

Die Schleimkeratine TK α und TK γ des Zebrafischlings *Danio rerio*

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sebastian Neumann

geb. am 01.11.1979 in Mainz

Mainz, 2012

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1	Das Cytoskelett	1
2	Struktur und Klassifizierung der IF-Proteine	2
3	Keratine	7
4	Die Schleimkeratine TK α und TK γ	8
5	Ziel der Arbeit	12
B	Material und Methode	13
1	Das Forschungsobjekt	13
1.1	Systematische Einordnung	13
1.2	Allgemeines zur Lebensweise von <i>Danio rerio</i>	13
1.3	Herkunft, Hälterung und Préparation der Tiere	13
2	Chemikalien und Geräte	14
3	Mikrobiologische Methoden	14
3.1	Bakterienstämme	14
3.2	Plasmidvektoren	14
3.3	Nährmedien und Agarplatten	15
3.4	Plattenkulturen	15
3.5	Flüssig-/ Übernachtkulturen	16
3.6	Glycerinkulturen	16
4	Allgemeine molekularbiologische Methoden	16
4.1	Préparation von Gesamt-RNA aus Gewebe	16
4.2	Préparation von DNA aus Gewebe	16
4.3	PCR-Techniken	16
4.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	16
4.3.2	Sonden-PCR	17
4.3.3	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	18
4.3.4	Klon-PCR	19
4.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	19
4.4.1	Préparation der Gele und der Elektrophoresekammer	20
4.4.2	Durchführung der Elektrophorese	20
4.5	Gelextraktion aus Agarosegelen	20

4.6	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	20
4.7	Klonierung und Transformation von RT-PCR-Produkten	21
4.8	Plasmid-Isolation aus Bakterien	21
4.9	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	21
5	Rekombinante Expression und Aufreinigung der Proteine	22
5.1	Klonierung in den Expressionsvektor pET-3a	23
5.2	Transformation	23
5.3	Induktion und Expression	24
5.4	Präparation und Aufreinigung der Proteine	24
5.4.1	Präparation der <i>inclusion bodies</i>	24
5.4.2	Ionenaustausch-Chromatographie	26
5.4.2.1	Anionenaustausch-Chromatographie	26
5.4.2.2	Kationenaustausch-Chromatographie	27
5.5	Aufkonzentrierung der Proteinlösungen	27
6	Proteinbiochemische Methoden	27
6.1	Biochemische Präparation der Intermediärfilamente	27
6.2	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE)	29
6.2.1	Präparation der Gele und der Elektrophoresekammer	30
6.2.2	Durchführung der Elektrophorese	30
6.3	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)	31
6.3.1	Die erste Dimension (isoelektrische Fokussierung; IEF)	31
6.3.1.1	Präparation der Rundgele	32
6.3.1.2	Auftragen der Proben und Elektrophorese	33
6.3.2	Auftrennung in der zweiten Dimension durch SDS-PAGE	34
6.4	Färben der Proteine im Gel	34
6.5	Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen	35
6.6	Reversible Färbung der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S	36
6.7	Biotinylierung von Proteinen	36
6.8	Modifizierter Komplementärer-Keratin-Blot-Bindungstest (CKBB)	36
6.8.1	Inkubation der Membranen mit biotinylierten Schleimkeratinen	37
6.8.2	Biotin/Streptavidin-Nachweis der Proteine	37
6.9	Herstellung der Antiseren Anti-TK α und Anti-TK γ	38
6.10	„Peptide Mass Mapping“ mit MALDI-Massen-Spektrometrie	38
6.11	Immunblot	38
6.11.1	Inkubation der Membranen mit primärem Antikörper	39
6.11.2	Inkubation der Membranen mit sekundärem Antikörper	39

6.12	Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase	39
6.13	Dokumentation der Ergebnisse	40
7	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	40
7.1	Anfertigung und Fixierung von Gefrierschnitten	40
7.2	Inkubation der Gefrierschnitte mit primärem Antikörper	41
7.3	Inkubation der Gefrierschnitte mit sekundärem Antikörper	41
7.4	Mikroskopieren und Photographieren der Gefrierschnitte	41
8	<i>In situ</i>-Hybridisierung	41
8.1	Behandlung der Larven / Fixierung	43
8.2	Hybridisierung und Farbreaktion	43
9	In vitro-Assemblierung von Intermediärfilamenten	44
10	Transmissions-Elektronenmikroskopie	45
C	Ergebnisse	47
1	Allgemeine Vorgehensweise	47
2	Amplifizierung der für TKα- und TKγ-kodierenden cDNAs	48
2.1	Sequenzanalyse	48
2.1.1	Abgeleitete Aminosäuresequenz der für TK α -kodierenden cDNA ..	48
2.1.2	Abgeleitete Aminosäuresequenz der für TK γ -kodierenden cDNA ..	49
2.1.3	Sequenzvergleich auf genomischer Ebene	50
2.2	Expression und Reinigung der rekombinanten Schleimkeratine rTK α und rTK γ	50
2.3	2D-PAGE der rekombinanten Schleimkeratine TK α und TK γ / MALDI-TOF Massenspektrometrie	52
3	Bindungseigenschaften von TKα und TKγ	54
3.1	<i>in vitro</i> -Assemblierungs Experimente	54
3.2	Bindungseigenschaften von rTK α und rTK γ	57
4	Biochemische Identifizierung von TKα und TKγ im Zebrafisch <i>Danio rerio</i>	60
4.1	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese / Koelektrophorese	60
4.2	Overlay-Assays	61
4.3	Immunologischer Nachweis	61
5	Expression von TKα und TKγ im adulten Tier; Immunhistologische Untersuchung	63

6	Expression von TKα und TKγ in larvalen Entwicklungsstadien	67
6.1	Whole mount-Immunfluoreszenz Färbungen.....	67
6.2	Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	68
D	Diskussion	70
1	Stand der Forschung zu Beginn dieser Arbeit.....	70
2	Rekombinante Expression und Sequenzanalyse.....	71
3	Bindungseigenschaften von TK.....	72
4	Identifizierung von TK α und TK γ in biochemischen Präparaten aus Gewebe.....	75
5	Expression im Gewebe.....	76
6	Evolutive Aspekte der Schleimkeratine.....	80
7	Ausblick.....	81
E	Zusammenfassung	84
F	Anhang	85
1	Abkürzungen.....	85
1.1	Allgemeine Abkürzungen.....	85
1.2	Abkürzungscode der Aminosäuren.....	88
2	Verwendete Primer.....	89
3	Immunisierungsprotokolle.....	89
4	cDNA-Sequenzen.....	91
4.1	TK α	91
4.2	TK γ	91
5	Alignments.....	92
5.1	Alignment der Aminosäuresequenzen von rTK α und der bereits veröffentlichten Sequenz.....	92
5.2	Alignment der Aminosäuresequenzen von rTK γ und der bereits veröffentlichten Sequenz.....	93
5.3	Alignment der cDNA-Sequenz und der DNA-Sequenz von TK α	94
5.4	Alignment der cDNA-Sequenz und der DNA-Sequenz von TK γ	95
5.5	Alignment TK α -kodierender cDNA- und EST-Sequenzen.....	96

G	Literaturverzeichnis	97
	Danksagung	107
	Curriculum Vitae	108
	Eidesstattliche Erklärung	109

A Einleitung

1 Das Cytoskelett

Tierische Zellen besitzen ein Cytoskelett, welches sich in Form eines dreidimensionalen Proteingeflechts über das gesamte Cytoplasma erstreckt. Dieses Netzwerk gewährleistet Reißfestigkeit, Verformbarkeit, Motilität und Form der Zelle. Innerhalb der Chordaten werden drei unterschiedliche Typen an Cytoskelettproteinen unterschieden. Die Mikrofilamente repräsentieren die kleinsten Cytoskelettfilamente. Die Filamente haben einen Durchmesser von 7 nm und werden von globulären Aktinmolekülen unter Hydrolyse von Adenosintri-phosphat bzw. Guanosintri-phosphat gebildet. Die größten Filamente bilden die Mikrotubuli mit einem Durchmesser von 20 nm. Die auch als Makrofilamente bezeichneten Filamente bilden sich ebenfalls unter Hydrolyse von Guanosintri-phosphat. Sowohl die Mikrofilamente als auch die Mikrotubuli weisen einen polaren Charakter auf und sind hauptsächlich für Bewegungs- und Transportvorgänge innerhalb der Zelle verantwortlich. Sie unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau, weswegen die entsprechend benötigten Monomere stets in hoher Anzahl im Cytoplasma vorliegen.

Der Durchmesser des dritten Filamenttyps liegt mit 7-12 nm zwischen dem der Mikro- und Makrofilamente. Aus dieser Eigenschaft heraus wird dieser dritte Typ als Intermediärfilament (IF) bezeichnet. Im Gegensatz zu den Mikro- und Makrofilamenten bestehen die Intermediärfilamente aus unpolaren, faserigen Strukturen, deren Monomere (IF-Proteine) als löslicher Pool im Cytoplasma vorliegen. Das von den IF gebildete Netzwerk erstreckt sich vom Zellkern bis hin zur Plasmamembran. Von dort aus können über Desmosomen bzw. Hemidesmosomen Kontakte mit benachbarten Zellen und/oder mit der extrazellulären Matrix gebildet werden (Owens und Lane, 2003).

Die Hauptfunktion eines solchen Netzwerkes liegt in der Formgebung und Erhöhung der Reißfestigkeit von Zellen (Eckes et al., 1998; Chou und Goldman, 2000; Coulombe et al., 2000; Wang und Stamenovic, 2000; D'Alessandro et al., 2002; Herrmann et al., 2003; Coulombe et al., 2004). Eine weitere Funktion der Intermediärfilamente besteht in der Festlegung einer Zellpolarität (Hull und Staehelin, 1979; Salas et al., 1997; Ameen et al., 2001). Zusätzlich interagieren diese Filamente mit weiteren Zellstrukturen und können sogar Informationen innerhalb von Signaltransduktionswegen übermitteln (Capetanaki et al., 1989; Capetanaki et al., 1990; Nigg, 1992; Kouklis et al., 1994; Liao und Omary, 1996; Ku et al., 1998; Paramio et al., 1999; Caulin et al., 2000; Langa et al., 2000; Takihara et al., 2000; Gilbert et al., 2001; Inada et al., 2001; He et al., 2002; Paramio und Jorcano, 2002; Santos et al., 2002; Toivola et al., 2002; Kirfel et al., 2003; Coulombe und Wong, 2004; Kim et al., 2006; Russell et al., 2006; Tao et al., 2006).

Im Vergleich zu den Untereinheiten der anderen Filamenttypen weisen die IF eine sehr hohe Diversität auf. So sind allein beim Menschen 73 IF-Protein-kodierende Gene nachgewiesen, weshalb die IF-Proteine zu den 100 größten Multigen-Familien des Menschen gezählt werden (Hesse et al., 2001; 2004; Rogers et al., 2004; 2005). Da die IF-Proteine neben Gewebe- auch Entwicklungs-spezifische Expressionsmuster aufweisen, werden diese in der Entwicklungsbiologie und Pathologie als molekulare Zelltypmarker verwendet (Lazarides, 1982; Moll et al., 1982; Osborn und Weber, 1983; Fuchs, 1988; Stoler et al., 1988; Kartenbeck, 1989; LaFlamme und Dawid, 1990; Zhou et al., 2006; Kuo und Weisblatt, 2011).

2 Struktur und Klassifizierung der IF-Proteine

Die IF-Proteine weisen Unterschiede innerhalb ihrer Primärstrukturen auf. Aufgrund der dadurch auftretenden Variation in der Anzahl der Aminosäuren, der Polarität, der Ladung und der Größe können IF-Proteine aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften (Molekülmasse M in kDa und isoelektrischer Punkt pI) charakterisiert werden. Anhand der Primärstruktur lassen sich die IF-Proteine derzeit in sechs Sequenzhomologieklassen (SHC von sequence homology class) einteilen (Parry und Steinert, 1999; Hermann und Aebi, 2000; Coulombe et al., 2001; Hesse et al., 2001; Herrmann und Aebi, 2004) und sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tab. 1: Typen, Molekülmassen und Vorkommen von IF-Proteinen

Name	Sequenztyp	Molekülmasse [kDA]	Typisches Vorkommen in Säugern
Keratin (sauer)	I	40-64	Epithelien
Keratin (basisch)	II	52-68	Epithelien
Vimentin	III	55	Mesenchymale Zellen
Desmin	III	53	Muskelzellen
GFAP	III	50-52	Astrozyten/Gliazellen
Peripherin	III	54	Neuronen (PNS)
Syncoilin	III/IV (?)	54	Muskelzellen
NF-L	IV	62	Neuronen (ZNS)
NF-M	IV	102	Neuronen (ZNS)
NF-H	IV	110	Neuronen (ZNS)
α -Internexin	IV	66	Neuronen (ZNS)
Lamin A/C	V	72/62	Nukleus
Lamin β 1	V	65	Nukleus
Lamin β 2	V	78	Nukleus
Nestin	VI (?)	240	Neuroepitheliale Zellen
Synemin	VI (?)	182	Muskel
Desmusilin	VI (?)	140	Muskel

Die mit (?) gekennzeichneten Sequenztypen zeigen bezüglich ihrer Zuordnung noch Unklarheiten; PNS, peripheres Nervenssystem; ZNS, zentrales Nervenssystem.

Die einzelnen Klassen werden weitestgehend Gewebe-spezifisch exprimiert (Fuchs und Weber, 1994; Klymkowsky, 1995; Hesse et al, 2001; Coulombe et al., 2001). Bei den Familien I-IV sowie VI handelt es sich um cytoplasmatische IF-Proteine, wohingegen die Lamine (Typ V) das IF-Netzwerk der Kernlamina bilden, welches an der Innenseite der inneren Kernmembran lokalisiert ist. Hierbei sei angemerkt, dass einige Autoren den Proteinen vom Typ VI keine eigene Klasse zuweisen (Steinert und Roop, 1988; Fuchs und Weber, 1994; Klymkowsky, 1995; Herrmann und Aebi, 2000; Chang und Goldman, 2004), sondern diese aufgrund ihrer Eigenschaften bei der spontanen Zusammenlagerung den Typ III- bzw. Typ IV IF-Proteinen zuordnen.

Die Sekundärstruktur der IF-Proteine ist weitestgehend konserviert und zeigt einen dreigeteilten Aufbau (siehe Abb. 1): Eine hoch konservierte α -helikale „Rod“-Domäne wird an beiden Enden von nicht-helikalen Strukturen flankiert. Der aminoterminal Bereich wird als Kopf-Domäne („Head“) bezeichnet wohingegen der carboxyterminale Bereich die Schwanz-Domäne („Tail“) bildet. Kopf- und Schwanz-Domäne sind im Gegensatz zur „Rod“-Domäne nur schwach konserviert und zeigen bezüglich ihrer Sequenz und Länge eine hohe Variabilität. Aufgrund dieser Unterschiede in den nicht-helikalen Bereichen besitzen IF-Proteine eine hohe immunogene und funktionelle Diversität (Hanukoglu und Fuchs, 1983; Nagle, 1988; Steinert und Roop, 1988).

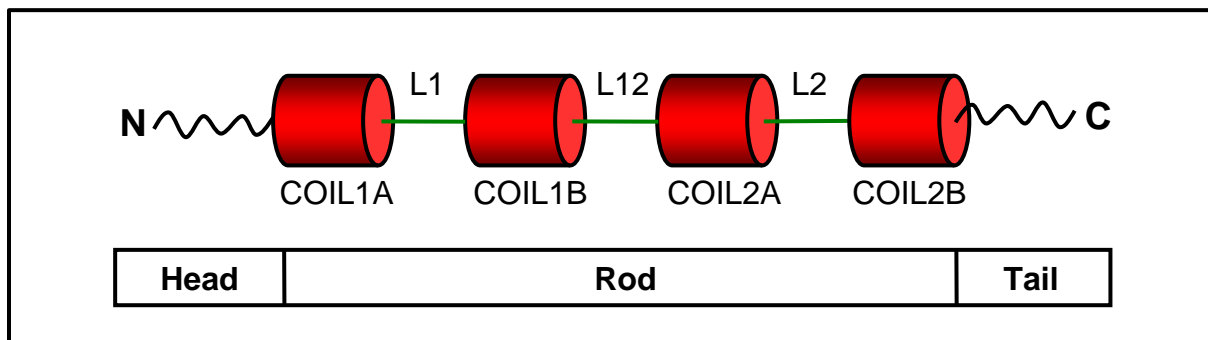


Abb. 1: Domänenstruktur eines IF-Proteins

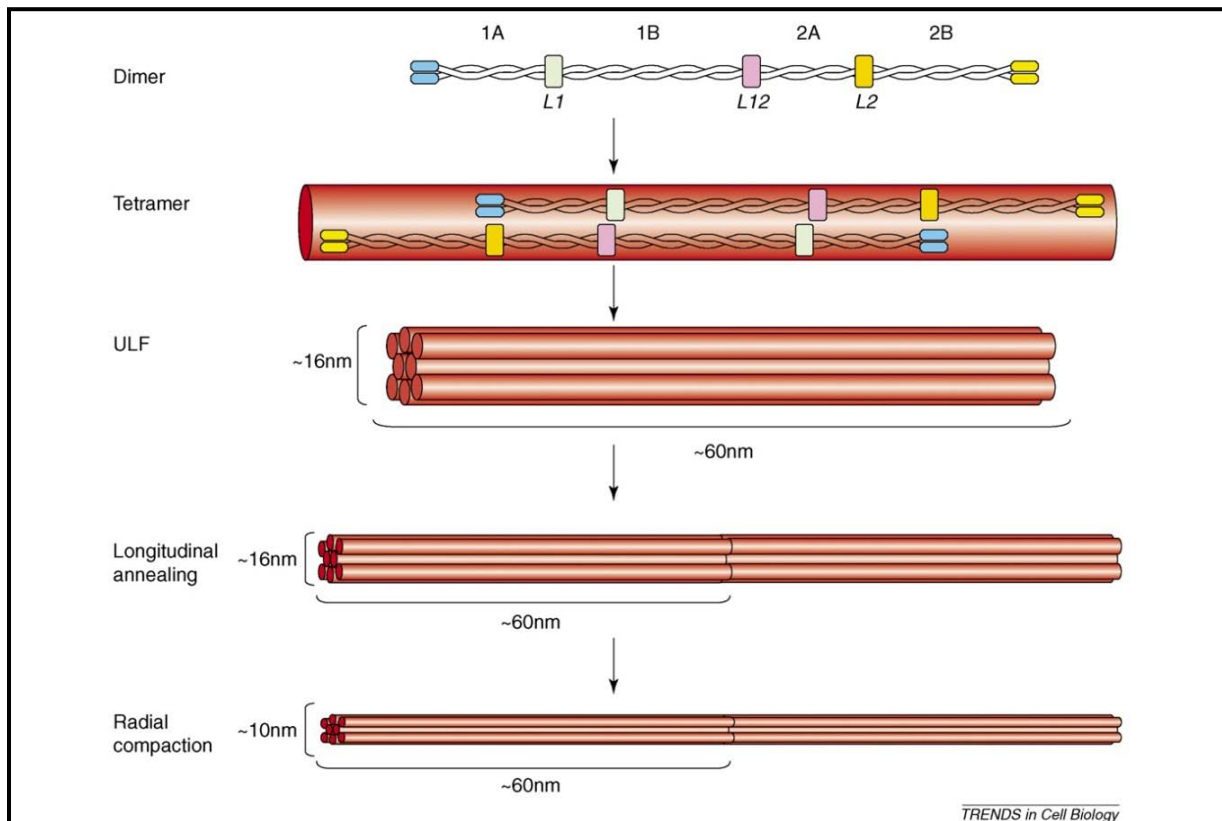
Die roten Abschnitte stellen die helikalen Bereiche (Coil 1A, 1B, 2A, 2B) und die grünen Abschnitte die nicht-helikalen Bereiche („Linker“; L1, L12, L2) der Rod-Domäne dar. Die beiden nicht-helikalen Termini (N-Terminus = „Head“; C-Terminus = „Tail“) sind schwarz gefärbt.

Die konservierte „Rod“-Domäne setzt sich aus 310 Aminosäuren (bei Laminen aus 350-360) zusammen und wird durch drei weniger konservierte, nicht-helikale „Linker“-Sequenzen in vier „Coils“ untergliedert (Conway und Parry, 1988; Albers und Fuchs, 1992; Shoeman und Traub, 1993; Fuchs and Weber, 1994; Coulombe et al., 2001). Jeder Coil zeigt eine sich wiederholende, heptadenartige Aminosäureabfolge $(a-b-c-d-e-f-g)_n$. Jeweils die erste (a) und vierte (d) Position werden zu 75 % von hydrophoben Aminosäuren besetzt, wohingegen die fünf restlichen Positionen meist von polaren bzw. geladenen Aminosäuren (Hanukoglu

und Fuchs, 1982; Steinert und Roop, 1988; Herrmann und Aebi, 2004) besetzt werden. Auf diese Weise bilden die hydrophoben Aminosäuren ein Band auf der Helixoberfläche, welches eine spontane Zusammenlagerung zweier Monomere zu einer superhelikalen, dimeren „coiled-coil“-Struktur ermöglicht. Die Bildung dieser Struktur stellt innerhalb der Zusammenlagerung der Intermediärfilamente den ersten Schritt dar (Hatzfeld und Franke, 1985; Quinlan et al., 1986; Hatzfeld et al., 1987; Hatzfeld und Weber, 1990; Steinert, 1990; Coulombe und Fuchs, 1990; Coulombe et al., 1990; Hatzfeld und Burba, 1994; Herrmann und Aebi, 2004). Im weiteren Verlauf der Zusammenlagerung zu Filamenten folgt ein tetramerer Zustand, in dem zwei Dimere antiparallel und leicht versetzt zusammengefügt vorliegen. In Folge weiterer Polymerisierungsschritte bilden sich Protofibrillen mit einem Durchmesser von 2-3 nm (Geisler et al., 1985; Steinert, 1991; Steinert et al., 1993a; Herrmann et al., 2002). Jeweils zwei bis sechs solcher Protofibrillen können schlussendlich zu 7-12 nm dicken Intermediärfilamenten aggregieren (Albers und Fuchs, 1992; Fuchs und Weber, 1994; Herrmann und Aebi, 2004). Hierbei sei angemerkt, dass sich bei manchen IF-Proteinen in Folge der lateralen Zusammenlagerung von Tetrameren sogenannte ULFs (unit length filament) bilden. In diesem Zustand liegen die einzelnen Tetramere in „gelockerter“ Form vor, so dass die ULFs mit ca. 16 nm einen größeren Durchmesser aufweisen als die fertig assoziierten Filamente. Infolge einer „Kompaktierung“ bilden sich schlussendlich 7-12 nm dicke Intermediärfilamente. In der folgenden Abbildung ist ein schematisches Modell der spontanen Zusammenlagerung am Beispiel des Typ III IF-Proteins Vimentin dargestellt:

Abb. 2 (auf folgender Seite): Schematische Darstellung der spontanen Zusammenlagerung von IF-Proteinen

Die spontane Zusammenlagerung beginnt stets mit der Assoziierung zweier Monomere zu einer dimeren „coiled-coil“-Struktur. Nachdem diese sich wiederum in einem weiteren Schritt zu Tetrameren organisiert haben, bilden diese Strukturen durch laterale Zusammenlagerung sogenannte ULFs. In Folge der anschließenden longitudinalen Assoziierung solcher ULFs bilden sich bereits Filamente. Diese haben einen größeren Durchmesser als die fertigen Filamente. Im abschließenden Schritt der spontanen Zusammenlagerung wird durch eine „Kompaktierung“ der Durchmesser von 16 nm auf ca. 10 nm verringert. Obwohl es sich bei diesem Schema um ein allgemeines Modell handelt, variiert der Vorgang der spontanen Zusammenlagerung innerhalb mancher IF-Protein Typen. Abbildung aus Godsel et al., 2008.



Da der Prozess der spontanen Zusammenlagerung nicht in allen Sequenzhomologieklassen identisch abläuft, werden die IF-Proteine basierend auf deren Eigenschaften bei der spontanen Zusammenlagerung zu Filamenten in drei Assemblierungsgruppen eingeteilt (siehe Abb. 3). Die in der Kernlamina lokalisierten Lamine werden zur *Assemblierungsgruppe 3* gezählt. Diese bilden im ersten Schritt der Zusammenlagerung parallele Dimere, welche sich dann „Kopf-an-Schwanz“ longitudinal zu Protofilamenten assoziieren. In darauf folgenden Schritten lagern sich die Protofibrillen lateral aneinander und formen auf diese Weise 10 nm dicke Filamente. Im Gegensatz zu den beiden anderen Assemblierungsgruppen bilden die Lamine keine ULFs. Zur *zweiten Assemblierungsgruppe* zählt man die Typ III- und Typ IV IF-Proteine. Im Gegensatz zu den Laminen formen sich bei dieser Assemblierungsgruppe im ersten Schritt Dimere durch antiparallele Zusammenlagerung. Daraufhin bilden sich Tetramere, die wiederum lateral zu ULFs assoziieren können. Erst nach der lateralen „Reifung“ lagern sich die ULFs longitudinal zusammen und formen in Folge einer Kompaktierung fertige Intermediärfilamente. Die *Assemblierungsgruppe 1* wird von den Keratinen (Typ I- und Typ II IF-Proteine) repräsentiert. Im Gegensatz zu den anderen Assemblierungsgruppen formen die Keratine Heterodimere. Dabei lagert sich im ersten Assemblierungsschritt stets ein Typ I Monomer mit einem Typ II Monomer antiparallel zusammen (Hatzfeld und Franke, 1985; Coulombe und Fuchs, 1990; Steinert, 1990; Hatzfeld und Weber, 1990). Nach Assoziierung zweier Dimere hin zu einem tetrameren Zustand folgt

die laterale Assoziierung (Bildung von ULFs) sowie das longitudinale Wachstum (inklusive Kompaktierung). Im Gegensatz zu den anderen Assemblierungsgruppen laufen beide Prozesse in etwa gleich schnell und zeitlich parallel ab. Obwohl *in vivo* nur bestimmte Typ I/II „Expressionspaare“ gebildet werden, können sich Keratine *in vitro* grundsätzlich mit jedem beliebigen Vertreter des komplementären Typs zu einem Heterodimer zusammenlagern (Hatzfeld und Franke, 1985; Hatzfeld et al., 1987). Diesbezüglich erscheint es manchen Autoren auch als sinnvoll, neu entdeckte Keratine anhand ihres Interaktionspartners einer bestimmten Sequenzhomologiekategorie zuzuordnen (Karabinos et al., 2002).

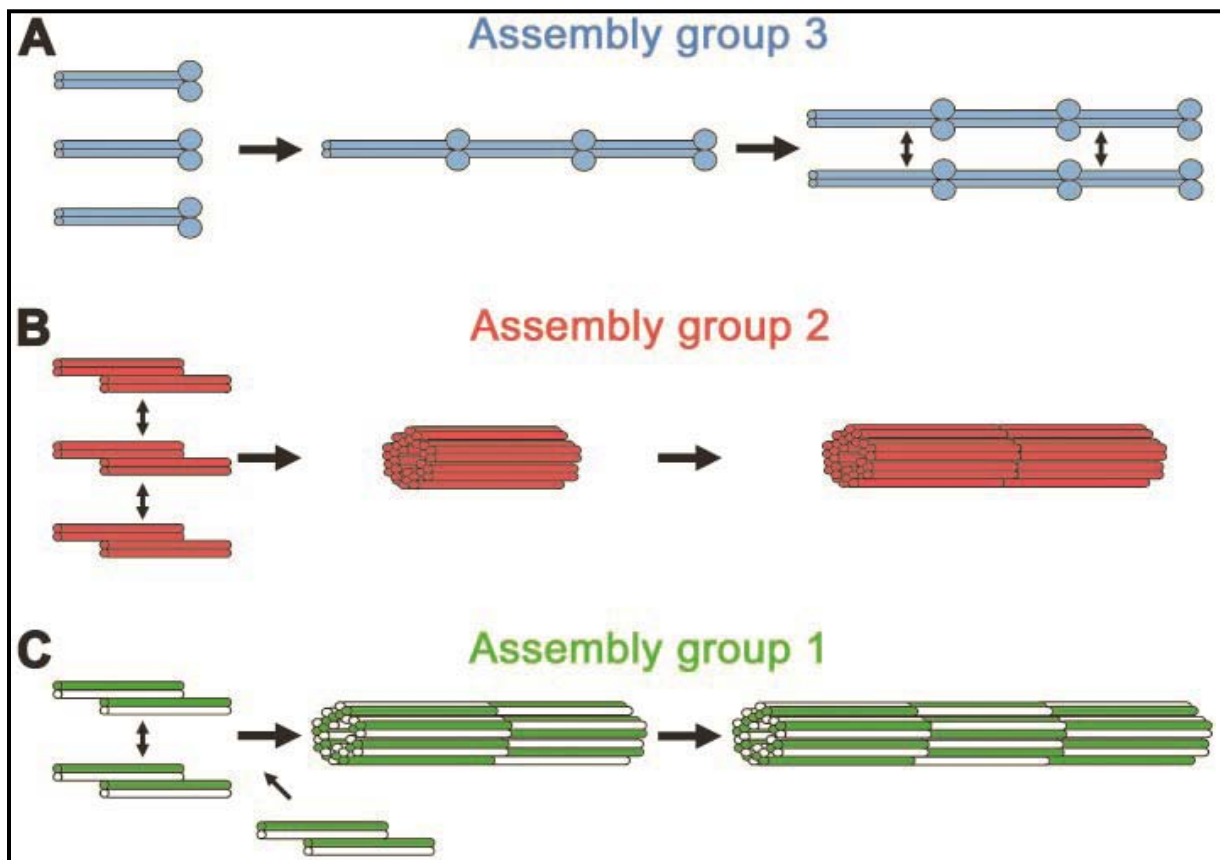


Abb. 3: Die drei Assemblierungsgruppen der IF-Proteine

Die Assemblierungsgruppe 3 wird von den Laminen (Typ V) repräsentiert (A). Diese nukleären IF-Proteine lagern sich „Kopf-an-Schwanz“ zusammen. Erst nach der longitudinalen Assoziierung kommt es zu einer lateralen „Reifung“. Es werden in dieser Assemblierungsgruppe keine ULFs gebildet. Zur Assemblierungsgruppe 2 werden die Typ III- und Typ IV IF-Proteine gezählt (B). Im Gegensatz zur Assemblierungsgruppe 3 läuft hier die laterale Assoziierung zeitlich gesehen vor der longitudinalen Assoziierung ab. In der Assemblierungsgruppe 2 formen sich in Folge der lateralen Zusammenlagerung ULFs. Durch „Kompaktierung“ reifen die Filamente zu ca. 10 nm dicken Intermediärfilamenten heran. Die Keratine (Typ I und Typ II) bilden die Assemblierungsgruppe 1 (C). Hierbei bilden sich im ersten Schritt stets Heterodimere. In späteren Schritten formen sich ULFs, deren Durchmesser in Folge einer „Kompaktierung“ verringert wird. Die laterale und longitudinale Assoziierung läuft in dieser Gruppe in etwa gleich schnell und zeitlich parallel ab. Abbildung aus Herrmann und Aebi, 2004.

Der gesamte Prozess der Zusammenlagerung verläuft spontan. Lediglich Anzahl, Lage und Länge der IF kann durch Phosphorylierung spezifischer Serinreste innerhalb der Kopfdomäne reguliert werden (Geisler et al., 1985; Coulombe und Fuchs, 1990; Steinert et al., 1993a; Steinert et al., 1993b; Inagaki et al., 1996; Ku und Omary, 2000; Ku et al., 2002; Toivola et al., 2002; Omary et al., 2006).

3 Keratine

Die Keratine (Typ I und Typ II) repräsentieren die größte und auch komplexeste Gruppe der IF-Proteine und kommen ausschließlich in Vertebraten vor, wo sie die IF-Netzwerke epithelialer Zelltypen formen (Moll et al., 1982; Steinert, 2001). Im Menschen konnten bisher mehr als 54 Keratin-kodierende Gene identifiziert werden (Hesse et al., 2001; 2004; Rogers et al., 2004; 2005), aber bereits in Fischen zeigt sich eine hohe Diversität an Typ I und Typ II IF-Proteinen (Zimek et al., 2003).

Neben deren Einteilung in Typ I (sauer) und Typ II (basisch) können die Keratine anhand ihrer gewebespezifischen Expression in weitere Gruppen aufgeteilt werden. So werden Keratine aus den Zellen einschichtiger Epithelien auch als S-Keratine (von „simple epithelial“) bezeichnet und jenen gegenüber gestellt, die typischerweise in mehrschichtigen Epithelien exprimiert und als E-Keratine (von „epidermal“) klassifiziert werden (Markl et al. 1989; Groff et al., 1997; Conrad et al., 1998; Markl und Schechter, 1998; Schaffeld et al., 1998; 2004; 2005; García et al., 2005). Demnach können Keratine in vier Gruppen differenziert werden: **IE, IIE, IS und IIS**.

Eine besondere Stellung innerhalb der Keratine nehmen die in einschichtigen Epithelien typischerweise exprimierten S-Keratine K8 (Typ II) und K18 (Typ I) ein. Dieses heterologe Paar konnte in allen bisher untersuchten gnathostomen Vertebraten detektiert werden (Moll, 1982; Fouquet, 1991; Groff et al., 1997; Conrad et al., 1998; Haberkamp, 2002; Schaffeld et al., 1998; Schultess, 2001; Schaffeld et al., 2002a; 2002b; 2003; 2005; García et al., 2005). Innerhalb des Typ I-Stammbaumes bilden die K18-Sequenzen eine Schwestergruppe zu allen restlichen Typ I-Keratinen der Gnathostomen. Im Gegensatz dazu sind die Gene des K8 (Typ II) in den unterschiedlichen Wirbeltiergruppen als Ausgangspunkt für eine unabhängige Radiation der IIE-Keratine zu betrachten (Schaffeld et al., 1998; 2002a; 2002b; 2003; 2004 und 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass K8 und K18 in der Ontogenese von Amphibien und Säugern die ersten zygotischen IF bilden (Franz und Franke, 1986; Bader et al., 1988; Fouquet, 1991). Aber auch auf chromosomaler Ebene nehmen die Keratine 8 und 18 eine Sonderstellung ein. Typ I und Typ II Keratingene sind im Menschen jeweils als Gencluster organisiert, welche auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Das K18 liegt jedoch nicht zusammen mit den anderen Typ I Keratinen in einem Cluster, sondern ist in direkter Nachbarschaft zum K8 anzutreffen und bildet

zusammen mit den anderen Typ II Keratinen ein gemeinsames Gencluster (Hesse et al., 2004). Diese Sonderstellung von K8 und K18, aber auch deren Stellung im Stammbaum lassen vermuten, dass es sich bei dem heterologen Paar K8 und K18 um die ursprünglichsten Keratine handelt, aus deren direkten Vorläufern die Evolutionslinien der E-Keratine hervorgegangen sind.

In niederen Chordaten konnten IF-Proteine identifiziert werden, die ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften besitzen wie die Keratine der Vertebraten (Erber et al. 1998, Karabinos et al., 1998; 2000; 2002; 2004; Riemer et al., 1998a; 1998b; Luke und Holland, 1999; Wang et al., 2000; 2002). So wurden in der Seescheide *Ciona intestinalis* fünf IF-Proteine identifiziert, von denen zwei Keratin-ähnliche Eigenschaften aufweisen (Karabinos et al., 2004). Im Lanzettfisch *Branchiostoma lanceolatum* konnten hingegen 13 IF-Proteine nachgewiesen werden, von denen fünf Keratin-ähnliche Eigenschaften besitzen. Obwohl diese Keratin-artigen IF-Proteine in der Lage sind Heterodimere miteinander zu formen und noch weitere Eigenschaften der Keratine aufweisen, ist eine klare Zuordnung in Typ I bzw. Typ II nicht möglich. So konnte mit Genstrukturanalysen gezeigt werden, dass die Organisation der Gene eher der eines Typ III IF-Proteins ähnelt (Branchiostoma) bzw. in der Seescheide eine komplett andere Genstruktur aufweist (Wang et al., 2002). Demzufolge fehlen den niederen Chordaten echte Gegenstücke zu den Keratinen der Vertebraten. Da eine entsprechende Verbindung hin zu den cytoplasmatischen IF-Proteinen der niederen Chordaten nicht möglich ist, bleibt der Ursprung der Keratin-Evolution in Wirbeltieren weitestgehend ungeklärt.

4 Die Schleimkeratine TK α und TK γ

Da die cytoplasmatischen IF-Proteine der niederen Chordaten mit den Keratinen der Vertebraten nur entfernt verwandt sind, konnte bisher keine entsprechende evolutive Verbindung hergestellt werden. Allerdings konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass diese Lücke möglicherweise von einer hoch spezialisierten Gruppe von IF-Proteinen geschlossen werden könnte.

Die als Schleimkeratine bezeichneten IF-Proteine wurden vor einigen Jahrzehnten im Schleimaal *Eptatretus stoutii* entdeckt und als TK α und TK γ (TK; von engl. *thread keratin*) bezeichnet (Downing et al., 1984; Spitzer et al., 1984; 1988; Koch et al., 1991; 1994; 1995). Schleimaale zählen gemeinsam mit Neunaugen zu den ältesten Vertretern der rezenten Wirbeltiere (*Agnatha*; Kieferlose Wirbeltiere). In Stresssituationen sondert der Schleimaal enorme Mengen einer schleimigen Substanz an das umgebende Wasser ab. Diese Tiere können den Schleim ihren Fraßfeinden regelrecht in den Rachen „schießen“ und somit deren Kiemen verstopfen (Lim et al., 2006, Zintzen et al., 2011). Das Sekret wird in speziellen Schleimdrüsen der äußeren Hautschicht gebildet. In den Drüsen finden sich zwei

unterschiedliche Zelltypen, die auch als GMCs (gland mucous cells) bzw. GTCs (gland thread cells) bezeichnet werden (Downing et al., 1984). GMCs synthetisieren eine schleimige Substanz, die in kleinen Vesikeln verpackt fast die gesamten Zellen ausfüllen. Die GTCs hingegen bilden bis zu 60 cm lange und bis zu 3 μm dicke, fadenförmige Strukturen (sogenannte „Fäden“ von engl. *threads*) aus, die in hoch organisierter Anordnung in den Zellen aufgewickelt vorliegen (Abb. 4). Diese „Fäden“ bestehen fast ausschließlich aus den Schleimkeratinen TK α und TK γ . Bei Gebrauch der Drüsen vermischen sich die Inhalte der GMCs und GTCs, was zu einer enormen Volumenzunahme des Schleimes führt. Dieser besteht dann zu 99.996% aus Meerwasser, wohingegen die Schleimvesikel und die Schleimkeratine lediglich einen Anteil von 0.0015% bzw. 0.002% ausmachen. Die schleimige Substanz besitzt extreme Eigenschaften, welche auf die Schleimkeratine TK α und TK γ zurückzuführen sind. So ist dieser spezielle Schleim ca. 1000mal verdünnter als typischer Säugetierschleim, weist jedoch neben einer ausgeprägten Elastizität auch eine enorme Zugfestigkeit auf. Die „Fäden“ der GTCs können ohne zu reißen auf das dreifache ihrer Ausgangslänge gestreckt werden und dabei ähnlichen Belastungen standhalten wie Baumwollfasern (Fudge et al., 2005). Da die Schleimkeratine des Schleimaals ähnliche Materialeigenschaften wie Spinnenseide aufweisen, werden diese als möglicher zukünftiger Textilersatz für Baumwolle und synthetische Fasern in Betracht gezogen (Fudge et al., 2010).

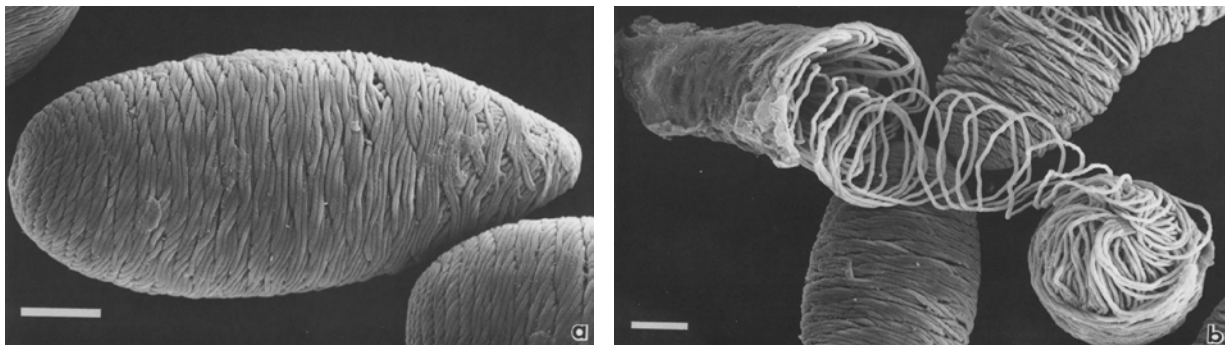


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von GTCs (ohne Zellmembran)

a) Die Zelle zeigt bereits äußerlich fadenförmige Strukturen. b) In dieser Präparation ist deutlich erkennbar, dass die GTC in hoch organisierter Form von einem einzelnen „Schleimkeratinfaden“ ausgefüllt ist. Der graue Balken entspricht 20 μm . Abbildung aus Downing et al., 1984.

Obwohl TK α und TK γ nur geringe Sequenzhomologien zu den bekannten IF-Typen aufweisen, lagern sie sich (a) wie Keratine in Form von Heterodimeren zusammen, werden (b) in der Hautepidermis exprimiert und weisen (c) Sequenzabschnitte auf, die typischerweise in E-Keratinen vorkommen, wie z.B. Glycin- und Serin-reiche Motive in der Kopf- und Schwanzdomäne. Bei diesen Motiven handelt es sich um Sequenzabschnitte, die vermutlich für die mechanische Flexibilität sowie für die Integrität der epidermalen Zellschicht verantwortlich sind (Hohl et al., 1991; Steinert et al., 1991; Schaffeld et al., 2002a; 2002b).

Allerdings ist eine klare Einteilung der Schleimkeratine in Typ I oder Typ II nicht möglich bzw. sinnvoll, da die Schleimkeratine auch Eigenschaften besitzen, die untypisch für Keratine sind (Koch et al., 1995). So zeigen die Sequenzen der Rod-Domänen nur eine geringe Homologie zu den restlichen Typ I-IV IF-Proteinen. Hierbei fällt besonders der für IF-Proteine ungewöhnlich hohe Threonengehalt auf. Als weitere Eigenheit ist die Linkerregion L2 zu erwähnen, welche mit 21 Aminosäuren länger ist als die der restlichen bisher untersuchten Keratine (16-17 Aminosäuren). Aber auch eine Zusammenlagerung zu höheren „Faden“-Strukturen sowie eine extrazelluläre Sezernierung konnte bisher noch bei keinem cytoplasmatischem Keratinfilament dokumentiert werden. Obwohl die Schleimkeratine aufgrund ihrer Keratin-typischen Eigenschaften von Koch et al. (1994; 1995) als E-Keratine des Typs I (TK γ) und des Typs II (TK α) klassifiziert wurden, sind diese als hoch abgeleitete Form betrachtet worden, deren Vorkommen sich wahrscheinlich auf den Schleimaal beschränkt.

In unserer Arbeitsgruppe konnten im Rahmen einer Dissertation die Schleimkeratine TK α und TK γ auch im Neunauge *Lampetra fluviatilis* nachgewiesen werden (Schultess, 2001). So wurden zwei TK α -Isoformen (TK α_1 ; TK α_2) und drei TK γ -Isoformen (TK γ_1 ; TK γ_2 ; TK γ_3) sequenziert, von denen das TK α_1 , das TK γ_1 sowie das TK γ_2 auch biochemisch identifiziert werden konnten. Die entsprechenden Proteinspots zeigten allerdings keine Reaktion im sogenannten CKBB-Test (= complement keratin blot binding-test), welcher zur biochemischen Identifizierung von Typ I bzw. Typ II IF-Proteinen verwendet wird. Dies kann als ein weiterer Hinweis für die besonderen Eigenschaften der Schleimkeratine in Bezug auf die restlichen cytoplasmatischen Keratine gedeutet werden (Schaffeld und Schultess, 2006). Im Neunauge konnten keine Hinweise gesammelt werden, ob die Schleimkeratine wie bereits beim Schleimaal beschrieben (a) höhere Strukturen wie „Fäden“ bilden und (b) diese extrazellulär an das umgebende Medium abgegeben werden (Schultess, 2001; Schaffeld und Schultess, 2006).

Nachdem die Schleimkeratine TK α und TK γ im Neunauge beschrieben wurden, sind in Sequenzdatenbanken auch entsprechende cDNA- bzw. EST-Sequenzen im Zebraquerschnitt *Danio rerio*, im Glatten Krallenfrosch *Xenopus laevis*, im Getüpfelten Gabelwels *Ictalurus punctatus*, in der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss*, im Östlichen Tigersalamander *Ambystoma tigrinum tigrinum* und im Axolotl *Ambystoma mexicanum* identifiziert worden. Mit Hilfe dieser Daten wurden phylogenetische Stammbäume berechnet. Hier nehmen TK α und TK γ sowohl eine distanzierte als auch basale Stellung zu den restlichen Keratinen ein (siehe Abb. 5), weshalb vermutet werden kann, dass die Schleimkeratine in der Evolution noch vor den restlichen Keratinen entstanden sind (Schaffeld und Schultess, 2006).

Bei Betrachtung der Genstruktur zeigt das TK γ im Zebraquerschnitt *Danio rerio* ebenfalls ein für Keratine untypisches Bild, da diese eher der eines Typ III IF-Proteins ähnelt. Zusätzlich liegt das Gen auf dem selben Chromosom, auf dem auch das Gen des Typ III IF-Proteins Desmin

lokalisiert ist (Schaffeld und Schultess, 2006). Ein ähnliche Situation wurde bereits bei den niederen Chordaten beschrieben. Hier besitzen die meisten Keratin-ähnlichen IF-Proteine ebenfalls Typ III Genstrukturen (Karabinos et al., 1998; 2000).

Obwohl in mehreren Fischen und Amphibien Hinweise auf das Vorkommen von TK α und TK γ gesammelt wurden, konnten die Schleimkeratine in diesen Tieren noch nicht biochemisch identifiziert werden. Obwohl der Zebraabräbling *Danio rerio* bezüglich seiner Keratine sehr gut untersucht ist (Conrad et al., 1998), zeigen sich bei Betrachtung des Gesamtkeratinkataloges keine Proteinflecken, die als mögliche Kandidaten für TK α bzw. TK γ in Betracht gezogen werden können. Durch Analysen von Verteilungsmustern entsprechender TK-kodierender EST-Sequenzen wurde gezeigt, dass die Schleimkeratine im Zebraabräbling *Danio rerio* überwiegend in larvalen Entwicklungsstadien vorzufinden sind. Aufgrund dieser ersten Expressionsdaten wurde über eine Funktion der Schleimkeratine innerhalb der Entwicklung von aquatisch lebenden Wirbeltieren spekuliert (Schaffeld und Schultess, 2006).

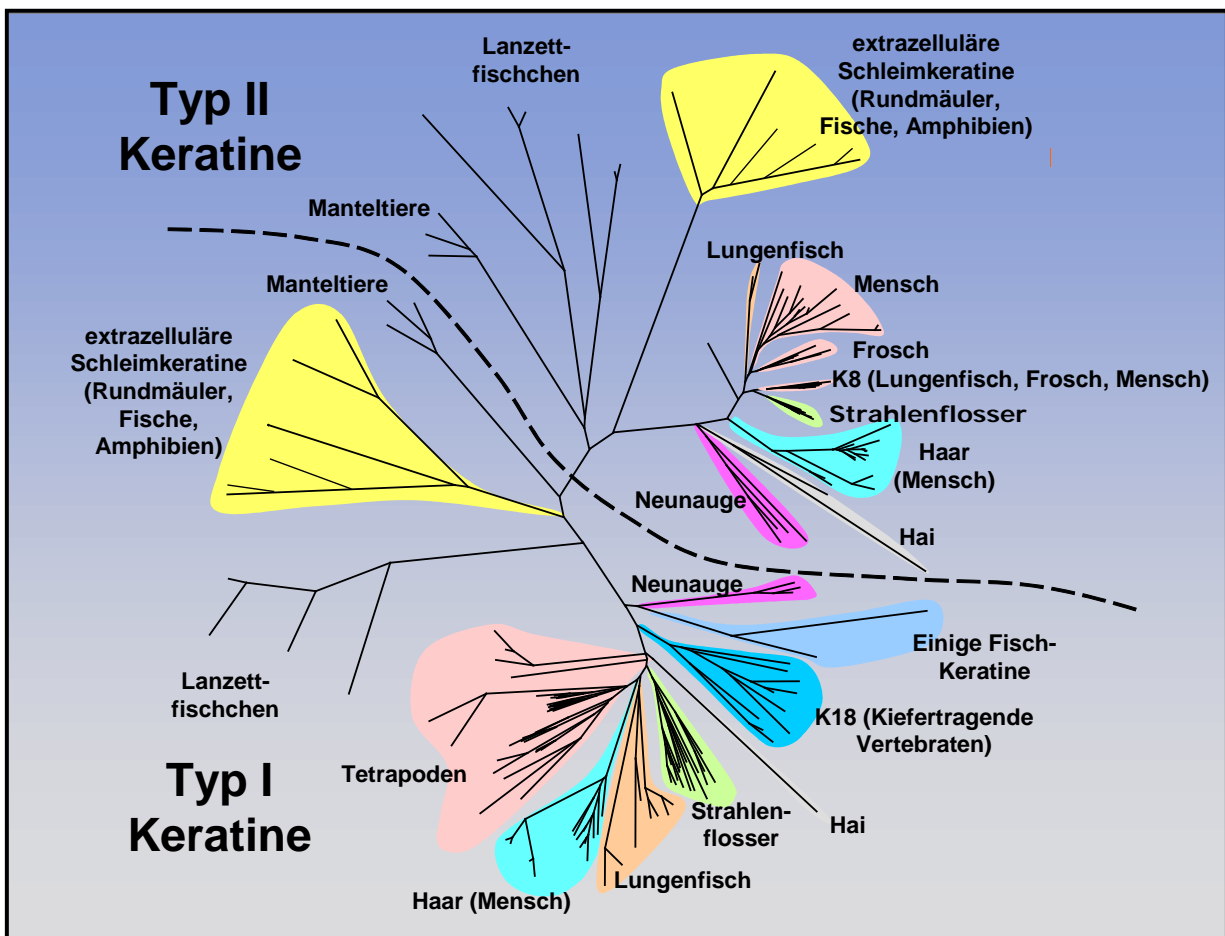


Abb. 5: Phylogenetischer Stammbaum der Typ I und Typ II IF-Proteine

Der phylogenetische Stammbaum veranschaulicht den komplexen Verlauf der Keratin-Evolution. Generell können die Typ I Keratine den Typ II Keratinen gegenüber gestellt werden. Man erkennt deutlich, dass die extrazellulären Schleimkeratine distanzierte Gruppen zu den restlichen Wirbeltierkeratinen bilden. Sie nehmen eine ursprünglichere Stellung ein als die restlichen Wirbeltier-Keratine. Abbildung nach Schaffeld und Markl, 2004.

5 Ziel der Arbeit

Die Schleimkeratine TK α und TK γ des Schleimaals besitzen F β -Proteine spezielle Eigenschaften. So bilden diese kabelartige „Fäden“-Strukturen, welche in Folge extrazellulärer Sezernierung an das umgebende Wasser abgegeben werden. Auch deutet die Position im Stammbaum auf eine besondere Stellung der Schleimkeratine innerhalb der cytoplasmatischen Keratine hin. Obwohl mittlerweile die Schleimkeratine TK α und TK γ auch in weiteren Fischen und Amphibien auf RNA-Ebene entdeckt wurden, ist bisher noch nichts über deren Eigenschaften bekannt. Zwar deuten die gesammelten Daten aus den Internetdatenbanken darauf hin, dass die Schleimkeratine in Fischen und Amphibien eher allgemeine Funktionen aufweisen, allerdings wurden bisher keine entsprechenden Studien durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Schleimkeratine TK α und TK γ im Modellorganismus Zebraärbling *Danio rerio* identifiziert und charakterisiert werden. Bisher konnten die Schleimkeratine noch in keinem modernen Fisch biochemisch nachgewiesen werden. Des Weiteren sollen Untersuchungen in Bezug auf deren Bindungseigenschaften Hinweise liefern, welche Bindungsinteraktionen die Schleimkeratine miteinander eingehen können. Zusätzlich soll untersucht werden, ob die Schleimkeratine im Zebraärbling, ähnlich wie im Schleimaal, höhere, kabelartige „Fäden“ formen können. Da im Schleimaal den Schleimkeratinen TK α und TK γ schleimmodifizierende Eigenschaften zugesprochen werden, könnte das Potential zur Bildung solcher Strukturen als erster Hinweis auf eine ähnliche Funktion gedeutet werden. Da die schleimmodifizierende Eigenschaften im Schleimaal auch mit deren extrazellulären Sezernierung einhergehen, sollen erste Expressionsdaten klären, ob die Schleimkeratine im Zebraärbling ebenfalls extrazellulär sezerniert werden oder aber wie alle restlichen Typ I- und Typ II-Keratine cytoplasmatisch lokalisiert vorliegen. Schlussendlich soll mit einer solchen Expressionsanalyse ein ggf. vorhandenes Gewebesowie Entwicklungs-spezifisches Expressionsmuster von TK α und TK γ dargestellt werden, wodurch sich ebenfalls Hinweise auf mögliche Funktionen ergeben könnten.

Mit der Identifizierung von TK α und TK γ im Zebraärbling *Danio rerio*, deren Charakterisierung bezüglich der Eigenschaften bei der spontanen Zusammenlagerung sowie der Expressionsanalyse sollen erste Hinweise auf eine mögliche Funktion der Schleimkeratine in modernen Fischen gesammelt werden. So soll diese Arbeit eine Basis für weitere funktionelle Studien an Schleimkeratinen im Modellorganismus Zebraärbling *Danio rerio* liefern.

B Material und Methode

1 Das Forschungsobjekt

1.1 Systematische Einordnung

Stamm	Chordata
Unterstamm	Vertebrata (Wirbeltiere)
Überklasse	Gnathostomata (Kiefermäuler)
Klasse	Osteichthyes (Knochenfische)
Infraklasse	Actinopterygii (Strahlenflosser)
Überordnung	Teleostei (moderne Knochenfische)
Ordnung	Cypriniformes (Karpfenähnliche)
Familie	Cyprinidae (Karpfenfische)
Unterfamilie	Rasborinae (Bärblinge)
Gattung	Danio
Art	<i>Danio rerio</i>

1.2 Allgemeines zur Lebensweise von *Danio rerio*

Beim Zebrabärbling *Danio rerio* handelt es sich um einen 4-5 cm großen Schwarmfisch, dessen Vorkommen sich auf Indien, Pakistan, Thailand, Malaysia, Indonesien und Sumatra beschränkt. Dort besiedelt er Flüsse und stehende Gewässer. Seinen Namen verdankt der Zebrabärbling den longitudinalen schwarzen Streifen, die sich über seinen gesamten Körper erstrecken. Die Tiere sind nach etwa sieben Monaten geschlechtsreif und erreichen ein Alter von ca. vier Jahren.

1.3 Herkunft, Hälterung und Präparation der Tiere

Die Tiere wurden von einem lokalen Zoonhändler bezogen. Für die Zucht wurden Containerbecken verwendet, in denen jeweils ca. zehn weibliche Zebrabärblinge gehalten wurden. Die Männchen wurden in getrennten Becken gehalten. Bei Bedarf wurden 2-3 Männchen zu den Weibchen gesetzt.

Zebrabärblinge zeigen ein fotoperiodisches Brutverhalten: zu Beginn der 14 h-Lichtphase beginnen die Tiere mit der Balz und die Weibchen laichen ca. 30-45 min später ab. Zum Schutz des Laichs wurden Laichbehälter aus Plexiglas benutzt, durch deren Plastikgitter die Eier hindurch sacken konnten. Die Zuchttiere konnten aufgrund der geringen Maschengröße nicht in das Laichbecken hinein schwimmen und den Laich fressen. Zusätzlich wurden Pflanzen in das Becken gesetzt, um den balzenden Tieren ausreichend Schutz zu bieten.

Um die Anzahl der gelegten Eier zu maximieren wurden die Tiere nicht öfter als einmal pro Woche für die Zucht verwendet. Des Weiteren wurden den Tieren zusätzlich zum Flockenfutter auch Artemien verabreicht.

Zur Präparation wurden die Embryonen/Larven auf Eis gelegt und in Petrischalen nach Entwicklungsstadien sortiert, anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Embryonen/Larven, welche für RNA-Analysen verwendet wurden, sind unmittelbar in Paraformaldehyd fixiert worden (siehe Punkt 8.1).

Adulte Tiere wurden mit 400 mg/Liter MS222 (3-Aminobenzoessäure-ethylester-methansulfonsäure; Serva Heidelberg) narkotisiert und durch Abschneiden des Kopfes und anschließendem Ausbluten getötet. Die Tiere wurden in Isopentan aufgenommen, welches mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt war. Die Gewebe wurden sofort bei -80°C eingefroren.

2 Chemikalien und Geräte

Die Standardchemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Kalsruhe), Sigma (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) in Analysequalität bezogen. Die verwendeten Elektrophoresekammern, Nassblotkammern und Netzgeräte waren Produkte der Firma Biotec Fischer (Reiskirchen). Für alle molekularbiologischen Arbeiten wurden autoklavierte (1 bar Überdruck, 121°C, 30 min) Geräte, sowie autoklaviertes, bidestilliertes Wasser benutzt. Zusätzlich sind zur Vermeidung einer Kontamination der Proben stets Nitrilhandschuhe getragen worden. Auf weitere verwendete Chemikalien und Geräte wird an entsprechenden Stellen im Text hingewiesen.

3 Mikrobiologische Methoden

3.1 Bakterienstämme

- *E. coli* StrataClone™ SoloPack® Competent Cells (Stratagene, Heidelberg)
- *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe)
- *E. coli* BL21 (DE3)pLys (Stratagene, Heidelberg)

3.2 Plasmidvektoren

- pSC-A (Stratagene, Heidelberg)
- pET3a (Novagen, Darmstadt)

3.3 Nährmedien und Agarplatten

- LB-Medium (1 L):
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
10 g Tryptone
pH 7,0
- LB-Agar (1 L):
20 g Agar-Agar
ad 1 L LB-Medium
- LB-X-Gal-Agar (1 L):
20 g Agar-Agar
100 mg X-Gal
47 mg IPTG
ad 1 L LB-Medium
- S.O.C.-Medium:
10 mM NaCl
0,5 % Hefe-Extrakt
10 mM MgCl₂
20 mM Glukose
2,5 mM KCl
2 % Trypton
10 mM MgSO₄
pH 7,0

Die Medien wurden nach der Herstellung direkt autoklaviert (1 bar Überdruck, 120°C, 30 min). Die autoklavierten Agar-Medien-Lösungen wurden auf 55°C abgekühlt und in Petrischalen mit einem Durchmesser von 85 mm bis zur Hälfte gefüllt. Zur selektiven Anzucht bestimmter Transformanten wurde den Medien nach Abkühlen auf mindestens 55°C das Antibiotikum Ampicillin mit einer Endkonzentrationen von 100 µg/ml zugesetzt.

3.4 Plattenkulturen

Bakteriensuspensionen von Transformationen wurden auf Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten enthielten ein Antibiotikum, welches der Resistenz des Vektors entsprach:

- Ampicillin: 100 mg / L LB-Medium
- Chloramphenicol 34 mg / L LB-Medium

Die Platten konnten für mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

3.5 Flüssig- / Übernachtskulturen

Mit einzelnen Kulturen von zuvor auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichenen Bakterien wurde ca. 3-4 ml LB-Medium angeimpft. Der Übertrag der Bakterienkolonie erfolgte mit einer sterilen Pipettenspitze. Die Flüssigkultur inkubierte über Nacht bei 37°C zur Vermehrung des Bakterienstammes in einem Schüttler (200 Upm).

3.6 Glycerinkulturen

Um Bakterien über einen langen Zeitraum aufzubewahren, wurden Glycerinkulturen angesetzt. Hierzu wurden 700 µl Bakterienflüssigkultur mit 300 µl sterilem Glycerin versetzt und gut vermischt. Bei einer Lagerung bei -80°C sind die Bakterien über mehrere Monate haltbar.

4 Allgemeine molekularbiologische Methoden

4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe

RNA wurde mit dem „Universal RNA Purification Kit“ der Firma Roboklon nach Angaben des Herstellerprotokolls isoliert. Die so extrahierte RNA wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C für maximal eine Woche eingefroren.

4.2 Präparation von DNA aus Gewebe

Die Extraktion von DNA aus Gewebe wurde mit dem „Tissue DNA Purification Kit“ der Firma Roboklon in Anlehnung an das Herstellerprotokoll durchgeführt. Die extrahierte DNA wurde direkt verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

4.3 PCR-Techniken

4.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR lassen sich genau definierte DNA-Abschnitte vervielfältigen. Die zu amplifizierenden Bereiche werden durch zwei flankierende Primer festgelegt. Die PCR setzt sich aus drei aufeinander folgenden Schritten zusammen:

- 1) *Denaturierung*: In diesem ersten Schritt wird bei 94°C der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge aufgetrennt.
- 2) *Annealing*: Durch Senkung der Temperatur auf die Primer-spezifische Schmelztemperatur kommt es zur Hybridisierung der Primer mit den komplementären Abschnitten der einzelsträngigen DNA.
- 3) *Elongation*: Im dritten Schritt dient das freie 3'-OH-Ende der Primer als Startpunkt für die thermostabile Polymerase, so dass der Einzelstrang in 5'-3'-Richtung zu einem Doppelstrang ergänzt wird.

Verwendet wurde die *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) in Anlehnung an die Herstellerangaben. Im Folgenden ist ein allgemeines Pipettierschema aufgeführt:

- 0,2-1 µg DNA
- 0,5 µl *forward*-Primer (50 pmol)
- 0,5 µl *reverse*-Primer (50 pmol)
- 5 µl 10 x PCR-Puffer
- 1,5-8 mM MgCl₂
- 2 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 0,5 µl (2,5 Units) *Taq*-Polymerase
- ad 50 µl H₂O_{dd}

Nachdem die Ansätze vermischt wurden, sind diese kurz zentrifugiert und bis zum Einsatz im Thermocycler (T Gradient Thermocycler 96, Biometra®) auf Eis gehalten worden. Folgendes Programm wurde verwendet:

- Einmalige, vollständige Denaturierung: 15 min bei 94°C
- 30 Zyklen:
 - 30 sec bei 94°C
 - 30 sec bei 55°C
 - 60 sec / 1000 bp bei 72°C
- Einmalige, lange Schlusselongation: 7 min bei 72°C

4.3.2 Sonden-PCR

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden DNA-Sonden benötigt. Dazu wurden PCR-Reaktionen mit dem PCR DIG Labeling Mix (Roche, Mannheim) durchgeführt. In diesem Mix ist Digoxigenin an das Nukleotid dUTP gekoppelt und wird zusätzlich zu den anderen Desoxynukleotiden mittels PCR in den Nukleotidstrang eingebaut. Die so hergestellten DNA-

Sonden können dann im weiteren Verlauf mit Digoxigenin-spezifischen Antikörpern, welche mit dem Enzym Alkalische Phosphatase kovalent verbunden sind, inkubiert werden. Auf diese Weise lassen sich die DNA-Sonden mittels Farbreaktion detektieren. Folgender PCR-Ansatz wurde zur Herstellung der Sonden verwendet:

- 50-200 ng Plasmid
- 10 pmol *forward*-Primer
- 10 pmol *reverse*-Primer
- 5 µl 10 x Puffer
- 3 µl MgCl₂
- 1 µl PCR DIG Labeling Mix
- 0,5 µl (2,5 Units) DNA-Polymerase
- ad 50µl H₂O_{dd}

Die Primer wurden so gewählt, dass sie Intron-überspannende Bereiche abdecken. Auf diese Weise sollte garantiert werden, dass die Sonden spezifisch an RNA binden. Die verwendeten Primer sind im Anhang unter Punkt 2 aufgeführt.

4.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit der Technik der RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) kann ein spezifisch gewählter RNA-Abschnitt durch das Enzym Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden. Diese cDNA dient wiederum als Matrize für eine im Anschluss durchgeführte PCR. Die auf diese Weise amplifizierten cDNAs können dann in weiteren Schritten sequenziert und kloniert werden.

Die RT-PCR wurde mit dem „QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit“ der Firma Qiagen in Anlehnung an das Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang unter Punkt 2 dargestellt.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

- Reverse Transkription: 30 min bei 50°C
- Einmalige, vollständige Denaturierung: 15 min bei 95°C
- 35 Zyklen:
 - 45 sec bei 94°C
 - 30 sec bei 55°C
 - 90 sec bei 72°C
- Einmalige, lange Schlusselongation: 7 min bei 72°C

Direkt nach der RT-PCR wurden die Ansätze in einem 1%igen Agarose Gel aufgetrennt, um die amplifizierte cDNA durch eine Gelextraktion (siehe Punkt 4.5) zurück zu gewinnen.

4.3.4 Klon-PCR

Im Anschluss an eine Klonierung (siehe Punkt 4.7) wurde eine Klon-PCR mit den transformierten Bakterien durchgeführt. Mit dieser Methode lässt sich schnell eine Klonierungsreaktion auf ihren Erfolg überprüfen.

Nach Lagerung von Plattenkulturen für ca. 24 h bei 37°C wurden einzelne Bakterienkolonien vorsichtig mit autoklavierten Pipettenspitzen in folgenden Ansatz überführt:

- 6,25 µl Red *Taq*[®] Ready Mix[™] (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 0,25 µl T3 Primer (10 pmol)
- 0,25 µl T7 Primer (10 pmol)
- 5,75 µl H₂O_{dd}

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

- Einmalige, vollständige Denaturierung: 2 min bei 95°C
- 30 Zyklen:
 - 10 sec bei 94°C
 - 30 sec bei 53°C
 - 120 sec bei 72°C
- Einmalige, lange Schlusselongation: 10 min bei 72°C

Der komplette Ansatz wurde im Anschluss in einem Agarosegel aufgetrennt. Ergab dies einen Hinweis auf die gesuchte Insertlänge, wurde eine Flüssigkultur der entsprechenden Kolonie angesetzt.

4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Lösungen

10 x TBE-Puffer:

- 0,9 M Tris
- 0,9 M Borsäure
- 20 mM EDTA
- pH 8,3

Loading Dye:	50 % Glycerin
	49,6 % 1 × TBE-Puffer
	0,4 % Bromphenolblau
	pH 8,0

Agarose

Ethidiumbromid

4.4.1 Präparation der Gele und der Elektrophoresekammer

Pro Gel wurde 0,5 g Agarose in 50 ml TBE-Puffer in einer Mikrowelle solange erhitzt, bis die Lösung klar war. Nach Abkühlen der Lösung auf 50-60°C wurden 2,5 µl Ethidiumbromid hinzu pipettiert und gut vermischt. Sofort im Anschluss wurde die Lösung in eine mit Probenkamm versehene und zuvor mit Klebefilm abgedichtete Elektrophoresekammer (Biotech Fischer, Reiskirchen) gegossen. Das Gel polymerisierte im Anschluss bei Raumtemperatur.

4.4.2 Durchführung der Elektrophorese

Unmittelbar vor der Elektrophorese wurde der Klebefilm entfernt und die Kammer mit 1 × TBE-Puffer gefüllt. Nach Entfernen des Probenkamms wurden die Taschen vorsichtig mit den Proben gefüllt. Zuvor wurden diese mit Loading Dye vermischt. Als Größenmarker diente Lambda DNA/EcoRI+HindIII. Die Elektrophorese lief bei 100 V und wurde nach ca. 30 min abgebrochen. Das DNA-Bandenmuster wurde unter UV-Licht (254-366 nm) dokumentiert bzw. entsprechende Banden für die Gelextraktion mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten.

4.5 Gelextraktion aus Agarosegelen

Für die Gelextraktion wurde das „GeneMATRIX DNA Purification Kit“ der Firma Roboklon in Anlehnung an das Herstellerprotokoll verwendet. Die so gewonnene cDNA konnte im Anschluss in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator, Bachoter) aufkonzentriert werden. Das Endprodukt wurde direkt zur Klonierung weiterverwendet bzw. bei 4°C aufbewahrt.

4.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (BioPhotometer 6131, Eppendorf). Hierzu wurde die optische Dichte bei 260 nm (OD260) gemessen. Eine Einheit entsprach dabei folgenden Werten:

ds DNA:	50 µg / ml
ss RNA:	40 µg / ml

Zur Bestimmung der Reinheit wurde der Quotient aus OD260 und OD280 ermittelt, wobei der optimale Wert für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen sollte.

4.7 Klonierung und Transformation von RT-PCR-Produkten

Als Klonierung wird eine Insertion eines PCR-Produktes in einen Vektor, sowie dessen Transformation in einen kompetenten Bakterienstamm bezeichnet. Zur Durchführung wurde das „StrataClone™ PCR Cloning Kit“ der Firma Stratagene nach Angaben des Herstellerprotokolls verwendet. Im Anschluss an die Klonierung wurde eine Klon-PCR mit den transformierten Bakterien durchgeführt (siehe Punkt 4.3.4).

4.8 Plasmid-Isolation aus Bakterien

Aus Flüssigkulturen wurden nach ca. 24 h die Plasmide mit dem „BlueMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit“ der Firma Roboklon in Anlehnung an das Herstellerprotokoll isoliert und anschließend sequenziert.

4.9 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die klonierten DNA-Fragmente wurden nach dem Sanger-Verfahren sequenziert. Das Insert befindet sich dabei in einem doppelsträngigen Vektor und kann von zwei Seiten sequenziert werden.

Zunächst wird ein DNA-Doppelstrang durch Hitze denaturiert. Nachdem sich die Sequenzierprimer angelagert haben beginnt eine DNA-Polymerase mit der Synthese des komplementären Stranges. Zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden liegen im Reaktionsgemisch auch noch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotide vor. Sobald ein solches Didesoxynukleotid in den komplementären Strang eingebaut wird kommt es zu einem Kettenabbruch, da die zur weiteren Verknüpfung notwendige 3'OH Gruppe in diesen Nukleotiden nicht vorhanden ist. Auf diese Weise entstehen Strangfragmente mit unterschiedlichen Längen, welche dann über ein Sequenziergel aufgetrennt und anschließend ausgewertet werden können. Als Sequenzierprimer wurden T3- bzw. T7-Primer (für den Vektor pSC-A) und pET03- bzw. pET05-Primer (für den Vektor pET-3a) verwendet.

Mit den isolierten Plasmiden wurde eine Sequenzier-PCR mit folgendem Ansatz durchgeführt:

- x µl Matrizen DNA (170-350 ng)
- 1 µl *forward*- oder *reverse*-Primer (10 pmol)
- 1 µl *Big Dye* (BD)
- 3 µl Sequenzierungspuffer (BD-Puffer)
- ad 10 µl H₂O_{dd}

Das PCR-Programm wurde wie folgt durchgeführt:

- 30 Zyklen:
 - 10 sec bei 96°C
 - 4 min bei 55°C

Die Sequenzierungen wurden von der Firma GENterprise, Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH (Mainz) durchgeführt. Die erhaltene Sequenz wurde im Anschluss in einer Internetdatenbank (BLAST NCBI) mit den dort vorhandenen Informationen verglichen. Folgende Internettools bzw. Programme wurden für die Sequenzanalysen verwendet:

- BLAST NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Exspasy Translate Tool <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>
- Chromas 1.55 <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>
- Geneious v5.4 <http://www.geneious.com>
- GeneDoc <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>
- Mega 5.05 <http://www.megasoftware.net/>

5 Rekombinante Expression und Aufreinigung der Proteine

Da für das weitere Vorgehen große Proteinmengen benötigt wurden, mussten diese in einem geeigneten Expressionssystem vorab hergestellt werden. Mit Hilfe der rekombinanten Expression wurden in Bakterien die gewünschten Proteine überexprimiert und anschließend aufgereinigt. Auf diese Weise konnten Proteinmengen im Milligrammbereich gewonnen werden.

Verwendet wurde das *E. coli* T7 Expressionssystem (Studier et al., 1990). In den Expressionsvektor pET-3a (plasmid for expression by T7 RNA polymerase) wurde die cDNA des zu exprimierenden Proteins ligiert. Daraufhin wurde der Vektor in die Zellen des Bakterienstammes BL21 (DE3)pLys (Stratagene, Heidelberg) transformiert. Die Expression ließ sich mit Hilfe des Lactose-Derivats IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induzieren.

5.1 Klonierung in den Expressionsvektor pET-3a

Für die Expression der rekombinanten Proteine wurde der Vektor pET-3a (Novagen, Darmstadt) verwendet. Zur Klonierung wurde der zirkuläre Vektor mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI geschnitten, so dass dieser in linearisierter Form vorlag. Weiterhin konnten auf diese Weise definierte Enden geschaffen werden, die für die anschließende Ligation benötigt wurden.

Daraufhin wurde der Vektor an den freien 5'-OH-Gruppen dephosphoryliert, wodurch eine Selbstligation des Vektors verhindert wurde. Hierzu wurde der Vektor für 30 min bei 37°C mit Alkalischer Phosphatase wie folgt inkubiert:

- 4-5 µg pET-3a Vektor
- 10 µl 10 x Puffer
- 1 µl Alkalische Phosphatase
- ad 100 µl H₂O_{dd}

Durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (10 min; 72°C) konnte die Alkalische Phosphatase wieder deaktiviert werden. Mit einer PCR-Aufreinigung wurde der für die Ligation aufgearbeitete Vektor gereinigt. Hierzu wurde das „*NucleoSpin Extract Kit*“ (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Anschließend wurde mithilfe der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI die zu klonierende cDNA-Sequenz aus dem Sequenziervektor psC-A herausgeschnitten. Der Erfolg des Verdauens konnte mittels Gelelektrophorese überprüft werden. In einer anschließenden Gelextraktion wurde das entsprechende Fragment isoliert und gleichzeitig aufgereinigt.

Zur Ligation wurde folgender Ansatz über das Wochenende bei 4°C inkubiert:

- 100-200 ng cDNA
- 2 µl pET-3a Vektor
- 2 µl 10 x Ligationspuffer
- 2 µl Ligase
- ad 20 µl H₂O_{dd}

5.2 Transformation

Für die Transformation wurden folgende Bakterien verwendet: *E.coli* Top 10 (Invitrogen, Groningen) und *E. coli* BL21 (DE3)pLys (Stratagene, Heidelberg).

Die kompetenten Zellen (25-100 µl) wurden auf Eis aufgetaut und dann mit den zu transformierenden Plasmiden (10-100 ng zirkuläre Plasmid-DNA) versetzt. Der Ansatz wurde

dann für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad (30 sec bei *E.coli* Top 10; 20 sec bei *E. coli* BL21 (DE3)pLys). Anschließend wurden 900 µl LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz bei 37°C für 2 h geschüttelt, so dass sich die Bakterien erholen konnten. Um das Medium entfernen zu können, wurde der Ansatz zentrifugiert (200 g; 3 min). Das Sediment wurde im verbleibenden Medium (150 µl) resuspendiert und auf LB-Ampicillin- und LB-Chloramphenicol-Platten ausplattiert. Dabei wurden jeweils unterschiedliche Mengen zwischen 20 µl und 100 µl pro Platte verwendet. Nach Inkubation der Bakterien (37°C; üN) wurden einzelne Klone gepickt und als Flüssigkultur mit Zugabe entsprechender Antibiotika angesetzt.

5.3 Induktion und Expression

Hierzu wurden aus der vorangegangenen Transformation BL21 (DE3)pLys-Klone in je 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt. Die Ansätze wurden bei 37°C über Nacht in einem Schüttelinkubator inkubiert. Nachdem die Bakterien auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,8-1,0 herangewachsen waren, wurden diese in Ampicillin-haltigem LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,05-0,1 verdünnt und erneut bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4-0,8 wurde der Ansatz mit 0,8 µl 0,5 M IPTG je ml LB-Medium induziert. Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte bei 25°C über Nacht. Für die Durchführung einer Negativkontrolle wurden dem Ansatz zuvor 5 ml entnommen und ohne Zugabe von IPTG unter sonst identischen Bedingungen inkubiert. Zur Überprüfung des Erfolges wurden die induzierten und uninduzierten Proben mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Punkt 6.2).

5.4 Präparation und Aufreinigung der Proteine

5.4.1 Präparation der *inclusion bodies*

Lösungen:

Lysis-Puffer :

50 mM Tris/Cl
25 % (w/v) Saccharose
1 mM EDTA
pH 8,0

Detergenz-Puffer:

200 mM NaCl
1 % (v/v) 10 % NP-40
1 % (v/v) 10 % Natriumdesoxycholat
20 mM Tris/Cl
2 mM EDTA

	pH 7,5
GII-Puffer:	10 mM Tris/Cl 5 mM EDTA 0,5 (v/v) 10 % NP-40 pH 8,0
GII Salz-Puffer:	1,5 M KCl
TE-Puffer:	10 mM Tris/Cl 1 mM EDTA pH 8,0

Der Ansatz der Flüssigkultur aus Punkt 5.3 wurde bei 4000 g (7000 Upm; GSA Rotor, Sorvall-Zentrifuge) für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde entweder bei -20°C aufbewahrt oder direkt weiter verarbeitet.

Zur weiteren Verarbeitung wurde das Sediment (ca. 5 g) in 8 ml Lysis-Puffer resuspendiert und in einen „Douncer“ gegeben. Daraufhin wurden 2 ml Lysozym-Lösung (10 mg/ml Lysozym in Lysis-Puffer) hinzu pipettiert und der ganze Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 100 µl (1 M) MgCl₂, 1 µl Benzonase, 100 µl PMSF (67 mg/ml Ethanol) sowie 200 µl 10%iges NP-40 dazu gegeben. Dieser Ansatz wurde dann 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml Detergenz-Puffer wurde der gesamte Ansatz mindestens 20 mal mit dem „Douncer“ bearbeitet, um die Bakterienzellen aufzubrechen und die *inclusion bodies* freizusetzen.

Die *inclusion bodies* wurden dann wie folgt gewaschen:

- 9000 g (11000 Upm; SS34 Rotor) für 10 min bei 4°C
- Resuspension des Sediments in 20 ml GII-Puffer (+20 µl 1,0 M DTT und 50 µl 67 mg/ml PMSF) mit anschließender Inkubation auf Eis (10 min). Zentrifugation bei 9000 g (11000 Upm; SS34) für 10 min bei 4°C.
- Resuspension des Sediments in 20 ml GII Salz-Puffer (+20 µl 1,0 M DTT und 50 µl 67 mg/ml PMSF) mit anschließender Inkubation auf Eis (30 min). Zentrifugation bei 9000 g (11000 Upm; SS34) für 10 min bei 4°C.
- Resuspension des Sediments in 20 ml GII-Puffer (+20 µl 1,0 M DTT und 50 µl 67mg/ml PMSF) und anschließender Inkubation auf Eis (10 min). Zentrifugation bei 9000 g (11000 Upm; SS34) für 10 min bei 4°C.

- Resuspension des Sediments in 20 ml TE-Puffer (+20 µl 1,0 M DTT und 50 µl 67 mg/ml PMSF) und anschließender Inkubation auf Eis (10 min). Zentrifugation bei 9000 g (11000 Upm; SS34) für 10 min bei 4°C.
- Resuspension des Sediments in 20 ml TE-Puffer (+20 µl 1,0 M DTT und 50 µl 67 mg/ml PMSF) und anschließender Inkubation auf Eis (10 min). Zentrifugation bei 9000 g (11000 Upm; SS34) für 10 min bei 4°C.

Abschließend wurde das Sediment in 40 ml 10 M Harnstoff resuspendiert, welchem unmittelbar vor Gebrauch 400 µl 1,0 M Tris-HCl (pH 8), 400 µl 0,5 M EDTA (pH 8), 40 µl 1,0 M DTT und 40 µl 67 mg/ml PMSF in EtOH hinzugegeben wurden. Der Ansatz wurde dann bei 100.000 g (24000 Upm; L-70 Ultracentrifuge, Beckman) für 60 min bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand konnte anschließend bei -20°C aufbewahrt oder direkt weiterverarbeitet werden.

5.4.2 Ionenaustausch-Chromatographie

Lösungen

Säulen-Puffer:	8 M Harnstoff
	10 mM Tris/Cl
	5 mM EDTA
	1 mM DTT
	pH 8,5

Zur Aufreinigung der Proteine wurde die Ionenaustausch-Chromatographie (IC) verwendet. Hierbei binden die Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen an eine Matrix. Je nach Eigenschaften der Matrix wird zwischen einer Anionenaustauschchromatographie (positive Ladungen) und einer Kationenaustauschchromatographie (negative Ladungen) unterschieden. Die Bindung eines Proteins an die Matrix ist abhängig vom verwendeten Puffer (pH-Wert und Ionenstärke), von der Dichte der Ladungen auf der Matrix und vom isoelektrischen Punkt des Proteins. So ist es möglich, durch graduelle Änderung der Ionenstärke die gebundenen Proteine getrennt zu eluieren.

5.4.2.1 Anionenaustausch-Chromatographie

Zum Anionenaustausch wurden 20 ml Säulenmaterial (Q-Sepharose® Fast Flow, Amersham Biosciences) in ein Becherglas gegeben. Nach ca. 30 min hatte sich die Sepharose abgesetzt, so dass der Überstand abpipettiert und durch 40 ml Säulen-Puffer ersetzt werden konnte. Dies wurde dann in eine Säule (Ø = 2,5 cm) gefüllt und solange gewartet, bis sich

das gesamte Säulenmaterial abgesetzt hat. Anschließend wurde mit 100 ml Säulen-Puffer equilibriert. Nach der Equilibrierung wurde mit einer Pasteur Pipette der Überstand aus Punkt 5.4.1 vorsichtig auf das Säulenmaterial gegeben. Die nun an die Matrix gebundenen Proteine wurden mit einer steigenden Ionenstärke im Puffer wieder herausgewaschen. Hierzu diente ein Gradientenmixer, mit dessen Hilfe ein 0-0,5 M Gu-HCl Gradient erzeugt werden konnte (insgesamt 100 ml). Die eluierten Proteine wurden in 1,5 ml Fraktionen gesammelt und anschließend photometrisch sowie mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Punkt 6.2). Fraktionen, die in der SDS-PAGE Proteinbanden der gewünschten Molekülmasse aufwiesen, wurden vereint und für die Kationenaustausch-Chromatographie weiterverwendet.

5.4.2.2 Kationenaustausch-Chromatographie

Die Kationenaustausch-Chromatographie wurde analog wie in Punkt 5.4.2.1 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden jedoch abweichend 15 ml Säulenmaterial (SP-Sepharose® Fast Flow, Amersham Biosciences) verwendet. Des Weiteren wurde die Probe mit der dreifachen Menge Säulen-Puffer verdünnt und der Gradient reichte von 0 M bis 1 M Gu-HCl.

5.5 Aufkonzentrierung der Proteinlösungen

Zur Aufkonzentrierung der Proteinlösungen wurden Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices (Millipore, Schwalbach) der Ausschlussgröße 30.000 nach Angaben des Herstellers verwendet. Die konzentrierten Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

6 Proteinbiochemische Methoden

6.1 Biochemische Präparation der Intermediärfilamente

Extraktionslösungen

Niedrigsalzpuffer:	150 mM NaCl 10 mM Tris/Cl pH 7,2 5 mM EDTA 1 % Triton X-100
Hochsalzpuffer:	1,5 M KCl 10 mM Tris/Cl pH 7,2 5 mM EDTA 1 % Triton X-100
TE-Puffer:	10 mM Tris/Cl pH 7,2

5 mM EDTA

Den oben aufgelisteten Pufferlösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch vier Proteasehemmstoffe zugesetzt:

- PMSF 2 mM (Stammlösung 0,38 M in Ethanol)
- Pepstatin A 0,7 µg/ml (Stammlösung 1 mg/ml H₂O)
- Leupeptin 4 µg/ml (Stammlösung 5 mg/ml H₂O)
- Benzamidin 1 mM (Stammlösung 2 mM in H₂O)

Lysis Puffer A:

9,5 M Harnstoff
25 mM DTT
2 % (w/v) Nonidet P-40
0,8 % Ampholine pH 4-6
0,8 % Ampholine pH 5-7
0,4 % Ampholine pH 3,5-10

Zur Extraktion der Intermediärfilamente wurden zwei, im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen stehende, physikochemische Eigenschaften ausgenutzt:

- (1) Ihre schlechte Löslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien (z.B. Triton)
- (2) Ihre schlechte Löslichkeit in Hochsalzlösungen (z.B. KCl bzw. NaCl)

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Um eine Kontamination der Proben mit Keratinen zu vermeiden wurden immer Latexhandschuhe getragen. Das aus der Präparation stammende eingefrorene Gewebe (ca. 1 cm³) wurde in einem vierfachen Volumen eisgekühlten Niedrigsalzpuffer aufgenommen und anschließend mit einem Ultra-Turrax der Firma Jahnke & Kunkel in einem 50 ml Kunststoffschraubgefäß (Greiner) homogenisiert. Mit einer Sorvall Kühlzentrifuge (SS34 Rotor, 4°C, 15000 Upm) wurde das Homogenisat 10 min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes und Zugabe eines gleichen Volumens Hochsalzpuffer wurde erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach einer erneuten Wiederholung des vorherigen Arbeitsschrittes wurde das Sediment in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch dreimaliges Waschen mit TE-Puffer konnten überschüssige Salze und Detergenzien entfernt werden. Hierzu wurde jeweils das Sediment in 2 ml TE-Puffer resuspendiert und in einer Eppendorf Zentrifuge (5415 R Tischzentrifuge) bei 16.100 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach der dritten Zentrifugation konnte das Sediment in 50-200 µl Lysis Puffer A aufgenommen werden. Die extrahierten Intermediärfilamente wurden bei -20°C gelagert.

6.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE)

Die 1D-PAGE wurde zur Überprüfung der Intermediärfilament-Präparate hinsichtlich ihrer Menge und Integrität durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte nach dem denaturierenden und diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970). Als reduzierendes Agens wurde DTT verwendet. Die Gele setzten sich aus einem grobmaschigen Sammelgel und einem feinmaschigen Trenngel zusammen, die sich zusätzlich noch im pH-Wert unterschieden. Als Gelkammer diente PHERO - minivert von Biotec Fischer (Reiskirchen) für zwei Gele im Format 80 x 82 mm.

Gellösungen

4 x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/Cl pH 8,8
0,4 % (w/v) SDS

4 x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/Cl pH 6,8
0,4 % (w/v) SDS

Laemmli-Puffer: 23 mM Tris
190 mM Glycin
0,2 % SDS

2 x Denaturierungspuffer: 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8
25 mM Dithiothreitol (DTT)
10 % (w/v) Glycerin
3,0 % SDS
0,1 % Bromphenolblau

Rotiphorese Gel30 Acrylamidlösung 37,5:1 (30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % Bisacrylamid

APS 10 % (w/w) in dest. H₂O (Ammoniumpersulfat)

TEMED 99 % p.A. (N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamid)

6.2.1 Präparation der Gele und der Elektrophoresekammer

Trenngel-/Sammelgelmischung:

x ml 30 % Acrylamid-Stocklösung

x ml 4 x Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer

x ml H₂O_d

10 µl 10 % Ammoniumpersulfat pro ml Trenngel- bzw. Sammelgelmischung

1 µl TEMED pro ml Trenngel- bzw. Sammelgelmischung

Zwei Glasplatten (Format 80 × 82 mm; Schichtdicke 1 mm), davon eine „Ohrenplatte“ mit einer 2,8 cm tiefen Einbuchtung, wurden aufeinander gelegt. Dazwischen wurde ein 1 mm dicker Abstandhalter („Spacer“) geschoben und diese Konstruktion mit Klebeband an den Rändern abgedichtet. Zusätzliche Abdichtung von Innen erfolgte mit aufgekochter 0,5%iger Agarose. Nachdem die Agarose abgekühlt und verfestigt war, wurde die Trenngelmischung (10 % Acrylamid) zwischen die Glasplatten bis 1,5 cm unter den Rand der "Ohrenplatte" gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Ethanol mit dest. H₂O gewaschen und die Sammelgelmischung (3,9 % Acrylamid) bis unter den Rand gegossen. Ein Probenkamm (1 mm Dicke; 12 Taschen) wurde sofort im Anschluss luftblasenfrei eingesetzt. Das Gel konnte nach vollständiger Polymerisation in feuchte Tücher eingewickelt und in einer luftdichten Plastikbox bei 4°C bis zu zwei Wochen aufbewahrt werden.

6.2.2 Durchführung der Elektrophorese

Unmittelbar vor der Verwendung der Gele wurde der Kamm und das Klebeband vorsichtig entfernt und die Taschen mit dest. H₂O gespült.

In Lysis Puffer A aufgenommene Sedimente der Intermediärfilament Präparationen wurden in einem Vortex-Mischer der Firma Jahnke & Kunkel vermischt und 1 min bei 16.100 g zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde mit gleicher Menge 2 x Denaturierungs-Puffer versetzt.

Für die Erfolgskontrolle der rekombinanten Expression wurden 4 ml Bakteriensuspension zentrifugiert (Eppendorf 5415 R Tischzentrifuge) und das Sediment in 50 µl Laemmli-Puffer gelöst und mit gleicher Menge 2 x Denaturierungs-Puffer versetzt.

Nach anschließender Denaturierung der Proteine für fünf Minuten bei 95°C wurden die so vorbereiteten Proben vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker diente „SDS-6H“ von Sigma (Deisenhofen) mit folgenden Proteinen:

- Carboanhydrase M_r 29000
- Ovalbumin M_r 45000
- Rinderserumalbumin M_r 66000
- Phosphorylase b M_r 97400
- β -Galactosidase M_r 116000
- Myosin M_r 205000

Nach Befüllen der Puffertanks mit Laemmli-Puffer und Verbinden des oberen Puffertanks mit der Kathode und des unteren Puffertanks mit der Anode startete die Elektrophorese mit einem Strom von 15 mA/Gel. Nach 15 min wurde der Strom auf 25 mA/Gel erhöht. Nachdem die Bromphenolblau-Front den unteren Gelrand verlassen hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen und das Trenngel wie unter Punkt 6.4 beschrieben mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt.

6.3 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde nach den Methoden von O'Farrel, 1975 und O'Farrel, 1977 durchgeführt. In der ersten Dimension wurden die Proteine in einem pH-Gradienten nach ihrer Ladung und in der zweiten Dimension unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Als Elektrophoresekammer diente Phero-vert-180 für zwei Gele à 180 × 170 mm mit 2-D-Riegeln zur Aufnahme von jeweils 7 Glasröhrchen (150 mm lang, Innendurchmesser 4 mm, Außendurchmesser 6 mm) von der Firma Biotec Fischer (Reiskirchen).

6.3.1 Die erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung; IEF)

Die Elektrophorese erfolgte in der ersten Dimension in Polyacrylamid-Rundgelen. Diese wurden in 2D-Riegel gesteckt und so an der Kammer fixiert, dass die Proteine im elektrischen Feld von der Kathode (mit basischem Puffer) zur Anode (mit saurem Puffer) wandern konnten. Durch Zugabe von Ampholinen zu den Gelen bildete sich während der Elektrophorese ein stabiler pH-Gradient, wodurch sich die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt auftrennten.

Gellösungen

Lysis Puffer A:	9,5 M Harnstoff
	25 mM DTT
	2 % (w/v) Nonidet P-40
	0,8 % Ampholine pH 4-6

0,8 % Ampholine pH 5-7
0,4 % Ampholine pH 3,5-10

Lysis Puffer K:

6 M Harnstoff
5 % (w/v) Nonidet P-40
0,4 % Ampholine pH 4-6
0,4 % Ampholine pH 5-7
0,2 % Ampholine pH 3,5-10

2D-Acrylamid (30 % w/v) (28,38:1,62):

28,38 g Acrylamid
1,62 g Bisacrylamid
H₂O ad 100 ml

O-Puffer:

60 mM Tris/Cl pH 6,8
20 mM Dithiotreitol (DTT)
2 % SDS
10 % (w/v) Glycerin

Anoden-Elektrophoresepuffer:

10 mM H₃PO₄

Kathoden-Elektrophoresepuffer:

20 mM NaOH

Nonidet P-40 10 % (w/v) in dest. H₂O (Nonylphenyl-polyethylenglykol)

APS 10 % (w/w) in dest. H₂O (Ammoniumpersulfat)

TEMED 99 % p.A. (N,N,N',N',-Tetramethylenethyldiamin)

6.3.1.1 Präparation der Rundgele

Die Glasröhrchen wurden vor Gebrauch mit Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Ein Ende ist mit Parafilm abgedichtet worden.

Zusammensetzung des Fokussiergels: (für 10-12 Gele)

- 5,7 g Harnstoff
- 1,33 ml 2D-Acrylamidlösung (30 %)
- 2 ml Nonidet P-40 10 %
- 2 ml H₂O
- 0,2 ml Ampholine pH 4-6
- 0,2 ml Ampholine pH 5-7
- 0,1 ml Ampholine pH 3,5-10

- 10 μ l APS 10 %
- 7 μ l TEMED

Der Harnstoff wurde zusammen mit der Acrylamidlösung, dem Nonidet P-40 und dem Wasser auf ca. 40°C erwärmt, bis der Harnstoff vollständig in Lösung gegangen war. Die hitzeempfindlichen Ampholine wurden zusammen mit APS und TEMED nach Abkühlen der Lösung hinzu gegeben. Mit einer Pasteurpipette konnte das Fokussiergel bis 1 cm unter den Rand gefüllt, mit H₂O überschichtet und im Dunkeln zum Polymerisieren aufbewahrt (mind. 5 h) werden. Die Gele waren bis zu acht Tage haltbar.

6.3.1.2 Auftragen der Proben und Elektrophorese

Nach Entfernen des Parafilms sowie gründlichem Abspülen der Geloberfläche mit dest. H₂O wurde mit einer Spritze das Gel etwas aus dem Glasrohr rausgedrückt, bis oben ca. 1,5 cm Platz frei war. Das unten überstehende Gel wurde mit einem Spatel abgetrennt. Die Gele sind dann in den 2D-Riegel eingeschoben und am unteren Ende mit Mull abgedichtet worden. Die so behandelten Gele konnten dadurch nicht aus dem Glasrohr herausrutschen, waren aber trotzdem in Kontakt mit der Pufferlösung. Nach Einspannen des 2D-Riegels in die Elektrophoresekammer wurde die Probe luftblasenfrei auf das Rundgel gefüllt. Diese setzte sich folgendermaßen zusammen:

x μ l Intermediärfilament-Probe
 x μ l Lysis A Puffer
 1 μ l Aktin aus Kaninchenmuskel (\triangleq 3 μ g Aktin)
2 μ l Rinderserumalbumin = BSA (\triangleq 3 μ g BSA)
 insgesamt 80 μ l Probe

Das Aktin aus Kaninchenmuskel und das Rinderserumalbumin dienten hierbei als Marker mit folgenden Eigenschaften:

	M_r	pI
Aktin aus Kaninchenmuskel	42000	5,4
Rinderserumalbumin (BSA)	66000	6,1

Die Probe wurde mit 2-3 Kristallen Harnstoff versetzt und mit 20 μ l Lysis K Puffer überschichtet. Zuletzt wurde das Rundgelröhrchen bis zum oberen Rand mit Kathoden-Elektrophoresepuffer gefüllt.

Nach Füllen der oberen Kammer mit Kathoden-Elektrophoresepuffer und der unteren Kammer mit Anoden-Elektrophoresepuffer, wurde die Elektrophorese mit einer Anfangs-

spannung von 200 V durchgeführt. Nach 30 min ist die Spannung für 30 min auf 300 V erhöht worden. Die Fokussierung erfolgte bei 400 V für weitere 16-18 h.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einer Spritze in eine Petrischale vorsichtig herausgedrückt, das saure bzw. basische Ende auf der Schale markiert und mit O-Puffer 20 min äquilibriert. Direkt im Anschluss erfolgte die Auftrennung in der zweiten Dimension oder die Rundgele wurden für eine spätere Verwendung bei -20°C eingefroren.

6.3.2 Auftrennung in der zweiten Dimension durch SDS-PAGE

Die verwendeten Glasplatten hatten ein Format von 170 mm × 180 mm, davon eine „Ohrenplatte“ mit einer Einbuchtung von 2,5 cm. Der untere Rand dieser Einbuchtung hatte einen schrägen nach innen zum Gel zeigenden Schliff, auf den das Rundgel aufgelegt wurde. Die Dicke der Abstandhalter („Spacer“) betrug 1 mm. Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele entsprach der in Punkt 6.2 Beschriebenen. Ebenso wurden die Glasplatten mit dazwischen gesetzten Abstandhaltern analog zur 1D-PAGE mit Klebeband und Agarose abgedichtet. Dann wurde das Trenngel bis 1,5 cm unter den geschliffenen Rand der Ohrenplatte gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Ethanol mit dest. H₂O gründlich weggespült und das Sammelgel bis zur Schliffkante der „Ohrenplatte“ gegossen. Die so hergestellten Gele konnten in feuchtem Papier eingewickelt in einer Plastikbox bei 4°C für zwei Wochen gelagert werden.

Unmittelbar vor der Elektrophorese wurde das Klebeband entfernt, das Gel mit dest. H₂O gespült und in die Elektrophoresekammer eingespannt. Auf die Schliffkante wurde das äquilibrierte Rundgel (mit dem basischen Ende auf der linken Seite) gelegt und mit aufgekochter 1%iger Agarose in O-Puffer befestigt. Ferner enthielt der O-Puffer Bromphenolblau als Farbmarder. Als Elektrophoresepuffer wurde Laemmli-Puffer verwendet. Nach einem anfänglichen Strom von 25 mA je Gel wurde nach 45 min auf 40 mA je Gel erhöht.

Nachdem die Bromphenolblau-Front am unteren Ende des Gels in den Puffer gelaufen war, wurde die Elektrophorese abgebrochen. Die Gele wurden entweder mit Coomassie Brilliant Blue R250 wie in Punkt 6.4 beschrieben angefärbt oder für einen Proteintransfer auf Nitrocellulose weiterverwendet.

6.4 Färben der Proteine im Gel

Färbelösung:

- 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva, Heidelberg)
- 7,5 % Essigsäure
- 40 % Ethanol

Entfärbelösung: 20 % Isopropanol
7,5 % Essigsäure

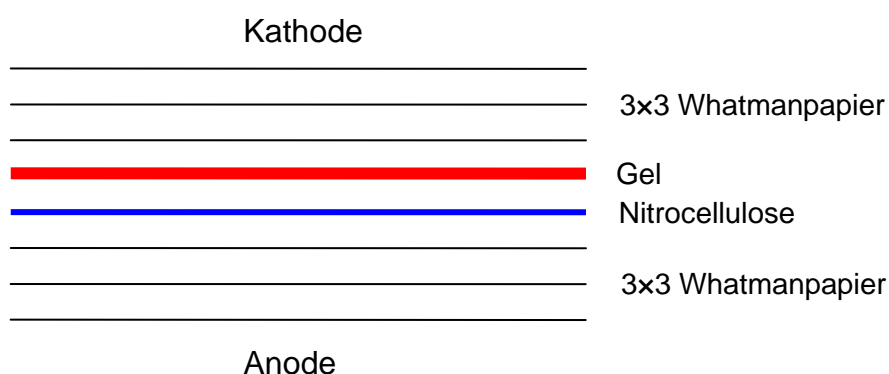
Die Gele wurden in einer Färbelösung über Nacht auf einem Wipptisch gesättigt. Zur Entfernung des Hintergrundes wurde das Gel solange in Entfärbelösung gelegt, bis die gefärbten Proteine gut sichtbar waren. Häufiges Wechseln der Lösung beschleunigte diesen Prozess. Dann wurden die Gele zur weiteren Differenzierung in 7,5%iger Essigsäure eingelegt und anschließend in Plastikfolie luftdicht eingeschweißt.

6.5 Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen

Lösungen

Transferpuffer (pH 8,8): 25 mM Borsäure
2 mM EDTA

Bei diesem Verfahren werden die Proteine elektrisch von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Hierzu wurde die Nassblotkammer PHERO-Blott von Biotec Fischer und Nitrocellulose der Firma Schleicher & Schuell mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Die Trenngele aus der 2D-PAGE wurden in Transferpuffer für 20 min äquilibriert. Die Gele und die Nitrocellulose-Membran waren wie in folgendem Schema in der Nassblotkammer positioniert. Alle Komponenten wurden mit Transferpuffer hydratisiert:



Der Transfer erfolgte über Nacht und wurde mit einer Stromstärke von 100 mA gestartet. Durch zweimalige Erhöhung der Stromstärke um jeweils 100 mA in Intervallen von 15 min wurde ein Endwert von 300 mA erreicht.

6.6 Reversible Färbung der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen 10 min lang in 0,2%iger Ponceau S-Lösung (Sigma, Deisenhofen) angefärbt. Der Hintergrund wurde durch Waschen in H₂O entfernt. Die Membranen wurden zwischen Whatman R 3MM Papier getrocknet und auf einen minimalen Rand zugeschnitten. Diese wurden dann auf eine Leuchtplatte der Firma Roth gelegt, so dass die Proteinmuster und Membranbegrenzungen auf transparente Folie gezeichnet werden konnten, um spätere Antikörperreaktionen eindeutig den Proteinspots zuordnen zu können. Die Membranen konnten zwischen Whatman R 3MM Papieren aufbewahrt oder direkt weiterverwendet werden.

6.7 Biotinylierung von Proteinen

Lösungen

BNHS:	1 mg/ml Biotinyl-N-hydroxysuccinimid in Dimethylformamid
TBS:	20 mM Tris/Cl pH 7,6 137 mM NaCl

Das zu biotinylierende Protein wurde mit TBS auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml verdünnt. Nach Zugabe von 50 µl BNHS-Lösung je ml Proteinlösung und anschließendem Mischen wurde 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte über Nacht bei 4°C eine Dialyse (Dialyseschlauch Visking der Firma Roth Karlsruhe) gegen TBS. Der Dialyseschlauch wurde zuvor 5 min ausgekocht. Das so markierte Protein wurde direkt weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

6.8 Modifizierter Komplementärer-Keratin-Blot-Bindungstest (CKBB-Test)

Im CKBB-Test können Typ I von Typ II Keratinen unterschieden werden. Hierbei nutzt man die Eigenschaft aus, dass Keratine des einen Typs jeweils Heterodimere mit dem anderen Typ bilden (Hatzfeld et al., 1987). Der in dieser Arbeit verwendete Test wurde in Anlehnung an den CKBB-Test durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode sollten TK α und TK γ identifiziert werden.

Zur Identifizierung von TK α wurden die Blots mit biotinyliertem, rekombinanten TK γ inkubiert. Zur Identifizierung von TK γ erfolgte die Inkubation mit biotinyliertem, rekombinanten TK α . Über die Kopplung an einen sekundären Antikörper (Streptavidin-Alkalische Phosphatase)

konnten abschließend die Keratine mit einer Farbreaktion der alkalischen Phosphatase sichtbar gemacht und so den Proteinflecken zugeordnet werden.

Lösungen

Bindungspuffer: 3 M Harnstoff
10 mM Tris/Cl
3 % BSA
0,1 % Tween 20
pH 8,0

Hochsalzextraktionspuffer: 1,5 M NaCl
10 mM Tris/Cl
30 mM KCl
0,5 % Triton X-100
0,1 % Tween 20
pH 8,0

TBST („Tris buffered saline and Tween“): 10 mM Tris/Cl
140 mM NaCl
0,1 % Tween 20
pH 8,0

6.8.1 Inkubation der Membranen mit biotinylierten Schleimkeratinen

Die Blots aus Punkt 6.6 wurden zur Renaturierung der Proteine und Blockierung der Membranoberfläche in TBST für 4 h bei Raumtemperatur geschüttelt. 20-30 µg biotinyliertes Protein wurde in 2-3 ml Bindungspuffer gelöst und mit der Nitrocellulose-Membran in Folie luftdicht eingeschweißt. Getestet wurden Bindungspuffer mit Harnstoffkonzentrationen von 0-7 M. Auf einem Drehbrett (Eigenbau der Feinmechanischen Werkstatt, Universität Mainz) fixiert erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C. Nichtgebundenes biotinyliertes Protein konnte durch 5-faches Waschen (je 15 min) mit Hochsalzextraktionspuffer bei Raumtemperatur entfernt werden. Da nach diesen Waschschrinen keine Reaktionen erzielt wurden, ist der Hochsalzextraktionspuffer alternativ durch TBST ersetzt worden.

6.8.2 Biotin/Streptavidin-Nachweis der Proteine

Zuerst erfolgte eine Blockierung für 1 h. Als Blockierungslösung wurde TBST, 10% Milchpulver in TBST oder 5 % Milchpulver in TBST getestet. Streptavidin-Alkalische

Phosphatase (Promega, Mannheim) wurde 1:5000 in einer Lösung von 5 % Milchpulver in TBST verdünnt, womit die Inkubation der Membranen für 1 h erfolgte. Nichtgebundene Streptavidin-Alkalische Phosphatase ist im Anschluss durch vier Waschschriffe (je 15 min) mit TBST entfernt worden. Die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase wurde wie in Punkt 6.12 beschrieben durchgeführt.

6.9 Herstellung der Antiseren Anti-TK α und Anti-TK γ

Für die Herstellung der Antiseren wurden jeweils einem Kaninchen in einem Zeitraum von ca. zwei Monaten vier Injektionen des rekombinant hergestellten TK α bzw. TK γ verabreicht. Zwei Wochen nach der vierten Injektion wurden die Tiere entblutet. Das detaillierte Immunisierungsprotokoll befindet sich im Anhang unter Punkt 3. Zur Überprüfung des Erfolges wurden nach der zweiten und der dritten Injektion Serumproben entnommen und mittels Immunblotanalysen auf ihre Spezifität hin überprüft. Entsprechend wurde nach Ausbluten der Tiere das Endserum getestet (siehe Unnold, 2008). Die Immunisierung der Kaninchen wurde von der Firma Charles River-Laboratories (Kisslegg) durchgeführt.

6.10 „Peptide Mass Mapping“ mit MALDI-Massen-Spektrometrie

Die rekombinanten Schleimkeratine wurden jeweils durch eine 2D-PAGE aufgetrennt und anschließend tryptisch verdaut und eluiert. Daraufhin wurden die Molekülmassen durch eine Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Massen-Spektrometrie (MALDI-MS) bestimmt. Die Spektren wurden anschließend ausgewertet und die entsprechenden Werte mit denen aus einem theoretischem Verdau verglichen. Auf diese Weise konnte eine abgeleitete Aminosäuresequenz eindeutig dem Protein aus dem 2D-Gel zugeordnet werden. Die massenspektrometrische Untersuchung wurde von der Firma ProteoSys (Mainz) durchgeführt.

6.11 Immunblot

Die auf der Nitrocellulose-Membran immobilisierten Proteine konnten mit spezifischen Antikörpern/-seren mittels Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase detektiert werden.

Lösungen

TBST („Tris buffered saline and Tween“): 10 mM Tris/Cl pH 8,0
140 mM NaCl
0,1 % Tween 20

Blockierungspuffer: 10 % Ziegenserum - Donor Herd oder

5-10 % Milchpulver in TBST

6.11.1 Inkubation der Membranen mit primärem Antikörper

Die Blots aus Punkt 6.6 wurden zur Renaturierung der Proteine und Blockierung der Membranoberfläche in Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Je nach Spezifität der Antikörper wurde 10 % Ziegen Serum, TBST oder 5-10 % Milchpulver in TBST verwendet. Als primäre Antikörper wurden die Anti-TK Antiseren 1: 5000-15000 verdünnt in TBST verwendet. Der monoklonale Anti-Keratin Antikörper PAN1-8 wurde in einer Konzentration von 1:40 in TBST verwendet. Die Membranen wurden mit entsprechenden Antiseren/-körpern in Folie luftdicht eingeschweißt und auf Drehplatten (Eigenbau der Feinmechanischen Werkstatt, Universität Mainz) fixiert. Die Blots inkubierten mit 3 ml Antikörperlösung bei 8°C über Nacht. Abschließend wurden durch viermaliges Waschen mit TBST (je 5 min) nichtgebundene Antikörper entfernt.

6.11.2 Inkubation der Membranen mit sekundärem Antikörper

Hierzu wurden mit Alkalischer Phosphatase gekoppelte Ziege-Anti-Kaninchen (IgG) und Ziege-Anti-Maus (IgG + IgM) -Antikörper verwendet (Dianova, Hamburg). Die Verdünnung der sekundären Antikörper betrug 1:7500 in TBST. Zur Inkubation wurden die Blots in 15 ml Antikörperlösung 1 h leicht geschüttelt. Anschließend sind durch viermaliges Waschen (je 5 min) mit TBST nichtgebundene Antikörper entfernt worden. Die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase erfolgte wie in Punkt 6.12 beschrieben.

6.12 Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase setzt das Substrat NBT zu einem mit bloßem Auge sichtbaren blau-violetten Farbstoff um. BCIP dient bei dieser Farbreaktion als Katalysator. Die so sichtbar gemachten Antikörper konnten dann den Proteinspots zugeordnet werden. Die auf Transparentfolie übertragenen Proteinmuster aus Punkt 6.13 dienten hierbei als Vergleich.

Lösungen**AP-Puffer :**

100 mM Tris/Cl pH 9,5

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂**Substrat NBT:**

50 mg/ml NBT in 70 % Dimethylformamid

(„p-Nitrobluetetrazoliumchlorid“)

Substrat BCIP: 50 mg/ml BCIP in 100 % Dimethylformamid
(„5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat-p-Toluidinsalz“)

Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Substratlösung (5 ml je Blot) bestehend aus 3,3 µl BCIP und 6,6 µl NBT pro ml AP-Puffer angesetzt. Die Nitrocellulose-Membranen wurden kurz in AP-Puffer äquilibriert, auf Whatman R 3MM Papier angetrocknet und auf einem Petrischalendeckel positioniert. Nach Zugabe der Substratlösung auf den Blot konnte die Farbreaktion je nach Intensität der Färbung nach 1-90 min beendet werden. Dafür wurden die Membran in destilliertes Wasser gelegt. Die so behandelten Blots konnten nach Trocknung zwischen Whatman R 3MM Papier lichtgeschützt aufbewahrt werden.

6.13 Dokumentation der Ergebnisse

Die Dokumentation der Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbten Gele, Membranen des CKBB-Tests und Immunblots erfolgte mit einem Flachbett-Scanner bzw. einer Digitalkamera. Die Membranen wurden dann auf eine Leuchtplatte der Firma Roth gelegt, so dass die Farbreaktionen auf transparente Folie gezeichnet und mit dem Proteinmuster verglichen werden konnten.

7 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Lösungen

PBS („Phosphate Buffered Saline“): 140 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄ × 2H₂O
1,5 mM KH₂PO₄

Petrolether

7.1 Anfertigung und Fixierung von Gefrierschnitten

Mit einem Gefriermikrotom (HM 500OM, Fa. Microm, Walldorf) wurden aus den in Isopentan eingefrorenen Tieren 5 µm (Querschnitte) bzw. 10 µm (Längsschnitte) dicke Schnitte angefertigt. Hierbei ist die Boxtemperatur des Mikrotoms und die Objekttemperatur auf -25°C eingestellt worden. Gefrorene Gewebestücke wurden auf einem Schneideblock zusammen mit einer Cryo-Einbett-Lösung festgefroren. Die Schnitte wurden im Folgenden auf Objekt-

träger überführt, welche zuvor zur Reinigung für 5 min in Petrolether eingelegt wurden. Die beladenen Objektträger wurden über Nacht vor Staub geschützt an der Luft getrocknet. Danach wurden die Gefrierschnitte 10 min in Aceton (-20°C) fixiert und erneut luftgetrocknet.

7.2 Inkubation der Gefrierschnitte mit primärem Antikörper

Verwendet wurden Anti-TK Antiseren in einer Konzentration von 1:1000-5000. Der monoklonale Anti-Keratin Antikörper PAN1-8 wurde in PBS verdünnt (1:4) verwendet. Zur Inkubation wurden 25 µl Antikörperlösung auf jeden Gefrierschnitt pipettiert und gleichmäßig verteilt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer und wurde nach 1 h abgebrochen. Durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit PBS konnten nichtgebundene Antikörper entfernt werden.

7.3 Inkubation der Gefrierschnitte mit sekundärem Antikörper

Hierzu wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 bzw. Cy2 -gekoppelte Ziege-Anti-Kaninchen (IgG) und Ziege-Anti-Maus (IgG + IgM) -Antikörper verwendet (Dianova, Hamburg). Die Verdünnung der sekundären Antikörper betrug 1:200 in PBS. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer und wurde nach 1 h abgebrochen. Nichtgebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit PBS entfernt. Durch einminütiges Waschen mit dest. H₂O ließen sich die Salze des PBS-Puffers entfernen. Danach wurden die Schnitte zur Dehydratisierung 5 min in 100 % Ethanol eingelegt und anschließend an der Luft getrocknet. Als Einbettmedium fand Elvanol Verwendung, was sich über Nacht verfestigte (Zur Herstellung des Elvanols wurde 1 g Polyvinylalkohol (M_r 6000) unter Erwärmen in 8 ml PBS gelöst und mit 4 ml Glycerin gemischt. Im Anschluss wurde der Ansatz autoklaviert und bei -20°C gelagert). Die fertigen Gefrierschnitte wurden in einer Mappe lichtgeschützt aufbewahrt.

7.4 Mikroskopieren und Fotografieren der Gefrierschnitte

Hierzu wurde das Epifluoreszenzmikroskop Leitz DM/RBD (Leica, Wetzlar) verwendet. Die Quecksilberhochdrucklampe HB050 vom Typ L1 diente als UV-Lichtquelle. Mikroskopiert und fotografiert wurde mit den Objektiven PL Fluotar 25x / 0,75 (Ölimmersion) und 40x / 1,0 (Ölimmersion). Die Bilder konnten mit der Digitalkamera Leica DC 500 und dem Computerprogramm Leica IM 500, Version 1.20 erstellt werden. Die Fluoreszenzreaktionen wurden so dokumentiert, dass sie möglichst dem durch das Mikroskop gesehenen Bild entsprachen. So konnte der Vergleich der Immunfluoreszenzreaktionen verschiedener Antikörper bzw. Gewebe sowohl qualitativ als auch quantitativ gewährleistet werden.

8 *In situ*-Hybridisierung

Für den Nachweis der für TK α bzw. TK γ -kodierenden mRNAs wurde die Methode der Whole Mount *in situ*-Hybridisierung gewählt. Hierbei werden komplette Larven mit markierten Sonden inkubiert, welche spezifisch an die gewünschte mRNA binden. In einer abschließenden Farbreaktion kann das entsprechende Reaktionsmuster sichtbar gemacht werden.

Lösungen

1 x PBS:	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,5 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBT:	1 x PBS 0,1 % Tween 20 (v/v)
PPE:	1 x PBS 4 % Paraformaldehyd 0,05 M EGTA (pH 8,0)
MAB:	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5
4 x Waschpuffer:	4 x SSC 50 % Formamid 0,1 % Tween20
2 x Waschpuffer:	2 x SSC 50 % Formamid 0,1 % Tween20
1 x Waschpuffer:	1 x SSC 50 % Formamid 0,1 % Tween20

Hybridisierungsmix:	50 % Formamid 5 x SSC 5 mM EDTA 1 x Denhardt's Lösung 100 µg Heparin 100 µg tRNA 0,1 % Tween20
Blockierungslösung:	2 % Blockingreagenz in Maleinsäurepuffer
AP-Puffer:	100 mM Tris/Cl pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
Substrat NBT:	50 mg/ml NBT (= p-Nitrobluetetrazoliumchlorid) in 70 % Dimethylformamid
Substrat BCIP:	50mg/ml BCIP in 100 % Dimethylformamid
Färbelösung:	5 µl NBT / ml AP-Puffer 3,75 µl BCIP / ml AP-Puffer

8.1 Behandlung der Larven / Fixierung

Die Larven wurden in 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS über Nacht bei 4°C leicht geschwenkt. Anschließend wurden sie bei RT in 3 % H₂O₂ / 0,5 % KOH so lange gebleicht, bis die Pigmentierung vollständig verschwunden war (ca. 30-60 min). Anschließend wurden die Tiere 5 min in PBS gewaschen. Um die Larven zu dehydratisieren, wurden sie für jeweils 5 min in folgenden Lösungen gewaschen: 25 % (v/v), 50 % (v/v), 75 % (v/v) Methanol in PBS und 100 % (v/v) Methanol. Die so behandelten Tiere wurden entweder direkt weiterverarbeitet, oder bei -20°C aufbewahrt.

8.2 Hybridisierung und Farbreaktion

Die Larven wurden rehydratisiert, indem sie für jeweils 5 min in folgenden Lösungen gewaschen wurden: 75 % (v/v), 50 % (v/v), 25 % (v/v) Methanol in PBS. Im Anschluss wurden die Larven viermal für 5 min in PBT gewaschen, um überschüssiges Methanol zu entfernen. Durch Inkubation (30 min) mit Proteinase K (10 µg/ml) in PBT wurden die Larven

permeabilisiert. Mit einem Waschriff (20 min) in 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS konnte der Proteinase K-Verdau gestoppt werden. Um überschüssiges Paraformaldehyd zu entfernen, folgten vier Waschriffe in PBT à 5 min. Danach sind die Larven für 5 h in Hybridisierungspuffer bei 48°C inkubiert worden. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte dann nach Zugabe der Sonde (diese wurde unmittelbar vor Gebrauch bei 65°C für 10 min denaturiert) über Nacht bei 42°C.

Am nächsten Tag wurden die Larven in folgenden Lösungen gewaschen:

- 3 mal in 4 x Waschpuffer bei 50°C à 10 min
- 2 mal in 2 x Waschpuffer bei 50°C à 15 min
- 2 mal in 1 x Waschpuffer bei 50°C à 15 min
- 3 mal in 1xSSC/0,1 % Tween bei RT à 20 min
- 2 mal in MAB bei RT à 10 min
- 1 mal in 2 % *blocking reagent* in MAB bei RT à 10 min

Nach dieser Behandlung wurden die Larven 2-3 h in 2 % *blocking reagent* in MAB bei RT inkubiert. Anschließend wurden pro ml Blockierlösung 0,5 µl Sekundär-Antikörper (Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase) der Firma Roche (Mannheim) zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach folgten fünf Waschriffe in MAB + 0,1 % Tween à 15 min, sowie zwei Waschriffe in AP-Puffer à 10 min. Währenddessen wurde die Enzymlösung für die Farbreaktion frisch angesetzt. Hierzu wurde pro ml AP-Puffer 5 µl NBT sowie 3,75 µl BCIP zugegeben. Die Farbreaktion erfolgte bei 4°C und konnte durch dreifaches Waschen in MAB à 5 min und zweifaches Waschen in PBT à 5 min abgebrochen werden. Abschließend konnten die gefärbten Larven in 70 % Glycerin aufbewahrt werden.

9 *In vitro*-Assemblierung von Intermediärfilamenten

Lösungen

8 M Harnstoff:

8 M Harnstoff
10 mM Tris/Cl
1 mM DTT
pH 8,5

5 M Harnstoff:	5 M Harnstoff 10 mM Tris/Cl 1 mM DTT pH 8,5
2,5 M Harnstoff:	2,5 M Harnstoff 10 mM Tris/Cl 1 mM DTT pH 8,5
0 M Harnstoff:	10 mM Tris/Cl 1 mM DTT pH 8,5

Für die Assemblierung wurden rekombinantes TK α und TK γ in äquimolaren Mengen in einer Gesamtkonzentration von 0,5 mg/ml vermischt und anschließend dialysiert. Hierbei wurden nacheinander vier Dialysen angesetzt (8 M-, 5 M-, 2,5 M-, 0 M-Dialysepuffer), um den Harnstoff sukzessive aus dem Puffer zu entfernen. Dazu wurden jeweils 50-100 μ l der Proteinlösungen in Dialysecaps (Pierce, Rockford) hineingegeben und für 30-60 min gegen 500 ml Dialysepuffer dialysiert. Nach einer abschließenden Dialyse gegen Assemblierungspuffer (die unterschiedlichen Puffer sind in Tabelle 2 aufgeführt) konnten die Proben direkt für die Transmissionselektronenmikroskopie weiterverwendet werden (siehe Punkt 10).

10 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Mit Hilfe der Transmissionen-Elektronenmikroskopie (TEM) können kleine, durchstrahlbare Objekte im Mikrometer- bis Nanometerbereich mit Elektronen durchstrahlt werden und vergrößert dargestellt werden.

Hierbei werden die Elektronen mittels einer Spannung beschleunigt und durch elektromagnetische Linsen fokussiert, bevor diese auf die Probe treffen. Die Probe lenkt die Elektronen von ihrem Weg ab, wobei Objekte hoher Dichte die Elektronen stark und Objekte mit geringer Dichte die Elektronen nur schwach ablenken. Die nicht abgelenkten Elektronen werden von einem Leuchtschirm detektiert, wodurch ein Bild entsteht, bei dem Bereiche mit niedriger Dichte hell und Bereiche mit hoher Dichte dunkel erscheinen. Der so entstehende Kontrast ermöglicht es, die Strukturen der Probe bildlich darzustellen.

Durchführung:

Als Trägerfilme fanden Kupfernetzchen mit 300-400 Maschen Verwendung, welche zuvor mit einem Kohlenstofffilm beschichtet wurden. Zur Beschichtung wurden die Netzchen in einer Aufdampfanlage einer Hitzeentladung ausgesetzt, wodurch die Kohlenstoffoberfläche adsorptionsfähiger für die Proteine wird. Auf diese Weise lässt sich gewährleisten, dass sich Objekt und Kontrastierungsmittel gleichmäßig auf der Kohlenoberfläche verteilen.

Für die Herstellung der Präparate wurde die *Single-droplet*-Methode für das „*Negative-Staining*“-Verfahren angewandt (Harris & Horne, 1991). Hierzu wurden auf Parafilm folgende Tropfen gegeben:

- 1 Tropfen Proteinlösung (0,5 mg/ml)
- 3 mal jeweils 1 Tropfen H₂O_d
- 1 Tropfen 2 % Uranylacetat (Kontrastierungsmittel)

Mit einer Pinzette wurden dann die Netzchen nacheinander in der oben aufgeführten Reihenfolge durch die Lösungen gezogen. Zwischen jedem Tropfen wurde das Netzchen vorsichtig mit Hilfe eines Filterpapiers trockengesaugt. Abschließend wurden die Netzchen auf einem Filterpapier getrocknet und bis zur weiteren Verwendung in einer Petrischale aufbewahrt.

Die auf diese Weise hergestellten Präparate wurden in einem *FEI Tecnai 12* Transmissions-Elektronenmikroskop analysiert. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit einer CCD-Kamera in digitaler Form.

C Ergebnisse

1 Allgemeine Vorgehensweise

In der vorliegenden Arbeit wurden die Schleimkeratine TK α und TK γ des Zebra**är**blings *Danio rerio* untersucht. Neben Analysen zu den Bindungseigenschaften von TK α und TK γ sollten diese Proteine auch biochemisch identifiziert und charakterisiert werden. Abschließend sollte gezeigt werden, wo die Schleimkeratine im Gewebe exprimiert werden, um erste Hinweise auf mögliche Funktionen von TK α bzw. TK γ zu erhalten.

Für die Untersuchungen wurden große Mengen an rekombinanten Schleimkeratinen benötigt, weshalb der erste Schritt in meiner Arbeit darin bestand, die Schleimkeratine TK α und TK γ des Zebra**är**blings rekombinant herzustellen. Da die cDNA-Sequenzen der Schleimkeratine des Zebra**är**blings bereits veröffentlicht vorlagen (Schaffeld & Schultess, 2006), konnten mit Hilfe von spezifischen Primern für TK α - sowie für TK γ -kodierende cDNA-Klone amplifiziert und jeweils in einen Expressionvektor kloniert werden. Diese Vektoren wurden dann in *E. coli* Bakterienzellen transformiert, so dass nach Induktion der Bakterien die Schleimkeratine TK α und TK γ im Milligrammbereich gewonnen werden konnten. Die auf diese Weise erhaltenen rekombinanten Proteine wurden aufgereinigt und konnten dann für unterschiedliche Untersuchungen verwendet werden.

Da die Schleimkeratine TK α und TK γ im Schleimaal *Eptatretus stoutii* wie bereits bekannt miteinander Filamente formen (Spitzer et al., 1984; 1988), wurden die rekombinanten Schleimkeratine des Zebra**är**blings *Danio rerio* mit Hilfe von *in vitro*-Versuchen auf ihre Assemblierungseigenschaften hin untersucht. Neben der elektronenmikroskopischen Analyse wurden weiterhin potentielle Bindungspartner der Schleimkeratine TK α und TK γ anhand von Overlay-Assays identifiziert. Mit Hilfe dieser Overlay-Assays gelang es, das TK α in zuvor auf Nitrocellulose transferierten Cytoskelettpräparationen aus kompletten Zebra**är**blingen zu identifizieren. Daraufhin wurden mit den rekombinanten Schleimkeratinen TK α - und TK γ -spezifische Antiseren gewonnen, indem Kaninchen gegen die rekombinant hergestellten Schleimkeratine immunisiert wurden. Mit den Schleimkeratin-spezifischen Antiseren konnte daraufhin ein immunologischer Nachweis von TK α und TK γ erbracht werden. Schlussendlich sollte auch gezeigt werden, wo die Schleimkeratine im Zebra**är**bling exprimiert werden. Dazu wurden Larven und adulte Zebra**är**blinge mit den Anti-TK Antiseren immunologisch analysiert. Zusätzlich wurde die Expression der Schleimkeratine in Larven auch auf RNA-Ebene anhand von Whole mount *in situ*-Hybridisierungsreaktionen untersucht.

2 Amplifizierung der für TK α - und TK γ -kodierenden cDNAs

Zu Beginn meiner Arbeit lagen die für TK α - und TK γ -kodierenden cDNA-Sequenzen bereits veröffentlicht vor (Schaffeld und Schultess, 2006) und werden im Folgenden als Ausgangssequenzen bezeichnet. Mit Hilfe der Ausgangssequenzen wurden spezifische Primer hergestellt, die verwendet wurden, um die für die Schleimkeratine TK α - und TK γ -kodierenden Bereiche als cDNA zu erhalten. Die Sequenzen der gewonnenen cDNA-Klone und die dazu verwendeten Primer sind im Anhang unter den Punkten 2 und 4 dargestellt.

2.1 Sequenzanalyse

Um zu überprüfen, ob es sich bei den erhaltenen Sequenzen auch um die gewünschten TK α - bzw. TK γ -kodierenden Zielsequenzen handelt, wurden diese mit den Ausgangssequenzen verglichen und dabei auf Unterschiede hin untersucht (Alignments sind im Anhang unter Punkt 5.1 und 5.2 dargestellt). Hierbei stellte sich heraus, dass sich sowohl die Aminosäuresequenz von TK α als auch von TK γ in einigen Aminosäurepositionen von den bereits veröffentlichten AS-Sequenzen unterscheidet. Da beide Gene im Genom des Zebrafisches nur einfach vertreten sind (Schaffeld & Schultess, 2006), ist davon auszugehen, dass es sich bei den von mir amplifizierten cDNA-Sequenzen um Allele von TK α sowie von TK γ handelt.

2.1.1 Abgeleitete Aminosäuresequenz der für TK α -kodierenden cDNA

Die isolierte cDNA kodiert für eine Polypeptidkette bestehend aus 585 AS. Die theoretisch errechnete Molekülmasse (M) beträgt 59,2 kDa und die Polypeptidkette besitzt einen theoretisch errechneten pI-Wert von 5,6. Die gesamte Aminosäuresequenz ist in Abb. 7 dargestellt. Die Sequenz weist im Vergleich zur bereits veröffentlichten Sequenz vier Aminosäuresubstitutionen auf (siehe Abb 7, rote Platzhalter). Zusätzlich fehlen der Sequenz des rTK α eine Abfolge von vier Aminosäuren (siehe Abb. 7, Pfeilkopf).

Um zu überprüfen, ob es sich bei den fünf Substitutionen sowie der Deletion nicht um Sequenzierungsfehler handelt, wurden die Internetdatenbanken nach identischen Sequenzen durchsucht. Dabei wurden cDNA- und EST-Sequenzen gefunden, die in ihrer Sequenzabfolge entsprechende Unterschiede aufweisen (Alignment im Anhang unter Punkt 5.5 dargestellt). Dies unterstützt die Vermutung, dass es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Sequenz im Vergleich zu den bereits von Schaffeld und Schultess (2006) veröffentlichten Ausgangssequenzen um ein weiteres Allel des für TK α -kodierenden Gens im Zebrafisch *Danio rerio* handelt.



Abb. 7: Aminosäuresequenz des rekombinant hergestelltem TK α (rTK α)

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des rekombinant exprimierten TK α (rTK α) des Zebrafischlings *Danio rerio*. Die N-terminale Head-Domäne sowie die C-terminale Tail-Domäne sind grün unterlegt. Die helikalen Bereiche (Coil1A, Coil1B, Coil2A und Coil2B) sind blau unterlegt. Die Linkerregionen (L1, L12 und L2) sind rot targetsellt. Im Vergleich zur Ausgangssequenz zeigt die erhaltene Sequenz vier Aminosäuresubstitutionen (rote Platzhalter) sowie eine Deletion von vier Aminosäuren (entsprechende Stelle ist mit einem Pfeilkopf markiert).

2.1.2 Abgeleitete Aminosäuresequenz der für TKy-kodierenden cDNA

Die isolierte cDNA kodiert für eine Polypeptidkette bestehend aus 475 AS. Die theoretisch errechnete Molekülmasse (M) beträgt 49,5 kDa und die Polypeptidkette besitzt einen theoretisch errechneten pI-Wert von 4,7. In Abb. 8 ist die gesamte Aminosäuresequenz dargestellt. Im Vergleich zur bereits veröffentlichten Sequenz kommt es an drei Stellen zu Aminosäuresubstitutionen. Zusätzlich weist die Sequenz des rekombinanten rTKy im Vergleich zur Ausgangssequenz eine Deletion von einer Aminosäure auf. Daraufhin wurden in Internetdatenbanken cDNA- und EST-Sequenzen mit entsprechenden Substitutionen bzw. Deletionen gefunden. Somit ist davon auszugehen, dass es sich im Vergleich zu den publizierten Sequenzen bei der in dieser Arbeit verwendeten, für TKy-kodierenden Sequenz um ein weiteres Allel von TKy handelt.

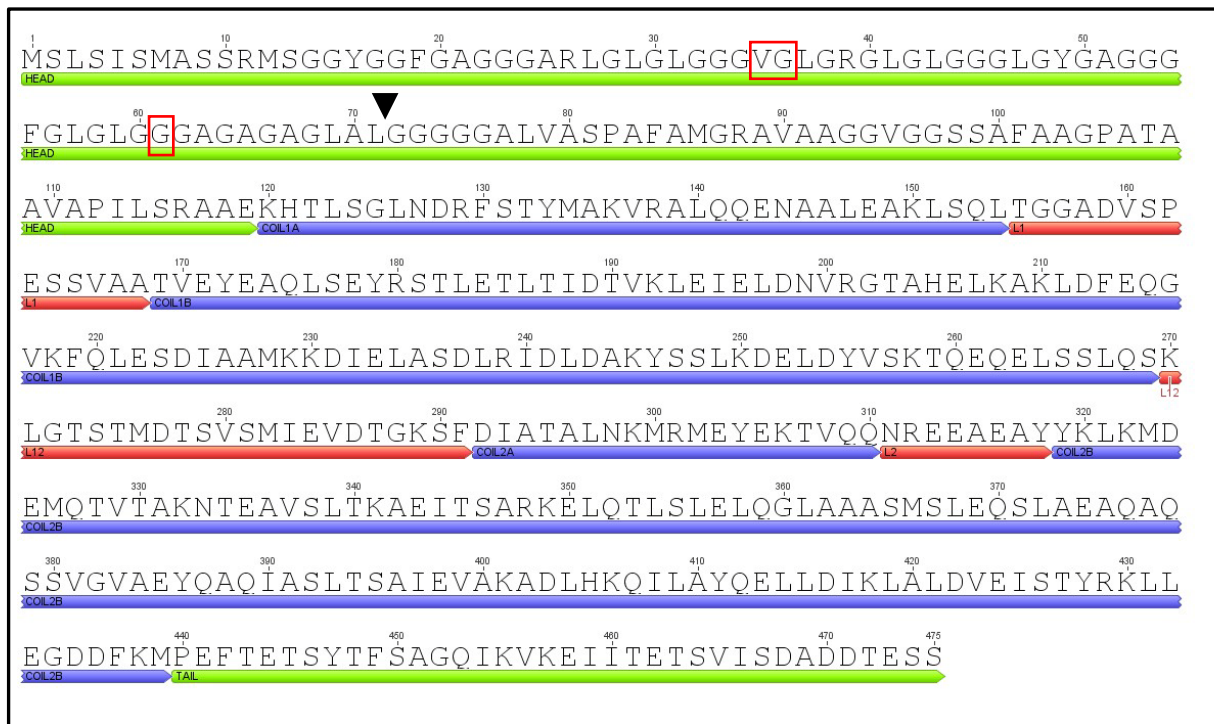


Abb 8: Aminosäuresequenz des rekombinant hergestelltem TK γ (rTK γ)

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des rekombinant exprimierten TK γ (rTK γ) des Zebrafischlings *Danio rerio*. Die N-terminale Head-Domäne sowie die C-terminale Tail-Domäne sind grün unterlegt. Die helikalen Bereiche (Coil1A, Coil1B, Coil2A und Coil2B) sind blau unterlegt. Die Linkerregionen (L1, L12 und L2) sind rot dargetstellt. Die roten Platzhalter markieren die Aminosäuresubstitutionen. Die Position der Deletion ist mit einem Pfeilkopf markiert.

2.1.3 Sequenzvergleich auf genomischer Ebene

Um nachzuprüfen, ob die Substitutionen und Deletionen auch auf genomischer Ebene auftreten, wurden die entsprechenden Sequenzabschnitte der Schleimkeratin-kodierenden cDNA-Sequenzen mit genomischen Sequenzabschnitten verglichen (Alignments im Anhang unter Punkt 5.3 und 5.4 dargestellt). Hierbei stellte sich heraus, dass die für Schleimkeratine kodierenden Gene an den entsprechenden Stellen die Substitutionen bzw. Deletionen aufweisen. Auf diese Weise konnte eine Identität zwischen den von mir klonierten cDNAs und den Schleimkeratin-Genen hergestellt werden.

2.2 Expression und Reinigung der rekombinanten Schleimkeratine rTK α und rTK γ

Für die Expression wurden die TK α - bzw. TK γ -kodierenden cDNAs jeweils in den Expressionsvektor pET-3a kloniert und die entsprechenden Plasmide in *E.coli* Bakterienzellen vom Stamm Top10 transformiert. Anschließend wurde das Integrat sequenziert, um den Erfolg der Klonierung sicherzustellen. Daraufhin wurden die Plasmide in

Expressionsbakterien des Stammes BL21(DE3)pLys transformiert. Der Erfolg wurde mittels Klon-PCR überprüft.

Für die Expression der rekombinanten Proteine wurden von positiven Klonen bis zu 1 L umfassende Flüssigkulturen angesetzt und mit IPTG zur Expression induziert. Parallel diente eine nicht-induzierte Bakterienlösung als Negativkontrolle. Mit einer anschließenden SDS-PAGE wurde die Expression auf ihren Erfolg hin überprüft (siehe Abb. 9). Da sich erfahrungsgemäß rekombinant exprimierte IF-Proteine in sogenannten *inclusion bodies* der Bakterien konzentrieren, wurden diese nach der Bakterienernte isoliert und aufgebrochen.

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurden Ionenaustausch-Chromatographien durchgeführt. Hierbei wurde zuerst ein Anionenaustausch durchgeführt und anschließend ein Kationenaustausch. Der Erfolg der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Nach der Aufreinigung von TK α wurde im SDS-Gel eine Bande bei ca. 59 kDa detektiert, wohingegen nach Aufreinigung des TK γ eine Bande bei ca. 50 kDa identifiziert werden konnte. Der Erfolg der einzelnen Aufreinigungsschritte ist in Abb. 9 am Beispiel von TK γ aufgezeigt.

Mit dem hier angewandten Expressionssystem konnte rekombinantes TK α und TK γ aufgereinigt und im Milligrammbereich gewonnen werden. Anschließend wurden die biochemischen Eigenschaften mittels 2D-PAGE überprüft und zusätzlich die Proteinflecken von rTK α sowie rTK γ massenspektroskopisch analysiert, um eine Zuordnung zu den entsprechenden cDNA-Sequenzen herstellen zu können.

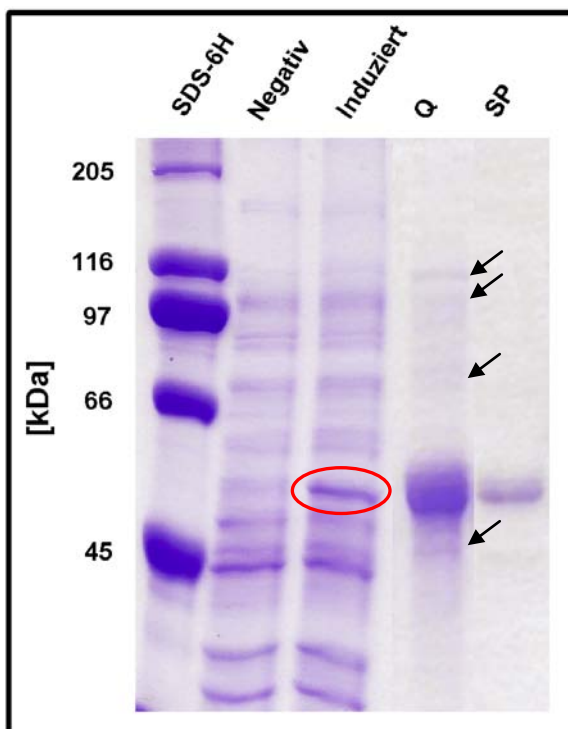


Abb. 9: Rekombinante Expression und Aufreinigung von TK γ

Die Bakterien enthielten den Expressionsvektor pET-3a, in welchen die entsprechende Sequenz inkloniert wurde. Die Bakterien wurden mit IPTG induziert und über Nacht inkubiert. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und das Sediment in Probenpuffer aufgenommen. Nach einer SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassie-Blue angefärbt. Im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrollprobe (Negativ) erkennt man deutlich in der induzierten Probe (Induziert) eine Bande bei 50 kDa (roter Kreis). Nach der Aufreinigung mit einer Q-Sepharose-Säule (Q) sind weiterhin einige bakterielle Proteine (schwarze Pfeile) zu erkennen. Diese konnten in einer abschließenden Säulenaufreinigung mit SP-Sepharose vollständig entfernt werden (SP).

2.3 2D-PAGE der rekombinanten Schleimkeratine TK α und TK γ / MALDI-TOF Massenspektrometrie

Um nachzuprüfen, ob es sich bei den in dieser Arbeit exprimierten und anschließend aufgereinigten Proteinen tatsächlich um die Schleimkeratine TK α bzw. TK γ handelt, wurde das Verfahren der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI; von engl. matrix-assisted laser desorption/ionisation) und die Flugzeitanalyse (TOF; von engl. time of flight) angewandt. Auf diese Weise sollte eine Verknüpfung zwischen den TK-kodierenden cDNA-Sequenzen und den Proteinflecken (2D-PAGE) der aufgereinigten, rekombinanten Proteine hergestellt werden.

Zur Durchführung der Massenspektrometrie wurden die rekombinant exprimierten Proteine mittels 2D-PAGE nach Ladung und Größe aufgetrennt (siehe Abb. 10). Das rTK α besitzt eine Molekülmasse (M) von 59 kDa. Es fällt auf, dass das rTK α in drei unterschiedlichen Ladungsvarianten vorliegt. Die entsprechenden isoelektrischen Punkte (pI) liegen bei pH 6.3, 6.2 und bei 6.0. Das rTK γ hat eine Molekülmasse (M) von 50 kDa und einen isoelektrischen Punkt (pI) bei pH 4.8. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Proteinflecken des rTK α (pI 6.2) sowie des rTK γ verwendet.

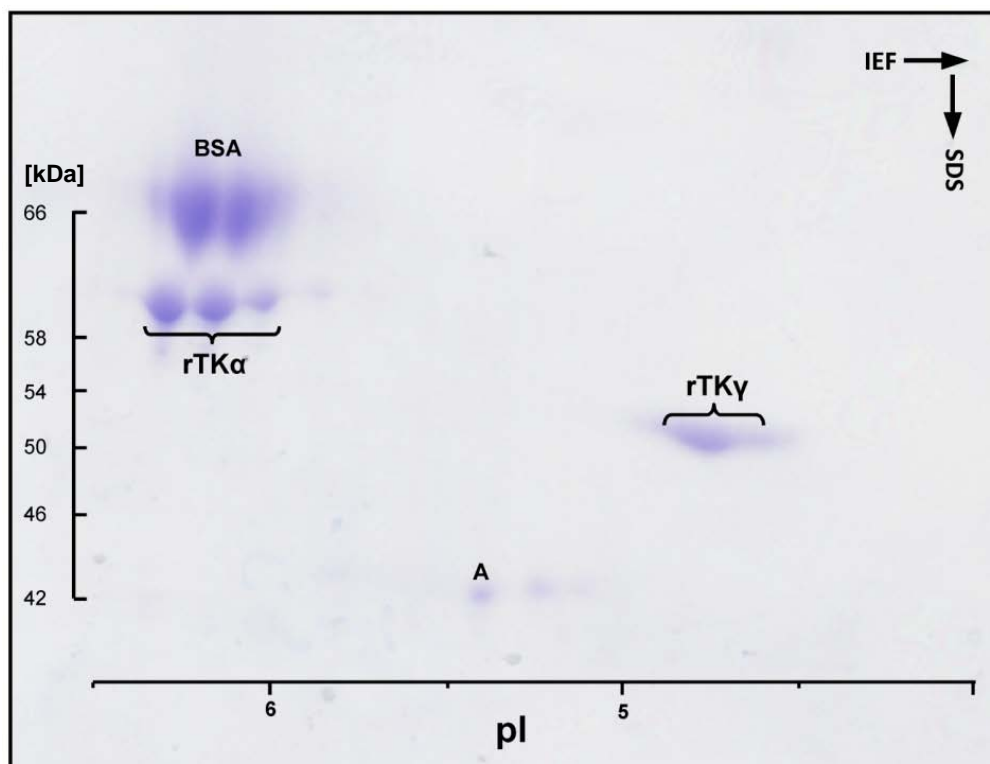


Abb. 10: Zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (2D-PAGE) von rTK α und rTK γ
In der ersten Dimension wurde eine isoelektrische Fokussierung (IEF) und in der zweiten Dimension eine SDS-PAGE durchgeführt; BSA, Rinderserumalbumin; A, Kaninchen α -Aktin. Das rTK α hat eine Molekülmasse von ca. 59 kDa und liegt in drei unterschiedlichen Ladungsvarianten vor (pI 6.3; 6.2 und 6.0). Das rTK γ ist 50 kDa groß und hat einen isoelektrischen Punkt bei pH 4.8.

Mittels massenspektrometrischer Analyse des Proteinflecks von rTK α konnten insgesamt 19 Massenentsprechungen gefunden werden, die 39 % der Gesamtsequenz abdecken. Bei der Analyse des rTK γ wurden insgesamt 25 Massenübereinstimmungen gefunden. Diese decken die Gesamtsequenz zu 62 % ab. Die Übereinstimmungen beider Massenspektrometriemethoden sind in Abbildung 11 dargestellt.

Anhand der hohen Übereinstimmung der Sequenzen aus der massenspektrometrischen Analyse ist davon auszugehen, dass es sich bei den in dieser Arbeit rekombinant exprimierten Proteinen tatsächlich um die gewünschten Schleimkeratine TK α und TK γ des Zebraäbrblings *Danio rerio*, handelt.

rTK α					
1	PGLLDSSSEC	KMTESLRIS	GGAVRFGATY	GGNRLFSGAR	SGGGASSALS
51	RSLGLARGGG	LGLGFGAGAG	AGAGAGAGLG	LGGGSLALGG	GLGLGGGLGL
101	GAGGAR AAGV	RAGVAHLRSH	LGGRVFKIGG	YGFNPSFISS	TTTVDAGVSP
151	MPSIDPSLPS	PDTVQVTRMK	EKEELQALND	KFASFIDKAR	SLEQHNAVLR
201	AK ISMFTNPE	QGGPANTSVL	L TSAIGAYKS	QIDSLSSTKE	AIIAEIEHFK
251	AIIEDDQARY	EEETSQTKSL	ELDWTALKEE	VDNLYLTLFE	LQTSICGLED
301	QIALSK QVYD	AKVKEVRTIV	TGGVK SAVSI	SVDNAAQAQD	LTSALTEVKA
351	HYETLAQRSK	QEALVSVQDS	LSMMSVSSQP	SSQTLTSAKD	ELRAYKLQID
401	SVQREIERLK	SLNLQLESQV	EEAECHSNH	TETYQDQVLT	LKSQQLDLRK
451	QITQYQEQYQ	ELLASKMSLD	VEITAYK LKLL	DSEENRLKSG	GGVTVHMSKT
501	LLGGGAGGAG	GLGAGAGGAG	LGGGAGLGLG	SGFGLGGGLG	GGLGGGLGGG
551	LGGGLGGGLG	LGLGGGLGFG	AGSSFGAGSS	FMSSSLSSSG	LSSTVY
rTK γ					
1	MSGGYGGFGA	GGGARLGLGL	GGVGLGRGL	GLGGGLGYGA	GGGFGLGLGG
51	GAGAGAGLAL	GGGGALVAS	PAFAMGRAVA	AGGVGGSSAF	AAGPATAAVA
101	PILSRAAEKH	TLSGLNDRFS	TYMAKVRALQ	QENAALAKL	SQLTGGADV
151	PESSVAATVE	YEAQLSEYRS	TLETLTIDTV	KLEIELDNVR	GTAHELKAKL
201	DFEQGVKFQL	ESDIAAMKGD	IELASDLRID	LDKYSSLKD	ELDYVSKTQE
251	QELSSLQSKL	GTSTMDTSVS	MIEVDTGKSF	DIATALNKMR	MEYEK TVQQN
301	REEAEAYYKL	KMDEMOTVTA	KNTEAVSLTK	AEITSARKEL	QTLSELELQGL
351	AAASMSLEQS	LAEAQAQSSV	GVAEYQAQIA	SLTSAIEVAK	ADLHK QILAY
401	QELLDIKLAL	DVEISTYRKL	LEGDDFKMPE	FTETSYTFSA	GQIKVKEIIT

Abb. 11: Massenspektrometrische Auswertung

Dargestellt sind die von den cDNAs abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Die roten Bereiche markieren Übereinstimmungen mit den Massen aus der spektrometrischen Analyse. Die erhaltenen Massen aus der Analyse des TK α decken sich zu 39 % mit der aus der cDNA erhaltenen Aminosäuresequenz. Bei der Analyse des TK γ wurde eine Übereinstimmung von 62 % erreicht.

3 Bindungseigenschaften von TK α und TK γ

3.1 *In vitro*-Assemblierungs Experimente

Um die Assemblierungs-Eigenschaften der Schleimkeratine zu untersuchen, wurden äquimolare Mengen von rTK α und rTK γ zusammengegeben und einer Reihe von Dialysen unterzogen, um die Harnstoffkonzentration im Puffer sukzessive zu senken (von 8 M nach 0 M Harnstoff). Abschließend wurde gegen einen Assemblierungspuffer dialysiert. In meinen Untersuchungen wurden unterschiedliche Assemblierungspuffer (siehe Tab. 2) getestet, wie sie üblicherweise für die *in vitro*-Assemblierung von Keratinen Verwendung finden. Des Weiteren wurden auch Typ III IF-Protein- bzw. Typ IV-IF-Protein-Assemblierungspuffer ausgetestet. Dabei ist anzumerken, dass zusätzlich die Konzentrationen im Puffer sowie die pH-Werte variiert wurden. Die so behandelten Proben wurden anschließend mit dem Verfahren des *Negative Stainings* elektronenmikroskopisch untersucht. Entsprechend wurden auch Proben analysiert, die entweder nur rTK α bzw. nur rTK γ enthielten. Als Kontrollprobe wurde rekombinantes, humanes K8 und K18 verwendet und in einem für diese Keratine bereits bekannten idealen Assemblierungspuffer (siehe Tab. 2) inkubiert. Dabei bildeten sich für Keratine typische ca. 10 nm dicke Filamente (siehe Abb. 12; a).

In vitro-Assemblierung von rTK α und rTK γ

Bei Verwendung von Typ I/II-Assemblierungspuffern, die in ihrer Salzkonzentration und ihrem pH-Wert variiert wurden, sind bei allen Proben ca. 12 nm dicke und ca. 40-70 nm lange, elliptisch geformte Strukturen (siehe Abb. 12; c, g) dokumentiert worden, welche in Form und Größe den ULFs (ULF = unit lengt filament) der Typ I-III IF-Proteine ähneln. Diese ULF-artigen Strukturen besaßen die Tendenz, miteinander sowohl lateral als auch longitudinal zu aggregieren (siehe Abb. 12; b-g). Neben diesen an ULFs erinnernde Strukturen wurden in den Proben weiterhin stets globuläre Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 10-20 nm gefunden, welche ebenfalls eine starke Tendenz zur Bildung von Aggregaten zeigten. Lediglich unter einer Inkubationsbedingung (200 mM Tris/HCl; pH 7,0) konnte eine filamentöse Struktur gefunden werden (siehe Abb. 12; b). Sowohl der Durchmesser von 10 nm als auch das äußere Erscheinungsbild glichen dem eines *in vitro*-gebildeten Intermediärfilaments. Allerdings war diese Struktur mit einer Länge von 0,5 μ m viel kürzer als ein typisches Intermediärfilament (zum Vergleich siehe Abb. 12; a), weshalb es als Filamentoid bezeichnet wurde.

Tab. 2: Verwendete Versuchsbedingungen und gebildete Strukturen

Verwendete Proteine	Verwendete Puffer/Zitat	Form und Struktur	Abbildung
hK8/hK18	10 mM Tris/HCl; pH 7,0	Filamente	Abb. 12; a
TK α /TK γ	200 mM Tris/HCl; pH 7,0	globuläre und ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“; Filamentoid	Abb. 12; b
TK α /TK γ	2 mM Tris; pH 7,0; Assemblierungspuffer für Keratine	globuläre und ULF-artige Strukturen; bilden „Knäuel“	-
TK α /TK γ	2 mM Tris; pH 8,5; Assemblierungspuffer für Keratine	Filamentoide; vereinzelt Bildung von „Knäuel“	-
TK α /TK γ	10 mM Tris; pH 7,0; Assemblierungspuffer für Keratine	globuläre und ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“	-
TK α /TK γ	10 mM Tris; pH 8,2; Assemblierungspuffer für Keratine	ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“	-
TK α /TK γ	10 mM Tris; pH 8,4; Assemblierungspuffer für Keratine	globuläre und ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“	-
TK α /TK γ	10 mM Tris; pH 8,5; Assemblierungspuffer für Keratine	globuläre und ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“;	-
TK α /TK γ	10 mM Tris; pH 8,8; Assemblierungspuffer für Keratine	globuläre und ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“	Abb. 12; c
TK α /TK γ	10 mM Tris; pH 9,0; Assemblierungspuffer für Keratine	globuläre und ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“	-
TK α /TK γ	1,6 M NaCl; 200 mM Tris/HCl; pH 7,0 Typ III Assemblierungspuffer	ULF-artige Strukturen; vereinzelt globuläre Strukturen; Bildung von „Knäuel“	Abb. 12; d
TK α /TK γ	2 mM CaCl ₂ ; [nach Gu et al. 2004]	globuläre und ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“	-
TK α /TK γ	6 mM CaCl ₂ ; [nach Gu et al. 2004]	globuläre und ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“	-
TK α /TK γ	10 mM CaCl ₂ ; [nach Gu et al. 2004]	globuläre und ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“; Filamentoid	Abb. 12; e-g
TK α /TK γ	20 mM CaCl ₂ ; [nach Gu et al. 2004]	globuläre und ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“	Abb. 12; h
TK α /TK γ	50 mM CaCl ₂ ; [nach Gu et al. 2004]	globuläre und ULF-artige Strukturen; Bildung von „Knäuel“	-
TK α	1,6 M NaCl; 200 mM Tris/HCl; pH 7,0	Filamentoide	Abb. 12; i
TK α	0 M Harnstoff Dialysepuffer	Filamentoide	-
TK α	1 M Harnstoff Dialysepuffer	Filamentoide	-
TK α	2 M Harnstoff Dialysepuffer	Filamentoide	-
TK α	5 M Harnstoff Dialysepuffer	Aggregate	-
TK γ	1,6 M NaCl; 200 mM Tris/HCl; pH 7,0	Globuläre Strukturen	-

Die Verwendung eines Typ III IF-Protein Assemblierungspuffers führte auch zur Bildung von ULF-artigen sowie globulären Strukturen (siehe Abb. 12; d). Dabei konnte kein erkennbarer Unterschied zu den Keratin-spezifischen Inkubationsbedingungen festgestellt werden, außer dass in dieser Probe kein Filamentoid gefunden wurde.

Nach Inkubation in Assemblierungspuffern, wie sie für die Assemblierung von Typ IV IF-Proteinen Verwendung finden (Gu et al., 2004; dabei wurden die Puffer in ihrer CaCl₂-Konzentration von 2 mM bis 50 mM variiert), konnten ebenfalls ULF-artige, sowie globuläre

Strukturen dokumentiert werden. Diese Strukturen traten sowohl singularär als auch in aggregierter Form auf. Wie auf Abb. 12; e exemplarisch dargestellt, bildeten diese Strukturen teilweise "Knäuel"-artige Aggregate. Entsprechende "Knäuel" wurden auch unter Verwendung von Typ I/II- bzw. Typ III-IF-Protein Assemblierungspuffern dokumentiert (nicht abgebildet). Bei einer Probe (Assemblierungspuffer: 10 mM CaCl_2) wurde eine filamentöse Struktur entdeckt, die einen Durchmesser von ca. 10 nm und eine Länge von 1,5 μm aufweist (siehe Abb. 12; h). Allerdings war die Oberfläche dieses Filamentoids im Vergleich zu *in vitro*-gebildeten Intermediärfilamenten weniger glatt.

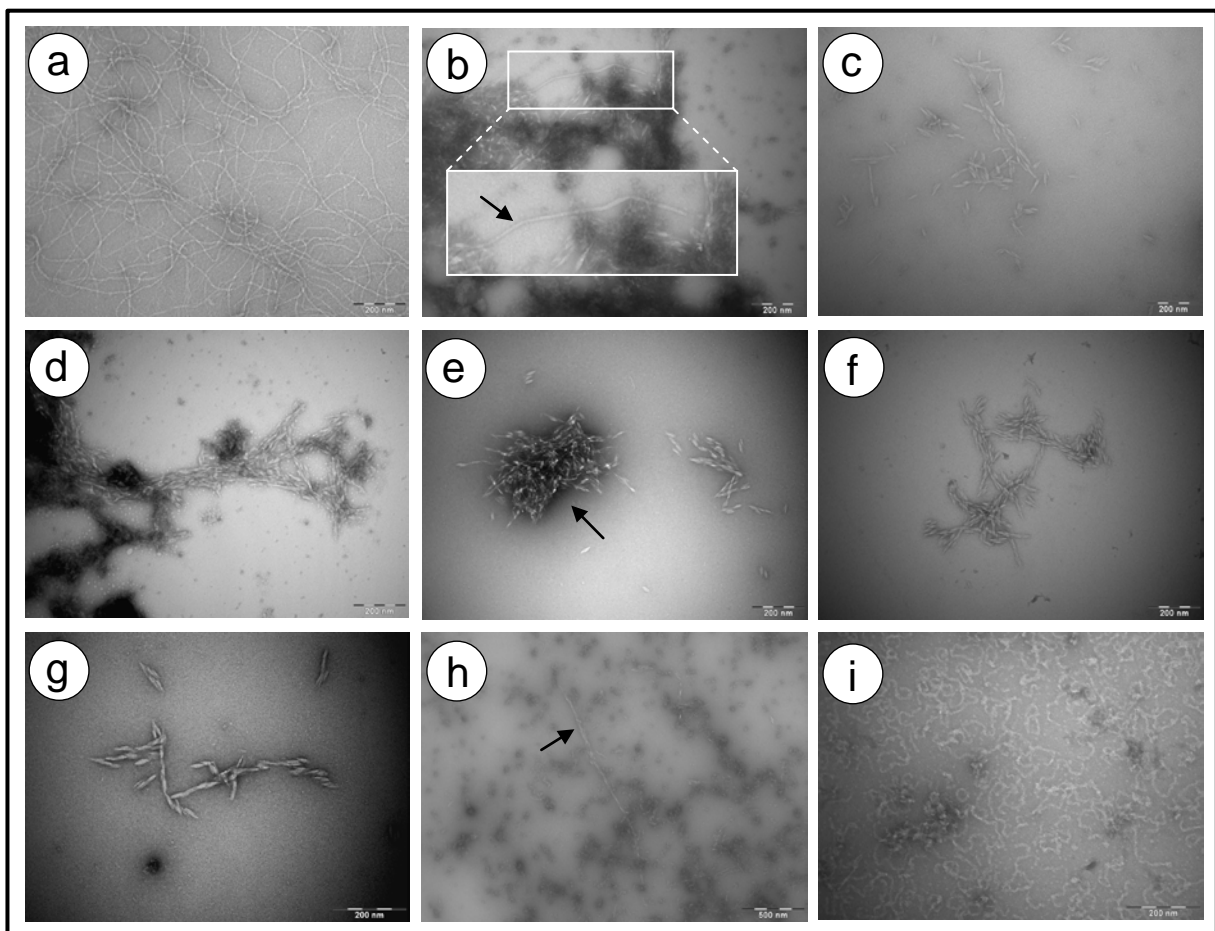


Abb. 12: Elektronenmikroskopische Analyse von rTK α - und rTK γ -Präparationen (*Negative Staining*) des Zebrafährlings *Danio rerio* (0,5 mg/ml).

Die dialysierten Reaktionsprodukte wurden auf mit Carbon überzogenen *Grids* verteilt und mit Uranylacetat behandelt. Die gebildeten Strukturen wurden anschließend mit einem Elektronenmikroskop visualisiert und dokumentiert. **a**, Kontrollprobe; rekombinantes humanes K8 und K18; **b-h**, rTK α und rTK γ ; **i**, TK α . **b**, 200 mM Tris/HCl; pH 7.0; **c**, 10 mM NaCl; pH 8.8 in Assemblierungspuffer für Keratine; **d**, Assemblierungspuffer für Typ III Intermediärfilamente (1,6 M NaCl; 200 mM Tris/HCl; pH 7.0); **e-g**, 10 mM CaCl_2 ; **h**, 20 mM CaCl_2 **i**, Assemblierungspuffer für Typ III-Intermediärfilamente (1,6 M NaCl; 200 mM Tris/HCl; pH 7.0).

In vitro-Assemblierung von rTK α

Bei der Untersuchung von rTK α wurde ein Typ III IF-Protein Assemblierungspuffer verwendet, da die Typ III IF-Proteine bekannterweise Homopolymere ausbilden. Bei diesen Inkubationsbedingungen formten sich filamentöse Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 10-12 nm und einer Länge von bis zu 300 nm (siehe Abb. 12, i). Allerdings besaßen diese Strukturen keine glatte Oberfläche wie typische Keratinfilamente, sondern zeigten eher ein "brüchiges" Erscheinungsbild. Die Filamentoide waren stark gebogen und einige formten sich zu geschlossenen Ringstrukturen. Da vermutet wird, dass im Schleimaal *Eptatretus stoutti* das TK α auch noch bei sehr hohen Harnstoffkonzentrationen (bis 8 M) homopolymere Strukturen ausbilden kann (Spitzer et al., 1984), habe ich unterschiedliche Harnstoffkonzentrationen (0-10 M) im Assemblierungspuffer getestet. Dabei konnte ich zeigen, dass das rTK α aus dem Zebrafisch *Danio rerio* die bereits beschriebenen Filamentoide auch bei Harnstoffkonzentrationen von 1 M und 2 M ausbildet. Bei einer Harnstoffkonzentration von 5 M bildeten sich keine Filamentoide aus.

Das rTK γ wurde ebenfalls mit Typ III IF-Protein Assemblierungspuffer inkubiert und anschließend elektronenmikroskopisch untersucht. Dieses lag in Form von globulären (mit einem Durchmesser von 10-20 nm) Strukturen vor, die wiederum miteinander aggregierten (nicht abgebildet). Filamentöse Strukturen konnten unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

3.2 Bindungseigenschaften von rTK α und rTK γ im Overlay-Assay

Ergänzend zu den *in vitro*-Assemblierungs Versuchen sollten die Bindungseigenschaften der Schleimkeratine mit Overlay-Assays analysiert werden. Die Versuchsbedingungen lehnten sich hierbei an den sogenannten CKBB-Test an, welcher in der Proteinbiochemie zum Nachweis von Keratinen verwendet wird (Hatzfeld et al., 1987). Dabei wurden die rekombinanten Schleimkeratine im ersten Schritt biotinyliert. Mit diesen vorbehandelten Proteinen wurden anschließend auf Nitrocellulose transferierte Proteinmuster inkubiert. Bei den transferierten Proteinen handelte es sich stets um rTK α und rTK γ aus dem Zebrafisch *Danio rerio* sowie rekombinantes, humanes K8 und K18. Zusätzlich wurde der Größenmarker SDS-6H der Firma Sigma (Deisenberg) aufgetragen. In einer abschließenden Farbreaktion konnten die biotinylierten Schleimkeratine detektiert werden, so dass eine Aussage darüber getroffen werden konnte, mit welchen Proteinen das rTK α bzw. rTK γ interagiert.

Nach Inkubation der Membranen mit den für Keratinen idealen Versuchsbedingungen zeigte sich vorerst keine Reaktion. Demnach wurde davon ausgegangen, dass die rekombinanten Schleimkeratine entweder nicht an die auf Nitrocellulose transferierten Proteine binden, oder aber die Bindungen so schwach ausgeprägt sind, dass diese in Folge von Waschschr

wieder gelöst werden. Daraufhin wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, dass die Waschschritte in Hochsalzextraktionspuffer weggelassen wurden. Mit diesen Inkubationsbedingungen zeigten sowohl das rTK α als auch das rTK γ positive Reaktionen. Das biotinylierte rTK α erkannte das rTK γ , wohingegen das biotinylierte rTK γ mit dem rTK α interagiert. Die Keratine K8 und K18 wurden von beiden rekombinanten Schleimkeratinen nicht erkannt, allerdings zeigten sich auch Reaktionen mit dem Größenmarker SDS-6H. Da diese nur sehr schwach waren und zeitlich verzögert auftraten, wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei möglicherweise um Hintergrundreaktionen handelt. Um diese weitestgehend zu minimieren, wurden unterschiedliche Harnstoffkonzentrationen im Bindungspuffer ausgetestet.

Die Variierung der Harnstoffkonzentration zeigte bei der Inkubation mit biotinyliertem rTK α ein Optimum bei 3 M Harnstoff im Bindungspuffer (siehe Abb.13). Bei dieser Konzentration ist die Reaktion mit dem rTK γ am intensivsten und die Kreuzreaktionen mit den Größenmarkerproteinen verhältnismäßig am geringsten. Durch weitere Erniedrigung bzw. Erhöhung der Harnstoffkonzentration nimmt die Intensität der Reaktion mit dem rTK γ weiter ab. Mit der Etablierung dieses Nachweisverfahrens konnte gezeigt werden, dass das rTK α mit rTK γ heteromere Strukturen formen kann, wohingegen vermutlich keine Interaktionen mit cytoplasmatischen Keratinen auftreten.

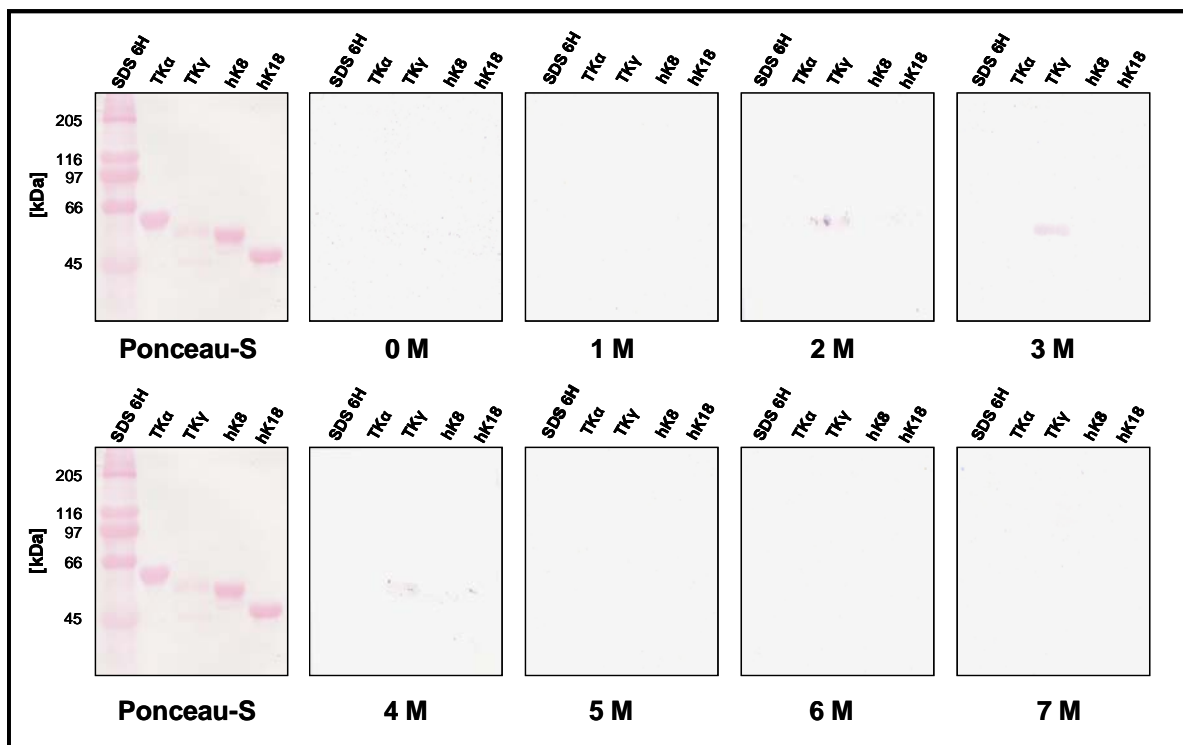


Abb. 13: Bindungseigenschaften des rTK α unter verschiedenen Harnstoffkonzentrationen

Gezeigt sind die Farbreaktionen nach Inkubation mit biotinyliertem rTK α bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen (0-7 M) im Bindungspuffer. Die Membranen wurden mit TBST blockiert und es wurden keine Waschschritte mit Hochsalzextraktionspuffer durchgeführt. Aufgetragen sind jeweils ein Größenmarker (SDS 6H), rTK α (Zebrabärbling), rTK γ (Zebrabärbling), rekombinantes K8 (human) und rekombinantes K18 (human). Links sind nicht-inkubierte, mit Ponceau-S gefärbte Membranen

gezeigt, wie sie auch für die entsprechenden Inkubationen verwendet wurden. Bei einer Harnstoffkonzentration von 2 M und 4 M im Bindungspuffer erkennt man eine schwache Färbung der TK -Bande. Bei Inkubation in Bindungspuffer mit 3M Harnstoff ist die Färbung der TK -Bande deutlich stärker.

Das biotinylierte rTK γ zeigt nach Variierung der Harnstoffkonzentration im Bindungspuffer ein etwas anderes Reaktionsmuster. Ausgehend von den Ausgangsbedingungen (4 M Harnstoff) des CKBB-Tests konnte durch Erniedrigung der Harnstoffkonzentrationen die Intensität der Reaktionen kontinuierlich verstärkt werden (siehe Abb. 14). Allerdings wurde dieser Trend auch durch eine Zunahme von unspezifischen Kreuzreaktionen mit dem Größenmarker SDS-6H begleitet (aufgrund der geringen Intensität sind diese in Abb. 14 nicht zu erkennen). Mit der Verwendung stärkerer Blockierungslösungen (10% Milchpulver in TBST) konnten daraufhin diese unspezifischen Bindungen weitestgehend minimiert werden.

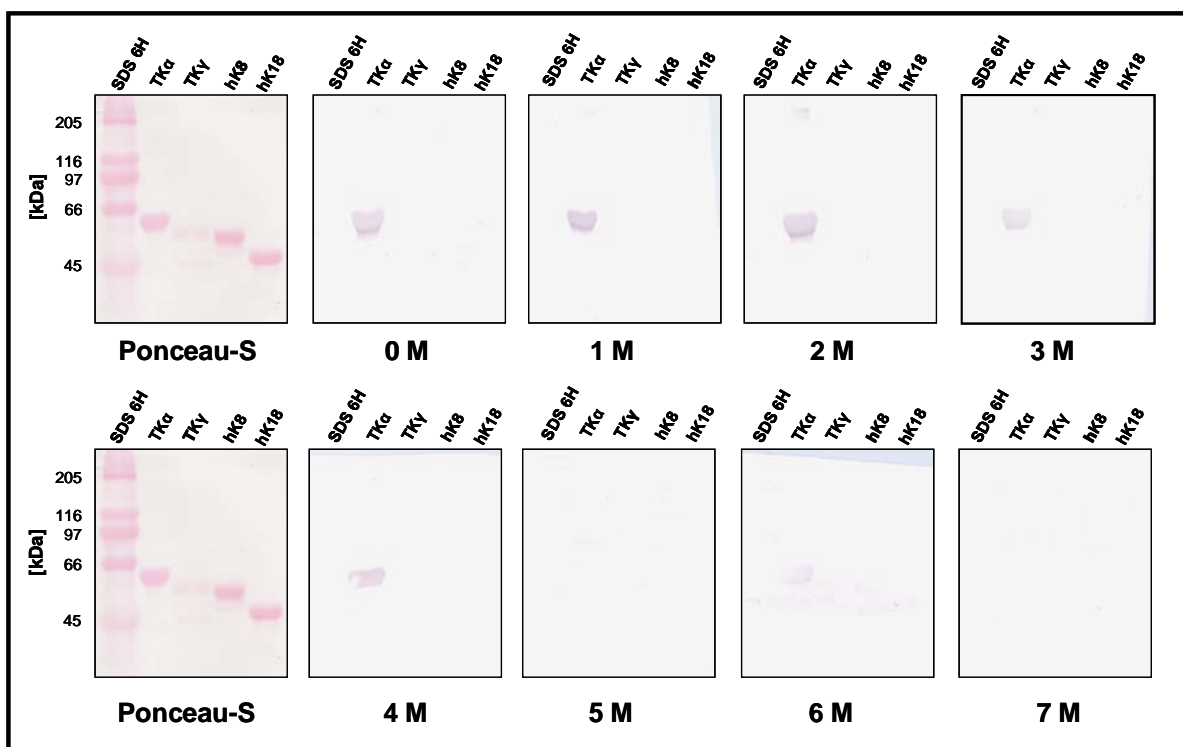


Abb. 14: Bindungseigenschaften des rTK γ unter verschiedenen Harnstoffkonzentrationen

Gezeigt sind die Farbreaktionen nach Inkubation mit biotinyliertem rTK γ bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen (0-7 M) im Bindungspuffer. Die Membranen wurden mit TBST blockiert und es wurden keine Waschschritte mit Hochsalzextraktionspuffer durchgeführt. Aufgetragen sind jeweils ein Größenmarker (SDS 6H), rTK α (Zebrafärbung), rTK γ (Zebrafärbung), rekombinantes K8 (human) und rekombinantes K18 (human). Links sind nicht-inkubierte, mit Ponceau-S gefärbte Membranen abgebildet, wie sie auch für die entsprechenden Inkubationen verwendet wurden. Das biotinylierte rTK γ erkannte das rTK α , allerdings waren auch schwache Kreuzreaktionen mit den Proteinen des Größenmarkers erkennbar. Mit Zunahme der Harnstoffkonzentration zeigt sich eine tendenzielle Abnahme der Farbintensität.

Da die Schleimkeratine rTK α und rTK γ lediglich miteinander interagieren und keine Bindung mit den cytoplasmatischen Keratinen eingehen, konnte dieser Assay auch im Folgenden (siehe Punkt 4.2) für den biochemischen Nachweis von TK α und TK γ verwendet werden.

Tab. 3: Inkubationsbedingungen für den Overlay-Assay zum TK α /TK γ -Nachweis

		Nachzuweisendes Protein	
		TK α	TK γ
Versuchsbedingung	Blockierungslösung	10 % Milchpulver in TBST	TBST
	Harnstoffkonzentration im Bindungspuffer	3 M	3 M
	Waschschritte in Hochsalzextraktionspuffer	nein	nein

4 Biochemische Identifizierung von TK α und TK γ im Zebra**ärbling** *Danio rerio*

Zur biochemischen Identifizierung der Proteine TK α und TK γ im Zebra**ärbling** wurden unterschiedliche Methoden durchgeführt. Zu Beginn wurden anhand zweidimensionaler Koelektrophoresen Hinweise gesammelt, ob TK α bzw. TK γ in Cytoskelettpräparationen des Zebra**ärblings** als erkennbare Proteinflecken auftreten. Anschließend wurden die Cytoskelettpräparationen immunologisch sowie mit dem modifizierten CKBB-Test (siehe Punkt 3.2) untersucht. Für den immunologischen Nachweis wurden Anti-TK α - bzw. Anti-TK γ Antisera in Kaninchen hergestellt und auf ihre Spezifität hin getestet (Unnold, 2008). Anhand dieses Methodenspektrums konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig TK α und TK γ in einem Knochenfisch biochemisch identifiziert werden.

4.1 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese / Koelektrophorese

Um mögliche Proteinspots aus Cytoskelettpräparationen des Zebra**ärblings** als mögliche Kandidaten für TK α bzw. TK γ zu identifizieren, wurde eine Koelektrophorese durchgeführt (siehe Abb. 15; c). Dabei wurden die Proteine einer IF-Präparation eines kompletten Zebra**ärblings** in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Entsprechenden IF-Präparationen wurde zusätzlich das rTK α und rTK γ beigemischt und ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Vergleich beider Proteinmuster (siehe Abb. 15; a) konnte gezeigt werden, dass keine erkennbaren Proteinflecken aus der Zebra**ärbling**-Gesamtpräparation mit denen der rTKs in Deckung zu bringen sind.

4.2 Overlay-Assays

Um TK α und TK γ mit den Overlay-Assays nachweisen zu können, wurden die Proteine aus Cytoskelettpräparationen zweidimensional aufgetrennt, anschließend auf Nitrocellulose transferiert und wie in Punkt 3.2 unter der Tabelle 3 beschrieben inkubiert. Nach Inkubation mit biotinyliertem rTK γ wurden zwei Proteinflecken angefärbt (siehe Abb. 15; d). Der isoelektrische Punkt des ersten Proteins (Pfeil) liegt bei pH 6.2 und dessen Molekülmasse beträgt ca. 59 kDa. Dieser Proteinspot besitzt identische physikochemische Eigenschaften wie das rTK α . Das zweite angefärbte Protein (Pfeilkopf) hat einen isoelektrischen Punkt bei pH 6.0 und ist 47 kDa groß. Dieser Proteinspot kann keinem bisher bekanntem cytoplasmatischem Keratin zugeordnet werden. Darüber hinaus wurden keine aus dem Zebrabärbling bisher bekannten Cytokeratine mit diesem Test erkannt (vgl. Conrad et al., 1998).

Die Inkubation mit biotinyliertem rTK α zum Nachweis von TK γ zeigte nach \ddot{u} ndfänger Inkubation keine diskrete Reaktion. Demnach konnte mit dieser Methode kein Nachweis von TK γ erbracht werden.

4.3 Immunologischer Nachweis

Ergänzend zu den Overlay-Assays wurden auf Nitrocellulose transferierte Cytoskelettpräparationen aus gesamten Zebrabärblingen mit Hilfe der Anti-TK Antiseren untersucht. Das Anti-TK α Antiserum dekorierte einen Proteinspot mit einer Molekülmasse (M) von 59 kDa und einem pI-Wert von 6.2 (siehe Abb 15; e). Das angefärbte Protein besitzt somit identische physikochemische Eigenschaften wie das rTK α und des bereits im Overlay-Assay als TK α identifizierte Protein. Zusätzlich färbte das Antiserum einige IE- und IIE-Keratine an. Allerdings waren diese Farbreaktionen zeitlich verzögert und relativ schwach. Ergänzend zu dem Anti-TK α Antiserum wurde ein monoklonaler Anti-Keratin Antikörper getestet, welcher ebenfalls mit dem rTK α und dem als TK α identifizierten Proteinspot reagierte (Unnold, 2008). Das Anti-TK γ Antiserum färbte einen Proteinspot an, welcher einen identischen pI-Wert (bei pH 4.8) sowie eine identische Molekülmasse (50 kDa) zum rekombinant hergestellten TK γ aufweist. Des Weiteren wurden Proteinspots angefärbt, bei denen es sich um IE-Keratine handelt (siehe Abb. 15; f). Im Vergleich beider Antiseren ist anzumerken, dass diese jeweils mit unterschiedlichen E-Keratinen kreuzreagiert haben.

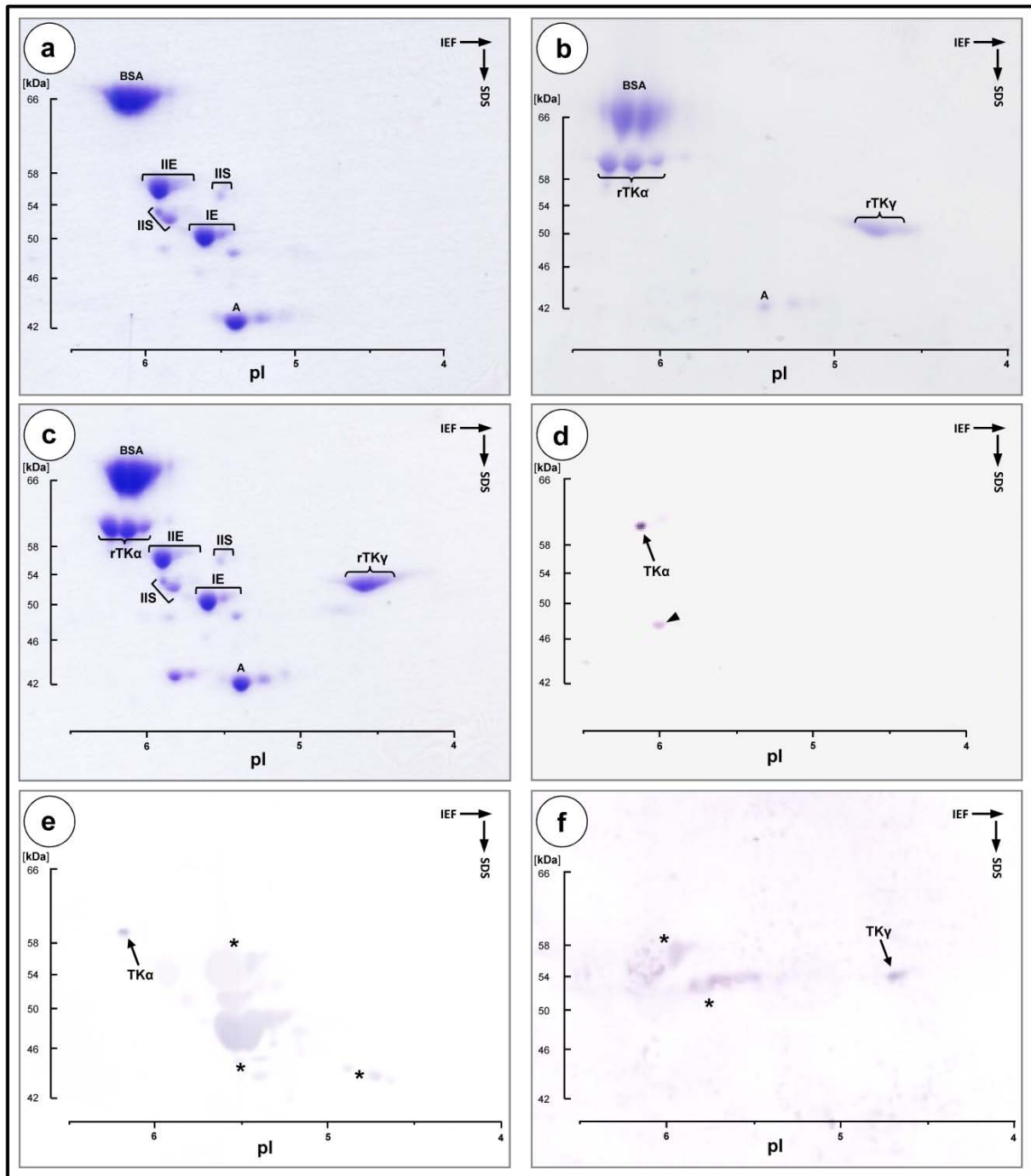


Abb. 15: Koelektrophorese (2D-PAGE), CKBB-Test und Reaktionen der Anti-TK Antiseren

In der ersten Dimension wurde eine isoelektrische Fokussierung (IEF) und in der zweiten Dimension eine SDS-PAGE durchgeführt; B, Rinderserumalbumin; A, Kaninchen α -Aktin; IE, Typ I E-Keratine; IIE, Typ II E-Keratine; IS, Typ I S-Keratine; IIS, Typ II S-Keratine; bei den mit einem Sternchen (*) gekennzeichneten Proteinspots handelt es sich wahrscheinlich um Hintergrundreaktionen. – a-c. Coomassie-blue gefärbte Gele. – d. modifizierter CKBB-Test. – e, f. Immunblots. – a. Cytoskelettpräparation eines Zebrafischblings – b. rTK α und rTK γ – c. Koelektrophorese einer Cytoskelettpräparation des Zebrafischblings sowie rTK α und rTK γ . – d. modifizierter CKBB-Test mit biotinyliertem rTK γ zur Identifizierung von TK α . Es wurden zwei Proteinflecken erkannt. Das mit einem Pfeil gekennzeichnete Protein besitzt identische physikochemische Eigenschaften wie das rTK α . Der mit einem Pfeilkopf markierte Proteinfleck kann keinem bisher bekannten Keratin im Zebrafischbling zugeordnet werden. – e. Reaktion des polyklonalen Antiserums Anti-TK α . Erkannt wurde ein Proteinfleck, der identische Laufeigenschaften zum rTK α aufweist. Zusätzlich zeigte das Antiserum

Kreuzreaktionen mit E-Keratinen. Da diese Reaktionen zeitlich versetzt auftraten und relativ schwach waren handelt es sich vermutlich um Hintergrundreaktionen. – f. Reaktion des polyklonalen Antiserums Anti-TKy. Das Antiserum hat ein Protein erkannt, welches identische physikochemische Eigenschaften besitzt wie das rTKy. Zusätzlich wurden weitere E -Keratine erkannt. Allerdings waren die Reaktionen zeitlich verzögert und auch weniger intensiv.

5 Expression von TK α und TKy im adulten Tier; Immunhistologische Untersuchung

Die Expression von TK α und TKy wurde mithilfe der Anti-TK Antiseren auf Gefrierschnitten untersucht. Hierfür wurden 5 μ m dicke Querschnitte bzw. 10 μ m dicke Längsschnitte vom Zebraäbrbling *Danio rerio* angefertigt und anschließend mit den Anti-TK Antiseren, sowie weiteren Anti-Keratin Antikörpern inkubiert. Die Inkubationen mit den Anti-Keratin Antikörpern wurden im Rahmen einer von mir betreuten Examensarbeit durchgeführt (Unnold, 2008). Beide Anti-TK Antiseren zeigten in der Epidermis, in den Flossen und in der Stirnhaut sowie im Oesophagus positive Reaktionen. In beschuppten Hauptbereichen sowie in inneren Organen wurden keine Zellen angefärbt. Die Färbungen der beiden Anti-TK Antiseren waren stets identisch. Der monoklonale Anti-Keratin Antikörper Pan1-8 zeigte ebenfalls ein nahezu identisches Reaktionsmuster wie die Anti-TK Antiseren. Lediglich Zellkernstrukturen wurden zusätzlich von diesem Antikörper erkannt.

Immunfluoreszenzfärbungen in der Flossenepidermis

Die polyklonalen Anti-TK Antikörper färbten in den Flossen ausschließlich die Epidermisbereiche an, welche zwischen den Flossenstrahlen liegen (siehe Abb. 16; a, a'). Hierbei fällt zudem auf, dass innerhalb der Epidermis lediglich die basale Zellschicht angefärbt wurde. Innerhalb dieser Zellen konzentriert sich das Signal an der basalen Zellseite und nimmt zur apikalen Zelloberfläche hin ab. Demgegenüber wurde die Epidermis in den Bereichen der Flossenstrahlen nicht dekoriert.

In der Flossenspitze wurden die basalen Zellen in der Proliferationszone nicht erkannt (siehe Abb. 16, a'). Erst mit dem Heranreifen der Zellen ist ein zunehmendes Fluoreszenzsignal erkennbar. Der monoklonale Anti-Keratin Antikörper PAN1-8 dekorierte bis auf zusätzlich angefärbte Zellkernstrukturen identische Strukturen wie die Anti-TK Antiseren (siehe Abb. 16; b, b').

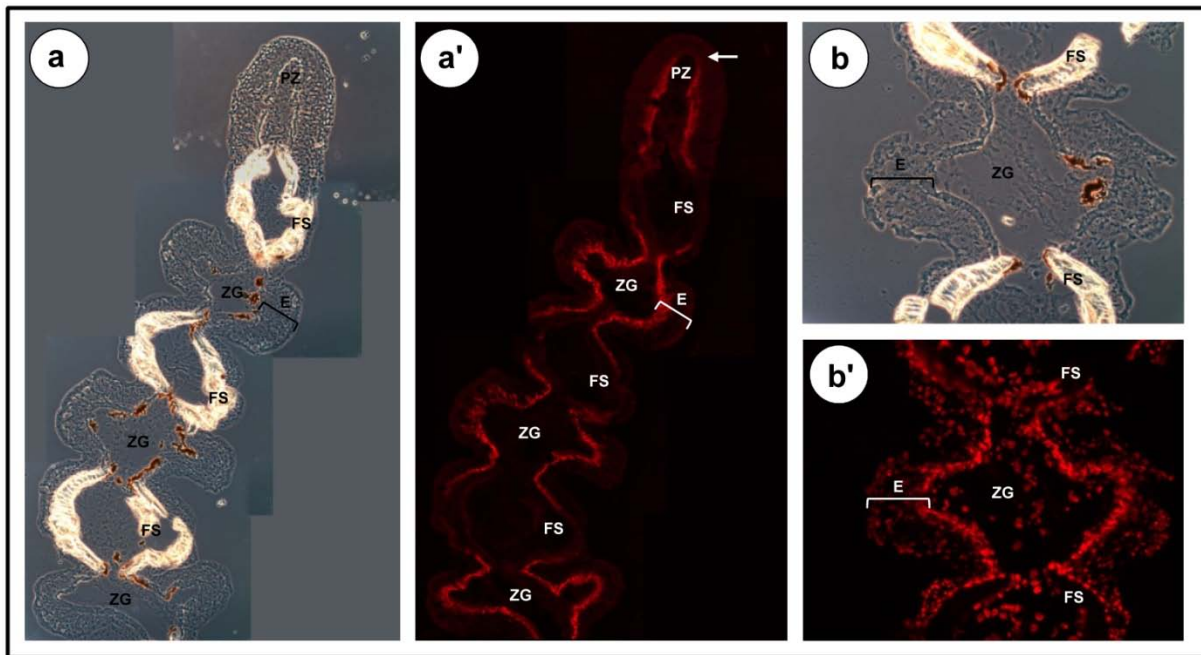


Abb. 16: Immunfluoreszenzmikroskopie an 5 µm dicken Gefrierschnitten der Flosse

E, Epidermis; D, Dermis; ZG, Zwischenflossenstrahlbereich; FS, Flossenstrahl; PZ, Proliferationszone. **a, b.** Phasenkontrastaufnahmen; **a', b'.** Epifluoreszenzaufnahmen; – **a, a'.** Reaktionen des polyklonalen Antikörpers Anti-TK α mit der basalen Zellschicht der Epidermis. In den Bereichen der Flossenstrahlen wurde die basale Zellschicht nicht dekoriert. Die Bilder wurden jeweils mit einem Grafikbearbeitungsprogramm aus vier einzelnen Aufnahmen zusammengesetzt. – **b, b'.** Reaktion des monoklonalen Anti-Keratin Antikörpers PAN1-8. Bis auf die angefärbten Zellkerne hat dieser Antikörper ein ansonsten identisches Reaktionsmuster wie die Antiseren Anti-TK α und Anti-TK γ .

Immunfluoreszenzfärbungen in der Stirnhautepidermis

Im Gegensatz zu beschuppten Hautpartien wurde die Epidermis der Stirnhaut von beiden Anti-TK Antiseren erkannt. Diese reagierten mit Epidermisbereichen, in denen keine Verknöcherung / Beschuppung vorzufinden ist (siehe Abb. 17). Die Antiseren zeigten in diesen Hautabschnitten ein ähnliches Reaktionsmuster wie in der Flossenepidermis. Es wurde stets die basale Zellschicht angefärbt (siehe Abb 18; a, a', b, b').

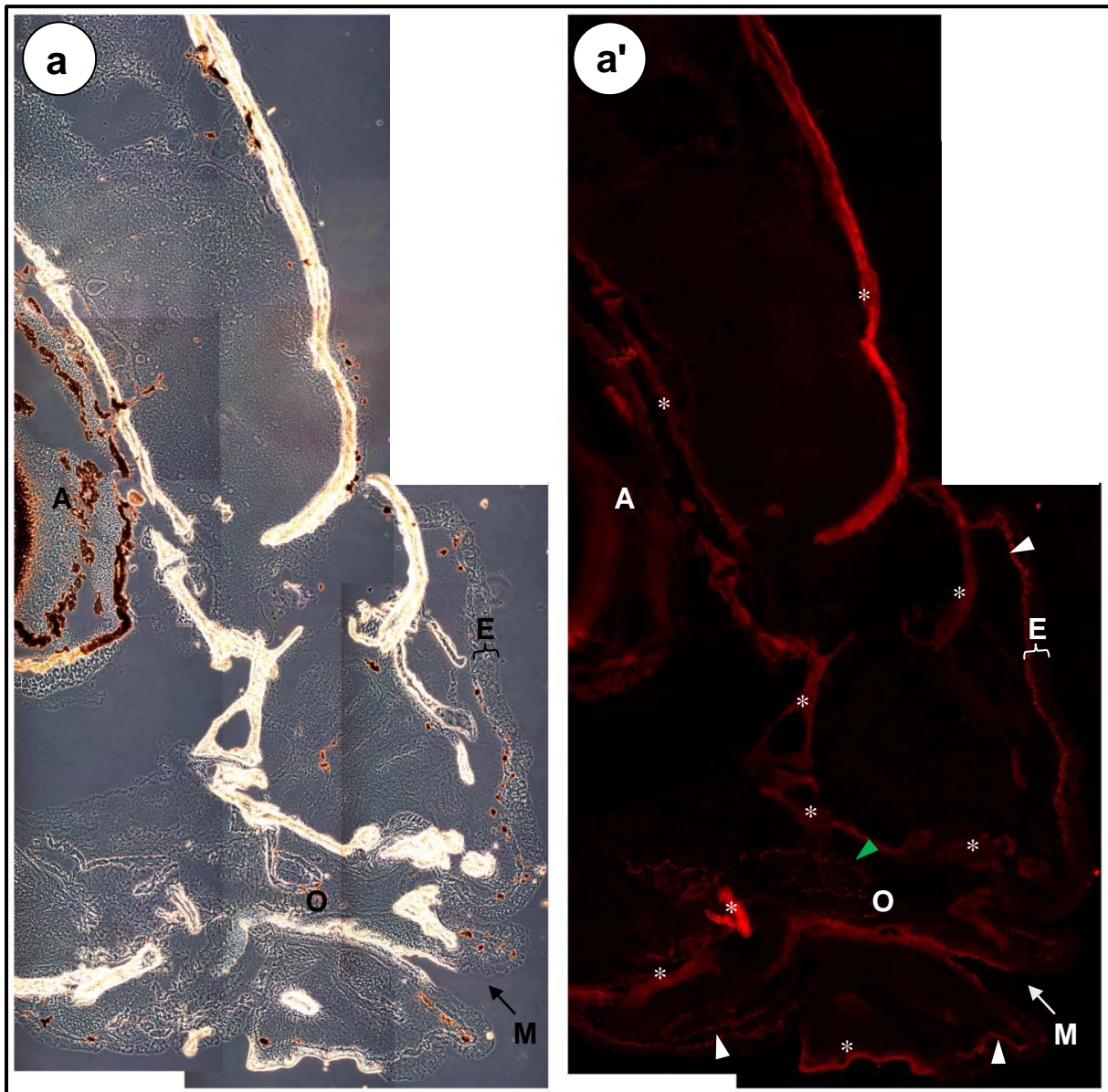


Abb. 17: Immunfluoreszenzmikroskopie an 10 µm dicken Gefrierschnitten vom Kopfbereich des Zebrafährlings *Danio rerio* (längs geschnitten) inkubiert mit dem Anti TK γ -Antiserum
 E, Epidermis; O, Oesophagus; A, Auge, M, Mundöffnung. a. Phasenkontrastaufnahme. b. Epifluoreszenzaufnahme. – a. Längsschnitt durch den Kopfbereich. – a'. Reaktion des polyklonalen Anti TK γ -Antiserums mit den basalen Zellen der Epidermis in unverknöcherten Bereichen des Kopfes (weiße Pfeilspitzen) und dem Mukosaepithel des Oesophagus (grüne Pfeilspitze). Die verknöcherten Strukturen besitzen eine Eigenfluoreszenz und sind mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Beide Bilder wurden jeweils mit einem Grafikbearbeitungsprogramm aus 15 einzelnen Aufnahmen zusammengesetzt.

Innerhalb der basalen Zellschicht ist die Färbung auf der basalen Seite sehr intensiv und nimmt zur apikalen Zellseite hin deutlich ab. Auch in der Haut zeigte der monoklonale Anti-Keratin Antikörper PAN1-8 ein fast identisches Reaktionsmuster wie die Anti-TK Antikörper. Lediglich die Zellkerne wurden von diesem Antikörper zusätzlich angefärbt (siehe Abb 18; d', d'')

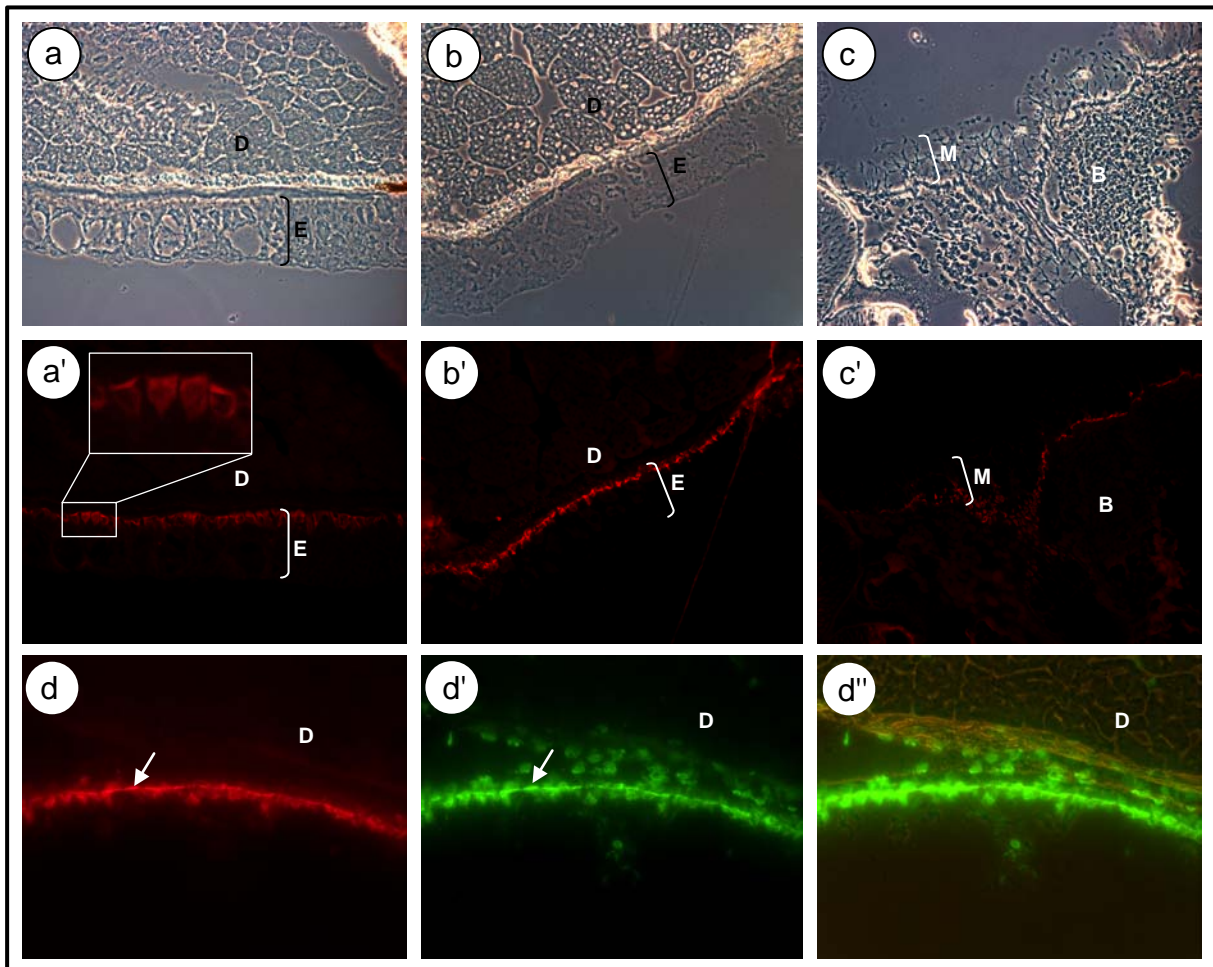


Abb. 18: Immunfluoreszenzmikroskopie an 5 µm dicken Gefrierschnitten verschiedener Gewebe des Zebrafährlings *Danio rerio*

E, Epidermis; D, Dermis; IF, Zwischenflossenstrahlbereich; **a-c**, Phasenkontrastaufnahmen. **a'-c'**, Epifluoreszenzaufnahmen. **d'**, Überlagerung von Phasenkontrast und dem entsprechendem Epifluoreszenzsignal. **a**, **b**, **a'**, **b'**, **d**, **d'**, **d''** Querschnitt durch die Stirnhaut; **c**, **c'**, Querschnitt durch den Oesophagus. – **a**, **a'**. Reaktionen des polyklonalen Anti TK α -Antiserums mit den basalen Epidermiszellen in Bereichen der unbeschuppten Stirnhaut. In **a'** sind angefärbte Zellen vergrößert dargestellt. Das Fluoreszenzsignal ist an der basalen Seite der basalen Epidermiszellen am intensivsten und nimmt zur apikalen Seite der Zelle hin ab. – **b**, **b'**. Der polyklonale Antikörper Anti-TK γ färbt die basale Zellschicht der Epidermis innerhalb unbeschuppter Hautpartien an. – **c**, **c'**. Der polyklonale Antikörper Anti-TK γ dekoriert im Mukosaepithel des Oesophagus die basale Zellschicht. – **d**, **d'**, **d''**. Doppelfluoreszenzfärbung des polyklonalen Anti-TK α Antiserums (**rot**) und des monoklonalen Anti-Keratin Antikörpers PAN1-8 (**grün**). Bei beiden Färbungen ist zu erkennen, dass die dekorierten Zellen auf ihrer basalen Seite durchgehend angefärbt wurden, wohingegen deren apikale Seite nur wenig dekoriert ist. Zur Verdeutlichung wurde in **d''** die Phasenkontrastaufnahme hinterlegt. Die Pfeile zeigen die basale Seite der Zellen, an denen eine „durchgehende“ Fluoreszenz zu sehen ist.

Immunfluoreszenzfärbungen im Oesophagus

Im Oesophagus dekorierten die Anti-TK Antiseren die basalen Zellen des mehrschichtigen Mukosaepithels. Im Vergleich zu den Farbreaktionen innerhalb der Epidermis waren die Färbungen im Oesophagus weniger intensiv (siehe Abb. 17; 18; c, c').

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Analyse darauf hin, dass TK α und TK γ in bestimmten Zelltypen koexprimiert werden. Dabei handelt es sich um die basale Zellschicht

der Stirnhautepidermis und der Flossenepidermis. Innerhalb dieser Zelltypen konzentriert sich das Signal an der basalen Zellseite und nimmt zur apikalen Seite hin stark ab. Zusätzlich konnten TK α und TK γ im Mukosaepithel des Oesophagus nachgewiesen werden.

6 Expression von TK α und TK γ in larvalen Entwicklungsstadien

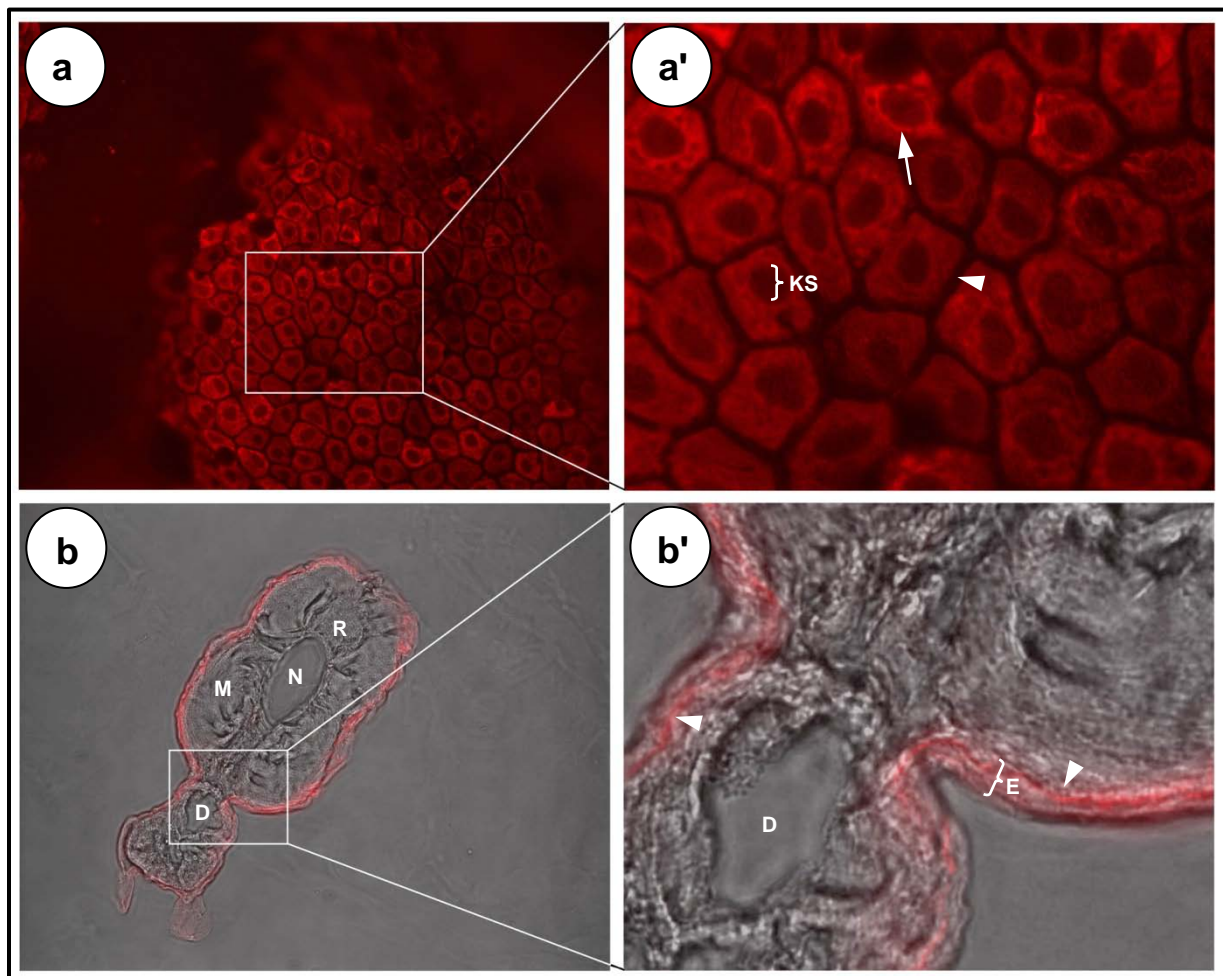
6.1 Whole mount-Immunfluoreszenz Färbungen

Für die Expressionsanalyse an Larvalstadien wurde die Methode der Whole mount-Immunfluoreszenz angewandt. Hierfür wurden komplette, 4 bis 5 Tage alte Larven mit den Anti-TK Antiseren inkubiert und anschließend über fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper detektiert. Die Färbungen wurden im Rahmen einer von mir mitbetreuten Diplomarbeit durchgeführt (Hartmann, 2009).

Beide Antiseren erkannten die Epidermiszellen (siehe Abb. 19; a) der Larven. Hierbei fällt auf, dass die Bereiche, die vom Zellkern verdeckt werden ein schwächeres Signal liefern (siehe Abb. 19; a') als die den Zellkern umgebenden Zellareale. Die Expression der Schleimkeratine TK α und TK γ beschränkt sich demnach auf die basalen Bereiche innerhalb der Zellen. Anhand von Querschnitten konnte gezeigt werden, dass das Signal zum einen in der lateralen Körperwand am stärksten ist und zum anderen sich an der Basis der Epidermis konzentriert (siehe Abb. 19; b, b').

Abb. 19 (auf folgender Seite): Immunfluoreszenzmikroskopie von Whole mount-Färbungen an Larven des Zebraärlings *Danio rerio*

E, Epidermis; D, Darm; M, Muskulatur; N, Notochord; R, Rückenmark. **a, a'**. Epifluoreszenzaufnahmen. **b, b'**. Überlagerung einer Phasenkontrastaufnahme mit der entsprechenden Epifluoreszenzaufnahme. – **a**. Reaktion des polyklonalen Anti TK γ -Antiserums mit der Epidermis. – **a'**. Vergrößerter Bereich aus **a**. Das Fluoreszenzsignal wird von den Zellkernen abgeschwächt (Kernschatten; KE). In den Zellzwischenräumen (Pfeilkopf) ist kein Signal erkennbar. – **b**. Querschnitt (10 μ m dick) einer mit Anti-TK α inkubierten Larve. Die Fluoreszenz beschränkt sich auf die Epidermis. – **b'**. Vergrößerter Ausschnitt aus **b**. Innerhalb der Epidermis konzentriert sich das Signal auf den basalen Bereich (Pfeilköpfe)



6.2 Whole mount *in situ*-Hybridisierung

Mit der Methode der Whole mount *in situ*-Hybridisierung (WMISH) wurden unterschiedliche Entwicklungsstadien des Zebraabärblinges daraufhin untersucht, in welchen Geweben bzw. Zellen die Schleimkeratingene exprimiert werden. Es konnten jedoch lediglich verwertbare Ergebnisse für frisch geschlüpfte Larven (4-5 Tage alt) erhalten werden. Für die Negativkontrollen wurden Larven ohne Zugabe der tk α - bzw. tk γ -spezifischen DNA-Sonden behandelt.

Nach Inkubation der Larven mit jeweils tk α - bzw. tk γ -spezifischen DNA-Sonden wurde das Notochord erkannt (siehe Abb. 20; a, b). Dabei zeigte nahezu das gesamte Organ eine intensive Färbung. Lediglich im Bereich der Schwanzflosse wurde kein Signal nachgewiesen. Des Weiteren zeigte auch die Epidermis nach Inkubation mit tk α - bzw. tk γ -spezifischen DNA-Sonden ein wenn auch nur sehr schwaches Signal (siehe Abb. 20; c). In Bereichen der ventro-lateralen Körperwand sowie im Bereich der Schwanzflosse wurde die Epidermis nicht erkannt.

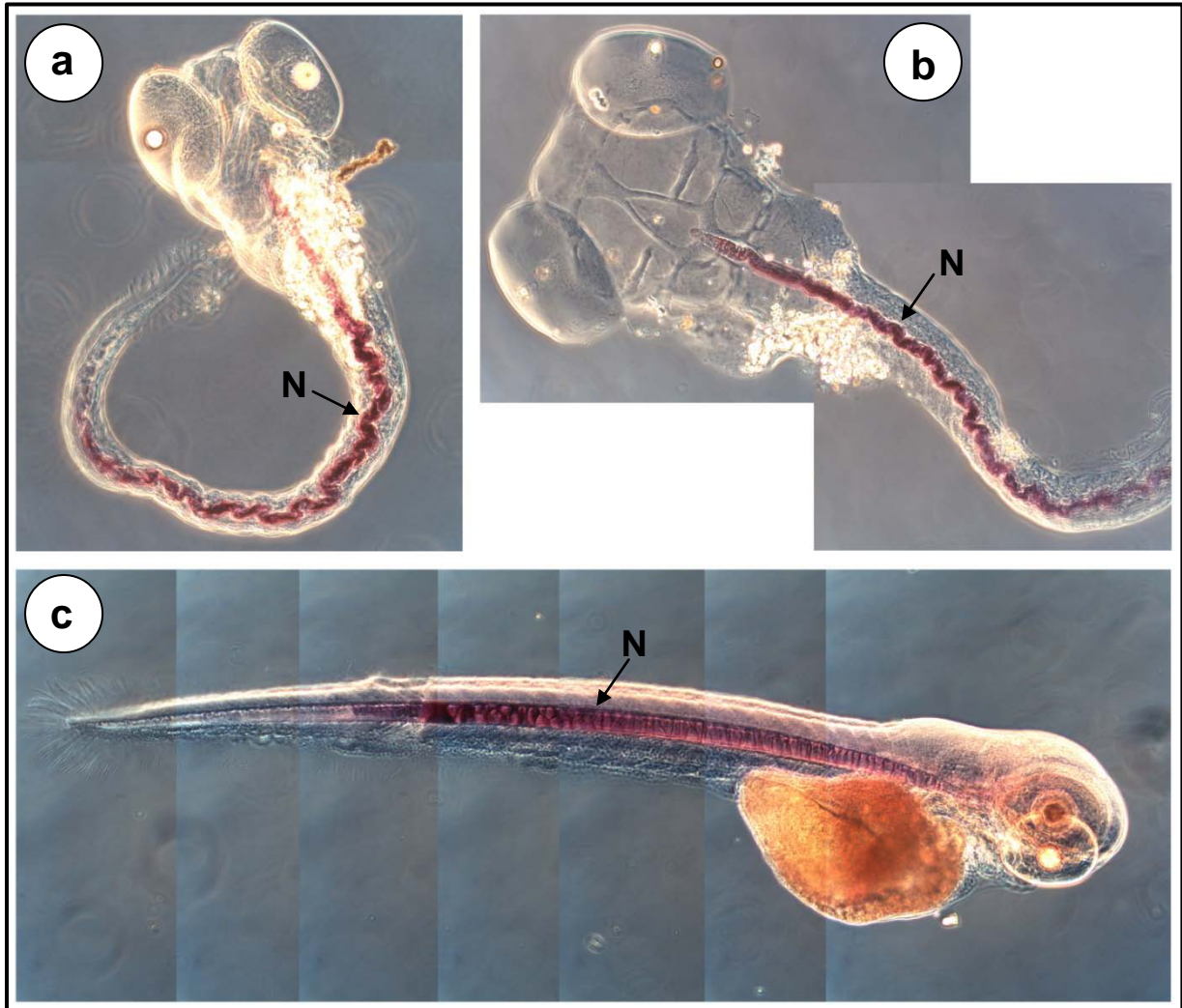


Abb. 20: In situ-Hybridisierung an Larven des Zebrafärblings *Danio rerio*

Phasenkontrastmikroskopie an 4-5 Tage alten Zebrafärblinglarven, die zuvor mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden behandelt wurden. N, Notochord. **a, c.** Inkubation mit tK α -spezifischen DNA-Sonden. Positive Reaktion mit dem Notochord. **b.** Inkubation mit tK γ -spezifischen DNA-Sonden. Identisches Reaktionsmuster wie in **a.** Das Notochord wurde von den Sonden erkannt. In **c** ist zusätzlich eine schwache Färbung der Epidermis erkennbar. Zum ventralen Körperbereich hin nimmt diese Färbung ab.

D Diskussion

1 Stand der Forschung zu Beginn dieser Arbeit

Die Schleimkeratine des Schleimaals *Eptatretus stoutii* wurden bisher stets als hochspezialisierte Keratine betrachtet, deren Vorkommen sich, wie damals vermutet wurde, auf den Schleimaal beschränkt. Die Entdeckung der Schleimkeratine TK α und TK γ in weiteren Wirbeltiergruppen zeigte, dass diese IF-Proteine ein viel breitgefächerteres Vorkommen aufweisen als bisher angenommen. So stellte sich die Frage, ob die Schleimkeratine TK α und TK γ in gnathostomen Wirbeltieren ähnliche Funktionen wie im Schleimaal aufweisen. Im Schleimaal formen TK α und TK γ miteinander höhere, fadenförmige Strukturen, die schlussendlich extrazellulär sezerniert werden und im umgebenden Wasser die viskoelastischen Eigenschaften des Schleims modifizieren. Dabei sind für diese Schleim-modifizierenden Eigenschaften die Fähigkeit zur Bildung kabelartiger Strukturen ausschlaggebend, da diese Fäden zusammen mit Schleimvesikeln eine Art Netzstruktur ausbilden, so dass in den dabei entstehenden Zwischenräumen Meerwasser gehalten werden kann und dadurch eine enorme Volumenzunahme des Schleims resultiert (Fudge et al., 2005). Obwohl die Schleimkeratine nun auch in modernen Fischen und Amphibien entdeckt wurden und einige Vertreter in Bezug auf deren Keratine gut untersucht sind, konnte bisher kein biochemischer Nachweis der Schleimkeratine TK α und TK γ in diesen Wirbeltiergruppen erbracht werden. Da in diesen Wirbeltieren auch keine höheren Kabelstrukturen beschrieben wurden und auch keine extrazelluläre Sezernierung von Keratinen dokumentiert werden konnte, liegt die Funktion der Schleimkeratine TK α und TK γ in gnathostomen Wirbeltieren möglicherweise nicht in der Modifizierung der viskoelastischen Schleimeigenschaften. Erste Hinweise auf eine mögliche Funktion der Schleimkeratine im Zebraärbling *Danio rerio* lieferten die Verteilungsmuster von TK-kodierenden EST-Sequenzen aus Internetdatenbanken (Schaffeld & Schultess, 2006). Diese ersten Expressionsdaten ließen vermuten, dass im Zebraärbling die Schleimkeratine TK α und TK γ vermutlich in larvalen Entwicklungsstadien eine Funktion übernehmen. So wurden die meisten EST-Sequenzen in embryonalen und larvalen Entwicklungsstadien detektiert. Zwar wurden auch TK-kodierende EST-Sequenzen in adulten Tieren gefunden, allerdings konnten im adulten Zebraärbling, der in Bezug auf seine Keratinausstattung gut untersucht ist (Conrad et al., 1998), keine Proteinkandidaten für das TK α bzw. TK γ identifiziert werden. Da die EST-Sequenzen in adulten Tieren hauptsächlich aus Geweben von regenerierenden Flossen stammen, lieferte dies erste Hinweise auf eine mögliche Funktion der Schleimkeratine innerhalb von Regenerationsprozessen von Flossengewebe (Schaffeld & Schultess, 2006). Im Rahmen

dieser Arbeit wurden diese Hypothesen mit Hilfe verschiedener Methoden überprüft bzw. erweitert, was in den folgenden Kapiteln diskutiert wird.

2 Rekombinante Expression und Sequenzanalyse

Die Methode der rekombinanten Expression wurde gewählt, da die Schleimkeratine TK α und TK γ in größeren Mengen benötigt wurden. Die rekombinant hergestellten Proteine wurden für die Analyse der Bindungseigenschaften benötigt. Neben einer elektronenmikroskopischen Untersuchung zur Bildung von Filamenten wurden die rekombinanten Schleimkeratine auch zur Etablierung eines Overlay-Assays verwendet. Dieser Overlay-Assay stellt gleichzeitig einen biochemischen Nachweistest der Schleimkeratine dar, mit dessen Hilfe die Identifizierung von TK α erzielt werden konnte. Mit Hilfe der rekombinanten Schleimkeratine konnten weiterhin Schleimkeratin-spezifische Antiseren hergestellt werden, wodurch eine Gewebe- und Entwicklungs-spezifische Expressionsanalyse ermöglicht wurde. Schlussendlich wurden diese Antiseren auch für die biochemische Identifizierung verwendet. Als Ausgangspunkt für die rekombinante Expression dienten die bereits veröffentlichten cDNA-Sequenzen, welche für TK α bzw. TK γ kodieren (Schaffeld & Schultess, 2006). Bevor mit den rekombinant hergestellten Proteinen weitergearbeitet wurde, sind diese daraufhin überprüft worden, ob es sich dabei auch um die gewünschten, für TK α - bzw. TK γ -kodierenden Sequenzen handelt. Hierfür wurden die Integrate der Expressionsvektoren nach jedem Klonierungsschritt sequenziert und mit den vorhandenen Ausgangssequenzen verglichen. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die für die rekombinante Expression verwendeten TK-kodierenden cDNA-Sequenzen leicht von ihren Ausgangssequenzen unterscheiden (siehe Abb. 7; 8). Die erhaltenen Sequenzen wurden daraufhin mit der Internetdatenbanken abgeglichen. Auf diese Weise wurden cDNA-Sequenzen und EST-Fragmente gefunden, die eine komplette Übereinstimmung zu den erhaltenen Sequenzen aufweisen. Zusätzlich wurden die Schleimkeratine auf genomischer Ebene untersucht, wodurch gezeigt werden konnte, dass sich die genomischen Sequenzen von TK α und TK γ mit den von mir klonierten cDNAs decken. Daher ist davon auszugehen, dass die von mir verwendeten cDNA-Sequenzen für andere Allele kodieren als die der bereits publizierten Ausgangssequenzen. Abschließend wurde mit den rekombinant hergestellten Proteinen ein peptide mass fingerprinting durchgeführt (siehe Abb. 11), wodurch bestätigt werden konnte, dass die Aminosäuresequenzen der rekombinanten Proteine den Zielsequenzen entsprechen und es sich demnach bei den in dieser Arbeit exprimierten Proteinen um die Schleimkeratine TK α und TK γ des Zebrafisches *Danio rerio* handelt, welche im Folgenden als rTK α bzw. rTK γ bezeichnet werden.

3 Bindungseigenschaften von TK

Obwohl die Schleimkeratine TK α und TK γ des Schleimaals *Eptatretus stoutii* nur geringe Sequenzhomologien zu den cytoplasmatischen Keratinen aufweisen, wurden die Schleimkeratine als Typ I- bzw. Typ II IF-Proteine bezeichnet (Koch et al., 1994; 1995). Hier sind vor allem deren Expression in der Epidermis, das Vorkommen Glycin- und Serin-reicher Motive in der Kopf- und Schwanzdomäne (wie sie typischerweise in E-Keratinen auftreten) und deren Eigenschaft, miteinander Heterodimere formen zu können (Spitzer et al., 1984, 1988) als keratintypische Eigenschaften zu erwähnen, aufgrund derer die Schleimkeratine schlussendlich als Typ I- bzw. Typ II IF-Proteine klassifiziert wurden (Koch et al., 1994; 1995). Zwar konnten in *in vitro*-Versuchen nach Vermischen von äquimolaren Mengen TK α und TK γ 8-11 nm dicke Filamente dokumentiert werden, jedoch liegen die Schleimkeratine des Schleimaals im lebenden Tier in Form höherer Fadenstrukturen vor, welche ca. 3 μ m dick und bis zu 60 cm lang werden können (Downing et al., 1981; 1984). Diese höheren Strukturen wurden bisher noch bei keinem anderen Tier und bei keinem bekannten IF-Protein beschrieben.

Da die Schleimkeratine TK α und TK γ mittlerweile auch in weiteren aquatisch lebenden Wirbeltieren wie Knochenfischen und Amphibien gefunden wurden, jedoch zu Beginn meiner Arbeit noch nicht weiter untersucht waren, sollten im Rahmen dieser Arbeit die Bindungseigenschaften von TK α und TK γ im Zebraquariabläschling *Danio rerio* charakterisiert werden. Dabei wurden äquimolare Mengen von rTK α und rTK γ vermischt und sukzessiv hin zu niedrigen Harnstoffkonzentrationen dialysiert. Abschließend wurde gegen einen Assemblierungspuffer dialysiert und die gebildeten Strukturen elektronenmikroskopisch untersucht. Ergänzend zur elektronenmikroskopischen Analyse konnten mit Hilfe von Overlay-Assays die Bindungspartner von rTK α bzw. rTK γ ermittelt werden.

Bildung von heteromeren Strukturen aus TK α und TK γ

Da die *in vitro*-Assemblierung der Intermediärfilamente von äußeren Faktoren wie z.B. der Salzkonzentration und des pH-Wertes im Assemblierungspuffer abhängt, wurden in dieser Arbeit vorerst Bedingungen gewählt, wie sie für *in vitro*-gebildete Keratine typischerweise verwendet werden (siehe Ergebnisse; Tabelle 2). Unter diesen Bedingungen (es wurden die Salzkonzentrationen und der pH-Wert variiert) formten sich globuläre Strukturen von 10-20 nm Durchmesser (siehe Abb. 12; b). Zusätzlich konnten stets Strukturen dokumentiert werden, welche in Form und Größe den ULFs (unit lengt filaments) der Typ I-III IF-Proteinen ähneln. Obwohl diese 12 nm dicken und 40-70 nm langen Strukturen auch solitär auftraten, bildeten diese bevorzugt Aggregate. Dabei wurden „Knäuel“-artige Strukturen dokumentiert (siehe Abb. 12; e), allerdings zeigten die an ULFs erinnernde Strukturen die Tendenz, sich bevorzugt longitudinal aneinander zu lagern (siehe Abb. 12; g). Obwohl unter

den Bedingungen, wie sie normalerweise für die *in vitro*-Assemblierung von Keratinen verwendet werden, lediglich globuläre und an ULFs erinnernde Strukturen vorzufinden waren, konnte in einer Präparation (200 mM Tris/HCl; pH 7.0) ein einzelnes Filament detektiert werden (siehe Abb. 12; b). Obwohl es in seinem Durchmesser (ca. 10 nm) und äußeren Erscheinungsbild einem Intermediärfilament gleicht, wurde es in dieser Arbeit aufgrund seiner geringen Länge (0,5 µm) als Filamentoid bezeichnet.

Nachdem sich unter den Bedingungen, wie sie für die Assemblierung von Keratinen verwendet werden, keine typischen Intermediärfilamente ausbildeten, wurden daraufhin Typ III IF-Protein-spezifische Assemblierungsbedingungen gewählt, da wie bereits erwähnt das TK γ eine Typ III IF-Protein-spezifische Genstruktur besitzt. Unter diesen Bedingungen formten sich ebenfalls globuläre sowie ULF-artige Strukturen (siehe Abb. 12, d). Allerdings konnten unter diesen Bedingungen keine Filamentoide bzw. Filamente dokumentiert werden. Mit CaCl₂ versetzter Assemblierungspuffer erzielte bei Neurofilamenten (bei denen es sich um Typ IV-IF Proteine handelt) allerdings bessere Resultate bei der spontanen Zusammenlagerung zu Filamenten (Gu et al., 2004). Daher habe ich entsprechende Assemblierungspuffer (2 bis 50 mM CaCl₂) verwendet. Dabei zeigten sich nur wenige Unterschiede zu den zuvor beschriebenen Strukturen. Allerdings konnte nach einer Inkubation in Assemblierungspuffer mit einer 10 mM CaCl₂ Konzentration eine filamentartige Struktur dokumentiert werden (siehe Abb. 12; h). Zwar ist dieses Filamentoid länger (ca. 1,5 µm) als das zuvor beschriebene, jedoch besitzt es eine leicht „rauhe“ Oberfläche im Vergleich zu typischen Keratinfilamenten.

Obwohl im Rahmen dieser Versuche keine Bedingungen ermittelt werden konnten, bei denen die Schleimkeratine typische Intermediärfilamente formen, bildeten rTK α und rTK γ höhere Strukturen, welche in Form und Größe den ULFs der Typ I-III IF-Proteinen ähneln. Somit lieferten diese Versuche erste Hinweise darauf, dass sich die Schleimkeratine TK α und TK γ im Zebrafisch *Danio rerio* zu Heteromeren zusammenlagern. Um dies etwas näher zu beleuchten wurden die Bindungseigenschaften der Schleimkeratine mit Hilfe von Overlay-Assays untersucht. Dieser Assay wurde in Anlehnung an den bereits für Keratinnachweise verwendeten CKBB-Test entwickelt. Mit Hilfe des Overlay-Assays konnte ich zeigen, dass die Schleimkeratine TK α und TK γ im Zebrafisch zum einen vermutlich keine Interaktionen mit cytoplasmatischen Keratinen eingehen und zum anderen, dass TK α und TK γ miteinander Heteromere bilden (siehe Abb. 13; 14). Schlussendlich weisen auch die Daten aus der Expressionsanalyse auf die Bildung heteromerer Strukturen von TK α und TK γ hin, da beide Schleimkeratin-spezifischen Antiseren stets identische Reaktionsmuster aufwiesen und somit zumindest von einer Koexpression auszugehen ist. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass TK α und TK γ im Zebrafisch *Danio rerio* vermutlich Heteromere miteinander formen können, wurden in den *in vitro*-

Assemblierungsversuchen keine Filamente dokumentiert, wie sie typischerweise von Keratinen bekannt sind. Da ich jedoch mit dem Overlay-Assay eine Interaktion zwischen TK α und TK γ nachweisen konnte und die Daten der immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse a) auf eine Koexpression von TK α und TK γ und b) auf filamentöse Strukturen hindeuten, lässt sich vermuten, dass TK α und TK γ *in vivo* miteinander Filamente ausformen.

Bildung von homomeren Strukturen aus TK α

Sowohl die Studien am Schleimaal *Eptatretus stoutii* (Spitzer et al., 1984; 1988) als auch die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Schleimkeratine TK α mit TK γ miteinander interagieren. Allerdings ergaben sich im Schleimaal auch Hinweise, die auf einen besonderen Charakter von TK α hindeuten. In diesen Studien wurde das TK α aus den GTCs (gland thread cells) isoliert und biochemisch analysiert. Bei Durchführungen von PAGEs zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wanderte ein Großteil des TK α nicht in das Gel hinein. Daraufhin wurde die Vermutung aufgestellt, dass das TK α homopolymere Strukturen ausbilden kann, weshalb selbst bei hohen Harnstoffkonzentrationen (bis zu 8 M) eine Auftrennung mittels PAGE nur nach chemischer Modifikation (Carbamylierung) der Proteine möglich ist (Spitzer et al., 1984; 1988). Eine ähnliche Situation fand sich auch im Rahmen meiner Untersuchungen am TK α des Zebrafisches *Danio rerio*. Zwar kam es bei hohen Harnstoffkonzentrationen nicht zu Aggregationsprozessen, jedoch habe ich bei niedrigen Konzentrationen Hinweise auf homomere Strukturen von TK α erhalten: bei der Durchführung der Overlay-Assays wurde die Biotinylierung von rTK α und rTK γ stets auf ihren Erfolg hin überprüft, indem die biotinylierten Proteine nach einer SDS-PAGE auf Nitrocellulose transferiert wurden und anschließend der Biotinylierungsgrad anhand der Intensität einer Farbreaktion abgeschätzt werden konnte. Ein Teil des biotinylierten rTK α , welches zuvor gegen 0 M Harnstoff dialysiert wurde, wanderte nicht in das Gel ein (Ergebnisse wurden nicht abgebildet), was als Hinweis auf die Bildung homomerer Strukturen von TK α bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen gedeutet werden kann. Ähnliche Phänomene treten erfahrungsgemäß auch nach der Biotinylierung von Typ III-IF Proteinen auf, die ja bekanntermaßen Homopolymere formen, wohingegen nach der Biotinylierung von cytoplasmatischen Keratinen (die bekanntermaßen Heteropolymere bilden) solche Erscheinungen nicht auftreten (unveröffentlichte Daten).

Einen weiteren Hinweis auf diesen speziellen Charakter von TK α lieferten die Overlay-Assays bei Durchführung unter verschiedenen Harnstoffkonzentrationen im Bindungspuffer (siehe Abb. 13). Bei Harnstoffkonzentrationen über 4 M kam es zu keiner Bindung von rTK α an rTK γ . Bei Harnstoffkonzentrationen zwischen 2 M und 4 M bindete das rTK α an das rTK γ . Dabei fällt auf, dass die Intensität der Reaktion bei 3 M am Stärksten ist und hin zu niedrigen Harnstoffkonzentrationen wieder abnimmt, so dass bereits bei einer Konzentration von 1 M

Harnstoff keine Farbreaktion mehr eintritt. Ein solches Reaktionsoptimum bei 3 M Harnstoff könnte dadurch zustande kommen, dass bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen das biotinylierte rTK α homomere Strukturen ausbildet und somit entsprechend weniger biotinyliertes rTK α für die Bindung an das rTK γ zur Verfügung steht.

Da die Overlay-Assays auf diese spezielle Eigenschaft von TK α im Zebrafisch hindeuteten, wurde daraufhin das rTK α elektronenmikroskopisch analysiert. Hierbei wurden Harnstoffkonzentrationen von 0-10 M im Assemblierungspuffer ausgetestet. Bei Konzentrationen von 0 M bis 2 M Harnstoff formte das rTK α 10-12 nm dicke, filamentartige Strukturen (siehe Abb. 12; i), die sich jedoch in folgenden Punkten von typischen Keratinfilamenten unterscheiden: a) deren Länge ist mit unter 300 nm sehr gering, b) die Filamentoide haben eine „brüchige“ bzw. „rauhe“ Oberfläche und c) sind diese Filamentoide stark gebogen, so dass einige Filamentoide sogar annähernd ringförmige Strukturen ausbilden. Das TK α des Schleimaals formt *in vitro* ebenfalls filamentartige Strukturen, jedoch besitzen diese lediglich einen Durchmesser von 6 nm (Spitzer et al., 1984). Da bisher keine TK α -Homopolymere im Gewebe nachgewiesen wurden, bleibt vorerst offen, ob das TK α auch unter physiologischen Bedingungen polymere Strukturen mit sich selbst ausbildet.

4 Identifizierung von TK α und TK γ in biochemischen Präparaten aus Gewebe

Für die biochemische Identifizierung wurden drei unterschiedliche Methodenansätze verwendet. Zuerst wurden Hinweise gesammelt, ob die Schleimkeratine in Cytoskelettpräparationen aus Larven und kompletten adulten Tieren als erkennbare Spots auftreten. Hierfür wurden zum Einen Cytoskelettpräparationen zweidimensional aufgetrennt und zum Anderen die rekombinanten Schleimkeratine rTK α und rTK γ entsprechenden Cytoskelettpräparationen beigemischt und ebenfalls zweidimensional aufgetrennt (Koelektrophorese). Durch Vergleich beider Proteinmuster konnte gezeigt werden, dass in den Cytoskelettpräparationen ohne Zugabe von rTK α und rTK γ an den entsprechenden Stellen keine erkennbaren Proteinspots vorhanden sind (siehe Abb. 15; a, c).

Da die Schleimkeratine TK α und TK γ für eine Detektion im Gel jedoch auch in zu geringen Mengen vorliegen könnten, wurden daraufhin sensitivere Methoden zur biochemischen Identifizierung verwendet. Wie zuvor bereits erwähnt, bindet in den Overlay-Assays das biotinylierte rTK α lediglich an rTK γ und *vice versa* das biotinylierte rTK γ an das rTK α , weshalb sich dieser Assay für einen spezifischen Nachweis von TK α bzw. TK γ im Zebrafisch anbietet. Entsprechend wurden zuvor auf Nitrocellulose transferierte Proteinmuster aus Gesamtpräparationen mit den biotinylierten rTKs behandelt. Nach Inkubation mit biotinyliertem rTK γ konnte ein Protein detektiert werden, welches die gleichen

physikochemischen Eigenschaften wie das rTK α aufweist (siehe Abb. 15; d). Der Nachweis von TK γ konnte allerdings mit dieser Methode nicht erzielt werden, da auch nach einstündiger Farbreaktion keine diskrete Reaktion auftrat. Schlussendlich wurden zur Identifizierung von TK γ auf Nitrocellulose transferierter Proteinmuster aus Gesamtpräparationen mit dem Anti TK γ -Antiserum behandelt. Hierbei wurde ein Protein angefärbt, welches identische Laufeigenschaften wie das rTK γ besitzt und bei dem es sich vermutlich um das TK γ des Zebraäbrlings handelt. Entsprechend wurden Membranen mit dem Anti TK α -Antiserum behandelt. Dabei reagierte das Antiserum mit einem Proteinfleck, der identische physikochemische Eigenschaften zum rTK α und somit auch zum Protein, welches im Overlay-Assay als TK α identifiziert wurde, besitzt. Hierbei sei angemerkt, dass beide Anti-TK Antiseren jeweils auch cytoplasmatische Keratine erkannt haben. Daraufhin habe ich die Reaktionsmuster aus meiner immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (siehe Abb. 18) mit den bereits publizierten Expressionsmustern der entsprechenden Keratine (siehe Conrad et al., 1998) verglichen. So reagierte beispielsweise das Anti TK α -Antiserum auf Immunblots mit dem epidermalen Keratin K1, welches bekannterweise in der gesamten Epidermis exprimiert wird. Da das Anti TK α -Antiserum auf Gefrierschnitten in der Epidermis jedoch lediglich die basale Zellschicht in unbeschuppten Hautpartien erkannte (siehe Abb. 18; a', b'), handelt es sich bei der Kreuzreaktion mit dem Keratin K1 auf dem Immunblot wahrscheinlich vielmehr um eine Hintergrundreaktion als um eine Kreuzreaktion. Obwohl beide Anti-TK Antiseren auf dem Immunblot unterschiedliche cytoplasmatische Keratine erkannten, waren die Reaktionsmuster beider Antiseren in den immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen identisch. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Anti-TK Antiseren spezifisch TK α bzw. TK γ erkennen und dass es sich bei den Reaktionen mit den cytoplasmatischen Keratinen vermutlich um Hintergrundreaktionen handelt.

5 Expression im Gewebe

Die Schleimkeratine TK α und TK γ werden im Schleimaal *Eptatretus stoutii* in speziellen Schleimdrüsen gebildet. Ungefähr 150 bis 200 solcher Drüsen finden sich entlang der ventro-lateralen Seite der Körperwand (Downing et al., 1984). Die Schleimkeratine werden extrazellulär ins umgebende Wasser sezerniert und modifizieren dort die viskoelastischen Eigenschaften des Schleims (Fudge et al., 2005). Der Schleim wird dabei zur Feindabwehr genutzt, indem der Schleimaal diesen dem Räuber in den Rachen „schießt“, wodurch Maul und Kiemen verstopft werden und eine Fluchtreaktion ausgelöst wird (Lim et al., 2006; Zintzen et al., 2011). Mittlerweile wird auch darüber spekuliert, ob der Schleim dem Beuteerwerb dient. So wird vermutet, dass die Schleimaale ihre Beutetiere packen und daraufhin mit Hilfe des Schleims ersticken (Zintzen et al., 2011). Eine solche extrazelluläre

Sezernierung von IF-Proteinen und die daran gebundene Modifikation der viskoelastischen Eigenschaften von Schleim wurde bisher nur beim Schleimaal beschrieben.

Nachdem die Schleimkeratine TK α und TK γ auch in weiteren Wirbeltiergruppen auf RNA/DNA-Ebene entdeckt wurden, konnten anhand von EST-Profilen erste Hinweise auf die Expression von TK α und TK γ im Zebraabärbling *Danio rerio* erbracht werden. Da die meisten für TK α - bzw. TK γ -kodierenden EST-Sequenzen in larvalen Entwicklungsstadien gefunden wurden und im gut untersuchten Modellorganismus Zebraabärbling bisher keine Hinweise auf spezielle Schleimdrüsen oder aber auch auf „Faden“-Strukturen beschrieben waren, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Funktion der Schleimkeratine in aquatisch lebenden Wirbeltieren innerhalb der embryonalen Entwicklung eine Rolle spielen könnte. Hierbei sei angemerkt, dass auch in adulten Zebraabärblingen für TK α - bzw. TK γ -kodierende EST-Sequenzen gefunden wurden, welche hauptsächlich aus regenerierendem Flossengewebe stammen (Schaffeld & Schultess, 2006). Da zu Beginn meiner Arbeit lediglich die Verteilungsmuster von TK α - bzw. TK γ -kodierenden EST-Sequenzen, jedoch noch keine Expressionsdaten auf Proteinebene bekannt waren, wurde in dieser Arbeit eine Entwicklungs- und Gewebe-spezifische Expressionsanalyse durchgeführt, um weitere Hinweise auf mögliche Funktionen von TK α und TK γ im Zebraabärbling *Danio rerio* zu erhalten.

Expression von TK α und TK γ in adulten Zebraabärblingen

Mit der Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Schleimkeratine TK α und TK γ im Zebraabärbling *Danio rerio* nicht wie im Schleimaal *Eptatretus stoutii* in speziellen Drüsen gebildet werden. Vielmehr werden TK α und TK γ im adulten Zebraabärbling in den basalen Zellen mehrschichtiger Epithelien koexprimiert, in denen keine Verknöcherung bzw. Beschuppung vorzufinden ist (Stirnhautepidermis, Zwischenflossenstrahl-Gewebe und Mukosaepithel des Oesophagus). Innerhalb dieser Zellen sind die Schleimkeratine an der basalen Zellseite konzentriert. Zur apikalen Seite hin nimmt das Fluoreszenzsignal ab.

Im Schleimaal hingegen formen die Schleimkeratine fadenförmige, bis zu 60 cm lange Strukturen. Die in speziellen Drüsen synthetisierten Fäden werden ans umgebende Meerwasser abgegeben und bilden mit zeitgleich ins Meerwasser sezernierten Schleimvesikeln eine Art Siebstruktur. Die Vesikel lagern sich an die Fäden und schwellen an. Auf diese Weise entstehen zwischen den Fäden Freiräume, in denen sich Wasser einlagern kann, in Folge dessen der Schleim seine volle Reife erlangt (Fudge et al., 2005). Da meine Untersuchungen am Zebrafisch *Danio rerio* keine Hinweise auf kabelartige Strukturen geliefert haben, ist von einer Schleim-modifizierenden Funktion von TK α und TK γ wahrscheinlich abzusehen. So beschränkt sich die Expression auf intrazelluläre Bereiche, in welchen die Schleimkeratine ein cytoplasmatisches IF-Netzwerk ausbilden. Vielmehr könnte

eine Funktion der Schleimkeratine in einer Formgebung mechanisch stark beanspruchter Körperpartien liegen, da die TK-exprimierenden Epithelien einerseits keinen mechanischen Schutz in Form von Schuppen aufweisen und andererseits gleichzeitig einer starken mechanischen Beanspruchung ausgesetzt sind.

Expression von TK α und TK γ in Zebrafischlarven

In Larven sind es ebenfalls Strukturen (Hautepidermis und Notochord), die einerseits mechanisch stark beansprucht werden und andererseits keinen Schutz in Form von Verknöcherung bzw. Beschuppung genießen, in welchen die Schleimkeratine TK α und TK γ koexprimiert werden. Allerdings unterstützen die Ergebnisse aus der immunfluoreszenz-mikroskopischen Analyse nur teilweise die aus der *in situ*-Hybridisierung erhaltenen Daten. Das Notochord wurde von den digoxigenierten Sonden erkannt, allerdings zeigte diese Stützstruktur mit den TK-spezifischen Antiseren keine Reaktion (siehe Abb. 19; b, b'). Jedoch wurden im Rahmen einer Untersuchung über Hemidesmosomen im Zebrafisch *Danio rerio* larvale Stadien immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert (Sonawane et al., 2005). Dabei sind Querschnitte angefertigt und mit dem Anti Keratin-Antikörper Pan1-8 inkubiert worden (siehe Abb. 21; a, b). In dieser besagten Studie reagierte der monoklonale Antikörper PAN1-8 einerseits mit der Körperwandepidermis (abgesehen vom ventro-lateralen Körperbereich) und weiterhin mit äußeren Bereichen des Notochords. Da dieser Antikörper in meinen Untersuchungen ein identisches Reaktionsmuster wie die Anti TK-Antiseren aufwies (abgesehen von der Sensitivität für Zellkernproteine) und in Immunblot-Analysen das TK α spezifisch erkannte (Unnold, 2008), kann davon ausgegangen werden, dass der Anti-Keratin Antikörper Pan1-8 im Notochord des Zebrafisches das Protein TK α erkannt hat (siehe Abb. 21). Da die Autoren jedoch nicht näher auf die Reaktion im Notochord eingehen, kann an dieser Stelle nicht mit Sicherheit gesagt werden, welche spezielle Struktur des Notochords vom Anti-Keratin Antikörper PAN1-8 erkannt wurde.

Beim Notochord handelt es sich um eine allen Chordaten gemeinsame Struktur, die neben einer Stützfunktion auch in entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt ist (Stemple, 2005). Die steife, aber flexible Struktur des Notochords dient als eine Art Anker, gegen den die kontrahierenden Muskeln agieren können, so dass dem Notochord eine fundamentale Rolle während der Lokomotion in larvalen Entwicklungsstadien zugesprochen werden kann. In der Entwicklung bilden sich aus dem Chordamesoderm vakuolisierte Zellen. Diese werden von einer Basalmembran umgeben, so dass dem enormen Turgordruck der vakuolisierten Zellen entgegen gewirkt werden kann, wodurch wiederum dem gesamten Notochord eine gewisse Steifheit und Härte verliehen wird (Adams et al., 1990). Die Basalmembran des Notochords baut sich aus drei Schichten auf. Zwar ist bekannt, dass in diesen drei Schichten ein Laminin- sowie ein Kollagennetzwerk miteinander verknüpft vorliegen (Colognato und

Yurchenco, 2000; Yurchenco und O'Rear, 1994), jedoch ist die komplette Zusammensetzung der Basalmembran bisher noch nicht aufgeklärt worden. Sollte sich jedoch herausstellen, dass es sich bei der Reaktion des monoklonalen Anti-Keratin Antikörpers PAN1-8 um die das Notochord umgebende Basalmembran handelt, wäre dies als erster Hinweis auf ein mögliches extrazelluläres Vorkommen von IF-Proteinen im Zebrafisch *Danio rerio* zu betrachten.

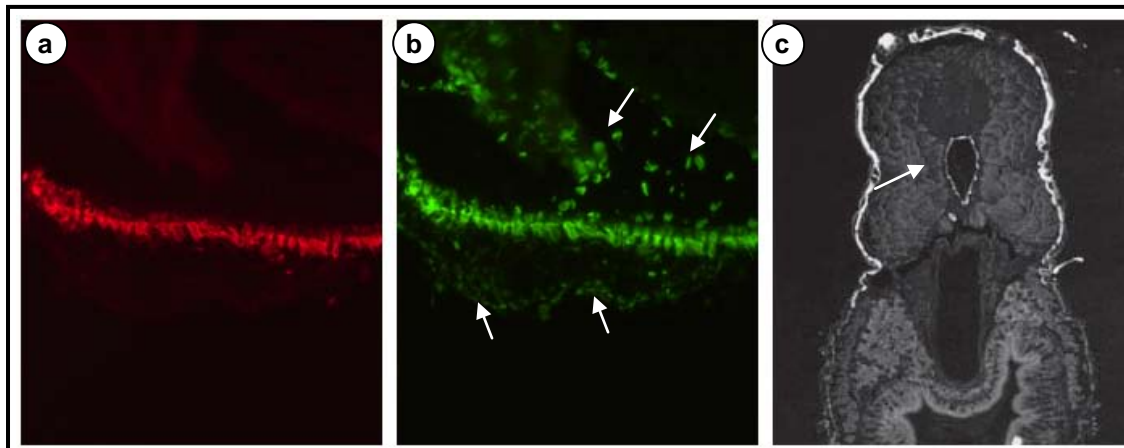


Abb. 21: Reaktionen des monoklonalen Anti-Keratin Antikörpers Pan1-8

– a. Der polyklonale Antikörper Anti-TK α färbt die basale Zellschicht der Epidermis im Bereich der Stirnhaut an. Der polyklonale Antikörper Anti-TK γ zeigt ein identisches Reaktionsmuster (nicht abgebildet) – b. Der monoklonale Anti-Keratin Antikörper Pan1-8 weist ebenfalls ein nahezu identisches Reaktionsmuster wie das Anti-TK α Antiserum auf. Lediglich die Zellkerne werden zusätzlich zu den basalen Epidermiszellen erkannt (Pfeile) – c. Der monoklonale Anti Keratin-Antikörper Pan1-8 erkennt im larvalen Entwicklungsstadium die basalen Strukturen der Körperwandepidermis (ausgenommen sind die Bereiche der ventro-lateralen Körperwand). Des Weiteren dekoriert der Antikörper die Basalmembran des Notochords (Pfeil). (aus Sonawane et al., 2005)

Die Expression von TK α und TK γ im Notochord könnte als Hinweis gedeutet werden, dass die Schleimkeratine diesem stark beanspruchten Stützorgan eine mechanische Integrität verleihen, bis sich innerhalb der Entwicklung verknöcherte Strukturen (Wirbel) ausbilden. Eine ähnliche Dynamik der Expression zeigt sich innerhalb der Hautepidermis. So werden die Schleimkeratine in frühen Entwicklungsstadien, in denen noch keine Beschuppung der Haut vorzufinden ist, in der gesamten Epidermis exprimiert. In adulten Tieren ist hingegen nur noch eine Expression in jenen Hautpartien nachzuweisen, die keinen mechanischen Schutz in Form von Schuppen bzw. Verknöcherung besitzen. Neben einer möglichen mechanischen Funktion der Schleimkeratine (mechanische Integrität stark beanspruchter Gewebe wie Epithelzellen und die Zellen des Notochord) weisen Untersuchungen am Glatten Krallenfrosch *Xenopus laevis* auch auf eine entwicklungsbiologische Funktion von TK α und TK γ hin. Im Krallenfrosch induziert eine Überexpression von TK α und TK γ die Akkumulation von T-Zellen, welche wiederum die Apoptose und somit die Degeneration des Schwanzes während der Metamorphose einleiten. So konnten diese degenerativen Prozesse während der Metamorphose durch einen *Knock-Down* von TK α bzw. TK γ

verhindert werden und ergänzend dazu konnte durch Überexpression von TK α bzw. TK γ eine vorzeitige Degeneration des Schwanzes künstlich induziert werden (Mukaigasa et al., 2009). Hierbei sei angemerkt, dass sich die Schleimkeratine in *Xenopus*-Larven im Schwanzgewebe sowie im Notochord konzentrieren. Zwar durchläuft der Zebrafisch *Danio rerio* keine Metamorphose, jedoch könnten die im Notochord exprimierten Schleimkeratine ebenfalls für die Larvalentwicklung wichtige Funktionen aufweisen, da das Notochord im Zebrafisch bekannterweise für diverse entwicklungsbiologische Vorgänge von hoher Bedeutung ist. So wird beispielsweise die Länge der Körperachse während der embryonalen Entwicklung im Zebrafisch maßgeblich vom Notochord reguliert (Odenthal et al., 1996; Parsons et al., 2002; Stemple et al., 1996). Murcanio et al. konnten im Jahr 2002 demonstrieren, dass die Entwicklung der Flosse im Zebrafisch, speziell die Länge und Bifurkation der Flossenstrahlen, u.a. von dem Zwischenflossenstrahl-Gewebe gesteuert wird. Dabei wurde in der basalen Zellschichten der Epidermis des Zwischenflossenstrahl-Gewebes ein Faktor nachgewiesen, welcher die Bifurkation der Flossenstrahlen einleitet. Da im afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* bereits eine entwicklungsbiologische Funktion der Schleimkeratine nachgewiesen werden konnte, ist auch im Zebrafisch *Danio rerio* eine Funktion innerhalb von Entwicklungsvorgängen denkbar.

6 Evolutive Aspekte der Schleimkeratine

Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass es sich bei den Schleimkeratinen um eine Sonderform der Typ I- bzw. Typ II IF-Proteine handelt, deren Vorkommen sich wie damals vermutet wurde auf den Schleimaal beschränkt (Koch et al., 1995). Nachdem TK α und TK γ auch in weiteren Wirbeltiergruppen entdeckt wurden, konnte gezeigt werden, dass sich die Schleimkeratine an der Basis des Keratinstammbaumes abspalten (Schaffeld & Schultess, 2006) und somit eine ursprüngliche Form der Keratine repräsentieren. Die Schleimkeratine könnten somit eine Art Übergangszustand zwischen den „keratinartigen“ IF-Proteinen der niederen Chordaten und den cytoplasmatischen Keratinen der Wirbeltiere darstellen. In der Seescheide *Ciona intestinalis* konnten zwei keratinartige IF-Proteine (Karabinos et al., 2004) und im Lanzettfisch *Branchiostoma lanceolatum* fünf keratinartige IF-Proteine (Karabinos et al., 2002) identifiziert werden. Obwohl diese in der Lage waren, Heterodimere zu bilden, haben die keratinartigen IF-Proteine im Lanzettfisch eine Genstruktur, die in ihrer Organisation der von Typ III IF-Proteinen gleicht (Wang et al., 2002). Eine ähnliche Situation findet sich bei dem TK γ im Zebrafisch *Danio rerio*. So wurde das TK γ aufgrund seiner Eigenschaft im Schleimaal, Heterodimere formen zu können, aber auch aufgrund seiner epidermalen Expression und E-keratintypischer Sequenzmotive als Typ I Keratin eingeordnet (Koch et al. 1995). Allerdings konnten Schaffeld und Schultess im Jahr 2006 zeigen, dass

die Genstruktur des TK γ im Zebra**är**bling nicht die Organisation aufweist, wie sie typischerweise bei Keratinen auftritt. Vielmehr besitzt das TK γ eine für Typ III IF-Proteine typische Genstruktur (Schaffeld und Schultess, 2006). Die basale Stellung im Keratin-Stammbaum, die Genstruktur von TK γ und die in dieser Arbeit aufgezeigte Eigenschaft von TK α Homopolymere bilden zu können, deuten auf einen Typ III IF-Protein-artigen, gemeinsamen Vorläufer der Keratine hin.

Bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde angenommen, dass die extrazelluläre Sezernierung an das umgebende Wasser und die Bildung von kabelartigen Strukturen eine Eigenheit der Schleimkeratine TK α und TK γ darstellen. Den Ergebnissen meiner Arbeit folgend scheinen die Schleimkeratine allerdings im Zebra**är**bling *Danio rerio* keine analogen Funktionen zu besitzen, was die Frage aufwirft, welches den ursprünglicheren Zustand innerhalb der Evolution repräsentiert. So ist es nur schwer vorstellbar, dass sich aus den hochspezialisierten Schleimkeratinen des Schleimaals *Eptatretus stoutii* im Laufe der Evolution erneut ein ursprünglicher Zustand etabliert hat, so dass die Schleimkeratine in modernen Knochenfischen in intrazellulären Filamentnetzwerken organisiert vorliegen. Demnach könnte es sich bei den im Zebra**är**bling *Danio rerio* nachgewiesenen, intrazellulär exprimierten Schleimkeratinen um eine ursprüngliche Form von TK α und TK γ handeln, aus denen die hochspezialisierten Schleimkeratine des Schleimaals hervorgegangen sind. Hierbei ist auch vorstellbar, dass in Folge von Radiationseignissen weitere Isoformen entstanden sind, aus denen sich die hochspezialisierten Schleimkeratine TK α und TK γ des Schleimaals entwickelt haben. Diesbezüglich wäre von weiteren TK α - bzw. TK γ -Isoformen im Schleimaal auszugehen, die möglicherweise intrazelluläre Netzwerke ausbilden und analoge Eigenschaften zu den Schleimkeratinen des Zebra**är**blings *Danio rerio* aufweisen. Anhand von Studien an einem weiteren Vertreter der Agnathen, dem Flussneunauge *Lampetra fluviatilis*, konnten bereits zwei Isoformen von TK α (TK α_1 und TK α_2) und drei Isoformen von TK γ (TK γ_1 , TK γ_2 und TK γ_3) als cDNA isoliert werden (Schultess, 2001; Schaffeld und Schultess, 2006). Allerdings sind deren Expressionsorte bisher noch nicht ermittelt worden, weshalb keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob und ggf. welche der Isoformen im Flussneunauge intrazelluläre Netzwerke formen bzw. extrazellulär Funktionen übernehmen.

7 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde eine Basis geschaffen, um die Schleimkeratine TK α und TK γ im Modellorganismus Zebra**är**bling *Danio rerio* auf funktionelle Aspekte hin zu untersuchen. So wurden die Schleimkeratine biochemisch identifiziert und deren Bindungseigenschaften charakterisiert. Mit der Expressionsanalyse konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass

die Funktion der Schleimkeratine im Zebraabärbling in einer Integrität von mechanisch stark beanspruchten Geweben liegen könnte.

Zwar lassen die Daten dieser Arbeit vermuten, dass die Schleimkeratine im Zebraabärbling keine höheren „Faden“-Strukturen bilden, jedoch konnte dies nicht eindeutig bestätigt werden. Mit weiteren elektronenmikroskopischen Untersuchungen und weiteren immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen sollte dieser Frage weiter nachgegangen werden, um schlussendlich zu klären, welche Strukturen die Schleimkeratine im Zebraabärbling *Danio rerio* ausformen. Hierbei gilt auch zu klären, ob das TK α unter bestimmten Bedingungen möglicherweise typische Intermediärfilamente formen kann und ob diese homomeren Strukturen auch im lebenden Organismus synthetisiert werden. Allerdings zeigten die Anti-TK-spezifischen Antiseren auf Gewebeschnitten stets identische Reaktionsmuster, die auf ein Netzwerk hindeuten, welches gemeinsam von TK α und TK γ aufgebaut wird. Da dieses Netzwerk nicht die gesamte Zelle ausfüllt, sondern sich an der basalen Zellseite konzentriert, stellt sich die Frage, ob innerhalb dieser Zellen noch ein weiteres IF-Netzwerk existiert oder ob das Schleimkeratin-Netzwerk alleine alle IF-Protein-spezifischen Aufgaben in diesen Zellen bewältigen kann.

Die Schleimkeratine TK α und TK γ weisen im Zebraabärbling ein entwicklungs-spezifisches Expressionsmuster auf. So werden die Schleimkeratine im larvalen Stadium scheinbar nicht in der Flossenepidermis exprimiert, sondern hauptsächlich im Notochord sowie in der Epidermis. Da sich in adulten Tieren die Expression auf wenige Zellen bestimmter Epidermisbereiche beschränkt, sollte der Übergang zwischen dem larvalen und adulten Expressionsmuster dargestellt werden. Zwar deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Funktion der Schleimkeratine im Zebraabärbling in einer mechanischen Integrität bestimmter Zellen liegt, jedoch ist eine Funktion innerhalb der Larvalentwicklung nicht abwägig, wie ja bereits im Krallenfrosch *Xenopus laevis* demonstriert werden konnte (Mukaigasa et al., 2009). So könnten mit *yeast two-hybrid* Analysen weitere mögliche Interaktionspartner von TK α bzw. TK γ identifiziert werden, um dadurch Hinweise auf entwicklungsbiologische Funktionen innerhalb der Larvalentwicklung zu erhalten. Mit Hilfe von *Knock-Down* Experimenten könnten die direkten Auswirkungen von TK α und TK γ auf den Organismus ermittelt werden, so dass schlussendlich die Funktionen der Schleimkeratine im Zebraabärbling aufgeklärt werden könnten.

Die Schleimkeratine wurden mittlerweile in mehreren aquatisch lebenden Wirbeltiergruppen gefunden. Im Krallenfrosch *Xenopus laevis* wurden auch erste Hinweise auf deren Funktion gesammelt. Da sich die Funktionen der Schleimkeratine im Schleimaal *Eptatretus stoutii* von denen des Zebrafisches und des Krallenfrosches offensichtlich enorm unterscheiden, ist es für ein Gesamtverständnis über diese besondere IF-Proteingruppe erforderlich, die entsprechenden Proteine auch in weiteren Tiergruppen genauer zu untersuchen. Da ich im

Rahmen meiner Untersuchungen gezeigt habe, dass unbeschuppte Hautpartien in adulten Zebraabräblingen ein Schleimkeratinnetzwerk ausbilden, könnten Untersuchungen an schuppenlosen Knochenfischen wichtige Erkenntnisse liefern, um die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese bezüglich der Integrität von mechanisch stark beanspruchten Geweben zu überprüfen. Zwar besitzen die Schleimkeratine wie bereits beschrieben neben ihren Keratineigenschaften auch Keratin-untypische Charakteristika. So wurde bereits von Koch et al. (1994; 1995) angemerkt, dass eine Einteilung der Schleimkeratine in eine eigene IF-Proteingruppe möglicherweise sinnvoll wäre. Da mittlerweile die Schleimkeratine auch in Knochenfischen und Amphibien entdeckt wurden, konnte anhand phylogenetischer Stammbaumanalysen gezeigt werden, dass diese in einem Schwestergruppenverhältnis zu den restlichen cytoplasmatischen Keratinen stehen (Schaffeld & Schultess, 2006). Die Typ III IF-Protein-spezifische Genstruktur von TK γ im Zebrafisch *Danio rerio*, aber auch die in dieser Arbeit dokumentierten TK α -Homopolymere sind weitere Eigenschaften, die für die Zuordnung der Schleimkeratine TK α und TK γ in eine eigene IF-Protein Gruppe sprechen.

E Zusammenfassung

Die Schleimkeratine TK α und TK γ aus dem Schleimaal *Eptatretus stoutii* besitzen für Keratine außergewöhnliche Eigenschaften. In speziellen Drüsen reifen die Schleimkeratine zu 3 μ m dicken und bis zu 60 cm langen kabelartigen Filamenten heran und werden anschließend zur Feindabwehr ins umgebende Wasser extrazellulär sezerniert, wodurch die viskoelastischen Eigenschaften des Schleims modifiziert werden. Mittlerweile wurden die Schleimkeratine auch in höheren Wirbeltiergruppen (Knochenfische und Amphibien) entdeckt. Zu Beginn meiner Promotion war jedoch bis auf EST-Verteilungsprofile noch nichts über die Expression und Funktion der Schleimkeratine in diesen Organismen bekannt.

Im Rahmen meiner Arbeit wurden die Schleimkeratine TK α und TK γ erstmalig im Zebraärbling *Danio rerio* identifiziert und näher charakterisiert. Mittels rekombinanter Expression wurden TK α und TK γ in ausreichenden Mengen hergestellt und auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht. Hierbei konnte ich zeigen, dass TK α und TK γ einerseits miteinander Heteromere formen und andererseits, dass das TK α in der Lage ist, auch homopolymere Strukturen auszubilden. Letztere Eigenschaft wurde bisher noch bei keinem bekannten cytoplasmatischen Keratin beschrieben. Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Schleimkeratine im Zebraärbling nicht extrazellulär sezerniert werden und zum anderen keine höheren, kabelartigen Strukturen ausformen. Vielmehr werden die Schleimkeratine bei adulten Tieren in den basalen Zellschichten der Epidermis exprimiert, welche keinen mechanischen Schutz in Form von Schuppen aufweisen (Stirnhautepidermis, Epidermis in Geweben zwischen den Flossenstrahlen). Innerhalb dieser Zellen formen die Schleimkeratine ein filamentöses Netzwerk aus, das sich an der basalen Zellseite konzentriert. Eine mögliche Funktion von TK α und TK γ könnte demnach in der Erhöhung der mechanischen Integrität von stark beanspruchten Geweben liegen, die keinen Schutz in Form von Schuppen aufweisen. So werden TK α und TK γ in larvalen Entwicklungsstadien in der Epidermis, sowie im mechanisch stark beanspruchten Notochord koexprimiert.

Da das Notochord im Zebraärbling auch in entwicklungsbiologischen Vorgängen eine entscheidende Rolle spielt und weiterhin in aktuellen Untersuchungen am glatten Krallenfrosch *Xenopus laevis* Funktionen der Schleimkeratine TK α und TK γ innerhalb von Degenerationsprozessen während der Metamorphose nachgewiesen werden konnten, sind auch im Zebraärbling *Danio rerio* Funktionen der Schleimkeratine TK α und TK γ im Rahmen von Entwicklungsprozessen denkbar.

F Anhang

1 Abkürzungen

1.1 Allgemeine Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
BD	Big dye
BNHS	Biotinyl-N-hydroxysuccinimid
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
C	Cytosin
ca.	circa
CCD	Charge-coupled device
cDNA	Copy- bzw. auch complement-DNA
CKBB	Complementary keratin blot-binding
Da	Dalton
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DS	Downstream
ds DNA	Double-stranded DNA

DTT	Dithiotreithol
dUTP	2'-Deoxyuridine, 5'- Triphosphate
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EST	Expressed sequence tag
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (Mittelwert $g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
ggf.	gegebenenfalls
GMC	Gland mucous cell
GTC	Gland thread cell
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dd}	Bidestilliertes Wasser
IC	Ionenaustausch-Chromotographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Intermediärfilament
Ig	Immunglobulin, Antikörper
IP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranoside
K	Keratin
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase (1000 Nukleotide)
KDa	Kilodalton (1000 Dalton)
L	Liter
LB	<u>L</u> ysogeny <u>b</u> roth (Nährmedium)
M	Molar
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
M _r	relative Molekülmasse
mRNA	Messenger RNA

NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
p. A.	<i>Pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHC	Sequenzhomologiekategorie
SSC	Saline sodium citrate
ss RNA	Single-stranded RNA
T	Thymin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS/TBST	Tris-Buffered-Saline / and Tween
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TE	Tris-EDTA
TK	Schleimkeratin (thread keratin)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ULF	Unit length filament

Upm	Umdrehungen pro Minute
US	Upstream
UTR	Untranslated region (Untranslatierter Bereich)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (volume/volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight/volume)
w/w	Gewicht pro Gewicht (weight/weight)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1.2 Abkürzungscode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin

M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

2 Verwendete Primer

Name	<i>forward/ reverse</i>	Sequenz (in 5' - 3' Orientierung)
TK α forward	<i>forward</i>	CTGACCGAGCACCG
TK α reverse	<i>reverse</i>	TGAATAAACAACCTCATAAGT
TK γ forward	<i>forward</i>	AGAATCTCACCCATAACTCTTT
TK γ reverse	<i>reverse</i>	CTTTATTGGAGAAACAGTGG
α Nde	<i>forward</i>	CTGAGTGCC ATATGA CAGAGCAAGC
α BamH1	<i>reverse</i>	TCATAAGTGGATCCTGAGAGTCTTCAGTAAACA
γ Nde	<i>forward</i>	CACCCATAACTCTTTCATATGTCTCTGTCCA
γ BamH1	<i>reverse</i>	CTTGATGGATCCCAGAGTTTAGGAGGATTC
PW- α 251	<i>forward</i>	CCTTGGCGGAGGTTCTCTGGC
PW- α 816	<i>forward</i>	TCTCTGGAGCTTGACTGGACGG
PW- α 1432	<i>forward</i>	TCA CCGCCTATA AGA AGCTCCTGG
PW- γ 199	<i>forward</i>	ACTTGGCCTTGGTGGAGGTG
InSitu α _f	<i>forward</i>	GCCATTATTGAGGACGATCAGG
InSitu α _r	<i>reverse</i>	AGAACTAGGCTGCGAGGATACAGAC
InSitu γ _f	<i>forward</i>	GGAGATTGAGCTGGACAACGTCAGG
InSitu γ _r1	<i>reverse</i>	TTCCTGGCTGATGTGATCTCTGCT
InSitu γ _r2	<i>reverse</i>	CAGTGACCGTCTGCATCTCATCC

3 Immunisierungsprotokolle

Tierart: 1.1.1 Kaninchen *Stamm:* NZW *Geschlecht:* weiblich *Herkunft:* 1.1.2 CR-Kisslegg

Lagerung: - 20°C *Dosierung:* 0,3 ml *Konzentration:* 1 mg / ml *Adjuvans:* 1. Injektion CFA
ab 2. Injektion IFA

Antigen:

Name:
Zebrafish TKa

Immunisierung:

Datum	Tag	Maßnahme
13.02.08	0	Präimmunserum / 1. Injektion
12.03.08	28	2. Injektion
25.03.08	38 +3	1. Serumprobe
26.03.08	42	3. Injektion
04.04.08	52 -1	2. Serumprobe
10.04.08	56	4. Injektion
24.04.08	70	Entblutung

Antigen:

Name:
Zebrafish TKy

Immunisierung:

Datum	Tag	Maßnahme
05.03.08	0	Präimmunserum / 1. Injektion
02.04.08	28	2. Injektion
11.04.08	38 -1	1. Serumprobe
16.04.08	42	3. Injektion
25.04.08	52 -1	2. Serumprobe
30.04.08	56	4. Injektion
14.05.08	70	Entblutung

4 cDNA-Sequenzen

4.1 TK α

ATGACAGAGTCAAGCTTGCGGATCAGTGGGGGCGCCGTGAGATTGGAGCCACCTATGGAGGCAAC
CGTCTGTTCTCTGGAGCCCGGAGTGGTGGAGGCGCCAGCTCGGCTCTGCCCCGTTCACTCGGCCTGG
CAAGGGGAGGAGGTTTGGGTTTAGGTTTTGGTGTCTGGAGCCGGGGCCGGGGCCGGTGCAGGTGCT
GGATTGGGCCTTGGCGGAGGTTCTCTGGCTCTCGGTGGTGGTCTTGGGTTAGGTGGTGGTCTTGGG
TTGGGTGCCGGTGGTGCCAGAGCAGCAGGCGTCAGGGCTGGTGTGGCTCACCTGAGATCTCATCTG
GGTGGCAGAGTGTTTAAAATCGGAGGCTACGTTTTAAACCCATCCTTCATCAGCTCTACCACCACAGT
GGATGCAGGTGTCAGTCCGATGCCAGCATTGACCCCTCGCTTCCATCACCAGACACAGTTCAGGTC
ACACGCATGAAGGAGAAGGAGGAAGTGCAGGCCCTCAATGATAAATTTGCCTCATTATTGATAAGG
CACGGTCTCTGGAGCAGCACAATGCAGTACTCAGAGCCAAGATTTCTATGTTTACTAACCCGGAGCA
GGCGGACCTGCCAACACCTCCGTTCTTCTGACCTCTGCCATCGGGGCGTACAAATCTCAGATTGACA
GCCTCTTCTACTAAAGAGGCCATAATTGCTGAGATTGAACACTTTAAAGCCATTATTGAGGACGAT
CAGGCCAGGTATGAAGAGGAAACCTCTCAAACCAATCTCTGGAGCTTGACTGGACGGCGTTGAAA
GAGGAAGTGATAATCTGTACCTTACCCTCTTGAGCTGCAGACCAGCATCTGTGGTTTTGGAGGATC
AAATTGCTCTGTCCAAGCAGGTGTATGATGCTAAAGTGAAAGAGGTGAGGACTATCGTGAAGTGTG
GAGTGAAGTCTGCCGTGTCGATCTCGGTGGATAATGCAGCCCAGGCACAGGACCTGACCTCAGCGC
TGACCGAAGTCAAAGCTCACTATGAAACCCTGGCTCAACGCAGCAAGCAAGAAGCTCTGGTCTCAGT
GCAGGACAGTCTCTCCATGATGTCTGTATCCTCGCAGCCTAGTTCTCAAACACTCACCTCAGCCAAAG
ACGAGCTCAGGGCTTACAACTACAGATCGACTCTGTGCAGAGGGAGATCGAGAGGCTCAAGTCTC
TGAAGTGCAGCTGGAGTCTCAGGTGGAGGAGGCCGAGTGTCACTCCAAGTCTCATAACAGAGACGT
ATCAGGATCAGGTTCTGACTCTCAAGTCTCAGCTTGATGATCTGAGGAAGCAAATCACTCAATATGGT
CAGGAATATCAGGAGCTTCTGGCCAGCAAGATGTCTCTGGACGTGGAAATCACCGCCTATAAGAAGC
TCCTGGACAGCGAGGAGAACAGGCTGAAGTCTGGAGGAGGGGTCACTGTGCACATGTCCAAGACTC
TGCTTGGCGGAGGAGCAGGAGGAGCTGGAGGTCTGGGTGCAGGTGCAGGAGGCGCAGGTCTGGG
TGGAGGTGCTGGTCTGGGTCTTGGAAAGTGGATTTGGGCTCGGTGGAGGTCTTGGAGGAGGTCTAG
GAGGAGGTCTAGGTGGAGGTCTTGGAGGAGGTCTAGGTGGAGGTCTTGGACTAGGACTCGGTGGA
GACTGGGTTTTGGAGCAGGAAGTTCCTTCGGTGCAGGAAGCAGTTTTATGTCCTCAAGCCTGAGCA
GCAGTGGCCTGTCGTCCACTGTTTACTGA

4.2 TK γ

ATGTCTCTGTCCATTTCAATGGCCTCCTCCAGGATGTCTGGTGGATATGGAGGTTTTCGGTGCGGGTG
GTGGAGCAAGGCTGGGTCTCGGGCTGGGGGTGGTGTGCGTTTTAGGTAGAGGTCTTGGTCTGGGG
GGAGGACTTGGATATGGTGCGGGTGGAGGTTTTGGACTTGGCCTTGGTGGAGGTGCAGGGGCAGG
TGCGGGATTGGCACTGGGTGGTGGTGGTGGTGCAGTGGTTGCCAGTCTGCATTGCTATGGGTGCG
CGCTGTTGCTGCTGGTGGAGTCGGTGGAAAGCTCTGCATTGCTGCTGGTCTGCAACCGCTGCTGTA
GCCCCATCCTTTCCAGAGCGGCTGAAAAGCACACACTCTCTGGGCTGAACGACCGCTTTTCCACATA
CATGGCCAAAGTGAGGGCGCTCCAGCAGGAGAACGCAGCTCTGGAGGCCAAACTGTCCCAGCTAAC
CGGGGGGGCAGATGTGTCTCCAGAATCCTCAGTGGCTGCAACGGTGGAGTACGAGGCTCAGCTGAG
CGAATATCGCAGCACCTGGAACTCTCACCATCGACACTGTCAAAGTGGAGATTGAGCTGGACAAC
GTCAGGGGAACTGCACATGAGCTGAAGGCTAAGCTTGACTTTGAGCAAGGAGTGAAGTTTCAGCTT
GAGTCTGATATCGCTGCCATGAAAAGGACATTGAACTGGCTTCTGATCTAAGAATTGACCTGGATG
CTAAATACTCTAGCTTGAAGATGAACTGGACTATGTGAGCAAAACGCAAGAACAGGAACTATCATC
TCTGCAGTCTAACTGGGCACATCAACAATGGACACTTCAGTTTCAATGATTGAAGTAGACACCGGG
AAGTCCTTTGACATTGCTACAGCACTCAACAAGATGCGAATGGAATATGAGAAAAGTGTACAGCAAA
ACAGAGAGGAGGCAGAGGCATATTACAACTCAAGATGGATGAGATGCAGACGGTCACTGCCAAA

AACACAGAGGCTGTGTCGTTGACTAAAGCAGAGATCACATCAGCCAGGAAAGAGCTGCAGACACTG
 AGTTTAGAGCTTCAAGGGCTTGCAGCTGCAAGCACGAGTCTGGAGCAGAGTTTAGCAGAAGCCCAG
 GCACAGTCCAGTGTGGAGTTGCTGAGTACCAGGCACAGATCGCTAGCCTCACATCAGCAATAGAG
 GTGGCTAAAGCTGACCTTCACAAACAGATCCTGGCCTACCAGGAGCTGCTGGACATCAAACCTGCCC
 TGGATGTAGAGATCTCCACCTACAGGAACTTCTGGAAGGAGACGACTTCAAGATGCCCGAGTTTAC
 AGAGACATCCTACACTTTTTTCAGCGGGTCAAATAAAGGTCAAAGAAATCATTACAGAGACATCAGTT
 ATCTCTGATGCAGATGATACCGAATCCTCCTA

5 Alignments

5.1 Alignment der Aminosäuresequenzen von rTK α und der bereits veröffentlichten Sequenz

Abgebildet sind die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von rTK α (TK_alpha) und der bereits veröffentlichten Sequenz (TK_alpha*). Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben.

```

TK_alpha   : MTESSLRISGGAVRFGATYGGNRLFSGARSGGGASSALSRSLGLARGGGLGLGFGAGAGAGAGAGLGL : 70
TK_alpha*  : MTESSLRISGGAVRFGATYGGNRLFSGARSGGGASSALSRSLGLARGGGLGLGFGAGAGAGAGAGLGL : 70

TK_alpha   : GGGSLALGGGLGLGGGLGLGAGGARAAGVRA GVAHLRSHLGGRVFKIGGYGFNPSFISSTTTVDAGVSPM : 140
TK_alpha*  : GGGSLALGGGLGLGGGLGLGAGGARAAGVRD GVAHLRSHLGGRVFKIGGYGFNPSFISSTTTVDAGVSPM : 140

TK_alpha   : PSIDPSLPSPDTVQVTRMKEKEELQALNDKFASFIDKARSLEQHNAVLRAKISMFTNPEQGGPANTSVLV : 210
TK_alpha*  : PSIDPSLPSPDTVQVTRMKEKEELQALNDKFASFIDKARSLEQHNAVLRAKISMFTNPEQGGPANTSVLV : 210

TK_alpha   : TSAIGAYKSQIDSLSSSTKEAIIAEIEHFKAIIEDDQARYEEETSQTKSLELDWTALKEEVDNLYLTLFEL : 280
TK_alpha*  : TSAIGAYKSQIDSLSSSTKEAIIAEIEHFKAIIEDNQARYEEETSQTKSLELDWTALKEEVDNLYLTLFEL : 280

TK_alpha   : QTSICGLEDDQIALSKQVYDAKVKEVRTIVTGGVKSAVSISVDNAAQAQDLTSALTEVKAHYETLAQRSKQ : 350
TK_alpha*  : QTSICGLEDDQIALSKQVYDAKVKEVRTIVTGGVKSAVSISVDNAAQAQDLTSALTEVKAHYETLAQRSKQ : 350

TK_alpha   : EALVSVQDSLMSMSVSSQSSQTLTSAKDELRAYKLQIDSVQREIERLKSLNLQLESQVEEAECHSNSHT : 420
TK_alpha*  : EALVSVQDSLMSMSVSSQSSQTLTSAKDELRAYKLQIDSVQREIERLKSLNLQLESQVEEAECHSNSHT : 420

TK_alpha   : ETYQDQVLTLSQLDDLRLKQITQYGQEQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVMHMSKTL : 490
TK_alpha*  : ETYQDQVLTLSQLDDLRLKQITQYGQEQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVMHMSKTL : 490

TK_alpha   : LGGGAGGAGGLGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF ---GLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGGL : 556
TK_alpha*  : LGGGAGGAGGLGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGFGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGGL : 560

TK_alpha   : GFGAGSSFAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 585
TK_alpha*  : GFGAGSSFAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 589

```

5.2 Alignment der Aminosäuresequenzen von rTKγ und der bereits veröffentlichten Sequenz

Abgebildet sind die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von rTK (TK_γ) und der bereits veröffentlichten Sequenz (TK_γ*). Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben.

```

TK_γ      : MSLSISMASRRMSGYGGFGAGGGARLGLGLGGGVGLGRGLGLGGGLGYGAGGGFGLGLGGGAGAGAGLA : 70
TK_γ*    : MSLSISMASRRMSGYGGFGAGGGARLGLGLGGGASLGRGLGLGGGLGYGAGGGFGLGLGAGAGAGAGLA : 70

TK_γ      : LGGGGGALVASPAFAMGRAVAAGGVGGSSAFAAGPATAAVAPILSRAAEKHTLSGLNDRFSTYMAKVRA : 139
TK_γ*    : LGGGGGALVASPAFAMGRAVAAGGVGGSSAFAAGPATAAVAPILSRAAEKHTLSGLNDRFSTYMAKVRA : 140

TK_γ      : LQQENAALEAKLSQLTGGADVSPESSVAATVEYEAQLSEYRSTLETLTIDTVKLEIELDNVRGTAHELKA : 209
TK_γ*    : LQQENAALEAKLSQLTGGADVSPESSVAATVEYEAQLSEYRSTLETLTIDTVKLEIELDNVRGTAHELKA : 210

TK_γ      : KLDFEQGVKFQLESDIAAMKKDIELASDLRIDLDAKYSSLKDELDYVSKTQEQELSSLQSKLGTSTMDTS : 279
TK_γ*    : KLDFEQGVKFQLESDIAAMKKDIELASDLRIDLDAKYSSLKDELDYVSKTQEQELSSLQSKLGTSTMDTS : 280

TK_γ      : VSMIEVDTGKSFDIATALNKMRMEYEKTVQQNREEAEAYKLKMDEMQTVTAKNTEAVSLTKAEITSARK : 349
TK_γ*    : VSMIEVDTGKSFDIATALNKMRMEYEKTVQQNREEAEAYKLKMDEMQTVTAKNTEAVSLTKAEITSARK : 350

TK_γ      : ELQTLSLELQGLAAASMSLEQSLAEAQAQSSVGVAEYQAQIASLTSAIEVAKADLHKQILAYQELLDIKL : 419
TK_γ*    : ELQTLSLELQGLAAASMSLEQSLAEAQAQSSVGVAEYQAQIASLTSAIEVAKADLHKQILAYQELLDIKL : 420

TK_γ      : ALDVEISTYRKLLEGDDFKMPEFTETSYTFSAGQIKVKEIITETSVISDADDTESS : 475
TK_γ*    : ALDVEISTYRKLLEGDDFKMPEFTETSYTFSAGQIKVKEIITETSVISDADDTESS : 476

```

5.3 Alignment der cDNA-Sequenz und der DNA-Sequenz von TK α

Die cDNA-Sequenz von TK α ist als TK_alpha und die DNA-Sequenz als gDNA gekennzeichnet. Abgebildet ist ein Teilbereich des Gens, welcher auch die Deletion beinhaltet. Unterschiede in der Sequenz sind rot hervorgehoben.

```

TK_alpha : ACAGGACCTGACCTCAGCGCTGACCGAAGTCAAAGTCACTATGAAACCCCTGGCTCAACGCAGCAAGCAA : 1050
gDNA      : -----TGACCTCAGCGCTGACCGAAGTCAAAGTCACTATGAAACCCCTGGCTCAACGCAGCAAGCAA : 62

TK_alpha : GAAGCTCTGGTCTCAGTGCAGGACAGTCTCTCCATGATGTCTGTATCCTCGCAGCCTAGTTCTCAAACAC : 1120
gDNA      : GAAGCTCTGGTCTCAGTGCAGGACAGTCTCTCCATGATGTCTGTATCCTCGCAGCCTAGTTCTCAAACAC : 132

TK_alpha : TCACCTCAGCCAAAGACGAGCTCAGGGCTTACAACTACAGATCGACTCTGTGCAGAGGGAGATCGAGAG : 1190
gDNA      : TCACCTCAGCCAAAGACGAGCTCAGGGCTTACAACTACAGATCGACTCTGTGCAGAGGGAGATCGAGAG : 202

TK_alpha : GCTCAAGTCTCTGAACCTGCAGCTGGAGTCTCAGGTGGAGGAGCCGAGTGTCACTCCAACCTCATACA : 1260
gDNA      : GCTCAAGTCTCTGAACCTGCAGCTGGAGTCTCAGGTGGAGGAGCCGAGTGTCACTCCAACCTCATACA : 272

TK_alpha : GAGACGTATCAGGATCAGGTTCTGACTCTCAAGTCTCAGCTTGATGATCTGAGGAAGCAAATCACTCAAT : 1330
gDNA      : GAGACGTATCAGGATCAGGTTCTGACTCTCAAGTCTCAGCTTGATGATCTGAGGAAGCAAATCACTCAAT : 342

TK_alpha : ATGGTCAGGAATATCAGGAGCTTCTGGCCAGCAAGATGTCTCTGGACGTGAAATCACCGCCTATAAGAA : 1400
gDNA      : ATGGTCAGGAATATCAGGAGCTTCTGGCCAGCAAGATGTCTCTGGACGTGAAATCACCGCCTATAAGAA : 412

TK_alpha : GCTCCTGGACAGCGAGGAGAACAGGCTGAAGTCTGGAGGAGGATGTCACCTGTGCACATGTCCAAGACTCTG : 1470
gDNA      : GCTCCTGGACAGCGAGGAGAACAGGCTGAAGTCTGGAGGAGGATGTCACCTGTGCACATGTCCAAGACTCTG : 482

TK_alpha : CTTGGCGGAGGAGCAGGAGGAGCTGGAGGCTGGGTGCAGGTGCAGGAGGCGCAGGTCTGGGTGGAGGTG : 1540
gDNA      : CTTGGCGGAGGAGCAGGAGGAGCTGGAGGCTGGGTGCAGGTGCAGGAGGCGCAGGTCTGGGTGGAGGTG : 552

TK_alpha : CTGGTCTGGTCTTTGGAAGTGGATTTGGGCTCGGTGGAGGTCTTGGAGGAGGTCTAGGAGGAGGTCTAGG : 1610
gDNA      : CTGGTCTGGTCTTTGGAAGTGGATTTGGGCTCGGTGGAGGTCTTGGAGGAGGTCTAGGAGGAGGTCTAGG : 622

TK_alpha : TGGAGGTCTTGGAGGAGGTCTAGGTGGAGGCTTGGACTAGGACTCGGTGGAGGACTGGGTTTTGGAGCA : 1680
gDNA      : TGGAGGTCTTGGAGGAGGTCTAGGTGGAGGCTTGGACTAGGACTCGGTGGAGGACTGGGTTTTGGAGCA : 692

TK_alpha : GGAAGTTCCTTCGGTGCAGGAAGCAGTTTTATGTCTCAAGCCTGAGCAGCAGTGGCTGTCGTCCTCACTG : 1750
gDNA      : GGAAGTTCCTTCGGTGCAGGAAGCAGTTTTATGTCTCAAGCCTGAGCAGCAGTGGCTGTCGTCCTCACTG : 762

TK_alpha : TTTACTGA----- : 1758
gDNA      : TTTACTGAAGACTCTCAGCCTCCACTTATGAGGTTGTTATTCA : 806

```

5.4 Alignment der cDNA-Sequenz und der DNA-Sequenz von TKy

Die cDNA-Sequenz von TKy ist als TK_gamma und die DNA-Sequenz von TKy ist als gDNA gekennzeichnet. Abgebildet ist ein Teilbereich des Gens, der auch die Deletion beinhaltet. Unterschiede in der Sequenz sind rot hervorgehoben.

```

TK_alpha : ACAGGACCTGACCTCAGCGCTGACCGAAGTCAAAGTCACTATGAAACCCCTGGCTCAACGCAGCAAGCAA : 1050
gDNA      : -----TGACCTCAGCGCTGACCGAAGTCAAAGTCACTATGAAACCCCTGGCTCAACGCAGCAAGCAA : 62

TK_alpha : GAAGCTCTGGTCTCAGTGCAGGACAGTCTCTCCATGATGTCTGTATCCTCGCAGCCTAGTTCTCAAACAC : 1120
gDNA      : GAAGCTCTGGTCTCAGTGCAGGACAGTCTCTCCATGATGTCTGTATCCTCGCAGCCTAGTTCTCAAACAC : 132

TK_alpha : TCACCTCAGCCAAAGACGAGCTCAGGGCTTACAAACTACAGATCGACTCTGTGCAGAGGGAGATCGAGAG : 1190
gDNA      : TCACCTCAGCCAAAGACGAGCTCAGGGCTTACAAACTACAGATCGACTCTGTGCAGAGGGAGATCGAGAG : 202

TK_alpha : GCTCAAGTCTCTGAACTTGCAGCTGGAGTCTCAGGTGGAGGAGGCCGAGTGTCACTCCAACCTCATACA : 1260
gDNA      : GCTCAAGTCTCTGAACTTGCAGCTGGAGTCTCAGGTGGAGGAGGCCGAGTGTCACTCCAACCTCATACA : 272

TK_alpha : GAGACGTATCAGGATCAGGTTCTGACTCTCAAGTCTCAGCTTGATGATCTGAGGAAGCAAATCACTCAAT : 1330
gDNA      : GAGACGTATCAGGATCAGGTTCTGACTCTCAAGTCTCAGCTTGATGATCTGAGGAAGCAAATCACTCAAT : 342

TK_alpha : ATGGTCAGGAATATCAGGAGCTTCTGGCCAGCAAGATGTCTCTGGACGTGGAAATCACCGCCTATAAGAA : 1400
gDNA      : ATGGTCAGGAATATCAGGAGCTTCTGGCCAGCAAGATGTCTCTGGACGTGGAAATCACCGCCTATAAGAA : 412

TK_alpha : GCTCCTGGACAGCGAGGAGAACAGGCTGAAGTCTGGAGGAGGAGTCACTGTGCACATGTCCAAGACTCTG : 1470
gDNA      : GCTCCTGGACAGCGAGGAGAACAGGCTGAAGTCTGGAGGAGGAGTCACTGTGCACATGTCCAAGACTCTG : 482

TK_alpha : CTTGGCGGAGGAGCAGGAGGAGCTGGAGGTCTGGGTGCAGGTGCAGGAGGCGCAGGTCTGGGTGGAGGTG : 1540
gDNA      : CTTGGCGGAGGAGCAGGAGGAGCTGGAGGTCTGGGTGCAGGTGCAGGAGGCGCAGGTCTGGGTGGAGGTG : 552

TK_alpha : CTGGTCTGGTCTTGGAAAGTGGATTTGGGCTCGGTGGAGGTCTTGGAGGAGGTCTAGGAGGAGGTCTAGG : 1610
gDNA      : CTGGTCTGGTCTTGGAAAGTGGATTTGGGCTCGGTGGAGGTCTTGGAGGAGGTCTAGGAGGAGGTCTAGG : 622

TK_alpha : TGGAGGTCTTGGAGGAGGTCTAGGTGGAGGTCTTGGACTAGGACTCGGTGGAGGACTGGGTTTTGGAGCA : 1680
gDNA      : TGGAGGTCTTGGAGGAGGTCTAGGTGGAGGTCTTGGACTAGGACTCGGTGGAGGACTGGGTTTTGGAGCA : 692

TK_alpha : GGAAGTTCCTTCGGTGCAGGAAGCAGTTTTATGTCCTCAAGCCTGAGCAGCAGTGGCTGTCGTCCTCACTG : 1750
gDNA      : GGAAGTTCCTTCGGTGCAGGAAGCAGTTTTATGTCCTCAAGCCTGAGCAGCAGTGGCTGTCGTCCTCACTG : 762

TK_alpha : TTTACTGA----- : 1758
gDNA      : TTTACTGAAGACTCTCAGCCTCCACTTATGAGGTTGTTATTCA : 806

```

5.5 Alignment TK α -kodierender cDNA- und EST-Sequenzen

Die abgeleitete TK α -kodierende Aminosäure-Teilsequenz ist als TK alpha bezeichnet. Bei den Sequenzen BC124740, BC115276, XM703952 und XM683070 handelt es sich um abgeleitete Aminosäuresequenzen von cDNA-Klonen, wobei es sich bei EH612644, EH602947, EH601954, EH600675, EH600129 und EH596065 um entsprechend abgeleitete EST-Sequenzen handelt. Die Bezeichnungen der Sequenzen entsprechen den acc.-nr. aus der Internetdatenbank. Unterschiede in den Sequenzen sind rot hervorgehoben.

```

          360          *          380          *          400          *          420
TK_alpha : EALVSVQDSLMMMSVSSQFSSQTLTSAKDELRAYKQLQIDSVQREIERLKSLNLQLESQVVEEAECHSNSHT : 420
BC124740 : EALVSVQDSLMMMSVSSQFSSQTLTSAKDELRAYKQLQIDSVQREIERLKSLNLQLESQVVEEAECHSNSHT : 420
BC115276 : EALVSVQDSLMMMSVSSQFSSQTLTSAKDELRAYKQLQIDSVQREIERLKSLNLQLESQVVEEAECHSNSHT : 420
XM703952 : EALVSVQDSLMMMSVSSQHSSQTLTSAKDELRAYKQLQIDSVQREIERLKSLNLQLESQVVEEAECHSNSHT : 420
XM683070 : EALVSVQDSLMMMSVSSQHSSQTLTSAKDELRAYKQLQIDSVQREIERLKSLNLQLESQVVEEAECHSNSHT : 420
EH612644 : -----EEAECHSNSHT : 11
EH602947 : -----EEAECHSNSHT : 11
EH601954 : -----EEAECHSNSHT : 11
EH600675 : -----EEAECHSNSHT : 11
EH600129 : -----EEAECHSNSHT : 11
EH596065 : -----EEAECHSNSHT : 11

```

```

          *          440          *          460          *          480          *
TK_alpha : ETYQDQVLTLSQLDDLRKQITQYGQEQYQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVHMSKTL : 490
BC124740 : ETYQDQVLTLSQLDDLRKQITQYGQEQYQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVHMSKTL : 490
BC115276 : ETYQDQVLTLSQLDDLRKQITQYGQEQYQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVHMSKTL : 490
XM703952 : ETYQDQVLTLSQLDDLRKQITQYGQEQYQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVHMSKTL : 490
XM683070 : ETYQDQVLTLSQLDDLRKQITQYGQEQYQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVHMSKTL : 490
EH612644 : ETYQDQVLTLSQLDDLRKQITQYGQEQYQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVHMSKTL : 81
EH602947 : ETYQDQVLTLSQLDDLRKQITQYGQEQYQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVHMSKTL : 81
EH601954 : ETYQDQVLTLSQLDDLRKQITQYGQEQYQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVHMSKTL : 81
EH600675 : ETYQDQVLTLSQLDDLRKQITQYGQEQYQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVHMSKTL : 81
EH600129 : ETYQDQVLTLSQLDDLRKQITQYGQEQYQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVHMSKTL : 81
EH596065 : ETYQDQVLTLSQLDDLRKQITQYGQEQYQELLASKMSLDVEITAYKKLLDSEENRLKSGGGVTVHMSKTL : 81

```

```

          500          *          520          *          540          *          560
TK_alpha : LGGGAGGAGLGGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF ---GLGGELGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGLGGGL : 556
BC124740 : LGGGAGGAGLGGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF GLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGLGGGL : 560
BC115276 : LGGGAGGAGLGGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF GLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGLGGGL : 560
XM703952 : LGGGAGGAGLGGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF GLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGLGGGL : 560
XM683070 : LGGGAGGAGLGGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF ---GLGGELGGGLGGGLGGGL ---GLGLGGLGGGL : 550
EH612644 : LGGGAGGAGLGGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF ---GLGGELGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGLGGGL : 147
EH602947 : LGGGAGGAGLGGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF ---GLGGELGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGLGGGL : 147
EH601954 : LGGGAGGAGLGGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF ---GLGGELGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGLGGGL : 147
EH600675 : LGGGAGGAGLGGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF ---GLGGELGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGLGGGL : 147
EH600129 : LGGGAGGAGLGGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF ---GLGGELGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGLGGGL : 147
EH596065 : LGGGAGGAGLGGAGAGGAGLGGGAGLGLGSGF ---GLGGELGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGLGLGGLGGGL : 147

```

```

          *          580
TK_alpha : GFGAGSSFGAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 585
BC124740 : GFGAGSSFGAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 589
BC115276 : GFGAGSSFGAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 589
XM703952 : GFGAGSSFGAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 589
XM683070 : GFGAGSSFGAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 579
EH612644 : GFGAGSSFGAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 176
EH602947 : GFGAGSSFGAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 176
EH601954 : GFGAGSSFGAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 176
EH600675 : GFGAGSSFGAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 176
EH600129 : GFGAGSSFGAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 176
EH596065 : GFGAGSSFGAGSSFMSSSLSSSGLSSIVY : 176

```

G Literaturverzeichnis

- Adams, D.S., Keller, R. und Koehl, M.A. (1990). „The mechanics of notochord elongation, straightening and stiffening in the embryo of *Xenopus laevis*.” *Development*, 110(1):115-130.
- Albers, K. und Fuchs, E. (1992). „The molecular biology of intermediate filament proteins.” *Int Rev Cytol.*, 134: 243-279.
- Ameen, N.A., Figueroa, Y. und Salas P. J. (2001). „Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia.” *J. Cell Sci.*, 114(Pt 3): 563-575.
- Bader, B. L., Jahn, L. und Franke, W. W. (1988). „Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in the vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene.” *Eur J Cell Biol*, 47(2): 3000-3019.
- Capetanaki, Y., Smith, S. und Heath, J. P. (1989). „Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation.” *J. Cell Biol.*, 109(4Pt1): 1653-1664.
- Capetanaki, Y., Kuisk, I., Rothblum, K. und Stames, S. (1990). „Mouse vimentin: structural relationship to fos, jun, CREB and tpr.” *Oncogene*, 5(5): 645-655.
- Caulin, C., Ware, C. F., Magin, T. M. und Oshima, R. G. (2000). „Keratin-dependent, Epithelial Resistance to Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis.” *J. Cell Biol.*, 149(1): 17-22.
- Chang, L. Und Goldman, R.D. (2004). „Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk.” *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5:601-613.
- Chou, Y. und Goldman, R. D. (2000). „Intermediate Filaments on the Move.” *J. Cell Biol.*, 150(3): 101-106.
- Colognato, H. Und Yurchenco, P.D. (2000). „Form and function: the laminin family of heterotrimers.” *Dev Dyn.*, 218(2): 213-234.
- Conrad, M., Lemb, K., Schubert, T. und Markl, J. (1998). „Biochemical identification and tissue-specific expression patterns of keratins in the zebrafish *Danio rerio*.” *Cell Tiss Res*, 293(2): 195-205.
- Conway, E. Y. und Parry, D. A. D. (1988). „Intermediate filament structure. 3. Analysis of sequence homologies.” *Int J Biol Macromol*, 10: 79-98.
- Coulombe, P. A., Chan, Y. M., Albers, K. und Fuchs, E. (1990). „Deletions in epidermal keratins leading to alterations in filament organization in vivo and in intermediate filament assembly in vitro.” *J Cell Biol.*, 111(6 Pt 2): 3049-3064.
- Coulombe, P. A. und Fuchs, E. (1990). „Elucidating the early stages of keratin filament assembly.” *J. Cell Biol.*, 111(1): 153-169.
- Coulombe, P. A., Bousquet, O., Ma, L., Yamada, S. und Wirtz, D. (2000). „The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization.” *Trends Cell Biol*, 10(10): 420-428.

- Coulombe, P. A., Ma, L., Yamada, S. und Wawersik, M. (2001). „Intermediate filaments at a glance.“ *J Cell Sci*, 114(Pt24): 4345-4347.
- Coulombe, P. A., Tong, X., Mazzalupo, S., Wang, Z. und Wong, P. (2004). „Great promises yet to be fulfilled: defining keratin intermediate filament function in vivo.“ *Eur J Cell Biol*, 83(11-12): 735-746.
- Coulombe, P. A. und Wong, P. (2004). „Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamics and multipurpose scaffolds.“ *Nat Cell Biol*, 6(8): 699-706.
- D'Alessandro, M., Russell, M., Morley, S. M., Davies, M. A. und Lane, B. (2002). „Keratin mutations of epidermolysis bullosa simplex alter the kinetics of stress response to osmotic shock.“ *J. Cell Sci.*, 115(Pt 22): 4341-4351.
- Downing, S.W, Spitzer, R.H., Salo, W.L., Downing, J.S., Saidel, L.J. und Koch, E.A. (1981). „Threads in the hagfish slime gland thread cells: organization, biochemical features, and length.“ *Science*, 212(4492): 326-328.
- Downing, S.W., Spitzer, R.H., Koch, E.A., Salo, W.L. und Saidel, L.J. (1984). „The Hagfish slime gland thread cell: I. A unique cellular system for the study of intermediate filaments and intermediate filament-microtubule interactions.“ *J. Cell Biol.*, 98: 653-669.
- Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., Merckling, A., Langa, F., Aumailley, M., Delougee, A., Koteliensky, V., Babinet, C. und Krieg, T. (1998). „Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts.“ *J. Cell Sci.*, 111(Pt 13): 1897-1907.
- Erber, A., Riemer, D., Bovenschulte, M. und Weber, K. (1998). „Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins.“ *J. Mol. Evol.*, 47: 751-762.
- Fouquet, B. (1991). „Expression von Intermediärfilamente-Proteinen in *Xenopus laevis*.“ Dissertation, Faculty of Biology, Heidelberg.
- Franz, J. K. und Franke, W. W. (1986). „Cloning of cDNA and amino acid sequence of a cytokeratin expressed in oocytes of *Xenopus laevis*.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(17): 6475-6479.
- Fuchs, E. (1988). „Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation.“ *Trends Genet.*, 4(10): 277-281.
- Fuchs, E. und Weber, K. (1994). „Intermediate filaments: Structure, dynamics, function and disease.“ *Annu. Rev. Biochem.*, 63: 345-382.
- Fudge, D.S, Levy, N., Chiu, S., und Gosline, J.M. (2005). „Composition, morphology and mechanics of hagfish slime.“ *J. Exp. Biol.*, 208: 4613-4625.
- Fudge, D.S., Hillis, S., Levy, N. und Gosline, J.M. (2010). „Hagfish slime threads as a biomimetic model for high performance protein fibres.“ *Bioinsp. Biomim.*, 5: 035002-035009.
- García, D. M., Bauer, H., Dietz, T., Schubert, T., Markl, J. und Schaffeld, M. (2005). „Identification of keratins and analysis of their expression in carp and goldfish: comparison with the zebrafish and trout keratin catalog.“ *Cell Tissue Res*, 322(2): 245-256.

- Geisler, N., Kaufmann, E. und Weber, K. (1985). „Antiparallel orientation of the double-stranded coiled-coil in the tetrameric protofilament unit of intermediate filaments.“ *J. Mol. Biol.*, 182(1): 173-177.
- Gilbert, S., Loranger, A., Daigle, N. und Marceau, N. (2001). „Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation.“ *J Cell Biol*, 154(4): 763-773.
- Godsel, L.M., Hobbs, R.P. und Green, K.J. (2008). „Intermediate filament assembly: dynamics to disease.“ *Trends Cell Biol.*, 18(1): 28-37.
- Groff, J. M., Nayan, D. K. und Higgins, R. J. (1997). „Cytokeratin-filament expression in epithelial and non-epithelial tissues of the common carp (*Cyprinus carpio*).“ *Cell Tissue Res*, 287(2): 375-384.
- Gu, L., Troncoso, J.C., Wade, J.B. und Monteiro, M.J. (2004). „In vitro assembly properties of mutant and chimeric intermediate filament proteins: insight into the function of sequences in the rod and end domains of IF.“ *Exp Cell Res*, 298(1):249-261.
- Haberkamp, M. (2002). „Zur Evolution des Cytoskeletts beim Sibirischen Stör *Acipenser baeri*.“ Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Hanukoglu, I. und Fuchs, E. (1982). „The cDNA sequence of a human epidermal keratin: divergence of sequence but conservation of structure among intermediate filament proteins.“ *Cell*, 31(1): 243-252.
- Hanukoglu, I. und Fuchs, E. (1983). „The cDNA sequence of a type II cytoskeletal keratin reveals constant and variable structural domains among keratins.“ *Cell*, 33(3): 915-924.
- Harris, J.R. und Horne, R.W. (1991). „Negative Staining“ In: *Electron Microscopy in Biology*, Harris, J.R., (ed.) IRL Press, Oxford, 203-228.
- Hartmann, T. (2009). „Biochemische Eigenschaften und larvale Expression der Schleimkeratine des Zebrafisches *Danio rerio*.“ Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Hatzfeld, M. und Franke, W. W. (1985). „Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides.“ *J. Cell Biol.*, 101(5 Pt 1): 1826-1841.
- Hatzfeld, M., Maier, G. und Franke, W. W. (1987). „Cytokeratin domains involved in heterotypic complex formation determined by in-vitro binding assays.“ *J Mol Biol*, 197(2): 237-255.
- Hatzfeld, M. und Weber, K. (1990). „The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression.“ *J. Cell Biol.*, 110(4): 1199-1210.
- Hatzfeld, M. und Burba, M. (1994). „Function of type I and type II keratin head domains: their role in dimer, tetramer and filament formation.“ *J Cell Sci*, 107(Pt 7): 1959-1972.
- He, T., Stepulak, A., Holmström, T. H., Omary, M. B. und Eriksson, J. E. (2002). „The Intermediate Filament Protein Keratin 8 is a Novel Cytoplasmatic Substrate for c-jun N-terminal Kinase.“ *J. Biol. Chem.*, 277(13): 10767-10774.

- Herrmann, H. und Aebi, U. (2000). „Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics.“ *Curr Opin Cell Biol*, 12(1): 79-90.
- Herrmann, H., Wedig, T., Porter, R. M., Lane, E. B. und Aebi, U. (2002). „Characterization of early assembly intermediates of recombinant human keratins.“ *J Struct Biol*, 137(1-2): 82-96.
- Herrmann, H., Hesse, M., Reichenzeller, M., Aebi, U. und Magin, T.M. (2003). „Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation.“ *Int Rev Cytol.*, 223: 83-175.
- Herrmann, H. und Aebi, U. (2004). „Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds.“ *Annu Rev Biochem*, 73: 749-89.
- Hesse, M., Magin, T. M. und Weber, K. (2001). „Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18.“ *J Cell Sci*, 114(Pt 14): 2569-2575.
- Hesse, M., Zimek, A., Weber, K. und Magin, T. M. (2004). „Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents.“ *J. Cell Biol.*, 83(8): 19-26.
- Hohl, D., Mehrel, T., Lichti, U., Turner, M.L., Roop, D.R. und Steinert, P.M. (1991). „Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins.“ *J. Biol. Chem.*, 226: 6626-6636.
- Hull, B. E. und Staehelin, L.A. (1979). „The terminal web. A reevaluation of its structure and function.“ *J. Cell Biol.*, 81(11): 67-82.
- Inada, H., Izawa, I., Nishizawa, M., Fujita, E., Kiyono, T., Takahashi, T., Momoi, T. und Inagaki. (2001). „Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD.“ *J. Cell Biol.*, 155(3): 415-426.
- Inagaki, N., Tsujimura, K., Tanaka, J., Sekimata, M., Kamei, Y. und Inagaki, M. (1996). „Visualization of protein kinase activities in single cells by antibodies against phosphorylated vimentin and GFAP.“ *Neurochem Res*, 21(7): 795-800.
- Karabinos, A., Riemer, D., Erber, A. und Weber, K. (1998). „Homologues of vertebrate type I, II and III intermediate filament (IF) proteins in an invertebrate: the IF multigene family of the cephalochordate Branchiostoma.“ *FEBS Lett.*, 437: 15-18.
- Karabinos, A., Riemer, Panapoulou, G., Lehrach, H. und Weber, K. (2000). „Characterization and tissue-specific expression of the two keratin subfamilies of intermediate filament proteins in the cephalochordate Branchiostoma.“ *Eur. J. Cell. Biol.*, 79: 17-26.
- Karabinos, A., Schunemann, J., Parry, D.A. und Weber, K. (2002). „Tissue-specific co-expression and *in vitro* heteropolymer formation of the two small Branchiostoma intermediate filament proteins A3 and B2.“ *J. Mol. Biol.*, 316: 127-137.
- Karabinos, A., Zimek, A. und Weber, K. (2004). „The genome of early chordate *Ciona intestinalis* encodes only five cytoplasmic intermediate filament proteins including a single type I and a type II keratin and a unique IF-annexin fusion protein.“ *Genetics*, 326: 123-129.

- Kartenbeck, J. (1989). „Intermediate filament proteins. Diagnostic markers in tumour pathology.” *Interdisc. Sci. Rev.*, 14(3): 278-283.
- Kim, S., Wong, P. und Coulombe, P. A. (2006). „A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth.” *Nature*, 441(7091): 362-365.
- Kirfel, J., Magin, T. M. und Reichelt, J. (2003). „Keratins: a structural scaffold with emerging functions.” *Cell Mol Life Sci.*, 60(1): 56-71.
- Klymkowsky, M. W. (1995). „Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions.” *Curr Opin Cell Biol*, 7(1): 46-54.
- Koch, E.A., Spitzer, R.H., Pithawalla, R.B. und Parry, D.A.D. (1994). „An unusual filament subunit from the cytoskeletal biopolymer released extracellularly into seawater by the primitive hagfish (*Eptatretus stouti*).” *J. Cell Sci.*, 107: 3133-3140.
- Koch, E.A., Spitzer, R.H., Pithawalla, R.B., Castillos, F.A. und Parry, D.A.D. (1995). „Hagfish biopolymer: a type I/type II homologue of epidermal keratin filaments.” *Int. J. Biol. Macromol.*, 17: 283-292.
- Koch, E.A., Spitzer, R.H., Pithawalla, R.B. und Downing, S.W. (1991). „Keratin-like components of gland thread cells modulate the properties of mucus from hagfish (*Eptatretus stouti*).” *Cell Tissue Res.*, 264: 79-86.
- Kouklis, P. D., Hutton, E. und Fuchs, E. (1994). „Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins.” *J. Cell Biol.*, 127(4): 1049-1060.
- Ku, N., Michie, S.A., Soetikno, R. M., Resurreccion, E. Z., Broome, R. L. und Omary, M. B. (1998). „Mutation of a Major Keratin Phosphorylation Site Predisposes to Hepatotoxic Injury in Transgenic Mice.” *J. Cell Biol.*, 143(7): 2023-2032.
- Ku, N. O. und Omary, M. B. (2000). „Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion.” *J Cell Biol*, 149(3): 547-552.
- Ku, N., Azhar, S. und Omary, M.B. (2002). „Keratin 8 Phosphorylation by p38 Kinase Regulates Cellular Keratin Filament Reorganization.” *J. Biol. Chem.*, 13: 10775-10782.
- Kuo, D. und Weisblatt, D.A. (2011). „Intermediate filament genes as differentiation markers in the leech *Helobdella*.” *Dev. Genes Evol.*, 221(4): 225-240.
- Laemmli, U.K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.” *Nature*, 227: 680-685.
- LaFlamme, S. E. und Dawid, I. B. (1990). „Differential keratin gene expression during the differentiation of the cement gland of *Xenopus laevis*.” *Dev Biol*, 137(2): 414-418.
- Langa, F., Kress, C., Colucci-Guyon, E., Khun, H., Vandormael-Pournin, S., Huerre, M. und Babinet, C. (2000). „Teratocarcinomas induced by embryonic stem (ES) cells lacking vimentin: an approach to study the role of vimentin in tumorigenesis.” *J. Cell Sci.*, 113(19): 3463-3472.
- Lazarides, E. (1982). „Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins.” *Annu. Rev. Biochem.*, 51: 219-250.

- Liao, J. und Omary, M. B. (1996). „14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor.” *J. Cell Biol.*, 133(2): 345-357.
- Lim, J., Fudge, D.S., Levy, N. und Gosline, J.M. (2006). “Hagfish slime eco-mechanics: testing the gill-clogging hypothesis.” *J. Exp. Biol.*, 209: 702-710.
- Luke, G.N. und Holland, P.W., (1999). „Amphioxus type I keratin cDNA and the evolution of intermediate filament genes.” *J. Exp. Zool.*, 285: 50-56.
- Markl, J., Winter, S. und Franke, W. W. (1989). „The catalog and the expression complexity of cytokeratins in a teleost fish, the rainbow trout.” *Eur J Cell Biol*, 50: 1-16.
- Markl, J. und Schechter, N. (1998). „Fish intermediate filament proteins in structure, function and evolution.” *Subcell Biochem.*, 31: 1-33.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. und Krepler, R. (1982). „The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.” *Cell*, 31(1): 11-24.
- Mukaigasa, K., Hanasaki, A., Maéno, M., Fujii, H., Hayashida, S., Itoh, M., Kobayashi, M., Tochinai, S., Hatta, M., Iwabuchi, K., Taira, M., Onoé, K. und Izutsu, Y. (2009). “The keratin-related Ouroboros proteins function as immune antigens mediating tail regression in *Xenopus* metamorphosis.” *PNAS*, 106(43): 18309-18314.
- Murciano, C., Fernández, T.D., Durán, I., Maseda, D., Ruiz-Sánchez, J., Becerra, J., Akimenko, M.A. und Marí-Beffa, M. (2002). „Ray-interray interactions during fin regeneration of *Danio rerio*.” *Dev Biol.*, 252(2): 214-224.
- Nagle, R. B. (1988). „Intermediate filaments. Efficacy in surgical pathologic diagnosis.” *Am J Clin Pathol*, 91(4 Suppl 1): 14-18.
- Nigg, E. A. (1992). „Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina.” *Semin Cell Biol*, 3(4): 245-253.
- Odenthal, J., Haffter, P., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J, Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Warga, R.M., Allende, M.L., Weinberg, E.S. und Nüsslein-Volhard, C. (1996). “Mutations effecting the formation of the notochord in the zebrafish, *Danio rerio*.” *Development*, 123: 103-115.
- O'Farrell, PH. (1975). „High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.” *J Biol Chem.*, 250(10): 4007-4021.
- O'Farrell, PH. und O'Farrell, PZ. (1977). „Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic fractionation.” *Methods Cell Biol.*, 16: 407-420.
- Omary, M. B., Ku, N. O., Tao, G. Z., Toivola, D. M. und Liao, J. (2006). „"Heads and tails" of the intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights.” *Trends Biochem Sci*, 31(7): 383-394.
- Osborn, M. und Weber, K. (1983). „Tumor diagnosis by intermediate filament typing: A novel tool for surgical pathology.” *Lab Invest*, 48(4): 372-394.
- Owens, D. W. und Lane, E. B. (2003). „The quest for function of simple epithelial keratins.” *Bioessays.*, 25(8): 748-758.

- Paramio, J. M., Casanova, M. L., Segrelles, C., Mittnacht, S., Lane, E. B. und Jorcano, J. L. (1999). „Modulation of Cell Proliferation by Cytokeratins K10 and K16.” *Mol. Cell. Biol.*, 19(4): 3086-3094.
- Paramio, J. M. und Jorcano, J. L. (2002). „Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling?” *Bioessays*, 24(9): 836-844.
- Parry, D. A. und Steinert, P. M. (1999). „Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism.” *Q REV BIOPHYS*, 32(2): 99-187.
- Parsons, M.J., Pollard, S.M., Saude, L., Feldman, B., Coutinho, P., Hirst, E.M. und Stemple, D.L. (2002). „Zebrafish mutants identify an essential role for laminins in notochord formation.” *Development*, 129: 3137-3146.
- Quinlan, R. A., Hatzfeld, M., Franke, W. W., Lustig, A., Schulthess, T. und Engel, J. (1986). „Characterization of dimmer subunits of intermediate filament proteins.” *J Mol Biol*, 192(2): 337-349.
- Riemer, D., Karabinos, A. and Weber, K. (1998a). „Analysis of eight cDNAs and six genes for intermediate filament (IF) proteins in the cephalochordate *Branchiostoma* reveals differences in the IF multigene families of lower chordates and the vertebrates.” *Gene*, 211: 361-373.
- Riemer, D. und Weber, K. (1998b). „Common and variant properties of intermediate filament proteins from lower chordates and vertebrates; two proteins from the tunicate *Styela* and the identification of a type III homologue.” *J. Cell Sci.*, 111: 2967-2975.
- Rogers, M. A., Winter, H., Langbein, L., Bleiler, R. und Schweizer, J. (2004). „The human type I keratin gene family: characterization of new hair follicle specific members and evaluation of the chromosome 17q21.2 gene domain.” *Differentiation*, 72(9-10): 527-540.
- Rogers, M. A., Edler, L., Winter, H., Langbein, L., Beckmann, I. und Schweizer, J. (2005). „Characterization of new members of the human type II keratin gene family and a general evaluation of the keratin gene domain on chromosome 12q13.13.” *J Invest Dermatol*, 124(3): 536-544.
- Russell, M. A., Lund, L. M., Haber, R., McKeegan, K., Cianciola, N. und Bond, M. (2006). „The intermediate filament protein, synemin, is an AKAP in the heart.” *Arch Biochem Biophys*, 456(2): 204-215.
- Salas, P. J., Rodriguez, M. L., Viciano, A. L., Vega-Salas, D. E. und Hauri, H. (1997). „The Apical Submembrane Cytoskeleton Participates in the Organization of the Apical Pole in Epithelial Cells.” *J. Cell Biol.*, 137(2): 359-375.
- Santos, M., Paramio, J. M., Bravo, A., Ramirez, A. und Jorcano, J. L. (2002). „The Expression of Keratin K10 in the Basal Layer of the Epidermis Inhibits Cell Proliferation and Prevents Skin Tumorigenesis.” *J. Biol. Chem.*, 277(21): 19122-19130.
- Schaffeld, M., Löbbecke, A., Lieb, B. und Markl, J. (1998). „Tracing keratin evolution: Catalog, expression patterns and primary structure of shark (*Scyliorhinus stellaris*) keratins.” *Eur. J. Cell Biol.*, 77(2): 69-80.
- Schaffeld, M., Höffling, S., Haberkamp, M., Conrad, M. und Markl, J. (2002a). „Type I keratin cDNAs from the rainbow trout: independent radiation of keratins in fish.” *Differentiation*, 70(6): 282-291.

- Schaffeld, M., Haberkamp, M., Brazilius, E., Lieb, B. und Markl, J. (2002b). „Type II keratin cDNAs from the rainbow trout: implications for keratin evolution.“ *Differentiation*, 70(6): 292-299.
- Schaffeld, M. und Markl, J. (2004). „Fish keratins.“ *Methods Cell Biol.*, 78: 627-671.
- Schaffeld, M., Knappe, M., Hunzinger, C. und Markl, J. (2003). „cDNA sequences of the authentic keratins 8 and 18 in zebrafish.“ *Differentiation*, 71(1): 73-82.
- Schaffeld, M., Höffling, S. und Markl, J. (2004). „Sequence, evolution and tissue expression patterns of an epidermal type I keratin from the shark *Scyliorhinus stellaris*.“ *Eur J Cell Biol*, 83(7): 359-368.
- Schaffeld, M., Bremer, M., Hunzinger, C. und Markl, J. (2005). „Evolution of tissue-specific keratins as deduced from novel cDNA sequences of the lungfish *Protopterus aethiopicus*.“ *Eur J Cell Biol*, 84(2-3): 363-377.
- Schaffeld, M. und Schultess, J. (2006). „Genes coding for intermediate filament proteins closely related to hagfish „thread keratins (TK)“ α and γ also exist in lamprey, teleosts and amphibians.“ *Exp. Cell Res.*, 312: 1447-1462.
- Schultess, J. (2001). „Molekulare Evolution der Intermediärfilament-Proteine des Flusneunauges *Lampetra fluviatilis*.“ Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Shoeman, R. L. und Traub, P. (1993). „Assembly of intermediate filaments.“ *Bioessays*, 15(9): 605-611.
- Sonawane, M., Carpio, Y., Geisler, R., Schwarz, H., Maischein, H. und Nuesslein-Volhard, C. (2005). „Zebrafish penner/lethal giant larvae 2 functions in hemidesmosome formation, maintenance of cellular morphology and growth regulation in the developing basal epidermis.“ *Development*, 132: 3255-3265.
- Spitzer, R.H., Downing, S.W., Koch, E.A., Salo, W.L. und Saidel, L.J. (1984). „Hagfish slime gland thread cells: II. Isolation and characterization of intermediate filament components associated with the thread.“ *J. Cell Biol.*, 98: 670-677.
- Spitzer, R.H., Koch, E.A. und Downing, S.W. (1988). „Maturation of Hagfish gland thread cells: composition and characterization of intermediate filament polypeptides.“ *Cell Motil. Cytoskelet.*, 11: 31-45.
- Steinert, P. M. und Roop, D. R. (1988). „Molecular and cellular biology of intermediate filaments.“ *Annu Rev Biochem*, 57: 593-625.
- Steinert, P. M. (1990). „The two-chain coiled-coil molecule of native epidermal keratin intermediate filaments is a type I-type II heterodimer.“ *J. Biol. Chem.*, 265(15): 8766-8774.
- Steinert, P. M. (1991). „Organization of coiled-coil molecules in native mouse keratin 1/keratin 10 intermediate filaments: evidence for altering rows of antiparallel in-register and parallel staggered molecules.“ *J Struct Biol*, 107(2): 157-174.
- Steinert, P.M., Mack, J.W., Korge, B.P, Gan, S.Q., Haynes, S.R. und Steven, A.C. (1991). „Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins.“ *Int. J. Biol. Macromol.*, 13: 130-139.

- Steinert, P. M., Marekov, L. N., Fraser, R. D. und Parry, D. A. (1993a). „Keratin intermediate filament structure. Crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly.“ *J Mol Biol*, 230(2): 436-452.
- Steinert, P. M., Marekov, L. N., und Parry, D. A. (1993b). „Diversity of intermediate filament structure: evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments.“ *J. Biol. Chem.* 268(33): 24916-24925.
- Steinert, P.M. (2001). „Keratins: dynamic, flexible structural proteins of epithelial cells.“ *Curr. Probl. Dermatol.*, 54: 193-198.
- Stemple, D.L., Solnica-Krezel, L., Zwartkruis, F., Neuhauss, S.C., Schier, A.F., Malicki, J., Stainier, D.Y., Abdellilah, S., Rangini, Z., Mountcastle-Shah, E. und Driever, W. (1996). „Mutations affecting development of the notochord in zebrafish.“ *Development*, 123: 117-128.
- Stemple, D.L. (2005). „Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development.“ *Development*, 132(11): 2503.
- Stoler, A., Kopan, R., Duvic, M. und Fuchs, E. (1988). „Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation.“ *J. Cell Biol.*, 107(2): 427-446.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. (1990). „Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes.“ *Methods Enzymol.*, 185: 259-268.
- Takahara, Y., Matsuda, Y., Irie, K., Matsumoto, K. und Hara, J. (2000). „14-3-3 protein family members have a regulatory role in retinoic acid-mediated induction of cytokeratins in F9 cells.“ *Exp Cell Res*, 260(1): 96-104.
- Tao, G. Z., Toivola, D. M., Zhou, Q., Strnad, P., Xu, B., Michie, S. A., Omary, M.B. (2006). „Protein phosphatase-2A associates with and dephosphorylates Keratin 8 after hypotonic stress in a site and cell-specific manner.“ *J Cell Sci*, 119(Pt 7): 1425-1432.
- Toivola, D. M., Zhou, Q., English, L. S. und Omary, M. B. (2002). „Type II Keratins Are Phosphorylated on a Unique Motif during Stress and Mitosis in Tissues and Cultured Cells.“ *Mol. Biol. Cell*, 13: 1857-1870.
- Unnold, K., (2008). „Biochemische und immunologische Identifizierung der Schleimkeratine TK- α und TK- γ im Zebrafisch *Danio rerio*.“ Staatsexamenarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Wang, N. und Stamenovic, D. (2000). „Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth.“ *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(1): C188-C194.
- Wang, J., Karabinos, A., Schunemann, J., Riemer, D. und Weber, K. (2000). „The epidermal intermediate filament proteins of tunicates are distant keratins; a polymerisation-competent hetero coiled coil of the Styela D protein and Xenopus keratin 8.“ *Eur. J. Cell Biol.*, 79: 478-487.
- Wang, J., Karabinos, A., Zimek, A., Meyer, M., Riemer, D., Hudson, C., Lemaire, P. und Weber, K. (2002) „Cytoplasmic intermediate filament protein expression in tunicate development: a specific marker for the test cells.“ *Eur. J. Cell Biol.*, 81: 302-311.
- Yurchenco, P.D. und O'Rear, J.J. (1994). „Basal lamina assembly.“ *Curr Opin Cell Biol*, 6(5): 674-681.

- Zhou, Q., Cadrin, M., Herrmann, H., Chen, C., Chalkley, R. J., Burlingame, A. L. und Bishr, M. (2006). „Keratin 20 serine 13 phosphorylation is a stress and intestinal goblet cell marker.“ *J Biol Chem*, 281(24): 16453-16461.
- Zimek, A., Stick, R. und Weber, K. (2003). „Genes coding for intermediate filament proteins: common features and unexpected differences in the genomes of humans and the teleost fish *Fugu rubripes*.“ *J. Cell Sci.*, 116: 2295-2302.
- Zintzen, V., Roberts, C.D., Anderson, M.J., Stewart, A.L., Struthers, C.D. und Harvey, E.S. (2011). „Hagfish predatory behaviour and slime defence mechanism.“ *Scientific Reports*, 1(131): 1-6.

Danksagung

████████████████████ danke ich herzlich für die Bereitstellung meines Promotionsthemas. Vielen Dank für die ausgezeichnete Betreuung, die tollen Gespräche und natürlich auch für die Korrektur meiner Arbeit.

████████████████████ möchte für die Übernahme der Zweitkorrektur danken.

████████████████████ danke ich vielmals für die Bereitstellung seiner Laboratorien.

████████████████████ gilt mein Dank für seine exzellente technische Assistenz.

Der gesamten Arbeitsgruppe ██████ möchte ich meinen Dank für das unübertroffene Arbeitsklima aussprechen. Danke für die fachliche Unterstützung, die unvergesslichen Momente, aber vor Allem für die neuen Freundschaften, die während meiner Promotion entstanden sind.

Meinen ██████ danke ich für eine wundervolle Zeit.

Schlussendlich möchte ich mich bei meinen ██████ für ihre kompromisslose Liebe und Unterstützung in allen Lebenssituationen bedanken. Ich danke euch aus tiefsten Herzen!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich Eides statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und auch nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. In meinen durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Ort, Datum

Unterschrift

CURRICULUM VITAE