

Ludwig-Maximilians-Universität München
Fakultät für Biologie

Dissertation

Lars Israel

Domänenanalyse des
Cyclase-assoziierten Proteins (CAP)
und Charakterisierung von Filactin,
einem neuartigen actinähnlichen Protein
aus *Dictyostelium discoideum*

September 2002

**Domänenanalyse des Cyclase-assoziierten Proteins (CAP)
und Charakterisierung von Filactin,
einem neuartigen actinähnlichen Protein
aus *Dictyostelium discoideum***

**Dissertation
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München**

vorgelegt von

Lars Israel

aus

Lippstadt

September 2002

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

München, September 2002

Lars Israel

Dissertation eingereicht: 23. September 2002

Erstgutachter: Prof. Dr. Harry K. MacWilliams

Zweitgutachter: Prof. Dr. Charles N. David

Sondergutachter: Prof. Dr. Michael M. Schleicher

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Mai 2003

Die Naturwissenschaften braucht der Mensch zum Erkennen,
den Glauben zum Handeln.

*Max Karl Ernst Ludwig Planck (1858 – 1947),
deutscher Physiker, 1918 Nobelpreis für Physik*

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden oder werden veröffentlicht:

Israel, L. und M. Schleicher (2002). *Dictyostelium* cyclase-associated protein: biochemical analysis of the C-terminal domain. In Arbeit

Ksiazek D., H. Brandstetter, L. Israel, G.P. Bourenkow, G. Katchalowa, H.D. Bartunik, R. Huber, M. Schleicher und T.A. Holak (2002). Structure of N-terminal domain of adenyl cyclase-associated protein (CAP) from *Dictyostelium discoideum*. In Arbeit

Noegel, A.A., R. Blau-Wasser, H. Sultana, L. Israel, M. Schleicher, H. Patel, C.J. Weijer (2002). CAP/ASP56 as regulator of cell polarity and cAMP signaling in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell*, in Revision

Rehm, T., C. Mavoungou, L. Israel, M. Schleicher und T.A. Holak (2002). Sequence-specific (^1H , ^{15}N , ^{13}C) resonance assignment of the N-terminal domain of the Cyclase-associated Protein (CAP) from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biomol. NMR* **23**, 337-338

Schleicher, M., F. Rivero-Crespo, L. Israel, J. Faix, Rolf Müller, L. Eichinger, S. Steinbacher und A.A. Noegel (2002). The novel protein filactin contains conventional actin as a domain and associates with ribosomes. In Arbeit

Israel, L., A.A. Noegel und M. Schleicher (2000). Characterization of proteins that influence stress-induced rearrangements of the cytoskeleton. *Supplement to Eur. J. Cell Biol.* **79**, 100, Abstract 281

Schleicher, M., L. Israel, D. Rieger, R. Mueller, L. Eichinger, F. Rivero und A.A. Noegel (2000). Filactin, a novel actin-related protein. *Supplement to Mol. Biol. Cell* **11**, 68a, Abstract 355

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von April 1999 bis August 2002 an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Adolf-Butenandt-Institut für Zellbiologie, unter der Anleitung von Prof. Dr. Michael Schleicher angefertigt. Die Betreuung der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Harry MacWilliams, Zoologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	VII
SUMMARY	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Actin-Cytoskelett	1
1.2 Cyclase-assoziiertes Protein (Cyclase-Associated Protein, CAP)	3
1.3 Filactin	6
1.4 <i>D. discoideum</i> als Modellorganismus	7
1.5 Aufgabenstellung	9
2 MATERIAL & METHODEN	10
2.1 Material	10
2.1.1 Enzyme, Antikörper, Inhibitoren und Antibiotika	10
2.1.1.1 Enzyme für die Molekularbiologie	10
2.1.1.2 Enzyme für die Protein-Biochemie	10
2.1.1.3 Antikörper	10
2.1.1.4 Inhibitoren	11
2.1.1.5 Antibiotika	11
2.1.2 Reagenzien	11
2.1.3 Medien	13
2.1.3.1 Medien für die <i>D. discoideum</i> Kultur	13
2.1.3.2 Medien für die <i>E. coli</i> Kultur	13
2.1.4 Puffer und andere Lösungen	14
2.1.5 Bakterienstämme	15
2.1.6 <i>D. discoideum</i> Stämme	15
2.1.7 Vektoren	17
2.1.8 Geräte	17
2.1.9 Sonstige Materialien	18

2.1.10 Zentrifugen und Rotoren _____	19
2.1.10.1 Zentrifugen _____	19
2.1.10.2 Rotoren _____	19
2.1.11 Computerprogramme _____	19
2.1.11.1 Windows 98 _____	19
2.1.11.2 Macintosh _____	19
2.2 Kultur von <i>D. discoideum</i> _____	20
2.2.1 Anzucht in Flüssigmedium _____	20
2.2.2 Anzucht auf Agarplatten _____	20
2.2.3 Sporenkonservierung _____	20
2.2.4 Einfrieren von <i>D. discoideum</i> Zellen _____	21
2.3 Molekularbiologische Methoden _____	21
2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA _____	21
2.3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (1981) _____	21
2.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA nach der Qiagen-Methode _____	22
2.3.2 Verdau mit Restriktionsenzymen _____	23
2.3.3 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) _____	24
2.3.4 Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit _____	24
2.3.5 Oligonukleotide _____	25
2.3.5.1 Oligonukleotide für die Sequenzierung _____	25
2.3.5.2 Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion _____	25
2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) _____	26
2.3.7 Phosphatase-Behandlung (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) _____	27
2.3.8 DNA-Ligase-Reaktion _____	27
2.3.9 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen für die Elektroporation _____	28
2.3.10 Elektroporation von <i>E. coli</i> _____	28
2.3.11 <i>E. coli</i> Dauerkulturen _____	29
2.3.12 Sequenzierung von DNA-Molekülen _____	29
2.4 Proteinchemische und immunologische Methoden _____	29
2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) _____	29
2.4.2 Coomassie Blau-Färbung von Proteinen _____	30
2.4.3 Silberfärbung von Proteinen nach SDS-PAGE (Oakley <i>et al.</i> , 1980) _____	30

2.4.4	Immunoblot („Western Blot“) – Nachweis der Antigene durch Chemilumineszenz oder Färbung _____	31
2.4.5	Proteinbestimmung _____	32
2.4.5.1	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i> _____	32
2.4.5.2	<i>Proteinbestimmung nach Lowry</i> _____	33
2.4.5.3	<i>Konzentrationsbestimmung nach Gill und von Hippel</i> _____	33
2.4.6	Aufreinigung und Markierung von Actin _____	33
2.4.6.1	<i>Präparation von Actin aus Kaninchenmuskel</i> _____	33
2.4.6.2	<i>Pyren-Markierung von Actin</i> _____	35
2.4.7	Expression von CAP-Konstrukten in <i>E. coli</i> und ihre Aufreinigung _____	36
2.4.8	Nachweis der Actinbindung _____	36
2.4.8.1	<i>Nachweis actinbindender Proteine durch Low-Shear-Viskosimetrie (MacLean-Fletcher und Pollard, 1980)</i> _____	36
2.4.8.2	<i>Polymerisation von Pyren-markiertem Actin in Gegenwart eines actinbindenden Proteins</i> _____	37
2.4.8.3	<i>Nachweis der Actinbindung durch Kosedimentation mit F-Actin</i> _____	38
2.4.8.4	<i>Nachweis der Actinbindung durch Chemische Quervernetzung</i> _____	38
2.4.9	Phosphorylierung durch Proteinkinasen _____	40
2.4.10	Chromatographische Analyse _____	41
2.4.10.1	<i>Präparation von Zellhomogenat und subzellulären Fraktionen</i> _____	41
2.4.10.2	<i>Analytische Gelfiltration</i> _____	41
2.4.11	Immunologische Methoden _____	42
2.4.11.1	<i>Aufreinigung von IgG über Affinitätschromatographie</i> _____	42
2.4.11.2	<i>Immunopräzipitation</i> _____	43
2.4.11.3	<i>Präparative Immunopräzipitationen</i> _____	44
2.5	Zellbiologische Methoden _____	45
2.5.1	Indirekte Immunfluoreszenz _____	45
2.5.1.1	<i>Methanol-Fixierung</i> _____	45
2.5.1.2	<i>Glutaraldehydfixierung nach Symons und Mitchison</i> _____	45
2.5.1.3	<i>Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixierung</i> _____	45
2.5.1.4	<i>Inkubation mit Antikörpern</i> _____	46
2.5.2	Triton-unlösliches Zellpellet nach cAMP-Stimulation _____	47
2.5.3	Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung nach osmotischem Schock der Zellen	47

3 ERGEBNISSE I

Untersuchungen zur Struktur und Funktion des CAP-Homologs

(Cyclase-assoziiertes Protein) in *D. discoideum* _____ 49

3.1 Das *D. discoideum* CAP-Homolog _____ 49

3.2 Untersuchungen zum *D. discoideum* CAP _____ 51

3.3 Untersuchungen zum *D. discoideum* CAP-N _____ 53

3.3.1 Klonierung und Expression von CAP-N'Px _____ 53

3.3.2 Aufreinigung von CAP-N'Px _____ 55

3.3.3 Untersuchung von CAP-N'Px mittels NMR-Spektroskopie _____ 57

3.3.4 Proteolytische Spaltung von CAP-N'Px und Ermittlung der Schnittstelle _____ 59

3.3.5 Klonierung und Expression von CAPN151-678 _____ 61

3.3.6 Aufreinigung von CAPN151-678 _____ 63

3.3.7 Sequenzspezifische Signalzuordnung von CAP-N _____ 64

3.3.8 Kristallisation von CAPN151-678 und Röntgenstrukturanalyse _____ 70

3.3.9 CAPN151-678 als mögliches Substrat von Proteinkinasen _____ 72

3.4 Untersuchungen zum *D. discoideum* CAP-C _____ 73

3.4.1 Beobachtungen zum *D. discoideum* CAP-C _____ 73

3.4.2 Klonierung und Expression von CAPC835-1392 _____ 75

3.4.3 Aufreinigung von CAPC835-1392 _____ 76

3.4.4 Viskosimetrische Messungen _____ 79

3.4.5 Nachweis der Actinbindung von CAPC835-1392
mittels Fluoreszenz-Spektrometrie _____ 80

3.4.6 Stabilität des G-Actin/CAPC835-1392-Komplexes _____ 82

4 ERGEBNISSE II

Untersuchungen zu Filactin, einem neuartigen actinverwandten

Protein in *D. discoideum* _____ 85

4.1 Filactin in *D. discoideum* _____ 85

4.2 Analyse der Filactin-Proteinsequenz _____ 86

4.3 Biochemische Charakterisierung von Filactin _____ 89

4.3.1	Filactin ist wahrscheinlich ein Monomer _____	89
4.3.2	Immunopräzipitation der actinverwandten Domäne von Filactin _____	90
4.3.3	Lokalisationsstudien _____	92
4.3.3.1	<i>Verteilung von Filactin unter Hochsalz-, depolymerisierenden und polymerisierenden Bedingungen nach Triton-Behandlung der Zellen</i> _____	92
4.3.3.2	<i>Verteilung von Filactin nach Einfrieren/Auftauen der Zellen und differentieller Zentrifugation</i> _____	94
4.4	Verteilung von Filactin nach cAMP-Stimulus:	
	Triton X-100-unlösliches Sediment _____	96
4.5	Untersuchungen zur Funktion von Filactin _____	99
4.5.1	Einfluß von Filactin auf die Polymerisation von Actin _____	99
4.5.1.1	<i>Polymerisation von Pyren-markiertem Actin in Gegenwart von IgG-GFP-Filactin-C</i> _____	99
4.5.1.2	<i>Messung der Viskosität von polymerisiertem Actin in Gegenwart von IgG-GFP-Filactin-C</i> _____	99
4.5.2	Tyrosin-Phosphorylierung nach osmotischem Schock _____	100
5	DISKUSSION _____	101
5.1	Struktur und Funktion des CAP-Homologs (Cyclase-assoziiertes Protein) in <i>D. discoideum</i> _____	101
5.1.1	Einfluß der Verprolin-homologen Domäne auf die actinbindende Funktion des <i>D. discoideum</i> CAP-C _____	101
5.1.2	Bildung stabiler Komplexe mit G-Actin und Dimerisierung von <i>D. discoideum</i> CAPC835-1392 _____	103
5.1.3	Strukturaufklärung des <i>D. discoideum</i> CAP-N mittels NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie _____	104
5.1.4	Die Regulation der CAP-Funktionen _____	108
5.2	Filactin, ein neuartiges actinverwandtes Protein in <i>D. discoideum</i> _____	110
5.2.1	Filactin als neues Mitglied der Actin-Familie _____	110
5.2.2	Verteilung von Filactin in <i>D. discoideum</i> _____	110
5.2.3	Eigenschaften von Filactin _____	112
5.2.4	Filactin als multifunktionelles Protein _____	113

6	LITERATURVERZEICHNIS	115
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	127
8	ABKÜRZUNGEN	129
	LEBENS LAUF	132
	DANKSAGUNG	133

Zusammenfassung

In dieser Arbeit standen zwei Aufgaben im Mittelpunkt: Zum einen wurde das Cyclase-assoziierte Protein (CAP) aus *Dictyostelium discoideum* hinsichtlich seiner Struktur-Funktionsbeziehungen eingehend untersucht, zum zweiten erfolgte eine erste Charakterisierung des neuartigen actinähnlichen Proteins Filactin aus *D. discoideum*.

CAP-homologe Proteine sind multifunktionell und entscheidend an signalabhängigen Veränderungen des Actin-Cytoskeletts, am Vesikeltransport und an der Zellentwicklung beteiligt. Die Bindung von monomerem Actin über die carboxyterminale Domäne stellt wahrscheinlich eine gemeinsame Eigenschaft aller Homologen dar. Von vier hochkonservierten Regionen im C-terminalen Abschnitt, die für eine spezifische Bindung in Frage kommen, wurde in dieser Arbeit der Verprolin-homologe Bereich des *D. discoideum* CAPs untersucht. Der Verlust dieser Domäne führte zwar zu einer deutlichen Senkung, nicht aber Unterdrückung der Actinbindung durch den carboxyterminalen Proteinbereich. Dementsprechend wurden in chemischen Quervernetzungsexperimenten stabile Komplexe des verkürzten CAP-C mit G-Actin erhalten. Durch das Auftreten von CAP-C-Dimeren wurde hier außerdem eine weitere Funktion des Proteins nachgewiesen.

Angesichts der weiten Verbreitung der Cyclase-assoziierten Proteine und ihrer Bedeutung für zellbiologische Prozesse ist es bemerkenswert, daß bisher noch keine Struktur dieses Proteintyps veröffentlicht ist. Es sollte daher in Kooperation mit der Gruppe von T. Holak am MPI f. Biochemie (Martinsried) die Struktur der membranassoziierten N-terminalen Domäne von *D. discoideum* CAP erarbeitet werden. Zu diesem Zweck mußten zunächst zahlreiche Proteinabschnitte aus dem N-terminalen Bereich kloniert und exprimiert, gereinigt und auf ihre Stabilität und dreidimensionale Faltung hin untersucht werden. Es stellte sich heraus, daß der stabile Bereich der aminoterminalen Domäne die Aminosäuren 51-226 umfasst. Nach NMR-spektroskopischen und röntgenkristallographischen Analysen liegt nun die Struktur vor. Danach bilden sechs antiparallel angeordnete und über Loop-Elemente miteinander verbundene α -Helices eine zylindrische Domäne aus, welche im Kristall dimerisiert vorliegt. Pro Dimer wird dabei ein Mg^{2+} komplexiert. Die Aufklärung der N-terminalen Struktur von *D. discoideum* CAP erlaubt nun gezielte Untersuchungen hinsichtlich der Interaktion mit Phospholipiden und CAP-Bindeproteinen.

Im zweiten Teil der Arbeit stand die Charakterisierung von Filactin im Mittelpunkt. Das bisher einzigartige und etwa 105 kDa große Protein verfügt über zwei Filamin-homologe Bereiche in der N-terminalen Region und eine stark ausgeprägte actinähnliche Domäne im C-terminalen Bereich. Während das endogene Filactin in der ruhenden Zelle sowohl eine cytoplasmatische Verteilung als auch eine Anbindung an bisher unbestimmte Proteinaggregate zeigt, verhält sich das GFP-Konstrukt der actinähnlichen Domäne im Zuge der Zellbewegung oder Phagozytose übereinstimmend mit Actin. Experimente mit chemotaktisch stimulierten Zellen zeigen darüber hinaus auch eine Stimulus-induzierte Kolokalisation von Actin und Filactin. Die Anpassung seiner carboxyterminalen Aminosäuresequenz an die Struktur von Muskelactin sagt für das Protein eine globuläre, actinähnliche Struktur voraus, in der alle für eine ATP/ADP-Bindung erforderlichen Aminosäurenreste vorhanden sind.

Summary

The cyclase-associated protein (CAP) from *Dictyostelium discoideum* was studied in detail regarding its structure and function relationships. The second part of the thesis describes the characterization of the novel actin-related protein filactin from *D. discoideum*.

CAP homologs are multifunctional proteins: they are involved in signal dependent changes in the actin cytoskeleton, in vesicle transport and cell development. The binding of monomeric actin through the C-terminal domain represents a common feature of all CAPs. From four highly conserved regions in this domain the verprolin homology region of the *D. discoideum* CAP was analyzed in this work. Loss of this region led to a clear decrease, but not suppression of the actin-sequestering activity. In agreement to these data, stable complexes of the modified CAP-C with G-actin could be identified in chemical crosslinking experiments, and it could be shown that CAP-C is able to dimerize.

Considering the high conservation of cyclase-associated proteins and their importance for cell biological processes it is remarkable that no structure of this protein has been elucidated so far. Therefore, in the frame of this thesis the structure of the membrane-associated N-terminal domain of *D. discoideum* CAP was to be determined in cooperation with the group of T. Holak at the MPI f. Biochemistry (Martinsried). For this purpose numerous constructs from the N-terminal domain had to be cloned and expressed, to be purified and examined for their stability and threedimensional folding.

It turned out that the stable core of the aminoterminal domain covers the amino acids 51-226. The structure was determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography. Six antiparallel α -helices are connected by loop elements and form a cylindrical core domain which can form a dimer in the crystal, dimerization occurs through Mg^{2+} ions. The clarification of the N-terminal structure of *D. discoideum* CAP will now simplify the research on its interaction with phospholipids and CAP binding proteins

The second part of this work dealt with the characterization of filactin. The unique 105 kDa protein contains two filamin homologous regions in its N-terminal, and a clearly actin-related domain within the C-terminal part. While in resting cells the endogenous filactin shows cytoplasmic distribution and interaction with protein aggregates as well, the GFP construct of the actin-related domain displays an actin-like behavior during cell movement or phagocytosis.

A stimulus-induced colocalization of actin and filactin was observed in experiments with chemotactically stimulated cells. The alignment of its C-terminal amino acid sequence with the structure of muscle actin predicts a globular, actin-related structure containing all residues that are important for ATP/ADP binding.

1 EINLEITUNG

1.1 Actin-Cytoskelett

Ein zentraler Bestandteil des Cytoskeletts ist Actin. Mit einem Gehalt von bis zu zehn Prozent (in Muskelzellen) stellt Actin eines der häufigsten Proteine in Eukaryonten dar. Es ist von Amöben bis zum Menschen universell verbreitet.

Straub isolierte 1942 monomeres Actin (globuläres Actin oder G-Actin) und fand heraus, daß dieses durch Erhöhung der Salzkonzentration (Mg^{2+} , K^+) zu filamentösem Actin (F-Actin) polymerisiert (Staub, 1942). Die Geschwindigkeit dieses reversiblen Prozesses wird zudem sehr stark von ATP beeinflusst. Jedes globuläre Actinmolekül enthält im allgemeinen ein Mg^{2+} -Ion, das mit einem ATP oder ADP komplexiert ist. Elektronenmikroskopische und Röntgenstrukturanalysen zeigten, daß F-Actin aus zwei Protofilamenten besteht, welche sich eng umeinander winden und so eine rechtsdrehende Doppelhelix mit einem Durchmesser von 7-9 nm bilden. In dieser Anordnung ist jede G-Actinuntereinheit von vier weiteren umgeben (Holmes *et al.*, 1990). Alle Untereinheiten in einem Actinfilament besitzen die gleiche Polarität. Aus diesem Grund ist die ATP-Bindungstasche einer Actinuntereinheit nur an einem Ende des Filaments zugänglich, das man als das Minus-Ende bezeichnet. Dieses unterscheidet sich auch hinsichtlich der Polymerisationskinetik vom fünf- bis zehnmal schneller wachsenden Plus-Ende. Ursache dafür sind die unterschiedlichen kritischen Actinkonzentrationen, $0,1 \mu M$ für das Plus- bzw. $0,8 \mu M$ für das Minus-Ende. Erst nach Überschreiten dieser Werte kommt es jeweils zur Polymerisation.

Das Actin-Cytoskelett ist ein sehr dynamisches Gebilde, in dem Filamente rasch wachsen oder verkürzt werden (Abb. 1). Durch den Einfluß actinbindender Proteine (Abb. 2), welche die Filamente beispielsweise zu Bündeln oder dreidimensionalen Netzwerken verknüpfen, oder sie an der Plasmamembran verankern, entstehen hochorganisierte Strukturen wie Stressfasern (längs angeordnete Bündel aus Actinfilamenten), Filopodien (fingerförmige Zellfortsätze), Lamellipodien (dünne, blattähnliche Zellausläufer) oder „crowns“ (kronenförmige Ausstülpungen an der Zelloberfläche, die z.B. der Phagozytose vorangehen). Andere Proteine fragmentieren bereits bestehende Filamente. Eine erneute Verlängerung oder die Entstehung neuer Filamente aus dem G-Actin-Reservoir führen somit zu einer ständigen Umstrukturierung des Actinnetzwerkes.

Das Actin-Cytoskelett ist daher maßgeblich an der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Zellform, an der Zellbewegung und Chemotaxis, am gerichteten intrazellulären Transport von Proteinen und Organellen, an der Cytokinese, der Exo- und Endocytose sowie an vielen weiteren Zellfunktionen beteiligt.

In *Dictyostelium discoideum* entfallen ungefähr acht Prozent des gesamten Zellproteins auf Actin, was einer zellulären Konzentration von etwa 100 μM entspricht (Podolski und Steck, 1990). Angesichts der ionischen Bedingungen im Cytosol und der kritischen Konzentrationen sollte Actin zu über 99% polymerisiert sein. In der unstimulierten Zelle liegt jedoch wie in anderen Organismen etwa die Hälfte des Actins in der monomeren Form vor (Eichinger *et al.*, 1999). Dieser Zustand wird durch G-actinbindende Proteine erreicht, welche die Polymerisation zu F-Actin verhindern und einen Großteil des zellulären Actins für einen raschen Umbau des Mikrofilamentsystems bereit halten. Zu diesen G-actinbindenden Proteinen gehören Profilin und das im folgenden beschriebene Cyclase-assoziierte Protein (CAP).

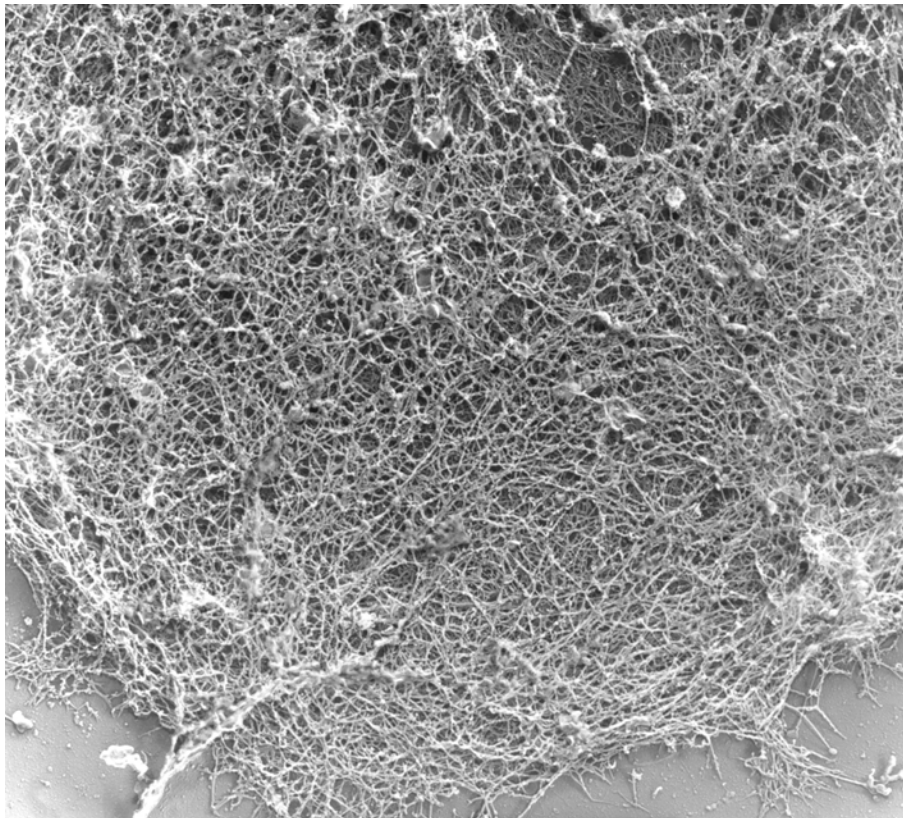


Abb. 1: Actinstrukturen in einer *D. discoideum* Zelle.

Eine flachgestreckte *D. discoideum* Zelle, deren Plasmamembran durch eine Detergensbehandlung entfernt worden ist, ist mit Bündeln und Netzwerken aus Actinfilamenten angefüllt. Einzelne Bündel stehen vom Zellkörper ab und bilden die strahlenförmigen Filopodien (siehe links unten). Im Gegensatz zu der nahezu parallelen Anordnung der einzelnen Filamente in den Bündeln liegen die Filamente in den Netzen, welche das gesamte Cytosol ausfüllen, meist verwinkelt zueinander (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von John Hartwig, Brigham and Women's Hospital, Boston, USA).

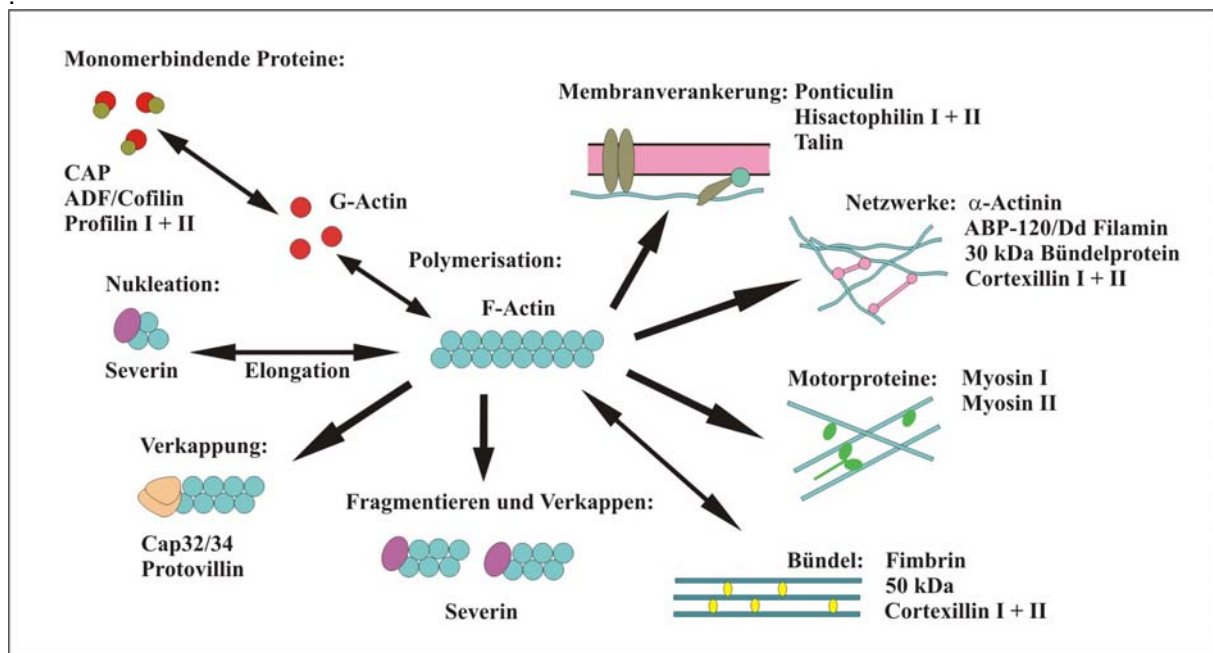


Abb. 2: Schematische Übersicht actinbindender Proteine aus *D. discoideum* und ihre Interaktionen mit dem Mikrofilamentsystem.

Die Unterteilung in Gruppen erfolgt nach den jeweiligen Funktionen der Proteine: G-actinbindende Proteine und jene, die F-Actin fragmentieren und/oder verkappen, erhalten das Gleichgewicht zwischen globulärem und filamentösem Actin. Komplexe des Severins mit G-Actin liefern eine Erklärung für den Mechanismus der Nukleation (Eichinger und Schleicher, 1992). Die Verknüpfung der Actinfilamente zu Bündeln und Netzen erfolgt durch quervernetzende Proteine. Membran-Mikrofilamentverbindende Proteine verankern corticale Actinnetzwerke an der Zellmembran, indem sie Actinfilamente mit integralen Membranproteinen verbinden. Myosine sind Motorproteine, die an Actinfilamente binden und die ATP-Hydrolyse mit Konformationsänderungen koppeln. Dadurch bewegen sich Myosinmoleküle und Actinfilamente relativ zueinander.

1.2 Cyclase-assoziiertes Protein (Cyclase-Associated Protein, CAP)

Bei der Frage nach einer Verbindung zwischen der extrazellulären Signalübertragung und den daraus resultierenden Veränderungen des Actin-Cytoskeletts wird dem Cyclase-assoziierten Protein (Cyclase-Associated Protein, CAP) eine wichtige Rolle zugeschrieben.

CAP wurde zuerst als 70 kDa große Untereinheit des Adenylat-Cyclase-Komplexes (Cyr1p) in *Saccharomyces cerevisiae* gefunden (Fedor-Chaikin *et al.*, 1990; Field *et al.*, 1990). Es folgten Nachweise homologer Proteine in zahlreichen anderen Spezies, darunter Mensch, Maus, Ratte, *Dictyostelium* und *Drosophila* (Matviw *et al.*, 1992; Vojtek und Cooper, 1993; Zelicof *et al.*, 1993; Gottwald *et al.*, 1996; Benlali *et al.*, 2000). Untersuchungen an *S. cerevisiae* Mutanten sowie weitere molekularbiologische und biochemische Ansätze zeigten, daß CAP ein multifunktionelles Protein ist.

Zum einen weisen aminoterminalen Sequenzwiederholungen, die ein mögliches Bindungsmotiv für die Adenylat-Cyclase darstellen, auf eine Beteiligung des Proteins an der Rasgekoppelten Signaltransduktion hin. Der C-terminale Abschnitt ist andererseits in entscheidendem Maße an der Reaktion der Zelle auf extrazelluläre Signale sowie damit verbundenen Cytoskelettänderungen beteiligt. So konnten zellmorphologische Abweichungen von CAP Mangelmutanten durch Expression der carboxyterminalen Domäne aufgehoben werden (Fedor-Chaikin *et al.*, 1990; Field *et al.*, 1990; Gerst *et al.*, 1991). Der strukturelle als auch funktionelle Aufbau von CAP scheint hochkonserviert zu sein und wiederholt sich in allen Homologen. Die N- und C-terminale Domäne sind dabei stets durch eine (*D. discoideum*) oder zwei (Hefe, Säuger) Polyprolin-Sequenzen (Linker) miteinander verbunden. In der Polyprolin-Region P2 des Hefe CAPs wurde ein Bindungsmotiv für SH3 (Src Homologie 3) Proteine entdeckt (Freeman *et al.*, 1995b). Damit wäre eine weitere Funktion von CAP definiert. Laut Lila und Drubin (1997) ist die P2-Region für die Lokalisation des Proteins am corticalen Cytoskelett verantwortlich.

CAP aus *D. discoideum* ist 50 kDa groß und wird von einem einzelnen Gen codiert (Noegel *et al.*, 1999). Bezüglich seiner Aminosäurefolge weist es etwa 40% Gleichheit und 60% Ähnlichkeit zu den Homologen aus Mensch und Hefe auf. An der Stelle der Polyprolin-Domäne, welche die N- mit der C-terminalen Hälfte verbindet, findet man hier einen prolinreichen Abschnitt (Aminosäurenreste 216-254) (Gottwald *et al.*, 1996).

Bei den Fragen nach Bindung und Aktivierung der Adenylat-Cyclase herrscht noch immer Unklarheit. Eine direkte Wechselwirkung wurde bis dato nur für *S. cerevisiae* und *S. pombe* gefunden (Gerst *et al.*, 1991; Kawamukai *et al.*, 1992), ein regulatorischer Einfluß konnte außerdem in *Candida albicans* nachgewiesen werden (Bahn und Sundstrom, 2001). *In vitro* Untersuchungen zur Cyclase-Aktivierung in *S. cerevisiae* haben gezeigt, daß für die Aktivierung von Cyr1p durch aktiviertes Ras2p die 168 aminoterminalen Aminosäuren von CAP benötigt werden (Shima *et al.*, 1997). Während diese Anzahl mit den *in vivo* Daten von Gerst *et al.* (1991) übereinstimmt, beschränken Swiston *et al.* (1995) den notwendigen Bindungsteil auf die ersten 36 Reste. In allen bisher beschriebenen CAP-Sequenzen findet man im N-terminalen Bereich eine Wiederholung der Aminosäurefolge RLE (z.B. *S. cerevisiae* AS 19-21 + 26-28; Vojtek und Cooper, 1993; Hubberstey und Mottillo, 2002). Das RLE/RLE Motiv soll die Struktureigenschaft besitzen, eine amphotere Helix zu formen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann (Cohen und Parry, 1986). Fenger *et al.* (1994) beschrieben diese Helix als mögliche Bindungsstelle für die Adenylat-Cyclase.

Da dies lediglich für die Hefe bestätigt wurde, könnte sich dieses hochkonservierte Motiv in der Evolution funktionell unterschiedlich entwickelt haben. Das CAP-homologe Protein aus *D. discoideum* besitzt ein geringfügig verändertes Motiv - RLD/RLE - an den Positionen 12-14 und 19-21 (Abb. 4). Dennoch wird eine Beteiligung in dem durch den Botenstoff cAMP eingeleiteten Signalweg angenommen (Noegel *et al.*, 2002). Erwiesen ist dagegen, daß der aminoterminal Bereich für die Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran verantwortlich ist (Noegel *et al.*, 1999).

Weiterhin konnte *in vitro* wie schon für das Homolog aus *S. cerevisiae* eine G-actin-sequestrierende Aktivität belegt werden (Freeman *et al.*, 1995a; Gottwald *et al.*, 1996; Wesp *et al.*, 1997). Demnach ist CAP Teil der Regulation des Actin-Cytoskeletts in *D. discoideum*. *In vitro* Bindungsexperimente mit und ohne Ca^{2+} , die sowohl mit dem Gesamtprotein als auch mit den einzelnen Domänen durchgeführt wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede und wiesen die Reaktion als unabhängig von diesem „second messenger“ aus. Außerdem wurde belegt, daß die Bindung carboxyterminal erfolgt, da dieser Teil von CAP (AS 255-464) das monomere Actin auch alleine bindet. Im Gegensatz zum kompletten Protein erfolgt diese Interaktion aber auf PIP₂-unabhängige Weise und mit höherer Effizienz. Für die aminoterminal Domäne (AS 1-214) wird daher angenommen, daß sie die PIP₂-Regulation moduliert (Gottwald *et al.*, 1996). Eine Consensus-Bindungssequenz für Polyphosphoinositole, wie sie von Yu *at al.* (1992) diskutiert und bei den actinbindenden Proteinen Gelsolin, gCap39, Villin, Cofilin und Profilin gefunden wurde, konnte jedoch für CAP bisher nicht bestätigt werden. Immunopräzipitate von Hefe und Säuger CAPs enthalten Actin, so daß davon ausgegangen werden kann, daß CAP Actin auch *in vivo* bindet (Vojtek *et al.*, 1991; Amberg *et al.*, 1995).

Der prolinreiche Abschnitt des *D. discoideum* CAPs enthält im Gegensatz zu allen anderen Homologen keine zum Hefeprotein homologe P1-Region, welche eine mögliche Bindungsstelle für Profilin sein könnte. Auch die Consensussequenz für die Bindungsstelle der SH3-Domäne (Ren *et al.*, 1993; Williamson, 1994), die sich in *S. cerevisiae* in der P2-Region befindet (Freeman *et al.*, 1996), ist hier mit der Aminosäurefolge APASSAAPV (AS 228-238; s. Abb.4) nur schwach konserviert. In der Hefe ist diese Polyprolin-Region zwar einer der Faktoren für die korrekte Lokalisation des Proteins am corticalen Cytoskelett, in bezug auf die actinbindende Funktion spielt sie aber scheinbar keine Rolle (Lila und Drubin, 1997).

Während CAP in der vegetativen *D. discoideum* Zelle gleichmäßig im Cytoplasma verteilt ist, akkumuliert das Protein in polarisierten, aggregationskompetenten Zellen auch im Bereich der vorderen Lamellen und am hinteren Ende direkt unter der Plasmamembran. Diese mit dem Actin-Cytoskelett einhergehenden dynamischen Veränderungen in der Verteilung konnten durch *in vivo* Studien belegt werden. Die Gesamtkonzentration von CAP wurde auf etwa 5 μM bestimmt (Gottwald *et al.*, 1996; Noegel *et al.*, 1999). Damit gehört das Protein zwar nicht zu den seltenen Proteinen in *D. discoideum*, aber den G-Actin-Pool (etwa 100 μM ; Podolski und Steck, 1990) scheinen andere G-actinbindende Proteine hauptverantwortlich zu binden. In der Summe sprechen die Erkenntnisse jedoch dafür, daß auch CAP an der Organisation des Mikrofilamentsystems in *D. discoideum* beteiligt ist, wobei sich diese Beteiligung vor allem auf die Bereiche der Plasmamembran konzentriert und durch PIP_2 reguliert wird.

1.3 Filactin

Filactin ist ein neuartiges actinähnliches Molekül aus *D. discoideum*. Seine Entdeckung begann mit der Suche nach filaminähnlichen Proteinen in der Genombank des *Dictyostelium*-Genomprojektes (<http://www.uni-koeln.de/dictyostelium/>; Eichinger *et al.*, 2001; Glockner *et al.*, 2002;). Filamine sind lange, biegsame, actinbindende Proteine, welche dreidimensionale Actinnetzwerke stabilisieren und sie außerdem an der Zellmembran verankern. Sie verbinden Signal- und zellgestaltende Funktionen und sind daher für die Entwicklung und die Zellbewegung notwendig (Stossel *et al.*, 2001).

Die Suche ergab eine Reihe von Sequenzen, die schwache Homologien zu dieser Gruppe von F-actinquervernetzenden Proteinen zeigten. Weitere Analysen führten dann aber zu einem neuartigen actinähnlichen Protein. Dieses hat eine Größe von etwa 105 kDa und zeigt eine ausgeprägte Domänenstruktur. Die C-terminale Hälfte beinhaltet eine actinähnliche Sequenz, die zu Muskelactin noch weit homologer ist als z.B. zu actinverwandten Proteinen (Actin-Related Proteins, ARPs). Auf der N-terminalen Seite besteht eine nicht so stark ausgeprägte Homologie zu zwei repetitiven Elementen, wie sie in *D. discoideum* Filamin gefunden worden sind. Aufgrund der beschriebenen Ähnlichkeiten wurde das Protein, welches bisher in keinem anderen Organismus gefunden werden konnte, „Filactin“ genannt. Man geht von einem einzelnen Filactin Gen in *D. discoideum* aus. Die knapp 3 kB große mRNA ist in allen Stadien der Entwicklung präsent.

Derzeit ist noch unklar, ob Filactin wegen seiner Homologien im aminoterminalen Teil eine Stäbchenform und im actinähnlichen Teil eine globuläre Struktur einnimmt. Letzere wird aber erhalten, wenn die Aminosäuresequenz der C-Domäne in die Struktur von Muskelactin eingefügt wird. Darüber hinaus sind alle Aminosäurenreste, die für eine ATP/ADP-Bindung erforderlich sind, vorhanden.

Untersuchungen an GFP-Fusionsproteinen sowohl des Actinteils als auch des Gesamtproteins weisen auf eine actinähnliche Verteilung in den corticalen Bereichen der Zelle hin. Übereinstimmend damit findet man die GFP-Konstrukte im Zuge der Pino- und Phagocytose in den Einstülpungen der Plasmamembran. Auf der anderen Seite belegen Immunfluoreszenzen aber auch eine Bindung des Gesamtproteins an Vesikel. Diese erfolgt sehr wahrscheinlich über den N-terminalen Bereich. Mit einem Actin:Filactin-Verhältnis von etwa 200:1 ist Filactin kein abundantes Protein in *D. discoideum*.

1.4 *D. discoideum* als Modellorganismus

D. discoideum wurde 1935 von K. Raper erstmals isoliert und beschrieben und wird der Klasse der Myxomyceten zugeordnet (Raper, 1935). Die unter natürlichen Bedingungen an den oberen Humusschichten des Waldbodens lebenden und auch als Amöben bezeichneten Einzeller vermehren sich vegetativ und ernähren sich von Bakterien und Hefen. Die Aufnahme solcher und anderer Partikel erfolgt über Phagocytose und erfordert das Zusammenspiel des Actin-Cytoskeletts mit dem Motormolekül Myosin und anderen actinbindenden Proteinen (Noegel und Luna, 1995; Aubry *et al.*, 1997). Laborstämme wie z.B. der in dieser Arbeit verwendete AX2-Stamm werden dagegen in Flüssigkultur angezogen, wobei die Zellen das Medium über Makropinocytose, einem ähnlichen, ebenfalls actinabhängigen Vorgang aufnehmen (Watts und Ashworth, 1970; Hacker *et al.*, 1997). Im Falle eines Nahrungsmangels wird ein sehr effizienter, asexueller Entwicklungszyklus (Abb. 3) induziert, welcher unter Laborbedingungen nach etwa 24 Stunden abgeschlossen ist. Die Einzelzellen bewegen sich dabei mittels Chemotaxis auf eine cAMP-Quelle zu und geben selbst cAMP als chemotaktisches Signal in die Umgebung ab. Es kommt zur Aggregation von etwa 10^5 Amöben, welche zusammen ein nun vielzelliges, wurmförmiges Pseudoplasmodium („slug“) bilden. In diesem sog. Migrationsstadium kann sich der vielzellige Organismus in einem thermotaktischen Gradienten ausrichten oder auf Licht zuwandern (Fisher *et al.*, 1997).

Im folgenden kommt es dann zu einer Differenzierung der Zellen zu Stiel- und Sporenzellen und schließlich zur Ausbildung eines Fruchtkörpers. Unter günstigeren Bedingungen können die widerstandsfähigen Sporen keimen und einzelne Amöben wieder entlassen. Die sich anschließende Zellteilung erfolgt in einem Zeitraum von wenigen Stunden (Loomis, 1982).

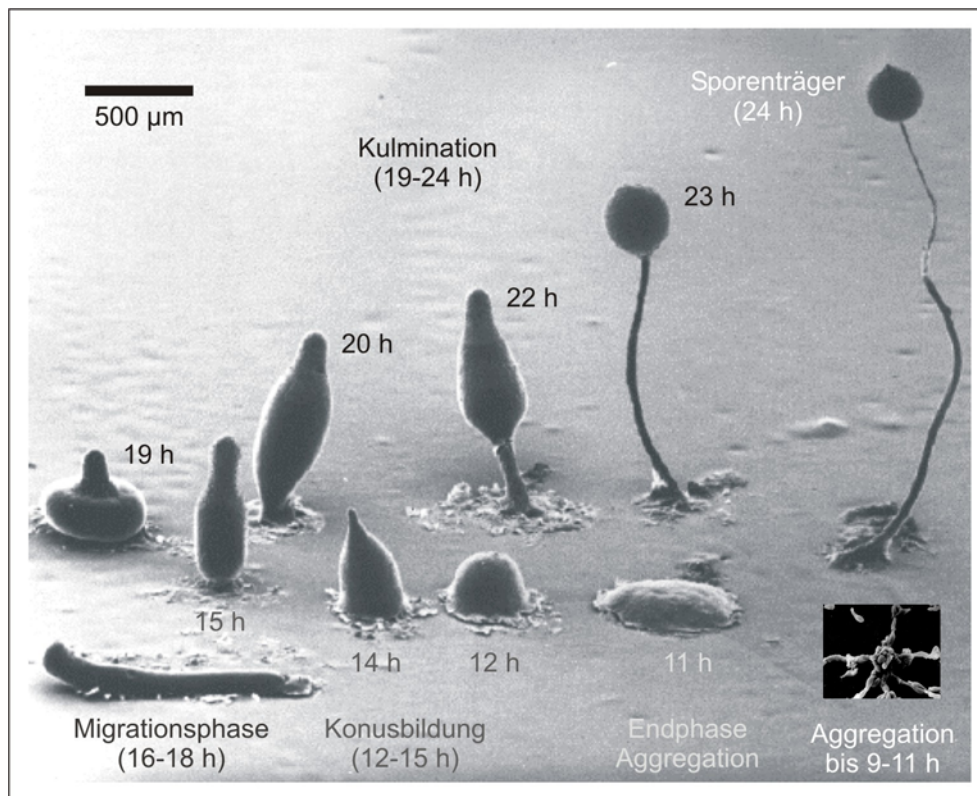


Abb. 3: Entwicklungszyklus von *D. discoideum*.

Während der vegetativen Vermehrung ernähren sich freilebende Amöben von Bakterien und Hefen. Bei Nahrungsmangel kommt es zur Aggregation (siehe rechts unten) und ein Pseudoplasmodium wird ausgebildet, welches eine Wanderungs- bzw. Migrationsphase durchläuft. Nach etwa 18 h beginnt die Kulmination, die durch die Ausbildung eines Sporenträgers bzw. Fruchtkörpers abgeschlossen wird. Durch Berührung eines reifen Sporenkopfes (Sorocarp) werden die Sporen freigesetzt. Diese können dann unter günstigeren Bedingungen wieder auskeimen und in einen neuen Zyklus eintreten (Elektronenmikroskopische Aufnahmen von R. Lawrence Blanton und Mark Grimson, Texas Tech University, USA; zum Größenvergleich: die einzelne Zelle in der mikroskopischen Aufnahme rechts unten hat einen Durchmesser von etwa 10 µm).

Die einfachen Anzuchtbedingungen, seine hohe Motilität und die Fähigkeit zu Chemotaxis, Pseudopodienbildung und Phagozytose machen *D. discoideum* zu einem potenten Modellorganismus für die Untersuchung des Actin-Cytoskeletts und seiner zellulären Funktionen wie die Zellbewegung, Signaltransduktion, Morphogenese und Differenzierung. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß *D. discoideum* haploid ist und molekulargenetisch manipuliert werden kann.

Das 36 MBp große Genom, welches auf sechs Chromosomen mit Größen von 4 bis 8 MBp verteilt ist, wird derzeit im Rahmen des *Dictyostelium*-Genomprojektes sequenziert (Eichinger *et al.*, 2001; Glockner *et al.*, 2002; <http://www.uni-koeln.de/dictyostelium/>). Die vollständige Genomsequenz soll im Jahre 2004 zur Verfügung stehen.

1.5 Aufgabenstellung

Diese Arbeit konzentrierte sich auf zwei Proteine aus *D. discoideum* und ihren Einfluß auf das Actin-Cytoskelett.

Das Cyclase-assoziierte Protein (CAP) wurde aufgrund seiner Topologie und Funktionalität in amino- und carboxyterminale Domäne unterteilt. Während der actinsequestrierende C-terminale Bereich im Hinblick auf seinen Domänenaufbau und die Stabilität seines Komplexes mit Actin untersucht werden sollte, wurde für die N-terminale Hälfte des Proteins die Auflösung seiner dreidimensionalen Struktur mittels NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie angestrebt. Hierbei wurde damit begonnen, das entsprechende Konstrukt rekombinant herzustellen und eine besonders gute bakterielle Expression zu erzielen. Für die NMR-spektroskopischen Messungen war dann die Herstellung protonierter, ¹⁵N- und ¹³C-markierter Proben sowie die Produktion von Proteinproben mit spezifisch markierten ¹⁵N-Aminosäuren notwendig. Um hohe Ausbeuten zu erhalten, mußten die Expressions- und Aufreinigungsschritte den jeweiligen Bedingungen angepaßt und optimiert werden. Der Befund der proteolytischen Spaltung im Bereich der 50 aminoterminalen Reste machte die Konzeption und Aufreinigung neuer Konstrukte erforderlich. Neben der NMR-Spektroskopie wurde auch versucht, die N-terminalen Proteine zu kristallisieren und ihre Struktur aus Röntgenmessungen zu erhalten. In beiden Fällen wurde eng mit der Gruppe von Tad A. Holak (MPI f. Biochemie, Martinsried) kooperiert.

Das neuartige actinähnliche Filactin war durch das *D. discoideum*-Genomprojekt (<http://www.uni-koeln.de/dictyostelium/>) entdeckt worden. In dieser Arbeit sollte das Protein weiter charakterisiert und vornehmlich seine *in vitro* Aktivitäten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden sowohl Wildtyp Zellen als auch Mutanten verwendet, welche GFP-Konstrukte der carboxyterminalen actinähnlichen Domäne bzw. des Gesamtproteins überexprimierten. Neben Fragen wie Lokalisation und Phosphorylierung sollte auch geklärt werden, ob der Actinteil des Filactins in der Lage ist, zu polymerisieren und das Mikrofilamentsystem zu beeinflussen.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Enzyme, Antikörper, Inhibitoren und Antibiotika

2.1.1.1 Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP)	Boehringer
Lysozym	Sigma
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Amersham, Gibco-BRL, New England Biolabs, Promega, Eurogentec
RNase A	Sigma
T4 DNA Ligase	Gibco-BRL

2.1.1.2 Enzyme für die Protein-Biochemie

Lysozym	Sigma
Proteinkinase A	Sigma

2.1.1.3 Antikörper

Anti-Actin (mAk Act-1)	(Simpson <i>et al.</i> , 1984)
Anti-CAP-C (mAk 223-91-3)	(Brokamp, R.)
Anti-Contact Site A (mAk 33-294-17)	(Bertholdt <i>et al.</i> , 1985)
Anti-Filactin (N-term.) (pAk Fusion 3S + 4S)	
(mAk 3S-55-4)	
(mAk 4S-59-4)	
(IgG Ak 3S-55-4)	
Anti-Filactin (C-term.) (mAk 1S-192-2)	
(mAk 1S-192-6)	(alle Rieger, D.)
(IgG Ak 1S-192-2)	
Anti-GFP (IgG Ak K3-184-2)	(Gassen, B.)
Anti-Phosphotyrosin	Boehringer
Ziege-anti-Maus IgG Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase	Dianova

Ziege-anti-Maus IgG Antikörper, gekoppelt an Cy3	Dianova
Ziege-anti-Maus IgG Antikörper, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase	Dianova

2.1.1.4 Inhibitoren

Benzamidin	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Complete Protease Inhibitor Cocktail (Tabletten)	Roche
Proteasen Inhibitor Cocktail	Sigma

2.1.1.5 Antibiotika

Blasticidin S	ICN Biomedicals
Geneticin (G418)	Sigma
Streptomycin	Sigma
Ampicillin	Roth
Kanamycin	Sigma

2.1.2 Reagenzien

Soweit nicht anders erwähnt, stammten die verwendeten Laborchemikalien von Biomol, Fluka, Merck, Roth, Serva oder Sigma und hatten den Reinheitsgrad „p.a.“.

Acrylamid (30%ige Stammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth
Agar-Agar, Typ RG	Euler
Agarose (SeaKem LE)	BMA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Bacto-Pepton/-Trypton	Oxoid/BD
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat- p-toluidinsalz)	Gerbu
Coomassie Brilliant Blau R 250, G 250	Roth, Sigma
DE52 (Diethylaminoethyl-Cellulose)	Whatman
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva
DTT (1,4-Dithio-D,L-threitol)	Gerbu

EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid)	Pierce
EDTA (Ethyldinitrilotetraessigsäure)	Biomol
EGTA (Ethylen-glycol-bis[2-amino-ethylether]- N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
γ - ³² P-ATP (10 mCi/ml)	ICN
Glutaraldehyd	Serva
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazid-N'- ethansulfonsäure)	Roth
Hefeextrakt	Oxoid
Hydroxyapatit Ceramic, Typ I, 20 μ m	BioRad
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Gerbu
β -Mercaptoethanol	Roth
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)	Roth
NBT (Nitro Blue Tetrazolium)	Sigma
NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid)	Pierce
Nickel-NTA Agarose	Qiagen
NP-40 (Nonylphenylpolyethylenglycol)	Boehringer
Nukleotide	New England Biolabs
P-1140 (Octylpolyoxyethylen)	Bachem
Protein A-Sepharose (CL-4B)	Pharmacia
Proteose-Pepton	Oxoid
Phenol	Appligene
Phosphocellulose P11	Whatman
2-Propanol	Roth
Rinderserumalbumin Fraktion V	Roth
Roti-Phenol/Chloroform	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma
Triton X-100 („surfact amps“)	Pierce

2.1.3 Medien

Alle verwendeten Medien und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, das über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) gefiltert worden war. Medien wurden bei 120°C autoklaviert. Platten wurden nach Abkühlen des Mediums auf etwa 50°C mit Hilfe eines Dispensers gegossen. Antibiotika wurden nach dem Abkühlen steril zugegeben.

2.1.3.1 Medien für die *D. discoideum* Kultur

AX-Medium (pH 6,7; Watts und Ashworth, 1970) SM-Agarplatten (pH 6,5)

14,3 g Pepton	9 g Agar
7,15 g Hefeextrakt	10 g Pepton
50 mM Glukose	50 mM Glukose
3,5 mM Na ₂ HPO ₄	1 g Hefeextrakt
3,5 mM KH ₂ PO ₄	4 mM MgSO ₄
ad 1 l mit bid. H ₂ O	16 mM KH ₂ PO ₄
	5,7 mM K ₂ HPO ₄
	ad 1 l mit bid. H ₂ O

Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0)

(Malchow *et al.*, 1972)

14,6 mM KH ₂ PO ₄
2 mM Na ₂ HPO ₄

Phosphat-Agarplatten (pH 6,0)

10 g Bacto-Agar
ad 1 l mit Soerensen-Puffer

HL5-Medium

10 g Hefeextrakt
20 g Proteose Pepton
50 mM Glukose
8,5 mM KH ₂ PO ₄
1,25 mM Na ₂ HPO ₄
ad 2 l mit bid. H ₂ O

Salzlösung („salt solution“)

10 mM NaCl
10 mM KCl
2,7 mM CaCl ₂

2.1.3.2 Medien für die *E. coli* Kultur

LB-Medium (pH 7,4; Sambrook *et al.*, 1989)

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
86 mM NaCl
ad 1 l mit bid. H ₂ O

Der pH-Wert von 7,4 wurde mit NaOH-Lösung eingestellt. Für Agarplatten wurden dem Medium 1,5% (^{w/v}) Agar zugesetzt. Bei Bedarf wurden 50 mg/l Ampicillin und/oder 25 mg/l Kanamycin (sterile 1000× Lösungen) zugefügt.

Definiertes Medium (Senn *et al.*, 1987)

10 g $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$
 5 g Glukose
 1 g Zitronensäure
 2 g Natriumacetat
 1 g NH_4Cl
 500 mg $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
 je 125 mg Guanosin, Cytosin, Uracil
 je 50 mg Nikotinsäure, Thiamin, Thymin
 10 mg $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
 5 mg $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$
 0,1 mg Biotin
 Aminosäuren:
 1,6 g Serin
 je 400 mg Alanin, Glutaminsäure, Glutamin
 Arginin, Glycin
 je 250 mg Asparaginsäure, Methionin
 je 100 mg Asparagin, Histidin, Isoleucin, Lysin,
 Prolin, Threonin, Tyrosin, Valin, Leucin
 je 50 mg Cystein, Cystin, Tryptophan, Phenylalanin
ad 1 l mit kaltem H_2O (bid., autokl.),
 pH mit 10 M KOH auf 7,4 einstellen,
 steril filtrieren,
 Zugabe von 50 mg Ampicillin (sterile Lösung)

Minimalmedium

10,5 g K_2HPO_4
 4,5 g KH_2PO_4
 1 g NH_4Cl
 0,5 g Natriumcitrat
ad 1 l mit kaltem H_2O (bid., autokl.),
 pH auf 7,0 einstellen,
 Zugabe von:
 1 ml 1 M $MgSO_4$
 100 μ l 1% Vitamin B1-Lösung
 50 mg L-Prolin
 30 ml 86% Glycerin oder 2 g Glukose
 steril filtrieren,
 Zugabe von 50 mg Ampicillin
 (sterile Lösung)

Während die Expression in LB-Medium zu protonierten Proben (1H) führte, wurde Minimalmedium eingesetzt, um ^{15}N - und $^{15}N/^{13}C$ -markierte Proteine zu erhalten. Die Verwendung von definiertem Medium diente schließlich der Herstellung von Proteinproben mit spezifisch markierten ^{15}N -Aminosäuren.

2.1.4 Puffer und andere Lösungen

Puffer und Lösungen, die hier nicht aufgeführt sind, finden sich im jeweiligen Methodenteil.

10 × Tris/Borat-Puffer (TBE; pH 8,3)

890 mM Tris
 890 mM Borsäure
 20 mM EDTA
 autoklavieren

TE-Puffer (pH 8,0)

10 mM Tris/HCl
 2 mM EDTA, pH 8,0
 autoklavieren

TEDABP-Puffer (pH 8,0)

10 mM Tris/HCl

1 mM EGTA

1 mM DTT

0,02% NaN₃

vor Gebrauch zugeben:

1 mM Benzamidin

0,5 mM PMSF

pH mit HCl einstellen

MEDABP-Puffer (pH 6,5)

10 mM MES

1 mM EGTA

1 mM DTT

0,02% NaN₃

vor Gebrauch zugeben:

1 mM Benzamidin

0,5 mM PMSF

pH mit NaOH-Plätzchen einstellen

KPDAEBP-Puffer (pH 6,7)10 mM KH₂PO₄

1 mM EGTA

1 mM DTT

0,02% NaN₃

vor Gebrauch zugeben:

1 mM Benzamidin

0,5 mM PMSF

pH mit KOH-Plätzchen einstellen

IEDANBP-Puffer (pH 7,6)

10 mM Imidazol

1 mM EGTA

1 mM DTT

0,02% NaN₃

0,2 M NaCl

vor Gebrauch zugeben:

1 mM Benzamidin

0,5 mM PMSF

KPM-Puffer (pH 6,5)2 mM KH₂PO₄

1 mM β-Mercaptoethanol

pH mit KOH-Lösung einstellen

2.1.5 Bakterienstämme*E. coli* BL21

(Studier und Moffat, 1986)

E. coli JM83

(Vieira und Messing, 1982)

Klebsiella aerogenes

(Williams und Newell, 1976)

2.1.6 *D. discoideum* Stämme

AX2-214

Axenisch und auf Bakterien wachsender
Abkömmling des Freilandisolates NC4
(Raper, 1935).

GFP-Filactin ¹	Axenisch wachsende Mutante, die neben dem endogenen Filactin auch das entsprechende GFP-Konstrukt exprimiert (Resistenz: G418). Bei der Herstellung des Plasmids wurde das <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I-Fragment der etwa 3 kBp großen Filactin cDNA in den pDex79-Vektor kloniert. Im erhaltenen Proteinkonstrukt befindet sich das GFP auf der N-terminalen Seite von Filactin (Noegel, A.A.; Köln).
GFP-Filactin	Axenische wachsende Mutante, die neben dem endogenen Filactin das entsprechende GFP-Konstrukt überexprimiert (Resistenz: G418). Die Filactin cDNA wurde hier partiell in den GFP-Vektor pDGFP-MCS-Neo (Dumontier <i>et al.</i> , 2000) kloniert (1. Restriktion mit <i>Sal</i> I, 2. Restriktion mit <i>Eco</i> RI). Im exprimierten Konstrukt ist Filactin über seinen N-Terminus mit dem GFP verbunden (Faix, J.; München).
GFP-Filactin-C ²	Axenisch wachsende Mutante, die neben dem endogenen Filactin auch das GFP-Konstrukt der actinähnlichen Domäne exprimiert (Resistenz: G418). Das etwa 1,2 kBp große <i>Eco</i> RI-Fragment aus der Filactin cDNA, welches für die carboxyterminale, actinähnliche Domäne codiert, wurde in den pDex79-Vektor kloniert. In diesem Fall befindet sich das GFP auf der N-terminalen Seite der C-Domäne von Filactin (Noegel, A.A.; Köln).

¹ Da sich in den Proteinkonstrukten das GFP jeweils auf der N-terminalen Seite des gesamten Filactins bzw. seiner actinähnlichen Domäne befindet, wurde in den Bezeichnungen für die Stämme „GFP“ in entsprechender Weise auf die linke Seite von „Filactin“ bzw. „Filactin-C“ geschrieben.

² Das Kürzel „C“ soll ausdrücken, daß in diesem Proteinkonstrukt nur die carboxyterminale, actinähnliche Domäne von Filactin an das GFP gebunden ist.

2.1.7 Vektoren

pT7-7	(Tabor, 1990)
pUC19	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)

2.1.8 Geräte

Analysenwaage AC 210 P	Sartorius
Brutschrank (Bakterien)	Memmert
Diavert Mikroskop (inverse Anordnung)	Leitz
Dispenser Optifix Basic 50	VWR
Dounce-Homogenisator	Braun
Eagle Eye II	Stratagene
Econosystem	BioRad
Elektroporationsgerät	BioRad
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss
Fraktionenkollektor RediFrac	Pharmacia
Heizblock/Schüttler Thermomixer 5436	Eppendorf
HiLoad Superdex S75 Gelfiltrationssäule	Pharmacia
Laborwaage LC 4800 P	Sartorius
Leitfähigkeitsmeßgerät LF 537	WTW
Lumineszenz-Spektrometer (FA-260-E1)	Aminco Bowman
Lyophilisationsgerät Alpha 1-4	Christ
Nuclepore-Filter	Costar, Whatman
Parr-Bombe	Parr Instrument Company
PCR-Thermocycler Uno	Biometra
Peristaltische Pumpe P-1	Pharmacia
Pipetten/-spitzen	Gilson
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences
pH-Meter pH526	WTW
Photometer Ultrospec III	Pharmacia
Proteintransfer Trans-Blot SD	BioRad
Quarzküvetten Infrasil	Hellma
Rührer Ikamag REO/RET	Ika

Rührwerk RW16 basic	Ika
Flachbettscanner ScanJet 4c/ScanJet 5470c	Hewlett Packard
Smart-System	Pharmacia
Ultraschallbad Transsonic 820/H	Elma
UV-Auflichtilluminator IL-200-M	Bachofer
Vortex	Bender & Hobein
Wasserbäder, Schüttler	GFL, Ika, Infors, Kühner

2.1.9 Sonstige Materialien

Dialyse-Membranen	Biomol
Gel-Blotting-Papier GB002	Whatman
Gewebekulturschalen, Ø 90 mm × 20 mm	Greiner
Gewebekulturplatten, 24 Wells	Nunc
Mikrokonzentratoren Centrikon-/Centriprep-10	Amicon
Nitrozellulose BA85	Schleicher & Schüll
Petrischalen, Ø 92 mm × 16 mm	Sarstedt
Pipetten, 10 und 25 ml	Nunc
Polyallomer-Röhrchen 1,5 ml	Beckman
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
0,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt
15 ml Röhrchen („Falcon“)	Sarstedt
50 ml Röhrchen („Falcon“)	Sarstedt
Röntgenfilm X-OMAT	Kodak
Spritzen	Braun Melsungen
Stahlkugeln, Ø 0,0025 inch, 440-C	New England Miniature Ball Company
Sterilfilter, 0,22 µm Millex GV	Millipore
Verstärkerfolien	Du Pont

2.1.10 Zentrifugen und Rotoren

2.1.10.1 Zentrifugen

Optima LE-80K Ultrazentrifuge	Beckman
Optima TL Ultrazentrifuge	Beckman
GS-6KR Zentrifuge	Beckman
J2-21M/E Zentrifuge	Beckman
J6-HC Zentrifuge	Beckman
Tischzentrifuge 5415c	Eppendorf

2.1.10.2 Rotoren

JA-10, JA-14, JA-20, Ti 35, Ti 45, Ti 70, TLA 100.3	Beckman
--	---------

2.1.11 Computerprogramme

2.1.11.1 Windows 98

CorelDRAW 9	Corel
Illustrator 8.0	Adobe
Photoshop 5.5	Adobe
Sigma Plot 2.01; Sigma Plot 2000	Jandel Scientific
UWGCG-Programmpaket (University of Wisconsin Genetics Computer Group)	(Devereux <i>et al.</i> , 1984)
Word 97, Word 2000	Microsoft

2.1.11.2 Macintosh

DNA Strider 1.3f	
Illustrator 8.0.1	Adobe
NIH Image 1.62	National Institutes of Health
Photoshop 5.5	Adobe
Swiss PDB Viewer v.3.7b1	(Guex und Peitsch, 1998)

2.2 Kultur von *D. discoideum*

2.2.1 Anzucht in Flüssigmedium

Der Wildtyp-Stamm AX2 und Mutanten wurden aus Sporen, Vorkulturen oder von SM-Platten in AX- oder HL5-Medium angeimpft. Um die Kulturen von *Klebsiella aerogenes* zu befreien, wurden die Zellen in Medium überführt, welches 40 µg/ml Streptomycin enthielt. Die Generationszeit in Schüttelkultur betrug bei 21°C und 150 UpM etwa 10 h. Zur Anzucht größerer Zellmengen für die Proteinaufreinigung wurden die Zellen in 4 × 2,5 l-Kulturen bis zu einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ bis max. $1,2 \cdot 10^7$ Zellen/ml herangezogen und durch Zentrifugation geerntet. Die Ausbeute an Zellen aus 10 l Kultur lag bei etwa 100 g Naßgewicht. Für zellbiologische Untersuchungen wurden die Zellen bis max. $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml angezogen, um ein Übergehen in die stationäre Phase zu vermeiden.

2.2.2 Anzucht auf Agarplatten

Zum Klonieren von Transformanten wurden SM-Agarplatten verwendet. Nachdem jeweils 0,1 ml einer dichten *K. aerogenes* Suspension (in Salzlösung) auf SM-Platten ausgestrichen worden waren, wurden die *D. discoideum* Zellen ausgebracht und die Platten etwa 2 d bei 21°C inkubiert. Die Generationszeit betrug hierbei 3-4 h. *D. discoideum*-Kolonien zeigten sich als klare Freßhöfe („plaques“) auf dem Bakterienrasen.

2.2.3 Sporenkonservierung

Axenisch gewachsene Zellen wurden durch 10minütiges Abzentrifugieren bei 1000 UpM geerntet, zweimal mit kaltem Soerensen-Puffer gewaschen und auf eine Dichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen/ml resuspendiert. Je 500 µl dieser Suspension wurden dann auf Phosphat-Agarplatten ausgebracht. Innerhalb von 2-3 d hatten sich die Zellen entwickelt und Fruchtkörper ausgebildet. Die Sporen jeder Agarplatte wurden durch kräftiges Abklopfen in den Deckel der Petrischale geerntet und in 10 ml kaltem Soerensen-Puffer aufgenommen. 1ml-Aliquots wurden schließlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zum Animpfen wurde ein Aliquot bei RT aufgetaut und in AX-Medium gegeben. Nach 3 d bei 21°C und 150 UpM hatte diese Vorkultur eine Dichte von ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

2.2.4 Einfrieren von *D. discoideum* Zellen

Zur Konservierung der Amöben wurden axenisch gewachsene Zellen geerntet und mit einer Dichte von $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium (AX- oder HL5-Medium + 5% (v/v) DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf 1ml-Aliquots verteilt, die dann zunächst auf Eis aufbewahrt wurden. Ein $10 \times 9 \times 5$ cm großer Messingblock (3,25 kg) mit passenden Bohrungen, der auf 4°C vorgekühlt worden war, wurde mit den Ampullen beschiekt und dann für mind. 15 h bei -70°C aufbewahrt. Die Ampullen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff oder bei -70°C gelagert. Zur Revitalisierung eingefrorener Zellen wurde ein Aliquot unter fließendem, kaltem Wasser schnell aufgetaut, die Zellen direkt einmal mit 20 ml kaltem AX-Medium gewaschen und schließlich in 10 ml AX-Medium resuspendiert und in eine Petrischale überführt. Bei Transformanten wurde nach 24 h das Medium gewechselt und das geeignete Selektionsmittel zugegeben.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

2.3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (1981)

Die von Holmes und Quigley 1981 beschriebene Methode wurde zur Isolierung kleiner Plasmidmengen (Minipräparation) verwendet, und ist sehr gut geeignet, um eine große Anzahl von Ansätzen parallel zu bearbeiten. Grundlage dieser Methode ist, daß chromosomale DNA, Proteine und Zellwandmaterial beim Erhitzen auf 95°C in einer Detergens-enthaltenden Lösung koagulieren und abzentrifugiert werden können, während RNA und Plasmid-DNA löslich bleiben und im Überstand zu finden sind.

Mit einem sterilen Zahnstocher wurden Bakterien von einem Kulturausstrich abgenommen und in $200 \mu\text{l}$ STET/Lysozym-Puffer resuspendiert. Alternativ wurden 1,5 ml einer frischen Über Nacht-Schüttelkultur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abgeerntet (10.000 UpM , 2 min, RT), der Überstand verworfen und das Bakteriensediment im oben genannten Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde 1 min bei 95°C inkubiert. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation sedimentiert (12500 UpM , 25 min, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) und das Sediment mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Nukleinsäuren im Überstand wurden nach Zugabe von $200 \mu\text{l}$ 2-Propanol 5 min bei RT gefällt und in der Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert (11.000 UpM , 20 min, RT).

Das DNA-Präzipitat wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, abermals zentrifugiert (14.000 UpM, 10 min, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge), bei 37°C getrocknet und schließlich in 20-50 µl H₂O (bid., autokl.) oder TE-Puffer aufgenommen.

STET/Lysozym-Puffer (pH 8,0)

50 mM Tris/HCl

50 mM EDTA

0.5% Triton X-100

8% Saccharose

(vor Gebrauch zugeben)

2.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA nach der Qiagen-Methode

Um sehr reine Plasmid-DNA aus *E. coli* zu erhalten, wurde das Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurden 5 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) mit den entsprechenden Bakterien von einem Kulturausstrich angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden darauf durch Zentrifugation (10.000 UpM, 2 min, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) geerntet und in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach direkter Zugabe von 300 µl P2-Puffer wurden die Ansätze vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Dabei kam es neben dem Verdau der RNA durch die RNase (P1) durch Alkali- und SDS-Behandlung (P2) zur Lyse der Zellmembran (Methode der „alkalischen Lyse“ nach Birnboim und Doly, 1979). Anschließend wurden 300 µl eisgekühlter P3-Puffer zugegeben, abermals vorsichtig gemischt und die Proben 10 min auf Eis inkubiert. Durch die folgende Zentrifugation (10.000 UpM, 15 min, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurden Proteine und übrige Zellbestandteile, wie z.B. die chromosomale DNA, die an Überreste der Zellmembran gebunden ist, sedimentiert. Das Sediment wurde verworfen und die überstehende Lösung, welche die Plasmid-DNA enthielt, durch einen zweiten Zentrifugationsschritt (10 min, „clearspin“) nochmals gereinigt. Der nun klare Überstand wurde auf eine QIAGEN-Säule aufgetragen, die zuvor mit 1 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war. Es folgten vier Waschgänge der Anionenaustauschersäule, an welche die Plasmid-DNA und RNA-Überreste gebunden hatten, mit jew. 1 ml QC-Puffer. Die Plasmid-DNA wurde schließlich mit 0,8 ml QF-Puffer eluiert, durch Zugabe von 0,7 Vol 2-Propanol gefällt und abzentrifugiert (12.000 UpM, 30 min, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat nach Waschen mit 1 ml eiskaltem, 70%igem Ethanol an der Luft getrocknet und in 30-50 µl H₂O (bid., autokl.) oder TE-Puffer aufgenommen.

Neben dem beschriebenen QIAGEN Plasmid Mini Kit wurde auch mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit gearbeitet, welches nach demselben Prinzip funktioniert.

Puffer P1	Puffer P2	Puffer P3
50 mM Tris/HCl (pH 8,0)	200 mM NaOH	3 mM Kaliumacetat (pH 5,5)
10 mM EDTA	1% SDS	
100 µg/ml RNase A		
Puffer QBT	Puffer QC	Puffer QF
750 mM NaCl	1 M NaCl	1,25 M NaCl
50 mM MOPS (pH 7,0)	50 mM MOPS (pH 7,0)	50 mM Tris/HCl (pH 8,5)
15% Ethanol		15% Ethanol
0,15% Triton X-100		

2.3.2 Verdau mit Restriktionsenzymen

Um doppelsträngige DNA-Moleküle an definierten Stellen zu schneiden, wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen verwendet. Die Restriktion erfolgte dabei nach Herstellerangaben in dem vorgesehenen Puffer und bei der enzymespezifischen Temperatur.

Für die Durchführung wurde das passende Enzym ausgewählt und mit Hilfe der folgenden Beziehung die Anzahl der „Units“ (U) an Enzym bestimmt, die benötigt wurden, um 1 µg DNA in 1 h vollständig zu restringieren:

$$[L_{\text{Standardgenom}} \cdot S_{\text{DNA-Molekül}}] / [L_{\text{DNA-Molekül}} \cdot S_{\text{Standardgenom}}] = U_{\text{Enzym}} / \mu\text{g} \cdot \text{h}$$

mit L = Länge der DNA und S = Anzahl der Schnittstellen der Restriktionsendonuklease.

Die Länge des Standardgenoms beträgt im Falle des λ-Phagen, auf den die meisten Enzymaktivitäten normiert sind, 48502 Bp.

Da Enzyme in 50% Glycerin aufbewahrt werden und dieses in zu hoher Konzentration die Restriktion stört, war es wichtig, daß der Enzymanteil höchstens $1/10$ des Gesamtansatzes betrug. Die Ansatzgrößen wurden jeweils für eine Restriktionsdauer von 1 h berechnet. Die Reaktion konnte dann entweder durch Zugabe von DNA-Probenpuffer (2.3.3) oder durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gestoppt werden.

Um den bei Agarosegel-Elektrophoresen störenden RNA-Hintergrund zu eliminieren, wurde nach Restriktion der DNA aus Minipräparationen in der Regel 1 µg RNase A zugesetzt und der Ansatz weitere 30 min bei 37°C inkubiert.

2.3.3 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989)

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in 0,7 bis 1,5%igen (^{w/v}) Agarosegelen, die in 1 × Tris/Boratpuffer angesetzt wurden. Laufpuffer und Gelpuffer waren identisch. Die Gele wurden in Flachbett-Gelapparaturen verschiedener Größen (4 × 7 cm, 8 × 7 cm, 12 × 13,5 cm, Eigenbau) gegossen. Die zu trennende DNA wurde mit ¹/₉ Vol 10 × DNA-Probenpuffer versetzt und geladen. Die Trennung erfolgte bei 1-5 V/cm. Nach dem Lauf wurden die Gele in einer wäßrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) für 10-30 min gefärbt und dann 30 min in Wasser entfärbt. Die Gele wurden unter UV-Licht bei 312 nm betrachtet und mit Hilfe des Eagle Eye-Systems fotografiert und ausgewertet.

DNA-Probenpuffer

40% Saccharose

0,5% SDS

0,25% Bromphenolblau

in TE-Puffer aufnehmen

DNA-Größenstandards:

*Hind*III-geschnittene λDNA (BRL):

23130 Bp, 9416 Bp, 6557 Bp, 4361 Bp,

2322 Bp, 2027 Bp, 564 Bp, 125 Bp

*Hae*III-geschnittene φX174-RF-DNA (BRL):

1353 Bp, 1078 Bp, 872 Bp, 603 Bp, 310 Bp,

281/271 Bp, 234 Bp, 194 Bp, 118 Bp, 72 Bp

2.3.4 Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

Die DNA wurde zunächst mittels Agarosegel-Elektrophorese in 1 × Tris/Boratpuffer aufgetrennt. Im Anschluß daran wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel unter UV-Licht (312 nm) betrachtet und das Gelstück mit dem gewünschten Fragment mit einer sterilen Skalpellklinge aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 3 Vol (100 mg ~ 100 µl) QG-Puffer wurde 10 min bei 50°C inkubiert. Um den Auflösungsvorgang des Gelstücks zu beschleunigen, konnte alle 2-3 min mit einem Vortex gemischt werden. Nach Zugabe von 1 Vol 2-Propanol wurde der Ansatz auf eine QIAquick-Säule (in 2 ml Auffanggefäß) geladen und 1 min bei 14.000 UpM zentrifugiert (RT, Eppendorf-Tischzentrifuge). Der Durchfluß wurde verworfen und, um alle Agarosereste zu entfernen, 0,5 ml QG-Puffer auf die Säule aufgetragen und abermals zentrifugiert (wie oben). Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 0,75 ml PE-Puffer (zweimalige Zentrifugation wie oben, um jeglichen Waschpuffer zu entfernen).

Zum Abschluß wurden 20-50 µl EB-Puffer oder H₂O (bid., autokl.) auf die Säule geladen, 1 min bei RT inkubiert und die DNA durch Zentrifugation (wie oben) in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert.

Puffer

alle im QIAquick Gel Extraction Kit enthalten

2.3.5 Oligonukleotide

Die für die Sequenzierung und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzten Oligonukleotide wurden in der Regel durch die Firmen MWG-Biotech oder Interactiva hergestellt und lyophilisiert geliefert. Die festen Oligonukleotide wurden in sterilem Wasser (bid., autokl.) aufgenommen und auf 20 pmol/µl verdünnt.

2.3.5.1 Oligonukleotide für die Sequenzierung

PT7-7-rev 5'–GTA ATC GTC AGA CCA AGT TTA–3'

2.3.5.2 Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion

CAP1f 5'–GGG CAT ATG TCA GAA GCA ACT ATT GTT G–3'
 CAP133f 5'–GGG CAT ATG GCT GGT CCA TCA TCA GCA TCA G–3'
 CAP151f 5'–GGG CAT ATG TCA GTT AAG GAA TTC CAA AAT TTA G–3'
 CAP220f 5'–GGG CAT ATG GCA CCA GAA GTT GGT AAT CAA G–3'
 CAP646f 5'–GGG CAT ATG AAT CCA AAA GGT GGA GAT G–3'
 CAP721f 5'–GGG CAT ATG GCT GTT TCA TCC ACT CCA G–3'
 CAP763f 5'–GGG CAT ATG TTA GGT GCA GTT TTC GGT G–3'
 CAP781f 5'–GGG CAT ATG GAA CTT AGC AAA GGT GAT GG–3'
 CAP835f 5'–GGG CAT ATG AAA TCC AAA AAT TTC ACC G–3'
 CAP645b 5'–GGG GGA TCC TTA CCA AGT TAA ACC GGT GGT ATG–3'
 CAP684b 5'–GGG GGA TCC TTA TGT AGC AGA TTT AGC ATC–3'
 CAP1311b 5'–GGG GGA TCC TTA ATC ATC ATT TTC AGT TGC ACC TGG–3'
 CAP1392b 5'–GGG GGA TCC TTA AAT ATG TGA AGT TGA TTC AG–3'

2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) kann ganz allgemein bei Wahl geeigneter Oligonukleotide zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Abschnitten verwendet werden (Saiki *et al.*, 1985). Dazu werden eine doppelsträngige DNA-Vorlage und zwei begrenzende Oligonukleotid-Primer in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden (dNTPs) und der hitzeresistenten *Pfu-Turbo* DNA Polymerase (Hogrefe *et al.*, 1997) einer kontinuierlich aufeinander folgenden Reihe von Denaturierungen, Primer-Hybridisierungen und DNA-Polymerisierungen ausgesetzt. Die Oligonukleotid-Primer können an den Enden einen Überhang von nicht hybridisierenden Nukleotiden haben, mit deren Hilfe andere Sequenzen wie z.B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingeführt werden.

Das Volumen eines PCR-Ansatzes betrug 50 µl. Durch die Verwendung eines Thermoblocks (Biometra UNO) mit beheizbarem Deckel entfiel die Überschichtung mit Mineralöl. Ein Durchlauf wurde stets durch einen vorgeschobenen Denaturierungsschritt von 300 s Dauer eingeleitet, um die DNA-Matrize zu Beginn der Reaktion vollständig zu denaturieren. An den letzten Zyklus wurde wiederum ein Polymerisationsschritt von 600 s Dauer angehängt, um vollständig polymerisierte Endprodukte zu erhalten. Die Hybridisierungstemperatur T_m (°C) eines Oligonukleotids wurde anhand seiner Basenzusammensetzung wie folgt abgeschätzt (Suggs *et al.*, 1981):

$$T_m (\text{°C}) \cong 4 \cdot (N_G + N_C) + 2 \cdot (N_A + N_T) - 10$$

Mit N = Anzahl der Adenine (A), Thyminen (T), Guanidinen (G) oder Cytosinen (C) im Oligonukleotid.

Reaktionsansatz (50 µl):

0,5 µg Plasmid-DNA
 10 pmol 5'-Oligonukleotid
 10 pmol 3'-Oligonukleotid
 dNTP-Mix (jeweils 5 mM)
 75 mM MgCl₂
 5 µl 10 x PCR-Puffer
 1,25-2,5 U *PfuTurbo* DNA Polymerase
 ad 50 µl mit H₂O (bid., autokl.)

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 92°C, 40-60 s
 Hybridisierung: 62-68°C, 40-60 s
 Verlängerung: 72°C, 40-60 s
 Zyklenzahl: 25

10 × PCR-Puffer (10 × Cloned *Pfu* DNA Polymerase Reaction Buffer, Stratagene)
 200 mM Tris/HCl (pH 8,8)
 100 mM KCl
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 20 mM MgSO₄
 1% Triton X-100
 1 mg/ml BSA (Nuklease-frei)

2.3.7 Phosphatase-Behandlung (Sambrook *et al.*, 1989)

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, Boehringer) entfernt. Dazu wurden im Zuge der Restriktion 1-2 U alkalischer Phosphatase zu der bereits linearisierten Vektor-DNA gegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch anschließende Fällung der DNA gestoppt.

2.3.8 DNA-Ligase-Reaktion

DNA-Fragmente wurden mit T4 DNA Ligase verknüpft. Nach Bestimmung der Konzentrationen von dephosphoryliertem Vektor und Fragment mittels Messung der Absorption bei 260 nm wurde die einzusetzende Menge an Fragment-DNA nach der unten aufgeführten Formel berechnet und die Ligation in einem Volumen von 10 oder 15 µl angesetzt. Dabei wurde stets ein molares Vektor:Insert-Verhältnis von 1:1 gewählt und von 100-200 ng Vektor-DNA ausgegangen. Für die Ligationsreaktion wurde 14-16 h bei 16°C inkubiert.

$$\{ [\text{ng}]_{\text{Vektor}} \cdot [\text{kBp}]_{\text{Insert}} / [\text{kBp}]_{\text{Vektor}} \} \cdot \text{molares Verhältnis} \left(\frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \right) = [\text{ng}]_{\text{Insert}}$$

Reaktionsansatz:	5 × Ligationspuffer (pH 7,6)
linearisierte Vektor-DNA (100-200 ng)	100 mM Tris/HCl
DNA-Fragment	25 mM MgCl ₂
¹ / ₅ Vol 5 × Ligationspuffer	25 mM DTT
1 U T4 DNA Ligase	2,5 mM ATP
ad 10 oder 15 µl mit H ₂ O (bid., autokl.)	250 µg/ml BSA

2.3.9 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Elektroporation

2 l LB-Medium wurden mit 20 ml Übernachtskultur des gewünschten *E. coli* Stammes angeimpft und bei 37°C und 220 UpM geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,5 erreicht war. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, in sterile Falconröhrchen überführt, abzentrifugiert (3000 UpM, 10 min, 4°C) und in sterilem, eiskaltem Wasser resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in sterilem, kaltem Wasser gewaschen und jeweils abzentrifugiert (wie oben), wobei bei jedem Waschschrift das Volumen um die Hälfte reduziert wurde. Die Zellen wurden schließlich nach Abdekantieren des Wassers in 20 ml 10% Glycerin aufgenommen und nach erneutem Zentrifugieren in der Restflüssigkeit (1-2 ml) resuspendiert. Aliquots zu je 50 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.10 Elektroporation von *E. coli*

Zur Transformation wurden die Zellen (50 µl pro Ansatz) auf Eis aufgetaut und zusammen mit dem kompletten Ligationsansatz, welcher zuvor gefällt und in 10 µl Wasser (bid., autokl.) aufgenommen worden war, in eine Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) pipettiert. Nach 10 min auf Eis wurde bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV transformiert. Der Transformationsansatz wurde dann direkt in 1 ml SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) aufgenommen und die Zellen 45-60 min bei 37°C und kontinuierlichem Schütteln regeneriert. Abschließend wurden drei ansteigende Volumina (meist 5, 10 und 25 bzw. 50µl) auf LB-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium

2% Bacto-Trypton

0,5% Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glukose

2.3.11 *E. coli* Dauerkulturen

Wichtige Transformanten wurden als Dauerkulturen konserviert. Zu diesem Zweck wurden pro Ansatz 2-3 Impfösen der entsprechenden Bakterien von einem Plattenausstrich in 1 ml LB-Medium mit 7% DMSO resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.3.12 Sequenzierung von DNA-Molekülen

Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden durch die Firma Toplab/Bereich Genomics (jetzt Firma Medigenomix) vorgenommen.

2.4 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE (Lämmli, 1970) wurden in der Regel 10, 12 oder 15%ige Trenngele und 3%ige Sammelgele verwendet ($7,5 \times 10 \times 0,05$ cm).

Trenngel (15%)	Trenngel (15%; ~ 64 ml-Ansatz für mind. 11 Gele)
15% (^w / _v) Acrylamid	31,95 ml Acrylamidlösung (30%:0,8% Bisacrylamid)
0,4% (^w / _v) Bisacrylamid	14,85 ml bid. H ₂ O
0,3% (^w / _v) APS	720 µl 20% (^w / _v) APS
0,1% (^v / _v) TEMED	16,05 µl TEMED
in Lower Tris	16,05 ml Lower Tris
Sammelgel (3%)	Sammelgel (3%; ~ 24 ml-Ansatz für mind. 11 Gele)
3% (^w / _v) Acrylamid	2,7 ml Acrylamidlösung (30%:0,8% Bisacrylamid)
0,08% (^w / _v) Bisacrylamid	15,15 ml bid. H ₂ O
0,15% (^w / _v) APS	360 µl 20% (^w / _v) APS
0,1% (^v / _v) TEMED	12 µl TEMED
in Upper Tris	6,0 ml Upper Tris
Upper Tris	Lower Tris
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
0,4 % (^w / _v) SDS	0,4 % (^w / _v) SDS

Zu der aufzutrennenden Proteinlösung wurde $\frac{1}{2}$ Vol 3 \times SDS-Probenpuffer gegeben und die Lösung für 3-5 min gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 140-180 V konstanter Spannung im unten beschriebenen Elektrophorese-Puffer. Als Standards wurden Gemische von Proteinen definierter Molekülmassen verwendet (s.u.).

3 \times SDS-Probenpuffer	Elektrophoresepuffer
65 mM Tris/HCl (pH 6,8)	25 mM Tris-Base
10% Glycerol	192 mM Glycin
3% ($^{w/v}$) SDS	0,1 % ($^{w/v}$) SDS
5% β -Mercaptoethanol	
Bromphenolblau <i>ad lib.</i>	
LMW („Low Molecular Weight“, Biorad):	See Blue (Novex, Invitrogen):
92,5 kDa, 68 kDa, 45 kDa,	250 kDa, 98 kDa, 64 kDa, 50 kDa,
33 kDa, 20 kDa, 14 kDa	36 kDa, 30 kDa, 16 kDa, 6 kDa, 4 kDa

2.4.2 Coomassie Blau-Färbung von Proteinen

SDS-PAGE-Gele wurden für 15-30 min in Färbelösung geschüttelt. Nicht gebundener Farbstoff wurde anschließend durch Schütteln in einer Entfärbelösung ausgewaschen.

SDS-PAGE-Gelfärbelösung	Entfärbelösung
0,1% Coomassie Brilliant Blau R 250	10% Ethanol
50% Methanol	7% Essigsäure
12% Essigsäure	
filtrieren	

2.4.3 Silberfärbung von Proteinen nach SDS-PAGE (Oakley *et al.*, 1980)

Das Acrylamidgel wurde zunächst 30 min in einer wässrigen Lösung (10% Ethanol, 7% Essigsäure) fixiert. Es folgte eine 30minütige Inkubation in einer 10%igen Glutaraldehyd-Lösung. Nach einem zweistündigen Waschschrift in Wasser (häufiges Wechseln) wurde das Gel für 30 min in ammoniakalischer Silbernitrat-Lösung (Lösung A) inkubiert, danach 10 s mit Wasser gewaschen und schließlich in Lösung B gefärbt. Die Färbereaktion wurde mit der wässrigen Lösung (s.o.) gestoppt.

Lösung A	Lösung B
2 ml NaOH (1 M)	10 ml Methanol
1,4 ml NH ₃ (25%)	1 ml Formaldehyd
92,6 ml H ₂ O	50 mg Zitronensäure
3 ml AgNO ₃ -Lsg. (0,2 mg/ml; tropfenweise zugeben)	90 ml H ₂ O

2.4.4 Immunoblot („Western Blot“) – Nachweis der Antigene durch Chemilumineszenz oder Färbung

Nach der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE wurden die Proteine nach der modifizierten Methode von Towbin *et al.* (1979) auf Nitrozellulose (Schleicher & Schuell BA85) transferiert. Dies erfolgte in der Regel mit einer „semi-dry“ Elektrophorese-Apparatur (BioRad Trans-Blot SD) für 50 min bei 12 V. Das Blotsystem wurde dabei wie folgt aufgebaut: 3 Lagen Gel-Blotting-Papier (Whatman) – Nitrozellulose (passend für das Gel zurechtgeschnitten) – Gel – 3 Lagen Gel-Blotting-Papier. Nitrozellulose und Gel-Blotting-Papiere waren zuvor ausreichend mit Transferpuffer befeuchtet worden. Eventuelle Luftblasen wurden jeweils ausgerollt.

Transferpuffer

25 mM Tris/HCl (pH 8,5)
190 mM Glycin
20% Methanol
0,02% SDS

Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose wurde diese über Nacht mit 5% Milchpulver in NCP-Puffer (für diese Anwendung mit 0,2% Natriumazid) abgesättigt. Im Anschluß daran wurde die Nitrozellulose 3 × in NCP-Puffer (jew. 5-10 min) und 3 × in NCP-Puffer mit 0,5% BSA (jew. 5-10 min.) gewaschen und dann für 60-90 min mit dem ersten Antikörper (unverdünnt oder bis 1:2000 in NCP-Puffer mit 0,5% BSA verdünnte Hybridomaüberstände) inkubiert. Nach erneutem Waschen (wie oben) folgte eine 60-90minütige Inkubation der Nitrozellulose mit dem sekundären Antikörper (1:1000 verdünnt in NCP-Puffer mit 0,5% BSA). Dabei konnte es sich um einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten oder einen Phosphatase-gekoppelten Ziege-anti-Maus IgG Antikörper handeln. Vor der abschließenden Nachweisreaktion wurde nochmals gründlich mit NCP-Puffer gewaschen (mehrfacher Pufferwechsel), um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen und störenden Hintergrund zu minimieren.

War der sekundäre Antikörper an Peroxidase gekoppelt, wurde der Nitrozellulosefilter anschließend mit der Blotseite nach unten in 4 ml Nachweisreagenz für Chemilumineszenz (ECL: Enhanced ChemiLuminescence, Amersham) gelegt und etwa 15 s inkubiert. Die Lumineszenzreaktion wurde dann umgehend mit Hilfe eines Röntgenfilms (X-omat AR 5, Kodak) nachgewiesen (Expositionszeit: 1-60 s). Bei dieser Methode oxidiert die an den Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase das Luminol im Nachweisreagenz, was zu einer Lichtemission bei etwa 430 nm führt. Dieses Blaulicht, welches durch zusätzliche Substanzen (Phenolderivate) im Puffer verstärkt wird, kann mit Röntgenfilm sehr sensitiv detektiert werden.

Bei Verwendung eines an alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörpers wurde eine Farb-reaktion durchgeführt. Dazu wurde die Membran zunächst 15 min in Substratpuffer (0,1 M Na₂CO₃-Puffer pH 10,2) inkubiert und dann in 30 ml Substratpuffer mit 0,2 mg/ml BCIP (zuvor in max. 300 µl DMSO gelöst) entwickelt. Nach etwa 5 min kam es zu einer Blaugrün-Färbung der spezifischen Banden. Diese konnte, wenn erforderlich, durch Zugabe von 0,33 mg/ml NBT erhöht werden, was jedoch zu einer Dunkelviolett-Färbung der Banden führte. Die Reaktion wurde schließlich mit destilliertem Wasser gestoppt.

Chemilumineszenz-Reagenz	10 × NCP-Puffer (pH 8,0)
200 µl Luminol (250 mM in DMSO; Luminol: 3-Amino-phthalhydrazid)	100 mM Tris/HCl 1,5 M NaCl
89 µl p-Cumarsäure (90 mM in DMSO)	5 ml Tween 20
2 ml Tris/HCl (1 M, pH 8,5)	ad 1 l mit bid. H ₂ O
ad 20 ml mit bid. H ₂ O (im Dunklen aufbewahren!) vor Gebrauch 6,1 µl H ₂ O ₂ (30%) zugeben	

2.4.5 Proteinbestimmung

2.4.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Diese beruht auf der Bindung von Coomassie Blau G-250 durch Proteine, wobei das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Zur Erstellung der Eichkurve wurde Rinderserumalbumin als Standard verwendet. SDS stört die Reaktion stark, weshalb für SDS-haltige Proben die folgende Methode verwendet wurde (bei der Kalibrierung wurde SDS in der gleichen Konzentration zugesetzt).

2.4.5.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Methode von Lowry *et al.* (1951) basiert auf der Reaktion des Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenzes (Phosphor-Wolfram/Molybdänsäurekomplex) mit Proteinen, wobei sich durch die Reaktion mit Tyrosin-Resten ein blaue Verfärbung ergibt. Die Extinktion verhält sich direkt proportional zu der Proteinmenge und kann photometrisch bei 750 nm bestimmt werden. Die Reaktion wird durch DTT beeinträchtigt.

2.4.5.3 Konzentrationsbestimmung nach Gill und von Hippel

Diese Methode ist geeignet, wenn die Proteinsequenz bekannt ist und das entsprechende Protein in reiner Form vorliegt. Sie basiert vor allem auf der Absorption des Tryptophans (W) und des Tyrosins (Y) bei einer Wellenlänge von 280 nm ($W = 5690$, $Y = 1280$; nach Gill und von Hippel, 1989). Über die Häufigkeit dieser Aminosäurenreste in der Polypeptidkette kann die Konzentration des entsprechenden aufgereinigten Proteins rechnerisch abgeschätzt werden: Die Anzahl jeder der beiden Aminosäuren wird dazu jeweils mit dem oben angegebenen Wert multipliziert und die resultierenden Werte addiert, woraus sich der OD_{280} -Wert einer 1 M Lösung des entsprechenden Proteins ergibt. Nach Messung der tatsächlichen Extinktion kann dann die molare Konzentration der vorliegenden Lösung mittels Dreisatz bestimmt und diese mit Hilfe der molaren Masse auch in mg/ml umgerechnet werden. Eine leichte Ungenauigkeit liegt darin, daß nicht alle W und Y in der entsprechenden Proteinsequenz mit den angegebenen Literaturwerten der OD_{280} übereinstimmen. Trotzdem ist diese Methode erheblich genauer als die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford oder Lowry *et al.* (Pace *et al.*, 1995).

2.4.6 Aufreinigung und Markierung von Actin

2.4.6.1 Präparation von Actin aus Kaninchenmuskel

Die Präparation von Actin aus Kaninchenmuskel folgte im wesentlichen den von Spudich und Watt (1971) sowie Pardee und Spudich (1982) beschriebenen Methoden. Bis zur Aufnahme des Sediments in Aceton (s.u.) wurde dabei stets bei 4°C gearbeitet. Begonnen wurde damit, frisches Muskelfleisch aus Kaninchenschenkel oder -rücken (vom Viktualienmarkt München, möglichst schlachtfrisch und nicht abgehangen) in einem Fleischwolf zu zerkleinern und 10 min mit eiskaltem Hochsalzextraktionspuffer unter Rühren zu extrahieren.

Das Gemisch wurde bei 4000 g (10 min, 4°C) abzentrifugiert und der Extraktionsschritt wiederholt. Dabei wurde hauptsächlich Myosin extrahiert. Als nächstes wurde das Sediment in eiskaltem Wasser aufgenommen und der pH-Wert durch Zugabe einer 1 M Na₂CO₃-Lösung auf 8,2 bis 8,5 eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation (4000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und der Vorgang mehrfach wiederholt, bis ein Anschwellen des Sediments zu beobachten war. Dieses wurde dann unter Rühren mit kaltem Aceton versetzt und etwa 1 h lang stehen gelassen, wobei noch mehrere Male umgerührt wurde. Anschließend wurde das Aceton gewechselt, die Inkubation wiederholt und danach der Ansatz durch ein Netzfilter filtriert. Das so erhaltene Acetonpulver wurde dann auf Abreißrollenpapier gelegt, mit dem Netzfilter abgedeckt und über Nacht bei RT im Abzug getrocknet. Danach konnte es bei -20°C trocken gelagert werden.

10 g des Acetonpulvers wurden in 200 ml G-Puffer für 30 min bei 0°C extrahiert und anschließend über mehrere Lagen Nylonfilter filtriert. Der Rückstand wurde nochmals auf gleiche Weise extrahiert. Die Filtrate wurden dann vereinigt und zentrifugiert (30.000 g, 30 min, 0°C). Um eine Polymerisation des Actins zu erreichen, wurde der erhaltene Überstand auf 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ und 1 mM ATP eingestellt und für 2 h bei 4°C inkubiert. Die Polymerisation des Actins war an der Zunahme der Viskosität der Lösung zu erkennen. Durch langsame Zugabe von festem KCl wurde die KCl-Konzentration der Lösung auf 0,8 M erhöht. Dieser Schritt diente zur Entfernung von Tropomyosin. Die Actin-Filamente konnten dann durch Zentrifugation (150.000 g, 3 h) sedimentiert werden. Das F-Actin-Sediment wurde in G-Puffer aufgenommen und zur Depolymerisation unter mehrfachem Pufferwechsel gegen G-Puffer dialysiert. Zur Abtrennung kurzer Actin-Oligomere und noch vorhandener Verunreinigungen wurde das Dialysat nochmals zentrifugiert (100.000 g, 3 h) und die oberen ²/₃ des Überstands über eine in G-Puffer äquilibrierte Sephacryl S300 (Pharmacia) Gelfiltrationssäule (2,5 × 45 cm) gereinigt. Das so erhaltene G-Actin wurde bei 4°C gelagert. Aufgrund der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 290 nm konnte die G-Actin-Konzentration (mg/ml) durch das Verhältnis OD₂₉₀/0,65 berechnet werden. Der molare Extinktionskoeffizient von Actin bei 290 nm beträgt 26600 M⁻¹cm⁻¹ (Wegner, 1976).

Extraktionspuffer (pH 6,5)

0,5 M KCl

0,1 M K₂HPO₄

G-Puffer (pH 8,0)

2 mM Tris/HCl

0,2 mM CaCl₂

0,2 mM ATP

0,02% NaN₃

0,5 mM DTT

Für die in 2.4.6.2 und 2.4.8.1-4 beschriebenen Anwendungen wurde stets Actin aus Kaninchenmuskel verwendet!

2.4.6.2 Pyren-Markierung von Actin

Die Markierung von Actin mit N-(1-pyrenyl)iodoacetamid (Pyren) wurde nach Kouyama und Mihashi (1981) und Weber *et al.* (1987) durchgeführt. Das gereinigte G-Actin wurde dazu dreimal gegen je 1 l P-Puffer dialysiert. Durch die anschließende Zugabe von KCl und MgCl₂ (150 bzw. 2 mM Endkonzentrationen) wurde die Actin-Polymerisation gestartet und unmittelbar danach Pyren (in DMSO) im 3-5fachen molaren Überschuß tropfenweise unter Rühren zugegeben. Da Pyren lichtempfindlich ist, wurden alle folgenden Schritte bei leichter Abdunklung durchgeführt. Das Actin-Pyren-Gemisch wurde zunächst 60 min bei RT und dann über Nacht bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden die Actinfilamente durch Zentrifugation (150.000 g, 3 h, 4°C) präzipitiert. Das F-Actin-Sediment wurde in G-Puffer homogenisiert und dreimal gegen G-Puffer dialysiert, um die Depolymerisation des Actins zu ermöglichen. Nach erneuter Ultrazentrifugation (150.000 g, 3 h, 4°C) wurde das Pyren-markierte G-Actin mittels Gelfiltration (siehe in 2.4.6.1) weiter aufgereinigt und schließlich bei -70°C gelagert. Der Anteil Pyren-markierten Actins wurde über die molaren Extinktionskoeffizienten von Actin ($\epsilon_{290} = 26600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Pyren-Actin ($\epsilon_{290} = 29400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und Pyren ($\epsilon_{344} = 22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) nach folgender Formel berechnet (Cooper *et al.*, 1983):

$$\text{Actinkonzentration: } c_{\text{Actin}} = (\text{OD}_{290} - (0,127 \cdot \text{OD}_{344})) / \epsilon_{\text{Actin}}$$
$$\text{Anteil Pyren-markierten Actins: Pyren-Actin (\%)} = c_{\text{Pyren}} \cdot 100 / c_{\text{Actin}}$$

Die Effizienz der durchgeführten Markierungen von Actin mit Pyren nach der beschriebenen Methode lag bei 70-90%.

P-Puffer (pH 7,6)

1 mM NaHCO₃

0,1 mM CaCl₂

0,2 mM ATP

2.4.7 Expression von CAP-Konstrukten in *E. coli* und ihre Aufreinigung

Alle Konstrukte des *D. discoideum* CAP wurden in *E. coli* BL21 Bakterien exprimiert. Die Zellen wurden dazu bei 30 oder 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geschüttelt (220-240 UpM) und dann die Expression durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration) induziert. Nach Übernachts-Inkubation unter gleichen Bedingungen wurden die Zellen schließlich geerntet, in TEDABP-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine ist im Ergebnisteil ausführlich beschrieben (3.3.2, 3.3.6, 3.4.3).

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Proteinaufreinigungen wurden bei 4°C durchgeführt!

2.4.8 Nachweis der Actinbindung

2.4.8.1 Nachweis actinbindender Proteine durch Low-Shear-Viskosimetrie (MacLean-Fletcher und Pollard, 1980)

Das Kugelfallviskosimeter kann zur Bestimmung der Viskosität einer Lösung verwendet werden. Es stellt daher ein geeignetes Instrument zum Nachweis von Proteinen dar, welche die Viskosität einer Actinlösung unter polymerisierenden Bedingungen beeinflussen. Ein relatives Maß für die Viskosität einer Lösung ist die Zeit, die eine Kugel benötigt, um eine definierte Strecke in einer Kapillare zurückzulegen, die mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt ist. Diese Methode, bei der während der Messung geringe Scherkräfte entstehen, wurde zur Untersuchung von actinbindenden Proteinen von MacLean-Fletcher und Pollard als Low-Shear- bzw. Kugelfall-Viskosimetrie eingeführt (MacLean-Fletcher und Pollard, 1980).

Das Gesamtvolumen des Versuchsansatzes betrug 160 µl. Die Endkonzentration von Actin wurde auf 0,4-0,6 mg/ml eingestellt. Zu einem bestimmten Volumen der zu testenden Proteinlösung wurden 16 µl 10 × Polymerisationspuffer (mit Ca²⁺ oder EGTA) und ein bestimmtes Volumen an Wasser gegeben, so daß nach Zugabe von G-Actin das Gesamtvolumen von 160 µl erreicht wurde. Durch Zugabe des G-Actins und Mischen der Probe (Vortex) wurde die Polymerisation gestartet. Die Probe wurde dann in eine 100 µl Glaskapillare überführt, deren unteres Ende mit Knetmasse verschlossen wurde.

Nach 20 min Inkubation bei RT (für alle Ansätze die gleiche Zeit!) wurde die Zeit bestimmt, die eine Stahlkugel benötigte, um eine definierte Strecke in der Kapillare (für alle Ansätze die gleiche Strecke!) zurückzulegen.

Die ermittelten Werte wurden jeweils auf die Zeit des Probenansatzes bezogen, der an Stelle des zu testenden Proteins nur Puffer oder Wasser enthielt. Dieser Wert, der für jede Meßreihe neu ermittelt wurde, wurde als 100% Viskosität definiert.

10 × Polymerisationspuffer (pH 7,2)

100 mM Imidazol

20 mM MgCl₂

10 mM ATP

2 mM CaCl₂ oder 10 mM EGTA

Der Polymerisationspuffer wurde mit und ohne Ca²⁺ (mit EGTA) eingesetzt, um eine mögliche Ca²⁺-Abhängigkeit des untersuchten Proteins zu ermitteln.

2.4.8.2 Polymerisation von Pyren-markiertem Actin in Gegenwart eines actinbindenden Proteins

Während der Polymerisation von Pyren-markiertem Actin erhöht sich die Fluoreszenz der gebundenen Pyrenmoleküle um etwa das 10-20fache. Es konnte gezeigt werden, daß Pyren selektiv mit dem Cys₃₇₄ des Actinmoleküls reagiert (Kouyama und Mihashi, 1981). Die Verwendung von Pyren-markiertem Actin stellt somit eine äußerst sensitive Methode dar, um Polymerisation und Depolymerisation von Actin zu verfolgen. Cooper und Pollard (1982) konnten zudem zeigen, daß sich durch die Markierung mit Pyren die Polymerisationseigenschaften von Actin nicht ändern. Einen Hinweis, wie die drastische Zunahme der Fluoreszenz von Pyren-markiertem Actin bei der Polymerisation verursacht werden könnte, lieferten die Arbeiten von Holmes *et al.* (1990). Aus der 3D-Struktur von G- und F-Actin ist zu ersehen, daß Cys₃₇₄ bei der Polymerisation in räumliche Nähe zu einer benachbarten Actinuntereinheit im Filament kommt. Dies könnte die starke Zunahme der Fluoreszenz des Pyrens bewirken. Weitere Vorteile dieser Methode sind, daß mit einem kleinen Probenvolumen gearbeitet werden kann und daß im Gegensatz zu den viskosimetrischen Messungen die Probe keinen Scherkräften ausgesetzt wird.

Die Messungen erfolgten mit einem Lumineszenz-Spektrometer (Aminco Bowman) in 1 ml Polystyren-Küvetten (Sigma, #C-5416). Anregungs- und Emissionswellenlänge betragen dabei 365 bzw. 386 nm. Die Polymerisation von Actin, die bei RT nach gut 1 h vollständig war, wurde in Gegenwart ansteigender Konzentrationen eines zu testenden Proteins gemessen. Das Gesamtvolumen des Versuchsansatzes betrug 800 µl.

Es wurden im allgemeinen 3 μM G-Actin und 0,3 μM Pyren-G-Actin (Endkonzentrationen) mit dem zu untersuchenden Protein in der Küvette gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von 80 μl 10 \times Polymerisationspuffer (mit Ca^{2+} oder EGTA) und Wasser (*ad* 800 μl) gestartet. Die unterschiedlichen Fluoreszenzwerte zum Startzeitpunkt, die auf der direkten G-Actin-Protein-Interaktion beruhten, wurden jeweils gleich Null gesetzt. Polymerisationspuffer mit EGTA wurde eingesetzt, um eine mögliche Ca^{2+} -Abhängigkeit des bindenden Proteins zu ermitteln. Der Einfluß der C-terminalen CAP-Domäne auf bereits polymerisiertes Actin wurde durch Zugabe des Proteins nach etwa 100 min Polymerisationszeit untersucht.

2.4.8.3 Nachweis der Actinbindung durch Kosedimentation mit F-Actin

Actinfilamente ab einer Länge von etwa zehn Monomeren können bei 100.000 g sedimentiert werden (Brown *et al.*, 1982). Proteine, die mit F-Actin assoziiert sind, befinden sich dann ebenfalls im Actin-Sediment. Dieser als „spin down assay“ bezeichnete Versuch erlaubt daher die Untersuchung der Bindung oder Assoziation eines Proteins an Actinfilamente.

Die hierbei eingesetzten Actin- und GFP-Filactin-C-Lösungen (beide aus Dialyse gegen G-Puffer, pH 8,0) wurden zuvor bei 50.000 UpM abzentrifugiert (30 min, 4°C, Optima TL Ultrazentrifuge, Beckman). Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug jeweils 100 μl und enthielt neben etwa 7 μM Actin (Endkonzentration, aus Überstand) ansteigende Mengen GFP-Filactin-C (aus Überstand) in 1 \times Polymerisationspuffer (mit Ca^{2+} oder EGTA). Die Ansätze wurden gemischt und nach gut einstündiger Inkubation (35 min bei RT + 30 min auf Eis) bei 50.000 UpM abzentrifugiert (30 min, 4°C, Optima TL Ultrazentrifuge, Beckman). Im Anschluß daran wurden jeweils 50 μl der Überstände mit 25 μl 3 \times SDS-Probenpuffer versetzt. Die Sedimente wurde jeweils vorsichtig, aber gründlich von den Überständen befreit, gut getrocknet und schließlich quantitativ in 150 bzw. 300 μl 1 \times SDS-Probenpuffer resuspendiert (mittels 2 min Ultraschallbehandlung). Die Sediment-Suspensionen und Überstände wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Commassie Blau-Färbung sowie Immunoblotting analysiert. Es wurden außerdem Versuche unter Hochsalzbedingungen (150 mM NaCl) und mit vorpolymerisiertem Actin (30 min bei RT) durchgeführt.

2.4.8.4 Nachweis der Actinbindung durch Chemische Quervernetzung

Chemische Quervernetzung wurde sowohl mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) als auch mit Glutaraldehyd durchgeführt.

Quervernetzung durch EDC:

Carbodiimide katalysieren die Bildung von Amidbindungen zwischen Carboxyl- und Aminogruppen durch Aktivierung der Carboxylgruppe zum O-Acylharnstoff. Dieses Intermediat kann direkt mit dem Amin zum Amid oder mit einem zweiten Carboxylat zum Anhydrid reagieren. Das Anhydrid kann dann von einem Amin angegriffen werden, wobei ein Amid entsteht und ein Carboxylat regeneriert wird. Durch die Verwendung von N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS) können die aktivierten Carboxylgruppen über die Bildung eines aktiven Esters vor Hydrolyse geschützt werden und damit die Ausbeuten erhöht werden. Die Kombination von EDC und NHS ermöglicht daher, durch Quervernetzung von räumlich nah benachbarten Amino- und Carboxylgruppen die Interaktion von Proteinen oder Untereinheiten nachzuweisen.

Zur Quervernetzung wurden 6 bzw. 9 μM CAPC835-1392 (*D. discoideum* CAP-C ohne Verprolin-homologe Domäne) und 2 μM Actin (Endkonzentrationen, in 20 mM KH_2PO_4 , pH 7,0; allg.: jew. 0,1-0,3 mg/ml) gemischt und nach 25minütiger Vorinkubation auf Eis zunächst 5 min mit 5 mM NHS (Endkonzentration) bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10 mM EDC (Endkonzentration) wurde die Reaktion dann gestartet und nach 1, 2, 5 bzw. 10 min bei RT durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration 50 mM) wieder gestoppt. Als Kontrolle wurden die Proteine wie geschildert behandelt, jedoch ohne Zugabe von EDC. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug nach Glycin-Zugabe 50 μl . Die Analyse der Reaktionen erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließender Immunmarkierung sowie Coomassie Blau-Färbung.

Quervernetzung durch Glutaraldehyd:

Bei der Quervernetzung mit Glutaraldehyd bilden die beiden Aldehydgruppen des Glutaraldehyds bevorzugt mit ϵ -Aminogruppen des Lysins unter Abspaltung von Wasser Schiff'sche Basen (Richards und Knowles, 1968). Dabei können durch die Polymerbildung des Glutaraldehyds auch räumlich weiter voneinander entfernte Lysine quervernetzt werden.

Die Quervernetzung von CAPC835-1392 und Actin (Endkonzentrationen wie oben, in 20 mM KH_2PO_4 , pH 7,0; allg.: jew. 0,1-0,3 mg/ml) wurde nach Mischen und 30minütiger Vorinkubation (25 min auf Eis + 5 min bei RT) durch Zugabe von 0,125% Glutaraldehyd (Endkonzentration, allg.: 0,1-0,2%) gestartet. Nach 1, 2, 5 bzw. 10 min bei RT wurde die Reaktion auch hier durch Glycin-Zugabe (s.o.) gestoppt. Auch das Gesamtvolumen eines Ansatzes und die folgenden Schritte entsprechen den obigen Angaben. Zur Kontrolle wurde hier auf die Zugabe des Glutaraldehyds verzichtet.

2.4.9 Phosphorylierung durch Proteinkinasen

Einer der häufigsten Mechanismen für die Regulation der Proteinaktivität ist die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des Proteins. Diese Reaktionen werden von Proteinkinasen bzw. Phosphatasen katalysiert. Die meisten Proteinkinasen phosphorylieren entweder Tyrosin oder Threonin bzw. Serin. In fast allen biologischen Prozessen spielt die Proteinphosphorylierung eine entscheidende Rolle, so z.B. bei der Zellteilung, der Transkription/Translation, beim Metabolismus und auch bei der Signalübertragung. Um die Rolle des CAP-Homologs in *D. discoideum* weiter zu untersuchen, wurde das Protein als Substrat für die Proteinkinase A eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine cAMP-abhängige Proteinkinase, die sich in der Regel aus zwei Untereinheiten, einer regulatorischen und einer katalytischen, zusammensetzt (Traugh *et al.*, 1974). Erst durch die Bindung von cyclischem AMP an die regulatorische Domäne wird die katalytische freigesetzt und ist dann in der Lage, den Transfer eines Phosphats von einem ATP auf ein Protein zu katalysieren. In diesem Versuchsansatz wurde nicht die Gesamtkinase eingesetzt, sondern lediglich die katalytische Untereinheit (Beavo *et al.*, 1974). Die Zugabe von cAMP war daher nicht erforderlich.

4 µg des CAPN151-678 Proteins, 3 U der Proteinkinasenuntereinheit sowie 4,7 µl 10 × Kinasierungspuffer (mit MgCl₂) und 0,5 µl γ-³²P-ATP (10 mCi/ml) wurden mit dest. Wasser auf ein Endvolumen von 47 µl aufgefüllt, wobei das radioaktive Phosphat zuletzt zugegeben wurde. Es wurde - abhängig von der Stärke der Radioaktivität - zwischen 10 und 30 min bei 30°C inkubiert. Im Anschluß daran wurden 23 µl 3 × SDS-Probenpuffer zugefügt und die Lösung 3-5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Coomassie Blau-Färbung und anschließender Entfärbung wurde das Gel mit den nun sichtbaren Banden zwischen ein zurechtgeschnittenes, gut befeuchtetes Stück Whatman-Papier und Frischhaltefolie gelegt und so für 2 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Zum Abschluß wurde ein Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -70°C exponiert.

10 × Kinasierungspuffer (pH 7,4)

200 mM Tris

100 mM MgCl₂

100 mM β-Glycerophosphat

10 mM DTT

2.4.10 Chromatographische Analyse

2.4.10.1 Präparation von Zellhomogenat und subzellulären Fraktionen

Dazu wurden etwa $8 \cdot 10^8$ axenisch gewachsene AX2 Zellen geerntet (1200 UpM, 5 min, 4°C), ein- bis zweimal mit kaltem Soerensen-Puffer gewaschen und das Zellsediment 1:1 (v/v) im jeweiligen Puffer (Homogenisations- oder IEDANBP-Puffer (mit 50 mM Imidazol), siehe Abschnitt 4.3.1) resuspendiert. Die Zellen wurden dann durch mehrfache Passage durch Nuclepore-Filter (5 µm Porengröße) geöffnet, wobei die Vollständigkeit der Öffnung unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Im Anschluß daran wurde das Zellhomogenat bei 100.000 g zentrifugiert (30 min, 4°C, TLA 100.3 Rotor). Der Überstand enthielt die cytosolischen Proteine, das Sediment umfaßte neben membranösen Bestandteilen und polymerisiertem Actomyosin auch Organellen wie Zellkerne und Mitochondrien. Durch Immunoblots konnte gezeigt werden, daß sich Filactin fast ausschließlich im Überstand befand. Für die anschließende Gelfiltration wurde dieser vorsichtig vom Sediment abgenommen und direkt verwendet.

Homogenisationspuffer (pH 8,0)

30 mM Tris/HCl

4 mM EGTA

2 mM EDTA

2 mM DTT

30% Saccharose

5 mM Benzamidin

vor Gebrauch zugeben:

0,2 mM ATP

0,5 mM PMSF

2.4.10.2 Analytische Gelfiltration

Der Filactin-enhaltende Überstand aus 2.4.10.1 wurde dazu auf eine Superose 12 PC 3.2/30-Säule (Pharmacia Smart System; V = 2,4 ml) geladen. Die Säule war zuvor bei 4°C mit 50 mM NaH₂PO₄-Puffer (pH 7,5) bzw. IEDANBP-Puffer (mit 50 mM Imidazol; pH 7,6) äquilibriumiert worden. Die Flußrate betrug 40 µl/min, das Volumen der entscheidenden Fraktionen betrug 80 µl. Diese wurden anschließend durch SDS-PAGE, gefolgt von Coomassie Blau-Färbung und/oder Immunmarkierung analysiert. Die Versuche wurden immer mindestens zweimal durchgeführt.

Die Elution der Markerproteine wurde über die Absorption bei 280 nm bestimmt und für die Erstellung einer halblogarithmischen Eichkurve verwendet. Die Datenauswertung wurde mit der Smart Manager Software für OS/2 (Pharmacia) durchgeführt und mittels Sigma Plot 2.01 (Jandel Scientific) graphisch dargestellt.

Standards:	[kDa]
Ferritin	450
Katalase	240
Aldolase	158
BSA	68
Ovalbumin	45
Chymotrypsinogen A	25
Cytochrom c	12,5
ATP	0,65

2.4.11 Immunologische Methoden

2.4.11.1 Aufreinigung von IgG über Affinitätschromatographie

600 ml des monoklonalen Hybridomaüberstandes 1S-192-2 (Anti-Filactin (C-term.)) wurden zunächst auf 55% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt. Die so gefällte Lösung wurde abzentrifugiert (10.000 UpM, 10 min, 4°C, JA-14 Rotor), der Überstand anschließend verworfen und das Präzipitat in ausreichend PBS-Puffer (pH 7,0) vollständig gelöst (hier: 45 ml). Diese Suspension wurde gegen PBS-Puffer dialysiert. Nach mehrfachem Pufferwechsel wurde dann abermals zentrifugiert (10.000 UpM, 10 min, 4°C, JA-20 Rotor; „clearspin“). Der erhaltene Überstand wurde auf eine mit PBS-Puffer äquilibrierte Protein A-Sepharose Säule (1 ml HiTrap, Pharmacia) geladen und für 16 h bei 4°C rezirkuliert. Im Anschluß daran wurde die beladene Säule mit PBS-Puffer gewaschen, bis die OD_{280} des Eluats $< 0,02$ war. Nach einem weiteren Waschschrift mit einem Säulenvolumen $^{1/10}$ PBS-Puffer erfolgte schließlich die Elution der gebundenen Antikörper mit 0,1 M Essigsäure + 0,15 M NaCl (pH 2,3). Die Fraktionen, die Antikörper enthielten, wurden mit 1 M Tris (pH 8,0) neutralisiert und gegen PBS-Puffer dialysiert. Nach einem Waschschrift mit 0,5 M Essigsäure + 0,15 M NaCl und erneuter Äquilibrierung mit PBS-Puffer konnte die Säule erneut zur Aufreinigung des gleichen Antikörpers verwendet werden.

PBS-Puffer (pH 7,0)

70 mM Na₂HPO₄

30 mM KH₂PO₄

150 mM NaCl

0,1% NaN₃

2.4.11.2 Immunopräzipitation

Dazu waren zunächst $3\text{-}4 \cdot 10^8$ axenisch gewachsene Zellen (GFP-Filactin, GFP-Filactin-C) geerntet (1200 UpM, 5 min, 4°C) und zweimal mit kaltem Soerensen-Puffer gewaschen worden (alle folgenden Schritte bei 4°C!). Das Zellsediment wurde dann zwischenzeitlich eingefroren oder direkt durch Vortexen in Lysis-Puffer resuspendiert. Das erhaltene Zellhomogenat wurde 5 min bei 10.000 g abzentrifugiert, das Sediment verworfen und der Überstand mit 50 µg gereinigtem IgG Antikörper unter Rotieren inkubiert. Kurz darauf wurden dann 200 µl gequollene Protein A-Sepharose (CL-4B, Pharmacia; 1:5 (v/v) in Lysis-Puffer → etwa 40 µl gepacktes Vol) zugegeben und für 2 h unter ständigem Rotieren inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend zentrifugiert (13.000 g, 2 min) und der Überstand gründlich abgenommen. Die Protein A-Sepharose wurde zweimal mit Lysis-Puffer gewaschen, in 3 × SDS-Probenpuffer (evtl. weitere Verdünnung durch Zugabe von 1 × SDS-Probenpuffer) aufgekocht und das Eluat mittels SDS-PAGE sowie anschließender Immunmarkierung und Coomassie Blau-Färbung analysiert.

Lysis-Puffer

25 mM HEPES

50 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

2 × Proteasen Inhibitor Cocktail (Sigma)

5% Glycerin

1,5% P-1140 (Octylpolyoxyethylen)

2.4.11.3 Präparative Immunopräzipitationen

(a) in vitro

Bei diesem Ansatz wurde etwa von der 3-4fachen Menge des Zellmaterials in 2.4.11.2 ausgegangen.

Die Zellen wurde nach den entsprechenden Zentrifugations- und Waschschritten in so viel Lysis-Puffer aufgenommen, daß etwa 5 ml Zellextrakt (Aliquot #1) erhalten wurden (alle folgenden Schritte bei 4°C!). Diese wurden dann bei 18.000 UpM abzentrifugiert (10 min, 4°C, JA-20 Rotor). Das Sediment dieser Zentrifugation (#3) wurde auf Eis gelagert und zum Überstand (#2) 200 µg IgG Antikörper gegeben. Nach kurzem Rotieren kamen 600 µl Protein A-Sepharose (1:5 (v/v) in Lysis-Puffer → etwa 125 µl gepacktes Vol) hinzu und der Ansatz wurde für weitere 2 h rotiert. Im Anschluß daran wurde erneut zentrifugiert (10.000 g, 5 min, 4°C). Der Überstand (#4) wurde auf Eis gelagert. Das Sediment wurde zweimal mit jeweils 500 µl Lysis-Puffer und einmal mit 500 µl $\frac{1}{10}$ Lysis-Puffer gewaschen. Für die Elution wurden dann 500 µl 0,1 M Essigsäure + 0,15 M NaCl (pH 2,3) zugegeben, 1 min rotiert und wieder zentrifugiert (wie zuvor). Der Überstand wurde mit 1 M Tris (pH 8,0) neutralisiert, und der Elutions- und Neutralisationsschritt mit dem Sediment noch einmal wiederholt. Die Überstände (#5) wurden schließlich vereinigt und wie das Sediment (#6) und die anderen Aliquots nach SDS-PAGE durch Coomassie Blau-Färbung und Immunoblotting analysiert.

(b) mit Protein A-Sepharose-IgG-Säule

(Alle folgenden Schritte bei 4°C!) Dazu musste zunächst eine Protein A-Sepharose-Säule gegossen werden (etwa 2 ml gepacktes Vol). Auf diese wurden dann etwa 3 ml IgG Antikörper geladen und solange rezirkuliert, bis der Gehalt an IgG Antikörpern im Eluat < 2,5% war. Damit war etwa 1 mg geladen worden. Als nächstes wurde die Säule mit PBS-Puffer (pH 7,0) äquilibriert (5-6 Säulenvolumina (SV)). In der Zwischenzeit wurden $1 \cdot 10^{10}$ axenisch gewachsene Zellen geerntet, zweimal mit Soerensen-Puffer gewaschen und in Lysis-Puffer aufgenommen (Endvolumen: ~ 50 ml). Es folgte eine 30minütige Ultrazentrifugation des Zellhomogenats bei 100.000 g, in deren Anschluß der Überstand (pH auf 7,0 eingestellt!) auf die äquilibrierte IgG-Säule geladen und über Nacht rezirkuliert wurde. Nach mehreren Waschschrritten (2 SV Lysis-, 2 SV PBS- und 2 SV $\frac{1}{10}$ PBS-Puffer) wurde der IgG-Protein-Komplex dann mit 4 M MgCl₂-Lösung (nur tropfenweise zugegeben!) eluiert und fraktioniert aufgefangen. Über die Messung der OD₂₈₀ wurden die stark proteinhaltigen Fraktionen ermittelt, gegen PBS-Puffer dialysiert und mittels SDS-PAGE und folgender Coomassie Blau-Färbung analysiert.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die intrazelluläre Verteilung von Filactin wurde unter anderem mittels indirekter Immunfluoreszenz näher untersucht, wobei die Zellen fixiert, mit monoklonalen Antikörpern markiert und die Verteilung des ersten Antikörpers mit einem fluoreszierenden zweiten Ziege-anti-Maus IgG Antikörper sichtbar gemacht wurde. Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden *D. discoideum* AX2 Zellen bis zu einer Dichte von $3\text{-}4 \cdot 10^6$ Zellen/ml kultiviert, geerntet (1200 UpM, 5 min) und nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer (für Immunfluoreszenz, pH 7,4) auf $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden jeweils 500 μl pro Deckgläschen (zuvor mit 0,1 M HCl gereinigt, zweimal mit bid. Wasser abgespült und getrocknet) ausgebracht und den Zellen für 30 min erlaubt, abzusetzen. Die überschüssige Lösung wurde danach abgesaugt und die vegetativen Zellen (t_0) mit der jeweiligen Methode sofort fixiert.

2.5.1.1 Methanol-Fixierung

Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Deckgläschen für 10 min in -20°C kaltem Methanol inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Die Deckgläser wurden danach 30 min an der Luft getrocknet und mit den Zellen nach oben auf einen Parafilm gelegt. Anschließend wurde bei RT 2×5 min mit PBS- und 2×15 min mit PBG-Puffer abgesättigt.

2.5.1.2 Glutaraldehydfixierung nach Symons und Mitchison

SM-Puffer kann bei F-Aktin-Markierungen mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin anstelle der Methanol-Fixierung verwendet werden. Fixiert wurde hier für 30 min, wobei 500 μl SM-Puffer pro Deckglas aufgetragen wurden. Im Anschluß daran wurde 3×15 min mit PBG-Puffer abgesättigt.

2.5.1.3 Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixierung

Als Alternative zur SM-Fixierung kann bei Phalloidinfärbungen des Aktin-Cytoskeletts auch mit einem Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Gemisch fixiert werden. Hierbei werden dann aber mind. doppelt so viele Zellen pro Deckglas aufgetragen. Zur Fixierung wurden 750 μl Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixativ pro Deckgläschen aufgetragen und 30 min inkubiert. Danach wurde wie folgt abgesättigt: $1 \times$ kurz mit 10 mM PIPES, $1 \times$ kurz mit PBS/Glycin, 5×5 min mit PBS/Glycin und 2×15 min mit PBG-Puffer.

2.5.1.4 Inkubation mit Antikörpern

Nachdem die Zellen fixiert und abgesättigt worden waren, wurde über Nacht mit Verdünnungen des ersten Antikörpers in PBG inkubiert. Nach Entfernen des ersten Antikörpers wurden die Präparate dann 6×10 min mit PBG gewaschen und danach der zweite fluoreszierende Antikörper (in PBG) für 1 h (nicht länger; im Dunklen!) aufgetragen. Dabei wurde Cy3-gekoppeltes Ziege-anti-Maus IgG (1:1000 - 1:2000 verdünnt) verwendet. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol, Sigma) in einer 1:1000 Verdünnung (0,25 $\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration) zugegeben. Nach jeweils dreimaligem Waschen für 5 min, zunächst in PBG- und dann in PBS-Puffer, wurden die Präparate mit bid. H_2O abgespült, in Gelvatol eingebettet und schließlich zum Aushärten über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

10 \times PBS (für Immunfluoreszenz, pH 7,4)

1,37 M NaCl

27 mM KCl

81 mM NaH_2PO_4

15 mM KH_2PO_4

in bid. H_2O , autoklavieren

PBG

0,5% BSA

0,05% Fischgelatine

in 1 \times PBS, steril filtrieren

SM-Puffer (Symons und Mitchison, 1991)

10 mM MES (pH 6,1)

138 mM KCl

3 mM MgCl_2

2 mM EGTA

vor Gebrauch zugeben:

0,5% Triton X-100 („surfact amps“, Pierce)

0,5% Glutaraldehyd („electron microscopy grade“)

PBS/Glycin

PBS + 100 mM Glycin

(Glycin bricht nach der Fixation freie Aldehydgruppen auf!)

10 mM PIPES (pH 6,0)

in bid. H_2O lösen,

pH mit NaOH einstellen \rightarrow

Lösung wird dann wieder klar.

Paraformaldehyd/Pikrinsäure

20 ml-Ansatz:

0,4 g Paraformaldehyd einwiegen,

in 7 ml H_2O lösen

(dazu leicht erhitzen, nicht über 40°C !),

durch Zugabe von 2-3 Tropfen 1-2 M NaOH

wird Lösung wieder klar,

nun 10 ml 20 mM PIPES-Lösung zugeben,

erst dann 3 ml gesättigte Pikrinsäure,

pH auf 6,0 einstellen

Gelvatol

20 g Gelvatol 20-30 (Polyvinylalkohol, MW 10.000) 16 h in PBS rühren,

40 ml Glycerin zugeben,

nochmals 16 h rühren,

zentrifugieren (12.000 g, 15 min, RT),

Überstand abnehmen,

25 ng/ml DABCO (Diazabicyclo-(2,2,2)-oktan) zum Überstand geben

und aliquotiert in Spritzen bei -20°C lagern

2.5.2 Triton-unlösliches Zellpellet nach cAMP-Stimulation

Nach Stimulation von *D. discoideum* Zellen mit cAMP steigt in der Zelle die Menge an F-Actin an, die sich als Triton-unlösliches Actin bestimmen läßt. Hierzu wurde mit einigen Modifikationen die Methode von McRobbie und Newell (1983) angewendet. Die Versuche sollten eine mögliche Assoziation des untersuchten Proteins (Filactin, GFP-Filactin) mit dem Cytoskelett dokumentieren.

Zellen, die bei einer Dichte von $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml 8 h gehungert hatten, wurden durch Zentrifugieren (1200 UpM, 5 min) geerntet und nach einem Waschschrift mit gleicher Dichte in RT-Soerensen-Puffer resuspendiert. Je 270 μ l dieser Zellsuspension wurden dann in die Löcher einer 24 Wells Gewebekulturplatte pipettiert und die Zellen bei 1000 UpM auf einem Heizblock/Schüttler (Thermomixer 5436 Eppendorf; bei RT!) geschüttelt. Es wurden pro Loch 30 μ l einer 10^{-6} M cAMP-Lösung zugegeben und die Stimulation dann zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von jeweils 300 μ l $2 \times$ McRobbie-Puffer abgebrochen. Im Anschluß daran wurden 300 μ l-Aliquots aller Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden nach 15minütiger Inkubation auf Eis und 15-20 min bei RT zentrifugiert (12.000 g, 10 min, 4°C, Eppendorf-Tischzentrifuge). Die Überstände wurden gründlich abgenommen und verworfen. Die Sedimente wurden nach kurzem Trocknen bei RT in 80 μ l $1 \times$ SDS-Probenpuffer aufgenommen (evtl. mittels Ultraschallbehandlung). Die nach SDS-PAGE und Immunoblotting erhaltenen Daten (Coomassie Blau-Gele und Western Blots) wurden schließlich mit dem Programm NIH Image 1.62 ausgewertet. Alle Versuche wurden mind. zweimal durchgeführt.

$2 \times$ McRobbie-Puffer (pH 7,0)

20 mM KCl

20 mM Imidazol

20 mM EGTA

4 mM NaN_3

2% Triton X-100

2.5.3 Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung nach osmotischem Schock der Zellen

Die Actinpolymerisation und anschließende Prozesse wie z.B. seine Verknüpfung mit der Membran werden zum einen durch nichtkovalente Bindung regulatorischer Proteine und kleinerer Liganden wie ATP, ADP, Ca^{2+} oder Mg^{2+} beeinflusst. Zum anderen erfolgt die Kontrolle der Actinfunktionen durch kovalente Modifikationen (Jungbluth *et al.*, 1995).

Säuger Actin wird beispielsweise *in vitro* an Tyrosinresten phosphoryliert (Machicao und Wieland, 1985), *in vivo* findet eine solche Phosphorylierung an Serinresten statt, infolge der Stimulation durch Epidermalen Wachstumsfaktor (Van Delft *et al.*, 1995). *D. discoideum* Actin kann ebenfalls an Serin/Threonin- (Schweiger *et al.*, 1992) und Tyrosinresten (Schweiger *et al.*, 1992; Howard *et al.*, 1993; Jungbluth *et al.*, 1994) phosphoryliert werden. Tyrosin-Phosphorylierung wurde hier unter folgenden Bedingungen beobachtet:

- Zugabe von Phenylarsenoxid (PAO; inhibiert Phosphotyrosin-Phosphatasen) (Schweiger *et al.*, 1992).
- Transfer hungernder Zellen in Nährmedium (Howard *et al.*, 1993),
- ATP-Abreicherung in Abwesenheit von Sauerstoff bzw. nach Behandlung mit 2,4-Dinitrophenol (DNP; schaltet die oxidative Phosphorylierung reversibel aus) (Jungbluth *et al.*, 1994) oder
- Osmotischer Schock (Osmoregulation) (Gamper *et al.*, 1999).

In den Punkten 2 und 3 korrelierte die Phosphorylierung mit Veränderungen der Zellgestalt (Abrunden der Zellen) und der Umgestaltung der Actinfilamente (Howard *et al.*, 1993; Jungbluth *et al.*, 1995). Stresssituationen wie diese scheinen daher zu einer Aktivierung von Signalwegen zu führen, welche es der *D. discoideum* Zelle erlauben, auf die äußerlichen Einflüsse zu reagieren. Die Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierung einiger Komponenten sind demnach Bestandteil dieser Wege.

Da Actin Gegenstand der Tyrosin-Phosphorylierung ist, sollte auch Filactin auf diesen Umstand untersucht werden. Dazu wurden drei unterschiedliche Zelltypen *in vivo* wie folgt einem osmotischen Schock unterzogen: AX2, GFP-Filactin und GFP-Filactin-C Zellen wurden zunächst geerntet (1200 UpM, 5 min). Nach einem Waschschrift ließ man die Zellen dann bei einer Dichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in RT-Soerensen-Puffer hungern (150 UpM, 21°C). Nach 3,5-4 h wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen abgenommen, geerntet (s.o.) und das Sediment in 80 μ l $1 \times$ SDS-Probenpuffer aufgenommen (3-5 min 95°C). Die übrigen Zellen wurden jeweils durch Einstellung auf 0,2 M Sorbitol (Zugabe von $\frac{1}{14}$ Vol 3 M Sorbitol) stimuliert und weitere 25 min bei 21°C und 150 UpM inkubiert (osmotischer Schock). Danach wurden wiederum $5 \cdot 10^6$ Zellen abgenommen und wie oben behandelt. Anteile der gesammelten Aliquots wurden schließlich durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie Blau- und Immunfärbung ausgewertet. Der Ansatz wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

3 ERGEBNISSE I

Untersuchungen zur Struktur und Funktion des CAP-Homologs (Cyclase-assoziiertes Protein) in *D. discoideum*

3.1 Das *D. discoideum* CAP-Homolog

Die Grundlagen dieses ersten Ergebnisteils waren einerseits die Dissertation von Ulrich Gottwald (1995) und die darin beschriebenen Untersuchungen zum Homolog des Cyclase-assoziierten Proteins (Cyclase-Associated Protein, CAP) in *D. discoideum*, und andererseits die dazugehörige Veröffentlichung (Gottwald *et al.*, 1996).

Auf der Suche nach neuen actinbindenden Proteinen war hier eine λ gt11 cDNA Expressionsbibliothek (Lacombe *et al.*, 1986) mit polyklonalem anti-Severin Serum von Kaninchen (André *et al.*, 1989) getestet worden. Die anschließende DNA-Sequenzierung ergab für einen positiven, 1505 Bp umfassenden Klon einen offenen Leserahmen, der für ein Protein aus 464 Aminosäuren codierte. Da die Sequenz für die Darstellung der Ergebnisse sehr wichtig ist, wird sie in Abb. 4 noch einmal gezeigt und kurz erklärt.

```

1   atg tca gaa gca act att gtt gaa tta tta aaa aga tta gat caa gca act act cgt tta
1   M S E A T I V E L L K R L D Q A T T R I
61  gaa gca gtt gaa aaa tca att gca tca ggt gtt gca tca tca tca tca tca tca cca
21  E A V E K S I A S G V A S S S S S S S S P
121 tca agt ggt gca gct ggt cca tca tca gca tca gtt aag gaa ttc caa aat tta gtt gat
41  S S G A A G P S S A S V K E F Q N L V D
181 caa cat att aca cca ttt gtt gct ctt tca aag aaa tta gca cca gaa gtt ggt aat caa
61  Q H I T P F V A L S K K L A P E V G N Q
241 gtt gaa caa tta gtt aaa gcc atc gat gct gaa aag gcc tta atc aac act gca tca caa
81  V E Q L V K A I D A E K A L I N T A S Q
301 agt aaa aaa cca tct caa gaa act tta tta gaa tta att aaa cca tta aat aac ttt gcc
101 S K K P S Q E T L L E L I K P L N N F A
361 gct gaa gtt ggt aaa att aga gat agc aac cgt tcc tca aaa ttc ttt aac aat ctc tct
121 A E V G K I R D S N R S S K F F N N L S
421 gct atc agt gaa tca att ggt ttc ctt agt tgg gtt gta gtt gaa cca act cca ggt cca
141 A I S E S I G F L S W V V V E P T P G P
481 cat gtt gca gaa atg aga ggt tca gct gaa ttc tac act aat cgt atc tta aaa gaa ttc
161 H V A E M R G S A E F Y T N R I L K E F
541 aaa ggt gtt aat caa gat caa gtt gat tgg gtt tca aac tat gta aac ttc ctt aaa gat
181 K G V N Q D Q V D W V S N Y V N F L K D
601 ctc gaa aaa tat att aaa caa tat cat acc acc ggt tta act tgg aat cca aaa ggt gga
201 L E K Y I K Q Y H T T G L T W N P K G G
661 gat gct aaa tct gct aca cca gca cca gct tca tca gca cca gcc gcc cca gtt gca cca
221 D A K S A T P A P A S S A P A A P V A P
721 gct gtt tca tcc act cca gtt gaa tca aag aaa ggt cca ggt tta ggt gca gtt ttc ggt
241 A V S S T P V E S K K G P G L G A V F G

```

```

781   gaa ctt agc aaa ggt gat ggt gtt acc agt ggt tta aaa aaa gtt acc aac gat atg aaa
261   E L S K G D G V T S G L K K V T N D M K
841   tcc aaa aat ttc acc gac aaa tca tca gtt gtt aaa gct gct gat act aaa gtc gcc aaa
281   S K N F T D K S S V V K A A D T K V A K
901   gtt gat gct cca tct aga cca gcc gtt ttt gct ctc caa ggt aac aaa tgg tcc att gaa
301   V D A P S R P A V F A L Q G N K W S I E
961   tat caa gtt aac aac aaa gaa att gtc att gcc gag cca gat agt cgt caa act gtt tac
321   Y Q V N N K E I V I A E P D S R Q T V Y
1021  att ttc caa tgt gta aac tct tta gtt caa atc aaa ggt aaa gtt aat gca att act ctt
341   I F Q C V N S L V Q I K G K V N A I T L
1081  gat ggt tgt aaa aag act tca atc gtt ttc gaa aat gcc att tcc tct tgt gaa gtt gtc
361   D G C K K T S I V F E N A I S S C E V V
1141  aat tgt aat ggt gtt gaa atc caa gtc act ggt cgt gta cca tca att gct atc gat aag
381   N C N G V E I Q V T G R V P S I A I D K
1201  aca agt ggt tgt caa att tat ctc tct aaa gat tct tta gaa act gaa atc gtc tct tca
401   T S G C Q I Y L S K D S L E T E I V S S
1261  aaa tca tct gaa atg aat gtt tta att cca ggt gca act gaa aat gat gat tta gtt gaa
421   K S S E M N V L I P G A T E N D D L V E
1321  tta gct att cca gaa caa tat aaa act tct gtt aaa ggt aat aaa tta cat act gaa tca
441   L A I P E Q Y K T S V K G N K L H T E S
1381  act tca cat att taa
461   T S H I *

```

Abb. 4: cDNA und davon abgeleitete Aminosäuresequenz des CAP-Homologs aus *D. discoideum*.

1392 Basenpaare codieren für ein Protein von 464 Aminosäuren und einer Molekularmasse von 49641 Da. Das codierende Leseraster endet mit TAA, dem bei *D. discoideum* gebräuchlichsten Stopcodon. Im aminoterminalen Bereich (dunkelgrau unterlegt, AS 1-215) ist das Protein durch eine Anhäufung von Serinen gekennzeichnet (AS 26-51). Insbesondere eine Folge von sieben Serinen, die alle einheitlich von dem Triplet TCA codiert werden, ist bemerkenswert (AS 33-39). Im prolinreichen Abschnitt (ohne Unterlegung, AS 216-254) sind 20% aller Aminosäuren Proline (P).

Weiterhin sind interessant:

- das RLD/RLE-Motiv (mögliche Bindungsstelle für die Adenylat-Cyclase) an den Positionen 12-14 und 19-21 (s. Abschnitt 1.2),
- die Aminosäurefolge APASSAPAAPV (mögliche Consensussequenz für die Bindungsstelle der SH3-Domäne) im prolinreichen Abschnitt (AS 228-238)(s. Abschnitt 1.2),
- die Verprolin-Homologie-Domäne an den Positionen 255-277 zu Beginn des carboxyterminalen Bereichs (hellgrau unterlegt, AS 255-464) (siehe Abschnitt 3.4.1).

Nach intensiven Sequenzvergleichen konnte dieses Protein der Gruppe der Cyclase-assoziierten Proteine (CAP) zugeordnet werden. Mit einer Molekülmasse von 49,6 kDa ist das *D. discoideum* Protein deutlich kleiner als sein 57,5 kDa großes Homolog aus *S. cerevisiae*, welches das erste beschriebene CAP war (Fedor-Chaikin *et al.*, 1990; Field *et al.*, 1990).

In vielen untersuchten Eukaryonten konnten weitere CAP-Homologe¹ identifiziert werden, darunter Fliege, Pflanzen und Säugetiere (Hubberstey und Mottillo, 2002). Die durchschnittliche Größe dieser hochkonservierten, actinbindenden Proteine liegt zwischen 50 und 53 kDa.

¹ Der Einfachheit halber werden alle in dieser Arbeit aufgeführten CAP-Homologen unabhängig von ihrer Herkunft und der Verbindung zur Adenylat-Cyclase mitunter lediglich als CAP bezeichnet!

In den Hefen findet man dagegen die größten CAP-Homologen. Sie liegen etwa 6-8 kDa über diesem Durchschnitt. Ähnlich groß sind die CAPs im Hausschwein, in *Lentinula endodes* und in *Drosophila melanogaster*. Alle diese Vergrößerungen sind auf Insertionen im aminoterminalen Bereich zurückzuführen. Vom Menschen sind zwei Isoformen bekannt, ebenso von Maus und Ratte. Solche multiplen CAP Gene sind bisher nur in Säugern entdeckt worden (Hubberstey und Mottillo, 2002). Die humanen CAP Proteine stimmen zwar zu 64% überein, unterscheiden sich aber deutlich in ihren Nettoladungen. Eine auffallend negative Nettoladung besitzt das CAP-Homolog aus *Candida albicans*. Tab.1 auf Seite 52 vergleicht die bis dato beschriebenen CAP Proteine in wesentlichen Aspekten.

D. discoideum CAP ist ein wasserlösliches Protein. Dies konnte auch anhand der Sequenz mit Hilfe von Hydrophobizitäts-Berechnungen gezeigt werden, nach denen das Protein keine ausgedehnten hydrophoben Regionen aufweist. Strukturelle Berechnungen zeigten einen erhöhten Anteil von α -Helices in der aminoterminalen Domäne, während der C-terminale Bereich mehr β -Faltblatt-Bereiche aufwies. Beim Vergleich der Aminosäuresequenz gegen sich selbst konnten keine Sequenz-Wiederholungen im Protein erkannt werden (Berechnungen mit der GCG-Software der Universität von Wisconsin, USA; Devereux *et al.*, 1984).

3.2 Untersuchungen zum *D. discoideum* CAP

Vorrangiges Ziel der Untersuchungen am *D. discoideum* CAP war die Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur. Dazu wurden die Ansätze NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie gewählt, die in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Tad A. Holak (MPI f. Biochemie, Martinsried) stattfanden.

Im Falle der Röntgenstrukturanalyse werden Röntgenstrahlen durch einen Proteinkristall geschickt. Da die Wellenlängen von Röntgenstrahlen kurz genug sind (0,1 bis 0,2 nm), werden die Strahlen beim Durchgang von den Atomen gebeugt. Die dann auf einem Film sichtbaren Beugungsmuster sind sehr komplex, und man erhält bereits von einem kleinen Protein bis zu 25000 Schwärzungspunkte. Für die richtige Interpretation der Beugungsmuster und die anschließende Ableitung der dreidimensionalen Struktur sind aufwendige Berechnungen erforderlich. Man verwendet im allgemeinen modifizierte Proteine, meist schwermetallhaltige Derivate.

Tab. 1: Vergleich der bisher beschriebenen CAP-Homologen aus verschiedenen Spezies.¹ IP steht für Isoelektrischen Punkt als errechnetem Wert.² Von ASP56 sind lediglich Teile des Proteins sequenziert worden. Die DNA-Sequenz ist nicht bekannt. Die Molekülmasse ist als apparente und nicht als kalkulierte angegeben.³ Für das Drosophila Protein existieren zwei Sequenzen. Obwohl die Expression des längeren Konstrukts in Drosophila bisher nicht bestätigt wurde, nimmt man an, daß es sich bei dem 424 Aminosäuren großen Protein um eine N-terminale Verkürzung des Gesamtproteins handelt.

Spezies	AS	kDa	Netto-Ladung	Netto-IP ¹	Autor
<i>Dictyostelium discoideum</i>	464	49,6	-1	7,3	Gottwald <i>et al.</i> (1996)
<i>Homo sapiens</i> (CAP1)	475	51,7	+2	8,1	Matviw <i>et al.</i> (1992)
<i>Homo sapiens</i> (CAP2)	476	52,8	-8	6,3	Yu <i>et al.</i> (1994)
<i>Rattus norvegicus</i> (CAP1)	474	51,5	0	7,5	Zelicof <i>et al.</i> (1993)
<i>Rattus norvegicus</i> (CAP2)	477	52,9	-2	7,2	Swiston <i>et al.</i> (1995)
<i>Mus musculus</i> (CAP1)	474	51,5	0	7,5	Vojtek und Cooper (1993)
<i>Mus musculus</i> (CAP2)	476	52,8	-8	6,2	unveröffentlicht
<i>Sus scrofa domestica</i> ² (ASP56; Thrombocyten)	228	56	-	-	Gieselmann und Mann (1992)
<i>Lentinula endodes</i>	518	55,4	+3	8,2	Zhou <i>et al.</i> (1998)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	526	57,5	-8	5,4	Field <i>et al.</i> (1990)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	551	60,2	-4	6,8	Kawamukai <i>et al.</i> (1991)
<i>Candida albicans</i>	545	59,6	-16	5,0	Bahn und Sundstrom (2001)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	476	51,0	-3	6,6	Town <i>et al.</i> (2002)
<i>Gossypium hirsutum</i>	471	50,6	-3	6,6	Kawai <i>et al.</i> (1998)
<i>Chlorohydra viridissima</i>	481	53,1	+1	7,6	Fenger <i>et al.</i> (1994)
<i>Xenopus laevis</i>	475	51,1	+5	8,8	Khosrowshahian <i>et al.</i> (2001)
<i>Drosophila melanogaster</i> ³	424	45,6	-1	7,0	Baum <i>et al.</i> (2000); Benlali <i>et al.</i> (2000)
	521	56,2	-10	5,5	unveröffentlicht
<i>Caenorhabditis elegans</i>	495	53,0	-2	6,9	unveröffentlicht

Bei der hochauflösenden NMR-Spektroskopie in Flüssigkeiten plazierte man eine konzentrierte Lösung des Proteins in einem starken Magnetfeld und mißt anschließend die im Radiofrequenzbereich (~ 400-800 MHz) liegenden Resonanzfrequenzen verschiedener Atome. Die Kernspinresonanzfrequenz eines Atoms wird durch die Atome der benachbarten chemischen Gruppierungen beeinflusst, wobei dieser Einfluß mit zunehmender Entfernung abnimmt. Aus der Größe der Verschiebung der Resonanzfrequenz, der sog. chemischen Verschiebung, kann man Abstände berechnen und daraus das dreidimensionale Modell des Proteins rekonstruieren. Der Vorteil dieser Methode, die von der ein- bis zur mehrdimensionalen (2D, 3D, 4D-NMR) Spektroskopie reicht, liegt darin, daß keine kristallinen Proben benötigt werden. Als Nachteil erweist sich jedoch die Tatsache, daß die Methode bis dato nur auf relativ kleine Proteine mit einer Molekülmasse bis etwa 25000 Da anwendbar ist.

Da sich die Untersuchungen zu Beginn dieser Arbeit auf die NMR-Spektroskopie konzentrierten, war dies Anlaß genug, zunächst eine Unterteilung des etwa 50 kDa großen *D. discoideum* CAPs vorzunehmen. Es wurde daher beschlossen, N- und C-terminale Domäne² des Proteins getrennt zu bearbeiten und neue, kürzere Konstrukte herzustellen. Im folgenden sind die Arbeitsschritte zu den aminoterminalen Proteinkonstrukten beschrieben, beginnend mit der Klonierung der cDNAs.

3.3 Untersuchungen zum *D. discoideum* CAP-N

3.3.1 Klonierung und Expression von CAP-N'Px

Die ersten Schritte zur Strukturauflösung der N-terminalen Domäne wurden mit dem Plasmid pT7-7 CAP-N'Px gemacht, welches zu Beginn der Arbeit schon zur Verfügung stand. In diesem Genkonstrukt war eine für die 226 aminoterminalen Aminosäuren des CAPs (siehe Abb. 4) und 6 Histidine codierende cDNA in den *E. coli* Expressionsvektor pT7-7 (Tabor, 1990) kloniert worden. Die Transkription, die beim endogenen Startcodon begann, erfolgte über den im Vektor enthaltenen T7-Promotor. Das resultierende Proteinkonstrukt besaß ein Molekulargewicht von 25400 und enthielt neben dem kompletten N-terminalen Abschnitt die elf folgenden Reste der prolinreichen Domäne sowie direkt daran anschließend sechs Histidine, einen sog. His-,tag“ (Abb. 5). Dieser ermöglicht die Bindung des gesamten Proteins an eine Ni-NTA Säule und vereinfacht so die Aufreinigung.

² Im folgenden werden die Kürzel CAP-N (bzw. CAPN) und CAP-C (bzw. CAPC) unabhängig vom Organismus für die amino- bzw. carboxyterminale Domäne von CAP verwendet!

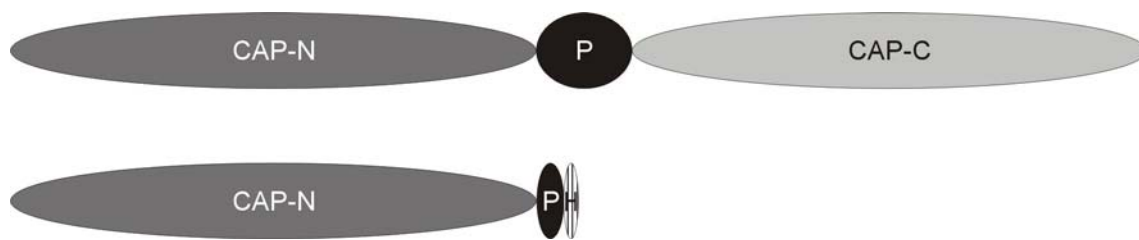


Abb. 5: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von *D. discoideum* CAP und CAP-N'Px.

Die Darstellung des CAP-Homologs aus *D. discoideum* (oben) wurde in Anlehnung an die Domänen-Funktionsanalyse von Gerst *et al.* (1991) bei CAP in *S. cerevisiae* festgelegt. Dem CAP-N'Px-Konstrukt (unten) fehlen im Gegensatz zum Gesamtprotein die 28 carboxyterminalen Aminosäuren der prolinreichen Region (P) sowie der komplette C-terminale Abschnitt. Dafür besitzt es an dieser Stelle einen His-„tag“ (H).

Das Plasmid wurde zunächst in den *E. coli* Stamm MC1061 transformiert. Da die Expression in diesem Fall jedoch nicht zu befriedigenden Ergebnissen führte – insbesondere die Expression in Minimalmedium war unzureichend –, wurde beschlossen, die Transformation im *E. coli* Stamm BL21 zu wiederholen. In diesem System war die Expression des CAP-N'Px Proteins ausgezeichnet und reproduzierbar. Dies galt sowohl für protonierte Ansätze in LB-Medium als auch für die Herstellung selektiv markierter Proteinproben in Minimal- oder definiertem Medium.

Die Zellen wurden stets bei 30°C und 200-220 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geschüttelt und die Expression des CAP-N'Px-Konstrukts dann durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration) induziert. Desweiteren wurde immer über Nacht inkubiert, da dies zu größeren Mengen an rekombinantem Protein pro Zelle führte. Im Anschluß daran wurden die Zellen geerntet (4200 UpM, 5-10 min, 4°C, Beckman J6-HC) und ein- bis zweimal in kaltem TEDABP-Puffer (pH 8,0) gewaschen. In diesem Puffer wurden sie schließlich bei -20°C eingefroren.

3.3.2 Aufreinigung von CAP-N'Px

Die gefrorenen Zellen wurden zunächst möglichst schnell in Eiswasser aufgetaut. Als etwa die Hälfte der Zellen aufgetaut war, wurden 0,2 mg/ml Lysozym³ und Proteaseninhibitor⁴ zugefügt. Zelllysate und Puffer wurden dann mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators homogenisiert (mit 5minütigen Pausen zwischen den einzelnen Durchgängen) und im Anschluß die recht dickflüssige Suspension durch Ultraschall-Behandlung (5×10 s) wieder dünnflüssig gemacht. Als nächstes folgte eine 30minütige Ultrazentrifugation (100.000 g, 4°C, Beckman Optima LE-80K, Ti 45 Rotor), in deren Anschluß der Überstand auf Eis gelagert und das Sediment in weiterem, kaltem TEDABP-Puffer pH 8,0 resuspendiert und abermals zentrifugiert wurde (wie oben). Während U. Gottwald in seiner Dissertation (1995) schreibt, daß sich die aminoternale Domäne (ohne die zusätzlichen Aminosäuren im Linker-Bereich) nach diesem Schritt als „inclusion bodies“ im Sediment befand, verblieb das rekombinante CAP-N'Px weitgehend als lösliches Protein im Überstand. Die gesammelten Überstände wurden daher nach Einstellung des pHs auf 8,0⁵ direkt auf eine Anionenaustauschersäule (DEAE-Säule; äquilibriert mit TEDABP-Puffer pH 8,0) geladen.

Das CAP-N'Px Protein befand sich bereits im Durchfluß. Dieser wurde durch Zugabe von $1/10$ Vol MEDA-Puffer pH 6,5 und 1 N HCl auf einen pH von 6,5 eingestellt und auf eine PC-Säule (Phosphocellulose P11, Kationenaustauschersäule; äquilibriert mit MEDABP-Puffer pH 6,5) geladen.

Die Elution erfolgte dann durch einen Salzgradienten von 200-1000 mM NaCl (2×250 ml), wobei das Protein erst zwischen 700 und 900 mM Salz eluiert wurde. In den meisten Präparationen war CAP-N'Px zu diesem Zeitpunkt bereits so gut aufgereinigt (>99%), daß weitere Aufreinigungsschritte nicht nötig waren. Falls doch, so wurde als dritte Säule Ni-NTA-Agarose, die mit KPM-Puffer pH 7,2 äquilibriert worden war, verwendet.

Nach mehrmaliger Dialyse des Hauptpools gegen den entsprechenden Puffer wurde dieser hierbei auf die Säule geladen und CAP-N'Px in einem Salzgradienten (2×40 ml, 0-300 mM Imidazol) bei etwa 200 mM Imidazol eluiert.

³ Lysozym greift den Polysaccharidanteil der *E. coli*-Zellwand an, indem es bestimmte glykosidische Bindungen hydrolysiert. Auf diese Weise wird die Zellwand derart geschädigt, daß das Bakterium später durch Zugabe eines Detergens lysiert werden kann.

⁴ Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche ($1/25$ einer 25 \times Lösung in 100 mM KH₂PO₄-Lösung, pH 7,0) oder Proteasen Inhibitor Cocktail, Sigma ($1/400$ einer 400 \times Lösung)

⁵ Hierzu wurde unter ständigem Rühren nur schwach konzentrierte Salzsäure zugegeben, da es sonst zu lokalem Proteinausfall kommen konnte.

In beiden Fällen wurden die gesammelten Protein-Fractionen dann schließlich gegen KPM-Puffer pH 6,5 dialysiert und mittels Ultrafiltration (Centrikon-/Centriprep-10) ankonzentriert. Aus 1 l Bakterienkultur wurden am Ende einer Aufreinigung unabhängig vom eingesetzten Medium 5-10 mg CAP-N'Px Protein erhalten. Für die anschließenden Experimente (NMR, Kristallisation) wurde dieses an die Gruppe Holak weitergegeben.

Im folgenden ist die Aufreinigung noch einmal schematisch dargestellt (Abb. 6). Die über SDS-PAGE erhaltenen Ergebnisse werden am Beispiel einer ^{15}N -Lysin markierten Probe gezeigt (Abb. 7).

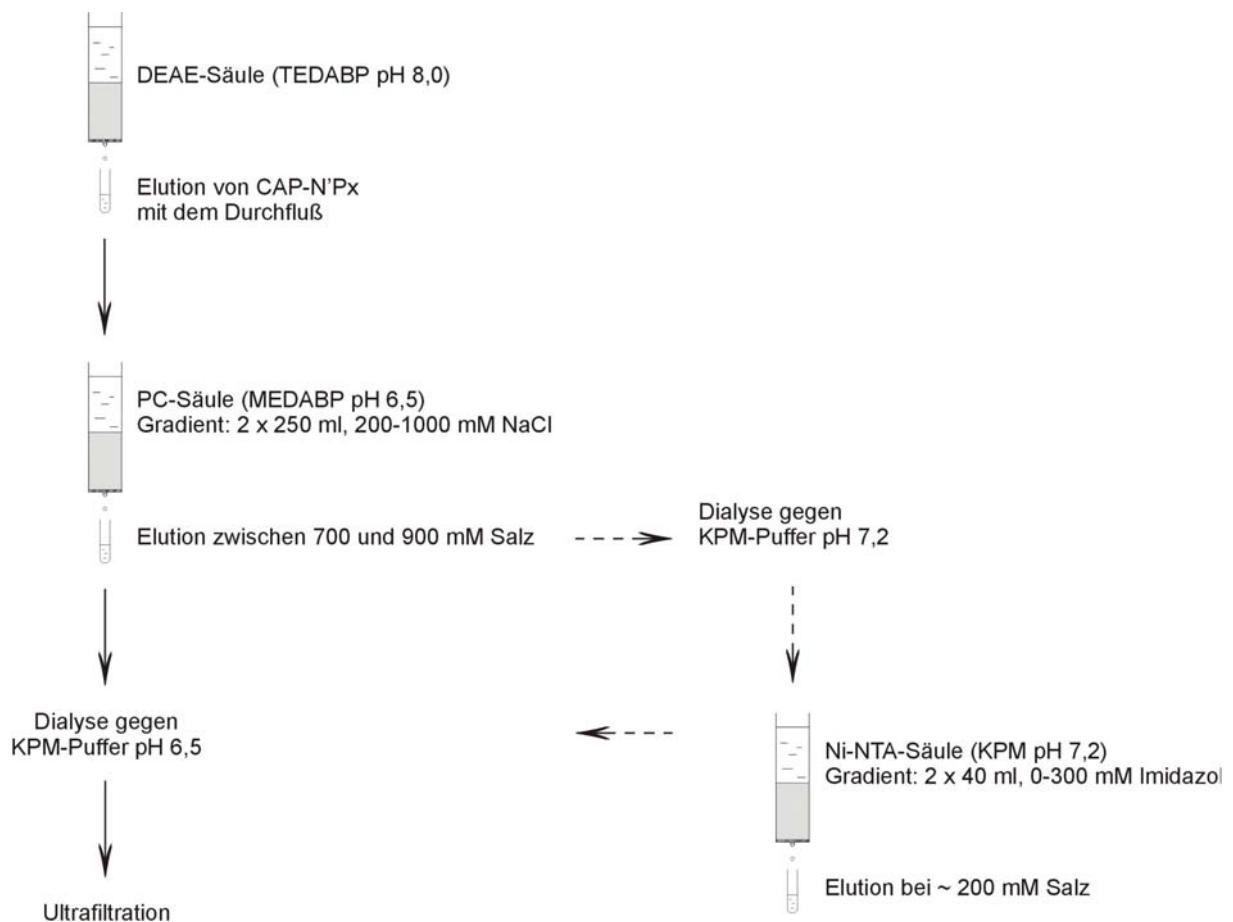


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aufreinigung von CAP-N'Px.

In den meisten Präparationen lag das CAP-N'Px Protein nach den ersten zwei Säulenschritten (DEAE, PC) ausreichend aufgereinigt vor. Mitunter mußte im Anschluß daran für die vollständige Aufreinigung der Umweg über eine Ni-NTA-Säule gegangen werden (gestrichelte Pfeile). In beiden Fällen wurde mit einer Dialyse gegen KPM-Puffer pH 6,5 und anschließender Ultrafiltration der Proteinlösung abgeschlossen.

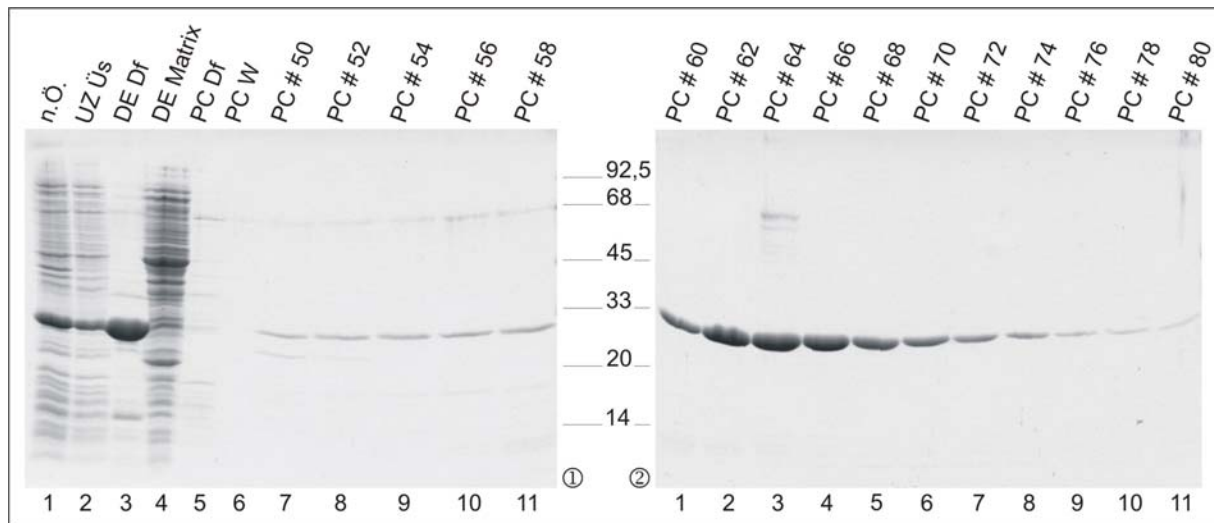


Abb. 7: Aufreinigung von CAP-N'Px.

In allen Proteinpräparationen dieser Arbeit wurden zu bestimmten Zeitpunkten jeweils Aliquots, d.h. definierte Mengen an Zellen bzw. Protein entnommen, in bestimmten Volumina 1 × oder 3 × SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 3-5 min aufgeköcht. Später wurden diese Proteinproben dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Spur 1 in Gel ① zeigt das Zellhomogenat nach dem Öffnen der Zellen mittels Lysozym, Homogenisierung und anschließender Ultraschallbehandlung (n.Ö.). CAP-N'Px ^{15}N -Lys sticht als prominenteste Bande bei etwa 25 kDa deutlich hervor. Nach den Ultrazentrifugationen ist der größte Teil des Proteins in den Überständen zu finden (UZ Üs), im Anschluß an den ersten Säulenschritt (DEAE-Säule) im Durchfluß (DE Df), während der Großteil der übrigen Proteine an die Säule bindet (DE Matrix). Der endgültige Aufreinigungsschritt (>99%) erfolgt dann über die zweite Säule, die Phosphocellulose. Der Hauptpool des CAP-N'Px ^{15}N -Lys befindet sich in den Gradient-Fractionen PC # 60-72 (Gel ② Spuren 1-7). In der Mitte sind die Molekülmassen des LMW-Markers in kDa gezeigt.

3.3.3 Untersuchung von CAP-N'Px mittels NMR-Spektroskopie

Die in dieser Arbeit abgebildeten und genannten NMR-Spektren wurden überwiegend von Till Rehm und Chrystelle Mavoungou aus der Gruppe von Tad A. Holak (MPI f. Biochemie, Martinsried) aufgenommen und ausgewertet. Meine Mitarbeit bei der Auswertung von NMR-Spektren beschränkte sich auf einige Wochen im Jahr 2001.

Von CAP-N'Px wurden dazu von mir folgende Proben hergestellt:

- protoniert, d.h. unmarkiert (^1H),
- uniform ^{15}N -markiert,
- $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -doppelmarkiert und
- selektiv markiert: ^{15}N -Ala, ^{15}N -Phe, ^{15}N -Gly, ^{15}N -Ile, ^{15}N -Lys, ^{15}N -Leu, ^{15}N -Val und ^{15}N -Gly/ ^{15}N -Ser

Die Proben waren zwischen 0,8 und 1,2 mM konzentriert und enthielten 10% D₂O. Der pH lag bei 7,3. Die NMR-Spektren wurden mit DRX 600 und DMX 750 Spektrometern der Firma Bruker gemessen.

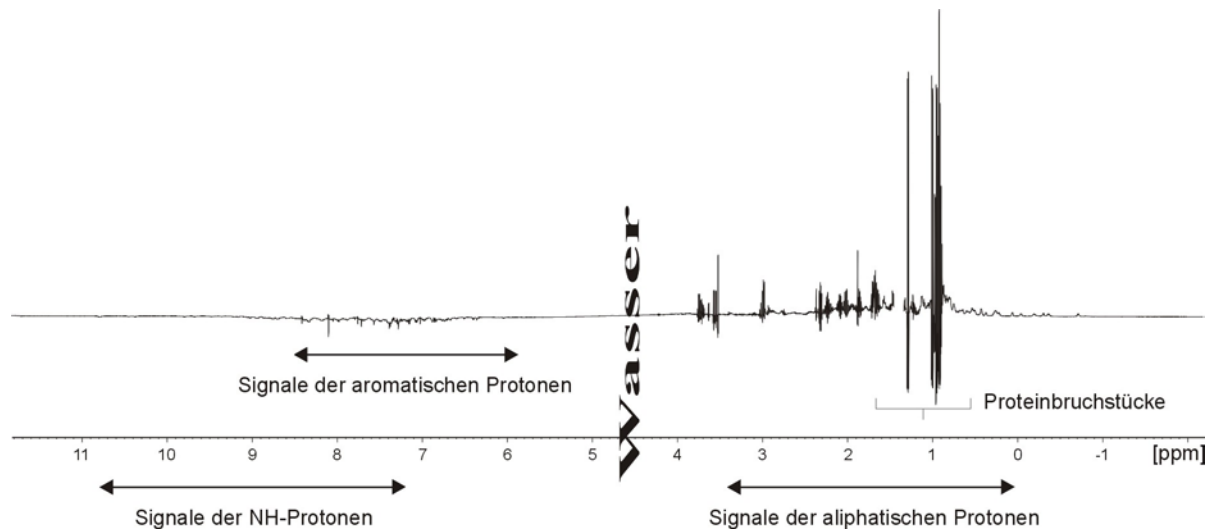


Abb. 8: 1D-Spektrum von CAP-N'Px.

Das Spektrum zeigt die Verteilung der Signale über die Frequenzachse von -1 bis etwa 10 ppm. Die Verteilungsdichte der Protonen in der aliphatischen Region von -1 bis 4 ppm deutet auf eine Helix-Konformation im N-terminalen Bereich hin. Die scharfen Signale im Bereich zwischen 0,7 und 1,6 ppm sind auf Proteinbruchstücke zurückzuführen. Eine Aussage über die Faltung konnte durch die Analyse der NH-Region gemacht werden. (aus: Mavoungou, 2000)

Abb. 8 zeigt das 1D-Spektrum einer unmarkierten Probe. Dieses ergab erste Hinweise über das Vorhandensein einer erhöhten Anzahl von Helices im *D. discoideum* CAP-N. Grund zu dieser Annahme war die hohe Signaldichte in der aliphatischen Region zwischen -1 und 4 ppm im Vergleich zur Region zwischen 6 und 9 ppm, in der relativ wenige Signale erhalten wurden. Weiterhin wiesen die sehr scharfen Signale zwischen 0,7 und 1,6 ppm auf Proteinbruchstücke hin. Um die Stabilität des Proteins zu überprüfen, wurden daraufhin Proteinproben gemessen, die zuvor einige Tage bei RT aufbewahrt worden waren. Dabei fiel ein deutlicher Zerfall des Proteins auf. Im folgenden Versuch wurde eine segmentierte Probe von den Bruchstücken befreit, mit Proteaseninhibitor versetzt und mittels 1D-Spektroskopie abermals gemessen. Das dabei aufgenommene Spektrum wurde anschließend mit dem einer gereinigten, nicht fragmentierten Probe mit Inhibitoren verglichen. Dabei fiel auf, daß nach Proteolyse und Reinigung schärfere Signale erhalten wurden (Abb. 13). Diese Änderung der Signalform deutete auf eine Veränderung der Proteingröße hin. Da 1D-Spektren keine Aussage über den Ort einer Schnittstelle erlauben, wurden im Anschluß 2D-¹⁵N-HSQC-Messungen durchgeführt.

3.3.4 Proteolytische Spaltung von CAP-N'Px und Ermittlung der Schnittstelle

Durch das Übereinanderlegen der ^{15}N -HSQC⁶-Spektren aller ^{15}N selektiv angereicherten Proteinproben (s.o.) sowie eines HeteroNOE-Lys-Spektrums und des ^{15}N -HSQC-Spektrums der ^{15}N uniform markierten Probe konnten die $^{\text{N}}\text{H}$ -Frequenzen der einzelnen vorhandenen, markierten Aminosäurensignale im Spektrum identifiziert und eingeordnet werden. Das Spektrum der uniform angereicherten Probe diente dabei als Referenz. Die $^{\text{N}}\text{H}$ -Signale der Aminosäuren, welche beim Übereinanderlagern der Spektren keine Dispersion⁷ mehr aufwiesen, befanden sich alle bei Frequenzwerten zwischen 7 und 8 ppm und ließen sich dadurch nicht mehr eindeutig im Referenzspektrum identifizieren. Bei diesen Werten handelt es sich um Zufallskonformationsfrequenzen („random coil“) von unstrukturierten Proteinresten. So konnten z.B. von den 21 vorhandenen $^{\text{N}}\text{H}$ -Signalen der Alanine nur noch 15 im Referenzspektrum zugeordnet werden, während sechs bei den „random coil“-Frequenzen zu finden waren. Dies deutete darauf hin, daß diese Alanine in Peptidbruchstücken enthalten waren. Nach Untersuchung aller selektiv markierten Proben wurde die Schnittstelle bzw. der Anfang des größten Proteinfragments zwischen den Aminosäuren 50 und 51 (siehe Abb. 4) festgelegt.

Zur Untersuchung auf weitere, mögliche Bruchstellen wurde eine Molekulargewichtsbestimmung einer älteren, aufgereinigten Probe (CAP-N'Px ^{15}N) mittels MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Disorption Ionisation - Mass Spectrometry) in Auftrag gegeben (ZMMK Service-labor, Köln). Die massenspektroskopische Analyse ergab das in Abb. 9A gezeigte Peakmuster. Unter Zugrundelegung eines vollständigen Austauschs von ^{14}N gegen ^{15}N konnte daraus geschlossen werden, daß das Protein im Bereich zwischen den Aminosäuren 43 und 55 an mehreren Stellen proteolytisch gespalten wurde. Die gefundenen Fragmente entsprachen den Aminosäuresequenzen 44-232, 47-232, 49-232, 51-232 und 54-232. Eine besondere Spaltungsspezifität war dabei nicht zu erkennen. Der Verlust von Resten war auch im Polyacrylamidgel deutlich zu beobachten (Abb. 9B).

⁶ Das HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)-Experiment verwendet den Übertrag von Magnetisierung auf einen Heterokern und wieder zurück. In einem ^{15}N -HSQC-Spektrum kommt es also innerhalb einer NH-Gruppe zur Korrelation zwischen einem Stickstoffatom und einem gebundenen Amidproton. Jedes im HSQC-Spektrum auftretende Signal repräsentiert ein an ein ^{15}N -Atom gebundenes Proton, d.h. das Spektrum besteht im wesentlichen aus den Signalen der $^{\text{N}}\text{H}$ -Protonen des Proteinrückgrats und zusätzlich aus den Signalen der NH_2 -Gruppen der Seitenketten von Asn und Gln bzw. der aromatischen $^{\text{N}}\text{H}$ -Protonen von Trp und His. Durch das HSQC-Experiment ist es meist möglich, überlappende Amidprotonenresonanzen durch die Entzerrung des Spektrums in die Stickstoffdimension deutlich getrennt darzustellen. Man erhält ein zweidimensionales Spektrum, welches einerseits die chemische Verschiebung des Stickstoffs (indirekte Dimension) und andererseits die des Protons (Akquisitionsdimension) zeigt.

⁷ Unter Signaldispersion versteht man die Signalverteilung auf der gesamten Frequenzachse des Spektrums.

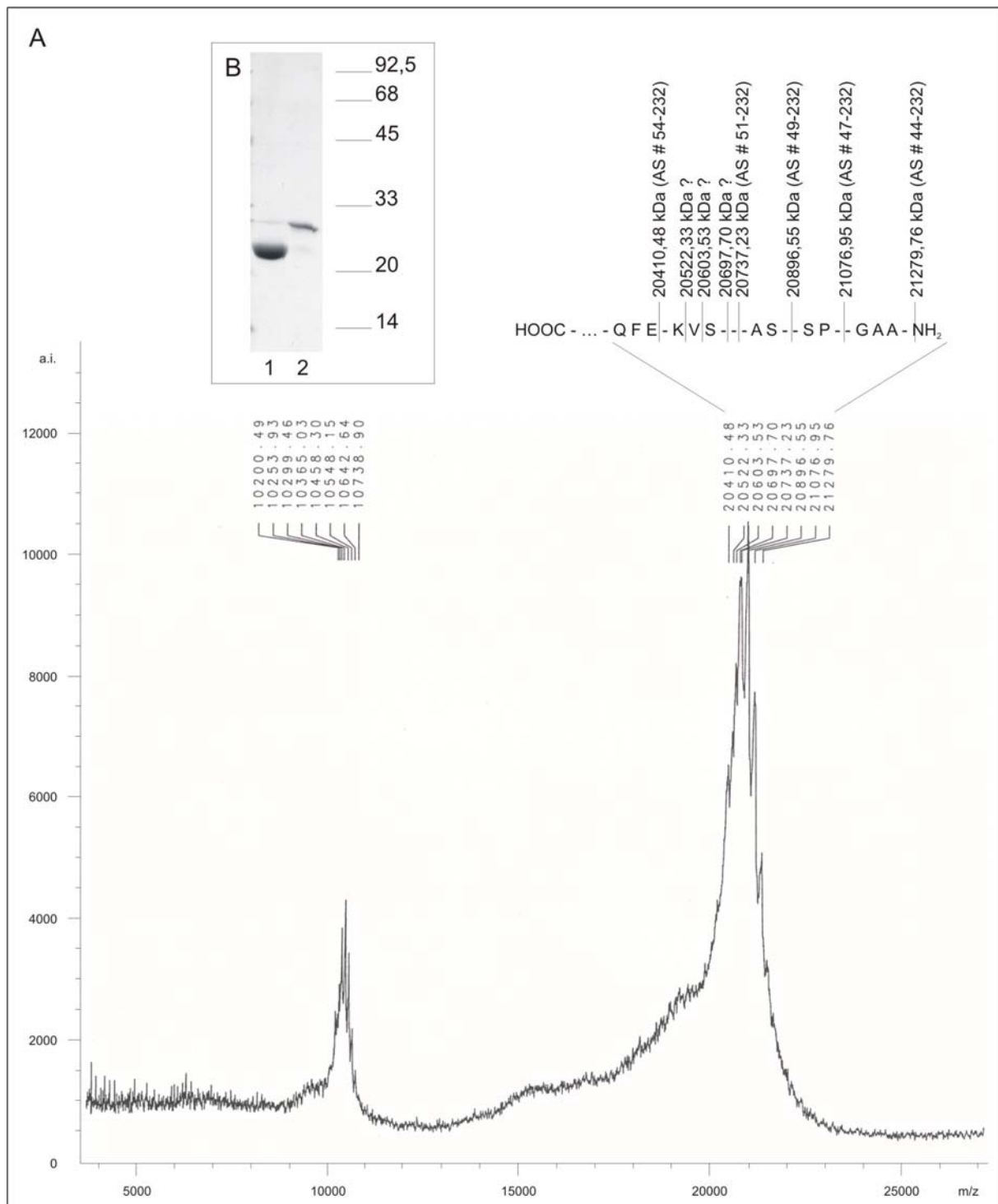


Abb. 9: Proteolytischer Abbau von CAP-N'Px.

A Massenspektroskopische Untersuchung einer ^{15}N -markierten CAP-N'Px-Probe: Probenvorbereitung: 1 μl der Probe wurde mit 1 μl gesättigter Matrixlösung (ACN/ H_2O 2:1) auf der Zielposition bei RT auskristallisiert. Der Probenspot wurde mit 3,5 μl 50 mM NH_4Ac -Lösung gewaschen und mit 1 μl ACN/ H_2O (2:1) umkristallisiert. Matrix: Sinapinsäure. Meßbedingungen: Beschleunigungsspannung 20 kV, Detektorspannung 1,9 kV, Suppression bis 2000 (max), PIE 14,5 kV (medium), Vakuum $2,2 \cdot 10^{-8}$ mbar. Kalibrierung: extern. Kalibriersubstanz: Bovine RNase A.

Ergebnis: Das Molekulargewicht der Spaltungsprodukte liegt zwischen 20410 und 21280 (\equiv den Sequenzen 54-232, 51-232, 49-232, 47-232 und 44-232) bzw. zwischen 10200 und 10739 (\equiv den Sequenzen 1-43, 1-46, 1-48, 1-50 und 1-53)(siehe auch Zuordnung oben rechts).

Eine besondere Spaltungsspezifität ist nicht zu erkennen. Die beobachteten Differenzen zwischen gemessener und theoretischer Masse liegen durchweg unter 250 ppm (Mittelwert 127 ppm).

B SDS-PAGE: Spaltung von CAP-N'Px: Das Coomassie-Gel zeigt zwei vollständig aufgereinigte, aber unterschiedlich alte CAP-N'Px-Proben im direkten Vergleich. Während die jüngere Probe in Spur 2 die zu erwartende Größe (~ 25 kDa) aufweist, scheint die ältere Probe in Spur 1 ein Stück verloren zu haben. Die Molekülmasse dieser Probe beträgt lediglich 20-21 kDa.

Weiterhin wurde am Max-Planck-Institut in Martinsried eine Edman-Sequenzierung vorgenommen. Die Durchführung erfolgte vor und nach Reinigung der fragmentierten Probe. Dabei stellte sich heraus, daß sich die Bruchstücke 59-226 und 74-226 lediglich vor der Reinigung in der Lösung befanden, während die Peptide 45-226 und 50-226 offensichtlich erst später entstanden waren.

Von den möglichen Fragmenten war das Peptid mit der Sequenz 51-232 das stabilste. Es stellt somit den stabilen Kern des *D. discoideum* CAP-N dar. Da die erfolgreiche Strukturaufklärung eines Proteins mittels NMR-Spektroskopie eine hohe Stabilität des Moleküls voraussetzt, wurde beschlossen, neue Konstrukte herzustellen. Ein weiterer Grund bestand darin, daß eine heterogene Peptidmischung nur unsauber oder gar nicht kristallisiert.

3.3.5 Klonierung und Expression von CAPN151-678

Folgende Konstrukte wurden im Hinblick auf die in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen Ergebnisse konzipiert:

- CAPN133-645	- CAPN151-645	- CAPN220-645
- CAPN133-678	- CAPN151-678	- CAPN220-678

Die Zahlen stehen dabei für die Basenpaare in der CAP Sequenz. Die korrespondierenden Proteinkonstrukte beginnen also mit Aminosäure # 45, # 51 bzw. # 74. Das Ende wurde so festgelegt, daß die Proteine entweder keinen prolinreichen Abschnitt besitzen oder aber über die elf carboxyterminalen Aminosäuren (AS 216-226) verfügen, welche auch schon im CAP-N'Px enthalten waren. Auf einen His-„tag“ wurde in allen Fällen verzichtet (Abb. 10).

Alle Basenfolgen wurden mit Primern, welche die Restriktionsstellen *NdeI* und *BamHI* als Überhänge codierten („add on sequences“), mittels PCR amplifiziert und dann in den pT7-7 Expressionsvektor (Tabor, 1990) kloniert. Das ATG der *NdeI*-Schnittstelle (CA↓TATG) wird als Startcodon verwendet.

Die erhaltenen DNA-Moleküle wurden nach Subtransformation in den *E. coli* Stamm JM83 und anschließender Präparation der Plasmid DNAs mit dem Plasmid Mini Kit der Firma Qia-gen in *E. coli* BL21 Bakterien transformiert. Dieser Umweg war nötig, da eine direkte Transformation in BL21 Bakterien erfolglos blieb.

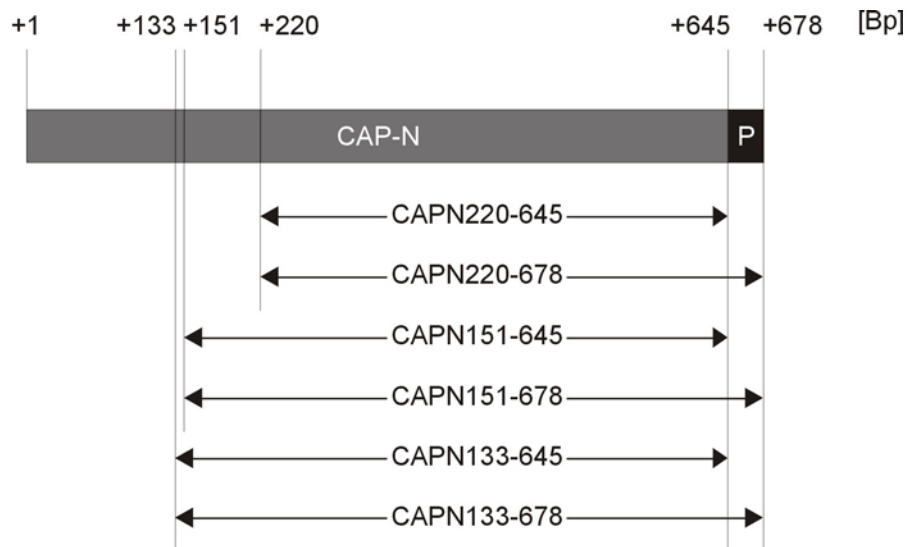


Abb. 10: Schematische Darstellung der CAPN DNA-Konstrukte.

Die cDNAs wurden jeweils über die als „add on sequences“ eingeführten Restriktionsstellen *NdeI* und *BamHI* in den pT7-7 Expressionsvektor (Tabor, 1990) kloniert.

Mit den erfolgreichen Transformanten wurde eine Reihe von Expressionstests durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß die Expression des CAPN220-645 Konstrukts vor allem in größeren Volumina (≥ 2 l) eher unbefriedigend war. Auch eine Variation der Inkubationsbedingungen ($30^\circ\text{C} \rightarrow 37^\circ\text{C}$ und $200 \text{ UpM} \rightarrow 220 \text{ UpM}$) führte zu keiner Verbesserung. Zudem blieb bei der Aufreinigung der größere Teil des Proteins ($\sim 60\%$) nach der Ultrazentrifugation als „inclusion bodies“ im Sediment.

Im Falle des Klons CAPN151-678 BL21 # 4.4 wurde demgegenüber eine starke und reproduzierbare Expression erhalten. Dies galt für alle Ansätze (LB-, Minimal- oder Definiertes Medium). Die Zellen wurden dabei stets bei 37°C und 220 UpM bis zu einer OD_{600} von $0,6-0,8$ geschüttelt und die Proteinexpression dann durch Zugabe von IPTG ($0,5 \text{ mM}$ Endkonzentration) eingeleitet. Es wurde wie schon beim CAP-N'Px Protein über Nacht inkubiert, da auf diese Weise auch hier größere Mengen an Protein pro Zelle erhalten wurden. Die Zellen wurden anschließend geerntet (4200 UpM , $5-10 \text{ min}$, 4°C , Beckman J6-HC) und ein- bis zweimal in kaltem TEDABP-Puffer ($\text{pH } 8,0$) gewaschen. Nach Resuspension in diesem Puffer wurden sie dann bei -20°C eingefroren.

3.3.6 Aufreinigung von CAPN151-678

Die ersten Schritte der Aufreinigung bis hin zur Ultrazentrifugation entsprachen mit einer Ausnahme den unter 3.3.2 beschriebenen Arbeitsvorgängen. Zumeist wurde hier ein weiterer Einfrieren/Auftauen-Schritt eingeschoben, um sicher zu gehen, daß die Zellen geöffnet waren. Im Anschluß an die Ultrazentrifugation (100.000 g, 30 min, 4°C, Beckman Optima LE-80K) befanden sich leider wie schon beim 220er-Konstrukt etwa 50-60% des Proteins als „inclusion bodies“ im Zellsediment. Nach einem zweiten und mitunter dritten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet dennoch verworfen und mit den gesammelten Überständen weiter gearbeitet. Diese wurden auf pH 8,0 eingestellt⁵ und dann auf eine DEAE-Säule geladen, die zuvor mit TEDABP-Puffer pH 8,0 äquilibriert worden war. Wie schon CAP-N'Px befand sich auch CAPN151-678 im Durchfluß. Dieser wurde mehrfach gegen KPDAEBP-Puffer pH 6,7 dialysiert und anschließend auf eine HA-Säule (Hydroxyapatit Ceramic, 20 µm; äquilibriert mit KPDAEBP-Puffer pH 6,7) geladen. Das Protein wurde dann mit Hilfe eines Gradienten (2 × 100 ml, 0-350 mM KH₂PO₄) zwischen 80 und 140 mM KH₂PO₄ eluiert. Es folgte eine Dialyse des Hauptpools gegen MEDABP-Puffer pH 6,5, in deren Anschluß das Dialysat auf eine entsprechend äquilibrierte PC-Säule geladen wurde. Nach dem Durchfluß, der fast alle Kontaminationsproteine mit sich trug, wurde die Säule mit MEDABP-Puffer pH 6,5 gewaschen. Die Elution von zu über 99% aufgereinigtem CAPN151-678 (MW 19800) vollzog sich bereits mit den ersten Wasch-Fractionen. Die Trennung von den übrigen Proteinen war dabei vollkommen ausreichend und stets reproduzierbar. Daher wurden Versuche mit niedrigeren pH-Werten (≤ 6,3; Säule und Puffer) schnell aufgegeben, zumal sie in allen Fällen mit der unumkehrbaren Bindung des Proteins an das Säulenmaterial endeten. Die CAPN151-678 enthaltenden Wasch-Fractionen wurden gesammelt und gegen KPM-Puffer pH 6,5 dialysiert. Nach Ankonzentration der Probe mittels Ultrafiltration (Centrikon-/Centriprep-10) wurde diese schließlich für die Folgeexperimente (NMR-Spektroskopie, Kristallisation) an die Gruppe Holak weitergegeben. Abb.11 auf Seite 64 zeigt noch einmal eine schematische Darstellung der Aufreinigung, Abb. 12 (Seite 65) die Ergebnisse am Beispiel eines Ansatzes in LB-Medium (protonierte Probe).

⁵ Hierzu wurde unter ständigem Rühren nur schwach konzentrierte Salzsäure zugegeben, da es sonst zu lokalem Proteinausfall kommen konnte.

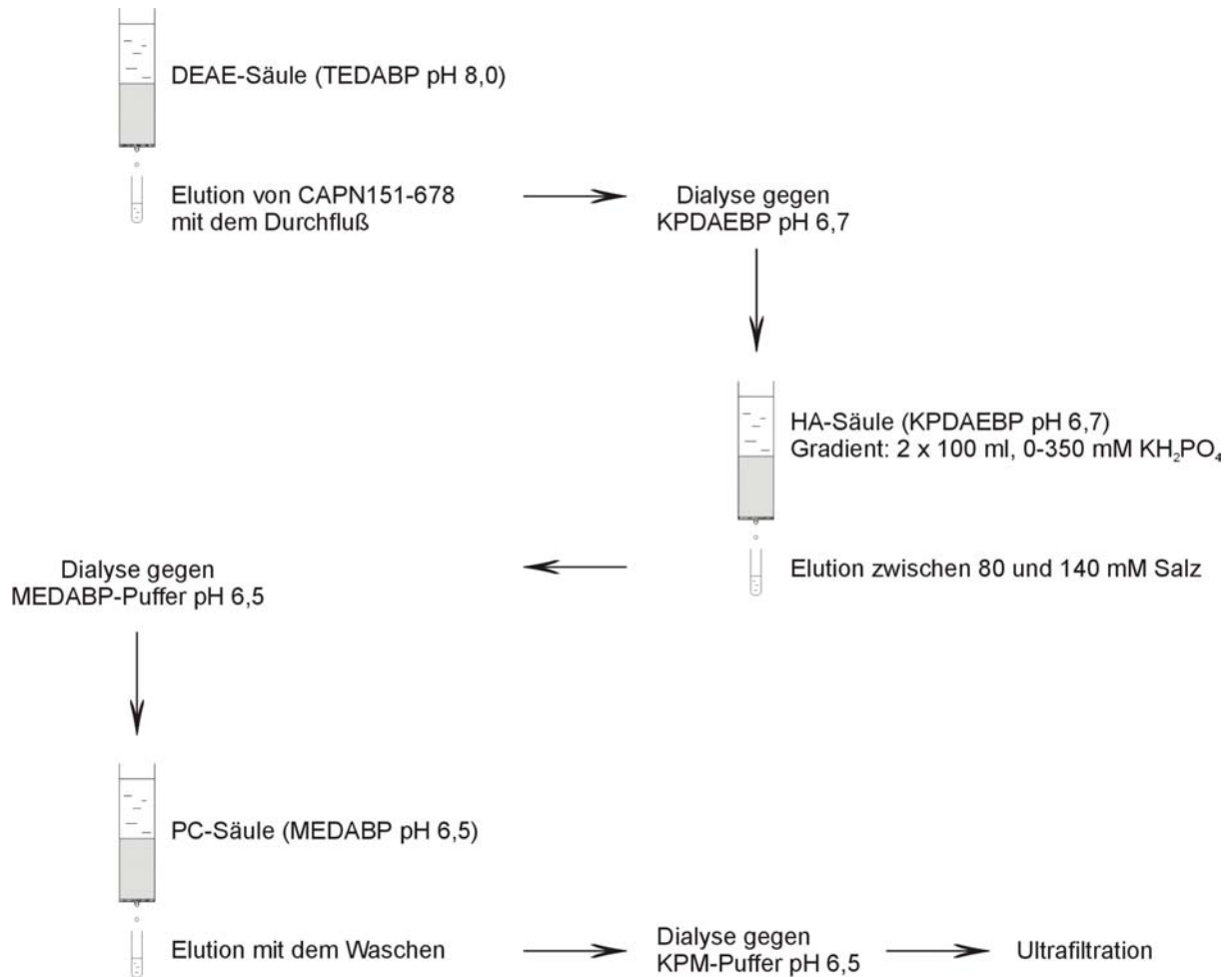


Abb. 11: Schematische Darstellung der Aufreinigung von CAPN151-678.

Im Gegensatz zur Präparation von CAP-N'Px waren hier immer drei Säulenschritte notwendig. Die angegebene Reihenfolge wurde stets beibehalten. Erstaunlich war dabei die saubere Trennung des CAPN151-678 Konstrukts von Kontaminationsproteinen im Verlauf des Waschens der PC-Säule. Dieser Schritt erwies sich als reproduzierbar.

3.3.7 Sequenzspezifische Signalzuordnung von CAP-N

Zu Beginn wurde ein 1D-Spektrum von CAPN151-678 aufgenommen (Abb13, Seite 66). Beim direkten Vergleich der Signale zwischen -1 und 3 ppm dieses Spektrums (Spektrum C) mit den entsprechenden Signalen der Spektren von CAP-N'Px und proteolytisch gespaltenem CAP-N'Px (B) zeigt CAPN151-678 deutlich schärfere und schmalere Peaks. Dieser Trend zeichnet sich auch schon für das fragmentierte Protein ab. Das nicht gespalte CAP-N'Px (A) weist dagegen die typischen breiten Signale eines großen Proteins auf. Eine eindeutige Signaltrennung ist hier nicht gewährleistet. So wird z.B. nicht deutlich, daß die beiden Peaks um 0 ppm Dupletts sind. Weiterhin sind die sehr scharfen Signale der Peptidbruchstücke zwischen 0 und 2 ppm (B) beim verkürzten CAP-Konstrukt (C) verschwunden.

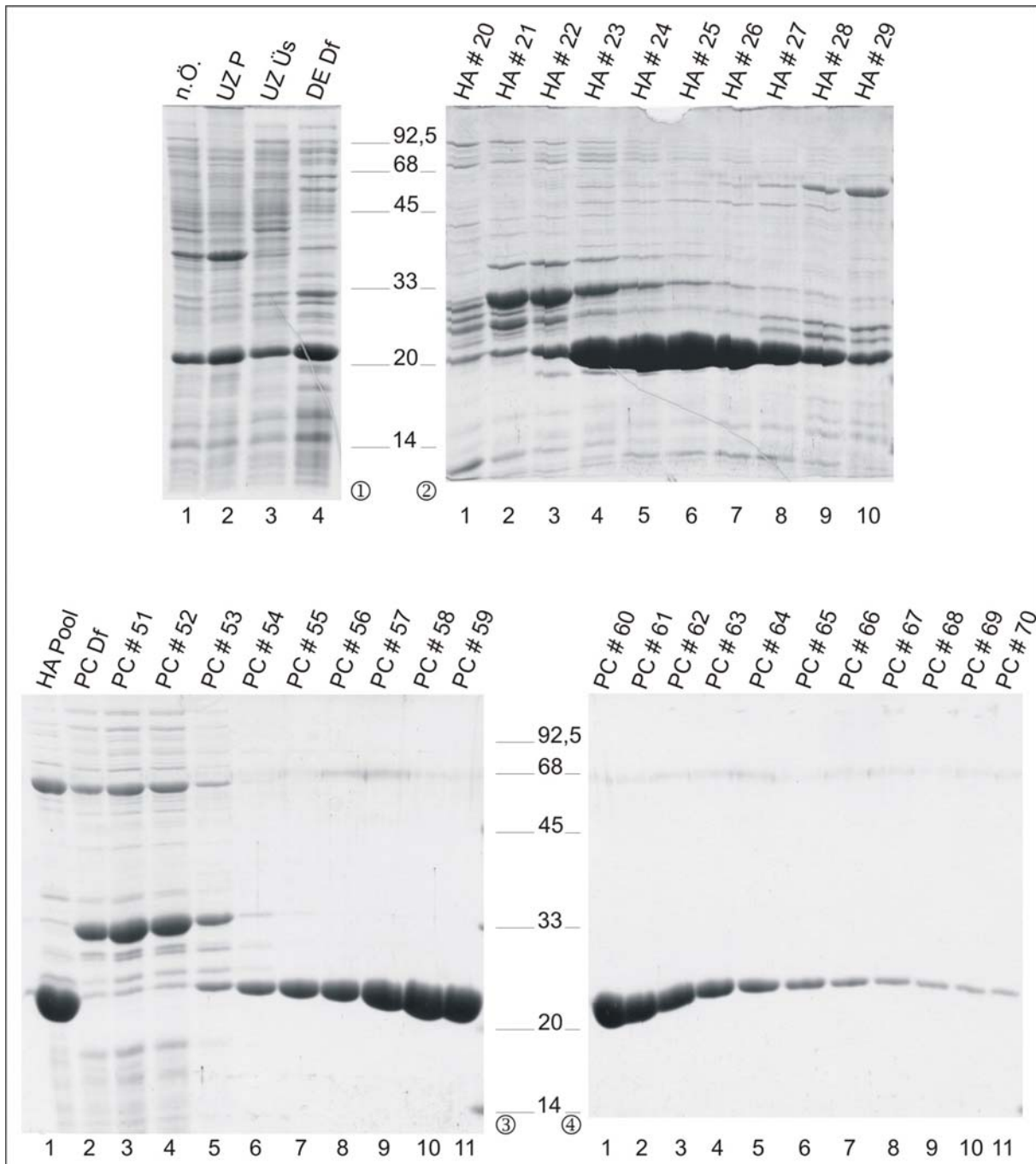


Abb. 12: Aufreinigung von CAPN151-678.

Spur 1 in Gel ① zeigt das Zellhomogenat nach dem vollständigen Öffnen der Zellen (n.Ö.). CAPN151-678 ist die prominente Bande bei 20 kDa. Im Anschluß an die Ultrazentrifugationen sind nur etwa 40% des Proteins in den Überständen (UZ Üs) zu finden, der größere Teil des Proteins verbleibt im Pellet (UZ P). Dies trifft aber auch auf ein starkes Kontaminationsprotein bei etwa 39 kDa zu. Nach dem ersten Säulenschritt (DEAE-Säule) befindet sich CAPN151-678 zu fast 100% im Durchfluß (DE Df). Gel ② zeigt den Aufreinigungsschritt über die zweite Säule, die HA-Säule. Die Gradient-Fractionen HA # 23-28 (Spuren 4-9) enthalten den Hauptanteil des Proteins, welches aber noch immer stark verunreinigt ist. Die endgültige Aufreinigung erfolgt dann über die PC-Säule. Im Anschluß an die letzten Durchfluß-Fractionen (PC # 50-53; Gel ③, Spuren 2-5) wird das CAPN151-678 Protein im Waschschrift sehr sauber eluiert (Hauptanteil: Fractionen PC # 55-66; Gel ③, Spuren 7-11 und Gel ④, Spuren 1-7). In der Mitte sind jeweils die Molekülmassen des LMW-Markers in kDa gezeigt.

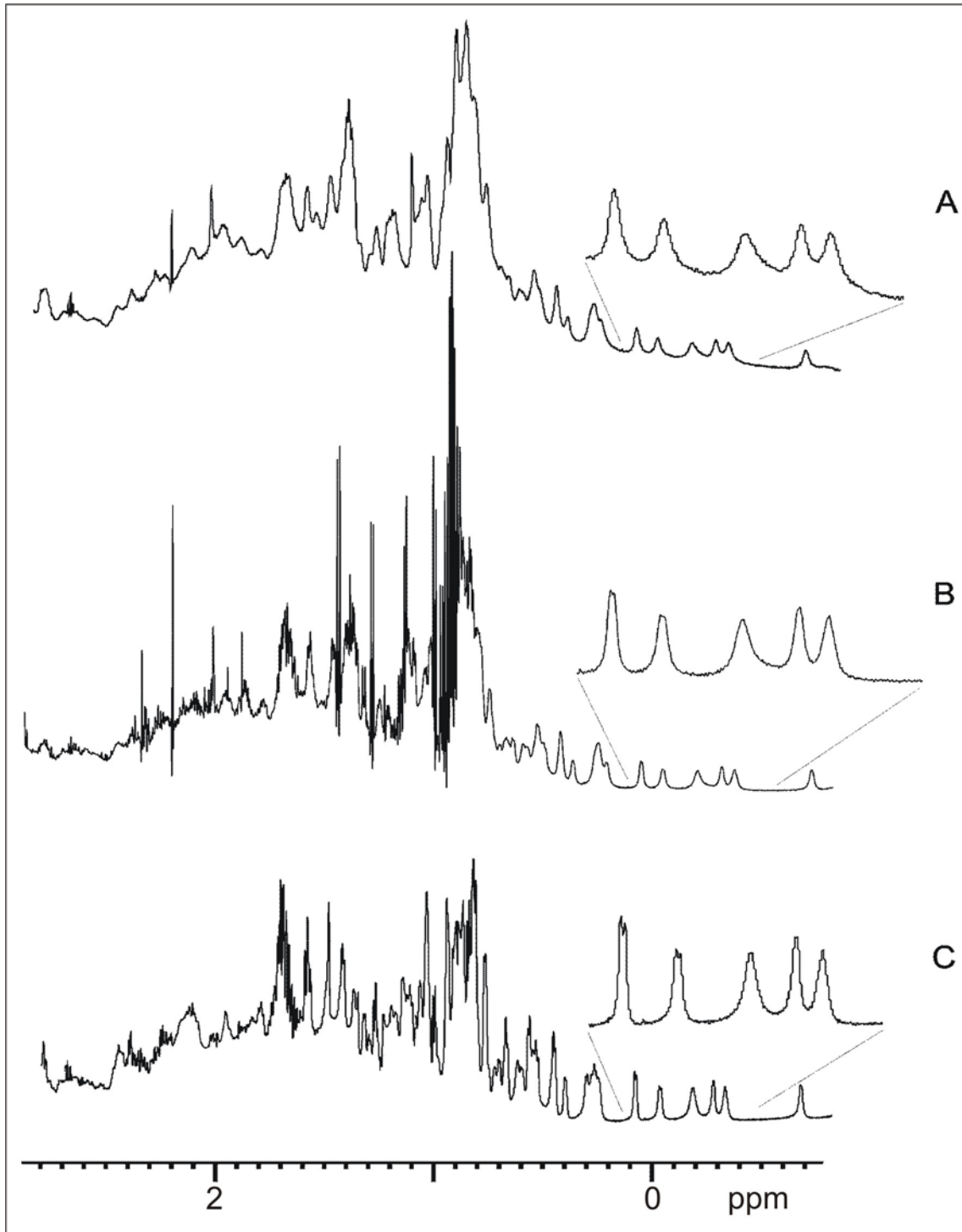


Abb. 13: Vergleich der 1D-Spektren von CAP-N'Px und CAPN151-678.

A Spektrum des aufgereinigten, mit Proteaseninhibitoren versehenen CAP-N'Px. Es zeigt die für ein relativ großes Molekül, wie z.B. einem Protein, typischen breiten Signale, die keine eindeutige Signaltrennung zulassen. **B** Spektrum des proteolytisch prozessierten CAP-N'Px Proteins. Die Peptidbruchstücke sind durch die scharfen Signale zwischen 0 und 2 ppm gekennzeichnet. **C** Spektrum des aufgereinigten, mit Proteaseninhibitoren versehenen CAPN151-678. Es weist sehr viel schärfere Peaks im Vergleich zu den Spektren A und B auf. Der Vergleich einiger Signale in der aliphatischen Region (jeweils vergrößert) macht den Nachteil der eindimensionalen NMR-Spektroskopie deutlich: Eine eindeutige Trennung ist bei den breiten Signalen des größeren Proteins (A, B) nicht gewährleistet. Im Spektrum des kleineren Konstrukts (C) sind dagegen schon Dupletts eindeutig zu identifizieren.

Von CAPN151-678 wurden folgende Proben hergestellt:

- protoniert (^1H),
- uniform ^{15}N -markiert,
- $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -doppelmarkiert und
- selektiv markiert: ^{15}N -Lys, ^{15}N -Leu

Die Proben waren zwischen 0,8 und 1,2 mM konzentriert und enthielten 10% D_2O . Der pH war auf 7,3 eingestellt worden. Für die Messungen wurden auch hier die Spektrometer DRX 600 und DMX 750 der Firma Bruker verwendet.

Mit Hilfe der ^{15}N -HSQC-Spektren der selektiv und der uniform markierten Proben aus Abschnitt 3.3.4 konnte ein Teil der Spinsysteme der Rückgrat-Atome ermittelt und anschließend in 2D-NOESY⁸- und 2D-TOCSY⁹-Spektren zugeordnet werden. Für die Zuordnung („assignments“) wurde das Software-Paket SPARKY (Goddard und Kneller, 2000) verwendet. Anschließend war es möglich, einige der interresidualen Signale mit intraresidualen der jeweiligen Spinsysteme zu korrelieren. Dabei wurden Signalgruppenpaare zu Ketten zusammengefügt, wobei aber die Primärstruktur nur bestimmte Kombinationen benachbarter Aminosäuren zuließ. Abb. 14 zeigt auf der Basis der Sekundärstrukturvorhersage, die mit Hilfe eines Proteinplotdiagramms (mit der GCG-Software der Universität von Wisconsin, USA; Devereux *et al.*, 1984) aus der Primärstruktur erstellt worden war und eine „all- α -conformation“ vorausgesagt hatte, eine schematische Darstellung der möglichen NOEs für den Sequenzabschnitt 51-226. Darin sind die sequentiellen NOEs und Kontakte mittlerer Reichweite ($[i-j] < 5$ Aminosäuren) der Amid- C_α -NH-Protonen in Abhängigkeit von der Primärstruktur der CAP-N-Domäne graphisch aufgetragen.

⁸ Das NOESY (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy)-Spektrum basiert auf der Kreuzrelaxation zweier Kernspins, dem sog. Nuclear Overhauser Effekt. Dieser wirkt durch den Raum und ist in erster Näherung proportional zu $1/r^6$ ($r \equiv$ Abstand zwischen den Kernen.). Der Magnetisierungsübertrag wird aber in der Regel nur bei Entfernungen von kleiner als 5 Å (in der Tertiärstruktur) beobachtet. Die auf diese Weise erhaltenen Informationen über die Abstände können zur Strukturberechnung herangezogen werden.

⁹ Im TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)-Experiment wird die Magnetisierung durch den Transfer über skalare J-Kopplung über das Spinsystem einer Aminosäure verteilt. Dabei ist ein Magnetisierungstransfer über bis zu vier Bindungen innerhalb einer Aminosäure möglich. Aufgrund der charakteristischen chemischen Verschiebung der Atomkerne ergibt sich für jede Aminosäure ein typisches Signalmuster, welches ihrem Spinsystem entspricht. Anhand dieser Signalmuster lassen sich die Aminosäuren dann identifizieren. Da aber z.B. alle Aminosäuren mit einer CH_2 -Gruppe als Seitenkettenspinsystem identische Muster aufweisen, ist diese Identifizierung nicht eindeutig.

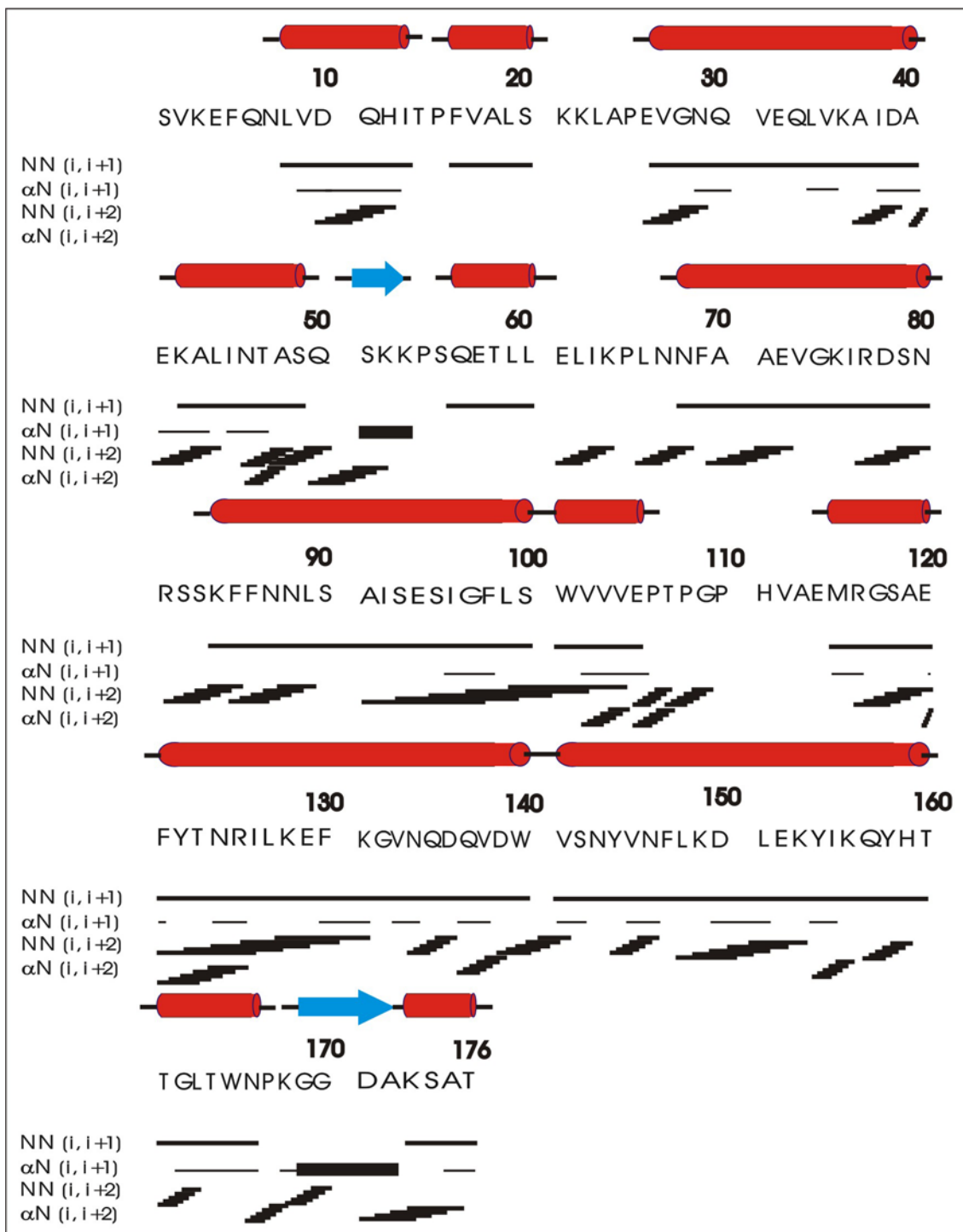


Abb. 14: Graphische Darstellung der NMR-Daten zur Identifizierung von Sekundärstrukturelementen.

Zur Ermittlung von Sekundärstrukturdaten wurden sowohl sequentielle NOEs und Kontakte mittlerer Reichweite von identifizierten Aminosäuren aus den 2D-Spektren als auch statistisch ermittelte Werte und Proteinplotdaten extrahiert. Die Breite der einzelnen Balken repräsentiert dabei die Intensität der NOE-Korrelationen. Diese erfolgten nach folgendem Klassifizierungsmuster: entsprechend sehr starker, starker, mittlerer, schwacher und sehr schwacher NOEs wurden Protonenabstände von $2,0 \pm 0,3 \text{ \AA}$, $2,5 \pm 0,3 \text{ \AA}$, $3,0 \pm 0,4 \text{ \AA}$, $3,5 \pm 0,5 \text{ \AA}$ und $4,0 - 0,6 \text{ \AA} + 0,8 \text{ \AA}$ ermittelt.

Um der bei 2D-Spektren auftauchenden Problematik der Signalüberlagerung zu entgehen, wurden zusätzlich zwei 3D-¹⁵N-NOESY-HSQC-Spektren¹⁰ mit Mischzeiten von $T_m = 120$ und 40 ms und ein 3D-¹³C-NOESY-HSQC-Spektrum ($T_m = 50$ ms) aufgezeichnet. Für die vollständige sequentielle Zuordnung der Resonanzen des Proteinerückgrats waren darüber hinaus die folgenden Tripelresonanz-Experimente¹¹ notwendig: ein HNCA-, ein CBCA(CO)NH- sowie ein HNCO-Spektrum.

Abb. 15 zeigt ein ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum der N-terminalen Domäne von CAP. Bis dato wurden mit Ausnahme der Aminosäurenreste Ser 1 und Leu 8, die in den Spektren nicht identifiziert werden konnten, die Resonanzen aller Rückgratamidgruppen zugeordnet. Weiterhin war die Zuordnung für 95% der H_α-, 93% der C_α- und C' (= C des CO)-Atome des Rückgrats sowie für etwa die Hälfte der Seitenkettenatome, darunter 95% der C_β- und 81% der H_β-Atome, erfolgreich. Mit diesen Informationen stehen nun die Mittel zur Verfügung, um in naher Zukunft die Struktur dieser Proteindomäne zu erhalten und seine Dynamik zu untersuchen. Die entsprechenden Daten können zukünftig unter <http://www.bmrb.wisc.edu> und der Eingangsnummer 5393 eingesehen werden.

¹⁰ Durch die Entzerrung der zweiten Dimension in eine dritte können Signalüberlagerungen verringert werden. Dabei werden die Signale in einem Quader anstatt auf einer Fläche verteilt, wodurch eine bessere Auflösung erzielt wird. Die dritte Dimension ist hier wie im HSQC eine heteronukleare Koordinate wie ¹⁵N oder ¹³C. Dazu werden einfach die Pulssequenzen für ein 2D-NOESY bzw. -TOCSY und ein 2D-HSQC kombiniert. In der Praxis wird an das erste Experiment anstelle der Akquisition ein HSQC-Experiment angehängt. Am Ende steht dann die direkte Datenakquisition. Das entstandene Spektrum wird dann als 3D-¹⁵N (oder ¹³C)-NOESY (oder TOCSY)-HSQC bezeichnet. Solche Experimente stellen die Basis für die sequenzspezifische Zuordnung von Proteinen mittlerer Größe (10-15 kDa) dar.

¹¹ Tripelresonanzexperimente ermöglichen die sequentielle Zuordnung des Proteinerückgrats von größeren Proteinen (> 15 kDa). Hier können zum einen die Überlappung von Signalen im NOESY-HSQC und zum anderen das Fehlen von Signalen im TOCSY-HSQC eine Auswertung erschweren. In diesen Experimenten werden drei verschiedene Kerne miteinander korreliert, und zwar jeweils die in der Bezeichnung aufgeführten. Man listet dabei der Reihe nach die Kerne auf, über die die Magnetisierung im Verlauf des Experiments übertragen wird. In einem HNCA-Spektrum z.B. läuft die Magnetisierung also vom Amid-Proton (H) auf den Rückgrat-Stickstoff (N) und den direkt gebundenen α-Kohlenstoff (CA) und wieder zurück. Tripelresonanzexperimente zeichnen sich durch ein einfaches Aussehen der Spektren, eine hohe Empfindlichkeit und kurze Relaxationszeiten aus.

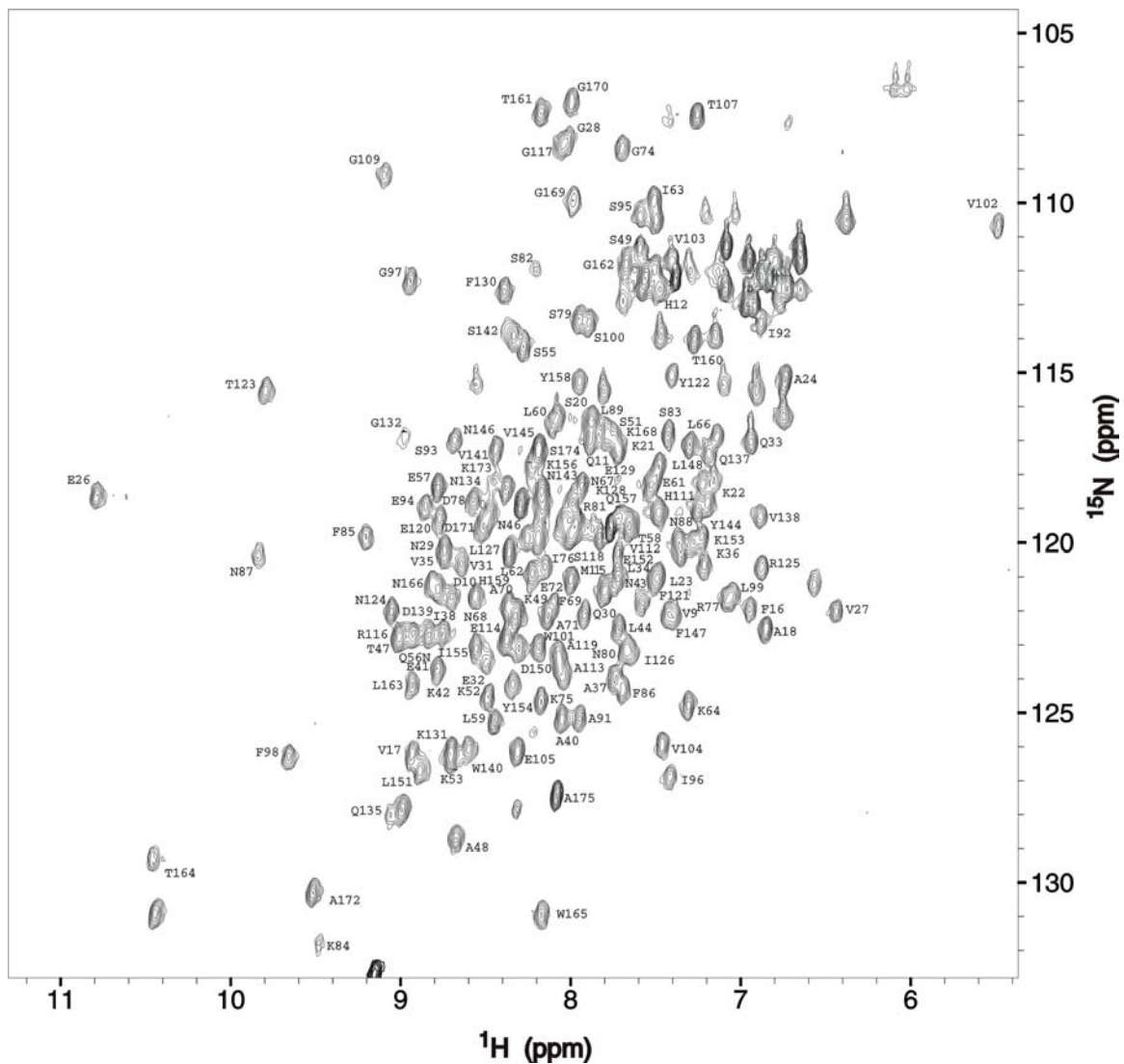


Abb. 15: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des *D. discoideum* CAP-N.

Das Spektrum wurde bei 300 K und pH 7,3 aufgenommen. Die restespezifische Zuordnung der Resonanzen ist durch das jeweilige Ein-Buchstaben-Symbol gekennzeichnet; einige wurden aus Übersichtsgründen ausgelassen.

3.3.8 Kristallisation von CAPN151-678 und Röntgenstrukturanalyse

Die Kristallisationsansätze und anschließenden Röntgenmessungen der erhaltenen Kristalle von CAPN151-678 wurden von Dorota Ksiazek aus der Gruppe von Tad A. Holak (MPI f. Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Die von mir gestellten, aufgereinigten Proben (CAPN151-678 ^1H ; siehe Abschnitt 3.3.6) wurden dafür zunächst mittels Gelfiltration über eine HiLoad Superdex S75 Gelfiltrationssäule einem weiteren Aufreinigungsschritt unterzogen.

Danach wurde das Protein in Centrikon-10 Mikrokonzentratoren (Amicon) durch Zentrifugation bei 5000 UpM (Sorvall SS34 Rotor) in Kristallisationslösung (5 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,0) umgepuffert, indem es bis auf ein Volumen von 40 μ l eingeengt und in obigem Puffer auf 2,5 ml verdünnt wurde. Anschließend wurde es auf eine Konzentration von 7 mg/ml eingeengt.

Die Kristallisationsexperimente wurden dann mittels der Dampfdiffusionsmethode (Übersicht in McPherson, 1990) mit sitzenden („sitting drop“) oder hängenden („hanging drop“) Tropfen ($V = 5 \mu$ l) durchgeführt. Als Gefäße wurden gasdicht verschlossene CrysChem-Schalen (Hampton Research, Laguna Niguel, Kalifornien) und Polystyrolschalen mit Deckel (\varnothing 7,5 cm, Höhe 3 cm) und Kunststoffbänkchen verwendet. Das Volumen der Reservoirlösung betrug 500 μ l. Zur Kristallisation, die stets bei 4°C stattfand, war zunächst ein Screening mit den Testlösungen der „crystal screens“ 1 und 2 der Firma Hampton Research notwendig (Jancarik und Kim, 1991; Cudney *et al.*, 1994). Optimale Kristallisationsbedingungen waren dann am Ende in der folgenden Reservoirlösung gegeben: 0,2 M $MgCl_2$ (Salz), 0,1 M MES, pH 6,1 (Puffer), 30% PEG 8000 (Präzipitant) und 10 mM β -Mercaptoethanol (Antioxidans). Auf diese Weise wurden native Kristalle ohne und mit Schwermetallen erhalten (Abb. 16D). Letztere wurden durch Zugabe von 20 mM Iridiumsalm zur Lösung mit dem bereits fertigen Kristall erzeugt.

Die Röntgenbeugungsanalysen wurden am DORIS (DESY, Hamburg) (Blume *et al.*, 2001) bei 100 K und unter Verwendung eines 156 mm MarCCD Detektors (Mar USA, Evanston, Illinois) durchgeführt und die gesammelten Daten anschließend am MPI f. Biochemie (Martinsried) ausgewertet.

Abb. 16 zeigt den Strukturvorschlag für CAPN151-678. Die stabile Domäne von CAP-N setzt sich danach aus sechs α -Helices zusammen, die antiparallel zueinander zylindrisch angeordnet sind: α -Helix α 1: Aminosäurenreste 52-73, α 2: 75-99, α 5: 158-180 und α 6: 185-207. Zwei der Helices sind unterbrochen und bilden jeweils Untereinheiten: α 3a: 107-111 und α 3b: 114-128 bzw. α 4a: 137-143 und α 4b: 145-153. Die erhaltene Struktur entspricht also der oben gemachten Vorhersage einer „all- α -conformation“. Im Kristall befinden sich in der asymmetrischen Einheit zwei solcher Zylinder, welche hier gegeneinander verdreht sind (siehe Abb. 16B) und als Dimer ein Mg-Ion komplexieren. Dieses befindet sich in unmittelbarer Nähe zu den Resten Arg 127, Asp 128 und Glu 144 beider Monomere.

In den NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde kein Dimer beobachtet, allerdings in Abwesenheit von Mg^{2+} .

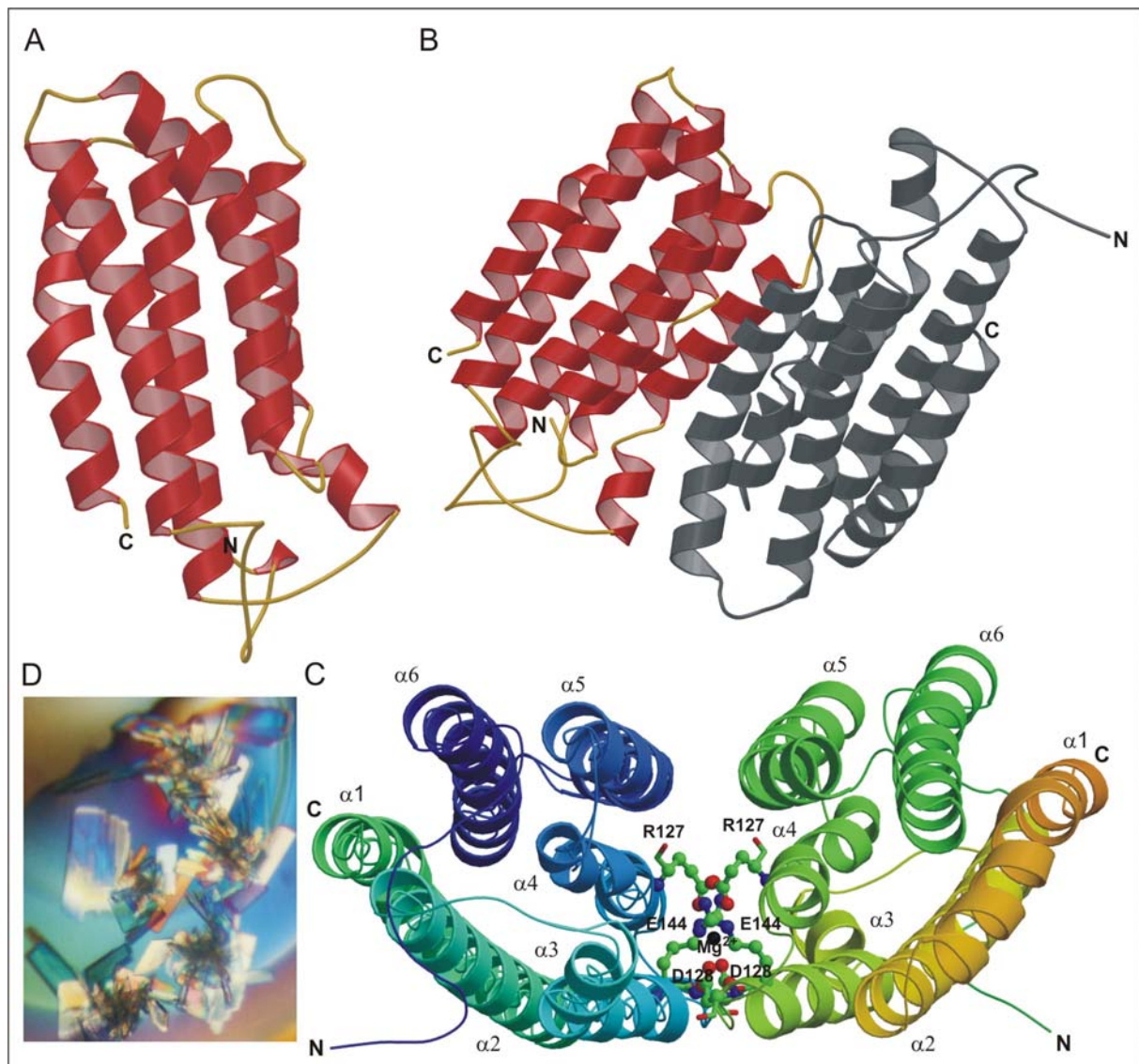


Abb.16: Strukturvorschlag und Kristalle von CAPN151-678.

A Sechs α -Helices, die antiparallel zueinander angeordnet sind und dabei eine zylindrische Form ausbilden, stellen die stabile Domäne von CAP-N dar. **B** Im Kristall liegen zwei solcher Monomere (rot-gelb bzw. grau dargestellt) als Dimer in der asymmetrischen Einheit vor. Die ungefähren Abmessungen dieses Dimers betragen $64 \text{ \AA} \times 54 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$. **C** Die Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ weisen kurze Unterbrechungen bzw. leichte Knicke auf. Die Komplexierung des Mg^{2+} findet jeweils über die Reste Arg 127, Asp 128 und Glu 144 statt. **D** Kristalle von CAPN151-678, welche nach den oben beschriebenen Kristallisationsbedingungen erhalten wurden (Abbildungen und Photographie von Dorota Ksiazek, MPI f. Biochemie, Martinsried).

3.3.9 CAPN151-678 als mögliches Substrat von Proteinkinasen

Für das CAP-Homolog in *D. discoideum* wird eine regulatorische Rolle in der dynamischen Reorganisation des Actin-Cytoskeletts nach externer Stimulierung vermutet. Als G-actin-sequestrierendes Protein nimmt es Einfluß auf die Gestalt des Actin-Netzwerkes in der Zelle (Vojtek *et al.*, 1991; Amberg *et al.*, 1995). Alle actinbindenden Proteine unterliegen ihrerseits einer genauen Regulation durch Ca^{2+} , Polyphosphoinositide, pH und/oder Phosphorylierung.

Für das *D. discoideum* CAP ist bereits bekannt, daß es Actin *in vitro* in einer Ca^{2+} -unabhängigen, aber PIP_2 -abhängigen Weise bindet (Gottwald *et al.*, 1996). Die hier gestellten Fragen beziehen sich auf die Möglichkeit einer Phosphorylierung des Proteins und damit verbunden auf seine Position in den Signalkaskaden, die den raschen Umbau des Cytoskeletts kontrollieren.

Der Versuch wurde wie in Abschnitt 2.4.9 beschrieben zweimal durchgeführt. Dabei diente CAPN151-678 als Substrat für die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A aus Rinderherz. In beiden Fällen wurde dabei ein negatives Ergebnis erhalten. CAPN151-678 ist auch kein *in vitro* Substrat für die *D. discoideum* STE20-ähnliche Proteinkinase 2 (DST2).

Zu diesem Zeitpunkt muß also davon ausgegangen werden, daß zumindest der untersuchte Teil des CAP-Homologs aus *D. discoideum* nicht phosphoryliert wird. Für den übrigen Teil des Proteins steht die Beantwortung dieser Frage noch aus.

3.4 Untersuchungen zum *D. discoideum* CAP-C

3.4.1 Beobachtungen zum *D. discoideum* CAP-C

Bei Betrachtung der C-terminalen Konstrukte muß zunächst auf die Funktionalität dieser Domäne eingegangen werden. Mit dieser verbindet man eine G-actinsequestrierende Aktivität, die *in vitro* u.a. für *S. cerevisiae* und *D. discoideum* nachgewiesen werden konnte (Freeman *et al.*, 1995a; Gottwald *et al.*, 1996). Hinweise auf eine *in vivo* Aktivität existieren ebenfalls in Hefe sowie in Säugern (Vojtek *et al.*, 1991; Amberg *et al.*, 1995). Die für die Bindung verantwortlichen spezifischen Reste konnten zwar bisher nicht bestimmt werden, bei einem Vergleich aller CAP Sequenzen stößt man jedoch auf vier hochkonservierte Regionen (*D. discoideum* AS 272-286, 344-363, 394-426 und 440-446; Hubberstey und Mottillo, 2002). So konnten CAPs aus *S. cerevisiae* und Mensch nach Deletion der 27 carboxyterminalen Aminosäuren Actin nicht mehr binden (Zelicof *et al.*, 1996). Die Reste E, P, E und Q aus der Aminosäurefolge E(X)₃PEQ, die sich in allen CAPs (außer den beiden pflanzlichen – Austausch des 2. E gegen Q) in diesem Bereich befinden, könnten also kritische Faktoren für die Actinbindung sein.

Für das Homolog aus *Drosophila* - *cap* - wurden die 22 carboxyterminal auf den Polyprolin-Bereich folgenden Aminosäuren als Verprolin-Homologie-Domäne, welche in zahlreichen actinbindenden Proteinen gefunden wurde (z.B. Thymosin, Fimbrin und α -Actinin), beschrieben (Baum *et al.*, 2000).

In vitro binden Mitglieder der WASP-Familie über dieses Motiv Actinmonomere, während es *in vivo* durch Aktivierung des Arp2/3-Komplexes die Actinpolymerisation katalysiert (Miki *et al.*, 1996; Miki *et al.*, 1998). Baum *et al.* (2000) nehmen daher für CAP-Homologe an, daß diese Region die Actinbindung ermöglicht. Im Verprolin selbst wurde die actinbindende Domäne auf das Hexapeptid LKKAET lokalisiert (Vaduva *et al.*, 1997). Insofern müßten die ersten 23 Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Proteins betrachtet werden. Im *D. discoideum* CAP sind an entsprechender Stelle 6 von 18 Aminosäuren identisch mit der Verprolin-Domäne und weitere 4 ähnlich (Abb. 17).

RDALLGDIRKGMK----LKKAET	Verprolin
LGAVFGEISKDGGVTSGLKKVTN	<i>Dictyostelium</i> CAP
RSALFAQINQGADITKGLKKVTG	Fliege CAP
RSALFAQINQGESITHALKHVS	Mensch CAP1
RGALLDQIRQGIQ----LNKTPG	Mensch WASP
KAALLDQIREGAQ----LKKVEQ	Mensch N WASP

Abb. 17: Sequenzvergleich der Verprolin-Homologie-Domänen verschiedener Proteine.

Es werden Verprolin-Homologie (VH)-Domänen aus unterschiedlichen Proteinen mit der entsprechenden Verprolin-Sequenz verglichen. Identische Aminosäuren sind blau gekennzeichnet, ähnliche rot. Die VH-Domäne des *D. discoideum* CAPs zeigt demnach nur eine relativ geringe Übereinstimmung - 30% der Aminosäuren sind identisch, weitere 22% ähnlich. Weitaus größer ist die Übereinstimmung im Fall des N WASP Moleküls (56%/22%).

Weiterhin wurden Oligomere von CAP beschrieben (Hubberstey *et al.*, 1996; Zelicof *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1999). Yu *et al.* (1999; *S. cerevisiae*) machen einen N-terminalen Abschnitt im Bindungsbereich der Adenylat-Cyclase für diese Fähigkeit verantwortlich. Die Funktion einer solchen Interaktion scheint jedoch komplizierter zu sein, zumal in *Homo sapiens* sowohl Wechselwirkungen der N-Domäne mit sich selbst und mit der C-Domäne als auch die analogen Wechselwirkungen des carboxyterminalen Abschnitts beobachtet wurden (Hubberstey *et al.*, 1996). Dieses Ergebnis läßt somit auf zwei Interaktionsdomänen schließen. Zelicof *et al.* (1996) beschreiben die Aminosäuren 360-526 des Hefe CAPs als notwendig und ausreichend für die Actinbindung und die Proteindimerisierung. Beide Funktionen lassen sich trennen und die carboxyterminalen Reste 499-526 werden für die Bindung des Actins benötigt (s.o.). Baum *et al.* (2000) weisen die C-terminalen Aminosäuren dagegen als Dimerisierungsdomäne aus und verlegen die actinsequestrierende Funktion auf den mittleren Bereich von CAP-C, zwischen VH- und Dimerisierungsregion, ohne dabei spezifische Reste zu nennen (Abb. 18).

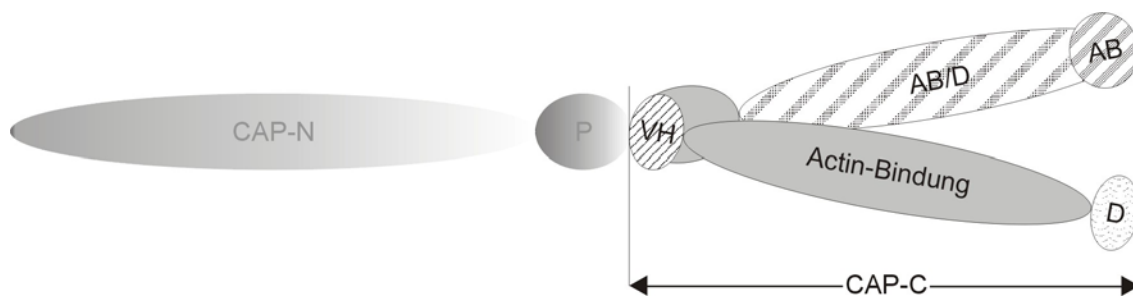


Abb. 18: Vorschläge für die Domänenstruktur von CAP-C.

Die C-terminale Domäne des CAP Proteins kann wie folgt unterteilt werden: nach Zelicof *et al.* (1996, Hefe; obere Ausrichtung) werden die 27 carboxyterminalen Aminosäuren für die Actinbindung (AB) benötigt, die Reste 300-464 werden als notwendig für Actinbindung und Proteindimerisierung (AB/D) angegeben. Baum *et al.* (2000, Fliege; untere Ausrichtung) verweisen die Dimerisierungsdomäne (D) dagegen auf das Ende von CAP-C. Die Region für die Actin-Bindung liegt davor (keine genauen Angaben von Resten). Am Anfang der carboxyterminalen Domäne haben sie für *Drosophila* einen Abschnitt mit Homologie zu Verprolin (VH) entdeckt (AS # 255-277) (Die hier angeführten Aminosäuren beziehen sich auf die Proteinsequenz des CAPs aus *D. discoideum!*).

3.4.2 Klonierung und Expression von CAPC835-1392

Bei der Planung der folgenden C-terminalen Konstrukte des *D. discoideum* CAPs wurden die in 3.4.1 genannten Aspekte in Betracht gezogen:

- | | | |
|-----------------------|----------------|----------------------|
| - CAPC646-1392 | - CAPC721-1392 | - CAP-C(763-1392) |
| - CAPC763-1311 (-ABD) | - CAPC781-1392 | - CAPC835-1392 (-VH) |

Auch hier stehen die Zahlen für die Basenpaare in der CAP Sequenz. Von besonderem Interesse waren die Konstrukte CAPC763-1311 und CAPC835-1392. Dem ersten fehlt in Anlehnung an Zelicof *et al.* (1996) die Actinbindungsdomäne (ABD), während sich letzteres durch den Verlust der Verprolin-Homologie (VH) auszeichnet (Abb. 19).

Die Klonierungen verliefen unter den gleichen Bedingungen wie schon für die CAPN-Konstrukte. So wurden die cDNAs auch hier mittels PCR amplifiziert und nach Restriktion mit *NdeI* und *BamHI* in den pT7-7 Expressionsvektor (Tabor, 1990) kloniert. Das ATG der *NdeI*-Schnittstelle (CA↓TATG) fungierte wiederum als Startcodon.

Die erhaltenen Plasmide wurden nach Subklonierung in *E. coli* JM83 Bakterien in den Stamm *E. coli* BL21 transformiert. Auch in diesem Fall blieb die direkte Klonierung problematisch.

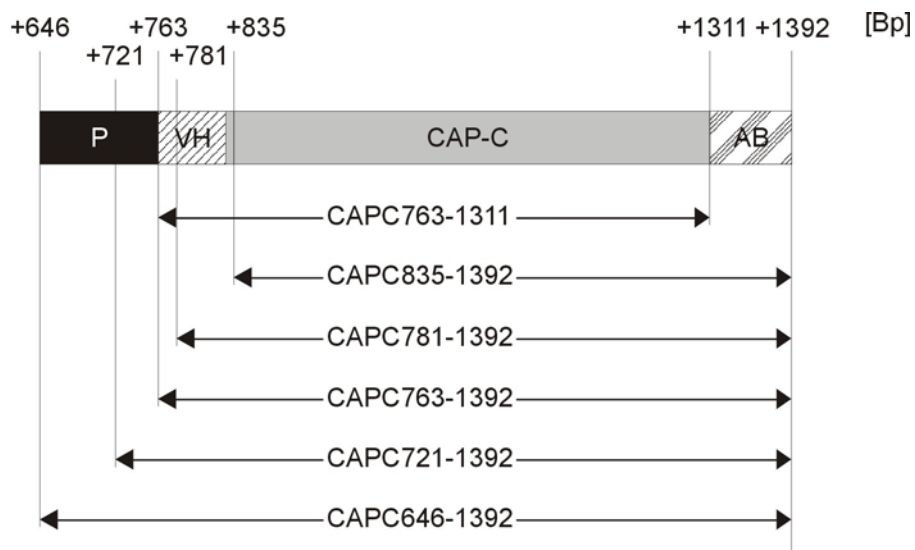


Abb. 19: Schematische Darstellung der CAPC DNA-Konstrukte.

Die Konstrukte wurden jeweils über die Restriktionsstellen *NdeI* und *BamHI*, die im Rahmen der PCR am 5'- bzw. 3'-Ende angefügt worden waren, in den pT7-7 Expressionsvektor (Tabor, 1990) kloniert.

Die Expression der Konstrukte verlief in fast allen Fällen enttäuschend (5 bzw. 500 ml-Ansätze in LB-Medium). Einzig das Konstrukt CAPC835-1392 zeigte ein zufriedenstellendes Ergebnis. Dabei wurden die Zellen bei 37°C und 240 UpM inkubiert. Die Induktion mit IPTG (0,5 mM Endkonzentration) erfolgte bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,7. Inkubation über Nacht wirkte sich auch hier positiv aus.

Die Zellen wurden im Anschluß abzentrifugiert (4200 UpM, 5-10 min, 4°C, Beckman J6-HC). Nach ein- bis zweimaligem Waschen in kaltem TEDABP-Puffer (pH 8,0) wurden sie in diesem Puffer aufgenommen und schließlich bei -20°C eingefroren.

3.4.3 Aufreinigung von CAPC835-1392

Die Zellen wurden wie schon in 3.3.2 und 3.3.6 beschrieben geöffnet. Im Anschluß an zwei Ultrazentrifugationen (100.000 g, 30 min, 4°C, Beckman Optima LE-80K, Ti 45 Rotor) befanden sich gut 85% des CAPC835-1392 Proteins (MW 20200) in den gesammelten Überständen. Nach pH-Einstellung auf 8,0 wurden diese dann auf eine mit TEDABP-Puffer pH 8,0 äquilibrierte DEAE-Säule geladen. Es wurden der Durchfluß aufgefangen und die Säule danach mit zwei Säulenvolumina TEDABP-Puffer pH 8,0 gewaschen. Für die Elution von CAPC835-1392 war ein linearer Gradient mit 2 × 200 ml und 0-250 mM NaCl in TEDABP-Puffer pH 8,0 nötig.

Das Protein wurde bereits zwischen 30 und 80 mM Salz vom Säulenmaterial gelöst und zeigte danach im Coomassie-Gel stets zwei Banden. Durch NMR-Spektroskopie konnte belegt werden, daß es sich bei der unteren Bande um ein Abbauprodukt des Proteins handelte.

Nachdem die Hauptfraktionen mittels Low Shear-Viskosimetrie auf ihre Actinbindung hin überprüft worden waren, wurden die Anteile mit den größten Aktivitäten anschließend gesammelt. Es wurde MES bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben und der pH auf 6,5 eingestellt. Die so behandelte Proteinlösung wurde dann auf eine PC-Säule geladen, die zuvor mit MEDABP-Puffer pH 6,5 äquilibriert worden war. Nach dem Durchfluß und einem Waschschrift mit zwei Säulenvolumina Puffer erfolgte die Elution des CAP-Konstrukts mit Hilfe eines Gradienten (2 × 250 ml, 0-500 mM NaCl in MEDABP-Puffer pH 6,5). Erfreulicherweise wurden Protein und Abbauprodukt dabei immer getrennt eluiert. Zwischen 180 und 240 mM Salz löste sich zunächst Letzteres von der Säule. Die Elution des kompletten CAPC835-1392 erfolgte dagegen erst zwischen 240 und 310 mM Salz. Diese Proben wurden schließlich mittels Ultrafiltration (Centriprep-10) ankonzentriert. Für NMR-spektroskopische Untersuchungen war zuvor gegen KPM-Puffer pH 6,5 dialysiert worden, für Actinbindungsversuche gegen G-Puffer pH 8,0. Abb. 20 zeigt eine schematische Darstellung der Präparation, Abb. 21 schildert den Verlauf anhand der Ergebnisse der SDS-PAGE.

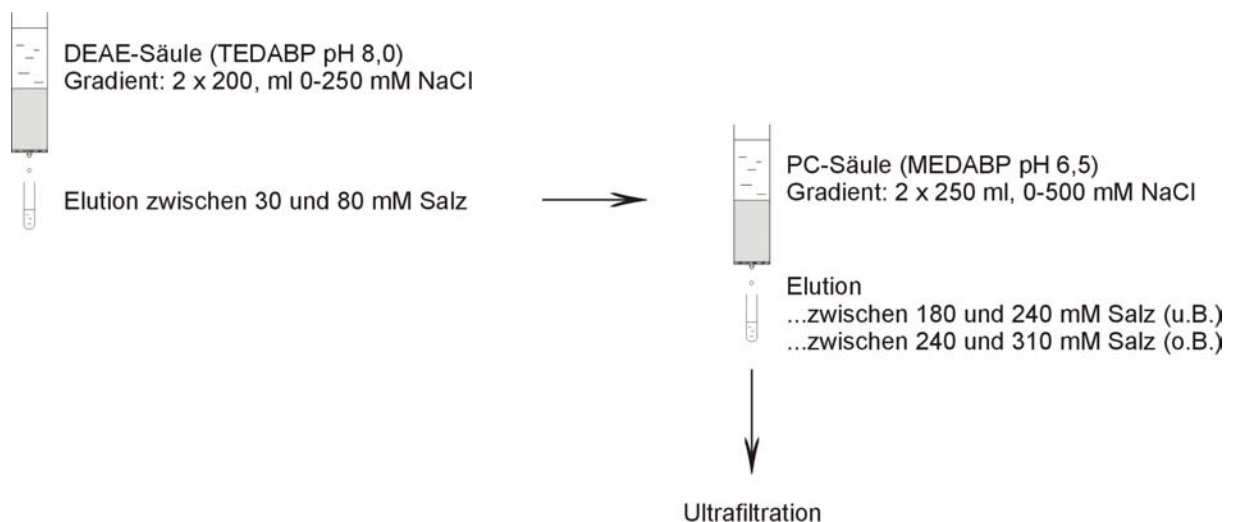


Abb. 20: Schematische Darstellung der Aufreinigung von CAPC835-1392.

CAPC835-1392 band relativ schwach an die DEAE-Säule. Die Elution des Proteins erfolgte daher bei geringer Salzkonzentration. Im Coomassie-Gel zeigte das Konstrukt danach zwei Banden, eine für das Gesamtprotein (o.B.) und eine weitere für ein Abbauprodukt (u.B.). Die Proteine wurden jedoch über die PC-Säule nacheinander und sauber eluiert.

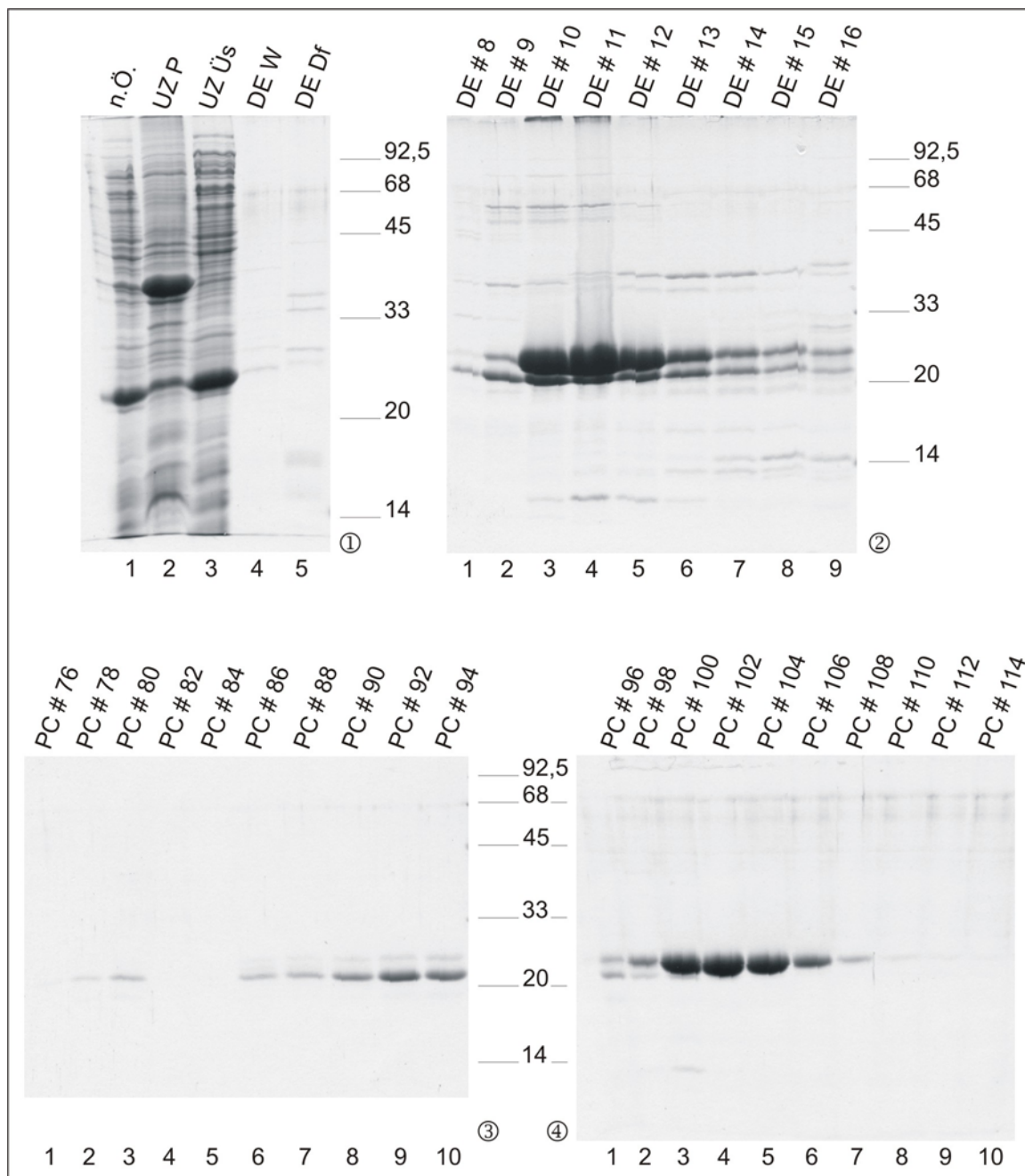


Abb. 21: Aufreinigung von CAPC835-1392.

Spur 1 in Gel ① zeigt das Zellhomogenat nach dem Öffnen der Zellen (n.Ö.). CAPC835-1392 sticht bei 20 kDa deutlich hervor. Nach den Ultrazentrifugationen befinden sich etwa 85% des Proteins in den Überständen (UZ Üs). Die Durchfluß- und Waschfraktionen der DEAE-Säule enthalten kein CAPC835-1392 (DE Df bzw. DE W). Das Protein wird erst durch einen NaCl-Gradienten eluiert (Gel ② alle Spuren; DE # 8-16). Zum ersten Mal fällt dabei ein Abbauprodukt auf. Es wird daher fortan zwischen oberer (Protein) und unterer Bande (Abbauprodukt) unterschieden. Die endgültige Aufreinigung und auch Trennung dieser Peptide erfolgt dann über die PC-Säule. Im Anschluß an das Abbauprodukt (PC # 86-94; Gel ③, Spuren 6-10) wird das vollständige Protein in den Fraktionen PC # 100-108 sauber eluiert (Gel ④, Spuren 3-7). Auf der rechten Seite (oben) bzw. in der Mitte (unten) sind jeweils die Molekülmassen in kDa gezeigt.

3.4.4 Viskosimetrische Messungen

Zur Überprüfung der Aktivität von CAPC835-1392 wurden die nach wichtigen Schritten der Präparation erhaltenen Fraktionen mit Hilfe der Kugelfall-Viskosimetrie untersucht. Auf diese Weise wurde zum einen sichergestellt, daß sich das actinsequestrierende Protein überhaupt in der fraglichen Fraktion befand, und zum anderen, daß es nach wie vor aktiv war.

Die Messungen machten deutlich, daß am Ende der Aufreinigung ein aktives, actinsequestrierendes CAPC835-1392 erhalten wurde. Steigende Mengen des Proteins reduzierten die Viskosität der F-Actin-Lösung zunehmend. Da beim CAPC835-1392 die VH-Domäne fehlt, liegt die Vermutung nahe, daß diese Region des *D. discoideum* CAPs, anders als vermutet (Baum *et al.*, 2000), keinen Einfluß auf die Actinbindung hat.

Auffallend ist außerdem die deutlich schwächere Aktivität des Abbauprodukts. Die erhaltene Senkung der Viskosität ist vielleicht sogar auf Verunreinigungen durch das Gesamtprotein zurückzuführen (siehe Coomassie-Gel in Abb. 22). Es stellt sich die Frage, welcher Teil des Konstrukts hier noch vorliegt, und welcher abgespalten wurde. Um dies herauszufinden, wären NMR- und/oder massenspektroskopische Messungen erforderlich. Der fehlende Abschnitt könnte hauptverantwortlich für die Actinbindung sein, oder zumindest ein entscheidender Teil der Bindungsdomäne.

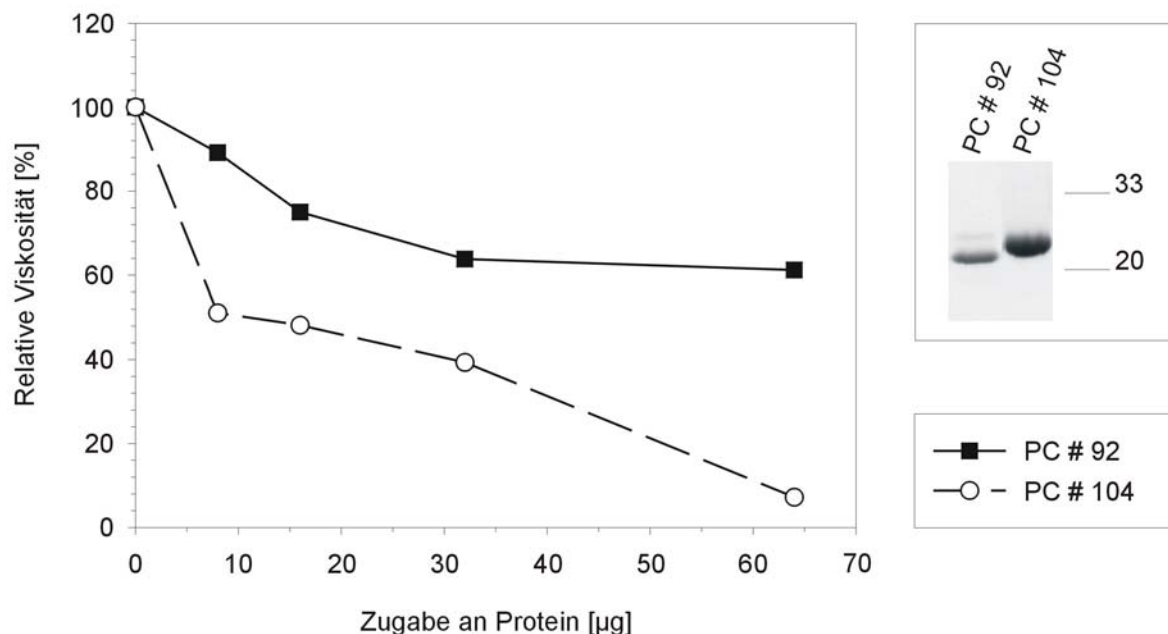


Abb.22: Aktivitätskontrolle von CAPC835-1392 mittels Low Shear-Viskosimetrie.

Der Graph zeigt die Aktivitätsmessungen für aufgereinigte Fraktionen des Abbauprodukts (PC # 92) und des kompletten CAPC835-1392 Proteins (PC # 104). Während das Abbauprodukt die Actinpolymerisation nur wenig behindert, wird diese durch Zugabe steigender Mengen von Fraktion PC # 104 fast ganz unterbunden.

3.4.5 Nachweis der Actinbindung von CAPC835-1392 mittels Fluoreszenz-Spektrometrie

Um weitere funktionelle Untersuchungen vorzunehmen, auch im Hinblick auf die VH-Domäne, wurde als nächstes in *in vitro* Experimenten die Interaktion von CAPC835-1392 mit Pyren-markiertem Actin getestet. Wie schon unter 2.4.8.2 beschrieben, stellt die Verwendung von Actin, welches zuvor mit N-(1-pyrenyl)iodoacetamid markiert worden ist, eine äußerst sensitive Methode dar, um die Polymerisation und Depolymerisation von Actin in An- oder Abwesenheit eines Liganden zu verfolgen. Die Polymerisation von Pyren-markiertem Actin alleine führt dabei zu einer drastischen Fluoreszenzverstärkung. Um den Einfluß des CAP-Konstrukts auf das Polymerisationsverhalten von Actin zu messen, wurde G-Actin in Gegenwart von CAPC835-1392 polymerisiert. G-Actin polymerisierte bei 2 mM MgCl₂ in etwa 80 min zum Gleichgewicht zwischen G- und F-Actin. Die Zugabe von CAPC835-1392 reduzierte die Actinpolymerisation in einer konzentrationsabhängigen Weise (Abb. 23). Bei einem molaren Verhältnis von 1,3:1 des Proteins zu monomerem Actin wurde die Polymerisation während der gemessenen Zeitspanne vollständig verhindert. Betrug die Konzentration des CAP-Konstrukts $\frac{2}{3}$ der G-Actinkonzentration, verlangsamte sich die Polymerisation immer noch so stark, daß am Ende der Messzeit die Fluoreszenzverstärkung um gut 40% niedriger als die Kontrolle war.

Für das Konstrukt mit der gesamten carboxyterminalen Domäne hatte U. Gottwald in seiner Dissertation (1995) ein Verhältnis von 1:2 und 1:10 (Domäne zu G-Actin) für die vollständige bzw. 50%ige Hemmung der Polymerisation bestimmt. Im Gegensatz zur Low Shear-Viskosimetrie sprechen die hier erhaltenen Resultate deshalb eher für einen Einfluß der VH-Domäne auf die Actinbindung durch CAP-C.

Da von vielen actinbindenden Proteinen bekannt ist, daß sie in ihrer Aktivität durch Ca²⁺ reguliert werden (Übersicht: Kreis und Vale, 1993), wurden die Versuche sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ca²⁺ durchgeführt. Wie beim gesamten CAP-C (Gottwald, 1995) wurden jedoch auch hier die gemessenen Interaktionen nicht von Ca²⁺ beeinflusst.

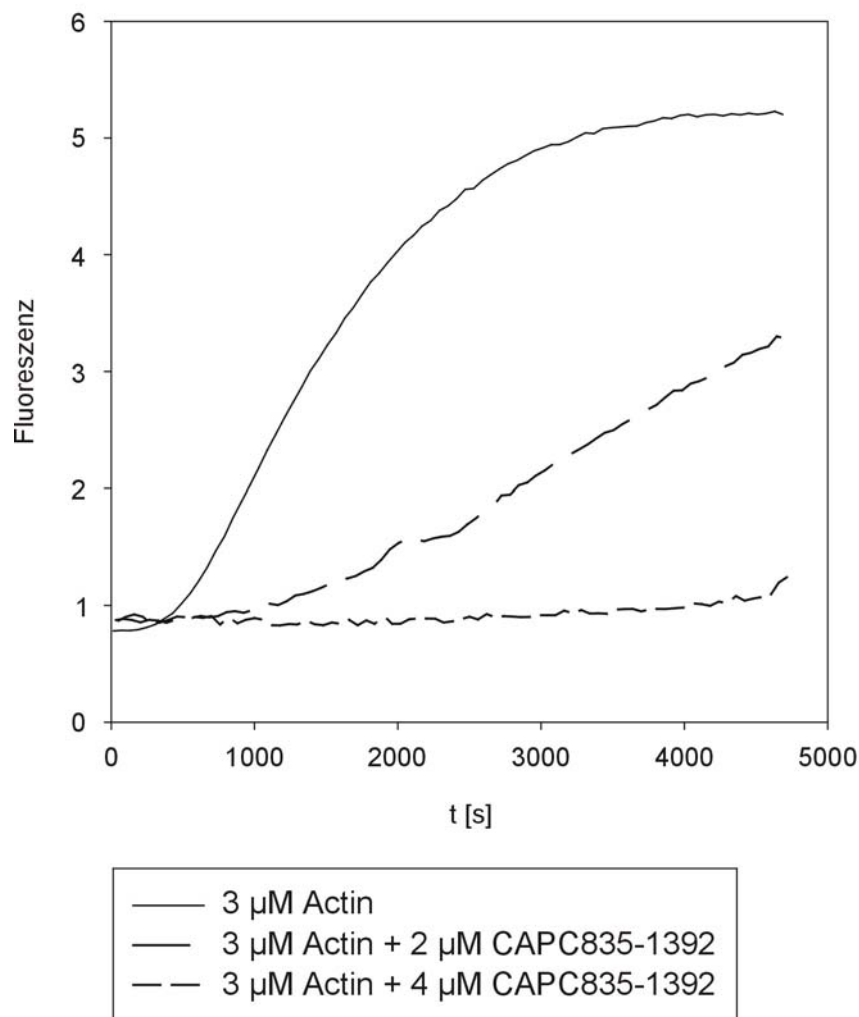


Abb. 23: Einfluß von CAPC835-1392 auf die Polymerisation von Actin.

Die Polymerisation von 3 μM G-Actin (10% Pyren-markiert) wurde als relativer Fluoreszenzanstieg in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von CAPC835-1392 gemessen. G-Actin alleine oder G-Actin und CAP wurden gemischt und die Ansätze jeweils durch Zugabe von 2 mM MgCl_2 (Endkonzentration) gestartet. CAPC835-1392 verhinderte die Actinpolymerisation vollständig über die gemessenen 80 min, wenn es in einem molaren Verhältnis von 1,3:1 (Protein zu G-Actin) zugegeben wurde (kurz gestrichelte Linie). Bei einem Verhältnis von 1:1,5 betrug die Senkung am Ende etwa 40% (lang gestrichelte Linie).

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß von CAPC835-1392 auf F-Actin überprüft. Dazu wurde das CAP-Konstrukt nach 90 min Polymerisierungszeit des Actins dem Ansatz vorsichtig zugemischt und die Fluoreszenz weiter verfolgt. Das G/F-Actingleichgewicht wurde dabei in Richtung des monomeren Pools verschoben. Der Fluoreszenzrückgang zeigt eine Depolymerisation des Actins an. Auch in diesem Fall war der Effekt, der von U. Gottwald (1995) für den gesamten C-terminalen Abschnitt gemessen wurde, im Vergleich deutlich größer.

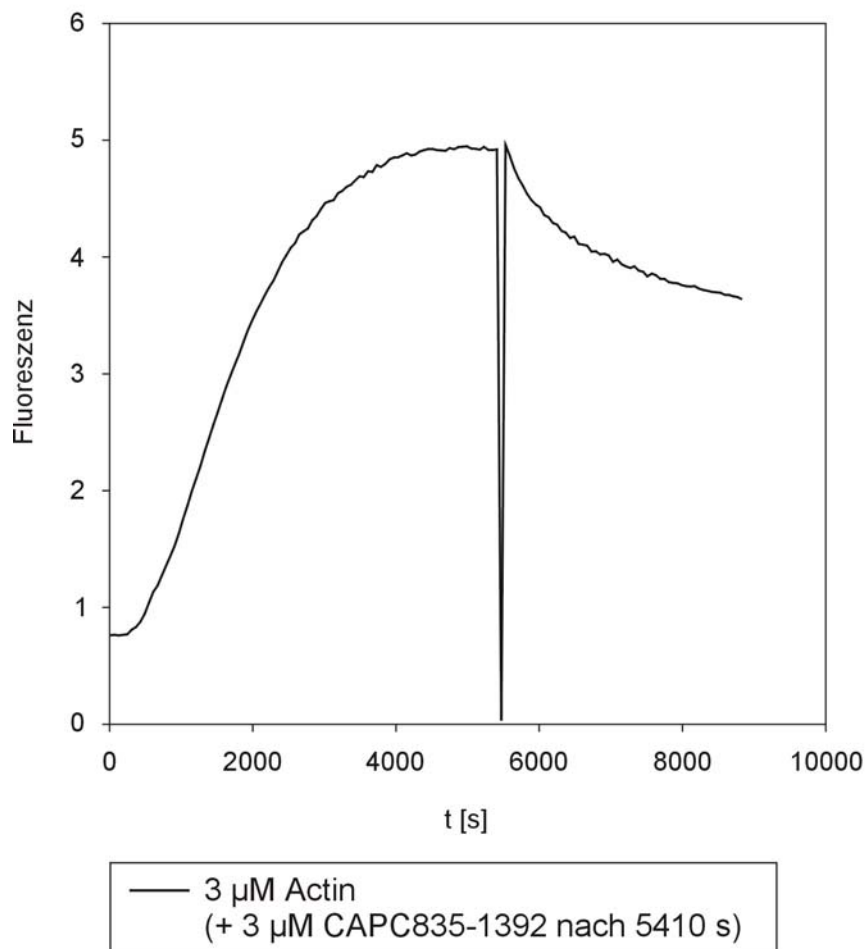


Abb. 24: Depolymerisation von F-Actin durch Zugabe von CAPC835-1392.

Nach etwa 90 min wurde dem auspolymerisierten Actin das CAPC835-1392 Protein im molaren Verhältnis von 1:1 vorsichtig zugemischt (senkrechter Sturz der Kurve). Die Depolymerisation des F-Actins wird durch den relativen Fluoreszenzrückgang signalisiert. Das G/F-Actingleichgewicht wird von den CAP Proteinen in Richtung des monomeren Actins verschoben.

3.4.6 Stabilität des G-Actin/CAPC835-1392-Komplexes

Eine weitere Methode, die Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen, ist die chemische Quervernetzung. Diese wurde sowohl mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) als auch mit Glutaraldehyd durchgeführt. Während im Fall von EDC in Kombination mit N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS) räumlich nah benachbarte Amino- und Carboxylgruppen von interagierenden Molekülen quervernetzt werden, kommt es beim Glutaraldehyd zur Quervernetzung von Lysinresten, die aufgrund der Polymerbildung des Glutaraldehyds räumlich auch weiter voneinander entfernt sein können.

Ein Ziel beider Ansätze war es, einen weiteren Befund für die Bindung des G-Actins an CAPC835-1392 zu erhalten und die Stabilität dieses Komplexes zu überprüfen. Außerdem wurde CAPC835-1392 auch im Hinblick auf die Fähigkeit zur Dimerisierung untersucht.

Das molare Verhältnis von G-Actin zum CAPC-Konstrukt betrug dabei 1:3 (Ansatz mit Glutaraldehyd) bzw. 1:4,5 (EDC/NHS). Weiterhin wurde wie unter 2.4.8.4 beschrieben verfahren. Experimente ohne G-Actin fanden unter den gleichen Bedingungen statt. Allerdings wurde dann nicht vorinkubiert.

In Abwesenheit von G-Actin wurden in beiden Ansätzen Dimere von CAPC835-1392 erhalten. Mit zunehmender Zeitspanne nahm dabei die Anzahl der Dimere zu, während die der Monomere abnahm. Sowohl die Dimere als auch ihre Zunahme konnten für den Versuch mit EDC/NHS auch im Coomassie-Gel beobachtet werden.

Bei den Quervernetzungen mit G-Actin wurden die Dimere von CAPC835-1392 ebenfalls erhalten. Eine Zunahme wurde allerdings nur im Ansatz mit Glutaraldehyd deutlich. Neben den Monomeren und Dimeren des CAPC-Konstrukts zeigten die Immunoblots auch Banden bei etwa 60 kDa. Diese könnten einem Komplex aus G-Actin und CAPC835-1392 entsprechen, dessen Größe etwa 62 kDa betragen würde. Für beide Methoden war dabei eine Zunahme der Bandenintensität zu beobachten. Die Komplexe waren im Coomassie-Gel zum EDC/NHS-Ansatz ebenfalls zu sehen.

Für den Ansatz mit Glutaraldehyd wurde darüber hinaus noch eine vierte Bande bei etwa 80 kDa erhalten. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Interaktion zwischen einem CAPC835-1392 Dimer und einem einzelnen G-Actin Molekül. Der Komplex wurde lediglich nach 10minütiger Inkubation erhalten.

Abb. 25: Chemische Quervernetzung von G-Actin und CAPC835-1392 mittels Glutaraldehyd.

Die Proteine wurden im Anschluß an die Quervernetzungsreaktion mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert (50 min, 12 V). Die Detektion des CAPC835-1392 erfolgte dann mit dem CAP-C mAk 223-91-3. In Spur 1 wurde unbehandeltes CAPC835-1392 als Kontrolle aufgetragen. Die Mehrfachbanden sind auf Abbauprodukte zurückzuführen. Die Spuren 2-5 zeigen das CAPC835-1392 Protein ohne G-Actin nach 1, 2, 5 bzw. 10 min Behandlung mit 0,125% Glutaraldehyd. Die Reaktion wurde danach jeweils durch Zugabe von Glycin (50 mM Endkonzentration) gestoppt. Die Anzahl der Proteindimere (bei ~40 kDa) steigt hierbei mit zunehmender Zeit an, während die der einzelnen Moleküle (bei ~20 kDa) abnimmt. Die Spuren 6-10 veranschaulichen die Ergebnisse der Reaktionen in Anwesenheit von G-Actin. Spur 6 zeigt die Kontrolle ohne Glutaraldehyd, die Spuren 7-10 die erhaltenen CAPC835-1392-Komplexe nach 1, 2, 5 bzw. 10 min Quervernetzungszeit (0,125% Glutaraldehyd). In allen Fällen wurden die Ansätze 30 min auf Eis vorinkubiert. Neben den schon zuvor beobachteten Banden der Monomere und Dimere fallen hier weitere Signale auf. In den Spuren 9 und 10 findet man bei etwa 60 kDa einen drit-

ten Komplex, der wahrscheinlich auf der Interaktion von G-Actin mit CAPC835-1392 (~62 kDa) beruht. Der vierte erhaltene Komplex bei etwa 80 kDa kann auf eine Wechselwirkung zwischen einem einzelnen G-Actin und einem CAPC835-1392 Dimer (~ 82 kDa) zurückgeführt werden. Auf der rechten Seite sind die Molekülmassen des See Blue-Markers in kDa gezeigt.

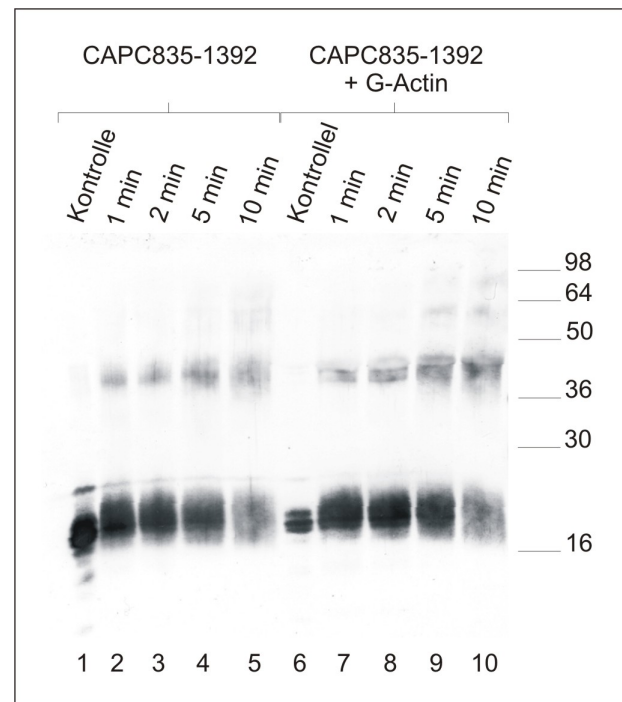
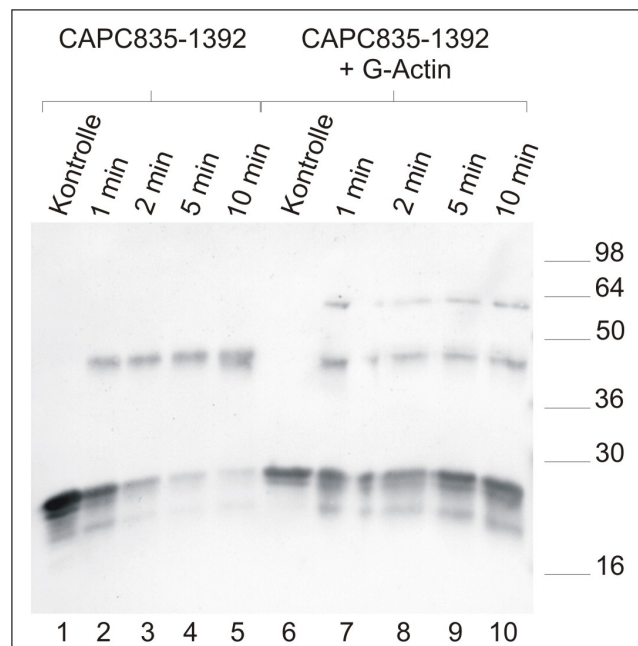


Abb. 26: Chemische Quervernetzung von G-Actin und CAPC835-1392 mittels EDC/NHS.

Die Quervernetzungsreaktionen mittels EDC/NHS bestätigen weitgehend die in Abb.25 beschriebenen Ergebnisse der Ansätze mit Glutaraldehyd. So können auch hier neben CAPC835-1392 Monomeren (~20 kDa) und Dimeren (~ 40 kDa) Komplexe zwischen dem Protein und G-Actin (~62 kDa) beobachtet werden. Auch im zugehörigen Coomassie-Gel ist der Komplex jeweils als schwache Bande in den Spuren 7-10 auszumachen. Der für das Glutaraldehyd erhaltene vierte Komplex kann jedoch in keinem Fall gefunden werden. Auf der rechten Seite sind die Molekülmassen des See Blue-Markers in kDa gezeigt.



4 ERGEBNISSE II

Untersuchungen zu Filactin, einem neuartigen actinverwandten Protein in *D. discoideum*

4.1 Filactin in *D. discoideum*

Im folgenden sind die Daten zusammengefaßt, die nicht im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit gewonnen wurden:

Bei der Suche nach filaminähnlichen Proteinen waren durch das *Dictyostelium*-Genomprojekt (Eichinger *et al.*, 2001; Glockner *et al.*, 2002; <http://www.uni-koeln.de/dictyostelium/>) zahlreiche Sequenzen mit Homologien zu dieser Gruppe von F-Actinquervernetzern entdeckt worden. Anschließende Nachforschungen brachten ein völlig neuartiges, actinähnliches Protein zum Vorschein. Dieses enthält in seiner N-terminalen Hälfte neben Abschnitten ohne besondere Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzen auch zwei Regionen mit Homologien zu actinbindenden Proteinen vom Typ der Filamine. Der C-terminale Abschnitt ist sehr actinähnlich. Seine Aminosäuresequenz und die des Muskelactins aus *Homo sapiens* sind zu etwa 66% identisch. Aufgrund dieser Homologien wurde das neue Molekül „Filactin“ genannt.

Bisher konnte Filactin in keinem weiteren Organismus gefunden werden. In *D. discoideum* lassen Northern- und Immunoblots auf ein einzelnes Filactin-Gen schließen. Die etwa 3 kB große Filactin mRNA kann in allen Stadien der Entwicklung beobachtet werden. Das Protein Filactin besitzt eine Molekülmasse von 104,7 kDa und weist einen rechnerischen isoelektrischen Punkt von 5,86 auf; die Nettoladung ist mit -15 extrem negativ. Abb. 27 zeigt die bisher bekannte Domänenstruktur von Filactin.

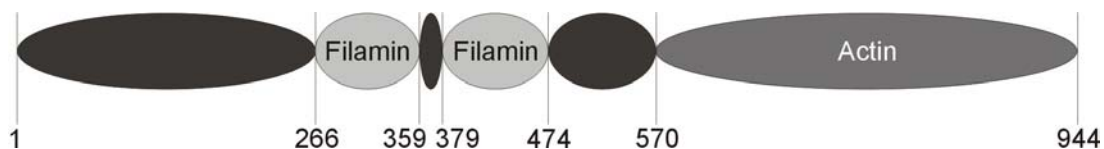


Abb. 27: Schematische Darstellung der Filactin Domänenstruktur.

Die Beschriftungen beziehen sich hier lediglich auf Homologien! Filactin ist aus 944 Aminosäuren aufgebaut. Seine Domänenstruktur enthält im C-terminalen Abschnitt (dunkelgrau) eine actinähnliche Sequenz (AS 570-944), die zu Muskelactin noch weit homologer ist als z.B. zu actinverwandten Proteinen (Actin-Related Proteins, ARPs). Im N-terminalen Bereich (schwarz und hellgrau) findet man zwei schwächere Homologien zu *D. discoideum* Filamin (AS 266-358 + AS 379-473)

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich vor allem mit der genaueren Analyse der Proteinsequenz sowie mit der Durchführung biochemischer Versuche zur subzellulären Verteilung von Filactin.

4.2 Analyse der Filactin-Proteinsequenz

Ein direkter Sequenzvergleich der C-terminalen actinähnlichen Domäne von Filactin mit weiteren Actinen zeigt hohe Übereinstimmungen (Abb. 28). Filactin kann daher als ein Actin mit einem extrem erweiterten N-Terminus, welcher zwei filaminähnliche Bereiche enthält, beschrieben werden.

Phylogenetische Untersuchungen mit dem Programm PHYLIP (Felsenstein, 1989) ergaben weiterhin, daß der actinähnliche Abschnitt im Vergleich zu den bekannten actinverwandten Proteinen (Actin-Related Proteins, ARPs) eine größere Homologie zu Actinen besitzt. Dies wird durch den phylogenetischen Baum in Abb. 29 deutlich.

Nach Anpassung der carboxyterminalen Aminosäuresequenz an die bekannte Struktur von Muskelactin (Kabsch *et al.*, 1990) zeigt sich auch dreidimensional eine hohe Ähnlichkeit. Der C-terminale Teil des Filactins baut sich demnach wie Actin aus zwei Domänen auf, wobei auch hier eine weitere Unterteilung in insgesamt vier Subdomänen denkbar ist. Außerdem weisen die Untereinheiten 1 und 3 eine ähnliche Architektur auf (Abb. 30 und Kabsch *et al.*, 1990). Es ist jedoch anzumerken, daß gerade in den Helix-Bereichen der Subdomäne 3 wie auch in einem Helix-Bereich der Subdomäne 4 die größten Abweichungen von der Actinstruktur vorliegen. Alles in allem kann von einer flexiblen Struktur ausgegangen werden, die ebenso wie Actin durch Nukleotidbindung und Salzbrücken zusammengehalten werden könnte. Grund zu dieser Annahme liefert die Tatsache, daß sich alle für eine ATP/ADP-Bindung erforderlichen Aminosäurenreste an der richtigen Stelle befinden (Stefan Steinbacher, mündliche Mitteilung; Abb. 30).

Filactin C-term.	~~~~~	~~~~~KA	GFAGEDAPRC	VFPSIIGYPM	FNSVMHGMG.	31
<i>B.d.</i> Actin 3	MCDDEVAALV	VDNGSGMCKA	GFAGDDAPRA	VFPSIVGRPR	HQGVVMVGMGQ	50
<i>D.d.</i> Actin 8	~~~~~	~~~~~	~AGDDAPRA	VFPSIVGRPR	HTGVMVGMGQ	28
<i>H.s.</i> Muskelactin	~~~~~	~~~~~	~GDDAPRA	VFPSIVGRPR	HQGVVMVGMGQ	27
Filactin C-term.	KDKYIGDEAQ	AKRGILNIKY	PIEHGIIITNW	NDMEALWEYI	FTNELRVNAS	81
<i>B.d.</i> Actin 3	KDSYVGDEAQ	SKRGILTLKY	PIEHGIIITNW	DDMEKIWHHT	FYNELRVAPV	100
<i>D.d.</i> Actin 8	KDSYVGDEAQ	SKRGILTLKY	PIEHGIVITNW	DDMEKIWHHT	FYNELRVAPV	78
<i>H.s.</i> Muskelactin	KDSYVGDEAQ	SKRGILTLKY	PIEHGIVITNW	DDMEKIWHHT	FYNELRVAPV	77
Filactin C-term.	KHPVLLTEPP	LNPKANRERM	VEITMFEYFNT	PAVYIAIQAV	LSLYASGRIT	131
<i>B.d.</i> Actin 3	EHPVLLTEAP	LNPKANREKM	TQIMFETFNT	PAMYVAIQAV	LSLYASGRIT	150
<i>D.d.</i> Actin 8	EHPVLLTEAP	LNPKANREKM	TQIMFETFNT	PAMYVAIQAV	LSLYASGRIT	128
<i>H.s.</i> Muskelactin	EHPVLLTEAP	LNPKANREKM	TQIMFETFNT	PAMYVAIQAV	LSLYASGRIT	127
Filactin C-term.	GTVLDGCGDV	CHTVPIYEGY	SIPHAIKRID	IGGRDITEYL	MRLITERGYA	181
<i>B.d.</i> Actin 3	GIVLDSGDGV	SHTVPIYEGY	ALPHAAILRLD	LAGRDLTDYL	MKILITERGYS	200
<i>D.d.</i> Actin 8	GIVMDSGDGV	SHTVPIYEGY	ALPHAAILRLD	LAGRDLTDYM	MKILITERGYS	178
<i>H.s.</i> Muskelactin	GIVMDSGDGV	THTVPIYEGY	ALPHAAILRLD	LAGRDLTDYL	MKILITERGYS	177
Filactin C-term.	FTTTAEREIV	RDIKEKTSFV	SQDFYASMNA	PEDNN.IIKD	YTMPDKQVLT	230
<i>B.d.</i> Actin 3	FTTTAEREIV	RDIKEKLCYV	ALDFEQEMAT	AAASTSLEKS	YELPDGQVIT	250
<i>D.d.</i> Actin 8	FTTTAEREIV	RDIKEKLAYV	ALDFEAEMQT	AASSSALEKS	YELPDGQVIT	228
<i>H.s.</i> Muskelactin	FTTTAEREIV	RDIKEKLCYV	ALDFEQEMAT	AASSSSLEKS	YELPDGQVIT	227
Filactin C-term.	IGKERFRCYE	AFEDPSVLGK	DQNGIHLLLN	ETITSCIDI	RRDLYKNIVV	280
<i>B.d.</i> Actin 3	IGNERFRCPE	SLFQPSFLGM	ESSGIHETVY	NSIMKCDVDI	RKDLYANIVM	300
<i>D.d.</i> Actin 8	IGNERFRCPE	ALFQPSFLGM	ESAGIHETTY	NSIMKCDVDI	RKDLYGNVVL	278
<i>H.s.</i> Muskelactin	IGNERFRCPE	ALFQPSFLGM	ESCGIHETTF	NSIMKCDVDI	RKDLYANTVL	277
Filactin C-term.	SGGSTMATGF	EKRLQKEMEL	LVSNPQVQIK	INAPPNRDIS	VWCGGSVLGD	330
<i>B.d.</i> Actin 3	SGGTTMYPGI	ADRMQKEITA	LAPS~TIKIK	IIAPPERKYS	VWIGGSILAS	349
<i>D.d.</i> Actin 8	SGGTTMFPGI	ADRMNKELTA	LAPS~TMKIK	IIAPPERKYS	VWIGGSILAS	327
<i>H.s.</i> Muskelactin	SGGTTMYPGI	ADRMQKEITA	LAPS~TMKIK	IIAPPERKYS	VWIGGSILAS	326
Filactin C-term.	LKTFSDQWIT	KQEYDEVGRG	IVHRKCF			357
<i>B.d.</i> Actin 3	LSTFQQMWIS	KQEYDESGPG	IVHRKCF			376
<i>D.d.</i> Actin 8	LSTFQQMWIS	KQEYDESGPS	IVHRKCF			354
<i>H.s.</i> Muskelactin	LSTFQQMWIS	KQEYDESGPS	IVHRKCF			353

Abb. 28: Sequenzvergleich der C-terminalen Domäne von Filactin mit verschiedenen Actinen.

Mit dem Programm „Clustal“ des GCG-Programmpaketes (Devereux *et al.*, 1984) wurde die Sequenz der actinähnlichen Domäne des Filactins mit den folgenden Actinmolekülen verglichen: Actin 3 aus *Bactrocera dorsalis*, Actin 8 aus *Dictyostelium discoideum* und Muskelactin aus *Homo sapiens*. In allen Fällen wurden dabei hohe Übereinstimmungen ($\geq 65\%$) erhalten. Identische Aminosäuren sind blau gekennzeichnet, ähnliche rot. Das Symbol „~“ steht für eine durch das Programm eingefügte Lücke, die den Vergleich erleichtern soll. Die verglichenen Sequenzen wurden unter den folgenden Zugriffsnummern aus der Datenbank SWISS-PROT/TrEMBL entnommen: (*B.d.* Actin 3) P45886; (*D.d.* Actin 8) P07830; (*H.s.* Muskelactin) P02568.

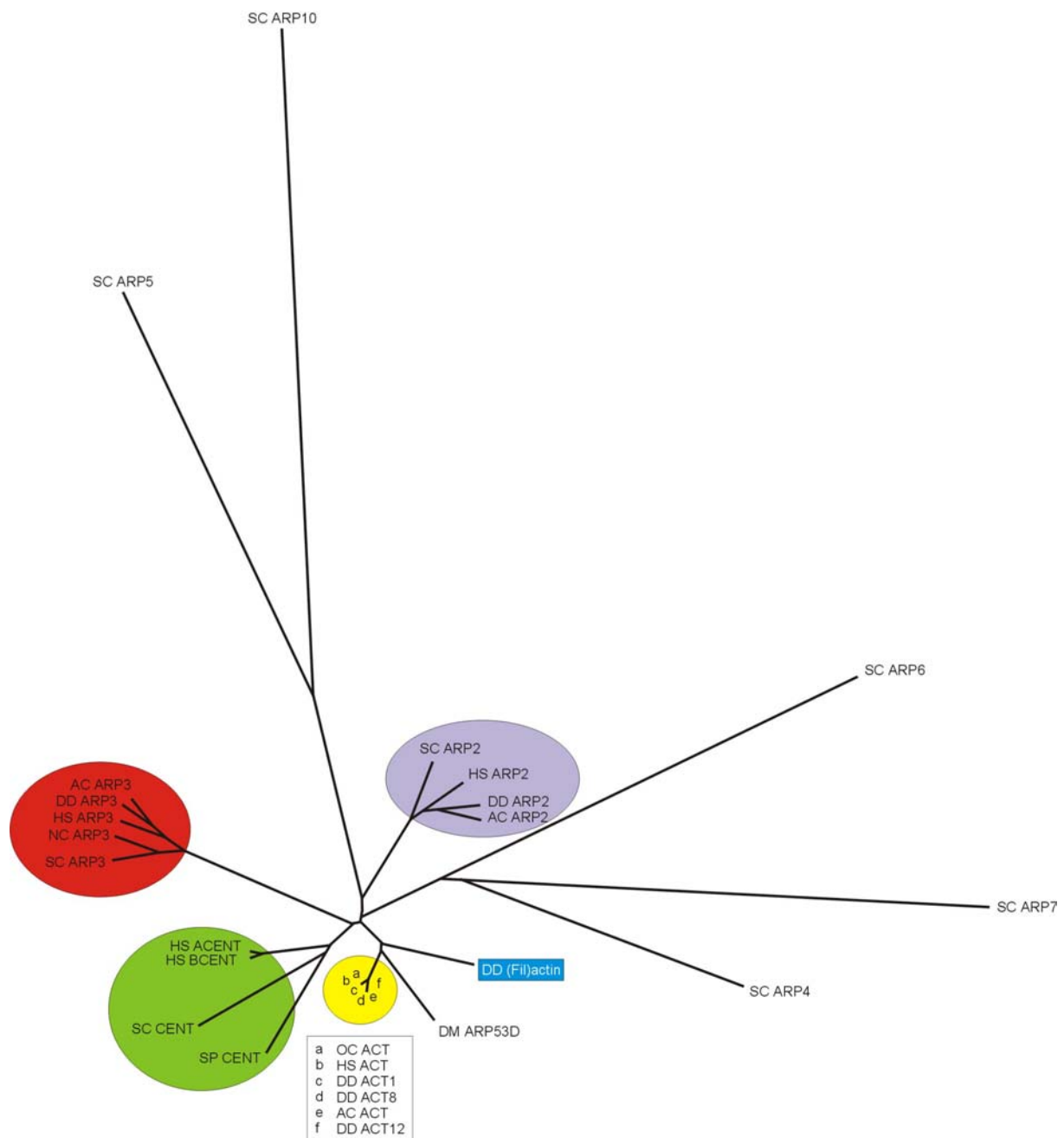


Abb. 29: Phylogenetischer Vergleich der C-terminalen Domäne von Filactin, Actinen und actin-verwandten Proteinen.

Der Baum wurde mit dem PHYLIP Programmpaket (Phylogeny Inference Package 3.2; Felsenstein, 1989) erstellt. Dieses berechnet die verwandtschaftlichen Beziehungen der einzelnen Proteine mit einer Kombination der „least squares“ und „Fitch-Margoliash“-Algorithmen. Die Actin-Domäne des Filactins ist blau unterlegt. Datenbank-Zugriffsnummern (SWISS-PROT/TrEMBL): (AC ACT) P02578; (AC ARP2) P53487; (AC ARP3) P53490; (DD ACT1) P02577; (DD ACT8) P07830; (DD ACT12) P07827; (DD ARP2) AAC99776 (aus PubMed); (DD ARP3) P42528; (DM ARP53D) P45891; (HS ACT) P02568; (HS ACENT) P42024; (HS BCENT) P42025; (HS ARP2) Q15142; (HS ARP3) P32391; (NC ARP3) P78712; (OC ACT) P29751; (SC CENT) P38696; (SC ARP2) P32381; (SC ARP3) P47117; (SC ARP4) P80428; (SC ARP5) P53946; (SC ARP6) Q12509; (SC ARP7) Q12406; (SC ARP10) Q04549; (SP CENT) Q94630.

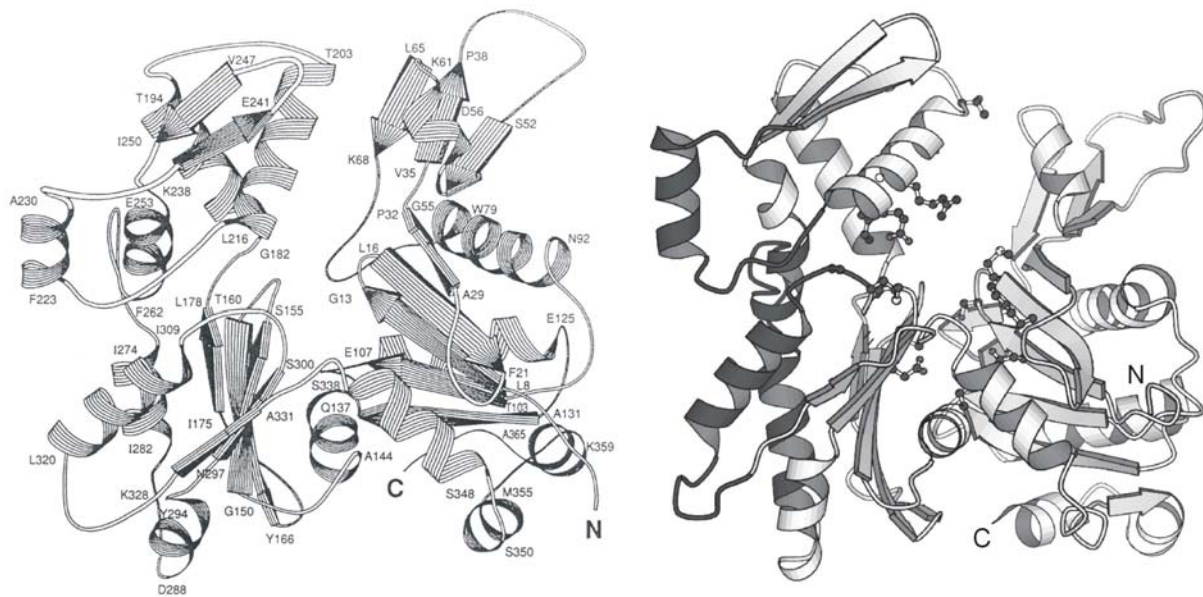


Abb. 30: Vermutliche Struktur der actinähnlichen Domäne von Filactin im Vergleich zur Struktur des Muskelactins.

Die mögliche Struktur der actinähnlichen Domäne des Filactins (rechts) wurde durch Einpassen der entsprechenden Aminosäuresequenz in die bekannte Struktur von Muskelactin (Kabsch *et al.*, 1990; links) erhalten. Die eingezeichneten Ketten im Strukturvorschlag des C-terminalen Abschnitts von Filactin kennzeichnen Aminosäuren, die zur Nukleotidbindung beitragen könnten. Die dunkel gezeichneten Helices weichen am stärksten von der Actinstruktur ab. Das Molekül kann wie Actin in vier Subdomänen eingeteilt werden: 1 rechts unten, 2 rechts oben, 3 links unten und 4 links oben.

4.3 Biochemische Charakterisierung von Filactin

4.3.1 Filactin ist wahrscheinlich ein Monomer

Aufgrund der actinähnlichen Domäne liegt die Vermutung nahe, daß Filactinmoleküle polymerisieren können. Um also zu klären, ob das endogene Filactin in der *D. discoideum* Zelle als Monomer, Dimer oder gar Polymer vorliegt, wurden AX2 Zellen wie in 2.4.10.1 beschrieben aufgeschlossen und der Filactin-enthaltende Überstand der 100.000 g-Zentrifugation mittels Gelfiltration analysiert.

Dabei war unterschiedlich vorgegangen worden: Zum einen wurden die Zellen in Homogenisationspuffer geöffnet und der spätere Überstand dann auf eine Gelfiltrationssäule geladen, die mit 50 mM Natriumhydrogenphosphat-Puffer (pH 7,6) äquilibriert worden war. Zum anderen wurde der komplette Versuch mit IEDANBP-Puffer (50 mM Imidazol und 200 mM NaCl; pH 7,6) durchgeführt.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten leider keine Übereinstimmung. Während der erste Ansatz auf ein Dimer deutet - die berechnete Molekülmasse lag bei 230 kDa -, spricht der zweite Ansatz für ein Monomer (berechnete Molekülmasse: 82 kDa). Da im IEDANBP-Puffer ein Salzgehalt von 0,2 M NaCl vorliegt und dies eher physiologischen Bedingungen entspricht, wird zu diesem Zeitpunkt von einem Filactin-Monomer ausgegangen. Für eine Bestätigung dieser Aussage sind aber weitere Untersuchungen nötig.

4.3.2 Immunopräzipitation der actinverwandten Domäne von Filactin

Vorab wurden Immunopräzipitationen in kleinerem Maßstab durchgeführt, in denen axenisch gewachsene GFP-Filactin-C Zellen zunächst wie in Abschnitt 2.4.11.2 beschrieben aufgeschlossen wurden. Anteile des nach Zentrifugation des Zelllysats erhaltenen Überstands wurden dann mit Protein A-Sepharose und den folgenden Immunglobulinen (IgG) inkubiert: (1) mit Antikörper (Ak) 1S-192-2, welcher gegen den C-terminalen Abschnitt, also die actinverwandte Domäne von Filactin gerichtet ist, (2) mit Ak 3S-55-4, der nur den aminoterminalen Teil des Proteins erkennt und somit als Negativ-Kontrolle dient, und (3) mit Ak K3-184-2, der an den GFP-Anteil bindet. Die am Ende eluierten IgG-Protein-Produkte wurden in einem Immunoblot analysiert. Wie in Abb. 31 deutlich zu sehen ist, wurde der Komplex aus GFP-Filactin-C und IgG nur in den Fällen (1) und (3) erhalten. Von Ak 3S-55-4 wurde das GFP-Konstrukt der Actin-Domäne folgerichtig nicht erkannt.

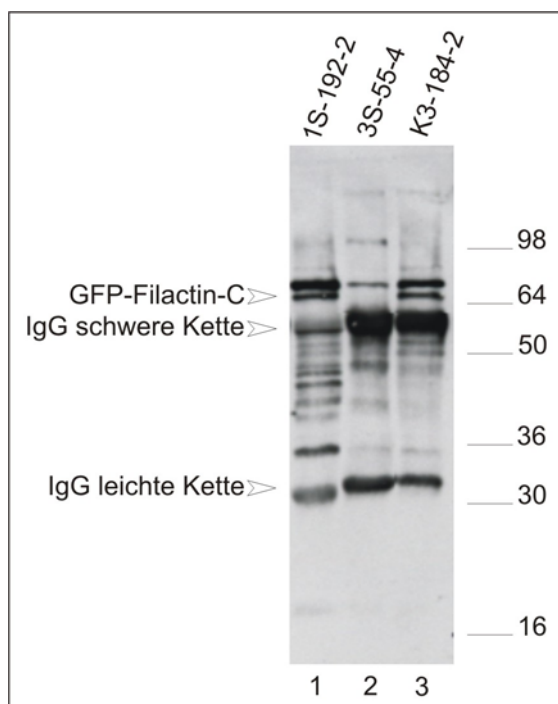


Abb. 31: Immunopräzipitation aus GFP-Filactin-C Zellen und verschiedenen Antikörpern.

Die Immunopräzipitation wurde wie unter 2.4.11.2 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden axenisch gewachsene GFP-Filactin-C Zellen sowie die folgenden IgG Antikörper (mit Angabe der Epitope) verwendet: Ak 1S-192-2 (Filactin C-terminale Domäne), Ak 3S-55-4 (Filactin N-terminale Domäne) und Ak K3-184-2 (GFP). Die entscheidenden Signale sind gekennzeichnet. Auf der rechten Seite sind die Molekülmassen des See Blue-Markers in kDa gezeigt.

Um größere Mengen der actinverwandten Domäne des Filactins für Funktionsuntersuchungen zu erhalten, wurden als nächstes präparative Immunopräzipitationen mit GFP-Filactin-C Zellen und 1S-192-2 Antikörpern vorgenommen. Auf der einen Seite wurden die Protein-IgG-Komplexe wie unter 2.4.11.3 (b) erläutert mit Hilfe einer Protein A-Sepharose-IgG-Säule erhalten und nach Elution mit $MgCl_2$ -Lösung die Produktfraktionen mittels Centrikon ankonzentriert (Ansatz 1). Wie in Abb. 32 zu sehen ist, wurde dabei ein relativ sauberes Produkt erhalten (siehe Markierung). Negativ ist allerdings, daß nach Ultrazentrifugation des Zellysats etwa die Hälfte des GFP-Filactin-C im Sediment (Spur 1) blieb und so verloren ging. Die weiteren Pfeilmarkierungen verweisen auf die Signale der schweren und leichten Kette des Immunglobulins.

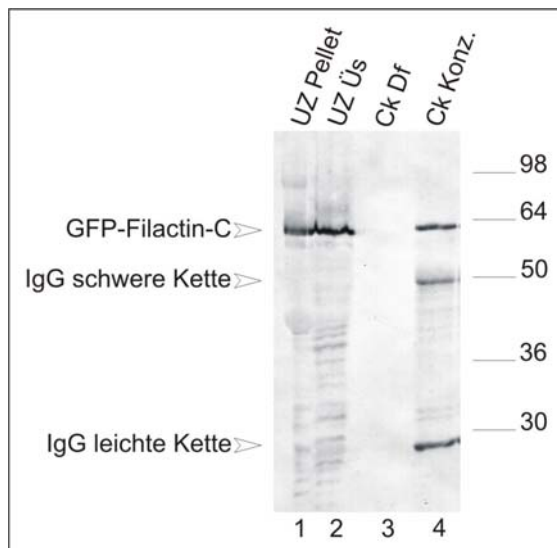


Abb. 32: Präparative Immunopräzipitationen von GFP-Filactin-C Zellen und 1S-192-2 Antikörpern (Ansatz 1).

Die Durchführung der Immunopräzipitation erfolgte wie in Abschnitt 2.4.11.3 beschrieben. Es wurden GFP-Filactin-C Zellen sowie der gegen die actinähnliche Domäne des Filactins gerichtete IgG 1S-192-2 Antikörper verwendet. Das erhaltene Centrikon-Konzentrat (Spur 4) enthält das IgG-GFP-Filactin-C-Produkt. Der Vergleich von Sediment (Spur 1) und Überstand (Spur 2) der Ultrazentrifugation macht den Verlust von etwa 50% GFP-Filactin-C (siehe Markierung) im Anschluß an diesen Schritt deutlich. Am rechten Rand sind die Molekülmassen des See Blue-Markers in kDa gezeigt.

In einem anderen *in vitro*-Ansatz wurde wie in Abschnitt 2.4.11.3 (a) beschrieben verfahren (Ansatz 2). Die IgG-Protein-Komplexe wurden hier mit Essigsäure von der Protein A-Sepharose gelöst. Selbst zwei Elutionschritte führten dabei jedoch lediglich zur Loslösung von etwa 30% der Komplexe, während die übrigen 70% an die Sepharose gebunden blieben. Die gesammelten Überstände wurden anschließend mittels Centrikon ankonzentriert.

Im folgenden wurden die in den beiden Ansätzen gewonnenen IgG-GFP-Filactin-C-Proteine gegen PBS (Ansatz 1) bzw. TEDABP pH 8,0 (Ansatz 2) dialysiert und für Funktionsuntersuchungen verwendet (siehe Abschnitt 4.5.1).

4.3.3 Lokalisationsstudien

Um endogenes Filactin unter verschiedenen Bedingungen zu lokalisieren, wurden die folgenden *in vitro* Experimente vorgenommen:

4.3.3.1 Verteilung von Filactin unter Hochsalz-, depolymerisierenden und polymerisierenden Bedingungen nach Triton-Behandlung der Zellen

$1,5 \cdot 10^9$ axenisch gewachsene AX2 Zellen wurden zunächst geerntet (1200 UpM, 5 min, 4°C, JA-14 Rotor). Das erhaltene Zellsediment wurde nach zweimaligem Waschen mit kaltem Soerensen-Puffer gewogen und 1:4 (^w/_v) in Triton-Puffer (TEDABP pH 8,0 + 2% Triton X-100 + 2 mM MgCl₂ + ¹/₂₅ 25 × Roche Proteasen Inhibitor Stammlösung) resuspendiert. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis wurden von der Suspension drei Aliquots (2 × 1,5 ml und 1 × 3,0 ml) genommen und diese dann jeweils einer Zentrifugation bei 10.000 g unterzogen (10 min, 4°C, JA-20 Rotor). Die dabei erhaltenen Überstände und Sedimente wurden wie folgt behandelt:

- 1) (1,5 ml) Es wurden Aliquots für spätere SDS-PAGE und Immunoblot Analysen genommen.
- 2) (1,5 ml) Das Sediment wurde in 350 µl TEDABP pH 8,0 + 500 mM NaCl resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und danach zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4°C). Von Überstand und Sediment wurden dann Aliquots für spätere SDS-PAGE und Immunoblot Analysen genommen.
- 3) (3,0 ml) Das Sediment wurde in 3,2 ml G-Puffer vollständig suspendiert und mehrmals gegen G-Puffer dialysiert. Nach Ende der Dialyse wurde das Dialysat bei 10.000 g zentrifugiert (30 min, 4°C, JA-20 Rotor) und von Überstand und Sediment jeweils Aliquots genommen. Der restliche Überstand wurde mit ¹/₉ Vol 10 × Polymerisationspuffer (Ca²⁺) versetzt und über Nacht auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 100.000 g (60 min, 4°C, Ti 70 Rotor), in deren Anschluß wiederum Aliquots von Überstand und Sediment genommen wurden.

Alle Aliquots wurden dann mittels SDS-PAGE sowie anschließender Immunmarkierung und Coomassie Blau-Färbung analysiert. Abb. 33 zeigt das Ergebnis des Immunoblots. Da der hier verwendete Antikörper auch Actin sehr schön detektiert, sind direkte Vergleiche möglich. Im Anschluß an die erste Zentrifugation verhielten sich beide Moleküle ähnlich. Sowohl Filactin als auch Actin gingen zu etwa 60% ins Sediment, während die übrigen 40% im Überstand blieben.

Durch die Salzbehandlung (Einstellung auf 500 mM NaCl) wurden dann erwartungsgemäß beide Proteine fast vollständig aus diesem Sediment herausgelöst. Unter depolymerisierenden Bedingungen (G-Puffer) verhielt sich Filactin dann jedoch abweichend: während Actin in seiner monomeren Form nach der Zentrifugation komplett im Überstand zu finden war, waren hier gut 30% im Sediment. Nach Einstellung des Überstands auf polymerisierende Umstände (Polymerisationspuffer) und anschließender Zentrifugation bei 100.000 g ging das filamentöse Actin dann ebenfalls ins Sediment. Filactin war auch hier wieder auf Sediment und Überstand verteilt (~ 50:50).

Daß ein Großteil der Moleküle trotz Depolymerisation ins Sediment geht, könnte damit erklärt werden, daß Filactin *in vivo* an Aggregate bindet (Michael Schleicher, mündliche Mitteilung). Unter polymerisierenden Bedingungen könnten Filactinmoleküle auch in Actinfilamente eingeschlossen sein. Da hier etwa die Hälfte des zuvor nicht aggregatgebundenen Filactins pelletiert, ist eine schwache Polymerisationsfähigkeit ebenfalls nicht auszuschließen.

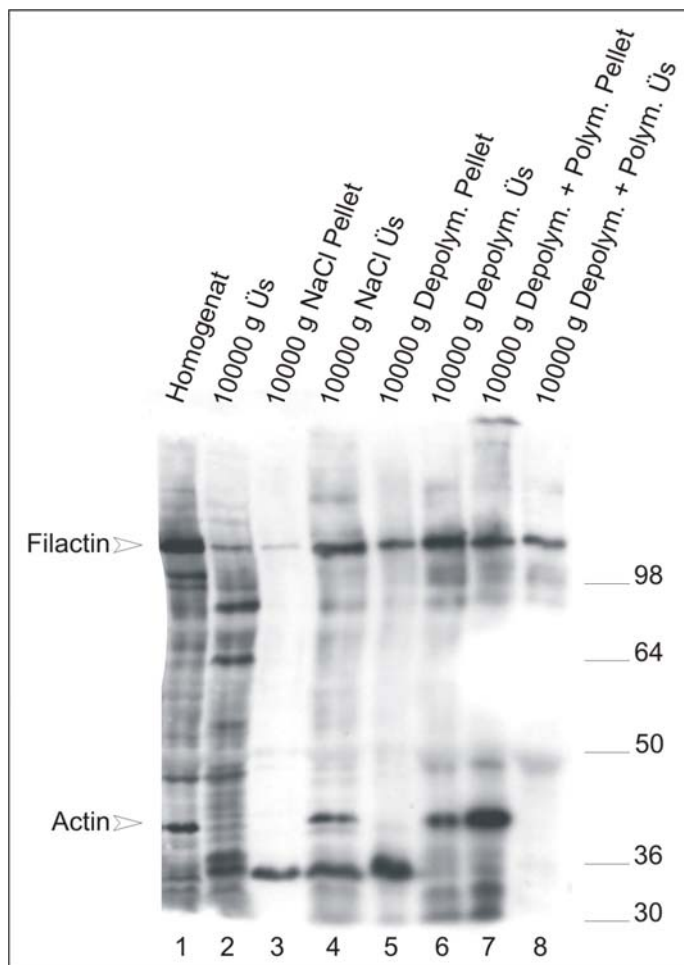


Abb. 33: Verteilung von Filactin unter Hochsals-, depolymerisierenden und polymerisierenden Bedingungen nach Triton-Behandlung.

Für die nach SDS-PAGE durchgeführte Immunmarkierung wurde der polyklonale Antikörper pAk Fusion 3S + 4S verwendet. Dieser ist zwar gegen das endogene Filactin gerichtet, detektiert aber auch sehr gut Actin (siehe Markierungen). Spur 1 zeigt das Zellhomogenat nach Aufschluß in Triton-Puffer. Filactin und Actin sind die prominentesten Banden. Im Anschluß an die 10.000 g-Zentrifugation ist Filactin recht gleichmäßig auf den Überstand (Spur 2) und das Sediment, welches weitere Verwendung findet, verteilt. Aus letzterem wird Filactin dann fast vollständig durch Salzbehandlung herausgelöst (vgl. 10.000 g NaCl Pellet und Üs in Spur 3 bzw. 4). Damit verhält es sich wie Actin. Unter depolymerisierenden (Spuren 5+6) bzw. polymerisierenden Bedingungen (Spuren 7+8) zeigt Filactin in beiden Fällen eine Gleichverteilung, während Actin im Überstand bleibt (Spur 6) bzw. sedimentiert wird (Spur 7).

4.3.3.2 Verteilung von Filactin nach Einfrieren/Auftauen der Zellen und differentieller Zentrifugation

Bei diesem Experiment wurden AX2 Zellen in unterschiedlichen Puffersystemen jeweils zwei ansteigenden Zentrifugationsschritten (10.000, 100.000 g) unterzogen. Dazu wurden zunächst eingefrorene Zellsedimente von $5 \cdot 10^7$ Zellen im jeweiligen Puffer aufgetaut und anschließend 15 min bei 10.000 g zentrifugiert (4°C, Eppendorf-Tischzentrifuge). Vom Überstand wurde danach ein Aliquot genommen und die restliche Menge in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g zentrifugiert (30 min, 4°C, TLA 100.3 Rotor). Im Anschluß an diesen Schritt wurden Aliquots von Überstand und Pellet für spätere SDS-PAGE und Immunoblot Analysen aufbewahrt. Die Sedimente mußten dabei durch Ultraschallbehandlung gelöst werden. Abb. 34 zeigt die Ergebnisse eines Ansatzes mit vier verschiedenen Puffern:

- 1) TEDABP pH 8,0 + 4 × Sigma Proteasen Inhibitor
- 2) TEDABP pH 8,0 + 4 × Sigma Proteasen Inhibitor + 1 M NaCl
- 3) Polymerisationspuffer (Ca^{2+}) + 4 × Proteasen Inhibitor Cocktail
- 4) Polymerisationspuffer (Ca^{2+}) + 4 × Proteasen Inhibitor Cocktail + 1% Triton X-100

Bei 10.000 g blieben sowohl Filactin als auch Actin, welches durch den verwendeten Antikörper ebenfalls detektiert wurde, in allen vier Ansätzen vorwiegend im Überstand (Informationen zum jeweiligen 10.000 g-Pellet wurden aus weiteren Blots erhalten, die hier aber nicht abgebildet sind.). Die Sedimentation von aggregatgebundenem Filactin, die in Abschnitt 4.3.3.1 diskutiert wurde, fand hier demnach nur bedingt statt. Vielmehr zeigt der Schritt eine absolute Übereinstimmung zwischen Filactin und Actin. Nach Zentrifugation bei 100.000 g unterschied sich das Verhalten dann allerdings drastisch. Während sich beide Moleküle nach Puffereinstellung auf 1 M NaCl noch übereinstimmend im Überstand befanden, wurde Filactin im Gegensatz zu Actin in den anderen Ansätzen stets pelletiert. Dieser Umstand deutet wiederum auf die Bindung von Filactin an Vesikel oder Aggregate hin. Warum allerdings Actin selbst unter polymerisierenden Bedingungen nicht ins Sediment ging, ist bisher ungeklärt. Dieser Befund wurde zwar auch in der Wiederholungen des Versuchs bestätigt, widerspricht aber dem Resultat aus Abschnitt 4.3.3.1, wo das polymerisierte Actin in der 100.000 g-Zentrifugation komplett sedimentiert wurde.

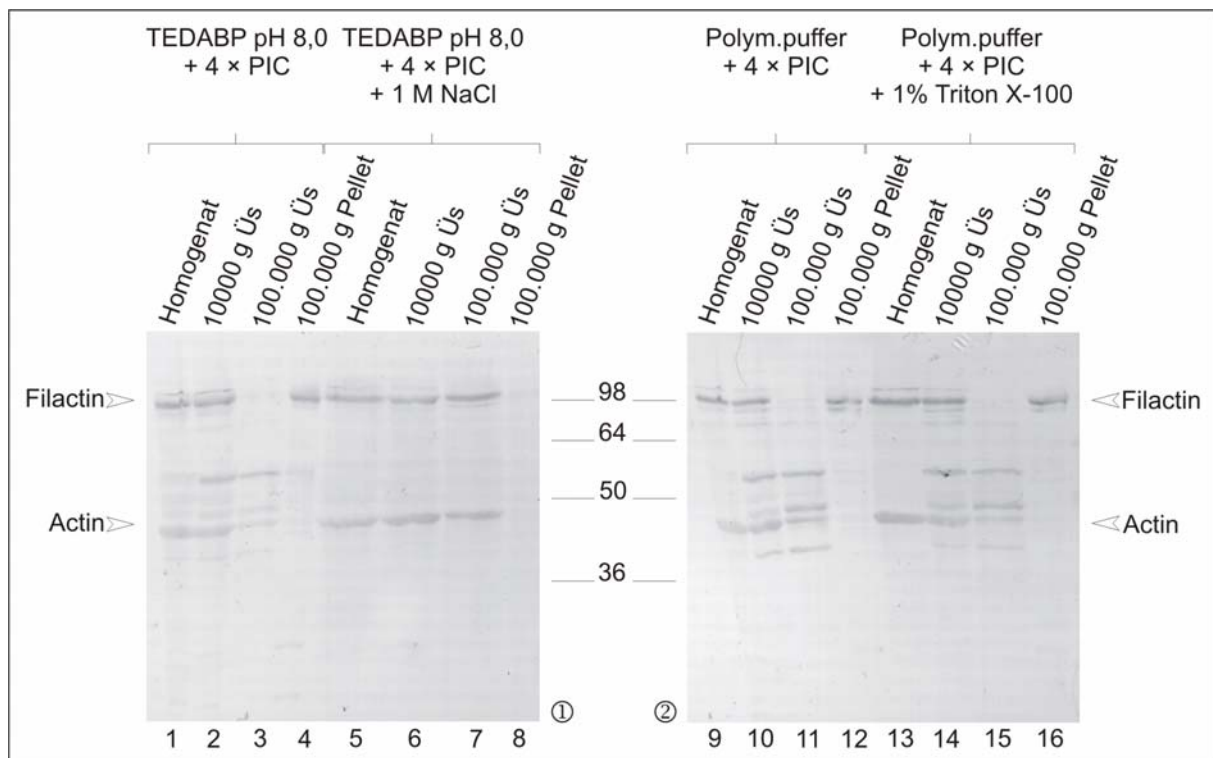


Abb. 34: Verteilung von Filactin nach Einfrieren/Auftauen der Zellen und differentieller Zentrifugation.

Die Immunmarkierung wurde mit dem monoklonalen Antikörper mAk 4S-59-4 durchgeführt. Dieser erkennt neben der Filactin N-Domäne auch Actin (siehe Markierungen). Damit ist ein direkter Vergleich möglich. In allen vier Fällen wurden jeweils das Zellhomogenat nach Auftauen und Aufschluß im jeweiligen Puffer, der 10.000 g Überstand, sowie Überstand und Pellet der 100.000 g-Zentrifugation untersucht. Dabei wird Filactin - schließt man die NaCl-Behandlung aus - bei 100.000 g immer sedimentiert (Blot ①, Spur 4 und Blot ②, Spuren 12+16). Nur nach Zugabe von NaCl bleibt es im Überstand (Blot ①, Spur 7). Auffallend ist bei diesem Zentrifugationsschritt, daß Actin selbst unter polymerisierenden Bedingungen nicht ins Pellet geht (Blot ①, Spuren 4+8 und Blot ②, Spuren 12+16). Bei 10.000 g bleibt Filactin dagegen immer vorwiegend im Überstand (Blot ①, Spur 2+6 und Blot ②, Spuren 10+14) und stimmt darin in allen vier Fällen mit Actin überein.

4.4 Verteilung von Filactin nach cAMP-Stimulus:

Triton X-100-unlösliches Sediment

Durch die chemotaktische Stimulation von *D. discoideum* Zellen mit cAMP kommt es zu einer raschen Veränderung des Gehalts des im Triton-unlöslichen Cytoskelett gebundenen Actins (McRobbie und Newell, 1983; Dharmawardhane *et al.*, 1989). Charakteristisch für in Suspension befindliche, aggregationskompetente Zellen sind zwei F-Actin Maxima. Das erste Maximum taucht etwa 3-5 s nach der Stimulation auf; etwa 30-40 s nach Zugabe des cAMPs kommt es zu einem zweiten F-Actin Peak, welcher cotemporal mit der Pseudopodienbildung von Amöben im Zuge der Stimulation durch Chemoattraktoren verläuft (Dharmawardhane *et al.*, 1989). Da die GFP-gebundene actinverwandte Domäne des Filactins in Immunfluoreszenzen scheinbar mit Actin kolokalisierte, sollte überprüft werden, ob das Gesamtprotein mit dem Triton-unlöslichen Actin-Cytoskelett assoziiert.

Die Zellen in den Suspensionen (siehe Abschnitt 2.5.2) wurden zunächst mit cAMP stimuliert. Nach bestimmten Zeiten wurden die Reaktionen dann durch Einstellung auf 1% Triton gestoppt und die Zellen lysiert. Polymere Bestandteile des Cytoskeletts wie F-Aktin und assoziierte Proteine werden dabei von dem Detergens nicht dissoziiert und können daher als „Triton-unlösliches Cytoskelett“ sedimentiert werden.

Im ersten Ansatz wurde von AX2 Zellen ausgegangen. Abb. 35 veranschaulicht die Zu- und Abnahme von Actin und endogenem Filactin im Triton-unlöslichen Cytoskelett durch cAMP-Stimulation der Zellen nach 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 20, 40 und 60 s. Die beiden Maxima, die dabei nach 5 und 40 s für das Actin erhalten wurden, stimmen sehr gut mit den Daten aus der Literatur (McRobbie und Newell, 1983; Dharmawardhane *et al.*, 1989) überein. Die Werte für das endogene Filactin stützen die These der Kolokalisation mit Actin, welche in den Immunfluoreszenzen beobachtet wurde. Die Peaks liegen hier ebenfalls bei 5 und 40 s. Auch sonst gehen die Veränderungen im Gehalt der beiden Proteine nahezu einher.

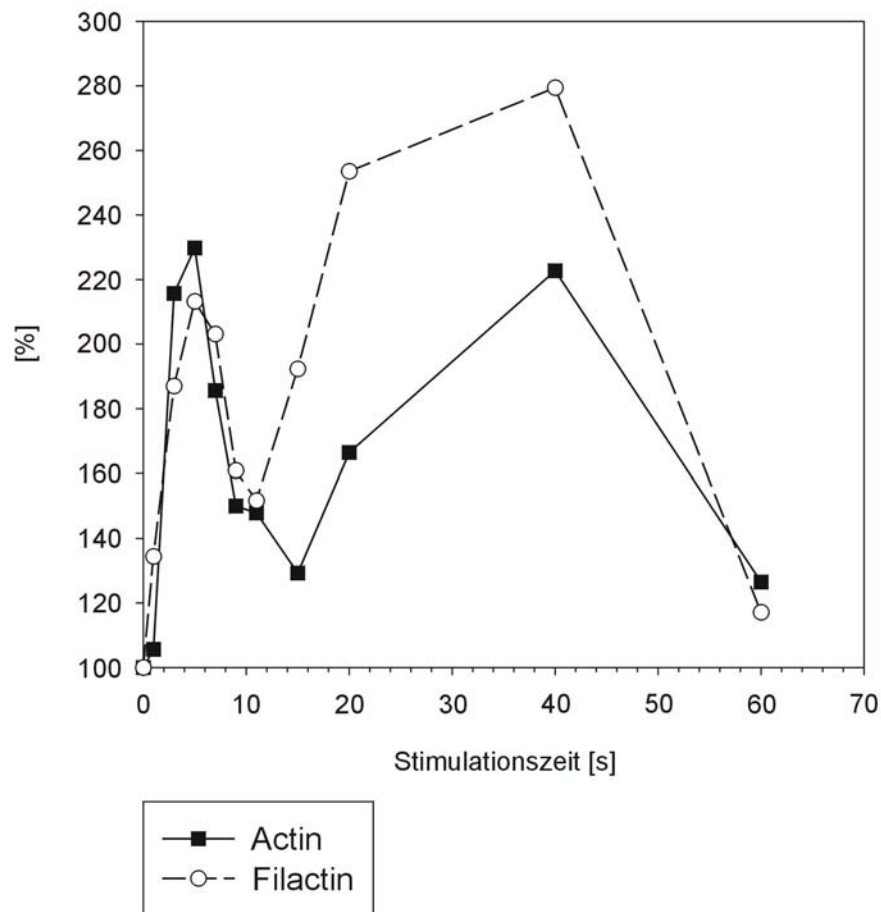


Abb. 35: Actin und Filactin im Triton-unlöslichen Cytoskelett nach cAMP-Stimulation von AX2 Zellen.

Vergleich der Actin- und Filactin-Konzentrationen im Triton-unlöslichen Cytoskelett: Die entsprechenden Signale auf dem Coomassie Blau-Gel (Actin) bzw. Immunoblot (Filactin) wurden mit dem Programm NIH Image 1.62 ausgewertet. Die prozentualen Veränderungen in den einzelnen Proben im Vergleich zur Kontrolle, welche 0 s und 100% entspricht, wurden anschließend jeweils gegen die entsprechenden Stimulierungszeiten aufgetragen.

Im zweiten Ansatz wurden GFP-Filactin Zellen verwendet, in denen das GFP-gebundene Filactin überexprimiert wird. Die Zellen wurden in diesem Fall für 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 20, 30, 40 und 60 s stimuliert, und die Zu- und Abnahme von Actin und GFP-Filactin im Triton-unlöslichen Cytoskelett wurde untersucht. Wie in Abb. 36 zu sehen ist, kam es dabei zu drei einheitlichen Maxima, nämlich jeweils bei 3, 7-9 und 40 s. Die zwei ersten Zunahmen stellen evtl. einen Doppelpeak dar. Damit wären die erhaltenen Ergebnisse sowohl in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten (McRobbie und Newell, 1983; Dharmawardhane *et al.*, 1989) als auch mit den Werten aus dem ersten Ansatz mit AX2 Zellen.

Wiederum schaut es so aus, als käme es im Zuge der Stimulation mit cAMP zu einer Kolokalisation von Actin und dem in diesem Fall GFP-gebundenen Filactinmolekül.

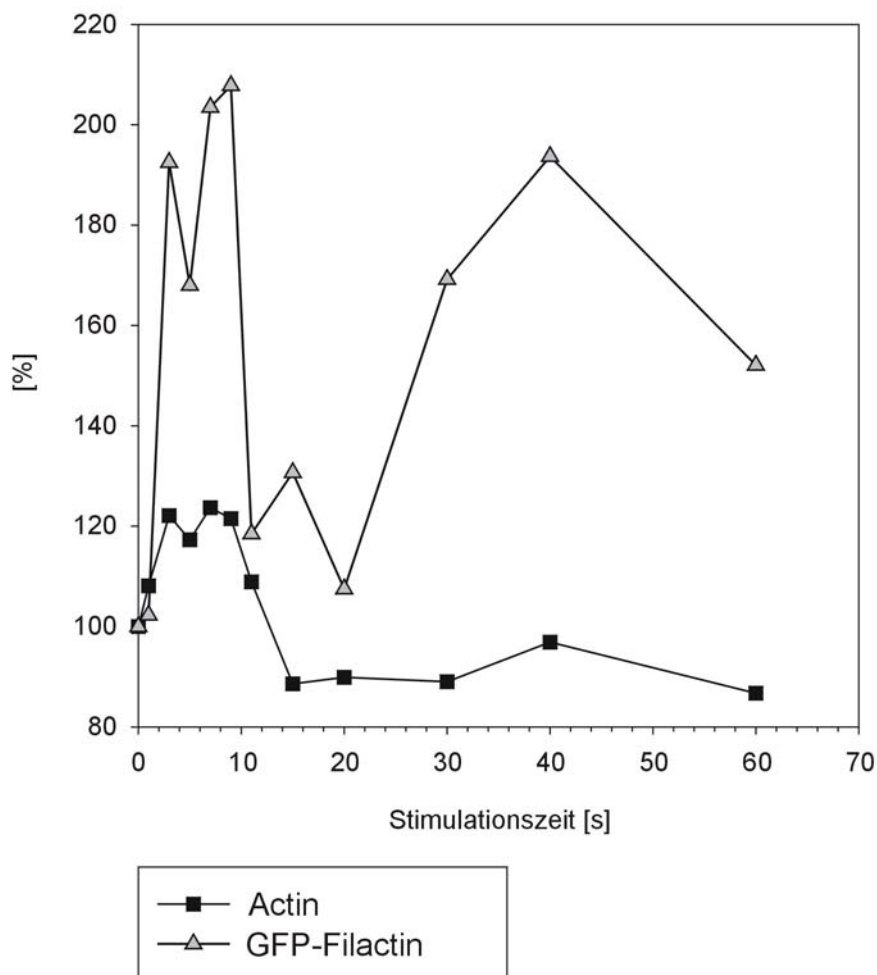


Abb. 36: Actin und GFP-Filactin im Triton-unlöslichen Cytoskelett nach cAMP-Stimulation von GFP-Filactin Zellen.

Vergleich der Konzentrationen von Actin und GFP-Filactin im Triton-unlöslichen Cytoskelett: Die prozentualen Veränderungen in den einzelnen Proben im Vergleich zur Kontrolle, welche 0 s und 100% entspricht, wurden jeweils gegen die entsprechenden Stimulierungszeiten aufgetragen.

4.5 Untersuchungen zur Funktion von Filactin

4.5.1 Einfluß von Filactin auf die Polymerisation von Actin

4.5.1.1 Polymerisation von Pyren-markiertem Actin in Gegenwart von IgG-GFP-Filactin-C

Wie in Abschnitt 2.4.8.2 ausführlich beschrieben, kommt es bei der Polymerisation von Pyren-markiertem Actin zu einer drastischen Fluoreszenzverstärkung. Um zu überprüfen, ob Filactin bzw. seine Actin-Domäne das Polymerisationsverhalten von Actin beeinflusst, wurde G-Actin in Gegenwart von GFP-Filactin-C-IgG-Proteinen (aus Ansatz 1 in Abschnitt 4.3.2; in PBS-Puffer pH 7,0) polymerisiert (bei pH 7,2). G-Actin alleine polymerisierte dabei wie gewohnt in einer bestimmten Zeit zum Gleichgewicht zwischen G- und F-Actin. Durch Zugabe von 50 µl der Immunopräzipitate (Endvolumen: 800 µl) wurde die Actin-Polymerisation drastisch reduziert. In einer Wiederholung des Versuchs mit IgG-GFP-Filactin-C aus Ansatz 2 in Abschnitt 4.3.2 (in TEDABP-Puffer, pH 8,0) konnte dieses Ergebnis leider nicht bestätigt werden. Da zum damaligen Zeitpunkt kein weiteres Proteinmaterial zur Verfügung stand, um die Ansätze zu vertiefen, bleibt die Frage nach dem Einfluß von Filactin auf die Actinpolymerisation an dieser Stelle unbeantwortet.

4.5.1.2 Messung der Viskosität von polymerisiertem Actin in Gegenwart von IgG-GFP-Filactin-C

Der Einfluß von IgG-GFP-Filactin-C (aus Ansatz 2 in Abschnitt 4.3.2; in TEDABP-Puffer pH 8,0) auf die Polymerisation von Actin wurde auch über die Messung der Viskosität mit Hilfe der Kugelfallmethode (MacLean-Fletcher und Pollard, 1980) untersucht. Dabei wurde keine Beeinträchtigung der Actinpolymerisation bzw. der Viskosität des nach 20 min untersuchten Actin-Netzwerkes ersichtlich. So benötigte die Kugel vergleichbare Zeiten für ihren Weg durch reine Actinlösungen und Actinlösungen, denen 5, 10, 20 bzw. 40 µl des IgG-Produkts beigemischt worden waren. Bei Betrachtung dieses Ergebnisses und des Teilergebnisses aus Abschnitt 4.5.1.1 ist zumindest ein negative Beeinflussung der Actinpolymerisation durch Filactin eher unwahrscheinlich.

4.5.2 Tyrosin-Phosphorylierung nach osmotischem Schock

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob Filactin wie auch Actin an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Schweiger *et al.*, 1992; Howard *et al.*, 1993). In *D. discoideum* Zellen geht die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Zuge von Stress u.a. mit der Umgestaltung der Actinfilamente einher (Howard *et al.*, 1993; Jungbluth *et al.*, 1995). Da in Immunfluoreszenzen sich bewegender und phagozytischer Zellen eine Kollokalisierung von Actin und der GFP-gebundenen Actindomäne von Filactin beobachtet worden war, konnte ein Gleichverhalten in diesem Punkt nicht von vornherein ausgeschlossen werden. Dementsprechend wurden AX2, GFP-Filactin und GFP-Filactin-C Zellen wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben einem osmotischen Schock unterzogen und auf die Möglichkeit einer Tyrosin-Phosphorylierung hin untersucht. Dabei ergab die dreimalige Durchführung dieses Versuchs immer das gleiche Resultat: weder das endogene noch das komplette GFP-gebundene Filactin noch die actinähnliche Domäne mit GFP waren Gegenstand einer Tyrosin-Phosphorylierung. Die Phosphorylierung des Actins konnte dagegen in allen drei Fällen nachgewiesen werden (Abb. 37). Dieser Umstand könnte bedeuten, daß Filactin im Gegensatz zu Actin nicht Teil der Signalkaskaden ist, mit der *D. discoideum* auf Osmostreß antwortet.

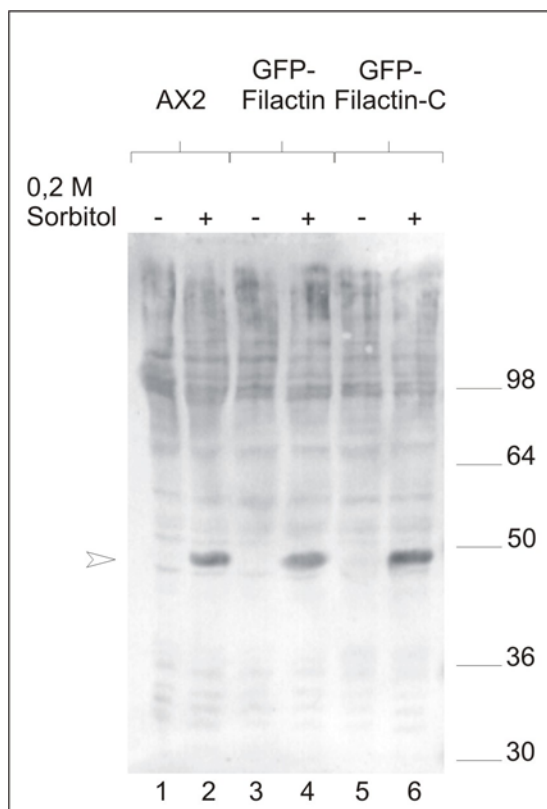


Abb. 37: Tyrosin-Phosphorylierung nach osmotischem Schock von AX2, GFP-Filactin und GFP-Filactin-C Zellen.

AX2, GFP-Filactin und GFP-Filactin-C Zellen ($c = 1 \cdot 10^7$ Zellen/ml) wurden nach 3,5 bis vierstündigem Hungern in Soerensen-Puffer durch Zugabe von Sorbitol (0,2 M Endkonzentration) osmotisch stimuliert. Aliquots ($5 \cdot 10^6$ Zellen), die vor und 25 min nach der Stimulation entnommen worden waren, wurden dann in einem Western Blot untersucht. Die Immunmarkierung wurde dabei mit einem anti-Phosphotyrosin Antikörper durchgeführt. Der vorliegende Blot zeigt in allen drei Zelltypen einen deutlichen Beweis für die Tyrosin-Phosphorylierung des Actins als Antwort auf die Stimulierung (siehe Markierung in den Spuren 2, 4 und 6). Weder das endogene Filactin (~ 105 kDa) noch das GFP-Konstrukt des ganzen Filactins (~ 131 kDa) oder das der actinverwandten Domäne (~ 67 kDa) wurden detektiert.

5 DISKUSSION

5.1 Struktur und Funktion des CAP-Homologs (Cyclase-assoziiertes Protein) in *D. discoideum*

5.1.1 Einfluß der Verprolin-homologen Domäne auf die actinbindende Funktion des *D. discoideum* CAP-C

Seit der Isolierung des Cyclase-assoziierten Proteins (CAP) in *S. cerevisiae* (Field *et al.*, 1990; Fedor-Chaikin *et al.*, 1990) konnten homologe Proteine in 14 weiteren Eukaryonten identifiziert werden. Nach heutigem Kenntnisstand sind CAP Proteine multifunktionell und erfüllen eine Reihe wichtiger Aufgaben, die sich nicht nur auf signalabhängige Veränderungen des Actin-Cytoskeletts beziehen, sondern auch auf den Vesikeltransport und die Entwicklung (Übersicht in Hubberstey und Mottillo, 2002). Die von Gerst *et al.* (1991) vorgeschlagene Einteilung in nur drei funktionelle Domänen ist daher nicht mehr ausreichend. Die direkte Bindung an die Adenylat-Cyclase über die N-terminale Region, Interaktionen mit den SH3 Domänen anderer Proteine über die Polyprolin-Region sowie Oligomerisation des Proteins über bisher nicht bekannte Motive wurden in einigen Fällen bereits nachgewiesen oder stehen zumindest in Frage.

Eine Eigenschaft, die CAPs aus allen Organismen wahrscheinlich gemein haben, ist die Bindung von monomerem Actin über die carboxyterminale Domäne. Dafür spricht zum einen, daß Phänotypen, die sich aus der Deletion des Gesamtproteins in einer Spezies ergeben haben, durch die Expression dieser Domäne aus einer anderen Spezies komplementiert werden konnten (Yu *et al.*, 1994; Vojtek und Cooper, 1993; Zelicof *et al.*, 1993; Matviw *et al.*, 1992). Zum anderen lassen auch die Konservierung dieses Proteinbereichs in allen CAPs und der hohe Konservierungsgrad der Actinstruktur und -funktion darauf schließen. Damit stünde CAP auf einer Stufe mit G-actinbindenden Proteinen wie Profilin (Übersicht in Sohn und Goldschmidt-Clermont, 1994), β -Thymosinen (Übersicht in Carlier und Pantaloni, 1994) und den Wiskott-Aldrich Syndrom Proteinen (WASP, Übersicht in Zigmond, 2000), die alle den Zellen ausreichende Mengen an nicht polymerisiertem Actin zur Verfügung stellen. Die für die Bindung verantwortlichen spezifischen Reste wurden bisher nicht bestimmt. Von den vier hochkonservierten Regionen im C-terminalen Abschnitt, die sich bei einem Sequenzvergleich aller CAP Proteine andeuten, wurde in dieser Arbeit der Verprolin-homologe Bereich untersucht.

Vaduva *et al.* (1997) beschrieben Verprolin als actinbindendes Protein in Hefe. Von den 70 aminoterminalen Resten des Proteins lokalisierten sie die Actinbindungsdomäne auf das Hexapeptid LKKAET. Entsprechende Motive wurden auch in anderen actinbindenden Proteinen gefunden, z.B. in den WASP Proteinen (Miki *et al.*, 1996). Das *D. discoideum* CAP besitzt hier eine 50%ige Identität und zeigt damit eine größere Übereinstimmung mit Verprolin als das humane WASP.

Im neu klonierten Proteinkonstrukt CAPC835-1392 fehlen die 24 aminoterminalen Reste der carboxyterminalen Domäne und damit sowohl die nach Baum *et al.* (2000) ausgewiesene Verprolin-Homologie als auch das genannte Hexapeptid. Während die Zugabe der kompletten carboxyterminalen Domäne des *D. discoideum* CAPs in Polymerisationsversuchen mit pyrenmarkiertem G-Actin bei einer 1:2- bzw. 1:10-Stöchiometrie (Domäne zu G-Actin) zur vollständigen bzw. 50%igen Unterdrückung der Actinpolymerisation führte (Gottwald *et al.*, 1996), wurden für das verkürzte Konstrukt mit 1,3:1 bzw. 1:1,5 (40%ige Senkung) deutlich größere Verhältnisse erhalten. Das Depolymerisierungsexperiment lieferte ein entsprechendes Ergebnis. Die Effizienz, mit der G-Actin der Polymerisation entzogen wurde, sank also deutlich. Der für die vollständige Inhibierung erhaltene Wert liegt sogar unter dem für das Gesamtprotein, obwohl dieses in *D. discoideum* und *S. cerevisiae* dem Gleichgewicht jeweils weniger wirksam als die C-Domäne Actin entzog (Gottwald *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1995a). Der Verprolin-homologen Domäne kann damit ein gewisser Einfluß nicht abgesprochen werden. Allerdings ist sie nicht essentiell für die Actinbindung, die hier nach wie vor stattgefunden hat und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von U. Gottwald (1995) unabhängig von Ca^{2+} verlief. Denkbar sind daher auch zwei Bindungsstellen im carboxyterminalen Proteinabschnitt, die G-Actin möglicherweise unterschiedlich stark sequestrieren.

In CAPs aus *S. cerevisiae* und Mensch, in denen jeweils die 27 carboxyterminalen Aminosäuren deletiert worden waren, war der Effekt dagegen vollständig. Actin wurde hier überhaupt nicht mehr gebunden (Zelicof *et al.*, 1996). Ob die in diesem Bereich enthaltene Aminosäurenfolge E(X)₃PEQ, von der die Reste E, P, E und Q in allen CAPs (außer den beiden pflanzlichen – Austausch des 2. E gegen Q) zu finden sind, einen kritischen Faktor für die Actinbindung darstellt, ist noch unklar. Um den Effekt in *D. discoideum* untersuchen zu können, wurde die Deletion auch hier vorgenommen und das CAP Konstrukt CAPC763-1311 (≡ C-Domäne ohne die 27 carboxyterminalen Reste) hergestellt. Leider wurde das Protein in den durchgeführten Ansätzen nur unzureichend exprimiert und bleibt damit Gegenstand zukünftiger Studien.

5.1.2 Bildung stabiler Komplexe mit G-Actin und Dimerisierung von *D. discoideum* CAPC835-1392

Die direkte Verknüpfung von CAP aus *D. discoideum* mit G-Actin wurde auch mit Hilfe chemischer Quervernetzung verifiziert. Dazu wurden die um die Verprolin-Homologie verkürzte C-Domäne und G-Actin in unabhängigen Ansätzen sowohl mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) umgesetzt, welches in Kombination mit N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS) räumlich nah benachbarte Amino- und Carboxylgruppen interagierender Moleküle quervernetzt, als auch mit Glutaraldehyd, bei dem es zur Quervernetzung von räumlich auch weiter voneinander entfernten Lysinresten kommt. In beiden Fällen wurden stabile Komplexe aus CAPC835-1392 und G-Actin mit einer Molekülmasse von etwa 62 kDa erhalten. Darüber hinaus tauchten in den Immunoblots Komplexe mit Größen von 40 und 82 kDa auf. Ersterer Komplex wurde auch in den parallel durchgeführten Ansätzen ohne G-Actin nachgewiesen. Es muß sich dabei also um ein Dimer von CAPC835-1392 handeln. Dementsprechend wird für den zweiten Komplex angenommen, daß er sich aus dem genannten Dimer und einem einzelnen G-Actinmolekül zusammensetzt. Dieser Komplex scheint jedoch nicht sehr stabil zu sein, da lediglich ein schwaches Signal nach 10minütiger Inkubation mit Glutaraldehyd erhalten wurde.

Die Resultate entsprechen damit den Befunden in anderen Organismen (*S. cerevisiae* und Säuger), in denen ebenfalls Dimere bzw. Oligomere von CAP beschrieben wurden (Zelicof *et al.*, 1996; Hubberstey *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999; Moriyama und Yahara, 2002). Die Polymerisierung stellt eine weitere Eigenschaft von CAP dar, die wie die Actinbindung in bezug auf ein schlüssiges Bindungsmotiv Fragen aufwirft. Da in Two-Hybrid-Screens mit humanen CAP-Dimeren einerseits Wechselwirkungen der N-Termini untereinander und mit den C-Termini und andererseits die analogen Interaktionen der C-Domänen beobachtet wurden (Hubberstey *et al.*, 1996), ist diese Funktion sehr komplex und ein einzelnes Bindungsmotiv erscheint nicht ausreichend. In den letzten Jahren tauchten zu diesem Thema unterschiedliche Meinungen auf. So lokalisierten Zelicof *et al.* (1996) im Hefe CAP die Funktionen Proteindimerisierung und Actinbindung auf die Aminosäuren 360-526. Während sie die carboxyterminalen Reste 499-526 für die Actinbindung verantwortlich machten (s.o), wurde ein entsprechender Bereich im *Drosophila* Homolog von Baum *et al.* (2000) als Dimerisierungsdomäne vorgeschlagen. Spezifische Bindungsmotive wurden jedoch in keinem Fall genannt. Nach den Aussagen von Yu *et al.* (1999) ist die Polymerisierungseigenschaft möglicherweise mit der Lokalisation des Proteins verknüpft.

Sie vermuten das Motiv in der aminoterminalen Domäne, in enger Nachbarschaft zur Bindungsstelle der Adenylat-Cyclase. Das in diesem Bereich entdeckte und über alle CAP-Proteine konservierte RLE/RLE-Motiv könnte für eine Protein-Protein-Interaktion verantwortlich sein. Faßt man zusammen, muß von zwei Dimerisierungsstellen ausgegangen werden. Durch die in dieser Arbeit beobachteten Dimere wurde der C-terminale Bereich als einer dieser Positionen im *D. discoideum* CAP bestätigt.

5.1.3 Strukturaufklärung des *D. discoideum* CAP-N mittels NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie

Die aminoterminal Domäne ist funktionell die wohl am wenigsten konservierte Region in den CAP-Homologen. In den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* konnte eine Bindung an die Adenylat-Cyclase und damit ein direkter Einfluß auf die Ras-vermittelte Signaltransduktion festgestellt werden (Gerst *et al.*, 1991; Kawamukai *et al.*, 1992). In *C. albicans* wurde zumindest eine entsprechende regulatorische Einwirkung nachgewiesen (Bahn und Sundstrom, 2001). Das Bindungsmotiv für die Cyclase wurde im *S. cerevisiae* CAP auf die 36 N-terminalen Reste beschränkt (Swiston *et al.*, 1995). Zwei unterschiedliche Mutationen in diesem Bereich (N12S/E28G und L13P/E28V) führten *in vitro* zu Defekten in der Ras-Bindung durch den Cyclase/CAP-Komplex (Shima *et al.*, 2000). Die Reste N12 und L13 sind in Säugern konserviert (d.h. N6, L7) und daher neben dem hochkonservierten RLE/RLE-Motiv vielleicht essentiell für die Anbindung von CAP an die Cyclase.

Sporulationsphänotypen von *S. pombe*, die sich aus dem Mangel der aminoterminalen Domäne von CAP ergaben, konnten durch die Expression von *S. cerevisiae* CAP nicht komplementiert werden (Kawamukai *et al.*, 1992). Ebenso verhielt es sich bei der Expression des humanen CAPs in den zwei Hefen, nachdem hier das RLE/RLE-Motiv deletiert worden war (Kawamukai *et al.*, 1992; Vojtek und Cooper, 1993; Zelicof *et al.*, 1993). Beides deutet auf eine funktionelle Divergenz, sowohl der gesamten Domäne als auch darin enthaltener hochkonservierter Motive, in höheren Eukaryonten im Laufe der Evolution hin. So müssen wahrscheinlich andere Signalproteine als Bindungspartner gefunden werden.

In *L. endodes* und *S. pombe* wurde beispielsweise die Interaktion zwischen der N-Domäne des CAP-Homologs und dem jeweiligen 14-3-3 Protein entdeckt (Zhou *et al.*, 2000). Eine Bindung des gesamten CAPs konnte nicht festgestellt werden, was vermuten läßt, daß die carboxyterminale Domäne einen negativen Einfluß auf diese konservierte Wechselwirkung hat.

14-3-3 Proteine waren die ersten Signalmoleküle, die als diskrete Phosphoserin-/threoninbindende Komponenten beschrieben wurden. Sie erfüllen wichtige Aufgaben im Rahmen zellulärer Signalwege, welche Teil des Zellzyklusses, entwicklungsbedingter, transkriptioneller Veränderungen und der Apoptose sind. 14-3-3-homologe Proteine übernehmen dabei unterschiedliche Aufgaben und binden an unterschiedliche Liganden (Yaffe, 2002). Sie könnten demnach auch eine Rolle in der Regulation der CAP-Funktion spielen.

Ein weiteres Beispiel stellt die Bindung des humanen CAP1 an den Cofilin-Actin-Komplex dar, die überraschenderweise nicht über den C-, sondern über den N-terminalen Bereich des CAP Proteins erfolgte (Moriyama und Yahara, 2002). Die aminoternale Domäne beschleunigte zudem die Depolymerisation am (-)-Ende des F-Actins. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion wurde durch die Anwesenheit von Cofilin und/oder der carboxyterminalen Domäne erhöht. Weiterhin ermöglichten CAP1 und sein C-terminaler Abschnitt die Filamentverlängerung am (+)-Ende und stimulierten außerdem den ADP/ATP-Austausch am G-Actin. Die Inhibierung dieses Nukleotidaustauschs durch Cofilin (Nishida, 1985; Blanchoin und Pollard, 1998) fand zwar in Gegenwart der C-Domäne von CAP1 unverändert statt, wurde aber durch den N-terminalen Bereich vermindert. Zusammengefaßt fällt hier CAP1 eine Schlüsselrolle zu. Durch die Kooperation mit Cofilin und die Wiederherstellung des ATP-G-Actins sowie durch seine Einwirkung auf beide Filamentenden beschleunigt es den sog. Treitmühleneffekt. Damit verhält es sich ähnlich wie Profilin, welches den Umschlag an den Filamenten auf gleiche Weise unterstützt (Didry *et al.*, 1998), dabei aber nicht mit dem Cofilin-Actin-Komplex assoziiert. Es ist wahrscheinlich, daß diese Interaktion von einem weiteren Bindungspartner reguliert wird, und vielleicht kommt hier sogar ein mit Ras2p/Cyr1p vergleichbarer Proteinkomplex in Frage.

Um die für die einzelnen Funktionen von CAP spezifischen Bindungsmotive aufdecken zu können, sind NMR-spektroskopische und röntgenbeugungsanalytische Daten absolut notwendig. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, die dreidimensionale Struktur des CAPs aus *D. discoideum* aufzuklären. Aus verfahrenstechnischen und zeitlichen Gründen wurde der Ansatz auf die N-terminale Domäne beschränkt. Die beiden Konstrukte, die dazu hergestellt wurden - CAP-N'Px und CAPN151-678 -, waren wie das Gesamtprotein wasserlöslich. Berechnungen, nach denen das Protein keine ausgedehnten hydrophoben Regionen besitzt, wurden damit verifiziert. Das CAP-N'Px Konstrukt besaß ein Molekulargewicht von 25400 und setzte sich aus dem kompletten N-terminalen Bereich, den elf daran anschließenden Resten der prolinreichen Domäne und einem His-,tag“ zusammen.

Die beste und reproduzierbare Expression des Proteins erfolgte mit Hilfe des pT7-7 Expressionsvektors in *E. coli* BL21 Bakterien. Zur Aufreinigung wurden eine DE52 (Whatman) Anionen- und eine Phosphocellulose (P11, Whatman) Kationenaustauschersäule sowie, wenn nötig, eine Ni-NTA-Agarosesäule verwendet. Es wurden unmarkierte (^1H), uniform ^{15}N -markierte, $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -doppelmarkierte und selektiv markierte (^{15}N -Ala, ^{15}N -Phe, ^{15}N -Gly, ^{15}N -Ile, ^{15}N -Lys, ^{15}N -Leu, ^{15}N -Val, ^{15}N -Gly/ ^{15}N -Ser) Proben hergestellt, von denen dann anschließend die benötigten NMR-Spektren aufgenommen wurden. Schon die ersten eindimensionalen Messungen deuteten auf eine Helix-Konformation im N-terminalen Bereich hin. Diese war in strukturellen Berechnungen bereits vorausgesagt worden. Ferner fiel eine Proteolyse des Proteins auf, die im Anschluß durch weitere Spektren näher untersucht wurde. So zeigten die ^1H -Signale der Aminosäuren, die sich in abgespaltenen Peptidbruchstücken befanden, nach Übereinanderlegen der 2D- ^{15}N -HSQC-Spektren aller ^{15}N selektiv angereicherten Proteinproben sowie eines HeteroNOE-Lys-Spektrums und des ^{15}N -HSQC-Spektrums der ^{15}N uniform markierten Probe, die als Referenz diente, keine Dispersion mehr. Mit Hilfe einer Massenspektrometrie und einer Edman-Sequenzierung einer gespaltenen Probe konnte dann das Peptid mit der Sequenz 51-232 als der stabile Kern des *D. discoideum* CAP-N bestimmt werden. Die meisten der in diesem Bereich befindlichen Aminosäuren konnten in den Spektren identifiziert und den entsprechenden Signalen zugeordnet werden.

Vor allem im Hinblick auf die bis hierhin mißglückten Kristallisationsansätze wurde das verkürzte Konstrukt CAPN151-678 hergestellt, welches sich aus den Aminosäuren des stabilen Kerns zusammensetzte. Das 19,8 kDa große Protein wurde im gleichen System exprimiert wie CAP-N³Px. Die Aufreinigung erfolgte über eine DE52 (Whatman) Anionenaustauscher-, eine Hydroxyapatit- sowie eine Phosphocellulose (P11, Whatman) Kationenaustauschersäule und war stets reproduzierbar. Mit den darauffolgenden NMR-Spektren wurde die sequenzspezifische Signalzuordnung des CAP-N fortgesetzt. Zunächst konnte ein Teil der Spinsysteme der Rückgrat-Atome ermittelt und anschließend in 2D-NOESY- und 2D-TOCSY-Spektren zugeordnet werden. Danach war es möglich, einige der interresidualen Signale mit intraresidualen der jeweiligen Spinsysteme zu korrelieren und Signalgruppenpaare zu Ketten zusammenzufügen. Dazu wurden sowohl sequentielle NOEs und Kontakte mittlerer Reichweite von identifizierten Aminosäuren aus den 2D-Spektren als auch statistisch ermittelte Werte und Proteinplotdaten extrahiert. Für die vollständige sequentielle Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrats waren neben zwei 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC- und einem 3D- ^{13}C -NOESY-HSQC-Spektrum Tripelresonanz-Experimente (ein HNCA-, ein CBCA(CO)NH- und ein HNCO-Spektrum) notwendig.

Zum jetzigen Zeitpunkt wurden die Resonanzen fast aller Rückgratamidgruppen zugeordnet. Lediglich die Reste Ser 1 und Leu 8 konnten in den Spektren nicht identifiziert werden. Weiterhin wurde die Zuordnung auf 95% der H_{α} - und 93% der C_{α} - und C' -Atome des Rückgrats sowie auf etwa 50% der Seitenkettenatome, darunter 95% der C_{β} - und 81% der H_{β} -Atome, vervollständigt. Damit stehen die Struktur dieser Proteindomäne und ihre Dynamik kurz vor ihrer Erschließung. Der Datensatz kann in Zukunft unter <http://www.bmrb.wisc.edu> mit der Eingangsnummer 5393 eingesehen werden.

Die Kristallisationsansätze wurden mit dem Proteinkonstrukt CAPN151-678, also mit dem stabilen Bereich der aminoterminalen Domäne durchgeführt. Nach Einstellung der optimalen Kristallisationsbedingungen wurden mit Hilfe der Dampfdiffusionsmethode Kristalle erhalten, die dann anschließend in Röntgenbeugungsanalysen verwendet wurden. Die Auswertung der dabei erhaltenen Daten führte zu einer Auflösung von 1,4 Å. Die Qualität der Kristalle war dementsprechend hoch. Der Strukturvorschlag zeigt für CAPN151-678 eine antiparallele, zylindrische Anordnung von sechs α -Helices ($\alpha 1 - \alpha 6$), die über Loop-Elemente miteinander verbunden sind. Von diesen sind die Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ durch kurze Unterbrechungen ihrer Helixstruktur gekennzeichnet. Die aus der Aminosäuresequenz berechnete Strukturvorhersage einer „all- α -conformation“ wurde also weitgehend bestätigt. Im Kristall findet man pro asymmetrischer Einheit ein Dimer aus zwei solchen Zylindern. Diese sind darin gegeneinander verdreht. Weiterhin wird von den beiden Monomeren ein Mg^{2+} komplexiert. Dabei befinden sich jeweils die Aminosäurenreste Arg 127, Asp 128 und Glu 144 in unmittelbarer Nähe zum Ion. Daß in den NMR-spektroskopischen Analysen, in Abwesenheit von Mg^{2+} , kein Dimer erhalten wurde, deutet auf eine Mg^{2+} -Abhängigkeit der Dimerisierung hin. Dieser Aspekt wird zur Zeit untersucht. Die endgültige Struktur der untersuchten Domäne wird in Kürze verfügbar sein.

Da bis vor kurzem über Strukturen von CAP-homologen Proteinen nichts bekannt war, ist man der Strukturaufklärung von CAP mit diesem Schritt ein großes Stück näher gekommen. Im Labor von Andreas Hofmann (Edinburgh) wird derzeit versucht, das gesamte Protein zu kristallisieren und die Struktur aufzuklären (Hofmann *et al.*, 2002). Bisher konnten allerdings noch keine Schwermetall-Derivate hergestellt werden. Die Struktur der 159 C-terminalen Reste des *S. cerevisiae* CAPs wird zur Zeit ebenfalls mit Hilfe röntgenkristallographischer Daten aufgeklärt, und es wurde bereits eine Struktur in der PDB-Datenbank (Protein Data Bank) veröffentlicht (<http://www.rcsb.org/pdb/>, Eingangscode 1KQ5). Die Gruppe um Steve Almo konnte dem Proteinkonstrukt, in dem das Prolin an Position 505 durch ein Serin ersetzt worden war, eine β -helikale Struktur zuweisen (Fedorov *et al.*, 2002).

In dieser ungewöhnlichen Anordnung bilden mitunter gebogene β -Faltblätter im Wechsel mit Loop-Elementen ein Helix, welche an α -helikale Formen erinnert und daher ihren Namen erhalten hat. Inwiefern über eine solche Struktur Actin gebunden wird oder das Protein dimerisieren kann, ist unbekannt.

5.1.4 Die Regulation der CAP-Funktionen

Die Frage, wie die Funktionen von CAP Proteinen reguliert werden, ist noch immer offen. Die Bindung an G-Actin könnte beispielsweise durch Phospholipidbindung (z.B. PIP₂) und damit auf vergleichbare Weise wie bei Profilin oder Cofilin kontrolliert werden. Solche Interaktionen zieht man auch für die Wechselwirkungen zwischen der N- und C-terminalen Domäne in Betracht. Wie alle bindenden Motive in CAP Proteinen muß auch der actinbindende Bereich noch spezifiziert werden. Jedoch könnten hier die in näherer Zukunft erscheinenden Daten aus NMR-spektroskopischen und röntgenkristallographischen Experimenten Abhilfe schaffen.

Signalwege stellen eine weitere, sehr wahrscheinliche Möglichkeit für die Kontrolle der CAP-Funktionen dar. Obwohl die Aktivierung des CAP/Adenylat-Cyclase-Komplexes durch Ras im Laufe der Evolution divergiert hat und diese Funktion zwischen Hefen und höheren Vertebraten scheinbar nicht konserviert wurde, können dennoch Effekte wie die temperatursensitive Umstrukturierung des Actin-Cytoskeletts in Hefe durch die Expression des humanen Ras komplementiert werden. Einige Ras-Funktionen in bezug auf die Kontrolle der Actinstruktur erscheinen daher konserviert (Ho und Bretscher, 2001). So wird auch CAP aus *D. discoideum* durch neuere Experimente in einen engeren Zusammenhang mit der Adenylat-Cyclase gebracht (Noegel *et al.*, 2002). Es konnte einerseits gezeigt werden, daß CAPminus-Mutanten die aggregationsspezifische Cyclase (ACA) im Zuge der Entwicklung und unter cAMP-Stimulus ebenso stark exprimieren wie das Wildtypzellen tun. Auf der anderen Seite fand man große Differenzen in der cAMP-Produktion, nachdem man die Zellen jeweils drei oder sechs Stunden hungern gelassen hatte - mit und ohne äußerliche cAMP-Pulse. Die Resultate sprechen zwar für eine funktionierende Cyclase in den Mutanten. Da die Antwort auf das cAMP-Signal aber vergleichsweise klein ausfiel, kann auf einen Einfluß des hier fehlenden CAP Proteins auf die Signaltransduktion geschlossen werden.

Die Interaktion des Hefe CAPs mit der Adenylat-Cyclase und seine Beteiligung an der cAMP-Produktion sprechen auch für eine Rolle des Proteinkinase A (PKA)-Weges bei der Modulation der CAP-Funktionen.

Allerdings konnte in vegetativ wachsenden Hefezellen kein großer Einfluß auf die durch das Cytoskelett bedingte Aufrechterhaltung der Polarität festgestellt werden (Ho und Bretscher, 2001). Außerdem fielen Experimente im Rahmen dieser Arbeit, in denen das CAPN151-678 Proteinkonstrukt als Substrat der Proteinkinase A untersucht wurde, negativ aus. Es bleibt also weiterhin offen, inwiefern und durch welche Moleküle die zwei CAP-Funktionen - die Kontrolle der Produktion spezifischer „second messenger“ und die Sequestrierung von Actin - miteinander verknüpft sind.

Die direkten und indirekten Wechselwirkungen von CAP mit wichtigen Komponenten der Endocytose und der Actinregulation in Hefe, z.B. Sla1p, Abp1p, Rvs167p, Act1p und Aip1p (Drees *et al.*, 2001; Amberg *et al.*, 1995; Lila und Drubin, 1997; Freeman *et al.*, 1996), deuten auf eine Beteiligung des Proteins an einem riesigen Regulationsapparat hin, welcher Elemente des sich auf- und abbauenden Actinnetzwerkes mit den für die Endocytose und den Vesikeltransport notwendigen Molekülen verbindet. Ob in höheren Eukaryonten die entsprechenden Interaktionen der homologen Proteine stattfinden, bleibt zu klären und Gegenstand zukünftiger Nachforschungen auf diesem Gebiet.

5.2 Filactin, ein neuartiges actinverwandtes Protein in *D. discoideum*

5.2.1 Filactin als neues Mitglied der Actin-Familie

Bei der Suche nach filaminähnlichen Proteinen mit Hilfe des *Dictyostelium*-Genomsequenzierungsprojekts (<http://www.uni-koeln.de/dictyostelium/>; Eichinger *et al.*, 2001; Glockner *et al.*, 2002) wurde eine Nukleotidsequenz entdeckt, die für ein neuartiges actinverwandtes Protein mit einer Molekülmasse von 104,7 kDa codierte. Aufgrund seiner sehr actinähnlichen, carboxyterminalen Domäne und zwei Filamin-homologen Bereichen in der N-terminalen Region wurde dieses Protein Filactin genannt. Bis dato konnte Filactin zwar in keinem anderen Organismus außer *D. discoideum* gefunden werden. Seine stark ausgeprägte, C-terminale Actinähnlichkeit macht es jedoch zu einem potentiellen Mitglied der Actin-Familie, zu der neben den traditionellen Actinen auch die actinverwandten Proteine (Actin-Related Proteins, ARPs) zählen. Um die Beziehung des Filactins zu anderen actinverwandten Proteinen aufzudecken, wurde die Sequenz seines C-terminalen Bereichs in einer phylogenetischen Analyse untersucht. Dabei kam heraus, daß die actinverwandte Domäne im Vergleich mit den ARP Proteinen eine größere Homologie zu *bona fide* Actinen besitzt. Insofern ist Filactin vielleicht nicht in die Reihe der actinverwandten Proteine (ARPs) einzuordnen, sondern stellt eher ein konventionelles Actinmolekül mit einem außergewöhnlich langen N-Terminus dar. Da man zum jetzigen Zeitpunkt von einem einmaligen Protein sprechen kann, ist davon auszugehen, daß Filactin wahrscheinlich keine fundamentalen Aufgaben in zellulären Prozessen übernimmt. Vielmehr spielt es wohl eine sehr spezifische Rolle in *D. discoideum*.

5.2.2 Verteilung von Filactin in *D. discoideum*

Berechnungen, nach denen sich Filactin zu einem Großteil im Cytoplasma befindet, stimmen mit Hydrophobizitäts-Berechnungen überein, die ein hydrophiles Protein vorhersagen. Widersprüchlich fielen dagegen biochemische Ansätze zur Lokalisation von endogenem Filactin in AX2 Wildtypzellen aus, die zum einen durch Behandlung mit Triton und zum anderen durch einen Einfrieren/Auftauen-Schritt geöffnet worden waren. Parallel dazu wurde das Verhalten des endogenen Actins beobachtet. Dieser Vergleich war auch schon im Vorfeld zu diesen Experimenten in Untersuchungen mittels konfokaler Mikroskopie gemacht worden. Hier zeigte das GFP-Konstrukt des actinähnlichen Proteinteils von Filactin eine an Actin erinnernde Verteilung. Das Protein befand sich im Zuge der Zellbewegung und der Phagocytose vor al-

lem an den vorderen Zellenden bzw. in Regionen mit Membraneinstülpungen. Dagegen zeigte das endogene Gesamtprotein in den Lokalisationsansätzen auch von Actin abweichende Eigenschaften. Nach Aufschluß der Zellen durch Triton und anschließender Zentrifugation mit 10.000 g befand sich der größere Teil der Filactinmoleküle im Sediment und verhielt sich damit übereinstimmend mit Actin. Geht man davon aus, daß Filactin hauptsächlich cytosolisch ist, spricht dieses Ergebnis möglicherweise für die Polymerisationsfähigkeit des Proteins oder aber für seine Assoziation an Elemente, die zusammen mit dem Triton-unlöslichen Cytoskelett sedimentiert wurden. In immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit *D. discoideum* Wildtypzellen schien das endogene Gesamtprotein an cytosolische Vesikel gebunden zu haben. Die beobachtete Sedimentation könnte demnach auch mit dieser Anbindung erklärt werden. Da Filactin wie auch Actin durch Einstellung auf eine hohe Ionenkonzentration aus diesem Sediment herausgelöst werden konnte und im Anschluß an eine 10.000 g-Zentrifugation im Überstand zu finden war, muß die Bindung unabhängig von ihrem Ort einen ionischen Charakter haben. Weiterhin sollte es sich bei den Vesikeln nicht um solche im üblichen, membranumhüllten Sinne handeln, da diese durch das Triton solubilisiert und damit nicht mehr pelletiert worden wären. Im weiteren Text wird daher von Aggregaten gesprochen. Unter depolymerisierenden Bedingungen wurden immerhin noch 30% sedimentiert (10.000 g), was ein weiteres Plus für die Aggregatbindung darstellt, zumal Actin komplett depolymerisiert wurde und im Überstand blieb. Wurde dieser auf polymerisierende Umstände eingestellt und bei 100.000 g zentrifugiert, pelletierte Actin vollständig, während nur etwa 50% des zuvor nicht aggregatgebundenen Filactins ins Sediment übergingen. Sollte Filactin also in der Lage sein, eigenständig zu polymerisieren, so ist diese Eigenschaft entweder nur schwach oder aber sind die Bedingungen dafür andere als beim Actin. Auszuschließen ist daher auch nicht ein Einbau des Moleküls in Actinfilamente.

In den Ansätzen, in denen die Zellen durch einen Einfrieren/Auftauen-Schritt geöffnet worden waren, befanden sich sowohl Actin als auch Filactin unabhängig von den Pufferbedingungen (ohne NaCl, mit NaCl oder polymerisierend) im Anschluß an die niedrige Zentrifugation (10.000 g) vorwiegend im Überstand. Unter polymerisierenden und auch depolymerisierenden Bedingungen wurde Filactin in der anschließenden Ultrazentrifugation (100.000 g) sedimentiert. Gerade unter letztgenannten Vorgaben hätte man einen Teil der Moleküle im Überstand erwartet, zumal hier auch Actin vollständig gefunden wurde. Die Assoziation an schwere Aggregate ist demnach in diesem Fall der allein verantwortliche Faktor. Völlig unklar ist allerdings, warum Actin in polymerisierendem Puffer auch durch Ultrazentrifugation nicht pelletiert wurde.

5.2.3 Eigenschaften von Filactin

Faßt man die Bewertungen aus Abschnitt 5.2.2 zusammen, so scheint die actinverwandte, carboxyterminale Domäne von Filactin ähnlich wie Actin polymerisieren zu können. In der wandernden oder phagocytierenden Zelle zeigt dieser Proteinteil daher eine mit Actin einhergehende Verteilung. Möglich ist auch, daß die Moleküle lediglich an die Actinfilamente angelagert werden oder aber, daß sie sogar beide Eigenschaften besitzen. In Versuchen, in denen Pyren-markiertes Actin in Gegenwart von IgG-GFP-Filactin-C polymerisiert wurde, konnte kein reproduzierbarer Einfluß auf das Polymerisationsverhalten durch die actinähnliche Domäne festgestellt werden. Außerdem besaßen Actinlösungen, die mit und ohne Zugabe von IgG-GFP-Filactin-C polymerisiert worden waren, eine vergleichbare relative Viskosität. Zumindest ein negativer Effekt auf die Actinpolymerisation ist deshalb wohl eher auszuschließen. Für eine endgültige Aussage sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Durch die angeschlossene N-Domäne wird das Verhalten des carboxyterminalen Bereichs scheinbar drastisch verändert. Glaubt man den Immunfluoreszenzen, bindet Filactin als Gesamtprotein an Aggregate, deren Identität noch unklar ist. Der Einbau in Elemente des Cytoskeletts oder aber eine eigenständige Polymerisation sind jedoch mit Blick auf die Lokalisationsexperimente ebenfalls nicht von der Hand zu weisen. Wie hier aber schon angeführt, kann die Polymerisation, sofern sie überhaupt stattfindet, nur sehr schwach sein. Zur Beantwortung dieser Frage sind Polymerisationsversuche mit aufgereinigtem Filactin notwendig. In den Gelfiltrationsanalysen wurden vornehmlich depolymerisierende Bedingungen gewählt. Hier wurde Filactin immer als Monomer (Puffer mit hohem Salzgehalt) oder Dimer (Puffer mit geringem Salzgehalt), aber nie als Polymer höherer Ordnung von der Säule eluiert. Allerdings wurde Actin unter ähnlichen Bedingungen (G-Puffer mit 50 mM NaCl) stets über einen weiten Bereich der Säule eluiert, was auf Polymere, die aus wenigen bis zahlreichen Einheiten aufgebaut sind, schließen läßt. Die Dimerisierung von Filactin kann demnach nicht sehr stark sein und findet außerdem nur bei niedrigem Salzgehalt statt.

Versuche, in denen AX2 t_8 -Zellen mit cAMP chemotaktisch stimuliert wurden, befürworten ebenfalls eine Kolo-kalisation des gesamten Filactins mit Actin. In den aggregierenden Zellen zeigten sowohl das endogene als auch ein überexprimiertes GFP-gebundenes Filactin mit Actin übereinstimmende Zu- und Abnahmen des im Triton-unlöslichen Cytoskelett gebundenen Proteins.

So waren im ersten Ansatz, in denen Actin und das endogene Filactin untersucht wurden, jeweils Maxima bei 5 und 40 s zu beobachten. Auch sonst gingen die Veränderungen im Gehalt der beiden Proteine nahezu einher.

Im zweiten Ansatz mit GFP-Filactin Zellen wurden drei einheitliche Maxima bei jeweils 3, 7-9 und 40 s erhalten. Betrachtet man die ersten zwei Peaks als eine Zunahme, wäre dieses Ergebnis in guter Übereinstimmung mit den Daten aus dem ersten Ansatz. Auch das GFP-gebundene Gesamtmolekül kolokalisiert somit scheinbar mit Actin. Da gerade polymere Bestandteile des Cytoskeletts wie F-Aktin und assoziierte Proteine als Triton-unlösliches Cytoskelett sedimentiert werden, sprechen diese Resultate für eine Assoziation von Filactin an Filamente. Aber auch die eigenständige Polymerisation sollte an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Mit der Bindung an Aggregate lassen sich die angeführten, zeitlichen Zu- und Abnahmen zumindest nicht erklären.

5.2.4 Filactin als multifunktionelles Protein

Hochaufgelöste Strukturdaten von Filactin gibt es noch nicht. Eine Anpassung der carboxy-terminalen Aminosäuresequenz an die Struktur von Muskelactin (Kabsch *et al.*, 1990) sagt jedoch eine globuläre, actinähnliche Struktur für diesen Proteinteil voraus. Die hierbei erhaltene, flexible Struktur kann wie die von Actin in vier Subdomänen unterteilt werden. In den Helix-Bereichen der Subdomänen 3 und 4 gibt in Übereinstimmung mit vielen actinverwandten Proteinen (ARPs), die an diesen Stellen Insertionen vorweisen, die größten Abweichungen von der Actinstruktur. Da alle für eine ATP/ADP-Bindung erforderlichen Aminosäurenreste vorhanden sind, ist eine Nukleotidbindung durch die Actindomäne von Filactin denkbar. Auch sollte die für das Gesamtprotein eher fragliche Polymerisationsfähigkeit für diesen Molekülteil in Betracht gezogen werden.

In seiner hohen Identität mit konventionellem Actin (> 60%) ähnelt Filactin dem actinverwandten Protein ARP1. ARP1 ist der größte Bestandteil von Dynactin (Lees-Miller *et al.*, 1992), einem Komplex, der sich aus mindestens zehn weiteren Proteinen zusammensetzt und der die dyneinabhängige Bewegung membranumhüllter Vesikel entlang von Mikrotubuli unterstützt (Gill *et al.*, 1991; Schroer und Sheetz, 1991). Der große Anteil von ARP1 am Dynactinkomplex ergibt sich aus seiner Eigenschaft, „Minifilamente“ bilden zu können, die im Gegensatz zu Actinfilamenten eine sehr einheitliche Länge besitzen (Schafer *et al.*, 1994). Stöchiometrischen Messungen zufolge besteht ein ARP1-Filament aus acht bis zehn Einheiten. Beide Enden werden scheinbar durch kleine Proteinkomplexe verkappt, so daß eine weitere Polymerisation oder der Zusammenschluß zweier Filamente verhindert wird (Schafer *et al.*, 1994). Die Geschwindigkeit dieser Polymerisation wird durch Steigerung der Ionenstärke erhöht. Außerdem scheint der Vorgang von einer ATP-Hydrolyse begleitet zu werden.

Es wurde nachgewiesen, daß ARP1 ATP binden kann (Bingham und Schroer, 1999). Außerdem kopolymerisierte es *in vitro* mit Actin (Melki et al., 1993).

In bezug auf ihre Lokalisation wurden ARP1 und Dynactin-Komponenten an den folgenden Positionen entdeckt: zum einen an Centrosomen (Clark und Meyer, 1992), desweiteren an verschiedenen Endomembranen wie z.B. Endosomen, Lysosomen und Vesikeln, die mit dem Golgi-Komplex assoziiert sind (Habermann *et al.*, 2001), und schließlich am Zellkortex, wo es wahrscheinlich während der Mitose hilft, die Mitosespindel mit der Plasmamembran zu verankern (Busson *et al.*, 1998; Skop und White, 1998).

Sollte Filactin in *D. discoideum* eine ähnliche Rolle übernehmen wie ARP1, könnte dies viele der gemachten Beobachtungen und die damit verbundenen Spekulationen erklären. Darunter fallen die Bindung von ATP, die eigenständige Polymerisation, die Kopolymerisation oder Assoziation mit konventionellem Actin und nicht zuletzt seine ausgeprägte Verteilung in der Zelle und damit auch die Bindung an Vesikel oder andere Proteinaggregate.

In einem weiteren Punkt stimmt Filactin mit den meisten Komponenten des Dynactinkomplexes überein: mit Ausnahme des Capping Proteins $\beta 2$ und von Actin, welches als fest assoziiertes Monomer in hochaufgereinigtem Dynactin gefunden wurde (Schafer *et al.*, 1994; Bingham *et al.*, 1998; Bingham und Schroer, 1999), besitzt keines der Moleküle größere Ähnlichkeit zu anderen Proteinen in den Sequenzdatenbanken. Um aber zu bestätigen, daß Filactin tatsächlich Teil eines solchen Komplexes ist, wird es notwendig sein, direkte Bindungspartner zu finden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Amberg, D.C., E. Basart und D. Botstein (1995). Defining protein interactions with yeast actin *in vivo*. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 28-35
- André, E., M. Brink, G. Gerisch, G. Isenberg, A. Noegel, M. Schleicher, J.E. Seagall und E. Wallraff (1989). A *Dictyostelium* mutant deficient in severin, an F-actin fragmenting protein, shows normal motility and chemotaxis. *J. Cell Biol.* **10**, 985-995
- Aubry, L., G. Klein und M. Satre (1997). Cytoskeletal dependence and modulation of endocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. In: „*Dictyostelium* – A model system for cell and developmental biology“ (Y. Maeda, K. Inouye und I. Takeuchi, Hrsg.). Universal Academy Press, Tokyo, 65-74
- Bahn, Y.S. und P. Sundstrom (2001). CAP1, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **183**, 3211-3223
- Baum, B., W. Li und N. Perrimon (2000). A cyclase-associated protein regulates actin and cell polarity during *Drosophila* oogenesis and in yeast. *Curr. Biol.* **10**, 964-973
- Beavo, J.A., P.J. Bechtel und E.G. Krebs (1974). Preparation of homogeneous cyclic AMP-dependent protein kinase(s) and its subunits from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* **38**, 299-308
- Benlali, A., I. Draskovic, D.J. Hazelett und J.E. Treisman (2000). act up controls actin polymerization to alter cell shape and restrict Hedgehog signaling in the *Drosophila* eye disc. *Cell* **101**, 271-281
- Bertholdt, G., J. Stadler, S. Bozarro, B. Fichtner und G. Gerisch (1985). Carbohydrates and other epitopes of the contact site A glycoprotein of *D. discoideum* as characterized by monoclonal antibodies. *Cell Differ.* **16**, 187-202
- Bingham, J.B., S.J. King und T.A. Schroer (1998). Purification of dynein and dynactin from brain tissue. *Meth. Enzymol.* **298**, 171-184
- Bingham, J.B. und T.A. Schroer (1999). Self-regulated polymerization of the actin-related protein Arp1. *Curr. Biol.* **9**, 223-226
- Birnboim, L. und J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1522
- Blanchoin, L. und T.D. Pollard (1998). Interaction of actin monomers with *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) and profilin. *J. Biol. Chem.* **273**, 25106-25111

- Blume, H., P. Boesecke, G.P. Bourenkov, D. Kosciesza und H.D. Bartunik (2001). *Nuclear Instr. Meth. A* 467-468, 1358-1362
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Brown, S.S., K. Yamamoto und J.A. Spudich (1982). A 40,000-Dalton protein from *Dictyostelium discoideum* affects assembly properties of actin in a Ca^{2+} -dependent manner. *J. Cell Biol.* **93**, 205-210
- Busson, S., D. Dujardin, A. Moreau, J. Dompierre und J.R. De Mey (1998). Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr. Biol.* **8**, 541-544
- Carlier, M.F. und D. Pantaloni (1994). Actin assembly in response to extracellular signals: role of capping proteins, thymosin beta 4 and profilin. *Semin. Cell Biol.* **5**, 183-191
- Clark, S.W. und D.I. Meyer (1992). Centractin is an actin homologue associated with the centrosome. *Nature* **359**, 246-250
- Cohen, C. und D. Parry (1986). Alpha-helical coiled-coils: a widespread motif in proteins. *Trends Biochem Sci.* **11**, 245-248
- Cooper, J.A. und T.D. Pollard (1982). Methods to measure actin polymerisation. *Meth. Enzymol.* **85**, 182-210
- Cooper, J.A., S.B. Walker und T.D. Pollard (1983). Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **4**, 253-262
- Cudney, B., S. Patel, K. Weisgräber, Y. Newhouse und A. McPherson (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 414-423
- Devereux, J., P. Haeberli und O. Smithies (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the vax. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395
- Dharmawardhane, S., V. Warren, A.L. Hall und J. Condeelis (1989). Changes in the association of actin-binding proteins with the actin cytoskeleton during chemotactic stimulation of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil. Cytoskel.* **13**, 57-63
- Didry, D., M.F. Carlier und D. Pantaloni (1998). Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J. Biol. Chem.* **273**, 25602-25611
- Döring, V., M. Schleicher und A.A. Noegel (1991). *Dictyostelium* annexin VII (synexin). cDNA sequence and isolation of a gene disruption mutant. *J. Biol. Chem.* **266**, 17509-17515

- Drees, B.L., B. Sundin, E. Brazeau, J.P. Caviston, G.-C. Chen, W. Guo, K.G. Kozminski, M.W. Lau, J.J. Moskow, A. Tong, L.R. Schenkman, A. McKenzie III., P. Brennwald, M. Longtine, E. Bi, C. Chan, P. Novick, C. Boone, J.R. Pringle, T.N. Davis, S. Fields und D.G. Drubin (2001). A protein interaction map for cell polarity development. *J. Cell Biol.* **154**, 549-576
- Dumontier, M., P. Höcht, U. Mintert und J. Faix (2000). Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **113**, 2253-2265
- Eichinger, L. und M. Schleicher (1992). Characterization of actin- and lipid-binding domains in severin, a Ca(2+)-dependent F-actin fragmenting protein. *Biochemistry* **31**, 4779-4787
- Eichinger, L., S.S. Lee und M. Schleicher (1999). *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc. Res. Tech.* **47**, 124-134
- Eichinger, L., A.A. Noegel und G. Glöckner (2001). Das *Dictyostelium*-Genomprojekt. *Biospektrum* **7**, 229-231
- Fedor-Chaikin, M., R.L. Deschenes und J.R. Broach (1990). SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast. *Cell* **61**, 329-340
- Fedorov, A.A., T. Dodatko, D.A. Roswarski und S.C. Almo (2002). Mutant structures of the actin-binding domain of cyclase associated protein (CAP) from *Saccharomyces cerevisiae*. Eingereicht, und: C-terminal domain of cyclase associated protein with Pro 505 replaced by Ser (P505S). Unter <http://www.rcsb.org/pdb/>, Eingangscodex 1KQ5
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166
- Fenger, U., M. Hofmann, B. Galliot und H.C. Schaller (1994). The role of the cAMP pathway in mediating the effect of head activator on nerve-cell determination and differentiation in hydra. *MOD* **47**, 115-125
- Field, J., A. Vojtek, R. Ballester, G. Bolger, J. Colicelli, K. Ferguson, J. Gerst, T. Kataoka, T. Michaeli, S. Powers, M. Riggs, L. Rodgers, I. Wieland, B. Wheland und M. Wigler (1990). Cloning and characterization of CAP, the *S. cerevisiae* gene encoding the 70 kd adenylyl cyclase-associated protein. *Cell* **61**, 319-327
- Fisher, P.R., A.A. Noegel, M. Fechheimer, F. Rivero, J. Prassler und G. Gerisch (1997). Photosensory and thermosensory responses in *Dictyostelium* slugs are specifically impaired by absence of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120). *Curr. Biol.* **7**, 889-892

- Freeman, N.L., Z. Chen, J. Horenstein, A. Weber und J. Field (1995a). An actin monomer binding activity localizes to the carboxyl-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 5680-5685
- Freeman, N.L., K.A. Mintzer und J. Field (1995b). The proline rich region of *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein (CAP) and its homologs contain a conserved SH3 binding site. *J. Biol. Chem. Sup.* **19b**, 136
- Freeman, N.L., T. Lila, K.A. Mintzer, Z. Chen, A.J. Pahk, R. Ren, D.G. Drubin und J. Field (1996). A conserved proline-rich region of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein binds SH3 domains and modulates cytoskeletal localization. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 548-556
- Gerst, J.E., K. Ferguson, A. Vojtek, M. Wigler und J. Field (1991). CAP is a bifunctional component of the *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase complex. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1248-1257
- Gieselmann, R. und K. Mann (1992). ASP-56, a new actin sequestering protein from pig platelets with homology to CAP, an adenylate cyclase-associated protein from yeast. *FEBS Lett.* **298**, 149-153
- Gill, S.C. und P.H. von Hippel (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-26
- Gill, S.R., T.A. Schroer, I. Szilak, E.R. Steuer und M.P. Sheetz (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol.* **115**, 1639-1650
- Glockner, G., L. Eichinger, K. Szafranski, J.A. Pachebat, A.T. Bankier, P.H. Dear, R. Lehmann, C. Baumgart, G. Parra, J.F. Abril, R. Guigo, K. Kumpf, B. Tunggal, E. Cox, M.A. Quail, M. Platzer, A. Rosenthal, A.A. Noegel; *Dictyostelium* Genome Sequencing Consortium (2002). Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **418**, 79-85
- Goddard, T.D. und D.G. Kneller (2000). SPARKY 3. University of California, San Francisco
- Gottwald, U. (1995). Identifizierung eines CAP Homologs (Adenylyl Cyclase assoziiertes Protein) in *Dictyostelium discoideum* und Charakterisierung als ein G-Aktin bindendes Protein. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Gottwald, U., R. Brokamp, I. Karagesisoglou, M. Schleicher und A.A. Noegel (1996). Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in *Dictyostelium discoideum* and characterization of its interaction with actin. *Mol. Biol. Cell* **7**, 261-272

- Guex, N. und M.C. Peitsch (1998). SWISS-MODEL and the Swiss PDB Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723
- Habermann, A., T.A. Schroer, G. Griffiths und J.K. Burkhardt (2001). Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynactin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles. *J. Cell Sci.* **114**, 229-240
- Hacker, U., R. Albrecht und M. Maniak (1997). Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **110**, 105-110
- Ho, J. und A. Bretscher (2001). Ras regulates the polarity of the yeast actin cytoskeleton through the stress response pathway. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1541-1555
- Hogrefe, H.H., B. Scott, K. Nielson, V. Hedden, C. Hansen, J. Cline, F. Bai, J. Amberg, R. Allen und M. Madden (1997). *Stratagies* **10**
- Holmes, D.S. und M. Quigley (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197
- Holmes, K.C., D. Popp, W. Gebhard und W. Kabsch (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-49
- Howard, P.K., B.M. Sefton und R.A. Firtel (1993). Tyrosine phosphorylation of actin in *Dictyostelium* associated with cell-shape changes. *Science* **259**, 241-244
- Hubberstey, A., G. Yu, R. Loewith, C. Lakusta und D. Young (1996). Mammalian CAP interacts with CAP, CAP2, and actin. *J. Cell. Biochem.* **61**, 459-466
- Hubberstey, A.V. und E.P. Mottillo (2002). Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. *FASEB* **16**, 487-499
- Jancarik, J. und S.H. Kim (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411
- Jungbluth, A., V. von Arnim, E. Biegelmann, B. Humbel, A. Schweiger und G. Gerisch (1994). Strong increase in the tyrosine phosphorylation of actin upon inhibition of oxidative phosphorylation: correlation with reversible rearrangements in the actin skeleton of *Dictyostelium* cells. *J. Cell Sci.* **107**, 117-125
- Jungbluth, A., C. Eckerskorn, G. Gerisch, F. Lottspeich, S. Stocker und A. Schweiger (1995). Stress-induced tyrosine phosphorylation of actin in *Dictyostelium* cells and localization of the phosphorylation site to tyrosine-53 adjacent to the DNase I binding loop. *FEBS Lett.* **375**, 87-90
- Kabsch, W., H.G. Mannherz, D. Suck, E.F. Pai und K.C. Holmes (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44

- Kawamukai, M., K. Ferguson, M. Wigler und D. Young (1992). Genetic and biochemical analysis of the adenylyl cyclase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Regul.* **2**, 155-164
- Kawamukai, M., J. Gerst, J. Field, M. Riggs, L. Rodgers, M. Wigler und D. Young (1992). Genetic and biochemical analysis of the adenylyl cyclase-associated protein, CAP, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **3**, 167-180
- Kawai, M., S. Aotsuka und H. Uchimiya (1998). Isolation of a cotton CAP gene: a homologue of adenylyl cyclase-associated protein highly expressed during fiber elongation. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1380-1383
- Kimmel, A.R. und R.A. Firtel (1983). Sequence organization in *Dictyostelium*: unique structure at the 5'-ends of protein coding genes. *Nucl. Acids Res.* **11**, 541-552
- Khosrowshahian, F., A.V. Hubberstey und M.J. Crawford (2001). CAP1 is differentially expressed during *Xenopus* development. Eingereicht
- Kouyama, T. und K. Mihashi (1981). Fluorometric study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin: local structural change of actin protomer both on polymerisation and on binding of heavy meromyosin. *Eur. J. Biochem.* **114**, 33-38
- Kreis, T. und R. Vale (1993). Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins. Oxford University Press, N.Y., 276pp.
- Kyte, J. und R.F. Doolittle (1989). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132
- Lacombe, M.-L., G.J. Podgorski, J. Franke und R-H. Kessin (1986). Molecular cloning and developmental expression of the cyclic nucleotide phosphodiesterase gene of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **261**, 16811-16817
- Lämmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* **227**, 680-685
- Lees-Miller, J.P., D.M. Helfman und T.A. Schroer (1992). A vertebrate actin-related protein is a component of a multisubunit complex involved in microtubule-based vesicle motility. *Nature* **359**, 244-246
- Lila, T. und D.G. Drubin (1997). Evidence for physical and functional interactions among two *Saccharomyces cerevisiae* SH3 domain proteins, an adenylyl cyclase-associated protein and the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **8**, 367-385
- Loomis, W.F. (1982). The development of *Dictyostelium discoideum*. Academic Press, New York

- Lowry, O.H., N.J. Rosebraugh, A.L. Farr und R.J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Machicao, F. und O.H. Wieland (1985). Insulin-stimulated phosphorylation of actin by human placental insulin receptor preparations. *Curr. Top. Cell Regn.* **27**, 95-105
- MacLean-Fletcher, S. und T.D. Pollard (1980). Viscometric analysis of the gelation of *Acanthamoeba* extracts and purification of two gelation factors. *J. Cell Biol.* **85**, 414-428
- Malchow, D., B. Nägele, H. Schwarz und G. Gerisch (1972). Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **28**, 136-142
- Matviw, H., G. Yu und D. Young (1992). Identification of a human cDNA encoding a protein that is structurally and functionally related to the yeast adenylyl cyclase-associated CAP proteins. *Mol. Cell Biol.* **12**, 5033-5040
- Mavoungou, C. (2000). Untersuchung am CAP-Protein des *Dictyostelium discoideums* mittels NMR-Spektroskopie. Diplomarbeit
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* **189**, 1-23
- McRobbie, S.J. und P.C. Newell (1983). Changes in actin associated with the cytoskeleton following chemotactic stimulation of *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 351-359
- Melki, R., I.E. Vainberg, R.L. Chow und N.J. Cowan (1993). Chaperonin-mediated folding of vertebrate actin-related protein and γ -tubulin. *J. Cell Biol.* **122**, 1301-1310
- Miki, H., K. Miura und T. Takenawa (1996). N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP₂-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 5326-5335
- Miki, H., T. Sasaki, Y. Takai und T. Takenawa (1998). Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* **391**, 93-96
- Moriyama, K. und I. Yahara (2002). Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover. *J. Cell Sci.* **115**, 1591-1601
- Nishida, E. (1985). Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* **24**, 1160-1164
- Noegel, A.A. und J.E. Luna (1995). The *Dictyostelium* cytoskeleton. *Experientia* **51**, 1135-1143

- Noegel, A.A., F. Rivero, R. Albrecht, K.P. Janssen, J. Köhler, C.A. Parent und M. Schleicher (1999). Assessing the role of the ASP56/CAP homologue of *Dictyostelium discoideum* and the requirements for subcellular localization. *J. Cell Sci.* **112**, 3195-3203
- Noegel, A.A., R. Blau-Wasser, H. Sultana, L. Israel, M. Schleicher, H. Patel, C.J. Weijer (2002). CAP/ASP56 as regulator of cell polarity and cAMP signaling in *Dictyostelium*. In Revision
- Oakley, B.R., D.R. Kirsch und N.R. Norris (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**, 361-363
- Pace, C.N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley und T. Gray (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423
- Pardee, J.D. und J.A. Spudich (1982). Purification of muscle actin. *Methods Cell. Biol.* **24**, 271-289
- Podolski, J.L. und T.L. Steck (1990). Length distribution of F-actin in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **265**, 1312-1318
- Raper, K. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**, 135-147
- Ren, R., B.J. Mayer, P. Cicchetti und D. Baltimore (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**, 1157-1161
- Richards, F.M. und J.R. Knowles (1968). Glutaraldehyde as a protein crosslinking agent. *J. Mol. Biol.* **37**, 231-233
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Ehrlich und N. Arnheim (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354
- Sambrook, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis (1989). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Schafer, D.A., S.R. Gill, J.A. Cooper, J.E. Heuser und T.A. Schroer (1994). Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *J. Cell Biol.* **126**, 403-412
- Schroer, T.A. und M.P. Sheetz (1991). Two activators of microtubule-based vesicle transport. *J. Cell Biol.* **115**, 1309-1318
- Schweiger, A, O. Mihalache, M. Ecke und G. Gerisch (1992). Stage-specific tyrosine phosphorylation of actin in *Dictyostelium discoideum* cells. *J. Cell Sci.* **102**, 601-609

- Senn, H., A. Eugster, G. Otting, F. Suter und K. Wuthrich (1987). ¹⁵N-labeled P22 c2 repressor for nuclear magnetic resonance studies of protein-DNA interactions. *Eur. J. Biophys.* **14**, 301-306
- Shima, F., Y. Yamawaki-Kataoka, C. Yanagihara, M. Tamada, T. Okada, K. Kariya und T. Kataoka (1997). Effect of association with adenylyl cyclase-associated protein on the interaction of yeast adenylyl cyclase with Ras protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1057-1064
- Shima, F., T. Okada, M. Kido, H. Sen, Y. Tanaka, M. Tamada, C.D. Hu, Y. Yamawaki-Kataoka, K. Kariya und T. Kataoka (2000). Association of yeast adenylyl cyclase with cyclase-associated protein CAP forms a second Ras-binding site which mediates its Ras-dependent activation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 26-33
- Simpson, P.A., J.A. Spudich und P. Parham (1984). Monoclonal antibodies prepared against *Dictyostelium* actin: characterization and interactions with actin. *J. Cell Biol.* **99**, 287-295
- Skop, A. und J. White (1998). The dynein complex is required for cleavage plane specification in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Curr. Biol.* **8**, 1110-1116
- Sohn, R.H. und P.J. Goldschmidt-Clermont (1994). Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays* **16**, 465-472
- Spudich, J.A. und S. Watt (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**, 4866-4871
- Stossel, T.P., J. Condeelis, L. Cooley, J.H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher und S.S. Shapiro (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 138-45
- Straub, F.B. (1942). *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* **2**, 3-15
- Studier, F.W. und B.A. Moffat (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130
- Suggs, S.V., T. Hirose, T. Miyake, E.H. Kawashima, M.J. Johnson, K. Itakura und R.B. Wallace (1981). Use of synthetic oligodesoxy-ribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences using purified genes. In: *Developmental Biology* (D.D. Brown und C.F. Fox, Hrsg.). Academic Press NY, 683-693
- Swiston, J., A. Hubberstey, G. Yu und D. Young (1995). Differential expression of CAP and CAP2 in adult rat tissues. *Gene* **165**, 273-277
- Symons, M.H. und T.J. Mitchison (1991). Control of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts. *J. Cell Biol.* **114**, 503-513

- Tabor, S. (1990). Expression using the T7 RNA polymerase/promotor system. In: „Current Protocols in Molecular Biology“ (F.A. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingsten, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith und K. Struhl, Hrsg.). Greene Publishing and Wiley Interscience, NY, 16.2.1-16.2.11
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354
- Town, C.D., B.J. Haas, D. Wu, R. Maiti, L.I. Hannick, A.P. Chan, L.J. Tallon, T. Rooney, T.R. Utterback, S.E. VanAken, T.V. Feldblyum, O. White und C.M. Fraser (2002). *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 CHR4v12152001 genomic sequence. Eingereicht
- Traugh, J.A., C.D. Ashby und D.A. Walsh (1974). Criteria for the classification of protein kinases. *Methods Enzymol.* **38**, 290-299
- Vaduva, G., N.C. Martin und A.K. Hopper (1997). Actin-binding verprolin is a polarity development protein required for the morphogenesis and function of the yeast actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, **139**, 1821-1833
- Van Delft, S., A.J. Verkleij, J. Boonstra, P.M.P Van Bergen en Henegouwen (1995). Epidermal growth factor induces serine phosphorylation of actin. *FEBS Lett.* **357**, 251-254
- Vieira, J. und J. Messing (1982). The pUC plasmid, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene (Amst.)* **19**, 259-268
- Vojtek, A., B. Haarer, J. Field, J. Gerst, T.D. Pollard, S. Brown und M. Wigler (1991). Evidence for a functional link between profilin and CAP in the yeast *S. cerevisiae*. *Cell* **66**, 497-505
- Vojtek, A.B. und J.A. Cooper (1993). Identification and characterization of a cDNA encoding mouse CAP: a homolog of the yeast adenylyl cyclase associated protein. *J. Cell Sci.* **105**, 777-785
- Watts, D.J. und J.M. Ashworth (1970). Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 171-174
- Weber, A., J. Northrop, M.F. Bishop, F.A. Ferrone und M.S. Mooseker (1987). Nucleation of actin polymerisation by villin and elongation at subcritical monomer concentrations. *Biochemistry* **26**, 2528-2536
- Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* **108**, 139-150

- Wesp, A., L. Hicke, J. Palecek, R. Lombardi, T. Aust, A.L. Munn und H. Riezman (1997). End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2291-2306
- Williams, C. und G. Newell (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* **82**, 287-307
- Williamson, M.P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **297**, 249-260
- Yaffe, M.B. (2002). How do 14-3-3 proteins work? – Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* **513**, 53-57
- Yang, S., M.J. Cope und D.G. Drubin (1999). Sla2p is associated with the yeast cortical actin cytoskeleton via redundant localization signals. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2265-2283
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119
- Yu, F.-X., H.-Q. Sun, P.A. Janmey und H.L. Yin (1992). Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin-monomer-binding domain of gelsolin. *J. Biol. Chem.* **267**, 14616-14621
- Yu, G., J. Swiston und D. Young (1994). Comparison of human CAP and CAP2, homologs of the yeast adenylyl cyclase-associated proteins. *J. Cell Sci.* **107**, 1671-1678
- Yu, J., C. Wang, S.J. Palmieri, B.K. Haarer und J. Field (1999). A cytoskeletal localizing domain in the cyclase-associated protein, CAP/Srv2p, regulates access to a distant SH3-binding site. *J. Biol. Chem.* **274**, 19985-19991
- Zelicof, A., J. Gatica und J.E. Gerst (1993). Molecular cloning and characterization of a rat homolog of CAP, the adenylyl cyclase-associated protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 13448-13453
- Zelicof, A., V. Protopopov, D. David, X.-Y. Lin, V. Lustgarten und J.E. Gerst (1996a). Two separate functions are encoded by the carboxy-terminal domains of the yeast cyclase-associated protein and its mammalian homologs. Dimerization and actin binding. *J. Biol. Chem.* **271**, 18243-18252
- Zhou, G.L., Y. Miyazaki, T. Nakagawa, K. Tanaka, K. Shishido, H. Matsuda und M. Kawamukai (1998). Identification of a CAP (adenylyl-cyclase-associated protein) homologous gene in *Lentinus endodes* and its functional complementation of yeast CAP mutants. *Microbiology* **144**, 1085-1093

- Zhou, G.L., T. Yamamoto, F. Ozoe, D. Yano, K. Tanaka, H. Matsuda und M. Kawamukai (2000). Identification of a 14-3-3 protein from *Lentinus endodes* that interacts with CAP (adenylyl cyclase-associated protein), and conservation of this interaction in fission yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 149-159
- Zigmond, S.H. (2000). How WASP regulates actin polymerization. *J. Cell Biol.* **150**, 117F-F120

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Actinstrukturen in einer <i>D. discoideum</i> Zelle	2
Abb. 2: Schematische Übersicht actinbindender Proteine aus <i>D. discoideum</i> und ihre Interaktionen mit dem Mikrofilamentsystem	3
Abb. 3: Entwicklungszyklus von <i>D. discoideum</i>	8
Abb. 4: cDNA und davon abgeleitete Aminosäuresequenz des CAP-Homologs aus <i>D. discoideum</i>	49/50
Tab. 1: Vergleich der bisher beschriebenen CAP-Homologen aus verschiedenen Spezies	52
Abb. 5: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von <i>D. discoideum</i> CAP und CAP-N'Px	54
Abb. 6: Schematische Darstellung der Aufreinigung von CAP-N'Px	56
Abb. 7: Aufreinigung von CAP-N'Px	57
Abb. 8: 1D-Spektrum von CAP-N'Px	58
Abb. 9: Proteolytischer Abbau von CAP-N'Px	60
Abb. 10: Schematische Darstellung der CAPN DNA-Konstrukte	62
Abb. 11: Schematische Darstellung der Aufreinigung von CAPN151-678	64
Abb. 12: Aufreinigung von CAPN151-678	65
Abb. 13: Vergleich der 1D-Spektren von CAP-N'Px und CAPN151-678	66
Abb. 14: Graphische Darstellung der NMR-Daten zur Identifizierung von Sekundärstrukturelementen	68
Abb. 15: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des <i>D. discoideum</i> CAP-N	70
Abb. 16: Strukturvorschlag und Kristalle von CAPN151-678	72
Abb. 17: Sequenzvergleich der Verprolin-Homologie-Domänen verschiedener Proteine	74
Abb. 18: Vorschläge für die Domänenstruktur von CAP-C	75
Abb. 19: Schematische Darstellung der CAPC DNA-Konstrukte	76
Abb. 20: Schematische Darstellung der Aufreinigung von CAPC835-1392	77
Abb. 21: Aufreinigung von CAPC835-1392	78
Abb. 22: Aktivitätskontrolle von CAPC835-1392 mittels Low Shear-Viskosimetrie	79
Abb. 23: Einfluß von CAPC835-1392 auf die Polymerisation von Actin	81
Abb. 24: Depolymerisation von F-Actin durch Zugabe von CAPC835-1392	82

Abb. 25: Chemische Quervernetzung von G-Actin und CAPC835-1392 mittels Glutaraldehyd _____	84
Abb. 26: Chemische Quervernetzung von G-Actin und CAPC835-1392 mittels EDC/NHS _____	84
Abb. 27: Schematische Darstellung der Filactin Domänenstruktur _____	85
Abb. 28: Sequenzvergleich der C-terminalen Domäne von Filactin mit verschiedenen Actinen _____	87
Abb. 29: Phylogenetischer Vergleich der C-terminalen Domäne von Filactin, Actinen und actinverwandten Proteinen _____	88
Abb. 30: Vermutliche Struktur der actinähnlichen Domäne von Filactin im Vergleich zur Struktur des Muskelactins _____	89
Abb. 31: Immunopräzipitation aus GFP-Filactin-C Zellen und verschiedenen Antikörpern _	90
Abb. 32: Präparative Immunopräzipitationen von GFP-Filactin-C Zellen und 1S-192-2 Antikörpern (Ansatz 1) _____	91
Abb. 33: Verteilung von Filactin unter Hochsalz-, depolymerisierenden und polymerisierenden Bedingungen nach Triton-Behandlung _____	93
Abb. 34: Verteilung von Filactin nach Einfrieren/Auftauen der Zellen und differentieller Zentrifugation _____	95
Abb. 35: Actin und Filactin im Triton-unlöslichen Cytoskelett nach cAMP-Stimulation von AX2 Zellen _____	97
Abb. 36: Actin und GFP-Filactin im Triton-unlöslichen Cytoskelett nach cAMP-Stimulation von GFP-Filactin Zellen _____	98
Abb. 37: Tyrosin-Phosphorylierung nach osmotischen Schock von AX2, GFP-Filactin und GFP-Filactin-C Zellen _____	100

8 ABKÜRZUNGEN

A		CENT	Centractin
A	Ampere	Ci	Curie
Abb.	Abbildung(en)	CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)
AC	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Ck	Centrikon
ACENT	Alpha-Centractin	cm	Zentimeter
ACT	Actin	C-term.	carboxyterminal
ad.	auf	Cy3	Carboxymethylindocyanin
A	Adenosin, Desoxyadenosin	Cys	Cystein
ADP	Adenosindiphosphat	D	
Ak	Antikörper	3D	dreidimensional
APS	Ammoniumperoxodisulfat	d	Tag(e)
ATP	Adenosintriphosphat	Da	Dalton
AS	Aminosäure(n)	<i>D.d./DD</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
autokl.	autoklaviert	Df	Durchfluß
B		d.h.	das heißt
BCENT	Beta-Centractin	Dial.	Dialyse
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz	DM	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>B.d.</i>	<i>Bactrocera dorsalis</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
bid.	bidestilliert	DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleinacid)
Bp	Basenpaar(e)	dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)	DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
bzw.	beziehungsweise	E	
C		<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
C	Cytidin, Desoxycytidin	EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid
c	Konzentration	EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic Adenosine-triphosphate)	EGTA	Ethylen-glycol-bis [2-amino-ethylether]- N,N,N',N'-tetra-essigsäure
CAP	Cyclase-Associates Protein (Cyclase-Associated Protein)	<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
CAP-C/		evtl.	eventuell
CAPC	CAP, carboxyterminal	ε	Extinktionskoeffizient
CAP-N/		F	
CAPN	CAP, aminoterminal	f.	für
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)	F-Actin	filamentöses Actin
°C	Grad Celsius		

G		MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
G	Guanosin, Desoxyguanosin	mg	Milligramm
g	Gramm oder Vielfaches der Erdbeschleunigung	μF	Mikrofarad
G418	Geneticin 418	μl	Mikroliter
G-Actin	globuläres Actin	μM	mikromolar, Mikromol/Liter
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein	μm	Mikrometer
GTP	Guanosintriphosphat	min	Minute(n)
H		mind.	mindestens
h	Stunde	ml	Milliliter
H	His-Tag = Peptid mit 6 Histidin-Resten, bindet an Ni^{2+}	mM	millimolar, Millimol/Liter
HA	Hydroxyapatit	mm	Millimeter
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazid - N'-ethansulfonsäure	MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
H.s./HS	<i>Homo sapiens</i>	mRNA	Boten RNA (Messenger RNA)
H ₂ O	Wasser	MW	Molekulargewicht
I		N	
IgG	Immunglobulin G	N	Normal
IP	Immunopräzipitation	n.	nach
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	NBT	Nitro Blue Tetrazolium
<i>in vitro</i>	„im Reagenzglas“	NC	<i>Neurospora crassa</i>
<i>in vivo</i>	„im lebenden Organismus“	ng	Nanogramm
K		NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
K	Kelvin	nm	Nanometer
kB	Kilobasen	n.Ö.	nach Öffnen
kBp	Kilobasenpaare	NP-40	Nonylphenylpolyethylenglycol
kDa	Kilodalton	Nt	Nukleotide
Konz.	Konzentrat	N-term.	aminoterminal
kV	Kilovolt	O	
L		o.B.	obere Bande
LB	Luria Bertani	OC	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
l	Liter	OD	Optische Dichte
LMW	Low Molecular Weight	P	
M		P	Prolinreiche Region
M	molar, Mol/Liter	P	Pellet
mA	Milliampere	<i>p.a.</i>	<i>per analysis</i> (zur Analyse)
mAk	monoklonaler Antikörper	PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
max.	maximal	pAk	polyklonaler Antikörper (polyclonal Antibody)
MBp	Megabasenpaare	PC	Phosphocellulose
		PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat	VH	Verprolin-Homologie
pmol	Picomol	Vol	Volumen/Volumina
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	(^v / _v)	Volumenprozent (^{volume} / _{volume})
ppm	Millionstel (parts per million)	W	
R		W	Waschen
Rez.	Rezirkulation	(^w / _v)	Gewichtsprozent (^{weight} / _{volume})
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleinacid)	Z	
RNase	Ribonuklease	z.B.	zum Beispiel
RT	Raumtemperatur	z.T.	zum Teil
S		Außerdem	
s	Sekunde(n)	∅	Durchmesser
<i>S.c./SC</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	≡	entspricht/entsprechen
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)	~	etwa
s.o.	siehe oben	×	fach, z.B. „2 ×“ = zweifach; mal, z.B. „2 ×“ = zweimal
sog.	sogenannte	>	größer
SP	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	≥	größer-gleich
s.u.	siehe unten	≅	ist/sind ungefähr gleich
SV	Säulenvolumen/-volumina	<	kleiner
T		≤	kleiner-gleich
T	Temperatur	#	Nummer
t	Zeit	Ω	Ohm
Tab.	Tabelle	%	Prozent
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin		
T _m	Mischzeit		
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan		
tRNA	Transfer RNA		
U			
U	Uridin oder Einheit (Unit)		
u.a.	unter anderem		
u.B.	untere Bande		
UpM	Umdrehungen pro Minute		
Üs	Überstand		
UTP	Uridintriphosphat		
UV	Ultraviolett		
UZ	Ultrazentrifugation		
V			
V	Volt		
vgl.	vergleiche		

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Lars Israel
geboren am 21. Mai 1972 in Lippstadt

Schulbildung:

August 1978 – Juni 1982 St. Josef-Grundschule, Lippstadt
August 1982 – Juni 1991 Ev. Gymnasium, Lippstadt
Juni 1991 *Allgemeine Hochschulreife*

Dienstpflicht:

Juli 1991 – September 1992 Wehrdienst in der Lipperland-Kaserne, Lippstadt

Universität und Forschung:

Oktober 1992 – September 1998 Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
April 1996 *Diplom-Vorprüfung*
Dezember 1997 – August 1998 Diplomarbeit in der Gruppe von Prof. Dr. B.-J. Benecke am Lehrstuhl für Biochemie der Fakultät für Chemie, Ruhr-Universität Bochum. Titel: „Bindungsstudien zur RNA-Protein-Wechselwirkung *in vitro*“
September 1998 *Diplom-Hauptprüfung*
Oktober 1998 – Dezember 1998 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Biochemie der Fakultät für Chemie, Ruhr-Universität Bochum, in der Gruppe von Prof. Dr. B.-J. Benecke
März 1999 – September 2002 Promotion in der Gruppe von Prof. Dr. M. Schleicher am Adolf-Butenandt-Institut für Zellbiologie; Betreuung durch Prof. Dr. Harry MacWilliams, Zoologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
23. September 2002 Abgabe der Promotion am Dekanat der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
13. Mai 2003 Mündliche Prüfung (Rigorosum)

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Harry MacWilliams für die Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät für Biologie.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Michael Schleicher bedanken, vor allem für sein Vertrauen, seine unendliche Geduld und die stete Unterstützung und Betreuung an allen guten und weniger guten Tagen dieser Promotion.

Herrn Dr. Tad Holak danke ich für die abwechslungsreiche Zusammenarbeit und die Bereitstellung wichtiger Chemikalien, die große Teile dieser Arbeit erst ermöglicht haben. Damit verbunden danke ich natürlich Dorota Ksiazek, Chrystelle Mavoungou und Till Rehm für all die Daten, die wir gemeinsam erarbeitet haben.

Frau Prof. Dr. Angelika Noegel und ihrer Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die ausgezeichnete Kooperation und die zahlreichen Daten, die meine Arbeit angetrieben haben.

Weiter danke ich Herrn Dr. Ullrich Gottwald für die vielen Fakten zum *Dictyostelium* CAP, die eine wichtige Grundlage dieser Arbeit waren.

Unseren PD's Dr. Ralph Gräf, Dr. Jan „Hans“ Faix und Dr. Ludwig Eichinger danke ich für die Beantwortung unzähliger Fragen sowie für ihre Tips und Ratschläge.

Ein ganz herzliches Dankeschön an Annika Gloss, die nicht nur Laborkollegin war, sondern auch eine Freundin ist, mit der ich Höhen und Tiefen und das Zimmer in San Francisco teilen durfte. Wir haben's trotzdem geschafft! Ein weiteres herzliches Dankeschön auch an „Bruder“ Marc Borath, mit dem ich fußballerische Katastrophen und Höhepunkte durchlebt habe, für Männergespräche und die wohl besten Kässpatzen der Welt.

Mein Dank geht auch an Daniela Rieger, nicht nur für unzählige Tips und Tricks, sondern auch für ihren morbiden Sarkasmus, an René Rost für die unermüdliche Verteidigung des Ostens in allen Lebenslagen, und an alle lieben Laborkollegen der alten und neuen Stunde: an meine Fahrschul-Mitstreiterinnen Athina Kallipolitou und Irene Schulz, Klaus-Peter „Grüss Ditsch!“ Janssen, Soo Sim „I don't care“ Lee, den FCB-Symphatisanten Stefan Thiel, die erste Botschafterin Indiens Jibi Jacob (all the best for your baby!) und „Indiens Dieter-Thomas Heck“ Rajesh Arasada, Annette „Talk First“ Vogel, Stefan „Beißholz“ Schwager, Hyun-Ju „Plan your life aggressively“ Son, „Mister Disco-Fox“ Thomas Giebing, die Computer-Genies Andreas Schneider und Christian Horn und all die anderen Schliwas, Gräfs und Bählers; nicht zu vergessen Maria Beer, Andrea Kirschner, Gudrun Koser, Rita Lorenz und Josef „Sepp“ Grimm für das so wichtige Drumherum.

Ein zweites, „dickes“ Danke an Michael, dieses Mal für die lebensnotwendige Auffüllung der berüchtigten Schublade: Sie haben uns glücklich gemacht!

Herzlichen Dank auch an alle lieben Menschen – egal ob Wissenschaftler oder Nichtwissenschaftler –, die mich auf meinem Weg zum „Doktor“ begleitet haben.

Zu guter Letzt möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken: Sandra, ohne die ich wohl nicht ins „Ausland“ gezogen wäre, für die Kraft und die wundervolle Zeit außerhalb dieser Arbeit. Und natürlich meinen Eltern und Brüdern, für den Rückhalt und die vielen kleinen und großen Taten, die mir sehr geholfen und mich immer wieder bestätigt haben.

Danke, daß Ihr immer ganz fest an mich geglaubt habt. Ohne Euch wäre dies alles nicht möglich gewesen. Ich bin stolz auf EUCH!

DANKE!!!

Make it so!

*Jean-Luc Picard,
Captain der U.S.S Enterprise*
