

Christoph Josef Schankin

Dr. med.

## **Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Aktin-Ubiquitin-Konjugates Arthrin**

Geboren am 03.01.1977 in Singen (Hohentwiel)

Reifeprüfung am 25.06.1996 in Singen (Hohentwiel)

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1997 bis SS 2003

Physikum am 23.03.1999 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 04.12.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Physiologie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. rer. nat. Rainer H. A. Fink

Ubiquitin besitzt ein großes Spektrum unterschiedlichster Aufgaben. Bekanntermaßen ist es am selektiven proteasomalen Proteinabbau beteiligt. Stabile Ubiquitinierung moduliert die Histone, das Calmodulin und virale Proteine. Nur Vermutungen existieren hingegen über die Funktion stabil ubiquitinierten Aktins. In *Plasmodium falciparum* könnte es am Mechanismus des Eindringens in die Erythrozyten teilhaben, während die in Brustkrebsgewebe vorkommenden stabilen Aktin-Ubiquitin-Konjugate möglicherweise an der Tumordinvasion beteiligt sind.

Streckaktivierung ist für eine regelrechte Funktion des Säugetierherzens notwendig neben seiner Bedeutung für den asynchronen Insektenflugmuskel. Eine Form der Hypertrophen Obstruktiven Kardiomyopathie basiert auf Veränderungen dieser Streckaktivierung. Ihre strukturelle Grundlage ist noch nicht vollständig verstanden.

Um mehr über die Funktion der stabilen Ubiquitinierung von Aktin und über die Streckaktivierung zu lernen, wurde Arthrin in dieser Arbeit im Tiermodell *Drosophila melanogaster* charakterisiert. Arthrin ist ebenfalls stabil ubiquitiniertes Aktin, das sich im

streckaktivierten indirekten Flugmuskel (IFM) weniger Ordnungen der geflügelten Insekten (Diptera und Hemiptera) finden läßt. Das Ubiquitin im Arthrin von *Drosophila melanogaster* ist wahrscheinlich kovalent gebunden an das Lysin 118 der für den IFM der Fruchtfliege spezifischen Aktinisoform *Act88F*. Die Ubiquitinierungsstellen in den anderen Aktin-Ubiquitin-Konjugaten sind unbekannt. Zu den Funktionen des Arthrins vermutet man, daß das Ubiquitin die Interaktion aktinbindender Proteine (ABP) mit Aktin beeinflusst. Das  $\alpha$ -Aktinin beispielsweise hat eine Bindungsstelle am Aktin (ABS1), die mit der Ubiquitinierungsstelle im Arthrin überlappt. Eine andere mögliche Funktion des Arthrins ist ein Beitrag zur strukturellen Grundlage der Streckaktivierung, da es bisher nur in streckaktivierten Muskeln gefunden werden konnte.

*Drosophila melanogaster* ist ideal, um die stabile Ubiquitinierung von Aktin und die Streckaktivierung zu untersuchen. Ihr IFM enthält mit Arthrin stabil ubiquitiniertes Aktin, ist streckaktiviert und besitzt durch das spezifische *Act88F* ein System für selektive Mutagenese.

Das Hauptprojekt dieser Arbeit war die Schaffung einer Nullmutante für Arthrin in *Drosophila melanogaster*. Dafür wurde ein Stamm generiert mit einem Austausch von Lysin durch Arginin an Position 118 des *Act88F*. Der erfolgreiche Nachweis der Abwesenheit von Arthrin und Anwesenheit von Aktin bestätigt, daß Ubiquitin tatsächlich kovalent an Lysin 118 im *Act88F* bindet, um Arthrin zu bilden.

Durch Charakterisierung dieser Nullmutante für Arthrin erwartet man neue Erkenntnisse über die Funktion der stabilen Ubiquitinierung von Aktin im allgemeinen bzw. über seine Beteiligung an der Streckaktivierung.

Das Motility Assay ist ein hilfreicher *in vitro* Test für die Charakterisierung dieser Nullmutante. Hier wurde eine kürzlich entwickelte Methode zur automatischen Analyse von Motility Assay Daten evaluiert im Vergleich mit einem manuellen Standard.

Die automatisch bestimmten absoluten Geschwindigkeiten waren etwas höher als die manuell erhaltenen. Das Geschwindigkeitsverhältnis zwischen verschiedenen Datensätzen wurde durch beide Methoden gleich bestimmt.

Anhand von Kosedimentationsexperimenten mit  $\alpha$ A1-2 (Bindungsdomäne des  $\alpha$ -Aktinins), rabbit skeletal actin (RSA), *Act88F* und Arthrin wurde die Interaktion zwischen Ubiquitin und  $\alpha$ -Aktinin untersucht.

Diese konnten keinen ausgeprägten Unterschied im Bindungsverhalten zwischen  $\alpha$ A1-2 und Arthrin im Vergleich zu *Act88F* oder RSA aufzeigen. Die Funktion des  $\alpha$ -actinin scheint also nicht durch die Ubiquitinierung des *Act88F* im Arthrin beeinflusst zu werden. Dieses Ergebnis könnte erklärt werden durch ein bewegliches Ubiquitin, das Lysin 118 bindet, welches mehr am Ende als im Zentrum der ABS1 liegt.

Schließlich wurde die Verteilung des Arthrins innerhalb der geflügelten Insekten untersucht. Durch Rekonstruktion der Anzahl unabhängig voneinander entwickelter Arthrins sollte herausgefunden werden, ob kovalente Bindungsstellen von Aktin ebenfalls konserviert sind und nicht nur seine Primärsequenz oder die nicht-kovalenten Bindungsstellen für ABPs wie  $\alpha$ -Aktinin, Troponin oder Myosin.