.4). Wenn nötig wurden diese noch einmal auf einer MonoQTM-Säule gereinigt, um die Konstrukte möglichst elektrophoretisch rein zu bekommen. Eine Muster-Aufreinigung des Konstruktes Vh¹⁻⁸⁵⁷ wird im nächsten Abschnitt (5.1.4.5) gezeigt.

Einige Konstrukte konnten in einem 50%igen Glycerin B10-Puffer bei -80°C gelagert werden. Jedoch zeigten die kleineren Konstrukte und die einen GST-Tag enthalten nach diesem Prozess keine oder nur eine verminderte Aktivität. Diese Konstrukte wurden sterilfiltriert und konnten bis zu zwei Wochen auf Eis gelagert werden.

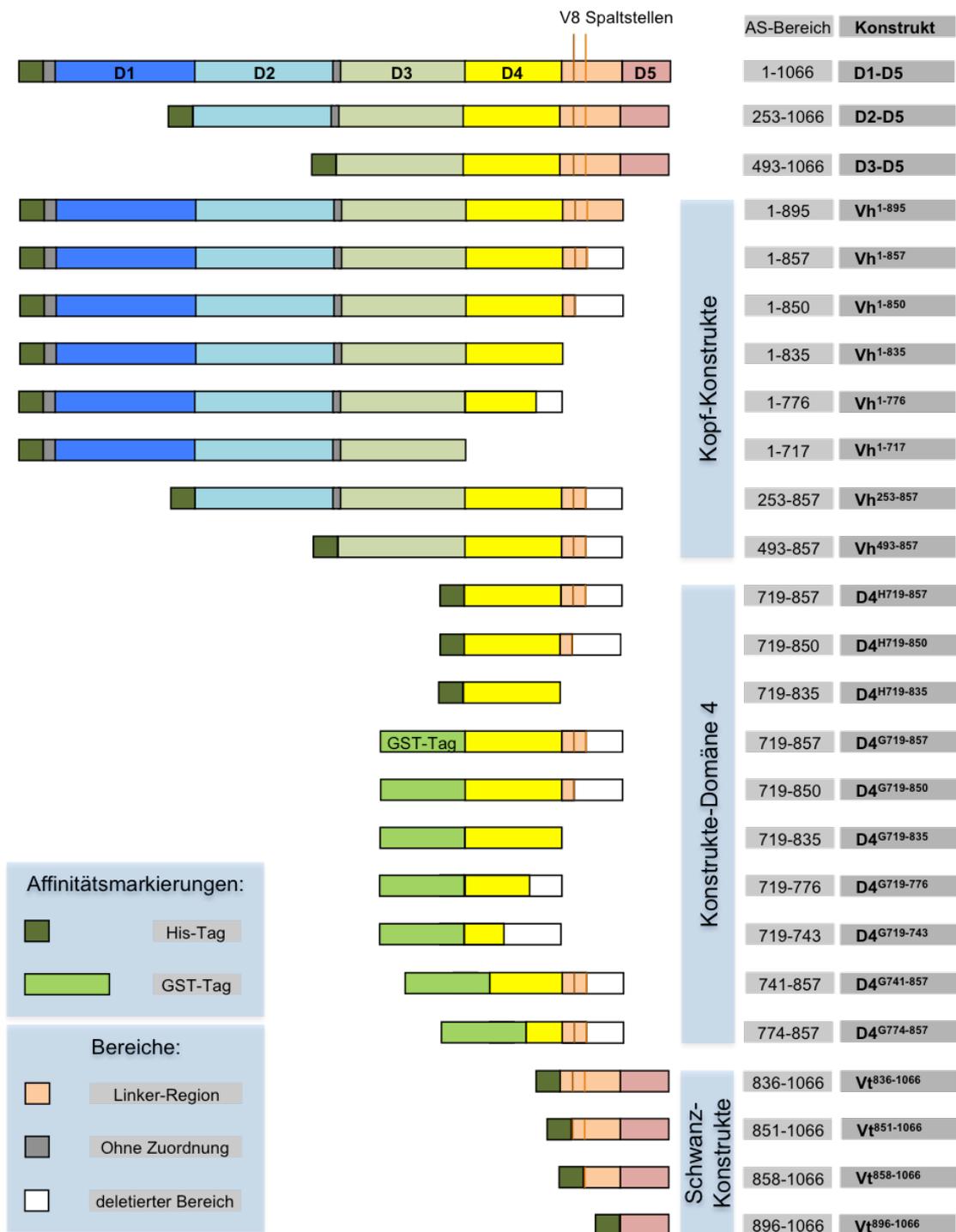


Abbildung 15: Übersicht der Puten-Vinculin Konstrukte

In der Abbildung sind die jeweiligen Puten-Vinculin Konstrukte dargestellt. In der Darstellung des kompletten Puten-Vinculins D1-D5 sind die jeweiligen Domänen nummeriert (D1: 6-252, D2: 253-485, D3: 493-717, D4: 719-835, D5: 896-1066 nach [Bakolitsa et al., 2004]).

5.1.4.1 Vinculin-Kopf-Konstrukte unter Einbeziehung der Linker-Regionen

Die Vinculin-Kopf-Konstrukte der Linker-Region, wurden nach bekannten Spaltstellen der Endoproteinase Glu-C (V8-Protease) ausgewählt.

In der Abbildung 16a) sind die Konstrukte des Vinculin-Kopfes schematisch dargestellt. Die Amplifikate der Konstrukte Vh^{1-717} , Vh^{1-776} , Vh^{1-835} , Vh^{1-850} , Vh^{1-857} & Vh^{1-895} wurden über BamHI/SacI und die Konstrukten $Vh^{253-857}$ & $Vh^{493-857}$ über NheI/SacI in einen zuvor gespaltenen pET100/PV-Vektor ligiert. In der Abbildung 16b) sind die Expressionskontrollen gezeigt und in c) ist der Reinheitsgrad der Konstrukte dargestellt. Alle Konstrukte außer von Vh^{1-850} und Vh^{1-895} sind elektrophorese-rein. Das Konstrukt Vh^{1-857} konnte nicht optimal von den restlichen Proteinen und Abbauprodukten getrennt werden. Einen möglichen Grund dafür stellt der lange hydrophobe Linkerbereich dar. Es konnte auch beobachtet werden, dass die chromatographische Trennung mit Zunahmen der Linker-Region erschwert wurde.

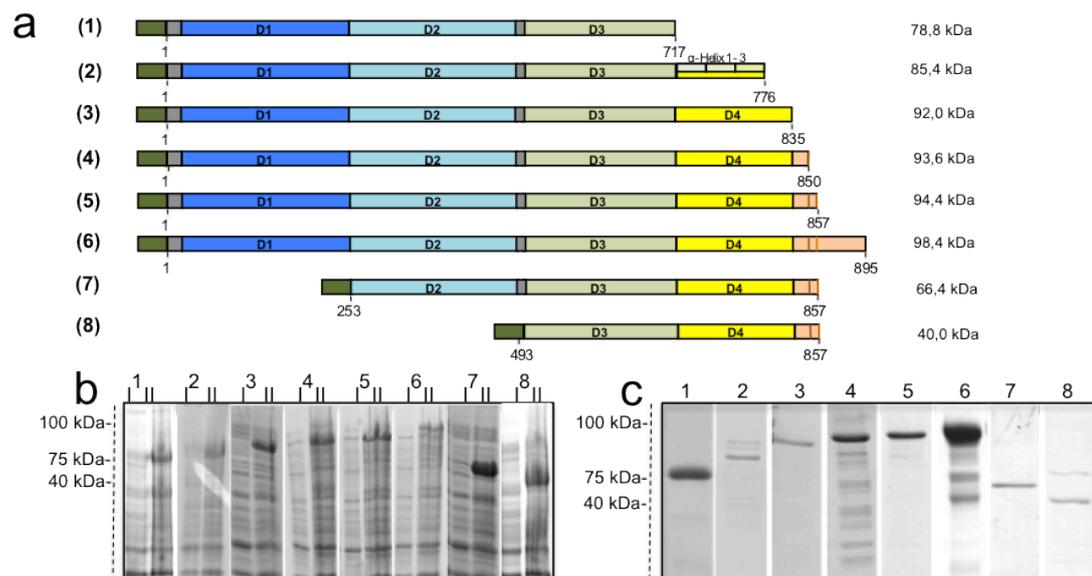


Abbildung 16: Klonierung und Expression der Vinculin-Kopf-Konstrukte

a) Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Konstrukte (1) Vh^{1-717} , (2) Vh^{1-776} , (3) Vh^{1-835} , (4) Vh^{1-850} , (5) Vh^{1-857} , (6) Vh^{1-895} , (7) $Vh^{253-857}$ und (8) $Vh^{493-857}$. **b)** (12% SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt) Diese unterschiedlichen SDS-Gels zeigen die Expressionskontrolle der in Abb. a vorgestellten Konstrukte in den Spuren 1-8, wobei die Spur I das Bakterienlysat vor der Expression und die Spur II das Bakterienlysat nach der Expression zeigt. **c)** (12% SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt) Diese unterschiedlichen SDS-Gele zeigen in den Spuren 1-8 die gereinigten Konstrukte.

5.1.4.2 Konstrukte der Domäne 4 unter Einbeziehung der Linker-Region

Wie bei den Vinculin-Kopf-Konstrukten (5.1.4.1), wurden auch bei den Konstrukten der Domäne 4 die bekannten V8-Protease-Spaltstellen ausgewählt, sowie die Domäne 4 N- und C-terminal verkürzt. Die Abbildung 17a) zeigt eine schematische Übersicht der hergestellten Domäne 4 und Konstrukte (nicht dargestellt $D4^{G719-835}$, $D4^{G719-850}$). Für die Klonierung wurden die Amplifikate über NheI/SacI in den Expressionsvektor pET100-Vektor und pET100-GST-Vektor ligiert. Die Konstrukte der Domäne 4 ($D4^{H719-835}$, $D4^{H719-850}$, $D4^{H719-857}$, $D4^{G719-835}$, $D4^{G719-850}$, $D4^{G719-857}$, $D4^{G719-776}$, $D4^{G719-743}$, $D4^{G741-857}$ & $D4^{G774-857}$) konnten nur bedingt durch den His-Tag gereinigt werden, jedoch liegt das exprimierte Protein im Überschuss vorhanden vor. Durch einen GST-Tag konnten diese Konstrukte elektrophoretisch rein hergestellt werden. Die hergestellten Konstrukte wurden sterilfiltriert und konnten nur sehr begrenzt auf Eis gelagert werden, da diese Konstrukte höhere Aggregate bildeten und als farbloses Sediment ausfielen.

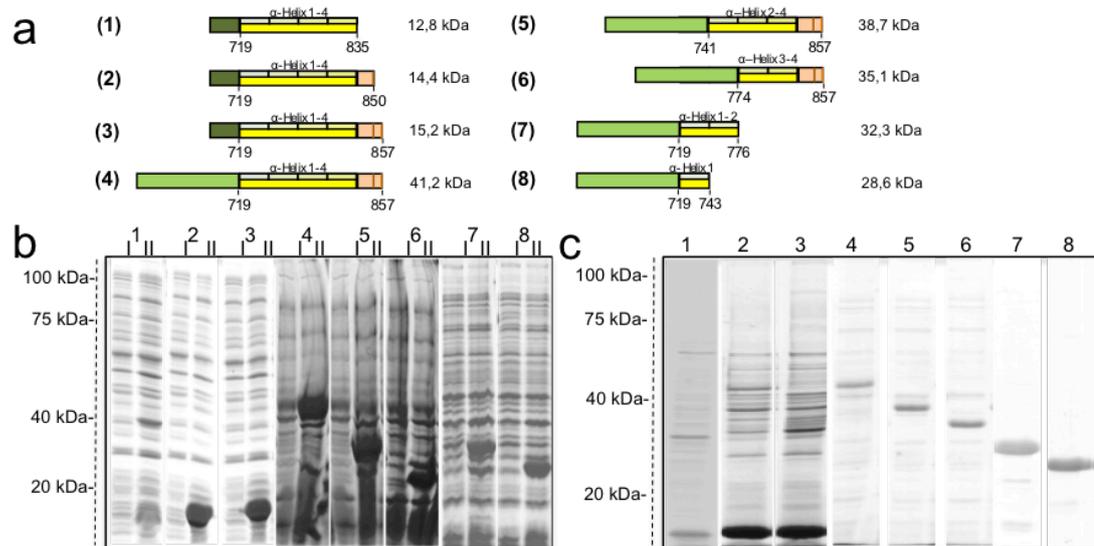


Abbildung 17: Klonierung und Expression der Domäne 4 Konstrukte

a) Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Konstrukte (1) $D4^{H719-835}$, (2) $D4^{H719-850}$, (3) $D4^{H719-857}$, (4) $D4^{G719-835}$, (5) $D4^{G719-850}$, (6) $D4^{G719-857}$, (7) $D4^{G719-776}$ & (8) $D4^{G719-743}$. **b)** (12% SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt) Diese unterschiedlichen SDS-Gele zeigen die Expressionskontrolle der in a) vorgestellten Konstrukte in den Spuren 1-8, wobei die Spur I das Bakterienlysat vor der Expression und die Spur II das Bakterienlysat nach der Expression zeigt. **c)** (12% SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt) Diese unterschiedlichen SDS-Gele zeigen in den Spuren 1-8 die gereinigten Konstrukte.

5.1.4.3 Konstrukte der Domäne D5 unter Einbeziehung der Linker-Region (Vinculin-Schwanz)

Wie bei den Konstrukten des Vinculin-Kopfes (5.1.4.1) und der Domäne 4 (5.1.4.2) wurden die bekannten V8-Protease-Spaltstellen ausgewählt. Es wurden außerdem Konstrukte mit der gesamten Linker-Region, sowie nur die Domäne 5 hergestellt (Abbildung 18a).

Für die Klonierung wurden die Amplifikate über NheI/SacI in den Expressionsvektor pET100-Vektor ligiert. Die Konstrukte haben eine Größe um 20kDa. In der Abbildung der Expressionskontrolle erkennt man einen leichten Unterschied zwischen den einzelnen Größen, der theoretisch von 26kDa bis 18kDa variieren kann. Die gereinigten Konstrukte der Domäne 5 sind, bis auf das Konstrukt $Vt^{896-1066}$, elektrophoretisch rein. Die vier Konstrukte konnten nur sehr begrenzt auf Eis gelagert werden, da auch die Konstrukte des Vinculin-Schwanzes Aggregate bildeten.

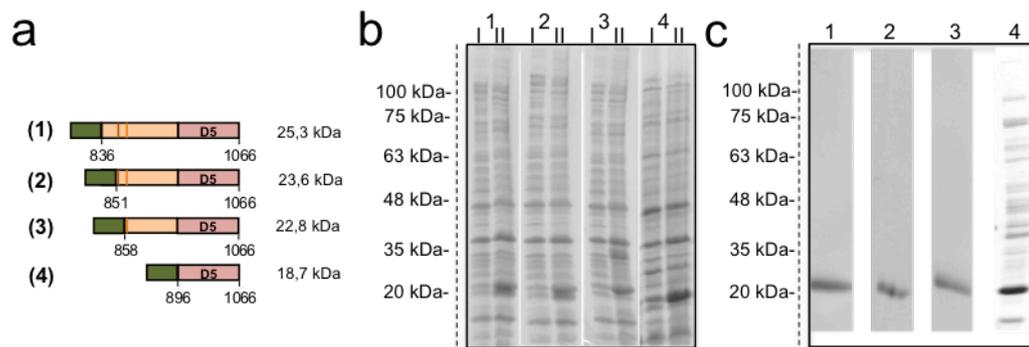


Abbildung 18: Klonierung und Expression der Vinculin-Schwanz-Konstrukte

a) Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Konstrukte (1) $Vt^{836-1066}$, (2) $Vt^{851-1066}$, (3) $Vt^{858-1066}$ und (4) $Vt^{896-1066}$. **b)** (12% SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt) Diese unterschiedlichen SDS-Gele zeigen die Expressionskontrolle der in a) vorgestellten Konstrukte in den Spuren 1-4, wobei die Spur I das Bakterienlysat vor der Expression und die Spur II das Bakterienlysat nach der Expression zeigt. **c)** (12% SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt) Diese unterschiedlichen SDS-Gele zeigen in den Spuren 1-4 die gereinigten Konstrukte.

5.1.4.4 Vinculin-Modell-Konstrukte („geöffnetes“ Vinculin)

Es wurden N-terminal-verkürzte Konstrukte des Vinculins hergestellt, indem schrittweise die Domänen deletiert wurden. Eine schematische Übersicht der Konstrukte ist in Abbildung 19a) dargestellt. Die Modell-Konstrukte dienen modellhaft für das geöffnete Vinculin (D2-D5 & D3-D5). Das Fehlen der Domäne 1 begünstigt die offene Konformation des Vinculins, so dass es zu keiner Kopf und Schwanz Interaktion kommt und die Bindestellen in der Linker-Region frei vorliegen.

Für die Klonierung wurden die Amplifikate über NheI/SacI in den Expressionsvektor pET100-Vektor ligiert. Die gereinigten Konstrukte sind nahezu elektrophoretisch rein. Die Modell-Konstrukte konnten nur sehr begrenzt auf Eis gelagert werden, da die Konstrukte nach einiger Zeit über den Schwanz höhere Aggregate bildeten.

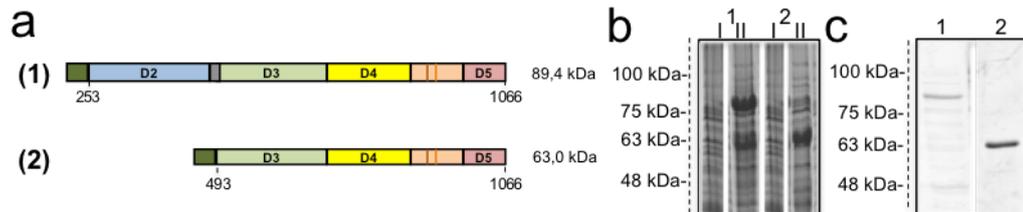


Abbildung 19: Klonierung und Expression von Vinculin-Modell-Konstrukten

a) Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Konstrukte D2-D5 und D3-D5. **b)** (12% SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt) Diese unterschiedlichen SDS-Gele zeigen die Expressionskontrolle der in a) vorgestellten Konstrukte in den Spuren 1 und 2, wobei die Spur I das Bakterienlysat vor der Expression und die Spur II das Bakterienlysat nach der Expression zeigt. **c)** (12% SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt) Diese unterschiedlichen SDS-Gele zeigen in den Spuren 1 und 4 die gereinigten Konstrukte.

5.1.4.5 Aufreinigung des rekombinanten Vinculin-Kopfes mit Ni-NTA

In der Abbildung 20a ist das Elutionsprofil dargestellt. Das Protein eluiert von der Ni-NTA-Agarose bei Zugabe von 100mM Imidazol von der Matrix. Um die Reinheit des Eluats zu verbessern, wurde die Matrix mit 5-10mM Imidazol gewaschen, wodurch das Protein bereits in größeren Mengen eluiert. Somit wurde auf einen Waschschrift verzichtet (nicht dargestellt).

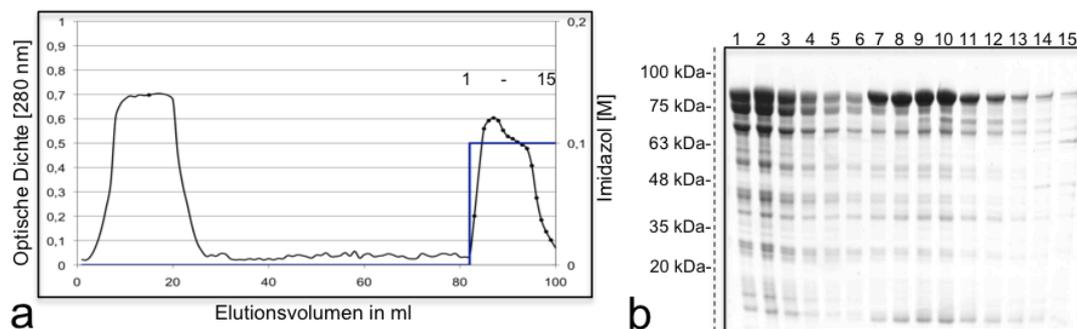


Abbildung 20: Elutionsprofil und SDS-Gel der rekombinanten Vinculin-Kopf-Präparation

a) (Elutionsprofil, Affinitätsmatrix: Ni-NTA-Agarose) Die Abbildung zeigt das Elutionsprofil der rekombinanten Vinculin-Kopf (Vh^{1-857}) Präparation und die Imidazol-Konzentration wurde angegeben. Aufgetragen ist eine optische Dichte von 280nm gegen das Volumen. Der Säulenlauf wurde mit einer Flussrate von 2ml/min betrieben. **b)** (12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Die Abbildung zeigt einige ausgewählte Fraktionen des Säulenlaufes. Die Spuren sind mit den Fraktionsnummern versehen. Die einzelnen Fraktionen sind auch als Punkt im Elutionsprofil a) gekennzeichnet.

Die Fraktionen 8-15 (Abbildung 20b) wurden vereint, gegen B10-Puffer dialysiert und auf eine MonoQTM appliziert. Das Konstrukt Vh¹⁻⁸⁵⁷ eluiert im Bereich von 220-360mM NaCl, wie in der Abbildung 21a gezeigt. Das Konstrukt Vh¹⁻⁸⁵⁷ konnte durch diese Reinigungsfolge elektrophoretisch rein hergestellt werden. Diese Aufreinigung steht als Beispiel für die weiteren Konstrukte.

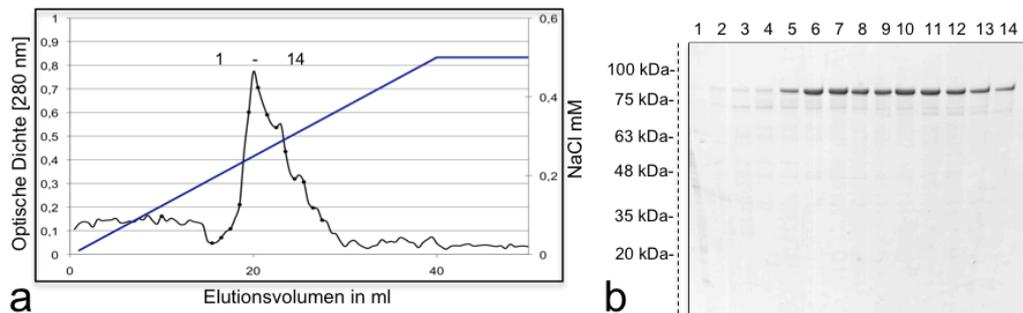


Abbildung 21: Elutionsprofil und SDS-Gel der rekombinanten Vinculin-Kopf-Präparation

a) (Elutionsprofil, Anionenaustauscher: MonoQTM-Säule) Die Abbildung zeigt das Elutionsprofil der rekombinanten Vinculin-Kopf (Vh¹⁻⁸⁵⁷) Präparation und der Gradient ist im Elutionsprofil angegeben. Aufgetragen ist eine optische Dichte von 280nm gegen das Volumen. Der Säulenlauf wurde mit einem linearen Gradienten von 10-500mM NaCl, mit einer Flussrate von 0,5ml/min gestartet. **b)** (12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Die Abbildung zeigt einige ausgewählte Fraktionen des Säulenlaufes. Die Spuren sind mit den Fraktionsnummern versehen. Die einzelnen Fraktionen sind auch als Punkt im Elutionsprofil a) gekennzeichnet.

5.2 Vergleichende Charakterisierung des nativen und rekombinanten Vinculins

Bei der vergleichenden Charakterisierung zwischen den nativen und rekombinanten Vinculinen wurde der Einfluss von rekombinanten Chimären-Proteinen, die einen N-terminal gelegenen Affinitätstag tragen, verglichen.

Die nativen und rekombinanten Vinculin, sowie die Vinculin-Kopf Konstrukte (Vh¹⁻⁸⁵⁰ und Vh¹⁻⁸⁵⁷) konnten durch einen monoklonalen Antikörper hVin1 in einer Immundetektion spezifisch nachgewiesen werden, außerdem waren die molekularen Größen dieser Konstrukte identisch. Dabei betrug die molare Masse des Vinculins 118kDa und die des Vinculin-Kopfes 93kDa.

5.2.1 CD-Spektroskopie von Vinculinen

Um eine Übersicht darüber zu gewinnen, ob der Anteil an Sekundärstruktur bei den Konstrukten, den der nativen Proteinen entspricht, wurden das native und das rekombinante Vinculin sowie die Vinculin-Kopf Konstrukte durch CD-Spektroskopie analysiert. Es sollte sichergestellt werden, dass die Struktur und Faltung des

rekombinanten und des nativen Vinculins möglichst gleich sind, und dass der N-terminale fusionierte Tag keinen Einfluss auf die Struktur zeigt. Hierzu wurden die Konstrukte in einem Wellenbereich von 190 bis 260nm in einem CD-Spektrometer vermessen (4.4.11).

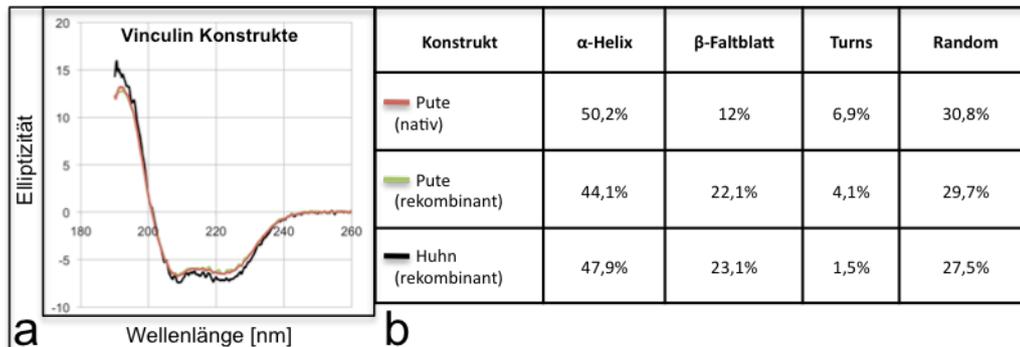


Abbildung 22: CD-Spektrum des Vinculins

In der Abbildung **a**) sind die CD-Spektren dargestellt. Die Elliptizität ist gegen die Wellen 190 bis 260nm aufgetragen. Dargestellt ist das gesamte Vinculin, mit den Proteinen nPV, rPV und rHV. **b**) Sowie die Sekundärstrukturen der einzelnen Proteine in einem prozentualen Verhältnis nach der Methode von (4.4.11).

In Abbildung 22 sind die CD-Spektren des gesamten Vinculins gezeigt, sowie die Anteile der jeweiligen Sekundärstrukturen sind aufgeführt. Man erkennt, dass alle CD-Spektren denselben Kurvenverlauf aufweisen. Die Verteilung der Sekundärstruktur ist sehr ähnlich, aber nicht identisch. Es liegt ein Unterschied in der β -Faltblattstruktur vor, der Anteil der rekombinanten Proteine ist um 10% höher als bei dem nativen Protein. Der α -Helixanteil der Proteine ist nahezu gleich.

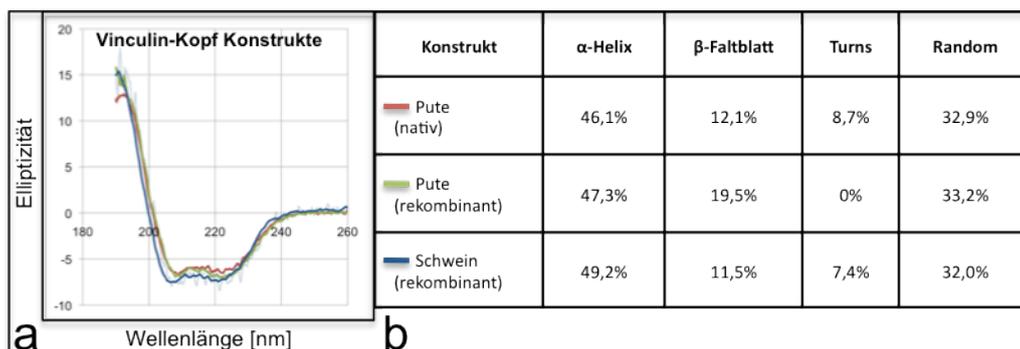


Abbildung 23: CD-Spektrum des Vinculin-Kopfes

In der Abbildung **a**) sind die CD-Spektren dargestellt. Die Elliptizität ist gegen die Wellen 190 bis 260nm aufgetragen. Dargestellt ist das gesamte Vinculin, mit den Proteinen nPV, rPV und rHV. **b**) Sowie die Sekundärstrukturen der einzelnen Proteine in einem prozentualen Verhältnis nach der Methode von (4.4.11).

In dieser Abbildung 23 sind die CD-Spektren des Vinculin-Kopfes gezeigt. Man erkennt, dass alle CD-Spektren einen identischen Kurvenverlauf aufweisen. Auch hier ist die Verteilung der Sekundärstruktur im Bereich der α -Helix und β -Faltblattstruktur sehr ähnlich. Es gibt Unterschiede in den Sekundäranteilen zwischen dem rekombinanten und nativen Vinculin, besonders unterscheiden sich der β -Faltblattstrukturanteil. Der native und rekombinante Vinculin-Kopf zeigten ebenfalls Unterschiede im β -Faltblattstrukturanteil, jedoch geringer als beim Vinculin. Der α -Helixstrukturanteil des Vinculins und des Vinculin-Kopfes sind relativ gleich, im Vergleich zwischen den nativen und rekombinanten Proteinen. Vinculin besteht hauptsächlich aus α -Helices und nur zu einem geringen Teil aus β -Faltblattstrukturen [Bakolitsa et al., 2004]. Ein struktureller Unterschied der Proteine kann durch die eingesetzten Proben begründet werden. Diese waren entweder zu einem geringen Teil verunreinigt oder ein Teil des Proteins lag als denaturierte Form vor, da sich bei der Expression stets ein leichter Abbau des Proteins zeigte.

Aufgrund der identischen CD-Spektren und des gleichen α -Helixanteil kann davon ausgegangen werden, dass die rekombinanten Proteine, der Vinculin-Kopf und das gesamte Vinculin die gleiche Proteinstruktur aufweisen.

5.2.2 Der Effekt von Vinculin und Vinculin-Konstrukten auf die Aktinpolymerisation

Zur Charakterisierung der möglichen Aktinbindung von Vinculin-Konstrukten wurde zunächst der Effekt auf die Nukleation der Aktinpolymerisation gemessen. Dazu wurde die Aktivität der nativen Proteine (Vinculin, Vinculin-Kopf und Vinculin-Schwanz) mit den entsprechenden Konstrukten verglichen.

Um die Basisaktivität der einzelnen Konstrukte zu bestimmen, wurde die Aktinpolymerisation fluorometrisch im Spektralfluorometer für 30min verfolgt.

Auf der Abbildung 24 sind die einzelnen fluorometrisch vermessenen Aktin-Polymerisationsansätze der Konstrukte des Vinculin-Kopfes, das gesamte Vinculin und der Vinculin-Schwanz in einem molaren Verhältnis von 1:20 dargestellt. Der Vergleich zwischen der Aktin-Kontrolle und aller Vinculin-Kopf-Konstrukte zeigt, dass diese eine aktinnukleationsverstärkende Eigenschaft besitzen. Das gesamte Vinculin zeigte eine gewisse nukleationsverstärkende Eigenschaft, die jedoch nicht so

stark ist wie bei dem Vinculin-Kopf. Die Unterschiede zwischen nativem und rekombinalem Protein sind nur gering, wie die intakte Funktionalität der Konstrukte bestätigt.

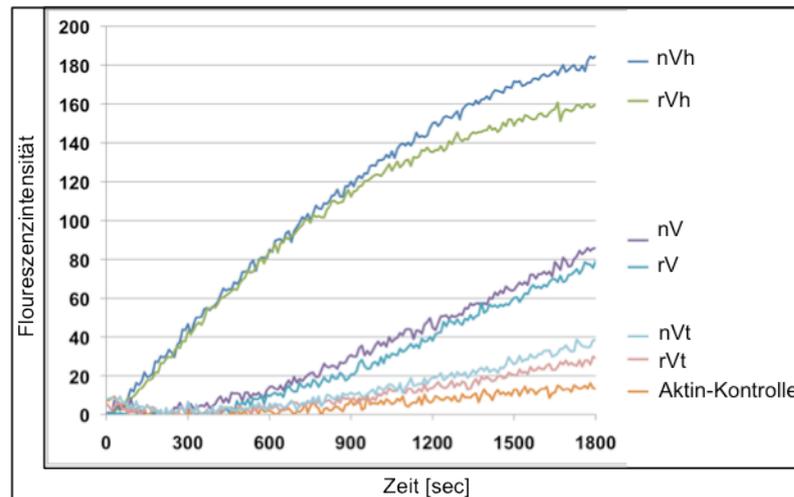


Abbildung 24: Vergleichende Nukleationsmessung der unterschiedlichen Vinculin-Konstrukte

In der Abbildung sind die einzelnen Messergebnisse der Vinculin-Konstrukte nativer Vinculin-Kopf (nVh), rekombinanter Vinculin-Kopf (rVh), natives Vinculin (nV), rekombinantes Vinculin (rV), nativer Vinculin-Schwanz (nVt), rekombinanter Vinculin-Schwanz $Vt^{358-1066}$ (rVt) und die Aktin-Kontrolle dargestellt. In den Diagrammen ist die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit [sec] aufgetragen. Für die Fluorometriemessung wurde ein Polymerisationsansatz bestehend aus 0,4mg/ml Aktin mit 10% Pyren-Aktin und das zu analysierende Konstrukt in einem molaren Verhältnis von 1:20 mit 100mM KCl gestartet. Als Aktin-Kontrolle der Polymerisation diente allein der Polymerisationsansatz.

Dagegen zeigen die Vinculin-Schwanz-Konstrukte im Vergleich mit der Aktin-Kontrolle nur eine sehr geringe Nukleationseigenschaft. Hinsichtlich der Basisaktivität zwischen den rekombinanten und dem nativen Proteinen besteht nur ein geringfügiger Aktivitätsunterschied.

5.3 Detaillierte Charakterisierung der Effekte verschiedener Vinculin-Konstrukte auf die Aktinpolymerisation

Für die funktionelle Charakterisierung wurden die zuvor beschriebenen unterschiedlichen Vinculin-Konstrukte verwendet. Es wurden sowohl Konstrukte des Vinculin-Kopfes, des Vinculin-Schwanzes, sowie auch Modellkonstrukte des Proteins verwendet.

Die Charakterisierung der Vinculin-Konstrukte in Hinblick auf eine mögliche Nukleation der Aktinpolymerisation wurde durch Viskosimetrie (4.4.9.2), als auch mit einem Spektralfluorometer (4.4.9.1) untersucht. Bei dieser Methode wird die Geschwindigkeit der Aktinpolymerisation gemessen und dadurch Rückschlüsse auf

die Zahl der Filamente bzw. Nuklei gezogen. Die Nukleation der Aktinpolymerisation bedeutet die Bildung zunächst eines binären und später eines ternären Komplexes, der einen stabilen Nukleus für ein Filament darstellt. Die beiden Verfahren unterscheiden sich in der Art des Nachweises des F-Aktins, welcher bei der Viskosität durch die sich verändernde Viskosimetrie der Lösung erfolgt und bei der Fluorometrie durch die Fluoreszenzintensität des Pyren-markierten Aktins gemessen wird.

5.3.1 Qualitative Nukleationsaktivität der Vinculin-Konstrukten

Die Eigenschaft der einzelnen Vinculin-Konstrukte in Hinblick auf eine Nukleationsverstärkung der Aktinpolymerisation wurde viskosimetrisch untersucht (4.4.9.2). Verfolgt man die Polymerisation des Aktins ohne Vinculin, so erhält man einen sigmoiden Kurvenverlauf, welchen man in die folgende Abschnitte unterteilen kann: eine Anfangsphase (Nukleationsphase / Bildung des Nukleus), eine stetige Wachstumsphase (Polymerisationsphase) und eine Endphase (stationäre Phase). Anhand einer verkürzten Nukleationsphase kann man auf eine Nukleationsaktivität schließen. Die Polymerisationsgeschwindigkeit erlaubt Rückschlüsse auf die Zahl der gebildeten Nuklei und die Höhe der stationären Phase gibt Auskunft über die Länge der entstehenden Aktin-Fragmente.

Durch die gezielten Deletionen von Domänen oder Bereichen wurde empirisch versucht die aktive Region des Vinculin-Kopfes zu identifizieren. Die Vinculin-Kopf-Konstrukte sind in C-terminal- und N-terminal-verkürzte Konstrukte aufgeteilt.

Am Ende des Kapitels befindet sich eine tabellarische Zusammenfassung der gleich vorgestellten Ergebnisse.

5.3.1.1 Vinculin-Kopf-Konstrukte

Die N-terminal (Abbildung 25) und C-terminal-verkürzten (Abbildung 26) Vinculin-Kopf-Konstrukte erreichen alle eine stationäre Phase bei einer spezifischen Viskosität von $\eta=0,5$ und zeigen einen sigmoiden Verlauf. Die Konstrukte Vh^{1-895} , Vh^{1-857} , Vh^{1-850} und Vh^{1-835} zeigen eine kürzere Lag-Phase, als die Aktin-Kontrolle. Das Konstrukt Vh^{1-835} zeigt einen geringeren Effekt. Insgesamt kann für alle Vinculin-Kopf-Konstrukte in Abbildung 25 eine Verkürzung der Lag-Phase und somit eine Verstärkung des Aktinnukleationseffektes gemessen werden.

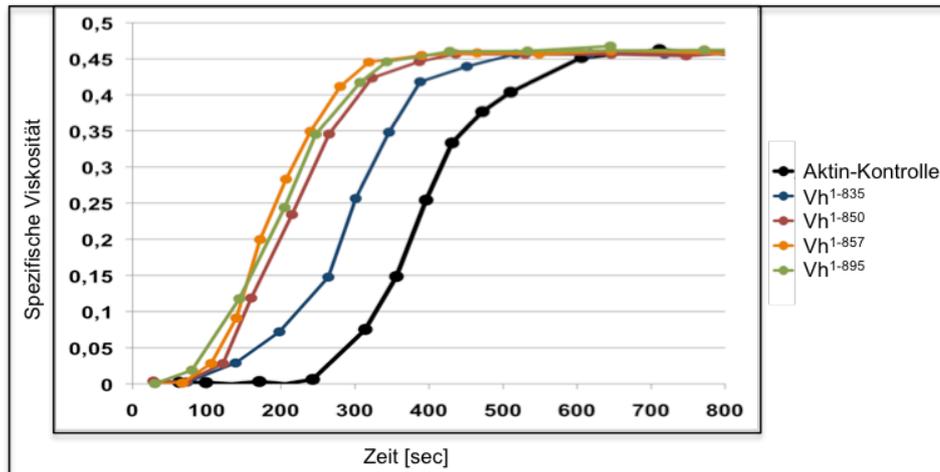


Abbildung 25: Aktivitätsanalyse der C-terminal-veränderten Kopf-Konstrukte

Die Abbildung stellt die spezifischen Viskositätskurven der Konstrukte Vh¹⁻⁸³⁵, Vh¹⁻⁸⁵⁰, Vh¹⁻⁸⁵⁷ und Vh¹⁻⁸⁹⁵ dar. Hier wurde die spezifische Viskosität gegen die Zeit aufgetragen. In der Legende sind die Namen der Konstrukte gelistet. Für die Viskositätsmessung wurde ein Polymerisationsansatz bestehend aus 1mg/ml Aktin und das zu untersuchende Konstrukt im molaren Verhältnis von 1:20 mit 100mM KCl gestartet. Als Aktin-Kontrolle der Polymerisation diente allein der Polymerisationsansatz.

Dagegen zeigen die Konstrukte Vh¹⁻⁷⁷⁶ und Vh¹⁻⁷¹⁷ (Abbildung 26) denselben Verlauf wie die Aktin-Kontrolle und sind somit inaktiv.

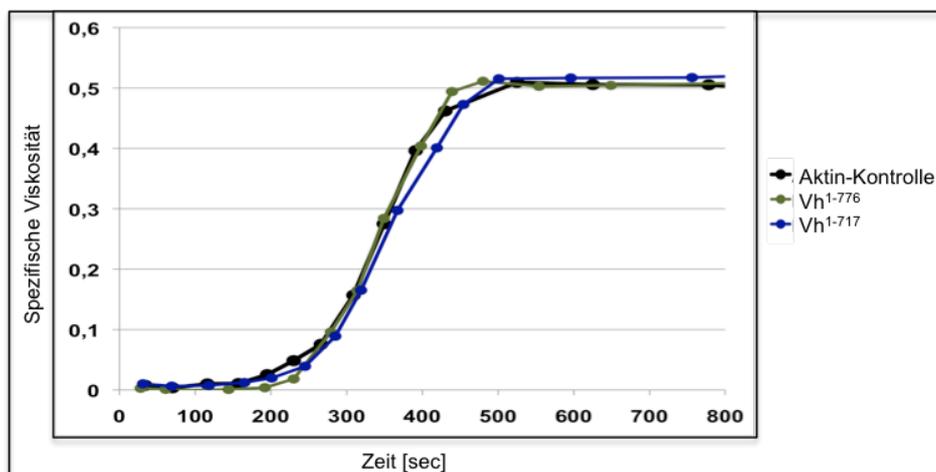


Abbildung 26: Aktivitätsanalyse der C-terminal-veränderten Kopf-Konstrukte

Die Abbildung stellt die spezifischen Viskositätskurven der Konstrukte Vh¹⁻⁷⁷⁶ und Vh¹⁻⁷¹⁷ dar. Hier wurde die spezifische Viskosität gegen die Zeit aufgetragen. In der Legende sind die Namen der Konstrukte gelistet. Die Viskositätsmessung erfolgt wie in der Abbildung 25.

Demnach sind alle Konstrukte Vh¹⁻⁸³⁵, Vh¹⁻⁸⁵⁰, Vh¹⁻⁸⁵⁷ und Vh¹⁻⁸⁹⁵, die eine komplette Domäne 4 und Bereiche der Linker-Region enthalten, aktiv. Die Konstrukte Vh¹⁻⁷⁷⁶ und Vh¹⁻⁷¹⁷ sind inaktiv.

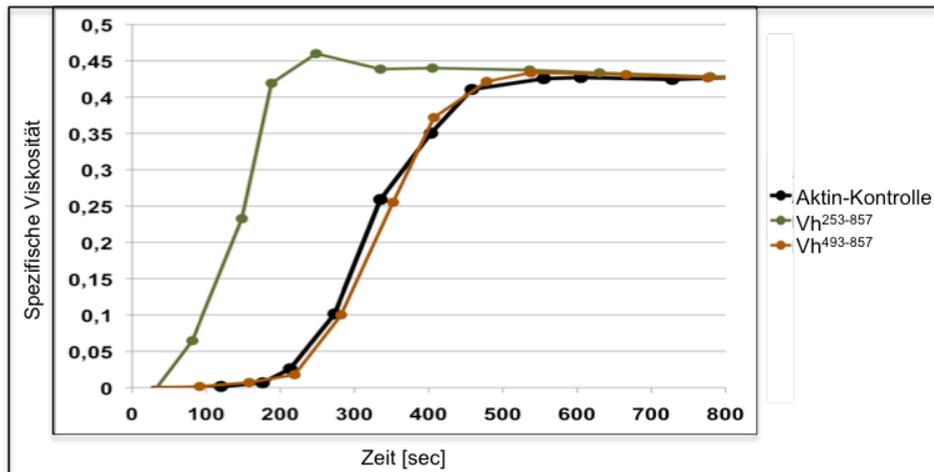


Abbildung 27: Aktivitätsanalyse der N-terminal-veränderten Kopf-Konstrukte

Die Abbildung stellt die spezifischen Viskositätskurven der Konstrukte $Vh^{253-857}$ und $Vh^{493-857}$ dar. Hier wurde die spezifische Viskosität gegen die Zeit aufgetragen. Die Viskositätsmessung erfolgt wie in der Abbildung 25.

In Abbildung 27 sind die Kurven der N-terminal verkürzten Konstrukte $Vh^{493-857}$ und $Vh^{253-857}$ dargestellt. Nur die Kurve des Konstruktes $Vh^{493-857}$ zeigt eine verkürzte Lag-Phase. Das Konstrukt $Vh^{493-857}$ zeigt den gleichen Kurvenverlauf wie die Aktin-Kontrolle und ist somit inaktiv. Kontrollexperimente mit Vinculin-Konstrukten des Schweins ($SVh^{493-835}$ und $SVh^{493-850}$) zeigten das gleiche Ergebnis (nicht abgebildet).

5.3.1.2 Vinculin-Konstrukte der Domäne 4

Die abgebildeten Kurven (Abbildung 28) zeigen einen sigmoiden Verlauf und erreichen die stationäre Phase bei $\eta=0,45$. Die Kurven der Konstrukte $D4^{H719-857}$, $D4^{H719-850}$ und $D4^{H719-835}$ zeigen alle eine verkürzte Lag-Phase gegenüber der Aktin-Kontrolle. Das Konstrukt $D4^{H719-835}$ zeigt allerdings einen geringeren Effekt.

Die Konstrukte haben eine nukleationsfördernde Eigenschaft auf Aktin. Die gleichen Konstrukte $D4^{G719-857}$, $D4^{G719-850}$ und $D4^{G719-835}$, jedoch mit einem GST-Tag am N-Terminus, zeigten keine nukleationsfördernde Eigenschaft (nicht abgebildet). Wahrscheinlich wird der Aktivitätsverlust durch den relativ großen GST-Tag ausgelöst. Die verkürzten Konstrukte der Domäne 4 $D4^{G741-857}$, $D4^{G774-857}$, $D4^{G719-776}$ und $D4^{G719-743}$ zeigten ebenfalls keine Aktivität (nicht dargestellt). Ob dieser Aktivitätsverlust durch den vorhandenen GST-Tag, oder ob diese Konstrukte grundsätzlich keine Aktivität besitzen, kann somit nur noch durch eine Interaktionsstudie mit G-Aktin analysiert werden.

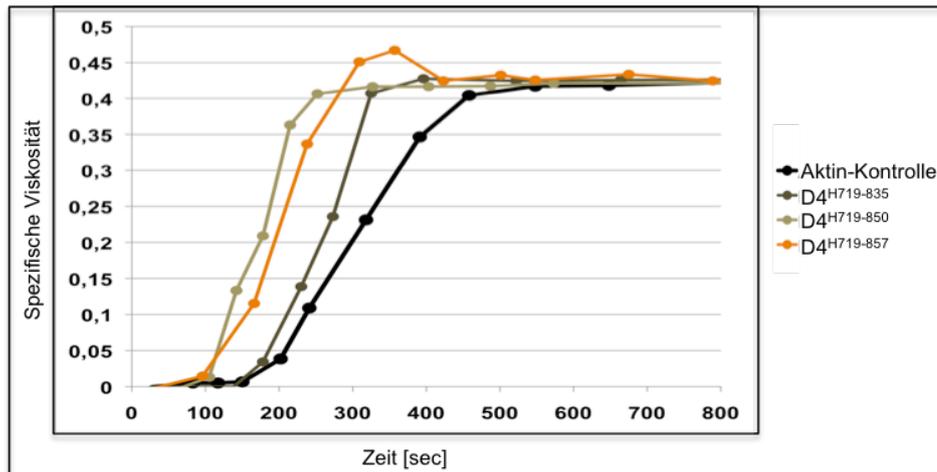


Abbildung 28: Aktivitätsanalyse der verschiedenen Konstrukte der Domäne 4

Die Abbildungen zeigen Konstrukte der Domäne 4, hierzu ist die spezifische Viskositätsmessung gegen die Zeit aufgetragen. Die Viskositätsmessung erfolgt wie in der Abbildung 25.

5.3.1.3 Vinculin-Schwanz-Konstrukte

Für die Charakterisierung einer möglichen Nukleationsverstärkung der Aktinpolymerisation wurden auch unterschiedliche Konstrukte des Vinculin-Schwanzes hergestellt und viskosimetrisch (4.4.9.2) analysiert.

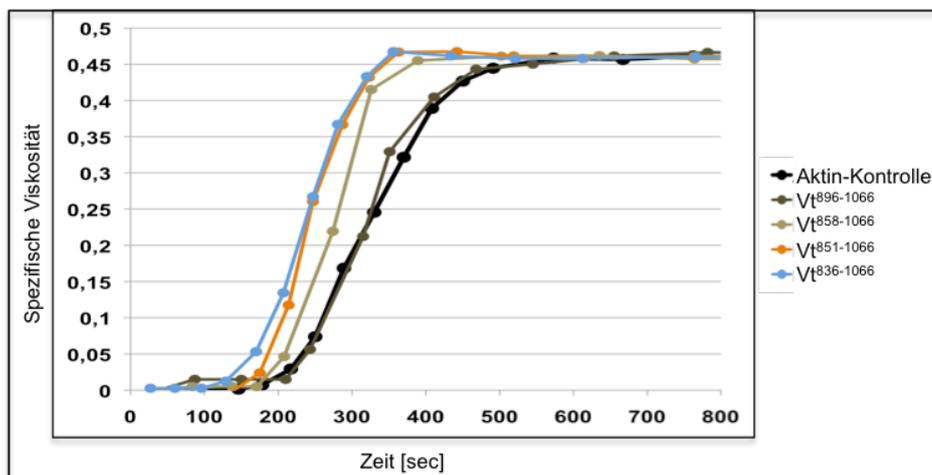


Abbildung 29: Aktivitätsanalyse der N-terminal-verkürzten Schwanz-Konstrukte

Die Abbildung zeigt die N-terminal-verkürzten Schwanz-Konstrukte $Vt^{836-1066}$, $Vt^{851-1066}$, $Vt^{858-1066}$ und $Vt^{896-1066}$. In der Legende sind die Namen der Konstrukte gelistet. Das Diagramm zeigt die spezifische Viskositätsmessung gegen die Zeit aufgetragen. Die Viskositätsmessung erfolgt wie in der Abbildung 25.

In der Abbildung 29 zeigen die Konstrukte $Vt^{836-1066}$, $Vt^{851-1066}$, $Vt^{858-1066}$ und $Vt^{896-1066}$ einen sigmoidalen Kurvenverlauf und erreichen die stationäre Phase bei $\eta=0,45$.

Die Konstrukte $Vt^{836-1066}$, $Vt^{851-1066}$, $Vt^{858-1066}$ enthalten Teile der Linker-Region und zeigen eine geringfügig kürzere Lag-Phase als Aktin allein, wobei das Konstrukt $Vt^{896-1066}$ keinerlei Aktivität zeigt.

Die Schwanz-Konstrukte $Vt^{836-1066}$, $Vt^{851-1066}$ und $Vt^{858-1066}$ zeigen einen relativ schwachen verstärkenden nukleationsfördernden Effekt des G-Aktins, jedoch zeichnet sich das Fragment $Vt^{836-1066}$, das die komplette Linker-Region besitzt, als das Aktivste aus, während $Vt^{896-1066}$ ohne Linker-Region inaktiv ist.

5.3.1.4 Vinculin-Modellkonstrukte

Für die geöffnete Vinculinstruktur wurden die Domänen D2-D5 und D3-D5 als Modell-Konstrukt hergestellt und auf eine Aktinpolymerisation getestet. Die Abbildung 30 zeigt die Viskositätskurven der gemessenen Konstrukte.

Beide Modell-Konstrukte, D2-D5 und D3-D5, zeigen einen verstärkenden nukleationsfördernden Effekt des G-Aktins.

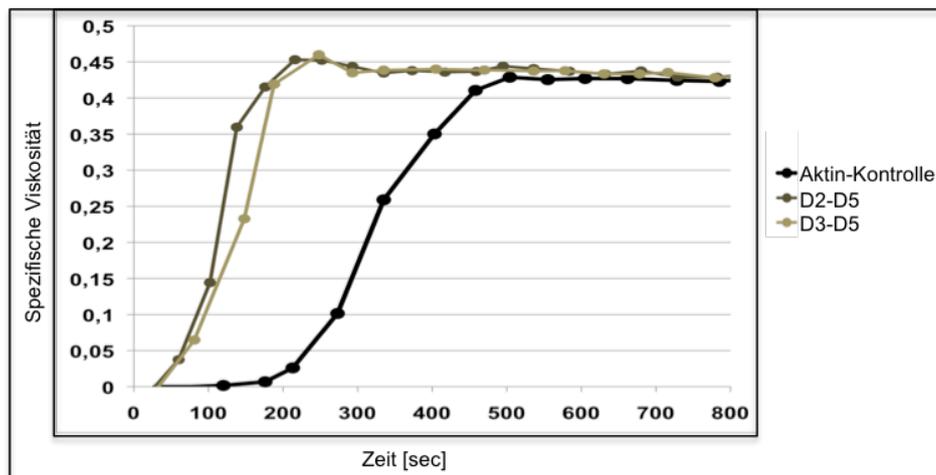


Abbildung 30: Aktivitätsanalyse der N-terminal-veränderten Kopf-Konstrukte

Die Abbildung stellt die spezifischen Viskosimetriekurven der verlängerten Kopf-Konstrukte D2-D5 und D3-D5 dar. Hierzu ist die spezifische Viskosimetrie gegen die Zeit aufgetragen. Die Viskositätsmessung erfolgt wie in der Abbildung 25.

5.3.1.5 Übersicht über die Nukleationsaktivität der verschiedenen Konstrukte

In dieser Übersicht sind die jeweiligen Vinculin-Konstrukte und Deletionsmutanten und deren nukleationsfördernde Effekte von G-Aktin gelistet (Tabelle 5). Da die jeweiligen Konstrukte stets mit der gleichen Konzentration vermessen wurden, kann

eine quantitative Tendenz der Stärke einer nukleationsfördernden Eigenschaft angegeben werden.

Tabelle 5: Übersicht der Nukleationsaktivität

Konstrukt	Nukleationsaktivität	Konstrukt	Nukleationsaktivität
Vh ¹⁻⁸⁹⁵	+++	D4 ^{H719-857}	+++
Vh ¹⁻⁸⁵⁷	+++	D4 ^{H719-850}	+++
Vh ¹⁻⁸⁵⁰	+++	D4 ^{H719-835}	++
Vh ¹⁻⁸³⁵	++	D4 ^{G719-857}	-
Vh ¹⁻⁷⁷⁶	-	D4 ^{G719-850}	-
Vh ¹⁻⁷¹⁷	-	D4 ^{G719-835}	-
Vh ²⁵³⁻⁸⁵⁷	+++	D4 ^{G719-776}	-
Vh ⁴⁹³⁻⁸⁵⁷	-	D4 ^{G719-743}	-
Vt ⁸³⁶⁻¹⁰⁶⁶	+	D4 ^{G741-857}	-
Vt ⁸⁵¹⁻¹⁰⁶⁶	+	D4 ^{G774-857}	-
Vt ⁸⁵⁸⁻¹⁰⁶⁶	+	D2-D5	++
Vt ⁸⁹⁶⁻¹⁰⁶⁶	-	D3-D5	++

Ein Nukleationseffekt konnte bei den Vinculin-Kopf-Konstrukten mit kompletter Domäne 4 verzeichnet werden. Dieser Nukleationseffekt konnte signifikant durch Anteile der Linker-Region verstärkt werden. Es zeigte sich eine Inaktivierung des Effektes bei Verwendung der Konstrukte der Domäne 4, wenn diese einen N-terminalen GST-Tag enthielten.

5.3.2 Dosis-Abhängigkeit des Effektes von Vinculin-Konstrukten auf die Nukleation der Aktinpolymerisation

Um den nukleationsfördernden Effekt der aktiven Konstrukte weiter zu analysieren, wurden die Polymerisationsansätze mit unterschiedlichen Konstruktkonzentrationen verwendet. Für einen Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen, wurde jeweils nur die Steigung der Anfangsphase der verschiedenen Polymerisationskurven aufgenommen. In diesem Kurvenbereich zeigt die Aktinpolymerisation einen fast linearen Zuwachs. Um auf die Beschleunigung der Aktinpolymerisation in Bezug auf die eingesetzte Konstruktkonzentrationen zu schließen, wurden die einzelnen Steigungswinkel in Bezug zu der prozentualen Konstruktkonzentration gesetzt. Für die konzentrationsabhängige Aktinpolymerisation wurden die Kopf-Konstrukte, die Konstrukte der Domäne 4 und die Schwanz-Konstrukte charakterisiert.

5.3.2.1 Qualitative Analyse der rekombinanten Vinculin-Kopf-Konstrukte

Die qualitative Charakterisierung des Vinculin-Kopf-Konstruktes Vh^{1-857} in Bezug auf die Aktinnukleation wurde durch die unterschiedlichen Konzentrationen des Konstruktes ermittelt.

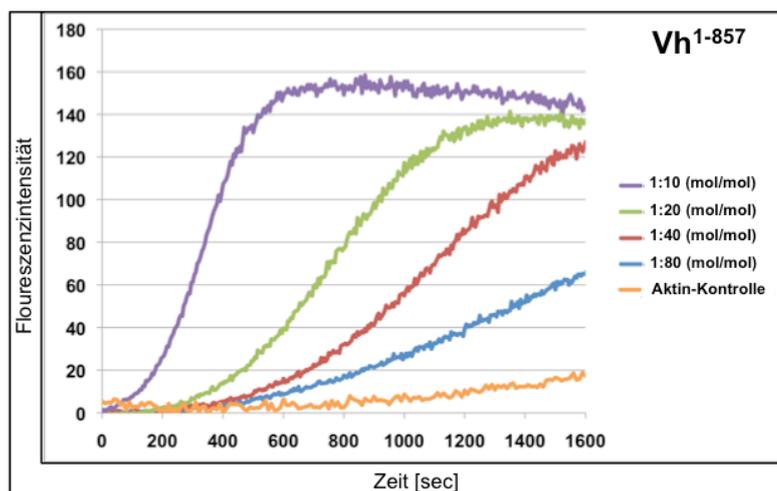


Abbildung 31: Vergleichende Nukleationsmessung der unterschiedlichen Vinculin-Konstrukte
 In der Abbildung sind die einzelnen Messergebnisse der Vinculin-Kopf-Konstrukte Vh^{1-857} und die Aktin-Kontrolle dargestellt. In den Diagrammen ist die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit [sec] aufgetragen. Für die Fluorometriemessung wurde ein Polymerisationsansatz bestehend aus 0,4mg/ml Aktin mit 10% Pyren-Aktin und das zu analysierende Konstrukt in einem molaren Verhältnis von 1:10 bis 1:80 mit 100mM KCl gestartet. Als Aktin-Kontrolle der Polymerisation diente allein der Polymerisationsansatz.

Hierzu wurden molare Verhältnisse von 1:10 bis 1:80 des Konstruktes relativ zum Aktin eingesetzt. In der Abbildung 31 sind die Fluoreszenzmessungen der Aktinpolymerisation mit unterschiedlichen Konzentrationen des Vinculin-Kopfes dargestellt. Die Messkurven mit den Konzentrationen 1:10 bis 1:40 enden in einer Stationärenphase auf einem gemeinsamen Wert von 140 der Fluoreszenzintensität. Die Elongations-geschwindigkeit dieser Kurve wird durch unterschiedliche Konzentrationen des Vinculin-Kopfes verändert und kann durch die Steigung wiedergegeben werden.

Die unterschiedlichen verwendeten Konzentrationen des Vinculin-Kopfes haben einen Einfluss auf die Nukleationsgeschwindigkeit des G-Aktins. Die Nukleation von G-Aktin wird durch eine höhere Konzentration des Vinculin-Kopfes verstärkt.

In der Abbildung 32c sind die Steigungen der einzelnen Kurven der eingesetzten Konzentration gegen die Zeit aufgetragen. Man erkennt, dass die Steigung der Kurve bei einem molaren Verhältnis von 1:10 (G-Aktin zu Vh^{1-857}) eine größere Elongationsgeschwindigkeit (Steigungswinkel) aufweist, als bei einem molaren Verhältnis von 1:80.

In der Abbildung 32a,b und c sind Fluoreszenz-Kurven der Konstrukte Vh^{1-835} , Vh^{1-850} und Vh^{1-857} dargestellt. Die Fluoreszenz wurde jeweils gegen die Zeit aufgetragen. Aufgrund der unterschiedlichen eingesetzten Konzentrationen ergeben sich Kurven mit unterschiedlichen Steigungen.

Man erkennt, dass die Steigung der Kurve bei einem molaren Verhältnis von 1:10 (G-Aktin zu Konstrukt) einen größeren Steigungswinkel aufweist, als bei einem molaren Verhältnis von 1:80, so dass eine Korrelation zwischen der Konzentration des eingesetzten Konstruktes mit der Nukleationsgeschwindigkeit besteht.

Die Auftragung der eingesetzten Konzentration der Konstrukte gegen die gemessene Verstärkung der Nukleation ergibt in allen Fällen einen nahezu linearen Zusammenhang, wobei der Steigungswinkel dieser Geraden einen quantitativen Zusammenhang zwischen der Intensität des Effektes für die verschiedenen Konstrukte erlaubt. Die Nukleationseffizienz wird offenbar durch den Bereich der Linker-Region beschleunigt: So sind die Steigungen der Kurven bei Vh^{1-857} größer als bei Vh^{1-835} . Das Konstrukt Vh^{1-857} hat somit die größte Aktivität, wie aus dem Vergleich der Einzelmessungen mit Vh^{1-835} hervorgeht. Steigungen der einzelnen Messungen des

Konstruktes Vh^{1-835} sind im Vergleich zu den Konstrukten Vh^{1-850} und Vh^{1-857} am geringsten (vgl. Abbildung 32d).

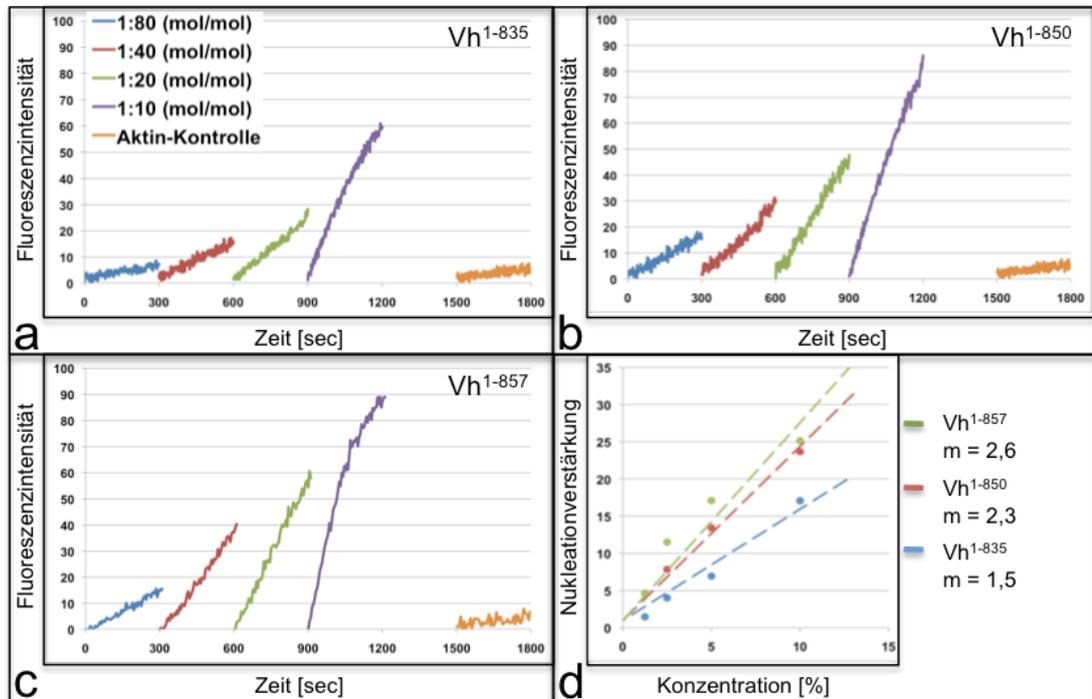


Abbildung 32: Konzentrationsabhängige Nukleationsmessung der Kopf-Konstrukte

In der Abbildung sind die einzelnen Messergebnisse der Kopf-Konstrukten **a)** Vh^{1-835} , **b)** Vh^{1-850} und **c)** Vh^{1-857} dargestellt. In den einzelnen Diagrammen ist hierzu die gesamte Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen. Für die Fluorometriemessung wurde ein Polymerisationsansatz bestehend aus 0,4mg/ml Aktin mit 10% Pyren-Aktin und das zu untersuchende Konstrukt in unterschiedlichen molaren Verhältnis von 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 mit 100mM KCl gestartet. Als Aktin-Kontrolle der Polymerisation diente allein der Polymerisationsansatz. **d)** Für den direkten Vergleich zwischen den Konstrukten, wurde die Nukleationsverstärkung gegen die Konzentration in Prozent aufgetragen.

5.3.2.2 Quantitative Analyse des nativen Vinculin-Kopfes

In der Abbildung 33a sind die verschiedenen Fluorometrie-Kurven der Aktinpolymerisation des nativen Vinculin-Kopfes gezeigt, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des nativen Vinculin-Kopfes umgesetzt wurden und als Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen sind. Aufgrund der unterschiedlichen eingesetzten nativen Vinculin-Kopf-Konzentrationen ergeben sich Kurven mit unterschiedlichen Steigungen.

Somit liegt auch bei diesen Konstrukten eine Korrelation zwischen der Konzentration des eingesetzten Konstruktes und der Nukleationsgeschwindigkeit vor. Mit zunehmender Konzentration des Vinculin-Kopfes wird die Nukleation beschleunigt.

Trägt man die Steigungen der einzelnen Kurven gegen die Zeit auf, wie in der Abbildung 33a dargestellt, können die Steigungswinkel bestimmt werden. Diese Steigungswinkel werden gegen die prozentuale Konzentration aufgetragen (Abbildung 33b) und können somit mit anderen Konstrukten in Beziehung gesetzt werden, da diese bei geringeren Konzentrationen in einer linearen Beziehung stehen.

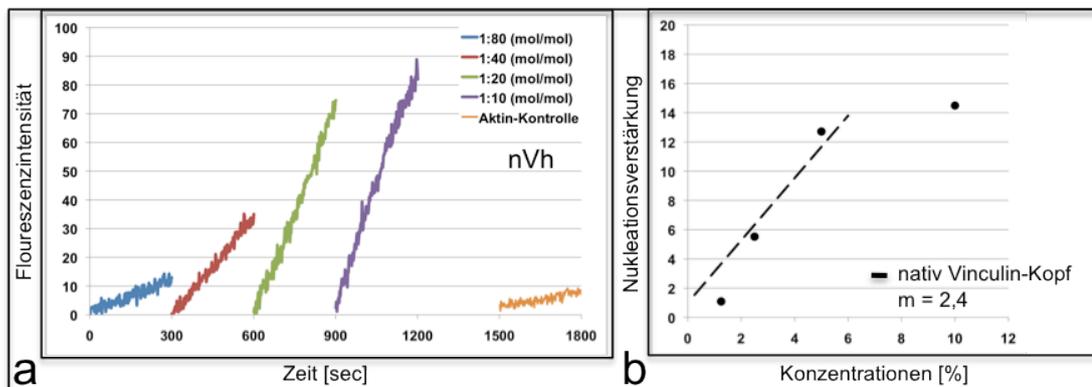


Abbildung 33: Vergleichende Nukleationsmessung des nativen Vinculin-Kopf-Konstruktes

In der Abbildung sind die einzelnen Messergebnisse des nativen Vinculin-Kopf-Konstruktes (nVh) und die Aktin-Kontrolle dargestellt. In den Diagrammen a) ist die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit [sec] aufgetragen. Für die Fluorometrie-Messung wurde ein Polymerisationsansatz bestehend aus 0,4mg/ml Aktin mit 10% Pyren-Aktin und das zu analysierende Konstrukt in einem molaren Verhältnis von 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 mit 100mM KCl gestartet. Als Aktin-Kontrolle der Polymerisation diente allein der Polymerisationsansatz. b) Um das nVh mit anderen Fluoreszenzintensitäts-Messungen zu vergleichen, wurde die Nukleationsverstärkung gegen die Konzentration in Prozent aufgetragen.

5.3.2.3 Quantitative Analyse der Konstrukte der Domäne 4

In der Abbildung 34a, b und c sind Fluorometrie-Kurven der Konstrukte $D4^{H719-835}$, $D4^{H719-850}$ und $D4^{H719-857}$ dargestellt. Wie in den vorherigen Messungen (5.3.2.1), zeigt auch dieses Konstrukt eine Dosisabhängigkeit auf die Nukleationsgeschwindigkeit. Das Konstrukt $D4^{H719-857}$ zeigt eine höhere Aktivität, als die Domäne 4 ($D4^{H719-835}$) allein. Die Konstrukte der Domäne 4 zeigten eine Zunahme der Nukleationsgeschwindigkeit in Korrelation der Linker-Region, wie die Kopf-Konstrukte ebenfalls zeigten.

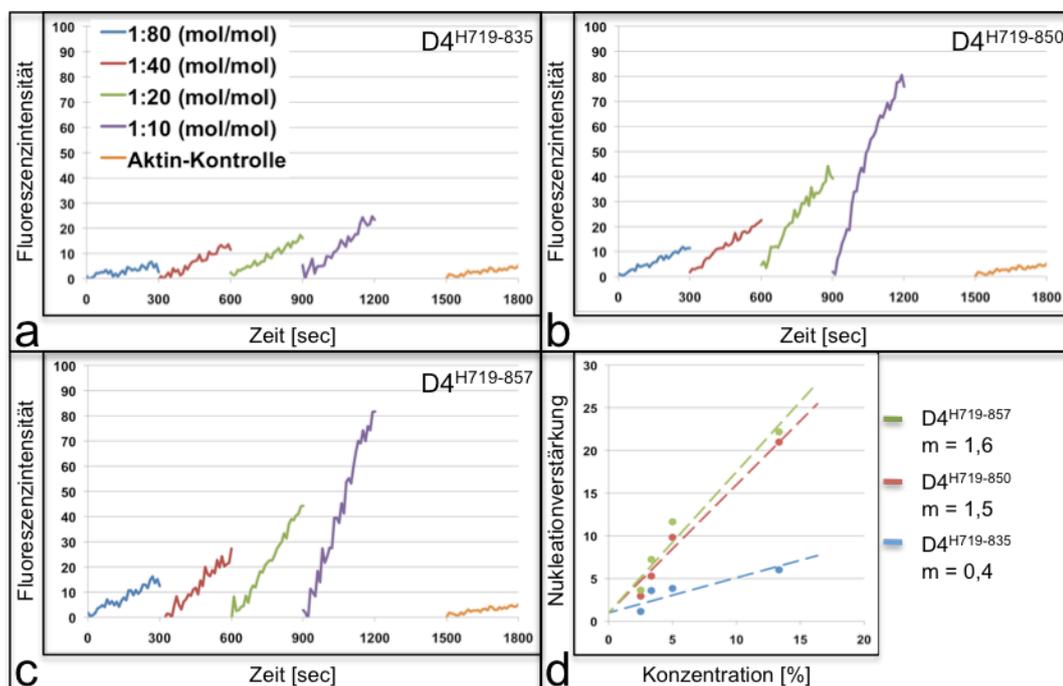


Abbildung 34: Konzentrationsabhängige Nukleationsmessung der Konstrukte der Domäne 4

In der Abbildung sind die einzelnen Messergebnisse der Kopf-Konstrukten a) $D4^{H719-835}$, b) $D4^{H719-850}$ und c) $D4^{H719-857}$ dargestellt. In den einzelnen Diagrammen ist hierzu die gesamte Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen. Für die Fluorometriemessung wurde ein Polymerisationsansatz bestehend aus 0,4mg/ml Aktin mit 10% Pyren-Aktin und das zu untersuchende Konstrukt in unterschiedlichen molaren Verhältnis von 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 mit 100mM KCl gestartet. Als Aktin-Kontrolle der Polymerisation diente allein der Polymerisationsansatz. d) Für den direkten Vergleich zwischen den Konstrukten, wurde die Nukleationsverstärkung gegen die Konzentration in Prozent aufgetragen.

5.3.2.4 Analyse der Vinculin-Schwanz-Konstrukte

In der Abbildung 34a sind die Fluorometrie-Kurven der Konstrukte $Vt^{836-1066}$, $Vt^{851-1066}$, $Vt^{858-1066}$ und $Vt^{896-1066}$ dargestellt. Wie in den zuvor gezeigten Messungen werden auch hier die Nukleationsgeschwindigkeiten miteinander verglichen, wie in der Abbildung 35b gezeigt. Auch bei den Schwanz-Konstrukten wird die Nukleationsgeschwindigkeit durch den Bereich der Linker-Region beeinflusst, so ist die Steigung der Kurven bei $Vt^{836-1066}$ größer ist als bei $Vt^{896-1066}$.

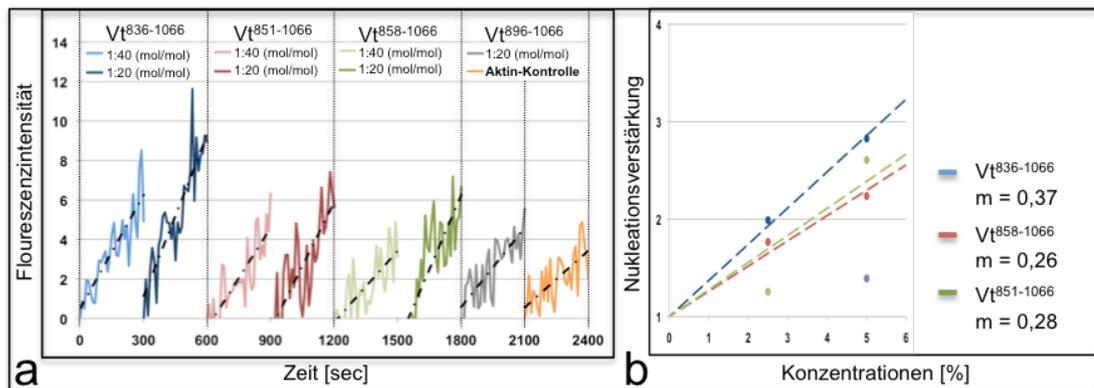


Abbildung 35: Konzentrationsabhängige Nukleationsmessung der Schwanz-Konstrukte

a) In der Abbildung sind die einzelnen Messergebnisse der Kopf-Konstrukte $Vt^{836-1066}$, $Vt^{851-1066}$, $Vt^{858-1066}$ und $Vt^{896-1066}$ dargestellt. In den einzelnen Diagrammen ist hierzu die relative Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen. Für die Fluorometriemessung wurde ein Polymerisationsansatz besteht aus 0,4mg/ml Aktin mit 10% Pyren-Aktin und das zu untersuchende Konstrukt in unterschiedlichen molaren Verhältnis von 1:20 und 1:40 mit 100mM KCl gestartet. Als Aktin-Kontrolle der Polymerisation diente allein der Polymerisationsansatz. **b)** In dieser Abbildung sind die Aktivitäten der einzelnen Proteine dargestellt, indem die Nukleationsverstärkung gegen die Konzentration in Prozent aufgetragen ist.

5.3.2.5 Quantitative Analyse der Vinculin-Modellkonstrukte

Die Abbildung 36 zeigt die Fluorometrie-Kurven der Vinculin-Modellkonstrukte D2-D5 und D3-D5. Die ermittelten Fluorometrieintensitäten wurden jeweils gegen die Zeit aufgetragen. In beiden Abbildungen erkennt man, dass die Kurven je nach molaren Verhältnis von 1:10 (G-Aktin zum Konstrukt) eine höhere Kurvensteigung aufweisen als bei den niedrigeren eingesetzten Verhältnissen. Die zwei Konstrukte enthalten den kompletten Linkerbereich und unterscheiden sich nur durch eine Domäne D2. Beide Modell-Konstrukte verstärken gleichermaßen die Aktinnukleation.

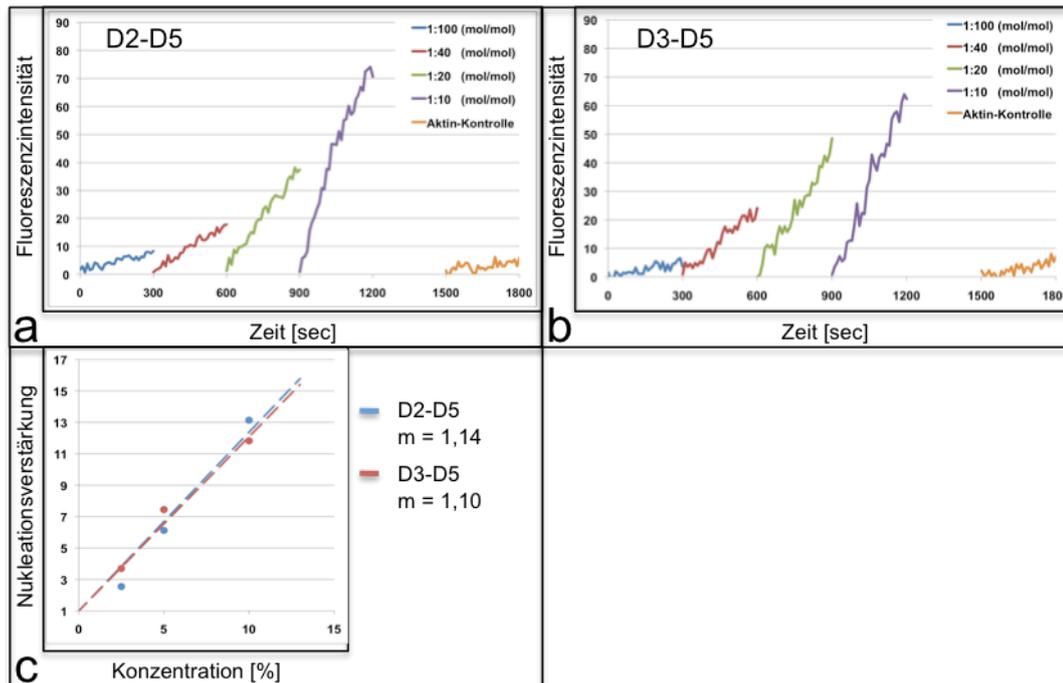


Abbildung 36: Konzentrationsabhängige Nukleationsmessung der Modell-Konstrukte

In der Abbildung sind die einzelnen Messergebnisse der Modell-Konstrukte a) D2-D5 und b) D3-D5 dargestellt. In den einzelnen Diagrammen ist hierzu die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen. Für die Fluorometriemessung wurde ein Polymerisationsansatz bestehend aus 0,4mg/ml Aktin mit 10% Pyren-Aktin und das zu untersuchende Konstrukt in unterschiedlichen molaren Verhältnis von 1:10, 1:20, 1:40 und 1:100 mit 100mM KCl gestartet. Als Aktin-Kontrolle der Polymerisation diente allein der Polymerisationsansatz. c) In dieser Abbildung sind die Aktivitäten der einzelnen Proteine dargestellt, indem der Steigungswinkel gegen die Konstruktkonzentration aufgetragen ist.

5.3.2.6 Vergleich zwischen den Vinculin-Konstrukten

Um die einzelnen Vinculin-Konstrukte in Beziehung zu setzen, wurde die spezifische Aktivität der einzelnen Proteine bestimmt, indem diese mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen zu G-Aktin vermessen wurden und aus den jeweiligen Kurvensteigungen der Steigungswinkel gegen die prozentuale Konzentration aufgetragen wurde. Die sich aus dieser Kurve ergebenden Steigung wird in der jeweiligen Arbeit als spezifische Aktivität bezeichnet.

In der Abbildung 37 sind die entsprechenden spezifischen Aktivitäten der jeweiligen Konstrukte dargestellt. Vergleicht man die spezifischen Aktivitäten aller Vinculin-Konstrukte ergibt sich folgendes Aktivitätsspektrum: Der nativ isolierte Vinculin-Kopf zeigt eine sehr hohe spezifische Aktivität im Vergleich zu den rekombinanten Proteinen. Die charakterisierten rekombinanten Proteine können in verschiedene Gruppen aufgeteilt werden, in Vinculin-Kopf, die Domäne 4 und Vinculin-Schwanz-Konstrukte, sowie in Vinculin-Modellkonstrukte. Bei den Konstrukten wurden

unterschiedlich lange Abschnitte der Linker-Region verwendet, um den Aktin nukleationsverstärkenden Effekt dieser Proteine zu analysieren. Man erkennt, dass je länger dieser Abschnitt der Linker-Region ist, desto höher wird die spezifische Aktivität. Die Daten zeigen, dass dieser Abschnitt einen bedeutenden Einfluss auf den nukleationsverstärkenden Effekt hat. Die Vinculin-Modellkonstrukte D2-D5 und D3-D5 zeigten eine gleiche spezifische Aktivität, die jedoch geringer ist, als bei dem nativen und rekombinanten Vinculin-Kopf.

Die Kopf-Konstrukte Vh^{1-850} und Vh^{1-857} entsprechen dem nativen Vinculin-Kopf. Dieser wird durch die V8-Protease gebildet und liegt in einem Gemisch vor, da diese Linker-Region zwei Spaltstellen enthält. Durch eine limitierende Proteolyse kann das kürzere Spaltprodukt und eventuell nur geringfügig das Längere gebildet werden. Der verminderte Aktivitätsunterschied zwischen nativen und rekombinanten Vinculin-Kopf könnte einen möglichen strukturellen Hintergrund haben, sodass Anteile von inaktiven Konstrukten enthalten sind, wodurch ein geringerer Nukleationseffekt erzielt wird.

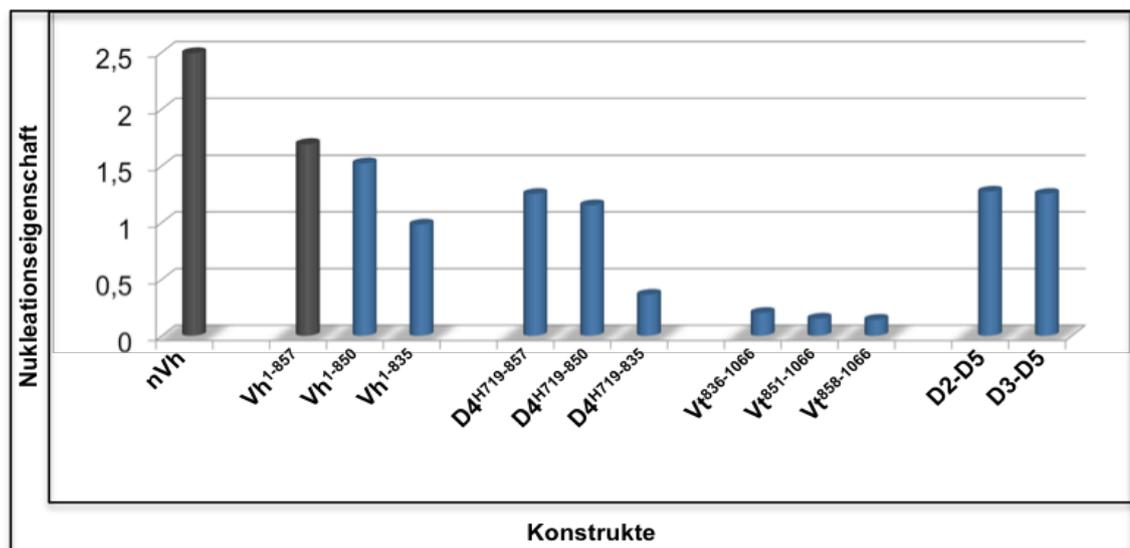


Abbildung 37: Konstrukte im Vergleich

Die Abbildung zeigt die spezifische Aktivität der jeweiligen Konstrukte an. Durch Messung von mehreren Aktinnukleationsversuche mit verschiedenen Protein-Konzentrationen konnte eine spezifische Aktivität ermittelt werden und so die Konstrukte in Beziehung gebracht werden.

5.3.3 Aktinnukleation und die Vinculin-Kopf-Schwanz-Interaktion

Um die Vinculin-Kopf-Schwanz-Interaktion weiter zu charakterisieren, wurden die beiden Proteine zusammen in einem Polymerisationsansatz verwendet. Durch die Kopf-Schwanz-Interaktion sollte ein komplettes Vinculin entstehen, welches jedoch nicht über den Linkerbereich verbunden ist. Für diese Messung wurde eine stöchiometrische Proteinkonzentration zwischen dem Vinculin-Kopf und Vinculin-Schwanz von 1:1 (mol/mol) eingestellt, um eine möglichst genaue Bildung des Intermediats zu erzielen.

Durch diese Wechselwirkung soll die mögliche Nukleationsfähigkeit des Aktins durch den Vinculin-Kopf beeinflusst werden, entsprechend der Situation im inaktiven Vinculin. Diese Interaktion wurde fluorometrisch im Spektralfluorometer untersucht. Hierzu wurde ein Polymerisationsansatz von 0,4mg/ml Aktin, mit einem 10%igen Anteil Pyren-Aktin verwendet (4.4.9.1).

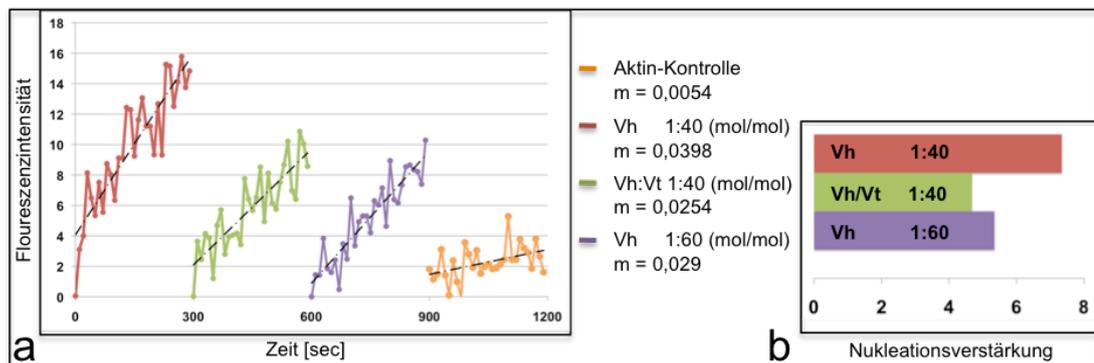


Abbildung 38: Vinculin-Kopf- und Schwanz-Interaktionen und Aktinnukleation

In der Abbildung ist die fluorometrische Analyse des Vinculin-Kopfes (Vh: Vh^{1-835}) in Kombination des Vinculin-Schwanzes (Vt: $Vt^{851-1066}$) und die Auswirkung auf die Nukleationsfähigkeit der Aktinpolymerisation gezeigt. Hierbei wurde, wie in der Legende angegeben, Konzentrationen eingesetzt und die Fluoreszenzintensität gegen Zeit aufgetragen. Der Vh und Vt wurde in einem gleichen Verhältnis eingesetzt. Der Polymerisationsansatz besteht aus 0,4mg/ml Aktin mit 10%igem Pyren-Aktin und das zu analysierende Konstrukt wurde mit 100mM KCl gestartet. **a)** In diesem Diagramm werden die fluorometrischen Messungen der unterschiedlichen Konstrukte gezeigt. **b)** In diesem Diagramm sind die Nukleationsverstärkung, der in Abb. a gezeigten Kurven, abgebildet.

In der Abbildung 38a sind die Fluorometrie-Kurven von Vinculin-Kopf (Vh) und Vinculin-Schwanz (Vt) dargestellt. Ein Unterschied des Nukleationseffektes ist zwischen dem Vh und Vh:Vt zu erkennen. Der Vh zeigt eine höhere Aktivität, als nur Vt und Vh in einer Verdünnung von 1:60. In der Abbildung 38b wird dieser Effekt nur durch die Nukleationsverstärkung verdeutlicht.

Durch die Vinculin-Kopf-Schwanz-Interaktion kann eine Reduktion der Nukleation um 36% beobachtet werden. Im Vergleich reduziert sich die nukleationsverstärkende Aktinpolymerisation in der Verdünnung des Vh 1:60 zu 1:40 um nur 27%.

5.4 Capping von F-Aktin durch die geöffneten Vinculin Modell-Konstrukte

Der Zustand des filamentösen Aktins ist von einem ständigen Auf- und Abbau von einzelnen Aktinmonomeren begleitet. Durch die Anlagerung eines Aktin bindenden Proteins am *pointed end* oder *barbed end* eines Filaments wird dieser Auf- und Abbau-Prozess des F-Aktin (meist am *barbed end*) blockiert. Diesen Effekt nennt man Capping.

Mit diesem Experiment wurde die Capping-Aktivität der Modell-Konstrukte D2-D5, D3-D5 und des Vinculin-Kopfes (Vh¹⁻⁸⁵⁷) untersucht. Hierzu wurde die Depolymerisation des F-Aktins durch eine spontane Verdünnung unterhalb der kritischen Konzentration gemessen. Der Capping-Effekt zeigt sich durch eine Stabilisierung des F-Aktins, wodurch die Depolymerisation verlangsamt wird.

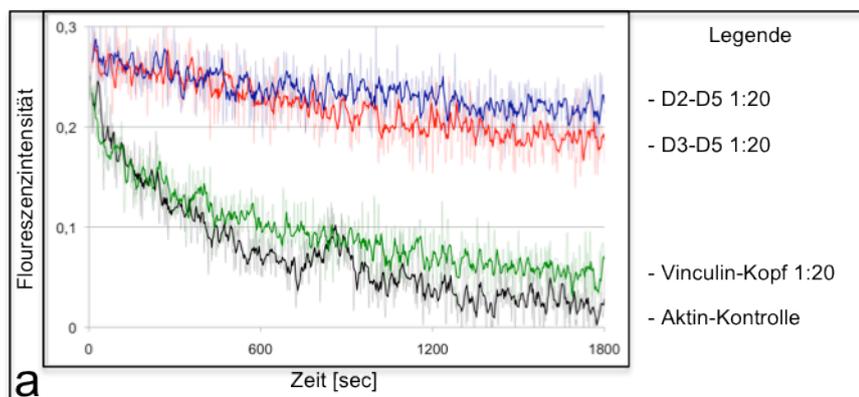


Abbildung 39: Capping von F-Aktin durch Vinculin-Modellkonstrukte

Die Abbildung zeigt die einzelnen Messergebnisse der Konstrukten D2-D5, D3-D5 und Vh¹⁻⁸⁵⁷ sowie die Aktin-Kontrolle. Die hervorgehobene Kurve stellt den gleitenden Durchschnitt von 5 Messwerten dar. Die Originalkurve ist als schwächere Kurve dargestellt. Bei den einzelnen Kurven wurde die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen. Für die Fluorometriemessung wurde ein Depolymerisationsansatz bestehend aus 0,1mg/ml Aktin mit einen 20%igen Anteil an Pyren-Aktin und das zu untersuchende Konstrukt mit 2fachen G-Puffer auf 2ml verdünnt. Als Aktin-Kontrolle der Depolymerisation diente allein der Depolymerisationsansatz.

Die Abbildung 39 zeigt den Kurvenverlauf der Konstrukte D2-D5, D3-D5 und den Vinculin-Kopf in einem molaren Verhältnis von 1:20 zur Aktin-Kontrolle. Der Kurvenverlauf zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der Aktin-Kontrolle und den Konstrukten D2-D5 und D3-D5, die Kurven dieser Konstrukte fallen sehr

langsam ab. Der Kurvenverlauf des Vinculin-Kopfes und der Aktin-Kontrolle sind annähernd gleich.

Abbildung 40 zeigt den Capping-Effekt der Konstrukte D2-D5 in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Kurvenverläufe der verschiedenen Konzentrationen zeigen einen unterschiedlichen Capping-Effekt. Der Capping-Effekt der konzentrierten Probe ist stärker, als bei der verdünnten Probe.

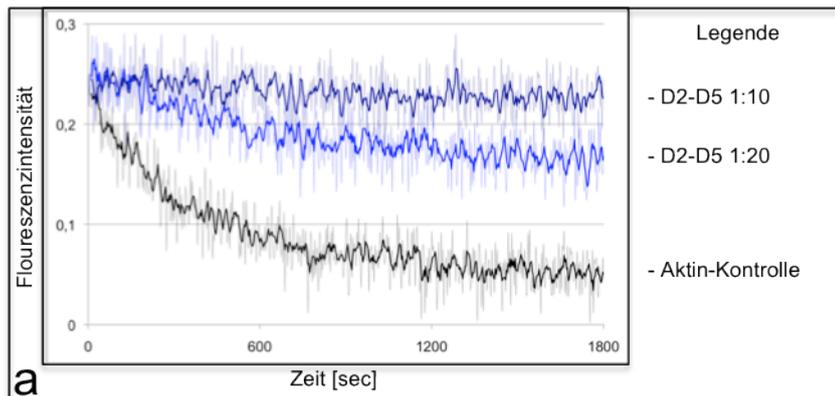


Abbildung 40: Capping von F-Aktin durch das Modell-Konstrukt D2-D3

Die Abbildung zeigt die einzelnen Messergebnisse der unterschiedlichen molaren Verhältnisse von 1:10 und 1:20 des Konstruktes D2-D5 und die Aktin-Kontrolle. Die hervorgehobene Kurve stellt den gleitenden Durchschnitt von 5 Messwerten dar. Die Originalkurve ist als schwächere Kurve dargestellt. Bei den einzelnen Kurven wurde die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen. Die Depolymerisation wurde wie in der vorangehenden Abbildung durchgeführt (vgl. Abbildung 39).

Eine abschließende Zusammenfassung des Capping-Effektes der Vinculin-Konstrukte zeigt, dass der Kopf keinen filamentstabilisierenden Einfluss „Capping-Effekt“ aufweist. Jedoch wird durch die Modell-Konstrukte ein solcher Capping-Effekt beobachtet.

5.5 Proteinwechselwirkung zwischen G-Aktin und den Vinculin-Konstrukten

Als weitere Methode für die Charakterisierung zwischen der Wechselwirkung von G-Aktin und den Vinculin-Konstrukten wurde die Methode Pulldown (4.4.6) verwendet. Wenn der Vinculin-Kopf eine aktinpolymerisationsfördernden Effekt besitzt, müsste dieser mit G-Aktin interagieren und wechselwirken. Für die Wechselwirkungsstudien wurden Kopf-Konstrukte ausgewählt, D1-D4, die Abschnitte von D4 oder die gesamte Domäne 4 enthalten.

5.5.1 Pulldown mit Vinculin-Kopf-Konstrukten

In der Abbildung 41 sind die Pulldowns der His-getaggtten Konstrukte Vh^{1-835} , Vh^{1-850} und Vh^{1-857} dargestellt. Alle Konstrukte wurden an die Affinitätsmatrix gebunden und sedimentiert. Das G-Aktin cosedimentiert ebenfalls unter der Anwesenheit der Kopf-Konstrukte. Die eingesetzten Konstrukte Vh^{1-835} , Vh^{1-850} und Vh^{1-857} zeigen eine Protein-Wechselwirkung mit G-Aktin. Das C-terminal verkürzte Konstrukt Vh^{1-776} wechselwirkt nicht mehr mit G-Aktin (nicht dargestellt).

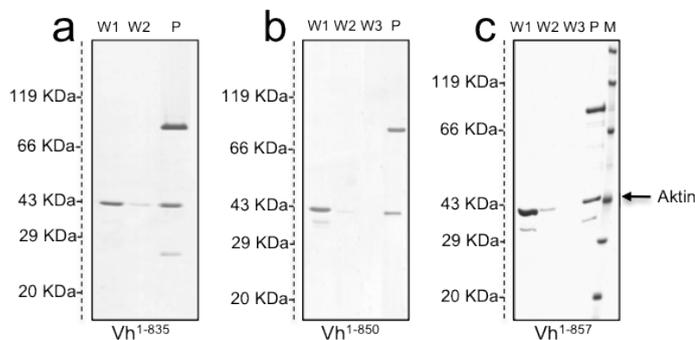


Abbildung 41: Pulldown von His-getaggtten Kopf-Konstrukten

(12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Das SDS-Gel zeigt den Pulldown von G-Aktin mit den Konstrukten Vh^{1-835} **a**), Vh^{1-850} **b**), Vh^{1-857} **c**). Für den Pulldown wurden die Konstrukte in einem molekularen Verhältnis von 1:10 eingesetzt, wobei G-Aktin im Überschuss vorlag. Die Ansätze wurden mehrmals gewaschen W1-W3 und das Sediment des Ansatzes in der Spur P dargestellt. Der Marker ist als M angegeben.

5.5.2 Pulldown mit Vinculin Domäne 4 Konstrukten

Für weitere Wechselwirkungsstudien wurden Konstrukte der Domäne 4 ausgewählt, da diese bereits eine Interaktion mit Aktin bei der Aktinpolymerisation zeigten.

Die folgenden Abbildungen zeigen Pulldowns der GST-getaggten (Abbildung 43) und His-getaggten (Abbildung 44) Konstrukte $D4^{G719-835}$, $D4^{G719-850}$ und $D4^{G719-875}$ mit G-Aktin, mit der entsprechenden Affinitätsmatrix. Die Konstrukte wurden an die Affinitätsmatrix gebunden und sedimentierten, wobei alle mit G-Aktin cosedimentierten. Die GST- oder His-getaggten Konstrukte $D4^{G719-835}$, $D4^{G719-850}$ und $D4^{G719-875}$ zeigten eine Wechselwirkung mit G-Aktin.

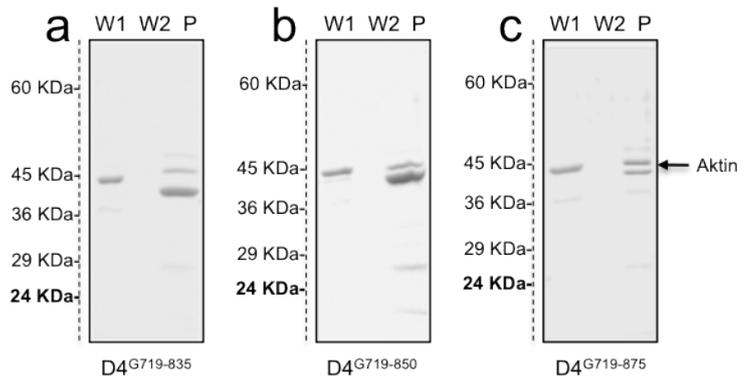


Abbildung 42: Pulldown von GST-getaggten Domäne 4 Konstrukten

(12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Das SDS-Gel zeigt den Pulldown von G-Aktin mit den Konstrukten $D4^{G719-835}$ a), $D4^{G719-850}$ b) und $D4^{G719-857}$ c). Für den Pulldown wurden die Konstrukte in einem molekularen Verhältnis von 1:10 eingesetzt, wobei G-Aktin im Überschuss vorlag. Die Ansätze wurden mehrmals gewaschen W1-W2 und das Sediment des Ansatzes in der Spur P dargestellt.

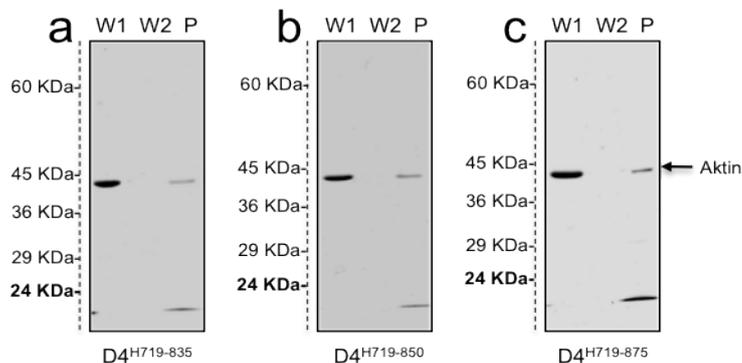


Abbildung 43: Pulldown von His-getaggten Domäne 4 Konstrukten

(12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Das SDS-Gel zeigt den Pulldown von G-Aktin mit den Konstrukten $D4^{H719-835}$ a), $D4^{H719-850}$ b) und $D4^{H719-857}$ c). Für den Pulldown wurden die Konstrukte in einem molekularen Verhältnis von 1:10 eingesetzt, wobei G-Aktin im Überschuss vorlag. Die Ansätze wurden mehrmals gewaschen W1-W2 und das Sediment des Ansatzes in der Spur P dargestellt.

Für weiterführende Interaktionsstudien mit G-Aktin wurden verkürzte Konstrukte der Domäne 4 verwendet. Die Abbildung 44 zeigt die Pulldowns der GST-getaggten Konstrukte $D4^{G741-857}$ a), $D4^{G774-857}$ b), $D4^{G719-776}$ c) und $D4^{G719-743}$ d). Alle Konstrukte

wurden an die Affinitätsmatrix gebunden und sedimentierten. Das G-Aktin cosedimentiert ebenfalls unter der Anwesenheit von den Konstrukten $D4^{G741-857}$ und $D4^{G774-857}$. Die Konstrukte $D4^{G719-776}$ und $D4^{G719-743}$ führen zu keiner Cosedimentation von G-Aktin.

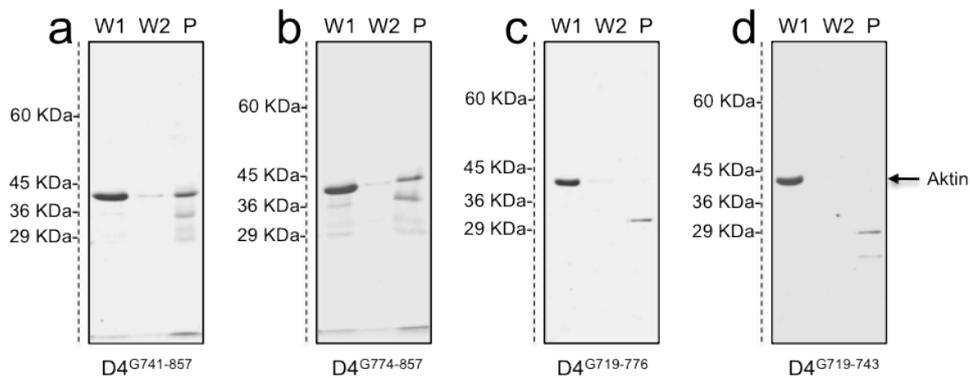


Abbildung 44: Pulldown von GST-getaggen verkürzten Domäne D4 Konstrukten

(12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Das SDS-Gel zeigt den Pulldown von G-Aktin mit den Konstrukten $D4^{G741-857}$ **a**), $D4^{G774-857}$ **b**), $D4^{G719-776}$ **c**) und $D4^{G719-743}$ **d**). Für den Pulldown wurden die Konstrukte in einem molekularen Verhältnis von 1:10 eingesetzt, wobei G-Aktin im Überschuss vorlag. Die Ansätze wurden mehrmals gewaschen W1-W2 und das Sediment des Ansatzes in der Spur P dargestellt.

5.5.3 Zusammenfassung der Pulldown-Ergebnisse

Die Konstrukte des Vinculin-Kopfes zeigen eine Interaktion mit G-Aktin (Tabelle 6), wobei das Konstrukt Vh^{1-776} nicht mit G-Aktin interagiert. Betrachtet man die Domäne 4, interagieren die N-terminal mit GST oder His fusionierten Konstrukte mit G-Aktin. Die Konstrukte der Domäne 4 $D4^{G774-857}$ und $D4^{G741-857}$ zeigen eine Interaktion mit G-Aktin. Die Konstrukte $D4^{G719-776}$ und $D4^{G719-743}$ zeigen dieses nicht mehr.

Tabelle 6: G-Aktin Interaktion mit den Vinculin-Kopf-Konstrukten

Konstrukt	Protein-Interaktion	Konstrukt	Protein-Interaktion
Vh^{1-857}	+	$D4^{G719-857}$	+
Vh^{1-850}	+	$D4^{G719-850}$	+
Vh^{1-835}	+	$D4^{G719-835}$	+
Vh^{1-776}	-	$D4^{G719-776}$	-
		$D4^{G719-743}$	-
$D4^{H719-857}$	+	$D4^{G741-857}$	+
$D4^{H719-850}$	+	$D4^{G774-857}$	+
$D4^{H719-835}$	+		

Das G-Aktin zeigte selbst keine Interaktion mit der Ni-NTA oder Glutathion-Sepharose Affinitätsmatrix. Somit findet keine Wechselwirkung mit G-Aktin statt,

auch wenn die Glutathion-Sepharose mit GST-Tag beladen wurde. Durch diese Proteinwechselwirkung konnte die G-Aktin-Interaktion auf die Domäne 4 und auf dem N-terminalen Bereich dieser Domäne 4 eingeschränkt werden.

5.5.4 Chemische-Quervernetzung mit NHS/EDC

Eine Proteinwechselwirkung kann auch durch Cross-Link (4.4.8) mit EDC und Sulfo-NHS identifiziert werden. Durch Verwendung von NHS/EDC wird ein stabiles Intermediat zwischen zwei Proteinen gebildet, die durch eine Proteinwechselwirkung in räumliche Nähe gebracht wurden. Das EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) ist ein *zero-length* Cross-Linker. Die Proteinfixierung wird durch die Bildung einer Amidbindung zwischen einer Carboxylgruppe und einer Aminogruppe gebildet.

Für die Wechselwirkungsstudien zwischen G-Aktin und Vinculin wurden die Vinculin-Kopf-Konstrukte Vh^{1-857} und Vh^{1-850} verwendet. Wenn der Vinculin-Kopf eine aktinpolymerisationsfördernden Effekt und eine Protein-Protein Wechselwirkung mit G-Aktin besitzt, müsste sich unter geeigneten Bedingungen ein Cross-Link Produkt zwischen G-Aktin und den Konstrukten bilden.

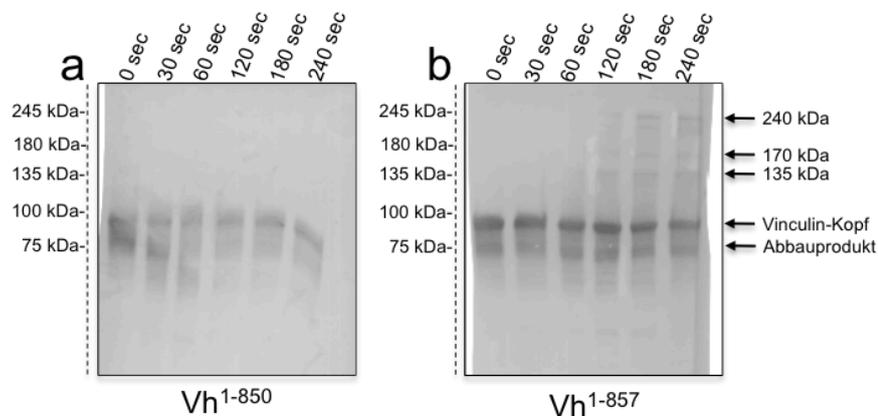


Abbildung 45: Cross-Link der Vinculin-Kopf-Konstrukte

(Western-Blot-Analyse, AP-Färbung, Antikörper *hVin1*, kontinuierliches 12%iges SDS-Polyacrylamidgel) Die Abbildung zeigt die Produkte des EDC/NHS Cross-Link zwischen G-Aktin und den Kopf-Konstrukten in einem zeitabhängigen Verlauf. In der Abbildung **a**) zeigt das Konstrukt Vh^{1-850} und **b**) Vh^{1-857} .

Die Abbildung 45 zeigt den Western-Blot des Cross-Links der Vinculin-Kopf-Konstrukte Vh^{1-857} und Vh^{1-850} mit G-Aktin. Das Konstrukt Vh^{1-857} (Abbildung 45b) zeigt nach 2min deutlich mehrere Banden oberhalb des eigentlichen Konstruktes, mit einer Größe von 135kDa, 170kDa und 240kDa. Das Konstrukt Vh^{1-850} (Abbildung

45a) zeigt selbst nach 4min keine weiteren Banden als die Konstrukt-Bande selbst. Eine weitere Bande von 75kDa ist als Abbauprodukt des Vinculin-Kopfes auf beiden Western-Blots zu erkennen.

Da es sich bei den beiden Kopf-Fragmenten nicht um genau gleiche Proteine handelt, besteht die Möglichkeit, dass es bei der Bindung zwischen monomeren Aktin und dem kürzeren Vinculin-Kopf-Konstrukt Vh^{1-850} zu keinem Cross-Link-Produkt kommt, da die Reaktion sterisch nicht begünstigt ist.

Zur Kontrolle wurde der Vinculin-Kopf Vh^{1-857} mit EDC und Sulfo-NHS inkubiert, um einen unspezifischen Cross-Link festzustellen. Dieser Western-Blot ist in Abbildung 46 gezeigt. Auf dem Western-Blot erkennt man die Bande des Vinculin-Kopfes von 94kDa. Erst nach 10min erkennt man eine leichte Bande von 190kDa, die ab der 15min deutlich zu erkennen ist. Dort erkennt man eine Bande von 130kDa bei 2min. In dem Western-Blot ist eine Bande von 75kDa als Abbauprodukt des Vinculin-Kopfes zu erkennen.

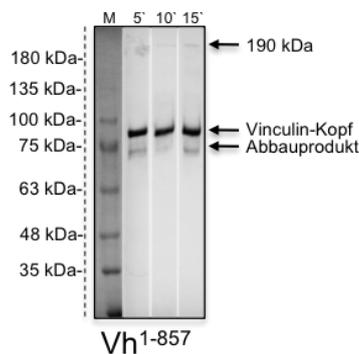


Abbildung 46: Cross-Link des Vinculin-Kopf-Konstruktes
(Western-Blot-Analyse, AP-Färbung, Antikörper *hVin1*, kontinuierliches 12%iges SDS-Polyacrylamidgel) Die Abbildung zeigt die Kontrolle, des EDC/NHS Cross-Links des Vinculin-Kopfes zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Aufgrund des Größenunterschiedes von ca. 40kDa der Cross-Link-Produkte kann davon ausgegangen werden, dass zwei monomere Aktine in Wechselwirkung mit dem Vinculin-Kopf Vh^{1-857} treten, während sich bei Vh^{1-850} kein Crosslink Produkt gebildet hat.

5.6 G-Aktin Interaktionsstudien durch Biacore

Die Proteinwechselwirkungen zwischen G-Aktin und den verschiedenen Vinculin-Konstrukten wurden durch das Biacore 3000 analysiert. Hierzu wurde 50µg G-Aktin über eine Thiol-Kopplung an einen CM5-Chip mit einer RU (*Resonanz Units*) Differenz von 7.000 kovalent gebunden. Die Proteinwechselwirkung kann indirekt über die Oberflächen-Plasmon-Resonanz verfolgt werden.

5.6.1 Interaktionsmessungen von G-Aktin mit unterschiedlichen Vinculin-Konstrukten

Für diese Interaktionsstudien wurden unterschiedliche Vinculin-Konstrukte verwendet. Besonderes Augenmerk wurde auf die Linker-Region und auf die Domäne 4 gelegt. Hierzu wurden die rekombinanten Konstrukte des Vinculin-Kopfes (rVh) und das gesamte Vinculin (rV), also auch der nativ-isolierte Vinculin-Kopf (nVh) und Vinculin (nV) analysiert (4.4.10). In der Abbildung 47 sind einige Sensogramme der wichtigsten Konstrukte gezeigt.

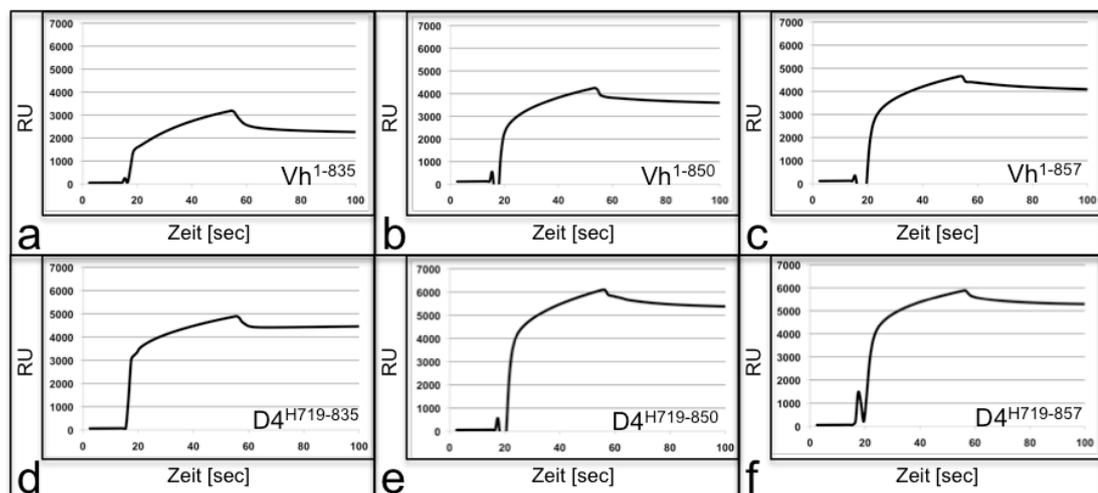


Abbildung 47: Qualitative Sensogramme der Konstrukte

In der Abbildung sind die Sensogramme der wichtigsten Vinculin-Kopf-Konstrukte Vh^{1-835} a), Vh^{1-850} b), Vh^{1-857} c), $D4^{H719-835}$ d), $D4^{H719-850}$ e) und $D4^{H719-857}$ f) dargestellt.

Man erkennt einen typischen Sensogrammverlauf. Die Assimilationskurve steigt fast nie zur Sättigung und erreicht den Reportpunkt. Die Dissoziationskurve erreicht nicht das ursprüngliche RU-Niveau und endet schließlich in einer stationären Phase. Erst nach Zugabe von 0,1M HCl wird die ursprüngliche RU erreicht und ein neuer Messzyklus kann gestartet werden. Die analysierten Proteininteraktionen der

Vinculin-Konstrukte sind in der Tabelle 7 gelistet und man erhält eine Übersicht, welche der Konstrukte eine Protein-Interaktion mit G-Aktin zeigen. Die Bestimmung des K_d -Wertes wurde durch die Software BIAevaluation ermittelt. Man erkennt, dass die Konstrukte, die einen Abschnitt der Linker-Region enthalten, eine Wechselwirkung mit G-Aktin zeigen.

Tabelle 7: Proteininteraktion analysiert durch Biacore

Konstrukt	Proteininteraktion mit G-Aktin	K_d ¹⁾
Vh ¹⁻⁷¹⁷	keine Interaktion	
Vh ¹⁻⁷⁷⁶	keine Interaktion	
Vh ¹⁻⁸³⁵	interagiert mit G-Aktin	$7,28 \cdot 10^{-7}$ (M)
Vh ¹⁻⁸⁵⁰	interagiert mit G-Aktin	$1,48 \cdot 10^{-8}$ (M)
Vh ¹⁻⁸⁵⁷	interagiert mit G-Aktin	$2,55 \cdot 10^{-8}$ (M)
Vh ²⁵³⁻⁸⁵⁷	interagiert mit G-Aktin	$2,28 \cdot 10^{-8}$ (M)
Vh ⁴⁹³⁻⁸⁵⁷	keine Interaktion	
D2-D5	interagiert mit G-Aktin	$4,05 \cdot 10^{-7}$ (M)
D3-D5	interagiert mit G-Aktin	$7,62 \cdot 10^{-7}$ (M)
D4 ^{H719-835}	interagiert mit G-Aktin	$1,07 \cdot 10^{-7}$ (M)
D4 ^{H719-850}	interagiert mit G-Aktin	$5,51 \cdot 10^{-8}$ (M)
D4 ^{H719-857}	interagiert mit G-Aktin	$5,78 \cdot 10^{-8}$ (M)
D4 ^{G719-835}	interagiert mit G-Aktin	$7,51 \cdot 10^{-8}$ (M)
D4 ^{G719-850}	interagiert mit G-Aktin	$3,44 \cdot 10^{-8}$ (M)
D4 ^{G719-857}	interagiert mit G-Aktin	$5,21 \cdot 10^{-8}$ (M)
D4 ^{G719-776}	keine Interaktion	
D4 ^{G719-743}	keine Interaktion	
Vh ¹⁻⁷⁷⁶	keine Interaktion	
nPVh	interagiert mit G-Aktin	$3,78 \cdot 10^{-7}$ (M)
rPV	keine Interaktion	
nPV	keine Interaktion	

1) Die K_d -Bestimmung für die Konstrukte wurde nur mit einer Konzentration bestimmt und kann daher nur als annähernd gelten.

5.6.2 Bestimmung der Bindekonstanten des Vinculin-Kopf - Konstruktes Vh¹⁻⁸⁵⁷

In der Abbildung 48 ist die Sensogramme des Konstruktes Vh¹⁻⁸⁵⁷ gezeigt. Die Bindekonstante wurde durch unterschiedliche Konzentrationen analysiert man erkennt einen typische Assimilationskurvenverläufe, die je nach Verdünnung einen unterschiedlichen Reportpunkt erreichen. Die Dissoziationskurve erreicht nicht das ursprüngliche RU Niveau und endet zum Schluss in einer stationären Phase. Es wurde

ein K_d -Werte für Bindekonstante zwischen G-Aktin und dem Konstrukt Vh^{1-857} von $5,31 \cdot 10^{-9}$ (M) bestimmt. Der gemessene K_d -Wert unterscheidet sich von der Einzelbestimmung in einer Zehnerpotenz.

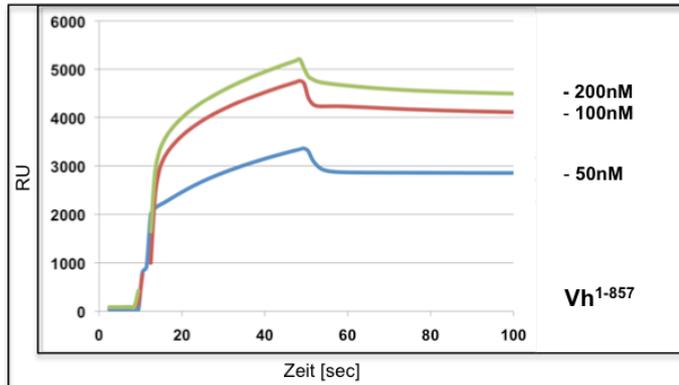


Abbildung 48: Quantitative Sensogramme des Vinculin-Kopfes

Die Abbildung zeigt die Sensogramme des Vinculin-Kopf-Konstruktes (Vh^{1-857}). Für eine Bestimmung der Bindekonstante wurden unterschiedliche Konzentrationen von 200nM, 100nM und 50nM eingesetzt. Die Puffersprünge wurden aus den Sensogrammen entfernt.

5.6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die Verwendung der Oberflächen-Plasmon-Resonanz konnte die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen G-Aktin und den Vinculin-Konstrukten des Kopfes (Vh^{1-835} , Vh^{1-850} , Vh^{1-857} & $Vh^{253-857}$), der Domäne 4 ($D4^{H719-835}$, $D4^{H719-850}$, $D4^{H719-857}$, $D4^{G719-835}$, $D4^{G719-850}$ & $D4^{G719-857}$) und den Modellstrukturen (D2-D5 & D3-D5) nochmals durch diese Methode bestätigt werden. Des Weiteren konnte die Dissoziationskonstante für diese Konstrukte annähernd und das Konstrukt Vh^{1-857} mit einer K_d von $5,31 \cdot 10^{-9}$ (M) bestimmt werden.

5.7 Proteinwechselwirkung zwischen F-Aktin und den Vinculin-Konstrukten durch Cosedimentation

Die Proteinwechselwirkung zwischen F-Aktin und den Konstrukten kann durch sogenannte Cosedimentation gezeigt werden. Durch Pelletierung bei 150.000xg sedimentieren Proteine die eine Interaktion mit F-Aktin zeigen und können im Pellet nachgewiesen werden (4.4.7). In der Abbildung 49 sind die SDS-Gele einiger Cosedimentationen der Konstrukte Vh^{1-835} , Vh^{1-850} und Vh^{1-857} dargestellt. Man erkennt, dass alle Konstrukte im Überstand (Ü) nach Zentrifugation enthalten sind und kein Konstrukt im Pellet (P) cosedimentiert wird. Eine Proteinwechselwirkung

zwischen F-Aktin und den Konstrukten Vh^{1-835} , Vh^{1-850} und Vh^{1-857} unter diesen Bedingungen kann daher ausgeschlossen werden.

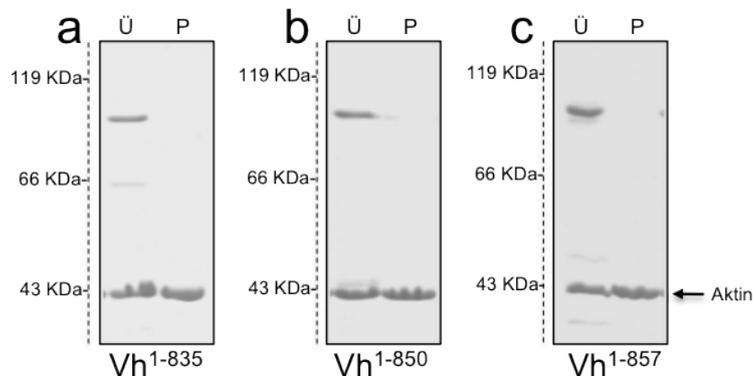


Abbildung 49: Cosedimentation zwischen F-Aktin und Kopf-Konstrukten

(12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Die Abbildung zeigt die SDS-Gele der verschiedenen Kopf-Konstrukte Vh^{1-835} **a**), Vh^{1-850} **b**) und Vh^{1-857} **c**) in Anwesenheit von F-Aktin. Dargestellt ist der Überstand des Pellets \ddot{U} und das Pellet P .

Die SDS-Gele der Modell-Konstrukte D2-D5 und D3-D5 sind in der Abbildung 50 gezeigt. Die beiden Konstrukte sind sowohl im Überstand (\ddot{U}) und als auch im Pellet (P) vorhanden und zeigen eine Proteinwechselwirkung mit F-Aktin.

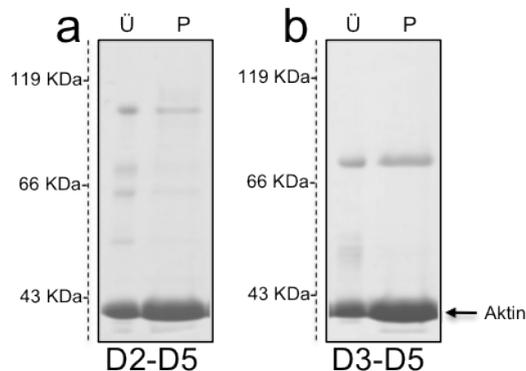


Abbildung 50: Cosedimentation zwischen F-Aktin und Modell-Konstrukten

(12%iges SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung) Die Abbildung zeigt die SDS-Gele der verschiedenen Kopf-Konstrukte D2-D5 **a**) und D3-D5 **b**) in Anwesenheit von F-Aktin. Dargestellt ist der Überstand des Pellets \ddot{U} und des Pellets P .

Tabelle 8: Interaktion der Vinculin-Konstrukte mit F-Aktin

Konstrukt	F-Aktin	Konstrukt	F-Aktin Interaktion
Vh^{1-835}	-	D2-D5	+
Vh^{1-850}	-	D3-D5	+
Vh^{1-857}	-		

Die Kopf-Konstrukte zeigen keine Interaktion mit F-Aktin. Eine Bindung konnte bei den Modell-Konstrukten nachgewiesen werden. Aus diesen Befunden kann man folgern, dass der Vinculin-Kopf eine reine G-Aktin-Interaktion zeigt.

5.8 F-Aktin-Bündelung durch die Domäne 5 des Vinculins

F-Aktin kann durch bivalente Metallionen oder Proteine, wie den Vinculin-Schwanz, gebündelt werden. Die F-Aktin-Bündel sind im Fluoreszenzmikroskop durch Anfärben mit Rhodamin/Phalloidin sichtbar. Die F-Aktin-Bündelung wurde zur Identifizierung der Basisaktivität der Konstrukte, sowie zur Charakterisierung der Bündelungsfähigkeit des Vinculin-Schwanzes verwendet. In der Abbildung 51 sind Aufnahmen von F-Aktin-Bündeln, die durch den Vinculin-Schwanz erzeugt wurden, gezeigt.

In der Abbildung 51a) erkennt man nur ein Bündel welches durch das Konstrukt $Vt^{896-1066}$ (D5) gebildet wurde. In den weiteren Aufnahmen erkennt man Bündel, welche durch das Konstrukt $Vt^{836-1066}$ (Abbildung 51b) und den nativen Vinculin-Schwanz (Abbildung 51c) gebildet wurden. Der Vergleich zwischen den Aufnahmen a) und b), sowie c) zeigt eine deutliche Zunahme der F-Aktin-Bündelung. Die Konstrukte unterscheiden sich durch eine unterschiedliche Linker-Region. So bündelt die Domäne 5 geringfügig F-Aktin, wird die Domäne 5 um die Linker-Region verlängert, findet eine F-Aktin-Bündelung statt.

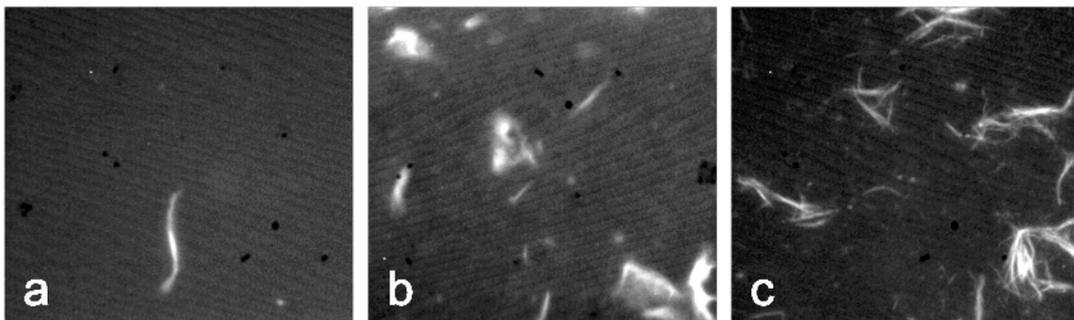


Abbildung 51: F-Aktin-Bündel durch Vinculin-Schwanz
(Mikroskopische Aufnahme, 100faches Öbobjektiv) Die Abbildung zeigt einige schwarzweiß Aufnahmen der Rhodamin/Phalloidin gefärbten F-Aktin-Bündel, die durch unterschiedliche Konstrukte $Vt^{896-1066}$ (D5) **a)**, $Vt^{836-1066}$ **b)**, und natives D5 **c)** gebildet wurden.

In der Abbildung 52 sind die Aufnahmen der F-Aktin-Bündel gezeigt. In Abbildung 52a) sind die Bündel des Konstruktes D2-D5 dargestellt und Abbildung 52b) zeigt die Bündel des Konstruktes D3-D5. Da diese Konstrukte eine F-Aktin Bündelung zeigen,

ist der Vinculin-Schwanz offenbar frei zugänglich und geht nicht wie im ganzen Vinculin eine Interaktion mit dem Vinculin-Kopf ein.

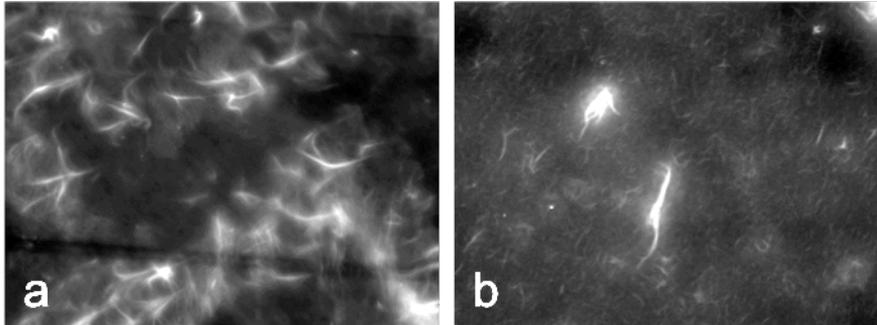


Abbildung 52: F-Aktin-Bündel durch Modell-Konstrukte

(Mikroskopische Aufnahme, 100faches Öbektiv) Die Abbildung zeigt einige schwarzweiß Aufnahmen der Rhodamin/Phalloidin gefärbten F-Aktin-Bündel, die durch die Konstrukte D2-D5 a) und D3-D5 b) gebildet wurden.

Des Weiteren wurde diese Methode der F-Aktin-Bündelung als Aktivitätskontrolle der Konstrukte verwendet. Somit liegen die Konstrukte des Vinculin-Schwanzes und die Modell-Konstrukte in einer aktiven Konformation vor, sodass der Bündelungseffekt durch den Anteil der Domänen 2 bis 4 dieser Modellkonstrukte nicht unterbunden wird.

5.9 Zellokalisation von GFP-Vinculin Konstrukten

Für die Lokalisation von Vinculin in vivo, insbesondere des Vinculin-Kopfes, wurden die Konstrukte mit einem GFP fusioniert. Für die GFP-Derivate wurde das GFPmut1 verwendet. Diese Variante besitzt zwei Aminosäuresubstitutionen von Phe⁶⁴ zu Leu sowie Ser⁶⁵ zu Thr und hat ein Anregungsmaximum von 488nm und Emissionsmaximum von 507nm.

Die GFP-Derivate wurden in Fibroblasten (NHI/3T3 Mausfibroblasten) transfiziert und nach einem Tag unter Selektionsdruck genommen. Diese Zellen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops betrachtet und dokumentiert. In der Abbildung 53 ist das Bild einer mit GFP-Vinculin-Kopf transfizierten Fibroblasten gezeigt.

Man erkennt einen sehr hell fluoreszierenden Bereich in mitten der Zelle. Dieser wird u.a. durch die Translation des GFP-Konstruktes an den Ribosomen erzeugt.

In der Zelle erkennt man mehrere grüne Punkte. Diese befinden sich bevorzugt am Rand der Zelle und stellen die Fokal-Kontakte dar. Diese Fokal-Kontakte sind noch mal in einer Vergrößerung dargestellt.

Aufgrund der fluoreszierenden Bereiche wird erstens das GFP-Vinculin-Kopf-Konstrukt in den Fibroblasten exprimiert und lagert sich in den Fokal-Kontakten an.

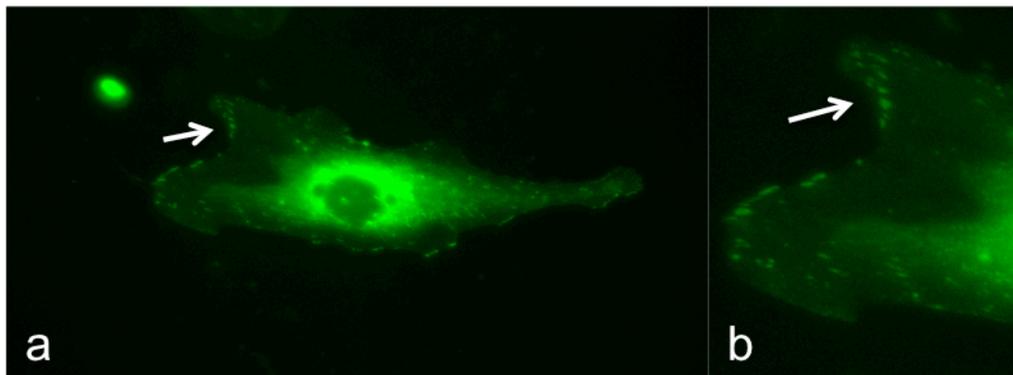


Abbildung 53: Fibroblasten mit transfizierten GFP-Vinculin-Kopf

(Mikroskopische Aufnahme, 40faches Objektiv) Die Abbildung **a**) zeigt eine farbige Abbildung der mit GFP-Vinculin-Kopf (GFP-Vh¹⁻⁸⁵⁷) transfizierten Fibroblasten (NHI/3T3 Mausfibroblasten), in der Abbildung **b**) wird ein Teilbereich vergrößert dargestellt.

Abbildung 54 zeigt das Bild einer mit GFP-Vinculin transfizierten Fibroblasten Zelle. Man erkennt, dass sich die Zelle gerade in der Phase der Zellteilung befindet, und die Zellstruktur ist zu erkennen. Sowohl in der Vergrößerung, als auch in der Zellabbildung erkennt man die einzelnen Fokal-Kontakte als grüne Punkte. Die helle Fluoreszenz, die den Zellkern umgibt, wird durch die Translation des GFP-Konstruktes erzeugt.

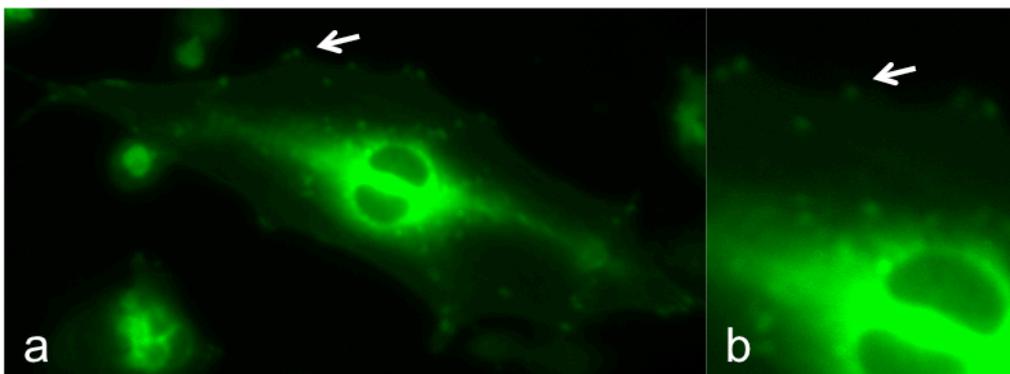


Abbildung 54: Fibroblasten mit transfizierten GFP-Vinculin

(Mikroskopische Aufnahme, 40faches Objektiv) Die Abbildung **a**) zeigt eine farbige Abbildung der mit GFP-Vinculin transfizierten Fibroblasten (NHI/3T3 Mausfibroblasten), in der Abbildung **b**) wird ein Teilbereich vergrößert dargestellt.

Auch dieses GFP-Vinculin-Konstrukt wurde in diesen Zellen exprimiert und lagert sich an den Fokal-Kontakten an. Die transfizierten Zellen konnten nicht selektioniert werden, da die übermäßige Expression letal auf die Zellen wirkte. Das GFP-Vinculin-Kopf-Konstrukt zeigte keinen Einfluss auf das Zellwachstum der Fibroblasten. Nach Selektion der Zellen wurde das transfizierte Konstrukt nicht mehr exprimiert.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung zwischen Vinculin und Aktin charakterisiert. Hierzu wurden die Aktinpolymerisation mit den Vinculin-Kopf und Vinculin-Schwanz-Konstrukten durch Viskosimetrie und Spektralfluorometrie verfolgt. Des Weiteren wurden die Wechselwirkungen zwischen Konstrukten und Aktin biochemisch nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine neue G-Aktin Bindestelle im Vinculin-Kopf (D1-D4) nachgewiesen und schließlich im Bereich der Domäne 4 (719-875) lokalisiert werden. Des Weiteren zeigt dieser Bereich eine Verstärkung der Aktinnukleation, die jedoch durch Interaktion des Vinculin-Schwanzes mit dem Vinculin-Kopf erniedrigt wird. Die Geschwindigkeit der Aktinnukleation wurde durch Bereiche der Linker-Region verstärkt. Einen Capping-Effekt konnte für den Vinculin-Kopf nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigten die Modellkonstrukte (D2-D5 & D3-D5) einen solchen Effekt.

6.1 Herstellung der nativen und rekombinanten Proteine

Für die Herstellung der rekombinanten Vinculin-Konstrukte wurde mRNA isoliert und mit Primern nach der Sequenz der Gendatenbank *PubMed* Nr.: NM_205441 amplifiziert. Die klonierte Vinculin cDNA-Sequenz des Huhnes (*Gallus gallus*) stimmt mit dieser Sequenz überein. Die Vinculin cDNA-Sequenz der Pute (*Meleagris gallopavo*) umfasst 1066AS und wurde mit der Sequenz des Huhns [Coutu & Craig 1988] verglichen. Die Sequenzen zeigten eine breite Übereinstimmung von 97,2%, wobei ein Austausch von vier Aminosäuren vorlag. Der Aminosäureaustausch umfasste nur die Region des Vinculin-Kopfes. Die ermittelte Sequenz wurde in die Gendatenbank *PubMed* unter der Nr.: GQ327928 eingestellt.

Die native Reinigung wurde nach der modifizierten Methode von Siliciano & Carig (1986) durchgeführt. Die Methode wurde um eine zusätzliche Gelfiltration erweitert. Dadurch konnte Vinculin in reiner Form gewonnen werden. Die rekombinanten Vinculin-Konstrukte der Pute, als auch des Huhns, konnten durch die N-terminale Affinitätsmarkierung und nach Verwendung eines Anionenaustauschers in relativ reiner Form gewonnen werden. Die Konstrukte mit einer kompletten Linker-Region

und insbesondere die kleineren Konstrukte der Domänen 4 und die Vinculin-Schwanz-Konstrukte ließen sich nur schwer abtrennen, da die Linker-Region viele hydrophobe Aminosäuren enthält.

6.2 Charakterisierung der Proteine

Das native und rekombinante Vinculin haben dieselbe molekulare Größe von 117kDa [Geiger et al., 1980]. Die verkürzten Fragmente zeigten die erwarteten Proteingrößen, welche durch das Programm *WinPep* berechnet wurden. Des Weiteren konnte die Domäne 1 der Vinculin-Konstrukte durch den spezifischen monoklonalen Antikörper hVin1 detektiert werden.

Durch CD-Spektroskopie wurde die Struktur der Konstrukte analysiert und mit den rekombinanten und nativen Vinculinen verglichen. Ferner wurden der rekombinante und der native Vinculin-Kopf durch CD-Spektroskopie ebenfalls verglichen.

Die ermittelten CD-Spektren des nativen und des rekombinanten Vinculins zeigen eine ähnliche prozentuale Verteilung des Sekundärstrukturanteils. Durch die CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten Proteine die gleiche Faltung haben wie die nativen Proteine. Die Sekundärstruktur des Vinculins besteht überwiegend aus α -Helices (63%) und zu einem geringen Teil aus der β -Faltblattstruktur [Bakolitsa et al., 2004]. Diese Tendenz der sekundären Struktur konnten aus den CD-Spektren abgeleitet werden. Der Kurvenverläufe zwischen den nativen und rekombinanten Vinculin-Produkten sind relativ äquivalent, was ebenfalls für eine gleiche Struktur spricht.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die rekombinanten Konstrukte eine weitgehend native Konformation besitzen und dass die beschriebene Analyse, der Interaktion mit Aktin unter Verwendung der verschiedenen Konstrukte auch die Eigenschaft des nativen Vinculins reflektieren.

6.3 Lokalisationsstudien des Vinculins in Fibroblasten

Die N-terminalen GFP-Fusionsproteine des Vinculins und des Vinculin-Kopfes lokalisieren sich an den Fokalkontakten. Dieser Befund zeigt zunächst, dass beide Konstrukte in vivo funktionell sind und dass das aktive Vinculin sich an den Fokalkontakten assoziiert, wie es in der Literatur beschrieben ist [Geiger, 1979;

Burridge & Feramisco, 1980; Burridge & Connel, 1983]. Dabei könnte sowohl der Vinculin-Kopf als auch das gesamte Vinculin eine Bindung mit Talin eingehen [Burridge & Mangeat, 1984].

Vinculin stellt an der Fokaladhäsion ein Bindeglied zwischen Talin und dem F-Aktin des Cytoskeletts dar [Bass et al., 2002; Weis, 2004]. Die verwendeten Zellen zeigten ein normales adhärentes Wachstum und eine normale Zellteilung. Beide Konstrukte akkumulieren sich in den Fokalkontakten der Zellen. Durch die Verwendung des Vinculin-Kopfes kann eine Interaktion nicht mit F-Aktin erfolgen, da die beiden F-Aktinbindestellen im Vinculin-Schwanz liegen [Hüttelmeier et al., 1997; Menkel et al., 1994]. Aufgrund der Ausbildung einer Fokaladhäsion kann der Kopf auch eventuell über den gebildeten trimeren Aktin-Komplex mit dem neuem F-Aktin interagieren. Eine direkte Interaktion zwischen den Vinculin-Kopf-Konstrukten Vh^{1-835} , Vh^{1-850} & Vh^{1-857} und F-Aktin konnte in einer Cosedimentation jedoch nicht nachgewiesen werden. Da die Fibroblasten nicht Vinculin defizient waren, konnte nicht überprüft werden, ob das Fehlen des Vinculin-Schwanzes letal ist.

6.4 Vinculin und die G-Aktin Interaktion

Die Erforschung von weiteren Interaktionspartnern des Vinculins ist von erheblicher Bedeutung, da Vinculin eine zentrale Rolle bei der Ausbildung von Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakten spielt [Geiger, 1979; Burridge & Feramisco, 1980; Burridge & Connel, 1983]. Das multiadaptive Vinculin wurde in einer Vielzahl von Gewebetypen [Otto, 1990], sowie bei zellulären Prozessen, wie der Zellproliferation, Zellmigration und Differenzierung [Berrier & Yamada, 2007; Huveneers & Danen, 2009; Schwartz & DeSimone, 2008], nachgewiesen. Bei den genannten zellulären Prozessen ist das Cytoskelett motiler Zellen, besonders die Aktinfilamente, einer permanenten Umwandlung unterworfen [Pollard et al., 2000]. Die Aktinfilamente befinden sich in einem ständigen Auf- und Abbau (*turnover*) [Wegner, 1982]. Dieser Prozess kann durch aktinbindende Proteine wie Talin [Muguruma et al., 1990; 1992; Kaufmann et al., 1991], Filamin [Loo et al., 1998] und α -Actinin [Mimura & Asano, 1986; Hemmings et al., 1992] beeinflusst werden. So ist bekannt, dass Vinculin über den Vinculin-Schwanz an F-Aktin bindet und so ein Strukturprotein zwischen dem Fokalkontakt und dem Mikrofilamentsystem darstellt [Hüttelmaier et al., 1997;

Menkel et al., 1994]. Da Vinculin in den unterschiedlichsten Zelltypen, wie Muskulatur [Small, 1985], Lymphozyten [Marchision et al., 1988], Thrombozyten [Koteliansky et al., 1984] und Fibroblasten vorkommt und als Strukturprotein bei der Ausbildung von Fokalkontakten fungiert [Burrige & Connel, 1983], kann das aktive Vinculin, über die Domäne 5 mit F-Aktin assoziieren [Hüttelmaier et al., 1997; Menkel et al., 1994]. Es ist bekannt, dass der Vinculin-Schwanz (Vt⁸⁸¹⁻¹⁰⁶⁶) die Fähigkeit zur Induktion der Aktinpolymerisation besitzt und *in vitro* F-Aktinbündel erzeugt [Wen et al., 2009]. Einen Capping-Effekt des *barded end* von F-Aktin konnte durch den Vinculin-Schwanz (Vt⁸⁷⁹⁻¹⁰⁶⁶) und abgeschwächt auch durch das Vinculin Δ D1 (V²⁵³⁻¹⁰⁶⁶) gezeigt werden [Clainche et al., 2010].

In dieser Arbeitsgruppe konnte eine Interaktion zwischen Vinculin und G-Aktin, sowie F-Aktin gezeigt werden [Neumann, 2004]. Die Wechselwirkung wurde identifiziert, indem Vinculin durch die Endoprotease Glu-C (V8-Protease) in Kopf- und Schwanz-Konstrukte gespalten wurde (Abschnitt 5.3). Nur der Vinculin-Kopf zeigt unter polymerisierenden Bedingungen einen signifikanten nukleationsverstärkenden Effekt der Aktinpolymerisation. Das gesamte Vinculin zeigt eine schwächere oder keine G-Aktin nukleationsverstärkenden Effekt. Der Vinculin-Schwanz zeigt einen sehr geringen nukleationsverstärkenden Effekt [Neumann, 2004; Oberlack, 2009]. Durch eine starke interne Wechselwirkung zwischen dem Vinculin-Kopf und -Schwanz [Bakolitsa et al., 2004; Cohen et al., 2005] liegt Vinculin im Cytoplasma als ein globuläres Protein vor [Geiger, 1982; Isenberg et al., 1982]. Der Vinculin-Kopf enthält in der Domäne 1 eine Bindestelle für den Vinculin-Schwanz und legt sich wie ein Scharnier an den Vinculin-Kopf [Weekes et al., 1996]. Durch diese reversible Kopf-Schwanz-Interaktion wird die Bindestelle zwischen G-Aktin und dem gesamten Vinculin wahrscheinlich maskiert, da die Nukleationsaktivität des gesamten Vinculins reduziert ist.

Das Vinculin-Molekül kann somit in unterschiedlich aktiven Konformationen vorliegen, wodurch eine funktionelle Charakterisierung des gesamten Vinculins erschwert ist. Durch die Wechselwirkungen mit anderen cytoplasmatischen Proteinen, wie Talin oder den Peptiden VBS1, VBS2 und VBS3, kann die Vinculin-Kopf-Schwanz-Interaktion verhindert werden [Bass et al., 1999; Gilmore et al., 1993; Lee et al., 1992; Izard & Vorrhein, 2004; Groesch & Otto, 1990], wobei der Vinculin-Kopf

und -Schwanz über die Linker-Region flexibel miteinander verbunden sind [Miller et al., 2001; Chen et al., 2006]. Die Kopf-Schwanz-Interaktion des Vinculins kann ebenfalls durch störende Substanzen wie Salze beziehungsweise durch die Aufreinigungsprozeduren oder die Temperatur beeinflusst werden.

Um mögliche Effekte des Vinculins, insbesondere der Kopffregion auf die Aktinpolymerisation zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit Konstrukte des Vinculin-Kopfes, Vinculin-Schwanzes und Vinculin-Modellkonstrukte verwendet. Durch das Fehlen der Domäne 1 oder Domäne 1-2 konnten die beiden Modellkonstrukte keine globuläre Konformation einnehmen, da die Bindestelle zwischen Kopf-Schwanz sich in der Domäne 1 befindet [Weekes et al., 1996]. In dieser Arbeit konnte ein verstärkender Nukleationseffekt der Aktinpolymerisation durch den Vinculin-Kopf bestätigt und die Interaktion auf einen Bereich des Moleküls eingegrenzt werden, außerdem zeigten die Modell-Konstrukte einen zusätzlichen Capping-Effekt des F-Aktins. Die Vinculin-Konstrukte mit der Domäne 5 zeigten eine F-Aktin-Bindung, wie es in der Literatur beschrieben wird [Hüttelmaier et al., 1997].

6.5 Aktinpolymerisation und die Basisaktivität

Mit Hilfe der Endoproteinase Glu-C (V8-Protease) kann das gesamte Vinculin-Molekül spezifisch in Kopf- und Schwanz-Konstrukte gespalten werden [Coutu & Craig, 1988; Groesch & Otto, 1990; Price et al., 1989]. Der isolierte native sowie der rekombinante Vinculin-Kopf zeigen beide einen verstärkenden Nukleationseffekt hinsichtlich der Aktinpolymerisation, wobei der native Vinculin-Kopf einen geringfügig größeren Effekt aufweist, als der rekombinante Vinculin-Kopf. Eine mögliche Ursache hierfür kann an einer nicht vollständig korrekten Faltung des rekombinanten Proteins liegen, da ein Teil des Proteins möglicherweise in einer inaktiven Konformation vorliegt, wodurch ein Aktivitätsunterschied gemessen wird. Teilweise wurde bei den rekombinanten Vinculin eine leichte Degradation des Proteins beobachtet. Die beiden Vinculin-Konstrukte unterscheiden sich dahingehend, dass das rekombinante Konstrukt N-terminal mit einem His-Tag fusioniert ist. Eventuell können sich auch dadurch strukturelle Veränderungen des Proteins ergeben.

6.6 Aktinpolymerisation des Vinculin-Kopfes und der Einfluss des Vinculin-Schwanzes auf die Aktivität

Der native Vinculin-Kopf wurde durch Spaltung aus dem gesamten Vinculin erzeugt. Durch die hohe Affinität von K_d 10^{-9} M [Bakolitsa et al., 2004; Cohen et al., 2005] zwischen Vinculin-Kopf und Vinculin-Schwanz kann eine Interaktion zwischen den nativ präparierten Konstrukten nicht ausgeschlossen werden. In einem Modellversuch wurde der G-Aktin nukleationsverstärkende Effekt des Vinculin-Kopfes, sowie die Auswirkungen der Kopf-Schwanz-Interaktion auf die Nukleationseigenschaft von G-Aktin getestet. Die G-Aktin Nukleationseigenschaft des Vinculin-Kopfes wird durch nachträgliche Zugabe des Vinculin-Schwanzes deutlich reduziert. Durch die Vinculin-Kopf-Schwanz-Interaktion muss somit die Bindestelle für G-Aktin maskiert werden. Des Weiteren zeigte sich, dass der Vinculin-Kopf einen Einfluss auf die G-Aktin Nukleation hat. Der Vinculin-Schwanz zeigte gegenüber dem Vinculin-Kopf nur einen sehr geringen nukleationsverstärkenden Effekt und verstärkt somit auch nicht die Nukleation des G-Aktins in diesen Versuchsreihen. Da bei einer nativen Proteinaufreinigung nicht ausgeschlossen werden kann, dass Anteile des Vinculin-Schwanzes am Vinculin-Kopf binden und dieses einen signifikanten Effekt auf die Nukleationsaktivität bewirken, wurden die Konstrukte rekombinant sortenrein hergestellt.

6.7 Aktivitäten der Modellkonstrukte

Bei beiden Modellkonstrukten, D2-D5 und D3-D5, konnte zunächst ein nukleationsfördernder Effekt der Aktinpolymerisation viskosimetrisch und fluorometrisch nachgewiesen werden. Es konnte außerdem davon ausgegangen werden (sowohl Literatur, als auch eigene Befunde), dass die Domäne 1 und 2 selbst keine Aktinbindungseigenschaften besitzen und somit die Konstrukte D2-D5 und D3-D5 die Eigenschaften des Vinculins reflektieren.

Des Weiteren zeigten die Konstrukte auch eine Interaktion mit F-Aktin, da die Domäne 5 zwei Bindestellen für F-Aktin enthält [Menkel et al., 1994; Johnson & Craig, 1995; Hüttelmaier et al., 1997; Steimle et al., 1999]. Die beiden Vinculin-Modellkonstrukte D2-D5 und D3-D5 zeigten zudem einen Capping-Effekt des F-Aktins. Aus der Art und Stärke dieses Effektes lässt sich auf ein Capping des

barded end des F-Aktins schließen. In der Literatur wurde ebenfalls ein Capping-Effekt des Konstruktes D2-D5 beschrieben [Clainche et al., 2010]. Die Modellkonstrukte D2-D5 und D3-D5 haben prinzipiell beide eine Capping-Aktivität. Es wurde aber eine Konzentrationsabhängigkeit des D2-D5 Konstruktes auf den Capping-Effekt beobachtet. Das Konstrukt D2-D5 erwies sich als weniger stark cappinges Protein, die verminderte Aktivität trotz fehlender Domäne 1 weist auf eine Interaktion mit dem Vinculin-Schwanz hin [Clainche et al., 2010]. Durch diese mögliche Interaktion mit der Domäne 2 bis 4 des Vinculin-Kopfes mit dem Vinculin-Schwanz kann möglicherweise der Capping-Effekt reduziert werden und dieser Effekt bewirkt eine Konzentrationsabhängigkeit. Eine Interaktion des Vinculin-Schwanzes mit der Domäne 4, wurde nachgewiesen [Cohen et al., 2005], wodurch es zu diesen reduzierten Capping-Effekt kommen kann.

6.8 Charakterisierung des Aktinpolymerisierenden Effektes der Konstrukte

Die Charakterisierung der Kopf-Konstrukte und der Schwanz-Konstrukte auf eine Aktin nukleationsverstärkende Eigenschaft wurde mit den rekombinanten Proteinen durchgeführt. Hierzu wurden zuerst die Vinculin-Kopf-Konstrukte vom C- und N-terminalen Ende verkürzt und auf Aktinpolymerisation getestet. Es zeigte sich, dass es ab einer Unterschreitung des C-terminalen Vinculin-Kopf-Bereiches ab 1-776 zu keiner Nukleation der Aktinpolymerisation mehr kommt.

Mit Ausnahme des Konstruktes Vh²⁵³⁻⁸⁵⁷ zeigten fast alle N-terminal verkürzten Vinculin-Kopf-Konstrukte eine G-Aktin nukleationsverstärkenden Effekt.

Werden die N-terminalen Domänen noch zusätzlich bis zur Domäne D4 verkleinert, interagierten diese wieder mit G-Aktin und es zeigte sich eine nukleationsverstärkender Effekt des G-Aktins. Die Inaktivität des D3-D4 Konstruktes kann nur durch eine nicht korrekte Faltung des Proteins erklärt werden, da die Domäne 3 im Inneren des globulären Vinculin-Kopfes liegt und zusammen mit den Domänen 1-3 eine zangenartige Struktur bildet [Bakolitsa et al., 2004; DeMali et al., 2005]. Durch den Verlust dieser Struktur, verliert das Konstrukt offensichtlich seine Konformation und wird dadurch inaktiv. Die C-terminal verkürzten Kopf-Konstrukte (D4^{H719-835}, D4^{H719-850} und D4^{H719-857}) zeigten eine nukleationsverstärkende Eigenschaft. Bei einer

N- oder C-terminalen Verkürzung innerhalb der Domäne 4 findet keine Nukleation von G-Aktin mehr statt.

Eine hohe Nukleationsaktivität wurde nur bei den Konstrukten beobachtet, welche aus den Domänen D1-D4 mit den verlängerten Teilbereichen der Linker-Region bestehen. Es zeigte sich, dass die Konstrukte ohne die Domäne 4 keinen nukleationsverstärkenden Effekt besaßen. Jedoch konnte bei Fehlen der N-terminalen Domänen, wie D1 und D1-D3, eine Verstärkung der Nukleation nachgewiesen werden. Somit sind die Domäne 4 und Teilbereiche der Linker-Region unabdingbar für den verstärkenden Nukleationseffekt.

Auch die Vinculin-Schwanz-Konstrukte wurden auf einen nukleationsfördernden Effekt hin analysiert. Diese Konstrukte enthalten die Domäne 5 und Teilbereiche der Linker-Region. Die Konstrukte des Vinculin-Schwanzes zeigten eine geringere Aktivität als die Vinculin-Kopf-Konstrukte. Der Kurvenverlauf der Aktinpolymerisation bei der Viskosimetrie lässt außerdem Rückschlüsse auf die Polymerlänge des F-Aktins zu. Da alle Nukleationskonstrukte dieselben Maxima der spezifischen Viskosimetrie erreichen, kann von derselben Länge des F-Aktins ausgegangen werden. Eine spontane Nukleation des G-Aktins findet unter diesen Bedingungen nur in geringem Umfang statt, da die Bildung über einen geschwindigkeitsbestimmenden trimeren Aktin-Komplex verläuft.

So interagieren zuerst zwei G-Aktine sehr labil miteinander und erst durch die Anlagerung eines dritten G-Aktins wird ein stabilerer trimerer Aktin-Komplex (Nukleus) erreicht. An diesen trimeren Aktin-Komplex lagern sich die freien G-Aktine an und die Elongation schreitet voran [Otomo et al., 2005; Pring et al., 2003; Good & Eck, 2007].

Ein nukleationsverstärkender Effekt des G-Aktins kann über eine Stabilisierung des Nukleus erfolgen. Durch die Stabilisierung der bereits gebildeten Nuklei wird die Anzahl der vorhandenen Nuklei nicht vermehrt, nur die anschließende Aktinpolymerisation erfolgt früher und die Länge der Aktinfilamente ist relativ gleich wie ohne eine Stabilisierung. Erfolgt aber nicht nur eine Stabilisierung eines Nukleus, sondern die Bildung zusätzlicher Nuklei, führt dies zu einer Reduktion der Länge des F-Aktins im Vergleich zu dem nicht stabilisierten Nukleus.

6.9 Aktinpolymerisation und Interaktion des Vinculin-Schwanzes

Der native und der rekombinante Vinculin-Schwanz zeigen beide einen verstärkenden Nukleationseffekt. Dieser ist jedoch geringer als der Nukleationseffekt der Kopf-Konstrukte. Die Vinculin-Schwanz-Konstrukte $Vt^{836-1066}$, $Vt^{851-1006}$ und $Vt^{858-1066}$ zeigen einen nukleationsverstärkenden Effekt mit G-Aktin. Jedoch fällt dieser sehr gering aus. Auch bei diesen Konstrukten wird die Aktivität durch die Linker-Region verstärkt. Da die Linker-Region einen offensichtlichen Einfluss auf den nukleationsverstärkenden Effekt des G-Aktins zeigt, was sich auch bei den Vinculin-Kopf-Konstrukten zeigte, ist dieser Bereich essentiell für den nukleationsverstärkenden Effekt des G-Aktins.

Einen geringeren nukleationsfördernden Effekt des Vinculin-Schwanzes wurde auch unter nicht polymerisierenden Bedingungen beschrieben. Der Vinculin-Schwanz ($Vt^{881-1066}$) polymerisiert G-Aktin zu F-Aktin und bündelt diese letztlich in F-Aktin-Bündeln [Wen et al., 2009]. Eine solche F-Aktin-Bündelung konnte nur durch die Konstrukte $Vt^{851-1066}$ und den native Vinculin-Schwanz erzielt werden, nicht aber durch die Domäne 5 ($Vt^{896-1066}$) allein. Somit sind die Bereiche der Linker-Region unabdingbar für die Wechselwirkung mit G-Aktin und deren Nukleation.

6.10 Aktinnukleation und Interaktion des Vinculin-Kopfes

Der nukleationsverstärkende Effekt der Vinculin-Konstrukte wurde quantitativ durch die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen Konzentrationen mit einem Spektralfluorometer analysiert. Alle verwendeten Konstrukte zeigten einen nukleationsverstärkenden Effekt des G-Aktins unter polymerisierenden Bedingungen.

Die Vinculin-Kopf-Konstrukte Vh^{1-835} , Vh^{1-850} und Vh^{1-857} zeigten unterschiedliche Aktivitäten. Diese Konstrukte unterscheiden sich nur durch die unterschiedlichen Bereiche der Linker-Region. Diese Bereiche der Linker-Region umfassten die beiden V8-Spaltstellen, die im Vinculin vorliegen. Die Linker-Region dieser Konstrukte hat einen Einfluss auf den Polymerisationseffekt. Es besteht ein erhöhter Nukleationseffekt bei den Konstrukten mit Anteilen der Linker-Region.

Zudem konnte durch biochemische Methoden sowohl eine G-Aktin Interaktion mit dem Vinculin-Kopf, als auch mit der Domäne 4 nachgewiesen werden. Aufgrund der Vermutung, dass es sich bei dieser Interaktion um eine dritte F-Aktin-Bindestelle

handeln könnte, liegt es nahe, die Vinculin-Kopf-Konstrukte durch Cosedimentation auf diese Protein-Interaktion zu testen. Eine solche Protein-Wechselwirkung zwischen F-Aktin und den Vinculin-Kopf-Konstrukten konnte aber nicht nachgewiesen werden, so dass hier also eine Interaktion mit G-Aktin vorliegen musste.

Die Konstrukte der Domäne 4 ($D4^{H719-835}$, $D4^{H719-850}$ und $D4^{H719-857}$) zeigen einen nukleationsverstärkenden Effekt, der ebenfalls durch die Linker-Region beeinflusst wird, wie es auch bei den Vinculin-Kopf-Konstrukten festgestellt wurde. Diese drei Konstrukte wurden jeweils N-terminal mit einem His-Tag und einem GST-Tag fusioniert. Einen G-Aktin nukleationsverstärkenden Effekt wurde in viskosimetrischen Messungen bei den GST-Fusionskonstrukten jedoch nicht beobachtet.

Der nukleationsverstärkende Effekt wird bei den kleinen Konstrukten durch den großen N-terminalen GST-Tag offenbar unterdrückt. Wahrscheinlich kommt es durch den gleichgroßen GST-Tag zu einer Maskierung der Bindestelle zwischen G-Aktin und den Vinculin-Konstrukten. Die Konstrukte $D4^{719-835}$, $D4^{719-850}$ und $D4^{719-857}$ mit einem fusionierten His-Tag und GST-Tag zeigten jeweils eine Protein-Protein Wechselwirkung mit G-Aktin, wie durch Pulldown gezeigt werden konnte. Somit besteht bei den N-terminal fusionierten GST-Konstrukten zwar eine Interaktion mit G-Aktin, die sich jedoch nicht in Form einer Nukleationsverstärkung des G-Aktins nachweisen lässt. Diese G-Aktin Interaktion und das Zusammenspiel mit der G-Aktinnukleation deutet auf mehrere Bindestellen zwischen G-Aktin und Vinculin hin. Bei weiteren Konstrukten $D4^{G719-776}$, $D4^{G719-743}$ und $D4^{G741-857}$, $D4^{G774-875}$ der Domäne 4 wurde kein Nukleationseffekt beobachtet. Wird die Domäne 4 N-terminal um eine oder zwei α -Helices verkürzt, cosedimentieren die Konstrukte in Gegenwart von G-Aktin in einem Pulldown. Wird stattdessen die Domäne 4 C-terminal um zwei α -Helices verkürzt, kommt es zu keiner weiteren Interaktion mit G-Aktin.

Eine chemische Vernetzung zwischen G-Aktin und dem Vinculin-Kopf-Konstrukt Vh^{1-857} wurde nur in sehr geringen Mengen gebildet und konnte ausschließlich nur in einem Immunblot analysiert werden. Die Cross-Link-Produkte wurden mit einer Größe von 135kDa, 170kDa und 240kDa detektiert. Das Cross-Link-Produkt mit der Größe von 190kDa wurde ebenfalls in der Vinculin-Kontrolle detektiert und wurde wahrscheinlich durch eine zufällige Verknüpfung gebildet. Aufgrund des Massenunterschieds von 40kDa des Cross-Link-Produktes von 135kDa liegt eine

In der Abbildung 55 sind die Bereiche der Domäne 4 und der Linker-Region, sowie die Bereiche in der eine Aktinnukleation und eine Aktin-Interaktion stattfinden, gekennzeichnet. Die Linker-Region enthält zwei prolinreiche Bereiche (PR¹ 837-847, PR² 859-878), am Anfang und Ende der Linker-Region. Ein kleiner Abschnitt dieser Linker-Region, PR¹, zeigt eine Homologie (DFPPPPPD) mit der Sequenz AS 841-848 von ActA. Diese Sequenz wurde in vierfacher Wiederholung in ActA nachgewiesen [Domann et al., 1992]. ActA ist ein 90kDa bakterielles Oberflächenprotein aus *Listeria monocytogenes*. Diese Bakterien besitzen die Fähigkeit zur Invasion von Säugerzellen und bewegen sich aktiv im Cytoplasma, indem sie die Aktinpolymerisation der Zelle induzieren und für ihre Fortbewegung nutzen [Price et al., 1989; Domann et al., 1992] und interagieren mit dem Protein VASP [Pistor et al., 1995].

Durch eine Dimerisierung werden zwei G-Aktine in räumliche Nähe gebracht, wodurch diese eine Aktivierung erfahren und durch Anlagerung eines dritten G-Aktins sich ein Trimer-Komplex (Nukleus) eines neuen barbed-ends bildet [Goode & Eck, 2007]. Ein solcher trimerer G-Aktin-Komplex kann sich auch spontan durch Ionen wie Mg²⁺ oder K⁺ bilden [Oosawa et al., 1972]. Eine solche Aktivierung des G-Aktins wird auch durch Formin [Pring et al., 2003; Shimada et al., 2004; Xu et al., 2004] und den Apr2/3-Komplex erzielt [Dayel et al., 2001; Marchand et al., 2001].

Die Nukleusbildung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei Ablauf der Aktinpolymerisation, da die Affinität zwischen den Aktinen sehr gering und konzentrationsabhängig ist. Folglich kommt es bei einer niedrigen Aktinkonzentration zu einer Nukleusbildung und einer solchen Polymerisation [Pollard & Cooper, 1986; Amman & Pollard, 200; Wegner, 1976].

Durch die Bindung von G-Aktin an den Vinculin-Kopf erfährt dieses eine Aktivierung und durch Stabilisierung kommt es zu einer weiteren Anlagerung von G-Aktinen und schließlich zur Bildung eines Nukleus. Eine solche Nukleusbildung, mit einer anschließenden Aktinpolymerisation erfolgt durch die Domäne 4 (AS 719-857). Die Bindung eines G-Aktins wird nur durch den Bereich 774-857 erzielt, aber zeigte keinen verstärkenden Nukleationseffekt. Offenbar ist der zusätzliche Aminosäurebereich 719-774 wichtig, um ein Nukleus zubilden und die Aktinpolymerisation zu beschleunigen. Die Bildung eines neuen Nukleus wird

dahingehend stabilisiert, dass der spontan gebildete Dimere-Komplex aus zwei G-Aktinen durch die Domäne 4 (719-857) stabilisiert wird und nicht zerfällt. Folglich wird die Anlagerung eines dritten G-Aktins begünstigt und die Aktinnukleation wird beschleunigt. Eine solche Stabilisierung eines Nukleus findet auch durch andere Proteine wie z.B. Formin statt [Pring et al., 2003; Shimada et al., 2004; Xu et al., 2004; Goode & Eck, 2007].

Da die Bildung des Aktindimers spontan verläuft, hat die Konzentration des Nukleators nur einen geringfügigen Einfluss auf die Nukleusbildung.

Das Modell eines solchen stabilisierenden Aktin-Dimers durch den Vinculin-Kopf und eine Nukleation von G-Aktin, kann wie in der Abbildung 56, postuliert werden.

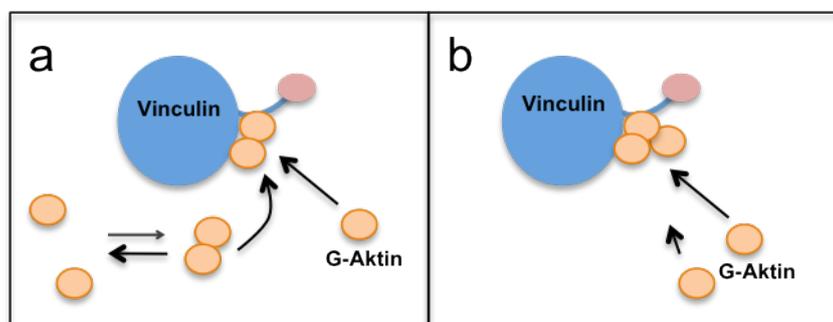


Abbildung 56: G-Aktin Nukleation des Vinculins

In der Abbildung ist schematisch die nukleationsfördernde Eigenschaft des Vinculins dargestellt. In der Abbildung a) lagert sich zwei G-Aktine spontan zu einem Dimer zusammen und werden über den Bereich (719-835) stabilisiert. Dann erfolgt die Anlagerung eines weiteren G-Aktins an das stabilisierte Dimer unter Bildung eines Nukleus, wie in der Abbildung b) dargestellt.

Eine solche Nukleusbildung ist essential für die Aktinpolymerisation einer Zelle, da Aktin zwar *in vitro* in einer hohen Konzentration vorliegt, wobei das G-Aktin (monomer) in niedriger Konzentration vorliegt [Korn, 1982; Pollard & Cooper, 1986].

Solche beschleunigten Aktinpolymerisationsvorgänge sind für die Zelle unerlässlich für die Struktur, Bewegung, Wundheilung, Phagozytose und Endocytose [Watanabe, 2010; Carlier et al., 2003; Welch & Mullins, 2002].

Aktinpolymerisierende Proteine verhelfen nicht nur der Nukleation, sondern bestimmen auch den Ort, eines sich bildenden Filamentes in der Zelle. Somit wird der Ort der Aktinnukleation im Fall von Vinculin im Bereich der Fokaladhäsion festgelegt.

6.12 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit zeigten die Modellkonstrukte des geöffneten Vinculins (D2-D5 und D3-D5) eine F-Aktin-Bündelung, sowie einen Capping- und Nukleationseffekt, wobei der Vinculin-Kopf nur einen Nukleationseffekt und eine G-Aktin-Bindung zeigte. Des Weiteren wurde eine G-Aktin-Bindestelle im Vinculin-Kopf (D1-D4) nachgewiesen, die schließlich im Bereich der Domäne 4 (719-875) lokalisiert wurde, wobei dieser Bereich eine nukleationsfördernde Aktinpolymerisation zeigte. Die Geschwindigkeit des Aktinnukleationseffektes wurde durch den Bereich der Linker-Region positiv verstärkt, jedoch durch Interaktion des Vinculin-Schwanzes mit dem Vinculin-Kopf erniedrigt.

Schlussfolgernd wurde durch diese Arbeit eine nicht bekannte G-Aktin Bindestelle, im Bereich 719-875 des Vinculin-Kopfes nachgewiesen und das geöffnete Vinculin, wurde als ein Aktin-nukleationsförderndes Protein identifiziert.

7 Ausblick

Weiterführend kann die Wechselwirkung zwischen G-Aktin und Vinculin weiter charakterisiert und eingegrenzt werden, indem die Bindestelle zwischen dem G-Aktin und Vinculin einem engeren Aminosäurenbereich zugeordnet wird. Hierzu können die Vinculin-Kopf-Konstrukte oder die Domäne 4 durch Punktmutationen dahingehend verändert werden, dass diese keine nukleationsfördernde Eigenschaft oder Interaktion mit G-Aktin mehr eingehen.

Die Punktmutationen für eine Veränderung müssten auf der letzten α -Helix der Domäne 4 und in der Linker-Region liegen. Hierzu sollten die exponierten Aminosäuren durch neutrale und ungeladene Aminosäuren ausgetauscht werden. Des Weiteren kann der prolinreiche Bereich durch neutrale Aminosäuren ausgetauscht werden. Dabei wird die Wechselwirkung indirekt gezeigt, da durch die Mutationen eine Protein-Protein-Wechselwirkung unterbunden wird. Um strukturelle Veränderungen, die durch die Mutationen induziert wurden, zu identifizieren, müssen diese stets die sekundären Strukturen dieser Mutanten mit dem Wildtyp-Konstrukt geprüft werden, um eine Aussage über die Protein-Protein-Wechselwirkung zu erhalten.

Die N-terminal fusionierten GST-Vinculin-Konstrukte können durch eine limitierte Protolyse abgespalten werden, um den Einfluss auf die Nukleation und Interaktion mit G-Aktin zu analysieren.

Durch die Plasmonenresonanz-Spektroskopie kann die Bindung zwischen Vinculin und G-Aktin nachgewiesen werden. Um die Bindungsanzahl (Komplex-Typ) zwischen G-Aktin und Vinculin zu bestimmen, dient das Vinculin als Substrat und G-Aktin als Ligand. Durch die Anlagerung des Liganden an Vinculin kann die Anzahl der Bindungen mit G-Aktin nachgewiesen werden.

8 Literaturverzeichnis

- Amann, K.J. & Pollard, T.D.** (2000): Cellular regulation of actin network assembly. *Curr. Biol.* 10(20): R728-30.
- Atkinson, S.J., Hosford, M.A., Molitoris, B.A.** (2004): Mechanism of actin polymerization in cellular ATP depletion. *J Biol Chem.* 13;279(7):5194-9.
- Bakolitsa, C., Cohen D.M., Bankston L.A., Bobkov, A.A., Cadwell G.W., Jennings L., Critchley, D.R., Craig, S.W., Liddington, R.C.** (2004): Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* 430(6999): 583-586.
- Bakolitsa, C., Pereda, J.M. Clive R. Bagshaw, C.R., Critchley, D.R., Liddington, R.C.** (1999): Crystal Structure of the Vinculin Tail Suggests a Pathway for Activation Cell, *Cell Press*, 603–613.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., Geiger, B.** (2001): Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell. Biol.*; 3 (5):466-72.
- Baltimore, D.** (1970). Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature* 226 (5252): 1209–1211.
- Barden, J.A., Wu, C.S., Dos Remedios, C.G.** (1983): Actin monomer conformation under polymerizing conditions studied by proton nuclear magnetic resonance and circular dichroism spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 28;748(2):230-5.
- Barstead, R.J., Waterston, R.H.** (1989): The Basal Component of the Nematode Dense-body Is Vinculin. *The Journal of Biochemistry* Vol. 264, No. 17. Issue of June 15, pp. 10177-10185.
- Barstead, R.J., Waterston, R.H.** (1991): Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *J Cell Biol.*;114(4):715-24.
- Barth, A.I., Nathke, I.S., Nelson, W.J.** (1997): Cadherins, Catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:683-690.

- Bartlett, J. M. S.; Stirling, D.** (2003): A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols*. 226. pp. 3–6.
- Bass, M.D., Patel, B., Barsukov, I.G., Fillingham, I.J., Mason, R, Smith, B..J., Bagshaw, C.R., Critchley, D.R.** (2002): Further characterization of the interaction between the cytoskeletal proteins talin and vinculin. *Biochem. J.* 362: 761-768.
- Bass, M.D., Smith, B.J., Prigent, S.A., Critchley, D.R.** (1999): Talin contains three similar vinculin-binding sites predicted to form an amphipathic helix. *Biochem J.*;341 (Pt 2):257-63.
- Belkin, A.M., Ornatsky, O.I., Glukhova, M.A., Koteliansky, V.E.** (1988a): Immunolocalization of meta-vinculin in human smooth and cardiac muscles. *J Cell Biol.*;107(2):545-53.
- Belkin, A.M., Ornatsky, O.I., Kabakov, A.E., Glukhova, M.A., Koteliansky, V.E.** (1988b): Diversity of vinculin/meta-vinculin in human tissues and cultivated cells. Expression of muscle specific variants of vinculin in human aorta smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 15;263(14):6631-5.
- Berrier, A.L., Yamada, K.M.** (2007): Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol.* Dec;213(3):565-73. Review.
- Bloch, S., Bloch, R.J.** (1985): Vinculin in Subsarcolemmal Densities in Chicken Skeletal Muscle: Localization and to Intracellular and Extracellular Structures. *Charles R. the Journal of Cell Biology - Vol.* 101, 240-256.
- Bois, P.R.J., Borgon, R.A., Vorrhein, C., Izard, T.** (2005): Structural Dynamics of α -Actinin-Vinculin Interactions *Mol. Cell. Biol.* 25: 6112-6122.
- Bois, P.R.J., O'Hara, B.P., Nietlispach, D., Kirkpatrick, J., Izard T.** (2006): The vinculin binding sites of talin and α -actinin are sufficient to activate vinculin. *J Biol. Chem.* 281:7228-7236.
- Borgon, R.A., Vorrhein, C., Bricogne, G., Bois, P.R., Izard T.** (2004): Crystal structure of human vinculin. *Structure (Camb.)* 12(7): 1189-1197.

- Bourdet-Sicard, R., Rüdiger, M., Jockusch, B.M., Gounon, P., Sansonetti, P., Nhieu, G.T.V.** (1999): Binding of the Shigella protein IpaA to vinculin induces F-Actin depolymerization. *EMBP Journal* Vol 18 No 21 pp. 5853-5862, 1999
- Bremer, A., Aebi, U.**, (1992): The structure of the F-actin filament and the actin molecule. *Curr Opin Cell Biol.*;4(1):20-6.
- Bretscher, A.** (1981): Fimbrin is a cytoskeletal protein that crosslinks F-actin in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.*;78(11):6849-53.
- Brindle, N.P., Holt, M.R., Davies, J.E., Price, C.J., Critchley, D.R.** (1996): The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem. J.* 318: 753-757.
- Burridge K. & Connell L.** (1983): A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes. *J. Cell. Biol.* 97(2):359-67.
- Burridge, K. und Feramisco, J.R.** (1980): Microinjection and localization of a 130K protein in living fibroblasts: a relationship to actin and fibronectin. *Cell.* 19: 587-595.
- Burridge, K. und Mangeat, P.** (1984): An interaction between vinculin and talin. *Nature* 308:744-746.
- Calderwood DA, Yan B, de Pereda JM, Alvarez BG, Fujioka Y, Liddington RC, Ginsberg MH.** (2002): The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem.* Jun 14;277(24):21749-58.
- Carlier MF.** (1989) Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int Rev Cytol.*;115:139-70.
- Carlier, M.F.** (1991): Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chern.* 266(1):1-4. Review.
- Carlier, M.F., Le Clainche, C., Wiesner, S., Pantaloni, D.** (2003): Actin-based motility: from molecules to movement. *Bioessays.*;25(4):336-45.

- Chandrasekar, I., Stradal, T.E.B., Holt, M.R., Entschladen, F., Jockusch, B.M., Ziegler, W.H.** (2005): Vinculin acts as a sensor in lipid regulation of adhesion-site turnover *Journal of Cell Science* 118, 1461-1472
- Chen, H., Choudhury, D.M., Craig, S.W.** (2006): Coincidence of actin filaments and talin is required to activate vinculin. *J. Biol. Chem.* 281: 40389-40398.
- Clainche, C., Dwivedi, S.P., Didry, D., Carlier, M.F.** (2010): Vinculin is a dually regulated actin filament barbed end-capping and side-binding protein. *J Biol Chem.* Jul 23;285(30):23420-32.
- Cohen, D.M., Chen, H., Johnson, R.P., Choudhury, B., Craig, S.W.** (2005): Two Distinct Head-Tail Interfaces Cooperate to Suppress Activation of Vinculin by Talin. *J. Biol. Chem.* 280: 17109-17117.
- Cooper, J.A., Buhle, E.L., Jr., Walker, S.B., Tsong, T.Y., Pollard, T.D.** (1983): Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization. *Biochemistry*, 22: 2193-2202.
- Coutu, M.D., Craig, S.W.** (1988): cDNA-derived sequence of chicken embryo vinculin. *Proc. Natl, Acad. Sei. USA* 85: 8535-8539.
- Cowin, P., Kapprell, H.P., Franke, W.W., Tamkun, J., Hynes, R.O.** (1986): Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell.*;46(7):1063-73.
- Craig, S.W., Pardo, J.V.** (1983) Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at costameres, myofibril-to-sarcolemma attachment sites. *Cell Motil.* 3(5-6):449-62.
- Crawford K, Flick R, Close L, Shelly D, Paul R, Bove K, Kumar A, Lessard J.** (2002a) Mice lacking skeletal muscle actin show reduced muscle strength and growth deficits and die during the neonatal period. *Mol Cell Biol.*; 22(16):5887-96.
- Crawford, K., Flick, R., Close, L., Shelly, D., Paul, R., Bove, K., Kumar, A., Lessard, J.** (2002b): Mice Lacking Skeletal Muscle Actin Show Reduced Muscle Strength and Growth Deficits and Die during the Neonatal. *Period Molecular and Cellular*, Aug. p. 5887–5896 Vol. 22, No. 16

- Critchley, D.R.** (2000): Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol.*; 12(1):133-9.
- Danowski, B.A., Imanaka-Yoshida, K., Sanger, J.M., Sanger, J.W.** (1992): Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J Cell Biol.*;118(6):1411-20.
- Dayel MJ, Holleran EA, Mullins RD.** (2001) Arp2/3 complex requires hydrolyzable ATP for nucleation of new actin filaments. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 98(26):14871
- DeMali, K.A., Barlow, C.A., Burridge, K.** (2002): Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol.* 159: 881-891.
- Disanza A, Steffen A, Hertzog M, Frittoli E, Rottner K, Scita G.** (2005) Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci.*; 62(9):955-70.
- Domann E, Wehland J, Rohde M, Pistor S, Hartl M, Goebel W, Leimeister-Wächter M, Wuenscher M, Chakraborty T.** (1992) A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.*; 11(5):1981-90.
- Drenckhahn D, Franz H.** (1986): Identification of actin-, alpha-actinin-, and vinculin-containing plaques at the lateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol.* May;102(5):1843-52.
- Dustin P.** (1980): Microtubules *Sci. Am.* 243, 66-76.
- Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M., Adelstein, R.S.** (1973): Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* ;70(9):2687-91.
- Esue, O., Harris, E.S., Higgs, H.N., Wirtz, D.** (2008): The filamentous actin cross-linking/bundling activity of mammalian formins. *J Mol Biol.* 12;384(2):324-34.

- Frieden, C.** (1983): Polymerization of actin: mechanism of the Mg^{2+} -induced process at pH 8 and 20 degrees c. *Proc. Natl. Acad. Sei, USA*, 80: 6513-6517.
- Galbraith, C.G., Yamada, K.M., Sheetz, M.P.** (2002): The relationship between force and focal complex development. *J. Cell. Biol.*; 159(4):695-705.
- Geiger B, Dutton AH, Tokuyasu KT, Singer SJ** (1981): Immunoelectron microscope studies of membrane-microfilament interactions: distributions of alpha-actinin, tropomyosin, and vinculin in intestinal epithelial brush border and chicken gizzard smooth muscle cells. *J Cell Biol.*;91(3 Pt 1):614-28.
- Geiger, B.** (1979): A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell*. 18: 193-205.
- Geiger, B.** (1982): Involvement of vinculin in contact-induced cytoskeletal interactions. *Cold Spring Harb Symp Quant. Biol.* 46 pt 2:671-82.
- Geiger, B., Ginsberg, D.** (1991): The cytoplasmic domain of adherens-type junctions. *Cell Motil Cytoskeleton.*;20(1):1-6. Review.
- Geiger, B., Tokuyasu, K.T., Dutton, A.H., Singer, S.J.** (1980): Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proc Natl Acad Sci.*;77(7):4127-31.
- Geiger, B., Volk, T., Volberg, T.** (1985): Molecular Heterogeneity of Adherens Junctions. *The Journal of Cell Biology* , Volume 101, 1523-1531
- Gilmore, A.P. und Burridge, K.** (1996): Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl
- Gilmore, A.P., Jackson, P., Waites, G.T., Critchley, D.R.** (1992): Further characterisation of the talin-binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Sci.*; 103 (Pt 3):719-31.
- Gilmore, A.P., Wood, C., Ohanian, V., Jackson, P., Patel, B., Rees, D.J., Hynes, R.O., Critchley, D.R.** (1993): The cytoskeletal protein talin contains at least two distinct vinculin binding domains. *J Cell Biol.*; 122(2):337-47.

- Gimona, M., Small, J.V., Moeremans, M., Van Damme, J., Puype, M., Vandekerckhove, J.** (1988): Porcine vinculin and metavinculin differ by a 68-residue insert located close to the carboxy-terminal part of the molecule. *EMBO J.* Aug;7(8):2329-34.
- Glukhova, M.A., Kabakov, A.E., Frid, M.G., Ornatsky, O.I., Belkin, A.M., Mukhin, D.N., Orekhov, A.N., Koteliansky, V.E., Smirnov, V.N.** (1988): Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* ;85(24):9542-6.
- Goldmann, W.H. & Ingber, D.E.** (2002): Intact Vinculin Protein Is Required for Control of Cell Shape, Cell Mechanics, and *rac*-Dependent Lamellipodia Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 749–755
- Goley, E.D., Rodenbusch, S.E., Martin, C.A., Welch, M.D.** (2004): Critical Conformational Changes in the Arp2/3 Complex Are Induced by Nucleotide and Nucleation Promoting Factor. *Molecular Cell*, Vol. 16, 269–279.
- Goode, B.L & Eck, M.J.** (2007): Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 76:593–627
- Groesch, M.E., Otto, J.J.** (1990): Purification and characterization of an 85 kDa talin-binding fragment of vinculin. *Cell Motil Cytoskeleton.*;15(1):41-50.
- Hamiaux, C., Eerde, A.V., Parsot, C., Broos, J., Dijkstra, B.W.** (2006): Structural mimicry for vinculin activation by IpaA, a virulence factor of *Shigella flexneri*. *EMBO reports*
- Hatano, S., Oosawa, F.** (1966a): Extraction of an actin-like protein from the plasmodium of a myxomycete and its interaction with myosin A from rabbit striated muscle. *J Cell Physiol.* ;68(2):197-202.
- Hatano, S., Oosawa, F.** (1966b): Isolation and characterization of plasmodium actin. *Biochim Biophys Acta.* 31;127(2):488-98.
- Hazan, R.B., Kang, L., Roe, S., Borgen, P.L, Rimm D.L.** (1997): Vinculin Is Associated with the E-cadherin Adhesion Complex. *J. Biol. Chem.* 272: 32448-32453.

- Hegyí, G., Venyaminov, S.Y.** (1980): Absence of gross changes in the secondary structure of actin at G-F transition. *FEBS Lett.* 1;109(1):134-6.
- Hemmings L, Kuhlman PA, Critchley DR.** (1992) Analysis of the actin-binding domain of alpha-actinin by mutagenesis and demonstration that dystrophin contains a functionally homologous domain. *J Cell Biol.*; 116(6):1369-80.
- Herman, I. M.** (1993): Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol.* Feb;5(1):48-55.
- Herrenknecht, K., Ozawa, M., Eckerskorn, C., Lottspeicht, F., Lenter, M., Kemler, R.** (1991): The uvomorulin-anchorage protein a catenin is a vinculin homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 88, pp. 9156-9160
- Horvath, A.R., Asijee, G.M., Muszbek, L.** (1992): Cytoskeletal assembly and vinculin-cytoskeleton interaction in different phases of the activation of bovine platelets. *Cell Motil Cytoskeleton.*;21(2):123-31.
- Hug C, Jay PY, Reddy I, McNally JG, Bridgman PC, Elson EL, Cooper JA.** (1995): Capping protein levels influence actin assembly and cell motility in dictyostelium. *Cell.* May 19;81(4):591-600.
- Hüttelmaier, S., Bubeck, P., Rudiger, M., Jockusch, B.M.** (1997): Characterization of two F-actin-binding and oligomerization sites in the cell-contact protein vinculin. *Eur. J. Biochem.* 247: 1136-1142.
- Hüttelmaier, S., Illenberger, S., Grosheva, I., Rüdiger, M., Singer, R.H., Jockusch, B.M.** (2001): Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins. *J Cell Biol.* Nov 26;155(5):775-86.
- Hüttelmaier. S., Mayboroda, O., Harbeck, B., Jarchau, T., Jockusch, B.M., Rudiger, M.** (1998): The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated byphosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr. Biol.* 8: 479-488.
- Huveneers, S., Danen, E.H.** (2009): Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci.*; 122(Pt 8):1059-69. Review.
- Huxley, H.E.** (1963): Electronmicropic studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.* 115: 151-158.

- Isenberg, G., Leonard, K., Jockusch, B.M.** (1982): Structural aspects of vinculin-actin interactions. *J Mol Biol.* 25;158(2):231-49.
- Izard, T., Vonnrhein, C.** (2004): Structural basis for amplifying vinculin activation by talin. *J. Biol. Chem.* 279(26):27667-78.
- Janssen, M.E., Kim, E., Liu, H., Fujimoto, L.M., Bobkov, A., Volkmann, N., Hanein, D.** (2006): Three-dimensional structure of vinculin bound to actin filaments. *Mol Cell.* Jan 20;21(2):271-81.
- Jockusch, B.M., Brown, D.F., Rusch, H.P.** (1971): Synthesis and some properties of an actin-like nuclear protein in the slime mold *Physarum polycephalum*. *J Bacteriol.* 108(2):705-14.
- Jockusch, B.M., Isenberg, G.** (1981): Interaction of alpha-actinin and vinculin with actin: opposite effects on filament network formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(5):3005-9.
- Jockusch, B.M., Isenberg, G.** (1982): Vinculin and alpha-actinin: interaction with actin and effect on microfilament network formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*;46 Pt 2:613-23.
- Johnson, R.P., Craig, S.W.** (1995): The carboxy-terminal tail domain of vinculin contains a cryptic binding site for acidic phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210:159-164.
- Johnson, R.P., Craig, S.W.** (1994): An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J. Biol. Chem.* 269(17):12611-9.
- Johnson, R.P., Craig, S.W.** (2000): Actin activates a cryptic dimerization potential of the vinculin tail domain. *J Biol Chem* Jan 7;275(1):95-105.
- Jones P, Jackson P, Price GJ, Patel B, Ohanion V, Lear AL, Critchley DR.** (1989) Identification of a talin binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Biol.*;109(6 Pt 1):2917-27.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., Holmes, K.C.** (1990): Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature.* 6;347(6288):37-44.

- Kabsch, W., Vandekerckhove, J.** (1992): Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*;21:49-76.
- Kaufmann S, Piekenbrock T, Goldmann WH, Bärmann M, Isenberg G.** (1991) Talin binds to actin and promotes filament nucleation. *FEBS Lett.*; 284(2):187-91.
- Kawabe, H., Hata, Y., Takeuchi, M., Ide, N., Mizoguchi, A., Takai, Y.** (1999): nArgBP2 a novel neural member of ponsin/ArgBP2/vinexin family that interacts with synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein (SAPAP). *J. Biol. Chem.* 274:30914-30918.
- Kawahara, E., Tokuda, R., Nakanishi, I.** (1999): Migratory phenotypes of HSC-3 squamous carcinoma cell line induced by EGF and PMA: relevance to migration of loosening of adhesion and vinculin-associated focal contacts with prominent filopodia. *Cell Biol Int.*;23(3):163-74.
- Khurana, S., George, S.P.** (2008): Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: villin's perspective. *FEBS Lett.* Jun 18;582(14):2128-39. Review.
- Kioka, N., Sakata, S., Kawauchi, T., Amachi, T., Akiyama, S.K., Okazaki, K., Yaen, C., Yamada, K.M., Aota, S.** (1999): Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SB3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J. Cell. Biol.* 144: 59-69.
- Korn ED.** (1982) Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol Rev.*;62(2):672-737.
- Koteliansky, V.E., Gneushev, G.N.** (1983): Vinculin localization in cardiac muscle *Federation of European Biochemical Societies*, Volume 159, number 1,2.
- Koteliansky, V.E., Gneushev, G.N., Glukhova, M.A., Venyaminov, S.Y., Muszbek, L.** (1984): Identification and isolation of vinculin from platelets. *FEBS* Volume 165, number 1.
- Kouyama T, Mihashi K.** (1981) Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur J Biochem.*;114(1):33-8.

- Kreishman-Deitrick, M., Goley, E.D., Burdine, L., Denison, C., Egile, C., Li, R., Murali, N., Kodadek, T.J., Welch, M.D., Rosen, M.K.** (2005): NMR Analyses of the Activation of the Arp2/3 Complex by Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein *Biochemistry* 2005, 44, 15247-15256
- Kroenker, M., Rudiger, A.H., Jockusch, B.M., Rudiger, M.** (1994): Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. *FEBS Lett.* 355: 259-262.
- Kuehl, W.M., Conti, M.A., Adelstein, R.S.** (1975): Structural studies on rabbit skeletal muscle actin. Ordering of the peptides produced by cleavage with cyanogen bromide. *J Biol Chem.* 10;250(15):5890-6.
- Kumar, A., Crawford, K., Close, L., Madison, M., Lorenz, J., Doetschman, T., Pawlowski, S., Duffy, J., Neumann, J., Robbins, J., Boivin, G. P., O'Toole, B. A., Lessard, J. L.** (1997): Rescue of cardiac a-actin-deficient mice by enteric smooth muscle g-actin. *Cell Biology* Vol. 94, pp. 4406–4411
- Lee SW, Wulfschlegel JD, Otto JJ.** (1992) Vinculin binding site mapped on talin with an anti-idiotypic antibody. *J Biol Chem.*; 267(23):16355-8.
- Lifshitz-Mercer, B., Czernobilsky, B., Feldberg, E., Geiger, B.** (1997): Expression of the adherens junction protein vinculin in human basal and squamous cell tumors: relationship to invasiveness and metastatic potential. *Hum Pathol.* Nov;28(11):1230-6.
- Loo DT, Kanner SB, Aruffo A.** (1998) Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction. *J Biol Chem.*; 273(36):23304-12.
- Lu J, Meng W, Poy F, Maiti S, Goode BL, Eck MJ.** (2007) Structure of the FH2 domain of Daam1: implications for formin regulation of actin assembly. *J Mol Biol. J.*; 369(5):1258-69.
- MacLean-Fletcher S, Pollard TD.** (1980) Identification of a factor in conventional muscle actin preparations which inhibits actin filament self-association. *Biochem Biophys Res Commun.*; 96(1):18-27.
- Mandai, K., Nakanishi, Ho, Satoh, A., Takahashi, K., Satoh, K., Nishioka, H., Mizoguchi, A., Takai, Y.** (1999). Ponsin/SH3PI2: an I-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. *J. Cell. Biol.* 144: 1001-1017.

- Marchand JB, Kaiser DA, Pollard TD, Higgs HN.** (2001) Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol.*; 3(1):76-82.
- Marchision, P.C., Bergui, L., Corbascio, G.C., Cremona, O., D'Urso, N., Schena, M., Tesio, L., Caligaris-Cappio, F.** (1988): Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood.* 72: 830-833
- McGregor, A., Blanchard, A.D., Rowe, A.J., Critchlev, D.R.** (1994): Identification of the vinculin-binding site in the cytoskeletal protein alpha-actin in. *Biochem. J.* 301 (Pt 1):225-33.
- Menard, R., Sansonetti, P.J., Parsot, C.** (1993): Nonpolar Mutagenesis of the ipa Genes Defines IpaB, IpaC, and IpaD as Effectors of Shigella flexneri Entry into Epithelial Cells *Journal of Bacteriology*, p. 5899-5906 Vol. 175, No. 18
- Menkel, A.R., Kroenker, M., Bubeck, P., Ronsiek, M., Nikolai, G., Jockusch, B.M.** (1994): Characterization of an F-actin-binding domain in the cytoskeletal protein vinculin. *J. Cell. Biol.* 126: 1231-1240.
- Meyer, T., Brinck, U.** (1997): Expression of myogenic marker proteins in human leiomyosarcoma. *APMIS.*;105(10):793-800.
- Mierke, C.T.** (2009): The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells. *Cell Biochem Biophys.*; 53(3):115-26. Review.
- Mierke, C.T., Kollmannsberger, P., Zitterbart, D.P., Diez, G., Koch, T.M., Marg, S., Ziegler, W.H., Goldmann, W.H., Fabry, B.** (2010): Vinculin facilitates cell invasion into three-dimensional collagen matrices. *J Biol Chem.* Apr 23;285(17):13121-30. Epub 2010 Feb 24.
- Miller, G.J., Dunn, S.D., Ball, E.H.** (2001): Interaction of the N- and C-terminal domains of vinculin. Characterization and mapping studies. *J. Biol. Chem.* 276: 11729-11734.
- Milligan, R.A., Whittaker, M., Safer, D.** (1990): Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature* 348(6298):217-21.

- Mimura N, Asano A.** (1986) Isolation and characterization of a conserved actin-binding domain from rat hepatic actinogelin, rat skeletal muscle, and chicken gizzard alpha-actinins. *J Biol Chem.*;261(23):10680-7.
- Moseley, J.B., Goode, B.L.** (2005): Differential activities and regulation of *Saccharomyces cerevisiae* formin proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J Biol Chem.* 2005 Jul 29;280(30):28023-33.
- Muguruma M, Matsumura S, Fukazawa T.** (1990) Direct interactions between talin and actin. *Biochem Biophys Res Commun.*; 171(3):1217-23.
- Muguruma M, Matsumura S, Fukazawa T.** (1992) Augmentation of alpha-actinin-induced gelation of actin by talin. *J Biol Chem.*; 267(8):5621-4.
- Nachmias, V.T., Ingram, W.C.**(1970): Actomyosin from *Physarum polycephalum*: electron microscopy of myosin-enriched preparations. *Science.* 13; 170(3959):743-5.
- Nagafuchi, A., Takeichi, M., Tsukita, S.** (1991): The 102 kd Cadherin-Associated Protein: Similarity to Vinculin and Posttranscriptional Regulation of Expression. *Cell*, Vol. 65, 649-657.
- Nayal, A., Webb, D.J., Horwitz, A.F.** (2004): Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* Feb;16(1):94-8.
- Neumann, N.** (2004) Vergleichende Charakterisierung der Interaktion von Metavinculin und Vinculin mit Actin. *Diplomarbeit Universität Bielefeld*
- Nhieu, G., Bourdet-Sicard, R., Duménil, G., Blocker, A., Sansonetti, P.J.** (2000): Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. *Cell Microbiol.* Jun;2(3):187-93. Review.
- Nhieu, G.T., Sansonetti, P.J.** (1999): Mechanism of *Shigella* entry into epithelial cells. *Curr Opin Microbiol.* Feb;2(1):51-5. Review.
- Nhieu, G.T.V., Ben-Ze'ev, A., Sansonetti, P.J.** (1997): Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *The EMBO Journal* Vol.16 No.10 pp.2717-2729.

- Nieset, J.E., Redfield, A.R., Jin, F., Knudsen, K.A., Johnson, K.R., Wheelock, M.J.** (1997): Characterization of the interactions of a-catenin with a-actinin and b-catenin/plakoglobin. *Journal of Cell Science* 110, 1013-1022.
- Oberlack, F. J.** (2009) Charakterisierung der Interaktion des Vinculin-Kopffragmentes monomeres mit Actin. *Diplomarbeit Universität Bielefeld*
- Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Mae'da, Y., Narita, A.** (2009): The nature of the globular- to fibrous-actin transition *Nature* Vol 457, 22
- Oosawa, F.** (1972): Dynamic properties of F-actin and the thin filament. *Nihon Seirigaku Zasshi.*;34(2):96-7.
- Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., Rosen, M.K.** (2005): Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature*. Vol 433,3
- Otto, J.J.** (1990): Vinculin. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 16(1):1
- Pantaloni, D., Le Clainche, C., Carlier, M.F.** (2001): Mechanism of actin-based motility. *Science*. May 25;292(5521):1502-6. Review.
- Papagrigoriou, E., Gingras, A.R, Barsukov, I.L., Bate, N., Fillingharn, I.J., Patel, B., Frank, R, Ziegler, W.H., Roberts, G.C.K., Critchley, D.R, Ernsley, J.** (2004): Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five-helix bundle *EMBO J* 23: 2942-2951.
- Pardo, J.V., Siliciano, J.D., Craig, S.W.** (1983a): Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. *J Cell Biol.*;97(4):1081-8.
- Pardo, J.V., Siliciano, J.D., Craig, S.W.** (1983b): A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci USA.*;80(4):1008-12.
- Park H, Valencia-Gallardo C, Sharff A, Tran Van Nhieue G, Izard T.** (2011) Novel vinculin binding site of the IpaA invasin of Shigella. *J Biol Chem.*; 286(26):23214-21.

- Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d'Hauteville, H., Sansonetti, P., Demers, B.** (2005): A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology* 56 (6), 1627–1635.
- Perrin, B.J. & Ervasti, J.M.** (2010): The Actin Gene Family: Function Follows Isoform *Cytoskeleton* 67:630–634 rew
- Pierobon-Bormioli, S., Sartore, S., Libera, L.D., Vitadello, M., Schiaffino, S.** (1981): "Fast" isomyosins and fiber types in mammalian skeletal muscle. *J Histochem Cytochem.*;29(10):1179-88.
- Pistor S, Chakraborty T, Walter U, Wehland J.** (1995) The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr Biol.*; 5(5):517-25.
- Pokutta, S., Weis, W.I.** (2002): The cytoplasmic face of cell contact sites. *Curr Opin Struct Biol.* Apr;12(2):255-62. Review.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., Mullins, R.D.** (2000): Molecular Mechanisms controlling Actin Filament Dynamics in nonmuscle cels. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:545–76
- Pollard, T.D., Cooper, J.A.** (1986): Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and *functions*. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 987-1035.
- Price, G.J., Jones, P., Davison, M.D., Patei, B., Bendori, R., Geiger, B., Critchley, D.R.** (1989): Primary sequence and domain structure of chicken vinculin. *Biochem J.* 259(2):453-61.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., Zigmond, S.H.** (2003): Mechanism of Formin-Induced Nucleation of Actin Filaments *Biochemistry* 2003, 42, 486-496
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E. Zigmond, S., Bretscher, A., Boone, C.** (2002): Role of Formins in Actin Assembly: Nucleation and Barbed-End Association *Science* 297, 612
- Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E., Mullins, R.D.** (2005): *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature*: 433(7024):382-8.
- Reinhard, M., Rudiger, M., Jockusch, B.M., Walter, U.** (1996): VASP interaction

with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett.* 399: 103-107.

Rickardt, J.E., Sheterline, P. (1988): Effect of ATP Removal and Inorganic Phosphate on Length Redistribution of Sheared Actin Filament Populations Evidence for a Mechanism of End-to-End Annealing *J. Mol. Biol.* 201, 675-681

Ridley, A.J. (2004): Pulling back to move forward. *Cell.*;116(3):357-8.

Rimm, D.L., Koslov., E.R., Kebriaei, P., Cianci, C.D., Morrow, J.S. (1995): α (E)-Catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 92, pp. 8813-8817

Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, Marchand JB, Higgs HN, Choe S, Pollard TD. (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science.*; 294(5547):1679-84.

Rodal, A.A., Sokolova, O., Robins, D.B., Daugherty, K.M., Hippenmeyer, S., Riezman, H., Grigorieff, N., Goode, B.L. (2005): Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nature Structural & Molecular Biology*

Rodríguez Fernández J.L., Geiger B., Salomon D., Ben-Ze'ev A. (1993): Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility, and anchorage-dependent growth of 3T3 cells. *J Cell Biol.* Sep;122(6):1285-94.

Rodríguez Fernández J.L., Geiger B., Salomon D., Sabanay I., Zöllner M., Ben-Ze'ev A. (1992a) Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. *J Cell Biol.* ;119(2):427-38.

Rodríguez Fernández, J.L., Geiger, B., Salomon, D., Ben-Ze'ev, A. (1992b): Overexpression of vinculin suppresses cell motility in BALB/c 3T3 cells. *Cell Motil Cytoskeleton.*;22(2):127-34.

Rosenfeld, G.C., Hou, D.C., Dingus, J., Meza, I., Bryan J. (1985): Isolation and Partial Characterization of Human Platelet Vinculin. *The Journal of Cell Biology* - Volume 100, 669-676

Rubenstein, P.A. (1990): The functional importance of multiple actin isoforms.

Bioessays.;12(7):309-15.

- Rüdiger, M.** (1998): Vinculin and alpha-catenin: shared and unique functions in adherens junctions. *Bioessays*. Sep;20(9):733-40.
- Sadano, H., Inoue, M., Taniguchi, S.** (1992): Differential expression of vinculin between weakly and highly metastatic B16-melanoma cell lines. *Jpn J Cancer Res.*; 83(6):625-30.
- Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L., Pellman, D.** (2002): An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and Profilin. *Nature Cell Biology*
- Samstag, Y., Eibert, S.M., Klemke, M., Wabnitz, G.H.** (2003): Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol.*;73(1):30-48.
- Saunders, A., Holth, M.R., Jennings, L., Sutton, D.H., Barsukova, I.L., Bobkovic, A., Liddington, R.C., Adamson, E.A., Dunn, G.A., Critchley, D.R.** (2006): Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *Ruth M. European Journal of Cell Biology* 85 (2006) 487–500
- Schildmeyer, L.A., Braun, R., Taffet, G., Debiase, M., Burns, A.E., Bradley, A., Schwartz, R.J.** (2000): Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle alpha-actin null mouse. *FASEB J.* ;14(14):2213-20.
- Schliwa, M.** (1981): Proteins Associated with Cytoplasmic Actin. *Cell*, Vol. 25. 587-590
- Schwartz, M.A., DeSimone, D.W.** (2008) Cell adhesion receptors in mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol.*; 20(5):551-6.
- Schwienbacher, C., Jockusch, B.M., Rüdiger, M.** (1996): Intramolecular interactions regulate serine/threonine phosphorylation of vinculin. *FEBS Lett.* 384: 71-74.
- Shear, C.R., Bloch, R.J.** (1985): Vinculin in subsarcolemmal densities in chicken skeletal muscle: localization and relationship to intracellular and extracellular structures. *J Cell Biol.*;101(1):240-56.
- Shen, K., Tolbert, C.E., Guilluy, C., Swaminathan, V.S., Berginski, M.E.,**

- Burridge, K., Superfine, R., Campbell, S.L.** (2011): The vinculin C-terminal hairpin mediates F-actin bundle formation, focal adhesion and cell mechanical properties. *J Biol Chem.* Nov 3.
- Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I.R., Kuhlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M.A., Wittinghofer, A.** (2004): The Core FH2 Domain of Diaphanous-Related Formins Is an Elongated Actin Binding Protein that Inhibits Polymerization. *Molecular Cell*, Vol. 13, 511–522
- Siliciano JD, Craig SW.** (1986) Isolation of metavinculin from chicken smooth muscle. *Methods Enzymol.*; 134:78-85.
- Small, J.V.** (1985): Geometry of actin-membrane attachments in the smooth muscle cell: the localisations of vinculin and ca-actinin. *The EMBO Journal* vol.4 no.1 pp.45-49.
- Somiari, R.I., Sullivan, A., Russell, S., Somiari, S., Hu, H., Jordan, R., George, A., Katenhusen, R., Buchowiecka, A., Arciero, C., Brzeski, H., Hooke, J., Shriver, C.** (2003): High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics.* ; 3(10):1863-73.
- Spudich JA, Watt S.** (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem.*; 246(15):4866-71.
- Steimle PA, Hoffert JD, Adey NB, Craig SW.** (1999) Polyphosphoinositides inhibit the interaction of vinculin with actin filaments. *J Biol Chem.*; 274(26):18414-20.
- Straub, F.B.** (1942): Actin. *Studies Med. Inst. Szeged.* 2, 3
- Subauste, C., Pertz, O., Adamson, E.D., Turner, C.E., Junger, S., Hahn, K.M.** (2004): Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility M. *The Journal of Cell Biology*, Volume 165, Number 3, May 10, 2004 371–381
- Tang, J.X. & Janmey P.A.** (1998): Two Distinct Mechanisms of Actin Bundle Formation Reference: *Biol. Bull.* 194: 406-408.
- Tigges, U., Koch, B., Wissing, J., Jockusch, B.M., 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 C. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 278, No. 26, Issue of June 27, pp. 23561–23569.

Todaro, G.J., Green, H. (1963): Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 17: 299-313, 1963.

Tseng, Y., An, K.M., Esue, O., Wirtz, D. (2004): The bimodal role of filamin in controlling the architecture and mechanics of F-actin networks. *J Biol Chem.* Jan 16;279(3):1819-26.

Turner, C.E., Glenney, J.R., Jr., Burridge, K. (1990): Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell. Biol.* 111: 1059-1068.

Valentin-Ranc, C., Carlier, M.F. (1989): Evidence for the direct interaction between tightly bound divalent metal ion and ATP on actin. Binding of the lambda isomers of beta gamma-bidentate CrATP to actin. *J Biol Chem.* 15;264(35):20871-80.

Vandekerckhove, J., Weber, K. (1978): At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.*; 126(4):783-802.

Wagner, C.R., Mahowald, A.P., Miller, K.G. (2002): One of the two cytoplasmic actin isoforms in *Drosophila* is essential. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11;99(12).

Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E.D., Takeichi, M. (1998): alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 142: 847-857.

Watanabe, N. (2010): Inside view of cell locomotion through single-molecule: fast F-/G-actin cycle and G-actin regulation of polymer restoration. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*;86(1):62-83.

Wear, M.A., Cooper, J.A. (2004): Capping protein: new insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem Sci.* Aug;29(8):418-28. Review.

Weedes A, Maciver S. (1993): F-actin capping proteins. *Curr Opin Cell Biol.*

Feb;5(1):63-9.

- Weekes, J., Barrv, S.T., Critchleyd, R.** (1996): Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding an protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem. J.* 314 (Pt 3):827-32.
- Wegner A.** (1982) Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. *J Mol Biol.*; 161(4):607-15.
- Wegner, A.** (1976): Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biot.* 108(1):139-50.
- Weiss, E.E., Kroemker, M., Rudigerah, Jockusch, B.M., Rüdiger, M.** (1998): Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J. Cell. Biol.* 141(3):755-64.
- Welch, M.D. und Mullins, R.D.** (2002): Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18: 247-288.
- Wen, K.K., Rubenstein, P.A., DeMali, K.A.** (2009): Vinculin Nucleates Actin Polymerization and Modifies Actin Filament Structure. *J Biol Chem.*; 284(44): 30463–30473
- Wood, C.K., Turner, C.E., Jackson, P., Critchley, D.R.** (1994): Characterisation of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin. *J Cell Sci.* Feb;107 (Pt 2):709-17.
- Xu, J., Tseng, Y., Wirtz, D.** (2000): Strain hardening of actin filament networks. Regulation by the dynamic cross-linking protein alpha-actinin. *J Biol Chem.* Nov 17;275(46):35886-92.
- Xu, W., Baribault, H., Adamson, A.E.** (1998): Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development* 125, 327-337
- Xu, Y., Moseley, J.B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B.L., Eck, M.J.** (2004): Crystal Structures of a Formin Homology-2 Domain Reveal a Tethered Dimer Architecture 2. *Cell*, Vol. 116, 711–723.
- Yorifuji, H., Hirokawa, N.** (1989): Cytoskeletal architecture of neuromuscular

junction: localization of vinculin. *J Electron Microscop Tech.*;12(2):160-71.

Zamir, E. & Geiger, B. (2001): Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 114(Pt 20):3583-90.

Zechel, K., Weber, K. (1978): Actins from mammals, bird, fish and slime mold characterized by isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem.* 15;89(1):105-12.

Zemljic-Harpe, Ponrartana, S., Avalos, R.T., Jordan, M.C., Roos, K.P., Dalton, N.D., Phan, V.Q., Adamson, E.D, Ross, R.S. (2004): Heterozygous Inactivation of the Vinculin Gene Predisposes to Stress-Induced Cardiomyopathy Alice E. *American Journal of Pathology, Vol. 165, No. 3.*

Zhang, Z., Izaguirre, G., Lin, S.Y., Lee, H.Y., Schaefer, E., Haimovich, B. (2004): The Phosphorylation of Vinculin on Tyrosine Residues 100 and 1065, Mediated by Src Kinases, Affects Cell Spreading. *Mol. Biol. Cell.* 15(9): 4234-47.

Ziegler, W.H., Liddington, R.C., Critchley, D.R. (2006): The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol.* 16(9): 453-460. Review.

Ziegler, W.H., Tigges, U., Zieseniss, A., Jockusch, B.M. (2002): A lipid-regulated docking site on vinculin for protein kinase C. *J Biol Chem.* Mar 1;277(9):7396-404.

9 Anhang

9.1 Allgemeine Abkürzungen

%	Prozent
‰	Promill
°	Grad
°C	Temperatur
A	Ampere
ABP	Aktin Bindende Proteine
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP / ADP	Adenosintri-phosphat / Adenosindiphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indoylphosphat-p-Toluidindsatz
BSA	engl.: <i>bovine serum albumine</i>
CD	engl.: circular dichroism
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i>
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
cm ²	Kubikzentimeter
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F-Aktin	Aktinfilament
FA	Fokale Adhäsion
FAK	engl.: <i>focal adhesion kinase</i>
FPLC	engl.: <i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm
G-Aktin	monomeres Aktin
GST	Glutathion-S-transferase
h	Stunde
HMW	engl.: <i>high molekular weight</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter

LMP	engl.: <i>low melting point</i>
LMW	engl.: <i>low molecular weight</i>
M	Stoffmengenkonzentration (Molarität)
MALDI	engl.: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MP	Milchpulver
MPW	Millipor Wasser
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i>
ng	Nanogram
NHS	N-Hydroxysuccinimidester
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
Ni-TED	Nickel-Tris(carboxymethyl)ethylen-diamin
nm	Nanometer
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PBS	engl.: <i>phosphate buffer solution</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
P ₁	Isoelektrischer Punkt
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase-C
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
Pyren	N-(1-pyrenyl)iodoacetamid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl.: <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
RU	engl.: <i>resonance units</i>
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	engl.: <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sec	Sekunde
TBS	engl.: <i>tris buffer solution</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TTBS	Twin
TTBS	engl.: <i>twin tris buffer solution</i>
U	Unit
Ü	Überstand
UV	Ultraviolet
v	Volumen
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen Verhältnis

VASP	engl.: <i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
VBS	engl.: <i>vinculin binding site</i>
w/v	Gewicht/Volumen Verhältnis
w/w	Gewicht/Gewicht Verhältnis
xg	Erdbeschleunigung
β-ME	β-Mercaptoethanol

Abkürzungen für diverse Vinculin-Konstrukte:

Vh	Besteht aus den Domänen D1-D4
Vt	Besteht nur aus der Domäne D5
Vh _n	Spaltprodukt der V8-Protesase, diese besteht aus den Domänen D1-D4, sowie aus dem Bereich der Linker-Region.
Vt _n	Spaltprodukt der V8-Protesase, diese besteht aus den Domänen D5, sowie aus dem Bereich der Linker-Region.
nPVh	Nativer Vinculin-Kopf aus Pute
rPVh	Rekombinanter Vinculin-Kopf aus Pute
nPVt	Nativer Vinculin-Schwanz aus Pute
rPVt	Rekombinanter Vinculin-Schwanz aus Pute
nPV	Natives Vinculin aus Pute
rPV	Rekombinantes Vinculin aus Pute

9.2 Vergleich der Vinculinsequenz zwischen Huhn und Pute

9.2.1 Vergleich der Aminosäure Sequenz

```

1    MPVFHTRTIE SILEPVAQQI SHLVIMHEEG EVDGKAIPDL TAPVSAVQAA VSNLVRVGKE
    .....
61   TVQTTEDQIL KRDMPPAFIK VENACTKLVR AAQMLQADPY SVPARDYLID GSRGILSGTS
    ..... ..A.....
121  DLLLTDFDEAE VRKIIRVCKG ILEYLTVAEV VETMEDLVTY TKNLGPMTK MAKMIDERQQ
    ..... ..L.....
181  ELTHQEHRVM LVNSMNTVKE LLPVLISAMK IFVTTKNTKS QGIEEALKNR NFTVEKMSAE
    .....
241  INEIIRVLQL TSWDEDAWAS KDTEAMKRAL ALIDSKMNQA KGWLRDPNAP PGDAGEQAIR
    .....
301  QILDEAGKAG ELCAGKERRE ILGTCCKTLGQ MTDQLADLRA RGQGATPMAM QKAQQVSOGL
    .....
361  DLLTAKVENA ARKLEAMTNS KQAIKAKIDA AQNWADPNG GSEGEHIRG IMSEARKVAE
    .....
421  LCEPKERDD ILSLGEISA LTAKLSLRR HGKGDSPPEAR ALAKQIATSL QNLQSKTNRA
    ..... ..P.....
481  VANTRPVKAA VHLEKIEQA QRWIDNPTVD DRGVQAAIR GLVAEGRRLA NVMMGPYRQD
    .....
541  LLAKCDRVDQ LAAQLADLAA RGEGESPOAR AIAAQLQDSL KDLKARMQEA MTQEVSDVFS
    ..... ..I..
601  DTTTPIKLLA VAATAPSDTP NREEVFEERA ANFENHAARL GATAEKAAAV GTANKTTVEG
    .....
661  IQATVKSARE LTPQVVSAAAR ILLRNPNQA AYEHFETMKN QWIDNVEKMT GLVDEAIDTK
    .....
721  SLLDASEEAI KKDLDKCKVA MANMQPQLV AGATSIARRA NRILLVAKRE VENSEDPKFR
    .....
781  EAVKAASDEL SKTISPMVMD AKAVAGNISD PGLQKSFLDS GYRILGAVAK VREAFQPQEP
    .....
841  DFPPPPDLE HLHLTDELAP PKPPLPEGEV PPRPPPPPEE KDEEFPEQKA GEAINQPMMM
    .....
901  AARQLHDEAR KWSKGNNDII AAKRMALLM AEMSRLVRGG SGNKRALIQC AKDIAKASDE
    .....
961  VTRLAKEVAK QCTDKRIRTN LLQVCERIPT ISTQLKILST VKATMLGRN ISDEESEQAT
    .....
1021 EMLVHNAQNL MQSVKETVRE AEAASIKIRT DAGFTLRWVR KTPWYQ
    .....

```

9.2.2 Vergleich der DNA-Sequenz

```

1   ATGCCCGTCT TCCACACGCG CACCATCGAG AGCATCTTGG AGCCCGTGGC TCAGCAGATC
   ..... C.....
61  TCCCACCTGG TCATCATGCA CGAGGAGGGG GAGGTAGACG GCAAGGCCAT CCCGGACCTC
   ..... T..... G.....
121 ACCGCCCCCG TGTCGGCCGT GCAGGCCGCT GTCAGCAACC TGGTGCGGGT TGGAAAAGAA
   ..... T..... T..... G..... G
181 ACTGTGCAGA CAACAGAAGA CCAGATCTTG AAAAGGGATA TGCCACCAGC ATTCATCAAA
   ..... C..... G.....
241 GTAGAGAATG CCTGCACCAA GCTCGTTCGA GCAGCCAGA TGCTGCAAGC AGATCCTTAT
   ..... G.....
301 TCAGTACCAG CTCGTGACTA CCTAATTGAT GGATCAAGAG GCATCCTTTC TGGAAACATCA
   .. T..... T.....
361 GACTTGCTTC TGACATTTGA TGAAGCAGAG GTCCGTAAAA TCATCCGTGT CTGCAAAGGA
   .....
421 ATATTGGAAT ATCTGACTGT GGCAGAAGTA GTAGAGACTA TGGAGGATTT GGTGACATAT
   C..... G.....
481 ACAAGAATC TAGGGCCAGG AATGACAAAG ATGGCAAAA TGATCGATGA GAGACAACAG
   ..... T.....
541 GAATTAATC ATCAGGAACA TAGGGTTATG CTGGTGAAC CCATGAATAC TGTGAAGGAG
   .....
601 CTATTGCCTG TACTTATTTT AGCTATGAAG ATCTTTGTAA CCACAAAAA CACTAAAAGC
   .....
661 CAGGGAATAG AAGAGGCCTT GAAAAATCGC AATTTACAG TAGAGAAAAT GAGTGCTGAG
   .....
721 ATAAATGAAA TAATCCGTGT ATTACAATC ACTTCCTGGG ATGAAGATGC CTGGGCCAGC
   ..... T.....
781 AAGGACACTG AAGCCATGAA AAGAGCTTTA GCCCTAATAG ATTCAAAGAT GAACCAGGCA
   ..... G
841 AAAGGCTGGC TGAGAGATCC AAACGCACCT CCAGGGGATG CTGGTGAGCA AGCAATAAGG
   ..... A
901 CAGATCCTTG ATGAAGCTGG AAAAGCAGGA GAATTGTGTG CAGGCAAAGA ACGCAGGGAG
   ..... C.....
961 ATTCTGGGAA CATGCAAAAC TTTGGGCCAA ATGACTGATC AACTTGCTGA TCTCCGAGCT
   ..... G.....
1021 AGAGGACAGG GTGCTACACC GATGGCAATG CAGAAGGCAC AGCAGGTGTC ACAAGGCCTG
   ..... A..... G..... T...
1081 GATTGCTCA CTGCAAAAGT GGAGAATGCA GCCCGGAAAT TGGAGGCCAT GACAAACTCT
   ..... G.....
1141 AAGCAGGCTA TTGCAAAGAA GATTGATGCT GTCAGAACT GGCTTGCGGA TCCCAACGGC
   ..... T...
1201 GGAAGTGAAG GAGAAGAACA CATTGAGGA ATTATGTCTG AAGCAAGGAA AGTTGCAGAA
   ..... G
1261 TTGTGTGAGG AGCCTAAAGA AAGAGATGAT ATCCTTCGCT CTTGGGGGA AATCTCTGCT
   ..... G... C.....
1321 CTGACAGCTA AGCTGTCAGA TCTGCGACGA CATGGGAAAG GCGACTCTCC TGAGGCCCGT
   ..... G..... C.....
1381 GCATTGGCCA AGCAAATAGC TACATCACTT CAGAACTTAC AGTCCAAAAC AAACAGAGCT
   ..... T..... A..... T.....
1441 GTAGCAAATA CTAGGCCAGT TAAAGCTGCT GTCCATTTGG AGGGCAAGAT TGAGCAAGCC

```

.....A...G..T
 1501 CAGAGGTGGA TAGATAATCC TACAGTTGAT GATCGGGGAG TAGGCCAGGC AGCAATTCGG
 ..A..A....CA....
 1561 GGTTTGGTTG CAGAAGGTCG TCGTCTAGCC AATGTCATGA TGGGACCTTA TCGTCAGGAC
T.....
 1621 CTGCTTGCCA AATGTGACCG TGTAGACCAG CTGGCTGCTC AGCTTGCTGA CCTTGCAGCA
G.....
 1681 AGAGGGGAAG GAGAGTCTCC TCAGGCTAGG GCAATTGCTG CTCAGCTTCA GGACTCCCTG
A..G.....
 1741 AAGGATCTCA AAGCACGGAT GCAAGAAGCA ATGACCCAGG AGGTGTCTGA TGTTTTTAGT
A.....
 1801 GACACTACAA CTCCTATTAA GTTGTTAGCA GTAGCAGCCA CTGCTCCTTC TGATACTCCC
C.....
 1861 AATAGAGAAG AGGTGTTTGA AGAAAGAGCA GCAAATTTTG AAAACCATGC TGCTAGACTG
G.....
 1921 GGAGCAACAG CAGAAAAAGC AGCTGCAGTT GGAAGTCTA ATAAACTAC TGTGGAAGGC

 1981 ATTCAGGCAA CAGTCAAATC TGCAAGGGAG CTTACACCAC AGGTAGTATC GGCTGCTCGA
G..... A..... C..... A..A.....
 2041 ATCCTCCTGA GAAATCCTGG AAATCAAGCT GCTTATGAGC ATTTTGAGAC AATGAAAAAC
 ..T.....
 2101 CAATGGATTG ATAATGTAGA AAAGATGACA GGGCTGGTGG ATGAGGCCAT CGATACCAAG
A.... ..A..... T.....
 2161 TCTCTGTTGG ATGCATCAGA AGAGGCTATT AAGAAGGATC TTGATAAATG TAAAGTTGCA
A.....
 2221 ATGGCCAATA TGCAACCTCA GATGCTGGTA GCTGGAGCCA CCAGCATTGC TAGACGAGCG
G.....A
 2281 AACCGCATCC TGCTTGTGGC AAAACGGGAG GTTGAAAATT CAGAAGACCC TAAATTCAGG
C..... G.....C..
 2341 GAGGCTGTTA AAGCAGCTTC TGATGAGCTG AGCAAAACCA TATCACCGAT GGTAATGGAT
AT.....A.....
 2401 GCTAAAGCTG TAGCAGGAAA TATCTCTGAT CCTGGTTTGC AGAAGAGTTT CTGATTCT
T.....
 2461 GGATACAGGA TTCTGGGAGC TGTGGCCAAA GTCAGAGAAG CCTTTCAGCC TCAGGAGCCA
 ..G..... C..... A...
 2521 GACTTTCCTC CTCCTCCTCC TGACCTCGAG CATCTCCATC TGACTGATGA GCTTGCTCCT
 ..T..... T... T.....
 2581 CCAAAACCAC CACTTCCAGA AGGTGAGGTT CCCCCACCA GACCACCACC CCCTGAAGAA
G.....
 2641 AAAGATGAGG AGTTCCAGA GCAGAAAGCA GGAGAAGCTA TTAATCAGCC CATGATGATG
 ..G.....A..... A..... T.....
 2701 GCTGCTAGGC AGTTGCATGA CGAGGCTCGG AAATGGTCTA GCAAGGGTAA CGACATCATT
T.....
 2761 GCTGCTGCTA AACGAATGGC GCTGCTCATG GCTGAGATGT CACGCCTGGT GCGAGGAGGC
A.....
 2821 AGCGGAAACA AGCGTGCCCT CATCCAGTGT GCAAAAGATA TTGCTAAGGC ATCGGATGAA
T..... C.....
 2881 GTCACCTGAT TGGCCAAAGA GGTGGCCAAG CAATGTACTG ATAAACGCAT TAGAACAAC
G..... C.....
 2941 CTCTTACAGG TCTGTGAGCG AATCCCAACC ATCAGCACGC AGCTCAAAT TCTTTCACA
A..A.....

```

3001 GTGAAAGCTA CCATGCTGGG CAGGACTAAC ATCAGCGATG AAGAATCAGA ACAGGCAACT
    ..T..... .....T.... .....
3061 GAGATGTTGG TTCATAACGC CCAGAACCTC ATGCAGTCTG TGAAGGAAAC TGTGAGAGAA
    .....T.. .....
3121 GCTGAAGCAG CATCCATTAA GATAAGAACA GATGCCGGAT TCACTCTGCG CTGGGTCAGA
    .....T.... .....
3181 AAGACCCCAT GGTATCAGTA A
    ..... G

```

9.2.3 Sequenz mit gekennzeichneten Domänen

```

1   ATGCCCGTCTTCCACACCGCGCACCATCGAGAGCATCTTGGAGCCCGTGGCCCAGCAGATC
1   M P V F H T R T I E S I L E P V A Q Q I
61  FCCCACCTGGTTCATCATGCATGAGGAGGGGAGGTGGACGGCAAGGCCATCCCGGACCTC
21  S H L V I M H E E G E V D G K A I P D L
121 ACCGCCCTGTGTGGCTGTGCAGGCCGCTGTCAGCAACCTGGTGCGGGTTGGGAAAGAG
41  T A P V S A V Q A A V S N L V R V G K E
181 ACTGTGCAGACAACAGAAGACCAGATCTTGAAAAGGGCTATGCCACCAGCGTTCATCAAA
61  T V Q T T E D Q I L K R A M P P A F I K
241 GTAGAGAATGCCTGCACCAAGCTCGTTCGAGCAGCCCAGATGCTGCAGGCAGATCCTTAT
81  V E N A C T K L V R A A Q M L Q A D P Y
301  TCTGTACCAGCTCGTGACTACCTTATTGATGGATCAAGAGGCATCCTTTCTGGAACATCA
101 S V P A R D Y L I D G S R G I L S G T S
361 GACTTGCTTCTGACATTTGATGAAGCAGAGGTCCGTAAAATCATCCGTGTCTGCAAAGGA
121 D L L L T F D E A E V R K I I R V C K G
421 CTATTGGAATATCTGACTGTGGCAGAAGTAGTGGAGACTATGGAGGATTTGGTGACATAT
141 L L E Y L T V A E V V E T M E D L V T Y
481 ACAAGAATCTAGGGCCAGGAATGACAAAAGATGGCAAAAATGATTGATGAGAGACAACAG
161 T K N L G P G M T K M A K M I D E R Q Q
541 GAATTAACTCATCAGGAACATAGGGTTATGCTGGTGAACCCATGAATACTGTGAAGGAG
181 E L T H Q E H R V M L V N S M N T V K E
601 CTATTGCCTGTACTTATTTTCAGCTATGAAGATCTTTGTAACCACAAAAACACTAAAAGC
201 L L P V L I S A M K I F V T T K N T K S
661 CAGGGAATAGAAGAGGCCTTGAAAAATCGCAATTTACAGTAGAGAAAATGAGTGCCTGAG
221 Q G I E E A L K N R N F T V E K M S A E
721 ATAAATGAAATAATTCGTGTATTACAACCTCACTTCC TGGGATGAAGATGCCTGGGCCAGC
241 I N E I I R V L Q L T S W D E D A W A S
781 AAGGACACTGAAGCCATGAAAAGAGCTTTAGCCCTAATAGATTCAAAGATGAACCAGGCG
261 K D T E A M K R A L A L I D S K M N Q A
841 AAAGGCTGGCTGAGAGATCCAAACGCACCTCCAGGGGATGCTGGTGAGCAAGCAATAAGA
281 K G W L R D P N A P P G D A G E Q A I R
901 CAGATCCTTGATGAAGCTGAAAAGCAGGAGAATTGTGCGCAGGCAAAGAACGCAGGGAG
301 Q I L D E A G K A G E L C A G K E R R E
961 ATTCTGGGAACGTGCAAACTTTGGGCCAAATGACTGATCACTTGCTGATCTCCGAGCT
321 I L G T C K T L G Q M T D Q L A D L R A
1021 AGAGGACAGGGTGCTACACCAATGGCGATGCAGAAGGCACAGCAGGTGTCACAAGGTCG

```

341 R G Q G A T P M A M Q K A Q Q V S Q G L
1081 GATTTGCTCACTGCAAAGGTGGAGAATGCAGCCCGAAAATTGGAGGCCATGACAACTCT
361 D L L T A K V E N A A R K L E A M T N S
1141 AAGCAGGCTATTGCAAAGAAGATTGATGCTGCTCAGAACTGGCTTGC GGATCCCAATGGC
381 K Q A I A K K I D A A Q N W L A D P N G
1201 GGAAGTGAAGGAGAAGAACACATTTCGAGGAATTATGTCTGAAGCAAGGAAAGTTGCAGAG
401 G S E G E E H I R G I M S E A R K V A E
1261 TTGTGTGAGGAGCCTAAAGAAAGAGATGATATCCTTCGCTCCTTGGGGGAGATCCCTGCT
421 L C E E P K E R D D I L R S L G E I P A
1321 CTGACAGCTAAGCTGTCTCAGATCTGCGGCGACATGGGAAAGGCGACTCTCCCGAGGCCGCT
441 L T A K L S D L R R H G K G D S P E A R
1381 GCATTGGCCAAGCAAATAGCTACATCACTTCAGAATTTACAATCCAAAAC TAACAGAGCT
461 A L A K Q I A T S L Q N L Q S K T N R A
1441 GTAGCAAATACTAGGCCAGTTAAAGCAGCTGTCCATTTGGAGGGCAAGATTGAGCAGGCT
481 V A N T R P V K A A V H L E G K I E Q A
1501 CAAAGATGGATAGATAATCCTACAGTTGACGATCGAGGAGTAGGCCAGGCAGCAATTCGG
501 Q R W I D N P T V D D R G V G Q A A I R
1561 GGTTTGGTTGCAGAAGGTTCGTTCGTTTAGCCAATGTCATGATGGGACCTTATCGTCAGGAC
521 G L V A E G R R L A N V M M G P Y R Q D
1621 CTGCTTGCCAAATGTGACCGTGTAGACCAGCTGGCTGCGCAGCTTGCTGACCTTG CAGCA
541 L L A K C D R V D Q L A A Q L A D L A A
1681 AGAGGAGAGGGAGAGTCTCCTCAGGCTAGGGCAATTTGCTGCTCAGCTTCAGGACTCCCTG
561 R G E G E S P Q A R A I A A Q L Q D S L
1741 AAGGATCTCAAAGCACGGATGCAAGAAGCAATGACCCAGGAGGTGTCTGATATTTT TAGT
581 K D L K A R M Q E A M T Q E V S D I F S
1801 GACACTACAACCTCTATTAAGTTGTTAGCAGTAGCAGCCACTGCCCTTCTGATACTCC C
601 D T T T P I K L L A V A A T A P S D T P
1861 AATAGAGAAGAGGTGTTTGAAGAAAAGAGCAGCGAATTTTGA AAAACCATGCTGCTAGACTG
621 N R E E V F E E R A A N F E N H A A R L
1921 GGAGCAACAGCAGAAAAAGCAGCTGCAGTTGGAACTGCTAATAAACTACTGTGGAAGGC
641 G A T A E K A A A V G T A N K T T V E G
1981 ATTCAGGCAACAGTGAAATCAGCAAGGGAGCTTACCCACAGGTAGTATCAGCAGCTCGA
661 I Q A T V K S A R E L T P Q V V S A A R
2041 ATTCTCCTGAGAAATCCTGGAAATCAAGCTGCTTATGAGCATT TTGAGACAATGAAAAAC
681 I L L R N P G N Q A A Y E H F E T M K N
2101 CAATGGATTGATAATGTAGAAAAAGATGACAGGGCTAGTGGATGAAGCCATTGATACCAAG
701 Q W I D N V E K M T G L V D E A I D T K
2161 TCTCTGTTGGATGCATCAGAAGAGGCTATTAAGAAAAGATCTTGATAAATGTAAAGTTGCA
721 S L L D A S E E A I K K D L D K C K V A
2221 ATGGCCAATATGCAACCTCAGATGCTGGTAGCTGGAGCCACCAGCATTTGCTAGGCGAGCA
741 M A N M Q P Q M L V A G A T S I A R R A
2281 AACCGCATCCTGCTCGTGGCAAACGGGAGGTTGAAAATTCAGAAGACCCGAAATTCGGG
761 N R I L L V A K R E V E N S E D P K F R
2341 GAGGCTGTTAAAGCAGCTTCTGATGAGCTAAGCAAAACTATATCACCAATGGTAATGGAT
781 E A V K A A S D E L S K T I S P M V M D
2401 GCTAAAGCTGTAGCTGGAAATATCTCTGATCCTGGTTTG CAGAAGAGTTTCTTGATTCT
801 A K A V A G N I S D P G L Q K S F L D S

2461 GGGTACAGGATTCTGGGAGCTGTGGCCAAAGTCAGAGAAGCCTTCAGCCTCAGGAACCA
821 G Y R I L G A V A K V R E A F Q P Q E P
2521 GATTTTCCCCCTCCTCCTCCTGACCTTGAGCATCTTCATCTGACTGATGAGCTTGCTCCT
841 D F P P P P P D L E H L H L T D E L A P
2581 CCAAAAACCACCACTTCCAGAAGGTGAGGTTCCCCACCCAGACCACCGCCCCCTGAAGAA
861 P K P P L P E G E V P P P R P P P P E E
2641 AAGGATGAAGAGTTCCAGAACAGAAAAGCAGGAGAAGCTATTAATCAGCCTATGATGATG
881 K D E E F P E Q K A G E A I N Q P M M M
2701 GCTGCTAGGCAGTTGCATGATGAGGCTCGGAAATGGTCTAGCAAGGGTAACGACATCATI
901 A A R Q L H D E A R K W S S K G N D I I
2761 GCTGCTGCTAAACGAATGGCGCTGCTCATGGCAGAGATGTCACGCCTGGTGGCAGGAGGC
921 A A A K R M A L L M A E M S R L V R G G
2821 AGCGGAAACAAGCGTGCCTCATTCAGTGTGCAAAAAGACATTGCTAAGGCATCGGATGAA
941 S G N K R A L I Q C A K D I A K A S D E
2881 GTCACTCGGTTGGCCAAAGAGGTGGCCAAGCAATGCACTGATAAACGCATTAGAACAAAC
961 V T R L A K E V A K Q C T D K R I R T N
2941 CTCTTACAGGTCTGTGAGCGAATCCCAACCATCAGCACACAACCTCAAAATTCCTTCCACA
981 L L Q V C E R I P T I S T Q L K I L S T
3001 GTTAAAGCTACCATGCTGGGCAGGACTAACATCAGTGATGAAGAATCAGAACAGGCAACT
1001 V K A T M L G R T N I S D E E S E Q A T
3061 GAGATGTTGGTTCATAATGCCCAGAACCTCATGCAGTCTGTGAAGGAAACTGTGAGAGAA
1021 E M L V H N A Q N L M Q S V K E T V R E
3121 GCTGAAGCAGCATCCATTAAGATAAGAACAGATGCTGGATTCACTCTGCGCTGGGTGAGA
1041 A E A A S I K I R T D A G F T L R W V R
3181 AAGACCCCATGGTATCAGTAG
1061 K T P W Y Q *

9.3 Klonierungsschema von Tags

9.3.1 Klonierungsschema des gesamten Vinculins

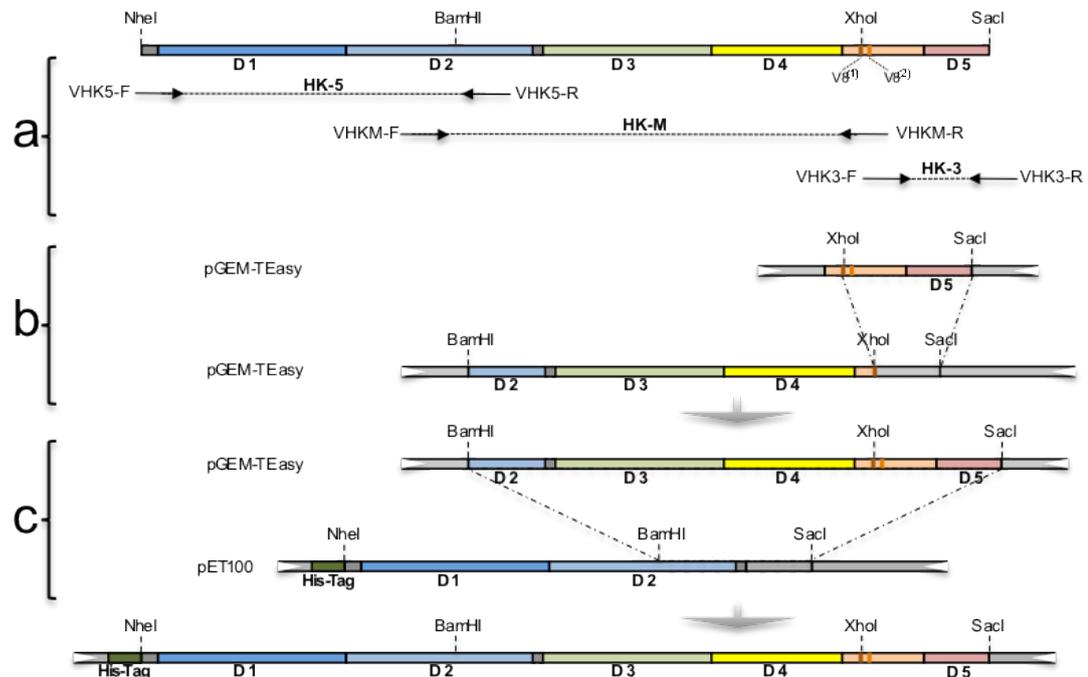


Abbildung 57: Klonierungsstrategie des gesamt Vinculins

a) Amplifikation der jeweiligen Fragmente HK-5, HK-M und HK-3 und in den Vektor pGEM[®]T easy zwischen ligiert. Das Fragment HK-5 wurde über die Schnittstellen NheI/SacI in den Vektor pET100 ligiert, nicht abgebildet **b)** Das HK-3 Fragment wurde über die Schnittstellen XhoI/SacI in Vektor pGEM[®]T/HK-M ligiert. **c)** Das Fragment HK-M3 wurde nun über die Schnittstellen BamHI/SacI in den Vektor pET100/HK-5 ligiert.

9.3.2 Klonierungsschema des N-terminalen GST-Tags

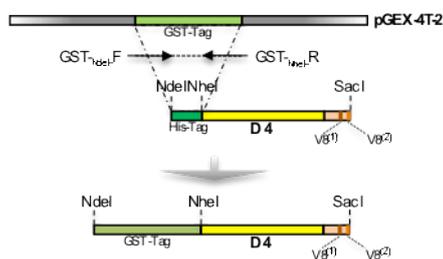


Abbildung 58: Schematische Darstellung der GST-Tag-Klonierung

Diese schematische Darstellung stellt die einzelnen Schritte der GST-Tag-Klonierung dar. Hierzu wurde der GST-Tag durch das Primerpaar GST-F und GST-R amplifiziert und als Tamplet diente der pGEX-4T2 Vektor. Das Amplifikat wurde über die Restriktionsendonukleasen NdeI/NheI in den pET100-Vektor ligiert.

9.3.3 Klonierungsschema des N-terminalen GFP-Tags

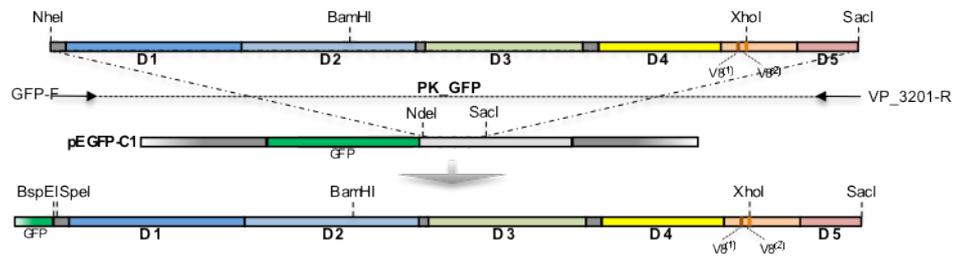


Abbildung 59: Schematische Darstellung der GFP-Klonierung

Diese schematische Darstellung stellt die einzelnen Schritte der GFP-Klonierung dar. Hierzu wurde das Vinculin durch das Primerpaar GFP-F und VP_3201-R amplifiziert, als Template diente der pET100/VP. Durch den Primer GFP-F wurden zwei Restriktionsschnittstellen BspEI und SpeI am 5'-Ende der DNA eingefügt. Das Amplifikat wurde über die Restriktionsendonukleasen BspEI/SacI in den pEGFP-C1-Vektor ligiert. Durch das Einfügen einer SpeI-Restriktionsschnittstelle, welches ein Isoschizomer zu NheI ist, kann eine Ligation über NheI/SacI erfolgen.

9.4 Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Vinculin

Die verwendeten Nukleotid und Aminosäuresequenzen wurden aus der Genbank PubMed bezogen.

9.4.1 cDNA Huhn (*Gallus g. d.*) nach Genbank Nr.: NM_205441

```

1   ATGCCCGTCTTCCACACGCGCACCATCGAGAGCATCTTGGAGCCCGTGGCTCAGCAGATC
   M P V F H T R T I E S I L E P V A Q Q I
61  TCCCACCTGGTCATCATGCACGAGGAGGGGAGGTAGACGGCAAGGCCATCCCGGACCTC
   S H L V I M H E E G E V D G K A I P D L
121 ACCGCCCCCGTGTGCGCCGTGCAGGCCGTGTCAGCAACCTGGTGCGGGTGGAAAAGAA
   T A P V S A V Q A A V S N L V R V G K E
181 ACTGTGCAGACAACAGAAGACCAGATCTTGAAAAGGGATATGCCACCAGCATTCATCAA
   T V Q T T E D Q I L K R D M P P A F I K
241 GTAGAGAATGCCTGCACCAAGCTCGTTCGAGCAGCCCAGATGCTGCAAGCAGATCCTTAT
   V E N A C T K L V R A A Q M L Q A D P Y
301 TCAGTACCAGCTCGTGACTACCTAATTGATGGATCAAGAGGCATCCTTTCTGGAACATCA
   S V P A R D Y L I D G S R G I L S G T S
361 GACTTGCTTCTGACATTTGATGAAGCAGAGGTCCGTAAAATCATCCGTGCTGCAAAGGA
   D L L L T F D E A E V R K I I R V C K G
421 ATATTGGAATATCTGACTGTGGCAGAAGTAGTAGACTATGGAGGATTTGGTGACATAT
   I L E Y L T V A E V V E T M E D L V T Y
481 ACAAGAATCTAGGGCCAGGAATGACAAAGATGGCAAAAATGATCGATGAGAGACAACAG
   T K N L G P G M T K M A K M I D E R Q Q
541 GAATTAACTCATCAGGAACATAGGGTTATGCTGGTGAACCCATGAATACTGTGAAGGAG
   E L T H Q E H R V M L V N S M N T V K E
601 CTATTGCCTGTACTTATTTAGCTATGAAGATCTTTGTAACCACAAAAACACTAAAAGC
   L L P V L I S A M K I F V T T K N T K S

```

661 CAGGGAATAGAAGAGGCCTTGAAAAATCGCAATTTACAGTAGAGAAAATGAGTGCTGAG
Q G I E E A L K N R N F T V E K M S A E
721 ATAAATGAAATAATCCGTGTATTACAACACTCTCCTGGGATGAAGATGCCTGGGCCAGC
I N E I I R V L Q L T S W D E D A W A S
781 AAGGACACTGAAGCCATGAAAAGAGCTTTAGCCCTAATAGATTCAAAGATGAACCAGGCA
K D T E A M K R A L A L I D S K M N Q A
841 AAAGGCTGGCTGAGAGATCCAAAACGCACCTCCAGGGGATGCTGGTGAGCAAGCAATAAGG
K G W L R D P N A P P G D A G E Q A I R
901 CAGATCCTTGATGAAGCTGAAAAGCAGGAGAATTGTGTGCAGGCAAAGAACGCAGGGAG
Q I L D E A G K A G E L C A G K E R R E
961 ATTCTGGGAACATGAAAACCTTTGGGCCAAATGACTGATCAACTTGCTGATCTCCGAGCT
I L G T C K T L G Q M T D Q L A D L R A
1021 AGAGGACAGGGTGCTACACCGATGGCAATGCAGAAGGCACAGCAGGTGTCACAAGGCCCTG
R G Q G A T P M A M Q K A Q Q V S Q G L
1081 GATTTGCTCACTGCAAAAAGTGAGAAATGCAGCCCGGAAATTTGGAGGCCATGACAAACTCT
D L L T A K V E N A A R K L E A M T N S
1141 AAGCAGGCTATTGCAAGAAGATTGATGCTGCTCAGAACTGGCTTGC GGATCCCAACGGC
K Q A I A K K I D A A Q N W L A D P N G
1201 GGAAGTGAAGGAGAAGAACACATTCGAGGAATTATGTCTGAAGCAAGGAAAGTTGCAGAA
G S E G E E H I R G I M S E A R K V A E
1261 TTGTGTGAGGAGCCTAAAGAAAGAGATGATATCCTTCGCTCCTTGGGGGAAATCTCTGCT
L C E E P K E R D D I L R S L G E I S A
1321 CTGACAGCTAAGCTGTGAGATCTGCGACGACATGGGAAAGGCGACTCTCCTGAGGCCCGT
L T A K L S D L R R H G K G D S P E A R
1381 GCATTGGCCAAGCAAATAGCTACATCACTTCAGAACTTACAGTCCAAAACAAACAGAGCT
A L A K Q I A T S L Q N L Q S K T N R A
1441 GTAGCAAATACTAGGCCAGTTAAAGCTGCTGTCCATTTGGAGGGCAAGATTGAGCAAGCC
V A N T R P V K A A V H L E G K I E Q A
1501 CAGAGGTGGATAGATAATCCTACAGTTGATGATCGGGGAGTAGGCCAGGCAGCAATTCGG
Q R W I D N P T V D D R G V G Q A A I R
1561 GGTTTGGTTGCAGAAGGTTCGTCGTCTAGCCAATGTCATGATGGGACCTTATCGTCTCAGGAC
G L V A E G R R L A N V M M G P Y R Q D
1621 CTGCTTGCCAAATGTGACCGTGTAGACCAGCTGGCTGCTCAGCTTGCTGACCTTGACGCA
L L A K C D R V D Q L A A Q L A D L A A
1681 AGAGGGGAAGGAGAGTCTCCTCAGGCTAGGGCAATTGCTGCTCAGCTTCAGGACTCCCTG
R G E G E S P Q A R A I A A Q L Q D S L
1741 AAGGATCTCAAAGCACGGATGCAAGAAGCAATGACCCAGGAGGTGCTGATGTTTTTAGT
K D L K A R M Q E A M T Q E V S D V F S
1801 GACACTACAACCTCTATTAAGTTGTTAGCAGTAGCAGCCACTGCTCCTTCTGATACTCCC
D T T T P I K L L A V A A T A P S D T P
1861 AATAGAGAAGAGGTGTTTGAAGAAAAGAGCAGCAAATTTTGAAAACCATGCTGCTAGACTG
N R E E V F E E R A A N F E N H A A R L
1921 GGAGCAACAGCAGAAAAAGCAGCTGCAGTTGGAAGTCTAATAAAACTACTGTGGAAGGC
G A T A E K A A A V G T A N K T T V E G
1981 ATTCAGGCAACAGTCAAATCTGCAAGGGAGCTTACACCACAGGTAGTATCGGCTGCTCGA
I Q A T V K S A R E L T P Q V V S A A R
2041 ATCCTCCTGAGAAATCCTGAAATCAAGCTGCTTATGAGCATTTTGAGACAATGAAAAAC

I L L R N P G N Q A A Y E H F E T M K N
 2101 CAATGGATTGATAATGTAGAAAAGATGACAGGGCTGGTGGATGAGGCCATCGATACCAAG
 Q W I D N V E K M T G L V D E A I D T K
 2161 TCTCTGTTGGATGCATCAGAAGAGGCTATTAAGAAGGATCTTGATAAATGTAAAGTTGCA
 S L L D A S E E A I K K D L D K C K V A
 2221 ATGGCCAATATGCAACCTCAGATGCTGGTAGCTGGAGCCACCAGCATTGCTAGACGAGCG
 M A N M Q P Q M L V A G A T S I A R R A
 2281 AACCGCATCCTGCTTGTGGCAAAACGGGAGGTTGAAAATTCAGAAGACCTAAATTCAGG
 N R I L L V A K R E V E N S E D P K F R
 2341 GAGGCTGTTAAAGCAGCTTCTGATGAGCTGAGCAAAACCATATCACCGATGGTAATGGAT
 E A V K A A S D E L S K T I S P M V M D
 2401 GCTAAAGCTGTAGCAGGAAATATCTCTGATCCTGGTTTGCAGAAGAGTTTCTTGATTCT
 A K A V A G N I S D P G L Q K S F L D S
 2461 GGATACAGGATTCTGGGAGCTGTGGCCAAAGTCAGAGAAGCCTTTCAGCCTCAGGAGCCA
 G Y R I L G A V A K V R E A F Q P Q E P
 2521 GACTTTCCTCCTCCTCCTGACCTCGAGCATCTCCATCTGACTGATGAGCTTGCTCCT
 D F P P P P P D L E H L H L T D E L A P
 2581 CCAAAACCACCACTTCCAGAAGGTGAGGTTCCCCACCCAGACCACCACCCCTGAAGAA
 P K P P L P E G E V P P P R P P P P E E
 2641 AAAGATGAGGAGTTCCCAGAGCAGAAAAGCAGGAGAAGCTATTAATCAGCCCATGATGATG
 K D E E F P E Q K A G E A I N Q P M M M
 2701 GCTGCTAGGCAGTTGCATGACGAGGCTCGGAAATGGTCTAGCAAGGGTAACGACATCATT
 A A R Q L H D E A R K W S S K G N D I I
 2761 GCTGCTGCTAAACGAATGGCGCTGCTCATGGCTGAGATGTCACGCCTGGTGGCAGGAGGC
 A A A K R M A L L M A E M S R L V R G G
 2821 AGCGGAAACAAGCGTGCCCTCATCCAGTGTGCAAAAGATATTGCTAAGGCATCGGATGAA
 S G N K R A L I Q C A K D I A K A S D E
 2881 GTCACTCGATTGGCCAAAGAGGTGGCCAAAGCAATGTAAGGATAAACGCATTAGAACAAC
 V T R L A K E V A K Q C T D K R I R T N
 2941 CTCTTACAGGTCTGTGAGCGAATCCCAACCATCAGCACGCAGCTCAAAATTTCTTCCACA
 L L Q V C E R I P T I S T Q L K I L S T
 3001 GTGAAAGCTACCATGCTGGCAGGACTAACATCAGCGATGAAGAATCAGAACAGGCAACT
 V K A T M L G R T N I S D E E S E Q A T
 3061 GAGATGTTGGTTCATAACGCCCAGAACCTCATGCAGTCTGTGAAGGAACTGTGAGAGAA
 E M L V H N A Q N L M Q S V K E T V R E
 3121 GCTGAAGCAGCATCCATTAAGATAAGAACAGATGCCGGATTCACTCTGCGCTGGGTGAGA
 A E A A S I K I R T D A G F T L R W V R
 3181 AAGACCCCATGGTATCAGTAA
 K T P W Y Q *

9.4.2 cDNA Pute (*Meleagris g. d.*) nach Genbank Nr.: GQ327928

1 ATGCCCGTCTTCCACACGCGCACCATCGAGAGCATCTTGGAGCCCGTGGCCCAGCAGATC
 M P V F H T R T I E S I L E P V A Q Q I
 61 TCCACCTGGTCATCATGCATGAGGAGGGGAGGTGGACGGCAAGGCCATCCCGACCTC
 S H L V I M H E E G E V D G K A I P D L
 121 ACCGCCCTGTGTGCGCTGTGCAGGCCGCTGTCAGCAACCTGGTGGGGTTGGGAAAGAG

T A P V S A V Q A A V S N L V R V G K E
181 ACTGTGCAGACAACAGAAAGACCAGATCTTGAAAAGGGCTATGCCACCAGCGTTCATCAA
T V Q T T E D Q I L K R A M P P A F I K
241 GTAGAGAATGCCTGCACCAAGCTCGTTCGAGCAGCCCAGATGCTGCAGGCAGATCCTTAT
V E N A C T K L V R A A Q M L Q A D P Y
301 TCTGTACCAGCTCGTGACTACCTTATTGATGGATCAAGAGGCATCCTTTCTGGAACATCA
S V P A R D Y L I D G S R G I L S G T S
361 GACTTGCTTCTGCATTTGATGAAGCAGAGGTCCGTAAAATCATCCGTGCTGCAAAGGA
D L L L T F D E A E V R K I I R V C K G
421 CTATTGGAATATCTGACTGTGGCAGAAGTAGTGGAGACTATGGAGGATTTGGTGACATAT
L L E Y L T V A E V V E T M E D L V T Y
481 ACAAGAATCTAGGGCCAGGAATGACAAAAGATGGCAAAAATGATTGATGAGAGACAACAG
T K N L G P G M T K M A K M I D E R Q Q
541 GAATTAACATCATCAGGAACATAGGGTTATGCTGGTGAACCCATGAATACTGTGAAGGAG
E L T H Q E H R V M L V N S M N T V K E
601 CTATTGCCTGTACTTATTTAGCTATGAAGATCTTTGTAACCACAAAAACACTAAAAGC
L L P V L I S A M K I F V T T K N T K S
661 CAGGGAATAGAAGAGGCCTTGAAAAATCGCAATTTACAGTAGAGAAAATGAGTGTGAG
Q G I E E A L K N R N F T V E K M S A E
721 ATAAATGAAATAATTCGTGTATTACAACCTCACTTCCTGGGATGAAGATGCCTGGGCCAGC
I N E I I R V L Q L T S W D E D A W A S
781 AAGGACACTGAAGCCATGAAAAGAGCTTTAGCCCTAATAGATTCAAAGATGAACCAGGCC
K D T E A M K R A L A L I D S K M N Q A
841 AAAGGCTGGCTGAGAGATCCAAACGCACCTCCAGGGGATGCTGGTGAAGCAAGCAATAAGA
K G W L R D P N A P P G D A G E Q A I R
901 CAGATCCTTGATGAAGCTGAAAAGCAGGAGAATTGTGCGCAGGCAAAGAACGCAGGGAG
Q I L D E A G K A G E L C A G K E R R E
961 ATTCTGGGAACGTGCAAAACTTTGGGCCAAAATGACTGATCAACTTGCTGATCTCCGAGCT
I L G T C K T L G Q M T D Q L A D L R A
1021 AGAGGACAGGGTGCTACACCAATGGCGATGCAGAAGGCACAGCAGGTGTCACAAGGTCTG
R G Q G A T P M A M Q K A Q Q V S Q G L
1081 GATTTGCTCACTGCAAAGGTGGAGAATGCAGCCCGAAAATGGAGGCCATGACAAACTCT
D L L T A K V E N A A R K L E A M T N S
1141 AAGCAGGCTATTGCAAAGAAGATTGATGCTGCTCAGAACTGGCTTGCGGATCCCAATGGC
K Q A I A K K I D A A Q N W L A D P N G
1201 GGAAGTGAAGGAGAAGAACACATTCGAGGAATTATGTCTGAAGCAAGGAAAGTTGCAGAG
G S E G E E H I R G I M S E A R K V A E
1261 TTGTGTGAGGAGCCTAAAGAAAAGAGATGATATCCTTCGCTCCTTGGGGGAGATCCCTGCT
L C E E P K E R D D I L R S L G E I P A
1321 CTGACAGCTAAGCTGTCAGATCTGCGGCGACATGGGAAAGGCGACTCTCCCGAGGCCCGT
L T A K L S D L R R H G K G D S P E A R
1381 GCATTGGCCAAGCAAATAGCTACATCACTTCAGAATTTACAATCCAAAACCTAACAGAGCT
A L A K Q I A T S L Q N L Q S K T N R A
1441 GTAGCAAATACTAGGCCAGTTAAAGCAGCTGTCCATTTGGAGGGCAAGATTGAGCAGGCT
V A N T R P V K A A V H L E G K I E Q A
1501 CAAAGATGGATAGATAATCCTACAGTTGACGATCGAGGAGTAGGCCAGGCAGCAATTCGG
Q R W I D N P T V D D R G V G Q A A I R

1561 GGT^{TT}GG^{TT}GCAGAAGGTCGTCG^{TT}TAGCCAATGTCATGATGGGACCTTATCGTCAGGAC
G L V A E G R R L A N V M M G P Y R Q D
1621 CTGCTTGCCAAATGTGACCGTGTAGACCAGCTGGCTGCGCAGCTTGCTGACCTTGCAGCA
L L A K C D R V D Q L A A Q L A D L A A
1681 AGAGGAGAGGGAGAGTCTCCTCAGGCTAGGGCAATTGCTGCTCAGCTTCAGGACTCCCTG
R G E G E S P Q A R A I A A Q L Q D S L
1741 AAGGATCTCAAAGCACGGATGCAAGAAGCAATGACCCAGGAGGTGTCTGATATTTTTAGT
K D L K A R M Q E A M T Q E V S D I F S
1801 GACACTACAACCTCCTATTAAGTTGTTAGCAGTAGCAGCCACTGCCCTTCTGATACTCCC
D T T T P I K L L A V A A T A P S D T P
1861 AATAGAGAAGAGGTGTTTGAAGAAAGAGCAGCGAATTTTGA^{AA}ACCATGCTGCTAGACTG
N R E E V F E E R A A N F E N H A A R L
1921 GGAGCAACAGCAGAAAAAGCAGCTGCAGTTGGA^{ACT}GCTAATAAA^{ACT}TACTGTGGAAGGC
G A T A E K A A A V G T A N K T T V E G
1981 ATTCAGGCAACAGTGAAATCAGCAAGGGAGCTTACCCACAGGTTAGTATCAGCAGCTCGA
I Q A T V K S A R E L T P Q V V S A A R
2041 ATTCTCCTGAGAAATCCTGAAATCAAGCTGCTTATGAGCATTTTGAGACAATGAAAA^C
I L L R N P G N Q A A Y E H F E T M K N
2101 CAATGGATTGATAATGTAGAAAAGATGACAGGGCTAGTGGATGAAGCCATTGATACCAAG
Q W I D N V E K M T G L V D E A I D T K
2161 TCTCTGTTGGATGCATCAGAAGAGGCTATTAAGAAAGATCTTGATAAAATGTAAGTTGCA
S L L D A S E E A I K K D L D K C K V A
2221 ATGGCCAATATGCAACCTCAGATGCTGGTAGCTGGAGCCACCAGCATTGCTAGGCGAGCA
M A N M Q P Q M L V A G A T S I A R R A
2281 AACCGCATCCTGCTCGTGGCAA^{AA}ACGGGAGGTTGAA^{AA}ATTCAGAAGACCCGAA^{AT}TCCGG
N R I L L V A K R E V E N S E D P K F R
2341 GAGGCTGTTAAAGCAGCTTCTGATGAGCTAAGCAA^{AA}CTATATCACCAATGGTAATGGAT
E A V K A A S D E L S K T I S P M V M D
2401 GCTAAAGCTGTAGCTGGAAATATCTCTGATCCTGGTTTGCAGAAGAGTTTCTTGATTCT
A K A V A G N I S D P G L Q K S F L D S
2461 GGGTACAGGATTCTGGGAGCTGTGGCAAAGTCAGAGAAGCCTTCCAGCCTCAGGAACCA
G Y R I L G A V A K V R E A F Q P Q E P
2521 GATTTTCCCCCTCCTCCTCCTGACCTTGAGCATCTTCATCTGACTGATGAGCTTGCTCCT
D F P P P P P D L E H L H L T D E L A P
2581 CAAAACCACCACTTCCAGAAGGTGAGGTTCCCCCACCAGACCACCGCCCCCTGAAGAA
P K P P L P E G E V P P P R P P P P E E
2641 AAGGATGAAGAGTTCCCAGAACAGAAAGCAGGAGAAGCTATTAATCAGCCTATGATGATG
K D E E F P E Q K A G E A I N Q P M M M
2701 GCTGCTAGGCAGTTGCATGATGAGGCTCGGAAATGGTCTAGCAAGGGTAACGACATCATT
A A R Q L H D E A R K W S S K G N D I I
2761 GCTGCTGCTAAACGAATGGCGCTGCTCATGGCAGAGATGTCACGCCTGGTGGCAGGAGGC
A A A K R M A L L M A E M S R L V R G G
2821 AGCGGAAACAAGCGTGCCCTCATTCAGTGTGCAA^{AA}AGACATTGCTAAGGCATCGGATGAA
S G N K R A L I Q C A K D I A K A S D E
2881 GTCACTCGGTTGGCAAAGAGGTGGCCAAGCAATGCACTGATAAACGCATTAGAACAAC
V T R L A K E V A K Q C T D K R I R T N
2941 CTCTTACAGGTCTGTGAGCGAATCCAACCATCAGCACACA^{ACT}CAAA^{AT}TCTTTCCACA

L L Q V C E R I P T I S T Q L K I L S T
3001 **GTTAAAGCTACCATGCTGGGCAGGACTAACATCAGTGATGAAGAATCAGAACAGGCAACT**
V K A T M L G R T N I S D E E S E Q A T
3061 **GAGATGTTGGTTCATAATGCCCAGAACCTCATGCAGTCTGTGAAGGAACTGTGAGAGAA**
E M L V H N A Q N L M Q S V K E T V R E
3121 **GCTGAAGCAGCATCCATTAAGATAAGAACAGATGCTGGATTCACTCTGCGCTGGGTCAGA**
A E A A S I K I R T D A G F T L R W V R
3181 **AAGACCCCATGGTATCAGTAG**
K T P W Y Q *

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hinssen für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Anregungen und seine ausgezeichnete Betreuung, für die stetige und konstante Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für die fachspezifische Unterstützung im Rahmen dieser Dissertation und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der Mittel, die dieses Arbeitsergebnis überhaupt haben ermöglichen können.

Des Weiteren danke ich Heiko Begemann und Dr. Andreas Unger für die ständige Hilfsbereitschaft, für die kollegiale und nette Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Sewald, Jens Conradi und Gesa Niemann für die Benutzung des Biacore und CD-Spektrometer und die fachspezifischen Unterstützung an den Geräten, sowie für die Benutzung des Labors.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Kaltschmidt für den Zugriff auf die Laborgeräte in seiner Arbeitsgruppe. Mein besonderer Dank gilt Angela Kralemann-Köhler und Patrick Lüningschrör, und zwar für ihre stetige und beispiellose Hilfsbereitschaft.

Letztendlich spreche ich meinen Eltern, meiner Frau Marion und Martin Deppermann herzlichen Dank aus für die aufgebrachte Geduld und dem stetigen Interesse an meiner Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum von Februar 2006 bis Januar 2012 am Lehrstuhl von Prof. Dr. H. Hinssen (Biochemie Zellbiologie) an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.

Ich versichere hiermit, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfsmittel angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel angegeben und die Stellen der Dissertation, die anderen Werken dem Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe.

Bielefeld, 26.01.2012

(Alexander Schäfer)