

Aus dem BioMedizinischen Zentrum der LMU

Lehrstuhl: Anatomie III - Zellbiologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Michael Kiebler

Charakterisierung von Filaktin als Bestandteil intranukleärer Aktin-Aggregate

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität-München

vorgelegt von

Benjamin Kurfürst

aus

Boston/USA

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Schleicher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Peter B. Becker

Prof. Dr. Claudia Veigel

Prof. Dr. Harald Steiner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Julia Gallinger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2016

Eidesstattliche Versicherung

Kurfürst, Benjamin

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Charakterisierung von Filaktin als Bestandteil intranukleärer Aktin-Aggregate

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 5. März 2016

Kurfürst, Benjamin

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen	1
1.2 Das Aktinfilamentsystem, seine Struktur und Funktion	2
1.3 Filaktin	4
1.3.1 Proteinsequenz von Filaktin	6
1.3.2 Berechnete Struktur der Aktindomäne	7
1.4 Nemalin-Myopathien	8
1.5 <i>Dictyostelium discoideum</i>	10
1.5.1 <i>D. discoideum</i> als Modellorganismus	10
1.5.2 Nukleäre Aktin-Aggregate in <i>D. discoideum</i>	12
1.6 Ziel der Arbeit	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Enzyme, Antikörper, Inhibitoren und Antibiotika	14
2.1.2 Antikörper	14
2.1.3 Antibiotika	15
2.1.4 Reagenzien	15
2.1.5 Medien	15
2.1.6 Medien für die <i>D. discoideum</i> -Kultur	16
2.1.7 Medien für die <i>E. coli</i> -Kultur	18

2.1.8 Puffer und Lösungen	18
2.1.9 Bakterienstämme	19
2.1.10 Vektoren	20
2.1.11 Primer	20
2.1.12 Geräte	21
2.1.13 Mikroskopie	21
2.1.14 Weitere Materialien	22
2.1.15 Zentrifugen	22
2.1.16 Software	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Molekulare Methoden	23
2.2.1.1 Molekularbiologische Standardmethoden.....	23
2.2.1.2 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	23
2.2.1.3 Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen	24
2.2.1.4 Ligation von DNA Fragmenten	24
2.2.1.5 Transformation von <i>E. coli</i>	24
2.2.1.6 Plasmid Mini/Maxi Präparation	25
2.2.1.7 Messen der DNA Konzentration	25
2.2.1.8 Kultivieren von axenischen <i>D. discoideum</i> Zellen	26
2.2.1.9 Einfrieren von <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	26
2.2.1.10 Auftauen von <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	26
2.2.1.11 Transformation von <i>D. discoideum</i> mittels Elektroporation	27
2.2.1.12 Kultur und Klonierung auf Bakterienrasen	28
2.2.2 Biochemische Methoden	29

2.2.2.1 Immunblot („Western Blot“) – Nachweis der Antigene durch Chemilumineszenz oder Färbung	29
2.2.2.2 Coomassie Blau-Färbung von Proteinen	31
2.2.2.3 Immunfluoreszenz an fixierten Zellen	31
3 Ergebnisse	35
3.1 Klonierung der Aktindomäne aus Filaktin	35
3.2 Erstellung eines pDEX-GFP-Filaktin-Aktin Vektors durch Amplifikation des gesamten Vorlage-Plasmids	39
3.3 Biochemischer Nachweis der in <i>D. discoideum</i> transformierten GFP-Fusionsproteine	46
3.4 Biochemischer Nachweis des Vorhandenseins der jeweiligen GFP-Fusionsproteine in den entsprechenden <i>D. discoideum</i> Zelllinien	48
3.5 Lokalisierung der Filaktin GFP-Fusionsproteinen <i>D. discoideum</i> mittels konfokaler Mikroskopie	54
3.5.1 Mutantenstämme	54
3.5.2 Proteinaggregate in Anwesenheit von DMSO	55
3.5.3 Proteinaggregate auch bei Filaktinsequenzen?	55
3.5.4 Stressreaktion durch DMSO	58
3.5.4.1 GFP - Cofilin ist Bestandteil nukleärer Aktinaggregate	58
3.5.4.2 In Filaktin Knock-Out Zellen ist die nukleäre Bündel-Bildung deutlich verlangsamt	59
3.5.4.3 Filaktin GFP-Fusionsproteine (FiaFullLength) sind nicht Bestandteil nukleärer Aktinbündel	59
3.5.4.4 Filaktin GFP Istl Protein verhält sich trotz später Anreicherung im Kern nicht wie Aktin	60

3.5.4.5 GFP Filamin-Ig-ähnliche Wiederholungen lokalisierten mit Aktin im Zytoplasma sowie im Zellkern der fixierten Zellen	61
3.5.4.6 Filaktin GFP-Fusionsprotein (FiaAct) reagierte auf DMSO induzierten Stress ohne Co-Lokalisation in den Aktin-Rods	62
4 Diskussion	63
5 Abbildungsverzeichnis	68
6 Literaturverzeichnis	70
7 Abkürzungen.....	76
8 Danksagung	78

Zusammenfassung

Die gerichtete Bewegung von Einzelzellen oder ganzen Geweben hat sich als eine essentielle Voraussetzung für das Überleben von Organismen schon sehr bald in der Evolution entwickelt. Die molekulare Grundlage ist die Dynamik des Aktin Zytoskeletts, das sich vor allem in Nicht-Muskelzellen ständig auf Signale von außerhalb der Zelle einstellen muss. Die Bedeutung dieser zellulären Abläufe spiegelt sich im extremen Evolutionsdruck wider, der z.B. Proteine wie Aktin oder das Aktin-bindende Protein Filamin über Milliarden von Jahren nahezu unverändert weitergegeben hat.

Es war das Ziel dieser Arbeit, das intrazelluläre Verhalten von Filaktin, einer Aktinvariante mit großer Homologie zu menschlichem Aktin und Filamin, zu untersuchen. Die Experimente wurden an der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum* durchgeführt, die durch die Möglichkeit gentechnischer, zellbiologischer und biochemischer Versuchsansätze, durch die Aufklärung des gesamten Genoms und vor allem durch ihre Aktin-getriebene gerichtete Zellbewegung als wichtiges Leukozyten Modellsystem eingestuft wird (Parent 2004).

Es wurden insbesondere zwei experimentelle Strategien verfolgt:

- I. die Transformation der amöboiden Zellen mit ausgewählten DNA Konstrukten
- II. die zellbiologische Analyse der Transformanten am konfokalen Mikroskop

Zunächst wurden im ersten Teil der Arbeit gentechnisch veränderte Expressionskonstrukte kloniert, die vor allem als GFP-Fusionsproteine im Fluoreszenzmikroskop die Analyse der subzellulären Verteilung der jeweiligen

Domänen ermöglichen sollten. Die konventionelle Klonierung der Aktindomäne von Filaktin erwies sich aber als äußerst schwierig. Wahrscheinlich aufgrund sekundärer DNA-Faltungen scheiterten die verschiedenen Versuchsansätze vor allem bei der Ligation der PCR Produkte in den Expressionsvektor. In einer unkonventionellen Strategie wurde deshalb der gesamte Vektor, der die vollständige Filaktin cDNA als Insert enthielt, gegenläufig PCR-amplifiziert. Dieser Ansatz war erfolgreich, führte zu einem PCR Produkt von nahezu 7.000 Basenpaaren und war durch spezifische Primer so begrenzt, dass nach der Ligation und der Transformation des PCR Produkts in *D. discoideum* Amöben eine GFP-markierte Aktindomäne exprimiert werden konnte. Weitere GFP-Konstrukte und auch verschiedene *D. discoideum* Transformanten lagen bereits vor. Unter den Transformanten war die Filaktin 'Knockout' Mutante FiaKO besonders wichtig. In der Regel wurde die Expression aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten GFP-Fusionsproteine durch Western Blots und GFP-Antikörper überprüft.

Die zellbiologische Analyse der Transformanten am konfokalen Mikroskop erfolgte nach künstlich induziertem Stress der Zelle durch Inkubation mit 5% DMSO für jeweils 0, 5, 15, 30, 60, 90 Min. Hier zeigten sich verschiedenste Veränderungen innerhalb der Zelle. Hauptaugenmerk lag auf der Bildung und Veränderung von Aktinaggregaten innerhalb der Zellkerne, sowie auf dem Verhalten verschiedener Filaktindomänen. Sechs Transformanten mit jeweils unterschiedlichen Filaktinkonstrukten wurden während der Arbeit untersucht und die jeweiligen Unterschiede bei der Aktin-Aggregatbildung dokumentiert. Diese Aggregate ähneln den stäbchenförmigen intranukleären Strukturen, die für die Entstehung der Nemalin-Myopathien verantwortlich sein dürften.

Die Aktin-Aggregatbildung bei der Filaktin-minus Mutante und den GFP-FiaFL Zellen war verlangsamt. Bei den Zelllinien FiaKO GFP-Ist1 (Ist1 = N-terminale Domäne in Filaktin) und FiaKO GFP-FilR (FilR = Filamin-ähnliche Wiederholungen in der N-terminalen Hälfte von Filaktin) war die Aktin-Aggregatbildung inhomogen. Normalerweise mündet die Bildung in einer klar differenzierten Stäbchenform.

Die vorliegenden Ergebnisse stellen eine wichtige Basis für eine weitere Erforschung der Nemalin-Myopathie dar. Eine Ablagerung stäbchenförmiger Proteinaggregate in den Kernen einer Muskelzelle korreliert ganz offensichtlich mit den beobachteten Muskelschwächen und Entwicklungsstörungen. Die Entstehung und Zusammensetzung von Aktin-Aggregaten muss auf molekularer Ebene aber erst gut verstanden sein, bevor es gelingen kann, bestimmte Konstrukte aus den Zellkernen fernzuhalten oder eine stabile Etablierung der Aktinaggregate im Zellkern zu verhindern

1 Einleitung

1.1 Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen

Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen ist ein kompliziertes Netzwerk aus Proteinfilamenten, welche sich durch das gesamte Zytoplasma erstrecken. In den meisten Fällen besteht das Gerüst des Zytoskeletts aus drei Filamenttypen: Intermediärfilamente, Mikrotubuli und Aktinfilamente. Jeder der drei Filamenttypen besteht aus charakteristischen Bausteinen und besitzt eine unterschiedliche Anordnung und Funktion innerhalb der Zelle (Fletcher und Mullins 2010).

Die Intermediärfilamente (Durchmesser ca. 10 nm) sind aus lang gestreckten fibrillären Proteinen aufgebaut. Sie verleihen der Zelle eine große Zugfestigkeit und eine große Widerstandsfähigkeit bei mechanischen Belastungen. Deshalb führen Mutationen bei den Intermediärfilamenten der menschlichen Haut vor allem zur Blasenbildung, da schon kleine mechanische Beanspruchungen zu einer Desintegration des Hautgewebes führen (Lammerding et al. 2004). Die strukturbildenden Proteine der Intermediärfilamente sind gewebespezifisch und dadurch exzellente Tumormarker. Als besonders wichtige Beispiele seien hier nur die Proteine Keratin (Haut, Haare), Desmin (Muskel) oder Vimentin (u.a. Nicht-Muskelzellen des Bindegewebes) genannt (Coulombe et al. 2000).

Mikrotubuli sind eher steife Proteinröhren (Durchmesser 24 nm), die an einer Stelle der Zelle zerfallen und an der anderen schnell und je nach Gebrauch aufgebaut werden können (dynamische Instabilität) (Davenport et al. 2005). Die Grundbausteine sind Tubulin-Dimere aus α - und β -Untereinheiten. Die Hauptaufgaben der Mikrotubuli sind vor allem die exakte Chromosomentrennung bei der Zellteilung und die Gewährleistung des Stofftransports mit Hilfe von

Motorproteinen entlang der Mikrotubuli, die in diesem Fall als Schienensystem für den Transport von Vesikeln, Organellen und anderen Zellbestandteilen innerhalb der Zelle bereitstehen (Cooper 2013). Auch Aktinfilamente sind für die eukaryontische Zelle essentiell. Das Aktinzytoskelett ist unentbehrlich für gerichtete und ungerichtete Zellbewegungen, für die Kontraktion von Muskelzellen, für Formveränderungen der Zelle oder auch intrazelluläre Transportprozesse wie Endo - und Exozytose (Schleicher 2008). Es wird als Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit gesondert besprochen.

1.2 Das Aktinfilamentsystem, seine Struktur und Funktion

Aktin repräsentiert in einer typischen tierischen Zelle ungefähr 5% der Gesamtproteinmenge. Davon ist die Hälfte in Aktinfilamenten (F-Aktin) eingebaut, während die andere Hälfte in Form von Aktinmonomeren (G-Aktin) frei oder im Komplex mit Monomer - sequestrierenden Proteinen (z.B. Profilin, Thymosin) im Zytosol vorliegt (Eichinger et al. 2001). Obwohl F-Aktin im gesamten Zytoplasma einer eukaryontischen Zelle anzutreffen ist, findet es sich in den meisten Nicht-Muskelzellen insbesondere in einer Schicht direkt unterhalb der Plasmamembran, dem sogenannten Zellkortex. Hier sind Aktinfilamente mithilfe Filament - vernetzender Proteine zu einem Geflecht verknüpft (Alberts et al. 2012).

Aktinfilamente und die Umlagerung der Aktinfilamente im Cortexbereich stellen die molekulare Grundlage für morphologische Änderungen der Zelle und für ihre Fortbewegung dar. So bewegen sich Neutrophile amöboid vorwärts und koordinieren mit Hilfe des Aktinsystems die für die Chemotaxis typische gerichtete Zellmotilität bei der Suche nach Bakterien oder bei der Wanderung in die Richtung von

Entzündungsherden. Auch die Regeneration von Skelettmuskel durch die gerichtete Bewegung von Satellitenzellen wäre ohne die Dynamik des Mikrofilamentsystems nicht möglich.

Aktinfilamente erscheinen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als feine Fäden von ca. 7-10 nm im Durchmesser. Die Schwankungen im Durchmesser sind auf die spirale Anordnung der Aktinmonomeren im Filament, das aus zwei umeinander gewundenen Helices besteht, zurückzuführen.

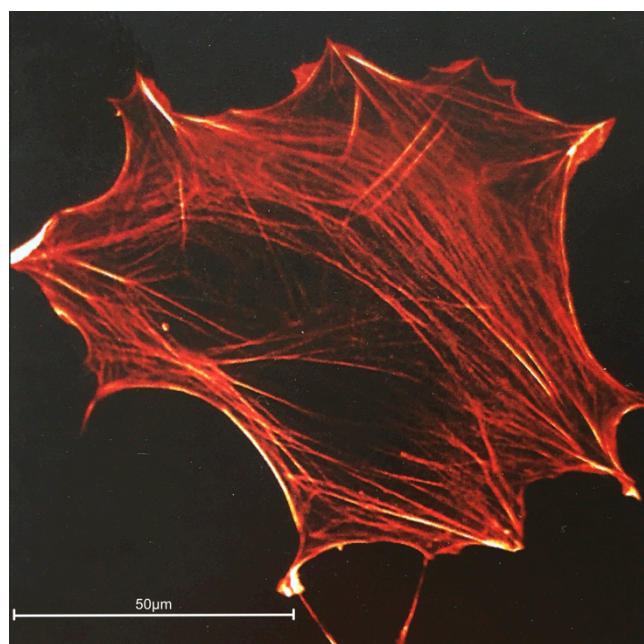


Abbildung 1: Zytoskelett einer Eukaryontenzelle

Rot gefärbte Bündel von Aktinfilamenten strahlen in der Nähe des Zellkerns aus und wirken bei der Formgebung der Zelle mit (modifiziert nach Alberts et al. 2012)

Auffällig ist die hochkonservierte Proteinsequenz von Aktin, was auf einen extremen evolutionären Druck hinweist. Dagegen variiert die Anzahl der Gene, die die Erbinformation für das Aktinprotein beinhalten, drastisch. So besitzt die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* nur ein einziges Aktin-Gen (Goffeau et al. 1996), während die Maus oder die Pflanze *Arabidopsis thaliana* 35 beziehungsweise 10 Gene besitzen.

Das *D. discoideum* Genom beinhaltet 41 Gene, die für Aktin und Aktin-verwandte Proteine kodieren. Innerhalb dieser AktinGruppe existiert eine sog. Act 8 - Gruppe, welche übergeordnet für 17 identische Aktinisoformen steht. 95% des Gesamtaktins der *D. discoideum* Zelle werden durch die Isoformen der Act 8-Gruppe beigesteuert. Das Aktin der Act 8 - Gruppe repräsentiert ein nahezu perfektes zytoplasmatisches Aktin, welches während der evolutionären Entwicklung konserviert blieb (Joseph et al. 2008; Vandekerckhove et al. 1980).

1.3 Filaktin

Das Protein Filaktin ist modular aufgebaut und weist in der C-terminalen Hälfte so große Homologien zu Aktin auf, dass man das Protein als eine Aktinvariante mit verlängertem N - Terminus definieren kann. Interessanterweise waren es zwei eher kurze Filamin - ähnliche Proteinabschnitte in der N-terminalen Hälfte, die zur Entdeckung des Proteins geführt hatten. Es wurde zunächst beim Modellorganismus *D. discoideum* im Zuge des Genomprojekts bei der Suche nach Filamin - ähnlichen Proteinen an der Universität zu Köln identifiziert (Eichinger et al. 2001; Glöckner et al. 2002).

Filamine sind lange, biegsame, aktinbindende Proteine, welche dreidimensionale Aktinnetzwerke 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). Am C-terminalen Ende besitzen Filamine flexible Anteile, die im Dimer zu der typischen V-oder Y-Form führen (Hartwig und Stossel, 1981). Diese Struktur erlaubt bei der Quervernetzung der Aktinfilamente die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerks, das mit einer

hohen Stabilisierung des Mikrofilamentsystems einhergeht. Die drei Filamin-Isoformen des Menschen sind: Filamin A (α -Filamin), Filamin B (β -Filamin) und Filamin C (γ -Filamin). Wie wichtig dieses Protein für den Menschen ist, zeigt sich bei fehlender Expression. So ist eine große Bandbreite an angeborenen Defekten (z.B. FG Syndrom, sog. Opitz - Kaveggia - Syndrom) nachgewiesen (Unger et al. 2007). Des Weiteren kommt es bei einer gestörten Filaminexpression häufiger zu Brust- und Colonkarzinomen (Sjoblom et al. 2006).

Filaktin wird aus 944 Aminosäuren aufgebaut, was zu einem berechneten Molekulargewicht von etwa 105 kDa führt. Der modulare Aufbau des Proteins ist insbesondere an der konservierten Aktin - Domäne in der C - terminalen Hälfte und zwei Filamin - ähnlichen Immunglobulin Motiven in der N - terminalen Hälfte zu erkennen (s. Abb. 2). Die Homologien zu Filamin und Aktin waren für die Bezeichnung des Proteins als ‚Filaktin‘ ausschlaggebend. Filaktin kommt offensichtlich nicht ubiquitär vor. Bisher wurde es nur bei *D. discoideum* und anderen Dictyosteliden, sowie beim pathogenen Einzeller *Entamoeba histolytica* gefunden.

Die Funktionen von Filaktins im Zytoskelett sind noch weitgehend unklar. Es ist zu vermuten, dass die Aktindomäne für die Dynamik der Polymerisation und somit für das Mikrofilamentsystem insgesamt eine gewisse Rolle spielt (Gallinger 2013). Eine erst kürzlich identifizierte N-terminale Ist1-ähnliche Domäne wird eventuell im endosomalen Transportsystem genutzt. Dort gibt es einen sog. ‚ESCRT-III pathway‘, bei dem diese Domäne eine Rolle spielen dürfte (Gallinger 2013). Es zeigt, welche vielfältigen Einflüsse das Protein haben könnte.

Die Domäne zwischen Ist1- und Aktin-Domäne wird Filamin - ähnliche Immunglobulin - Wiederholung genannt. Auch hier sind die Funktionen noch nicht

klar. Man nimmt an, dass die Funktion der Filamin - ähnlichen Immunglobulin-Wiederholung bei der Faltung des Proteins zum Tragen kommt. Des Weiteren verknüpft dieser Sequenzabschnitt eventuell F-Aktin mit Caveolae, die z.B. bei der sog. transzellulären Diapedese eine Rolle spielen. Diese Hypothesen sind allerdings bis dato experimentell noch nicht bestätigt.

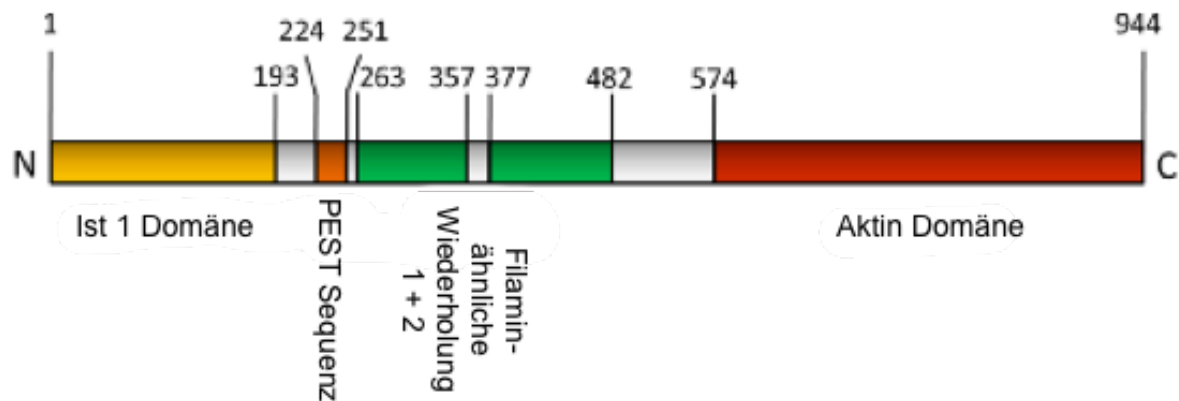


Abbildung 2: Schematische Organisation der Aktinvariante Filaktin

Die Abbildung zeigt die Aktin Domäne (rot), welche am C Terminus lokalisiert ist, eine Ist1 Domäne (gelb) am N Terminus, der eine PEST Sequenz (orange) und zwei Filamin-ähnliche Wiederholungen (jeweils grün) folgen. Die Aktin Domäne (rot) zeigt eine hohe Homologie zu humanem Muskelaktin. Filaktin besteht aus 944 Aminosäuren, welche eine ungefähre Masse von 105.000 Da ergeben. Die Ist1 Domäne könnte eine Verbindung mit dem ESCRT-Weg vermitteln, die Filamin-ähnlichen Wiederholungen und die Aktin Domäne lassen zytoskelettäre Funktionen vermuten

1.3.1 Proteinsequenz von Filaktin

Da die Entdeckung und die ersten Analysen von Filaktin bisher noch nicht veröffentlicht sind, sollen hier zum besseren Verständnis der Versuchsansätze die Proteinsequenz und die berechneten dreidimensionalen Strukturen eingefügt werden.

Die Farbmarkierung entspricht der Kodierung in Abbildung 2.

MTGFSIPNMSMLLKLANSRLVLHKNKNFEQSNVHKKEIAELLQLGKEEQARVRTVSVINEDYHTEVLGI
 LIYCETLANRIRGIEGVKVCPPDLKEACCSIIIFASPYLDKQVELYKIRKRLIEKFGKKFPFEECIDCCCINP
 KIVHRLSNKPPEESLVNYYLSNIAKKHNVAWDTPALPPLVDLQQSIPDFTLTSLAEQFPSAPSNGSGG
 GGNDLLMDFPSVPKESTATIDQFPSPPTSNISTTSTTTTTKLEFPNINNIPSIGIAEASQCKVSGDGL
 KKGIVGRECSFIIQAYDAKGNKHTKGGETFNVLIQQGYGDQLYGKVVDDQNGTYNVTYTPPKAGGYA
 IAIYLQNTPIGDQQPHISNIDEAPTISVGA~~LDLVDPLKCEAYGPGLETGSPGVLSTFTIVARTSKGNPIEA~~
 GKLPPGQRFYVFGPPGIQHGDIKNNNDGFTATYTPTVAGGYGVMVYYENQPIRSEAWTFFLEK
 EKAPPKFPSIINVPLQQQVASTESEEDMDKLWKQTSDFSFPVKSTAVIENYADAKAANIPEPPSF
 AKYQESIAKSSRAEFFQKIT~~EKTLVIDNGSGMVKAGFAGEDAPRCVFPSIIGYPMFNSVMHGMGKDK~~
~~YIGDEAQAKRGILNIKYPPIEHGIITNWNDMEALWEYFTTNELRVDASKHPVLLTEPPLNPKANRERMVE~~
~~TMFEYFNTPAVYIAIQAVLSLYASGRTTGTVLDCGDGVCHTVPIYEGYSIPHAIKRIDIGGRDITEYLMR~~
~~LLTERGYAFTTTAEREIVRDIKEKTSFVSQDFYASMNAPEDNNILKDYTMPDKQVLTIGKERFRCYEA~~
~~FDPSVLGKDQNGIHLLNETITSCDIDIRDLKYNIVVSGGSTMATGFELKRLQKEMELLVSNPQVQIKIN~~
~~APPNRDISVWCGGSVLGDLKTFSDQWITKQEYDEVGRGIVHRKCF~~

Abbildung 3: Proteinsequenz von *D. discoideum* Filaktin

Die wichtigsten Domänen vom N- zum C-Terminus sind die Ist1-Domäne (ocker), eine durch Computeranalysen vorhergesagte kurze PEST Domäne (orange) mit ihren gehäuft auftretenden Prolin, Serin und Threonin Resten, die beiden Ig/Filamin-ähnlichen Domänen (grün) und die Aktindomäne auf der C-terminalen Seite (rot).

1.3.2 Berechnete Struktur der Aktindomäne

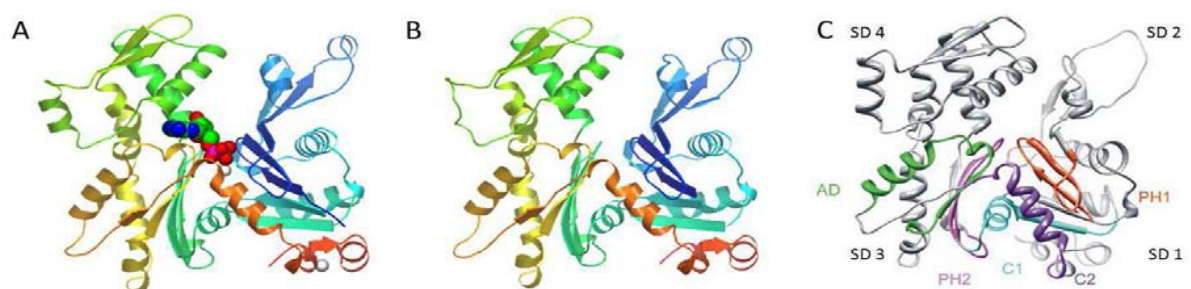


Abbildung 4: Berechnetes Modell der Filaktin Aktin-Domäne A

Kristallstruktur des *Oryctolagus cuniculus* Aktin (PDB 1J6ZA; Otterbein 2001), die als Vorlage verwendet wurde, um die mutmaßliche Struktur der in **B** gezeigten Filaktin Aktindomäne zu errechnen. **C**) Modell von *D. discoideum* act8 in vier Teilbereiche gegliedert (SD 1-SD 4) (modifiziert nach Joseph et al. 2008). Fünf extrem konservierte Sequenzmotive säumen die Nukleotid-Bindungstasche: die Adenosin-bindende Schleife AD (grün), die beiden Phosphatbindungsschleifen PH1 und PH2 (rot und lila) und die Sub-Anschluss Motive C1 und C2 (blau und violett), (mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Julia Gallinger)

1.4 Nemalin-Myopathien

Unter der Bezeichnung 'Nemalin-Myopathien' versteht man vor allem die Ablagerung stäbchenförmiger Proteinaggregate in der Muskelzelle und die mit dieser Ablagerung einhergehenden Muskelschwäche (Nowak et al. 1999). Sowohl Symptomatik als auch die molekularen Grundlagen sind außerordentlich vielfältig. So können sich Aggregate aus mutiertem Aktin, Nebulin, Cofilin, Troponin, Tropomyosin usw. bilden; die faden- oder bündelförmigen Ablagerungen können im Zytoplasma oder im Kern auftreten; die Krankheit ist oft kongenital (Mutationen) und betrifft vor allem Kinder, sie kann aber auch erst im Erwachsenenalter auftreten (Sparrow et al. 2003). Aufbau und Biophysik der Nemalinkörper sind noch wenig untersucht. Es ist anzunehmen, dass bei intranukleären Nemalin-Myopathien vor allem durch die ständige Kontraktion der Muskelzellen eine Schädigung des Chromatins auftritt, was letztendlich zum Absterben der Muskelzelle führt (Hutchinson et al. 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind vor allem die Intranukleäre Rod Myopathien (IRM) interessant. Charakteristisch sind intranukleäre stäbchenförmige Aktin-Aggregate in Muskel- aber auch Nicht-Muskelzellen, die durch einen künstlich hervorgerufenen Stress induziert werden können (Domazetovska et al. 2007).

So ist bei auftretenden Aggregaten innerhalb des Zellkerns eine verminderte Zellproliferation bestätigt und die Konformationsänderung ist zu einer hohen Wahrscheinlichkeit sogar toxisch für die Zelle (Stüven et al. 2003) bzw. beeinflusst ihr Proliferationspotential negativ (Wada et al. 1998). Das Auftreten der aggregierten Zelleinschlüsse häuft sich, je älter der Patient wird (Kaimaktchiev et al. 2006). Kaimaktchiev et al. (2006) vermuten zudem einen Zusammenhang des Ausbruchs der Krankheit mit einer Mutation im ActA1 Gen (Punktmutation Val163Leu).

Mikroskopisch sind die länglichen Aggregate durch Muskelbiopsien nachzuweisen. Muskelbiopsien sind meist ambulante Verfahren, bei denen nach örtlicher Betäubung Gewebe von einem Muskel, welcher von der Krankheit betroffen ist, entnommen und im Anschluss analysiert wird (Goebel et al. 2005). Domazetovska et al. (2007) beschreiben außerdem, dass sich die stäbchenförmigen Aktinverbindungen negativ auf Zellfunktionen auswirken und zur Pathologie beim Menschen führen. Das pathologische Erscheinungsbild wurde erstmals von Shy et al. (1963) nach o. g. Muskelbiopsien publiziert. Die erste Beschreibung der Krankheit erfolgte schon 1958 durch Dr. Douglas Reye, wurde aber durch eine falsche Interpretation seiner Forschung nie veröffentlicht (Schnell et al. 2000).

Wie es allerdings im Detail zu dieser Krankheit bzw. den Entwicklungen der Stäbchenformen kommt, ist nicht vollständig geklärt. Das klinische Bild der Patienten ist ein negativer Befund der standardisierten neonatalen Bluttests, wobei kein abnormales Erscheinungsbild bei der Computertomographie des Kopfes bzw. des Gehirns zu erkennen ist. Es zeigen jedoch alle Patienten eine verminderte Entwicklung der Sprache und der motorischen Fähigkeiten, einen starken Hypotonus sowie geringe körperliche Belastbarkeit, verminderte Sehnenreflexe und im Durchschnitt eine verminderte Lebenserwartung (Kaimaktchiev et al. 2006).

1.5 *Dictyostelium discoideum*

1.5.1 *D. discoideum* als Modellorganismus

In dieser Arbeit wird der Modellorganismus *D. discoideum* benutzt, um die IRM näher zu untersuchen. Mit der Hilfe von *D. discoideum* sollen also medizinisch und klinisch relevante Themen und Zusammenhänge im Detail analysiert werden.

Die Amöbe *D. discoideum* ist haploid und zeigt in der vegetativen Phase eine Größe von 10-20 Mikrometer. Die ungerichtete Fortbewegung dieses Einzellers findet durch zahlreiche Pseudopodien statt (Bonner, 1950). *D. discoideum*, ein Vertreter der sozialen Amöben, ernährt sich bei ausreichender Verfügbarkeit von Bakterien durch Phagozytose (Wachstumsphase). Die Zellen sind sehr beweglich und spüren die Nahrung durch Chemotaxis auf (Gaudet et al. 2008).

Die Amöbe *D. discoideum* ist in der Lage, mittels eines Glykoproteins, dem sog. PSF (Pre-Starvation-Factor, Faktor für Nahrungsknappheit), abzuschätzen, welches Verhältnis zwischen Nahrungsquelle und der eigenen Populationsdichte vorliegt. Entsteht ein Ungleichgewicht im Konzentrationsverhältnis zu Lasten der Nahrung, leitet die Zelle die Hungerphase ein. Dies ist gleichzeitig auch der fließende Übergang zur mehrzelligen Entwicklungsphase (Gaudet et al. 2008).

Tritt eine Hungerperiode auf, können bis zu 100 000 Zellen aggregieren. Dies wird durch extrazelluläre Gradienten von cAMP gelenkt, das üblicherweise nur als intrazellulärer Botenstoff verwendet wird.

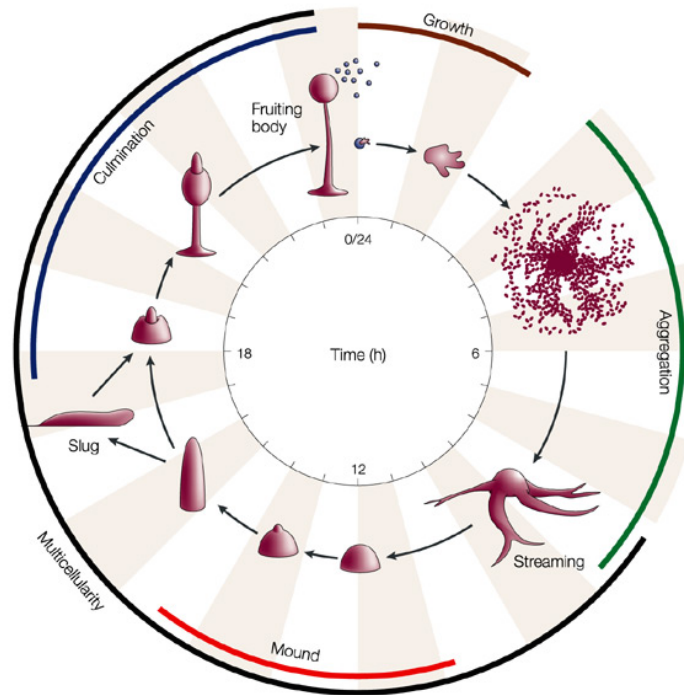


Abbildung 5: *D. discoideum* Entwicklungszyklus (Chisholm und Firtel, 2004)

Einzelne Zellen beginnen den Entwicklungszyklus aus einem Fruchtkörper heraus. Die einzelnen Sporen befinden sich in einem abgekapselten Kopf des Fruchtkörpers. Induziert durch cAMP formt sich bei Versiegen der Nahrungsquelle dann ein multizellulärer Organismus, bei dem sich einfache Gewebe ausdifferenzieren können. Eine Zellaggregation (grün) ist typisch für den ersten Teil der Morphogenese. Der resultierende vielzellige Organismus gleicht einem sog. Hügel (rot). Die Entwicklung endet in einem Fruchtkörper, dessen keimfähige Sporen ungünstige Umweltbedingungen überdauern können (blau).

Nach der Aggregation zu einem Zellhaufen und einer motilen länglichen Masse (sog. Slug) differenzieren sich die Zellen zu primitiven Geweben, die schließlich zur Ausbildung von Sporen (80%) bzw. Stiel- und Diskzellen (20%) führen. Unter Laborbedingungen läuft diese Entwicklung in 24 h ab. Bei günstigeren Bedingungen können die widerstandsfähigen Sporen wieder eine teilungsfähige Zelle entlassen und sich so über Nahrungsengpässe retten (Kessin 2010).

D. discoideum ist also als Modellorganismus in mehrfacher Hinsicht bemerkenswert:

- (i) die amöboide Zellbewegung erlaubt direkte Vergleiche mit der Zellmigration von Neutrophilen
- (ii) durch den haploiden Chromosomensatz können molekulargenetisch bedingte

Defekte (z.B. nach gezielter Gendisruption) sofort sichtbar gemacht werden

(iii) durch die Chemotaxis-getriebene Aggregation in der Hungerphase bildet sich ein mehrzelliges Stadium, in dem mehrere unterschiedlich differenzierte Gewebe voneinander abgegrenzt werden können

(iv) die Anzucht der Zellen ist unproblematisch, wodurch auch ausgedehnte biochemische Versuchsansätze ermöglicht werden.

1.5.2 Nukleäre Aktin-Aggregate in *D. discoideum*

Fukui et al. (1978, 1979) berichten über Veränderungen des Zytoskeletts z.B. durch Zugabe von DMSO. Durch DMSO wird die Zelle einem milden und reversiblen Stress ausgesetzt, was zur Bildung von großen Aktinbündeln innerhalb des Interphase-Nukleus führt. Trotz dieser gezielten Manipulation ist noch nicht geklärt, inwiefern diese strukturelle Änderung auch ersichtliche Auswirkungen auf den Kern oder sogar auf die Expression verschiedener Gene im Kern hat. Die Versuche von Fukui (1978) schaffen allerdings eine Grundlage für die Untersuchung der nukleären Proteinaggregation und die Entstehung der IRM beim Menschen.

1.6 Ziel der Arbeit

Durch die sowohl medizinische als auch grundlegende Bedeutung von Aktinbündeln im Kern sollten diese Proteinaggregate in einem leicht zugänglichen Modellsystem detaillierter untersucht werden. Im Vordergrund standen dabei molekulargenetische und zellbiologische Methoden, die Aufschluss über die Entstehung, die Zusammensetzung und die Stabilität der supramolekularen Aktinstrukturen geben

konnten. Als Untersuchungsobjekt wurde *D. discoideum* verwendet, weil diese amöboide Zelle dem Verhalten von Leukozyten ähnelt, gleichzeitig aber umfangreiche gentechnische Versuchsansätze erlaubt (Devreotes 1988). Von besonderem Interesse waren die Proteine Aktin und die bisher unveröffentlichte Aktinvariante Filaktin. Beide Proteine sollten als GFP-Fusionsproteine eingesetzt werden, wobei auf schon existierende Filaktin-minus Mutanten und spezifische monoklonale Antikörper zurückgegriffen werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme, Antikörper, Inhibitoren und Antibiotika

Alkalische Phosphatase	Roche
DNA-Polymerase	Sigma
Lysozym	Sigma
Proteinkinase K	Sigma
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNase A	Sigma
T4 Poly Nucleotid Kinase	Finnzymes
T4 DNA Ligase	Finnzymes
Taq-Polymerase	New England Biolabs

2.1.2 Antikörper

Filaktin AK CT 4S-59-4	Daniela Rieger
Filaktin AK NT 3S-55-4	Daniela Rieger
GFP AK - K3 -184-2	Daniela Rieger
Ziege-anti-Maus- Antikörper	Dianova

2.1.3 Antibiotika

Ampicillin	Roth
Blasticidin S	Sigma
Geneticin (G418)	Sigma
Kanamyzin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Sigma

2.1.4 Reagenzien

Agarose	Cambrex
---------	---------

Alle nicht aufgeführten Chemikalien stammten in der Regel von Merck, Roth, Serva oder Sigma und hatten den Reinheitsgrad ‚p.a.‘.

2.1.5 Medien

Das Wasser zur Herstellung aller Medien und Puffer wurde über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) deionisiert. Die Medien und Puffer wurden (falls erforderlich) bei 120° autoklaviert.

Antibiotika wurden unter sterilen Bedingungen immer erst zu abgekühlten Medien gegeben.

2.1.6 Medien für die *D. discoideum*-Kultur

Soerensen-Puffer pH6,0:

14,6mM KH_2PO_4
 2,0mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 ggf. autoklavieren

SM-Agarplatten pH 6,4-6,5

10g Bacto-Pepton
 50mM Glucose
 1g Hefeextrakt
 4mM MgSO_4
 5,7mM KH_2PO_4
 16mM KH_2PO_4
 10-15g Agar
 mit H_2O bidest. auf 1 Liter auffüllen

AX-Medium (1l, pH=6,7)

14,3g Bakteriologisches Pepton
 7,15g Hefeextrakt
 3,5mM Na_2HPO_4
 3,5mM KH_2PO_4
 50mM Maltose (oder Glucose)

Phosphatagarplatten

12-15g Bacto-Agar
 in 1l Soerensen-Puffer (pH=6,0)

Kobalt-SM Plattenfür *Klebsiella aerogenes*

Bestandslösung $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ mit einer Konzentration von 100mg/ml ansetzen und autoklavieren

Dem bereits autoklavierten ca. 60°C warmen SM-Agar wurden dann pro Liter 3 ml der Bestandslösung zugesetzt.

Normalagar (1L)

15-20g Agar

1g Bacto-Peptide

1g Glucose

auf 1l mit Soerensenpuffer pH=6,0 einstellen

HL5 Medium (2l, pH=7,5)

10g Hefeextrakt

50mM Glukose

20g Proteose Pepton

1,25mM Na_2HPO_4 8,5mM KH_2PO_4

Das angesetzte Medium sollte bei max. 120°C und nicht länger als 20 Min. autoklaviert werden, da sonst der Zucker auskaramelisiert (Umschlag in tiefbraune Farbe) und damit eine Verlangsamung des Zellwachstums einhergehen kann.

Einfriermedium für die Aufbewahrung lebender Zellen

90ml AX-Medium oder Soerensen Puffer + 10ml Pferde-Serum (Sigma) + 10ml DMSO.

2.1.7 Medien für die *E. coli*-Kultur

LB-Medium

10g Bacto-Trypton

5g Hefe Extrakt

5g NaCl

in 1l H₂O

Antibiotikazusatz

LB-Amp-Medium

50µg/ml Ampicillin

Stocklösung: 50mg/ml (1:1000)

2.1.8 Puffer und Lösungen

TE-Puffer (pH 8,0)

10mM Tris/HCl

1mM EDTA

autoklavieren

PBS (pH 7,0)

70mM Na₂HPO₄

30mM KH₂PO₄

150mM NaCl

0,1% NaN₃

TE-Puffer (pH 8,0)

10mM Tris/HCl

1mM EDTA

autoklavieren

PBS (pH 7,0)70mM Na₂HPO₄30mM KH₂PO₄

150mM NaCl

0,1% NaN₃10-facher NCP - Puffer (pH 8,0)

100mM Tris/HCl

1,5 M NaCl

5ml Tween 20

0,2% NaN₃mit H₂O (bidest.) auf 1l auffüllen**2.1.9 Bakterienstämme***E.coli* Stämme DH10B

Invitrogen

K. aerogenes

(Williams 1976)

***D. discoideum*-Stämme**

AX2-214

wächst axenisch und auf Bakterienrasen,
Abkömmling des Freilandisolates NC4
(Raper, 1935), Wildtyp

AX2 GFP-Cofilin

GFP-Cofilin überexprimierende Zelllinie

AX2 GFP-FiaAct

GFP-Filaktin überexprimierende Zelllinie

<i>FiaKO</i>	Filaktin Knockout Zelllinie
<i>FiaKO GFP-FiaFL</i>	GFP-Filaktin überexprimierende Filaktin Knockout Zelllinie
<i>FiaKO GFP-FilR</i>	GFP-Filamin-ähnliche Ig-Wiederholungen überexprimierende Filaktin Knockout Zelllinie
<i>FiaKO GFP-Ist1</i>	GFP-Ist1 überexprimierende Filaktin Knockout Zelllinie

2.1.10 Vektoren

pUC 19	New England BioLabs
pGEX - 6P - 1 (GST)	GE Healthcare
pDEX GFP g418 N1	Meino Rohlf
pDEX- GFP- g418 N2	Meino Rohlf
pDrive	Qiagen

2.1.11 Primer

GTATCATCACCAATTGGAATGATATGG	Benni_seq_primer2_rev_FiaGFP_10.01.2011 (B. Kurfürst, 2011)
GTGTTTGTGCATACCGTGCCAATCTATG	Benni_seq_primer1_rev_FiaGFP_10.01.2011 (B. Kurfürst, 2011)
GACCCTTCAGTACTAGGT	Primer_Fia_Seq_CT_for (M. Rohlf)
GATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTT	GFP_seq_for (M. Rohlf)
GAATTCTTTCAAAAATCACTG	Primer_for (B. Kurfürst, 2011)
GGATCCACGGGTACCTTC	Primer_rev (B. Kurfürst, 2011)
GAATTCTTTCAAAAATC	Primer_for C2 Fia (J. Gallinger)
GATCCCATTTTAAGC	Primer_rev C2 Fia (J. Gallinger)

2.1.12 Geräte

Analysenwaage	Sartorius
Brutschrank (Bakterien, Hefen)	Memmert
Elektroporationsgerät	Bio-Rad
Entwicklermaschine	Bio-Rad
Konfokale Mikroskopie LSM	Zeiss
Kühlaggregat Multistar	Fryka
Laborwaage	Sartorius
Nuclepore-Filter	Corning Costar
PCR Thermocycler UNO	Biometra
pH- Meter 643	Knick
Protein Transblot Semi-Dry	Bio-Rad
Quarzküvetten Infrasil	Hellma
Rührer Combimag RET	Ika
Scanner	Hewlett Packard
Thermomixer	Eppendorf
Vortex	Merck
Wasserbäder, Schüttler	GFL

2.1.13 Mikroskopie

Axiovert 200M	Carl Zeiss
Axiovert 25	Carl Zeiss
Coverslip Glasplättchen	Euromex
LSM 510 Meta konfokales Mikroskop	Carl Zeiss
Stereomikroskop Wild M3	Wild Leitz

2.1.14 Weitere Materialien

3M Filterpapier	3M Filterpapier
Nylonmembran	Pall
Polyallomer-Röhrchen 1,5ml	Beckman
Röntgenfilm X-omat	Kodak
15 ml/50 ml Röhrchen	Falcon
1,5 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf

2.1.15 Zentrifugen

Optima TL 100 Ultrazentrifuge	Beckman
L80M Ultra- Zentrifuge	Beckman
J2-21M/E, J6-HC	Beckman
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hettich

Alle Zellen wurden stets in vorgekühlten (4°C) Zentrifugen geerntet. Die Zentrifugation von *D. discoideum*-Zellen erfolgte in 15 ml bzw. in 50 ml Falcon-Röhrchen bei 1000 g über 5 Min. bei 4°C.

Kleinere Mengen wurden in Eppendorf-Gefäßen in einer üblichen Tischzentrifuge durch kurzes Anzentrifugieren sedimentiert.

2.1.16 Software

Sigma Plot 2.01, Pages, Photoshop 5.5, Keynote, Office 2010/2011, Zeiss Zen 2009/2011

2.2 Methoden

2.2.1 Molekulare Methoden

2.2.1.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Standardprotokolle wurden im Wesentlichen wie beschrieben (Sambrook 2001) durchgeführt. Die DNA der *D. discoideum* Stämme wurde mit dem LYb Puffer (10 mM Tris pH 8,0, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,45% NP40, 0,45% Tween20, 0,5 µg / µl Proteinase K) (Charette 2004) isoliert. Die gesamte RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen) gereinigt und cDNA wurde anschließend unter Verwendung des High Fidelity Transcriptor cDNA Synthesis Kit (Roche) synthetisiert. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde entweder mit Taq-Polymerase oder Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. PCR-Produkte wurden in Expressionsvektoren unter Verwendung von Standardrestriktionsenzymen oder durch die Klonierung des PCR-Cloning Kits (Qiagen) kloniert. Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* mit Hilfe der Mini- und Maxiprep Kits (Roche, Macherey Nagel) gewonnen. Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode (Dagert 1979) hergestellt. Die Genauigkeit der DNA-Sequenzen, die in die entsprechenden Expressionsvektoren eingefügt wurden, konnte durch Sequenzierung unter Verwendung spezifischer Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) kontrolliert werden.

2.2.1.2 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in Agarosegelen mit einem Agarosegehalt von 0,7% (Sambrook 2001). Als Gel- und Laufpuffer wurde ein Loening-Puffer (36mM Tris (pH7,8), 34,3 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA) verwendet

(Loening 1967). Die Gele wurden vor dem Beladen der DNA Proben mit einer bekannten Standard-DNA-Leiter (RiboRuler, ThermoScientific) und einem Farbmarker (0,25% Bromphenolblau) versehen. Die Trennung der Proben erfolgte bei 7 V/cm. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel in Ethidiumbromid-Lösung (5µg/ml) für drei Min. eingefärbt und für 30 Min. in Wasser entfärbt. Danach konnten die Gele fotografisch bei UV-Licht (312nm) analysiert werden.

2.2.1.3 Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen

Der Restriktionsverdau der DNA erfolgte in 5 µl Proben-DNA mit den vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Puffersystemen und Mengen. Die zu verdauende DNA wurde bei 37°C für 2 Stunden inkubiert, anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und nach Standardprotokoll analysiert.

2.2.1.4 Ligation von DNA Fragmenten

Die gewonnenen DNA Fragmente wurden nach Protokoll (Roche) mit T4-DNA-Ligase über 16 Stunden bei 17°C verbunden. (20 µl Ansatz: 15µl Insert, 2µl Vektor, 2µl Puffer (10xT4 DNA Ligase Puffer, Roche), 1µl Ligase, Roche).

2.2.1.5 Transformation von *E. coli*

Nachdem 100 µl kompetente *E.coli* Zellen aus dem -80°C Vorrat für 10 Min. auf Eis aufgetaut waren, wurden sie zusammen mit 10 µl Ligationsprodukt bzw. 1 µl Vektor für 20 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C und folgender Abkühlung auf Eis wurde 1 ml LB zugegeben und die Transformation für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 g für 5 Min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in ca. 100 µl LB resuspendiert. Die Suspension wurde mit einem Glasspatel auf LB Amp.-Platten aufgetragen und

diese wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation entstanden Bakterien-Kolonien auf den Selektionsplatten.

2.2.1.6 Plasmid Mini/Maxi Präparation

Die molekularbiologische Isolierung von Plasmid - DNA wird Plasmidpräparation genannt. Je nachdem, welche Mengen an DNA isoliert werden sollen, spricht man von Mini-/Midi-/Maxipräparation. Die Präparation der DNA erfolgte nach dem Standardprotokoll der Firma Roche bei Minipräparationen und der Firma Machery-Nagel bei Maxipräparationen.

2.2.1.7 Messen der DNA Konzentration

Die DNA - Proben wurden in genormten Glasküvetten gemessen. Diese wurden gereinigt und zuerst mit der Referenz befüllt. Nach deren Messung wurde die Küvette mit der zu messenden Probe befüllt, ohne die Küvette von außen zu verunreinigen. Die Proben wurden immer in derselben Glasküvette gemessen, da geringfügige Produktionsunterschiede bestehen und die Messergebnisse verfälscht werden könnten.

DNA absorbiert UV Licht der Wellenlänge 260 nm. Die DNA-Konzentration wurde am OD-Meter mit einem vorprogrammierten Programm ‚Nucleic acids‘ bestimmt (der Verdünnungsfaktor beträgt normalerweise 200 bzw. 500). Zuerst wurde die Referenz (ddH₂O) gemessen. Die Reinheit der Probe sollte bestenfalls zwischen 1,8 - 2 liegen (Quotient aus den Messwerten der OD_{260nm} und der OD_{280nm}, welcher Proteinverunreinigungen anzeigt).

2.2.1.8 Kultivieren von axenischen *D. discoideum* Zellen

D. discoideum Kulturen wurden in Schüttelkultur oder in Petrischalen mit Flüssigmedium bei einer Temperatur von 21°C gehalten. Die Generationszeit des AX2-Wildtyps beträgt bei 21°C ca. 10 Stunden. *D. discoideum* Kulturen wurden bei 150 UpM geschüttelt. Die Zellen zeigten unter normalen Bedingungen eine logarithmische Wachstumskurve. Für alle zellbiologischen Experimente wurden Zellen in der logarithmischen Phase bei einer Dichte von $1-5 \times 10^6/\text{ml}$ verwendet. Die Kontrolle der Zelldichte erfolgte mittels der Neubauer Zählkammer. Zellen wurden bis zu 3 Wochen in Kultur gehalten, dann wieder erneut aus dem -80°C Vorrat aufgetaut.

2.2.1.9 Einfrieren von *D. discoideum*-Zellen

Axenische Zellen wurden herangezogen, bis eine Zelldichte von $2-3 \times 10^6 \text{ Z/ml}$ erreicht war. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit Einfriermedium auf $5 \times 10^7 \text{ Z/ml}$ eingestellt. Die Suspension wurde jeweils in 1 ml Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden in einen auf 4°C vorgekühlten Einfrierblock gestellt und darin 3 Stunden oder über Nacht im -80°C Gefrierschrank inkubiert. Danach wurden sie in den -80°C Gefrierschrank eingeordnet.

2.2.1.10 Auftauen von *D. discoideum*-Zellen

Beim Auftauen der *D. discoideum*-Zellen sollte auf rasches Arbeiten geachtet werden, da DMSO, welches im Einfriermedium enthalten ist, bei den Versuchszellen toxisch wirkt. Der Auftauvorgang kann bei ständigem Schütteln durch Wasser (Rt) beschleunigt werden. Der Inhalt der Ampulle wurde in 10 ml AX- bzw. in HL5 Medium resuspendiert und anschließend 5 Min. bei 1000 g abzentrifugiert. Das

Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und in eine Petrischale gegeben bzw. wurde eine Schüttelkultur damit angeimpft.

Nach ca. 24 Stunden wurde, falls erforderlich, das entsprechende Antibiotikum zugegeben.

2.2.1.11 Transformation von *D. discoideum* mittels Elektroporation

D. discoideum Zellen können ausgehend von einer Schüttelkultur oder von einer zusammen mit *K. aerogenes* bewachsenen SM - Platte transformiert werden. Pro Transformation wurden 2×10^7 Zellen eingesetzt. Die Schüttelkultur wurde 5 Min. bei 1000 g, 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet wurde mit gekühltem Soerensen - Puffer gewaschen. Die Zellen auf der *K. aerogenes*-Platte wurden mit gekühltem Soerensen - Puffer und einem Drygalsky-Spatel abgetragen und resuspendiert. Die Zellen wurden in diesem Fall für 5 Min. bei 1000 g und 4°C zentrifugiert und mit gekühltem Soerensen - Puffer gewaschen, um die Bakterienkonzentration in der Suspension bestmöglich zu verringern. Diesem Vorgang folgten zwei kurze Inkubationen mit auf Eis gekühltem, sterilem Elektroporationspuffer. Daraufhin wurden die Zellen auf eine Konzentration von 2×10^7 Z/ml eingestellt. Es wurden ca. 25 µg der jeweiligen DNA in 4mm Elektroporationsküvetten vorgelegt. Dann wurde 1 ml der mit Elektroporationspuffer auf die entsprechende Dichte eingestellten Zellen zugegeben. Die Elektroporation von *D. discoideum* wurde mit dem Bio-Rad Gene Pulser Xcell durchgeführt (Einstellungen: Rechteckstrom, V=1.kV, 1.0 ms Pulslänge, 2 Pulse, 5 Sekunden Pulsintervall).

Nach der Elektroporation wurden die Zellen wieder für zwei Minuten auf Eis gestellt. Danach folgte ein Transfer der Zellen in eine Petrischale, welche bei ca. 50 UpM für 15 Min. geschüttelt wurde. Daraufhin wurden 10µl einer 1 mM $MgCl_2/CaCl_2$ Lösung

hinzugefügt und weitere 15 Min. geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension in 12 ml HL5 Medium aufgenommen und auf zwei Petrischalen aufgeteilt. Jede Schale wurde dann auf ca. 12 ml mit Medium aufgefüllt. Im Falle, dass die transformierten Zellen von einer *K. aerogenes* SM-Platte stammten, wurde das Medium zusätzlich mit 10 µl einer Ampicillin/Streptomycin-Lösung (100 µg/µl) versetzt.

Am nächsten Tag wurde das entsprechende Antibiotikum dazugegeben, um die erfolgreich transformierten Zellen zu selektieren: G418 (10 µg/ml Medium) und/oder Blastidicin (5µg/ml Medium). Das Medium wurde dann alle zwei bis vier Tage gewechselt. Die Kolonien erschienen nach ca. 7-14 Tagen.

2.2.1.12 Kultur und Klonierung auf Bakterienrasen

Klebsiellakulturen wurden auf SM - Platten mittels Kobalt selektiert und bei 4°C aufbewahrt (Dauerkultur). Auf normalen SM-Platten wurden Tochterkulturen herangezogen. Mit einer sterilen Impföse wurde etwas Zellmaterial von der Oberfläche entnommen. Das Zellmaterial wurde in 2 – 4 ml HL5 Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden mittels steriler Einmalpipette ca. 5 Tropfen auf eine SM Platte gegeben. Mit der Methode ‚*spreader dilution*‘ lassen sich *D. discoideum* Zellen klonieren.

Ein bis drei Tropfen einer in ca. 3 ml Medium resuspendierten axenischen *D. discoideum* Kultur (z.B. erfolgreich transformierte Zellen) wurden auf die SM-Platte mit der noch nicht getrockneten *Klebsiella* - Suspension gegeben. Diese Zellen wurden mit einem sterilen Glasspatel über die gesamte Platte verteilt. Zwei nachfolgende *Klebsiella* - Platten wurden mit demselben Spatel bearbeitet, ohne dass weitere *D. discoideum* Zellsuspension zugegeben worden war. So entstand eine Verdünnungsreihe der Zellen. Nachdem die Platten angetrocknet waren,

wurden sie bei 21°C gelagert. Die Bakterien bildeten unter diesen Bedingungen sehr schnell einen gleichmäßigen Rasen. Nach ein bis zwei Tagen ließen sich kleine Fresshöfe auf den Platten erkennen. Diese Plaques entsprachen einzelnen klonierten *D. discoideum* Kulturen. Diese wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt und in 24-well Platten überführt, die mit Medium und entsprechender Selektion befüllt waren. Die Klone wurden so axenisch hochgezogen und deren erfolgreiche Transformation nochmals mithilfe des Mikroskops und/oder biochemischer Methoden bestätigt.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Immunblot („Western Blot“) – Nachweis der Antigene durch Chemilumineszenz oder Färbung

Um die erfolgreiche Transformation (z.B. das Vorhandensein von entsprechenden GFP-Fusionsproteinen) zu untersuchen, wurde die Methode des sog. Westernblottings angewandt. Für die SDS-PAGE (Laemmli, 1970) wurden 10 prozentige Trenngele hergestellt. Zuerst wurde die Zellzahl der zu analysierenden *D. discoideum* Zelllinien bestimmt, die entsprechenden Mengen abzentrifugiert und das Zellpellet in 3-fach konzentriertem SDS - Probenpuffer gelöst, so dass sich ein Äquivalent von 2×10^5 Zellen pro 10 µl SDS Extrakt ergab. Die Proben wurden mittels SDS - PAGE im Bio-Rad - Gelsystem aufgetrennt. Es wurde eine Spannung von ca.100 -120 V angelegt. Anschließend wurden die über die SDS - PAGE der Größe nach aufgetrennten Proteine mittels eines Semi-Dry Blots auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurden zunächst drei, in Blotting Puffer getränkte, Filterpapiere auf die Anoden-Platte gelegt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran ebenfalls kurz in Blotting Puffer angefeuchtet und auf die

Filterpapiere gelegt. Das Gel wurde direkt auf der Membran platziert, ohne dessen Position nachträglich zu verschieben. Auf das Gel folgten weitere drei Schichten Filterpapier. Luftblasen wurden durch sanftes Rollen über das ‚Blot-Sandwich‘ vermieden. Zuletzt wurde die Blot-Apparatur mit dem Kathoden-Deckel geschlossen.

Der Transfer der Proteine auf Nitrozellulose erfolgte mittels einer Bio-Rad Trans-Blot SD Apparatur. Es wurde über 75 Min. eine Spannung von 12 Volt angelegt. Dem Proteintransfer auf die Membran folgte das Abblocken unspezifischer Bindestellen. Dazu wurde die Membran mindestens eine Stunde bis über Nacht in NCP-Puffer (siehe: Puffer und Lösungen) mit 5% Magermilchpulver inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran 5x mit NCP-Puffer gewaschen (ca. 10 Min. je Waschgang).

Nach dem Waschen der Membran wurde diese mit dem primären Antikörper inkubiert (2 Stunden bis über Nacht bei 4°C). Nach Inkubation und erneutem Waschen mit NCP-Puffer wurde der sekundäre Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes Ziege-anti-Maus IgG) appliziert (1:5000 verdünnt). Dies geschah bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Vor der Nachweisreaktion musste nochmals gründlich mit NCP-Puffer gewaschen werden, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Bei der Nachweis-Reaktion mittels der Meerrettich-Peroxidase wird Luminol zu 3-Aminophthalat oxidiert. Diese Reaktion geht mit Lichtemission bei 428 nm einher, die durch bestimmte Chemikalien verstärkt wird. Um die Nachweis-Reaktion zu starten, wurde die Nitrozellulosemembran in einer frisch hergestellten Lösung von 1 ml Lösung A (0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 250 mM Luminol), 100 µl Lösung B (90 mM p-Cumarsäure in DMSO) und 0,3 µl 35%igem Wasserstoffperoxid für ca. 5 Min. inkubiert. Anschließend wurde in der Dunkelkammer ein Film auf die

behandelte Membran aufgelegt und nach entsprechender Belichtungszeit in einer Entwicklermaschine entwickelt.

2.2.2.2 Coomassie Blau-Färbung von Proteinen

Um unspezifisch alle in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine anzufärben, wurde dieses über Nacht in Coomassie-Färbelösung geschüttelt und anschließend in Entfärbelösung gegeben. Durch langsames Schütteln und Hinzufügen eines kleinen Stücks Papierhandtuch wurde nicht gebundener Farbstoff ausgewaschen.

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

2.2.2.3 Immunfluoreszenz an fixierten Zellen

<u>Puffer:</u>	<u>PBS/Glycin 100 mM Glycin:</u>
10-fach PBS pH 7,4	200 ml PBS
1370 mM NaCl	1,5 g Glycin
27 mM KCl	PBG (PBS + 0.5 % BSA, 0.045 % Fischgelatine) steril filtrieren
81 mM Na ₂ HPO ₄	in PBS
15 mM KH ₂ PO ₄	0,5 % BSA
in H ₂ O; pH 7,4	0,045 % Fischgelatine
zum Gebrauch mit 1:10 mit Aqua bidest verdünnen	<i>Haltbarkeit: aliquotiert bei -20°C</i>

PIPES-Puffer 20 mM, pH 6,0 (Piperazin-N, N'-bis-2-ethanesulfonic acid)

auf 100 ml

PIPES (Sigma P-6757) 0,605 g

Gelvatol

Fixierungen nach Standardprotokoll:

1.Methanol oder

2.Pikrinsäure-Paraformaldehyd oder

3.Glutaraldehyd-Formaldehyd

Sekundärer Antikörper (verdünnt in PBG):

Antikörper Goat Anti Mouse IgG, CY3, Dianova 115-165-062

1:1000 Verdünnung, üblicherweise 1h Inkubationszeit

Farbstoff	Firma	Verdünnung	Inkubationszeit
FITC-Phalloidin	Sigma P5282	1:200 - 1:2000	30min-1h
Rhodamin-Phalloidin	Sigma P5157	1.200 - 1:2000	30min-1h
DAPI	Sigma D1388	1:1000	10-15min

Um die zelluläre Lokalisation von Proteinen nachzuweisen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz angewandt. 30ml Kulturen wurden auf ca. 3×10^6 Z/ml wachsen gelassen. Die Zellen wurden bei 1000 U/Min. bei 4°C für 4 Min. abzentrifugiert. Danach wurden die Proben 2x mit Soerensenphosphatpuffer gewaschen und auf 5×10^5 Z/ml eingestellt. HCl-gereinigte Deckgläschen wurden auf eine mit Parafilm überzogene Glasplatte gelegt, die sich in einer feuchten Kammer befand. 300µl

Zellsuspension wurden pro Deckglas ausgebracht und nach 15-30 Min., damit sich die Zellen absetzen konnten, fixiert. Danach erfolgte eine erneute Spülung für 2 x 5 Min. mit PBS/Glycin und 2 x 15 Min. mit PBG.

Pro Deckgläschen wurden ca. 150 - 200µl zentrifugierte primäre Antikörperlösung verwendet und die Deckgläschen über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Im zweiten Schritt erfolgte nach erneuter Spülung mit PBG (4 x 5 Min. mit PBG) die Inkubation mit dem sekundären Antikörper auf ähnliche Weise. Anschließend erfolgte eine 5 minütige Spülung mit PBG, eine 5 minütige Spülung mit PBS und anschließend eine einmalige Spülung mit Aqua bidest. Die Proben wurden in das Einbettmedium (z.B. Gelvatol) eingelassen und die Objektträger bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Das Ziel der hier dargestellten Versuche war die Untersuchung qualitativer Veränderungen bei der Entstehung intranukleärer Aktin-Aggregate. Es wurden deshalb keine detaillierten quantitativen Erfassungen der Fluoreszenz-positiven Zellen durchgeführt.

Bei dem gewählten Versuchsansatz ist es aber trotzdem essentiell, Artefakte sauber ausschließen zu können. Es musste sichergestellt werden, dass die Abbildungen einzelner fluoreszierender Zellen einer statistisch signifikanten Population positiver Zellen entstammen. Bei einer typischen Immunfluoreszenz wurden in der Regel mindestens 150.000 Zellen auf ein Deckglas ausgebracht. Nach der Anheftung der Zellen und der Fixierung waren normalerweise 50% der Zellen immobilisiert und wurden mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Bei der Analyse im Fluoreszenzmikroskop wurden bei kleinster Vergrößerung routinemäßig über 1.000

Zellen in verschiedenen Bereichen des Deckglases auf die gleichmäßige Verteilung fluoreszierender Zellen überprüft. Die Expression der verschiedenen GFP-Konstrukte lag normalerweise bei 60-80% der Zellpopulationen, manchmal sogar bei über 95% der fixierten Zellen.

Es wurden also bei geringer Vergrößerung pro Experiment 600-950 Zellen als Fluoreszenz-positiv eingestuft. Von dieser Zellpopulation wurden dann bei starker Vergrößerung die in dieser Arbeit dargestellten Einzelzellen aufgenommen.

Die Abschätzung statistischer Signifikanz wurde durch biochemische Ansätze unterstützt. Typische Abbildungen sind die Abb. 14 und 15. Dort konnte durch SDS-Gelelektrophorese (jeweils 2×10^5 Zellen pro Spur) nach Anfärbung mit Coomassie Blue bzw. im Immunoblot nachgewiesen werden, dass die Expression aller dort gezeigten GFP-Konstrukte vergleichbar war.

3 Ergebnisse

Wie erwähnt, teilt sich die Arbeit in zwei Anteile. Im Folgenden ist nun die Transformation von *D. discoideum* mit ausgewählten DNA Konstrukten dargestellt.

3.1 Klonierung der Aktindomäne aus Filaktin

Ziel war es, die Aktindomäne aus Filaktin als GFP Fusionsprotein in *D. discoideum* zu exprimieren. Als Ausgangsmaterial standen zwei Vektoren zur Verfügung: zum einen der pDEX(g418)-GFP-N2-Filaktin full length, bei dem sich die GFP-Sequenz an N-terminaler Seite des Filaktins befindet; zum anderen der Vektor pDEX(g418)-GFP-C2-Filaktin full length, bei dem sich die GFP-Sequenz an C-terminaler Seite des Filaktins befindet. Beide Vektoren kodieren eine Geneticin (G418) - Resistenz. Zunächst sollte anhand dieser Vorlagen mittels Polymerasekettenreaktion nur die DNA, welche die Aktindomäne kodierende DNA amplifiziert, verdaut und in einen GFP-Vektor ligiert werden.

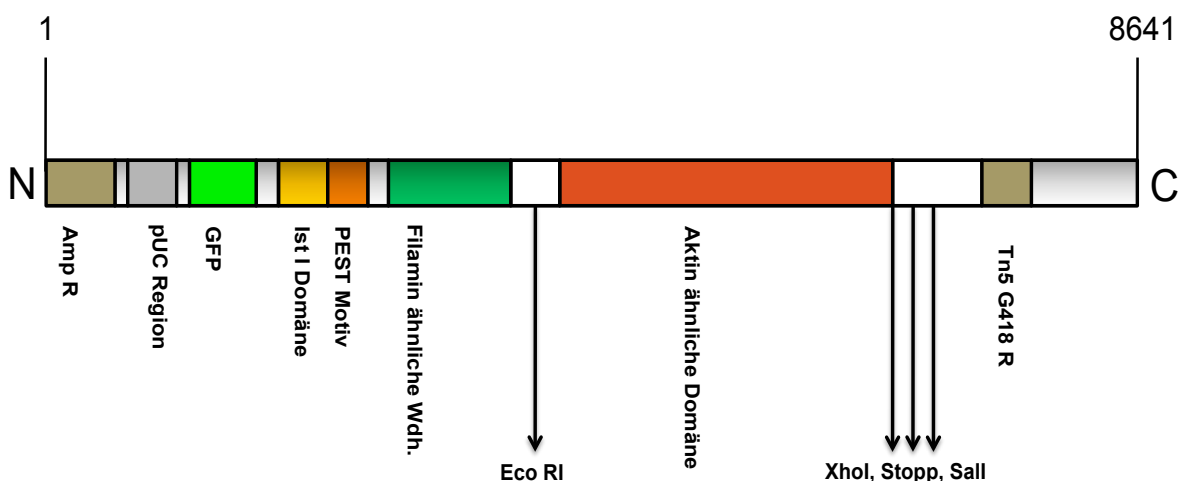


Abbildung 6: pDEX GFP g418 N2 Fia Full Length

Abbildung 6 zeigt den Ausgangsvektor pDEX-GFP(g418)N2-Fialaktin full length (Länge mit Insert 8641 Nukleotide). Die DNA, die für die Aktindomäne (rot) kodiert, sollte isoliert und in *D. discoideum* exprimiert werden. Die nötigen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Eco RI, Xho I und Sall sind jeweils am 5' und am 3' Ende der Aktindomäne (weiß).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
1  GGATCCATGCAAAAAATCACTGAAAAAACATTGGTTATCGATAATGGTAGTGGTATGGTTAAAGCAGGATTGCTGGTGAAGATGCTCCAAGATGTGTTT
      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
101 TCCCATCGATCATTTGGTTATCCAATGTTCAATTCAGTTATGCATGGTATGGGTAAAGATAAATACATTGGTGATGAAGCTCAAGCTAAACGTGGTATTCT
      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
201 CAATATTAAATACCCAATTGAACATGGTATCATCACCAATTGGAATGATATGGAAGCACTTTGGGAATATACATTACAAATGAACCTCGTGTGCGATGCT
      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
301 TCAAAACATCCAGTTTATTAACTGAACCACCACTTAATCCAAAAGCGAACAGAGAAAGAAATGGTCGAAACAATGTTGAATATTTCATACTCCTGCAG
      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
401 TTTATATAGCAATTCAAGCCGTTCTCTCTTTGTATGCATCTGGTCGTACCACCTGGTACCGTATTGGATTGTGGTGATGGTGTTCATACCGTGCCAAT
      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
501 CTATGAAGGTTATTCTATTCCACATGCAATTAAAAGAATCGATATCGGTGGTCGTGATATCACAGAGTATTTAATGCGTTTACTCACTGAAAGAGGTTAT
      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
601 GCTTTCACTACAACCGCCGAAAGAGAAATCGTACGTGATATCAAAGAGAAAACCTTCATTTGTCTCTCAAGATTCTATGCGCTCTATGAATGCTCCAGAGG
      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
701 ATAATAATATACTCAAGGATTATACGATGCCCGATAAACAAAGTTTAAACCATTGGTAAAGAAAGATTCCGTTGTTATGAAGCTTTCTTTGACCCTTCAGT
      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
801 ACTAGGTAAGATCAAAATGGTATTCATCACCTCTTAAATGAACTATCACCTCTTGTGATATTGATATTTCGTCGTGATCTCTATAAAAAATATTGTAGTT
      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
901 FCTGGTGGTTCAACAATGGCAACAGTTTTGAAAAACGTTTACAAAAGAAATGGAACCTTTAGTTTCAAATCCTCAAGTCCAAATTTAAATTAATGCAC
      1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100
1001 CACCAAAATCGTGATATTAGTGTTTGGTGTGGTGGTTCGGTTTTAGGTGATCTTAAAACTTTTTCGGATCAATGGATTACAAAACAAGAATATGATGAAGT
      1110      1120      1130      1140
1101 TGGTAGAGGAATTGTTTCATAGAAAATGTTTCTCGAGTAAAGTCGAC

```

Abbildung 7: Basensequenz des Filaktin-Aktin Konstruktes

Die kodierende Sequenz besteht aus 1110 Bb. Am 5' Ende befindet sich eine Schnittstelle für Restriktionsenzyme (rosa), BamHI (GGATCC) und ein Startcodon (ATG) (blau). Am 3' Ende befindet sich ebenfalls eine Schnittstelle für die Enzyme XhoI (CTCGAG) und Sall (GTCGAC, weiß), sowie das Stopp-Codon TAA (lila)

Als Vorlage für die PCR diene der Vektor pDEX(g418)-GFP-N2-Filaktin full length.

Mittels der Primer Actin-like NT forward (5'- GTG GGA TCC ATG CAA AAA ATC ACT G-3') und Actin-like CT reverse (5'-GTG GTC GAC TTA CTC GAG AAA ACA TTT TCT ATG-3') wurde ein Fragment amplifiziert, das eine 5' BamHI-Schnittstelle und eine 3' Sall-Schnittstelle besitzt. Der Primer Actin-like CT- reverse wurde so konzipiert, dass das Stopp-Codon durch eine eingefügte XhoI-Schnittstelle entfernt werden kann, um eine Klonierung in den pDEX(g418)-GFP-C2 Vektor zu ermöglichen, bei dem die für GFP kodierende Sequenz ohne Unterbrechung des Leserahmens an das 3' Ende fusioniert wird. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde

über das PCR Purification Kit (Roche) aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen BamHI und Sall verdaut. Die Vektoren pDEX(g418)-GFP-N2, pGEX-6P-1 und pUC19 wurden mit BamHI und Sall verdaut und zusätzlich mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert, um ein Schließen der Vektoren zu vermeiden. Vektoren und Insert (Abb. 7) mit den korrekt modifizierten Schnittstellen wurden wiederum über das PCR Purification Kit (Roche) aufgereinigt. Das Insert wurde in die jeweiligen Vektoren ligiert.

Ein Teil des Inserts wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI verdaut, um das Stopp-Codon zu entfernen, damit ein durchgehendes Anhängen der GFP-Sequenz ermöglicht wird. Auch in diesem Fall wurde der Vektor pDEX(g418)-GFP-C2 mit BamHI und Sall verdaut und dephosphoryliert. Er wurde mit Sall verdaut, da er keine XhoI-Schnittstelle besitzt. Die Restriktionsenzyme Sall und XhoI erzeugen allerdings die selben "sticky ends", die problemlos miteinander ligiert werden können.

Alle angestrebten Klonierungen waren nicht erfolgreich, so dass bei einem modifizierten Ansatz das PCR Produkt mit Hilfe des pDrive-Klonierungskits (Qiagen) direkt ohne Verdau in den pDrive Vektor ligiert wurde. Das pDrive Cloning Kit (Qiagen) erleichtert in der Regel schwierige Klonierungen. Der pDrive Vektor wird in linearer Form geliefert und trägt an den Enden einen Uracil-Überhang (Abb. 8). PCR-Produkte, die mit einer Taq-Polymerase ohne „proofreading“-Aktivität amplifiziert wurden, tragen an den Enden einen Adenosin-Überhang. Dadurch kann ein PCR-Produkt ohne weiteren Verdau direkt in den pDrive Vektor ligiert werden.

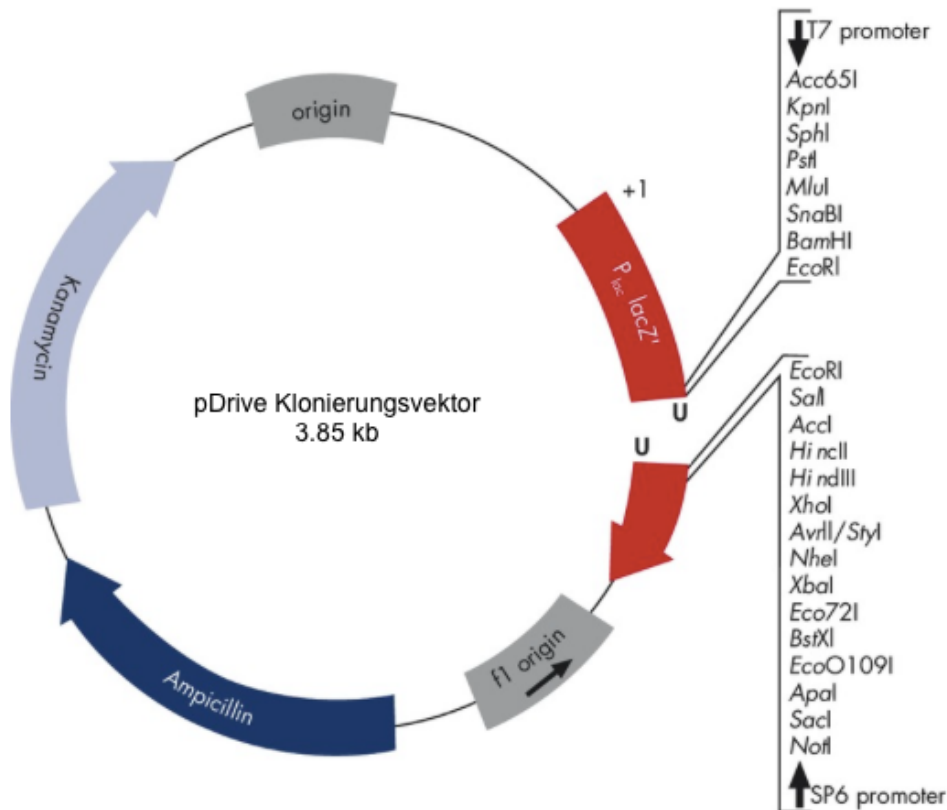


Abbildung 8: pDrive Klonierungsvektor

Der pDrive Klonierungsvektor (Zeichnung: Qiagen) zeigt viele Schnittstellen für u.a. BamHI, EcoRI, SalI und ist somit vielseitig verwendbar. Die überhängenden Uracil Reste erleichtern eine schnelle Ligation des PCR Produktes, welches durch eine Taq-Polymerase vervielfältigt wurde. Eine erfolgreiche Selektion der transformierten Bakterienstämme kann schließlich durch die Ampicillin- (dunkelblau) und Kanamycinresistenzen (hellblau) ausgeführt werden.

Da die PCR mit der Phusion Polymerase durchgeführt wurde, die eine „proofreading“-Aktivität besitzt, wurden nachträglich die Adenosin-Überhänge angefügt. Dazu wurde das PCR-Produkt mit einer Taq-Polymerase ohne „proofreading“-Aktivität und zusätzlichen zugegebenen Desoxyribo-Adenosintriphosphaten (dATPs) 15 Min. bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde das so modifizierte PCR-Produkt über das Kit aufgereinigt und entsprechend der Anleitung des Qiagen pDrive-Klonierungskit-Handbuchs in den pDrive Vektor ligiert. Der Ligation folgte eine Transformation in kompetente *E.coli* Bakterien (DH10B).

Der pDrive Vektor besteht aus 3850 Bp. und kodiert Kanamycin und Ampicillin Resistenzen. Erfolgreich transformierte Bakterienzellen sind also resistent sowohl

gegen Kanamycin als auch Ampicillin und können so selektiert werden. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe einer Minipräparation isoliert.

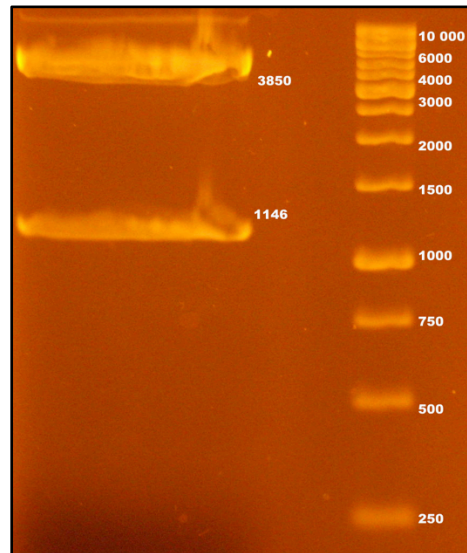


Abbildung 9: Verdau einer maxipräparierten Plasmid-DNA des Vektors pDrive + Filaktin-Aktin-ähnlicher Domäne mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI

Die obere Bande zeigt den linearisierten pDrive Vektor (3850 Bp), die untere Bande das ausgeschnittene Insert, die für die Filaktin-Aktin-ähnliche Domäne (1146 Bp) kodiert.

Abb. 9 zeigt einen Testverdau des einzigen erfolgreich transformierten Klons. Das Insert (untere Bande in Abb. 9) konnte gut ausgeschnitten werden, allerdings nicht in die verdauten pDEX-GFP Vektoren ligiert werden. Weitere Klonierungen in die passenden GFP-Vektoren waren ebenfalls nicht erfolgreich.

3.2 Erstellung eines pDEX-GFP-Filaktin-Aktin Vektors durch Amplifikation des gesamten Vorlage-Plasmids

Für einen völlig neuen Lösungsansatz wurden wiederum die bereits existierenden pDEX-GFP-Filaktin full length Vektoren als Vorlage benutzt: Der pDEX(g418)-N2 Filaktin full length und der pDEX(g418)-C2 Filaktin full length Vektor. Bei dieser Herangehensweise sollte das gesamte Plasmid abzüglich der N-terminalen

Domänen des Filaktin full length (Istl-Domäne bis Ende der Filamin-ähnlichen-Ig-Wiederholungen-Domäne) amplifiziert werden. Daher wurde ein forward Primer gewählt, der direkt vor der Aktin-ähnlichen Domäne ansetzt (5'-CACGTGCTGAATTCTTTC-3'). Der reverse Primer (5'-GGATCCACGGGTACCTT-3') setzt vor dem Startcodon an und so wurden die Sequenzen der Filaktin-Aktin-ähnlichen Domäne, des Act8-Terminators, der Ampicillin- und Geneticin-Resistenzen, des Act8-Promotors und des GFPs als ein Stück amplifiziert. Für die Amplifikation eines pDEX(g418)-GFP-C2-Filaktin-Aktin Vektors wurden ebenfalls Primer konstruiert und auf dieselbe Weise eine PCR mit der Phusion-Polymerase durchgeführt. Der PCR folgte ein Test-Agarosegel (Abb. 10).

Der Testverdau und das danach angefertigte Agarosegel zeigten jeweils zwei Banden bei ca. 7000 Bp. Das konstruierte Produkt sollte 6936 Basenpaare enthalten.

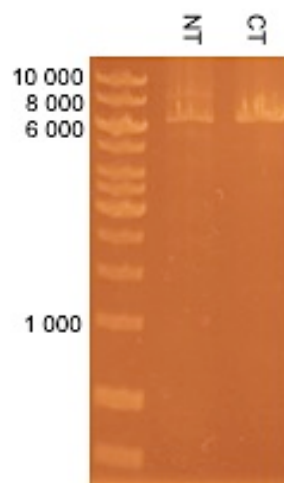


Abbildung 10: Agarose Testgel der pDEX (g418)-GFP Vektoren NT/CT

5' Bereich der kodierenden Sequenz (links) und 3'-Bereich (rechts). Die Größe der Banden liegt zwischen 6000 Bp. und 8000 Bp. Die vorausgesagte Basenzahl entspricht in etwa dieser Größe und würde auf einen gelungenen Ansatz deuten.

Die PCR-Produkte wurden über das PCR Purification Kit aufgereinigt. Um die Vektoren erfolgreich zu ligieren, wurden diese daraufhin mit einer T4 Polynukleotid-Kinase phosphoryliert und anschließend ligiert. Der Ligationsansatz wurde in kompetente Bakterienzellen (DH10B) transformiert und auf LB - Amp. - Platten ausplattiert, die entsprechenden Kolonien gepickt und eine Vorkultur angeimpft. Darauf folgte eine DNA - Minipräparation.

Zur Überprüfung der Plasmide wurde ein Testverdau angesetzt. Um die fertigen Plasmide sequenzieren zu lassen (MWG Eurofins), mussten die Vektoren über ein Plasmid Purification Kit (Roche) aufgereinigt werden. Somit wurde die DNA bestmöglich von bei der Sequenzierung störendem Protein und genomischer DNA gereinigt.

Das Sequenzierungsergebnis des pDEX(g418)-GFP-N2 Filaktin-Aktin Vektors ergab eine Verschiebung des Leserahmens, die durch einen Fehler im Primer entstanden war. Eine solche Verschiebung des Leserahmens führt immer zu vorzeitigem Abbruch der durch ein zufällig auftretendes Stoppcodon zustande kommt. Daher war das Plasmid unbrauchbar. Durch Ausschneiden der Sequenz der Filaktin-Aktin-ähnlichen Domäne mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SacI konnte das Fragment in den Vektor pDEX(g418)-GFP-N1 umklontiert werden. Dieser Vektor besitzt einen um ein Basenpaar-verschobenen Leserahmen im Vergleich zu dem Vektor pDEX(g418)-GFP-N2. Durch die Ligation des verdauten Inserts in den pDEX(g418)-GFP-N1 Vektor entstand so ein funktionierendes Konstrukt mit korrektem Leserahmen.

Die Klonierung des Konstrukts mit C-terminalem GFP war nicht erfolgreich, daher erfolgten die weiteren Arbeiten mit dem pDEX(g418)-GFP-N1-Filaktin-Aktin Konstrukt (Abb. 11).

Um das Konstrukt pDEX(g418)-GFP-N1-Filaktin-Aktin in *D. discoideum* Zellen zu transformieren, wurde es in einer Maxipräparation in einer Konzentration von 1,1 µg/µl aufgereinigt.

1 ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGC CGCATTTTGCCCTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAAGTAAAAGATG

101 CTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGAT

201 GAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAACTGACTTG

301 GTTGAGTACTACCAAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCA

401 ACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCT

501 GAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGCATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCT

601 TCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTG

701 GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAGACGGGAGTCAGGCAAC

801 TATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGAT

901 TTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGT

1001 CAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGT

1101 TTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTCTTAGTGTAGCCGTAGTTA

1201 GGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCG

1301 GGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGA

1401 ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGTCGGAACAGGAGAG

1501 CGCAGGAGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAG

1601 GGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCTGGCCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCC

1701 TGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGAA

1801 GAGCGCCCAATACGAAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGAAGCGGCATCTAGATCT

1901 AAAAAAATTTTATTTATTTTATTTTGAATTAAATAGATTACAAAATTAATTAATCCCATCAAAATCTTTAAAAAATGTTTAA

2001 AAAAACTTGGGTTGGTTAATTATTTTGAATAATTTAAACCCAAATTAATAAATGAGATTCAAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

2101 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGATTGTCATAAAAAAGATTTTTTTTTTTTTTTTCTTATTTCTTAAAACAAATAAATAAATAAATTAAGCTTAA

2201 AATGAGTAAAGTGAAGAATTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTGAGTGGAGAGGT


```

4601 GATCGAGCCCGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTC
4701 ATAGAAGCGCGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTGGGCGTCGCTTGGTCGGTCATTTGAAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAAGCTCGTCAA
4801 GAAGCGCATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGAGCGCGGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATC
4901 ACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTCCACCATGATATTCGGC
5001 AAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCTCGCCGTGGGCGATGCGCGCTTGAGCTGGCGAACAGTTGGCTGGCGCGAGCCCTGATGCTCTT
5101 CGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATC
5201 AAGCGTATGCAGCCCGCGCATTCGATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCTGCCCGGCACTTCGCCCAAT
5301 AGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTGAGGACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTGGTGGCCAGCCAGATAGCCGGCTGCCTCGTCTGCA
5401 GTTCATTACAGGACCGGACAGGTGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGAAACAGCGCGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG
5501 TTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCTCTCCACCCAAAGCGGCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTGTGTCAATCATGCCAAACGATCCAGCTTGAACA
5601 TCTTACCATCCATTTTATATATATTTATTTATTTGATTATTTTGAATTAATTAATAAAAAAAAAAAAAATTCATTTTATAATCTCAGAAACCTCAA
5701 AAAAAAAAAAATAAAAAATAAAAAATATAAAAAATAAAAAATAAAATCCCAATTTTAAAGCGAAAAACCCCATGGTTTGAAATTTCAATCAATTC
5801 AAATAACTTTACTTAAAAAAACCCATTTTATTTAAAAATTTCTTTTAAATTAGGCATCAGAATATCAATTCCTTGTATTACTTGAATTATTTAG
5901 GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCATCCATTTGTAATAAACTTTAAATTTCTATTTTTTTTTTTTTTTTATAATTATTTATTTTTCATATCTCT
6001 TTTTTTTTTTATATAAAATATCCATCATTTCTTCAAAATAAAAAATAATTACAAAAAGTGAATAATAATTAATAATTAATAAACCTTTACACTTTT
6101 TTTTTTCTTTTACAGTTTTTATATTTATTTTAAATTTTATTTTTCGCAACTTTGAAAAATAAAAAAGATAAAGTTTTTATAAATATCTATCAAAAA
6201 GATATCGTTGTGATTGATTATTTTGGATAATTTTCTTTAAATTTGGGCGAAATCTGTAATTTTCAGATTAATAAGATTTTCTCTTTTATTTCTTTT
6301 TAGTTTTTGTAAATTTTAAAAATAAACCTCTGAATTAATTCACGCGCGTCTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAACCTTGGCGTTACCCAACTTAATC
6401 GCCTTGCAGCACATCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCG
6501 CCTGATGCGGTATTTCTCCTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAG
6601 CCCCAGACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGT
6701 GTCAGAGTTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCTCGTGATAGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTA
6801 GACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCC
6901 TGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT

```

Abbildung 11: Basensequenz des gesamten pDEX (g418)-GFP-N1-Filaktin-Aktin Konstrukts

Das entstandene Konstrukt umfasst 6936 Bp. Die Farbcodierungen zeigen die jeweiligen Basenpaarsequenzen mit den jeweils unterschiedlichen Funktionen. Die wichtigsten Basen-Sequenzen, beginnend am N-terminus: AmpR (orange, 1-861) - Ampicillin Resistenz Gen; GFP (grün, 2202-2915) - grün fluoreszierendes Protein (Tsien 1998); BamHI (rot, 2958-2963) - Schnittstelle für Restriktionsenzym der Bakterienspezies *Bacillus amyloliquefaciens* H; Aktin-ähnliche Domäne (lila, 2993-4102) - Aktindomäne zentrales Gen dieser Arbeit; XhoI (rot, 4103-4108) - Schnittstelle für Restriktionsenzym der Bakterienspezies *Xanthomonas helicola*; Sall (rot, 4112-4117) - Schnittstelle für Restriktionsenzym der Bakterienspezies *Streptomyces albus*; Tn5 G418R (orange, 44696-5575) - Kanamycin Resistenz Gen.

3.3 Biochemischer Nachweis der in *D. discoideum* transformierten GFP-Fusionsproteine

Das Plasmid wurde mittels Elektroporation in *D. discoideum* Zellen transformiert. Hierfür wurden der Wildtyp (AX2) und die Filaktin-Knockout Zelllinie benutzt. Es wurden wie im Kapitel 2 "Material und Methoden" beschrieben, einzelne Klone gewonnen, jeweils 3 verschiedene der Transformation von AX2 bzw. Filaktin KO mit dem Plasmid pDEX(g418)-GFP-N1-Filaktin Aktin. Im Folgenden werden die Zelllinien als AX2 GFP-FiaAct bzw. FiaKO GFP-FiaAct bezeichnet.

Abbildung 12 zeigt eine Coomassie-Färbung des SDS-Gels, auf das Lysate der verschiedenen Klone aufgetragen worden waren.

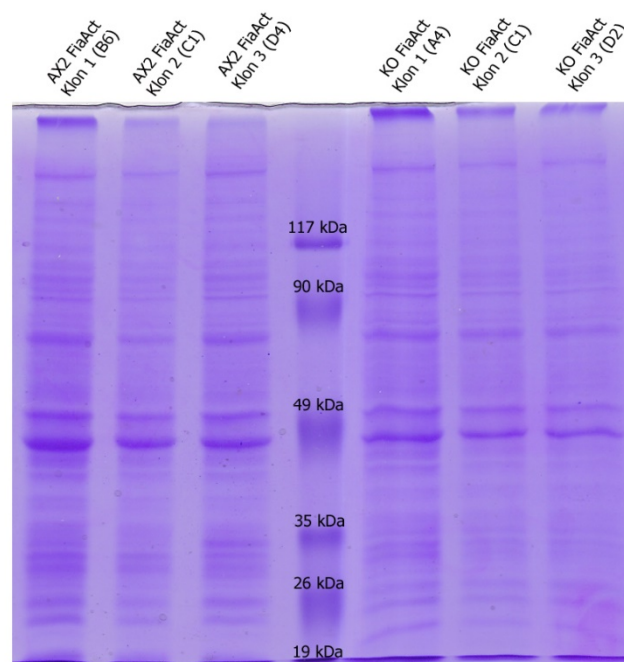


Abbildung 12: Coomassie-Färbung des 10%igen SDS-Gels mit den Lysaten der mit dem Plasmid pDEX(g418)-GFP-N1 Filaktin-Aktin transformierten *D. discoideum* AX2 bzw. Fia KO Klone

Pro Spur wurden 2×10^5 Zelläquivalente aufgetragen

Abbildung 13 zeigt zwei Western Blots, die exakt wie das Coomassie-gefärbte Gel beladen wurden. Es wurden zwei verschiedene primäre Antikörper benutzt, um das

Vorhandensein des GFP-Filaktin Aktin Fusionsproteins zu bestätigen. Der Antikörper 4S-59-4 erkennt ein Epitop in der Aktin-ähnlichen Domäne von Filaktin, der Antikörper K3-184-2 erkennt ein Epitop im GFP-Teil. So konnte bestätigt werden, dass das vollständige korrekte GFP-Filaktin Aktin in den transformierten Zellen überexprimiert wird.

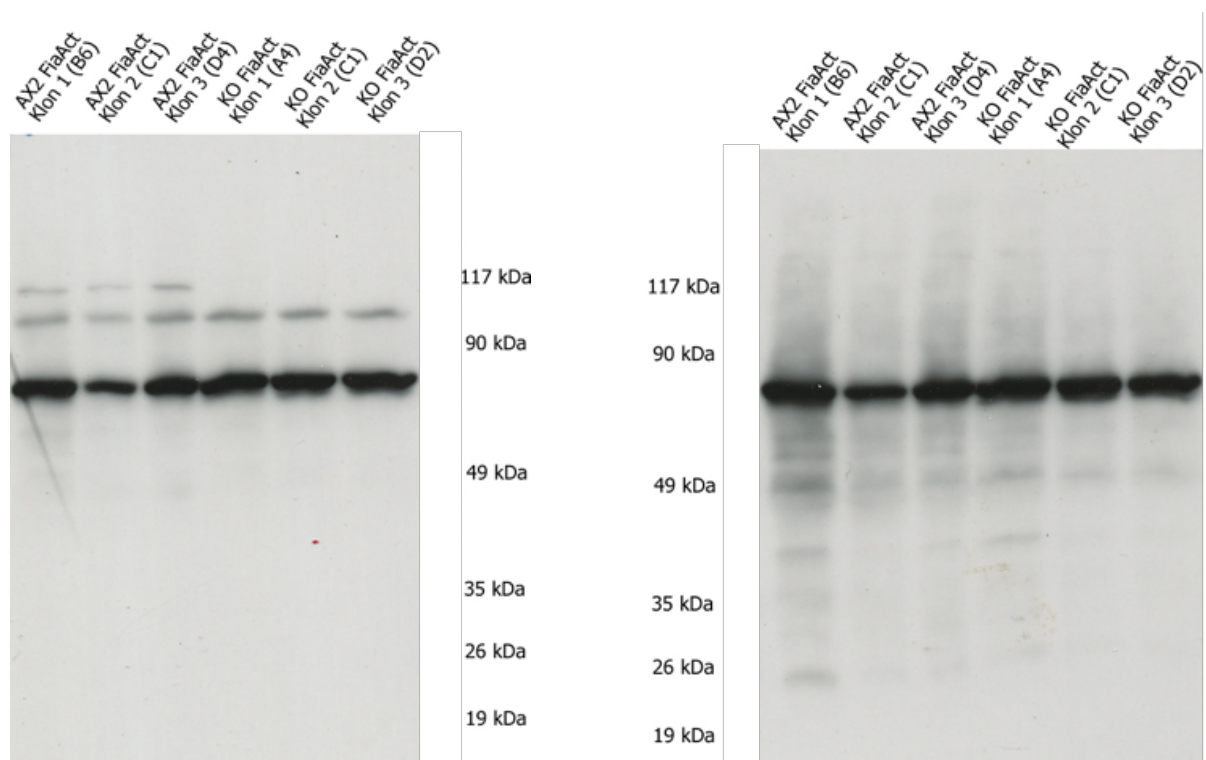


Abbildung 13: Immunanalyse des 10%igen SDS-Gels mit den Lysaten der mit dem Plasmid pDEX(g418)-GFP-N1 Filaktin-Aktin transformierten *D. discoideum* AX2 bzw. FiaKO Klone

Pro Spur wurden 2×10^5 Zelläquivalente aufgetragen.

Western Blot Links: Die auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper 4S-49-4 markiert, der den C-terminalen Bereich des Filaktins (die Aktin-ähnliche Domäne) erkennt. In AX2 und FiaKO sind deutlich die starken Banden bei 72 kDa zu sehen - die überexprimierte GFP-Filaktin-Aktin Domäne. Im AX2 ist außerdem bei ca. 105 kDa eine Bande zu sehen, das endogene Filaktin in ganzer Länge. Die Bande bei ca. 100 kDa scheint eine Kreuzreaktion mit einem unbekannten Protein zu sein.

In den Filaktin KO Zellen (Spur 4, 5 und 6) ist das endogene Filaktin wie erwartet nicht zu sehen.

Western Blot Rechts: Gleiche Beladung wie links, allerdings wurde er mit dem K3-184-2 Antikörper inkubiert, welcher GFP erkennt. Deutlich wird hier, dass die überexprimierten Proteine tatsächlich GFP-Fusionsproteine sind. Selbstverständlich ist in diesem Fall das endogene Filaktin nicht nachzuweisen.

3.4 Biochemischer Nachweis des Vorhandenseins der jeweiligen GFP-Fusionsproteine in den entsprechenden *D. discoideum* Zelllinien

Da die Klonierungen der Vektoren, bei denen das GFP N-terminal bzw. C-terminal an die Filaktin-Aktin-ähnliche Domäne fusioniert werden sollten, zeitaufwändiger waren als zunächst erwartet und erst gegen Ende dieser Arbeit die Proteine in *D. discoideum* Zellen exprimiert werden konnten, wurde in den folgenden Immunfluoreszenz-Experimenten mit einer Zelllinie gearbeitet, die von Angelika Noegel aus dem Institut für Biochemie Köln zur Verfügung gestellt worden war. Hierbei handelte es sich um eine AX2 Zelllinie, die die Filaktin-Aktin ähnliche Domäne als GFP-Fusionsprotein überexprimiert. Bei dem transformierten Vektor handelte es sich um einen pDEX79 (G418), in den das 1200 Bp große Fragment durch EcoRI Verdau an beiden Seiten hineinkloniert worden war. Das GFP befindet sich in diesem Fall am N-Terminus.

Außerdem wurden folgende Zelllinien verwendet: AX2, der Wildtyp, sowie eine AX2 Zelllinie, die GFP-Cofilin überexprimiert.

Des Weiteren wurde die Filaktin Knockout Zelllinie, sowie die Filaktin Knockout Zelllinie mit drei verschiedenen überexprimierten GFP-Fusionsproteinen benutzt: FiaKO GFP-FiaFL, FiaKO GFP-IstI und FiaKO GFP-FilR.

FiaKO GFP-FiaFL ist eine Zelllinie, die Filaktin mit N-terminalem GFP in der Filaktin Knockout Zelllinie überexprimiert. Bei den anderen beiden handelt es sich um Zelllinien, die die N-terminalen Teile vor der Aktin-ähnlichen Domäne als N-terminale

GFP-Fusionsproteine überexprimieren, nämlich einmal die N-terminale IstI-Domäne (Bp. 1-601) und einmal die zwei folgenden Filamin-Ig-Wiederholungen (Bp. 790-1477). Durch die Expression von einzelnen Domänen in den Filaktin Knockout Zellen wurde eine Analyse der in vivo Funktion der einzelnen Domänen angestrebt.

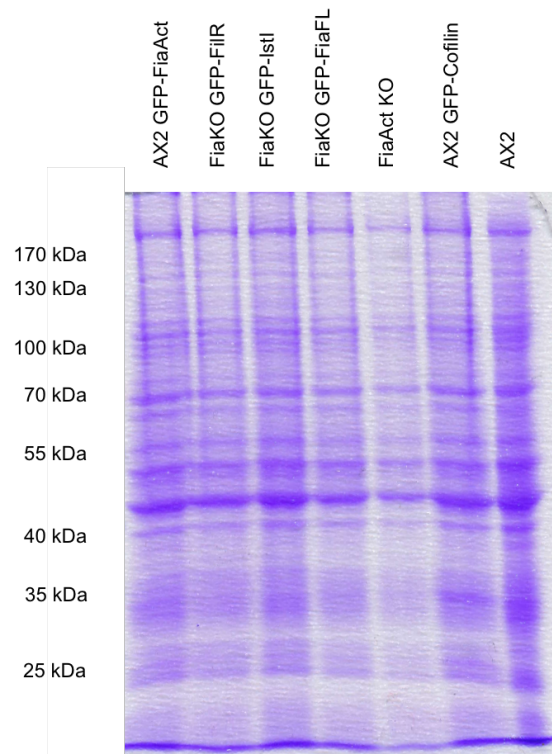


Abbildung 14: Coomassie-Färbung eines SDS-Polyacrylamidgels (10% Acrylamid).

Es wurden *D. discoideum* Zelllysate (2×10^5 Zelläquivalente pro Spur) aufgetragen.

Im Verfahren durch Western Blot mit den verwendeten Zelllinien sollte kontrolliert werden, ob die GFP-Fusionsproteine von den jeweiligen GFP bzw. Filaktin - Antikörpern erkannt werden und die erwartete Molekülmasse zeigen.

zu erwartendes Molekulargewicht der GFP-Fusionproteine

GFP-FiaAct: 72 kDa

GFP-FilR: 53 kDa

GFP-Ist1: 51 kDa

GFP-FiaFL : 132 kDa

GFP-Cofilin: 42 kDa

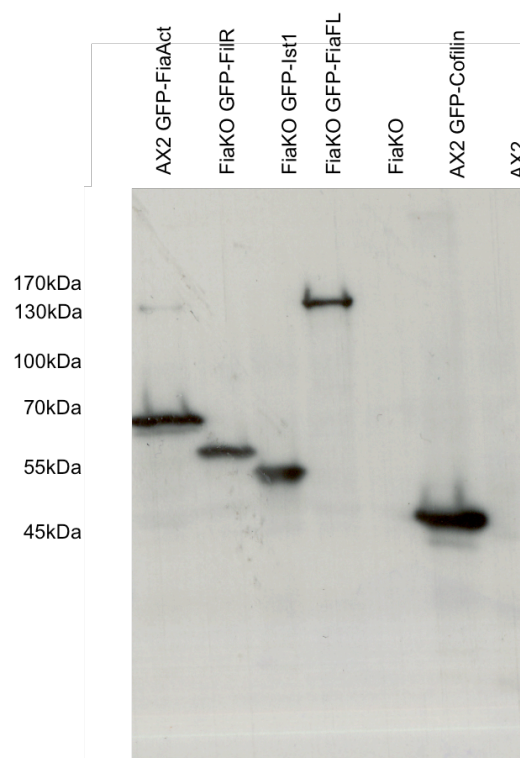


Abbildung 15: Western Blot ausgehend von einem SDS-Polyacrylamidgel. Die Nitrozellulosemembran wurde mit dem GFP-Antikörper (K3-184-2) inkubiert

Die Proben zeigen jeweils ihr zu erwartendes Molekulargewicht der GFP Fusionproteine: **1.** Spur: AX2 GFP - FiaAct - 72kDa; **2.** Spur: FiaKO GFP FilR - 53kDa; **3.** Spur: FiaKO GFP Ist1 - 51kDa; **4.** Spur: FiaKO GFP FiaFL - 132kDa; **6.** Spur: GFP Cofilin - 42kDa als Kontrolle; **5.** Spur mit FiaAct KO und **7.** Spur mit AX2 Wildtyp zeigen erwartungsgemäß keine Reaktionen.

Abb. 15 zeigt einen Western Blot, auf dem die exprimierten GFP-Fusionsproteine der jeweiligen Zelllinien markiert wurden. In der ersten Spur ist das GFP-Filaktin-Aktin zu erkennen, welches bei ca. 72 kDa läuft. In der zweiten Spur ist die GFP-FilR Bande, bei ca. 53 kDa, sowie das etwas kleinere GFP-Ist1 der dritten Spur bei ca. 51

kDa. Auch das GFP-Filaktin in ganzer Länge wird bei 130 kDa erkannt. Die Kontrolle GFP-Cofilin ist bei ca. 42 kDa. In der Spur des Wildtyps (AX2), sowie in der Spur des Filaktin Knock-Out Klons ist keine Reaktion mit dem Antikörper zu erkennen. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Fusionsprodukte gleich gut exprimiert werden und dass sich auch keine Abbaubanden oder Artefakte widerspiegeln.

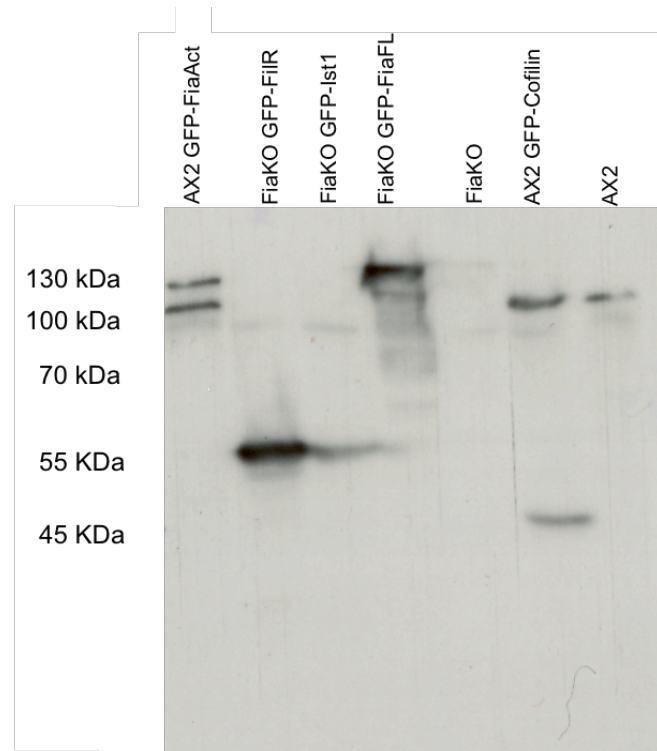


Abbildung 16: Western Blot ausgehend von einem SDS-Polyacrylamidgel. Die Nitrozellulosemembran wurde mit dem Filaktin-Antikörper (3S-55-4) inkubiert

Der Filaktin Antikörper bindet an Filamin-ähnlichen Wiederholungen. Die aufgetragenen Zelllinien: 1. Spur: AX2 FiaAct; 2. Spur: GFP FilR ; 3. Spur: GFP Istl; 4. Spur: FiaActFL; 5. Spur: FiaKO; 6. Spur: GFP Cofilin; 7. Spur: AX2 Wildtyp

Abbildung 16 zeigt eine Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem Filaktin-Antikörper 3S - 55 - 4. Dieser Antikörper erkennt ein Epitop am N-terminus, im Bereich der Filamin-Ig-ähnlichen Wiederholungen, daher werden im Blot nur Proteine markiert, die diese Sequenz beinhalten, sowie das Filaktin in ganzer Länge oder das GFP-FilR. In der ersten Spur des Blots (AX2 GFP-FiaAct) läuft das endogene Filaktin (bei ca. 105 kDa). Die oberste Bande scheint eine Kreuzreaktion

darzustellen und bleibt unklar. In den Spuren 6 und 7 (AX2 GFP-Cofilin Zelllinie und AX2 Wildtyp) wurde das endogene Filaktin erkannt, wohingegen diese Bande bei den Filaktin Knock-Out Zelllinien nicht zu detektieren wäre.

In der Spur des FiaKO GFP-FiaFL wurde das GFP-Konstrukt erkannt (oberste Bande). Auch wurde das GFP-FilR durch den Antikörper bei ca. 55 kDa dargestellt. Beim Beladen des Gels mit den Proben kam es evtl. zu einem Überlaufen des Zelllysates von FiaKO GFP-FilR auf die Spur rechts daneben, was zu einer leichten Bande bei ca. 50 kDa geführt haben dürfte. Diese Spur sollte leer sein, da der Antikörper nicht an die Ist1 Domäne bindet.

Bei ca. 100 kDa ist eine leichte Bande in allen Spalten, was wiederum auf eine unspezifische Kreuzreaktion zurückzuführen ist. In der AX2 GFP-Cofilin Zelllinie wurde das endogene Filaktin bei 105 kDa markiert.

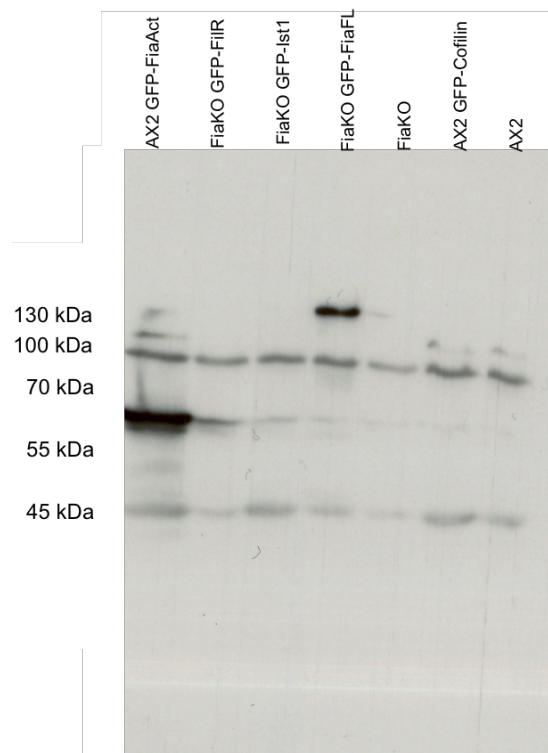


Abbildung 17: Western Blot ausgehend von einem SDS-Polyacrylamidgel. Die Nitrozellulosemembran wurde mit dem Filaktin-Antikörper (4S-59-4) inkubiert

Der Filaktin Antikörper bindet an ein Epitop innerhalb der Aktin-ähnlichen Domäne des Filaktins (4S-59-4). Zusätzlich zeigt dieser Antikörper eine Kreuzreaktion mit endogenem Aktin (bei 42 kDa) der *D. discoideum* Zellen.

Aufgetragene Zelllinien: 1. Spur: AX2 FiaAct; 2. Spur: GFP FilR; 3. Spur: GFP Ist1; 4. Spur: FiaActFL; 5. Spur: FiaKO; 6. Spur: GFP Cofilin; 7. Spur: AX2 Wildtyp.

Der 4S 59 4 Antikörper erkennt im Gegensatz zu dem 3S 55 4 Antikörper sein Epitop in der C-terminalen Hälfte von Filaktin, also im Aktinteil. Folglich muss der Blot NT (Abb. 16) verglichen zu Blot CT (Abb. 17) unterschiedlich verlaufen. Die Spuren 1-7 zeigen Aktin bei ca. 42 kDa. Deutlich wird in der Zelllinie AX2 GFP-FiaAct das GFP-FiaAct erkannt. In der Spur des AX2 GFP-FiaAct, des AX2 GFP-Cofilin und des Wildtyps AX2 ist das endogene Filaktin bei ca. 105 kDa, welches bei den Knockout Zellen nicht nachzuweisen ist. In der Spur des FiaKO GFP-FiaFL ist das GFP-Fusionsprotein bei ca. 130 kDa markiert. In jeder Spur ist eine Bande bei ca. 100 kDa dargestellt. Hierbei handelt es sich um eine Kreuzreaktion mit einem bisher unbekannten Protein.

Zusammenfassend zeigen die erstellten Western Blots, dass die in den folgenden Immunofluoreszenzen verwendeten Zelllinien die korrekten GFP-Fusionsproteine exprimieren.

3.5 Lokalisierung der Filaktin GFP-Fusionsproteinen *D. discoideum* mittels konfokaler Mikroskopie

Wie erwähnt, teilt sich die Arbeit in zwei Anteile. Im Folgenden ist nun die zellbiologische Analyse der Transformanten am konfokalen Mikroskop dargestellt.

3.5.1 Mutantenstämme

Während dieser Arbeit wurden speziell gentechnisch veränderte *D. discoideum* Zellen fixiert. Hierzu wurden folgende Zelllinien verwendet:

- AX2 GFP-Cofilin: Expression von GFP-markiertem Cofilin im AX2 Wildtyp
- Fia KO: Gendisruption des Filaktin Gens im AX2 Hintergrund
- FiaKO GFP-FiaFL: Expression des vollständigen GFP-Filaktins in der Filaktin-minus Mutante
- FiaKO GFP-IstI, Expression der GFP-Ist Domäne in der Filaktin-minus Mutante
- FiaKO GFP-FilR. Expression der GFP-markierten Filamin-Wiederholungen in der Filaktin-minus Mutante
- AX2 GFP-FiaAct. Expression der GFP-markierten Aktindomäne im AX2 Wildtyp Hintergrund

Ziel war es, Hinweise über die Funktion der einzelnen Filaktin-Domänen in den Zellen zu erhalten. Daher wurden, wenn möglich, die Filaktin Knock-Out Zellen benutzt und das gesamte bzw. Teile des Filaktins in diesem Hintergrund exprimiert.

3.5.2 Proteinaggregate in Anwesenheit von DMSO

Fukui und Katsumaru (1979) beschrieben eine Veränderung der Zellen (*D. discoideum*) in Form und Struktur unter Zugabe von 2,5%, 5%, 10% und 20% DMSO bei einer Einwirkzeit von 30 Min. Die Zellen rundeten sich ab und veränderten ihre Motilität. Besonders interessant war in dieser Veröffentlichung der Zusammenhang zwischen der DMSO-Behandlung und intranukleärem Aktin, welches unter diesen Bedingungen im Kern Proteinaggregate, sog. 'nuclear actin rods', formte. Die zelluläre Reaktion auf extern induzierten Stress war später durch eine Publikation von Sameshima et al. (2000) bestätigt worden.

3.5.3 Proteinaggregate auch bei Filaktinsequenzen?

Verhalten sich also die einzelnen Sequenzen des Filaktin unterschiedlich, nachdem sie innerhalb der Zelle exprimiert wurden und die Zelle gestresst wird? Inwiefern spielt Filaktin eine Rolle bei der Bildung der intranukleären Bündel (sog. Rods)?

Cofilin ist Bestandteil in diesen Rods (Nishida et al. 1987). Stressbedingungen, wie zum Beispiel das Applizieren von DMSO oder Druck, führen dazu, dass das 21 kDa große und Aktin-bindende Protein, Bestandteil der entstehenden Aggregate wird. In den durchgeführten Experimenten wurde die AX2 GFP-Cofilin Zelllinie als Kontrolle benutzt. Bei Behandlung mit DMSO geht auch das GFP markierte Cofilin in den Zellkern und beteiligt sich an der Ausbildung intranukleärer Rods, die durch das GFP leicht sichtbar gemacht werden können.

Dazu wurden die verschiedenen Zelllinien mit 5% DMSO Medium versetzt und nach 0/5/15/30/60/90 Minuten Inkubation fixiert. Nach der Fixierung der Zellen erfolgte eine Anfärbung des endogenen Aktins durch Inkubation mit dem *D. discoideum*-spezifischen Aktin Antikörper Act-1 (Simpson 1984). Dieser wurde durch den

sekundären Antikörper (Broome 1978), Ziege Anti-Maus IgG, für die Fluoreszenzmikroskopie markiert (CY3, Dianova 115-165-062, 1:1000, 1h Inkubation). Anschließend wurden die Proben mithilfe des konfokalen Mikroskops analysiert.

Das Konfokale Mikroskop ist ein Lichtmikroskop, das das jeweilige Präparat Punkt für Punkt abtastet und somit eine extrem genaue Auflösung auf der gerasterten Ebene ermöglicht. Der Laserstrahl regt fluoreszierende Stoffe zur jeweiligen Lichtemittierung an und erzeugt somit für den Betrachter ein scharfes und farbiges Bild auf jeder gewünschten Ebene des Objektes. Häufig werden zu analysierende Zellbestandteile mit mehreren Farbstoffen markiert und durch mehrere Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt. So sind intrazelluläre Bestandteile besser zu unterscheiden. Zellstrukturen können explizit betrachtet werden und die Veränderung einer Struktur (z.B. Aktin des Zytoskeletts) kann über die Zeit genau nachvollzogen werden. Ein LSM (engl. laser scanning microscope) ist also besonders gut geeignet, die Entstehung, die Verteilung und auch den Zerfall so feiner Strukturen wie intranukleärer Rods in dreidimensionaler Anordnung in sehr guter Tiefenschärfe ohne störenden Hintergrund zu dokumentieren.

In den Aufnahmen am Konfokalen Mikroskop war DNA nach Inkubation mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), das sich bevorzugt an A/T-reichen Regionen anlagert, blau eingefärbt. Dies erleichterte erheblich die Identifizierung des Kerns und machte es möglich, den Weg der Proteine in den Kern und die Bildung der Proteinbündel nachzuvollziehen. Eine andere Möglichkeit den Kern isoliert darzustellen, war die Inkubation mit TO-PRO-3-DNA (Fa. Carl Zeiss Microscopy GmbH), ein für DNA Visualisierung häufig verwendeter Farbstoff.

In grüner Farbe ist das ‚Green Fluorescent Protein‘ (GFP) dargestellt, das bei Anregung mit blauem Licht grün fluoreszierte. Die GFP Domäne war in den beschriebenen Zellen (bis auf FiaKO und dem AX2 Wildtyp) enthalten. Jene Zellen, die das GFP exprimieren, können im konfokalen Mikroskop sichtbar gemacht werden (Chalfie et al. 1994).

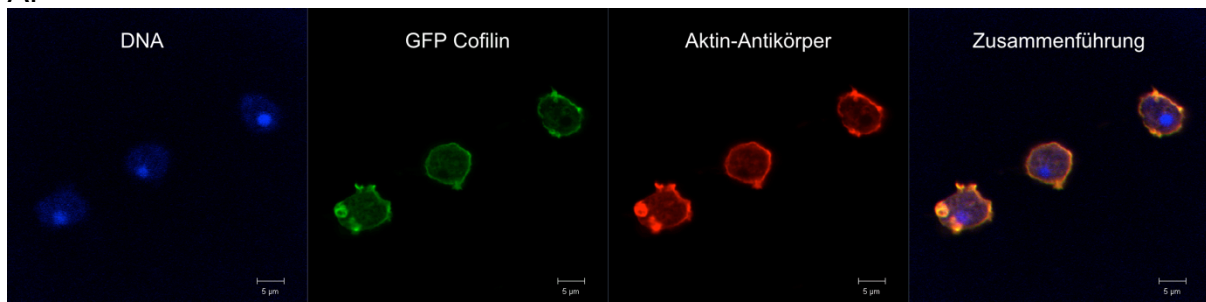
Im Allgemeinen ist zu sagen, dass die Farbstoffe sehr sensibel auf das Laserlicht reagierten und dazu neigten auszubleichen. Daher war immer eine kurze Belichtung und ein zügiges Arbeiten erstrebenswert.

3.5.4 Stressreaktion durch DMSO

Die fixierten jeweils unterschiedlich genetisch veränderten *D. discoideum* Zellen wurden immer nach dem gleichen Muster mit DMSO 5% behandelt. Die DNA wurde mit ToPro (blau) eingefärbt. Inkubation mit Act-1 Antikörper (rot).

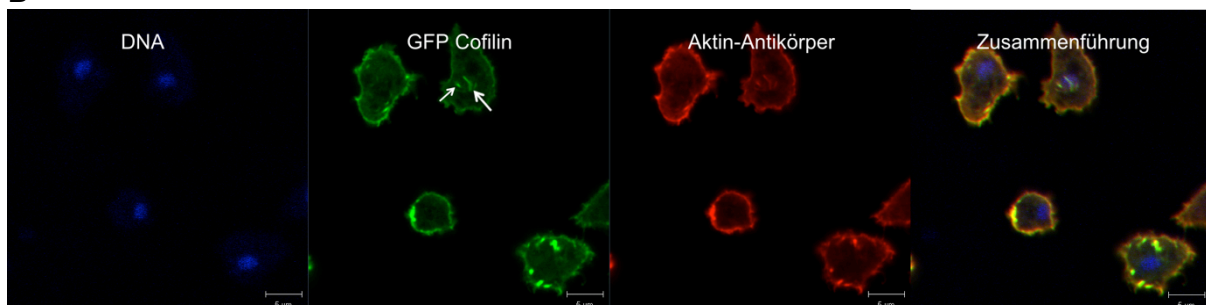
3.5.4.1 GFP - Cofilin ist Bestandteil nukleärer Aktinaggregate

A:



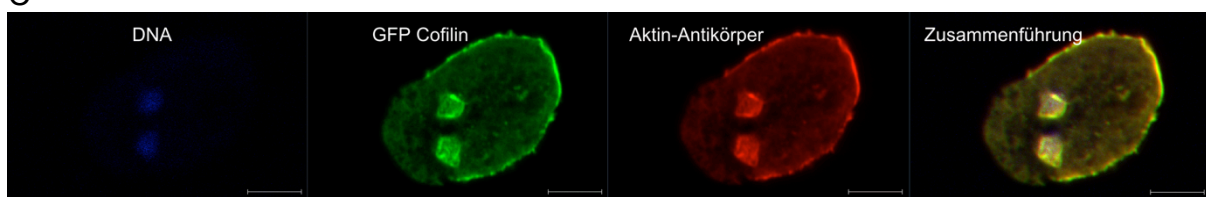
Inkubation mit DMSO 5%: 0 Min.

B



Inkubation mit DMSO 5%: 5 Min.

C



Inkubation mit DMSO 5%: 15 Min.

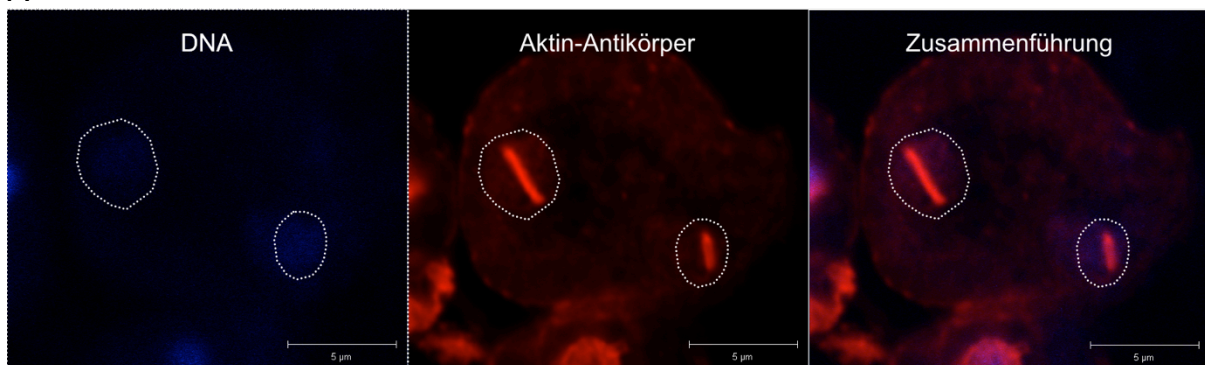
Abbildung 18: *D. discoideum* Zellen runden sich ab und GFP-Cofilin wird Bestandteil nukleärer Aggregate

Fixierte AX2 GFP-Cofilin Zellen. Die DNA wurde mit ToPro (blau) eingefärbt. Inkubation mit Act-1 Antikörper (rot). Maßstab D,E 5µm A) unbehandelte AX2 GFP-Cofilin Zellen. Die Übersichtsaufnahme zeigt eine Lokalisation von GFP-Cofilin im Zellcortex. B) erste Anreicherung von GFP Cofilin und Aktin im Zellkern (Pfeil). Allerdings noch nicht bei allen Zellen. C) prägnanter stäbchenförmiger GFP Cofilin Bildung im Zellkern.

3.5.4.2 In Filaktin Knock-Out Zellen ist die nukleäre Bündel-Bildung deutlich verlangsamt

Dieselbe Versuchsreihe wurde auch für die Filaktin Knock-Out Zellen (FiaKO) durchgeführt. Dies ist eine Zelllinie ohne GFP-Fusionsprotein, daher gab es auch kein Signal im grünen Kanal. Lediglich der Zellkern und Aktin können sichtbar gemacht werden. Es gibt Hinweise, dass das Fehlen von Filaktin die Bildung von intranukleären Aktinbündeln nicht verhindert, aber deutlich verlangsamt. Genauere Aussagen lassen sich nur nach statistischer Absicherung machen. Als Beispiel soll aber eine Zelle nach 90 minütiger Inkubation mit DMSO gezeigt werden.

A



Inkubation mit DMSO 5%: 90 Min.

Abbildung 19: Kompakte Aktinaggregate bilden sich in der Filaktin Knock-Out Mutante verzögert

Fixierte AX2 Filaktin Knock-Out Zellen. Maßstab 5µm. Die prägnante Stäbchenform der Aktinaggregate entwickelt sich erst nach 90 Minuten Inkubationszeit. Eine gestrichelte Linie (weiß) dient zur besseren Darstellung der Lokalisation der Zellkerne.

3.5.4.3 Filaktin GFP-Fusionsproteine (FiaFullLength) sind nicht Bestandteil nukleärer Aktinbündel

Im Folgenden wird das Verhalten der GFP-fusionierten Filaktin-Domänen bei der Aktin-Aggregat-Bildung untersucht. Das GFP besteht aus 238 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 26,9kDa. Dieser Umstand könnte dafür verantwortlich sein, dass das GFP Filaktin Fusionprotein (Abb. 20) nicht in den Zellkern gelangen

kann. Eine mögliche Ursache könnte die Größe des Moleküls sein, was die Passage durch die Zellkernmembran unmöglich macht. Die Immunofluoreszenzversuche (Abb. 20) beweisen diesen Umstand.

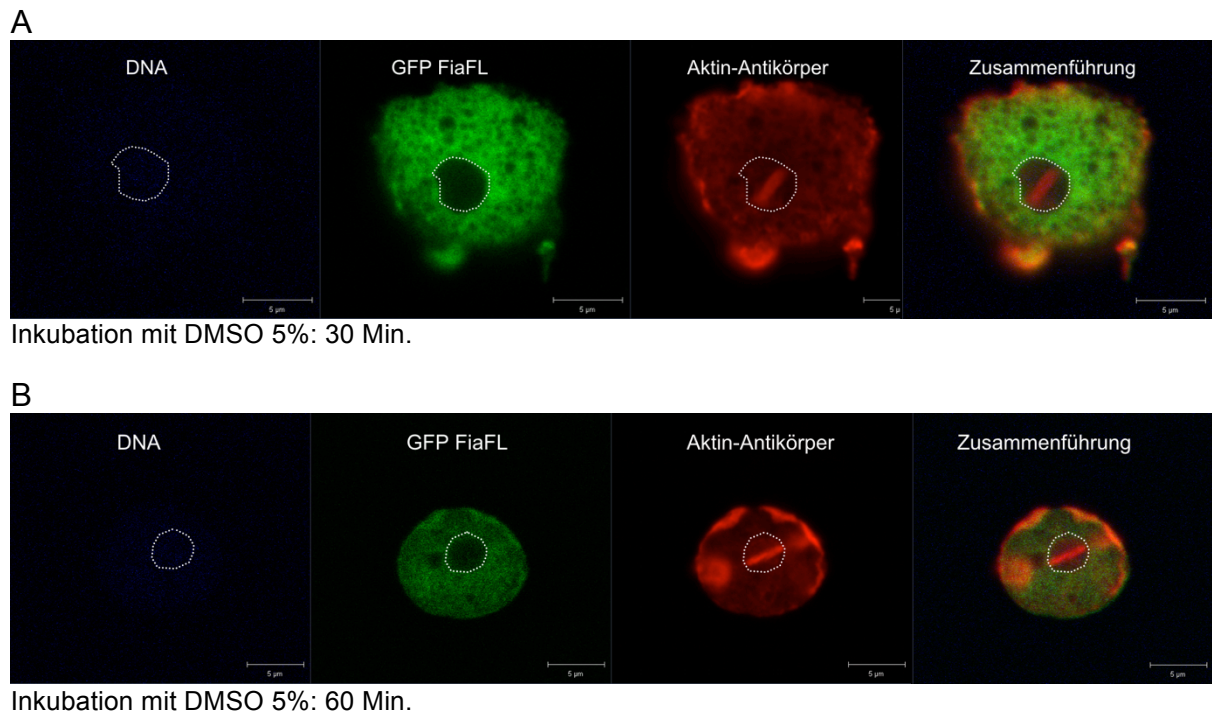


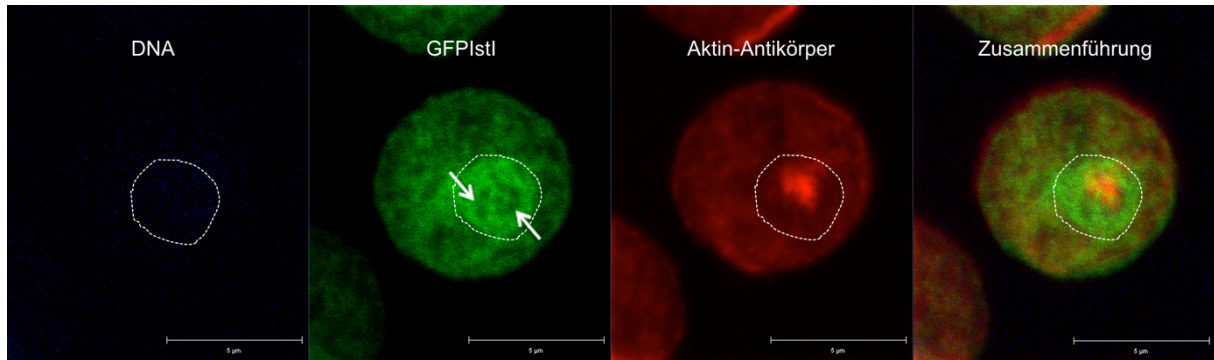
Abbildung 20: Differenzierte Aktinaggregate im Zellkern, Filaktin GFP-Fusionsprotein verbleibt im Zytoplasma

Fixierte AX2 Filaktin Full Length Zellen. Maßstab D,E 5μm. A), B) klare Aktinaggregation im Zellkern. Eine gestrichelte Linie (weiß) dient zur besseren Darstellung der Lokalisation des Zellkerns.

3.5.4.4 Filaktin GFP Istl Protein verhält sich trotz später Anreicherung im Kern nicht wie Aktin

Wie bei Abbildung 20 erwähnt, hat das GFP eventuell Auswirkungen auf die Integration in die sich formenden Rods. Bei der Untersuchung unter Stressbedingungen mit DMSO konnte nachgewiesen werden, dass die Anreicherung von GFP Istl im Zellkern stattfindet, jedoch erneut eine Verlangsamung des Eindringens in den Zellkern, sowie die ausbleibende Integration in die Rods zu sehen ist (Abb. 21)

A



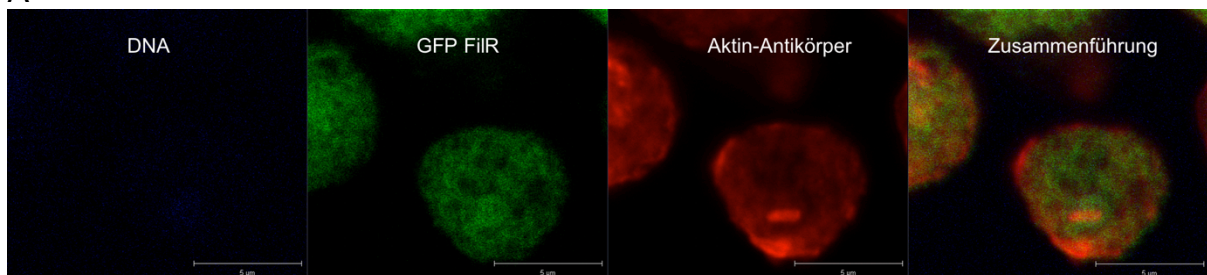
Inkubation mit DMSO 5%: 60 Min.

Abbildung 21: GFP Istl Aggregatbildung nach 60 Min. DMSO 5% Inkubation

Fixierte AX2 GFP Istl Zellen. Maßstab: 5µm. A) abgerundete Zelle mit knotiger Akkumulation von Aktin bei GFP Istl Aggregation im Zellkern. Das GFP Istl Protein reichert sich deutlich im Zellkern an. Zu sehen ist, dass es jedoch nicht Bestandteil der Rods wird (Pfeil). Eine gestrichelte Linie (weiß) dient zur besseren Darstellung der Lokalisation des Zellkerns.

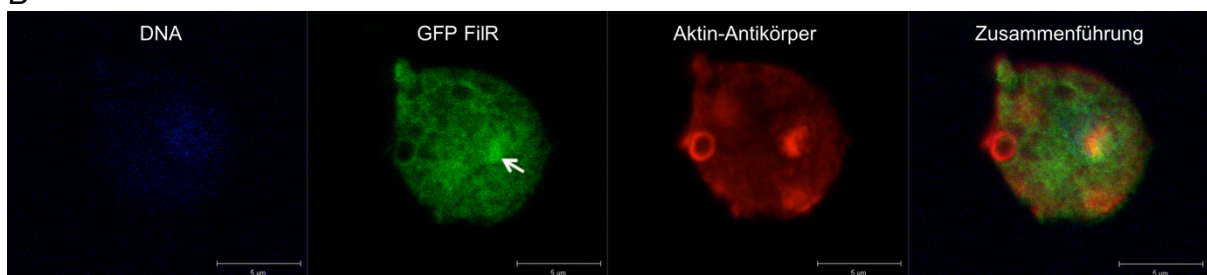
3.5.4.5 GFP Filamin-Ig-ähnliche Wiederholungen lokalisierten mit Aktin im Zytoplasma sowie im Zellkern der fixierten Zellen

A



Inkubation mit DMSO 5%: 30 Min.

B



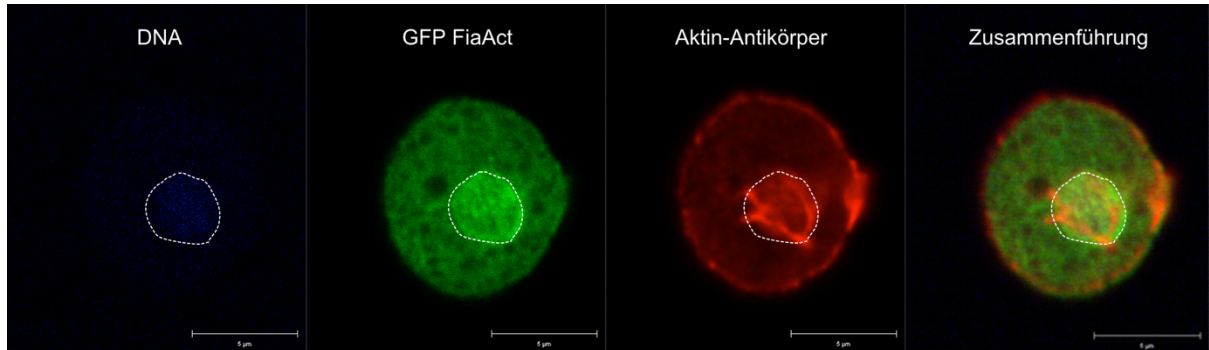
Inkubation mit DMSO 5%: 60 Min.

Abbildung 22: N terminale Filaktin Domäne GFP FilR im Zellkern und Zytoplasma lokalisiert.

Fixierte AX2 GFP-FilR Zellen. Die DNA wurde mit ToPro (blau) eingefärbt. Inkubation mit Act-1 Antikörper (rot). Maßstab A,B 5µm. A) abgerundete Zellen mit typischer Aktinaggregatbildung im Zellkern B) fast kreisförmige Abrundung der Zelle mit Lokalisation von FilR und Aktin im Zellkern. Die N-terminale Filaktin Domäne FilR zeigt sich sowohl als dichtes Aggregat im Zellkern (Pfeile), sowie als Strukturgeflecht im Zytoplasma. Auch hier bleibt die Integration in die entstandenen Rods aus (siehe auch Abb. 21).

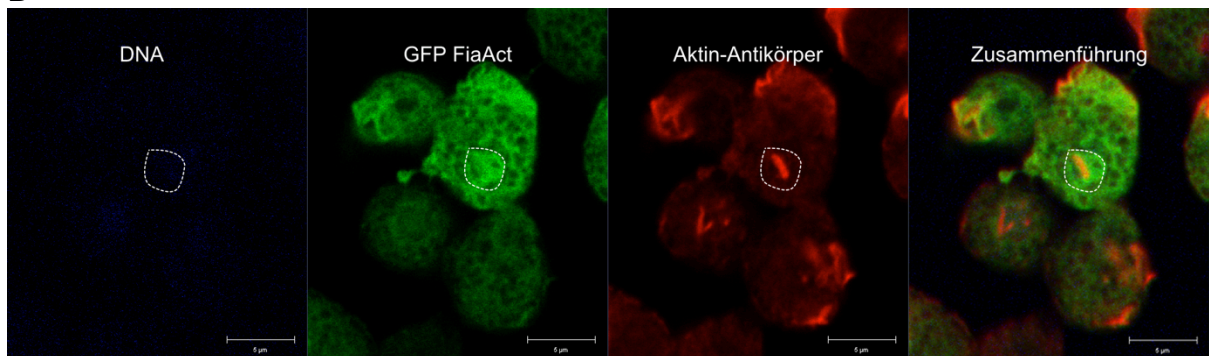
3.5.4.6 Filaktin GFP-Fusionsprotein (FiaAct) reagierte auf DMSO induzierten Stress ohne Co-Lokalisation in den Aktin-Rods

A



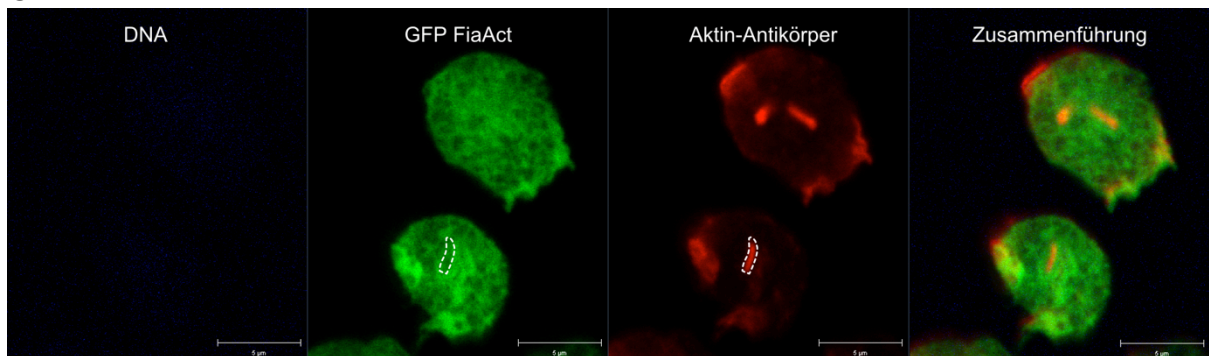
Inkubation mit DMSO 5%: 30 Min.

B



Inkubation mit DMSO 5%: 60 Min.

C



Inkubation mit DMSO 5%: 90 Min.

Abbildung 23: GFP FiaAct verdichtet sich im Zellkern

Maßstab A,B,C 5µm. A) inhomogene zytoplasmatische Verteilung, Wabenstruktur. Ausgeprägte Aktinaggregatbildung im Zellkern mit Verdichtung von FiaAct Protein im Zellkern B) Konzentration von GFP FiaAct im Zellkern, ohne sich jedoch im Aktin-Rod darzustellen. Eine gestrichelte Linie (weiß) dient zur besseren Darstellung der Zellkerne und der Lokalisation des Aktinaggregat (in C). Es zeigt, dass sich das GFP FiaAct nicht im Aktinaggregat (rot) befindet.

4 Diskussion

Zentraler Schwerpunkt dieser Arbeit war es, das intrazelluläre Verhalten von Filaktin, einer Aktinvariante (944 Aminosäuren), aufzuklären. Filaktin ist bisher vor allem durch seine ausgeprägte Domänenstruktur charakterisiert, bei der u.a. die Aktindomäne in der C-terminalen und zwei Filamin Domänen in der N-terminalen Hälfte aufgrund Ihrer Homologie zum menschlichen Aktin und Filamin besonders hervorzuheben sind. Mit Hilfe des *D. discoideum* Modellsystems wurden insbesondere zwei experimentelle Strategien verfolgt: (i) die Transformation der amöboiden Zellen mit ausgewählten DNA Konstrukten, und (ii) die zellbiologische Analyse der Transformanten am konfokalen Mikroskop.

Bislang ist erst wenig über Filaktin oder die Funktion seiner Domänen bekannt (Gallinger 2013). Da aber Filaktin auch in intranukleären Aktinaggregaten gestresster *D. discoideum* Zellen auftritt, war das Verhalten gentechnisch veränderter Formen dieser Aktinvariante von besonderem Interesse.

(I) Transformation von *D. discoideum* mit ausgewählten DNA Konstrukten

Für die genaue Analyse der Filaktin-Domänen wurden gentechnisch veränderte Expressionsklone konstruiert, die jeweils durch GFP markiert und somit im Fluoreszenzmikroskop detektierbar waren. Um die intrazelluläre Verteilung der rekombinanten Proteine im LSM exakt ansprechen zu können, wurde zusätzlich die Immunfluoreszenz mit bereits vorhandenen und gut charakterisierten Antikörpern gegen Zytoskelettproteine eingesetzt.

Bei der Entnahme der jeweiligen DNA aus dem vorgegebenen Vektor pDEX(g418)-GFP-N2-Filaktin full length bzw. pDEX(g418)-GFP-C2-Filaktin full length kam es im

Verlauf der Arbeit allerdings zu unerwarteten Schwierigkeiten, die schließlich nur durch eine sehr unkonventionelle Vorgehensweise bewältigt werden konnten. Der erste und naheliegende Versuchsansatz der Klonierungen durch Ausschneiden der DNA und anschließender Ligation war in einigen Fällen nicht erfolgreich. Auch die Vervielfältigung eines Filaktin-Aktin Konstrukts mit einem pDrive-Klonierungsvektor und die anschließende Ligation in einem GFP Vektor schlug fehl. Das kann durch Sekundärstrukturen der DNA hervorgerufen worden sein, die sehr spezifisch sein können und im Prinzip nicht zu verhindern sind.

Als völlig neuer Lösungsansatz wurden deshalb in diesen schwierigen Fällen bereits existierende pDEX-GFP-Filaktin Full Length Vektoren als Matrize benutzt und nicht das gewünschte DNA Insert, sondern der gesamte Vektor mit entsprechend zugeschnittenem Insert durch PCR vervielfältigt. Trotz der enormen Länge der zu erwartenden PCR-Produkte (bis zu 7000 Basenpaare) verlief dieser Versuchsansatz erfolgreich.

Weitere PCR Produkte wurden in Vektoren ligiert und dann in kompetente Bakterienzellen transformiert. Eine Sequenzierung des Vektors pDEX(g418)-GFP-N2 ergab allerdings eine Verschiebung des Leserahmens. Durch ein Ausschneiden mittels Restriktionsenzymen und Einfügen in einen Vektor pDEX(g418)-GFP-N1 mit einem um ein Basenpaar-verschobenen Leserahmen konnte ein funktionierendes Konstrukt (Abb. 11) gebaut werden. Zu beachten ist aber auch hier, dass die Klonierung mit C-terminalem GFP, aus welchen Gründen auch immer, nicht funktionierte.

(II) Zellbiologische Analyse der Transformanten am konfokalen Mikroskop

Der zeitliche Aufwand bei den Klonierungsarbeiten hatte zur Folge, dass in den Immunfluoreszenz-Experimenten mit einer Zelllinie gearbeitet wurde, die von Angelika Noegel aus dem Institut für Biochemie Köln zur Verfügung gestellt worden war. Dieser Punkt ist wichtig, da bei Verwendung anders hergestellter Transformanten zwar das vermeintlich identische Konstrukt vorliegt, ein Einfluss eines abweichenden genetischen Hintergrunds aber nicht ausgeschlossen werden kann. Vor einer Veröffentlichung der Ergebnisse müssten also die dokumentierten und bei -80°C eingefrorenen Aliquots erneut in ausgewählten Versuchsreihen überprüft werden. Auf der anderen Seite muss aber festgehalten werden, dass in beiden Fällen der Wildstamm AX2 verwendet worden war, ein signifikanter Unterschied des genetischen Hintergrunds also sehr unwahrscheinlich ist.

Bei den Aufnahmen am konfokalen Mikroskop war besonders erstaunlich, dass die Aktin-Aggregatbildung bei den FiaKO und den GFP-FiaFL Zellen verlangsamt ist. Bei den Zelllinien FiaKO GFP-Ist1 und FiaKO GFP-FilR war die Aktin-Aggregatbildung inhomogen und mündete nicht wie gewohnt in einer klar differenzierten Stäbchenform. Eventuell trägt die Anwesenheit der N-terminalen Filaktin Domänen zu einer zeitlich veränderten Aggregatbildung bei und vielleicht bedingt diese auch eine inhomogene Aggregatbildung (Abb. 22 B).

Das GFP-FiaFL gelangt, wie schon bei anderen Veröffentlichungen (Gallinger 2013) beobachtet, nicht in den Kern. Einzelne Domänen reichern sich aber im Kern an, ohne Teil der Aktin-Aggregate zu sein (Abb. 23 C). Was hindert sie also daran, Teile der Aktin-Aggregate zu werden, obwohl sie, etwas zeitverzögert, in den Kern gelangen können?

Betrachtet man in Abb. 20 A) und B) den grünen Kanal, der das GFP FiaFL Konstrukt darstellt, fällt auch nach 60 und 90 minütiger Einwirkzeit von DMSO auf, dass das Konstrukt nicht im Kern angereichert wird. An der Größe des Proteins kann es nicht liegen. Als Faustregel gilt für die Kernporen, dass Proteine kleiner als 30 kDa durch Diffusion passieren können, während größere Proteine entweder nicht in den Kern gelangen können oder ein besonderes Transportsystem benötigen. Da endogenes Filaktin mit einer Größe von 105 kDa im Kern bzw. den nukleären Proteinaggregaten nachgewiesen werden kann, ist die Größe kein limitierender Faktor und auch ein zusätzliches GFP sollte eine Lokalisation im Kern nicht verhindern. Es sei denn, es liegt durch den GFP Anteil eine sterische oder funktionelle Störung für die Passage durch die Kernporen vor, die sehr spezifisch für das GFP-Filaktin Fusionskonstrukt sein kann. Ein empfehlenswerter Versuchsansatz ist in solchen Fällen eine Fusionierung des GFP Anteils am C-terminalen Ende.

Nur als Ausblick soll hier ein Aspekt erwähnt werden, der eine völlig neue Betrachtungsweise der molekularen Abläufe mit sich bringen kann. Die Filamin-ähnliche Domäne in der N-terminalen Hälfte von Filaktin ist wohl wie im Filamin in *D. discoideum* oder im Menschen aus jeweils sieben Ig-ähnlichen Faltblättern aufgebaut. Bisher war man der Meinung, dass diese Strukturen lediglich als Abstandshalter zwischen zwei funktionell wichtigen Domänen agieren. Untersuchungen der Ig-ähnlichen Domänen im Kraftmikroskop (AFM) haben aber gezeigt, dass sich eine solche Domäne bei Zug-Spannung vollständig und vor allem reversibel entfalten kann (Schwaiger et al. 2004). Die Veränderungen in der Moleküllänge sind beträchtlich. *D. discoideum* Filamin kann sich durch das Entfalten einer einzigen Ig-ähnlichen Domäne in seiner Länge verdoppeln und auf diese

Weise ein enorm dynamisches und flexibles Momentum in das Zytoskelett einbringen. Es wäre also ein sehr vielversprechender Versuchsansatz, auch die Filamin-ähnlichen Wiederholungen im Filaktin auf diese Entfaltungsaktivität zu überprüfen. Vielleicht stabilisiert Filaktin die Lokalisation der Proteinaggregate in den Kernen durch die Interaktion Aktindomäne/Aktinfilamente an den stäbchenförmigen Aggregaten und eine durch die reversible Faltung/Entfaltung elastischen Aufhängung der Aggregate an der Innenseite der Kernmembran.

Aus medizinischer Sicht sind die Ergebnisse langfristig als Basis für die weitere Erforschung der Nemalin-Myopathie anzusehen. Weiterführende Versuche in einem Modellsystem könnten klären, ob es möglich ist, die Entstehung der Aktin-Aggregate nachzuverfolgen und im Detail zu verstehen. Wie können die Aggregate in vitro verzögert werden? Gibt es einen Mechanismus, der es der Zellkernmembran ermöglicht, ein Konstrukt wie GFPFiaFL aus dem Kern fernzuhalten. Könnte dieser Mechanismus durch in vitro Studien kopiert und so verändert werden, dass zelleigene Aktin-Aggregate daran gehindert werden könnten, die erforderlichen Proteine in den Kern einzuschleusen oder zumindest die stabile Etablierung der Aggregate im Kern zu verhindern.

5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zytoskelett einer Eukaryontenzelle.....	3
Abbildung 2: Schematische Organisation der Aktinvariante Filaktin	6
Abbildung 3: Proteinsequenz von <i>D. discoideum</i> Filaktin.....	7
Abbildung 4: Berechnetes Modell der Filaktin Aktin-Domäne A	7
Abbildung 5: <i>D. discoideum</i> Entwicklungszyklus (Chisholm und Firtel, 2004)	11
Abbildung 6: pDEX GFP g418 N2 Fia Full Length	35
Abbildung 7: Basensequenz des Filaktin-Aktin Konstruktes	36
Abbildung 8: pDrive Klonierungsvektor	38
Abbildung 9: Verdau einer maxipräparierten Plasmid-DNA des Vektors pDrive + Filaktin-Aktin-ähnlicher Domäne mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI	39
Abbildung 10: Agarose Testgel der pDEX (g418)-GFP Vektoren NT/CT	40
Abbildung 11: Basensequenz des gesamten pDEX (g418)-GFP-N1-Filaktin-Aktin Konstrukts.....	45
Abbildung 12: Coomassie-Färbung des 10%igen SDS-Gels mit den Lysaten der mit dem Plasmid pDEX(g418)-GFP-N1 Filaktin-Aktin transformierten <i>D. discoideum</i> AX2 bzw. Fia KO Klone	46
Abbildung 13: Immunanalyse des 10%igen SDS-Gels mit den Lysaten der mit dem Plasmid pDEX(g418)-GFP-N1 Filaktin-Aktin transformierten <i>D. discoideum</i> AX2 bzw. FiaKO Klone	47

Abbildung 14: Coomassie-Färbung eines SDS-Polyacrylamidgels (10% Acrylamid).	49
Abbildung 15: Western Blot ausgehend von einem SDS-Polyacrylamidgel. Die Nitrozellulosemembran wurde mit dem GFP-Antikörper (K3-184-2) inkubiert	50
Abbildung 16: Western Blot ausgehend von einem SDS-Polyacrylamidgel. Die Nitrozellulosemembran wurde mit dem Filaktin-Antikörper (3S-55-4) inkubiert	51
Abbildung 17: Western Blot ausgehend von einem SDS-Polyacrylamidgel. Die Nitrozellulosemembran wurde mit dem Filaktin-Antikörper (4S-59-4) inkubiert	53
Abbildung 18: <i>D. discoideum</i> Zellen runden sich ab und GFP-Cofilin wird Bestandteil nukleärer Aggregate	58
Abbildung 19: Kompakte Aktinaggregate bilden sich in der Filaktin Knock-Out Mutante verzögert.....	59
Abbildung 20: Differenzierte Aktinaggregate im Zellkern, Filaktin GFP-Fusionsprotein verbleibt im Zytoplasma.....	60
Abbildung 21: GFP Istl Aggregatbildung nach 60 Min. DMSO 5% Inkubation	61
Abbildung 22: N terminale Filaktin Domäne GFP FilR im Zellkern und Zytoplasma lokalisiert.....	61
Abbildung 23: GFP FiaAct verdichtet sich im Zellkern	62

6 Literaturverzeichnis

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2012): *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie* **4**

Bonner JT (1950): Observations on polarity in the slime mold *Dictyostelium Discoideum*. *The Biological Bulletin* **99**: 143-151

Broome S, Gilbert W. (1978): Immunological screening method to detect specific translation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **75**: 2746-2749

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805

Charette SJ, Cosson P (2004): Preparation of genomic DNA from *Dictyostelium discoideum* for PCR analysis. *BioTechniques* **36**: 574-575

Chisholm RL, Firtel RA (2004): Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 531-541

Cooper JA (2013): Mechanisms of cell migration in the nervous system. *Journal of Cell Biology* **202**: 725-734

Coulombe PA, Bousquet O, Ma L, Yamada S, Wirtz D (2000): The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends Cell Biology* **10**: 420 – 428

Dagert M, Ehrlich SD (1979): Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-28

Davenport JR, Yoder BK (2005): An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle. *American Journal of Physiology Renal Physiology* **289**: 1159-1169

Devreotes PN, Zigmond SH (1988): Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annual Review of Cell Biology* **4**: 649-686

Domazetovska A, Ilkovksi B, Cooper ST, Ghoddusi M, Hardeman EC, Minamide LS, (2007): Mechanisms underlying intranuclear rod formation. *Brain* **130**: 3275-3284

Eichinger L, Noegel AA, Glöckner G (2001): Das *Dictyostelium*-Genomprojekt. *Biospektrum* **7**: 229-231

Fletcher DA, Mullins RD (2010): Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**: 485-492

Fukui Y (1978): Intranuclear actin bundles induced by dimethyl sulfoxide in interphase nucleus of *Dictyostelium*. *Journal of Cell Biology* **76**: 146-157

Fukui Y, Katsumaru, H. (1979): Nuclear actin bundles in Amoeba, Dictyostelium and human HeLa cells induced by dimethyl sulfoxide. *Experimental Cell Research* **120**: 451-455

Gallinger J. (2013): WH2 domains and actin variants as multifunctional organizers of the actin cytoskeleton http://edoc.ub.uni-muenchen.de/16169/1/Gallinger_Julia.pdf

Gaudet P, Williams JG, Fey P, Chisholm RL (2008): An anatomy ontology to represent biological knowledge in *Dictyostelium discoideum*. *BMC Genomics* **9**: 130

Glöckner G, Eichinger L, Szafranski K, Pachebat JA, Bankier AT, Dear PH, Lehmann R, Baumgart C, Parra G, Abril JF, Guigo R, Kumpf K, Tunggal B, Cox E,

Quail MA, Platzer M, Rosenthal A, Noegel AA (2002): Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **418**: 79-85

Goebel HH, Kiefer R, Pongratz D, von Moers A (2005): Indikation und Qualifikationskriterien für die Biopsie und präparative Aufarbeitung von Muskel- und Nervengewebe. *Nervenheilkunde Schattauer* **933**

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996): Life with 6000 genes. *Science* **274**: 563-567

Hartwig JH, Stossel TP (1981): Structure of macrophage actin-binding protein molecules in solution and interacting with actin filaments. *Journal of molecular biology* **145**: 563-581

Hutchinson DO, Charlton A, Laing NG, Ilkovski B, North KN (2006): Autosomal dominant nemaline myopathy with intranuclear rods due to mutation of the skeletal muscle ACTA1 gene: clinical and pathological variability within a kindred. *Neuromuscular Disorder* **16**: 113-121

Joseph JM, Fey P, Ramalingam N, Liu XI, Rohlf M, Noegel AA, Müller-Taubenberger A, Glöckner G, Schleicher M (2008): The actinome of *Dictyostelium discoideum* in comparison to actins and actin-related proteins from other organisms. *PLoS One* **3**: e2654

Kaimaktchiev V, Goebel H, Laing N, Narus M, Weeks D, Nixon R (2006): Intranuclear nemaline rod myopathy. *Muscle Nerve* **34**: 369-372

Kessin RH (2010): *Dictyostelium*: evolution, cell biology and the development of multicellularity. *Cambridge University Press*.

Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, Kozlov S, Sullivan T, Kamm RD, Stewart CL, Lee RT (2004): Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *Journal of Clinical Investigation* **113**: 370-378

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Loening UE (1967): Polyacrylamid-Gelelektrophorese von hochmolekularer RNA. *Biochemistry Journal* **102**: 251-257

Nishida E, Iida K, Yonezawa N, Koyasu S, Yahara I, Sakai H (1987): Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**: 5262-5266

Nowak KJ, Wattanasirichaigoon D, Goebel HH, Wilce M, Pelin K, Donner K, Jacob RL, Hübner C, Oexle K, Anderson JR, Verity CM, North KN, Iannaccone ST, Müller CR, Nürnberg P, Muntoni F, Sewry C, Hughes I, Sutphen R, Lacson AG, Swoboda KJ, Vigneron J, Wallgren-Pettersson C, Beggs AH, Laing NG (1999): Mutations in the skeletal muscle alpha-actin gene in patients with actin myopathy and nemaline myopathy. *Nature Genetics* **23**: 208-212

Parent CA (2004): Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and *Dictyostelium*. *Current Opinion in Cell Biology* **16**: 4-13

Raper KB (1935): *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *Journal of Agricultural Research* **50**: 135-147

Sambrook J, Russel DW (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory New York* **3**

Sameshima M, Kishi Y, Osumi M, Mahadeo D, Cotter DA (2000): Novel actin cytoskeleton: actin tubules. *Cell Structure and Function* **25**: 291-295.

Schleicher M, Jockusch BM, (2008): Actin: it's cumbersome pilgrimage through cellular compartments. *Histochemistry and Cell Biology* **129**: 695-704

Schnell C, Kan A, North K (2000): An artefact gone awry: identification of the first case of nemaline myopathy by Dr. RDK Reye. *Neuromuscular Disorder*. **10**: 307-312

Schwaiger I, Kardinal A, Schleicher M, Noegel AA, Rief M (2004): A mechanical unfolding intermediate in an actin-crosslinking protein. *Nature Structural and Molecular Biology* **11**: 81-85

Shy GM, Engel WK, Somers JE, Wanko T (1963): Nemaline Myopathy. A new congenital myopathy. *Brain* **86**: 793-810

Simpson PA, Spudich JA, Parham P (1984): Monoclonal antibodies prepared against *Dictyostelium* actin: characterization and interactions with actin. *Journal of Cell Biology* **99**: 287-295

Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD (2006): The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* **314**: 268–274

Sparrow JC, Nowak KJ, Durling HJ, Beggs AH, Wallgren-Pettersson C, Romero N, Nonaka I, Laing NG (2003): Muscle disease caused by mutations in the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). *Neuromuscular Disorder* **13**: 519-531

Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS (2001): Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 138-145

Stüven T, Hartmann E, Görlich D (2003): Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin actin complexes. *EMBO Journal* **22**: 5928-5940

Tsien RY (1998): The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 509-544

Unger S, Mainberger A, Spitz C, Bähr A, Zeschnigk C, Zabel B, Superti-Furga A, Morris-Rosendahl DJ. (2007): Filamin A mutation is one cause of FG syndrome. *American Journal of Medical Genetics* **143**: 1876-1879

Vandekerckhove J, Weber K (1980): Vegetative *Dictyostelium* cells containing 17 actin genes express a single major actin. *Nature* **284**: 475-477

Wada A, Fukuda M, Mishima M, Nishida E (1998): Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO Journal* **17**: 1635-1641

Williams KL, Newell PC (1976): A genetic study of aggregation in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* **82**: 287-307

7 Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Bp.	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
ca.	circa
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
engl.	englisch
Fa.	Firma
Fia	Filaktin
FL	Full length
FilR	Filamin-Ig-ähnliche Wiederholungen
g	Gravitationsbeschleunigung
GFP	Grünes Fluoreszierendes Protein
IRM	Intranukleäre Rod Myopathie
Ist1	Filaktin Ist1 - Domäne
KO	Knock-out

kb	Kilobasen
Min.	Minute
nm	Nanometer
NM	Nemalin-Myopathie
o.g.	oben genannt/en
ON	over night, über Nacht
Rt	Raumtemperatur
s.	siehe
sog.	sogenannt
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
Z	Zelle/Zellen

8 Danksagung

Vielen Dank an *Prof. Michael Schleicher* für die Ausdauer und motivierende Art und Weise der Betreuung und Unterstützung bei sämtlichen Anliegen.

Vielen Dank auch an *Dr. Julia Gallinger* und *Dr. Christoph Gallinger* für die herausragende Unterstützung, ausdauernde Motivation und Hilfestellung während der gesamten Arbeit.