

Ludwig-Maximilians Universität München

Fakultät für Biologie

Dissertation

Charakterisierung des

Zytoskelett-Proteins Villidin

und einer dritten Profilin-Isoform

in *Dictyostelium discoideum*

Annika Gloss

2001

**Charakterisierung des Zytoskelett-Proteins Villidin
und einer dritten Profilin-Isoform
in *Dictyostelium discoideum***

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

vorgelegt von

Annika Gloss

aus

Ansbach

19. Juli 2001

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

München, 19. Juli 2001

Annika Gloss

Dissertation eingereicht: 19. Juli 2001

Erstgutachter: PD Dr. F. Siegert

Zweitgutachter: Prof. Dr. C.N. David

Sondergutachter: Prof. Dr. M. Schleicher

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2001

“... Aber heute braucht man viele gute Belege um jemanden zu überzeugen - eben diesen Beleg versuche ich nun beizubringen ...”

Oswald Avery

(aus einem Brief an seinen Bruder über die Forschungsarbeit am transformierenden Prinzip)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind in Arbeit:

Gloss, A., F. Rivero, N. Khaire, R. Müller, W.F. Loomis, M. Schleicher und A.A. Noegel. 2001. Villidin, a novel WD-repeat and villin related protein from *Dictyostelium discoideum*, is associated with membranes and the cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell.* (eingereicht).

Gloss, A., M. Borath, D. Rieger, A.A. Noegel und M. Schleicher. 2001. Profilin III, a third profilin isoform in *Dictyostelium discoideum*. (in Arbeit).

Gloss, A., F. Rivero, W.F. Loomis, M. Schleicher und A.A. Noegel. 2000. Villidin, a member of the villin-family in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell. (Supplement to Mol. Biol. Cell.)* 11:555a. Abstract: 2871.

Gloss, A., F. Rivero, R. Müller, W.F. Loomis, M. Schleicher und A.A. Noegel. 1999. Villidin, a member of the villin-family in *Dictyostelium*, is involved in morphogenesis. *1st Munich Symposium on Cell Dynamics, Germany*. Abstract: T22.

Gloss, A., F. Rivero, M. Schleicher, W.F. Loomis und A.A. Noegel. 1999. Cloning and characterization of villidin, a novel villin-like protein from *Dictyostelium discoideum*. *European Cell Biology Organization (ECBO), Congress in Bologna, Italy. (Book of Abstracts)*. Abstract: B-8.

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von April 1998 bis Februar 2001 an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Adolf-Butenandt-Institut / Zellbiologie, unter der Anleitung von Prof. Dr. Michael Schleicher angefertigt. Die Betreuung der Arbeit erfolgte durch PD Dr. Florian Siegert, Zoologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	VII
SUMMARY	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Zytoskelett und Aktin	1
1.2 Aktin-bindende Proteine und die Regulation des Mikrofilamentsystems	2
1.3 Die Gelsolin-Familie	4
1.3.1 Gelsolin und Gelsolin-homologe Proteine	4
1.3.2 Villin und die Bedeutung der „headpiece“-Domäne	5
1.4 Die „WD-repeat“-Familie	7
1.4.1 Charakteristika der Gruppe der „WD-repeat“-Proteine	7
1.4.2 Das „WD-repeat“-Protein Coronin	9
1.5 Profilin	9
1.6 <i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus	11
1.7 Aufgabenstellung	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Material	14
2.1.1 Enzyme, Antikörper, Inhibitoren und Antibiotika	14
2.1.1.1 Enzyme für die Molekularbiologie	14
2.1.1.2 Antikörper	14
2.1.1.3 Inhibitoren	15
2.1.1.4 Antibiotika	15
2.1.2 Reagenzien	15
2.1.3 Medien	16
2.1.3.1 Medien für die <i>D. discoideum</i> Kultur	16
2.1.3.2 Medien für die <i>E. coli</i> Kultur	17
2.1.3.3 Medien für die <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kultur	17
2.1.4 Puffer und Lösungen	18

2.1.5	Bakterienstämme.....	19
2.1.6	Hefestämme	19
2.1.7	<i>Dictyostelium discoideum</i> Stämme	19
2.1.8	Vektoren	19
2.1.9	Radiochemikalien.....	20
2.1.10	Geräte	20
2.1.11	Sonstige Materialien.....	21
2.1.12	Zentrifugen und Rotoren	21
2.1.13	Computerprogramme zur Sequenzanalyse und Datendarstellung	22
2.2	<i>Dictyostelium discoideum</i> Kulturen	22
2.2.1	Anzucht in Flüssigmedium	22
2.2.2	Anzucht auf Agarplatten.....	22
2.2.3	Entwicklung von <i>D. discoideum</i>	23
2.2.4	Sporenkonservierung.....	23
2.2.5	Einfrieren von <i>Dictyostelium</i> -Zellen.....	23
2.3	Molekularbiologische Methoden	24
2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA	24
2.3.1.1	Präparation von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (1981).....	24
2.3.1.2	Präparation von Plasmid-DNA nach der Qiagen-Methode	24
2.3.2	Präparation chromosomaler DNA aus <i>D. discoideum</i>	25
2.3.3	Verdau mit Restriktionsenzymen.....	26
2.3.4	Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	26
2.3.5	Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen	27
2.3.5.1	Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen mit DE-81 Ionenaustauschpapier.....	27
2.3.5.2	Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen nach der Qiagen-Methode	27
2.3.6	„Southern-Blotting“	28
2.3.7	Radioaktive Markierung von DNA-Proben.....	29
2.3.8	Hybridisierung mit radioaktiv markierten Proben	29
2.3.9	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>D. discoideum</i>	30
2.3.10	Elektrophorese von RNA in Agarosegelen	31
2.3.11	„Northern-Blotting“	32
2.3.12	Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen.....	32
2.3.12.1	Oligonukleotide.....	32

2.3.12.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
2.3.12.3	RT-PCR nach der QIAGEN OneStep Methode.....	35
2.3.13	Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA.....	36
2.3.13.1	Phosphatase Behandlung.....	36
2.3.13.2	DNA-Ligase Reaktion.....	36
2.3.14	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen für die Elektroporation.....	37
2.3.15	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation.....	37
2.3.16	DNA-Kolonie-Blot für <i>E. coli</i>	38
2.3.17	<i>E. coli</i> Dauerkulturen.....	38
2.4	„Yeast-Two-Hybrid“-System.....	39
2.4.1	Kultur von Hefen.....	40
2.4.1.1	Anzucht der Hefen auf Agarplatten.....	40
2.4.1.2	Vermehrung in Flüssigmedium.....	40
2.4.1.3	Stammhaltung.....	40
2.4.2	Transformation von DNA in Hefen.....	40
2.4.3	Autoaktivitätstest der DNA-BD/Villidin-Konstrukte („bait“)......	42
2.4.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen.....	43
2.5	Proteinchemische Methoden.....	44
2.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.5.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	45
2.5.3	Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen.....	46
2.5.4	Silberfärbung von Proteinen nach SDS-PAGE (Oakley <i>et al.</i> , 1980).....	47
2.5.5	„Western-Blot“ - Nachweis der Antigene durch Chemilumineszenz.....	47
2.5.6	Proteinbestimmung.....	48
2.5.7	Untersuchung der Villidin-Verteilung durch Präparation von Zellhomogenaten und subzellulären Fraktionen.....	49
2.5.8	Zellfraktionierung.....	49
2.5.9	Messung von Enzymaktivitäten in subzellulären Fraktionen.....	50
2.5.10	Aufreinigung und Markierung von Aktin.....	51
2.5.10.1	Präparation von Aktin aus Kaninchenmuskel.....	51
2.5.10.2	Reinigung von Aktin aus <i>D. discoideum</i>	52
2.5.10.3	Pyren-Markierung von Aktin.....	53
2.5.11	Induktion, Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	54
2.5.11.1	Expression und Reinigung des rekombinanten Villidin-pFc3.....	54

2.5.11.2	Expression und Reinigung des rekombinanten Villidin-„headpiece“.....	54
2.5.11.3	Expression von verschiedenen rekombinanten Villidin-Konstrukten.....	55
2.5.11.4	Induktion und Reinigung von rekombinatem Profilin III.....	56
2.5.12	Nachweis der Aktin-Bindung	57
2.5.12.1	Kosedimentation mit F-Aktin	57
2.5.12.2	Nachweis der Aktin-Bindung durch Fluoreszenzspektroskopie.....	58
2.5.12.3	Einfluß von PIP ₂ auf die Aktin-Polymerisation.....	58
2.5.13	Kosedimentation von Profilin III mit poly-(L)-Prolin-Matrix.....	59
2.5.14	Kosedimentation mit Phospholipiden (nach Touhara <i>et al.</i> , 1995)	59
2.5.15	Chromatographische Methoden	60
2.5.15.1	Analytische Gelfiltration	60
2.5.15.2	Gelfiltrationschromatographie unter denaturierenden Bedingungen	60
2.5.15.3	Affinitätschromatographie zum Nachweis von Bindungspartnern.....	61
2.5.16	Immunologische Methoden	62
2.5.16.1	Herstellung von polyklonalem Antiserum aus Kaninchen.....	62
2.5.16.2	Aufreinigung von IgG über Affinitätschromatographie.....	62
2.5.16.3	Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern.....	63
2.5.16.4	Immunpräzipitation	63
2.6	Zellbiologische Methoden	63
2.6.1	Indirekte Immunfluoreszenz	63
2.6.2	Nachweis von Pinozytose und Phagozytose.....	66
2.6.3	Konfokale Mikroskopie.....	67
2.6.4	Analyse der Migrationsphase (Phototaxis-Versuch).....	67
3	ERGEBNISSE	68
3.1	Sequenzanalyse von Villidin	68
3.1.1	Die C-terminale Gelsolin/Villin-Homologie	70
3.1.2	Die „headpiece“-Domäne von Villidin	72
3.1.3	Das N-terminale „WD-repeat“-Sequenzmotiv	73
3.2	Biochemische und zellbiologische Charakterisierung von Villidin.....	77
3.2.1	Villidin-Konstrukte zur rekombinanten Proteinexpression.....	77
3.2.2	Expression und Reinigung des pFc3-Stücks von Villidin in <i>E. coli</i>	78
3.2.3	Expression und Reinigung der „headpiece“-Domäne von Villidin in <i>E. coli</i>	79

3.2.4	Expressionsversuch charakteristischer Villidin-Fragmente in <i>E. coli</i>	80
3.2.5	Spezifität des polyklonalen Antikörpers 6336 und des monoklonalen Antikörpers 257-6-2	82
3.2.6	Sedimentationsassay der rekombinanten „headpiece“-Domäne mit Aktin.....	85
3.2.7	Intrazelluläre Verteilung von Villidin in <i>D. discoideum</i> in der Immunfluoreszenz im Vergleich zu der Lokalisation von Villidin-GFP-Fusionsproteinen	87
3.2.7.1	Intrazelluläre Verteilung von Villidin	87
3.2.7.2	Intrazelluläre Verteilung der Villidin-GFP-Fusionsproteine.....	95
3.2.8	Zellfraktionierung	99
3.2.9	Gelfiltrationschromatographie unter denaturierenden Bedingungen	101
3.2.10	Charakterisierung von Villidin-minus-Mutanten.....	102
3.2.11	Suche nach potentiellen Villidin-Bindungspartnern	104
3.3	Molekularbiologische Charakterisierung von Profilin III	106
3.3.1	Sequenzanalyse von Profilin III.....	106
3.3.2	Analyse des Profilin III-Gens in <i>D. discoideum</i>	110
3.3.3	Nachweis der Genexpression durch RT-PCR.....	112
3.4	Biochemische und zellbiologische Charakterisierung von Profilin III	114
3.4.1	Expression und Extraktion von rekombinantem Profilin III	114
3.4.2	Nachweis der Interaktion zwischen Profilin III und poly-L-Prolin	115
3.4.3	Reinigung des rekombinanten Profilin III	115
3.4.4	Sedimentationsversuch zum Nachweis der Phospholipid-Bindung.....	116
3.4.5	Nachweis der Phospholipid-Bindung durch Gelfiltration	117
3.4.6	Aktin- und PIP ₂ -Bindeeigenschaften von Profilin III in der Fluoreszenzspektroskopie.....	119
4	DISKUSSION	121
4.1	Villidin	121
4.1.1	Die Sonderstellung von Villidin in der Gelsolin/Villin-Familie	122
4.1.1.1	Strukturelle Organisation der Proteine der Gelsolin/Villin-Familie	122
4.1.1.2	Strukturelle Voraussetzung für die Fragmentierung von Filamenten.....	123
4.1.1.3	Strukturelle Erfordernisse der F-Aktin-Vernetzung.....	125
4.1.1.4	Physiologische Funktionen der Gelsolin-Familie und „headpiece“-Proteine.....	128

4.1.2	Villidin und die N-terminale „WD-repeat“-Domäne	131
4.1.2.1	Strukturelle Organisation der β -Propellerstruktur der „WD-repeat“-Familie	131
4.1.2.2	Villidin ist ein Coronin-Homolog mit Villin-homologer Sequenzerweiterung	132
4.1.3	Intrazelluläre Lokalisation von Villidin	134
4.1.4	Die Bedeutung von Villidin in der Morphogenese von <i>D. discoideum</i>	135
4.1.5	Charakterisierung der Villidin-minus-Mutante	136
4.2	Profilin III	137
4.2.1	Die drei Profilin-Isoformen in <i>D. discoideum</i>	137
4.2.1.1	Die genomische Struktur der drei Profilin-Isoformen	137
4.2.1.2	Entwicklungsregulation von Profilin I, II und III	138
4.2.1.3	Die Struktur der Profilin III-Peptidsequenz	138
4.2.2	Die poly-L-Prolin-Bindungsfähigkeit von Profilin III	140
4.2.3	Die Interaktion von Profilin III mit Aktin <i>in vitro</i>	141
4.2.4	Die PIP ₂ -Regulation der Profilin III-Aktin-Interaktion	142
4.2.5	Die physiologische Bedeutung von Profilin	142
5	LITERATURVERZEICHNIS	144
6	ABKÜRZUNGEN	166
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	167
	LEBENS LAUF	170
	DANKSAGUNG	171

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen beeinflusst die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in *Dictyostelium*-Amöben zwei neue Proteine beschrieben: das neuartige Zytoskelett-Protein Villidin und eine dritte Profilin-Isoform.

Ziel des ersten Teilprojekts war es charakteristische Besonderheiten der Villidin-Sequenz detailliert zu analysieren sowie durch molekularbiologische, biochemische und zellbiologische Versuchsansätze das Protein näher zu beschreiben. Villidin ist ein 190 kDa großes Molekül, das aufgrund seiner Domänenstruktur sowohl der Gelsolin/Villin- als auch der „WD-repeat“-Familie zugeordnet wird. Die Gruppe der „WD-repeat“-Proteine umfaßt hauptsächlich regulatorische Proteine, die bei der Signaltransduktion und anderen wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind. Am Aminoende von Villidin finden sich vier bis acht der Familien-typischen Wiederholungseinheiten, die wahrscheinlich eine β -Propellerstruktur ausbilden können. Der „WD-repeat“-Domäne schließt sich eine 400 Aminosäure lange Region an, die die Verbindung zu der zweiten charakteristischen Villidin-Domäne am C-Terminus herstellt. Diese zeichnet sich durch eine auffallende Ähnlichkeit zu Villin aus, allerdings fehlt die erste der sechs Familien-typischen Gelsolin/Villin-Domänen in Villidin, doch das markante zusätzliche C-terminale „headpiece“-Segment ist vorhanden. Die Villidin-mRNA ebenso wie das Protein werden in der Wachstumsphase und der frühen Zellaggregation nur schwach exprimiert. Die Konzentration steigt im Verlauf der Entwicklung stetig an und erreicht vor der Kulmination ein Maximum. Das Protein liegt sowohl zytosolisch als auch Zytoskelett- und Membran-assoziiert vor. Diese biochemischen Befunde stimmen gut mit den Immunfluoreszenzergebnissen überein. Das endogene Villidin ist gleichmäßig über das Zytosol verteilt und lokalisiert an vesikulären Strukturen. Aufgrund von Kollokalisationsversuchen ist davon auszugehen, daß es sich hierbei um eine noch nicht identifizierte Vesikelpopulation handelt. GFP-Fusionen mit der Villin-Domäne lassen eine dem endogenen Protein vergleichbare Verteilung über das Zytosol beobachten. Eine Lokalisation zusammen mit F-Aktin während Pinozytose und Phagozytose war nur für Fusionsproteine mit der „WD-repeat“-Domäne zu beobachten. Die Untersuchung von Villidin-minus-Mutanten zeigte einen Phototaxisdefekt im Stadium des Pseudoplasmodiums. In Hinblick auf diesen Defekt und die Domänenstruktur von Villidin wird eine Rolle in der Signaltransduktion vermutet.

Das zweite Teilprojekt beinhaltete den molekularbiologischen Nachweis der dritten Profilin-Isoform in *D. discoideum* sowie die biochemische Analyse der *in vitro* Funktion eines rekombinant exprimierten Profilin III. Die bekannten *Dictyostelium*-Profilin-Isoformen I und II sind in der Lage mit G-Aktin, PIP₂ und poly-L-Prolin zu interagieren. Ebenso wie Profilin I und II wird Profilin III durch ein einzelnes Gen kodiert. Die Transkription von Profilin III zeigt im Gegensatz zu Profilin I und II keine Entwicklungsregulation. Alle drei Isoformen zeichnen sich durch das Auftreten typischer, hochkonservierter Aminosäuren in der C-terminalen Aktin- und der N-terminalen poly-L-Prolin-bindenden Region aus. Die funktionellen Eigenschaften des rekombinant exprimierten, 13 kDa großen Profilin III korrespondieren mit dieser Sequenzstruktur. Das rekombinante Protein kosedimentiert mit poly-L-Prolin und hemmt deutlich die Aktin-Polymerisation, wobei die PIP₂-Interaktionsfähigkeit mit der G-Aktin-Affinität konkurriert. Die geringe Expression der Profilin III-mRNA spricht gegen eine mögliche Aktin-sequestrierende Funktion. Da Profilin I- und II-Transkripte gegen Ende der Entwicklung fast ganz verschwinden, die Profilin III-mRNA hingegen stets konstant transkribiert wird, werden unterschiedliche Aufgaben für die drei Isoformen vermutet.

SUMMARY

A large number of actin-binding proteins regulates the dynamics of the actin cytoskeleton. Here we report the identification and characterization of two new proteins in *Dictyostelium discoideum*: the novel cytoskeleton protein villidin and a third profilin isoform.

One goal of the project was to analyze the features of the villidin sequence in detail and to investigate the protein by molecular, biochemical and cell biological approaches. Villidin has a calculated molecular mass of 190,000 Da. Based on the domain structure of the protein, villidin can be assigned to the gelsolin/villin-family as well as to the WD-repeat family. In principal, the group of the WD-repeat proteins includes regulatory proteins which are involved in signal transduction and other important cellular processes. The N-terminus of villidin harbours between four and eight of the specific WD-repeats and forms probably a β -propeller structure. The WD-domain is followed by an intervening domain of 400 amino acids that leads to the second characteristic villidin domain at the C-terminus. This part of the sequence exhibits a similarity to villin, though the first of the six villin domains is absent in villidin. However the typical headpiece is present. Villidin mRNA and protein are expressed in low amounts during growth and early aggregation, they are increased during development and reach highest levels at the tipped aggregate stage. The protein is present in the cytosol as well as in the cytoskeletal and the membrane fraction. These biochemical results are in agreement with the immunofluorescence data. The endogenous villidin is homogeneously distributed throughout the cytosol and localizes at vesicular structures. Colocalization experiments lead to the assumption that these structures might belong to a still unknown population of vesicles. GFP fusion proteins with the villin homology domains show a similar distribution, whereas GFP fusions of the N-terminal part encompassing the WD-repeats are present in F-actin rich regions at the plasma membrane and on internal membranes during motility, pinocytosis and phagocytosis. Mutants lacking villidin do not show an aberrant phenotype during growth and development but are defective in motility and phototaxis in the multicellular slug stage. Based on this defect and the multidomain structure of the protein, villidin might be involved in signal transduction processes leading to phototactic movement.

The second part of the project dealt with a new gene which codes for a third profilin isoform in *D. discoideum*. The well-known *Dictyostelium* profilin isoforms I and II are able to interact with G-actin, PIP₂ and poly-L-prolin. As in the case of profilin I and II, profilin III is encoded

by a single gene. In contrast to profilin I and II, the transcription of profilin III is not developmentally regulated. All three isoforms show the typical limited homology at the amino acid level. The recombinant Profilin III protein cosediments with poly-L-prolin, inhibits the actin-polymerisation and the PIP₂ interaction of profilin III competes with the G-actin affinity. The low expression of Profilin III mRNA in growing and developing cells suggests a distinct role of profilin III because a low protein concentration argues against an actin sequestering function.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Zytoskelett und Aktin

Das wohl bekannteste Beispiel für das Zytoskeletts ist der Aufbau des Muskels mit seinen kontraktionsfähigen Filamenten. Doch auch in Nicht-Muskelzellen ist ein Zytoskelett zu finden. Es ermöglicht die Aufrechterhaltung der Form, verleiht dynamische Fähigkeiten wie Bewegung, Phagozytose oder Zellteilung und beeinflusst nicht zuletzt entscheidende Entwicklungsprozesse. Diesem intrazellulären Netzwerk liegt das Zusammenwirken dreier filamentärer Strukturen zugrunde. Mikrotubuli (\varnothing ca. 24 nm) und Mikrofilamente (\varnothing ca. 6-10 nm) finden sich in allen eukaryontischen Zellen. Intermediärfilamente (\varnothing ca. 10 nm) konnten hingegen in Pflanzen und niederen Organismen bisher noch nicht nachgewiesen werden. Die Voraussetzung für dynamisches Verhalten von Filamenten sind Polymerisation und Depolymerisation der hochkonservierten Proteinmonomere, der α/β -Tubuline, der Aktin-Monomere und im Falle der Intermediärfilamente einer Vielzahl verschiedener Proteine (z.B. Keratin).

In Kontrast zum hoch geordneten Aufbau des Mikrofilamentsystems der Muskelzellen steht seine Dynamik in migrationsfähigen Zellen, wie es beispielsweise Leukozyten oder Amöben sind. Das Aktin-Zytoskelett ist im Verlauf der Evolution bereits sehr früh entstanden und die Sequenz von Aktin ist stark konserviert. Die Aminosäuren des G-Aktins sind in vier Domänen um einen zentralen Spalt angeordnet, der eine Nukleotidbindungsstelle (für ATP/ADP) und eine Bindungsstelle für ein divalentes Kation (Mg^{2+}) aufweist. Beim Überschreiten der sogenannten kritischen Aktin-Konzentration (Grenzkonzentration, bei der unter definierten Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation herrscht) kommt es zur Polymerisation des G-Aktins, wodurch Mikrofilamente (F-Aktin) entstehen. Während des Polymerisationsverlaufs des Aktins lassen sich *in vitro* vier Phasen beobachten. Die Aktivierungsphase des Aktins, die Nukleation und die anschließende Elongation, bis sich schließlich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation eingestellt hat. *In vivo* unterliegt dieser Vorgang zahlreichen Regelmechanismen, wobei Aktin-bindende Proteine eine wichtige Rolle spielen.

1.2 Aktin-bindende Proteine und die Regulation des Mikrofilamentsystems

Der Aktiningehalt von *Dictyostelium discoideum* beträgt insgesamt etwa 175 μM Aktin. Wie auch in anderen Zelltypen liegen allerdings nur ca. 40 % des gesamten Aktins unter unstimulierten Bedingungen als F-Aktin vor (Haugwitz *et al.*, 1994). Aktin-bindende Proteine haben Einfluß auf den Polymerisationsverlauf, die Einstellung des Gleichgewichts zwischen G- und F-Aktin sowie auf die Lokalisation und die Anordnung der entstandenen Filamente (Stossel *et al.*, 1985; Luna und Condeelis, 1990; Schleicher und Noegel, 1992; Carlier, 1998, Pollard *et al.*, 2000). Daß die Gruppe der Aktin-bindenden Proteine relativ viele Proteine beinhaltet, liegt vermutlich in der funktionellen Redundanz begründet (Witke *et al.*, 1992).

G-Aktin-bindende Proteine verhindern eine vollständige Polymerisation, indem sie dem Gleichgewicht G-Aktin entziehen und der Zelle damit einen Vorrat an unpolymerisiertem Aktin für einen raschen Umbau des Mikrofilamentsystems zur Verfügung stellen. Vertreter dieser Gruppe sind Profilin (Haugwitz *et al.*, 1991; Rothkegel *et al.*, 1996), Thymosin β 4 (Nachmias, 1993), Cofilin (Theriot, 1997) und CAP (Gottwald *et al.*, 1996).

F-Aktin-verkappende und fragmentierende Proteine kontrollieren die Anzahl und Länge der Filamente. Die F-Aktin-verkappenden Proteine binden in der Regel an das schnell wachsende plus-Ende von Aktinfilamenten, verhindern so die spontane Anlagerung weiterer Aktin-Untereinheiten und damit eine Verlängerung der Filamente. PIP_2 ist in der Lage, verkappende Proteine von Aktin zu dissoziieren (Toker, 1998). Der Ablösung dieser Proteine folgt die Polymerisation des Aktinsystems. Zu den verkappenden Proteinen zählen z.B. das heterodimere Protein CAP 32/34 aus *D. discoideum* (Haus *et al.*, 1993) sowie Gelsolin, das in höheren Eukaryonten gefunden wird und zusätzlich eine F-Aktin-fragmentierende Aktivität aufweist (Yin und Stossel, 1979; Witke *et al.*, 1995).

F-Aktin-vernetzende Proteine beeinflussen die räumliche Anordnung der Aktin-Filamente. Dazu zählen Proteine, die eine parallele Anordnung der Filamente bewirken oder solche, die eine dreidimensionale Anordnung des Aktin-Netzwerkes erzeugen und stabilisieren. Typische vernetzende oder „cross-linking“ Proteine sind Filamin (Hock und Condeelis, 1987; Stossel *et al.*, 2001), α -Aktinin (Noegel *et al.*, 1987), Gelationsfaktor/Ddfilamin (Noegel *et al.*, 1989; Rivero *et al.*, 1996; Fucini *et al.*, 1997) und Spectrin (Pinder und Baines, 2000). Cortexillin I und II (Faix *et al.*, 1996) und Interaptin (Rivero *et al.*, 1998) aus *Dictyostelium* sind weitere vernetzende Proteine, die der α -Aktinin/Spectrin Superfamilie zugeordnet werden.

Membran-assoziierte Aktin-bindende Proteine verbinden das Mikrofilamentsystem mit der Plasmamembran. Zu ihnen zählen das integrale Plasmamembranprotein Ponticulin (Shutt *et al.*, 1995), das Golgi-assoziierte Comitin (Weiner *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 1996) und Talin (Kaufmann *et al.*, 1992; Kreitmeier *et al.*, 1995). Hisactophilin aus *D. discoideum* nimmt eine Sonderstellung in dieser Gruppe ein, da es sowohl direkt an F-Aktin bindet als auch die Aktin-Polymerisation in Abhängigkeit vom pH-Wert stimuliert (Stoeckelhuber *et al.*, 1996).

Motormoleküle können chemische Energie in gerichtete mechanische Kraft umwandeln. Diese Gruppe wird durch die stetig wachsende Familie der Myosin-Proteine gebildet. Allen Vertretern ist die Motordomäne gemeinsam (Bähler, 1996; Baker und Titus, 1998).

Die dynamischen Eigenschaften des Zytoskeletts werden *in vivo* durch ein komplexes Wechselspiel verschiedenster Moleküle gesteuert und zahlreiche Forschungsergebnisse vervollständigen stetig das Gesamtbild. So sind neben den aufgeführten klassischen Aktin-regulierenden Proteinen in den letzten Jahren neue Proteine im Regulationskreis des Aktins gefunden und beschrieben worden. Eine mögliche Hypothese der Ausbildung des Aktin-Filamentsystems für den Modellorganismus *Acanthamoeba* wird bei Pollard *et al.* (2000) dargestellt. Ein extrazellulärer Reiz aktiviert intrazelluläre GTPasen der Rho-Familie, welche Proteine der WASP/Scar-Familie stimulieren. Aktive WASP/Scar Proteine führen je ein Aktin-Monomer und Arp2/3 Komplex zusammen, dessen Untereinheiten zwei Aktin-verwandte Proteine beinhalten. Der Arp2/3 Komplex („actin related proteins“) initiiert das Wachstum eines neuen Filaments als Ast an einem älteren Filament. Die schnelle Elongation erfolgt durch Anlagerung von Aktin-Profilin-Komplexen, bis sie durch ein verkappendes Protein gehemmt wird. Der Einbau von ATP-Aktin führt zur Hydrolyse des gebundenen ATP. Anschließend fragmentiert und depolymerisiert ADF/Cofilin die ADP-Aktin-Filamente. Profilin fungiert als Nukleotidaustauschfaktor für Aktin, wodurch es den Austausch von ADP gegen ATP ermöglicht und so den G-Aktin Pool auffüllt. Allerdings vernachlässigt dieses Modell beispielsweise stark die vielschichtige Bedeutung der Proteine der Gelsolin-Familie und skizziert nur einen Teilbereich der umfangreichen Interaktionen. Beispielsweise konnten *in vitro* Studien zeigen, daß Gelsolin Aktin-Filamente wesentlich effizienter fragmentieren kann als ADF/Cofilin (Pope *et al.*, 2000; Southwick, 2000).

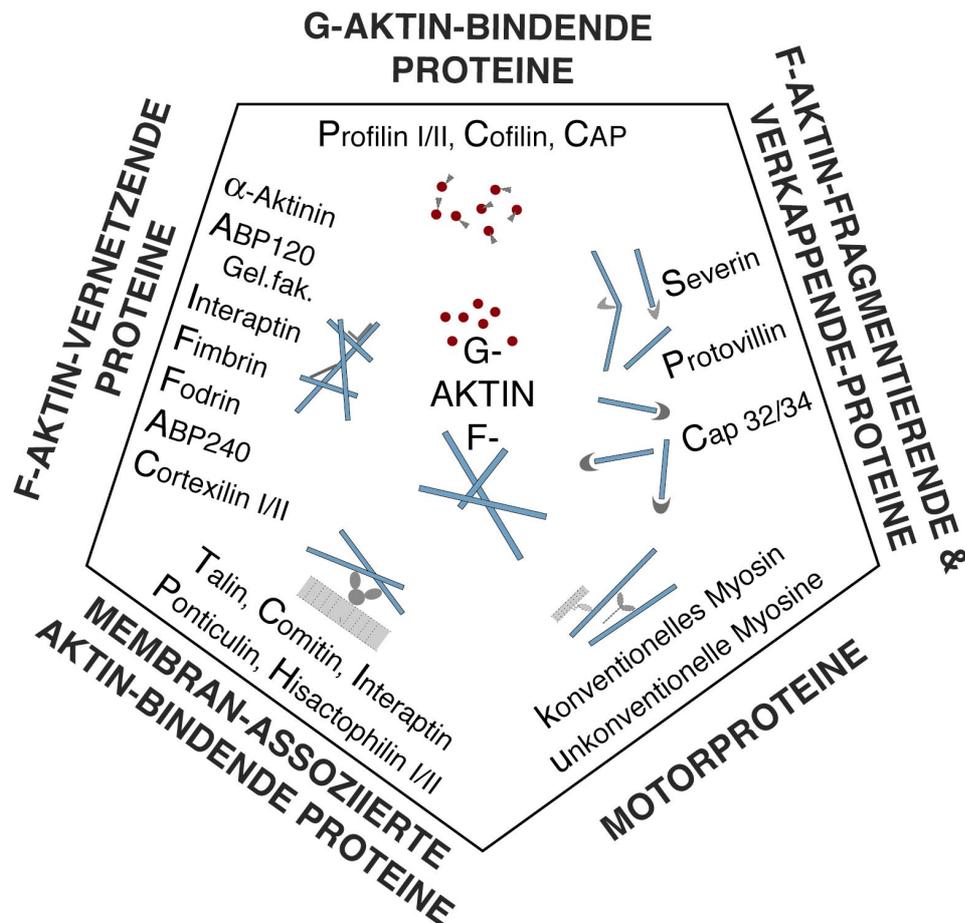


Abb. 1: Schematische Übersicht der Aktin-bindenden Proteine aus *D. discoideum* und ihre Interaktionen mit dem Mikrofilamentsystem.

Als Kriterium zur Unterteilung in Hauptgruppen dient die Funktion der Proteine. G-Aktin-bindende Proteine und jene, die Aktin-Filamente fragmentieren oder verkappen, ermöglichen die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen monomerem G- und filamentösem F-Aktin. Aktin-vernetzende Proteine gewährleisten die Viskoelastizität des Aktin-Netzwerkes, und Membran-„Anker“ verbinden es mit der Membran. (Modifiziertes Schema nach Eichinger et al., 1999).

1.3 Die Gelsolin-Familie

1.3.1 Gelsolin und Gelsolin-homologe Proteine

Proteine, die neben ihrer fragmentierenden Aktivität auch über Verkappungseigenschaften verfügen, werden aufgrund ihrer Homologie zu Gelsolin auf der Ebene der Primärstruktur unter der sogenannten Gelsolin-Familie beschrieben. Zuerst wurde das etwa 80 kDa große Gelsolin aus Makrophagen der Kaninchenlunge (Yin und Stossel, 1979/1981) und aus Blutplättchen (Bryan and Kurth, 1984) isoliert. Gelsolin liegt in der Zelle vor allem zytosolisch vor, ist aber auch Membran- oder Aktin-assoziiert vorzufinden (Barkalow *et al.*,

1996). Ca^{2+} aktiviert die Fragmentierungsfunktion des zytosolischen Gelsolins und erhöht dessen Bindung an PIP_2 , wodurch die Verkappung der Filamente aufgehoben wird. Durch diese Zyklen von Fragmentierung und Entkappung wird die Aktin-Polymerisation beschleunigt. Darüber hinaus kann Gelsolin durch Caspase3 gespalten werden, so daß der N-terminale Abschnitt freigesetzt und das Aktin-Zytoskelett demontiert werden, ohne daß eine Ca^{2+} -Aktivierung notwendig ist (Kothakota *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß Gelsolin möglicherweise eine Funktion während der Apoptose einnimmt. Proteine mit der Fähigkeit Aktinfilamente in kurze Stücke zu zerteilen und die entstandenen Fragmente zu verkappen, sind ferner Fragmin (Hinssen, 1981 a/b; Gettemans *et al.*, 1992), EWAM (D'Haese *et al.*, 1987; Giebing *et al.*, 1994) und Villin (Glenney *et al.*, 1981 a/b, Janmey und Matsudaira, 1988; Pope *et al.*, 1994; Friederich *et al.*, 1999). In *D. discoideum* wird diese Aufgabe von dem 40 kDa-Protein Severin übernommen (Brown, 1986; Eichinger *et al.*, 1991, Eichinger und Schleicher, 1992). CapG in Säugerzellen (Synonyme: gCAP39; Mishra *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1995) sowie die *Dictyostelium*-Proteine CAP 32/34 (Haus *et al.*, 1993) und Protovillin (Hofmann *et al.*, 1993) wirken hingegen ausschließlich verkappend. Weitere Proteine, die der Großgruppe der Gelsolin-Familie zugeordnet werden, sind beispielsweise FliI (Campbell *et al.*, 1993/1997/2000, Liu und Yin, 1998), GRP125 aus *D. discoideum* (Stocker *et al.*, 1999), Adseverin (Synonym: Scinderin; Lueck *et al.*, 1998), Advillin (Synonym: p92; Marks *et al.*, 1998) und Supervillin (Synonym: p205; Pestonjamas *et al.*, 1997; Wulfskuhle *et al.*, 1999). Charakteristisch für die Gelsolin-Familie sind hochkonservierte, repetitive Sequenzmotive (Way und Weeds, 1988), von denen die 40 kDa Vertreter wie Severin und Fragmin je drei, die größeren Moleküle wie Gelsolin und Villin je sechs enthalten (Eichinger *et al.*, 1991; Janmey, 1993).

1.3.2 Villin und die Bedeutung der „headpiece“-Domäne

Eine Sonderstellung innerhalb der Gelsolin-Familie nimmt das 92,5 kDa große Villin ein, da es neben den sechs Domänen noch ein zusätzliches C-terminales 8.5 kDa großes Teilstück aufweist. Dieses sogenannte „headpiece“ (hp) verleiht ihm bündelnde Aktivität, es ermöglicht also die Quervernetzung von Aktin-Filamenten (Glenney und Weber, 1981c; Louvard, 1989; Friederich *et al.*, 1990; Heintzelman und Mooseker, 1992). Villin ist ein saures Monomer und wurde erstmals in den Mikrovilli von Epithelzellen des Hühnerdarms entdeckt (Bretscher *et al.*, 1979). Die Sequenzidentität von Villin und Gelsolin beträgt ca. 50 %. Wie für Gelsolin gültig, ist auch Villins *in vitro* Aktivität in der Aktin-Polymerisation Ca^{2+} -abhängig. Bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (0,2-1 mM) zerlegt es F-Aktin in kurze Filamente. Diese

Fragmentierungsaktivität wird wiederum durch PIP₂ gehemmt. Wenn Ca²⁺ auf eine Konzentration von 10-100 nM sinkt, verkappt Villin die schnell wachsenden Enden und verhindert so die Elongation. Darüber hinaus ist dieses Protein bei niedrigen Ca²⁺-Konzentration auch in der Lage, die Bildung von Mikrofilamenten aus Aktin-Monomeren durch Nukleation zu fördern. In der Abwesenheit von Ca²⁺ zeigt Villin keinen Einfluß auf die Polymerisation, kann aber mittels der „headpiece“-Domäne die Aktin-Filamente vernetzen. Damit ist Villin bis dato das einzige Protein der Gelsolin/Villin-Familie, das vier *in vitro* Aktin-Regulationsfunktionen ausführen kann (Friederich *et al.*, 1999). Tropomyosin und Caldesmon binden ebenfalls an die Seiten von Aktin-Filamenten (Fraser *et al.*, 1997) und konkurrieren mit Villin/Gelsolin um die gleichen Bindestellen. Auf diese Weise schützen sie vor Fragmentierung durch die Gelsolin/Villin-Familie bzw. verhindern die Quervernetzung durch Villin und andere „headpiece“-Proteine. Eines der größten Mitglieder der Villin/Gelsolin-Familie ist Supervillin p205, das in Plasmamembranen von Neutrophilen (Rind) identifiziert wurde (Pestonjamas *et al.*, 1997). Infolge seiner auffallenden Ähnlichkeit zu Villin und Gelsolin am C-Terminus wurde es dieser Großgruppe zugeordnet. Supervillin ist bei der Zell-Zell-Adhäsion, an der Aktin-Filamente als Zytoskelettbestandteil beteiligt sind, involviert (Wulfskuhle *et al.*, 1999) und spielt vermutlich eine vielfältige Rolle bei Zellwachstum und Zellbewegung. Es kosedimentiert in Saccharose-Gradienten und der Immunpräzipitation mit endogenem Aktin. Allerdings bindet die Gelsolin/Villin-Domäne *in vivo* nur schwach an Aktin und die F-Aktin-Bindung wird vielmehr durch die N-terminale Domäne gefördert, die durch Kernlokalisierungssignale auffällt. Erst kürzlich wurde Archvillin als Supervillin-Isoform identifiziert (Posterpräsentation ASCB 2000; Oh *et al.*, Labor: E. Luna), das mit seinen ca. 248 kDa nunmehr das größte Protein der Villin-Familie ist.

Protovillin ist das erste bis dato veröffentlichte Villin-Homolog aus *D. discoideum* (Hofmann *et al.*, 1993). Trotz der Homologie zu Villin auf der Ebene der Primärstruktur, zeigen sich deutlich funktionelle Abweichungen in Protovillin. Im Gegensatz zu dem multifunktionellen Villin, ist Protovillin nur in der Lage, Aktin-Filamente zu verkappen; offensichtlich fehlt die F-Aktin-Bindestelle in Domäne II als Voraussetzung der Fragmentierungsfähigkeit. Es konnte gezeigt werden, daß die F-Aktin-Bindestelle von Severin, Gelsolin und Villin in der Domäne II lokalisiert ist (Eichinger *et al.*, 1991; Friederich *et al.*, 1992; Puius *et al.*, 2000). Die zusätzliche Funktion der Quervernetzung von Aktin-Filamenten ist durch eine weitere F-Aktin Bindestelle in der „headpiece“-Domäne des Villins gegeben.

„Headpiece“-Domänen konnten in zahlreichen Zytoskelettproteinen unterschiedlichster Funktion und Zellokalisation identifiziert werden. Die Sequenzen dieser Domänen zeigen keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen der Genbanken bzw. anderen F-Aktin-bindenden Proteinen, sind allerdings zu etwa 35-40 % untereinander identisch (Pope *et al.*, 1994; Azim *et al.*, 1995). Proteine, die sich durch ein „headpiece“-Segment auszeichnen, können aufgrund der Organisation der jeweiligen anhängenden „Kern“-Domäne in die Villin-, Dematin- und Talin-Familie eingeteilt werden (Vardar *et al.*, 1999). Das „headpiece“ findet sich stets am äußersten C-terminalen Ende einer Sequenz. Nicht alle „headpiece“-Domänen sind in der Lage, F-Aktin zubinden. Die Voraussetzung hierfür scheint eine Folge basischer Aminosäurereste (KKEK) am C-Terminus zu liefern. Ihre spezifische Funktion konnte durch *in vivo* Experimente gezeigt werden (Friederich *et al.*, 1992). Villin, bei dem die Sequenz KKEK zu KEEE mutiert worden war, hatte keinen Einfluß mehr auf die Organisation des Zytoskeletts. Protovillin aus *Dictyostelium*, das keine Quervernetzungsfähigkeit zeigt, fehlt dieses Sequenzmotiv völlig (Hofmann *et al.*, 1993). In Dematin, ein Aktin-vernetzendes Protein des Zytoskeletts der Erythrozytenmembran, kann die Quervernetzungsaktivität durch Phosphorylierung reversibel moduliert werden. Auch AblIM und seine Isoformen haben ein „headpiece“ im Anschluß an eine Dematin-homologe Region, binden F-Aktin aber *in vitro* mittels der Dematin-ähnlichen Domäne (Roof *et al.*, 1997). In *C. elegans* stellt UNC-115 das AblIM-Homolog dar (Lundquist *et al.*, 1998). Weitere „headpiece“-Proteine sind Quail (Cant *et al.*, 1998), Advillin (Marks, 1998), Supervillin (Wulfskuhle *et al.*, 1999) und das Talin-Homolog in *Dictyostelium*, TALB (Tsujioka *et al.*, 1999).

1.4 Die „WD-repeat“-Familie

1.4.1 Charakteristika der Gruppe der „WD-repeat“-Proteine

Proteine der „WD-repeat“-Familie sind in allen eukaryontischen Zellen verbreitet. Sie stehen nicht unmittelbar mit Aktin-Interaktionen in Zusammenhang, sondern vereinen diverse regulatorische Proteine, die an einer Vielzahl von Aufgaben im Nukleus und Zytoplasma beteiligt sind, in einer gemeinsamen Großgruppe. Beispiele für die Verbreitung der „WD-repeat“-Proteine finden sich in der Signaltransduktion (Neer, 1995), Zytokinese (Harris und Hamer, 1995), Gentranskription (Gutjahr *et al.*, 1995; Sathe und Harte, 1995), mRNA-Modifikation (Takagaki und Manley, 1992), Beteiligung am Kernporenkomplex (Siniossoglou *et al.*, 1996) und ferner auch Vesikel-Formation und Fusion (Stenbeck *et al.*,

1993 ; Gerisch *et al.*, 1995). Die unterschiedlichen funktionellen Rollen liefern folglich keine Definitionsgrundlage. Vielmehr erfolgt die Klassifizierung aufgrund einer strukturellen Homologie. Typisch für „WD-repeat“-Proteine ist ein relativ schwach konserviertes, repetitives Sequenzmotiv, das sich vier bis acht Mal wiederholen kann (van der Voorn und Ploegh, 1992; Smith *et al.*, 1999). Der Kern der Wiederholungseinheit endet für gewöhnlich mit der Aminosäurefolge Tryptophan (W) - Asparaginsäure (D). Entdeckt wurde diese repetitive Sequenz in der Signal-transduzierenden β -Untereinheit der heterotrimeren GTP-bindenden Proteine (Wall *et al.*, 1995). Einer Region variabler Länge schließt sich eine zentrale Domäne (Kerndomäne) von mehr oder weniger konstanter Länge an (44-60 Aminosäuren). Die beiden Bereiche werden durch zwei charakteristische Elemente, nämlich Gly-His (GH) und Tryp-Asp (WD), getrennt. Allerdings handelt es sich bei GH und WD nicht um eine absolute Konservierung. Die Anzahl der Aminosäuren von WD zum nächsten GH kann sehr variieren (11-150), obwohl eher kürzere Sequenzen häufiger auftreten (Neer *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999). Der Kerndomäne zwischen GH und WD liegt eine Konsensussequenz zu Grunde, die von der Arbeitsgruppe E. J. Neer (1999) beschrieben wurde (Abb. 5 C oben).

In der dreidimensionalen Struktur des „WD-repeat“-Proteins $G\beta$ formen die sieben repetitiven Einheiten eine zirkuläre, Propeller-ähnliche Konformation mit sieben, aus je vier β -Strängen gebildeten Blättern (Wall *et al.*, 1995; Sondek *et al.*, 1996 / Abb. 34 A). Die korrespondierenden Sequenz- und Strukturwiederholungen, führen zu der Schlußfolgerung, daß alle „WD-repeat“-Proteine eine vergleichbare Struktur besitzen. Im allgemeinen ist das Auftreten eines homologen Sequenzmusters innerhalb verschiedener Proteine ein Hinweis darauf, daß diesen eine biochemische Funktion gemein ist. Dem gegenüber stehen allerdings jene Sequenzmuster wie das „WD-repeat“-Motiv, die im Laufe der Evolution konserviert wurden, aber nicht direkt mit einer bestimmten Funktion assoziiert sind. Der Grund dieser Konservierung sind in diesem Falle die strukturellen Eigenschaften. Die β -Propellerstruktur bietet drei potentielle Protein-Interaktionsoberflächen, nämlich die Ober- und Unterseite wie die Umfangsfläche des Propellers. Der zentrale Tunnel hingegen erscheint ungeeignet für eine Protein/Protein-Interaktion, spielt aber unter Umständen eine wichtige Koordinationsrolle (Wall *et al.*, 1995; Sondek *et al.*, 1996). Es konnte bis jetzt nicht geklärt werden, welche konkrete Funktion der „WD-repeat“-Domäne selbst zugeordnet werden kann. Darüber hinaus ist die Frage offen, welche Bedeutung N- und/oder C-terminalen Ausdehnungen im Zusammenhang mit den „WD-repeats“ haben.

1.4.2 Das „WD-repeat“-Protein Coronin

Coronin zählt ebenfalls zu der WD-Familie und wurde zuerst aus *D. discoideum* isoliert (de Hostos *et al.*, 1991). Innerhalb der 445 Aminosäuren langen Sequenz befinden sich fünf „WD-repeats“, die von „nicht-WD“-Domänen umgeben sind. Die letzten 32 Aminosäuren des C-Terminus bilden eine α -helikale „coiled-coil“-Struktur aus. Das zytoplasmatische Protein akkumuliert Aktin-assoziiert an der sich fortbewegenden Zellfront („leading edge“) sowie in Zellausstülpungen, die als „crowns“ („Zellkronen“) bezeichnet werden. Es sedimentiert mit F-Aktin, zeigt aber keine markanten Effekte auf die Aktin-Polymerisation *in vitro* (de Hostos *et al.*, 1991). Zusammen mit anderen Proteinen ist es an der Organisation des Mikrofilamentsystems während der Zellbewegung und chemotaktischen Orientierung beteiligt. Ferner ist bekannt, daß es mit dem Aktin-Myosin-Komplex interagiert und an der Zytokinese mitwirkt (Gerisch *et al.*, 1995). Coronin-Null-Mutanten sind nicht in der Lage, die Zytokinese effizient zu beenden und bilden vielkernige Zellen aus (de Hostos *et al.*, 1993). Die Arbeitsgruppe Fukui konnte mittels GFP-Fusion die Akkumulierung von Coronin zusammen mit Aktin in der Teilungsfurche beobachten (Fukui, Y. *et al.*, 1997; Fukui, Y. *et al.*, 1999). Die Gruppe der Coronin-Homologen wächst stetig und scheint ubiquitär in Eukaryonten verbreitet zu sein (de Hostos, 1999), weshalb die Proteine in der sogenannten Coronin-Familie zusammengefaßt werden. Der Hauptunterschied der Moleküle dieser neuen Untergruppe liegt in der variablen Region (22-194 As), die zwischen der konservierten „WD-repeat“- und der C-terminalen „coiled-coil“-Domäne lokalisiert ist. Die funktionellen Unterschiede sind vermutlich auch auf diese Sequenzunterschiede zurückzuführen.

1.5 Profilin

Profilin wurde ursprünglich aus Kälbermilch isoliert (Carlsson *et al.*, 1977) und zunächst als ein G-Aktin „sequestering“ Protein beschrieben, das G-Aktin aus dem Polymerisationsgleichgewicht entzieht und somit die Filamentausbildung hemmt. Viele eukaryontischen Zellen exprimieren mehrere Profilin-Isoformen, wie beispielsweise *Entamoeba histolytica* (Binder *et al.*, 1995), *D. discoideum* (Haugwitz *et al.*, 1991) oder der Mensch (Gieselmann *et al.*, 1995). Im Laufe der letzten Jahrzehnte konnte gezeigt werden, daß dieses zytoplasmatische Protein (12-15 kDa) eine multifunktionelle Rolle in der Polymerisation von Aktin spielt. Wenn die plus-Enden („barbed ends“) der Aktin-Filamente verkappt sind, kommt die sequestrierende Aktivität zum Tragen. Daneben beeinflussen Profiline den Nukleotidaustausch (ADP/ATP) in Aktin Monomeren und fördern bei freien Enden und der

Anwesenheit von β -Thymosin die Polymerisation (Carlier und Pantaloni, 1997). Die Profilin-Aktin-Bindung wird *in vitro* durch Membranphospholipide wie PIP₂ reguliert (Lassing und Lindberg, 1985; Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1990). Diese Interaktion wie auch die Bindung an Prolin-reiche Proteine wie VASP („vasodilator-stimulated phosphoprotein“; Reinhard *et al.*, 1995) oder Mena, ein VASP-Homolog (Gertler *et al.*, 1996), lassen eine Rolle in Signaltransduktionswegen zum Zytoskelett vermuten (Carlier und Pantaloni, 1997). Darüber hinaus interagiert Profilin mit Arp2/3. Die tatsächliche Funktion von Profilin hängt letztlich von den gegebenen Bedingungen in der Zelle ab. Profilin, das beispielsweise in der Birke auch als Allergen identifiziert wurde (Valenta *et al.*, 1991; Aalberse, 2000), bleibt weiterhin ein interessantes Molekül für die Wissenschaft, da seine genaue physiologische Bedeutung an der Schnittstelle von Zytoskelett und Signaltransduktion noch nicht vollständig geklärt werden konnte (Sohn und Goldschmidt-Clermont, 1994; Karakesisoglou *et al.*, 1999).

Kristallographie von Profilin (Schutt *et al.*, 1993; Cedergren-Zeppezauer *et al.*, 1994) und die NMR-Strukturanalyse verschiedener typischer Profiline (Constantine *et al.*, 1993; Archer *et al.*, 1994; Metzler *et al.*, 1995) zeigen, daß Proteine dieser Familie eine hochkonservierte dreidimensionale Faltung aufweisen (Abb. 33 B). Die hydrophoben Aminosäuren der N- und C-terminale α -Helices bilden eine Art hydrophobe Tasche aus, die für die Bindung von poly-L-Prolin verantwortlich ist (Haarer *et al.*, 1993; Metzler *et al.*, 1993; Archer *et al.*, 1994; Kaiser und Pollard, 1996). Strukturanalysen des Profilin-Aktin-Komplexes veranschaulichten, wie Profilin mit G-Aktin einen 1:1 Komplex ausbildet (Vandekerckhove *et al.*, 1989; Schutt *et al.*, 1993).

Für *D. discoideum* sind bis dato zwei Profilin Isoformen bekannt, Profilin I und II, die eine Sequenzidentität von 56% aufweisen (Haugwitz *et al.*, 1991). Zellen, denen lediglich eine der Isoformen fehlt, sind nicht von Wildtyp-Zellen zu unterscheiden. Doppelmutanten hingegen, die keine der beiden Profiline exprimieren, zeigen deutliche Phänotypänderungen. Der Anstieg der F-Aktin-Konzentration um 60-70% ist ein Hinweis darauf, daß *Dictyostelium* Profilin *in vivo* in erster Linie als Aktin-„sequestering“-Protein fungiert. Darüber hinaus verhalten sich die ProfilinI/II-defizienten Zellen abnormal in der Zytokinese und in der Entwicklung. Deutlich wird dies in einer Herabsetzung der Motilität, der Zunahme der Zellgröße, dem Auftreten vielkerniger Zellen und dem Wachstum auf Platten. Besonders markant ist für diese Mutanten der Entwicklungsblock weit vor der Fruchtkörperbildung (Haugwitz *et al.*, 1994). *In vitro* Experimente zeigten, daß die Affinität der beiden Isoformen zu G-Aktin geringfügig unterschiedlich ist und sowohl Profilin I wie II die kritische Aktin-Konzentration für die Polymerisation auf ein höheres Niveau verschieben. Durch die

Expression von punktmutierten Profilin II-GFP-Fusionsproteinen in Profilin-minus-Mutanten, konnten funktionelle Domänen näher beschrieben, und die *in vivo* Rolle von Profilin in *D. discoideum* weiter analysiert werden (Lee *et al.*, 2000). Die Punktmutationen K114E und W3N resultieren in einer Änderung der Aktin- und poly-L-Prolin-Bindungsaktivität. Es zeigte sich, daß die effiziente poly-L-Prolin-Bindungsaktivität notwendig für die Suppression eines mutierten Phänotyps ist. Die G-Aktin-Bindungsaktivität erscheint diesbezüglich unbedeutender. Ferner wird angenommen, daß die Akkumulation von Profilin an phagozytischen Strukturen („phagozytic-cups“) unabhängig von der poly-L-Prolin- und der Aktin-Bindeaktivität ist.

1.6 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

Dictyostelium discoideum zählt zu der Klasse der Myxomyceten und wurde zum ersten Mal 1935 von K. Raper beschrieben. Auffallend ist der Lebenszyklus, der durch den Wechsel von einer einzelligen Lebensform zu einem multizellulären Organismus gekennzeichnet ist. Die sich vegetativ vermehrenden *D. discoideum* Amöben besiedeln die oberen Humusschichten des Waldbodens und ernähren sich von Bakterien. Die Aufnahme von Bakterien und anderen Partikeln erfolgt durch Phagozytose, die auf dem Zusammenspiel des Aktin-Zytoskeletts mit verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen basiert (Noegel und Luna, 1995; Aubry *et al.*, 1997). Laborstämme nehmen Flüssigmedium größtenteils über Makropinozytose auf, die ebenfalls Aktin-abhängig erfolgt (Hacker *et al.*, 1997). Der etwa 24-stündige Entwicklungszyklus (Abb. 2) kann unter Laborbedingungen bei Entzug der Nahrungsquelle ausgelöst werden. Durch Ausschüttung des chemischen Signalstoffes cAMP strömen etwa 10^5 Einzelzellen auf ein gemeinsames Zentrum zu, ohne miteinander zu verschmelzen. Im Verlauf fortschreitender Aggregation wird ein multizelluläres Gebilde, das Pseudoplasmodium („slug“), gebildet. Dieses Aggregationsplasmodium kann sich ebenfalls auf dem Substrat fortbewegen, wobei es eine Schleimspur hinter sich zurück läßt. Nach ungefähr 18 h haben sich Präsporen- und Prästielzellen ausdifferenziert, der „slug“ richtet sich auf und der größere Teil der Zellen wandert entlang eines wachsenden Stiels an die Spitze des Fruchtkörpers. Die im Kopf befindlichen Sporen, werden durch Berührung aus dem Sorocarp entlassen, keimen bei geeigneten Bedingungen aus und es kommt zur Freisetzung einzelner Amöben.

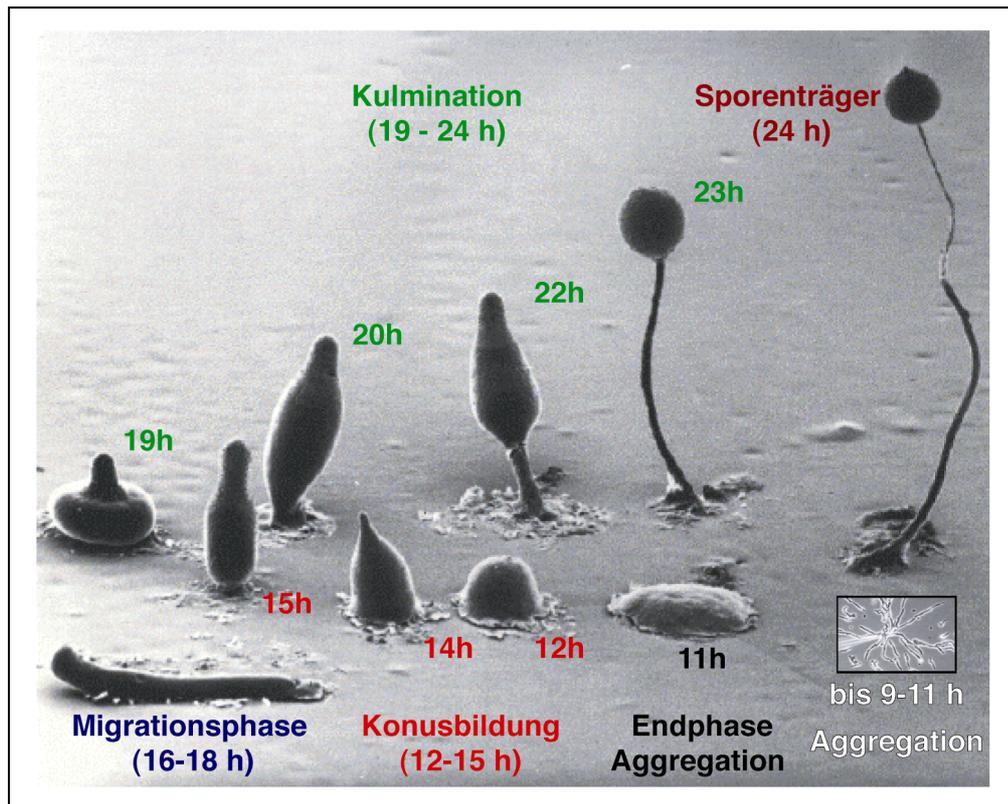


Abb. 2: Entwicklungszyklus von *D. discoideum*.

Während der vegetativen Vermehrung ernähren sich freilebende Amöben von Bakterien. Bei Nahrungsmangel kommt es zur Aggregation und ein Pseudoplasmodium wird ausgebildet, das eine Wanderungsphase durchläuft. Nach etwa 18 h beginnt die Kulmination, die durch die Ausbildung des Sporenträgers abgeschlossen wird. Durch Berührung eines reifen Sporenkopfes (Sorocarp) werden die Sporen freigesetzt, die dann wieder unter idealen Bedingungen auskeimen und in einen neuen Zyklus eintreten können. (Elektronenmikroskopieaufnahmen von R. Lawrence Blanton und Mark Grimson, Texas Tech University).

Als Modellorganismus im Labor bietet *Dictyostelium* nicht nur durch den schnell abgeschlossenen Lebenszyklus zahlreiche Vorteile. Die relativ einfachen Anzuchtbedingungen ermöglichen die Kultivierung großer Mengen genetisch identischer Zellen, und Proteine können auf einzelliger wie vielzelliger Ebene biochemisch analysiert werden. Insbesondere die Zellaggregation bis hin zum multizellulären, migrationsfähigen Pseudoplasmodium bietet die Möglichkeit, die Koordination von bis zu 100.000 Einzelzellen detailliert zu untersuchen. Diese Koordination erfolgt in erster Linie durch cAMP-gesteuerte Zell-Zell-Signaltransduktion und Chemotaxis (Siegert und Weijer, 1995; Rietdorf *et al.*, 1998; Miura und Siegert, 2000). Doch auch Phototaxiseffekte spielen dabei eine wichtige Rolle.

Mit 34 Mb, die sich auf sechs Chromosomen zwischen vier und sieben Mb verteilen, ist das haploide *Dictyostelium*-Genom gut für molekularbiologische Untersuchungen geeignet (Schleicher *et al.*, 1995). Insbesondere ist die Analyse von Mutanten ein nützlicher

Untersuchungsansatz, um typische Zytoskelett-gesteuerte Eigenschaften wie Pseudopodienbildung, Chemo- und Phototaxis oder Phagozytose der *Dictyostelium*-Zellen näher beschreiben zu können (Eichinger *et al.*, 1999; Noegel und Schleicher, 2000). Neben der Analyse von Mutanten ist in diesen Zusammenhängen auch die Markierung von Zytoskelettproteinen mit GFP („green fluorescence Protein“) ein nützliches zellbiologisches Werkzeug, wodurch die Visualisierung der Proteinexpression *in vivo* ermöglicht wird (Gerisch *et al.*, 1995; Westphal *et al.*, 1997).

1.7 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, neue Aktin-bindende Proteine in *D. discoideum* zu identifizieren und zu charakterisieren.

Im Rahmen des ersten Teilprojektes sollte das neuartige Zytoskelett-Protein Villidin näher beschrieben werden. Ausgangsbasis war der Klon pFc3 (ca. 1 kB), dessen abgeleitete Proteinsequenz (ca. 33 kDa) eine signifikante Ähnlichkeit zum Villin „headpiece“ aufwies. Dieses cDNA-Stück stammte aus einem Klonierungsexperiment der Gruppe von W. F. Loomis (La Jolla, USA) und wurde an das Labor von Angelika Noegel (Universität zu Köln) weitergegeben, wo das Gen vervollständigt und monoklonale Antikörper gegen das 33 kDa-Stück gewonnen wurden. Monoklonale Antikörper und GFP-Fusionsproteine wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ziel war es nun, die nur wenig beschriebenen Homologien von Villidin zu anderen Proteinfamilien herauszuarbeiten und das Protein biochemisch und zellbiologisch zu charakterisieren. Neben der Beschreibung des gesamten Proteins lag der Schwerpunkt der Untersuchungen vor allem auf dem N-terminalen („WD-repeats“) und C-terminalen Ende (Villin-ähnlicher Bereich) des Moleküls.

Eine Datenbankrecherche lieferte den Hinweis auf eine dritte Profilin Isoform in *D. discoideum*, weshalb das Protein die Bezeichnung Profilin III erhielt. Profiline sind in ihrer dreidimensionalen Struktur den Villin-Domänen sehr ähnlich und spielen in vielen Aktin-abhängigen Prozessen eine wichtige Rolle. Die synchrone Abschaltung der beiden bekannten Profilin-Isoformen in *Dictyostelium* hatte zu einem Entwicklungsblock noch vor Ausbildung der Fruchtkörper geführt (Haugwitz *et al.*, 1994). Zur Aufklärung der Bedeutung von Profilin III in der Wachstumsphase und der Entwicklung von Amöben sollten zunächst durch molekularbiologische Analyse das Gen selbst, sowie die Expression und Regulation nachgewiesen werden. Ferner sollte durch Analyse eines rekombinanten Profilin III die Funktion näher untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Enzyme, Antikörper, Inhibitoren und Antibiotika

2.1.1.1 Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Boehringer
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	Boehringer
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Boehringer
„Prime-it“-Kit	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Amersham, Gibco-BRL, New England Biolabs, Promega, Eurogentec
RNase A	Sigma
S1-Nuklease	Promega
T4 DNA-Ligase	Promega, Gibco
Pfu-Polymerase	Stratagene
Taq-Polymerase	Amersham, Eurogentec
Vent-Polymerase	New England Biolabs

2.1.1.2 Antikörper

Anti-Aktin (mAk Act1)	(Simpson <i>et al.</i> , 1984)
Anti-Contact Site A (mAk 33-294-17)	(Bertholdt <i>et al.</i> , 1985)
Anti-Comitin (mAk 190-68-1)	(Weiner <i>et al.</i> , 1993)
Anti-Coronin (mAk 176-3D-6)	(De Hostos <i>et al.</i> , 1991)
Anti-β-COP (mAk E5A3/mAD)	(Duden <i>et al.</i> , 1991)
Anti-DdLIMP (pAk 3416)	(Karakesisoglou und Janssen., 1999)
Anti-α-L-Fucosidase (mAk 173-185-1)	(Schopohl <i>et al.</i> , 1992)
Anti-„His-tag“ (mAk)	Qiagen
Anti- <i>D.d.</i> Myosin „full-length“ (mAk 21-96-3)	(Claviez <i>et al.</i> , 1982)
Anti-Profilin I (mAk 153-246-10)	(Haugwitz <i>et al.</i> , 1991)
Anti-Profilin II (mAk 174-380-3)	(Haugwitz <i>et al.</i> , 1991)

Anti-Villidin (mAk 257-6-2)	(vorliegende Arbeit, Labor A.A. Noegel)
Anti-Villidin (pAk 6336)	(vorliegende Arbeit)
lysosomaler Marker mAk 221-342-5	(Neuhaus <i>et al.</i> , 1998)
Ziege-anti-Maus IgG Antikörper,	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, (gekoppelt an alkalische Phosphatase oder gekoppelt an Cy3 oder FITC)	

2.1.1.3 Inhibitoren

Benzamidin	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEP)	Sigma
E64 (Cystein-Proteaseinhibitor; #E 0514)	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid PMSF	Serva
Proteaseinhibitorcocktail (#P2714)	Sigma
RNasin (RNase-Inhibitor; #N251A)	Promega

2.1.1.4 Antibiotika

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

2.1.2 Reagenzien

Agarose (SeaKem ME)	FMC Bioproducts
Bacto-Agar, -Pepton und -Trypton	Difco
DE52 (Diethylaminoethyl-Cellulose)	Whatman
Hefeextrakt, Pepton, Proteose-Pepton	Oxoid
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid)	Gerbu
Phenol	Appligene
Triton X-100 („surfact amps“ oder „membrane-grade“)	Pierce oder Boehringer
„Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids“ (YNB)	Difco
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Gerbu

Soweit nicht anders erwähnt, stammen die verwendeten Laborchemikalien von Merck, Roth, Sigma, Serva, Fluka, Riedel de Haen oder Pharmacia und hatten den Reinheitsgrad „p.a.“.

2.1.3 Medien

Alle verwendeten Medien und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, das über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) gereinigt worden war. Die Medien wurden bei 120°C autoklaviert, Antibiotika wurden nach Abkühlen des Mediums auf etwa 50°C zugegeben.

2.1.3.1 Medien für die *D. discoideum* Kultur

AX-Medium (pH 6,7):

(Claviez *et al.*, 1982)

14,3 g	Pepton
7,15 g	Hefeextrakt
50,0 mM	Glucose
3,5 mM	Na ₂ HPO ₄
3,5 mM	KH ₂ PO ₄

auf 1 l mit H₂O (bidest.) auffüllen

SM Agarplatten (pH 6,5)

9,0 g	Agar
10,0 g	Pepton
50,0 mM	Glucose
1,0 g	Hefeextrakt
4,0 mM	MgSO ₄
16,0 mM	KH ₂ PO ₄
5,7 mM	K ₂ HPO ₄

auf 1 l mit H₂O (bidest.) auffüllen

Soerensen Phosphatpuffer (pH 6,0):

(Malchow *et al.*, 1972)

14,6 mM	KH ₂ PO ₄
2,0 mM	Na ₂ HPO ₄

gegebenenfalls autoklavieren

Phosphatagarplatten (pH 6,0)

15,0 g	Bacto-Agar
--------	------------

mit Soerensen-Puffer auf 1 l auffüllen

HL-5 Medium (pH 7,5)

10,0 g	Hefeextrakt
20,0 g	Proteose Pepton
50,0 mM	Glucose
8,5 mM	KH ₂ PO ₄
1,25 mM	Na ₂ HPO ₄

auf 2 l mit H₂O (bidest.) auffüllen

Salzlösung („salt solution“)

10,0 mM	NaCl
10,0 mM	KCl
2,7 mM	CaCl ₂

2.1.3.2 Medien für die *E. coli* Kultur

LB-Medium (pH 7,4) nach:

(Sambrook *et al.*, 1989)

10,0 g Bacto-Trypton

5,0 g Hefeextrakt

86,0 mM NaCl

auf 1 l mit H₂O (bidest.) auffüllen

Der pH wurde mit NaOH eingestellt.

Für Agaroseplatten wurden dem Medium 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Bei Bedarf wurden 50 mg/l Ampicillin und/oder 25 mg/l Kanamycin zugesetzt.

2.1.3.3 Medien für die *Saccharomyces cerevisiae* Kultur

Vollmedium YPD (pH 5,8) nach:

(Sherman *et al.*, 1986)

1% Hefeextrakt

2% Bacto-Pepton

2% Glucose (getrennt autoklavieren)

2% Bacto-Agar (nur für Platten)

Minimalmedium SD (pH 5,8) nach:

(Sherman *et al.*, 1986)

0,67% „Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids“

2% Glucose (getrennt autoklavieren)

2% Bacto-Agar (nur für Platten)

+ Aminosäuren und Nukleoside

YPD Flüssigmedium wurde verwendet, um Hefestämme für die Transformation zu kultivieren. SD („Synthetic Dropout“) ist ein Minimalmedium, das in der Hefetransformation zur Selektion von spezifischen Phänotypen herangezogen wurde.

Glucose wurde als 10 x Stammlösung angesetzt, separat autoklaviert und nach Abkühlen des Mediums auf etwa 55°C zugegeben. Aminosäuren und Nukleoside wurden vor Zugabe steril filtriert. Endkonzentration:

40 µg/ml Adeninsulfat ¹	50 µg/ml L-Phenylalanin	20 µg/ml Uracil ¹
40 µg/ml L-Tryptophan [*]	150 µg/ml L-Valin	20 µg/ml L-Histidin/HCl [*]
20 µg/ml L-Arginin/HCl	20 µg/ml L-Methionin	30 µg/ml L-Lysin/HCl
30 µg/ml L-Tyrosin ¹	200 µg/ml L-Threonin	
30 µg/ml L-Isoleucin	60 µg/ml L-Leucin [*]	

(*) Je nach Transformationsansatz wurden diese Aminosäuren dem Minimalmedium nicht zugegeben, um auf das entsprechende Plasmid selektionieren zu können.

(¹) Die auf diese Weise markierten Aminosäuren wurden separat angesetzt und steril filtriert. 100 x Adenin-Stammlösung wurde mit einigen Tropfen HCl, 100 x Tyrosin mit NaOH und 100 x Uracil-Stammlösung unter Wärmezufuhr in Lösung gebracht.

Alle weiteren Aminosäuren wurden als 10 x Dropout-Stammlösung hergestellt (steril filtriert).

3-AT-Stammlösung

1 M 3-Amino-1,2,4-Triazol (toxisch; Sigma)
in H₂O (bidest.) lösen und steril filtrieren

1000 x Cycloheximid-Stammlösung

1 mg/ml Cycloheximid (Sigma)
in H₂O (bidest.) lösen und steril filtrieren,
bei 4°C maximal 2 Monate lagern

3-AT wirkt als Inhibitor auf das Hefe HIS3-Protein (His3p) und soll eine undichte „leaky“ Expression im Reporterstamm verhindern (Fields, 1993; Durfee *et al.*, 1993). Die verwendete Konzentration im entsprechenden Selektionsmedium ist abhängig vom Stamm. Nach Abkühlen des Mediums auf 55°C wurden für den Hefestamm Y190 25 mM 3-AT zugegeben.

Der Hefestamm Y190 ist aufgrund des *cyh^{r2}* mutierten Allels (rezessiv gegenüber Wildtyp Gen) Cycloheximid-resistent. Sobald die Hefen mit einem Plasmid, welches das Wildtyp-Gen enthält, transformiert wurden, reagiert der Y190-Stamm sensitiv auf Cycloheximid. Nach Abkühlen des Mediums (55°C) wurden zur Selektion von Transformanten der Y190-Hefen 10 µg/ml Cycloheximid zugegeben.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen, die hier nicht aufgeführt sind, finden sich unter den jeweiligen Methoden.

10 x Tris/Boratpuffer (TBE) (pH 8,3)

890 mM Tris
890 mM Borsäure
20 mM EDTA
autoklavieren

TE-Puffer (pH 8,0)

10,0 mM Tris/HCl
1,0 mM EDTA
autoklavieren

TEDABP (pH 8,0)

10,0 mM Tris/HCl
1,0 mM EGTA
1,0 mM DTT
0,02% NaN₃

PBS (pH 7,0)

70 mM Na₂HPO₄
30 mM KH₂PO₄
150 mM NaCl
0,1% NaN₃

vor Gebrauch zugeben:

1,0 mM Benzamidin
0,5 mM PMSF

10 x NCP-Puffer (pH 8,0)

100,0 mM	Tris/HCl
1,5 M	NaCl
5,0 ml	Tween 20
0,2%	NaN ₃

auf 1 l mit H₂O (bidest.) auffüllen

2.1.5 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> JM83	(Vieira und Messing, 1982)
<i>E. coli</i> M15	(Qiagen)
<i>E. coli</i> BL21	(Studier und Moffat, 1986)
<i>E. coli</i> XL1 blue	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	(Williams und Newell, 1976)

2.1.6 Hefestämme

<u>Stamm:</u>	<u>Reporter:</u>	<u>Transformationsmarker:</u>	<u>Referenz:</u>
Y 190	HIS3 lacZ	trp1, leu2, cyh ^{r2}	(Flick und Johnston, 1990; Harper <i>et al.</i> , 1993)
Y 187	lacZ	trp1, leu2	(Harper <i>et al.</i> , 1993)

2.1.7 *Dictyostelium discoideum* Stämme

AX2-214	Axenisch und auf Bakterien wachsender Abkömmling des Freilandisolates NC4 (Raper, 1935)
Myosin-minus-Mutante	Axenisch wachsende Mutante, die kein Myosin exprimiert (Fukui <i>et al.</i> , 1990)
pII/la2	Axenisch wachsende Mutante, der zwei Profilin Isoformen fehlen (Haugwitz <i>et al.</i> , 1994)
Villidin-minus-Mutante	Blasticidin-resistente Villidin-Mangel-Mutante (vorliegende Arbeit)

2.1.8 Vektoren

pCR2.1	(Invitrogen)
pGEX	(Pharmacia Biotech)
pIMS5	(Simon <i>et al.</i> , 1988)
pMal	(Maina <i>et al.</i> , 1988)

pUC18/19	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pT7-7	(Tabor, 1985)
pQE30	(Qiagen)
pAS2	(nach Harper <i>et al.</i> , 1993)
pACT2	(Durfee <i>et al.</i> , 1993)
pACT2- <i>Dictyostelium</i> -„developmental-library“ (als Phagen-Bank): Insertgrößen 1,3-5 kB	(freundlicherweise von A. Kuspa zur Verfügung gestellt)

2.1.9 Radiochemikalien

[α - ³² P]-dATP (10 mCi/ml)	ICN
--	-----

2.1.10 Geräte

Analysenwaage AC 210P	Sartorius
Axiophot Mikroskop	Zeiss
Brutschrank (Bakterien, Hefen)	Memmert
CCD-Kamera C5985-10	Hamamatsu
Diavert Mikroskop (inverse Anordnung)	Leitz
Dounce Homogenisator	Braun
EagleEye II	Stratagene
Econosystem	Biorad
Elektroporationsgerät	Biorad
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Fraktionenkollektor RediFrac	Pharmacia
Hybridisierungs-ofen	Biometra
Konfokale Mikroskopie DM IRBE (invers)	Leica
Kühlaggregat Multistar	Fryka
Laborwaage LC 4800P	Sartorius
Leitfähigkeitsmeßgerät LF 537	WTW
Lumineszenz Spektrometer	Aminco Bowman, Sopra GmbH
Lyophilisationsgerät Alpha 1-4	Christ
Multiphor II (2D-Gelelektrophorese)	Pharmacia
Nuclepore-Filter	Corning Costar
Parr-Bombe	Parr Instrument Company
PCR-Thermocycler UNO	Biometra
Peristaltische Pumpe P1	Pharmacia

pH-Meter 643	Knick
Photometer Ultrospec III	Pharmacia
Proteintransfer Trans-Blot SD	Biorad
Quarzküvetten Infrasil	Hellma
Rührer Combimag RET	Ika
Flachbettscanner ScanJet 4c	Hewlett Packard
Smart-System	Pharmacia
Speed-vac-Konzentrator	Bachhofer
Stereomikroskop Wild M3	Wild Leitz
Ultrafiltration Centricon	Amicon
Vortex	Merck
Wasserbäder, Schüttler	GFL

2.1.11 Sonstige Materialien

Ampholine PagPlate (3,5-9,5) für isoelektrische Fokussierung	Pharmacia
Cellulosenitrat-Röhrchen für Rotor SW40	Beckman
Dialyse-Membranen	Biomol
Immobiline DryStrips (3-10 und 4-7)	Pharmacia
3MM Filterpapier	Whatman
Nitrozellulose BA85	Schleicher & Schüll
Nylonmembran	Pall
Polyallomer-Röhrchen 1,5 ml	Beckman
Röntgenfilm X-omat	Kodak
15 ml / 50 ml Röhrchen	Falkon
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf

2.1.12 Zentrifugen und Rotoren

Zentrifugen

Optima TL100 Ultrazentrifuge, L8-70M Ultra-zentrifuge, G6-SKR, J2-21M/E, J6-HC.	Beckman
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf

Rotoren

Ti 70, JA 14.1, Ti 20.1, Ti 45, JA 20, SW40, TLA 100.3	Beckman
--	---------

2.1.13 Computerprogramme zur Sequenzanalyse und Datendarstellung

Sigma Plot 2.01	Jandel Scientific
CorelDraw 4.0	Corel
Winword 8.0	Microsoft
BioEdit v.4.8.8	(Hall, 1999)
NIH Image 1.60	National Institut of Health
Photoshop 5.5, Illustrator 8.01	Adobe
Phylip Phylogeny Package 3.2	(Felsenstein, 1989)
Swiss PdP Viewer v. 3.7b1	(Guex und Peitsch, 1998)
UWGCG-Programmpaket (University of Wisconsin Genetics Computer Group)	(Devereux <i>et al.</i> , 1984)
BLASTP	(Altschul, 1993)

2.2 *Dictyostelium discoideum* Kulturen

2.2.1 Anzucht in Flüssigmedium

Der Wildtyp-Stamm AX2 wurde mit Sporen oder von SM-Platten in AX-Medium oder HL-5 Medium angeimpft (nach Claviez *et al.*, 1982). Die Generationszeit betrug bei 21°C und 150 UpM etwa 10 h. Zur Anzucht größerer Zellmengen für die Proteinreinigung wurden Zellen in 4 x 2,5 l Kulturen bis zu einer Dichte von 5×10^6 bis maximal $1,2 \times 10^7$ Zellen/ml herangezogen und durch Zentrifugation geerntet. Die Ausbeute an Zellen aus 10 l Kulturen lag bei etwa 100 g Nassgewicht. Für zellbiologische Untersuchungen wurden die Zellen bis maximal 5×10^6 Zellen/ml angezogen, um ein Übergehen in die stationäre Phase zu vermeiden.

2.2.2 Anzucht auf Agarplatten

Zum Herstellen von Massenplatten wurden SM-Agarplatten verwendet. Hierzu wurden je 0,1 ml einer dichten *K. aerogenes* Suspension (in Salzlösung) auf SM-Platten ausgestrichen, die *Dictyostelium*-Zellen ausgebracht und die Platten bei 21°C ca. 2 Tage inkubiert. Die Generationszeit betrug hierbei 3-4 h. *D. discoideum* Kolonien zeigen sich als klare Freshhöfe („plaques“) auf dem Bakterienrasen.

2.2.3 Entwicklung von *D. discoideum*

AX2-Zellen wurden axenisch bis zu einer Dichte von $3\text{-}5 \times 10^6$ Zellen/ml („log-phase“) kultiviert, geerntet (200 g, 5 min, 4°C), dreimal mit kaltem Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0) gewaschen und auf eine Dichte von 8×10^7 Zellen/ml mit Phosphatpuffer eingestellt. Auf frisch gegossenen Phosphatagarplatten (\varnothing 90 mm, 17 mm) wurden dann 8×10^8 Zellen/Platte ausgebracht. Die Zellen durften 15 min absitzen, dann wurde der klare Überstand vorsichtig mit einem Tuch abgesaugt und die Platten wurden nun bei 21°C inkubiert. Die Zellen wurden dann zu den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten mit kaltem Soerensen-Phosphatpuffer abgespült. Alternativ zur Entwicklung auf Phosphatagarplatten konnten die Zellen auch in Phosphatpuffer-Schüttelkultur (150 UpM) bis zu 8 h entwickelt werden.

2.2.4 Sporenkonservierung

Axenisch gewachsene Zellen wurden durch 10 min Abzentrifugieren bei 200 g geerntet, einmal mit kaltem Soerensen-Puffer gewaschen und auf eine Dichte von 2×10^8 Zellen/ml resuspendiert. Je 500 μ l der Suspension wurden auf Phosphatagarplatten ausgebracht. Die Zellen entwickelten sich innerhalb von 2-3 Tagen und bildeten Fruchtkörper. Die Sporen jeder Agarplatte wurden durch kräftiges Abklopfen in den Deckel der Petrischale geerntet, in 10 ml kaltem Soerensen-Puffer aufgenommen, auf 1 ml Aliquots verteilt (2,2 ml Nunc-Einfrierröhrchen) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zum Animpfen wurde ein Aliquot aufgetaut (bei RT) und in AX-Medium gegeben. Nach drei Tagen bei 21°C und 150 UpM hatte diese Vorkultur eine Dichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml.

2.2.5 Einfrieren von *Dictyostelium*-Zellen

Zur Konservierung von *Dictyostelium*-Zellen wurden axenisch gewachsene Zellen geerntet und mit einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium (AX-Medium oder HL-5 Medium + 5% (v/v) DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots auf vorgekühlte Einfrierröhrchen verteilt (Nunc: 2,2 ml). Ein Messingblock (3,25 kg) wurden auf 4°C vorgekühlt, mit den Ampullen beschickt und bei -70°C aufbewahrt. Die Ampullen wurden nach ca. 15 h in flüssigem Stickstoff oder bei -70°C gelagert. Zur Revitalisierung der Zellen wurde eine Ampulle unter fließendem, kaltem Wasser schnell aufgetaut, die Zellen wurden sofort einmal mit 20 ml kaltem AX-Medium gewaschen und der Inhalt in eine Petrischale mit 10 ml AX-Medium überführt. Bei Transformanten wurde nach 24 h das Medium gewechselt und das geeignete Selektionsmittel zugegeben.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

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

Von einem Kulturausstrich wurden mit einem sterilen Zahnstocher Bakterien abgenommen und in 200 µl STET/Lysozym-Puffer suspendiert. Alternativ wurden 1,5 ml einer frischen Übernacht-Schüttelkultur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abgeerntet (6000 UpM, 15 sec, RT), der Überstand verworfen und das Bakteriensediment resuspendiert. Die Suspension wurde 1 min im Wasserbad gekocht („Boiling-Prep“), danach wurden durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge die unlöslichen Bestandteile sedimentiert (13.000 UpM, 10 min, RT) und das Sediment anschließend mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Nukleinsäuren im Überstand wurden mit 200 µl Isopropanol für 5 min bei RT gefällt und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert (13.000 UpM, 15 min, RT). Die DNA wurde mit Ethanol (80%) gewaschen, bei RT oder im Speed-vac-Konzentrator getrocknet und in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

STET-Puffer (pH 8,0)

50 mM	Tris/HCl
50 mM	EDTA
0,5%	Triton X-100
8%	Saccharose
1 mg/ml	Lysozym (vor Gebrauch zugeben)

2.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA nach der Qiagen-Methode

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde unter anderem auch der Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet. Sollte eine größere Menge von Plasmid-DNA aus *E. coli* isoliert werden, wurde der Qiagen-Midi-Kit herangezogen. Dazu wurde eine Bakterienkultur in 150 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in 10 ml P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml P2 wurden die Zellen einer alkalischen Lyse unterzogen. Die Ansätze wurden durch Invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml eisgekühlter Puffer P3 zugegeben, wiederum durch Invertieren gemischt und die Proben abzentrifugiert (JA20 Rotor, 17.000 UpM, 30 min, 4°C), um Proteine und Zellbruchstücke zu sedimentieren. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde durch einen

zweiten Zentrifugationsschritt (10 min) erneut gereinigt. Der nun klare Überstand wurde auf eine zuvor mit 5 ml Puffer QBT äquilibrierte „tip 100“-Säule (Qiagen) aufgetragen. Anschließend wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (JA20 Rotor, 12.000 UpM, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment nach Waschen mit eiskaltem Ethanol (80% oder absolut) bei RT oder im Speed-vac-Konzentrator getrocknet und in 100 µl 1/10 TE-Puffer aufgenommen.

Puffer P1

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

10 mM EDTA

100 µg/ml RNase A

Puffer P2

200 mM NaOH

1% SDS

Puffer P3

3 mM K-Acetat (pH 5,5)

Puffer QBT

750 mM NaCl

50 mM MOPS (pH 7,0)

15% Ethanol

0,15% Triton X-100

Puffer QC

1 M NaCl

50 mM MOPS (pH 7,0)

Puffer QF

1,25 M NaCl

50 mM Tris/HCl (pH 8,5)

15% Ethanol

2.3.2 Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

Da *D. discoideum* einen hohen Gehalt an Kohlenhydraten und RNA besitzt, die bei der Reinigung die chromosomale DNA begleiten, wird die DNA aus angereicherten Zellkernen isoliert (Noegel *et al.*, 1985). Um Scherkräfte zu vermindern, die eine physikalische Schädigung der DNA hervorrufen können, wurde im Verlauf der Präparation durch vorsichtiges Invertieren (nicht vortexen) gemischt. Ferner wurden die Spitzen der Pipetten vorne abgeschnitten, um die Öffnung zu vergrößern.

1-2 x 10⁸ Zellen einer axenisch gewachsenen Kultur wurden zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und das Zell-Sediment in 50 ml Kernlyse-Puffer resuspendiert. Durch diese Behandlung lysieren die Zellen, die Zellkerne bleiben jedoch intakt und werden bei 6000 g abzentrifugiert (JA20, 7500 UpM, 10 min, 4°C). Das weißliche Zellkern-Sediment wurde in 500 µl SDS-Lysispuffer aufgenommen, mit 100 µl Proteinase K Lösung versetzt und 2-3 h bei 60°C inkubiert. Das Lysat wurde anschließend 2-3 x mit je einem Volumen Phenol/Chloroform durch vorsichtiges Mischen extrahiert. Durch Zugabe von 1/10 Vol. 2 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Vol. Ethanol zur wässrigen Phase wurde die DNA präzipitiert und konnte mit einem Glashaken ausgedreht werden. Die DNA wurde in Ethanol gewaschen, kurz

an der Luft getrocknet und in etwa 500 µl 1/10 TE-Puffer gelöst. Photometrisch Konzentrationbestimmung (OD_{260} von 1,0 = 50 µg DNA; $OD_{260}/OD_{280} = 1,8$ bis 2,0).

Kernlyse-Puffer

10 mM Mg-Acetat

10 mM NaCl

30 mM HEPES (pH 7,5)

10% Saccharose

2% Nonidet P40

SDS-Lysispuffer

0,7% SDS in TE-Puffer

Proteinase K

14,7 mg/ml, vor Gebrauch

30 min bei 37°C inkubieren

2.3.3 Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Temperaturbedingungen. In der Regel wurden pro µg DNA 2-10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. In einem 50 µl Ansatz wurden 1-5 µg Plasmid-DNA für 1-5 h verdaut. Chromosomale DNA wurde in einem 100-200 µl Ansatz für 3-12 h verdaut. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.3.4 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989) in Agarosegelen mit einem Agarosegehalt von 0,7% bis 1,7% (w/v), die in 1 x Tris-Borat-Puffer (TBE) angesetzt wurden. Laufpuffer und Gelpuffer waren identisch. Die Gele wurden in Flachbett-Gelapparaturen verschiedener Größen (4 x 7 cm bis 20 x 20 cm, Eigenbau) gegossen. Die zu trennende DNA wurde mit 0,2 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt und geladen. Die Trennung erfolgte bei 1-5 V/cm. Nach dem Lauf wurden die Gele in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) für 10-30 min gefärbt und 30 min in Wasser entfärbt. Die Gele wurden mit Hilfe des EagleEye-Systems fotografiert (UV-Licht = 312 nm).

DNA-Probenpuffer

40% Saccharose

0,5% SDS

0,25% Bromphenolblau

in TE-Puffer aufnehmen

DNA-Größenstandards:

Hind III-geschnittene λDNA (BRL): 23130 Bp, 9416 Bp, 6557 Bp, 4361 Bp, 2322 Bp, 2027 Bp, 564 Bp, 125 Bp

Hae III-geschnittene φX174-RF-DNA (BRL): 1353 Bp, 1078 Bp, 872 Bp, 603 Bp, 310 Bp, 281/271 Bp, 234 Bp, 194 Bp, 118 Bp, 72 Bp

2.3.5 Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen

2.3.5.1 Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen mit DE-81 Ionenaustauschpapier

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA in Agarosegelen in Tris-Borat-Puffer aufgetrennt und nach der von Dretzen *et al.* (1981) beschriebenen Methode isoliert. Das mit Ethidiumbromid angefärbte Gel wurde bei 312 nm betrachtet. Über und unter der zu isolierenden DNA-Bande wurde mit einer sterilen Skalpellklinge ein Schnitt gesetzt, in den dann je ein passendes Stück Anionenaustauschpapier DE-81 (Whatman) eingesetzt wurde. Da sich während der weiteren Elektrophorese kein Laufpuffer über dem Gel befinden durfte, wurde der Kontakt zwischen Gel und Puffer mit einem feuchten Whatman-Filterpapier hergestellt. Die Elektrophorese wurde so lange fortgesetzt, bis das DNA-Fragment vollständig an das DE-Papier gebunden hatte (30-45 min). Das Anionenaustauschpapier wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gelegt, dessen Boden durchbohrt und mit Glaswolle gestopft worden war. Darunter wurde ein zweites Eppendorfgefäß gegeben, um das Eluat aufzufangen. Das DE-Papier wurde viermal mit je 100 µl Waschlösung gewaschen und die Waschlösung durch kurzes Zentrifugieren abgetrennt. Die Elution der DNA erfolgte durch Inkubation des DE-Papiers für jeweils etwa 5 min mit viermal 100 µl Elutionslösung und nachfolgender Zentrifugation. Die DNA in den vereinigten Eluaten wurde dann durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol gefällt.

<u>Waschlösung (pH 7,5)</u>		<u>Elutionslösung (pH 7,5)</u>	
10,0 mM	Tris/HCl	10,0 mM	Tris/HCl
1,0 mM	EDTA	1,0 mM	EDTA
0,1 M	LiCl	1,0 M	LiCl
		20%	Ethanol

2.3.5.2 Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen nach der Qiagen-Methode

Zur Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten in der Größenordnung von 70 Bp bis 10 kB aus Agarosegelen wurde ferner der QIAquick Gel Extraktionskit (Qiagen) verwendet. Das DNA-Fragment wurde mit einem sauberen, scharfen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und das Agarosestück in ein 2,0 ml Eppendorfgefäß überführt und abgewogen. Zu einem Volumen Gel (100 mg ~ 100 µl) wurden 3 Volumina Puffer QG (QIAquick Gel Extraktionskit, Qiagen) zugegeben. Dann wurde die Agarose bei 50°C unter mehrmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes inkubiert, bis sie vollständig geschmolzen war. Die Bindung der DNA an die QIAquick Membran ist im Bereich $\text{pH} \leq 7,5$ effizient. Wenn der

Farbindikator im Puffer QG nach Schmelzen der Agarose nicht eine gelbe, sondern orange oder violette Färbung zeigte, wurde der pH-Bereich durch Zugabe von 3 M Na-Acetat (pH 5,0) eingestellt, bis die Lösung wieder gelb erschien. Durch Zugabe von einem Gel-Volumen Isopropanol konnte insbesondere die Menge von DNA-Fragmenten der Größenordnung <500 Bp und >4 kB erhöht werden. Das Gemisch wurde auf die QIAquick Spin Säule aufgetragen, unter welche ein 2 ml Auffanggefäß gegeben wurde. Durch Zentrifugation mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge (13.000 UpM, 1 min, RT) wurde die DNA an die Säulenmembran gebunden. Um Agarosereste zu entfernen, wurde die Säule mit 0,5 ml Puffer QG gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 0,75 ml Puffer PE (QIAquick Gel Extraktionskit, Qiagen) für ca. 3 min inkubiert und dann zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 13.000 UpM, 1 min, RT). Durch nochmalige Zentrifugation wurde sichergestellt, daß Ethanolreste aus Puffer PE von der Säulenmembran entfernt wurden. Die DNA wurde mit 30 bis 50 µl H₂O eluiert.

2.3.6 „Southern-Blotting“

Die als „Southern-Blotting“ (Southern, 1975) bezeichnete Technik dient dazu, die in Agarosegelen nach Größe getrennte DNA auf Nylonmembran oder Nitrozellulose zu immobilisieren. Durch Hybridisierung mit einer markierten DNA-Probe können dann spezifische Fragmente identifiziert werden. Das gefärbte und gemeinsam mit einem angelegten Lineal bei 312 nm fotografierte Gel wurde zunächst 20-30 min in 0,5 M NaOH denaturiert, kurz mit Wasser gespült und 30 min in 1 M Tris/HCl (pH 8,0) neutralisiert. Anschließend wurde das Gel für 20 min in 20 x SSC (siehe 2.1.8) äquilibriert.

Der Transfer der DNA auf Nylonmembran erfolgte in 20 x SSC für 18 h aufgrund von Kapillarkräften (Kapillarblot). Das Agarosegel lag mit den Taschenöffnungen nach unten auf glatt ausgebreiteter Zellophanfolie (Haushaltsware) und wurde mit Parafilmstreifen umrahmt. Daraufhin wurde es mit einer in 20 x SSC angefeuchteten Nylonmembran, sowie drei Lagen Whatman 3MM-Papier (ebenfalls in 20 x SSC befeuchtet) und einem ca. 6 cm dicken Stapel von Saugpapier belegt und beschwert (ca. 0,5 kg). Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran 10 min in 5 x SSC gewaschen, auf Whatman 3MM-Papier einige Minuten bei RT getrocknet und zur Fixierung der Nukleinsäure durch „cross-linking“ unter UV-Licht für 90 sec inkubiert.

2.3.7 Radioaktive Markierung von DNA-Proben

DNA-Proben zur Hybridisierung von „Southern-“ oder „Northern-Blots“ wurden nach der „prime-it“ Methode hergestellt. Hierbei werden Zufalls-Oligonukleotidprimer an die zu markierende Einzelstrang-DNA-Sonde hybridisiert. Mit Hilfe des Klenow-Enzyms erfolgt die Neusynthese des komplementären Stranges unter Einbau des radioaktiven Isotops. 25 ng DNA wurden in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und mit autoklaviertem Wasser auf 24 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 µl „random oligonucleotide primer“ wurde die Probe 5 min im Heizblock bei 95°C denaturiert, danach sofort für 1 min auf Eis gestellt und dann kurz abzentrifugiert. Nach Zugabe von 10 µl 5 x „dATP primer buffer“, 5 µl [α -³²P]-dATP, 1 µl Klenow-Enzym und sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz 2-10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zupipettieren von 2 µl „stop-mix“ beendet, und die nicht eingebauten Nukleotide wurden durch Zentrifugation (2000 UpM, 2 min) über eine 1 ml Sephadex-G50 Säule in TE-Puffer abgetrennt. Die markierte Probe wurde 5 min bei 100°C denaturiert und in etwa 7 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen.

2.3.8 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Proben

Die Hybridisierungsbedingungen entsprachen denen von Mehdy *et al.* (1983). Der Nitrozellulosefilter bzw. die Nylonmembran mit immobilisierter DNA oder RNA wurde in einer Hybridisierungsröhre für 1 h bei 37°C mit Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Die Vor-Hybridisierungslösung wurde entfernt, die DNA-Sonde in Hybridisierungspuffer zugegeben und bei 37°C für 18 h unter Drehen inkubiert. Die radioaktive Lösung wurde abgenommen und der Filter zunächst bei RT zweimal 10 min in 2 x SSC + 0,1% SDS und dann 1 h bei 37°C in Hybridisierungswaschpuffer gewaschen. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit Whatman-Filterpapier abgesaugt, der Filter in eine Klarsichtfolie eingepackt und auf einem Röntgenfilm (X-omat AR-5) mit Verstärkerfolie bei -70°C exponiert.

Hybridisierungspuffer

50%	Formamid
1%	Na-Laurylsarcosinat
0,1%	SDS
4,0 mM	EDTA (pH 7,2)
0,12 M	Na-Phosphatpuffer (pH 6,8)
2 x	SSC
4 x	Denhardts Reagenz

Hybridisierungswaschpuffer

Der Hybridisierungswaschpuffer hatte die gleiche Zusammensetzung, wurde jedoch ohne Denhardts Reagenz angesetzt. Für die Hybridisierung unter geringer Stringenz wurde Puffer mit 30% anstelle von 50% Formamid verwendet. Die Waschschriffe erfolgten wie oben beschrieben.

<u>20 x SSC</u>		<u>100 x Denhardts Reagenz</u>	
3,0 M	NaCl	2%	Ficoll 400
0,3 M	NaCitrat	2%	Polyvinylpyrrolidon
		2%	Rinderserumalbumin

2.3.9 Isolierung von Gesamt-RNA aus *D. discoideum*

Zum Schutz vor RNasen wurden generell während des Arbeitens Handschuhe getragen und alle Lösungen mit DEP-behandeltem Wasser angesetzt (0,1% DEP, für mehrere Stunden rühren, autoklavieren). Es wurden ausschließlich sterile Plastikgefäße und Pipetten verwendet. Um eine Aussage über die Entwicklungsregulation der mRNA-Expression eines Gens machen zu können, wurde Gesamt-RNA aus vegetativen Zellen und verschiedenen Entwicklungsstadien isoliert.

Qiagen RNeasy Mini Kit

1-1,5 x 10⁷ Zellen wurden geerntet, 1 x mit kaltem, sterilem und 1 x mit DEP-behandeltem Wasser gewaschen und anschließend nach dem Qiagen RNeasy Kit Protokoll behandelt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Die Zellen wurden mit 600 µl RLT-Puffer (aus Qiagen RNAeasy Mini Kit) lysiert, zentrifugiert (14.000 UpM, 1 min, RT) und der Überstand danach in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 3 min, der resultierende Überstand wurde wiederum in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und mit einem Volumen 70% Ethanol (in DEP-Wasser) versetzt. Diese Lösung wurde auf eine „RNA mini spin“-Säule gegeben und bei RT mit 10.000 UpM für 15 sec abzentrifugiert. Die Säulenmatrix wurde mit 700 µl RW1-Puffer (aus Qiagen RNAeasy Mini Kit) und anschließend mit 500 µl RPE-Puffer (aus Qiagen RNAeasy Mini Kit) gewaschen (10.000 UpM, 15 sec, RT), gefolgt von einem zusätzlichen Waschschrift mit RPE für 2 min. Um jegliche Ethanolreste zu entfernen, welche die folgende Elution behindern könnten, wurde die Säule nochmals bei maximaler Geschwindigkeit der Eppendorf-Tischzentrifuge für eine Minute zentrifugiert. Danach wurde unter die Säule ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die RNA von der Membran mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser (aus Kit) eluiert (10.000 UpM, 1 min, 4°C, 1-2 Elutionsschritte). Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht 40 µg RNA. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte zwischen 1,9 und 2,0 liegen. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

Phenol/Chloroform Extraktionsmethode

1 x 10⁸ Zellen wurden geerntet, mit kaltem, sterilem H₂O gewaschen und in 10 ml 50 mM HEPES (pH 7,5) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 100 µl DEP und 1 ml SDS (10%) unter heftigem Schütteln lysiert. Diese Suspension wurde unverzüglich mit 1 Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Gleiche Volumina Phenol/HEPES und Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) wurden zupipettiert und die Suspension 1 min kräftig gemischt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (CS-6KR Beckman, 3000 UpM, 10 min, 4°C) beschleunigt. Die wässrige Phase wurde so oft mit Phenol/HEPES und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (zwei- bis dreimal), bis keine Interphase mehr sichtbar war. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 2 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Volumina Ethanol wurde die RNA präzipitiert (12 h, -20°C) und abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 12.000 UpM, 20 min, 4°C). Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde sie getrocknet und in 0,5 ml DEP-Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.3.10 Elektrophorese von RNA in Agarosegelen

1% bis 1,3% Agarose (Endkonzentration) wurde mit 148 ml DEP-Wasser und 20 ml 10 x RNA-Gelpuffer aufgeköcht und auf 60°C abgekühlt. Dann wurden 32 ml einer 36%igen Formaldehyd-Lösung zugegeben, die Mischung in einer vorher mit SDS-Lösung (1%) und DEP-Wasser gespülten Flachbett-Gelapparatur (20 x 20 cm) gegossen und das Gel nach Erhärten mit RNA-Laufpuffer überschichtet. Die RNA wurde mit etwa einem Volumen RNA-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 65°C denaturiert und nach der Zugabe von 1/10 Volumen RNA-Farbmarker sofort auf das Gel aufgetragen. Die RNA wurde mit 2 V/cm aufgetrennt. Interner RNA-Größenstandard: 26S rRNA (4,1 kB) und 17S rRNA (1,9 kB).

10 x RNA-Gelpuffer (pH 8,0)

200 mM	MOPS/NaOH
50 mM	Na-Acetat
10 mM	EDTA

10 x RNA-Laufpuffer (pH 7,0)

200 mM	MOPS/NaOH
50 mM	Na-Acetat
10 mM	EDTA

Die Puffer erhalten durch das Autoklavieren eine gelbliche Farbe.

<u>RNA-Probenpuffer</u>		<u>RNA-Farbmarker</u>	
50%	Formamid	50%	Saccharose (RNase frei)
6%	Formaldehyd	0,25%	Bromphenolblau
10 µg/ml	Ethidiumbromid		
in 1 x RNA-Gelpuffer, pH 8,0		in DEP-Wasser	

2.3.11 „Northern-Blotting“

Nach der Elektrophorese wurden die Gele im UV-Licht (312 nm) fotografiert, 5 min in DEP-Wasser und anschließend 25 min in 10 x SSC äquilibriert. Der Transfer auf Nylonmembran erfolgte in einem Zeitraum von 18 h in 20 x SSC aufgrund von Kapillarkräften (Kapillarblot).

Das Agarosegel lag auf Whatman 3 MM-Papier mit Kontakt zu einem 20 x SSC Reservoir und wurde mit einer Nylonmembran, 3 Lagen Whatman 3MM-Papier und einem ca. 6 cm dicken Stapel von Saugpapier belegt und leicht beschwert (ca. 0,2 kg). Nach dem Transfer wurden die Filter 10 min in 5 x SSC gewaschen, auf Whatmanpapier kurz getrocknet und die „geblottete“ RNA auf der Membran mittels „cross-linking“ unter UV-Licht für 90 sec fixiert.

2.3.12 Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen

2.3.12.1 Oligonukleotide

Die für die Sequenzierung und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzten Oligonukleotide wurden in der Regel durch MWG hergestellt und lyophilisiert geliefert. Die Oligonukleotide wurden in sterilen Wassers aufgenommen und auf 20 pmol/µl verdünnt.

Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion:

A: WD40-uni	GCGACA GCATG C ATG GAA TAT AAA AGT TTT GAA
B: WD40-revgr	GCGC A AGCTT A CAT TGG TGA TGG TGC AAC
C: WD40-revkl	GCGC A AGCTT A GAT TTC ACA AAT GTT AAC ATC
D: PST/NoHou	GCGACA GCATG C GCA TTA CAA AAA TTC TCT
E: PST/NoHor	GCGC A AGCTT A CAA TAA ATT ACC ATT ACT ACC
F: vilHP-uni	GCGACA GCATG C CCA ATT GAT GAA GGT GG
G: vilHP-rev	GCGC A AGCTT A GAA TGT ATA TTA TAG ATA GAG
NPIIInde-uni	GCG CAT ATG ACT TGG CAA GCA TAT ATT GAT AC
PIII-rev	GCG TCT AGA TTA GAA ACC TTG TTC TCT TAA ATA ATC ACC

Oligonukleotide für die Sequenzierung:

JC173mr | GCC CAT GAG GAT CCA TCT GCT G

Soweit nicht anders angegeben, wurden für die Sequenzierung Standard-Primer der Firma TopLab verwendet.

2.3.12.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde verwendet, um genomische DNA-Abschnitte und cDNA-Bereiche zu amplifizieren oder um Restriktionsstellen an DNA-Fragmente anzuhängen. Das Volumen eines PCR-Ansatzes betrug 50 µl. Durch die Verwendung eines Thermoblocks (Biometra UNO) mit beheizbarem Deckel entfiel die Übersichtung mit Mineralöl. Die Hybridisierungstemperatur (TH) eines bestimmten Oligonukleotids wurde anhand seiner Basenzusammensetzung folgendermaßen abgeschätzt (Suggs *et al.*, 1981):

$$4 (G+C) + 2(A+T) - 10 = TH (°C)$$

Um die DNA-Matrize zu Beginn völlig zu denaturieren, lief der erste Denaturierungsschritt länger ab als die folgenden. Auch die letzte Verlängerung dauerte länger als die vorausgehenden, um vollständig polymerisierte Endprodukte zu erhalten.

10 x PCR-Pufferfür Taq-Polymerase:

100 mM Tris/HCl (pH 8,3)

500 mM KCl

15 mM MgCl₂

0,1% (w/v) Gelatine

10 x PCR-Pufferfür PfuTurbo-Polymerase:

200 mM Tris/HCl (pH 8,7)

100 mM KCl

100 mM (NH₄)₂SO₄20 mM MgSO₄

1% Triton x-100

1mg/ml BSA

10 x PCR-Pufferfür Vent-Polymerase:

200 mM Tris/HCl (pH 8,8)

100 mM KCl

100 mM (NH₄)₂SO₄200 mM MgSO₄

1% Triton X-100

PCR-Bedingungen zur Amplifizierung von Villidin-Fragmenten an cDNA-Matrize vil20:

REAKTIONSBEDINGUNGEN		REAKTIONSANSATZ
1. Denaturierung:	94°C, 240 sec	0,5 µg Plasmid-DNA
Denaturierung:	94°C, 60 sec	20 pmol 5'-Oligonukleotid
Hybridisierung:	50°C, 60 sec	20 pmol 3'-Oligonukleotid
Verlängerung:	72°C, 60 sec	dNTP-Mix (jeweils 5 mM)
Zyklenzahl:	30 (für Taq), 20 (für Vent)	1 U Taq- od. 2 U Vent
Letzte Verlängerung:	72°C, 180 sec	5 µl 10 x PCR-Puffer

Die PCR zur Amplifikation der Villidin-Fragmente WD4, LinkerWDV, cVVD und hp (unter 2.5.11) erfolgte am cDNA-Klon vil20. Aus einem cDNA „library screen“ („slug“ Stadium) wurde das Plasmid pFc3 (W.F. Loomis) entwickelt, dessen Insert hohe Homologie zum C-Terminus des *Dictyostelium* Protovillins (Hofmann *et al.*, 1993) zeigte. Um längere DNA-Stücke zu erhalten wurde, die cDNA Bank mit einem 900 Bp EcoRI-Fragment dieses pFc3-Plasmides gesichtet (A.A. Noegel). Dabei konnte unter anderem der Klon vil20 identifiziert werden, der ein 5,0 kB Insert enthielt, welches die gesamte Villidin-Sequenz kodierte.

PCR-Bedingungen zur Amplifizierung der Profilin III-Sequenz an einer cDNA-Matrize:

REAKTIONSBEDINGUNGEN		REAKTIONSANSATZ
1. Denaturierung:	94°C, 300 sec	0,2 µg Plasmid-DNA
Denaturierung:	94°C, 50 sec	20 pmol 5'-Oligonukleotid
Hybridisierung:	58°C, 60 sec	20 pmol 3'-Oligonukleotid
Verlängerung:	72°C, 50 sec	dNTP-Mix (jeweils 5 mM)
Zyklenzahl:	26	2 U PfuTurbo-Polymerase
Letzte Verlängerung:	72°C, 240 sec	5 µl 10 x PCR-Puffer 4 mM MgCl ₂

Für die Profilin III-PCR diente das JC2c173c02.r1-Plasmid (pUC19-Vektor) (*Dictyostelium* Genomprojekt Jena) als cDNA „template“, dessen Insert die gesamte Profilin III-Sequenz enthält.

PCR-Bedingungen zur Amplifizierung der Profilin III-Sequenz an genomischer AX2-DNA:

REAKTIONSBEDINGUNGEN		REAKTIONSANSATZ
1. Denaturierung:	94°C, 420 sec	90 ng genomische DNA
Denaturierung:	94°C, 45 sec	20 pmol 5'-Oligonukleotid
Hybridisierung:	58°C, 60 sec	20 pmol 3'-Oligonukleotid
Verlängerung:	68°C, 50 sec	dNTP-Mix (jeweils 5 mM)
Zyklenzahl:	20	1 U Taq- od. 2 U PfuTurbo
Letzte Verlängerung:	68°C, 240 sec	5 µl 10 x PCR-Puffer
		4 mM MgCl ₂

2.3.12.3 RT-PCR nach der QIAGEN OneStep Methode

Zum Nachweis der Transkription des Profilin III Gens in AX2 Wildtyp-Zellen und der Profilin II/I Doppelmutante pII/Ia2, wurde neben „Northern-Blot“ Analyse auch RT-PCR herangezogen. Hierfür wurde der QIAGEN OneStep RT-PCR Kit verwendet, dessen Enzym Mix sowohl die reverse Transkriptase (rT) als auch die HotStarTaq DNA Polymerase beinhaltet. Dies ermöglichte die reverse Transkription der RNA in eine cDNA-Matrize und die daran anschließende PCR-Amplifikation in nur einem Reaktionsgefäß. Die Synthese des cDNA-„templates“ erfolgte bei 50°C für 15 min. Anschließend wurde die DNA-Polymerase initial durch Inkubation bei 95°C für 15 min aktiviert, wobei gleichzeitig die reverse Transkriptase inaktiviert wurde. Es wurden Gen-spezifische Primer für Profilin III eingesetzt, die auch für die PCR verwendet wurden. Um sicher zu stellen, daß mRNA nachgewiesen wurde und nicht, durch eine geringe DNA-Verunreinigung in der Gesamt-RNA-Lösung, die Profilin III Gensequenz, wurde eine Kontrollreaktion angesetzt. Hierfür wurde der Enzym Mix erst nach der 50°C rT-Aktivierung zugegeben. Eine weitere Kontrolle wäre die parallele RT-PCR mit spezifischen Primern, die eine Intron-Sequenz eines beliebigen „Kontroll“-Gens umrahmen. In beiden Fällen sollte bei einer reinen RNA-Lösung keine Bande im Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel zu sehen sein.

Alle Pipettierschritte wurden auf Eis, mit Handschuhen und unter einer Sterilbank durchgeführt, um RNase-Kontaminationen zu vermeiden. Es wurden nur sterile PCR-Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wie DEP-behandeltes, steriles Wasser verwendet.

RT-PCR-Bedingungen zur Amplifizierung der Profilin III mRNA aus Gesamt-RNA:

REAKTIONSBEDINGUNGEN		REAKTIONSANSATZ
Reverse Transkription:	50°C, 30 sec	in RNase-freien Wasser (aus Kit)
Initiale PCR-Aktivierung:	95°C, 15 sec	1 µg AX2 od. pII/Ia2 Gesamt-RNA
Denaturierung:	95°C, 45 sec	1 µM 5'-Oligonukleotid
Hybridisierung:	54°C, 60 sec	1 µM 3'-Oligonukleotid
Verlängerung:	72°C, 50 sec	dNTP-Mix (jeweils 400 µM)
Zyklenzahl:	30	2 µl OneStep RT-PCR Enzym Mix
Letzte Verlängerung:	72°C, 240 sec	5 U RNase Inhibitor (RNasin, Promega) 10 µl 5 x OneStep RT-PCR-Puffer (einschließlich 2,5 mM MgCl ₂)

2.3.13 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA2.3.13.1 Phosphatase Behandlung

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende mit alkalischer Phosphatase entfernt. Die Behandlung mit Phosphatase wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. In einem 50 µl Ansatz wurden 1-5 µg linearisierter Vektor mit 1-2 U alkalischer Phosphatase in Phosphatase-Puffer bei 37°C 20 min lang umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 10 mM EDTA-Lösung und Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10 min gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit 2 Volumina Ethanol gefällt.

10 x Phosphatase-Puffer (pH 9,0)

500 mM	Tris/HCl
10 mM	MgCl ₂
1 mM	ZnCl ₂
10 mM	Spermidin

2.3.13.2 DNA-Ligase Reaktion

DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase verknüpft. Nach Abschätzen der Konzentration des dephosphorylierten Vektors und des Fragments auf einem analytischen Agarosegel und Berechnung der einzusetzenden Mengen nach unten aufgeführter Formel, wurde die Ligation in einem Volumen von 15 µl angesetzt. Nachdem der Vektor und das Insert für die Ligation vorbereitet waren, wurden die Konzentrationen in einem Agarosetestgel abgeschätzt.

Die in der Ligation einzusetzenden DNA-Mengen wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\{[\text{Vektor (ng)} \times \text{Insert (kB)}] / \text{Vektor (kB)}\} \times \text{molares Verhältnis [Insert/Vektor]} = \text{Insert (ng)}$$

Für die Ligation von kleinen Fragmenten (< 1000 Bp) wurde ein vier- bis zehnfacher molarer Überschuß an Fragment eingesetzt, große Fragmente wurden meist mit der gleichen Menge Vektor ligiert. Zur Verbindung glatter Enden wurde 24 h, zur Verbindung überhängender Enden 12-16 h bei 16 oder 21°C inkubiert.

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>10 x Ligationspuffer (pH 7,6)</u>	
50-200 ng	linearisierte Vektor-DNA	200 mM	Tris/HCL
	DNA-Fragment	50 mM	MgCl ₂
1,5 µl	10 x Ligationspuffer	50 mM	DTT
2 U	T4-Ligase	5 mM	ATP
mit Wasser auf 15 µl auffüllen		500 µg/ml	BSA

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

1 l LB-Medium wurde mit 5 ml Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C mit 240 UpM geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, in sterile Falkonröhrchen überführt, abzentrifugiert (CS-6KR Beckman, 3000 UpM, 10 min, 4°C) und in sterilem, eiskaltem Wasser resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit kaltem Wasser gewaschen und abzentrifugiert, wobei bei jedem Waschschrift das Volumen um die Hälfte reduziert wurde. Schließlich wurden die Zellen nach dem Abdekantieren in der Restflüssigkeit (1-2 ml) resuspendiert, in Aliquots zu je 50 µl abgefüllt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.15 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

Zur Transformation wurden die Zellen (50 µl) auf Eis aufgetaut und entweder ein gefällter und in Wasser aufgenommener Ligationsansatz oder eine Verdünnung zirkulärer Plasmid-DNA zupipettiert. Nach 10 min auf Eis wurde das *E. coli*-Plasmid-Gemisch in eine Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) gefüllt und die Zellen wurden bei 25 µF, 200 Ohm und 2,5 kV transformiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in 1 ml SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) aufgenommen, die Zellen 30 min bei 37°C regeneriert und 1, 10 und 100 µl auf LB-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert.

SOC-Medium

2%	Bacto-Trypton
0,5%	Hefeextrakt
10,0 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10,0 mM	MgCl ₂
10,0 mM	MgSO ₄
20,0 mM	Glucose

2.3.16 DNA-Kolonie-Blot für *E. coli*

Die Kolonien einer Agarplatte wurden durch Auflegen und vorsichtiges Abziehen eines Nitrozellulosefilters auf diesen übertragen. Filter und Platten wurden markiert, um später eine genaue Zuordnung eines Autoradiogrammsignals zu einer Kolonie zu ermöglichen. Die Agarplatte wurde zum Regenerieren der Kolonien mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Die Filter wurden mit den anheftenden Bakterienkolonien nach oben in folgenden Lösungen inkubiert: 30 sec in einer 10% SDS-Lösung, 3-5 min in 0,5 M NaOH und zur Neutralisation 5 min in einer 1 M Tris/HCl-Lösung (pH 8,0). Die SDS- und NaOH-Lösungen (je etwa 2 ml) wurden auf Klarsichtfolie pipettiert und die Filter auf die Oberfläche der Flüssigkeit gelegt, um ein Verwischen der Kolonien zu vermeiden. Die Filter wurden anschließend zweimal 5 min in 2 x SSC gewaschen, bis keine Bakterienreste mehr auf den Filter sichtbar waren, auf saugfähigem Papier getrocknet, 2 h bei 80°C gebacken und nach einstündiger Vor-Hybridisierung (analog 2.3.8) mit der entsprechenden Sonde hybridisiert.

2.3.17 *E. coli* Dauerkulturen

Wichtige Transformanten wurden als Dauerkultur konserviert. Eine Impföse voll Bakterien wurde in LB-Medium mit 7% DMSO übertragen, die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.4 „Yeast-Two-Hybrid“-System

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde nach dem Protokoll des MATCHMAKER Two-Hybrid-System2 (Clontech) gearbeitet. Dieses System basiert auf dem GAL4-Prinzip (Fritz und Green, 1992; Pina, 1993; Bartel *et al.*, 1993; Fields und Sternglanz, 1994; Luban und Goff, 1995). GAL4 ist ein Hefe Transkriptionsfaktor, der sich aus einer DNA-bindenden (DNA-BD) und einer Transkriptions-aktivierenden Domäne (AD) zusammensetzt. Beide Domänen sind nötig, um ein Gen zu aktivieren, und sie sind normalerweise Teil des gleichen Proteins. Werden sie molekular-technisch getrennt und in der gleichen Zelle exprimiert, sind sie nicht in der Lage, direkt miteinander zu interagieren und Gen-aktivierend zu wirken (Brent und Ptashne, 1985; Ma und Ptashne, 1988). Das „Two-Hybrid-System“ basiert darauf, daß getrennte Fusionsproteine mit diesen beiden Domänen erzeugt werden. Die rekombinanten Hybrid-Proteine werden gemeinsam in Hefen (Y190-Stamm, Abkömmling des Y153) koexprimiert und im Falle einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine, kommt es zur erneuten Zusammenführung der beiden GAL4-Domänen, was in der Aktivierung der Reportergene (*lacZ* und *HIS3*) resultiert. Um Interaktionspartner von Villidin zu finden, sollte eine *D. discoideum* „developmental-pACT2-library“ (Labor: A. Kuspa; pACT2-Vektor: GAL4-AD, *LEU2*, *amp^r*) mit DNA-BD/Villidin-Konstrukten (im pAS2-Vektor: GAL4-DNA-BD, *TRP1*, *CYH^{s2}*, *amp^r*) gescreent werden. Die beiden Typen von Hybrid-Plasmiden ermöglichen die Selektion nach Transformanten, die beide Plasmide enthalten. Hierfür wurden die Zellen auf Minimalmedium kultiviert, welchem die Transformationsmarker Leucin und Tryptophan fehlten. Durch den Verzicht auf Histidin im Medium konnte ferner auf die Expression des *His⁺*-Reporters getestet werden, was die Voraussetzung für eine Interaktion der zu untersuchenden Proteine darstellt. Eine „undichte“ *HIS3*-Reporter-Expression wurde durch die Verwendung des Toxins 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) verhindert. Darüber hinaus wurden die *His⁺*-Transformanten auf die Expression des zweiten Reportergens (*lacZ*) durch einen β -Galactosidase-Aktivitätstest geprüft. Die Zugabe von Cycloheximid im Medium stellt eine zusätzliche Selektionsmöglichkeit dar, da der pAS2-Vektor die entsprechende Resistenz vermittelt.

2.4.1 Kultur von Hefen

2.4.1.1 Anzucht der Hefen auf Agarplatten

Aus Glycerin- oder Flüssigkulturen wurden mit einer sterilen Impföse die Hefen auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen. Flüssigkulturen konnten nach geeigneter Verdünnung auch direkt ausplattiert werden. Die Platten wurden bei 30°C für 2-10 Tage inkubiert. Für die Bestimmung der Temperatursensitivität wurden die Platten 2-5 Tage bei 37°C inkubiert.

2.4.1.2 Vermehrung in Flüssigmedium

Zur Anzucht von Hefen wurden Einzelkolonien von Kulturplatten in 5-20 ml des entsprechenden Mediums angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in frischem Medium auf eine $OD_{600} < 0,2$ verdünnt und unter Schütteln (180 UpM) weiter bei 30°C inkubiert. Entsprechend der weiteren Verwendung der Hefen wurden sie bei unterschiedlichen OD-Werten geerntet. Für Transformationen sollten sich die Hefen in der frühen logarithmischen Wachstumsphase befinden, d.h. sie wurden bei einer OD_{600} zwischen 0,6-0,8 geerntet. Für die Proteinextrakte konnten sie bis zu einer OD_{600} von 3 wachsen. Die stationäre Wachstumsphase der Hefen wird erst nach 48 h erreicht.

2.4.1.3 Stammhaltung

Übernachtskulturen der einzelnen Stämme wurden mit einem Volumen Glycerin vermischt und bei -70°C eingefroren. Um Glycerinkulturen von Plattenkulturen anzulegen, mußten die Hefen dicht auf einer Platte ausgestrichen werden. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C wurde der Zellrasen abgeschabt und in 30% Glycerin suspendiert. Glycerinkulturen sind bei -70°C für mehrere Jahre haltbar. Alternativ konnte die Zellen mit 9% DMSO im entsprechenden Selektionsmedium resuspendiert, dann im flüssigen Stickstoff gefroren und bei -70°C gelagert werden.

2.4.2 Transformation von DNA in Hefen

Die Transformation der beiden Plasmid-Typen DNA-BD-Konstrukt (pAS2-Vektor) und AD-Konstrukte (pACT2-„library“) erfolgte in der Regel sequentiell. Das heißt, daß zunächst das DNA-BD/Villidin-Konstrukt in Hefen transformiert wurde, nicht zuletzt um es auf eine Autoaktivierung zu testen (2.4.3). Positive Transformanten, die keine Transkriptionsaktivität zeigten, wurden dann transformationskompetent gemacht und es konnte die Transformation

der pACT-„library“ erfolgen. Daneben wurde auch die simultane Transformation durchgeführt, wobei beide Plasmide gleichzeitig in die Zellen eingeführt werden, was allerdings meist in einer geringeren Effizienz resultiert.

Transformation mit Lithiumacetat (Gietz *et al.*, 1992):

Die Behandlung der Hefen mit Lithium-Ionen führt zu transformationskompetenten Zellen (Ito *et al.*, 1983). Es wurde ein modifiziertes Protokoll nach Gietz und Schiestl (1992) angewendet, oder die Transformation erfolgte nach einer weiteren modifizierten Lithiumacetat-Methode (Gietz *et al.*, 1995). Die Hefen wurden in 1 ml des entsprechenden Selektionsmedium bzw. in YPD durch Vortexen in Lösung gebracht. Mit dieser Suspension wurden 30-50 ml Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde entweder sofort abzentrifugiert oder es wurden damit weitere 50 ml YPD auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 eingestellt und für 3-5 h bei 30°C (230 UpM) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 vermehrt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1000 g, 5 min, RT) und in 25 ml sterilem H₂O gewaschen. Der Überstand wurde abgekippt, so daß ca. 50 µl über dem Pellet verblieben. Nun wurde die zu transformierende DNA (1-10 µg) zugegeben. Um eine höhere Transformationseffizienz zu erzielen, wurden 2-20 µl Carrier-DNA (gescherte und denaturierte Hering-Sperma-DNA) zugegeben und das Pellet durch Vortexen gelöst. Pro Transformationsansatz wurden 500 µl PLATE-Lösung (frisch hergestellt) mit der DNA-Zellsuspension gemischt, dann 20 µl 1 M DTT (bei -20°C gelagert) untermischt und der Transformationsansatz über Nacht bei RT inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock bei 42°C für 10-15 min wurden die Zellen kurz abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen. Auf Selektionsplatten wurden Aliquots von 100-500 µl ausplattiert und die Platten bei 30°C für 2-8 Tage inkubiert.

10 x TE-Puffer (pH 7,5)

0,1 M Tris/HCl
10 mM EDTA

10 x LiAc (pH 7,5)

1,0 M Lithiumacetat (Sigma)

PEG 4000-Lösung

50% PEG 4000 (Polyethylen Glycol)

1,0 M Tris/HCl Stammlösung (pH 7,5)

0,5 M EDTA Stammlösung

PLATE-Lösung

40% PEG 4000
1 x TE-Puffer
1 x LiAc
1 mM EDTA

Alle Puffer und Lösungen wurden autoklaviert!

vor Gebrauch frisch herstellen

Carrier-DNA:

Zur Herstellung der Carrier-DNA (Schiestl und Gietz, 1989) wurden 200 mg Herings-Sperma-DNA in 100 ml TE-Puffer unter starkem Rühren bei 4°C über Nacht gelöst. Die gelöste DNA wurde in 100-500 µl Aliquots bei -20°C gelagert. Vor jeder Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut, für 5 min bei 95°C linearisiert und sofort auf Eis gestellt, um ein erneutes Schließen der DNA-Stränge zu vermeiden.

2.4.3 Autoaktivitätstest der DNA-BD/Villidin-Konstrukte („bait“)

Bevor ein DNA-BD/Villidin-Konstrukt (pAS2-Vektor) im „Two-Hybrid-System“ eingesetzt werden konnte, mußte seine Transkriptionsaktivität im Y190 Stamm in Abwesenheit des AD-Plasmides (pACT2-Vektor; „library“) getestet werden, um eine Autoaktivierung ausschließen zu können. Hierfür wurde ein β-Galactosidase-Filter-Test durchgeführt. Eine Blaufärbung der Kolonien in Anwesenheit von X-Gal ist Indikator dafür, daß das entsprechende rekombinante Protein bereits schwach den lacZ-Reporter aktiviert. Zeigte ein Klon Verfärbung, wurde er für eine weitere Verwendung im „library-screen“ nicht eingesetzt.

Die Kolonien einer Platte wurden durch Auflegen und Abziehen eines Nitrozellulosefilters auf diesen übertragen. Filter und Platten wurden markiert, um später eine genaue Zuordnung zu ermöglichen. Die Filter wurden für 10 sec in flüssigen Stickstoff gegeben, bis sie vollständig gefroren waren. Danach ließ man sie bei RT kurz auftauen. Whatmanpapiere wurden in Petrischalen gegeben, mit Z-Puffer/X-Gal getränkt und die Filter mit den Kolonien nach oben luftblasenfrei darauf gelegt. Die Inkubation fand bei 30°C für 0,5-8 Stunden statt. In regelmäßigen Abständen wurde die Farbentwicklung der Kolonien kontrolliert.

<u>1 x Z-Puffer (pH 7)</u>		<u>Z-Puffer/X-Gal</u>	
90 mM	Na ₂ HPO ₄ (x 2 H ₂ O)	100,00 ml	1 x Z-Puffer
35 mM	NaH ₂ PO ₄ (x H ₂ O)	0,27 ml	β-Mercaptoethanol
10 mM	KCl	1,67 ml	X-Gal-Stammlösung
1 mM	MgSO ₄ (x 7 H ₂ O)	für Gesamtvolumen von 101,97 ml	
autoklavieren, bis zu 1 Jahr bei RT lagern		vor Gebrauch frisch herstellen	

X-Gal-Stammlösung

20 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal; Sigma)
lösen in N,N-Dimethylformamid (DMF)
bei -20°C maximal 4 Wochen lagern (lichtsensitiv)

2.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Aus 10 ml Übernachtskulturen (30°C, ~20 h, 250 UpM) der transformierten Hefekulturen (in SD/-Leu/-Trp/-His/+3-AT Selektionsmedium) wurde Plasmid-DNA isoliert, um sie für weitere Analysen in Bakterien zu retransformieren. Der Umweg über *E. coli* ist nötig, da isolierte Plasmid-DNA aus Hefen oft mit genomischer DNA verunreinigt ist und sich nicht für einen analytischen Restriktionsverdau eignet. Die Hefezellen wurden abzentrifugiert (CS-6KR Beckman, 4000 UpM, 5-10 min, RT), mit H₂O gewaschen und der Überstand abdekantiert. Das Pellet wurde in der Restflüssigkeit durch Vortexen resuspendiert, mit 5 Volumina (~200 µl) Lysispuffer versetzt und die gleiche Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. In einem Reaktionsgefäß wurden ca. 0,3 g Glasperlen („acid-washed glass beads“, ϕ 425-600 µm, Sigma) vorgelegt und das Lysisgemisch darauf gegeben. Durch Vortexen (2 min) werden die Zellen mechanisch geöffnet und dann abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14.000 UpM, 5 min, RT). Der Überstand wurde abgenommen, mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) in 2,5 Volumina Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet (RT). Das Pellet wurde in 20 µl H₂O aufgenommen und 1-10 µl dieser Lösung konnten mittels Elektroporation in *E. coli* transformiert werden.

Lysispuffer (pH 8)

10 mM	Tris/HCl
1 mM	EDTA
100 mM	NaCl
2%	Triton X-100
1%	SDS

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE (Lämmli, 1970) wurden in der Regel 7,5%, 10%, 15% (s.u.) oder 18% Trenngele mit 3%igen Sammelgelen verwendet (7,5 x 10 x 0,05 cm).

Sammelgel

125 mM Tris/Glycin (pH 6,8)

0,1% SDS

3,3% Acrylamid (38:1 Bisacrylamid)

pro 16 ml:

240 µl 20%iges Ammoniumperoxodisulfat (APS)

8 µl TEMED

Trenngel

380 mM Tris/Glycin (pH 8,8)

0,1% SDS

15% Acrylamid (38:1 Bisacrylamid)

pro 42 ml:

480 µl 20%iges APS

12 µl TEMED

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer

250 mM Tris

1,9 M Glycin

1% SDS

3 x SDS-Probenpuffer

65 mM Tris/HCl (pH 6,8)

10% Glycerin

2,3% SDS

5% β-Mercaptoethanol

Bromphenolblau a.l.

Zu der aufzutrennenden Proteinlösung wurden 1/3 Volumen 3 x SDS-Probenpuffer gegeben und die Lösung für 3 min gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V konstanter Spannung. Als Standard wurde ein Gemisch von Proteinen definierter Molekülmassen verwendet:

LMW („low molecular weight“, Biorad)

92,5 kDa, 68 kDa, 45 kDa, 33 kDa, 20 kDa, 14 kDa

„See blue“ (Novex)

250 kDa, 98 kDa, 64 kDa, 50 kDa, 36 kDa, 30 kDa, 16 kDa, 6 kDa, 4 kDa

2.5.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese bestand aus einer isoelektrischen Fokussierung (erste Dimension), die auf immobilisierten linearen pH Gradienten (Immobiline DryStrip, Pharmacia) durchgeführt wurde, und aus einer SDS-PAGE (zweite Dimension) in selbstgegossenen Acrylamidgelen.

Für die erste Dimension wurden pH 3-10 und pH 4-7 Gradienten verwendet. Zunächst wurden die gefriergetrockneten DryStrips (flache Acrylamid-Gelstreifen auf einer Trägerfolie) über Nacht in Rehydrationspuffer in einer „reswelling“-Kammer (Pharmacia) rehydriert. Die DryStrips wurden entweder umgehend verwendet oder bei -20°C eingefroren, und waren so für zwei bis drei Wochen haltbar. Die Proteinproben (mindestens 10 µg gereinigtes Protein oder 30 µg Protein als Zellhomogenat) wurden mit 1/3 Volumen Probenpuffer versetzt und mit Hilfe von Filterpapierstücken auf die DryStrips geladen (anodische Applikation). Die isoelektrische Fokussierung wurde auf einer gekühlten (2°C) Multiphor II Elektrophorese-Apparatur durchgeführt. Um den nötigen Mindest-Stromfluß zu erreichen, wurden sechs oder mehr DryStrips parallel eingesetzt. Die Fokussierung wurde bei 300 V begonnen (2 mA, 5W), nach 45 min wurde die Spannung auf 1400 V erhöht (16 h).

Nach dem Lauf konnten die markierten, nicht sofort weiterverarbeiteten DryStrips für einige Wochen bei -70°C aufbewahrt werden. Die DryStrips wurden direkt nach der Fokussierung (oder nach dem Auftauen) einzeln in ein mit Äquilibriumspuffer A gefülltes Reagenzglas gelegt. Das Glas wurde mit Parafilm verschlossen und für 10 min auf den Schüttler gelegt. Anschließend wurde der Puffer abgekippt, Puffer B zugegeben und wieder für 10 min auf dem Schüttler inkubiert. Die DryStrips wurden dem Reagenzglas entnommen, kurz mit Whatman-Papier von der Seite abgetrocknet und in ihrer Länge der verwendeten Gelkammer angepaßt, wobei die Abschnitte genau abgemessen und vermerkt wurden, um eine spätere Zuordnung zu ermöglichen. Um die DryStrips leichter auf dem Acrylamidgel plazieren zu können, wurden Gele mit doppelter Dicke (1 mm) gegossen. Die gekürzten DryStrips wurden zwischen die Glasplatten des SDS-PAGE-Gels in eine entsprechend breite Tasche des Trenngels gelegt und mit 1% Agaroselösung luftblasenfrei fixiert. Die Orientierung des DryStrips (Lage der sauren Seite des Gradienten) wurde vermerkt. Erst nach dem Festwerden der Agarose wurde das SDS-Gel mit Laufpuffer überschichtet und die Elektrophorese unter Standardbedingungen durchgeführt. Nach der Elektrophorese konnten die Gele entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder auf Nitrozellulose übertragen werden.

Rehydrationspuffer

12,0 g Harnstoff
 50,0 mg DTT
 0,13 ml Triton X-100
 0,13 ml Pharmalyte 3-10 (Serva)

mit Wasser auf 25 ml auffüllen, einige Körnchen Bromphenol zugeben (stets frisch herstellen)

Äquibrierungspuffer

4,0 ml Tris/HCl (1 M, pH 6,8)
 14,4 g Harnstoff
 12,0 ml Glycerin
 0,4 g SDS
 13,4 ml H₂O
 (ergibt 40 ml, Ansatz für 1 DryStrip)

Protein-Probenpuffer

13,5 g Harnstoff
 250,0 mg DTT
 0,5 ml Triton X-100
 0,5 ml Pharmalyte 3-10
 5,0 mg Pefabloc
 35,0 mg PMSF

mit Wasser auf 25 ml auffüllen, etwas Bromphenol zugeben; bei -20°C aufbewahren

Puffer A:

20 ml Äquibrierungspuffer
 + 100 mg DTT

Puffer B:

20 ml Äquibrierungspuffer
 + 0,9 g Iodoacetamid
 einige Körnchen Bromphenolblau

Zur Kalibrierung der ersten Dimension wurde der „broad pI“-Standard von Pharmacia verwendet. Hierzu wurde der DryStrip nach der ersten Dimension mit Coomassie-Blau gefärbt.

pI: 3,75 (Methylrot, kann nur direkt nach dem Lauf identifiziert werden); 4,55; 5,2; 5,85; 6,55; 6,85; 7,35; 8,15; 8,45; 8,65; 9,3.

2.5.3 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen

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

SDS-PAGE Gelfärbelösung

0,1% Coomassie Brilliant Blau R 250
 50% Methanol
 12% Essigsäure, filtrieren

Entfärber

0% Ethanol
 7% Essigsäure

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

Das Acrylamidgel wurde 30 min in einer wässrigen Lösung (10% Ethanol, 7% Essigsäure) fixiert und dann für 30 min in einer 10% Glutaraldehyd-Lösung inkubiert. Nach einem Waschschrift in Wasser (2 h, häufiges Wechseln) wurde das Gel 30 min in ammoniakalischer Silbernitrat-Lösung (Lsg. A) inkubiert, danach 10 sec mit Wasser gewaschen und schließlich mit Lösung B gefärbt. Die Reaktion wurde mit 10% Ethanol und 7% Essigsäure gestoppt.

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

2.5.5 „Western-Blot“ - Nachweis der Antigene durch Chemilumineszenz

Nach der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE wurden die Proteine nach der modifizierten Methode von Towbin *et al.* (1979) auf Nitrozellulose (Schleicher und Schuell BA 85) transferiert. Dies erfolgte in der Regel mit einer „semi-dry“ Elektrophorese-Apparatur (Biorad Trans-Blot SD) zwischen in Transferpuffer getränktem Whatman-Filterpapier (12 V, 60 min). Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose wurde diese über Nacht mit 5% Milchpulver in NCP-Puffer (ohne Azid) abgesättigt. Anschließend wurde die Nitrozellulose 3 x mit NCP-Puffer gewaschen und mit dem ersten Antikörper (1:2 bis 1:10.000 mit NCP-Puffer verdünntes Kaninchenserum oder Hybridomaüberstände) für 1-4 h inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit NCP-Puffer wurde die Nitrozellulose mit dem sekundären Antikörper (1:2000 mit NCP-Puffer verdünnt) für 1 h inkubiert, und anschließend wieder mehrmals gewaschen. Der Nitrozellulosefilter wurde dann mit 6 ml Nachweisreagenz für Chemilumineszenz (ECL: *enhanced chemiluminescence*) 1 min lang überschichtet. Die Lumineszenzreaktion wurde mit einem Röntgenfilmes (X-omat AR 5, Kodak) nachgewiesen.

Transferpuffer

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

Chemilumineszenz-Reagenz (ECL)

200 µl Luminol (250 mM in DMSO; Luminol: 3-Amino-phthalhydrazid)

89 µl p-Cumarsäure (90 mM in DMSO)

2 ml Tris/HCl (1 M, pH 8,5)

auf 20 ml mit Wasser auffüllen (im Dunkeln aufbewahren)

vor Gebrauch 6,1 µl H₂O₂ (30%) zugeben

2.5.6 Proteinbestimmung

Proteinbestimmung nach Bradford

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

Proteinbestimmung nach Lowry *et al.*

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

Konzentrationsbestimmung nach Gill und von Hippel

Diese Methode ist geeignet, wenn die Proteinsequenz bekannt ist und das entsprechende Protein in reiner Form vorliegt. Sie basiert vor allem auf der Absorption von Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) bei einer Wellenlänge von 280 nm ($W=5690$, $Y=1280$; nach Gill und von Hippel, 1989). Über die Zahl dieser Aminosäurereste in der Polypeptidkette kann die Konzentration der entsprechenden aufgereinigten Proteine rechnerisch abgeschätzt werden. Dabei wird die Anzahl einer der aufgeführten Aminosäuren mit ihrem angegebenen Wert multipliziert, die resultierenden Werte werden addiert (Extinktionskoeffizient) und ergeben den OD₂₈₀-Wert einer Konzentration von 1 mol/l. Eine leichte Ungenauigkeit liegt darin, daß nicht alle W und Y in der entsprechenden Proteinsequenz mit den angegebenen Literaturwerten der OD₂₈₀ übereinstimmen. Trotzdem ist diese Methode erheblich genauer als die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) oder Lowry *et al.* (1951) (Pace *et al.*, 1995).

2.5.7 Untersuchung der Villidin-Verteilung durch Präparation von Zellhomogenaten und subzellulären Fraktionen

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt, um proteolytischen Abbau möglichst gering zu halten. Die Villidin-Expression ist entwicklungsreguliert und erreicht ein Maximum nach 12 bis 15 h Entwicklung. Axenisch gewachsene AX2-Zellen wurden geerntet (200 g, 5 min, 4°C) und wie unter 2.2.3 beschrieben für 14 h bei 21°C entwickelt, ab gespült und erneut mit Phosphat-Puffer 2 x gewaschen. Verschiedene Protokolle wurden verwendet, um die Zellen zu öffnen und die Verteilung von Villidin im Immunoblot mittels des monoklonalen Villidin Antikörpers 267-6-2 nachzuweisen. Im allgemeinen wurden die Zellen in TEDABP-Puffer (pH 8,0), der 1:100 verdünnten Proteaseinhibitorcocktail (Sigma, #P2714) und 2,0 mM MgCl₂ enthielt, resuspendiert. Die Zellen wurden entweder durch mehrfache Passage durch Nuclepore-Filter (5 µm Porengröße, Corning Costar) geöffnet, oder durch Lysis mit 1% (Endkonzentration) Triton X-100 („surfact amps“, Pierce oder „membrane-grade“, Boehringer), oder aber durch Einfrieren bei -20°C und rasches Auftauen unter fließendem kaltem Wasser („freeze-thaw“). Das Zellhomogenat wurde bei 10.000 g bzw. 100.000 g zentrifugiert (Ti45 Rotor, 1 h, 4°C). Der Überstand enthielt die zytosolischen Proteine, das Sediment umfaßt neben Membranvesikeln und polymerisiertem Aktomyosin auch Organellen wie Zellkerne und Mitochondrien. Durch Immunblots konnte gezeigt werden, daß sich Villidin bis zu 60% im Sediment befand.

2.5.8 Zellfraktionierung

1 x 10⁹ Zellen einer axenisch gewachsenen *D. discoideum* Kultur wurden abzentrifugiert, gewaschen und für 8 h bei 21°C wie unter 2.2.3 beschrieben inkubiert. Danach wurden die Zellen mit kaltem Soerensen-Puffer geerntet und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde auf einer Zelldichte von 1 x 10⁸ Zellen/ml in HEPES-Puffer, der mit Proteaseinhibitorcocktail (Sigma) versetzt war, resuspendiert. Die Zellen wurden durch mehrere Passagen durch einen Nuclepore Filter mit 5 µm Porengröße oder durch Einfrieren (Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließend -20°C) und schnelles Auftauen unter fließendem, kaltem Wasser geöffnet. Die vollständige Öffnung der Zellen wurde im Mikroskop kontrolliert. Das Homogenat wurde abzentrifugiert (15.000 g, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde nach Abnahme eines Aliquots auf Eis gelagert, das Membran-Pellet mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators in einem kleinen Volumen HEPES-Puffer resuspendiert. Auf einen vorbereiteten diskontinuierlichen Saccharose-Stufengradienten wurde letzteres bzw. Zellhomogenat aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einem SW40 Swing out Rotor bei

112.000 g (29.000 UpM, 20 h, 4°C). Die einzelnen Stufen des Gradienten (je 2 ml) enthielten (von oben nach unten) 0,88; 1,02; 1,17; 1,32; 1,47; 1,62; 1,77 und 2,49 M Saccharose (entspricht 30, 40, 45, 50, 55, 60 und 80% (w/v) Saccharose) in HEPES-Puffer (Weiner *et al.*, 1993). Nach der Zentrifugation wurden 11 Fraktionen von 0 M nach 2,49 M Saccharose entnommen, jede Fraktion umgehend in Immunoblots analysiert und auf Proteingehalt und Enzymaktivität hin untersucht.

HEPES-Puffer (pH 7,4)

10,0 mM HEPES/NaOH

1,0 mM DTT

vor Gebrauch zugeben

0,5 mM PMSF

2,0 mM Benzamidin

+ Proteaseinhibitorcocktail (Sigma, #P2714)

+ E64 (trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-[4-Guanidino]Butan; Cystein-Proteaseinhibitor; Sigma, #E0514)

2.5.9 Messung von Enzymaktivitäten in subzellulären Fraktionen

Durch die Messung der Enzymaktivität der sauren oder alkalischen Phosphatase (Loomis, 1969; Loomis und Kuspa, 1984) in den einzelnen Fraktionen der Saccharose-Gradienten wurde die Verteilung von Plasmamembran und Lysosomen bestimmt. Die Ansätze wurden nach Stoppen der Reaktion kurz abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 13.000 UpM, 30 sec) und die Extinktion der Überstände bei 410 nm im Spektralphotometer bestimmt. Die Enzymaktivitäten der einzelnen Fraktionen wurden als relative Werte in Prozent der Gesamtaktivität aller gemessenen Fraktionen eines Gradienten dargestellt.

Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase

500 µl Citratpuffer (90 mM, pH 4,8)

500 µl p-Nitrophenylphosphat (50mM) (Substrattabletten, Sigma)

10 µl Fraktion

Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Na₂CO₃ (1M) gestoppt. Als Standard diente eine Probe, bei der 10 µl H₂O zugegeben wurden.

Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase

SUBSTRAT-LÖSUNG		ANSATZ:	
10 mM	p-Nitrophenylphosphat	900 µl	Substrat-Lösung
10 mM	MgCl ₂	100 µl	Fraktion
10 mM	Tris/HCl (pH 8,5)		

Nach 1 h Inkubation bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Na₂CO₃ (1M) gestoppt. Als Standard diente eine Probe, bei der 100 µl H₂O zugegeben wurden.

2.5.10 Aufreinigung und Markierung von Aktin

2.5.10.1 Präparation von Aktin aus Kaninchenmuskel

Die Präparation von Aktin aus Kaninchenmuskel folgte im wesentlichen den von Spudich und Watt (1971) sowie von Pardee und Spudich (1982) beschriebenen Methoden. Die einem frisch ausgeblutetem Kaninchen entnommenen Rücken- und Oberschenkelmuskeln wurden in einem Fleischwolf zerkleinert und 10 min mit Hochsalzextraktionspuffer unter Rühren extrahiert. Das Gemisch wurde bei 4000 g (10 min) abzentrifugiert und der Extraktionsschritt wiederholt. Mit dem Hochsalzschrift wurde hauptsächlich Myosin extrahiert. Das Sediment wurde dann in Wasser aufgenommen und der pH-Wert durch Zugabe einer 1 M Na₂CO₃-Lösung auf 8,2 bis 8,5 eingestellt. Nach Zentrifugation (4000 g, 10 min) wurde der Überstand verworfen und der Vorgang mehrfach wiederholt, bis ein Anschwellen des Sedimentes zu beobachten war. Das Sediment wurde danach unter Rühren mit kaltem Azeton versetzt, filtriert, einmal mit Azeton gewaschen, über Nacht getrocknet, einmal mit Chloroform extrahiert und wieder getrocknet. Das so erhaltene Azetonpuder konnte bei -20°C trocken gelagert werden.

10 g des Azetonpuders wurden in 200 ml G-Puffer für 30 min bei 0°C extrahiert und über mehrere Lagen Nylonfilter filtriert. Der Rückstand wurde nochmals auf die gleiche Weise extrahiert, die Filtrate wurden vereinigt und zentrifugiert (30.000 g, 30 min).

Für die Polymerisation wurden dem Überstand KCl (50 mM), MgCl₂ (2 mM) und ATP (1 mM) zugegeben und die Lösung bei 4°C für 2 h inkubiert. Die Polymerisation des Aktins war an der Zunahme der Viskosität der Lösung zu erkennen. Eine Erklärung der Konzentration auf 0,8 M diente zur Ablösung von Tropomyosin. Die Aktin-Filamente konnten dann durch Zentrifugation (150.000 g, 3 h) sedimentiert werden. Das F-Aktin-Sediment wurde in G-Puffer aufgenommen und zur Depolymerisation unter mehrfachem

Pufferwechsel gegen G-Puffer dialysiert. Zur Abtrennung kurzer Aktin-Oligomere und noch vorhandener Verunreinigungen wurde das Dialysat nach einer nochmaligen Zentrifugation (100.000 g, 3 h) und Verwerfen des unteren Drittels des Überstands über eine in G-Puffer äquilibrierte Sephacryl S300 (Pharmacia) Gelfiltrationssäule (2,5 x 45 cm) gereinigt. Das so erhaltene G-Aktin wurde bei 4°C gelagert. Aufgrund der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 290 nm konnte die G-Aktin Konzentration (mg/ml) durch das Verhältnis $OD_{290}/0,65$ berechnet werden. Der Extinktionskoeffizient von Aktin bei 290 nm beträgt 26.000 (Wegner, 1976).

<u>Extraktionspuffer</u>		<u>G-Puffer (pH 8,0)</u>	
0,5 M	KCl	2,0 mM	Tris/HCl
0,1 M	K ₂ HPO ₄	0,2 mM	CaCl ₂
		0,2 mM	ATP
		0,02%	NaN ₃
		0,5 mM	DTT

2.5.10.2 Reinigung von Aktin aus *D. discoideum*

Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4°C ausgeführt. Bis zum Laden auf den Anionenaustauscher wurde möglichst ohne Unterbrechung gearbeitet, um den proteolytischen Abbau gering zu halten. Eine 10 l Kultur von axenisch gewachsenen AX2-Zellen wurde bis zu einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml kultiviert, geerntet (200 g, 4°C) und 2 x in Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Das Zellpellet wurde gewogen und im zweifachen Volumen Homogenisationspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch rasche Dekompression in einer Parr-Bombe geöffnet (Schleicher *et al.*, 1984). Die Zellorganellen, besonders die Lysosomen, sollen bei dieser schonenden Homogenisation intakt bleiben. Das Zellhomogenat wurde bei 10.000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert und der Überstand wiederum 3 h mit 100.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand stellt die lösliche Zellfraktion dar.

Aktin wurde bei 37% (Sättigung) Ammoniumsulfat präzipitiert. Das Pellet der darauffolgenden Zentrifugation (JA14.1, 10.000 UpM, 20 min, 4°C) wurde in wenig G-Puffer aufgenommen, im Glashomogenisator homogenisiert und mehrfach gegen G-Puffer dialysiert (5 x 1 l). Das Dialysat wurde zentrifugiert (Ti 45, 35.000 UpM, 1 h, 4°C) und der Überstand mit KCl (50 mM), MgCl₂ (2 mM) und ATP (1 mM) versetzt. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 4°C inkubiert. Die in dieser Zeit polymerisierten Aktin-Filamente wurden abzentrifugiert (150.000 g, 3 h, 4°C), in wenig G-Puffer aufgenommen, homogenisiert und durch erneute Dialyse gegen G-Puffer (5 x 1 l) depolymerisiert. Nach einer Zentrifugation des Dialysats

(150.000 g, 3 h, 4°C) wurden die oberen 2/3 der Lösung gesammelt und zur Abtrennung kurzer Aktin-Oligomere auf eine Gelfiltrationssäule geladen (S-300, Vol.: 350 ml). Das so erhaltene G-Aktin wurde bei 4°C gelagert.

Homogenisationspuffer (pH 8,0)

30,0 mM	Tris/HCl
2,0 mM	DTT
4,0 mM	EGTA
2,0 mM	EDTA
30% (w/v)	Saccharose

vor Gebrauch zugeben:

5,0 mM	Benzamidin
0,5 mM	PMSF (aus 50 mM Stammlösung in 2-Propanol)

2.5.10.3 Pyren-Markierung von Aktin

Die Markierung von Aktin mit N-(1)pyrenyliodoacetamide (Pyren) erfolgte wie unter Kouyama und Mihashi (1981) beschrieben. Das gereinigte G-Aktin wurde dreimal gegen je 1 l P-Puffer dialysiert. Die Aktin-Polymerisation wurde durch die Zugabe von KCl (150 mM) und MgCl₂ (2 mM) eingeleitet und ein 3-5 facher molarer Überschuss von Pyren (in DMSO) wurde unter Rühren sofort zu der Aktin-Lösung hinzugegeben. Da Pyren lichtempfindlich ist, wurden alle folgenden Schritte bei leichter Abdunklung durchgeführt. Das Aktin-Pyren-Gemisch wurde über Nacht bei RT unter Schütteln inkubiert; anschließend wurden die Aktin-Filamente durch Zentrifugation (150.000 g, 3 h, 4°C) sedimentiert. Das F-Aktin-Pellet wurde in G-Puffer homogenisiert und dreimal gegen G-Puffer dialysiert, um die Depolymerisation des Aktins zu ermöglichen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (150.000 g, 3 h, 4°C) wurde Pyren-markiertes G-Aktin durch Gelfiltration aufgereinigt und bei -70°C gelagert.

P-Puffer (pH 7,6)

1 mM	NaHCO ₃
0,1 mM	CaCl ₂
0,2 mM	ATP

2.5.11 Induktion, Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen

2.5.11.1 Expression und Reinigung des rekombinanten Villidin-pFc3

Zur Immunisierung von Mäusen und Kaninchen wurde ein C-terminales 900 Bp EcoRI-Fragment des pFc3-Klons (siehe unter 2.3.12.2) in *E. coli* XL1 blue exprimiert (ATG-Expressionsvektor pIMS5 (Simon *et al.*, 1988). Zur Expression des rekombinanten pFc3 Proteins (263 As) wurde eine LB-Kultur (+ 50 µg/ml Ampicillin) bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 0,3 mM IPTG induziert und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen, sowie durch Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 0,1 mg/ml) lysiert, auf Eis homogenisiert und mit Ultraschall (5-6 x 20 sec) geöffnet, danach wurde abzentrifugiert (Ti 45, 35.000 UpM, 15 min, 4°C). Das rekombinante pFc3 befand sich im Pellet und konnte durch Extraktion mit 2 x 8 M Harnstoff in TEDABP in Lösung gebracht werden. Die beiden 8 M pFc3-haltigen Überstände wurden vereinigt und das Protein durch eine Anionenaustauschchromatographie über eine DEAE-Säule gereinigt. Hierfür wurde vorgequollene DE52-Zellulose (Whatman) wiederholt in TEDABP suspendiert, um die Zellulose auf die gewünschten Pufferbedingungen zu äquilibrieren. Die Suspension wurde in eine Säule geladen und bei maximalem Eigenfluß gepackt. Nach einmaliger Rezirkulation des pFc3-Überstandes konnte das Protein mit einem linearen Salzgradienten (0 bis 300 mM NaCl) eluiert werden, die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und anschließend gegen TEDABP dialysiert. Zu letzt wurde die Proteinlösung auf eine S300-Gelfiltrationssäule gegeben; das gereinigte Protein konnte zur Immunisierung verwendet werden.

Die Gewinnung polyklonaler Antikörper ist unter 2.5.16.1 beschrieben. Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurde im Labor von Prof. A.A. Noegel durchgeführt. Der monoklonale Antikörper 257-6-2 erwies sich als besonders gut und wurde in allen weiteren proteinchemischen Villidin-Untersuchungen verwendet.

2.5.11.2 Expression und Reinigung des rekombinanten Villidin-„headpiece“

Ein 300 Bp Fragment des vil20 Plasmides (siehe unter 2.3.12.2), welches der Villidin-„headpiece“-Domäne entspricht, wurde über eine EcoRI Schnittstelle in den IPTG induzierbaren, Ampicillin resistenten pIMS5 Expressionsvektor (Simon *et al.*, 1988) kloniert. Zur Überprüfung wurde das Insert sequenziert, um Fehler durch die PCR-Amplifikation auszuschließen. Das Konstrukt (hp) von Base 4932 bis 5245 erstreckt sich über das Stop-Codon (5113-15) hinaus. Das resultierende rekombinante Protein bestand aus

83 Aminosäureresten, die eigentliche „headpiece“-Domäne umfaßt allerdings nur 76 Aminosäuren. Die ersten vier der sieben zusätzlichen N-terminalen Reste stammen aus dem pIMS5 Vektor und die nächsten drei aus der Villidin-Sequenz. Die errechnete Molekülmasse betrug 10 kDa, das Protein ist einfach negativ geladen, der errechnete pI von 5,9.

Zur Expression wurde der *E. coli* Stamm XL1 blue benutzt. Eine 6 l Hauptkultur (+ 50 µg/ml Ampicillin) wurde 1:20 mit einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C (220 UpM) bis zu eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte nun durch Zugabe von 1 mM IPTG und weitere Inkubation für 3 bis 5 h. Danach wurden die Zellen geerntet (Beckman J6-HC, 4.000 UpM, 15 min, 4°C), einmal in Phosphat-Puffer gewaschen, in 20 ml TEDABP aufgenommen und durch mehrmaliges Einfrieren/Auftauen (Schockfrieren in flüssigem Stickstoff, Auftauen unter kaltem Wasser) geöffnet. Die Zellen wurden während des letzten Auftauschrittes mit Lysozym (Endkonzentration 0,1 mg/ml) versetzt, danach auf Eis homogenisiert, zusätzlich mit Ultraschall (5 x 20 sec) behandelt und sodann zentrifugiert (JA 14.1, 14.000 UpM, 15 min, 4°C). Das rekombinante Villidin-hp befand sich größtenteils im löslichen Überstand. Zur Kontrolle wurde das Sediment nach einem weiteren Waschschrift (1 x TEDABP) mit 8 M Harnstoff (in TEDABP) extrahiert.

Der lösliche Überstand wurde auf eine DEAE-Säule gegeben; durch Elution über einen Salzgradienten (0-400 mM NaCl) konnte das rekombinante Protein partiell gereinigt werden (Elution bei 50-100 mM NaCl). Die hp haltigen Fraktionen wurden vereinigt und mit 0-50% Ammoniumsulfat gefällt und abzentrifugiert (JA 20, 15.000 UpM, 15 min, 4°C). Das ankonzentrierte Proteinpellet wurde in 1 ml 10 x TEDABP (pH 8) gelöst und auf eine in IEDANBP (mit 10 mM Imidazol, pH 7,6; siehe 2.5.15.1) äquilibrierte Gelfiltrationssäule (S300; 2,5 x 110 cm, V=560 ml) geladen. Das gereinigte hp-Protein eluierte bei einem Volumen von 260-330 ml.

2.5.11.3 Expression von verschiedenen rekombinanten Villidin-Konstrukten

Für die Expressionsversuche der rekombinanten Villidin-Fragmente WD4, LinkerWDV und cVVD wurde der *E. coli* Stamm M15 (Qiagen), der neben dem transformierten Plasmid zusätzlich das pREP4-Plasmid enthält, verwendet. Dieses vermittelt Kanamycin-Resistenz und kodiert zusätzliche Kopien des lac Repressors, wodurch eine Expression des gewünschten Proteins vor IPTG-Induktion weitestgehend verhindert werden kann.

Die Fragmente wurden an der vil20 Plasmid-DNA als Matrize amplifiziert (2.3.12.2) und über SphI/HindIII in den pQE30 Vektor kloniert. Das 1,0 kB Fragment WD4 (Synonym: AC)

(Base 1 bis 1036) beinhaltet vier „WD-repeats“ und hat eine theoretische Molekülmasse von ca. 38,5 kDa. LinkerWDV (Synonym: DE) ist ein 1,2 kB großes Fragment und erstreckt sich von Base 1799 bis 3013. Es umfaßt den mittleren Bereich der Villidin-Sequenz einschließlich der PST-reichen Region. Die berechnete Molekülmasse betrug 49 kDa. Das ebenfalls 1,2 kB große Fragment cVVD (Synonym: FG) (Base 3876 bis 5113) beginnt in der Domäne IV und umfaßt das C-terminale Stück der Villin-Homologie einschließlich des „headpiece“. Das rekombinante cVVD-Protein (412 As) hatte eine Molekülmasse von 48 kDa.

Nachdem Übernachtskulturen in LB-Medium, das 50 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin enthielt, verdünnt (1:100) und bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von etwa 0.5 bei 37°C bzw. 30°C gewachsen waren, erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 0.1 mM bis 1 mM IPTG und weitere Inkubation für 1-15 h bei 37°C oder 30°C. Danach wurden die Zellen geerntet, in TEDABP-Puffer resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Die *E. coli* Zellen wurden aufgeschlossen, indem sie aufgetaut, nach Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 0.1 mg/ml) ca. 1 h auf Eis inkubiert, mit einem Dounce-Homogenisator behandelt und durch Ultraschall lysiert (5 x 20 sec) wurden. Das Zellhomogenat wurde 20 min bei 12.500 UpM (JA 14.1) zentrifugiert. Das Sediment wurde in einem in TEDABP-Puffer suspendiert und unlösliches Material für 20 min bei 12500 UpM (JA 14.1) sedimentiert. Diese Prozedur wurde jeweils zweimal mit TEDABP-Puffer wiederholt, der 2 und 7 M Harnstoff enthielt. Zu analytischen Zwecken wurde das verbliebene Sediment in 1 % SDS resuspendiert. Aliquots der Überstände wurden mittels SDS-PAGE, Coomassie Blau- und Silberfärbung, sowie im Immunoblot untersucht. Für den Nachweis der rekombinanten Proteine wurde ein „His-tag“-Antikörper verwendet.

2.5.11.4 Induktion und Reinigung von rekombinantem Profilin III

Für Funktionsanalysen und Immunisierung von Mäusen wurde die Profilin III-Sequenz (PIII) rekombinant exprimiert (*E. coli* BL21). Die Sequenz wurde mit den Primern NP3nde-uni und PIII-rev anhand der Plasmid-DNA JC2c173c02.r1 als Matrize amplifiziert und über NdeI/XbaI Schnittstellen in den Ampicillin resistenten pT7-7 Expressionsvektor (Tabor, 1985) kloniert. Zur Überprüfung wurde das Insert sequenziert. Das resultierende 126 As lange rekombinante PIII-Protein war einfach negativ geladen, hatte eine berechnete Molekülmasse von 10,56 kDa und einen errechnete isoelektrischen Punkt von 5,8.

Eine 10 l Hauptkultur (LB-Medium + Ampicillin 50µg/ml) wurde 1:20 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 30°C (220 UpM) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG und weitere

Inkubation für 6 h bei 30°C. Danach wurden die Zellen geerntet (4.000 UpM, 15 min, 4°C), einmal mit sterilem, kaltem Wasser gewaschen und in 50 ml TEDABP (einschließlich Proteaseinhibitorcocktail) aufgenommen. Durch dreimaliges Einfrieren/Auftauen (Schockfrieren in flüssigem Stickstoff, dann -20°C, Auftauen unter kaltem Wasser), anschließende Zugabe von 0,1 mg/ml Lysozym (Endkonzentration) wie Homogenisation auf Eis und Ultraschallbehandlung (3 x 20 sec) wurden die Zellen aufgeschlossen. Danach wurde abzentrifugiert (Ti 45, 40.000 UpM, 30 min, 4°C). Das rekombinante Profilin III befand sich in „inclusion bodies“, daher wurde das Sediment nach zwei weiteren Waschstufen (1 x mit TEDABP-Puffer, 1 x mit 2 M Harnstoff in TEDABP) mit 5 M Harnstoff in Lösung gebracht (2 Extraktionsschritte). Der Überstand der 5 M Harnstoff-Extraktion wurde mehrfach gegen TEDABP dialysiert und auf eine in TEDABP äquilibrierte poly-(L)-Prolin Säule geladen (etwa 40 ml Säulenmaterial, Ø 3,5 cm). Zur Herstellung der Säule wurde zunächst poly-(L)-Prolin nach Vorschrift an CNBr-aktivierte Sepharose (Pharmacia) gebunden, in TEDABP aufgenommen und dann die Säule gegossen. Nachdem die Proteinlösung einmal vollständig über die Säule gelaufen war, anschließend weiterhin über Nacht über das Säulenmaterial zirkulieren konnte, wurde die Säule mit TEDABP gewaschen (4-6 Säulenvolumina). Die Elution erfolgte in zwei Schritten (je etwa 3-4 Säulenvolumina) von 2 M und 7 M Harnstoff. Profilin III eluierte mit 7 M Harnstoff. Die vereinigten Eluate wurden schrittweise gegen TEDABP dialysiert. Die Ausbeute lag bei etwa 10 mg gereinigtem rekombinanten Profilin III aus einer 10 l Bakterienkultur.

2.5.12 Nachweis der Aktin-Bindung

2.5.12.1 Kosedimentation mit F-Aktin

Für die Kosedimentationsversuche des rekombinanten Villidin-„headpiece“-Konstruktes (VD-hp) wurde Aktin aus Kaninchenmuskel und aus *D. discoideum* verwendet. Der Ansatz aus G-Aktin, Polymerisationspuffer und Proteinprobe wurde 20-40 min bei RT inkubiert und dann bei 110.000 g (Optima Ultrazentrifuge, TLA 100.3, 50.000 UpM, 30 min, 4°C) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Sediment in 100 µl Wasser resuspendiert und durch SDS-Gelelektrophorese analysiert.

Da der Polymerisationspuffer mit und ohne Ca²⁺ eingesetzt werden kann, ist es möglich die Ca²⁺-Abhängigkeit eines Aktin bindenden Proteins zu ermitteln.

<u>10 x Polymerisationspuffer (pH 7,2)</u>		<u>Ansatz</u>	
100,0 mM	Imidazol	5 μ M	G-Aktin
20,0 mM	MgCl ₂	50 μ l	Probe (10-20 μ M VD-hp)
2,0 mM	CaCl ₂ <u>oder</u> 10 mM EGTA	10 μ l	Polymerisationspuffer mit Wasser auf 100 μ l aufgefüllt

2.5.12.2 Nachweis der Aktin-Bindung durch Fluoreszenzspektroskopie

Zum Nachweis der Aktin-Bindung des rekombinanten Profilins III wurde die Polymerisation von Kaninchen Aktin und in Gegenwart von Pyren-markiertem Aktin induziert. Die Polymerisation kann mit dieser Methode verfolgt werden, da bei der Polymerisation von G- zu F-Aktin die Fluoreszenzemission des Pyrens etwa 20 fach erhöht wird (Kouyama und Mihashi, 1981; Lee *et al.*, 1988). Grund hierfür ist eine Konformationsänderung infolge des Einbaus von Pyren-markiertem Aktin. Die für das Experiment bestimmten Proteine wurden gegen G-Puffer (2.5.10) dialysiert. Das in G-Puffer dialysierte Aktin wurde bei 50.000 UpM (Optima TL Ultrazentrifuge) bei 4°C für 2 h abzentrifugiert, um die Aktin-Oligomere zu entfernen. Pyren-Aktin wurde für 15 min bei 4°C und 1400 UpM (Eppendorf-Tischzentrifuge) abzentrifugiert und dann auf Eis gelagert. Das für die Messung bestimmte, aufgereinigte Profilin III wurde kurz bei 14.000 UpM (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Es wurden in der Regel 0,3-0,6 μ M Pyren-Aktin, 2,7-2,4 μ M unmarkiertes Aktin und unterschiedliche Profilin-Mengen in Gegenwart von G-Puffer in einem Endvolumen von 800 μ l eingesetzt. Die Polymerisation wurde bei RT durch Zugabe des Polymerisationspuffers (2.5.12.1) induziert und die Fluoreszenz bei 386 nm (Emission) und 365 nm (Anregung) gemessen (Aminco Bowman Lumineszenz Spektrometer).

2.5.12.3 Einfluß von PIP₂ auf die Aktin-Polymerisation

Die Interaktion von rekombinatem Profilin III mit Aktin wurde in der Fluoreszenzspektroskopie unter anderem in Gegenwart von PIP₂ durch Verwendung von Pyren-markiertem G-Aktin untersucht. PI(4,5)P₂ (L- α -Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat, Natriumsalz aus Rinderhirn, Sigma) wurde in einer Konzentration zu 1 mg/ml in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung in Lösung gebracht, bis diese optisch klar erschien (Janmey und Stossel, 1989). Die Phospholipidlösung wurde innerhalb einer Woche verarbeitet oder konnte bei -70°C gelagert werden, mußte aber vor Gebrauch nochmals einer Ultraschallbehandlung unterzogen werden. Die Polymerisation von 3 μ M G-Aktin, welches im allgemeinen 10-20% Pyren-Aktin enthielt, wurde durch Zugabe

des Polymerisationspuffers (2.5.12.1) bei An- wie Abwesenheit unterschiedlicher Profilin III Konzentrationen eingeleitet. Alle Messungen wurden in einem Reaktionsvolumen von 800 μl , bei einer Anregung von 365 nm und einer Emission von 386 nm durchgeführt.

2.5.13 Kosedimentation von Profilin III mit poly-(L)-Prolin-Matrix

Die Kosedimentation von Profilinen beruht auf der Profilin-Bindung an poly-(L)-Prolin (Tanaka und Shibata, 1985). Zum Nachweis der poly-(L)-Prolin Bindung von Profilin III wurde das rekombinante Protein mit einer poly-(L)-Prolin-Matrix kosedimentiert. Hierzu wurde poly-(L)-Prolin nach Vorschrift an CNBr-aktivierte Sepharose (Pharmacia) gebunden und im Verhältnis 1:5 (v/v) in PBS aufgenommen. Zunächst wurden 200 μl der poly-(L)-Prolin-Suspension mehrfach mit TEDABP (pH 8) bzw. IEDANBP (mit 10 mM Imidazol, pH 7,6; siehe 2.5.15.1) gewaschen. Nach Abnehmen des Waschüberstandes wurden 500 μl der zu analysierenden Probe mit den poly-(L)-Prolin-„beads“ unter ständigem Rotieren inkubiert (4 h bis über Nacht, 4°C). Der Ansatz wurde zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 12.000 UpM, 10 min, 4°C), das Sediment einmal mit TEDABP-Puffer gewaschen, in 50 μl SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch SDS-PAGE analysiert.

2.5.14 Kosedimentation mit Phospholipiden (nach Touhara *et al.*, 1995)

Gereinigtes Profilin III wurde mit IEDAN-Puffer (pH 7,6) oder auch TEDABP (pH 8) und Phospholipid-Lösung für 30 min auf Eis inkubiert, wobei das Gesamtvolumen 150 μl betrug. Anschließend wurde der Ansatz bei 100.000 g zentrifugiert (Optima Ultrazentrifuge, TLA 100.3, 50.000 UpM, 20 min, 4°C), und die oberen 50 μl des Überstandes als Aliquot abgenommen. Der restliche Überstand wurde verworfen und das Sediment einmal mit 150 μl IEDAN bzw. TEDABP gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (TLA 100.3, 50.000 UpM, 10 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 75 μl 1 x SDS resuspendiert. Überstand und Sediment wurden durch Gelelektrophorese analysiert. Die Versuche wurden in An- und Abwesenheit von 1 mM CaCl_2 parallel durchgeführt, da nach Flanagan *et al.* (1997) PIP_2 nur in Gegenwart divalenter Kationen effizient sedimentiert werden kann.

2.5.15 Chromatographische Methoden

2.5.15.1 Analytische Gelfiltration

Aufgereinigtes rekombinantes Profilin III, dialysiert gegen IEDANBP (mit 50 mM Imidazol) wurde 1:1 (v/v) mit IEDANBP (mit 50 mM Imidazol) oder mit Phospholipidlösung versetzt (Gesamtvolumen 100 µl) und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde kurz zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 6000 UpM, 10 min, 4°C) um eventuell vorhandene Aggregate zu entfernen. 90 µl des Überstandes wurden umgehend auf eine Superose 6 PC 3.2/30-Säule (Pharmacia Smart System) geladen. Die Säule wurde zuvor bei 4°C in IEDANBP (mit 50 mM Imidazol) äquilibriert. Die Flußrate betrug 40 µl/min, die Fraktionsgröße lag bei 60 µl. Proteinhaltige Fraktionen wurden durch SDS-PAGE, gefolgt von Coomassie Blau Färbung analysiert. Alle Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt und zusätzlich in Anwesenheit von 2 mM CaCl₂ parallel durchgeführt. Die Elution der Markerproteine wurde über die Absorption bei 280 nm bestimmt und für die Erstellung einer halblogarithmischen Eichkurve verwendet. Die Datenauswertung wurde mit der Smart Manager Software für OS/2 durchgeführt und mittels Sigma Plot 2.01 graphisch dargestellt.

IEDANBP (pH 7,6)

10 od. 50 mM Imidazol

1,0 mM EGTA

1,0 mM DTT

0,02% NaN₃

200 mM NaCl

vor Gebrauch zugeben

1,0 mM Benzamidin

0,5 mM PMSF

Entgasen durch Sterilfiltration

Standards:

Ferritin (450 kDa)

Katalase (240 kDa)

Aldolase (158 kDa)

BSA (68 kDa)

Ovalbumin (45 kDa)

Chymotrypsinogen (25 kDa)

Cytochrom c (12,5 kDa)

ATP (0,65 kDa)

2.5.15.2 Gelfiltrationschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Da Villidin sehr Protease-sensitiv ist und es deshalb unter typischen nativen Bedingungen, einschließlich verschiedener Proteaseinhibitoren nicht möglich war, die Denaturierung des Gesamtproteins zu vermeiden, wurden ferner Gelfiltrationsversuche unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (SDS-Säule). Ziel war es, die Proteine zwar linearisiert nach Größe zu trennen, aber gleichzeitig Proteaseaktivität zu verhindern. Eine S300-Säule (1 cm im Durchmesser, 80 cm hoch, 120 ml Volumen) wurde in 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer bei RT 1-2 Tage äquilibriert. Da die Konzentration von 0,1% SDS unter Umständen nicht ausreicht

um die Cystinbrücken zu öffnen, wurde der 1 x SDS-Puffer zusätzlich mit 0,3 mM DTT versetzt. Für 6 h entwickelte AX2-Wildtypzellen (etwa 1 g Nassgewicht) wurden mit 300 µl 10 x SDS-PAGE-Laufpuffer und 150 µl 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer/DTT resuspendiert bis die Lösung klar wurde. Danach wurde die Suspension entweder für 5 min gekocht oder sofort für 10 min bei 10.000 UpM (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert auf die Säule geladen. Die Eluate wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Immunoblots analysiert.

2.5.15.3 Affinitätschromatographie zum Nachweis von Bindungspartnern

Die Chromatographie ist eine universelle Methode zur Trennung von Proteinen. Neben der Gelfiltrations- und Ionenaustausch-Chromatographie, die oftmals der Aufreinigung von Proteinen dienen, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Affinitätschromatographie angewendet, mit dem Zweck Antikörper zu reinigen oder Bindungspartner für Villidin und Profilin III zu finden. Hierfür wurde rekombinantes Villidin-hp bzw. Profilin III an eine HiTrap Affinitätssäule nach Vorschrift gekoppelt (Pharmacia). Die Säule war mit 1 ml „NHS-activated Sepharose High Performance“ gepackt. Diese Gelmatrix ermöglicht die kovalente Kopplung eines Liganden, der primäre Aminogruppen enthält. Grundlage des Gels sind stark vernetzte Agarose Kügelchen, die durch Epichlorohydrin an die Matrix gebunden sind und durch N-Hydroxysuccinimid aktiviert werden. Alle Arbeitsschritte wurden stets bei 4°C durchgeführt. Zunächst wurde ein Tropfen eiskaltes 1 mM HCl auf die Säule gegeben, um Luftblasen zu vermeiden. Etwa 1-2 mg/ml Villidin-hp bzw. Profilin III wurden in Kopplungspuffer gelöst und 1 ml auf die Säule geladen (maximale Kopplung bei pH 8). Nach vier stündiger Inkubation (4°C) wurde die Säule nach Vorschrift mit Puffer A und B gewaschen und deaktiviert. Vor und nach Kopplung wurde die OD₂₈₀ gemessen, um die Kopplungseffizienz zu bestimmen (50-80%). Die Säule wurde mit 1% BSA in Startpuffer abgesättigt und mit je 3 ml Start-, dann Elutions- und erneut Startpuffer äquilibriert. Untersucht wurde 100.000 g Überstand von vegetativen als auch entwickelten (6-9 h) AX2-Zellen (etwa 1-3 x 10⁹ Zellen). Nach Rezirkulation über Nacht wurde die Säule mit 3-5 Volumina Startpuffer gewaschen und anschließend schrittweise mit 100 mM bis 1000 mM NaCl in Startpuffer eluiert. Die Säule wurde gewaschen, in Aufbewahrungslösung gelagert und konnte mehrfach verwendet werden.

Kopplungspuffer (pH 8,3)

0,2 M NaHCO₃

0,5 M NaCl

Puffer A (pH 8,3)

0,5 M Ethanolamin

0,5 M NaCl

Puffer B (pH 4)

0,1 M Azetat

0,5 M NaCl

<u>Aufbewahrungslösung (pH 7)</u>	<u>Startpuffer</u>
0,05 M Na ₂ HPO ₄	als sogenannter Startpuffer diente der unter 2.5.10.2
0,1% NaN ₃	beschriebene Homogenisationspuffer (pH 8,0)

2.5.16 Immunologische Methoden

2.5.16.1 Herstellung von polyklonalem Antiserum aus Kaninchen

Die Herstellung polyklonaler Antiseren wurde von der Firma Eurogentec (Ougrée, Belgien) vorgenommen. Hierfür wurde das entsprechende rekombinante Protein-Fragment (Villidin: pFc3-Konstrukt) in lyophilisierter Form nach Belgien geschickt. Zwei Kaninchen (SA6335 und SA6336) wurde Präimmenserum abgenommen und anschließend die Antigen-Lösung injiziert (jeweils etwa 50 µg pFc3-Konstrukt), gefolgt von weiteren „boost“-Injektionen nach 14, 28, 56 und 80 Tagen. Ab der 2. „boost“-Injektion wurde den Tieren jeweils 10 Tage nach der Injektion eine geringe Menge Blut (anfangs 2 ml, dann 20 ml) entnommen und das Serum in gefrorener Form verschickt. Das Serum wurde jeweils auf seine Reaktivität gegenüber dem rekombinanten pFc3-Villidin-Konstrukts und *D. discoideum* Zellhomogenat getestet. Nach 104 Tagen wurden die Kaninchen ausgeblutet (50 ml).

2.5.16.2 Aufreinigung von IgG über Affinitätschromatographie

20 ml des monoklonalen Hybridomaüberstandes 257-6-2 (Villidin mAk, siehe unter 2.5.11.1) wurden auf eine mit 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 8,0) äquilibrierte ProteinA-Sepharose Säule gegeben (1 ml HiTrap, Pharmacia) und für 12 h bei 4°C rezirkuliert. Die Säule wurde dann mit Natriumphosphat-Puffer gewaschen, bis das Eluat eine OD₂₈₀ < 0,01 aufwies. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mit 0,1 M Essigsäure + 0,15 M NaCl. Die Fraktionen, die Antikörper enthielten, wurden mit 1 M Tris neutralisiert und gegen PBS dialysiert. Nach einem Waschschrift mit 0,5 M Essigsäure + 0,15 M NaCl und erneuter Äquilibrierung mit Natriumphosphat-Puffer konnte die Säule zu einer neuerlichen Aufreinigung des gleichen Antikörpers verwendet werden.

2.5.16.3 Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern

Zur Affinitätsreinigung des polyklonalen Villidin-Antiserums SA6336 wurde rekombinantes pFc3 nach Vorschrift an eine HiTrap Säule (Pharmacia) gekoppelt. Das polyklonale Antiserum wurde 3:2 in PBS (= Startpuffer) verdünnt, auf die Säule geladen und fünfmal rezirkuliert. Anschließend wurde die Säule mit 3 x 1 ml PBS und 2 x 1 ml 1/10 PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 mM Essigsäure und 150 mM NaCl (pH 2), in den einzelnen Fraktionen (0,5 ml) wurden je 100 µl 1 M Tris pH 8 vorgelegt, um die Eluate zu neutralisieren. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert.

2.5.16.4 Immunpräzipitation

Zellhomogenate wurden mit 10 µg gereinigtem Antikörper (polyklonal und monoklonal) 4 h bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde 50 µl gequollene ProteinA-Sepharose (CL-4B, Pharmacia) zugegeben und für weitere 4 h oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 13.000 UpM, 15 min, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Die ProteinA-Sepharose wurde mit PBS gewaschen, mit 3 x SDS-Probenpuffer aufgekocht und das Eluat mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die intrazelluläre Verteilung des Villidin-Proteins wurde unter anderem mittels indirekter Immunfluoreszenz näher untersucht, bei der die Zellen fixiert, mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern markiert und die Verteilung des ersten Antikörpers mit einem fluoreszierenden zweiten Ziege-anti-Maus IgG oder Ziege-anti-Hase IgG Antikörper sichtbar gemacht wurden. Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden die Deckgläschen zunächst mit 0,1 M Salzsäure gereinigt. *D. discoideum* Zellen wurden bis zu einer Dichte von 3-4 x 10⁶ Zellen/ml kultiviert, dann mit kaltem Soerensen geerntet, 2 x gewaschen, 5 x 10⁵ Zellen auf ein Deckgläschen ausgebracht und den Zellen für 15 min erlaubt, abzusetzen. Anschließend wurden die überschüssige Lösung abgesaugt und die vegetativen Zellen mit der Methode der Wahl sofort fixiert (t0). Villidin ist ein entwicklungsreguliertes Protein, dessen Expression bis zu 12-15 h zunimmt. Um eine Optimierung des Immunfluoreszenzsignal zu erreichen, wurden die Zellen für weitere 4-8 h bei RT (21°C) auf dem Deckgläschen inkubiert.

„Agar overlay“

Um eine Situation zu simulieren, der die Zellen unterliegen, wenn sie sich im Zellverband in natürlicher Umgebung befinden, wurde ein sogenannter „agar overlay“ durchgeführt. Nachdem die Zellen sich abgesetzt hatten, wurde der überschüssige Puffer behutsam abgenommen und das Agarosestück mit einer Rasierklinge aus der Voratslösung (Phosphatpuffer) aufgenommen und auf die Zellen plaziert. Mit einem Streifen Whatman-Papier wurde der restliche Puffer von der Peripherie und der Oberfläche der Agarscheibe abgesaugt. Dieser Arbeitsschritt erfolgte unter einem Phasenkontrastmikroskop mit 20 facher Vergrößerung, um nur soviel Puffer abzusaugen bis die Zellen durch den mechanischen Druck des Agarstücks abflachen. In einer feuchten Kammer war es möglich die Zellen über mehrere Stunden entwickeln zu lassen. Danach wurde nochmals eventuell vorhandener Puffer abgesaugt, um zu vermeiden, daß während der anschließenden Methanol-Fixierung der Agarblock abfällt. Die Methanol-Fixierung erfolgt wie unten beschrieben, allerdings bei -10°C bis -15°C und beim letzten Waschschrift mit PBS wurde das Agarstück vorsichtig mit einer Pinzette entfernt.

Für die Agarosescheiben wurde unter Erwärmen eine 2% (w/v) Agaroselösung („immunological grade“) in 15 mM sterilen Phosphatpuffer hergestellt. Zwei Deckgläser (0,15 mm dick) wurden auf die Kanten eines Objektträger gelegt und dazwischen einige Tropfen der Agaroselösung pipettiert. Rasch wurde auf die Agarose ein weiterer Objektträger plaziert, leicht angedrückt und die Agarose konnte auspolymerisieren. Danach wurde ein Objektträgerglas entfernt und die Agarose mit einer Rasierklinge in ca. 10 x 10 mm Rechtecke geschnitten. Diese Agarosescheiben konnten einige Tage in Phosphatpuffer in einer flachen Petrischale gelagert werden.

(a) Methanol-Fixierung

Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Deckgläschen für 10 min in -20°C kaltes Methanol gegeben, um die Zellen zu fixieren. Im Falle eines „agar overlay“ wurden nur mit -15°C kaltem Methanol fixiert, um zu vermeiden daß die Agarblöcke festfrieren und brechen. Die Deckgläser wurden kurz an Luft getrocknet und mit den Zellen nach oben auf einen Parafilm gelegt. Anschließend wurde 1-2 h mit PBG abgesättigt.

(b) Glutaraldehydfixierung nach Symons und Mitchison

SM-Puffer (s.u.) wurde bei F-Aktin-Markierungen mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin anstelle der Methanol-Fixierung verwendet. Dazu wurden runde Deckgläschen (12 mm Durchmesser) verwendet, die mit den Zellen nach oben in die Vertiefungen von 24er

Zellkulturplatten gelegt wurden, und die Fixierungs-, Wasch- und Inkubationslösungen wurden in die Vertiefungen pipettiert. Fixiert wurde für 10 min. Durch diese schonende Vorgehensweise wurde ein Ablösen der fixierten Zellen vom Deckgläschen vermieden.

Die Absättigung erfolgte für 10 Minuten mit einer frisch angesetzten Borhydrid-Lösung (1 mg/ml in TBS-Puffer), die freie Aldehydgruppen reduziert. Die Waschschriffe erfolgten mit TBS-TX-Puffer und nach Inkubation mit dem 2. Antikörper mit TBS-Puffer.

(c) Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-Fixierung

Als Alternative zur SM-Fixierung wurde bei Phalloidin-färbungen des Aktin-Zytoskeletts auch mit einem Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-Gemisch in H-Phem-Puffer fixiert. Paraformaldehyd wurde als 4% Stammlösung angesetzt und unter Erwärmen bis 50°C und Zugabe eines Tropfen NaOH gelöst. Die Fixierung erfolgte für 2 min bei RT und anschließend wurde mit Fixans ohne Glutaraldehyd und NP-40 bzw. mit frischer Borhydrid-Lösung (1 mg/ml in TBS-TX-Puffer) abgesättigt.

Inkubation mit Antikörpern

Nachdem die Zellen fixiert und abgesättigt waren, wurde über Nacht mit Verdünnungen des ersten Antikörpers in PBG inkubiert. Nach Entfernen des ersten Antikörpers wurden die Präparate 5 x 10 min mit PBG gewaschen und mit dem zweiten, fluoreszierenden Antikörper in PBG für 1 h überschichtet. Zum Einsatz kamen FITC- oder Cy3-gekoppeltes Ziege-anti-Maus IgG bzw. Ziege-anti-Hase IgG (1:100 - 1:2000 verdünnt). Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol, Sigma) in einer 1:1000 Verdünnung (0,25 µg/ml Endkonzentration) zugegeben. Für die Markierung des Aktin-Zytoskeletts wurde neben dem Act1-mAk auch TRITC-Phalloidin oder Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (Molecular Probes) verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und kurzem Abspülen mit H₂O wurden die Präparate in Gelvatol eingebettet und zum Aushärten über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

SM-Puffer

(Symons und Mitchison, 1991)

10 mM	MES (pH 6,1)
138 mM	KCl
3 mM	MgCl ₂
2 mM	EGTA

vor Gebrauch zugeben:

0,5%	Triton X-100 („surfact amps“, Pierce)
0,5%	Glutaraldehyd („electron microscopy grade“)

H-PHEM-Puffer (pH 7)

15,0 mM	PIPES
6,25 mM	HEPES
10,0 mM	EGTA
0,5 mM	MgCl ₂

Paraformaldehyd/Glutaraldehyd

2%	Paraformaldehyd
0,05%	Glutaraldehyd
0,02%	NP-40 (10% Stammlösung)
in H-PHEM-Puffer	

10 x PBS (für Immunfluoreszenz, pH 7,4)

1,37 M	NaCl
27,0 mM	KCl
81,0 mM	NaH ₂ PO ₄
15,0 mM	KH ₂ PO ₄
in Wasser, autoklavieren	

PBG

0,5%	BSA
0,05%	Fischgelatine
(0,1%	NaN ₃)
in 1 x PBS, sterilfiltriert	

TBS (pH 7,4)

0,15 M	NaCl
0,02 M	Tris/HCl

TBS-TX

TBS-Puffer	
+ 0,1% Triton C-100 („surfact amps“)	

Gelvatol

20,0 g	Gelvatol 20-30 (Polyvinylalkohol, MW 10.000) in PBS 16 h rühren
40,0 ml	Glycerin zugeben, nochmals 16 h rühren zentrifugieren (12.000 g, 15 min, RT), Überstand abnehmen
25,0 ng/ml	DABCO (Diazabicyclo (2,2,2) oktan) zum Überstand geben und aliquotiert in Spritzen bei -20°C lagern

2.6.2 Nachweis von Pinozytose und Phagozytose

Zur Analyse von Pinozytose und Phagozytose wurden 5×10^5 AX2-Zellen bzw. Villidin-GFP exprimierende Zellen auf Deckgläschen ausgebracht und den Zellen erlaubt abzusitzen.

Für den Nachweis der Pinozytose wurde das Medium abgenommen und gegen eine TRITC-Dextran-Lösung (1 mg/ml TRITC-Dextran in HL5) ausgetauscht (Hacker *et al.*, 1997). Nach 2 und 6 min wurde die überschüssige Lösung abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem Methanol (-20°C) fixiert. Im Rahmen einer alternativen Methode verzichtete man auf die TRITC-Dextran-Inkubation und fixierte die Zellen sofort nachdem sie 20 min absitzen konnten. Da Aktin um Pinosomen akkumuliert konnten diese Strukturen durch den monoklonalen Antikörper Act1 (Simpson *et al.*, 1984) sichtbar gemacht werden.

Zur Untersuchung der Phagozytose wurden die Zellen geerntet, 2-3 x in Soerensen gewaschen und für 15 min in Phosphatpuffer inkubiert. Danach wurden 300 µl Zellen bei einer Dichte

von 2×10^6 Zellen/ml auf Deckgläschen ausgebracht, durften für 15 min absitzen und wurden anschließend für 15 min mit unmarkierter Hefe (Bäckerhefe ca. 5×10^9 Zellen/ml Soerensen) inkubiert. Fixiert wurden die Zellen mit Pikriksäure/Paraformaldehyd (Jungbluth *et al.*, 1994). F-Aktin konnte in den fixierten Präparaten mit Rhodamin-Phalloidin nachgewiesen werden.

2.6.3 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Mikroskopie wurde an Standard-Immunfluoreszenzpräparaten mit einem invers angeordneten Mikroskop (Leica TCS-SP Mikroskop), das mit einem Argon-Laser sowie mit einem 63X Pl Fluotar 1.32 Ölimmersionsobjektiv ausgerüstet war, durchgeführt. Folgende Laserwellenlängen wurden verwendet: 488 nm (FITC) und 515 nm (Cy3). Zur Untersuchung der Präparate mit Doppelfärbung wurden beide Farbstoffe separat gemessen und anschließend zusammengesetzt. Dadurch sollte „cross-talk“ zwischen den Signalen vermieden werden, der sich bei gleichzeitiger Messung beider Wellenlängen störend auswirkt. Die Rohdaten wurden auf ein Leica TCS NT Bildverarbeitungssystem übertragen und auf einem Power Macintosh 8500/180 mit den Programmen NIH Image und Adobe Photoshop weiterverarbeitet.

2.6.4 Analyse der Migrationsphase (Phototaxis-Versuch)

Das Villidin-Gen wurde durch ein „gen replacement“ Konstrukt ausgeschaltet und so die Expression der entsprechenden mRNA und des Villidin-Proteins in *D. discoideum* verhindert (A.A. Noegel). Zur Analyse der Migrationsphase dieser Villidin-minus-Mutante wurden 5×10^5 Amöben im Zentrum einer Wasseragarplatte auf eine $0,5 \text{ cm}^2$ große Fläche ausgebracht. Die Agarplatte wurde mit Alufolie abgedunkelt und ein Spalt für Lichteinfall freigelassen, so daß die sich bildenden Pseudoplasmodien („slugs“) in Richtung Licht wandern konnten (Fisher *et al.*, 1983). Die „slugs“ und entstandenen Schleimspuren wurden auf Nitrozellulosefilter übertragen (BA85, Schleicher und Schuell) und mit Coomassie Blau gefärbt. Für diesen Versuch wurden drei unabhängig isolierte Mutanten-Zelllinien verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Sequenzanalyse von Villidin

Die vollständige cDNA-Sequenz des vil20-Klons (siehe unter 2.3.12.2) hat eine Länge von 5115 Bp und kodiert für ein Protein mit 1704 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 190.342 mit einem theoretischen pI von 6,9 entspricht (Peptidesort-Programm; UWGCG). Dem Startkodon 60 Bp nach Beginn der sequenzierten Region geht ein Stopkodon 6 Bp stromaufwärts von ATG und ein A-reicher Sequenzabschnitt voraus. Mit dem ATG beginnt ein offener Leserahmen, welcher mit dem TAA Stopkodon endet. Introns konnten in der Villidin-Sequenz nicht identifiziert werden (Analyseprogramm bereitgestellt durch *Dictyostelium* Genom Projekt; <http://www.uni-koeln.de/dictyostelium/>). Die Basenzusammensetzung der Villidin cDNA (Datenbank-Zugriffsnummer: AJ427856) ist typisch für kodierende Bereiche im *Dictyostelium* Genom.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese sollte eine konkrete Aussage über den isoelektrischen Punkt von Villidin geben und eventuell existierende, modifizierte Varianten des Proteins identifizieren. Als erste Dimension wurde das 2D-Elektrophorese-System mit DryStrips (immobilisierte pH-Gradientengele, Pharmacia) verwendet. Nach Abschluß der zweiten Dimension wurden die Proben neben Commassie-Blau und Silberfärbung auch im Immunoblot untersucht. Zur Analyse diente die Auftrennung von Zytosol aus *D. discoideum* (100.000 g Überstand). Einzelne Proteine waren als „Spots“ zu erkennen. Im Immunoblot konnte für Villidin kein entsprechender Punkt zugeordnet werden. Grund hierfür kann einerseits die Größe des Proteins (190 kDa) sein (Kapazitätsgrenze des 2D-Systems bei etwa 100 kDa; mündliche Mitteilung der Expertenabteilung von Pharmacia). Zum anderen zeichnet sich Villidin durch eine starke Proteolyse-Sensitivität aus, was zum Abbau des Proteins führt. Wie sich in Folgeversuchen zeigte, sinkt beispielsweise der Ertrag an der Villidin-Gesamtmenge im Verlauf successiver Extraktionen und häufig sind lediglich Abbauprodukte nachweisbar. Eine genaue quantitative Aussage war deshalb nicht möglich gewesen.

Durch den Verdau genomischer DNA aus AX2-Zellen mit verschiedenen Restriktionsenzymen konnte gezeigt werden, daß Villidin durch ein einzelnes Gen im Genom kodiert wird. Unter stringenten Bedingungen (50% Formamid) zeigte sich bei Enzymen, die keine Schnittstelle innerhalb des Villidin-Gens aufwiesen, nur eine Bande. Der

Restriktionsverdau von genomischer DNA aus Villidin-minus-Mutanten mit Bgl II bestätigte, daß das Villidin-Gen unter Verwendung eines Genaustausch-Vektors („gen-replacement-vector“) ausgeschaltet werden konnte. Die Hybridisierung mit einer radioaktiven 1,8 kB Sonde, welche die mutierte Region überspannte, resultierte in der Detektion zweier Hybridbanden der Größe 8,2 und 3,8 kB, wohingegen in der AX2-Kontrolle nur ein mehr als 12 kB großes Fragment zu sehen war. Das Auftreten der Doppelbande nach Verdau der mutierten DNA wird durch eine zusätzliche Bgl II-Restriktionsstelle bedingt, die durch den Einbau einer Blasticidin-Resistenz-Kassette (Genaustauschereignis) in die DNA eingeführt wurde (A.A. Noegel).

Die Untersuchung der Villidin-Gen-Expression zeigte ein auffallendes Entwicklungsregulationsmuster mit geringer Expression in der Wachstumsphase, Akkumulation der mRNA-Konzentration während der Entwicklung und Erreichen eines signifikanten Maximums im Stadium des migrationsfähigen Pseudoplasmodiums und der frühen Kulmination. Anschließend kommt es zum Absinken der mRNA-Menge noch vor Ausbildung der Vorstielzellen. Die Villidin-Proteinexpression (Nachweis im Immunoblot mit mAk 257-6-2) entspricht dieser Entwicklungsregulation. Das Protein war nur schwer in der Wachstumsphase nachzuweisen, jedoch nimmt die Konzentration während der Entwicklung stetig zu und erreicht ebenso wie die mRNA-Expression ein Maximum nach 12 bis 14 h. Erst nach ungefähr 18 h kam es wieder zu einer Abnahme der Villidin-Konzentration. „Northern-Blot“ Analyse von Gesamt-RNA, wie „Western-Blot“-Untersuchungen von Proteinextrakten aus Villidin-minus-Zellen bestätigten darüber hinaus, daß das Villidin-Gen abgeschaltet werden konnte.

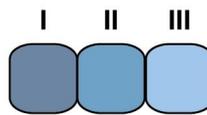
Das Protein zeichnet sich in der Sequenz-Zusammensetzung durch vier auffallende Elemente aus. Der 700 Aminosäuren lange C-terminale Abschnitt zeigt eine starke Homologie zu Villin (Säuger: 38% Ähnlichkeit und 26% Identität in der Sequenz). Die erste der sechs Villin-Domänen fehlt im Falle von Villidin, aber die typische „headpiece“-Domäne ist vorhanden. Aufgrund dieser Homologie erhielt das Protein den Namen Villidin. Die N-terminale Domäne mit 600 Aminosäuren ist neuartig für Proteine der Gelsolin/Villin-Familie und wurde infolge der vier bis acht „WD-repeat“-Motive der „WD-repeat“-Familie zugewiesen. Diese beiden markanten Elemente werden durch einen 400 Aminosäuren langen Sequenzabschnitt miteinander verbunden („linker“). Im ersten Viertel dieses Sequenzbereichs erstreckt sich ein Prolin/Serin-reiches Segment, das auch durch das Auftreten eines Polyglutamin und Polythreonin Bereichs gekennzeichnet ist. Im Anschluß daran folgt eine Region (701-1000 As), der keine bekannte Homologie zugeordnet werden konnte. Villidin läßt sich zum

einen aufgrund der Homologie zu Villin im C-terminalen Bereich eindeutig der Gelsolin-Familie zuordnen. Andererseits kann Villidin auch als Vertreter der „WD-repeat“-Familie angesehen werden, da sich der amino-terminale Abschnitt durch vier bis acht typische WD-Wiederholungen ausweist (siehe 3.1.3). Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Villidin-Gens mit den Datenbanken erfolgte mittels des BLASTP-Programmes (Altschul *et al.*, 1990) und ist die Grundlage der in Abbildung 3 schematisch dargestellten Gegenüberstellung. Darüber hinaus zeigte die Analyse eine homologe Proteinsequenz aus *Entamoeba histolytica* (Datenbank-Zugriffsnummer: AAD30430) auf. Allerdings sind bis dato keine näheren Daten erhältlich.

3.1.1 Die C-terminale Gelsolin/Villin-Homologie

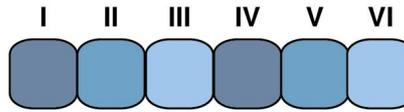
Die Aminosäure-Sequenzanalyse ergab, daß Villidin aus *Dictyostelium* am C-Terminus eine hohe Homologie zu Villin aus Vertebraten besitzt. Allerdings ist in der Villidin-Sequenz die erste Domäne der sechs Gelsolin/Villin-Domänen nicht zu finden. Das kennzeichnende kurze C-terminale Endstück („headpiece“; hp), das für die Aktin-bündelnde Fähigkeit von Villin sorgt, ist in Villidin eindeutig anzutreffen (Abb. 3). Es zeigt 54 % Ähnlichkeit und 40 % Identität zu den „headpiece“-Domänen von Villin und Protovillin (Abb. 5 A). Damit charakterisiert das „headpiece“-Segment Villidin als Villin- und nicht als Gelsolin-Homolog. Die typischen Sequenzmotive, die für die Bindung von F-Aktin in Gelsolin bzw. Villin verantwortlich sind, wurden auch in der zweiten Domäne und im headpiece (KKEK-Motiv) von Villidin gefunden. Ein direkter Vergleich der zweiten Domäne von Villidin (*D. discoideum*) mit der Severin-Domäne II aus *D. discoideum* (Eichinger und Schleicher, 1992), *Dictyostelium* Protovillin (Hofmann *et al.*, 1993) und dem menschlichen Gelsolin ist in Abb. 5 B dargestellt. Hervorgehoben ist das mögliche PIP₂-Interaktionsmotiv in Protovillin und Villidin. Zur Erstellung des Sequenzvergleiches wurde das Programm ClustalW des Programmpaketes BioEdit v4.7.8 verwendet. Die homologen Bereiche zwischen Villidin und Villin aus Säugern wurden auch durch das Programm DotPlot (UWGCG) identifiziert und graphisch dargestellt (nicht gezeigt). Der Vergleich mit Villin zeigt fünf der sechs „Gelsolin-repeats“ im C-terminalen Bereich des Villidin-Moleküles (As 1000-1704), einschließlich des kleinen hp-Teilstückes am Ende des Moleküls (Stringenz 11). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den charakteristischen Domänen der Gelsolin/Villin-Familie. Die DotPlot-Matrix sowie der direkte Vergleich mit Vertretern der Gelsolin/Villin-Familie stellen die Grundlage für die Klassifizierung von Villidin dieser Großgruppe dar (Abb. 3).

Severin/ Fragmin/ CapG

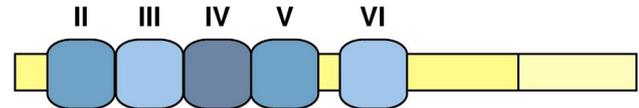


Gelsolin/Villin-Familie

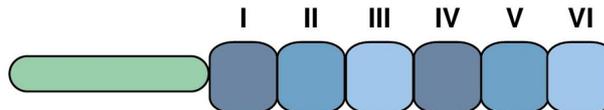
Gelsolin/ Adseverin



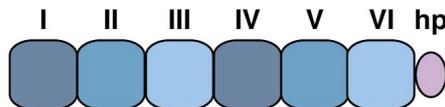
GRP125



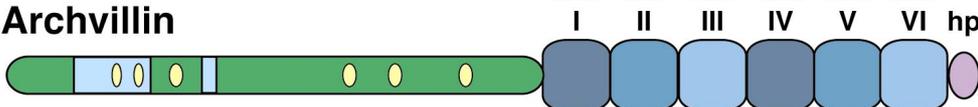
Flightless



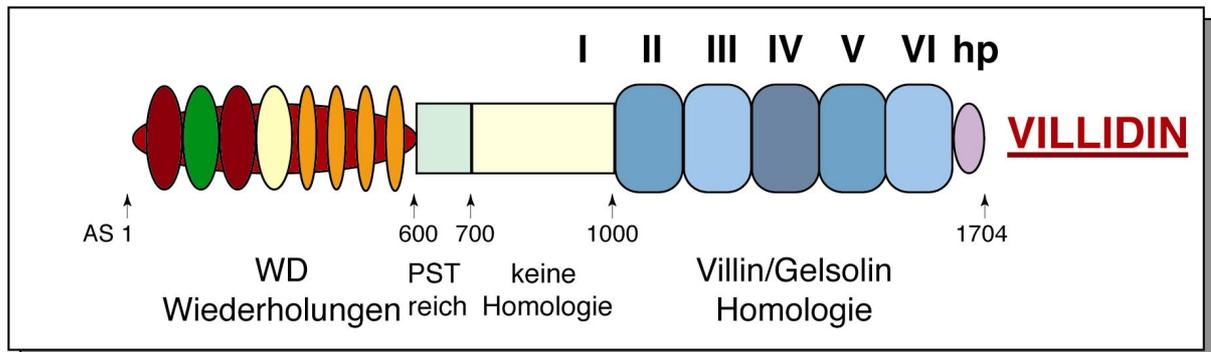
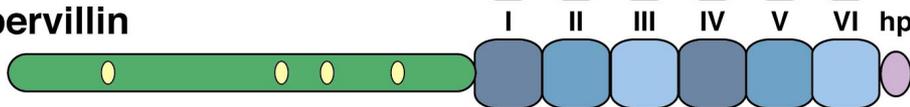
Villin/ Advillin/ Quail/ Protovillin



Archvillin

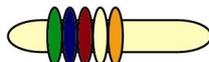


Supervillin



Coronin (Zytoskelett-Regulation)

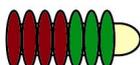
„WD-repeat“-Familie



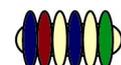
Gβ (Signaltransduktion)



RACK1 (Signaltransduktion)



SEC13 (Vesikel-Transport)



Groucho (Genregulation)

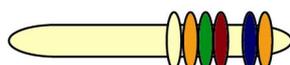


Abb. 3: Domänenstruktur des Villidin im Vergleich zum Domänenaufbau von Proteinen aus der Gelsolin/Villin-Familie und Mitgliedern aus der "WD-repeat"-Familie.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Villidin umfaßt 1704 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von etwa 190 kDa entspricht. Villidin kann aufgrund seiner markanten Domänenstruktur zwei großen Protein-Familien zugeordnet werden; der Gelsolin/Villin-Familie und der Großgruppe der „WD-repeat“-Proteine. Villin, Advillin, Quail, Protovillin, Supervillin und Archvillin zeigen die typische Domänenstruktur der Villin-Familie mit dem charakteristischen „headpiece“-Endstück. Dematin, AbLIM, UNC15 sowie Talin und TALB sind

weitere Proteine mit „headpiece“-Domänen (nicht gezeigt), die nicht den hier aufgeführten Protein-Familien angehören. Die zueinander homologen Domänen der Villin/Gelsolin-Vertreter und Villidin sind durchnummeriert (I-VI). In Villidin fehlt allerdings das Homolog der ersten Villin-Domäne. Das markante C-terminale Teilstück („headpiece“; hp), das für die bündelnde Aktivität von Villin verantwortlich ist, kann auch am C-Terminus des Villidin gefunden werden. Am N-Terminus befinden sich repetitive Elemente, die zu „WD-repeat“-Proteinen homolog sind. Die ovalen Symbole repräsentieren die einzelnen „WD-repeats“. Die unterschiedliche Farbgebung steht für die Übereinstimmung mit der „WD-repeat“-Konsensussequenz (nach Smith et al., 1999): (dunkelrot) ~0-3 Abweichungen; (dunkelblau) ~3-4 Abweichungen; (dunkelgrün) ~4-5 Abweichungen; (gelb) ~5-6 Abweichungen; (orange) > 6 Abweichungen. Bei den ersten vier „repeats“ in Villidin handelt es sich um eindeutige WD-Wiederholungselemente (breite Ovale), die folgenden „repeats“ weisen wesentlich weniger Übereinstimmungen zur Konsensussequenz auf. Dem „WD-repeat“-Bereich schließt sich eine Region an, die durch ein gehäuftes Auftreten der Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin (PST-reiche Region) ausgezeichnet ist. Etwa in der Mitte des Proteins gibt es einen Bereich, der weder in der Aminosäure-Zusammensetzung noch durch Homologie zu bekannten Proteinen auffällt. Dieser Abschnitt verbindet die N- und C-terminale Villidin-Domänen, die Villidin als Mitglied zweier unterschiedlicher Protein-Familien auszeichnen. Die rote Schriftfarbe indiziert Proteine aus dem *D. discoideum* Proteom. Gelsolin-Familie: Supervillin: N-terminale Domäne (grüner Balken) enthält Kernlokalisierungssignale (gelbe Kreise) (Wulfskuhle et al., 1999); Archvillin: Supervillin-Isoform mit zusätzlichen Insertionen am N-terminalen Ende (blaue Boxen) (Posterpräsentation ASCB 2000, Oh et al., Labor: E. Luna); Flightless: N-terminale Domäne (grüner Balken) enthält Leucin-reiche Wiederholungselemente (Campbell et al., 1993/2000); „WD-repeat“-Familie: gelbe Balken repräsentieren die „nicht-WD-repeat“-Sequenzabschnitte.

3.1.2 Die „headpiece“-Domäne von Villidin

Die „headpiece“-Domäne von Villidin ist dem entsprechenden Stück im Villin von Vertebraten deutlich homolog und zeigt im direktem Vergleich eine geringere Homologie zu dem „headpiece“ von Protovillin (Abb. 5 A). Die NMR-Struktur des Villin-„headpiece“-Konstruktes HP67 (Abb. 33 D a) gab Aufschluß auf den strukturellen Aufbau dieser Domäne (Vadar *et al.*, 1999). In HP67 fehlen die ersten neun As des proteolytisch definierten Villin „headpiece“ (*G. gallus*), doch die F-Aktin-Bindeaffinität erscheint identisch.

VD-hp	Y	T	Y	EE	L	LA	-----	LP	A	G	V	D	ST	K	L	D	T	Y
PV-hp	Y	P	L	SV	L	KQ	-----	LP	N	D	I	D	KS	C	L	H	L	Y
KonsNhp	F/Y	x	L/Y	xx	L	xx	-----	LP	x	G/D	V/I	D/N	xx	R/K	x	E/D	x	H/Y

Abb. 4: Vergleich der Konsensussequenz der N-terminalen Hälfte des Villin-„headpiece“ mit der entsprechenden Region der Villidin-Sequenz.

Die Konsensussequenz (untere Zeile) für die N-terminale Villin-„headpiece“-Untereinheit basiert auf einem strukturellen Vergleich mehreren hp-Domänen (Vadar et al., 1999) und beginnt mit der As 16 des HP67-Konstruktes. „x“ steht für jede beliebige As, die Symbole „-“ indizieren die Position eines variablen „loops“ (mit variabler Aminosäurezahl). Die entsprechende Villidin-Region beginnt mit der Aminosäure 20 in Abb. 5 A, die Protovillin-Region mit As 21. Boxen markieren die Übereinstimmung mit dem Konsensus, dunkle Boxen heben Aminosäuren hervor, die in allen drei Sequenzen gleich sind.

Die Aminosäuren des N-terminalen Villin-hp-Konsensus (As 16-42 der HP67-Sequenz) sind besonders wichtig für die F-Aktin-Bindung (Vadar *et al.*, 1999). Wenngleich die Villidin-„headpiece“-Sequenzen dieser Konsensussequenz entspricht (Abb. 4), fehlt das Histidin, welches im Villin-„headpiece“ die Faltung des N-Terminus in Abhängigkeit des pH-Wertes stabilisiert. Darüber hinaus war für das Villidin-„headpiece“ eine F-Aktin-Affinität nicht zu beobachten (Abb. 12).

3.1.3 Das N-terminale „WD-repeat“-Sequenzmotiv

Der zusätzliche N-terminale Sequenzabschnitt räumt Villidin wie auch Supervillin und seiner gewebespezifisch exprimierten Isoform Archvillin (Posterpräsentation ASCB 2000, Oh *et al.*) eine Sonderstellung in der Villin-Familie ein. Im Gegensatz zum N-Terminus von Supervillin, der sich durch Kernlokalisierungssignale auszeichnet, zeigt Villidin repetitive Sequenzmuster, die der „WD-repeat“-Familie zugeordnet werden. Dabei handelt es sich um eine große Proteinfamilie, die nicht im direktem Zusammenhang mit dem Aktin-Zytoskelett steht. „WD-repeats“ wurden in einer heterogenen Gruppe von Proteinen gefunden, die unterschiedlichste Funktionen in der Zelle übernehmen, sei es in der Signaltransduktion, der Transkription, der Zellteilung, im Rahmen des Zytoskelett-„assembling“ oder des Vesikeltransportes (Neer *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999). Der Vergleich der Sequenz von Villidin mit der Datenbank ergab eine signifikante Ähnlichkeit mit „WD-repeat“-Proteinen im N-terminalen Bereich des Proteins. Die Homologie liegt in dem „WD-repeat“-Motiv, dessen Konsensus für gewöhnlich C-terminal durch die Aminosäuren Trp-Asp (WD) begrenzt wird (Neer *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999). Ein „WD-repeat“-Motiv besteht aus kurzen, konservierten Kernstrukturen, die durch Züge von Aminosäuren unterschiedlicher Länge und Sequenz getrennt sind (Abb. 5 C; vgl. 1.4.1). Wenngleich dem Konsensus keine absolute Konservierung zu Grunde liegt, ist in vielen WD-Wiederholungen der C-terminale Teil stärker konserviert als der N-terminale mit den Aminosäuren (G/S/A/V)H. Dieses Charakteristikum ist auch in Villidin zu erkennen (Abb. 5 C). Fünf von den acht repetitiven Elementen haben geringere Abweichungen vom Konsensus der Kernstruktur, als die verbleibenden drei „repeats“. Die Länge der Kernregion zwischen GH und WD beträgt in den „WD-repeats“ des Villidins 32 - 58 Aminosäuren, die variable Region 11 bis 48 Aminosäuren. Insbesondere „WD-repeat“ 1 und 3 entsprechen dem Konsensus ohne auffallenden Fehler. „WD-repeat“ 2 zeigt vier Abweichungen. Die restlichen Wiederholungssequenzen haben mehr als sechs Abweichungen an konservierten Stellen. Insbesondere bei den sechsten, siebten und achten „repeats“ muß die Stringenz deutlich herabgesetzt werden, um noch ein ähnliches Muster ableiten zu können.

Abb. 5: Vergleich ausgewählter Aminosäuresequenzabschnitte von Villidin (VD) mit entsprechenden Sequenzbereichen verschiedener homologer Proteine und mit der „WD-repeat“-Konsensussequenz.

Identische Aminosäuren werden durch dunkel eingefärbte Markierungsboxen gekennzeichnet. Das Symbol „-“ steht für ein durch das Programm ClustalW (BioEdit v4.7.8) eingefügte Lücke. Die Angabe der Aminosäurezahl am Zeilenende entspricht der Länge des gezeigten Sequenzfragments. **(A)** Vergleich der Aminosäuresequenzen der „headpiece“-Domäne (hp) von Villidin (*D. discoideum*; VD), Protovillin (*D. discoideum*; PV), Supervillin (*B. taurus*; SV), Advillin (*H. sapiens*; AV) und Villin (*G. gallus*; V). Die Sekundärstruktur des Villin-hp ist in der letzten Zeile dargestellt (in Anlehnung an das HP67-Konstrukt; Vadar et al., 1999). Der Beginn des proteolytisch definierten Villin-hp beginnt in dieser Abbildung mit As-Position 7. „_“ markiert die Helices 1-4 (von li nach re) und „-“ steht für das β 1-Blatt der dreidimensionalen Struktur. „*“ hebt Aminosäuren hervor, die im Villin-hp an der F-Aktin-Bindung involviert sind (Vadar et al., 1999). In diesem Zusammenhang wird das KKEK-Motiv durch Markierungsrahmen besonders hervorgehoben. Lokalisation der hp-Sequenzen in den Aminosäuresequenzen: VD: 1630-1704; PV: 881-959; SV: 1712-1788; AV: 738-819; V: 745-826; D: 316-383. Die Sequenzen-Zugriffsnummern in der Gendatenbank/SWISS-PROT: (PV) P36418; (SV) O46385; (AV) O75366; (V) P02640; (D) Q08495. **(B)** Sequenzvergleich der zweiten Gelsolin/Villin-Domäne (DII) von Villidin (VD), Severin (S) und Protovillin (PV) aus *D. discoideum*, sowie des menschlichen Gelsolins (G). In Villidin, Severin und Protovillin ist das potentielle PIP₂-Bindemotiv umrahmt. Lokalisation der DII-Sequenzen in den Aminosäuresequenzen: VD: 1019-1142; S: 151-262; PV: 186-305; G: 177-293. Die Sequenzen wurden unter folgenden weiteren Zugriffsnummern aus der Datenbank entnommen: (S) P10733; (G) P06396. **(C)** Vergleich der möglichen acht „WD-repeats“ von Villidin mit dem „WD-repeat“-Konsensus. Die Strukturelemente innerhalb der einzelnen Wiederholungseinheiten („repeats“) der Villidin-Proteinsequenz werden an den Kriterien für „WD-repeats“ nach Smith et al., 1999 (Konsensus) ausgerichtet. Die Sequenzanalyse erfolgte durch einen Internet-Service der „WD-repeat“-Internetseite (<http://huxley.bu.edu/wdrepeat/>). Der „WD-repeat“-Konsensus wird in der obersten Zeile gezeigt. Für die Variable x kann jede beliebige Aminosäure stehen. Die möglichen, alternativ auftretenden Aminosäuren der jeweiligen Positionen in der Sequenz wurden in der Reihenfolge ihres häufigsten Auftretens aufgezählt. Die Aminosäuren im Strang d sind besonders schwach konserviert und treten nicht in jedem „repeat“ auf. Darüber hinaus ist die Länge dieser Sequenzabschnitte sehr unterschiedlich. Dennoch zeigen die Stränge a, b und c ein definierbares Sequenzmuster, das für eine spezifische Oberflächenstruktur (Propellerblätter) steht. Zwischen Strang c des einen Blattes und Strang a des folgenden (bzw. zwischen WD des einen und GH des folgenden) liegt die sogenannte Region I mit größter Variabilität in der Länge. Normalerweise um die 20 AS lang, kann sich dieser Bereich bis 150 AS ausdehnen. Die Minimallänge beträgt 11 AS, allerdings sind bei Propellern aus nur vier „repeats“ minimal 14 AS vorhanden (Chothia et al., 1997). Die zweite variable Längenregion besteht aus 2-30 AS und liegt zwischen Strang a und b (Region II). Sie bildet eine Schleife aus („reverse loop“). Die Sequenzlänge zwischen Strang b und c ist hochkonserviert. Hier findet sich eine Aspartatsäure D (nicht von WD), die hochkonserviert in 84% der „repeats“ vorkommt. Durch rote Buchstaben und Unterstreichung in den ersten vier „repeats“ hervorgehoben, sind jene konservierten Aminosäurereste, die an der Ausbildung der charakteristischen Propellerstruktur beteiligt sein könnten. Identische Aminosäuren in den acht „repeats“ sind dunkel unterlegt. Mit Kästen werden die Ersten fünf repetitiven Sequenzen markiert, bei denen es sich laut Nomenklatur eindeutig um „WD-repeats“ handelt. Die anschließenden drei Wiederholungseinheiten (WD6-8) (unterstrichen) zeigen vergleichsweise wenig Übereinstimmungen mit dem Konsensus, aber die hochkonservierte Aspartatsäure D ist auch hier zu finden, wohingegen sie in WD5 fehlt. Die einzelnen Elemente beginnen in der Villidin-Sequenz bei folgenden Aminosäurezahl: WD1: 82, WD2: 133, WD3: 180, WD4: 226, WD5: 276, WD6: 339, WD7: 465, WD8: 529.

Unter Berücksichtigung der Definition eines „WD-repeats“ nach Smith *et al.* (1999) und nach Analyse der Sequenz durch einen Internet-Service zur Identifizierung von „WD-repeats“ (<http://huxley.bu.edu/wdrepeat/>) zeigte sich, daß die ersten vier „WD-repeat“-Elemente von Villidin stärker mit der Konsensussequenz übereinstimmen als die folgenden (Abb. 5 C), so daß nur diese nach Definition als echte „WD-repeats“ bezeichnete werden.

VD	MEYKSF EKSI	VRESKV RNVF	SKVCKKELFY	TNLKVN--SA	SEELLKSSKS	LFAYPSSIGG	58
Co	-----MSKV	VRSSKYRHVF	AAQPKKEECY	QNLKVTKSAW	DSNYVAANTR	YFGVIWDAAG	54
Crn	-----MSGRF	VRASKYRHIF	GOTCKKELCY	DNIKLSNNAW	DSNLLSVNPF	YLSVNWNA GA	55
p57	-----MSRQV	VRSSKFRHVF	GQPAKADQCY	EDVRVSQTTW	DSGFCAVNP K	FVALICEASG	55
Cl	-----MAQI	VRQSKFRHVF	CKPVKHESCM	SDIRVTEITW	DSLFCDVNPK	FIAFINRGAG	54
-----VDWD1-----							
VD	GSCLSITKLS	NHGKVPDTPF	CIKGHTDPI S	CFEFSNFNDY	VIATGSRDCT	IKIWEVPEEG	118
Co	GGSF AVIPHE	ASGKTTS-VP	LFNGHKSAVL	DIAFH PFNEN	LVGSVSEDCN	ICIWGIPEGG	113
Crn	GGALAVIPLN	ERGKLPDQVN	LFRGHTAAVL	DTDWNPFDHQ	VLASGGDDSK	IMIWKVPEDY	115
p57	GGAFLLVPLG	KTGRV DKNAP	TVCGHTAPVL	DIACWPHNDN	VIASGSEDCT	VMVWEIPDGG	115
Cl	G-PFMVIPVN	KIGRV D KDYP	FVDAH KAPCL	EWAWS PFNDN	VIASC SEDTT	CKVWVIPDRG	113
-----VDWD2-----							
VD	--LIKDNLV T	PLITL PKQOK	RVTGVYFHPS	VDSL FMSSTL	DYTLDIW DLS	STGEQSSVIQ	176
Co	---L TDSIST	PLQTL SGHKR	KVGTISFGPV	ADNVAVTSSG	DFLVKTWDVE	-QGKNLTTVE	169
Crn	TVMEPYEDVH	PIAELKGHSR	KVGLVQYHPT	AANVLISSSA	DNTIKLWDCE	-KGV AHVSLK	174
p57	---LMLPLRE	PVVTL EGHTK	RVGIVAWHTT	AQNVLLSAGC	DNVIMVWDVG	-TGAAMLTLG	171
Cl	---LNRNLSE	PAVELTGHQK	RVNTIAWHPV	ANNVLLTAGG	ENVMFMWNVG	-TGEALLEIS	169
-----VDWD3-----							
VD	KLTGHEDLIM	SVGWNTW SGG	DKLATSSRDK	KMRLYDP RSQ	STPIQTISTH	EGAQGFKLCW	236
Co	G---HSDMIT	SCEWNHN--G	SQIVTTCCKDK	KARVDFPRTN	SIVNEVVC-H	QGVKNSRAIF	223
Crn	---MDVMCQ	SMSFNAD--G	TRLVTTSRDK	KVRVWDPRTD	KPVS VGNH-H	AGAKNPRVWV	227
p57	PEV-HPDTIY	SVDWSRD--G	GLICTSCRDK	RVRIIEPRKG	TVVAEKDRPH	EGTRPVR AVF	228
Cl	--G-HPDQIW	SINFNF D--G	SQFVTTCKDK	KIRILLSHTG	EVVHE-----	-----	209
-----VDWD5-----							
VD	ADSNGL ELIC	TVGANKSAQR	QLYLWDFRQL	QSSQPLV-SK	DVTTDSS ILS	PYYDFGTNMV	295
Co	AKD----KVI	TVGFSKT SER	ELHIYDPR--	AFTTPLS-AQ	VVDSASGLLM	PFYDADNSIL	276
Crn	LGSL--DRFA	TTGFSKMSDR	QIALWDPT--	NLSEPIGGFT	TLDTGSG ILM	PFWDDGTKVI	283
p57	VSEG---KIL	TTGFSRMSER	QVALWDTK--	HLEEPSL-LQ	ELDTSSGVLL	PFDFPDTNIV	282
Cl	-----	-----	-----	-----	-----	-----	209
VD	YLCGKG DG-I	YYYEIE----	---	310			
Co	YLAGKGDGNI	RYEELVDESP	YIH	299			
Crn	YLAGKGDGNI	RYEYENDVF	HYL	306			
p57	YLCGKG DSSI	RYFEITSEAP	FLH	305			
Cl	-----	-----	---	209			

Abb. 6: Vergleich des N-terminalen Abschnittes der Villidin „WD-repeat“-Domäne („WD-repeat“ 1-5) mit den „WD-repeat“-Bereichen von Coronin aus *D. discoideum* und Coronin-Homologen.

Villidin (*D. discoideum*; VD: Gesamtlänge (GL) 1704 As): As 1-310 (WD1-5); Coronin (*D. discoideum*; Co: GL 445 As): As 1-299 (WD1-4): WD1: As 77-117; WD2: As 127-167; WD3: As 170-209; WD4: As 259-299; Crn1 (*S. pombe*; Crn: GL 601 As): As 1-306 (WD 1-5): WD1: As 79-119; WD2: As 132-172; WD3: As 174-213; WD4: As 220-260; WD5: As 266-306; Coronin 1A / Synonym: p57 (*H. sapiens*; p57: GL 461 As): As 1-305 (WD 1-5): WD1: As 79-119; WD2: 129-169; WD3: As 174-213; WD4: As 218-260; WD5: 265-305; Coronin-Homolog in *C. elegans* (Cl: GL 605 As): As 1-209 (WD 1-3): WD1: As 77-117; WD2: As 127-167; WD3: As 170-209. Identische Aminosäuren wurden dunkel unterlegt. Die fünf „WD-repeat“-Motive von Villidin werden durch Linien markiert. Datenbanken-Zugriffsnummern (SWISS-PROT, TrEMBL): (Co) P27133; (Crn) O13923; (p57) P31146; (Cl) Q21624.

Ein Vergleich der N-terminalen „WD-repeat“-Region von Villidin mit der Datenbank zeigt insbesondere eine hohe Homologie zum „WD-repeat-Protein“ Coronin aus *D. discoideum* (41%). Die Gruppe der Coronin-homologen Proteinen wächst stetig. Ein direkter Sequenzvergleich der vorderen N-terminalen Villidin-Domäne mit der „WD-repeat“-Domäne von *D. discoideum* Coronin und einigen Vertretern der neuen Coronin-Familie (de Hostos, 1999) veranschaulicht die große Ähnlichkeit dieser Proteine (Abb. 6).

3.2 Biochemische und zellbiologische Charakterisierung von Villidin

3.2.1 Villidin-Konstrukte zur rekombinanten Proteinexpression

Zur näheren biochemischen und zellbiologischen Beschreibung des Villidin sollten diverse rekombinante Villidin-Fragmente rekombinant exprimiert werden. Spezifische PCR-Produkte wurden in bakterielle Expressionsvektoren kloniert und in geeigneten Bakterienstämmen exprimiert. Die Konstrukte der Villidin-Domänen sind in Abbildung 7 im Vergleich zur Villidin-Struktur dargestellt. Ein 300 Bp Fragment des vil20-Plasmides, das der Villidin-„headpiece“-Domäne entspricht, wurde über eine EcoRI Schnittstelle in den IPTG induzierbaren, Ampicillin resistenten pIMS5 Expressionsvektor (Simon *et al.*, 1988) kloniert und in XL1 blue Bakterien exprimiert. Das resultierende rekombinante Protein besteht aus 83 Aminosäuren, die eigentliche „headpiece“-Domäne umfaßt allerdings nur 77 Aminosäuren. Die ersten vier der sechs zusätzlichen N-terminalen Reste stammen aus dem pIMS5 Vektor und die nächsten zwei aus der Villidin-Sequenz. Die errechnete Molekülmasse betrug 10 kDa. Ein C-terminales 900 Bp EcoRI-Fragment des pFc3-Klons (unter 2.3.12.2) wurde in den ATG-Expressionsvektor pIMS5 (Simon *et al.*, 1988) kloniert. Das rekombinante Protein, das 263 Aminosäuren umfaßt, wurde ebenfalls in XL1 blue exprimiert und hat ein Molekülmasse von etwa 33 kDa.

Für die Expression der rekombinanten Villidin-Fragmente AC, DE und FG wurde unter anderem das pQE-Expressionssystem (Qiagen) und der M15 *E. coli* Stamm verwendet. Die Fragmente wurden an der vil20 Plasmid-DNA (Matrize) amplifiziert und über SphI/HindIII in den IPTG induzierbaren, Ampicillin resistenten pQE30 Vektor kloniert. Das 1,0 kB Fragment WD4 (Synonym: AC; Base 1-1036) beinhaltet die ersten vier „WD-repeats“ (As 1-345) und hat eine theoretische Molekülmasse von ca. 38,5 kDa. LinkerWDV (Synonym: DE) ist ein 1,2 kB großes Fragment (Base 1799 bis 3013) und umfaßt den mittleren Bereich der Villidin-Sequenz einschließlich der PST-reichen Region (As 600-1004). Die berechnete

Molekülmasse betrug 49 kDa. Das ebenfalls 1,2 kB große Fragment cVVD (Synonym: FG; Base 3876 bis 5113) beginnt am Ende der Domäne III und umfaßt das C-terminale Stück der Villin-Homologie einschließlich des „headpiece“ (As 1292-1704). Das rekombinante cVVD-Protein (412 As) hatte eine theoretische Molekülmasse von 48 kDa.

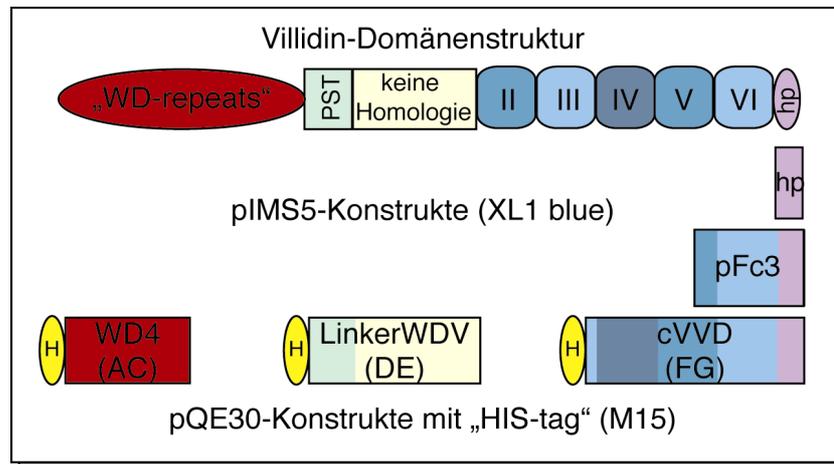


Abb. 7: Graphische Darstellung der Villidin-Konstrukte hp, pFc3, WD4, LinkerWDV (DE) und cVVD (FG) im Vergleich zu der vollständigen Villidin-Sequenz.

Die gesamte Villidin-Proteinsequenz wird in dieser Abbildung mit ihrer Domänenstruktur schematisch dargestellt. Die Konstrukte werden durch Balken repräsentiert. hp: ein 300 Bp langes vil20-PCR-Produkt wurde über EcoRI in den pIMS5-Vektor kloniert und im XL1 blue Bakterien exprimiert; pFc3: 900 Bp EcoRI-Fragment wurde mit dem pIMS5-Vektor in XL1 blue exprimiert; WD4/ LinkerWDV/ cVVD: vil20-PCR-Produkte wurden über SphI/HindIII-Schnittstellen in den pQE30 Vektor kloniert. Das pQE-Expressionsvektorsystem fügt das „His-tag“ (6xHIS, gelbe Ovale H) an die Fusionsproteine an, die in M15 Bakterien exprimiert werden. WD4 (AC): 1 kB, LinkerWDV (DE): 1,2 kB, cVVD (FG): 1,2 kB.

3.2.2 Expression und Reinigung des pFc3-Stücks von Villidin in *E. coli*

Das C-terminale Villidin-Fragment pFc3 wurde in *E. coli* XL1 blue exprimiert, um Protein zur Immunisierung von Mäusen und Kaninchen zu erhalten (Abb. 8). Das rekombinante Protein umfaßt das C-terminale „headpiece“, die Domäne VI und das hintere Drittel der vorausgehenden Domäne V (Abb. 7). Die Bakterienzellen lagerten das exprimierte pFc3 in „inclusion bodies“ ab. Es konnte mit 8 M Harnstoff in Lösung gebracht werden. Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgte im ersten Schritt über eine DEAE-Säule (TEDABP, pH 8) und Elution über einen linearen Salzgradienten (0-300 mM NaCl). Anschließend wurde das Villidin-Fragment von den mitgereinigten Proteinen durch weitere Ionenaustauschchromatographie, diesmal über eine PC-Säule (MEDABP, pH 6,8; Elution: Salzgradient 0-300 mm NaCl) partiell abgetrennt und mittels Centriprep ankonzentriert.

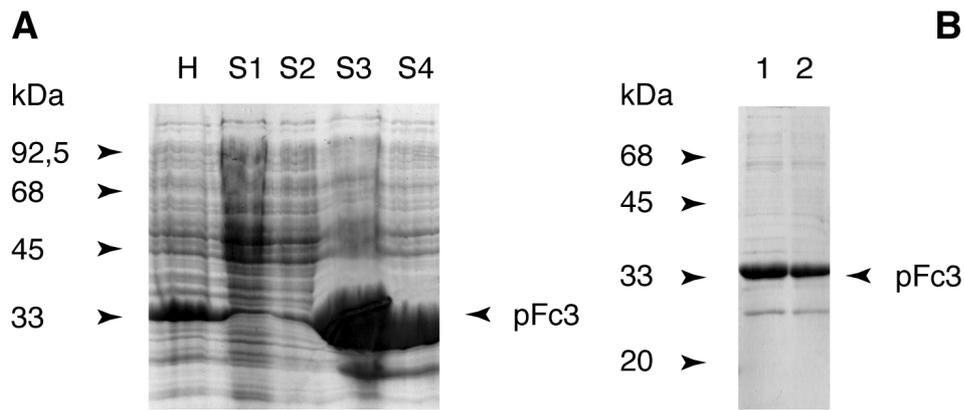


Abb. 8: Extraktion und Reinigung des exprimierten pFc3 aus Bakterien.

(A) Extraktion des exprimierten pFc3. Die Zellen wurden mit 0,3 mM IPTG über Nacht induziert. Nach Lyse (H: Zellhomogenat) und Zentrifugation der Bakterien befand sich pFc3 im Pellet. Das rekombinante Protein wurde nach Waschen des Sediments mit TEDABP (S1) und 2M Harnstoff (S2) durch Extraktion mit zweimal 8 M Harnstoff (S3, S4) in Lösung gebracht. (B) Gereinigtes rekombinantes pFc3 nach Ionenaustauschchromatographie. Der pFc3-haltige Überstand wurde auf eine DEAE-Säule geladen. Die Säule wurde gewaschen und mit einem linearen Salzgradienten (0-300 mM NaCl) eluiert. Anschließend erfolgte eine Reinigung über eine PC-Säule. Der pFc3-haltige Durchlauf wurde mittels Centriprep10 ankonzentriert (Spur: 1 und 2). Im Coomassie-Blau gefärbten Gel ist eine deutliche Bande (Pfeilspitze) bei etwa 33 kDa zu erkennen, was der erwarteten Größe entspricht.

3.2.3 Expression und Reinigung der „headpiece“-Domäne von Villidin in *E. coli*

Die „headpiece“-Domäne des Villin und homologer Proteine ist das markante Unterscheidungsmerkmal im Vergleich zu Gelsolin-Proteinen. Doch nicht alle „headpiece“-Segmente zeigen die bündelnde Fähigkeit, die Villin besitzt. Das „headpiece“ von Supervillin (Wulfskuhle *et al.*, 1999) oder Protovillin (Hofmann *et al.*, 1993) ist nicht in der Lage, Aktin zu binden. Um die Eigenschaften des Villidin-„headpiece“ (hp) näher zu untersuchen, wurde es rekombinant in XL1 blue exprimiert (Abb. 7). Nach Öffnen der Zellen befand sich das hp vor allem im löslichen Überstand und wurde über eine Anionenaustauschchromatographie-Säule DEAE partiell gereinigt. Es eluierte bei einer Salzkonzentration von 50-100 mM NaCl und die hp-haltigen Fraktionen wurden durch eine Ammoniumsulfatfällung (0-50%) ankonzentriert. Durch Gelfiltration wurde das Protein abgetrennt und die Reinheit im SDS-PAGE-Gel überprüft. Die Größe entsprach der errechneten Molekülmasse von 10 kDa.

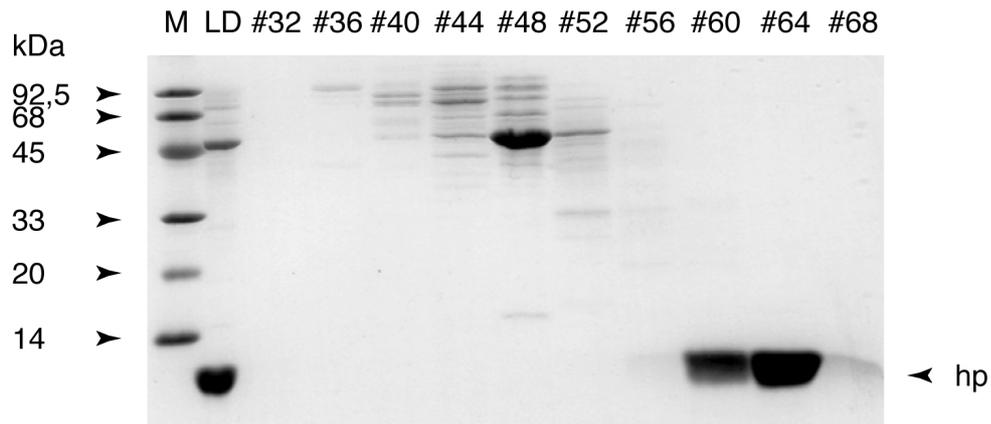


Abb. 9: Reinigung von rekombinatem Villidin-„headpiece“ (hp).

Nach 5 h Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Zellen geöffnet. Villidin-hp lag zum größten Teil als lösliches Protein vor. Der lösliche Überstand wurde auf eine DEAE-Säule geladen und das Protein eluierte bei einer Salzkonzentration von 50-100 mM NaCl. Nach Fällung der hp-haltigen Fraktionen mit 0-50% Ammoniumsulfat wurde das Konzentrat auf eine Gelfiltrationssäule geladen (LD) und eluierte bei einem Volumen von 260 bis 330 ml IEDANBP (Fraktion #60-#64). Bei etwa 10 kDa ist eine hp-Bande zu erkennen (Pfeilspitze), die sauber von den anderen Proteinen abgetrennt ist.

3.2.4 Expressionsversuch charakteristischer Villidin-Fragmente in *E. coli*

Die Domänenstruktur und die Lokalisation der funktionellen Eigenschaften von Severin, Gelsolin, Villin und anderen Aktin-assoziierten Proteinen wurden in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben (siehe 1.3). Im Gegensatz dazu geben die sehr unterschiedlichen Funktionen und intrazellulären Lokalisationen von „WD-repeat“-Proteinen keine Hinweise auf eine allgemeine funktionelle Bedeutung des „WD-repeat“-Motivs, sondern lassen vielmehr eine strukturelle Gemeinsamkeit der Proteine dieser Familie vermuten (siehe 1.4). Villidin vereint in seiner Sequenz Bereiche, die beiden Protein-Familien angehören. Um die Eigenschaften der Villidin-Domänen näher beschreiben zu können und um monoklonale Antikörper mit verschiedenen Epitopen entlang der Villidin-Sequenz zu erhalten, sollten charakteristische Proteinfragmente in *E. coli* exprimiert werden (Abb. 7). Das rekombinante Protein WD4 umfaßt die ersten vier „WD-repeat“-Motive, das Konstrukt LinkerWDV beinhaltet den mittleren Villidin-Abschnitt einschließlich der PST-reichen Region; das Villidin-Stück cVVD erstreckt sich von der Villin-homologen Domäne VI bis zum C-terminalen Ende. Zunächst wurde das „His-tag“-System von Qiagen verwendet, um eine einfache und schnelle Reinigung der rekombinanten Proteine über eine Ni²⁺-NTA-Säule nutzen zu können. Die bakterielle Expression der cDNA-Fragmente erfolgte durch den *E. coli* Stamm M15. In allen Fällen wurden mehrere Klone getestet und die Expressionsbedingungen mehrfach modifiziert.

Beim WD4-Klon war die Expression des rekombinanten Proteins eindeutig IPTG-abhängig (Abb. 10), wenngleich es bei einigen untersuchten Klonen bereits ohne Induktion zu einer geringen Expression kam. Das Laufverhalten in der SDS-PAGE entspricht in etwa der erwarteten Molekülmasse von 38,5 kDa. Proteinproben des LinkerWDV-Klones zeigten im Immunoblot ein sauberes Induktionsmuster (Abb. 10). Das aus dem Blot ersichtliche Molekulargewicht von etwa 50 000 stimmt mit dem erwartenden Wert von 49 000 sehr gut überein. Die Expression des rekombinanten cVVD-Proteins wurde mit 1 mM IPTG induziert. Das Protein läuft in der SDS-PAGE etwas langsamer als erwartet (48 kDa) und verhält sich eher wie ein 50 kDa-Protein (Abb. 10). Dieses ungewöhnliche Laufverhalten ist wahrscheinlich auf Besonderheiten in der Sequenz zurückzuführen.

Die Expression (Abb. 10) und Extraktion aller drei rekombinanten Proteine (nicht gezeigt) wurde im Immunoblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen das „His-tag“ (6xHistidin) nachgewiesen, konnte aber nicht in Coomassie-Blau gefärbten Gelen (Abb. 10) oder durch Silberfärbung der Gele (nicht gezeigt) visualisiert werden. Durch Testen verschiedener Expressionsbedingungen (Temperatur: 30°C, 37°C; Zeit: 1-24 h) wurde versucht, die Proteinexpression quantitativ zu optimieren. Unter keinen Bedingungen war es möglich, eine signifikante Proteinkonzentration zu erhalten, um weitere Versuche durchführen zu können. Die exprimierte Proteinmenge für die Aufreinigung über die Ni²⁺-NTA-Affinitätssäule war zu gering, um noch ausreichend Protein von der Säule eluieren, ankonzentrieren und weiter verarbeiten zu können. Aus diesem Grunde wurden die Villidin-Konstrukte in andere Expressionssysteme kloniert (pT7-7, pIMS5, pMal, pGEX). Weder die Fusionen mit GST, noch mit dem Maltose-Binde-Protein waren erfolgreich. Auch im Falle des pT7-7 Systems oder des pIMS5-Expressionssystems, die keine Nachweismöglichkeit im Immunoblot bieten, konnte weder im Coomassie-Blau gefärbten Gel noch durch Silberfärbung eine Expression nachgewiesen werden. Aus diesen Gründen wurde dieser Projektansatz eingestellt, und ein neues Ziel war es, Peptidantikörper herzustellen (Kooperation mit F. Rivero).

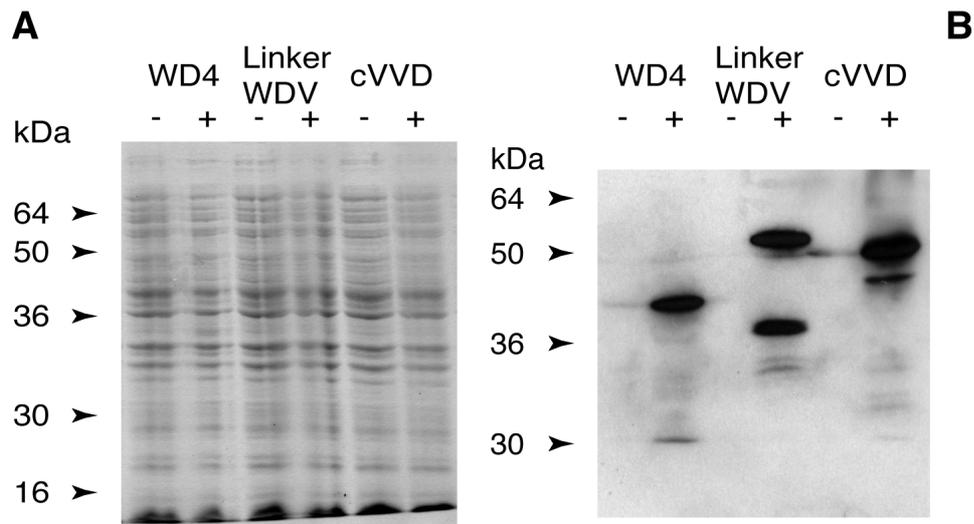


Abb. 10: Expression rekombinanter Villidin-Fragmente in *E. coli* M15.

Die Expression wurde **(A)** durch SDS-PAGE, Coomassie-Blau Färbung und **(B)** Immunoblots mit einem monoklonalen Antikörper gegen das „His-tag“ (6xHistidin) überprüft. Proteinproben wurden vor (-) und nach (+) IPTG-Induktion der Bakterienkulturen entnommen. Im Immunoblot zeigte der WD4-Klon und der LinkerWDV-Klon ein klares (+)/(-)-Induktionsmuster. Der cVVD-Klon exprimierte das rekombinante Protein in geringen Mengen ohne Induktion. Im Coomassie-Gel konnte keine Expression nachgewiesen werden.

3.2.5 Spezifität des polyklonalen Antikörpers 6336 und des monoklonalen Antikörpers 257-6-2

Für die Immunisierung von zwei Kaninchen wurde die Firma Eurogentec beauftragt. Die beiden Tiere wurden mit identischen Antigenpräparationen und Immunisierungsprotokollen behandelt. Die Antiseren 6335, 6336 und die Hybridomaüberstände (hergestellt am Institut für Biochemie, Köln) wurden mit Immunoblots auf ihre Spezifität getestet. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe des zur Immunisierung verwendeten pFc3-Materials verwendet, ferner *Dictyostelium*-Homogenate sowie Extraktionsüberstände und Sedimente nach 100.000 g Zentrifugation (Abb. 11). Das pFc3-Protein wurde im Immunoblot noch bei einer Konzentration von 100 ng deutlich detektiert (Abb. 11 A, Spur 2). Die starke Bande bei etwa 33 kDa entspricht der berechneten Größe des rekombinanten Proteins und stimmt mit der Bande im Coomassie-Blau gefärbten Gel überein. Die Antiseren 6336, 6335 (nicht gezeigt) und der monoklonale Hybridomaüberstand 257-6-2 hatten eine ähnliche Spezifität im Immunoblot. Unter den sechs untersuchten Hybridomaüberständen zeigte der Antikörper 257-6-2 sowohl in Immunoblots mit verschiedenen *Dictyostelium*-Präparationen als auch in der Immunfluoreszenz die besten Ergebnisse und wurde für alle weiteren Versuche herangezogen.

Der polyklonale Antikörper 6336 wie auch der monoklonale Antikörper 257-6-2 detektierten in *Dictyostelium*-Homogenaten und Extrakten eine Bande bei etwa 190 kDa, was der erwarteten Größe des Villidin-Proteins entspricht (Abb. 11 B). Da Villidin äußerst sensitiv gegenüber proteolytischen Abbau reagiert, stellen die schwächeren Signale von geringerer Größe vermutlich Degradationsprodukte dar. Unterschiedliche Extraktionsmethoden dienten zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Villidin, ob es in *Dictyostelium* Zellen fest an das Zytoskelett gebunden vorliegt, ob es Membran-assoziiert ist oder aber in gelöster Form im Zytoplasma vorkommt und eventuell nur transient mit dem Zellskelett interagiert. Das Öffnen der Zellen erfolgte mittels Passage durch Nucleoporefilter oder mit Detergens (Triton X-100), anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile bei 100.000 g abzentrifugiert. Bei der Ultrazentrifugation bleiben lösliche Moleküle im Überstand, während größere Aggregate wie Ribosomen und kleine Membranvesikel, die beim Öffnen der Zellen entstehen können, sedimentiert werden. Der Aufschluß der Zelle durch Scherkräfte ist sehr schonend und effizient und beläßt die Membranen im wesentlichen intakt, die Lysis mit Triton X-100 hingegen solubilisiert größtenteils die Membranen und lediglich das Triton-unlösliche Zytoskelett kann durch Zentrifugation sedimentiert werden. In beiden Fällen war Villidin sowohl im löslichen Überstand wie auch zu etwa 40 % im Pellet zu finden. Wurden die Sedimente anschließend mit 100-200 mM NaCl behandelt, konnte nahezu das gesamte Villidin in Lösung gebracht werden, was auf eine Membran-Assoziation von Villidin hindeutet. Villidin liegt folglich zum Großteil als lösliches Protein vor, ist aber ebenso Membran-assoziiert und im Triton-unlöslichen Zytoskelett zu finden. Als Kontrolle wurde eine Proteinprobe von Zellen aus dem entsprechenden Entwicklungsstadium (14 h), die lediglich mit 1 x SDS geöffnet worden waren, aufgetragen (Abb. 11 B).

Die Spezifität des polyklonalen und des monoklonalen Antikörpers wurde auch in Immunfluoreszenz-Untersuchungen überprüft (Abb. 11 C, 13,14). In diesen Untersuchungen wurde ein deutlicher Unterschied ersichtlich (Abb. 11 C). Das Fluoreszenzsignal des mAk 257-6-2 ist sehr schwach und die Lokalisation des Villidin ist nur schwer erkennbar. Die Verwendung des polyklonalen Antikörpers führte, insbesondere nach Affinitätsreinigung des Antiserums, zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal, während ein IgG-gereinigter monoklonaler Villidin-Ak eine kaum merkliche Verbesserung bewirkte. Durch Vergleich der Fluoreszenz in Villidin-Wildtyp-Zellen und Villidin-minus-Mutanten konnte die Spezifität der Markierung bestätigt werden, da in Villidin-defizienten-Zellen keine vergleichbare Villidin-Antikörperfärbung beobachtet werden konnte (Abb. 13-14). Die Lokalisation von Villidin erscheint vesikulär, über das Zytoplasma verteilt.

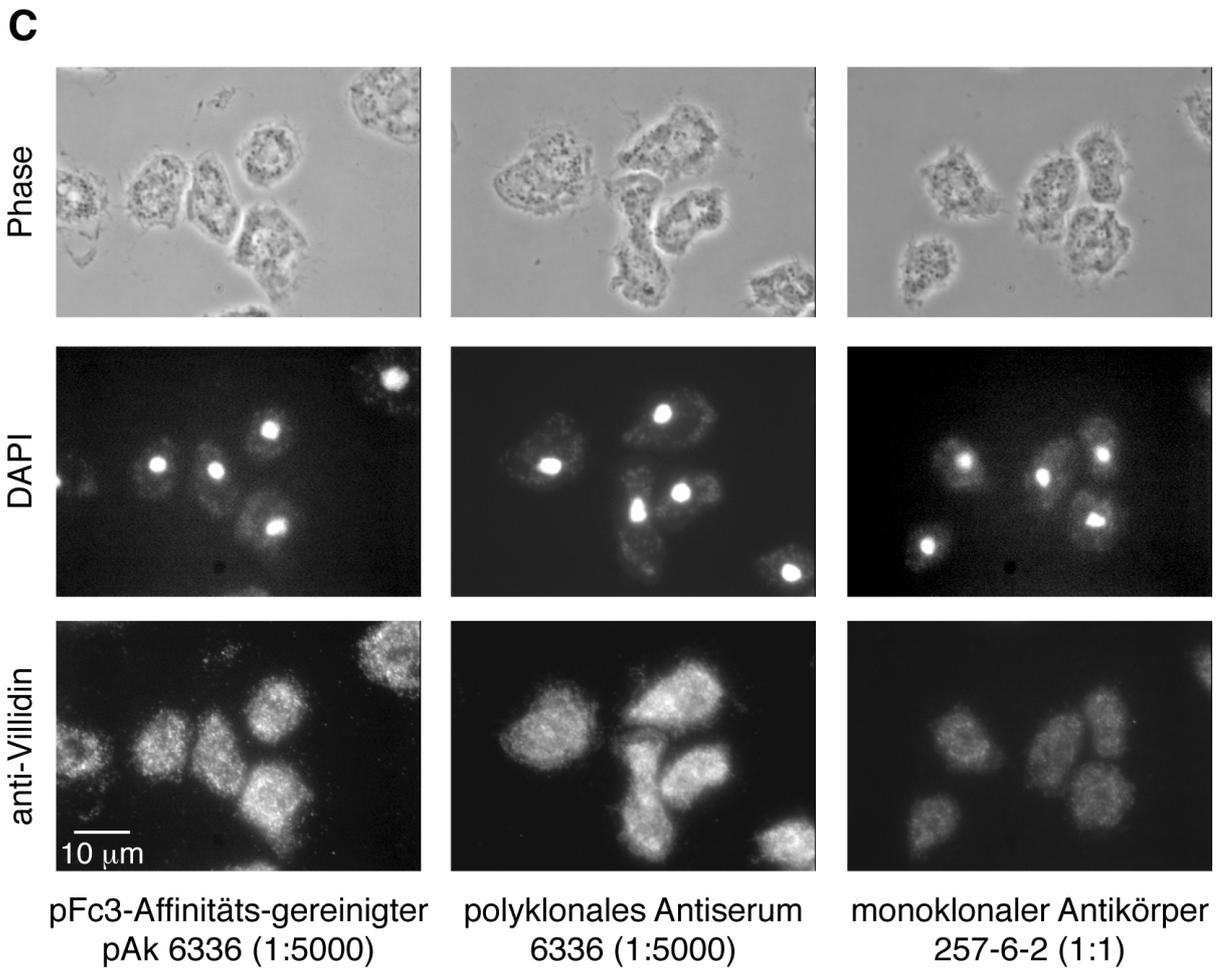
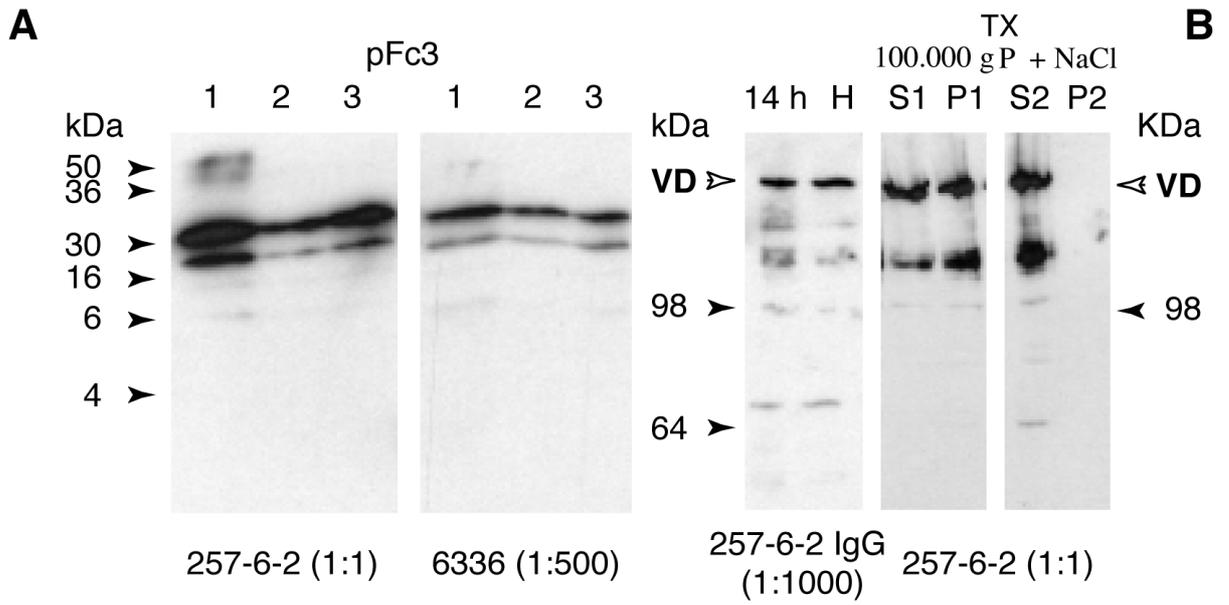


Abb. 11: Spezifität des polyklonalen anti-pFc3-Villidin Antiserums 6336 und des monoklonalen anti-pFc3-Villidin Antikörpers 257-6-2.

In Klammern ist das Verdünnungsverhältnis der Antikörperlösungen angegeben. **(A)** Nach der zweiten Immunisierung wurde das Kaninchenserum auf Reaktionen im Immunoblot getestet und mit dem Hybridomaüberstand 257-6-2 verglichen. Das zur Immunisierung verwendete gereinigte pFc3-Material aus *E. coli* wurde in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Spur 1: 400 ng; Spur 2: 100 ng; Spur 3: 200 ng. Das Antiserum 6336 wie auch der monoklonale Ak 257-6-2 zeigen ein Signal von der erwarteten Größe des rekombinanten Villidin-pFc3-Fragments (33 kDa). Das Antiserum 6335 hatte eine sehr ähnliche Spezifität (nicht gezeigt). **(B)** Entwickelte Dictyostelium-Zellen wurden mittels Nucleporefilter oder Detergens (TX: Triton X-100) geöffnet. Als Kontrolle wurde eine Proteinprobe von ganzen Zellen aus dem entsprechenden Entwicklungsstadium (14 h) aufgetragen. Das Homogenat (H) wurde bei 100.000 g abzentrifugiert. Villidin liegt bei Zellfraktionierungen zu 50-60% im löslichen Überstand (S1) vor und ist zu 40-50% im entsprechenden Pellet zu finden (P1). Mit 100-200 mM NaCl konnte Villidin fast gänzlich in Lösung gebracht werden (S2). Der monoklonale Antikörper 257-6-2 (Hybridomaüberstand und IgG-Aufreinigung) erkannte, ebenso wie der polyklonale Ak 6336 (nicht gezeigt), eine Bande von 190 kDa (weiße Pfeilspitze). **(C)** Spezifität der Villidin-Antikörper in der Immunfluoreszenz. Während das Fluoreszenzsignal des monoklonalen Antikörpers selbst nach IgG-Reinigung relativ schwach war (rechts), zeigte der polyklonale Antikörper 6336 (Mitte) wesentlich deutlicher eine vesikel-ähnliche, punktförmige Lokalisation von Villidin, das über das Zytosol gleichmäßig verteilt vorliegt. Durch Affinitätsreinigung konnte diese Markierung verbessert werden (links). Als sekundärer Antikörper diente der Cy3-gekoppelte IgG. Kernfärbung der Zellen mit DAPI (DAPI). Phasenkontrastaufnahme (Phase).

3.2.6 Sedimentationsassay der rekombinanten „headpiece“-Domäne mit Aktin

Um die Interaktionsfähigkeit des Villidin-„headpiece“ mit Aktin näher zu untersuchen, wurden *in vitro* Kosedimentationsversuche mit Aktin aus dem Skelettmuskel eines Kaninchens und *D. discoideum* („nicht-Muskel“-Aktin) durchgeführt. Das rekombinante Protein wurde mit G-Aktin für 20-40 min inkubiert und dabei die Polymerisation durch Anwesenheit von 2 mM MgCl₂ induziert. Durch Zentrifugation bei 100.000 g wurde F-Aktin sedimentiert. Die Sedimente wurden einmal gewaschen und die Aktin- wie hp-Verteilung wurden in der SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau Färbung analysiert. Aktin lag infolge der Polymerisation zum Großteil in der F-Aktin-Form vor und war damit im Zentrifugationspellet zu finden. In Kontrollansätzen, die das „headpiece“-Protein, aber kein Aktin beinhalteten, verblieb das rekombinante Protein nach Zentrifugation im löslichen Überstand. Diese Lokalisation ändert sich auch nicht, wenn das „headpiece“-Segment mit Aktin inkubiert und zentrifugiert wurde. Das Villidin-„headpiece“ zeigt keine spezifische Affinität an Aktin zu binden.

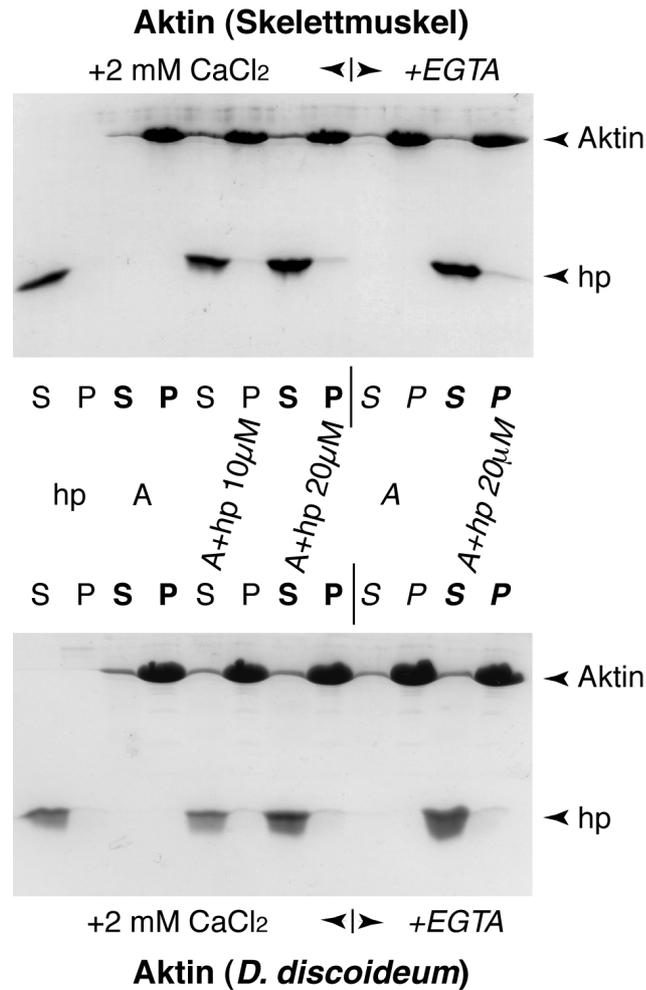


Abb. 12: Sedimentation von rekombinantem Villidin „headpiece“-Protein zusammen mit Aktin.

Die Versuche wurden sowohl mit aufgereinigtem Aktin aus Skelettmuskel eines Kaninchens als auch aus *D. discoideum* durchgeführt. Aufgereinigtes hp (Endkonzentration 10 und 20 µM) wurde mit Polymerisationspuffer (Kontrolle: Spur 1-2) oder mit Aktin (A: Endkonzentration 5 µM) für 30 min bei RT inkubiert (Spur 5-6 und 11-12). Zur weiteren Kontrolle wurde ein Ansatz, der Aktin aber kein hp enthielt, verwendet (Spur 3-4 und 9-10). Die Ansätze wurden in An- und Abwesenheit von Calcium-Ionen durchgeführt (+2 mM CaCl₂ und +EGTA). Nach 100.000 g Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und die Sedimente einmal gewaschen. Überstände (S) und Sedimente (P) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Aktin lag fast ausschließlich in der polymerisierten F-Aktin-Form vor und konnte sedimentiert werden. Das Villidin-hp von etwa 10 kDa blieb auch in Gegenwart von Aktin löslich und kosedimentierte nicht mit Aktin.

3.2.7 Intrazelluläre Verteilung von Villidin in *D. discoideum* in der Immunfluoreszenz im Vergleich zu der Lokalisation von Villidin-GFP-Fusionsproteinen

3.2.7.1 Intrazelluläre Verteilung von Villidin

Die Villidin-Proteinsequenz vereint Homologien zu zwei großen Proteinfamilien, die Villin/Gelsolin- und die „WD-repeat“-Familie. Proteine dieser beiden Großgruppen stehen in keinem unmittelbaren Zusammenhang und zeigen diverse funktionelle Aufgaben und unterschiedlichste Lokalisationen in der Zelle. Neben der biochemischen Analyse der subzellulären Verteilung von Villidin (unter 3.2.5) wurden auch Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt, um die Lokalisation innerhalb der Zelle näher beschreiben zu können. So wurden in Anlehnung an die unter 2.6.1 beschriebene Methoden, die Zellen auf unterschiedliche Weise fixiert und sowohl der monoklonale Antikörper 257-6-2 wie das polyklonale Antiserum 6336 verwendet. Um ein verbessertes Ergebnis des Immunfluoreszenzsignals zu erzielen, wurde der monoklonale Antikörper mittels Protein A-Säule und der polyklonale durch Affinitätschromatographie über eine pFc3-gekoppelte Affinitätsäule aufgereinigt und auf diese Weise ankonzentriert. Wie bereits unter 3.2.5 erläutert, erwies sich der polyklonale Antikörper in der Immunfluoreszenz am geeigneteren (Abb. 11 C). Standardmäßig wurde parallel eine negative Kontrolle betrachtet, bei der lediglich der sekundäre Cy3-konjugierte bzw. der Fluorescein-gekoppelte Antikörper eingesetzt wurde, um die Hintergrundfärbung abschätzen zu können. Kern- und Aktin-Färbung wie diverse Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen ausgewählte Proteine dienten zur näheren Beschreibung der Villidin-spezifischen Färbung. Da Villidin in *Dictyostelium* entwicklungsreguliert exprimiert wird, wurden in der Regel für alle Experimente bis zu 6 h entwickelte Zellen verwendet, da die Villidin-Konzentration im Lauf der Entwicklung zunimmt. Um die Abschaltung des Villidin-Gens in der Immunfluoreszenz nachzuweisen und eine zusätzliche Aussage über die Spezifität der Villidin-Markierung geben zu können, wurden neben entwickelten AX2-Zellen auch Villidin-minus-Zellen, ebenso wie Severin- und Myosin-minus-Zellen verwendet (Abb. 13-14).

Es erwies sich auch nach zahlreichen, modifizierten Experimenten als diffizil, die Lokalisation des endogenen Villidin-Proteins eindeutig zu beschreiben. Zu beobachten war eine Anfärbung intrazellulärer, vesikulärer Strukturen. In einigen Präparaten erschienen diese Strukturen in der Peripherie und selten auch in Kernnähe etwas dichter konzentriert (Abb. 13 H, Mitte), waren aber in der Regel homogen über das Zytosol verteilt. Die Ergebnisse

bestätigten die zytosolische Verteilung des Proteins, wie sie auch biochemisch nachgewiesen wurde (unter 3.2.5), lassen aber auch eine Assoziation von Villidin mit Vesikeln vermuten.

Um die Spezifität des Villidin-Antikörpers sicher bestätigen zu können, wurden Villidin-minus-Zellen im Vergleich zu Villidin-positiven Zelltypen (z.B. Wildtyp-Zellen, Severin-minus-Zellen usw.) untersucht. Hierzu wurde ein Gemisch aus 80% Severin-minus- bzw. Myosin-minus- oder auch AX2-Zellen mit 20% Villidin-defizienten-Zellen auf den Objektträger ausgebracht (Abb. 13). Die Abschaltung des Villidin-Gens konnte so auch in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Unter Verwendung eines anti-Severin- bzw. anti-Myosin-mAks, parallel zum polyklonalen Villidin-Antikörper, war es möglich, eindeutig zwischen den unterschiedlichen Mutanten zu differenzieren (Abb. 13 A, B). Villidin wurde nur in Severin- bzw. Myosin-minus-Zellen lokalisiert, nicht aber in den Villidin-minus-Mutanten, die lediglich durch den Severin- bzw. Myosin-Antikörper angefärbt wurden. Der Versuchsaufbau, wie für die Beispiele 12 A und B, ermöglichte allerdings keine Aussage hinsichtlich einer Kolo-kalisation von Villidin mit dem Gelsolin-Protein Severin oder dem Motorprotein Myosin. Angemerkt werden muß an dieser Stelle, daß sich das Myosin-Fluoreszenzsignal als sehr intensiv erwies, so daß es im Wellenlängenbereich von Cy3 noch erfaßt wurde (Abb. 13 B, „merge“). Folglich ist hier eine Interpretation der Gelbfärbung als Kolo-kalisation mit Villidin oder Kreuzreaktion des Villidin pAks mit Myosin nicht zutreffend. Die vermeintliche Kofärbung ist nur in Villidin-minus-, sprich Myosin-positiven-Zellen zu finden. Darüber hinaus zeigt diese Aufnahme Villidin-minus-Zellen, die Myosin-minus-Zellen phagozytiert haben (keine phagozytische Präferenz für einen Zelltyp, andere Beispiele dieses Präparates nicht gezeigt). Dieses Verhalten könnte durch die Streßsituation, die durch den „agar-overlay“ hervorgerufen wird, erklärt werden.

Bei der Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts mit TRITC-Phalloidin sollte neben der Differenzierung zwischen den Zelltypen Myosin- und Villidin-minus in erster Linie untersucht werden, ob Villidin gemeinsam mit Aktin lokalisiert. Dies konnte für das endogene Villidin mit den Antikörpern 6336 und 257-6-2 nicht überzeugend gezeigt werden, war aber für die Villidin-GFP-Fusionsproteine vilK1- und vilK2-GFP möglich (Abb. 16, 21).

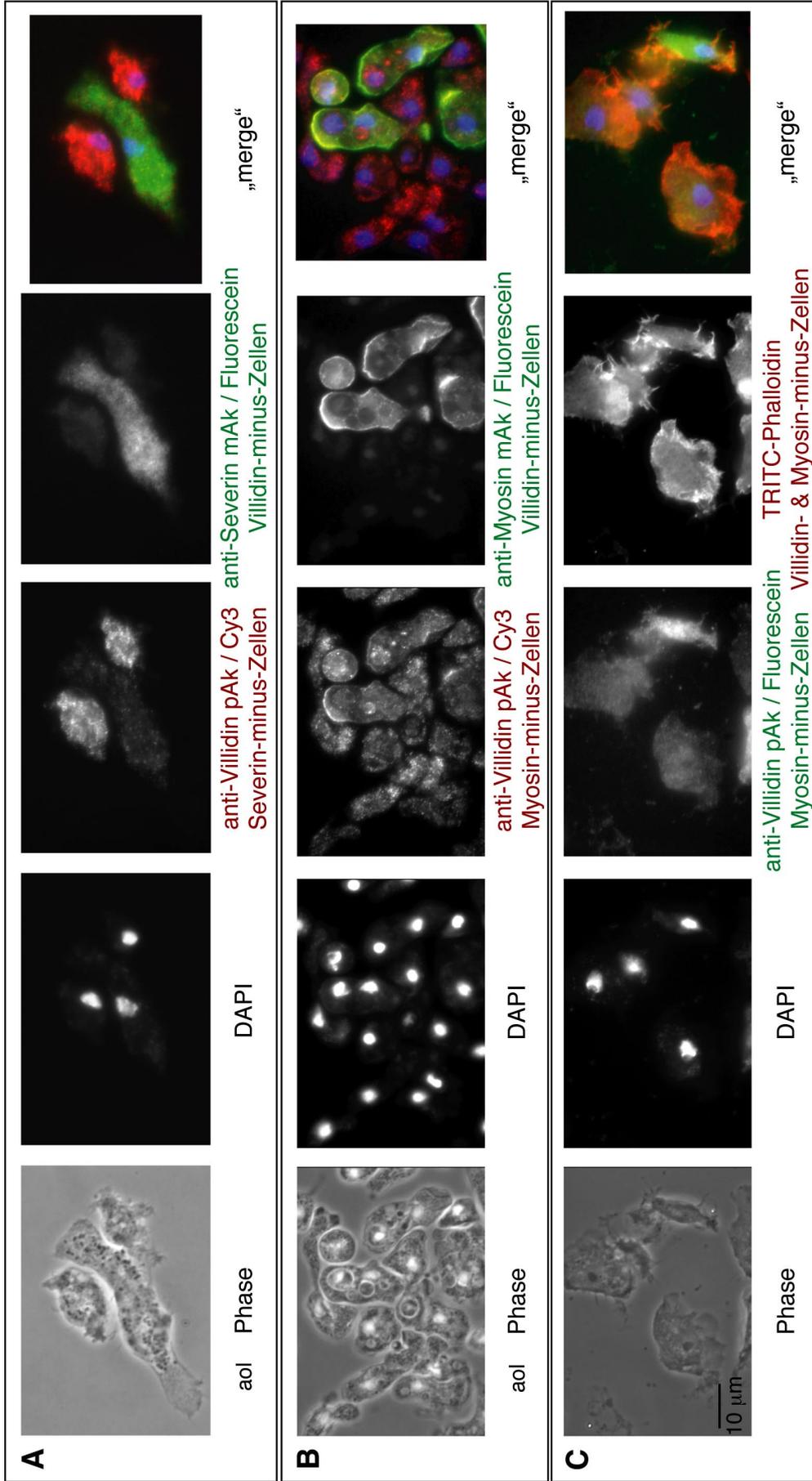


Abb. 13 (A-C): (A) Villidin-minus- und Severin-minus-Zellen wurden im Verhältnis 1:4 gemischt, auf Objektgläsern nach Vorschrift ausgebracht und nach 6 h Entwicklung fixiert. Zur Lokalisation von Severin wurde der monoklonale anti-Severin Antikörper 102-425-1 herangezogen. Deutlich zu erkennen ist der Unterschied zwischen Villidin- und Severin-minus Zellen. (B) Villidin-minus- und Myosin-minus-Zellen (1:4). Zur Lokalisation von Myosin wurde der monoklonale anti-Myosin Antikörper 21-96-3 verwendet. Zu sehen ist die Unterscheidung zwischen Villidin- und Myosin-minus-Zellen. (C) Aktin wurde durch TRITC-Phalloidin in Myosin- und Villidin-defizienten-Zellen angefärbt.

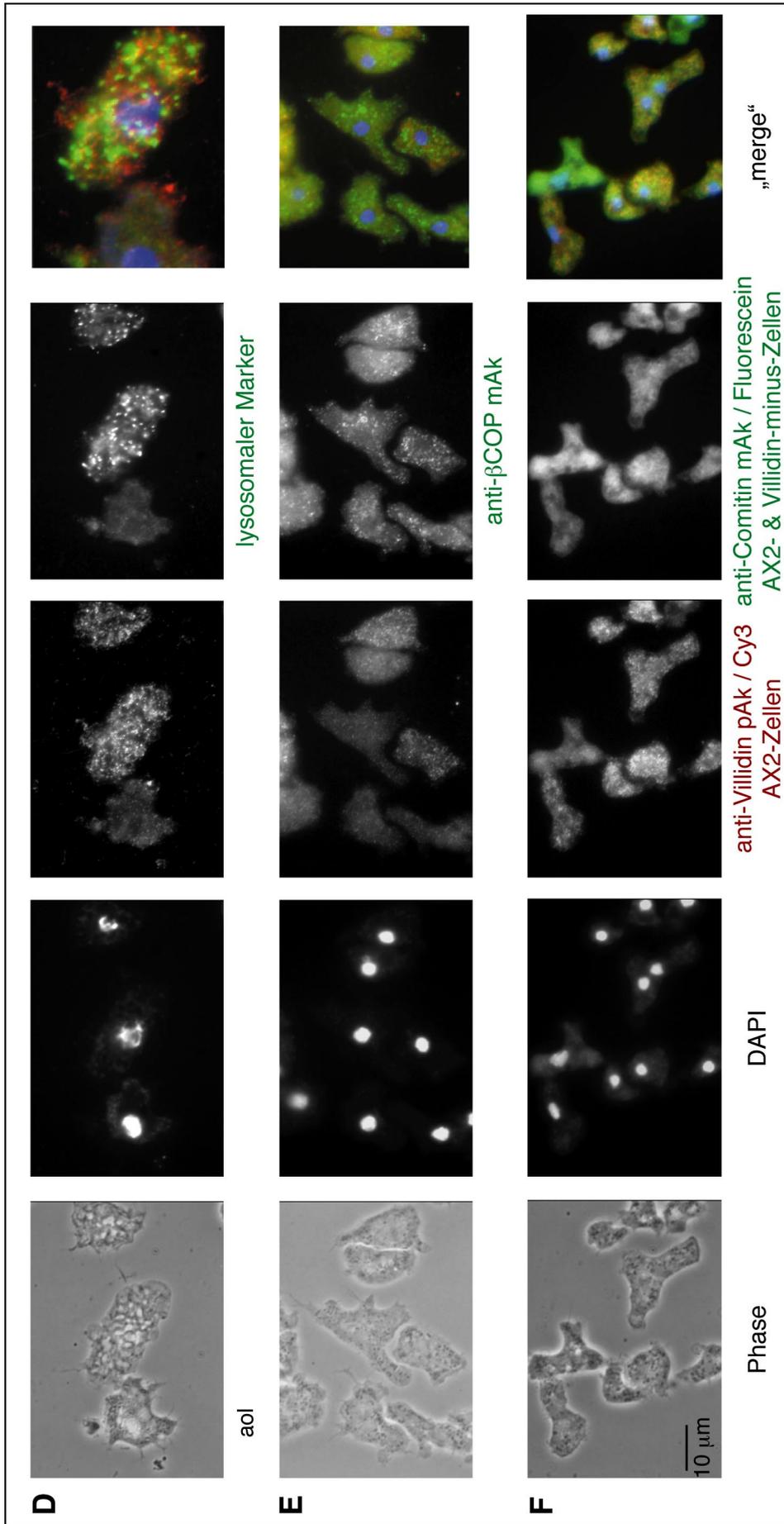


Abb. 13 (D-F): Die Villidin-Lokalisation erscheint als feine Markierung, punktförmig und vesikel-ähnlich, weshalb Doppelmarkierungen mit verschiedenen vesikulären Markern durchgeführt wurden. Hierfür wurden 1:4 Mischungen von Villidin-defizienten- und AX2-Zellen (6 h entwickelt) untersucht. In allen Immunfluoreszenzversuchen war die Differenzierung zwischen AX2- und Villidin-defizienten-Mutanten gut sichtbar, doch eine Kolo-kalisation von Villidin in AX2-Zellen mit den untersuchten Proteinen konnte nicht gezeigt werden. **(D)** Lysosomaler Marker mAk 221-342-5. **(E)** mAk E5A3, gegen das βCOP-Protein aus Mäusen gerichtet (COPI "coatome"Komplex), markiert in *D. discoideum* ein ähnliches Protein. **(F)** Comitin (Golgi-Apparat) wurde mit dem mAk 190-68-1 markiert.

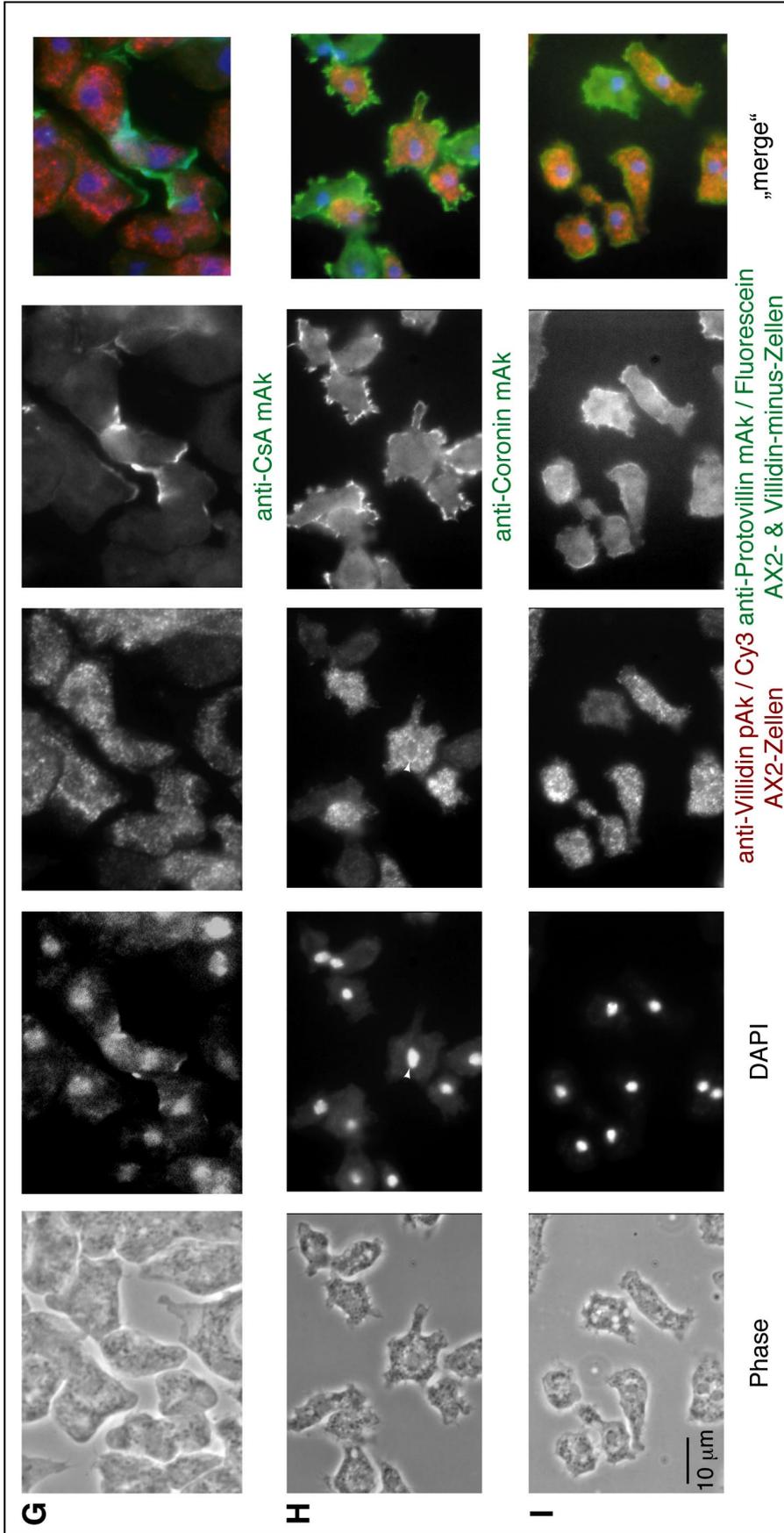


Abb. 13 (G-I): Ferner erfolgten Doppelfärbungen mit einem Plasmamembranmarker und typischen Aktin-assoziierten Dictyostelium-Proteinen.. Hierfür wurden 1:4 Mischungen von Villidin-defizienten- und AX2-Zellen (6 h entwickelt) untersucht. In allen Immunfluoreszenzversuchen war der Unterschied zwischen AX2- und Villidin-defizienten-Mutanten gut sichtbar, doch eine Kolo-kalisation von Villidin in AX2-Zellen mit den untersuchten Proteinen konnte auch hier nicht gezeigt werden. **(G)** "Contact Site" A (CsA, Plasmamembran) wurde durch den mAk 33-294-17 detektiert. **(H)** Coronin ("WD-repeat"-Protein) wurde mit dem mAk 176-3D-6 in der Aktin-reichen Zellperipherie und in den sich ausstreckenden Filopodien detektiert. Die weiße Pfeilspitze zeigt auf eine hin und wieder zu beobachtende mögliche Villidin-Lokalisation in Kernnähe. **(I)** Protovillin (Gelsolin/Villin-Protein) wurde durch den mAk 196-278 lokalisiert. Zu erkennen ist eine homogene Markierung über den gesamten Zellkörper mit Akkumulation unterhalb der Plasmamembran und in Pseudopodien, wo sich auch das Aktin-Zytoskelett befindet.

Abb. 13: Immunfluoreszenz-Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Villidin im Vergleich zu ausgewählten Proteinen. (Detail-Beschreibung auf Seite 89-91).

DNA wurde mit DAPI gefärbt. Zur Detektion von Villidin wurde das pFc3-Affinitäts-gereinigte Antiserum 6336 eingesetzt und anschließend mit einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Die Lokalisation der anderen Proteine erfolgte mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern, gefolgt von einem Fluorescein-gekoppelten sekundären anti-Maus Antikörper. In einigen Abbildungen sind Immunfluoreszenzaufnahmen nach Behandlung der Zellen durch einen „agar-overlay“ (aol) gezeigt. Villidin-minus-Zellen werden durch den Villidin-Antikörper kaum markiert. Die erkennbare Färbung entspricht annähernd der Fluoreszenz der negativ Kontrolle, bei der lediglich mit dem sekundärem Antikörper inkubiert wurde (nicht gezeigt).

Durch Doppelmarkierung mit dem lysosomalen Marker 221-342-5 (Neuhaus *et al.*, 1998) konnte keine Kolokalisation nachgewiesen werden (Abb. 13 D). Ferner wurde eine Zweifachfärbung mit dem monoklonalen Antikörper E5A3 gegen das β -COP-Protein (Mäusen) durchgeführt. Es ist Bestandteil des COPI „coatome“ Komplexes und markiert in *Dictyostelium* ein ähnliches Protein. Die Immunfluoreszenz ergab keine Kolokalisation mit Villidin, so daß ein vergleichbare vesikuläre Assoziation für Villidin in *Dictyostelium* zunächst nicht angenommen wurde (Abb. 13 E). Darüber hinaus wurde durch die Doppelmarkierung mit dem monoklonalen Antikörper gegen das Golgi-assoziierte Protein Comitin ausgeschlossen, daß Villidin in Zusammenhang mit dem Golgi-Apparat steht (Abb. 13 F). Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, daß es sich bei der Villidin-Lokalisation um die Markierung einer gesonderten Vesikelpopulation handelt, die nicht mittels der hier herangezogenen Proteinmarker beschrieben werden kann. Die Verwendung eines anti-„Contact-Site“ A monoklonalen Antikörpers als Plasmamembranmarker, konnte in der Immunfluoreszenz keine gemeinsame Lokalisation mit Villidin zeigen und gab keinen Hinweis auf eine spezifische Markierung der Plasmamembran (Abb. 12 G).

Weitere Doppelfärbungen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen Coronin und Protovillin durchgeführt. Protovillin ist das zweite Villin-Homolog in *Dictyostelium*. Coronin, ein „WD-repeat“-Protein aus *D. discoideum*, lokalisiert in Zellausstülpungen, die als „crowns“ bezeichnet werden und der Makropinozytose vorausgehen. Auch hier war keine Kolokalisation mit der Markierung des endogenen Villidins zu beobachten (Abb. 13 H-I). Für die Villidin-GFP-Konstrukte vilK1- und vilK2-GFP konnte allerdings eine Coronin-ähnliche Lokalisation während Phago- und Pinozytose gezeigt werden (Abb. 16, 21).

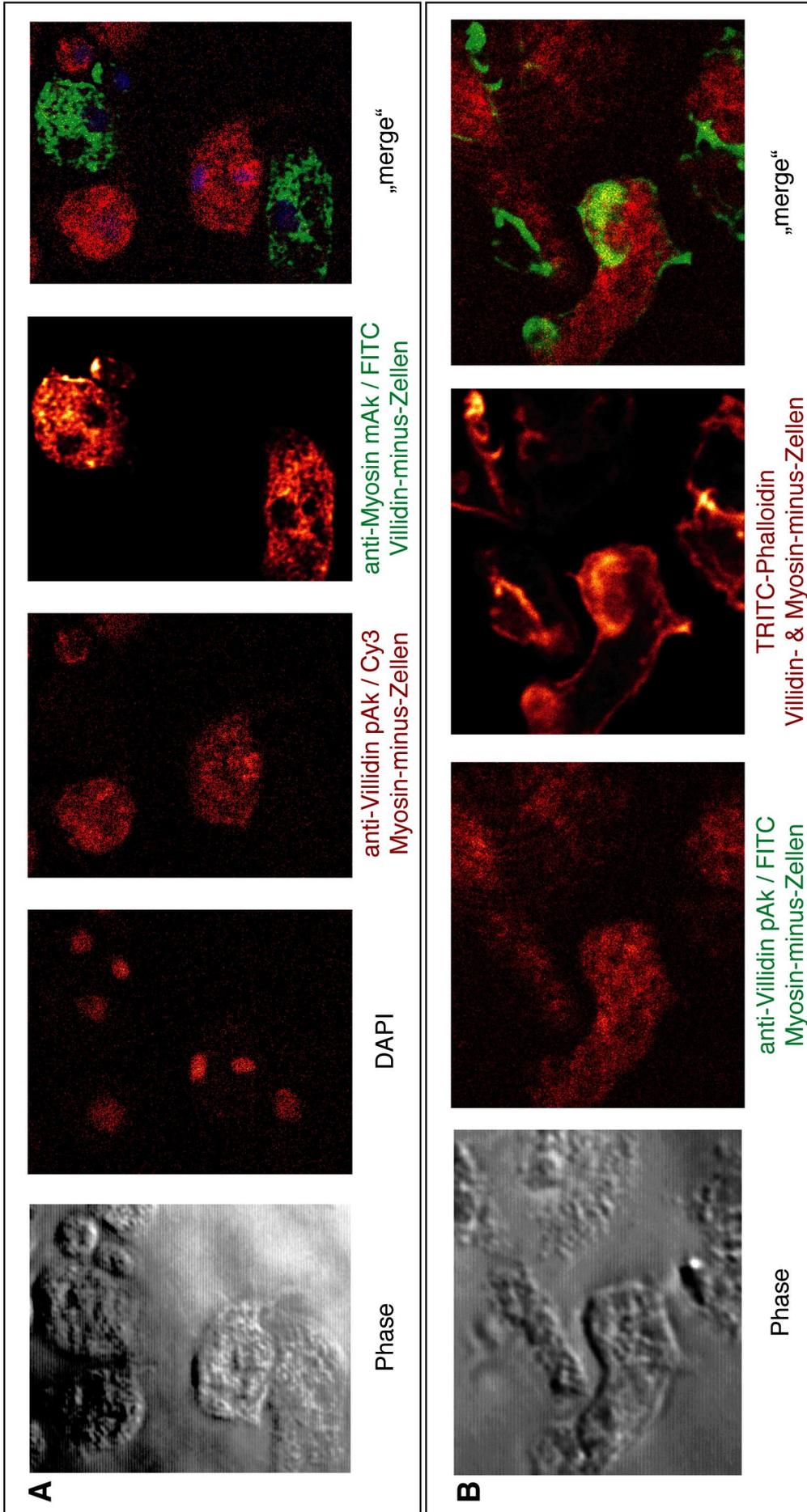


Abb. 14: Konfokale Mikroskopie der Lokalisation von Villidin mit anderen Proteinen und die Unterscheidung zwischen Villidin-minus und -positiven-Zellen. Dargestellt sind Projektionen aller durchgeführten Schnitte in eine Ebene. **(A-B):** Villidin-minus- und Myosin-minus-Zellen (= Villidin-positive-Zellen) wurden im Verhältnis 1:4 gemischt (6 h entwickelt). **(A)** Zur Lokalisation von Myosin wurde der monoklonale anti-Myosin Antikörper 21-96-3 verwendet. Zu sehen ist die Differenzierung zwischen Villidin- und Myosin-minus Zellen. **(B)** Aktin wurde durch TRITC-Phalloidin angefärbt. Die Akkumulation unterhalb der Plasmamembran ist deutlich zu erkennen.

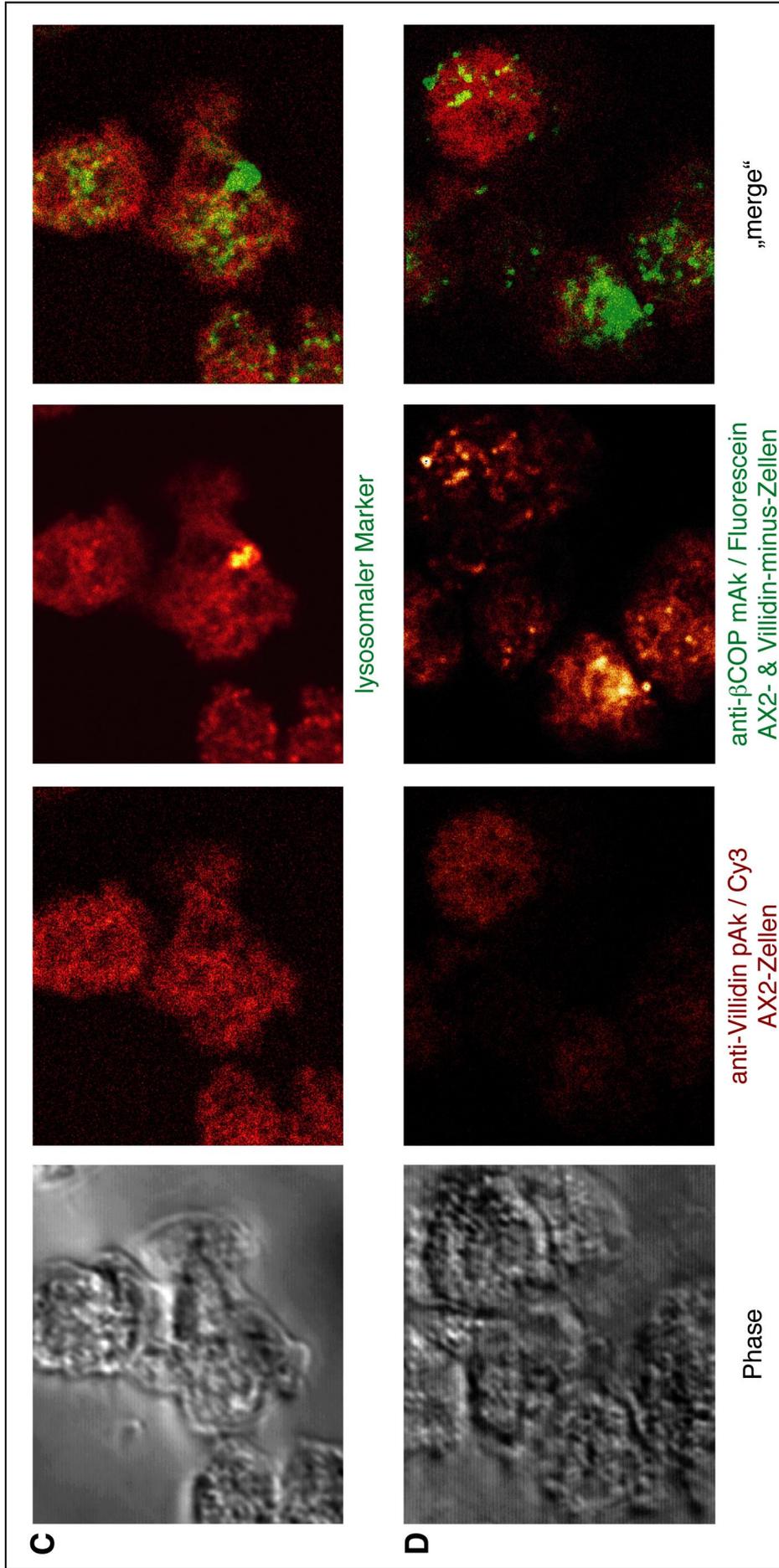


Abb. 14 (C-D): 1:4 Mischung von Villidin-defizienten- und AX2-Zellen (6 h entwickelt). **(C)** Lysosomaler Marker mAk 221-342-5. **(D)** MAk E5A3, der gegen das βCOP-Protein aus Mäusen gerichtet ist (COP1 "coatome"Komplex), markiert in *D. discoideum* ein ähnliches Protein. In der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie kann eine schwache Kollokalisierung mit Villidin angenommen werden.

Alle Experimente wurden zusätzlich mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie durchgeführt. Doch auch hier konnten keine auffallenden Lokalisationsmerkmale von Villidin beobachtet werden und es war nicht möglich, ein genaueres Bild der Villidin-positiven-Strukturen zu vermitteln (Abb. 14). Wenngleich keine eindeutige Kolo-kalisation von Villidin mit anderen Proteinen sichtbar wurde, bestätigte sich der klare Unterschied zwischen Villidin-minus-Zellen und Villidin-positiven Zelltypen (Abb. 14 A). Die Doppelmarkierung mit Aktin (Abb. 14 B) deutete zum Teil eine Kolo-kalisation mit Villidin an, was mit der Lokalisation von vilK1- und vilK2-GFP gemeinsam mit Aktin in der Zellperipherie konform geht. Eine schwache Kolo-kalisierung war mit dem anti- β COP mAk E5A3 in der konfokalen Laser-Scanning-Analyse zu erahnen (Abb 14 D). Die Kolo-kalisation ist bei einigen intensiv E5A3-markierten ringartigen Strukturen zu erkennen. Die Villidin-positiven-Strukturen erscheinen allerdings wesentlich feiner und punktartiger gestaltet. In Säuger-Zellen ist β -COP in Assoziation mit sekretorischen Vesikeln zu finden (Whitney *et al.*, 1995).

3.2.7.2 Intrazelluläre Verteilung der Villidin-GFP-Fusionsproteine

Wie die Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, lokalisiert das endogene Villidin-Protein an vesikel-ähnlichen Strukturen, die über das Zytosol meist homogen verteilt zu beobachten sind (Abb. 13-14). Um die intrazelluläre Verteilung der charakteristischen Villidin-Domänen innerhalb fixierter Zellen zu bestimmen und *in vivo* Studien durchzuführen, wurden GFP-Fusionsproteine mit ausgewählten Villidin-Fragmenten erzeugt (freundlicherweise durch A. A. Noegel zur Verfügung gestellt). Die Lage der in der PCR amplifizierten Sequenzabschnitte, die mit GFP fusioniert wurden, ist in Abbildung 21 schematisch dargestellt. vilK1-GFP beinhaltet die N-terminale „WD-repeat“-Region (As 1-600), vilK2-GFP schließt zusätzlich die PST-reiche Domäne ein (As 1-700) und vilK4-GFP beschränkt sich auf die Villin-Domäne (As 1000-1704). Die Expression im *Dictyostelium*-Stamm AX2 unterliegt der Kontrolle des Aktin 15-Promotors (pDEX-GFP-Vektor, „red-shifted GFP“, Westphal *et al.*, 1997), der sowohl in der Wachstumsphase als auch in der Entwicklung aktiv ist.

Lichtmikroskopische Aufnahmen von fixierten Zellen, welche die entsprechenden GFP-Fusionsproteine exprimieren, zeigten eine homogene, zytosolische Verteilung von vilK1-, vilK2- und vilK4-GFP, wie es auch beim endogenen Villidin zu beobachten ist. Insbesondere erinnert die homogene Verteilung von vilK4-GFP, die intrazelluläre Strukturen erkennen läßt, an die Lokalisation des endogenen Villidins (Abb. 15). Bei vilK1- und vilK2-GFP kommt es teilweise zu einer Anreicherung an der Zellfront. Mit Ausnahme von vilK1-GFP akkumulieren die Fusionsproteine im Nukleus (Abb. 15). Dies kann auf das kurze Peptidstück zwischen dem Villidin-Fragmenten und GFP zurückgeführt werden, da es nach Westphal *et al.* (1997) als Kernlokalisierungssignal fungieren kann. In sich entwickelnden Zellen (4 h) akkumuliert vilK1- und vilK2-GFP in Pseudopodien, nicht aber vilK4-GFP.

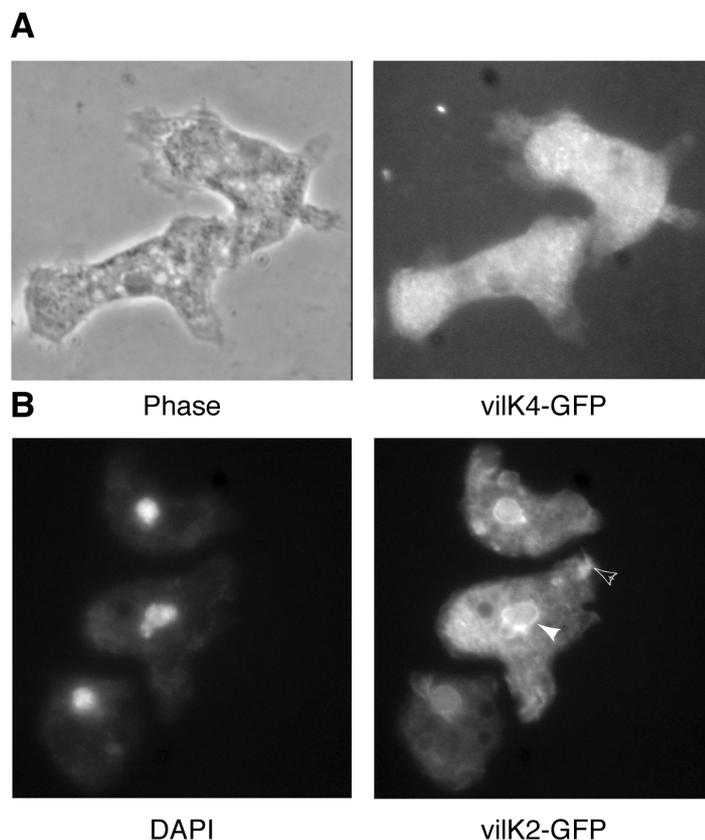


Abb. 15: Immunfluoreszenz-Untersuchungen der Villidin-GFP-Fusionsproteine exprimierenden Zellen.

Schematische Darstellung der Konstrukte in Abb. 21. VilK4- und vilK2-GFP exprimierende Zellen zeigen eine homogene, zytosolische Verteilung der Fusionsproteine. Für vilK2-GFP ist darüber hinaus eine Akkumulation an den Zellrändern zu beobachten (hier nur schwach zu erkennen, z. B. offene Pfeilspitze). **(A)** Die Lokalisation von vilK4-GFP an intrazellulären Strukturen erinnert an die Antikörper-Markierung des endogenen Villidins. **(B)** Außer vilK1-GFP neigen die Fusionsproteine zur Kernlokalisierung (weiße Pfeilspitze). Hier vilK2-GFP gezeigt.

Ferner wurden die Pinozytose und Phagozytose in fixierten Zellen untersucht. Bilder, die im konfokalen Mikroskop entstanden sind, zeigen im Vergleich zu lichtmikroskopischen Aufnahmen wesentlich deutlicher, die Lokalisation der Fusionsproteine während Pino- und Phagozytose. Die Aktin-Verteilung während dieser Zellprozesse wurde mit dem monoklonalen Act1 Antikörper (pinozytierende Zellen) bzw. mit Rhodamin-Phalloidin (phagozytierende Zellen) nachgewiesen. Sowohl vilK2-GFP als auch Aktin kolokalisieren an sich bildenden pinozytischen und phagozytischen Strukturen (Abb. 16). Diese Lokalisation der Villidin-„WD-repeat“-Domäne ist mit der von Coronin in *D. discoideum* vergleichbar.

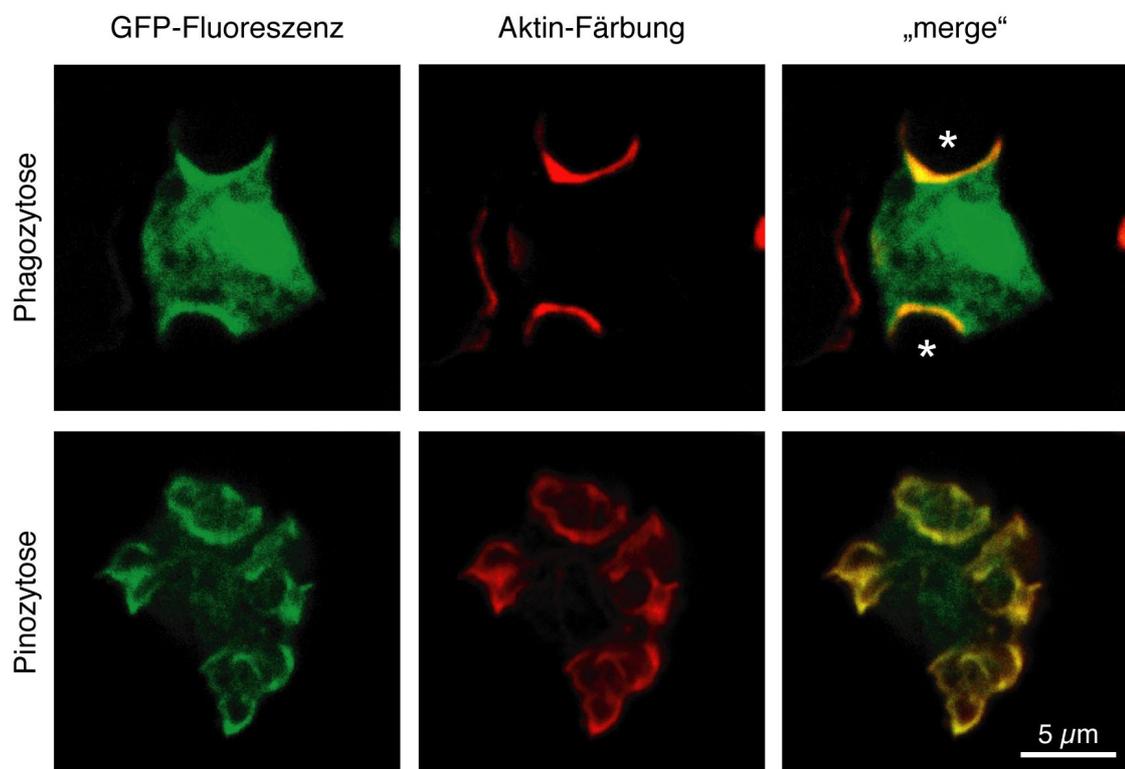


Abb. 16: Konfokale Mikroskopie zum Nachweis der Kolokalisation von vilK2-GFP mit Aktin.

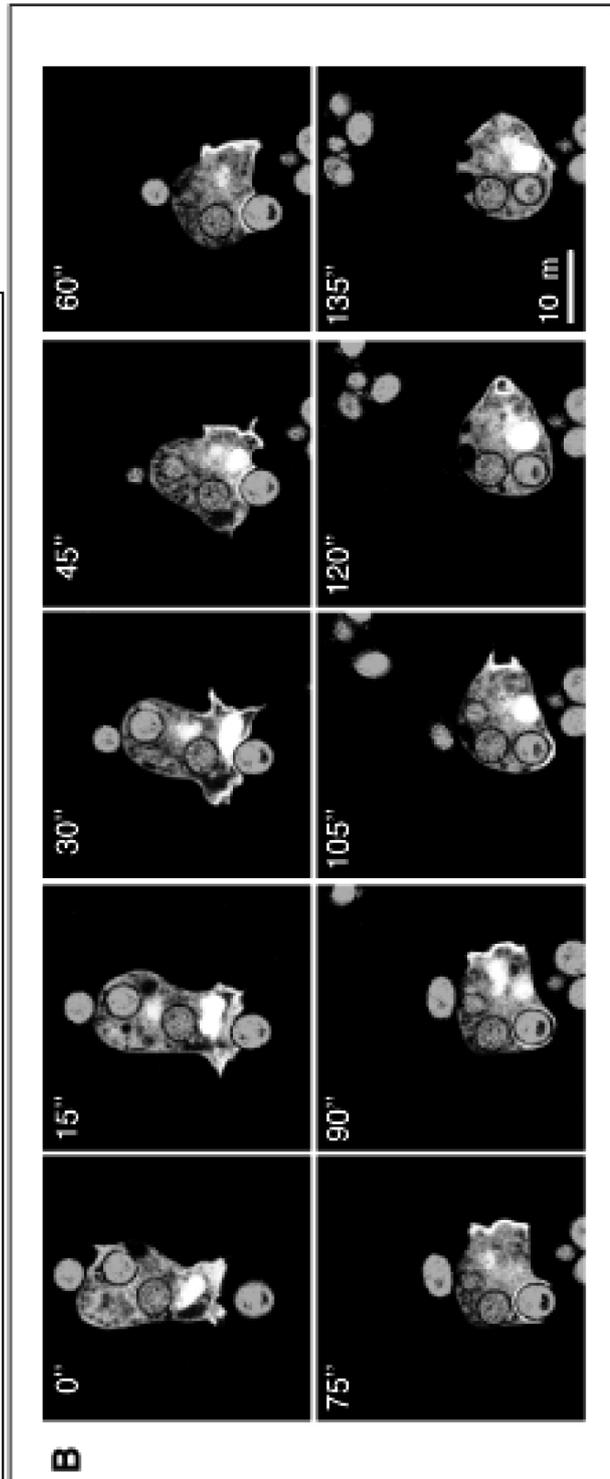
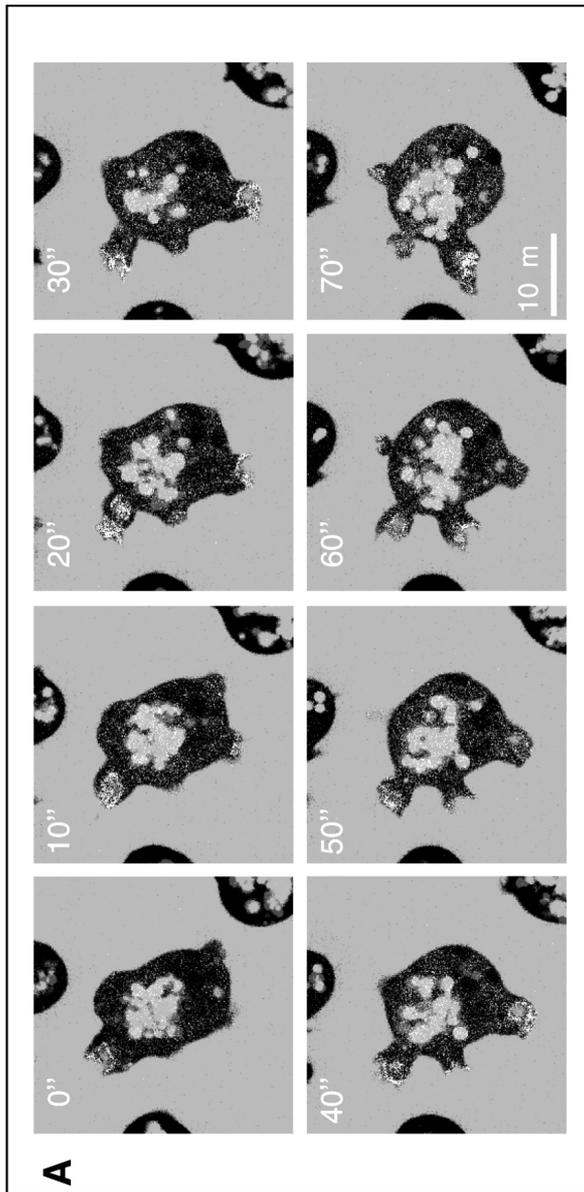
Schematische Darstellung des Konstruktes in Abb. 21. Die GFP-Transformanten wurden entweder zur Pinozytose in Medium belassen oder zur Untersuchung der Phagozytose (oben) mit unmarkierten Hefen für 15 min inkubiert. Pinozytose Zellen wurden mit kaltem Methanol und phagozytierende Zellen mit Pikriksäure/Paraformaldehyd fixiert und F-Aktin entweder mit dem mAk Act1 (Pinozytose) oder durch Rhodamin-Phalloidin-Färbung (Phagozytose) detektiert. Die Position der Hefen wird durch Sterne symbolisiert. Maßstab = 5 µm. Aktin lokalisiert zusammen mit vilK2-GFP an Phagozytose-Strukturen („phagocytic cups“) und in Makropinosomen. (Die gezeigten Strukturen waren durch eigene Versuche am Axiophot ebenfalls zu beobachten. Allerdings erwiesen sich Aufnahmen am konfokalen Mikroskop als deutlich besser. Die oben gezeigten Bilder wurden freundlicherweise von Dr. F. Rivero, Köln, zur Verfügung gestellt.)

Abb. 17: Konfokale Mikroskopie zur Analyse der Verteilung von viK2-GFP während Pinozytose und Phagozytose in lebenden Zellen.

(A) Um die Verteilung von viK2-GFP während der Pinozytose verfolgen zu können, wurden die Zellen zusammen mit TRITC-markierten Dextran inkubiert. Konfokale Bilder wurden in 10 sec Abständen aufgenommen. Gezeigt ist die Ausbildung eines Pinosoms, an welchem viK2-GFP akkumuliert.

(B) Phagozytische Aufnahme von Rhodamin-markierten Hefe-Zellen. Konfokale Bilder wurden alle 15 sec aufgenommen. Zu erkennen ist eine Akkumulation von viK2-GFP entlang der sich ausbildenden Struktur einer phagozytischen Tasche. In der Endphase der Aufnahme dissoziiert

das Fusionsprotein wieder (90-105 sec). (Aufnahmen wurden freundlicherweise von F. Rivero zur Verfügung gestellt).



Die Betrachtung lebender Zellen zeigte eine schnelle Anreicherung der Fusionsproteine vilK1-GFP und vilK2-GFP an der Plasmamembran und während Endo- und Phagozytose. Makropinozytose und Pinozytose sind zwei Zytoskelett-abhängige Mechanismen, durch welche in *Dictyostelium* Flüssigkeit aufgenommen wird. Die Verteilung von vilK2-GFP wurde in Zellen, die Makropinosomen ausbilden, untersucht (Abb. 17 A). Zunächst reichert sich das Fusionsprotein an den Bildungsstellen der zukünftigen Makropinosomen an. Bereits nach 10 Sekunden, sobald das Pinosom erscheint, kommt es zur Ausbreitung von vilK2-GFP entlang der becherförmigen Struktur. Während der Fusion des Pinosoms kommt es zur weiteren Akkumulation. Nach 50 bis 60 Sekunden verschwindet das Fusionsprotein wieder.

Auch während der phagozytischen Aufnahme von Hefepartikeln ist eine deutliche Lokalisation von vilK2-GFP zu beobachten (Abb. 17 B). Zunächst kommt es auch hier zur einer lokalen Anreicherung an der Kontaktstelle zwischen *Dictyostelium*-Plasmamembran und Hefe (15 und 30 sec). Das Protein lokalisiert an den phagozytischen Taschen („phagocytic cup“) und dissoziiert im Laufe der späten Aufnahmephase (90-105 sec). Danach ist vilK2-GFP noch kurze an der Plasmamembran zu beobachten und verschwindet dann vollständig.

3.2.8 Zellfraktionierung

Da in der Immunfluoreszenz keine Kolokalisation von Villidin mit bekannten vesikulären Markern zu beobachten war, aber die Villidin-positive-Färbung ein vesikuläres Erscheinungsbild zeigte, wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Ziel war es zu untersuchen, mit welchen Zellbestandteilen Villidin in der Fraktionierung zu finden ist. Außerdem sollte auf diesem Wege der mögliche Villidin-assoziierte Vesikeltyp näher charakterisiert werden. Hierzu erfolgte eine differentielle Zentrifugation auf einem diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (Abb. 18). Um zwischen Lysosomen und Plasmamembran unterscheiden zu können, wurden die Leitenzyme saure und alkalische Phosphatase verwendet. In den ersten Fraktionen von geringer Dichte (lysosomale Fraktion) zeigte die saure Phosphatase eine starke Aktivität (nicht gezeigt). Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde zusammen mit Membranen von mittlerer und hoher Dichte gefunden, die zum Membransystem der kontraktiven Vakuole und der Plasmamembran gehören (Weiner *et al.*, 1993).

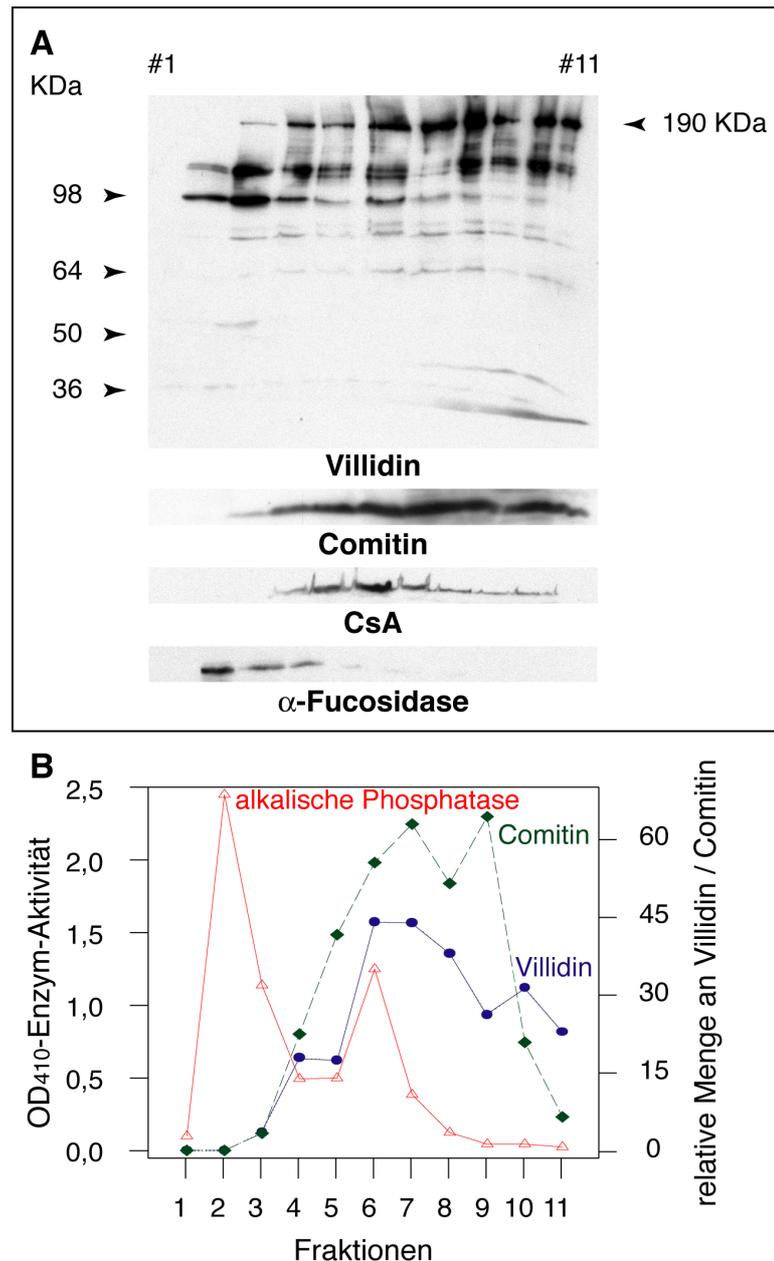


Abb. 18: Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation.

Entwickelte AX2-Zellen (t8) wurden mittels "freez thawing" geöffnet und die Membranfraktionen in einem Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Nach der Zentrifugation wurden 11 Fraktionen von 0 M (Fraktion #1) bis 2,49 M (Fraktion #11) entnommen. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und „Western-Blotting“ analysiert. Der Nachweis des Membran-assoziierten Comitín dient als Golgi-Marker, das Zelladhäsionsprotein CsA indiziert die Verteilung von Plasmamembranen und die α-Fucosidase ist ein lysosomaler Marker. **(A)** Verteilung von Villidin, Comitín, „Contact Site“ A und α-Fucosidase im Immunoblot. Die Spuren entsprechen Fraktion #1-#11. Villidin ist in Fraktionen mittlerer bis höchster Dichte zu finden. Für die Villidin-Abbauprodukte ist eine Verschiebung zu Membranfraktionen mittlere bis geringere Dichte zu erkennen. Villidin hat eine Gesamtgröße von etwa 190 kDa (Pfeilspitze re) **(B)** Die Verteilung von Plasmamembranen wurde durch Aktivitätsmessung des Leitenzymes alkalische Phosphatase (Plasmamembranen; rote Dreiecke) bestimmt. Die Verteilung von Villidin und Comitín (Golgi-Marker) wurde als Mittelwert aus drei Desitometrie-Messungen dargestellt. Auf der x-Achse sind die Saccharose-Fraktionen und auf der y-Achse die Phosphataseaktivität bzw. die relative Proteinmenge angegeben.

Die Fraktionen des Gradienten wurden daneben auch in Immunoblots unter Verwendung von Antikörpern gegen ausgewählte Proteine analysiert und die Verteilung der Proteine durch Densitometrie quantifiziert. Die Verteilung des Membran-assoziierten Proteins Comitin (Golgi-Marker) und dem Zelladhäsionsmolekül CsA („Contact site A“, Plasmamembran-Marker) entspricht dem Aktivitätsnachweis der alkalischen Phosphatase in Regionen mittlere und hoher Dichte. Der Nukleus und die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befinden sich in den Fraktionen höchster Dichte.

Villidin war nicht in den ersten Fraktionen zu finden und lokalisierte nicht zusammen mit dem lysosomalen Leitenzym α -L-Fucosidase. Vielmehr lag das Villidin-Protein ebenso wie Comitin und CsA in Bereichen von Membranen höherer Dichte vor. Für die Villidin-Degradationsprodukte zeigte sich eine Verschiebung zu Fraktionen von mittlere bis geringerer Dichte.

3.2.9 Gelfiltrationschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Da Villidin sehr Protease-sensitiv ist und es deshalb unter typischen nativen Bedingungen selbst unter Verwendung verschiedener Proteaseinhibitoren nicht möglich war, die Denaturierung des Proteins zu vermeiden, wurden Gelfiltrationsversuche unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (SDS-Säule). Ziel war es, die linearisierten Proteine der Größe nach zu trennen und gleichzeitig Proteaseaktivität zu verhindern. Die zu erwartende Villidin-Bande ist bei 190 kDa zu finden und entspricht der erwarteten Proteingröße. Doch trotz der denaturierenden Umgebung während des Zellaufschlusses sind auch hier Villidin-Abbauprodukte vorhanden. Sie eluieren gemeinsam mit dem vollständigen Villidin-Protein, doch die Elution ist aufgrund der geringeren Größe in Richtung späterer Fraktionen verschoben. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre die hohe Sensitivität des Villidins für proteolytischen Abbau. Vermutlich ist eine minimale Restaktivität der Proteasen in den Zellen genau im Moment des Zellaufschlusses ausreichend, um den Proteinabbau zu bedingen.

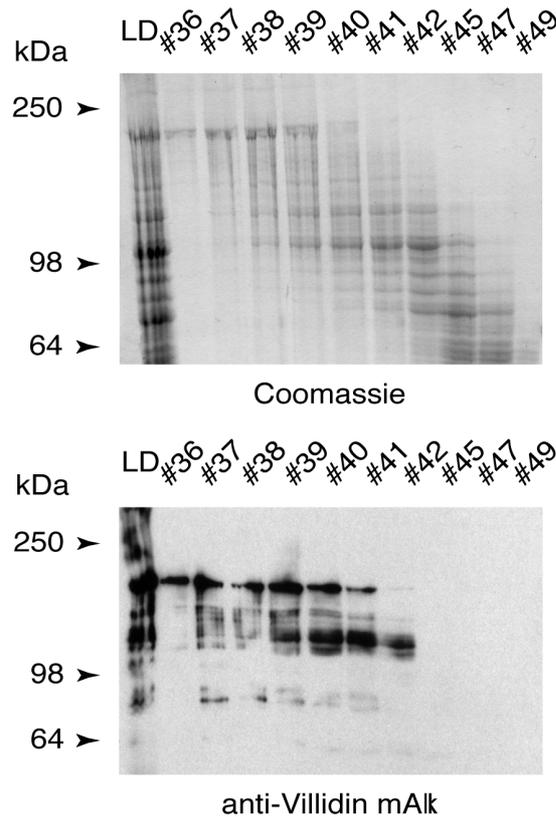


Abb. 19: Gelfiltrationschromatographie über eine SDS-Säule.

Entwickelte AX2-Zellen (8 h) wurden in SDS-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 100°C inkubiert. Die Lösung (LD) wurde anschließend auf eine mit SDS-Puffer äquilibrierte S 300 Gelfiltrationssäule geladen und die denaturierten Proteine ihrer Größe nach bei RT aufgetrennt. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE, Coomassie-Blau Färbung und Immunoblots mit dem monoklonalen Villidin Antikörper 257-6-2 analysiert. Villidin eluierte bei einem Volumen von 36 - 42 ml.

3.2.10 Charakterisierung von Villidin-minus-Mutanten

Die Abschaltung des Villidin-Gens durch ein Genaustauschexperiment konnte sowohl in der „Southern-, Northern- und Western-Blot“-Analyse als auch in der Immunfluoreszenz (Abb. 13-14) nachgewiesen werden. Die Entwicklung von Villidin-defizienten Mutanten ist nicht von der Entwicklung des Wildtyps zu unterscheiden. Villidin-minus-Mutanten bilden ebenso wie AX2-Zellen einen Fruchtkörper mit reifen Sporen aus. Auch im Wachstumsverhalten und hinsichtlich Pino- und Phagozytose zeigen die Mutanten keinen Unterschied zu Wildtyp-Zellen (nicht gezeigt). Da Villidin in größeren Mengen im Entwicklungsstadium des Pseudoplasmodiums exprimiert wird, wurde dieses Stadium näher untersucht. Das Pseudoplasmodium („slug“) ist in der Lage, durch die Fähigkeit zur Chemo- und Phototaxis gerichtete Bewegungen auf einer Oberfläche durchzuführen. Bei der Migration entsteht eine Schleimspur. Die Analyse der Schleimspuren und der entsprechenden phototaktischen

Antworten der Pseudoplasmodien wurde in einem Balkendiagramm abgebildet (Abb. 20). Hierfür wurden die welligen Spuren, welche mit Coomassie-Blau angefärbt wurden, anhand einer Gerade gemittelt und dann vermessen (Länge und Abweichungswinkel vom Ursprung). Pseudoplasmodien aus Wildtyp-Zellen hinterlassen lange (~15,8 mm), phototaktisch gerichtet Spuren. Die Spuren, welche die Mutanten hinterlassen, sind hingegen wesentlich kürzer (8,3 mm). Neben dieser Defizienz im Wanderverhalten zeigten die Villidin-Mutanten einen Phototaxis-Defekt. Die Bewegung in Richtung Lichtquelle erscheint ungerichteter und mit mangelnder Orientierungsfähigkeit, wohingegen sich Wildtyp-„slugs“ wesentlich gezielter auf eine Lichtquelle zubewegen. Dieser Defekt drückt sich durch eine größere Abweichung von der Lichtquelle aus (durchschnittliche Abweichung 30°) als es bei Wildtyp-„slugs“ der Fall ist (mittlere Abweichung 17,4°).

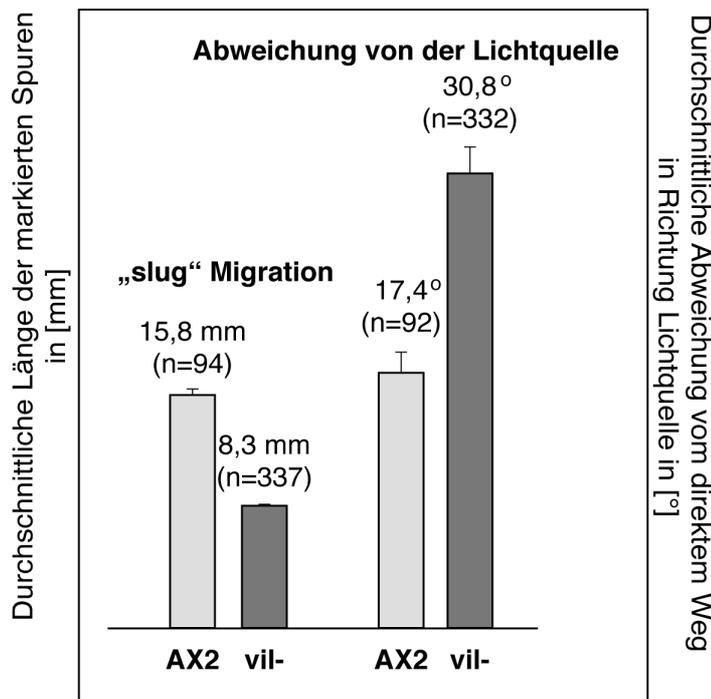


Abb. 20: Migrations- und Phototaxis-Verhalten von Wildtyp- und Villidin-defizienten-Pseudoplasmodien („slugs“).

Wildtyp- (AX2) und Villidin-minus-Zellen (vil-) wurden nach Vorschrift auf Phosphatagarplatten plaziert und für zwei Tage in einer Phototaxis-Kammer inkubiert. Die Schleimspuren der „slugs“ wurden auf einen Nitrozellulosefilter transferiert, mit Coomassie Blau gefärbt und anschließend analysiert. Das Zentrum der Applikation der Zellen wurde als Startpunkt der „slug“-Wanderung angenommen. Die durchschnittliche Länge der markierten Spuren ist in mm („slug“-Migration) und die durchschnittliche Abweichung vom direkten Migrationsweg in Richtung Lichtquelle in Grad (Abweichung von der Lichtquelle) angegeben. „n“ ist die Anzahl der analysierten Migrationsspuren.

3.2.11 Suche nach potentiellen Villidin-Bindungspartnern

Mit dem Ziel, Interaktionspartner von Villidin zu identifizieren, wurden neben Affinitätschromatographie über eine mit rekombinantem Villidin-„headpiece“-Protein gekoppelte NHS-Säule, auch Fusionsproteine für einen „Yeast-Two-Hybrid-screen“ erzeugt. PCR-Produkte, die mit charakteristischen Villidin-Domänen korrespondieren (Abb. 21), wurden N-terminal mit der DNA-Binde-Domäne (DNA-BD) fusioniert, um eine potentielle „Yeast-Two-Hybrid“-Interaktion mit einem anderen Protein, dem die aktivierende Domäne (AD) anhängt, nachweisen zu können. Die in Abbildung 21 dargestellten Villidin-Fragmente, wurden zum einen mit einer GFP-Kodierungssequenz fusioniert, zum anderen in den pAS2-Vektor kloniert, der die Fusion mit der DNA-Binde-Domäne ermöglicht. vilK1 beinhaltet die „WD-repeat“-Region von As 1-600, vilK3 umspannt das mittlere Villidin-Sequenzstück (As 700-1000), und vilK4 repräsentiert die Villin-Homologie (As 1000-1704). Das vilK2-Fragment wurde ausschließlich zur GFP-Fusion verwendet. Mit dem DNA-BD-Villidin-Fusionsprotein („bait“) sollten aus einer *Dictyostelium*-AD-„library“ (pACT2-Vektor) Villidin-Bindungspartner „gefischt“ und weiter beschrieben werden. Wie vorausgehende Autoaktivitätstest zeigten, erwies sich nur das vilK4-Konstrukt geeignet für die „Two-Hybrid“-Interaktion. Die Fusionsproteine vilK1 und vilK2 führten bereits in Abwesenheit von AD-Fusionsproteinen, autoaktiv zu einer Blaufärbung der Hefekolonien. Alle „Two-Hybrid“-Studien wurden anhand des Clontech-Produkt-Protokolls (angelehnt an Chien *et al.*, 1991 und anderen) durchgeführt. Als Wirtstamm diente der Y190 Hefestamm, der für den „library-screen“ mit vilK4 sowohl sequentiell wie simultan mit den beiden Plasmid-Typen (pAS2-DNA-BD-vilK4 und pACT2-AD-„library“) transformiert wurde. Die vilK4 exprimierenden Zellen, bildeten kleine Kolonien mit Wachstumsverzögerung aus. Die Kotreformationseffizienz der „library“-DNA in die kompetenten vilK4-Transformanten lag auch nach zahlreichen Optimierungsversuchen im Vergleich zu Kontrolletransformationen mit einem NCAP-DNA-BD-Fusionskonstrukt, weit unter der empfohlenen Größe von 1×10^4 cfu/ μ g DNA (cfu: „colony forming unit“). Die Kultivierung des vilK4/„library“-Transformationsansatzes auf Leu⁻, Trp⁻, His⁻-Platten brachte sehr kleine und wenige Kolonien (0.3×10^3 cfu/ μ g DNA) hervor. Für einen repräsentativen „library-screen“ müßten mindestens 1×10^6 Kolonien erfaßt werden. Es war nicht möglich, mit dem hier verwendeten vilK4-„Yeast-Two-Hybrid“-Konstrukt oder mittels affinitätschromatographischer Analysen (mit rekombinantem Villidin-„headpiece“-Protein gekoppelte NHS-Säule) einen Villidin-Bindungspartner zu identifizieren.

Durch Immunpräzipitationsversuche sollte darüber hinaus versucht werden das endogene Villidin-Protein aus *D. discoideum* partiell anzureichern. Zellhomogenate bzw. zytosolische Überstände wurden mit Villidin-Antikörpern und Protein A-Sepharose nach Vorschrift inkubiert. Der *Zentrifugationsüberstand* wie die einmal gewaschenen Sedimente wurden mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Immunoblots analysiert. Mit dem monoklonalen Antikörper 257-6-2 war es auch unter Verwendung von aufgereinigten IgGs nicht möglich Villidin im nicht-degradiertem Zustand zu präzipitieren. Das Villidin-Protein reagiert äußerst sensitiv auf proteolytischen Abbau und die längeren Inkubationszeiten im Rahmen der Immunpräzipitation, auch unter Zugabe verschiedener Proteaseinhibitoren bedingen die Villidin-Degradation.

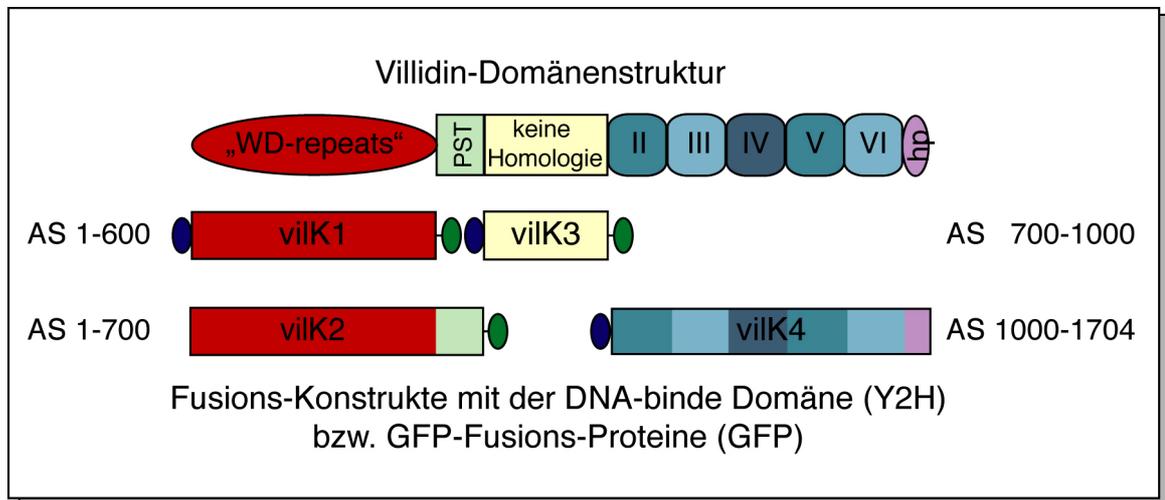


Abb. 21: Schematische Darstellung der Villidin-Konstrukte vilK1, vilK2, vilK3 und vilK4 für das „Yeast-Two-Hybrid“-System und die GFP-Fusion im Vergleich zu der vollständigen Villidin-Sequenz.

Die gesamte Villidin-Proteinsequenz wird in dieser Abbildung mit ihrer Domänenstruktur schematisch dargestellt. Die Konstrukte werden durch Balken repräsentiert. PCR-Produkte, die den abgebildeten Sequenzabschnitten entsprechen, wurden zum einen in den GFP-Fusionsvektor kloniert, der die Mutation S65T enthielt (Westphal et al., 1997), und zum anderen in den pAS2 Vektor, der die DNA-Binde-Domäne (DNA-BD) für das „Yeast-Two-Hybrid“-System (Y2H) beinhaltet (nach Harper et al., 1993) (blaue Ovale). VilK2 wurde ausschließlich mit GFP (grünes Oval) fusioniert (vilK2-GFP). Bei vilK1, vilK2 und vilK3 handelt es sich um eine C-terminale GFP-Fusion, bei vilK4 um eine N-terminale. Die Linie zwischen GFP und dem vilK2-Fragment symbolisiert das typische kurze Peptidstück zwischen GFP und klonierter Sequenz. Nach Westphal et al. (1997) kann diese Peptidsequenz als Kernlokalisierungssignal fungieren.

3.3 Molekularbiologische Charakterisierung von Profilin III

3.3.1 Sequenzanalyse von Profilin III

Im Zuge einer Datenbankrecherche mit den bekannten Profilin I und II-Sequenzen aus *D. discoideum* konnte eine Sequenz identifiziert werden, die eine weitere Profilin-Isoform repräsentiert. In der Datenbank des *Dictyostelium*-Genomprojektes Jena befand sich der Klon JC2c173c02.r1, der die vollständige Sequenz beinhaltet, welche eine signifikante Homologie zu Profilin I und II aufwies. Der Klon wurde zur Kontrolle mit pUC19-Standardsequenzierprimern und Profilin III spezifischen Primern sequenziert. Die komplette Nukleotidsequenz wie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz von Profilin III ist in Abbildung 22 dargestellt. Daß der Sequenzbeginn korrekt ist, wird zum einen dadurch belegt, daß mit dem ATG ein 381 Bp langer, offener Leserahmen beginnt, zum anderen liegt in 5'-Richtung vor dem Gen eine für *Dictyostelium* typische intergenische Region mit auffallend hohem AT-Gehalt (nicht gezeigt). Das offene Leseraster endet mit einem TAA Stopkodon, welches in *Dictyostelium* am häufigsten auftritt (Sharp und Devine, 1989). Die abgeleitete Aminosäuresequenz umfaßt 126 Aminosäurereste. Die theoretische Betrachtung mit dem Peptidesort-Programm (UWGCG) ergab ein einfach negativ geladenes Protein mit einem rechnerisch ermittelten Molekulargewicht von 13,3 kDa und einem pI von 5,80.

Durch einen computergestützten Vergleich (ClustalW, BioEdit v4.7.8) der drei *Dictyostelium* Profilin Isoformen konnte die Homologie in Form eines direkten Sequenzvergleiches dargestellt werden (Abb. 23). Die prozentualen Werte des Sequenzvergleichs mit dem Bestfit-Programm wurden in Tabelle 1 gegenübergestellt. Profilin III ist zu Profilin II etwas ähnlicher als zu Profilin I. Die beiden ersten Isoformen zeigen zueinander die größte Homologie. Wie in den beiden anderen Profilinen sind in der Profilin III-Sequenz ebenfalls die N-terminalen aromatischen Aminosäuren W xx Y x D (As 3-8) zu finden, deren Bedeutung für die poly-L-Prolin-Bindung nachgewiesen wurde (Lee *et al.*, 2000; Lu und Pollard, 2001). Profilin II enthält am C-terminalen Ende die hochkonservierte Aminosäurefolge LADY, die in zahlreichen Profilinen zu finden ist und mit der Aktin-Interaktion in Zusammenhang gebracht wird (Vandekerckhove, 1989; Lu und Pollard, 2001). In Profilin I und III, finden sich allerdings mit LAGY eine Modifikation des entsprechenden Sequenzabschnittes. Anstelle der Aminosäure Lysin K114, die in Profilin II eine wichtige Rolle für die G-Aktin-Bindung spielt (Lee *et al.*, 2000), findet sich in Profilin III Alanin (A114). Wie die folgenden Versuche zeigten, nimmt diese Substitution keinen merklichen Einfluß auf die Aktin-Bindung.

```

1  ATGACTTGGCAAGCATATATTGATACTAATCTTATTGGTTCAGGATTTATTTTCAGCACAA
1  M T W Q A Y I D T N L I G S G F I S A Q

61  ATTCTTAGTTCAGCAGATGGATCCTCATGGGCAAATTCAAATGGATTTTCAGTTAGCGCC
21  I L S S A D G S S W A N S N G F S V S A

121 ACTGAAGCCCAACATATCCTTTCTTGTTTTAAAGATTCAAATAAAGCTTCAGCAATGGGT
41  T E A Q H I L S C F K D S N K A S A M G

181 ATCACTATCAATAATGTTAAAACTTTGTATTTAAAGCTGACGATAAATCCATATACGCA
61  I T I N N V K N F V L K A D D K S I Y A

241 AAGAAAGATGCTGGTGGTGTAGTTTTAGTAAAAACAAATCAAACCATTTTAGTTGCAGTT
81  K K D A G G V V L V K T N Q T I L V A V

301 TATAATAGTAATCTTCAACCAGGTGCTGCTGCTAATGCTTGTGAAGCCCTTGGTGATTAT
101 Y N S N L Q P G A A A N A C E A L G D Y

361 TTAAGAGAACAAGGTTTCTAA
121 L R E Q G F *
    
```

Abb. 22: Vollständige Nukleotidsequenzen des Profilin III-Gens und die abgeleitete Aminosäuresequenz.

Das für *D. discoideum* typische TAA-Stop-Codon ist durch ein Sternsymbol gekennzeichnet. Die kodierende DNA-Sequenz ist in der oberen Zeile dargestellt, die untere Zeile zeigt die daraus resultierende Proteinsequenz. (Datenbank-Zugriffsnummer: AJ430084)

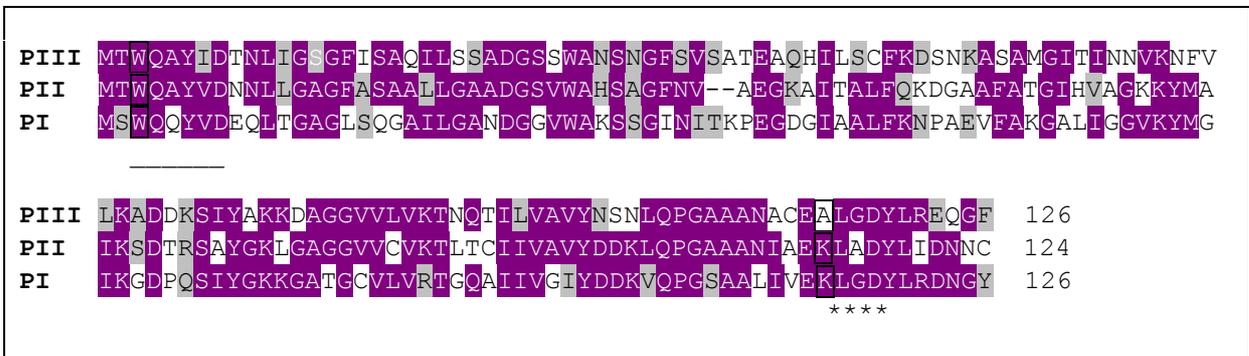


Abb. 23: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Profilin III mit den beiden homologen Profilin-Isoformen II und I (*D. discoideum*).

Die Aminosäuresequenz von Profilin III wurde von der Nukleotidsequenz abgeleitet. Die Proteine wurden in ihrer ganzen Länge miteinander verglichen und identische Aminosäuren farbig unterlegt. Das N-terminale poly-L-Prolin-Bindemotiv ist unterstrichen, das G-Aktin-Bindemotiv mit Sternern markiert. Die für Profilin II wichtigen Aminosäuren zur Bindung von Aktin- (K114) und poly-L-Prolin (W3) (Lee et al., 2000) wurden durch Rahmen gekennzeichnet.

Tab. 1: Vergleich der Profilin III Sequenz mit den beiden bekannten Profilin-Isoformen in *D. discoideum*.

Die Proteinesequenzen wurden mit dem Programm Bestfit (UWGCG) verglichen.

Protein	Vergleich der Aminosäuresequenzen		Vergleich der Nukleotidsequenzen
	Homologie [%]	Identität [%]	Homologie/Identität [%]
PI / PII	60,66	56,56	62,47
PI / PIII	49,21	43,65	56,38
PII / PIII	57,14	52,10	61,22

Die große Homologie innerhalb der Gruppe der Profiline spiegelt sich nicht nur in der Sequenz wieder. Die dreidimensionale Struktur zahlreicher Profiline wurde durch NMR- und Kristallisationsstudien ermittelt und es zeigte sich eine starke strukturelle Konservierung unabhängig von vorhandenen Sequenzunterschieden (Vinson *et al.*, 1993; Metzler *et al.*, 1993; Fedorov *et al.*, 1994; u.v.a.). Mit dem Programm Swiss Pdb Viewer v3.7b2 wurde die in Abbildung 33 (B) mögliche strukturelle Gestaltung von Profilin III erstellt. Dieses Model demonstriert die Wahrscheinlichkeit, daß auch diese neue Profilin-Isoform strukturell hoch konserviert ist.

Die große Gruppe der Profiline ist in allen untersuchten eukaryontischen Organismen vertreten. Einige der in der Datenbank verfügbaren Proteinsequenzen aus dieser Gruppe wurden unter Verwendung des Programmes ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/service/stmp>) verglichen, und die erhaltenen Werte zur Erstellung eines phylogenetischen Baumes (Abb. 24) mit dem Programm PHYLIP verwendet (Felsenstein, 1989). Profilin III findet sich in signifikanter Nähe zu den beiden *D. discoideum*-Profilinen innerhalb der Gruppe der Amöben. Die Ausnahme bildet das Profilin aus *E. histolytica*, da dieses phylogenetisch von der Gruppe der amöboiden Lebewesen entfernt eingereiht wird und einen gemeinsamen Evolutionsursprung mit den Säugern teilt. Die *Dictyostelium*-Profiline sind nach der Entstehung der Hefe *S. cerevisiae* eingegliedert, dennoch liegen sie nahe am evolutionären Ursprung. Dies stimmt mit dem vermuteten frühen Entstehungsursprung von *Dictyostelium* überein, der nach der Entwicklung der Hefen, aber vor der evolutionären Aufzweigung der Vielzeller (Metazoen) angesiedelt wird (Loomis und Smith, 1995). *Dictyostelium* Profilin III zweigt sich von Profilin II ab, was mit der etwas größeren Sequenzhomologie konform geht. Unter evolutionsgeschichtlichen Aspekten betrachtet ist es das „jüngste“ Profilin in *D. discoideum*.

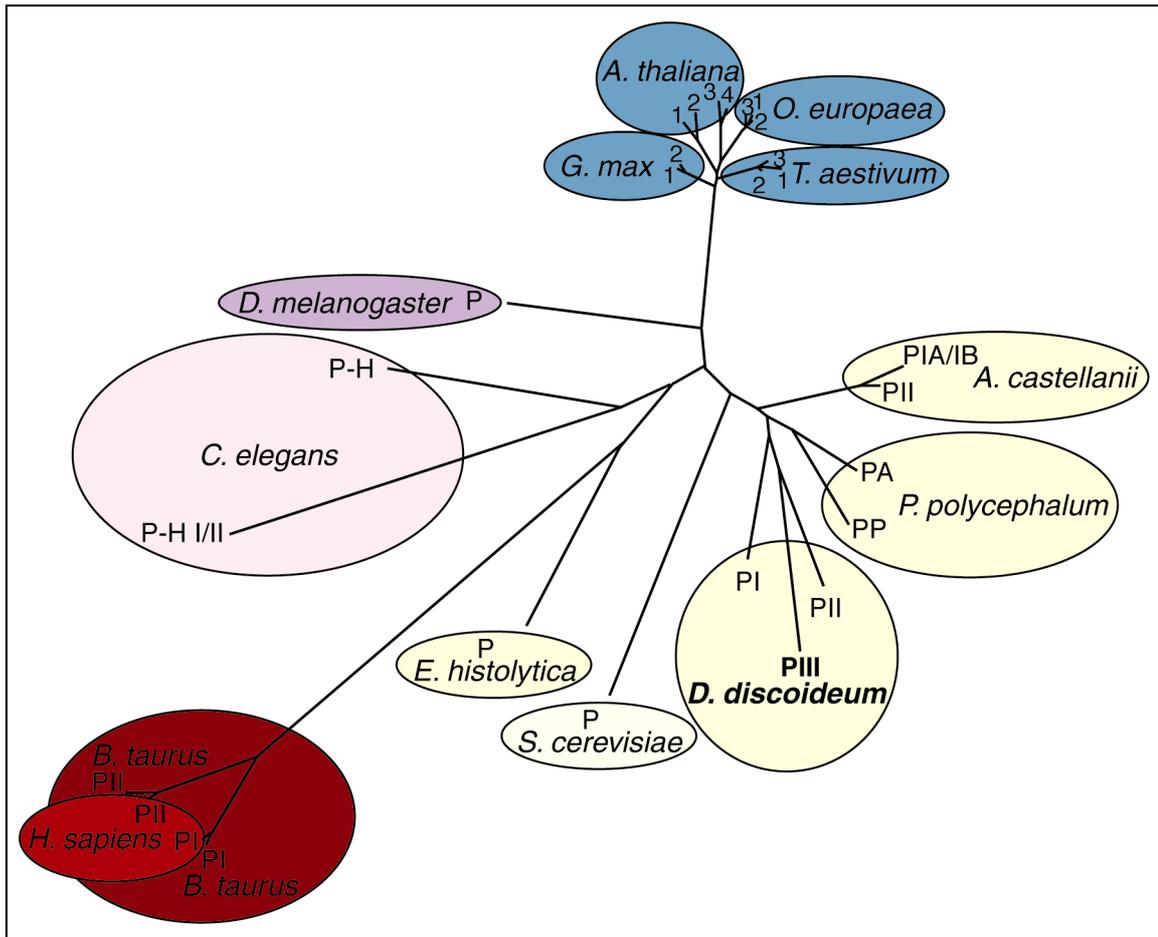


Abb. 24: Phylogenetischer Vergleich von Profilin III mit den Proteinen aus höheren Eukaryonten.

Der phylogenetische Baum wurde mit dem Programm PHYLIP mit einer Kombination der „least squares“ und „Fitch-Margoliash“ Algorithmen errechnet. Der zugrundeliegende Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW erstellt. Die hierzu verwendeten Profilin-Sequenzen (P) und ihre Datenbank-Zugriffsnummern (SWISS-PROT) sind: *Acanthamoeba castellanii* (Amöbe): PIA/IB (P07763), PII (P19984); *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand): P1 (Q42449), P2 (Q42418), P3 (Q38904), P4 (Q38905); *Bos taurus* (Rind): PI (P02584); PII (Q09430); *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm): P-Homolog zu PI und PII (Q20025), P-Homolog (Q21193); *Dictyostelium discoideum* (Amöbe): PI (P26199), PII (P26200); *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege): P (P25843); *Entamoeba histolytica* (Entamoeba): P (p49230); *Glycine max* (Sojabohne): PI (O65809); PII (O65810); *Homo sapiens* (Mensch): PI (P07737); PII (P35080); *Olea europaea* (gewöhnliche Olive): P1 (O24169), P2 (O24170), P3 (O24171); *Physarum polycephalum* (Amöbe): PA (P22271), PP (P18322); *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe): P (P07274); *Triticum aestivum* (Weizen): P1 (P49232), P2 (P49233), P3 (P49234).

3.3.2 Analyse des Profilin III-Gens in *D. discoideum*

Zur Analyse des Profilin III-Gens im *Dictyostelium* Genom wurde genomische DNA von AX2-Zellen und von Profilin II/I-minus-Mutanten (pII/Ia2) mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden unter nieder- und hochstringenten Bedingungen (30% und 50% Formamid) mit einer radioaktiv markierten Profilin III-Sonde (PCR-Produkt) hybridisiert. Introns zeichnen sich in *Dictyostelium* durch AT-Reichtum aus. In der Profilin III-Sequenz konnten keine identifiziert werden. Unter Verwendung des Restriktionsenzymes EcoRV, das kein Sequenzmotiv in der kodierenden DNA von Profilin III erkennt, zeigte sich nur eine Bande (Abb. 25 A). In den mit HindIII oder EcoRV/HindIII behandelten Ansätzen sind jeweils zwei Banden zu erkennen, da eine HindIII-Schnittstelle innerhalb des Profilin III-Gens vorhanden ist. Der Verdau mit BamHI führt offensichtlich zu einem sehr großem DNA-Stück, das unter den verwendeten Transfer-Bedingungen nicht mehr nachweisbar war. Die „Southern-Blot“-Analyse weist darauf hin, daß Profilin III durch ein einzelnes Gen kodiert wird. Das Bandenmuster ist unabhängig von der Stringenz und erscheint spezifisch für Profilin III. Deutlich wurde dies durch die Detektion identischer Banden nach analogen Verdau von Wildtyp- wie Mutanten-DNA und durch eine vorausgehende Hybridisierung bei niedriger Stringenz (30% Formamid), um kreuzreagierende Banden ausschließen zu können. Die Profilin II/I-Doppelmutante pII/Ia2 wurde durch Transformation eines Profilin II-defizienten Klons mit einem Profilin I-„antisense“-Konstrukt erzeugt, so daß das endogene Profilin I-Gen durch homologe Rekombination zerstört wurde (Haugwitz *et al.*, 1994). Die Kontrollhybridisierung mit einer Profilin I-Sonde (PI-Insert aus pDEXRHs; Haugwitz *et al.*, 1994), nach Entfernen der radioaktiven Profilin III-Sonde („Strippen“ des „Southern-Blots“ mit 0,05 x SSC; 0,01 M EDTA; pH 8; + 0,1% SDS) (Abb. 25 B) bestätigte die Spezifität der Profilin III-Banden, da das entsprechende Bandenmuster sich deutlich vom Profilin III spezifischen Muster unterscheidet.

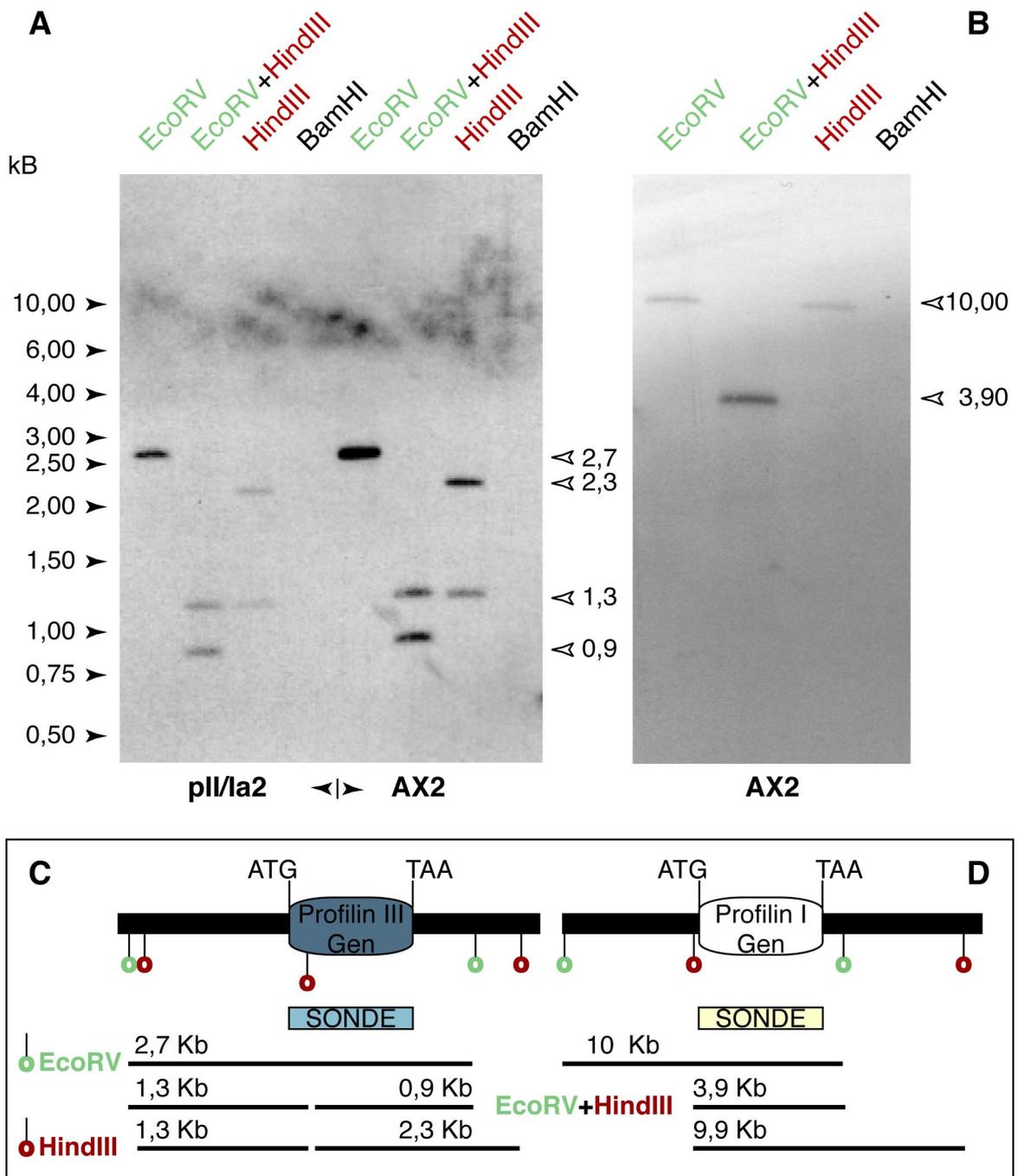


Abb. 25: „Southern-Blot“ mit restriktionsverdauter genomischer DNA aus AX2-Zellen und aus der Profilin-Doppelmutante pII/la2.

Die genomische DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. **(A)** Die radioaktive Markierung erfolgte durch Hybridisierung mit einer Profilin III-Sonde und **(B)** einer Profilin I-Sonde. **(C-D)** Die Positionen der Restriktionsstellen sind schematisch dargestellt. Die Positionierung der Schnittstellen innerhalb des Genoms (breiter schwarzer Balken) ist fiktiv. Die durch den entsprechenden enzymatischen Verdau entstandenen DNA-Fragmente, welche durch die jeweilige Sonde detektiert werden, sind als schmale Balken symbolisiert.

3.3.3 Nachweis der Genexpression durch RT-PCR

Um zu zeigen, daß das Profilin III-Gen in *D. discoideum* exprimiert wird, wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien von AX2-Zellen und Profilin II/I-minus-Mutanten (pII/Ia2) isoliert und in der „Northern-Blot“-Analyse mit einer radioaktiv markierten Profilin III-Sonde (PCR-Produkt) hybridisiert bzw. für RT-PCR-Analysen verwendet. Für den Northern-Blot (nicht gezeigt) wurden im Agarosegel 20-30 µg Gesamt-RNA pro Gelspur geladen und nach elektrophoretischer Trennung auf eine Nylonmembran transferiert. Das zu erkennende radioaktive Detektionssignal, blieb auch nach verschiedenen Optimierungsversuchen sehr schwach. Es war zu vermuten, daß das Profilin III Gen in allen Entwicklungsstadien transkribiert wird, aber die mRNA nur in wenigen Kopien in der Zelle zu finden ist. Durch sensitive RT-PCR an Gesamt-RNA konnte diese Annahme bestätigt werden (Abb. 26). Das Amplifikationsprodukt stimmt gut mit der erwarteten Größe überein (PIII-Kodierungssequenz: 0,381 kB). Eine Entwicklungsregulation der mRNA-Expression war nicht nachweisbar. Die Untersuchung der Profilin II/I-defizienten-Doppelmutante zeigte, daß die Profilin III spezifische mRNA in diesen Zellen exprimiert wird (Abb. 26 B). Da es bei dieser Mutante zu einem Block der Entwicklung vor der Fruchtkörperausbildung kommt, konnte RNA nur aus frühen Entwicklungsstadien analysiert werden. Unter Verwendung von PII-spezifischen Primern (nicht gezeigt) in Kontrollansätzen wurde in Wildtyp-RNA ein entsprechendes PCR-Produkt im Agarosegel nachgewiesen. Aus pII/Ia2-RNA konnte Profilin II nicht amplifiziert werden. Um auszuschließen, daß anstelle des RNA-Nachweises DNA amplifiziert wird (DNA-Kontamination der Gesamt-RNA-Präparationen), wurde in Kontrollansätzen auf die Aktivierung der reversen Transkriptase (rT) verzichtet. Dadurch kommt es zu keiner Rücktranskription der „messenger“-RNA in cDNA und die Matrize für die PCR-Amplifikation sollte folglich nicht vorhanden sein. Das amplifizierte Produkt dieser Kontrollen ist vergleichsweise schwach, so daß davon auszugehen ist, daß es sich in den rT-aktivierten Reaktionen um einen echten mRNA-Nachweis handelt (Abb. 26 A). Wie die RT-PCR zeigte, wird das Profilin III-Gen in Wildtyp- als auch in pII/Ia2-Zellen exprimiert.

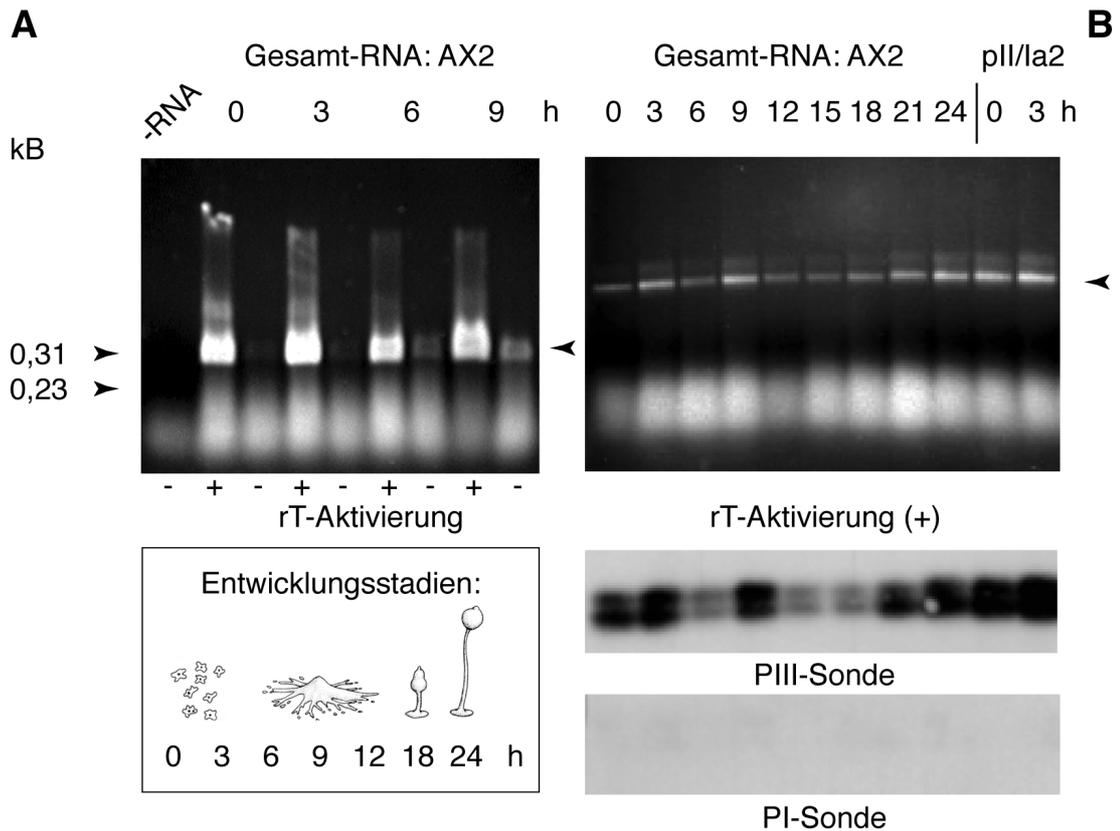


Abb. 26: RT-PCR mit Gesamt-RNA aus AX2 und Profilin-minus-Doppelmutanten.

Dictyostelium Amöben (AX2 und pII/la2) wurden auf Phosphatagarplatten zur Entwicklung gebracht, zu den angegebenen Zeitpunkten abgeerntet und zur RNA-Isolierung verwendet. Es wurden spezifische Primer für Profilin III eingesetzt. **(A)** Die Synthese der cDNA-Matrize erfolgte durch die Aktivierung der reversen Transkriptase bei 50°C (+ rT Aktivierung). Anschließend wurde die DNA-Polymerase initial durch Inkubation bei 95°C aktiviert, wobei gleichzeitig die reverse Transkriptase inaktiv wird. Um sicherzustellen, daß es sich um einen mRNA-Nachweis handelt und keine Amplifikation der PIII-Gensequenz stattfindet (infolge einer möglichen DNA-Verunreinigung in der Gesamt-RNA-Lösung), wurde in Kontrollansätzen auf die rT-Aktivierung verzichtet (- rT-Aktivierung). Eine weitere Negativ-Kontrolle ohne RNA-Zugabe (- RNA) diente hier zum Vergleich. Das Signal in den (-) Ansätzen ist im Vergleich zu den Reaktionen mit vorausgehender rT-Aktivität viel schwächer, so daß es sich für Profilin III um einen echten mRNA-Nachweis handelt. Die untere Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Entwicklungsstadien von *D. discoideum*. **(B)** Sowohl in Wildtyp-RNA als auch in RNA aus der Profilin II/I-Doppelmutante konnte mit den PIII-spezifischen Primern mRNA nachgewiesen werden. Das Agarosegel wurde „geblottet“ und mit einer radioaktiven PIII-Sonde sowie anschließend mit einer PI-Sonde hybridisiert. Somit konnte die Spezifität des PIII-Signals gezeigt werden. Wurden in der RT-PCR PII-spezifische Primer verwendet, zeigte sich nur ein Signal unter Verwendung der Wildtyp-RNA (nicht gezeigt). Das Profilin III-Gen wird hingegen in Wildtyp- als auch in pII/la2-Zellen exprimiert (Pfeilspitze).

3.4 Biochemische und zellbiologische Charakterisierung von Profilin III

3.4.1 Expression und Extraktion von rekombinantem Profilin III

Profilin III wurde in *E. coli* exprimiert (Abb. 27 A), um rekombinantes Material für Funktionsanalysen und zur Immunisierung von Mäusen zu erhalten. Das Protein wurde bereits ohne IPTG-Induktion produziert. Die Expression konnte leicht gesteigert werden, wenn sich die Zellen für 4-6 h vermehren konnten. Das rekombinante Produkt umfaßt die gesamte Länge von Profilin III von Aminosäure 1 bis 126 und hat ein Molekülmasse von etwa 13 kDa, was der erwarteten Größe entspricht. Nach Öffnen der Zellen lag das Protein zum Großteil unlöslich, in „inclusion bodies“ eingeschlossen vor. Durch Extraktion mit 5 M Harnstoff konnte es in Lösung gebracht werden (Abb.27 B).

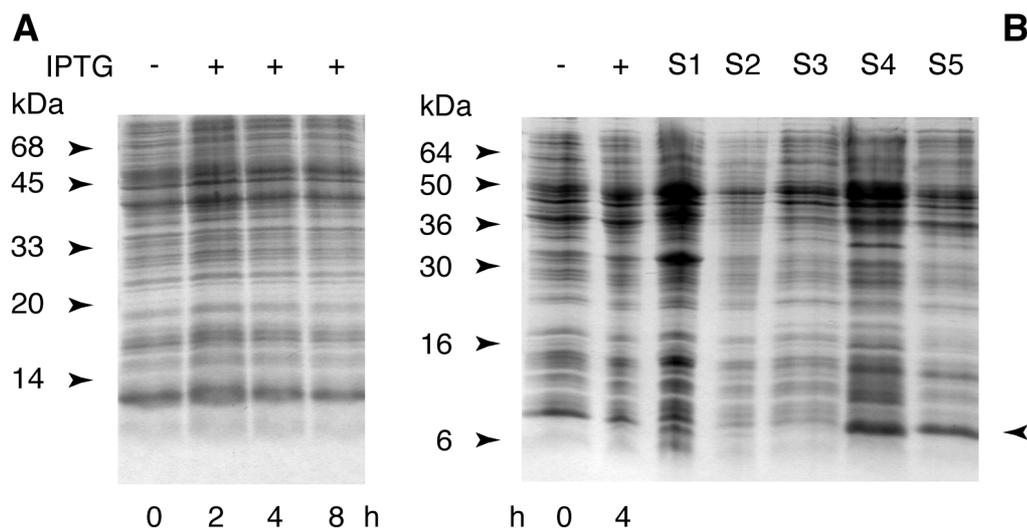


Abb. 27: Expression und Extraktion von Profilin III in *E. coli*.

(A) Induktion der Profilin III-Expression. Gleiche Mengen *E. coli* BL21 wurden vor und nach 1 bis 8 stündiger Induktion (mit 1 mM IPTG) in SDS-Probenpuffer aufgenommen, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Blau-Färbung analysiert. (B) Profilin III konnte mit 5 M Harnstoff aus „inclusion bodies“ gelöst werden (S4, S5). Es weist eine Größe von etwa 13 kDa auf, was mit dem theoretischen Wert übereinstimmt (Pfeilspitze). S1: löslicher Überstand; S2: Wasch-Überstand; S3: 2 M Harnstoff-Überstand.

3.4.2 Nachweis der Interaktion zwischen Profilin III und poly-L-Prolin

Die Affinität des rekombinanten Profilin III für poly-L-Prolin wurde durch Sedimentation mit poly-L-Prolin gekoppelten Agarose-„beads“ (2.5.13) untersucht. Für diesen Interaktionstest wurden die beiden Profilin III haltigen 5 M Harnstoff-Extraktionsüberstände herangezogen. Das vorhandene Profilin III konnte mit poly-L-Prolin sedimentiert werden (Abb. 28). Diese Fähigkeit poly-L-Prolin zu binden, wird zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins über eine poly-L-Prolin-Säule genutzt.

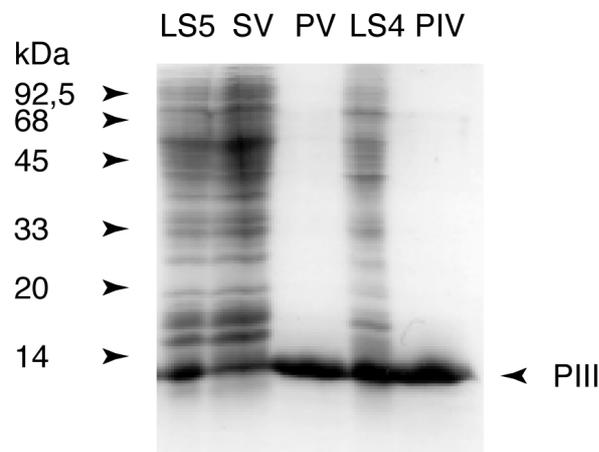


Abb. 28: Affinität des rekombinanten Profilin III für poly-L-Prolin.

Nach Inkubation der dialysierten PIII haltigen 5 M Harnstoff-Extraktionsüberstandes S5 (LS5) und S4 (LS4) mit poly-(L)-Prolin-„beads“ für 4 h wurde abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Sedimente einmal gewaschen. Überstände (SV; SIV nicht gezeigt) und die entsprechenden Pellets (PV, PIV) wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung analysiert. Profilin III (Pfeilspitze) kosedimentiert in Anwesenheit von poly-L-Prolin „beads“.

3.4.3 Reinigung des rekombinanten Profilin III

Nach Öffnen der Bakterien wurde das rekombinante Profilin III mit 5 M Harnstoff solubilisiert (Abb. 27 B). Der resultierende Zentrifugationsüberstand wurde gegen TEDABP pH 8 dialysiert. Da gezeigt werden konnte, daß Profilin III poly-L-Prolin-Bindeeigenschaften besitzt (Abb. 28), wurde das Dialysat auf eine poly-L-Prolin-Affinitätssäule (2.5.11.4) geladen. Das gebundene Profilin III ließ sich mit 7 M Harnstoff eluieren (Abb. 29). Die Profilin III haltigen Fraktionen wurden schrittweise gegen TEDABP pH 8 dialysiert, um den Harnstoff zu entfernen und eine Rückfaltung des Proteins in seine korrekte Tertiärstruktur zu ermöglichen. Für alle folgenden Anwendungen wurde das Protein gegen geeignete Puffer dialysiert.

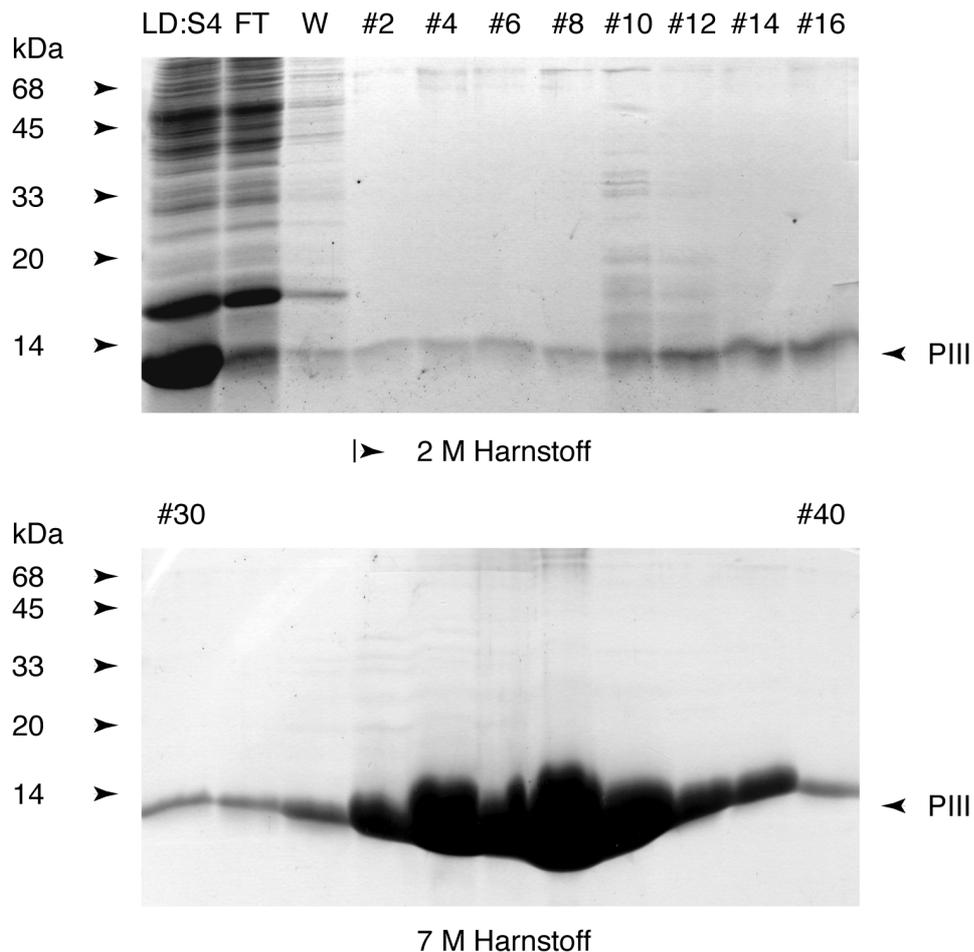


Abb. 29: Reinigung des extrahierten Profilin III über eine poly-L-Prolin-Affinitätssäule.

Der Profilin III haltige 5 M Harnstoff-Extraktionsüberstand S4 (Abb. 27) wurde gegen TEDABP pH 8 dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine poly-L-Prolin Säule geladen. LD: Auftrag des S4 auf die Säule („load“); FT: Durchfluß („flow through“); W: Waschen der Säule mit TEDABP (pH 8). Die Elution erfolgte schrittweise mit 2 M (Fraktion #2-#16) und 7 M Harnstoff (Fraktion #30-#40). Im Coomassie-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gel ist zu sehen, daß das Protein mit 7 M Harnstoff eluiert.

3.4.4 Sedimentationsversuch zum Nachweis der Phospholipid-Bindung

Da Profilin durch die Phospholipide PI(4)P und PI(4,5)P₂ reguliert wird (Lassing und Lindberg, 1985; Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1990), wurde Profilin III auf eine mögliche Phospholipid-Bindung hin untersucht. Dazu wurde das gereinigte Profilin III gegen IEDANBP pH 7,6 dialysiert. Nach Inkubation mit PIP₂ wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment mit SDA-PAGE untersucht. In Abwesenheit von Phospholipiden befand sich Profilin III ausschließlich im Überstand. Nach Zugabe von PIP₂ konnte Profilin III nur in der Anwesenheit von CaCl₂ sedimentiert werden (Abb. 30). Dies entspricht den Angaben von Flanagan *et al.* (1997), daß PIP₂-Micellen nur in Anwesenheit von zweiwertigen Kationen in eine sedimentierbare, aggregierte Form übergehen.

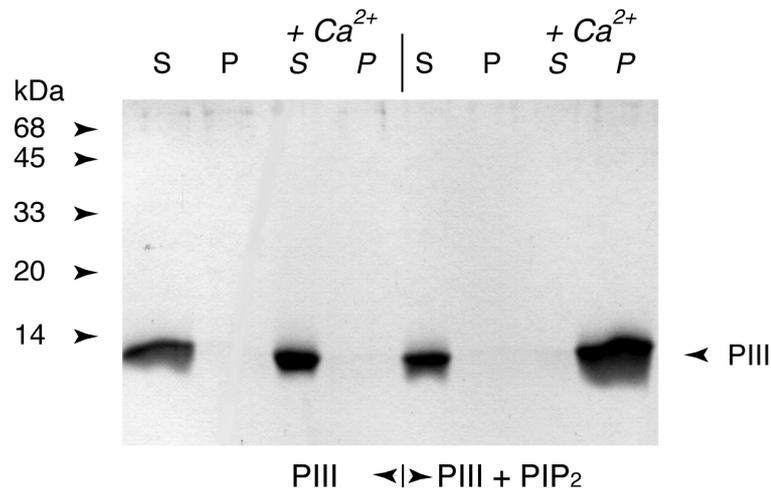


Abb. 30: Sedimentationsversuch zur PIP₂-Bindung.

Profilin III kann durch PIP₂-Micellen sedimentiert werden. Aufgereinigtes rekombinantes Profilin III wurde mit IEDAN-Puffer (Kontrolle) oder PIP₂-Micellen (Endkonzentration 0,5 mg/ml) in An- und Abwesenheit von 1 mM CaCl₂ (+/- Ca²⁺) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 100.000 g zentrifugiert, die Überstände abgenommen und das Sediment nochmals gewaschen. Überstände (S1) und Sedimente (P2) wurden durch elektrophoretische Trennung analysiert. Profilin III befindet sich in Gegenwart von PIP₂ und divalenten Kationen im Sediment.

3.4.5 Nachweis der Phospholipid-Bindung durch Gelfiltration

Die Bindung von Profilin III an PIP₂-Micellen konnte unter anderem durch Gelfiltrationsversuche gezeigt werden. Hierfür wurde das Smart System (Pharmacia) mit einer Superose 12 Säule verwendet. Es erlaubt den Einsatz sehr kleiner Probenvolumina und besitzt eine sehr sensitive Detektionskapazität. Die Kalibrierung der Säule erfolgte durch die Trennung von Proteinen mit bekannter Molekülmasse (Abb. 31 B). In Abwesenheit von Phospholipiden eluierte Profilin III reproduzierbar bei 1,69 ± 0,02 ml (± Standardabweichung aus vier Experimenten) als Monomer. PIII hat eine berechnete Molekülmasse von 13 kDa. Wurde ein Gemisch aus Profilin III und dem Eichprotein Cytochrom c (12,5 kDa) auf die Säule geladen, war ein einzelnes Elutionspeak bei 1,71 ml zu erkennen (Chromatogramm nicht abgebildet). Das Coomassie-Gel zeigte, daß beide Proteine in den gleichen Fraktionen zu finden waren, da sie auf Grund ihrer Größe gemeinsam eluierten (nicht gezeigt). In Gegenwart von PIP₂-Micellen war eine Verschiebung des Profilin III Retentionsvolumens auf 1,24 ml zu beobachten. Diese Verschiebung kann damit erklärt werden, daß ein Profilin III-Protein mindestens eine ganze PIP₂-Micelle gebunden hat. PIP₂-Micellen haben in wässrigen Lösungen eine Molekülmasse von 93 kDa (Sugiura, 1981). Die An- bzw. Abwesenheit von 1 mM Ca²⁺ hatte keinen Einfluß auf die Ergebnisse.

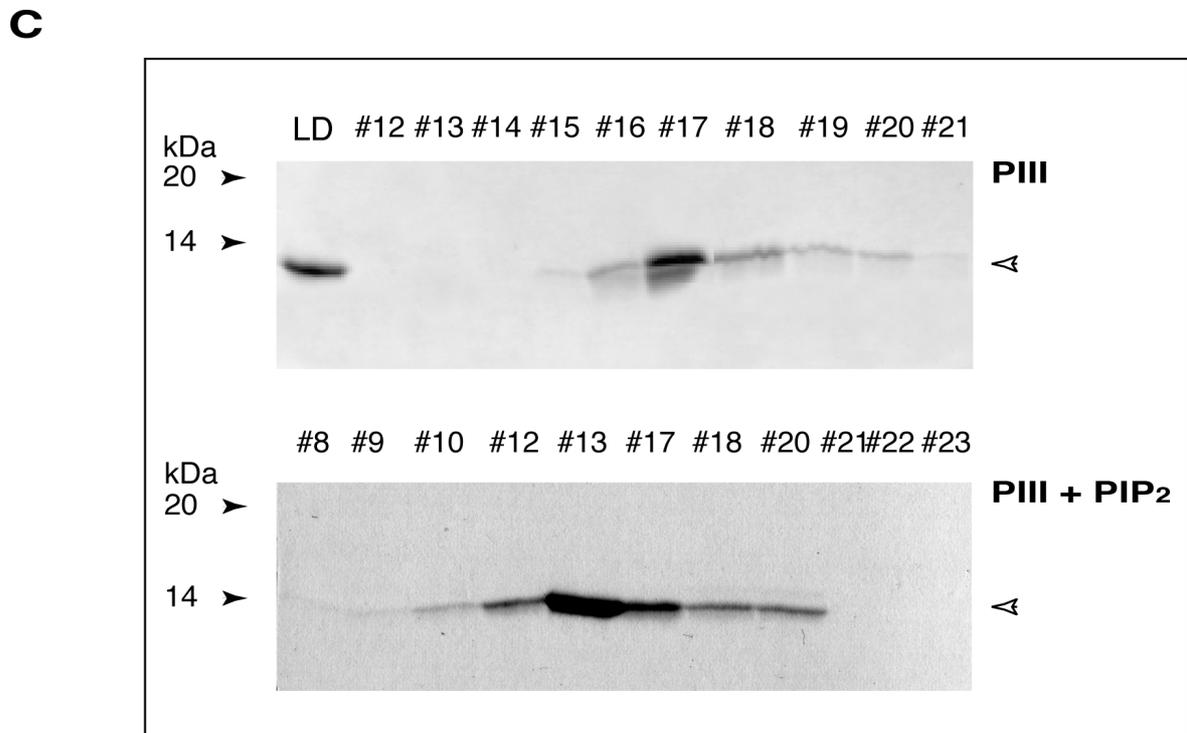
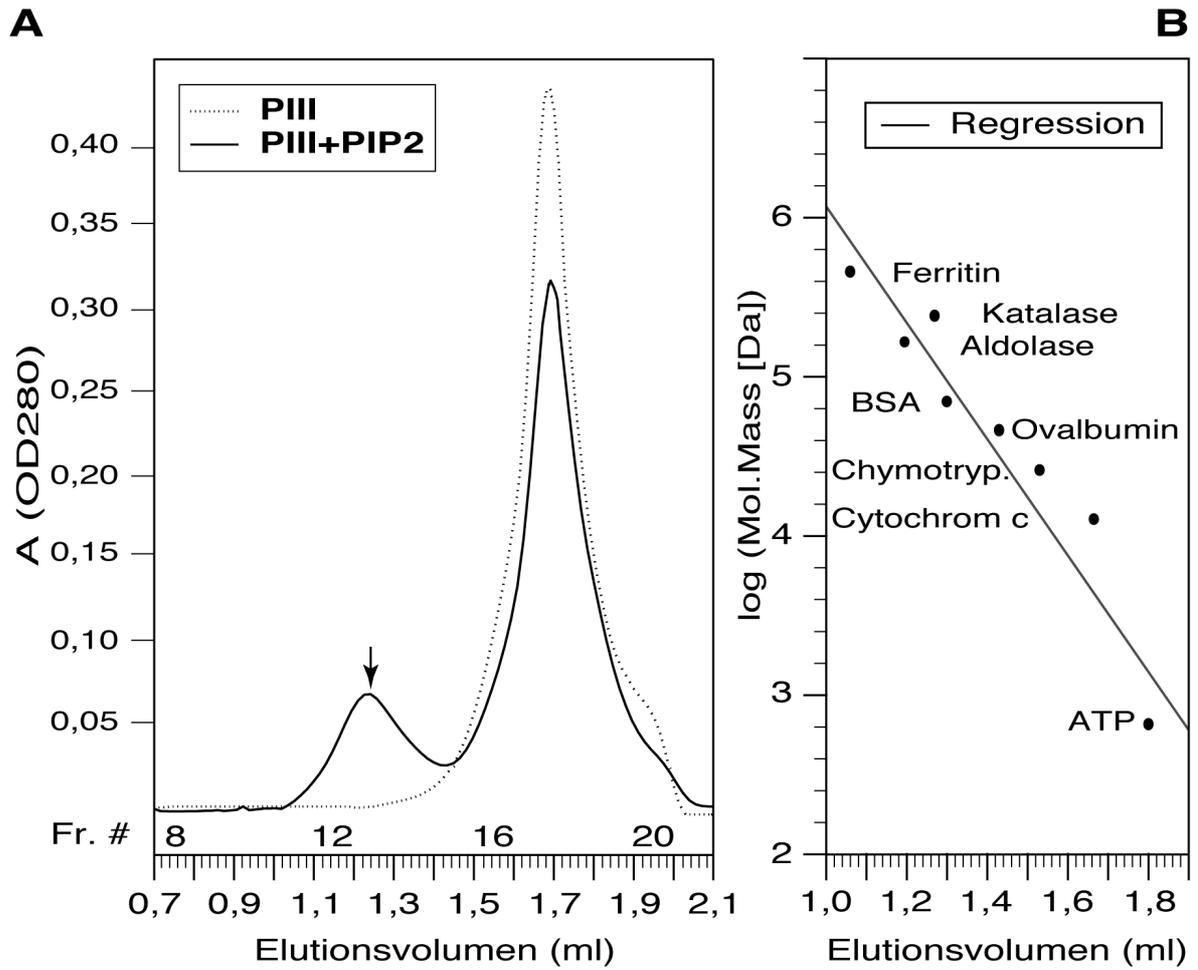


Abb. 31: Analytische Gelfiltrationsversuche zum Nachweis der PIP₂-Bindung.

Aufgereinigtes, rekombinantes Profilin III wurde mit Puffer oder Cytochrom c oder reinem PIP₂ versetzt und mit einer Superose 12 Gelfiltrationssäule (Smart) chromatographisch aufgetrennt. **(A)** Das Chromatogramm zeigt die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm der gesammelten Fraktionen. Profilin III eluiert bei einem Retentionsvolumen von 1,69 ml. Nach Inkubation mit PIP₂ (1:1 v/v) verschob sich die Elution von Profilin III auf 1,24 ml (schwarzer Pfeil markiert entsprechendes Elutionspeak). **(B)** Die Gelfiltrationssäule wurde mit folgenden Standardproteinen kalibriert: Ferritin (450 kDa), Katalase (240 kDa), Aldolase (158 kDa), BSA (68 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa), Cytochrom c (12,5 kDa) und ATP (0,65 kDa). **(C)** Die Fraktionen der Profilin III-Elution wurden in der SDS-PAGE analysiert. Wurde Profilin III auf die Säule geladen, zeigt das Coomassie-Gel (oben), daß die Fraktionen #15 bis #20 Profilin III haltig sind und das Protein als Monomer vorliegt („peak“ #17). Das Coomassie-Gel unten zeigt, daß die Fraktionen #10 bis #20 Profilin III enthielten, da die Elution durch die Bindung an PIP₂-Micellen verschoben wurde und das Protein auf fünf weitere Fraktionen verteilt eluierte („peak“ #13, #17).

3.4.6 Aktin- und PIP₂-Bindeeigenschaften von Profilin III in der Fluoreszenzspektroskopie

Die Interaktion von Profilin III mit Aktin (Skelettmuskel Kaninchen) wurde durch Fluoreszenzspektroskopie unter Verwendung von Pyren-markiertem G-Aktin untersucht. Diese Methode beruht auf der bis zu 20-fachen Zunahme der Fluoreszenzemission des Pyren-Aktin im Verlauf der Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin (Kouyama und Mihashi, 1981). Bereits ein 1:1 molares Verhältnis von G-Aktin und Profilin III zeigte einen inhibierenden Effekt von Profilin III auf die Aktin-Polymerisation. Deutlicher wird der Effekt bei einem Verhältnis von 1:3 ersichtlich (Abb. 32 A). PIP₂ wirkt bei den bekannten Profilinen wie Profilin I und II aus *D. discoideum* störend auf die sequestrierende Aktivität, die Profilin auf Aktin hat. Das Phospholipid PIP₂ zeigte in der Fluoreszenzspektroskopie einen vergleichbaren Einfluß auf Profilin III (Abb. 32 B), wenngleich nicht so deutlich wie beispielsweise bei *D. discoideum* Profilin II (Lee *et al.*, 2000).

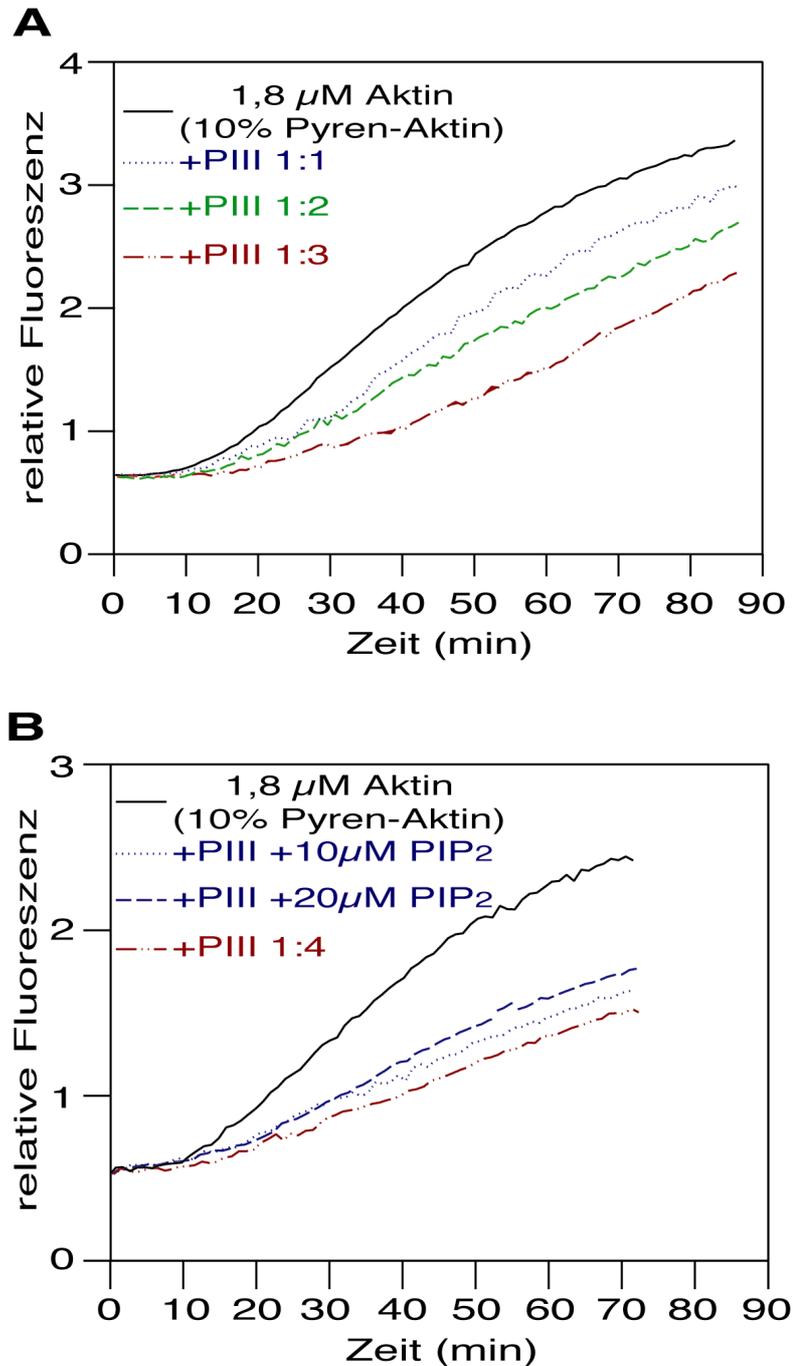


Abb. 32: Einfluß von Profilin III auf die Polymerisation von Muskel-Aktin (Kaninchen).

Die Polymerisation von 2,0 μM Aktin (10% Pyren-Aktin) wurde durch die Zugabe von 2 mM MgCl_2 induziert und die Polymerisationskinetik in Gegenwart von Profilin III (PIII) wie in An- und Abwesenheit von PIP_2 gemessen. Die Diagramme zeigen die Zunahme der relativen Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit. **(A)** Aktin und Profilin III wurden in einem Verhältnis 1:0, 1:1, 1:2 und 1:3 eingesetzt. **(B)** Aktin und Profilin III wurden in einem Verhältnis 1:4 in An- und Abwesenheit von 10 und 20 μM PIP_2 eingesetzt. Die Daten zeigen, daß Profilin III hemmend auf die Polymerisation wirkt. Ebenso konnte der regulative Einfluß von PIP_2 auf die Profilin III-Aktivität nachgewiesen werden.

4 DISKUSSION

Das Aktin-Zytoskelett ist eine wichtige Komponente zellulärer Bewegungsvorgänge und zahlreiche Aktin-bindende Proteine bestimmen als wichtige Regulationsfaktoren seine Dynamik. Ziel dieser Arbeit war es, neue Aktin-bindende Proteine in *D. discoideum* zu identifizieren und zu charakterisieren.

4.1 Villidin

Das erste Teilprojekt dieser Studie beschäftigt sich mit Villidin, das neben dem 100 kDa großen, F-Aktin verkappenden Protovillin (Hofmann *et al.*, 1993) das zweite Villin-ähnliche Molekül in *D. discoideum* ist. Wegen der Homologie zu Villin wurde es Villidin genannt. Villin selbst ist ein typisches Mitglied der Gelsolin-Familie, doch trotz der C-terminalen Ähnlichkeit unterscheidet sich das 190 kDa große Villidin strukturell deutlich von der Großgruppe der Gelsolin/Villin-Proteine. Die auffallendsten Unterschiede liegen zunächst in der Größe, der unvollständigen Homologie zu Gelsolin und dem Auftreten eines weiteren homologen Abschnitts, der der Gruppe der „WD-repeat“-Proteine zugeordnet werden kann. Die Villidin-mRNA und das -Protein liegen in der Wachstumsphase und der frühen Zellaggregation nur in geringer Konzentration vor. Die Konzentration steigt im Verlauf der Entwicklung an und erreicht während der Konusbildung und Migrationsphase (nach 12-16 h) ein Maximum. Villidin liegt etwa zu gleichen Teilen im Zytosol und im 100.000 g Sediment vor, und ist hier sowohl in der Zytoskelett- als auch der Membranfraktion zu finden. Der monoklonale Antikörper 257-6-2 und das polyklonale Antiserum 6336 zeigen in der Immunfluoreszenz eine homogen verteilte, vesikel-ähnliche Markierung des endogenen Villidin-Proteins. GFP-Fusionen mit der Villin-Domäne zeigen eine vergleichbare Verteilung. GFP-Fusionsproteine, welche die N-terminale „WD-repeat“-Region beinhalten, kolokalisieren hingegen zusammen mit Aktin während Zellbewegungs-, Pinozytose- und Phagozytoseereignissen an der Plasmamembran. Die Abschaltung des Villidin-Gens führt zu einem Phototaxisdefekt im multizellulären Stadium des Pseudoplasmodiums.

4.1.1 Die Sonderstellung von Villidin in der Gelsolin/Villin-Familie

4.1.1.1 Strukturelle Organisation der Proteine der Gelsolin/Villin-Familie

Proteine der Gelsolin-Familie sind Aktin-bindende Proteine, die in der Regel die Fragmentierung und Depolymerisation von Aktin-Filamenten verursachen, aber auch die Bildung der Filamente durch Nukleation fördern können (Eichinger und Schleicher, 1992). Charakteristisch für die strukturelle Organisation der Proteine dieser Familie ist ein sich wiederholendes Sequenzmotiv (Way and Weeds, 1988). Die Anzahl dieser repetitiven Motive führt zunächst zur Unterteilung in zwei Gruppen. Zum einen gibt es Proteine mit je sechs Domänen wie beispielsweise Gelsolin, Villin oder Supervillin, zum anderen die kleineren Vertreter Fragmin, Severin und CapG mit je nur drei Domänen (Abb. 3). Die strukturelle Besonderheit, nämlich das Vorhandensein einer zusätzlichen, ca. 80 As langen „headpiece“-Domäne am C-Terminus, unterscheidet Villin und seine Homologe von den anderen Gelsolin-Proteinen.

Es wurde allgemein angenommen, daß die Proteine mit sechs Domänen aus einer Genduplikation der Proteine mit nur drei Domänen hervorgegangen sind. Kwiatkowski und Mitarbeiter vermuteten 1986 noch, daß die Evolution der Gelsolin-Familie im Laufe der Entwicklung von Vertebraten stattgefunden haben muß, da damals Gelsolin und Villin nur in höheren Organismen nachgewiesen werden konnten. Widerlegt wurde diese Hypothese zuerst 1993 durch die Identifizierung von Protovillin in *D. discoideum* als ein Villin-Homolog. Wegen der Stellung von *D. discoideum* in der Evolution und der funktionellen und regulatorischen Unterschiede zu Vertebraten-Villin wurde es als Villin-Prototyp betrachtet (Hofmann *et al.*, 1993). Darüber hinaus wurden in neueren Studien die ersten Villin-homologen Proteine in Pflanzen vorgestellt (Tominaga *et al.*, 2000; Klahre *et al.*, 2000). Die Identifizierung des Villidin als weiteres Villin-homologes Protein in *D. discoideum* bestätigt nicht zuletzt die Widerlegung der ehemaligen Kwiatkowski- Hypothese. Die strukturellen Ähnlichkeiten, die von amöboiden Organismen bis hin zum Menschen konserviert wurden, stützen die Auffassung, daß Villidin und die übrigen Mitglieder der Villin-Familie auf ein gemeinsames Vorläufer-Protein von etwa 14 kDa zurückzuführen sein könnten (Bazari *et al.*, 1988; Finidori *et al.*, 1992; Weeds und Maciver, 1993; Puius *et al.*, 1998).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Proteine charakterisiert, die aufgrund homologer Sequenzmotive und Funktionen der Gelsolin/Villin-Familie zugeordnet werden konnten (Kwiatkowski, 1999). Wie in Abbildung 3 dargestellt, fallen einige Vertreter durch besondere Sequenzmerkmale auf. Flightless (Campbell *et al.*, 1993) und Supervillin (Pestonjamsap *et*

al., 1998) nehmen die erste Sonderstellung ein, da sie sich durch zusätzliche N-terminale Sequenzausdehnungen auszeichnen. Das Gelsolin-Homolog GRP125 aus *D. discoideum* (Stocker *et al.*, 1999) sticht hingegen durch das Fehlen der ersten Domäne und einer C-terminalen Verlängerung hervor. In Villidin ist die Sequenzhomologie zu Villin am C-Terminus mit einer N-terminalen „WD-repeat“-Homologie und einem verbindenden Mittelstück kombiniert, so daß es beiden Untergruppen zugeordnet werden kann, jedoch wohl eher die Möglichkeit einer neuen Untergruppe eröffnet. Das Auftreten der zusätzlichen „headpiece“-Domäne in Villidin ist das entscheidende Charakteristikum für die eindeutige Beschreibung von Villidin als Villin-Homolog auf der Ebene der Primärstruktur. Viele der konservierten Aminosäuren, die für die strukturelle Stabilität oder die F-Aktin-Bindung des Villin-„headpiece“-Segmentes verantwortlich sind (Doering und Matsudaira, 1997; McKnight *et al.*, 1997), finden sich in Villidin.

4.1.1.2 Strukturelle Voraussetzung für die Fragmentierung von Filamenten

Die Fragmentierung von Aktin-Filamenten durch die Gelsolin-Familie ist ein Zusammenwirken von F-Aktin-Bindung und Verkappung, allerdings ist der Mechanismus bis heute nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Modellvorstellung ist, daß sich das Protein mit seiner F-Aktin-Bindestelle in der Domäne II und III zuerst an das Aktin-Filament anlagert, sich dann mit Hilfe der Verkappungsdomäne I zwischen die einzelnen Aktin-Untereinheiten schiebt und so das Filament in Teile trennt (Way *et al.*, 1992; McLaughlin *et al.*, 1993). Für die Fragmentierung sind also die Gelsolin-Segmente I-III nötig, wohingegen die Segmente IV-VI die Nukleation der Aktin-Polymerisation ermöglichen (Sun *et al.*, 1994). Wichtige Hinweise auf die genaue Lage der G- und F-Aktin-bindenden Bereiche gab die 1997 ermittelte Kristallstruktur von Gelsolin (Burtnick *et al.*, 1997).

Die Gelsolin-Domäne I bindet an die schnell wachsenden plus Enden der Aktin-Filamente, verkappt diese und ist auch in der Lage G-Aktin zu binden. Dies konnte durch die 1993 ermittelte Kristallstruktur des Gelsolin Domäne I / G-Aktin-Komplexes veranschaulicht werden (McLaughlin *et al.*, 1993). In Villidin fehlt diese erste Gelsolin/Villin-Domäne. Diese auffallende Besonderheit findet sich auch in der Sequenz des *Dictyostelium*-Gelsolin-Homolog GRP125. Übereinstimmende Studien an Villin, Gelsolin und Severin konnten die F-Aktin-verkappende Funktion in Domäne I lokalisieren (de Arruda *et al.*, 1992; Way *et al.*, 1990; Eichinger *et al.*, 1991; Eichinger und Schleicher, 1992). Nach bisherigen Erkenntnissen wäre eine verkappende Aktivität von Villidin überraschend und würde wohl durch einen neuartigen Bindungsmechanismus erklärt werden müssen, der unter Umständen in der

Dictyostelium-Evolution seinen Ursprung hat. Es ist vorstellbar, daß eine bis jetzt unerkannte Stelle in der „WD-repeat“-Region oder der mittleren Villidin-Domäne die Funktion des ersten Gelsolin/Villin-Segmentes ersetzen könnte.

Die Gelsolin-Domäne II bindet ausschließlich an die Seiten der Aktin-Filamente. Da für die molekulare Interaktion zwischen der Gelsolin-Domäne II und F-Aktin noch keine detaillierte Strukturdaten vorliegen, konstruierten Puius *et al.* (2000) ein vorläufiges Modell, das unter anderem auf der Struktur der Severin Domäne II (Eichinger und Schleicher, 1992) basiert. Die Severin-Struktur zeichnet sich durch ein parallel/antiparallel gemischtes, fünf-strängiges β -Faltblatt aus, das durch eine lange, parallel liegende α -Helix auf der einen Seite und auf der anderen Seite durch eine kurze α -Helix flankiert wird (Abb. 33 C). Der Sequenzvergleich der Villidin-Domäne II mit der entsprechenden Severin-Domäne und anderen Gelsolin-Proteinen veranschaulicht den starken Übereinstimmungsgrad auf Ebene der Primärstruktur (Abb. 5 B).

Die Modelle der dreidimensionalen Strukturen für die Villidin- und Protovillin-Domäne II wurde in Anlehnung an die Severin-Struktur mit Hilfe des Programmes Swiss-Pdb Viewer v3.7b2 (Guex und Peitsch, 1998: www.expasy.ch/spdbv/mainpage.html) berechnet (Abb. 33 C). Überlagerungen der theoretischen Struktur von Villidin und Protovillin mit der NMR- oder Kristallstruktur von Severin (Schnuchel *et al.*, 1995; Puius *et al.*, 2000), lassen nur unwesentliche Unterschiede erkennen. Auch Strukturdaten der Domänen II anderer Gelsolin-Proteine zeigen eine entsprechende Architektur, was zu der Vermutung führt, daß die Faltung dieses Segmentes im Zuge der Evolution stark konserviert wurde. Allerdings erscheint diese Konservierung lediglich auf strukturelle Merkmale beschränkt, denn funktionelle Unterschiede innerhalb der Gelsolin-Familie konnten für verschiedene Vertreter nachgewiesen werden. Beispielsweise ist Protovillin aufgrund seiner Primärstruktur ein eindeutiges Gelsolin/Villin-Homolog, seine Funktionalität beschränkt sich aber ausschließlich auf das Verkappen der Filamente (Hofmann *et al.*, 1993). Offensichtlich fehlt die F-Aktin-Bindestelle in Domäne II als Voraussetzung der Fragmentierungsfähigkeit.

Die erste Definition für Gelsolin-Proteine, die von Hinssen 1981 geprägt wurde, stellt die drei Funktionen des Gelsolin in den Mittelpunkt und besagt, daß nur jene Aktin-bindenden Proteine Gelsoline sind, die unter Ca^{2+} -Abhängigkeit sowohl mit G- als auch mit F-Aktin Komplexe eingehen, das schnell wachsende Filamentende blockieren, die Nukleation der Aktin-Filamente fördern und Filamente durch direktes Schneiden verkürzen. In Hinblick auf die zahlreichen Proteine, die eine klare Sequenzverwandtschaft aufzeigen, aber deren Funktionalität reduziert ist bzw. noch nicht nachgewiesen wurde, erscheint diese Definition

mittlerweile unzureichend. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen letztlich die Spekulation zu, daß es im Verlauf der Evolution zu einer zunehmenden funktionellen Differenzierung und Aufgabenverteilung zwischen den einzelnen Domänen kam. Wie für andere Protein-Familien gültig, z. B. im Falle der „WD-repeat“-Familie, stellt eine deutliche Sequenz-homologie zunächst die einzige Klassifizierungsgrundlage dar und hat sich im Zuge der Identifizierung von Sequenz-homologen Proteinen zur Definitionsbasis der Gelsolin/Villin-Familie entwickelt.

4.1.1.3 Strukturelle Erfordernisse der F-Aktin-Vernetzung

Die zusätzliche Funktion der Quervernetzung von Aktin-Filamenten wird durch die „headpiece“-Domäne ermöglicht. Das „headpiece“ (hp) von Villin beinhaltet eine von zwei F-Aktin-Bindestellen, die für die Filamentbündelung verantwortlich sind. Eine Reihe basischer Aminosäuren in der Villin-Domäne II (erste F-Aktin Bindestelle) ist allerdings unerlässlich für die bündelnde Aktivität (Finidori *et al.*, 1992; de Arruda *et al.*, 1992; Pope *et al.*, 1994). Nicht alle „headpiece“-Domänen können F-Aktin binden. Die Voraussetzung hierfür scheint unter anderem eine Folge basischer Aminosäurereste (KKEK) innerhalb des „headpiece“ zu liefern, wie für Villin gezeigt werden konnte (Friederich *et al.*, 1992, 1999; siehe auch 1.3.2).

Die „headpiece“-Domäne in Protovillin (*D. discoideum*), zeigt keine Quervernetzungsfähigkeit, was am Fehlen dieses Sequenzmotives liegen könnte (Hofmann *et al.*, 1993). Die sechs Hauptdomänen (780 As) und das „headpiece“ (80 As) werden hier durch eine Prolin-Threonin-reiche „neck“-Region, die nur für Protovillin kennzeichnend ist, getrennt. Im Gegensatz zur deutlichen Homologie des „headpiece“ zwischen Villidin und Vertebraten Villin, ist die Homologie zum entsprechenden Protovillin-Segment, das parallel in der gleichen Zelle vorkommt, wesentlich schwächer ausgeprägt. Ferner finden sich im Villidin-„headpiece“ die Aminosäurereste KKEK an gleicher Position wie das KKEK-Motiv in Villin (Abb. 5 A). *In vitro* war allerdings keine Kosedimentation des Villidin-„headpiece“-Konstruktes zusammen mit Aktin nachweisbar (Abb. 12).

Die NMR-Struktur des Villin-„headpiece“-Konstruktes HP67 (*G. gallus*) gab Aufschluß über den strukturellen Aufbau dieser Domäne (Vadar *et al.*, 1999). Die „headpiece“-Struktur setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, die einen dicht gepackten hydrophoben Kern teilen. Die C-terminale Hälfte des HP67-Konstruktes setzt sich aus drei Helices zusammen, wobei die Helix am äußersten C-Terminus das KKEK-Motiv enthält. Der N-terminale Abschnitt enthält Biegungen, reverse Drehungen und eine aus vier Aminosäuren gebildete α -Helix (Abb. 33 D). Ein einzelnes Histidin (H41) stabilisiert in Abhängigkeit des pH-Wertes die

Faltung des N-Terminus. Ferner scheinen einige Aminosäuren am Aminoende des Villin-„headpiece“ wichtig für die F-Aktin-Bindung (Vadar *et al.*, 1999) zu sein und spielen vermutlich eine Rolle im Arrangement der C-terminalen Hälfte für eine effektive Bindung. Wenngleich die Protovillin- und Villidin-„headpiece“-Sequenzen der N-terminalen Villin-hp-Konsensussequenz entsprechen (Abb. 4), fehlt in beiden Fällen das besagte Histidin und die „headpiece“-Konstrukte zeigen kaum bis keine F-Aktin-Affinität.

Die Modellierung der dreidimensionalen Struktur des Villidin- und Protovillin-„headpiece“ mittels des Computerprogrammes Swiss-Pdb Viewer wurde auf der Basis der NMR-Struktur von HP67 durchgeführt. Die Berechnung resultierte in einer sehr ähnlichen strukturellen Organisation und läßt auf eine starke strukturelle Konservierung der „headpiece“-Domäne schließen. Es stellt sich jedoch die Frage, wie sich trotz der strukturellen Homologie, die fehlende funktionelle Konservierung, sprich das unterschiedliche Aktin-Bindevverhalten verschiedener „headpiece“-Segmente, erklären läßt.

Die strukturellen Besonderheiten für die F-Aktin-Affinität ausgewählter „headpiece“-Konstrukte konnten vor kurzem durch ein Modell der Arbeitsgruppe McKnight näher beschrieben werden (schriftliche Mitteilung Vadar *et al.*). Obgleich Gelfiltrations-, NMR-Studien und theoretische Strukturvorhersagen eine homologe Strukturorganisation der „headpiece“-Segmente aufzeigen, wurden in Aktin-Sedimentationsversuchen deutliche Unterschiede ersichtlich. Villin- und Dematin-„headpiece“-Konstrukte binden F-Aktin bereits bei geringen mikromolaren Bindeaffinitätswerten (Pope *et al.*, 1994). Für das Protovillin-„headpiece“ war eine vier- bis 25-fache Erniedrigung der Bindeaffinität zu beobachten (schriftliche Mitteilung Vadar *et al.*). Für die Supervillin- und Villidin-„headpiece“-Domänen konnte keine spezifische Bindung nachgewiesen werden. Selbst unter Verwendung *D. discoideum* spezifischen Aktins konnte das Villidin-„headpiece“ nicht mit F-Aktin sedimentiert werden (Abb. 12).

Die computergestützten Modellierungen der „headpiece“-Konstrukte mit dem Programm Modeller (Sali und Blundell, 1993) lassen signifikante Veränderungen hinsichtlich der Ladungsverteilung in der Aktin-Bindeoberfläche ersehen (Abb. 33 E). Die hydrophobe Kappe („cap“), die geladene Krone („crown“) und das positive Muster („positive patch“), liefern für das Villin- und Dematin-„headpiece“ vermutlich die Voraussetzung zur F-Aktin-Bindung (Vadar *et al.*, 1999). Die Reduktion des positiven Musters in Protovillin wie auch die extrem negativ geladene Oberfläche des Villidin-„headpiece“ könnten letztlich der Grund für die fehlende Bindung an das ebenfalls negativ geladene F-Aktin sein.

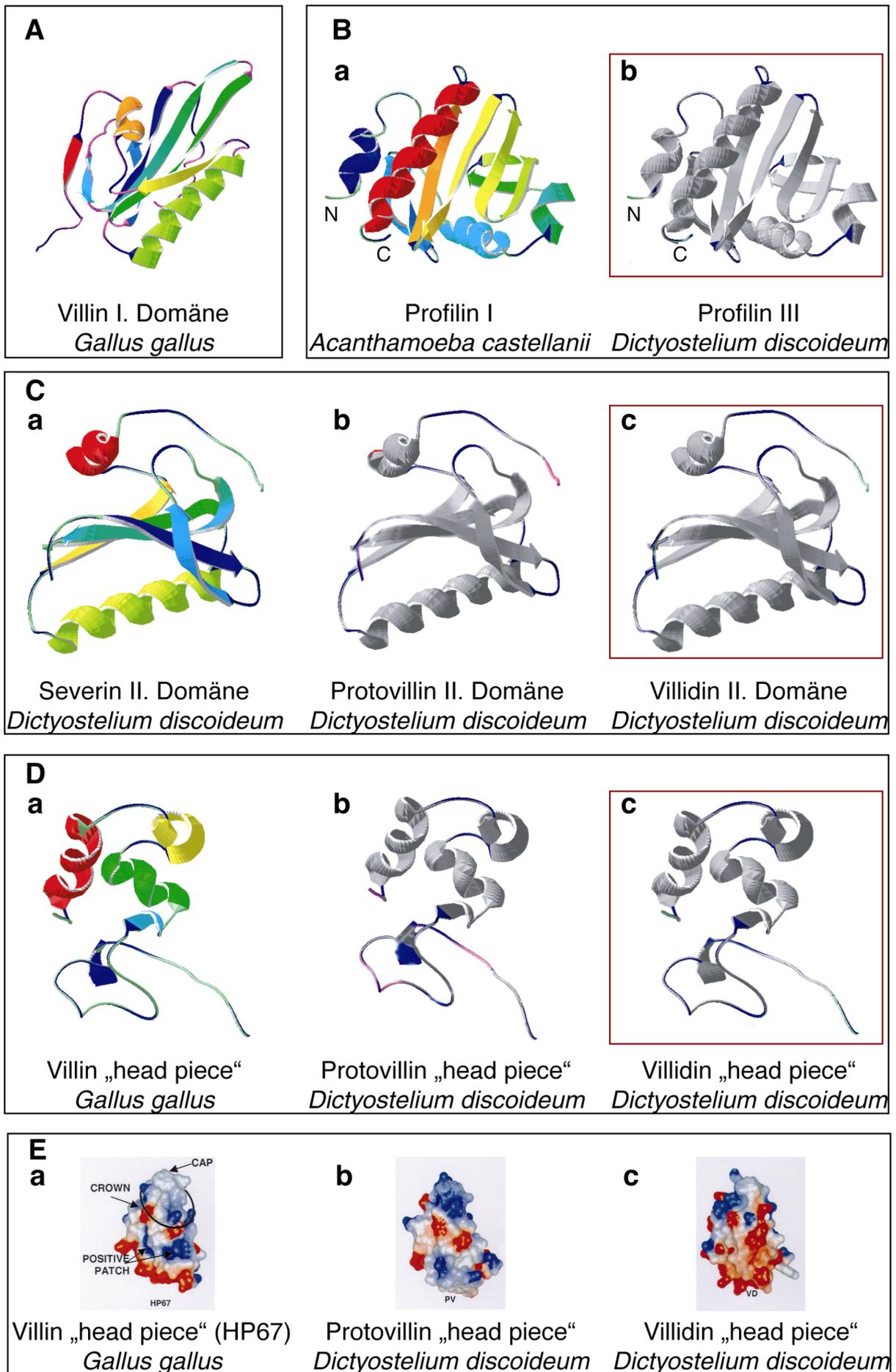


Abb. 33: Gegenüberstellung der Gerüststrukturen der Villin-Domäne I, des Profilin-Proteins und der theoretischen Profilin III-Faltung; Gegenüberstellung der Domäne II und der „headpiece“-Domäne im Vergleich zu den theoretischen Modellierungen der entsprechenden Protovillin- und Villidin-Segmente.

Die Strukturmodelle wurden unter Verwendung der Protein-Struktur-Datenbank RCSB-PDB (www.rcsb.org/pdb/) mit Hilfe des Programmes Swiss-Pdb Viewer v3.7b2 errechnet und modelliert. Gezeigt werden in A-D die „ribbon“-Darstellungen. Die Datenbank-Zugriffsnummern der bekannten Strukturen sind in Klammern angegeben. Die „ribbon“-Modelle der Villidin-Domänen sind durch rote Rahmen hervorgehoben. **(A)** Die G-Aktin bindende Villin-Domäne I (*G. gallus* / Huhn: 2VIK; Markus et al., 1997). **(B a)** Dreidimensionale Struktur des G-Aktin-sequestrierenden Profilin I (*A. castellanii* / Amöbe: 1ACF; Fedorov et al., 1994). **(B b)** Das Strukturmodell von Profilin III stimmt gut mit der hochkonservierten Struktur bekannter Profiline überein. **(C a)** Gerüststruktur der Severin-Domäne II (*D. discoideum* / Amöbe: 1SVR; Schnuchel et al., 1995). **(C b)** Theoretisches Strukturmodell der Protovillin-Domäne II. **(C c)** Modellierung der Villidin-Domäne II. **(D a)** Dreidimensionale Struktur der Villin-„headpiece“-Domäne (*G. gallus*/ Huhn: 1QQV; Vadar et al., 1999). **(D b)** Theoretische Struktur des Protovillin-„headpiece“. **(D c)** Theoretisches Modell des Villidin-„headpiece“. **(E)** Die Modellierungen dreier „headpiece“-Konstrukte mit dem Programm Modeller (Sali und Blundell, 1993) lassen signifikante Veränderungen in der Ladungsverteilung der Aktin-Bindeoberfläche erkennen (schriftliche Mitteilung Vadar et al.). Während im Protovillin und Villidin-hp die hydrophobe Kappe („cap“), die geladenen Krone („crown“) und das positive Muster („positive patch“) stark variieren, erscheinen diese Strukturelemente im Villin- und Dematin-„headpiece“ (nicht abgebildet) konserviert. **(E a)** Abbildung der „headpiece“-Domänen eines 67 Aminosäuren langen Villin-Konstruktes (HP67). **(E b)** Das Protovillin-„headpiece“ (PV) zeigt eine Reduktion des positiven Musters. **(E c)** Die Oberfläche des Villidin-„headpiece“ (VD) scheint vergleichsweise stärker negativ geladen zu sein.

4.1.1.4 Physiologische Funktionen der Gelsolin-Familie und „headpiece“-Proteine

Die detaillierte Untersuchung der Struktur des Villin-„headpieces“ zeigt, daß die Faltung der N-terminalen Untereinheit pH-abhängig erfolgt (Vadar *et al.*, 1999). Unter pH 6,0 kommt es durch die Protonierung des einzelnen Histidins zu einer Zerstörung der Faltung der N-terminalen Hälfte des „headpiece“, ohne jedoch die Faltung der C-terminalen Hälfte zu beeinträchtigen. Es ist vorstellbar, daß *in vivo* eine intrazelluläre Ansäuerung solch eine Konformationsänderung bewirkt und damit die Auflösung von F-Aktin-Bündeln beeinflusst. Ein so bedingter rascher Zytoskelettabbau kann z. B. während der Apoptose nötig sein (Lieberthal und Levine, 1996).

Die „headpiece“-Proteine Villin und Dematin, deren hp-Domänen eine 48%ige Sequenzidentität zeigen, sind in der Lage Aktin-Filamente zu bündeln. Supervillin ist hingegen ein Villin-Homolog mit N-terminaler Verlängerung, dessen „headpiece“ kein Aktin bindet (Wulfkühle *et al.*, 1999). In Dematin, das ein Aktin-vernetzendes Protein des Zytoskeletts der Erythrozytenmembran ist, befindet sich das zusätzliche hp-Segment im Anschluß an eine Kerndomäne, die als Dematin-typische Domäne eine eigenständige

Proteingruppe klassifiziert. Die Quervernetzungsaktivität (Husain-Chishti *et al.*, 1989; Derick *et al.*, 1992) kann durch Phosphorylierung reversibel moduliert werden. Es gibt jedoch keinen Hinweis darauf, daß eine Phosphorylierung in der „headpiece“-Domäne diese Veränderung verursacht (Azim *et al.*, 1995). Auch Talin besitzt ein „headpiece“ im Anschluß an eine F-Aktin- und Vinculin-bindende Domäne (Hemmings *et al.*, 1996). TALB, ist ein Talin-Homolog in *D. discoideum*, für das eine Rolle in der multizellulären Morphogenese während der Entwicklung angenommen wird (Tsujioka *et al.*, 1999). Auch Villidin scheint für Morphogenese und Zellbewegung wichtig zu sein (4.1.4, 4.1.5). Dabei kann es seine Aufgabe vermutlich auch ohne die typischen Villin-„headpiece“-Funktionen auszuführen.

Allerdings erscheint die Idee, daß dieses universell verbreitete Proteinsegment keine spezifische Funktion im Falle der nicht-F-Aktin-bindenden Vertreter besitzt, schwer vorstellbar, da es im Laufe der Evolution von *Dictyostelium* bis hin zum Menschen konserviert wurde. Eventuell entstand die bündelnde Fähigkeit der „headpiece“-Domäne erst im Zuge der Evolution höherer Eukaryonten. Zum Beispiele konnte in der Amöbe *Acanthamoeba* bis dato weder ein „headpiece“-Protein noch ein Gelsolin-Homolog beschrieben werden.

Die Gruppe der Villin-ähnlichen Proteine zeichnet sich durch das Vorhandensein eines „headpiece“ aus, doch allein Villin ist in der Lage, Aktin-Filamente sowohl zu bündeln, zu fragmentieren, zu verkappen und auch die Nukleation zu fördern (Glenney *et al.*, 1981a/b; Janmey und Matsudaira; 1988). Es wurde bis jetzt kein Villin-Homolog beschrieben, das ebenfalls alle vier Funktionen übernehmen kann. Eines der größten Mitglieder der Villin-Familie ist Supervillin. Das 205 kDa große Protein wurde in Plasmamembranen von Neutrophilen des Rindes identifiziert (Pestonjamas *et al.*, 1997). Villidin ist mit 190 kDa etwas kleiner als Supervillin, der augenscheinlichste Unterschied liegt aber in der Organisation der zusätzlichen N-terminalen Domänen, denn charakteristisch für Supervillin ist in diesem Bereich das Auftreten von vier Kernlokalisationsignalen. „WD-repeats“ sind keine vorhanden. Supervillin lokalisiert an Fokalkontakten der Plasmamembran und scheint bei der Zell-Zell-Adhäsion involviert zu sein. Das Protein kosedimentiert in Saccharose-Gradienten und Immunpräzipitationen mit endogenem Aktin. GFP-Fusionen mit Supervillin-Fragmenten zeigten, daß der N-Terminus die Lokalisation an Adhäsionsplaques und die F-Aktin-Bindung fördert (Wulfkühle *et al.*, 1999). N-terminale GFP-Fusionen der „WD-repeat“-Domäne von Villidin kolokalisieren ebenfalls mit Aktin, aber ein Zusammenhang mit der Zell-Adhäsion konnte für Villidin nicht gezeigt werden (Abb. 13 G).

Eine hochkonservierte PIP₂-Bindungsstelle ist gewöhnlich am N-terminalen Ende der Gelsolin/Villin-Domäne II lokalisiert (Eichinger und Schleicher, 1992) und findet sich auch in der entsprechenden Domäne von Villidin (Abb. 5 B). Viele der Aktivitäten der Gelsolin/Villin-Proteine werden durch PIP₂ und Ca²⁺ reguliert. Die Fragmentierung von Aktin-Filamenten ist ein Zusammenwirken von F-Aktin-Bindung und Verkappung (Way *et al.*, 1992; McLaughlin *et al.*, 1993). Dabei aktiviert Calcium die Fragmentierungsfunktion durch eine Konformationsänderung in der C-terminalen Gelsolin-Hälfte, so daß die Aktin-Bindungsstelle in der N-terminalen Hälfte exponiert wird. PIP₂ hemmt wiederum die Fragmentierungsaktivität (Yu *et al.*, 1992; Van Troys *et al.*, 1996) durch die Dissoziation des Gelsolin-Proteins vom plus-Ende des Filaments, was als der physiologische Entkappungsmechanismus beschrieben wird (Janmey *et al.*, 1998). Die Calcium- und Polyphosphoinositol-Regulation beeinflusst die Länge der Aktin-Filamente und die Zyklen von Fragmentierung und Entkappung beschleunigen die Aktin-Polymerisation.

Gelsolin spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts im Rahmen der Zellbewegung, sondern wird ferner in Verbindung mit G-Protein- und Phospholipase-Signaltransduktion sowie Apoptose gebracht (Kwiatkowski *et al.*, 1999). Zum Beispiel stimuliert die kleine GTPase Rac1 unter PIP₂-Abhängigkeit die Entkappung (Hartwig *et al.*, 1995), was zu der Hypothese führte, daß Gelsolin Teil des „downstream“ Rac1-Zytoskelett-Signalweges ist. Untersuchungen von Gelsolin-minus-Mutanten konnten diese Theorie bestätigen (Azuma *et al.*, 1998). Ferner spiegelt die Eigenschaft Polyphosphoinositol zu binden eine Rolle in der „upstream“ Signaltransduktion wider, indem Gelsolin die Verfügbarkeit von PIP₂ für Signalenzyme beeinflusst, die einer Phosphoinositol-Regulation unterliegen. Ein Beispiel hierfür ist die aktivierende wie hemmende Wirkung von aufgereinigtem Gelsolin auf Phospholipase C und 3-OH Kinase (Lin *et al.*, 1997). Für Villidin und seine PIP₂-Bindestelle können ähnliche Aufgaben nur vermutet werden.

Die Lokalisation einer „DEAD box“ befindet sich in Villidin in der C-terminalen Hälfte der Domäne III. Auch in Gelsolin ist eine „DEAD box“ vertreten, die den Grund für die Sensitivität gegenüber Caspase 3-Aktivität darstellt. Dieses Enzym nimmt eine wesentliche Rolle während der Apoptose ein (Kothakota *et al.*, 1997). Die Gelsolin-Spaltung durch Caspase 3 räumt Gelsolin einen Platz im Rahmen des programmierten Zelltodes ein. Die starke Proteolysesensibilität von Villidin könnte im Zusammenhang mit ähnlichen Proteaseaktivitäten stehen. Allerdings wurden Caspasen in *D. discoideum* bisher nicht gefunden.

4.1.2 Villidin und die N-terminale „WD-repeat“-Domäne

4.1.2.1 Strukturelle Organisation der β -Propellerstruktur der „WD-repeat“-Familie

Die zusätzliche N-terminale Domäne von Villidin begründet seine Sonderstellung innerhalb der Gelsolin/Villin-Familie. Wenngleich auch Flightless und Supervillin sich durch Sequenzverlängerungen auszeichnen (Campbell *et al.*, 1993; Pestonjamsap *et al.*, 1998), ist Villidin einzig in der Homologie zu der „WD-repeat“-Familie. Für die Gruppe der „WD-repeat“-Proteine konnte bis jetzt keine gemeinsame funktionelle Aufgabe identifiziert werden; es sind vielmehr ausschließlich strukturelle Eigenschaften, die diese Familie definieren.

Die Kristallstruktur des „WD-repeat“-Proteins G β zeichnet sich durch eine markante β -Propellerstruktur aus (Wall *et al.*, 1995). In G β formen die sieben repetitiven Einheiten eine zirkuläre, Propeller-ähnliche Konformation mit sieben, aus je vier β -Strängen gebildeten Blättern (Wall *et al.*, 1995; Sondek *et al.*, 1996) (Abb. 34 A). In G β stimmt jede Wiederholungseinheit in der Sequenz („repeat“) mit einer sich wiederholenden Strukturausbildung (Propellerblatt) überein. Allerdings steht eine einzelne repetitive Sequenzeinheit nicht für den Aufbau eines einzelnen Propellerblattes. Vielmehr enthält ein „repeat“ die ersten drei Stränge (Strang a,b,c) eines Blattes und den letzten Strang des nächsten Propellerblattes (Strang d) (Abb. 5 C). Das „WD-repeat“-Sequenzmotiv erlaubt also eine überlappende Struktur, die für die Stabilität des Propellers wichtig ist. Die korrespondierenden Sequenz- und Strukturwiederholungen führen zu der Schlußfolgerung, daß alle „WD-repeat“-Proteine eine vergleichbare Struktur besitzen. Da die Variabilität der „WD-repeat“-Konsensussequenz die Identifizierung und Zuordnung von „WD-repeat“-Proteinen diffizil gestaltet, veröffentlichte die Gruppe Neer 1999 folgende Definition: „A probable WD-repeat-protein is defined as one that has at least two non-overlapping matches to the GH-WD-core regular expression and two or more additional repeats in which mismatches to the expression are allowed“ (Smith *et al.*, 1999). Diese Definition basiert auf der Tatsache, daß es für eine β -Propellerstruktur unwahrscheinlich ist, daß sie aus weniger als vier Blättern besteht (Chothia *et al.*, 1997). Obgleich es vorstellbar ist, daß nur zwei oder drei „WD-repeats“ in einem Polypeptid dimerisieren und so vier oder sechs Propellerblätter formen.

Die β -Propellerstruktur ist in zahlreichen Protein-Familien vertreten. Auch die „WD-repeat“-Proteine werden aufgrund ihrer potentiellen Propellerstruktur der Großgruppe der β -Propeller-Proteine zugeordnet (Fülöp und Jones, 1999). Diese hochsymmetrische Struktur setzt sich aus gedrehten β -Blättern zusammen, die radial um einen zentralen Tunnel angeordnet sind. Bei den meisten Propeller-Proteinen dient dieser zentrale Tunnel bzw. der „Eingang“ des Tunnels der Koordination eines Liganden (Russell *et al.*, 1998). Das β -Propeller-Protein Clathrin, das eine Rolle in Endozytose und lysosomaler Biogenese einnimmt (Marsh und McMahon, 1999), Propeller-Proteine mit „kelch-repeat“-Motiv wie die Galactose-Oxidase (Adams *et al.*, 2000) oder das Propeller-Protein Kollagenase mit seinen hochkonservierten hydrophoben Aminosäuren (Li *et al.*, 1995; Neer und Smith, 1996) zeigen keine Sequenzähnlichkeit mit der „WD-repeat“-Familie. Für die Kollagenase wird ein interessanter Funktionsmechanismus angenommen: Nach der Bindung des Kollagen-Substrats legt sich die Propellerdomäne über die kalatytische Seite und führt so das Substrat der aktiven Seite zu (Gomis-Rüth *et al.*, 1996). Für die N-terminalen Domäne des Villidins ist ein vergleichbarer „Klapp“-Mechanismus im Zusammenhang mit Aktin-Interaktionen denkbar.

4.1.2.2 Villidin ist ein Coronin-Homolog mit Villin-homologer Sequenzerweiterung

Ein Vergleich der vollständigen „WD-repeat“-Domänen von Villidin und anderen WD-Proteinen mittels des Programmes Bestfit verdeutlichte, daß die Ähnlichkeit zu Coronin aus *D. discoideum* mit 41% am markantesten ist. Coronin ist ein zytoplasmatisches Aktin-assoziiertes Protein, das fünf „WD-repeats“ enthält (de Hostos *et al.*, 1991). Es akkumuliert zusammen mit Aktin in der „leading edge“ von sich fortbewegenden Zellen ebenso wie in Zellausstülpungen, die als „crowns“ (Zell-Kronen) bezeichnet werden und ist an der Organisation des Mikrofilamentsystems während der Zellbewegung und chemotaktischen Orientierung beteiligt (Gerisch *et al.*, 1995). Zahlreiche Coronin-homologe Proteine konnten in den letzten Jahren identifiziert werden und der Begriff der Coronin-Familie wurde geprägt (de Hostos, 1999). In Coronin folgt auf die fünf N-terminalen „WD-repeats“ eine „nicht-WD-repeat“-Domäne, wobei die letzten 32 Aminosäuren des C-Terminus eine α -helikale „coiled-coil“-Struktur ausbilden. Der Hauptunterschied der Moleküle der Coronin-Familie liegt in der variablen Region (22-194 As), die zwischen der konservierten „WD-repeat“- und der „coiled-coil“-Domäne lokalisiert ist. Darauf sind vermutlich auch die funktionellen Unterschiede zurückzuführen. Die Coronin-Homologie von Villidin liegt in der „WD-repeat“-Domäne beider Proteine begründet. Eine „coiled-coil“-Konfiguration wie in Coronin konnte in Villidin nicht identifiziert werden.

Die computergestützte Modellierung der dreidimensionalen Struktur der „WD-repeat“-Domäne von Villidin (Abb. 34 B) wurde auf der Basis der G β -Struktur berechnet. Es zeigte sich, daß die N-terminalen fünf Villidin-„WD-repeats“, nicht die Berechnung einer Propellerkonfiguration ermöglichen. Für die Ausbildung eines Propellers erscheinen zusätzlich die folgenden „repeats“ unerlässlich, obgleich diese in der Sequenzanalyse dem „WD-repeat“-Konsensus kaum entsprechen. Scheinbar gewährleisten sie eine Strukturverlängerung, die sich gut der radialen Propellerstruktur anpassen kann. Für Coronin (*D. discoideum*) sind bereits vier der fünf „WD-repeats“ ausreichend, um einen β -Propeller zu modellieren (nicht gezeigt).

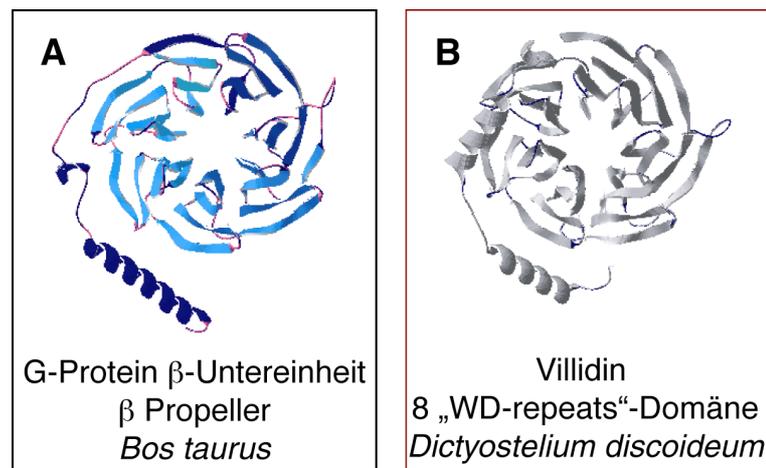


Abb. 34: Vergleich der bekannten β -Propellerstruktur von G β mit dem Modell für die „WD-repeat“-Strukturausbildung von Villidin.

(A) Aufsicht der sieben-blättrigen β -Propellerstruktur der G-Protein β -Untereinheit. Jedes Blatt der Propellerstruktur besteht aus einem einzelnen vier-strängigen β -Bogen („ β -sheet“). Sequenz- und Strukturwiederholungseinheiten sind nicht identisch, sondern überlappend, wodurch letztlich ein Mechanismus erzeugt wird, um den Ring zu schließen (Fülöp und Jones, 1999). (B) Mindestens acht Villidin-„WD-repeats“ sind nötig, um eine annähernd ähnliche Propellerstruktur zu erhalten.

Die stabile Plattform einer potentiellen β -Propellerstruktur der „WD-repeats“ kann Komplexe mit verschiedenen Proteinen ausbilden und ermöglicht so, die gleichzeitige oder sequentielle Koordination von Protein-Protein-Interaktionen. Zum Beispiel interagiert die G β -Untereinheit schwach mit Gy und gleichzeitig mit einem weiteren von mehr als 15 Interaktionspartnern (van der Voorn und Ploegh, 1992). In der vielfältigen Interaktionsmöglichkeit der Propellerstruktur liegt vermutlich die große funktionelle Diversität der Proteine der WD-Familie begründet. „WD-repeat“-Proteine und andere β -Propeller-Moleküle übernehmen die unterschiedlichsten Aufgaben in der Zelle. Sie sind in Zusammenhang mit Signaltransduktion, dem Kernporenkomplex oder der Vesikel-Formation zu finden (Neer, 1995; Siniossoglou *et al.*, 1996; Stenbeck *et al.*, 1993), um nur einige Beispiele zu nennen.

4.1.3 Intrazelluläre Lokalisation von Villidin

Nahezu alle Proteine der Gelsolin/Villin-Familie sind lösliche Proteine und einige lassen eine spezifische subzelluläre Anreicherung beobachten. Die Analyse der intrazellulären Villidin-Lokalisation wurde durch die Proteolyseempfindlichkeit von Villidin erschwert. Trotzdem war es möglich nachzuweisen, daß Villidin ein überwiegend lösliches Protein ist, das auch mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert vorliegt. Zellfraktionierungen verdeutlichten ferner die Assoziation mit Membranen.

In der Immunfluoreszenz war das endogene Villidin zytosolisch sowie an intrazellulären Strukturen lokalisiert, die ein vesikuläres Erscheinungsbild zeigen und über das gesamte Zytosol verteilt vorliegen. GFP-Fusionen mit der Villin-homologen Domäne zeigten eine vergleichbare Lokalisation. Vesikuläre Strukturen finden sich zum Beispiel im Rahmen des sekretorischen Transportwegs. Hauptkomponenten sind dabei die klassischen zytoplasmatischen „coats“. Beispielsweise sind COP II-„coats“, an deren Aufbau das „WD-repeat“-Protein Sec31p beteiligt ist, in den anterograden Transport aus dem ER involviert (Barlowe, 1998). Das Sec31p-Homolog des Menschen lokalisiert an kleinen, punktuellen Strukturen des Zytoplasmas (Shugrue *et al.*, 1999). Diese Immunfluoreszenzlokalisierung ähnelt der des endogenen Villidins und unterstützt ferner die Vermutung einer Kolo-kalisation von Villidin mit einem noch nicht identifizierten „coatomer“-Protein in *Dictyostelium* (Abb. 14 C). Das WD-Protein Sec13p ist wiederum am Aufbau des Kernporenkomplexes beteiligt (Siniosoglou *et al.*, 1996). Endogenes Villidin zeigt in der Immunfluoreszenz teilweise eine Lokalisation in Kernnähe (Abb. 13 H). Welche Bedeutung allerdings diese Lokalisation eventuell auch im Zusammenhang mit der „WD-repeat“-Domäne haben könnte, bleibt fraglich.

Studien der intrazellulären Verteilung von Villidin-GFP-Fusionsproteinen mit der N-terminalen „WD-repeat“-Domäne ließen eine Lokalisation an Membranregionen und eine Kolo-kalisation mit F-Aktin während Zellwanderung, Pino- und Phagozytose beobachten. Die F-Aktin-Bindung von Villidin scheint also über die Coronin-homologe Domäne und nicht über die F-Aktin-bindenden Motive der Villin-Domäne ermöglicht zu werden. Die *in vivo* Lokalisation an der Plasmamembran von *Dictyostelium*-Zellen konnte für mehrere Aktin-bindende-Proteine während Bewegungsprozessen beobachtet werden. Ebenso wie RacF1, ein Mitglied der Rho-Familie (Rivero *et al.*, 1999) und die „WD-repeat“-Proteine Coronin (Maniak *et al.*, 1995) und DAip1 (Konzok *et al.*, 1999) akkumulieren die Villidin-WD-Konstrukte vilk1- und vilk2-GFP an sich bildenden Pinosomen und Phagosomen. Allerdings verbleiben RacF1 und DAip1 an diesen Strukturen bis zur deren vollständiger Aufnahme in

die Zelle. Villidin-WD-GFP-Proteine werden hingegen wieder freigesetzt, wenn sich das Phagosom bzw. Pinosom von der Membran abdrückt (Abb. 17). Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, daß diese Proteine unterschiedliche Funktionen während Pino- und Phagozytose einnehmen. Die Analyse von Villidin-defizienten-Mutanten zeigte allerdings, daß das Villidin-Protein weder für Pino- noch Phagozytose essentiell erscheint, da die Mutanten Flüssigkeit oder Partikel ebenso effizient aufnehmen konnten wie Wildtyp-Zellen.

Die Lokalisation von *Dictyostelium* Coronin, Villidin und des Coronin-Homologs p57 in menschlichen Neutrophilen (phagozytische Leukozyten) läßt die Annahme zu, daß die Assoziation von Coronin-ähnlichen-Proteinen mit der Endozytose im Laufe der Evolution konserviert wurde. Coronin 1 (Synonyme: p57, hcoronin) verhält sich während der Phagozytose wie Coronin und Villidin in *Dictyostelium* und akkumuliert mit F-Aktin um Endozytose-Vesikel (Grogan *et al.*, 1997). Coronin 2 ist ein weiteres Coronin-Homolog (Okumura *et al.*, 1998), das mit Aktin interagiert. Interessanterweise hat es aber eine vesikuläre Lokalisation, die nicht mit dem F-Aktin-Muster überlappt (Parente *et al.*, 1999). Dieses Lokalisationsmuster erinnert wiederum an die Lokalisation des endogenen Villidins.

4.1.4 Die Bedeutung von Villidin in der Morphogenese von *D. discoideum*

Das wohl markanteste Merkmal von *D. discoideum* ist der auffallende Lebenszyklus, der die Entwicklung von Einzelzellen bis hin zu einem quasi-multizellulären Organismus mit differenzierten Zelltypen beinhaltet. Die meisten Aktin-bindenden Proteine, die bis dato in *Dictyostelium* identifiziert wurden, werden in allen Entwicklungsstadien exprimiert. Eine Ausnahme ist zum Beispiel Interaptin, das mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert vorliegt. Dieses Aktin-bindende Protein akkumuliert während der späten Aggregationsphase und der Kulmination. Wie Analysen von Mutanten zeigten, nimmt Interaptin eine wichtige Rolle für die Zell-Zell-Adhäsion ein (Rivero *et al.*, 1998). Die Analyse der Villidin-Expression auf mRNA- wie Proteinebene zeigte, daß es sich ebenfalls um ein entwicklungsreguliertes Protein handelt, dessen Expression in den ersten 14 Stunden stetig zunimmt, nach 16 h wieder sinkt und bis Ende der Entwicklung relativ konstant bleibt. Villidin ist nicht so strikt reguliert wie manche Zell-Adhäsions- oder Chemotaxisproteine, aber eine Akkumulation nach 12-16 h, also in der Phase der Konusbildung und des migrationsfähigen Pseudoplasmodiums, ist eindeutig. Kolokalisationsexperimente lassen allerdings darauf schließen, daß Villidin nicht wie Interaptin mit dem ER oder der Zell-Zell-Adhäsion in Zusammenhang steht. Villidin-minus-Mutanten lieferten einen ersten Einblick in die Bedeutung von Villidin während des „slug“-Stadiums.

4.1.5 Charakterisierung der Villidin-minus-Mutante

Durch die Zerstörung eines Gens können infolge damit verbundener phänotypischer Defekte Rückschlüsse auf die *in vivo* Funktion des entsprechenden Proteins im Wildtyp gemacht werden (Eichinger *et al.*, 1999; Noegel und Schleicher, 2000). Um die Bedeutung der Proteine der Gelsolin/Villin-Familie besser verstehen zu können, wurden zahlreiche Mutanten erzeugt. Beispielsweise war für *Drosophila*-Mutanten, die das Villin-Homolog Quail nicht exprimieren, ein Oogenese-Defekt zu beobachten (Mahajan-Miklos und Cooley, 1994). Severin-defiziente *Dictyostelium*-Zellen zeigen hingegen keinen auffälligen Phänotyp (André *et al.*, 1989). Die Generationszeit und Zelldichte der Villidin-minus-Mutanten war nicht von Wildtyp-Kulturen zu unterscheiden, ebenso wie das Wachstum auf Bakterienrasen. Diese Ergebnisse weisen auf intakte Pino- und Phagozytose hin. Auch im Laufe des Entwicklungszyklus zeigen die Villidin-minus-Mutanten zunächst keinen augenscheinlichen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp-Stamm. Da die Villidin-Expression entwicklungsreguliert erfolgt und ein Konzentrationsmaximum im Stadium des Pseudoplasmodiums erreicht, war die Migrationsphase von besonderem Interesse. Die Auswertung des Wanderverhaltens der Villidin-minus-Mutanten zeigte einen Defekt in der Migrationsfähigkeit und der Phototaxis der „slugs“. Allerdings ist ein Phototaxisdefekt für Mutanten, welchen ein Aktin-bindendes-Protein fehlt, nicht ungewöhnlich. *Dictyostelium*-Mutanten, die den Gelationsfaktor nicht exprimieren oder denen das Gelsolin-Homolog GRP125 fehlt, sind ebenfalls in ihrem Phototaxisverhalten beeinträchtigt (Fisher *et al.*, 1997; Stocker *et al.*, 1999). Proteine, die im Zusammenhang mit der Phototaxis stehen, sind vermutlich Teil von komplexen Signaltransduktionswegen, die wiederum von intrazellulären Botenstoffen wie cAMP oder Ca^{2+} gesteuert werden (Fisher *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu GRP125-Mutanten zeigen Villidin-Null-Pseudoplasmodien neben dem Phototaxisdefekt noch eine Verkürzung in der zurückgelegten Migrationsstrecke. In Hinblick auf diese Defekte und die Domänenstruktur von Villidin ist es naheliegend, für Villidin eine Rolle in der Signaltransduktion und innerhalb von Migrationsprozessen anzunehmen. Villidin könnte also als ein mögliches Verbindungsglied zwischen Signaltransduktion und Zytoskelett-Dynamik fungieren. Im Vergleich zu der potentiellen Rolle von Gelsolin in der Signaltransduktion, eröffnet die Villidin-Domänenstruktur die Möglichkeit eines breiteren Funktionsspektrums.

4.2 Profilin III

Im Rahmen einer Blast-Recherche konnte in der Datenbank des *Dictyostelium*-Genomprojekts Jena ein Klon identifiziert werden, der die Sequenzinformation für eine dritte Profilin-Isoform beinhaltet, welche eine starke Homologie zu den beiden anderen Profilin-Isoformen aus *D. discoideum* aufwies. Das Ziel dieses zweiten Teilprojektes war, die Expression dieser neuen Isoform molekularbiologisch nachzuweisen und durch *in vitro* Untersuchungen die Funktion näher zu analysieren. Dazu wurde Profilin III rekombinant gereinigt und biochemisch charakterisiert.

4.2.1 Die drei Profilin-Isoformen in *D. discoideum*

4.2.1.1 Die genomische Struktur der drei Profilin-Isoformen

Die Struktur der beiden Gene, welche die Profilin-Isoformen I und II in *D. discoideum* kodieren, zeigte, daß sich in beiden Genen mindestens ein Intron befindet (Haugwitz *et al.*, 1991). Solche Intronsequenzen sind in *Dictyostelium* besonders AT-reich (>85%) und durchschnittlich etwa 100-200 Basenpaare lang (Eichinger und Noegel, 2001). Allerdings kommen sie im *Dictyostelium*-Genom im Vergleich zu höheren Eukaryonten eher seltener vor. Besonders unter diesem Gesichtspunkt und bei der geringen Größe der Profilin-Gene ist das Auftreten von Introns in beiden Genen sehr erstaunlich. Somit war es von primärem Interesse, neben dem Nachweis der Profilin III-Expression auf mRNA-Ebene auch zu überprüfen, ob diese neue Profilin-Isoform durch ein eigenes Gen oder eventuell doch durch spezifisches Spleißen der Profilin I- oder II-RNA-Transkripte gebildet wird. Die „Southern-Blot“-Analyse von Wildtyp-DNA und DNA aus Profilin II/I-minus-Doppelmutanten läßt vermuten, daß für Profilin III in *D. discoideum* ein einzelnes Gen existiert. Das nachgewiesene Profilin-III-Transkript stellt also kein Spleißprodukt eines der beiden anderen Profilin-Gene dar. Introns konnten für das Profilin III-Gen selbst nicht identifiziert werden. Wie auch in *A. castellanii* und *P. polycephalum* werden die Profilin-Isoformen in *D. discoideum* also durch singuläre Gene kodiert.

4.2.1.2 Entwicklungsregulation von Profilin I, II und III

Die Transkription der Profilin I- und II-Gene erfolgt entwicklungsreguliert, aber mit unterschiedlichen Transkriptionsmustern (Haugwitz *et al.*, 1991). Die mRNA-Menge von Profilin I bleibt in den ersten 6 h der Entwicklung konstant, steigt danach an und verschwindet kurz vor der Kulminationsphase (nach 15 h) fast vollständig. Profilin II spezifische mRNA nimmt hingegen zu Beginn der Entwicklung zu, nach 12 Stunden wieder ab, und verschwindet ebenfalls beinahe gänzlich. Im Gegensatz zu Profilin I und II wird das Profilin III-Transkript, zwar während der gesamten Entwicklung exprimiert, aber in so geringen Mengen, daß es am Rande der Nachweisgrenze für eine „Northern-Blot“-Analyse mit Gesamt-RNA lag. Eine Entwicklungsregulation der Transkriptmenge war in der RT-PCR nicht nachweisbar. Die unterschiedliche, entwicklungsregulierte Transkription der drei Profilin-Gene könnte durch verschiedene funktionelle Aufgaben dieser multiplen Profilin-Formen erklärt werden. Es wird vermutet, daß Profilin II zu Beginn der Entwicklung, die durch eine hohe zelluläre Bewegungsaktivität geprägt ist, eine stärkere Rolle spielt als Profilin I, das bei der anschließenden Aggregation und Differenzierung von größerer Bedeutung sein könnte (Haugwitz *et al.*, 1991/1994). Da die Expression beider Profile kurz vor der Kulmination extrem abnimmt und bis Ende der Entwicklung nahezu gänzlich verschwindet, könnte hier die funktionelle Bedeutung der dritten Profilin-Isoform zu finden sein. Beispielsweise könnte Profilin III eine Rolle bei der Bildung des Sorocarps und der Sporen einnehmen.

4.2.1.3 Die Struktur der Profilin III-Peptidsequenz

Die Kristallstrukturen von Profilin (Schutt *et al.*, 1993; Cedergren-Zeppezauer *et al.*, 1994) und die NMR-Strukturanalyse verschiedener typischer Profile (Constantine *et al.*, 1993; Archer *et al.*, 1994; Metzler *et al.*, 1995) zeigen, daß Proteine dieser Familie eine analoge, hochkonservierte dreidimensionale Faltung aufweisen (Abb. 33 B). Das Profilin-Molekül wird aus einem zentralen antiparallelen β -Faltblatt gebildet, das auf der einen Seite von amino- und carboxy-terminalen α -Helices und auf der anderen Seite von kleineren α -Helices und einem β -Strang umgeben wird. Diese Profilin-Struktur zeigt darüber hinaus eine relativ hohe Ähnlichkeit zu der Faltung der Villin-Domäne I, die das G-Aktin-Bindemotiv beinhaltet. Villin zählt allerdings zu der Gruppe der Aktin-fragmentierenden und -verkappenden Proteine und weist ansonsten keine Ähnlichkeit zu Profilin auf (Markus *et al.*, 1997). Profilin ist ein G-Aktin sequestrierendes Protein. Strukturanalysen des Profilin-Aktin-Komplexes

veranschaulichten, wie Profilin mit G-Aktin einen 1:1 Komplex bildet, wobei es an die Untereinheiten 1 und 3 des monomeren Aktins bindet (Vandekerckhove *et al.*, 1989; Schutt *et al.*, 1993). In Profilin wird die Bindungsregion für Aktin durch die Helices 3 und 4 sowie die Strängen 4-6 geformt. Die Bedeutung des Lysinrestes (Lys) K125 des Aktin-Bindemotivs in Profilin (Rind), homolog zu K115 von *Acanthamoeba* Profilin, konnte durch chemische Vernetzung mit dem Glutaminsäurerest (Glu) E364 des Aktins gezeigt werden (Vandekerckhove *et al.*, 1989). Hochkonservierte, hydrophobe Aminosäuren bilden die N- und C-terminalen α -Helices des Profilins. Dabei wird eine Art hydrophobe Tasche ausgebildet, die für die Bindung von poly-L-Prolin verantwortlich ist (Haarer *et al.*, 1993; Metzler *et al.*, 1993; Archer *et al.*, 1994; Kaiser und Pollard, 1996).

Die Modellierung der dreidimensionalen Struktur von Profilin III wurde mittels des Programmes Swiss-Pdb Viewer v3.7b2 erzeugt. So konnten zunächst die potentiellen Eigenschaften dieser neuen Isoform und seiner Aminosäuren theoretisch abgeschätzt werden. Zahlreiche detaillierte Strukturanalysen für Profiline lassen annehmen, daß die Proteinfaltung des Profilins von Amöben bis hin zum Menschen stark konserviert wurde, unabhängig von mehr oder minder großen Unterschieden in den zugrundeliegenden Primärstrukturen. Im direkten Sequenzvergleich unterscheiden sich Profiline niederer Eukaryonten relativ stark von jenen der Säugetiere, was vermutlich im Zusammenhang mit dem viel späteren Entwicklungsursprung der Säuger steht. Die Betrachtung der phylogenetischen Entstehung von Profilin im Zuge der Evolution erlaubt ferner die Vermutung (Abb. 24), daß es sich bei Profilin I um die ursprünglichste Isoform in *D. discoideum* handelt und daß Profilin III erst nach den beiden anderen Profilinen, vielleicht infolge einer Genduplikation des Profilin II, entstanden ist. Das in Abbildung 33 B dargestellte theoretische Strukturmodell für Profilin III unterstützt die Annahme, daß auch dieses Profilin hochkonserviert vorliegt. Doch die Konservierung der dreidimensionalen Proteinstruktur bedingt nicht unbedingt die Konservierung funktioneller Eigenschaften eines Proteins, was am Beispiel des Villidin-„headpiece“-Segments bereits ausführlich in dieser Arbeit erläutert wurde. Für Profilin III konnten allerdings die typischen Profilin-Eigenschaften mittels biochemischer Analysetechniken bestätigt werden.

4.2.2 Die poly-L-Prolin-Bindungsfähigkeit von Profilin III

Die aus hochkonservierten Aminosäuren gebildete hydrophobe Tasche der Profilin-Struktur ist für die Bindung von poly-L-Prolin verantwortlich (Haarer *et al.*, 1993; Kaiser und Pollard, 1996). Das Profilin des Vaccinia-Virus ist das einzige bekannte Profilin-Homolog, das nicht an poly-L-Prolin binden kann, was an der Substitution bestimmter aromatischer Aminosäurereste liegt (Machesky *et al.*, 1994). Profilin III zeichnet sich am N-Terminus durch das poly-L-Prolin-Bindemotiv aus. Sedimentationsversuche des rekombinanten Profilin III mit einer poly-L-Prolin-Matrix bestätigten die vermutete poly-L-Prolin-Interaktionsfähigkeit. Die Bindung von Profilin III an poly-L-Prolin erschien in diesem Experiment relativ intensiv, was zu der Vermutung führt, daß vielleicht *in vivo* eine unterschiedliche Affinität von Profilin III, II und I für Prolin-reiche Proteine existieren könnte. Für *Dictyostelium* konnten noch keine natürlichen Prolin-reichen Liganden von Profilin beschrieben werden. Die einzig bekannten Proteine mit poly-L-Prolin-Sequenzen sind VASP und das VASP-Homolog Mena (Reinhard *et al.*, 1995; Gertler *et al.*, 1996).

Allerdings war es für *Dictyostelium* Profilin II durch die Analyse von Punktmutationen im Bereich des poly-L-Prolin- und Aktin-Bindemotivs möglich, die Bedeutung beider Interaktionen zu differenzieren (Lee *et al.*, 2000). Dabei war die Profilin II/I-null-Doppelmutante von Nutzen, die weder Profilin I noch II exprimiert und nicht in der Lage ist Fruchtkörper auszubilden (Haugwitz *et al.*, 1994; Karakesisoglou *et al.*, 1996). Die Profilin-Punktmutation K114E, die eine funktionsfähige poly-L-Prolin-Bindestelle besitzt, kann bereits bei geringen Konzentrationen den Entwicklungsblock der Doppelmutante aufheben. Im Falle der Profilin-W3N-Mutation, bei der durch den Austausch des konservierten Tryptophan gegen Asparagin die poly-L-Prolin-Bindeeigenschaft aufgehoben ist, waren wesentlich höhere zelluläre Konzentrationen nötig um den Wildtyp-Phänotyp wiederherzustellen. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, daß zur Aufrechterhaltung einer normalen Zellphysiologie die poly-L-Prolin-Interaktion von Profilin II essentieller erscheint als die Fähigkeit Aktin zu binden. In diesem Zusammenhang liegt die Frage nahe, ob eine Überexpression von Profilin III, die Ausbildung von Fruchtkörpern für die Doppelmutante ermöglicht. Die Tatsache, daß die Abschaltung von Profilin I und II solch einen extrem phänotypischen Defekt verursacht, obgleich Profilin III exprimiert wird, kann durch die geringe Profilin III-Konzentration in den Zellen erklärt werden. Die Vermutung, daß eine Profilin III-Funktion erst gegen Ende der Entwicklung zum Tragen kommt, stellt eine weitere Erklärungsmöglichkeit dar. „Rescue“-Versuche diesbezüglich befinden sich in Arbeit.

4.2.3 Die Interaktion von Profilin III mit Aktin *in vitro*

Die Polymerisation und Depolymerisation der Aktin-Filamente unterliegt einer komplexen Regulation und verleiht der Zelle die Fähigkeit zur schnellen und drastischen Umorganisation des Zytoskeletts. Eine wichtige Funktion von Aktin-bindenden Proteinen ist die Hemmung der Filamentbildung entweder durch Inhibierung der Nukleation des Filamentes oder durch Erzeugung einer nicht-polymerisationsfähigen Form der Aktin-Monomere. Profilin ist ein G-Aktin bindendes Protein, und die ursprünglich beschriebene Hauptfunktion ist die Blockierung des Filamentwachstums durch die Bildung eines Profilaktin-Komplexes (Carlsson *et al.*, 1977). Profilin kann aber ebenso einen positiven Effekt auf die Polymerisation haben. Bei der Interaktion von Profilin mit G-Aktin fungiert Profilin auch als Nukleotidaustauschfaktor und es kommt zu einer Steigerung der ADP/ATP-Austauschrate (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1992). Darüber hinaus kann Profilin die kritische Konzentration herabsetzt und so die Polymerisation fördern (Pantaloni und Carlier, 1993). Die Filamente polymerisieren entweder durch die direkte Bindung von ATP-Aktin oder durch die Bindung des ATP-Aktin-Profilin-Komplexes und anschließender Dissoziation des Profilins. Bei niedrigen Profilin-Konzentrationen tendieren die Zellen zur Depolymerisation, während sie bei hohen Konzentrationen die Tendenz zur Bindung des Aktin-Profilin-Komplexes zeigen.

Die Profilin-Aktin-Bindung wird *in vitro* durch Membranphospholipide wie PIP₂ reguliert (Lassing und Lindberg, 1985; Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1990). Die tatsächliche Funktion von Profilin hängt letztlich von den gegebenen Bedingungen in der Zelle ab. Für die *Dictyostelium*-Profilin-Isoformen I und II konnte die G-Aktin-Bindung und eine Hemmung der Aktin-Polymerisation festgestellt werden (Haugwitz *et al.*, 1991). Sowohl Profilin I als auch Profilin II bilden einen 1:1 Komplex mit G-Aktin und bewirken eine Erhöhung der kritischen Aktin-Konzentration. Allerdings zeigt Profilin II eine leicht höhere Aktivität. Auch für Profilin III konnte die hemmende Wirkung auf die Aktin-Polymerisation gezeigt werden. Sie erscheint allerdings im Vergleich zu den beiden anderen Isoformen etwas schwächer, was als Hinweis auf eine unterschiedliche *in vitro* Funktion gedeutet werden könnte. Das Vorhandensein des für die Aktin-Bindung nötigen Lysins in der korrekten Sequenzposition (Abb. 23) sowie die Strukturvorhersage für Profilin III (Abb. 33 B) lassen die Annahme zu, daß alle drei *Dictyostelium*-Profiline mit Aktin in der gleichen Region interagieren, wie es bereits durch Kristallisationsanalysen zum erstenmal für Profilin aus *Acanthamoeba* gezeigt wurde (Schutt *et al.*, 1989).

4.2.4 Die PIP₂-Regulation der Profilin III-Aktin-Interaktion

Phosphatidylinositol-Phospholipide spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Zytoskeletts, obgleich sie nur einen geringen Anteil der Gesamtlipide in den Membransystemen von Eukaryonten ausmachen. Das Signalmolekül PIP₂ reguliert die Aktivität vieler Aktin-bindender Proteine (Janmey, 1995; Toker, 1998), wie Gelsolin, Severin und Profilin. Durch die Bindung von PIP₂ an einen Profilaktin-Komplex kommt es zur Dissoziation von Profilin und G-Aktin wird freigesetzt. Das an PIP₂ gebundene Profilin hemmt die Phospholipase C, die ansonsten PIP₂ in die sekundären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-tris-Phosphat (IP₃) spalten würde (Machesky *et al.*, 1990). IP₃ würde wiederum die Freisetzung von Calcium ins Zytoplasma auslösen. Es kommt also durch die PIP₂-Bindung an den Profilaktin-Komplex zu einem Ansteigen der Konzentration an freiem G-Aktin in der Zelle und parallel zu einer Unterdrückung der Freisetzung von sekundären Botenstoffen. Profilin beeinflusst also auch die Signaltransduktion und setzt diese mit einer geregelten Aktin-Polymerisation in Beziehung (Machesky *et al.*, 1990). In *D. discoideum* konnte ebenfalls die Wirkung von PIP₂ auf die Aktin-sequestrierende Eigenschaft von Profilin I und II beobachtet werden (Lee *et al.*, 2000). Auch für Profilin III war der Einfluß von PIP₂ nachweisbar. Die dritte Isoform besitzt folglich alle typischen Profilin-Eigenschaften von der poly-L-Prolin- über die G-Aktin-Bindung bis hin zur Interaktionsfähigkeit mit PIP₂, die mit der G-Aktin-Affinität konkurriert.

4.2.5 Die physiologische Bedeutung von Profilin

Ebenso wie *Dictyostelium* exprimieren zahlreiche Organismen zwei oder drei Profilin-Isoformen. Pflanzliche Profile existieren sogar in großen Multigen-Familien (Guillen *et al.*, 2001). Es wird angenommen, daß bis zu sechs Isoformen in *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* exprimiert werden (Christensen *et al.*, 1996; Gibbon *et al.*, 1998). Die Isoformen unterscheiden sich sowohl in ihrer Affinität für G-Aktin (Gieselmann *et al.*, 1995), Polyphosphoinositole (Machesky *et al.*, 1990; Lambrechts *et al.*, 1997) oder poly-L-Prolin (Lambrechts *et al.*, 1997) als auch in der zellulären Lokalisation (Bubb *et al.*, 1998) und der gewebespezifischen Expression (Kovar *et al.*, 2000). Neben dem detaillierten Wissen über die unterschiedliche Affinität gegenüber Interaktionspartnern *in vitro*, ist die potentielle Bedeutung dieser Unterschiede *in vivo* hinsichtlich der Regulation des Aktin-Zytoskeletts oder anderer zellulärer Prozesse noch unklar.

Die Lokalisation der *Dictyostelium*-Profiline I und II konnte zunächst nicht eindeutig für spezifische Zellregionen nachgewiesen werden (Haugwitz *et al.*, 1991). Neueste konfokale Mikroskopie-Daten von lebenden *Dictyostelium*-Zellen, die mit einem Profilin II-GFP-Fusionsprotein transfiziert wurden, zeigen allerdings eine deutliche Assoziation von Profilin mit Aktin-abhängigen zellulären Prozessen. So akkumuliert Profilin II am Zellkortex, ferner an der Zellfront von aggregierenden Zellen sowie transient an den typischen Phagozytosestrukturen. Für Profilin III liegen diesbezüglich noch keine Daten vor. Obgleich die mRNA-Konzentration von Profilin III auf einem gleichbleibend niedrigen Niveau zu bleiben scheint, ist nicht auszuschließen, daß diese Isoform in lokalen Zellbereichen oder in bestimmten, differenzierten Zelltypen der späten Entwicklungsstadien akkumuliert und erst dann von Bedeutung ist. Die bereits in Herstellung befindlichen monoklonalen Profilin-Antikörper werden letztlich zur Aufklärung der Expression und intrazellulären Verteilung des Profilin III-Proteins beitragen können.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Aalberse, R.C. 2000. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 106(2):228-38.
- Adams, J., R. Kelso und L. Cooley. 2000. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol.* 10(1):17-24.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers und D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-10.
- Altschul, S.F. 1993. A protein alignment scoring system sensitive at all evolutionary distances. *J Mol Evol.* 36(3):290-300.
- André, E., M. Brink, G. Gerisch, G. Isenberg, A.A. Noegel, M. Schleicher, J.E. Segall und E.A. Wallraff. 1989. *Dictyostelium* mutant deficient in severin, an F-actin fragmenting protein, shows normal motility and chemotaxis. *J Cell Biol.* 108(3):985-95.
- Archer, S.J., V.K. Vinson, T.D. Pollard und D.A. Torchia. 1994. Elucidation of the poly-L-proline binding site in *Acanthamoeba* profilin I by NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* 337(2):145-51.
- Aubry, L., G. Klein und M. Satre. 1997. Cytoskeletal dependence and modulation of endocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. In: „*Dictyostelium* - A model system for cell and developmental biology“ (Maeda, Y., K. Inouye und I. Takeuchi, Hrsg.). *Universal Academy Press, Tokyo.* 65-74.
- Azim, A.C., J.H. Knoll, A.H. Beggs and A.H. Chishti. 1995. Isoform cloning, actin binding, and chromosomal localization of human erythroid dematin, a member of the villin superfamily. *J Biol Chem.* 270(29):17407-13.
- Azuma, T., W. Witke, T.P. Stossel, J.H. Hartwig and D.J. Kwiatkowski. 1998. Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility. *EMBO J.* 17(5):1362-70.
- Bähler, M. 1996. Myosins on the move to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 8(1):18-22.
- Baker, J.P. and M.A. Titus. 1998. Myosins: matching functions with motors. *Curr Opin Cell Biol.* 10(1):80-6.
- Barkalow, K., W. Witke, D.J. Kwiatkowski and J.H. Hartwig. 1996. Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by gelsolin and capping protein. *J Cell Biol.* 134(2):389-99.
- Barlowe, C. 1998. COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Acta.* 1404(1-2):67-76.

- Bartel, P., C.T. Chien, R. Sternglanz und S. Fields. 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*. 14(6):920-4.
- Bazari WL, Matsudaira P, Wallek M, Smeal T, Jakes R, Ahmed Y. 1988. Villin sequence and peptide map identify six homologous domains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85(14):4986-90.
- Ben Yehuda, S., I. Dix, C.S. Russell, S. Levy, J.D. Beggs und M. Kupiec. 1998. Identification and functional analysis of hPRP17, the human homologue of the PRP17/CDC40 yeast gene involved in splicing and cell cycle control. *RNA*. 4(10):1304-12.
- Bertholdt, G., J. Stadler, S. Bozzaro, B. Fichtner und G. Gerisch. 1985. Carbohydrate and other epitopes of the contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum* as characterized by monoclonal antibodies. *Cell Differ*. 16(3):187-202.
- Binder. M., S. Ortner, H. Erben, O. Scheiner, G. Wiedermann, R. Valenta und M. Duchene. 1995. The basic isoform of profilin in pathogenic *Entamoeba histolytica*. cDNA cloning, heterologous expression, and actin-binding properties. *Eur J Biochem*. 233(3):976-81.
- Birnboim, H.C. und J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7(6):1513-23.
- Blanchoin L., T.D. Pollard und R.D. Mullins. 2000. Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol*. 10(20):1273-82.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.
- Brent, R. und M. Ptashne. 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*. 43(3 Pt 2):729-36.
- Bretscher, A. und K. Weber. 1979. Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76(5):2321-5.
- Brown, S.S. 1986. Purification of severin. *Methods Enzymol*. 134:9-13.
- Bryan, J. und M.C. Kurth. 1984. Actin-gelsolin interactions. Evidence for two actin-binding sites. *J Biol Chem*. 259(12):7480-7.
- Bubb, M.R., I.C. Baines und E.D. Korn. 1998. Localization of actobinding, profilin I, profilin II, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) in *Acanthamoeba castellanii*. *Cell Motil Cytoskeleton*. 39(2):134-46.

- Burtnick, L.D., E.K. Koepf, J. Grimes, E.Y. Jones, D.I. Stuart, P.J. McLaughlin und R.C. Robinson. 1997. The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell*. 90(4):661-70.
- Campbell, H.D., T. Schimansky, C. Claudianos, N. Ozsarac, A.B. Kasprzak, J.N. Cotsell, I.G. Young, H.G. de Couet und G.L. Miklos. 1993. The *Drosophila melanogaster* flightless-I gene involved in gastrulation and muscle degeneration encodes gelsolin-like and leucine-rich repeat domains and is conserved in *Caenorhabditis elegans* and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(23):11386-90.
- Campbell, H.D., S. Fountain, I.G. Young, C. Claudianos, J.D. Hoheisel, K.S. Chen und J.R. Lupski. 1997. Genomic structure, evolution, and expression of human FLII, a gelsolin and leucine-rich-repeat family member: overlap with LLGL. *Genomics*. 42(1):46-54.
- Campbell, H.D., S. Fountain, I.G. Young, S. Weitz, P. Lichter und J.D. Hoheisel. 2000. Fliih, the murine homologue of the *Drosophila melanogaster* flightless I gene: nucleotide sequence, chromosomal mapping and overlap with Llglh. *DNA Seq*. 11(1-2):29-40.
- Cant, K., B.A. Knowles, S. Mahajan-Miklos, M. Heintzelman und L. Coole. 1998. *Drosophila* fascin mutants are rescued by overexpression of the villin-like protein, quail. *J Cell Sci*. 111(Pt 2):213-21.
- Carlier, M.F. 1998. Control of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 10(1):45-51.
- Carlier, M.F. und D. Pantaloni. 1997. Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol*. 269(4):459-67.
- Carlsson, L., L.E. Nystrom, I. Sundkvist, F. Markey und U. Lindberg. 1977. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol*. 115(3):465-83.
- Cedergren-Zeppezauer, E.S., N.C. Gooneseker, M.D. Rozycki, J.C. Myslik, Z. Dauter, U. Lindberg und C.E. Schutt. 1994. Crystallization and structure determination of bovine profilin at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol*. 240(5):459-75.
- Chothia, C., T. Hubbard, S. Brenner, H. Barns und A. Murzin. 1997. Protein folds in the all- β and all- α classes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 26:597-627.
- Christensen, H.E., S. Ramachandran, C.T. Tan, U. Surana, C.H. Dong und N.H. Chua. 1996. *Arabidopsis* profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *Plant J*. 10(2):269-79.
- Claviez, M., K. Pagh, H. Maruta, W. Baltes, P. Fisher und G. Gerisch. 1982. Electron microscopic mapping of monoclonal antibodies on the tail region of *Dictyostelium* myosin. *EMBO J*. 1:1017-1022.

- Constantine, K.L., M.S. Friedrichs, A.J. Bell, T.B. Lavoie, L. Mueller und W.J. Metzler. 1993. Relaxation study of the backbone dynamics of human profilin by two-dimensional ^1H - ^{15}N NMR. *FEBS Lett.* 336(3):457-61.
- de Arruda, M.V., H. Bazari, M. Wallek und P. Matsudaira. 1992. An actin footprint on villin. Single site substitutions in a cluster of basic residues inhibit the actin severing but not capping activity of villin. *J Biol Chem.* 267(18):13079-85.
- de Hostos, E.L., B. Bradtke, F. Lottspeich, R. Guggenheim und G. Gerisch. 1991. Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein β -subunits. *EMBO J.* 10(13):4097-104.
- de Hostos, E.L., C. Rehfuess, B. Bradtke, D.R. Waddell, R. Albrecht, J. Murphy und G. Gerisch. 1993. *Dictyostelium* mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. *J Cell Biol.* 120(1):163-73.
- de Hostos, E.L. 1999. The coronin family of actin-associated proteins. *Trends Cell Biol.* 9(9):345-50.
- Derick, L.H., S.C. Liu, A.H. Chishti und J. Palek. 1992. Protein immunolocalization in the spread erythrocyte membrane skeleton. *Eur J Cell Biol.* 57(2):317-20.
- Devereux, J., P. Haerberli und O. Smithies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12(1 Pt 1):387-95.
- D'Haese, J., M. Rutschmann, B. Dahlmann und H. Hinssen. 1987. Activity of a gelsolin-like actin modulator in rat skeletal muscle under protein catabolic conditions. *Biochem J.* 248(2):397-402.
- Doering, D.S. und P. Matsudaira. 1996. Cysteine scanning mutagenesis at 40 of 76 positions in villin headpiece maps the F-actin binding site and structural features of the domain. *Biochemistry.* 35(39):12677-85.
- Duden, R., G. Griffiths, R. Frank, P. Argos und T.E. Kreis. 1991. β -COP, a 110 kD protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to β -adaptin. *Cell.* 64(3):649-65.
- Durfee, T., K. Becherer, P.L. Chen, S.H. Yeh, Y. Yang, A.E. Kilburn, W.H. Lee und S.J. Elledge. 1993. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 7(4):555-69.
- Durfee, T., O. Draper, J. Zupan, D.S. Conklin und P.C. Zambryski. 1999. New tools for protein linkage mapping and general two-hybrid screening. *Yeast.* 15(16):1761-8.
- Dretzen, G., M. Bellard, P. Sassone-Corsi und P. Chambon. 1981. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal Biochem.* 112(2):295-8.

- Eichinger, L., A.A. Noegel und M. Schleicher. 1991. Domain structure in actin-binding proteins: expression and functional characterization of truncated severin. *J Cell Biol.* 112(4):665-76.
- Eichinger, L. und M. Schleicher. 1992. Characterization of actin- and lipid-binding domains in severin, a Ca(2+)-dependent F-actin fragmenting protein. *Biochemistry.* 31(20):4779-87.
- Eichinger, L., S.S. Lee und M. Schleicher. 1999. *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech.* 47(2):124-34.
- Eichinger, L. und A.A. Noegel. 2001. Das *Dictyostelium*-Genomprojekt. *Biospektrum.* 3.01 7. Jahrgang.
- Faix, J., M. Steinmetz, H. Boves, R.A. Kammerer, F. Lottspeich, U. Mintert, J. Murphy, A. Stock, U. Aebi und G. Gerisch. 1996. Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin-bundling proteins with a parallel coiled-coil tail. *Cell.* 86(4):631-42.
- Fedorov, A.A., K.A. Magnus, M.H. Graupe, E.E. Lattman, T.D. Pollard und S.C. Almo. 1994. X-ray structures of isoforms of the actin-binding protein profilin that differ in their affinity for phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(18):8636-40.
- Feldman, R.M., C.C. Correll, K.B. Kaplan und R.J. Deshaies. 1997. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell.* 91(2):221-30.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics.* 5:164-166.
- Fields, S. 1993. The yeast two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *METHODS. A Companion to Meth. enzymol.* 5:116-124.
- Fields, S. und R. Sternglanz. 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 10(8):286-92.
- Finidori, J., E. Friederich, D.J. Kwiatkowski und D. Louvard. 1992. *In vivo* analysis of functional domains from villin and gelsolin. *J Cell Biol.* 116(5):1145-55.
- Fisher, P.R., W.N. Grant, U. Dohrmann und K.L. Williams. 1983. Spontaneous turning behaviour by *Dictyostelium discoideum* slugs. *J Cell Sci.* 62:161-70.
- Fisher, P.R., A.A. Noegel, M. Fechheimer, F. Rivero, J. Prassler und G. Gerisch. 1997. Photosensory and thermosensory responses in *Dictyostelium* slugs are specifically impaired by absence of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120). *Curr Biol.* 7(11):889-92.

- Flanagan, L.A., C.C. Cunningham, J. Chen, G.D. Prestwich, K.S. Kosik und P.A. Janmey. 1997. The structure of divalent cation-induced aggregates of PIP₂ and their alteration by gelsolin and tau. *Biophys J.* 73(3):1440-7.
- Flick, J.S. und M. Johnston. 1990. Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 10(9):4757-69.
- Fraser, I.D., O. Copeland, W. Bing und S.B. Marston. 1997. The inhibitory complex of smooth muscle caldesmon with actin and tropomyosin involves three interacting segments of the C-terminal domain IV. *Biochemistry.* 36(18):5483-92.
- Friederich, E., E. Pringault, M. Arpin und D. Louvard. 1990. From the structure to the function of villin, an actin-binding protein of the brush border. *Bioessays.* 12(9):403-8.
- Friederich, E., K. Vancompernelle, C. Huet, M. Goethals, J. Finidori, J. Vandekerckhove und D. Louvard. 1992. An actin-binding site containing a conserved motif of charged amino acid residues is essential for the morphogenic effect of villin. *Cell.* 70(1):81-92.
- Friederich, E., K. Vancompernelle, D. Louvard und J. Vandekerckhove. 1999. Villin function in the organization of the actin cytoskeleton. Correlation of *in vivo* effects to its biochemical activities *in vitro*. *J Biol Chem.* 274(38):26751-60.
- Fritz, C.C. und M.R. Green. 1992. Fishing for partners. *Current Biol.* 2:403-405.
- Fritz, C.C., M.L. Zapp und M.R. Green. 1995. A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature.* 376(6540):530-3.
- Fucini, P., C. Renner, C. Herberhold, A.A. Noegel und T.A. Holak. 1997. The repeating segments of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120) have an immunoglobulin-like fold. *Nat Struct Biol.* 4(3):223-30.
- Fukui, Y., A. De Lozanne und J.A. Spudich. 1990. Structure and function of the cytoskeleton of a *Dictyostelium* myosin-defective mutant. *J Cell Biol.* 110(2):367-78.
- Fülöp, V. und D.T. Jones. 1999. β -propellers: structural rigidity and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol.* 9(6):715-21.
- Fukui, Y., E.L. de Hostos und S. Inoue. 1997. Dynamics of GFP-coronin and eupodia in live *Dictyostelium* observed with real-time confocal optics. *Biol Bull.* 193(2):224-5.
- Fukui, Y., S. Engler, S. Inoue und E.L. de Hostos. 1999. Architectural dynamics and gene replacement of coronin suggest its role in cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 42(3):204-17.
- Gerisch, G., R. Albrecht, C. Heizer, S. Hodgkinson und M. Maniak. 1995. Chemoattractant-controlled accumulation of coronin at the leading edge of *Dictyostelium* cells monitored using a green fluorescent protein-coronin fusion protein. *Curr Biol.* 5(11):1280-5.

- Gertler, F.B., K. Niebuhr, M. Reinhard, J. Wehland und P. Soriano. 1996. Mena, a relative of VASP and *Drosophila Enabled*, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*. 87(2):227-39.
- Gettemans, J., Y. De Ville, J. Vandekerckhove und E. Waelkens. 1992. *Physarum* actin is phosphorylated as the actin-fragmin complex at residues Thr203 and Thr202 by a specific 80 kDa kinase. *EMBO J*. 11(9):3185-91.
- Gibbon, B.C., H. Ren und C.J. Staiger. 1998. Characterization of maize (*Zea mays*) pollen profilin function *in vitro* and in live cells. *Biochem J*. 327 (Pt 3):909-15.
- Giebing, T., H. Hinssen und J. D'Haese. 1994. The complete sequence of a 40-kDa actin-modulating protein from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Eur J Biochem*. 225(3):773-9.
- Gieselmann, R., D.J. Kwiatkowski, P.A. Janmey und W. Witke. 1995. Distinct biochemical characteristics of the two human profilin isoforms. *Eur J Biochem*. 229(3):621-8.
- Gietz, R.D., A. St Jean, R.A. Woods und R.H. Schiestl. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*. 20(6):1425.
- Gietz, R.D., R.H. Schiestl, A.R. Willems und R.A. Woods. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*. 11(4):355-60.
- Gill, S.C. und P.H. von Hippel. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*. 182(2):319-26.
- Glenney, J.R. Jr., P. Kaulfus und K. Weber. 1981a. F actin assembly modulated by villin: Ca²⁺-dependent nucleation and capping of the barbed end. *Cell*. 24(2):471-80.
- Glenney, J.R. Jr., N. Geisler, P. Kaulfus und K. Weber. 1981b. Demonstration of at least two different actin-binding sites in villin, a calcium-regulated modulator of F-actin organization. *J Biol Chem*. 256(15):8156-61.
- Glenney, J.R. Jr. und K. Weber. 1981c. Calcium control of microfilaments: uncoupling of the F-actin-severing and -bundling activity of villin by limited proteolysis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78(5):2810-4.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., L.M. Machesky, J.J. Baldassare und T.D. Pollard. 1990. The actin-binding protein profilin binds to PIP₂ and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science*. 247(4950):1575-8.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., M.I. Furman, D. Wachsstock, D. Safer, V.T. Nachmias und T.D. Pollard. 1992. The control of actin nucleotide exchange by thymosin β 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell*. 3(9):1015-24.

- Gomis-Rüth, F.X., U. Gohlke, M. Betz, V. Knauper, G. Murphy, C. Lopez-Otin und W. Bode. 1996. The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): 2.7 Å crystal structure of its C-terminal haemopexin-like domain. *J Mol Biol.* 264(3):556-66.
- Goode, B.L., J.J. Wong, A.C. Butty, M. Peter, A.L. McCormack, J.R. Yates, D.G. Drubin und G. Barnes. 1996. Coronin promotes the rapid assembly and cross-linking of actin filaments and may link the actin and microtubule cytoskeletons in yeast. *J Cell Biol.* 144(1):83-98.
- Gottwald, U., R. Brokamp, I. Karakesisoglou, M. Schleicher und A.A. Noegel. 1996. Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in *Dictyostelium discoideum* and characterization of its interaction with actin. *Mol Biol Cell.* 7(2):261-72.
- Grogan, A., E. Reeves, N. Keep, F. Wientjes, N.F. Totty, A.L. Burlingame, J.J. Hsuan und A.W. Segal. 1997. Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils. *J Cell Sci.* 110 (Pt 24):3071-81.
- Guex, N. und M.C. Peitsch. 1998. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18(15):2714-23.
- Guillen, G., L.M. Lopez-Sanchez, C.S. Roman-Roque, F. Sanchez und M.A. Villanueva. 2001. Biochemical characterization of profilin from seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol.* 2001 42(1):54-62.
- Gutjahr, T., E. Frei, C. Spicer, S. Baumgartner, R.A. White und M. Noll. 1995. The Polycomb-group gene, extra sex combs, encodes a nuclear member of the WD-40 repeat family. *EMBO J.* 1995 Sep 1;14(17):4296-306.
- Haarer, B.K., A.S. Petzold und S.S. Brown. 1993. Mutational analysis of yeast profilin. *Mol Cell Biol.* 13(12):7864-73.
- Hacker, U., R. Albrecht und M. Maniak. 1997. Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* 110 (Pt 2):105-12.
- Haugwitz, M., A.A. Noegel, D. Rieger, F. Lottspeich und M. Schleicher. 1991. *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J Cell Sci.* 100 (Pt 3):481-9.
- Haugwitz, M., A.A. Noegel, J. Karakesisoglou und M. Schleicher. 1994. *Dictyostelium* amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell.* 79(2):303-14.
- Haus, U., P. Trommler, P.R. Fisher, H. Hartmann, F. Lottspeich, A.A. Noegel und M. Schleicher. 1993. The heat shock cognate protein from *Dictyostelium* affects actin polymerization through interaction with the actin-binding protein cap32/34. *EMBO J.* 12(10):3763-71.

- Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi and S.J. Elledge. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993 75(4):805-16.
- Harris, S.D. und J.E. Hamer. 1995. sepB: an *Aspergillus nidulans* gene involved in chromosome segregation and the initiation of cytokinesis. *EMBO J*. 14(21):5244-57.
- Hartwig, J.H., G.M. Bokoch, C.L. Carpenter, P.A. Janmey, L.A. Taylor, A. Toker und T.P. Stossel. 1995. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell*. 82(4):643-53.
- Heintzelman, M.B. und M.S. Mooseker. 1992. Assembly of the intestinal brush border cytoskeleton. *Curr Top Dev Biol*. 26:93-122.
- Hemmings, L., D.J. Rees, V. Ohanian, S.J. Bolton, A.P. Gilmore, B. Patel, H. Priddle, J.E. Trevithick, R.O. Hynes und D.R. Critchley. 1996. Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J Cell Sci*. 11:2715-26.
- Hinszen, H. 1981a. An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. II. Ca⁺⁺-dependence and other properties. *Eur J Cell Biol*. 23(2):234-40.
- Hinszen, H. 1981b. An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. I. Isolation and purification. *Eur J Cell Biol*. 23(2):225-33.
- Hock, R.S. und J.S. Condeelis. 1987. Isolation of a 240-kilodalton actin-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*. 262(1):394-400.
- Hofmann, A., A.A. Noegel, L. Bomblies, F. Lottspeich und M. Schleicher. 1993. The 100 kDa F-actin capping protein of *Dictyostelium* amoebae is a villin prototype ('protovillin'). *FEBS Lett*. 328(1-2):71-6.
- Hoffmeister, K.M., H. Falet, A. Toker, K.L. Barkalow, T.P. Stossel und J.H. Hartwig. 2001. Mechanisms of cold-induced platelet actin assembly. *J Biol Chem*. (im Druck)
- Holmes, D.S. und M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*. 114(1):193-7.
- Howard, P.K., K.G. Ahern und R.A. Firtel. 1988. Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res*. 16(6):2613-23.
- Husain-Chishti, A., W. Faquin, C.C. Wu und D. Branton . 1989. Purification of erythrocyte dematin (protein 4.9) reveals an endogenous protein kinase that modulates actin-bundling activity. *J Biol Chem*. 264(15):8985-91.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata und A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*. 153(1):163-8.

- Janda, L., P. Tichy, J. Spizek und M. Petricek. 1996. A deduced *Thermomonospora curvata* protein containing serine/threonine protein kinase and WD-repeat domains. *J Bacteriol.* 178(5):1487-9.
- Janmey, P.A. und P.T. Matsudaira. 1988. Functional comparison of villin and gelsolin. Effects of Ca^{2+} , KCl, and polyphosphoinositides. *J Biol Chem.* 263(32):16738-43.
- Janmey, P.A. und T.P. Stossel. 1989. Gelsolin-polyphosphoinositide interaction. Full expression of gelsolin-inhibiting function by polyphosphoinositides in vesicular form and inactivation by dilution, aggregation, or masking of the inositol head group. *J Biol Chem.* 264(9):4825-31.
- Janmey, P. 1993. Cell biology. A slice of the actin. *Nature.* 364(6439):675-6.
- Janmey, P.A. 1995. Protein regulation by phosphatidylinositol lipids. *Chem Biol.* 2(2):61-5.
- Janmey, P.A., T.P. Stossel und P.G. Allen. 1998. Deconstructing gelsolin: identifying sites that mimic or alter binding to actin and phosphoinositides. *Chem Biol.* 5(4):R81-5.
- Janssen, K.P. und M. Schleicher. 2001. *Dictyostelium discoideum*: a genetic model system for the study of professional phagocytes. Profilin, phosphoinositides and the Imp gene family in *Dictyostelium*. *Biochim Biophys Acta.* 1525(3):228-33.
- Jiang, J. und G. Struhl. 1998. Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature.* 391(6666):493-6.
- Jung, E., P. Fucini, M. Stewart, A.A. Noegel und M. Schleicher. 1996. Linking microfilaments to intracellular membranes: the actin-binding and vesicle-associated protein comitin exhibits a mannose-specific lectin activity. *EMBO J.* 15(6):1238-46.
- Jungbluth, A., V. von Arnim, E. Biegelmann, B. Humbel, A. Schweiger und G. Gerisch. 1994. Strong increase in the tyrosine phosphorylation of actin upon inhibition of oxidative phosphorylation: correlation with reversible rearrangements in the actin skeleton of *Dictyostelium* cells. *J Cell Sci.* 107 (Pt 1):117-25.
- Kaiser, D.A. und T.D. Pollard. 1996. Characterization of actin and poly-L-proline binding sites of *Acanthamoeba* profilin with monoclonal antibodies and by mutagenesis. *J Mol Biol.* 256(1):89-107.
- Karakesisoglou, I., M. Schleicher, B.C. Gibbon, C.J. Staiger. 1996. Plant profilins rescue the aberrant phenotype of profilin-deficient *Dictyostelium* cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 34(1):36-47.
- Karakesisoglou, I., K.P. Janssen, L. Eichinger, A.A. Noegel, M. Schleicher. 1999. Identification of a suppressor of the *Dictyostelium* profilin-minus phenotype as a CD36/LIMP-II homologue. *J Cell Biol.* 145(1):167-81.

- Kaufmann, S., J. Kas, W.H. Goldmann, E. Sackmann und G. Isenberg. 1992. Talin anchors and nucleates actin filaments at lipid membranes. A direct demonstration. *FEBS Lett.* 314(2):203-5.
- Klahre, U., E. Friederich, B. Kost, D. Louvard und N.H. Chua. 2000. Villin-like actin-binding proteins are expressed ubiquitously in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122(1):35-48.
- Konzok, A., I. Weber, E. Simmeth, U. Hacker, M. Maniak und A. Muller-Taubenberger. 1999. DAip1, a *Dictyostelium* homologue of the yeast actin-interacting protein 1, is involved in endocytosis, cytokinesis, and motility. *J Cell Biol.* 146(2):453-64.
- Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T.J. McGarry, M.W. Kirschner, K. Koths, D.J. Kwiatkowski und L.T. Williams. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 278(5336):294-8.
- Kouyama, T. und K. Mihashi. 1981. Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur J Biochem.* 114(1):33-8.
- Kovar, D.R., B.K. Drobak und C.J. Staiger. 2000. Maize profilin isoforms are functionally distinct. *Plant Cell.* 12(4):583-98.
- Kreitmeier, M., G. Gerisch, C. Heizer, A. Muller-Taubenberger. 1995. A talin homologue of *Dictyostelium* rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *J Cell Biol.* 129(1):179-88.
- Kwiatkowski, D.J., T.P. Stossel, S.H. Orkin, J.E. Mole, H.R. Colten und H.L. Yin HL. 1986. Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature.* 323(6087):455-8.
- Kwiatkowski, D.J. 1999. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 11(1):103-8.
- Lämmler, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(259):680-5.
- Lambrechts, A., J.L. Verschelde, V. Jonckheere, M. Goethals, J. Vandekerckhove und C. Ampe. 1997. The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences. *EMBO J.* 16(3):484-94.
- Lassing, I. und U. Lindberg. 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature.* 314(6010):472-4.
- Lee, S., M. Li und T.D. Pollard. 1988. Evaluation of the binding of *Acanthamoeba* profilin to pyrene-labeled actin by fluorescence enhancement. *Anal Biochem.* 168(1):148-55.

- Lee, S.S., I. Karakesisoglou, A.A. Noegel, D. Rieger und M. Schleicher. 2000. Dissection of functional domains by expression of point-mutated profilins in *Dictyostelium* mutants. *Eur J Cell Biol.* 79(2):92-103.
- Lieberthal, W. und J.S. Levine. 1996. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol.* 271(3 Pt 2):F477-88.
- Li, J., P. Brick, M.C. O'Hare, T. Skarzynski, L.F. Lloyd, V.A. Curry, I.M. Clark, H.F. Bigg, B.L. Hazleman, T.E. Cawston, *et al.* 1995. Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain containing a calcium-linked, four-bladed β -propeller. *Structure.* 3(6):541-9.
- Lin, K.M., E. Wenegieme, P.J. Lu, C.S. Chen und H.L. Yin. 1997. Gelsolin binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is modulated by calcium and pH. *J Biol Chem.* 272(33):20443-50.
- Liu, Y.T. und H.L. Yin. 1998. Identification of the binding partners for flightless I, a novel protein bridging the leucine-rich repeat and the gelsolin superfamilies. *J Biol Chem.* 273(14):7920-7.
- Loomis, W.F. 1969. Developmental regulation of alkaline phosphatase in *Dictyostelium discoideum*. *J Bacteriol.* 100(1):417-22.
- Loomis, W.F. und A. Kuspa. 1984. Biochemical and genetic analysis of pre-stalk specific acid phosphatase in *Dictyostelium*. *Dev Biol.* 102(2):498-503.
- Loomis, W.F. und D.W. Smith. 1995. Consensus phylogeny of *Dictyostelium*. *Experientia.* 51(12):1110-5.
- Louvard, D. 1989. The function of the major cytoskeletal components of the brush border. *Curr Opin Cell Biol.* 1(1):51-7.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebraugh, A.L. Farr und R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lu, J. und T.D. Pollard. 2001. Profilin Binding to Poly-L-Proline and Actin Monomers along with Ability to Catalyze Actin Nucleotide Exchange Is Required for Viability of Fission Yeast. *Mol Biol Cell.* 12(4):1161-75.
- Luban, J. und S.P. Goff. 1995. The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions. *Curr Opin Biotechnol.* 6(1):59-64.
- Lueck, A., D. Brown und D.J. Kwiatkowski. 1998. The actin-binding proteins adseverin and gelsolin are both highly expressed but differentially localized in kidney and intestine. *J Cell Sci.* 111 (Pt 24):3633-43.
- Luna, E.J. und J.S. Condeelis. Actin-associated proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Genet.* 11(5-6):328-32.

- Lundquist, E.A., R.K. Herman, J.E. Shaw und C.I. Bargmann. 1998. UNC-115, a conserved protein with predicted LIM and actin-binding domains, mediates axon guidance in *C. elegans*. *Neuron*. 21(2):385-92.
- Ma, J. und M. Ptashne. 1988. Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell*. 55(3):443-6.
- Machesky, L.M., P.J. Goldschmidt-Clermont und T.D. Pollard. 1990. The affinities of human platelet and *Acanthamoeba* profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C. *Cell Regul.* 1(12):937-50.
- Machesky, L.M., N.B. Cole, B. Moss und T.D. Pollard. 1994. *Vaccinia* virus expresses a novel profilin with a higher affinity for polyphosphoinositides than actin. *Biochemistry*. 33(35):10815-24.
- Maciver, S.K., D.H. Wachsstock, W.H. Schwarz und T.D. Pollard. 1991. The actin filament severing protein actophorin promotes the formation of rigid bundles of actin filaments crosslinked with α -actinin. *J Cell Biol.* 115(6):1621-8.
- MacLean-Fletcher, S.D. und T.D. Pollard. 1980. Viscometric analysis of the gelation of *Acanthamoeba* extracts and purification of two gelation factors. *J Cell Biol.* 85(2):414-28.
- Mahajan-Miklos, S. und L. Cooley. 1994. The villin-like protein encoded by the *Drosophila* quail gene is required for actin bundle assembly during oogenesis. *Cell*. 78(2):291-301.
- Maina, C.V., P.D. Riggs, A.G. Grandea, B.E. Slatko, L.S. Moran, J.A. Tagliamonte, L.A. McReynolds und C.D. Guan. 1988. An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene*. 74(2):365-73.
- Malchow, D., B. Nagele, H. Schwarz und G. Gerisch. 1972. Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Biochem.* 28(1):136-42.
- Maniak, M., R. Rauchenberger, R. Albrecht, J. Murphy und G. Gerisch. 1995. Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell*. 83(6):915-24.
- Marks, P.W., M. Arai, J.L. Bandura und D.J. Kwiatkowski. 1998. Advillin (p92): a new member of the gelsolin/villin family of actin regulatory proteins. *J Cell Sci.* 111 (Pt 15):2129-36.
- Markus, M.A., P. Matsudaira und G. Wagner. 1997. Refined structure of villin 14T and a detailed comparison with other actin-severing domains. *Protein Sci.* 6(6):1197-209.

- Marsh, M. und H.T. McMahon. 1999. The structural era of endocytosis. *Science*. 285(5425):215-20.
- McLaughlin, P.J., J.T. Gooch, H.G. Mannherz und A.G. Weeds. 1993. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature*. 364(6439):685-92.
- McKnight, C.J., P.T. Matsudaira und P.S. Kim. 1997. NMR structure of the 35-residue villin headpiece subdomain. *Nat Struct Biol*. 4(3):180-4.
- Mehdy, M.C., D. Ratner und R.A. Firtel. 1983. Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Cell*. 32(3):763-71.
- Metzler, W.J., K.L. Constantine, M.S. Friedrichs, A.J. Bell, E.G. Ernst, T.B. Lavoie und L. Mueller. 1993. Characterization of the three-dimensional solution structure of human profilin: ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR assignments and global folding pattern. *Biochemistry*. 32(50):13818-29.
- Metzler, W.J., B.T. Farmer, K.L. Constantine, M.S. Friedrichs, T. Lavoie und L. Mueller. 1995. Refined solution structure of human profilin I. *Protein Sci*. 4(3):450-9.
- Miki, H., K. Miura und T. Takenawa. 1996. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP₂-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J*. 15(19):5326-35.
- Mishra, V.S., E.P. Henske, D.J. Kwiatkowski und F.S. Southwick. 1994. The human actin-regulatory protein cap G: gene structure and chromosome location. *Genomics*. 23(3):560-5.
- Miura, K. und F. Siegert . 2000. Light affects cAMP signaling and cell movement activity in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(5):2111-6.
- Muro, Y., E.K. Chan, G. Landberg und E.M. Tan. 1995. A cell-cycle nuclear autoantigen containing WD-40 motifs expressed mainly in S and G2 phase cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 207(3):1029-37.
- Nachmias, V.T., L. Cassimeris, R. Golla und D. Safer. 1993. Thymosin β 4 (T β 4) in activated platelets. *Eur J Cell Biol*. 61(2):314-20.
- Neer, E.J. und T.F. Smith. 1996. G protein heterodimers: new structures propel new questions. *Cell*. 84(2):175-8.
- Neer, E.J., C.J. Schmidt, R. Nambudripad und T.F. Smith. 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*. 371(6495):297-300.
- Neer, E.J. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. 80(2):249-57.

- Nellen, W., C. Silan und R.A. Firtel. 1984. DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol Cell Biol.* 4(12):2890-8.
- Neuhaus, E.M., H. Horstmann, W. Almers, M. Maniak und T. Soldati. 1998. Ethane-freezing/methanol-fixation of cell monolayers: a procedure for improved preservation of structure and antigenicity for light and electron microscopies. *J Struct Biol.* 121(3):326-42.
- Noegel, A.A., D.L. Welker, B.A. Metz und K.L. Williams. 1985. Presence of nuclear associated plasmids in the lower eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *J Mol Biol.* 185(2):447-50.
- Noegel, A.A., W. Witke und M. Schleicher. 1987. Calcium-sensitive non-muscle α -actinin contains EF-hand structures and highly conserved regions. *FEBS Lett.* 221(2):391-6.
- Noegel, A.A., S. Rapp, F. Lottspeich, M. Schleicher und M. Stewart. 1989. The *Dictyostelium* gelation factor shares a putative actin binding site with α -actinins and dystrophin and also has a rod domain containing six 100-residue motifs that appear to have a cross- β conformation. *J Cell Biol.* 109(2):607-18.
- Noegel, A.A. und J.E. Luna. 1995. The *Dictyostelium* cytoskeleton. *Experientia.* 51(12):1135-43.
- Noegel A.A. und M. Schleicher. 2000. The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *J Cell Sci.* 113 (Pt 5):759-66.
- Oakley, B.R., D.R. Kirsch und N.R. Morris. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 105(2):361-3.
- Oh, S.W., R.K. Pope, K.P. Smith, K.N. Pestonjamas, J.B. Lawrence und E.J. Luna. 2000. Archvillin, the chief isoform of supervillin in muscle cells, localizes with F-actin at the plasma membrane and can promote actin polymerization. *Mol. Biol. Cell.* (Supplement to *Mol. Biol. Cell.*) 11:75a. Abstract: 395. (Posterpräsentation).
- Okumura, M., C. Kung, S. Wong, M. Rodgers und M.L. Thomas. 1998. Definition of family of coronin-related proteins conserved between humans and mice: close genetic linkage between coronin-2 and CD45-associated protein. *DNA Cell Biol.* 17(9):779-87.
- Pace, C.N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley und T. Gray. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4(11):2411-23.
- Pantaloni, D. und M.F. Carrier. 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β 4. *Cell.* 75(5):1007-14.
- Pardee, J.D. und J.A. Spudich. 1982. Purification of muscle actin. *Methods Cell Biol.* 24:271-89.

- Parente, J.A., X. Chen, C. Zhou, A.C. Petropoulos und C.S. Chew. 1999. Isolation, cloning, and characterization of a new mammalian coronin family member, coroninse, which is regulated within the protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem.* 274(5):3017-25.
- Pestonjamas, K.N., R.K. Pope, J.D. Wulfschlegel und E.J. Luna. 1997. Supervillin (p205): A novel membrane-associated, F-actin-binding protein in the villin/gelsolin superfamily. *J Cell Biol.* 139(5):1255-69.
- Pina, B., S. Berger, G.A. Marcus, N. Silverman, J. Agapite und L. Guarente. 1993. ADA3: a gene, identified by resistance to GAL4-VP16, with properties similar to and different from those of ADA2. *Mol Cell Biol.* 13(10):5981-9.
- Pinder, J.C. und A.J. Baines. 2000. A protein accumulator. *Nature.* 2000 406(6793):253-4.
- Puius, Y.A., N.M. Mahoney und S.C. Almo. 1998. The modular structure of actin-regulatory proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 10(1):23-34.
- Puius, Y.A., E.V. Fedorov, L. Eichinger, M. Schleicher und S.C. Almo. 2000. Mapping the functional surface of domain II in the gelsolin superfamily. *Biochemistry.* 39(18):5322-31.
- Pollard, T.D., L. Blanchoin und R.D. Mullins. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29:545-76.
- Pope, B., M. Way, P.T. Matsudaira und A. Weeds. 1994. Characterisation of the F-actin binding domains of villin: classification of F-actin binding proteins into two groups according to their binding sites on actin. *FEBS Lett.* 338(1):58-62.
- Pope, R.K., K.N. Pestonjamas, K.P. Smith, J.D. Wulfschlegel, C.P. Strassel, J.B. Lawrence und E.J. Luna. 1998. Cloning, characterization, and chromosomal localization of human supervillin (SVIL). *Genomics.* 52(3):342-51.
- Pope, B.J., S.M. Gonsior, S. Yeoh, A. McGough und A.G. Weeds. 2000. Uncoupling actin filament fragmentation by cofilin from increased subunit turnover. *J Mol Biol.* 298(4):649-61.
- Raper, K.B. 1935. *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agric. Res.* 50:133-147.
- Reinhard, M., K. Giehl, K. Abel, C. Haffner, T. Jarchau, V. Hoppe, B.M. Jockusch und U. Walter. 1995. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* 14(8):1583-9.
- Rietdorf, J., F. Siegert und C.J. Weijer. 1998. Induction of optical density waves and chemotactic cell movement in *Dictyostelium discoideum* by microinjection of cAMP pulses. *Dev Biol.* 204(2):525-36.

- Rivero, F., B. Koppel, B. Peracino, S. Bozzaro, F. Siegert, C.J. Weijer, M. Schleicher, R. Albrecht und A.A. Noegel. 1996. The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. *J Cell Sci.* 109 (Pt 11):2679-91.
- Rivero, F., A. Kuspa, R. Brokamp, M. Matzner und A.A. Noegel. 1998. Interaptin, an actin-binding protein of the α -actinin superfamily in *Dictyostelium discoideum*, is developmentally and cAMP-regulated and associates with intracellular membrane compartments. *J Cell Biol.* 142(3):735-50.
- Rivero, F., R. Albrecht, H. Dislich, E. Bracco, L. Graciotti, S. Bozzaro und A.A. Noegel. 1999. RacF1, a novel member of the Rho protein family in *Dictyostelium discoideum*, associates transiently with cell contact areas, macropinosomes, and phagosomes. *Mol Biol Cell.* 10(4):1205-19.
- Roof, D.J., A. Hayes, M. Adamian, A.H. Chishti und T. Li. 1997. Molecular characterization of abLIM, a novel actin-binding and double zinc finger protein. *J Cell Biol.* 138(3):575-88.
- Rothkegel, M., O. Mayboroda, M. Rohde, C. Wucherpfennig, R. Valenta und B.M. Jockusch. 1996. Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells. *J Cell Sci.* 109 (Pt 1):83-90.
- Russell, R.B., P.D. Sasieni und M.J. Sternberg. 1998. Supersites within superfolds. Binding site similarity in the absence of homology. *J Mol Biol.* 282(4):903-18.
- Sali, A. und T.L. Blundell. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 234(3):779-815.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. „Molecular cloning“. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sathe, S.S. und P.J. Harte. 1995. The *Drosophila* extra sex combs protein contains WD motifs essential for its function as a repressor of homeotic genes. *Mech Dev.* 52(1):77-87.
- Schiestl, R.A. und R.D. Gietz. 1989. High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr.Genet.* 16:339-346.
- Schleicher, M., G. Gerisch und G. Isenberg. 1984. New actin-binding proteins from *Dictyostelium discoideum*. *EMBO J.* 3:2095-2100.
- Schleicher, M. und A.A. Noegel. 1992. Dynamics of the *Dictyostelium* cytoskeleton during chemotaxis. *New Biol.* 4(5):461-72.

- Schleicher, M., B. Andre, C. Andreoli, L. Eichinger, M. Haugwitz, A. Hofmann, I. Karakesisoglou, M. Stoeckelhuber und A.A. Noegel. 1995. Structure/function studies on cytoskeletal proteins in *Dictyostelium amoebae* as a paradigm. *FEBS Lett.* 369:38-42.
- Schnuchel, A., R. Wiltscheck, L. Eichinger, M. Schleicher und T.A. Holak. 1995. Structure of severin domain II in solution. *J Mol Biol.* 247(1):21-7.
- Schopohl, D., A. Muller-Taubenberger, B. Orthen, H. Hess und W. Reutter. 1992. Purification and properties of a secreted and developmentally regulated α -L-fucosidase from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem.* 267(4):2400-5.
- Schutt, C.E., U. Lindberg, J. Myslik und N. Strauss. 1989. Molecular packing in profilin: actin crystals and its implications. *J Mol Biol.* 209(4):735-46.
- Schutt, C.E., J.C. Myslik, M.D. Rozycki, N.C. Goonesekere und U. Lindberg. 1993. The structure of crystalline profilin- β -actin. *Nature.* 365:810-816.
- Sharp, P.M. und K.M. Devine. 1989. Codon usage and gene expression level in *Dictyostelium discoideum*: highly expressed genes do 'prefer' optimal codons. *Nucleic Acids Res.* 17(13):5029-39.
- Sherman, F., G.R. Fink und J.B. Hicks. 1986. „Laboratory Course Manual for Methods in yeast genetics“. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.*
- Shugrue, C.A., E.R. Kolen, H. Peters, A. Czernik, C. Kaiser, L. Matovcik, A.L. Hubbard und F. Gorelick. 1999. Identification of the putative mammalian orthologue of Sec31p, a component of the COPII coat. *J Cell Sci.* 112 (Pt 24):4547-56.
- Shutt, D.C., D. Wessels, K. Wagenknecht, A. Chandrasekhar, A.L. Hitt, E.J. Luna und D.R. Soll. 1995. Ponticulin plays a role in the positional stabilization of pseudopods. *J Cell Biol.* 131(6 Pt 1):1495-506.
- Siegert, F. und C.J. Weijer. 1995. Spiral and concentric waves organize multicellular *Dictyostelium* mounds. *Curr Biol.* 5(8):937-43.
- Simon, M.N., R. Mutzel, H. Mutzel und M. Veron. 1988. Vectors for expression of truncated coding sequences in *Escherichia coli*. *Plasmid.* 19(2):94-102.
- Simpson, P.A., J.A. Spudich und P. Parham. 1984. Monoclonal antibodies prepared against *Dictyostelium* actin: characterization and interactions with actin. *J Cell Biol.* 99 (1Pt1):287-95.
- Siniooglou, S., C. Wimmer, M. Rieger, V. Doye, H. Tekotte, C. Weise, S. Emig, A. Segref und E.C. Hurt. 1996. A novel complex of nucleoporins, which includes Sec13p and a Sec13p homolog, is essential for normal nuclear pores. *Cell.* 84(2):265-75.

- Smith, T.F., C. Gaitatzes, K. Saxena und E.J. Neer. 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci.* 24(5):181-5.
- Sohn, R.H. und P.J. Goldschmidt-Clermont. 1994. Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays.* 16(7):465-72.
- Sondek, J., A. Bohm, D.G. Lambright, H.E. Hamm und P.B. Sigler. 1996. Crystal structure of a G-protein β - γ -dimer at 2.1Å resolution. *Nature.* 379(6563):369-74.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98(3):503-17.
- Southwick, F.S. 2000. Gelsolin and ADF/cofilin enhance the actin dynamics of motile cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 97(13):6936-8.
- Spudich, J.A. und S. Watt. 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem.* 246(15):4866-71.
- Stenbeck, G., C. Harter, A. Brecht, D. Herrmann, F. Lottspeich, L. Orci und F.T. Wieland. 1993. β -COP, a novel subunit of coatamer. *EMBO J.* 12(7):2841-5.
- Stocker, S., M. Hiery und G. Marriott. 1999. Phototactic migration of *Dictyostelium* cells is linked to a new type of gelsolin-related protein. *Mol Biol Cell.* 10(1):161-78.
- Stoeckelhuber, M., A.A. Noegel, C. Eckerskorn, J. Kohler, D. Rieger und M. Schleicher. 1996. Structure/function studies on the pH-dependent actin-binding protein hisactophilin in *Dictyostelium* mutants. *J Cell Sci.* 109 (Pt 7):1825-35.
- Stossel, T.P., C. Chaponnier, R.M. Ezzell, J.H. Hartwig, P.A. Janmey, D.J. Kwiatkowski, S.E. Lind, D.B. Smith, F.S. Southwick, H.L. Yin, *et al.* 1985. Nonmuscle actin-binding proteins. *Annu Rev Cell Biol.* 1:353-402.
- Stossel, T.P., J. Condeelis, L. Cooley, J.H. Hartwig, A.A. Noegel, M. Schleicher and S.S. Shapiro. 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2):138-45.
- Studier, F.W. und B.A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189(1):113-30.
- Suggs, S.V., R.B. Wallace, T. Hirose, E.H. Kawashima und K. Itakura. 1981. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human β -2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78(11):6613-7.
- Sugiura, Y. 1981. Structure of molecular aggregates of 1-(3-sn-phosphatidyl)-L-myo-inositol 3,4-bis(phosphate) in water. *Biochim Biophys Acta.* 641(1):148-59.

- Sun, H.Q., D.C. Wooten, P.A. Janmey und H.L. Yin. 1994. The actin side-binding domain of gelsolin also caps actin filaments. Implications for actin filament severing. *J Biol Chem.* 269(13):9473-9.
- Sun, H.Q., K. Kwiatkowska, D.C. Wooten und H.L. Yin. 1995. Effects of CapG overexpression on agonist-induced motility and second messenger generation. *J Cell Biol.* 129(1):147-56.
- Symons, M.H. und T.J. Mitchison. 1991. Control of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts. *J Cell Biol.* 114(3):503-13.
- Tabor, S. und C.C. Richardson. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. 1985. *Biotechnology.* 24:280-4.
- Takagaki, Y. und J.L. Manley. 1992. A human polyadenylation factor is a G protein β -subunit homologue. *J Biol Chem.* 267(33):23471-4.
- Tanaka, M. und H. Shibata. 1985. Poly-L-proline-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur. J. Biochem.* 151:291-297.
- Theriot, J.A. 1997. Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J Cell Biol.* 136(6):1165-8.
- Toker, A. 1998. The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Cell Biol.* 10(2):254-61.
- Tominaga, M., E. Yokota, L. Vidali, S. Sonobe, P.K. Hepler und T. Shimmen. 2000. The role of plant villin in the organization of the actin cytoskeleton, cytoplasmic streaming and the architecture of the transvacuolar strand in root hair cells of *Hydrocharis*. *Planta.* 210(5):836-43.
- Touhara, K., W.J. Koch, B.E. Hawes und R.J. Lefkowitz. 1995. Mutational analysis of the pleckstrin homology domain of the β -adrenergic receptor kinase. Differential effects on $G\beta$ - γ and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding. *J Biol Chem.* 270(28):17000-5.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.
- Tsujioka, M., L.M. Machesky, S.L. Cole, K. Yahata und K. Inouye. 1999. A unique talin homologue with a villin headpiece-like domain is required for multicellular morphogenesis in *Dictyostelium*. *Curr Biol.* 9(7):389-92.

- Valenta, R., M. Duchene, K. Pettenburger, C. Sillaber, P. Valent, P. Bettelheim, M. Breitenbach, H. Rumpold, D. Kraft und O. Scheiner. 1991. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*. 253(5019):557-60.
- Vandekerckhove, J.S., D.A. Kaiser und T.D. Pollard. 1989. *Acanthamoeba* actin and profilin can be cross-linked between glutamic acid 364 of actin and lysine 115 of profilin. *J Cell Biol*. 109(2):619-26.
- van der Voorn, L. und H.L. Ploegh. 1992. The WD-40 repeat. *FEBS Lett*. 307(2):131-4.
- Van Troys, M., D. Dewitte, M. Goethals, J. Vandekerckhove und C. Ampe. 1996. Evidence for an actin binding helix in gelsolin segment 2; have homologous sequences in segments 1 and 2 of gelsolin evolved to divergent actin binding functions? *FEBS Lett*. 397(2-3):191-6.
- Vardar, D., D.A. Buckley, B.S. Frank und C.J. McKnight. 1999. NMR structure of an F-actin-binding „headpiece“ motif from villin. *J Mol Biol*. 294(5):1299-310.
- Vieira, J. und J. Messing. 1982. The pUC plasmid, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene (Amst.)* 19:259-268.
- Vinson, V.K., S.J. Archer, E.E. Lattman, T.D. Pollard und D.A. Torchia. 1993. Three-dimensional solution structure of *Acanthamoeba* profilin I. *J Cell Biol*. 122(6):1277-83.
- Wall, M.A., D.E. Coleman, E. Lee, J.A. Iniguez-Lluhi, B.A. Posner, A.G. Gilman und S.R. Sprang. 1995. The structure of the G protein heterotrimer Gi- α -1- β -1- γ -2. *Cell*. 83(6):1047-58.
- Way, M. und A. Weeds. 1988. Nucleotide sequence of pig plasma gelsolin. Comparison of protein sequence with human gelsolin and other actin-severing proteins shows strong homologies and evidence for large internal repeats. *J Mol Biol*. 203(4):1127-33.
- Way, M., B. Pope, J. Gooch, M. Hawkins und A.G. Weeds. 1990. Identification of a region in segment I of gelsolin critical for actin binding. *EMBO J*. 9(12):4103-9.
- Way, M., B. Pope und A.G. Weeds. 1992. Are the conserved sequences in segment I of gelsolin important for binding actin? *J Cell Biol*. 116(5):1135-43.
- Weeds, A. und S. Maciver. 1993. F-actin capping proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 5(1):63-9.
- Wegner, A. 1976. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*. 108(1):139-50.
- Weiner, O.H., J. Murphy, G. Griffiths, M. Schleicher und A.A. Noegel. 1993. The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus. *J Cell Biol*. 123(1):23-34.

- Westphal, M., A. Jungbluth, M. Heidecker, B. Muhlbauer, C. Heizer, J.M. Schwartz, G. Marriott und G Gerisch. 1997. Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr Biol.* 7(3):176-83.
- Whitney, J.A., M. Gomez, D. Sheff, T.E. Kreis und I. Mellman. 1995. Cytoplasmic coat proteins involved in endosome function. *Cell.* 83(5):703-13.
- Williams, C. und G. Newell. 1976. A genetic study of aggregation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* 82:287-307.
- Witke, W., M. Schleicher und A.A. Noegel. 1992. Redundancy in the microfilament system: abnormal development of *Dictyostelium* cells lacking two F-actin cross-linking proteins. *Cell.* 68(1):53-62.
- Witke, W., A.H. Sharpe, J.H. Hartwig, T. Azuma, T.P. Stossel und D.J. Kwiatkowski. 1995. Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin. *Cell.* 81(1):41-51.
- Wulfkuhle, J.D., I.E. Donina, N.H. Stark, R.K. Pope, K.N. Pestonjamas, M.L. Niswonger and E.J. Luna. 1999. Domain analysis of supervillin, an F-actin bundling plasma membrane protein with functional nuclear localization signals. *J Cell Sci.* 112(13):2125-36.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33(1):103-19.
- Yin, H.L. und T.P. Stossel. 1979. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature.* 281: 581-586.
- Yin, H.L., J.H. Hartwig, K. Maruyama und T.P. Stossel. 1981. Ca²⁺ control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization. *J Biol Chem.* 256(18):9693-7.
- Yu, F.X., H.Q. Sun, P.A. Janmey und H.L. Yin. 1992. Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin monomer-binding domain of gelsolin. *J Biol Chem.* 267(21):14616-21.

6 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung(en)	mM	Millimolar
AP	Alkalische Phosphatase	MOPS	(Morpholino) ethansulfonsäure
As	Aminosäurerest(e)	mS	Millisiemens
ATP	Adenosintri-phosphat	MW	Mittelwert, Molekulargewicht
Bp	Basenpaar(e)	nm	Nanometer
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)	Nonidet P40	Nonylphenylpolyethylenglycol
bzw.	beziehungsweise	#	Nummer, Bestellnummer, Fraktionnummer
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	OD	optische Dichte
Cy3	Carboxymethylindocyanin	pAk	polyklonales Antiserum
DEP	Diethylpyrocarbonat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid	PC	Phosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)	PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
DNase	Desoxyribonuklease	pI	Isoelektrischer Punkt
DTT	1,4-Dithiothreitol	PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat, auch: PI(4,5)P ₂ , PtdIns4,5-P ₂
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
EGTA	Ethylenglycol-bis (2-amino-ethyl-ether) N, N, N', N'-tetraessigsäure	PS	Phosphatidylserin
EM	Elektronenmikroskop	re	rechts
ER	Endoplasmatisches Retikulum	RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
EtOH	Ethanol	RNase	Ribonuklease
F-Aktin	filamentöses (polymerisiertes) Aktin	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	RT	Raumtemperatur
g	Erdbeschleunigung; Gramm	sec	Sekunden
G-Aktin	globuläres Aktin (Monomer)	SDS	Natriumdodecylsulfat
h	Stunde(n)	s.u.	siehe unten
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazid-N'-ethansulfonsäure	TBE	Tris-Borat-EDTA
„His-tag“	Peptid mit 6 Histidin-Resten, bindet an Ni ²⁺	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
IgG	Immunglobulin G	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
IPTG	Isopropyl-thiogalaktopyranosid	TRITC	Tetramethylrhodamin-isocyanat
kB	Kilobase	TX	Triton X-100, Oktylphenolpoly(ethylenglycolether) _n
kDa	Kilodalton	u.	und
li	links	U	Unit(s)
Lsg.	Lösung(en)	UpM	Umdrehungen pro Minute
μ	mikro	V	Volt
M	Molar, mol/l	Vol	Volumen
min	Minute(n)	v/v	Volumen/Volumen
		w/v	Gewicht/Volumen („weight/volume“)

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Schematische Übersicht der Aktin-bindenden Proteine aus <i>D. discoideum</i> und ihre Interaktionen mit dem Mikrofilamentsystem.....	4
Abb. 2:	Entwicklungszyklus von <i>D. discoideum</i>	12
Abb. 3:	Domänenstruktur des Villidin im Vergleich zum Domänenaufbau von Proteinen aus der Gelsolin/Villin-Familie und Mitgliedern aus der „WD-repeat“-Familie.....	71-72
Abb. 4:	Vergleich der Konsensussequenz der N-terminalen Hälfte des Villin-„headpiece“ mit der entsprechenden Region der Villidin-Sequenz.....	72
Abb. 5:	Vergleich ausgewählter Aminosäuresequenzabschnitte von Villidin (VD) mit entsprechenden Sequenzbereichen verschiedener homologer Proteine und mit der „WD-repeat“-Konsensussequenz.....	74-75
Abb. 6:	Vergleich des N-terminalen Abschnittes der Villidin „WD-repeat“-Domäne („WD-repeat“ 1-5) mit den „WD-repeat“-Bereichen von Coronin aus <i>D. discoideum</i> und Coronin-Homologen.....	76
Abb. 7:	Graphische Darstellung der Villidin-Konstrukte hp, pFc3, WD4, LinkerWDV (DE) und cVVD (FG) im Vergleich zu der vollständigen Villidin-Sequenz.....	78
Abb. 8:	Extraktion und Reinigung des exprimierten pFc3 aus Bakterien.....	79
Abb. 9:	Reinigung von rekombinantem Villidin-„headpiece“ (hp).....	80
Abb. 10:	Expression rekombinanter Villidin-Fragmente in <i>E. coli</i> M15.....	82
Abb. 11:	Spezifität des polyklonalen anti-pFc3-Villidin Antiserums 6336 und des monoklonalen anti-pFc3-Villidin Antikörpers 257-6-2.....	84-85
Abb. 12:	Sedimentation von rekombinantem Villidin „headpiece“-Protein zusammen mit Aktin.....	86
Abb. 13:	Immunfluoreszenz-Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Villidin im Vergleich zu ausgewählten Proteinen. (Detail-Beschreibung auf Seite 89-91).....	89-92
Abb. 14:	Konfokale Mikroskopie der Kolokalisation von Villidin mit anderen Proteinen und die Unterscheidung zwischen Villidin-minus und -positiven Zellen.....	93-94
Abb. 15:	Immunfluoreszenz-Untersuchungen der Villidin-GFP-Fusionsproteine exprimierenden Zellen.....	96

Abb. 16: Konfokale Mikroskopie zum Nachweis der Kolokalisation von vilK2-GFP mit Aktin.....	97
Abb. 17: Konfokale Mikroskopie zur Visualisierung der Verteilung von vilK2-GFP während Pinozytose und Phoagozytose.....	98
Abb. 18: Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation.....	100
Abb. 19: Gelfiltrationschromatographie über eine SDS-Säule.....	102
Abb. 20: Migrations- und Phototaxis-Verhalten von Wildtyp- und Villidin-defizienten- Pseudoplasmodien („slugs“).....	103
Abb. 21: Schematische Darstellung der Villidin-Konstrukte vilK1, vilK2, vilK3 und vilK4 für das „Yeast-Two-Hybrid“-System und die GFP-Fusion im Vergleich zu der vollständigen Villidin-Sequenz.....	105
Abb. 22: Vollständige Nukleotidsequenzen des Profilin III-Gens und die abgeleitete Aminosäuresequenz.....	107
Abb. 23: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Profilin III mit den beiden homologen Profilin-Isoformen II und I (<i>D. discoideum</i>).....	107
Tab. 1: Vergleich der Profilin III Sequenz mit den beiden bekannten Profilin-Isoformen in <i>D. discoideum</i>	108
Abb. 24: Phylogenetischer Vergleich von Profilin III mit den Proteinen aus höheren Eukaryonten.....	109
Abb. 25: „Southern-Blot“ mit restriktionsverdauter genomischer DNA aus AX2-Zellen und aus der Profilin-Doppelmutante pII/Ia2.....	111
Abb. 26: RT-PCR mit Gesamt-RNA aus AX2 und Profilin-minus-Doppelmutanten.....	113
Abb. 27: Expression und Extraktion von Profilin III in <i>E. coli</i>	114
Abb. 28: Affinität des rekombinanten Profilin III für poly-L-Prolin.....	115
Abb. 29: Reinigung des extrahierten Profilin III über eine poly-L-Prolin-Affinitätssäule.....	116
Abb. 30: Sedimentationsversuch zur PIP ₂ -Bindung.....	117
Abb. 31: Analytische Gelfiltrationsversuche zum Nachweis der PIP ₂ -Bindung.....	118-119
Abb. 32: Einfluß von Profilin III auf die Polymerisation von Muskel-Aktin (Kaninchen).....	120

-
- Abb. 33: Gegenüberstellung der Gerüststrukturen der Villin-Domäne I, des Profilin-Proteins und der theoretischen Profilin III-Faltung; Gegenüberstellung der Domäne II und der „headpiece“-Domäne im Vergleich zu den theoretischen Modellierungen der entsprechenden Protovillin- und Villidin-Segmente. 127-128
- Abb. 34: Vergleich der bekannten β -Propellerstruktur von G β mit dem Modell für die „WD-repeat“-Strukturausbildung von Villidin. 133

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Annika Gloss

geboren am 04.03.1972 in Ansbach

Schulbildung

09/1978 - 07/1982 Grundschule, Bechhofen

09/1982 - 06/1991 Theresien-Gymnasium, Ansbach, (Allgemeine Hochschulreife)

Universität und Forschung

10/1991 - 02/1997 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

02/1997 - 03/1997 Diplom-Hauptprüfung

05/1997 - 02/1998 Diplomarbeit in der Gruppe von Frau Prof. Dr. A.A. Noegel am
Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, in
Zusammenarbeit mit dem Institut für Zellbiologie der Ludwig-
Maximilians-Universität (LMU) München, Arbeitsgruppe von
Herr Prof. Dr. M. Schleicher. Titel: „Identifizierung und
Charakterisierung eines entwicklungsregulierten Aktin-
Bindeproteins“.

04/1998 - 07/2001 Promotion in der Gruppe von Herrn Prof. Dr. M. Schleicher am
Institut für Zellbiologie; Betreuung durch Dr. F. Siebert,
Zoologisches Institut der LMU München.

19.07.2001 Abgabe der Promotion am Dekanat der Fakultät für Biologie,
LMU München.

14.12.2001 Mündliche Prüfung (Rigorosum).

01/1999-04/1999 Forschungsaufenthalt am Institut für Biochemie I, Universität zu
Köln. Thema: „Yeast-Two-Hybrid-System“.

DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. Florian Siegert vielen Dank für die Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät für Biologie.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Michael Schleicher für die Ermöglichung dieser Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und stetige fachliche Unterstützung.

Prof. Dr. Manfred Schliwa danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Institut.

Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel gilt mein herzlicher Dank für die Begleitung der Arbeit, Ihre Anregungen und die Möglichkeit eines längeren Forschungsaufenthaltes in Köln.

Vielen Dank an Dr. Francisco Rivero für die Kollaboration und seine kompetente Anleitung zur konfokalen Mikroskopie.

Herzlichen Dank an Dr. Ralph Gräf für seine zahlreichen nützlichen Tips und sein Interesse an meiner Arbeit. Ein Dank an die Postdocs Dr. Ludwig Eichinger, Dr. Jan Faix und Dr. Günther Wöhlke. Meinem langjährigen Benchnachbarn Dr. Klaus-Peter Janssen sei Dank für eine wissenschaftlich inspirative wie auch lustige Zeit im Labor.

Herzhaftes Dankeschön an Dr. Harald Felgner und besonders an Andreas Schneider und Christian Horn, den Herrn über die Computerwelt. Bei Larsen-Marsen Israel möchte ich mich für seine Loyalität, seinen Teamgeist und nicht zu letzt seinen so speziellen Humor bedanken. Lieben Dank an "Ex-Someone" Dr. Soo Sim Lee "for being short one", an meine Mitbewohnerin und kompetente Kollegin Christine Zoglmaier und an Daniela Rieger für die Fürsorge bei so manch "blauem Fleck".

Mein Dank geht an meine Laborkollegen Jibi, Stephan S., Hyun-Ju, Marc, René, Radjesh und noch nicht vergessen Melanie, Stefan T. und Thomas für die angenehme Arbeitsatmosphäre; ferner an Andrea für das Korrekturlesen; an die "Gräfschaft" und die netten Leutlies im dritten Stock; und nicht zu vergessen an Sepp, die liebe Maria sowie an die Mitglieder des Institutes für Biochemie I in Köln, die ich in äußerst angenehmer Erinnerung behalten werde.

Ein Danke an meine Familie und spezieller Dank an Holger und die guten Freunde, die stets ein offenes Ohr für mich hatten. Und dann sei noch Dank jenem Konzern, der die Produktion der leckeren Cola Light sicherstellt - obgleich der Dank wohl eher der Stammkundin gebührt.

Ich sag Dange!

“Die Wissenschaft fängt eigentlich erst dann an interessant zu werden, wo sie aufhört.”

Justus von Liebig

“KEEP SMILING, KEEP ROCKING! ... AND, KEEP RESEARCHING!”

Dr. Klaus-Peter Janssen