Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Schliwa

Charakterisierung von Trix, einem neuen Guaninnukleotid-Austauschfaktor aus *Dictyostelium discoideum*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Axel Strehle
aus Höchstädt a. d. Donau

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Michael Schleicher
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Gunnar Schotta Priv. Doz. Dr. rer. nat. Alexander Faußner
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. rer. nat. Jan Faix
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser
Tag der mündlichen Prüfung:	23.10.2008

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Strehle, A., M. Schleicher, J. Faix (2003). Characterisation of Trix, a novel Rho guanine-nucleotide exchange factor in *Dictyostelium discoideum*. Eur J Cell Biol 82(Suppl. 53): Abstract, 75.

Strehle, A., M. Schleicher, J. Faix (2006). Trix, a novel Rac guanine-nucleotide exchange factor from *Dictyostelium discoideum* is an actin-binding protein and accumulates at endosomes. Eur J Cell Biol 85(9-10): 1035-45.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG V
SUMMARY VII
1 EINLEITUNG 1
1.1 Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen 1
1.2 Das Aktinfilamentsystem und seine dynamischen Eigenschaften 1
1.3 Polymerisationskinetik von Aktin; Aktin bindende Proteine 3
1.4 Die Regulation des Aktinzytoskeletts 4
1.4.1 Intrazelluläre Signalkaskaden und kleine GTPasen 4
1.4.2 Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und der Funktionszyklus der Rho-GTPasen 6
1.4.3 Humanpathologische Aspekte zu GTPasen und GEF-Proteinen 8
1.4.4 Rho-Proteine involvierende Signalkaskaden in *D. discoideum* 10
1.5 *D. discoideum* als Modellorganismus 12
1.6 Aufgabenstellung 13
2 MATERIAL UND METHODEN 15
2.1 Material 15
2.1.1 Enzyme, Antikörper, Inhibitoren und Antibiotika 15
2.1.1.1 Enzyme für die Molekularbiologie 15
2.1.1.2 Antikörper 15
2.1.1.3 Inhibitoren 15
2.1.1.4 Antibiotika 15
2.1.2 Reagenzien 16
2.1.3 Medien 16
2.1.3.1 Medien zur *D. discoideum*-Kultur 16
2.1.3.2 Medien zur *E. coli*-Kultur 17
2.1.3.3 Antibiotikazusatz 17
2.1.4 Puffer und Lösungen 17
2.1.5 Bakterienstämme 18
2.1.6 *D. discoideum*-Stämme 18
2.1.7 Vektoren 18
2.1.8 Radiochemikalien 18
2.1.9 Geräte 18

2.1.10 Weitere Materialien 20
2.1.11 Zentrifugen, Rotoren und Zentrifugation von Zellen 20
2.1.12 Software 21
2.1.13 Alignment, Sequenz- und Strukturanalyse der Dbl-Homologie-Sequenz 22
2.2 *D. discoideum*-Kulturen 23
2.2.1 Axenische Flüssigkulturen 23
2.2.2 Kultur und Klonierung in Costar-Lochplatten 23
2.2.3 Kultur und Klonierung auf Klebsiella-Agarplatten 23
2.2.4 Entwicklung von *D. discoideum* 24
2.2.5 Einfrieren von *D. discoideum*-Zellen 24
2.2.6 Auftauen von *D. discoideum*-Zellen 25
2.3 Molekularbiologische Methoden 25
2.3.1 Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen 25
2.3.1.1 Oligonukleotide 25
2.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion, PCR 26
2.3.1.3 RT-PCR nach der Promega-Methode 27
2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 28
2.3.3 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen, Markerstandards 29
2.3.4 Präparation von Plasmid-DNA nach der Qiagen-Methode 29
2.3.5 Fragmentisolierung aus DNA-Gelen nach der Qiagen-Methode 30
2.3.6 Verdau mit Restriktionsenzymen 31
2.3.7 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA 31
2.3.7.1 Phosphatase-Behandlung 31
2.3.7.2 DNA-Ligase-Reaktion 32
2.3.8 Glätten von Restriktionsschnittstellen 32
2.3.9 Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum* 33
2.3.9.1 Präparation chromosomaler DNA aus angereicherten Zellkernen 33
2.3.9.2 Präparation chromosomaler DNA mit der Roche-Methode 33
2.3.10 Isolierung der Gesamt-RNA aus *D. discoideum* mit der Qiagen-Methode 34
2.3.11 Southern-Blot 35
2.3.12 Elektrophorese von RNA in Agarosegelen 35
2.3.13 ^{32}P-Markierung von DNA-Proben durch 'nick-translation' 36
2.3.14 Hybridisierung mit ^{32}P markierten Sonden 37
2.3.15 Transformation von *D. discoideum*-Zellen durch Elektroporation 37

2.3.16 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen 38
2.3.17 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock 38
2.3.18 *E. coli*-Dauerkulturen 38
2.4 Proteinchemische Methoden 39
2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 39
2.4.2 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen 39
2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford 40
2.4.4 Western-Blot 40
2.4.5 Reinigung rekombinanter Proteine 41
2.4.6 Einfrieren gereinigter Proteine 42
2.4.7 Fluoreszenzspektroskopische Aktivitätsmessung 42
2.4.8 Immunisierung und Gewinnung polyklonaler Antikörper 42
2.5 Zellbiologische Methoden 43
2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz 43
2.5.2 Phototaxis 45
2.5.3 Chemotaxis 45
2.5.4 Bestimmung der Phagozytoserate 46
2.5.5 Bestimmung der intrazellulären Verweildauer phagozytierter Partikel 46
2.5.6 Konfokale Mikroskopie 46
3 ERGEBNISSE 48
3.1 Klonierung eines neuen Guaninnukleotid-Austauschfaktors 48
3.1.1 Datenbankrecherche 48
3.1.2 Klonierung des Gens aus Teilkonstrukten 51
3.1.3 Sequenzanalyse 54
3.1.3.1 Klassifizierung der Calponin-Homologie-Domänen 55
3.1.3.2 Sequenzhomologie und Struktur der Dbl-Homologie-Domäne 58
3.2 Biochemische Charakterisierung von Trix 63
3.2.1 Expression rekombinanter Trix-Fragmente 63
3.2.2 Aktin-Bindung durch die Trix Calponin-Homologie-Domänen 64
3.2.3 Wechselwirkung der Dbl-Homologie-Domäne mit Rac-GTPasen 65
3.3 Zellbiologische Charakterisierung von Trix 67
3.3.1 Expression von Trix während des Entwicklungszyklus 67
3.3.2 Subzelluläre Lokalisierung von Trix 67
3.3.2.1 Die erste CH-Domäne als GFP-Fusionsprotein 67

3.3.2.2 Das vollständige Trix-Protein als GFP-Fusionsprotein 68
3.3.2.3 Lokalisation von Trix während der Phagozytose 69
3.3.3 Knockout des Trix-Gens 70
3.3.4 Charakterisierung von Trix$^-$-Mutanten 73
3.3.4.1 Morphologie unfixierter Zellen 73
3.3.4.2 Verteilungsmuster von Aktin 74
3.3.4.3 In-vivo-Aktin-Organisation in Trix$^-$-Mutanten 75
3.3.4.4 Multinukleäre Zellen 76
3.3.4.5 Wachstumsgeschwindigkeit und Phagozytoseverhalten 77
3.3.4.6 Geschwindigkeit des Entwicklungszyklus 78
3.3.4.7 Expression von Markerproteinen 79
3.3.4.8 Phototaktische Stimulation 80
3.3.4.9 Chemotaktische Stimulation 81
3.3.4.10 Phagozytoserate und Transitrate 82
4 DISKUSSION 83
4.1 Ein neuer Aktin bindender Rac-Guaninnukleotid-Austauschfaktor 83
4.2 Lokalisierung an späten Endosomen und Aktin-Bindung des Proteins 84
4.3 GDP/MANT-GDP-Austauschaktivität 86
4.4 Hinweise auf die In-vivo-Funktion von Trix durch Charakterisierung von Trix$^-$-Mutanten 86
5 LITERATURVERZEICHNIS 88
6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 106
7 ABKÜRZUNGEN 108
8 LEBENSLAUF 111
9 DANKSAGUNG 113

ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand dieser Arbeit ist ein neuer Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF-Protein) für Rac-GTPasen in *Dictyostelium discoideum*. GEF-Proteine fungieren als stimulatorische Proteine der Rac-GTPasen, welche eine zentrale Bedeutung bei der Kontrolle Aktin involvierender Prozesse einnehmen. Aktin ist ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts, eines dynamischen Netzwerks filamentärer Strukturen, welches eine Grundlage für elementare Prozesse beim Wachstum, der Differenzierung, Zellbewegung und Zellteilung bietet.

Die Amöbe *D. discoideum* ist ein haploider eukaryontischer Einzeller, der als Modell zum Studium der elementaren Aktin involvierenden Prozesse höherer Eukaryonten dient. Das kürzlich vollständig sequenzierte *D. discoideum*-Genom bietet eine Fülle regulatorischer Komponenten des Aktinzytoskeletts, aus denen das Gen eines bislang nicht charakterisierten GEF-Proteins ausgewählt wurde. Das Gen wurde kloniert und die vom Genomprojekt veröffentlichte Sequenz bestätigt. Bei einer kodierenden Sequenz von 3597 Bp umfasst die Proteinsequenz 1198 Aminosäuren. Sie enthält drei Calponin-Homologie-Domänen (CH) sowie eine Dbl-Homologie/Pleckstrin-Homologie-Tandemdomäne, die typisch für GEF-Proteine ist. Auf Grund dieser Domänenarchitektur wurde als Proteinname 'Trix' gewählt, für '**Tri**-Calponin-E**x**change-Factor'. Die CH-Domänen wurden als Typ-1 und Typ-3 Domänen (Typ3-Typ3-Typ1) klassifiziert. Dies stellt eine bislang unbekannte Kombination von CH-Domänen bei den Rho-GEF-Proteinen dar. Für ein rekombinantes Fragment dieser drei CH-Domänen konnte die Fähigkeit zur Bindung und Bündelung von Aktinfilamenten gezeigt werden, was sich anhand der für CH-Domänen bisher beschriebenen Funktionen jedoch nicht erklären lässt.

Trix reichert sich in vivo im Bereich des Aktin-reichen Zellkortex sowie an den Membranen fortgeschrittener endozytischer Vesikel an. Für Trix lässt sich somit eine regulatorische Funktion bei der Assemblierung oder dem Abbau jenes Aktin-Mantels postulieren, welcher sich dem endozytischen Vesikel während des späten endozytären Zyklus anlagert. Es wurde gezeigt, dass Trix überwiegend während des vegetativen Entwicklungsstadiums von *D. discoideum* exprimiert wird, was mit einer Anlagerung des Proteines an endozytische Vesikel grundsätzlich im Einklang steht. Gleichwohl ist bei *D. discoideum* bislang jedoch keine Assoziation von Rac-GTPasen mit späten endozytären Vesikeln bekannt.

Für Trix konnte keine GDP/MANT-GDP-Austauschaktivität für die Rac-GTPasen Rac1a, RacC und RacE nachgewiesen werden und somit keine Zuordnung des Proteins als Wirkungspartner zu einer Rac-GTPase erfolgen. Bislang sind teils ausgeprägte Spezifitäten einzelner Austauschfaktoren für spezifische Rac-GTPasen gezeigt worden. Somit könnte die Aktivität von Trix auf eine nicht getestete Rac-GTPase gerichtet sein. Des Weiteren könnte die Aktivierung von Trix von bislang nicht identifizierten regulatorischen Koproteinen abhängen. Ebenso ist eine Abweichung der in-vitro-Ergebnisse von der in-vivo-Situation möglich, was beispielhaft für andere Austauschfaktoren bekannt ist.

Durch eine Gen-Disruption wurde das Trix-Gen in AX2-Wildtypzellen ausgeschaltet, was die Untersuchung der Proteinfunktion in der lebenden Zelle ermöglichte. Trix ist kein essentielles Protein. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bei der Expression wichtiger Markerproteine, bei der Phototaxis, Chemotaxis, Phagozytose und Zytokinese sowie hinsichtlich des Wachstumsverhaltens der Trix$^-$-Mutanten. Die Zellen zeigen Unregelmäßigkeiten bei der Organisation des Aktin-Mikrofilamentsystems sowie eine geringe Verzögerung im Entwicklungszyklus. Die markanteste phänotypische Abweichung besteht hinsichtlich der Exozytose eines pinozytierten Flüssigmarkers, die bei Trix$^-$-Mutanten deutlich verzögert ist. Dies lässt sich als weiterer Hinweis für eine regulatorische Beteiligung des Proteins bei der Exozytose werten.

Insgesamt scheint Trix an der Organisation Aktin involvierender Vorgänge in *D. discoideum*, speziell bei der Regulation des späten endozytären Zyklus, beteiligt zu sein. Das Fehlen eindrücklicherer phänotypischer Effekte bei Trix$^-$-Mutanten könnte durch redundante Funktionen der einzelnen *D. discoideum*-Rho-GEF-Proteine bedingt sein.

SUMMARY

The goal of this project was the characterisation of a new guanine nucleotide exchange factor (GEF protein) for Rac GTPases in *Dictyostelium discoideum*. GEF proteins function as stimulating proteins of Rac GTPases which are of central importance in the regulation of actin-involving processes. Actin is a major component of the cytoskeleton, constituting a dynamic network of filamentous structures which provide the basis for elementary tasks of growth, differentiation, cell movement and cell division.

The ameba *D. discoideum* is a haploid unicellular eukaryote. It serves as a model organism to study basic actin-involving processes in higher organisms. The *D. discoideum* genome has been fully sequenced recently and comprises a wide range of regulatory components for the actin cytoskeleton. The gene of a novel GEF protein with a coding sequence of 3597 bp was studied in detail. The gene was cloned and the sequence verified. The protein sequence of 1198 amino acids comprises three Calponin homology domains (CH) and one Dbl homology/Pleckstrin homology tandem domain which is a typical sequence feature of GEF proteins. On the basis of this domain architecture the protein was named 'Trix' in short for '**tri**ple Calponin e**x**change factor'.

The CH domains were classified as type 1 and type 1 CH domain (type 3 - type 3 - type 1). This resembles a novel combination of CH domains in a Rho GEF protein. A recombinant fragment carrying the three CH domains was shown to bind and bundle actin filaments which is not explained by the functions that have been described for CH domains so far.

In vivo Trix is localised in the area of the actin-rich cell cortex as well as on the membranes of late endocytic vesicles. This suggests a regulatory role for Trix in the assembly or the disassembly of the actin coat that is associated with endocytic vesicles during the late stages of endocytosis. It was shown that Trix is mainly expressed during the vegetative stadium of *D. discoideum* which would be consistent with the increased endocytosis during growth. An association of Rac GTPases with late endocytic vesicles in *D. discoideum* was not described so far.

Trix displayed no GDP/MANT-GDP exchange activity with the Rac GTPases Rac1a, RacC and RacE, hence the protein could not be allocated to a Rac GTPase signaling pathway. Some of the interactions between exchange factors and their respective Rac GTPases are of a very specific nature. Thus a potential activity of Trix might be directed against a Rac GTPase that has not yet been tested. The activation of Trix might also depend on further uncharacterised

regulatory components. Finally, the results of the in vitro assays might differ from the in vivo situation as it has been demonstrated for other Rho GEFs.

The Trix gene was disrupted in AX2 wildtype cells by a gene replacement approach. This allowed detailed characterisation of the protein's function in vivo. Trix is not an essential protein. There were no significant differences in the expression of important marker proteins, in phototaxis, chemotaxis, phagocytosis, cytokinesis, and growth of Trix$^-$ mutants. The mutant cells showed subtle changes in the organisation of the actin system as well as a slight delay during the developmental cycle. The most severe phenotypic deviation displayed by Trix$^-$ mutants consisted in a marked reduction of exocytosis. This provides further evidence for a regulatory function of the protein in exocytosis.

The data suggest that Trix plays a role in the organisation of actin-involving processes in *D. discoideum*, especially in the regulation of the late endocytic cycle. Trix could not be allocated to a specific Rac GTPase signaling pathway and definite structural or dynamic tasks on the basis of the protein’s actin-binding and actin-bundling properties. The subtle phenotypic alterations in Trix$^-$ mutants might be due to a general redundancy in the functions of *D. discoideum* Rho GEF proteins.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen

Eine grundlegende Aufgabe für alle Arten von Zellen ist die Festlegung ihrer Gestalt, von der äußeren Zellform bis zur korrekten inneren Struktur (Alberts *et al.*, 2002). Dabei muss Robustheit erreicht werden, um die Plasmamembran zu stabilisieren und die Integrität der Zelle gegen Scherkräfte und andere äußere Einflüsse zu sichern. Andererseits soll ein hohes Maß an Flexibilität gewährleistet sein, denn ohne die Fähigkeit zur dynamischen Reorganisation wären Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Zellbewegung und Zellteilung unmöglich. Diese universellen Forderungen erfüllen eukaryontische Zellen mit dem Zytoskelett, einem Netzwerk filamentärer Strukturen, das die ganze Zelle durchzieht und statische wie dynamische Eigenschaften in sich vereinigt. In treffender Weise umschreiben Marie-France Carlier und Gary Borisy die Bedeutung des Zytoskeletts: *'The cytoskeleton participates in such a diverse array of cellular activities that pointing to any single theme risks oversimplification. However, one such theme may be the recognition that the cytoskeleton constitutes an ensemble of molecular machines working in consort to accomplish key cellular functions of movement, transport and organization'* (Carlier und Borisy, 2000).

1.2 Das Aktinfilamentsystem und seine dynamischen Eigenschaften

Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen ist ein hochdifferenziertes Netzwerk aus drei Hauptgruppen von Filamenten: Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Mikrofilamente. In ihrem Aufbau zeigt sich als gemeinsames Motiv die nicht-kovalente und reversible Polymerisation monomerer Proteine.

Die Mikrotubuli besitzen einen Durchmesser von ca. 25 nm und sind in der Regel aus 13 röhrenförmig angeordneten Protofilamenten aufgebaut, die wiederum aus Tubulinheterodimeren bestehen (Mandelkow und Mandelkow, 1989). Die Mikrotubuli sind u. a. wesentlich am Aufbau des Spindelapparates beteiligt, der die Trennung der Chromosomen während der Zytokinese ermöglicht (Gardner und Odde, 2006). Auch der gerichtete Transport von Vesikeln und Organellen mit Hilfe von Motorproteinen wie Dynein und Kinesin basiert auf Mikrotubuli (Welte, 2004).

Intermediärfilamente stehen im Hinblick auf ihren Durchmesser von ca. 10 nm zwischen den Mikrotubuli und den Mikrofilamenten (s. u.). Sie setzen sich aus diversen Proteinen ähnlicher

Domänenstruktur zusammen und bilden eine sehr heterogene Gruppe: saure und basische Keratine (Typ I und II), Vimentine (Typ III), neuronale Intermediärfilamente (Typ IV) und nukleäre Lamine (Typ V) (Herrmann und Aebi, 2004). Sie geben den Zellen ein widerstandsfähiges inneres Gerüst zur Strukturierung des Zytoplasmas und zur mechanischen Stabilität gegen äußere Einflüsse. Für diese Gruppe von Proteinen werden zahlreiche Mutationen beschrieben, die zu Erkrankungen beim Menschen führen (Al-Chalabi und Miller, 2003; Lariviere und Julien, 2004).

In dieser Arbeit wird den Mikrofilamenten besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Das Mikrofilamentsystem besteht aus Aktinfilamenten und wird ob seiner überragenden Bedeutung auch Aktinzytoskelett genannt. Die Bezeichnung von F-Aktin als Mikrofilament rührt her von dem schmalen Durchmesser (6-10 nm) im Vergleich zu den anderen Filamenten. Aktinfilamente bieten ein widerstandsfähiges und gleichzeitig flexibles inneres Gerüst, legen die grundlegende Zellform fest und gestatten deren gezielte Veränderung. Ein wesentlicher Teil des Aktins konzentriert sich als dichtes Filamentnetzwerk im sog. Zellkortex, welcher unterhalb der Zellmembran einen schmalen, zellumspannenden Bereich einnimmt. Als Grundlage motiler Prozesse kann durch verschiedene Aktin involvierende Motorproteine mechanische Kraft erzeugt werden. Dafür finden sich in spezialisierten Geweben hochgeordnete und permanente Strukturen von Aktinfilamenten, was sich besonders an den Sarkomeren der quergestreiften Skelettmuskulatur beobachten lässt. In beweglichen Einzelzellen wird Aktin dagegen meist kurzfristig rekrutiert und steht in einem dynamischen Auf- und Abbauprozess.
Diese flexiblen Eigenschaften des Aktins ermöglichen die Ausbildung spezialisierter Zellfortsätze wie Pseudopodien, Lamellipodien und Filopodien (Ridley *et al.*, 2003; Faix und Rottner, 2006). Somit wird u. a. eine gleitende Zellfortbewegung ermöglicht, die eine essentielle Eigenschaft vieler Einzeller und spezialisierter Zellpopulationen in höheren Organismen ist. Als Beispiele lassen sich die Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten), die Fibroblasten bei den Vorgängen der Wundheilung sowie bewegliche Stammzellen bei der Embryonalentwicklung anführen. Besondere Bedeutung erlangt die Motilität einzelner Zellen auch im Rahmen maligner Neoplasien. Bei der Expansion maligner Tumore können entartete Zellen die Fähigkeit zur eigenständigen Fortbewegung erlangen und dann ohne Rücksicht auf ihre ontogenetisch festgelegten Funktionen und die innere Kohärenz des Organismus metastasieren (Yamaguchi und Condeelis, 2006).

Das Aktinzytoskelett ist jedoch in viele weitere Vorgänge innerhalb von Zellen eingebunden, wie z. B. Phago-, Pino- und Exozytose oder den intrazellulären Vesikel- und Organellentransport entlang von Aktinfilamenten (Kuznetsov *et al.*, 1992; Doussau und Augustine, 2000; Stamnes, 2002; Murray und Wolkoff, 2003; Ayscough, 2004). Des Weiteren ist Aktin an fokalen Adhäsionskomplexen, sog. Podosomen, beteiligt, welche Zellen untereinander und mit ihrer extrazellulären Matrix verbinden (Critchley, 2000; Linder und Äpfelbacher, 2003).

1.3 Polymerisationskinetik von Aktin; Aktin bindende Proteine

F-Aktin stellt ein helikal-filamentäres Polymer des globulären G-Aktin (42 kDa) dar (Korn, 1982). Die Polymerisation findet in einem ATP-konsumierenden Prozess statt, der mit der sog. Aktivierungsphase durch die Bindung zweiwertiger Kationen an das G-Aktin beginnt. Anschließend erfolgt der für die Polymerisation zeitbestimmende Schritt, die Nukleation. Dabei geschieht eine kritische Kernbildung von Trimeren, durch die eine weitere Anlagerung von Monomeren gegenüber der Dissoziation wahrscheinlicher wird. In der nächsten Phase wird das entstehende Filament elongiert, bis sich in der abschließenden vierten Phase ein Gleichgewichtszustand ('steady-state') zwischen G-Aktin-Polymerisation und F-Aktin-Depolymerisation einstellt.

Das dynamische Potential der Aktinpolymerisation wird mit einem großen Arsenal Aktin bindender Proteine (ABPs) reguliert. Aktinbindende Proteine bestimmen die Polymerisationskinetik und die Einstellung des Gleichgewichtszustandes zwischen G- und F-Aktin. Des Weiteren bestimmen Aktin bindende Proteine – vereinfacht dargestellt – die Ausgestaltung von Aktinnetzwerken sowie die mannigfaltigen Interaktionen der Aktinfilamente im zellulären Kontext. Nach Dos Remedios und Mitarbeitern (Dos Remedios *et al.*, 2002) sind die Aktin bindenden Proteine nach funktionellen Gesichtspunkten in folgende Gruppen einzuteilen:

1) Proteine, die monomeres Aktin binden und damit separieren. So verhindern sie die Polymerisation zu F-Aktin. Typische Vertreter dieser Gruppe sind z. B. Profilin (Witke, 2004), Thymosin-beta4 (Huff *et al.*, 2001), DNase1 (Kabsch *et al.*, 1990) und das Cyclase-assoziierte Protein CAP (Noegel *et al.*, 1999; Hubberstey und Mottillo, 2002).

2) Filament-verkappende Proteine, welche noch während der Polymerisation die weitere Anlagerung von Aktinmonomeren, an das schnell wachsende Ende eines Filaments, verhindern und so die Viskosität des Zytosols niedrig halten können. Besonders gut

untersuchte Proteine dieser Gruppe sind die heterodimeren 'capping'-Proteine CapZ aus dem Muskel (Yamashita *et al.*, 2003) oder Cap32/34 aus Nicht-Muskelzellen (Schleicher *et al.*, 1984).

3) Aktinfilament-fragmentierende oder -zerschneidende Proteine, z. B. Gelsolin (Ono, 2007) und Severin (Eichinger und Schleicher, 1992; Summerscales und Dawson, 2004), binden an bereits polymerisiertes Aktin. Sie können z. B. kortikale Aktin-Strukturen in Bruchteilen von Sekunden beseitigen und ermöglichen so die Ausbildung einer Membranausstülpung.

4) Quervernetzende und bündelnde Proteine, für die mindestens zwei F-Aktin-Bindestellen beschrieben sind und welche Aktinfilamente in lockerer oder fester Art miteinander verbinden, oder bis zu dreidimensionalen Netzwerken verzweigen können, z. B. der Arp2/3-Komplex (Goley und Welch, 2006), die ubiquitären α-Actinine und Spectrine (Otey und Carpen, 2004; Broderick und Winder, 2005), oder die Gruppe der Filamine (Grzegorz *et al.*, 2006).

5) Stabilisierende Proteine, die eine Filamentdepolymerisierung verhindern, z. B. Tropomyosin (Gordon *et al.*, 2001; Brown und Cohen, 2005).

6) Myosine, welche als Motorproteine chemische Energie in mechanische Kraft umwandeln und Zellmotilität und Muskelkontraktion sowie z. B. Materialtransport entlang der Aktinfilamente ermöglichen (Berg *et al.*, 2001; Somlyo *et al.*, 2004).

Zahlreiche bekannte Proteine interagieren mit Aktin in bislang nicht näher charakterisierter Weise und für viele Proteine sind multiple Fähigkeiten beschrieben, z. B. für den Arp2/3-Komplex (Filamentnukleation, -elongation und -verzweigung).

Aufgrund der Fülle von Funktionen für das Aktinzytoskelett in eukaryontischen Zellen lässt verstehen, warum für Aktin mehr Protein-Interaktionen als für jedes andere bekannte Protein beschrieben sind (Dominguez, 2004). Bisher werden über 160 Proteine sowie ca. 30 verschiedene Toxine und Pharmaka beschrieben, die mit Aktin spezifisch in Interaktion treten.

1.4 Die Regulation des Aktinzytoskeletts

1.4.1 Intrazelluläre Signalkaskaden und kleine GTPasen

Um eine Reorganisation des Zytoskeletts in gerichteter Weise erreichen zu können, ist eine ständige Anpassung an äußere und innere Milieufaktoren notwendig. Eukaryontische Zellen besitzen dafür komplexe intrazelluläre Signalwege, die sich stark vereinfacht als funktionelle

Aneinanderreihungen von Proteinen skizzieren lassen. Sie führen kaskadenartig von einer exogenen oder endogenen Stimulation zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Solche Signalwege bilden jedoch keine isolierten Reaktionsketten, sondern Netzwerke von Proteinkaskaden (Jordan *et al.*, 2000; Kholodenko, 2006). Viele Details der meisten Signalkaskaden sind bislang unbekannt. Generelle Motive des intrazellulären Signalgeschehens sind jedoch auch bei der Reorganisation des Zytoskeletts von Bedeutung: Extrazelluläre Stimuli initiieren eine Signalweitergabe z. B. an membranständige Rezeptoren. Für *D. discoideum* sind Licht, Nukleotide und Peptide geeignete Stimuli des extrazellulären Milieus. Die intrazelluläre Weiterleitung von Informationen wird von Querverbindungen der einzelnen Signalpfade beeinflusst. Dabei können Stimuli entweder integriert, aufgeschlüsselt oder unterdrückt werden. Die Vorgänge der Signaltransduktion laufen dabei in feiner zeitlicher und räumlicher Auflösung ab.

Eine Schlüsselposition bei der Regulation verschiedener intrazellulärer Signalwege nehmen monomere GTP-bindende Proteine ein. Die sog. kleinen GTPasen zeichnen sich im Vergleich zu anderen GTP-bindenden Proteinen durch ein geringes Molekulargewicht von 20-25 kDa aus. Die GTP-bindende Domäne dieser kleinen GTPasen ist homolog zur GTPase Ras. Deshalb werden sie als Proteine der Ras-Superfamilie bezeichnet. Aufgrund von Sequenzhomologien sowie ihrer jeweils spezifischen Funktionen werden innerhalb der Ras-Superfamilie fünf Unterfamilien von GTPasen unterschieden (Wennerberg *et al.*, 2005):

(1) Rho-GTPasen. Diese werden gesondert und genauer vorgestellt.
(2) Ras-GTPasen. Hier sind die GTPasen der Ras-Unterfamilie aus der Ras-Superfamilie gemeint. Sie sind in der Steuerung von Apoptose, Proliferation und Differenzierung involviert. (Repasky *et al.*, 2004).
(3) Rab- und Arf-GTPasen. Sie regulieren die Bildung, Fusion und Bewegung von Vesikeln zwischen Membrankompartimenten der Zelle (Pereira-Leal und Seabra, 2001; Zerial und McBride, 2001; Pasqualato *et al.*, 2002).
(4) Ran-GTPasen sind an der Kontrolle des Kerntransportes von Proteinen und RNA sowie an der Ausbildung der Mitosespindel beteiligt (Weis, 2003; Li *et al.*, 2003).

Von besonderer Relevanz für diese Arbeit sind die Rho-GTPasen. Sie bilden eine stark konservierte Gruppe von Molekülen und existieren in zahlreichen eukaryontischen Organismen. In Säugerzellen wurden 20 verschiedene Rho-GTPasen identifiziert: Rho, mit drei Isoformen (Rho A, Rho B, Rho C); Rac 1, 2 und 3; Cdc42; TC10; TCL; Chp 1 und 2;

RhoG; Rnd 1, 2 und 3; RhoBTB 1 und 2; RhoD; Rif und TTF (Etienne-Maneville und Hall, 2002). Die drei wichtigsten Untergruppen sind Rho, Rac und Cdc42. Ihre jeweiligen Hauptvertreter sind seit einigen, mittlerweile klassischen Studien an Swiss 3T3 Fibroblasten Anfang der 1990er Jahre, die am besten charakterisierten Rho-GTPasen. In vielen Säugerzellen kontrolliert RhoA die Bildung von kontraktilen Aktomyosin-Stressfasern und die Organisation großer Adhäsionskomplexe (Ridley und Hall, 1992). Rac1 reguliert die Wachstumsfaktor induzierte Bildung von Lamellipodien (Ridley *et al.*, 1992) und Cdc42 ist an der Ausbildung von Filopodien und auch an der Festlegung der Zellpolarität beteiligt (Nobes und Hall, 1995; Kozma *et al.*, 1995). Der Aktivierungszustand einzelner Rho-GTPasen in vivo beeinflusst dabei die Aktivität anderer Rho-GTPasen. So führt eine Aktivierung von Cdc42 zu einer Stimulation der Rac-Aktivität, die wiederum die Aktivierung von Rho fördert (Nobes und Hall, 1995).

Zusammenfassend besteht die Hauptfunktion der Rho-GTPasen in der Kontrolle der meisten Aktin involvierenden Prozesse (Etienne-Maneville und Hall, 2002). Sie beeinflussen die Ausrichtung der Zellpolarität (Fukata *et al.*, 2003) und der gerichteten Zellmotilität (Raftopoulou und Hall, 2004). Weiterhin organisieren sie Aktinprozesse bei Membrantransporten (Ridley, 2006) und nehmen Einfluss auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (Etienne-Maneville und Hall, 2002). Rho-GTPasen greifen auch regulatorisch in die Vorgänge der Zytokinese und Mitose ein, wobei sie hier wie auch in anderen Bereichen zahlreiche Wechselwirkungen mit dem Mikrotubulussystem eingehen (Zheng, 2004; Kamijo *et al.*, 2006; Bement *et al.*, 2006). Insgesamt stehen die recht detaillierten Kenntnisse über Rho-GTPasen und ihre In-vivo-Funktionen einem allenfalls lückenhaften Bild über jene Abläufe gegenüber, die stromabwärts sowie vor allem stromaufwärts der Rho-GTPasen liegen und die letztendlich von einem extrazellulären Stimulus zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts führen.

1.4.2 Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und der Funktionszyklus der Rho-GTPasen

Die monomeren GTPasen der Ras-Gruppe arbeiten nach einem zyklischen Prinzip und werden oft mit molekularen Schaltern verglichen. Das zentrale Element ist dabei die Bindung und anschließende Hydrolyse von GTP. Im ersten Schritt erfolgt die Bindung von GTP, wodurch das Molekül in einen aktiven Zustand versetzt wird. Somit werden nachfolgende Signalkaskaden entweder über Proteininteraktionen oder über komplexe Aktivierungskaskaden aus Protein- bzw. Lipidkinasen angeschaltet. Daraufhin erfolgt eine Hydrolyse des

gebundenen GTP zu GDP durch eine intrinsische GTPase-Aktivität, wodurch die GTPase in den inaktiven Zustand versetzt und die nachfolgende Signalweitergabe gedrosselt wird (siehe Abb. 1). Der jeweilige Funktionszustand wird durch Konformationsänderungen des GTPase-Moleküls vermittelt.

Die direkte Regulierung der kleinen GTPasen unterliegt akzessorischen Proteinen, welche die Aktivität der Rho-GTPasen vermindern oder steigern können. Bislang wurden zwei Klassen von GTPase-Inhibitoren und eine Klasse von GTPase-Aktivatoren beschrieben:

'**G**TPase-**A**ctivating-**P**roteins' (GAP) steigern die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-Proteine um ein Vielfaches. Dadurch wird GTP rascher zu GDP hydrolysiert, der inaktive Zustand der GTPasen rascher erreicht und die nachfolgende Signalweitergabe gedrosselt (Tcherkezian und Lamarche-Vane, 2007).

'**G**TPase-**D**issociation-**I**nhibitors' (GDI) hemmen die GTPasen, indem sie die Abgabe von GDP bremsen und somit die Bindung von neuem GTP verhindern. Dadurch verharren die Rho-GTPasen länger in ihrem inaktiven Zustand (Dovas und Couchman, 2005; DerMardirossian und Bokoch, 2005).

Die vorliegende Arbeit beschreibt einen Vertreter der '**G**uanine-nucleotide-**E**xchange-**F**actors' oder GEF-Proteine. Sie katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der zyklischen Reaktion, die Abgabe von GDP. Dabei stabilisieren sie einen intermediären Zustand, in dem die GTPase weder GDP noch GTP in Bindung hält. Da GTP in höherer Konzentration in der Zelle vorliegt als GDP, erfolgt rasch eine spontane, reaktivierende GTP-Bindung. Somit aktivieren die GEF-Proteine eine entsprechende GTPase, was zur Signalweitergabe bzw. Aktivierung nachgeschalteter Signalwege führt (Rossman *et al.*, 2005).

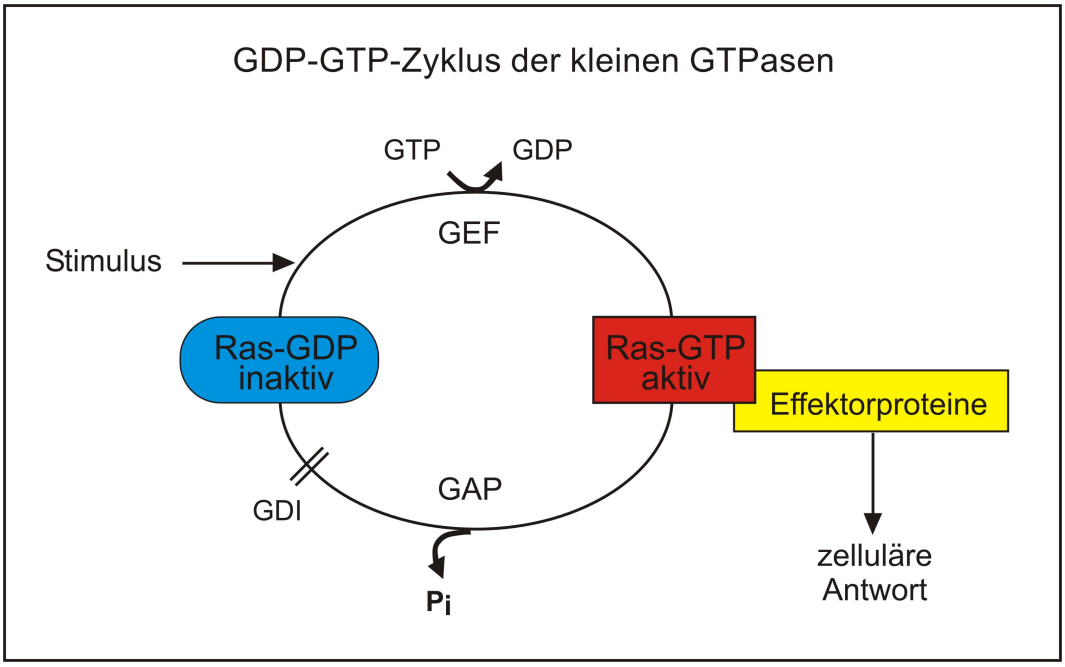


Abbildung 1: GDP-GTP-Zyklus der kleinen GTPasen.
Die GTPasen werden durch die Bindung von GTP aktiviert, wobei Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) den Austausch von bereits gebundenem GDP zu GTP fördern. Die GTPasen interagieren nun mit Effektorproteinen und initiieren die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. GTPase-aktivierende Proteine (GAP) steigern die intrinsische GTPase-Aktivität und GTP wird zu GDP hydrolysiert. Die GTPasen sind somit in den inaktiven Zustand versetzt, wodurch die Signalweiterleitung beendet wird. Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDI) können den Nukleotidaustausch hemmen und eine weitere GTPase-Aktivierung unterbinden.

1.4.3 Humanpathologische Aspekte zu GTPasen und GEF-Proteinen

Viele Rho-GEF-Proteine wurden ursprünglich als Onkogene entdeckt, z. B. Dbl, Lbc, Lfc, Lsc, Dbs/ost, Vav, Net 1, Ect2 und Tim (Eva und Aaronson, 1985; Katzav *et al.*, 1989; Miki *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 1994; Horii *et al.*, 1994; Toksoz und Williams, 1994; Whitehead *et al.*, 1995 a, 1995 b; Chan *et al.*, 1996; Glaven *et al.*, 1996; Schmidt und Hall, 2002). Die Bedeutung von GEF-Proteinen für die Tumorigenese liegt zumindest teilweise in der Rolle der kleinen GTPasen bei der Tumorentstehung begründet. Die Dysregulation kleiner GTPasen ist ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Tumoren. Maßgeblich ist eine Überfunktion dieser Proteine, welche entweder durch Überexpression oder durch Punktmutation von GTPasen zu Stande kommt. In ca. 30 % aller Tumore findet man zumeist punktmutierte, konstitutiv aktive GTPase-Moleküle, die vornehmlich der Ras-Unterfamilie aus der Ras-Superfamilie entstammen. Vertreter der Rho-Unterfamilie können ebenfalls eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen. Bislang wurden jedoch keine veränderten bzw. mutierten Rho-

Proteine beschrieben, sondern nur die Überexpression nicht-mutierter Proteine (Benitah *et al.*, 2004).

Diese Besonderheit steht vermutlich im Zusammenhang mit den grundlegend verschiedenen Funktionsmechanismen von Ras- und Rho-GTPasen (Takai *et al.*, 2001). GTPasen der Ras-Untergruppe aktivieren so lange ihre nachgeschalteten Proteinkinasen, bis ihr gebundenes GTP hydrolysiert ist. In ihrem Funktionsprinzip gleichen sie damit jenen heterotrimerischen G-Proteinen, die an der Zellmembran als Schaltstationen zwischen extrazellulären Signalen und intrazellulärer Signalantwort fungieren (siehe Abb. 2 A). Durch eine entsprechende Punktmutation kann der Funktionsmechanismus dieser GTPasen von einer GTP-Bindung entkoppelt werden. Somit werden die Moleküle in einen konstitutiv aktiven Zustand versetzt, was zu einer fatalen Daueraktivierung führt.

Im Gegensatz dazu arbeiten die Rho-GTPasen jedoch meist mit einer zyklischen Reaktionsfolge. Dies gilt speziell für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, die nicht direkt über nachgeschaltete Proteinkinasen vermittelt wird. Dabei ist vor jedem Arbeitsschritt eine Reaktivierung mit GTP zwingend. Vertreter der Rho-Gruppe gleichen somit eher den Elongationsfaktoren bei der Proteinsynthese (siehe Abb. 2 B), die für jedes hydrolysierte GTP nur eine Aminosäure an eine entstehende Peptidkette anhängen können. Bislang konnte in vivo für mutierte Rho-GTPasen kein konstitutiv aktiver Zustand gezeigt werden. Dies scheint sich direkt aus der Notwendigkeit ihrer zyklischen Aktivierung und Inaktivierung zur Ausführung ihrer zellulären Funktionen zu ergeben (Takai *et al.*, 2001).

Damit lässt sich die Bedeutung der regulatorisch-stimulierenden Proteine für eine Überfunktion bei diesen zyklisch arbeitenden GTPasen erschließen. Mutierte GEF-Proteine können die Rate der ausgehenden Impulse durch immer neue Aktivierung der GTPasen steigern (Jaffe und Hall, 2002; Sahai und Marshall, 2002).

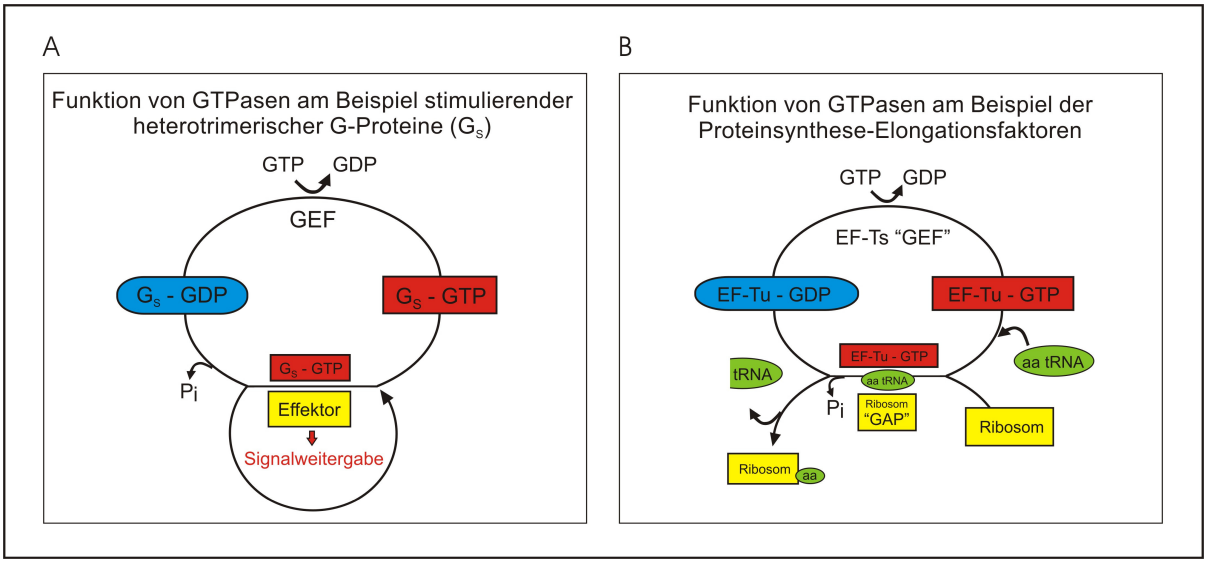


Abbildung 2: Funktionszyklus stimulierender heterotrimerischer G-Proteine und GTP-bindender Moleküle bei der Proteinsynthese.
A: Stimulierende heterotrimerische G-Proteine (G_S) verbinden die Signale von Membranrezeptoren mit intrazellulären Effektormolekülen, z. B. der Adenylatzyklase. Im aktiven Zustand nach Bindung von GTP aktivieren die G_S-Proteine kontinuierlich ihre Effektormoleküle, bis sie ihr gebundenes GTP zu GDP hydrolysieren. Ein ähnliches Funktionsprinzip findet man auch bei den GTPasen der Ras-Untergruppe aus der Ras-Großfamilie. **B:** Die Proteinsynthese geschieht mit Hilfe von Elongationsfaktoren, die als GTP-bindende Moleküle (EF-Tu) fungieren. Die Funktionsweise dieser GTPasen unterscheidet sich dabei von derjenigen heterotrimerischer G-Proteine. Für jede Aktivierung mit GTP wird jeweils nur ein Elongationsschritt ausgeführt, bei dem eine Aminoacyl-tRNA gebunden und die Aminosäure an den Polypeptidketten-Ribosomenkomplex angehängt wird. Das Ribosom fungiert hier als GTPase-aktivierendes Protein (GAP), das nach jedem Elongationsschritt die Hydrolyse des GTP veranlasst. Diese Arbeitsweise einzelner Zyklen findet man auch bei den GTPasen der Rho-Untergruppe der Ras-GTPasen. EF-Ts: Elongationsfaktor in der Funktion eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors.

1.4.4 Rho-Proteine involvierende Signalkaskaden in *D. discoideum*

Das *D. discoideum*-Genomprojekt zeigt bei einem kompakten, zu 62 % kodierenden Genom von *D. discoideum* ca. 12 500 Gene (Eichinger *et al.*, 2005). Somit steht das *D. discoideum*-Genom den Genomen multizellulärer Organismen (*D. melanogaster* 13 676 Gene, *C. elegans* 19 893 Gene, *H. sapiens* 22 287 Gene) näher als denen anderer einzelliger Eukaryonten (*P. falciparum* 5 268 Gene, *S. cerevisiae* 5 538 Gene). Hinsichtlich des Zytoskeletts von *D. discoideum* sowie der assoziierten Signaltransduktionsmechanismen zeigt sich eine besonders eindrucksvolle Vielfalt, welche die früher postulierten Modelle von einer Redundanz der zytoskelletalen Regelmechanismen bestätigt (Witke *et al.*, 1992). Trotz der vorangegangenen langjährigen intensiven Erforschung des Zytoskeletts von *D. discoideum* konnte neben den

bisher bekannten Komponenten eine Fülle neuer Gene für Signalmoleküle und Strukturproteine entdeckt werden, die teilweise neue Untergruppen definieren. In *D. discoideum* existieren 15 Gene für Vertreter der Rho-GTPasen, von denen sechs der Rac-Untergruppe angehören (Rac 1a, Rac 1b, Rac 1c, Rac F1, RacF2, Rac B) und eines zur Rho-BTB-Gruppe homolog ist (Rac A). Die weiteren Rho-Homologe können keiner bislang beschriebenen Untergruppe zugeordnet werden (Bush *et al.*, 1993; Rivero *et al.*, 2001). Weiterhin sind nunmehr 55 potentielle G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren und jeweils mehr als 40 Vertreter für die GEF- und GAP-Proteine bekannt. Die akzessorischen Proteine überwiegen ihre GTPase-Substrate somit in dreifacher Zahl, was auch für höhere Eukaryonten wie z. B. *H. sapiens* beschrieben wurde (Venter *et al.*, 2001). Es existiert außerdem eine Fülle Aktin bindender bzw. Zytoskelett organisierender Proteine, mindestens elf Aktin verwandte Proteine und eine Abundanz von 30 Genen für Aktin selbst (Eichinger *et al.*, 2005). Im Vergleich zu anderen sequenzierten Genomen stellt sich heraus, dass *D. discoideum* einige Proteingruppen verloren hat, während bei anderen Proteinen eine Diversifizierung eingetreten ist. Diese Motive finden sich beispielhaft auch bei Komponenten des Zytoskeletts. So gibt es keine nahen Homologe für die Rho-GTPasen der Subfamilien Cdc42 oder Rho oder für die Subklassen der Rho-Effektor-Proteine. Eine besondere Vielfalt hat sich demgegenüber z. B. bei Calponin-Homologie-Proteinmotiven entwickelt, für die eine Diversifizierung durch 'domain-shuffling' angenommen wird. Insgesamt lässt sich vermerken, dass *D. discoideum* bei einem reduzierten Maß an Komplexität im Vergleich zu höheren Eukaryonten ein erstaunliches Maß an Komplexität für einen einzelligen Organismus besitzt.

Einige der Rho verwandten GTPasen in *D. discoideum* wurden bereits charakterisiert. Dabei hat sich ein weit reichendes Wirkungsspektrum dieser Proteine in *D. discoideum* gezeigt (Rivero und Somesh, 2002). Einige *D. discoideum*-Proteine mit Domänenstrukturen - typisch für Rho-GEF-Proteine - wurden ebenso bereits charakterisiert. Das Protein DDRacGAP1 (DRG) besitzt neben einer für Rho-GAP-Proteine typischen Domäne auch eine Rho-GEF-Domäne. Eine In-vitro-GDP/GTP-Austauschaktivität konnte selektiv für Rac1A gezeigt werden, nicht jedoch für RacC oder RacE (Ludbrook *et al.*, 1997; Knetsch *et al.*, 2001). *D. discoideum* RacGEF1 stimuliert in vitro einen GDP/GTP-Austausch bei RacB und in geringerem Maß bei Rac1B, jedoch keinen Austausch bei RacC, RacE oder RacG (Park *et al.*, 2004). Das Protein MyoM besitzt eine selektive GDP/GTP-Austauschaktivität für Rac1A und Rac1B, zeigt jedoch Inaktivität gegenüber RacC und RacE (Geissler *et al.*, 2000). Ein weiteres mutmaßlich regulatorisches Protein für Rac-GTPasen ist Darlin, welches Sequenz-

homologie zum Säugetier Rho-GEF smgGDS zeigt. Darlin bindet an RacE und RacC. Es besitzt jedoch keine typische Guaninnukleotid-Austauschdomäne (Vithalani *et al.*, 1998).

1.5 *D. discoideum* als Modellorganismus

Die Amöbe *D. discoideum* ist haploid und teilt sich unter Laborbedingungen nach ca. sieben Stunden. Evolutionär steht *D. discoideum* an der Grenze vom Einzeller zum Vielzeller. *D. discoideum* bietet erstaunliche Differenzierungsprozesse, die jedoch weniger komplex sind als die höherer Eukaryonten. Bei Nahrungsmangel durchläuft die Amöbe einen Entwicklungszyklus, welcher über ein Aggregationsstadium in der Ausbildung eines Fruchtkörpers kulminiert (siehe Abb. 3). Der Fruchtkörper besteht aus Sporen und wird von einem Fruchtstiel getragen, dessen Zellmasse nicht überlebt, sondern die Überlebensbedingungen für die Subpopulation sichert. *D. discoideum* ist somit ein Einzeller, welcher als Population quasi sozial agiert.

Von besonderem Interesse ist das Aktinzytoskelett von *D. discoideum* mit seinen assoziierten Proteinen. Der Organismus dient als Modell zum Studium der komplexeren Verhältnisse in motilen Zellsystemen mehrzelliger Eykaryonten (Schleicher *et al.*, 1995; Eichinger und Schleicher, 1999; Noegel und Schleicher, 2000). Grundlegende Eigenschaften wie Chemotaxis und Phagozytose teilt *D. discoideum* mit höheren Eukaryonten (Janssen und Schleicher, 2001; Gotthardt *et al.*, 2002). Der Organismus ist allen gängigen Methoden der Molekularbiologie zugänglich, wobei das haploide Genom gut manipulierbar ist. Von Bedeutung ist dabei das Ausschalten einzelner Gene durch homologe Rekombination (De Lozanne und Spudich, 1987; Witke *et al.*, 1987; Noegel und Schleicher, 2000). Der Organismus reagiert zudem stabil auf das Einbringen verschiedener Expressionsvektoren. Dadurch lassen sich zelleigene, mit Fluoreszensmarkern gekoppelte Proteine in vivo exprimieren und lokalisieren. Auf Grund der für Eukaryonten vergleichsweise kurzen Generationszeit wird außerdem ein methodisch rasches Vorgehen ermöglicht.

Während der vegetativen Vermehrung ernähren sich frei lebende Amöben von Bakterien und Hefen. Bei Nahrungsmangel entstehen durch Aggregation sog. Pseudoplasmodien (siehe Abb. 3), welche eine ca. 18 Stunden andauernde Migrationsphase beginnen. Wenn danach weiterhin ein Nahrungsmangel besteht, so beginnt die Kulmination, welche durch die Ausbildung eines Fruchtstieles und eines Sporenkopfes (Sorocarp) abgeschlossen wird. Durch Berührung eines reifen Sporenkopfes werden die Sporen freigesetzt, die dann unter günstigeren Bedingungen auskeimen und in einen neuen Zyklus eintreten können.

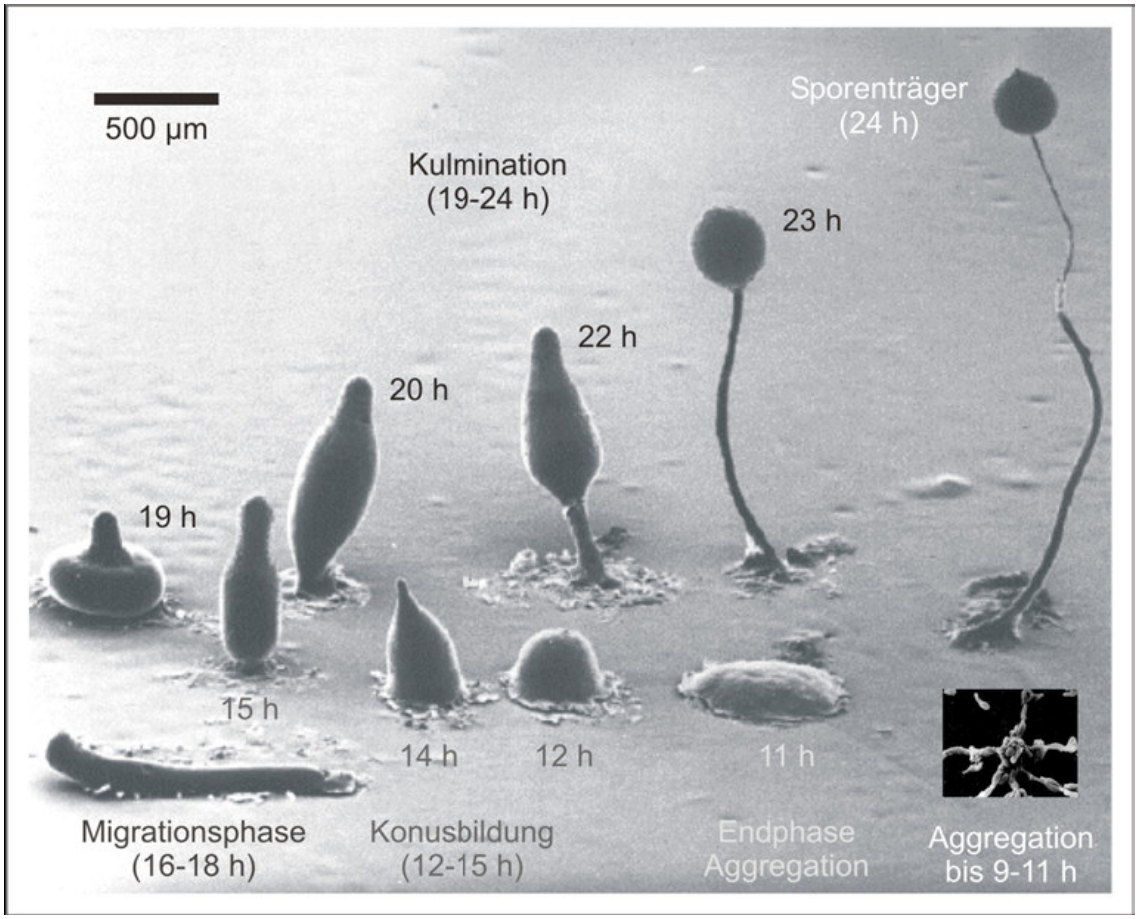


Abbildung 3: Entwicklungszyklus von *D. discoideum*.
Der *D. discoideum*-Entwicklungszyklus dauert von der Aggregationsphase bis zur vollständigen Ausbildung des Fruchtkörpers ca. 24 h. (Elektronenmikroskopische Aufnahmen von R. Lawrence Blanton und Mark Grimson, Texas Tech University, USA; zum Größenvergleich: Eine einzelne Zelle in der mikroskopischen Aufnahme rechts unten hat einen Durchmesser von etwa 10 µm).

1.6 Aufgabenstellung

Diese Arbeit steht im Kontext einer fortlaufenden Entschlüsselung von intrazellulären Signalkaskaden, die an der Regulation des Aktinzytoskeletts in *D. discoideum* beteiligt sind. Viele grundlegende Aspekte zu den Rac-GTPasen sowie zu den von den Rac-GTPasen abhängigen Zielproteinen sind bereits bekannt. Die Rac-GTPasen nehmen eine Schlüsselstellung bei der Aktinreorganisation sowohl im motilen Einzeller *D. discoideum* als auch in höheren Organismen ein. Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Einordnung jener relativ wenig erforschten Proteine zu leisten, welche regulatorisch auf die Rac-GTPasen einwirken. Mit dem *D. discoideum*-Genomprojekt wurde eine Fülle entsprechender unbeschriebener und uncharakterisierter regulatorischer Komponenten entdeckt. Aus diesen regulatorischen

Proteinen war ein Kandidatengen bzw. –protein auszuwählen und molekularbiologisch, proteinchemisch sowie zellbiologisch zu charakterisieren. Insbesondere sollte dabei die Position des Proteins in einer intrazellulären Signalkaskade zugeordnet werden. Im Einzelnen sollten die Sequenz des Genomprojektes bestätigt, hinsichtlich vorausgesagter Proteindomänen analysiert und die Proteinwechselwirkungen dieser Proteindomänen beschrieben werden. Bei der zellbiologischen Charakterisierung sollten bei *Dictyostelium* etablierte Techniken angewandt werden, wobei insbesondere ein Knockout des Gens sowie eine anschließende zellbiologische Charakterisierung der Trix-Mutanten angestrebt wurden. Weitere Rückschlüsse auf die Genfunktion sollten durch eine Bestimmung der subzellulären Lokalisierung ermöglicht werden. Die Bedeutung des Proteins war auch im Hinblick auf den Entwicklungszyklus von *D. discoideum* herauszuarbeiten.

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	Roche
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	Boehringer
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Boehringer
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, New England Biolabs, Eurogentec
RNase A	Sigma
T4 DNA-Ligase	Promega
Taq-Polymerase	im Labor exprimiert und gereinigt

2.1.1.2 Antikörper

Anti-Aktin (mAk Act1)	(Simpson *et al.*, 1984)
Anti-Contact Site A (mAk 33-294-17)	(Bertholdt *et al.*, 1985)
Anti-MUD1-Antikörper (mAk)	(Gregg *et al.*, 1982; Early *et al.*, 1988)
Anti-'His-tag' (mAk)	Qiagen
Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (IgG) (gekoppelt an alkalische Phosphatase)	Dianova
Anti-Trix-GEF-Antikörper (pAk)	siehe 2.4.8

2.1.1.3 Inhibitoren

Benzamidin	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEP)	Sigma
Proteaseinhibitorcocktail (#P2714)	Sigma

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-Zellulose)	Whatman
Hefeextrakt, Pepton, Proteose-Pepton	Oxoid
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid)	Gerbu
Phenol	Appligene
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	Gerbu

Alle nicht aufgeführten Chemikalien stammen in der Regel von Merck, Roth, Sigma, Serva oder Fluka und haben den Reinheitsgrad 'p. a.'.

2.1.3 Medien

Das Wasser zur Herstellung aller Medien und Puffer wird über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) deionisiert. Die Medien und Puffer werden (falls erforderlich) bei 120°C autoklaviert. Antibiotika werden immer erst zu abgekühlten Medien gegeben.

2.1.3.1 Medien zur *D. discoideum*-Kultur

AX-Medium pH 6,7

14,3 g	Bacto Pepton
7,15 g	Hefe Extrakt
18,0 g	Maltose
0,616 g	$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$
(alternativ 0,491 g Na_2HPO_4)	
0,486 g	KH_2PO_4
mit H_2O (bidest.) auf 1 l 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_2PO_4
5,7 mM	K_2HPO_4
mit H_2O (bidest.) auf 1 l auffüllen	

Soerensen-Phosphatpuffer pH 6,0
(Malchow *et al.*, 1972)
14,6 mM KH_2PO_4
2,0 mM Na_2HPO_4
gegebenenfalls autoklavieren

Phosphatagarplatten pH 6,0
15,0 g Bacto-Agar
mit Soerensen-Puffer auf 1 l auffüllen

2.1.3.2 Medien zur *E. coli*-Kultur

LB-Medium
10,0 g Bacto-Trypton
5,0 g Hefe Extrakt
5,0 g NaCl
in 1 l H_2O

2.1.3.3 Antibiotikazusatz

LB-Amp-Medium
50 µg/ml Ampicillin
Stocklösung: 50 mg/ml (1:1000)

AX-Amp-Strep-Medium
0,05 mg/ml Ampicillin
0,04 mg/ml Streptomycin
Stocklösung: 5 mg/ml Ampicillin, 4 mg/ml Streptomycin (1:100)

bei Trix$^-$-Mutanten und GFP-Konstrukten mit Blasticidin-Resistenz-Gen
0,01 mg/ml Blasticidin
Stocklösung: 10 mg/ml (1:1000)

bei GFP Konstrukten mit Geneticin-Resistenz-Gen zusätzlich
0,02 mg/ml Geneticin
Stocklösung: 20 mg/ml (1:1000)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Nicht aufgeführte Puffer und Lösungen finden sich bei den jeweiligen Methoden.

TE-Puffer (pH 8,0)
10 mM Tris/HCl
1 mM EDTA
autoklavieren

PBS (pH 7,0)
70 mM Na_2HPO_4
30 mM KH_2PO_4
150 mM NaCl
0,1 % NaN_3

10 x NCP-Puffer (pH 8,0)

100 mM	Tris/HCl
1,5 M	NaCl
5 ml	Tween 20
0,2%	NaN_3

mit H_2O (bidest.) auf 1 l auffüllen

2.1.5 Bakterienstämme

E. coli JM83	(Vieira und Messing, 1982)
E. coli XL1 blue	(Sambrook *et al.*, 1989)
Klebsiella aerogenes	(Williams und Newell, 1976)

2.1.6 *D. discoideum*-Stämme

AX2-214	wächst axenisch und auf Bakterienrasen, Abkömmling des Freilandisolates NC4 (Raper, 1935)
Trix$^-$-Mutante (Trix-minus-Mutante)	Knockout des Trix-Gens, siehe 3.3.3

2.1.7 Vektoren

Floxed-Bsr-Knockout-Vektor	(Faix *et al.*, 2004)
Puc 19	(Yanisch-Perron *et al.*, 1985)
pGex 5X1	Pharmacia Biotech
pMal c2	(Maina *et al.*, 1988)
pQE30	(Qiagen)

2.1.8 Radiochemikalien

[a-^{32}P]-dATP (10 mCi/ml)	ICN

2.1.9 Geräte

Analysenwaage AC 210P	Sartorius
Axiophot Mikroskop	Zeiss
Brutschrank (Bakterien, Hefen)	Memmert

CCD-Kamera C5985-10	Hamamatsu
Diavert Mikroskop (invers)	Leitz
Dounce Homogenisator	Braun
EagleEye II	Stratagene
Econosystem	Biorad
Elektroporationsgerät	Biorad
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Fraktionenkollektor RediFrac	Pharmacia
Hybridisierungsofen	Biometra
Konfokale Mikroskopie LSM510	Zeiss
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
Spektralfluorimeter FP-6500	Jasco
Ultrafiltration Centricon	Amicon
Vortex	Merck
Wasserbäder, Schüttler	GFL

Mikroskopie	
Stereomikroskop Wild M3	Wild Leitz
Konfokales Mikroskop	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Coverslip-Glasplättchen zur Betrachtung lebender Zellen	
Objektschalen zur Betrachtung lebender Zellen	

2.1.10 Weitere Materialien

Zellulosenitrat-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	Falcon
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf

2.1.11 Zentrifugen, Rotoren und Zentrifugation von Zellen

Zentrifugen		Rotoren	
Optima TL100 Ultrazentrifuge	Beckman	Ti 70, JA 14.1,	Beckman
L8-70M Ultra-Zentrifuge, G6-SKR,		Ti 20.1, Ti 45,	
J2-21M/E, J6-HC		JA 20, SW40	
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf	TLA 100.3	

Alle Zellen werden stets in vorgekühlten (4° C) Zentrifugen geerntet. Die Zentrifugation von *D. discoideum*-Zellen erfolgt in 15 ml bzw. 50 ml Falcon-Röhrchen, in den oben bezeichneten Zentrifugen mit 1800 Upm über 2 bzw. 4 Minuten bei 4 °C. Kleine Mengen werden in Eppendorf-Gefäßen in einer üblichen Tischzentrifuge durch kurzes Anzentrifugieren sedimentiert.

2.1.12 Software

Internetressourcen zur Suche von Nukleotidsequenzen und Proteinen nach Schlüsselwortsuche:

- Preliminary Directory of *Dictyostelium* Genes – version 2.1
  (http://dicty.sdsc.edu/cgi-bin/clone-search.cgi)
- NCBI Nucleotide, NCBI Protein, NCBI OMIM
  (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Server der EMBL European Molecular Biology Organisation
  (http://smart.embl.de/, Letunic *et al.*, 2004)

Internetressourcen zur Analyse von Proteindomänen

- NCBI Conserved Domain Database
  (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml)
- NCBI Conserved Domain Architecture Retrieval Tool
  (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=rps)
- *D. discoideum* GeneDB, Motif Search
  (http://www.genedb.org/genedb2/motifSearch?org=dictye)
- SMART, Simple Modular Architekture Research Tool
  (http://smart.embl-heidelberg.de/)
- PROSITE, Database of Protein Families and Domains
  (http://www.expasy.org/prosite/)
- Pfam Protein Families Database of Alignments and HMMs
  (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml)

Internetressourcen zum Sequenzalignment

- ClustalW2
  (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html, Larkin *et al.*, 2007)
- Jalview
  (http://www.jalview.org, Clamp *et al.*, 2004)

Software zur Analyse und Visualisierung der Sekundär- und Tertiärstruktur

- PHDsec, Profile Network Prediction HeiDelberg, Sekundärstruktur von Proteinen
  (http://www.predictprotein.org, Rost und Sander, 1994)
- CPHmodels 2.0, Tertiärstruktur von Proteinen
  (http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels, Lund *et al.*, 2002)
- AISMIG, An Interactive Server-side Molecule Image Generator
  (www.dkfz-heidelberg.de/spec/aismig, Bohne-Lang *et al.*, 2005)

Text und Grafik:		Bild- und Filmbearbeitung:	
Sigma Plot 2.01	Jandel Scientific	ImageJ	NCBI
CorelDraw 4.0	Corel		
Winword 8.0	Microsoft		
NIH Image 1.60	National Institut of Health		
Photoshop 5.5, Illustrator 8.01	Adobe		

2.1.13 Alignment, Sequenz- und Strukturanalyse der Dbl-Homologie-Sequenz

Das Sequenzalignment erfolgt mit dem Programm ClustalW2 bei unveränderten Standardeinstellungen. Für das Alignment werden die Dbl-Homologie-Sequenzen von Trix und von bereits charakterisierten Rho-GEF-Proteinen verwendet (nach Soisson *et al.*, 1998): *D. discoideum* Trix, *H. sapiens* Sos1, *H. sapiens* Dbl, *C. elegans* unc-73, *H. sapiens* Abr, *H. sapiens* Bcr, *H. sapiens* Fgd1, *H. sapiens* Lbc, *H. sapiens* Net1, *H. sapiens* Tiam-1, *H. sapiens* Trio (besitzt zwei Dbl-Homologie-Sequenzen, somit zweifach gelistet), *H. sapiens* Dbs, *H. sapiens* Ect2, *H. sapiens* Lfc, *H. sapiens* Lsc, *H. sapiens* RasGRF, *H. sapiens* Vav, *S. cerevisiae* cdc24, *S. pombe* Scd1. Auf homologe Proteine nahe verwandter Spezies wird verzichtet, um das Sequenzalignment nicht zu verfälschen. Mit Jalview wird die prozentuale Verteilung der häufigsten Aminosäure für jede Position des ClustalW2-Alignments dargestellt (bei unveränderten Standardeinstellungen) und farblich markiert. Zur Verdeutlichung werden nur Identitäten ab 45 % markiert (45 – 60 % gelb, 65 – 80 % orange, 85 – 100 % rot). Die Nummerierung der Aminosäurepositionen ist auf die Dbl-Homologie-Sequenz von Trix bezogen. Eine Berechnung von Sekundärstrukturmerkmalen erfolgt mit dem Programm PHDsec bei unveränderten Standardeinstellungen. Die Sekundärstrukturmerkmale werden mit Balken für Helizes und Linien für 'coil'-Regionen dargestellt.

Eine mögliche Tertiärstruktur für die Trix-Dbl-Homologie-Domäne wird mit dem Programm CPHmodels 2.0 errechnet. Die internetbasierte Software erstellt im Abgleich mit Datenbanken bekannter Proteinsequenzen (NCBI- und SwissProt-Datenbanken) ein Sequenzprofil, für das eine 'Template'-Datei in einer Datenbank von Proteinen bekannter Struktur (RCSB, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) gesucht wird. Anhand der 'Template'-Datei wird dann eine mögliche Tertiärstruktur errechnet. Als 'Template'-Datei mit 25,1 % Sequenzidentität wird hier die .pdb-Datei '1ki1' mit der Strukturinformation zur Guaninnukleotid-Austauschregion des *H. sapiens* Rho-GEF-Proteins Intersectin verwendet. Das Ergebnis steht als eine .pdb-Datei zur Verfügung, welche mit dem Programm AISMIG als Schleifen-

modell und Oberflächenmodell abgebildet wird. Mit AISMIG erfolgt auch eine farbliche Markierung Oberflächen bildender, konservierter Reste, entsprechend den Ergebnissen aus der 'Alignment'-Berechnung.

2.2 *D. discoideum*-Kulturen

2.2.1 Axenische Flüssigkulturen

Die Generationszeit des AX2-Wildtyps beträgt bei 21 °C ca. 10 Stunden und bei 23 °C ca. 8 Stunden. Die Zellen zeigen unter normalen Bedingungen eine logarithmische Wachstumskurve. Für alle zellbiologischen Experimente werden Zellen in der logarithmischen Phase, bei einer Dichte von 1-5 $\times$ 10^6/ml verwendet. Größere Zellmengen werden in Schüttelkulturen bei 150 Upm und 21 bis 23 °C angezogen. Zum Animpfen wird folgende Formel verwendet:

Impfmenge = (gewünschter Zelltiter $\times$ gewünschtes Volumen)/(tatsächlicher Titer $\times$ 2^x)

x = Anzahl der Generationszeiten.

Kleinere Zellmengen werden in Gewebekulturschalen mit flüssigem Medium kultiviert. Bei dieser Methode wird das Medium alle zwei Tage gewechselt.

2.2.2 Kultur und Klonierung in Costar-Lochplatten

Nach erfolgreicher Transformation von *D. discoideum*-Zellen sind nach ca. fünf Tagen erste Transformantenkulturen am Boden der Kulturschale sichtbar. Man kann nun unter dem Mikroskop direkt mit einer Pipette Zellmaterial von diesen Kulturen mobilisieren, ansaugen und in eine Costar-Lochplatte bringen. Die einzelnen Vertiefungen werden dafür mit ca. 300 µl des entsprechenden AX-Mediums vorbereitet. Auf diese Weise erreicht man eine Vorselektion der Transformanten. Die zuverlässige Klonierung erfordert das Anlegen von Verdünnungsreihen oder die Anwendung der 'spreaded dilution' (s. u.).

2.2.3 Kultur und Klonierung auf Klebsiella-Agarplatten

Die Klebsiellen zum Animpfen werden in regelmäßigen Abständen auf Nährböden mit Kobaltgehalt selektioniert. Davon werden Tochterkulturen auf normalen SM-Platten angezogen. Man entnimmt mit einer sterilen Impföse etwas Zellmaterial von der Oberfläche, verschüttelt dies in einigen ml Phosphatpuffer und bringt von dieser Suspension 0,3 ml auf einer SM-Platte aus. Je nach Zielsetzung wird nun unterschiedlich verfahren. Um das Fressverhalten von *D. discoideum* zu untersuchen, verstreicht man die Klebsiellensuspension

gleichmäßig mit einem sterilen Glasspatel und lässt die Platte einige Minuten trocknen. Nun kann man mit einem sterilen Zahnstocher *D. discoideum*-Zellmaterial auf die SM-Platte picken und in bestimmten Zeitabständen den bald sichtbaren, sich vergrößernden Fressrand markieren. Anders geht man bei der Technik der 'spreaded dilution' vor, mit der sich *D. discoideum*-Zellen klonieren lassen. Zuerst wird ein Tropfen *D. discoideum*-Zellmaterial aus einer axenischen Kultur in einem ml Phosphatpuffer verdünnt. Hiervon bringt man in einer Verdünnungsreihe 1 bis 15 µl auf die Klebsiella-Agarplatten aus. Die *D. discoideum*-Zellen werden dabei auf die Klebsiellensuspension pipettiert und dann mit den Glasspatel über die gesamte Platte verteilt. Nach einigen Tagen bilden sich kleine Fresshöfe oder 'Plaques', welche einzelnen *D. discoideum*-Kulturen entsprechen. Um diese Plaques isoliert zu kultivieren, impft man Costar-Lochplatten an (s. o.).

2.2.4 Entwicklung von *D. discoideum*

D. discoideum-Zellen (AX2 bzw. Trix$^-$-Mutanten) werden unter axenischen Bedingungen auf eine Dichte von 1 bis 3 x 10^6/ml kultiviert. Für alle weiteren Schritte wird kalter Soerensen-Puffer verwendet: Nach zwei Waschvorgängen werden die Zellen auf eine Konzentration von 10^7 Zellen/ml eingestellt. Für die Untersuchung der Entwicklung werden in der Regel insgesamt 10^8 Zellen auf Phosphatagarplatten ausgebracht. Dazu wird eine entsprechende Menge Zellen auf die Platten pipettiert und für 15 Minuten zum Absetzen gebracht. Der Puffer wird daraufhin mit der Wasserstrahlpumpe am Plattenrand abgesaugt. Jede überschüssige Flüssigkeit soll entfernt werden, die Platten müssen aber feucht bleiben. Die Inkubation erfolgt bei 21°C bis zu den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten. Bis t12 (entspricht 12 Stunden Entwicklungszeit) müssen die Zellen mit dem Puffer vom Agar gelöst werden, ab ca. t12 schwimmen die inzwischen stark vakuolisierten Zellen auf dem Puffer und sind nur schwer quantitativ zu ernten. Am effektivsten ist dann simples Abspülen. Das gewonnene Material wird abzentrifugiert, in jeweils 5 ml SDS-Probenpuffer aufgenommen und für zwei Minuten bei 90°C inkubiert.

2.2.5 Einfrieren von *D. discoideum*-Zellen

D. discoideum-Zellen werden axenisch bis zu einer Dichte von 2 bis 3 × 10^6/ml kultiviert. Man zentrifugiert die Zellen ab und stellt sie mit dem Einfriermedium rasch auf eine Dichte 1 × 10^8 Zellen/ml ein. Davon werden Aliquots von 1 ml auf beschriftete Einfriergefäße verteilt, in die Bohrungen eines 10 cm x 10 cm x 5 cm großen Messingblocks gestellt und über Nacht

bei -70° C aufbewahrt. Der schwere Messingblock garantiert ein langsames und schonendes Einfrieren. Nach dieser Behandlung werden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.
Einfriermedium: 7 % DMSO in AX2-Medium

2.2.6 Auftauen von *D. discoideum*-Zellen

Für jedes Aliquot eingefrorener Zellen werden 10 ml AX2-Medium in einem Falcon-Röhrchen und eine leere Petrischale bereitgestellt. Die Einfriergefäße werden in Wasser bei Raumtemperatur angetaut. In halb getautem Zustand wird der Inhalt dann in das Falcon-Röhrchen geleert, welches geschlossen und einige Male gewendet wird. Dadurch tauen letzte Eisreste rasch auf. Die Zellen werden nun einmal in AX2-Medium gewaschen und dann mit 10 ml AX2-Medium in die Petrischale ausgebracht. Wichtig ist ein rasches Arbeiten, da DMSO ein für die Zellen toxischer Stoff ist. Falls gewünscht, kann nach 24 Stunden mit dem Selektionsdruck durch Antibiotika begonnen werden. Zusätzlich empfiehlt sich dann auch der Amp/Strep-Antibiotikazusatz, um Kontaminationen zu vermeiden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen

2.3.1.1 Oligonukleotide

Alle eingesetzten Oligonukleotide stammen von MWG Biotech, geliefert in lyophilisiertem Zustand und mit H_2O auf 50 pmol/µl eingestellt.

'Upstream' Primer Trix (nach Reihenfolge auf der genomischen Sequenz)

3chKoBU	CGC GGA TCC ACA ATT AAA TTA AAT CAG ATT TAA AAA
3chBU	CGC GGG ATC CGC ATG TTT TCA AAT TTT TTT GGT AGT
AnaU	AGT AAT AGT ATT CAA TCA ACA TCA CAT CAA
3chKoHU	CGC AAG CTT TAA AAC ATT AGG CTT ACA AAG TGT
seq3chBU	CGC GGA TCC GCT AAC GAG TGC AAG TGG TGG TAG TA
seqlinkcorr	TGA TAT GTC TAA TGA CTT GAG AAA TGG TGT
3chSU CGC	GTC GAC TAT TTG ACT TTT AAA TTT CCT TAG
TrixMalBU	CGC GGA TCC CCA ATG GAT ACT AGA AGA CAA AAA GTC ATT
3chGEFBU	CGC GGG ATC CGC CCA ATG GAT ACT AGA AGA CAA AAA
3chrtGEF	CAA GAT ACA CAC AAT GGA TTG GAT

'Downstream' Primer Trix (nach Reihenfolge auf der genomischen Sequenz)

TrixEcoD	CGC GAA TTC TTT ATT ATT GAT TAT CGA TAT TTT TTA TGG TAT C
3chSD3	CGC GTC GAC TTA ATA AAT TAA TAA AAA TAA ATA ACA TAC AAA TTG
3chSD	CGC GTC GAC TTA ATA AAT TAA TAA AAA TAA ATA ACA
AnaD+	TTC AAT GAC TTT TTG TCT TCT AGT ATC
3chSD2	CGC GTC GAC TGG AAT TGA TTT CAT TTG ATG ATC
AnaD	TTT CTT TCA CCT GCT AAA TGT ATA CCA TTA
3chKoPD	CGC CTG CAG CAT TTT CTA GCG GTT TGT TCC AAT

Primer in der BSR-Kassette

BsrU+ CTT CTA CTA ATT CTA GTA CTT GTT GAG

2.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion, PCR

Mit der Polymerase Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1985) werden Trix Fragmente von genomischer DNA (siehe 2.3.9.1 und 2.3.9.2) amplifiziert. Bei allen PCR-Reaktionen werden initial ein langer Denaturierungsschritt von fünf Minuten pro 10^3 Basen des erwarteten Produktes, eine Verlängerung von einer Minute sowie abschließend eine letzte Verlängerung von zehn Minuten zur Vervollständigung begonnener Produkte durchgeführt. Die verwendeten Geräte funktionieren als Thermocycler mit beheizbaren Deckeln, weshalb keine Ölüberschichtung verwendet wird. Die Temperatur zur Hybridisierung der Oligonukleotide wird nach Suggs und Mitarbeitern (Suggs *et al.*, 1981) berechnet:

$$4\,(G+C) + 2(A+T) - 10 = TH\ (°C).$$

10 x PCR-Puffer für Taq-Polymerase:

100 mM	Tris/HCl (pH 8,3)
500 mM	KCl
15 mM	$MgCl_2$
0,1 %	(w/v) Gelatine

Oligonukleotide:

50 pmol/µl in TE pH 8,0

Template DNA:

Genomische AX2 DNA (1.3.9.1 und 1.3.9.2)

XTP: dNTP Mix aus dATP, dTTP, dCTG, dGTG; jeweils 1 mM

Reaktionsansätze für Trix Volllänge, 3ch-Fragment, GEF-Fragmet

genomische DNA	90 ng
5'-Oligonukleotid	jeweils 100 pmol
3'-Oligonukleotid	jeweils 100 pmol
dNTP-Mix	jeweils 5 mM
10x PCR-Puffer	10 µl
Taq-Polymerase	1 U
H_2O bidest	auf insgesamt 100 µl

Reaktionsbedingungen	Trix Volllänge	3ch-Fragment	GEF-Fragmet
Initiale Denaturierung		*- Jeweils 94°C, 5 min -*	
Weitere Denaturierungen		*- Jeweils 94°C, 30 s -*	
Hybridisierung	50°C, 40 s	50°C, 40 s	50°C, 40 s
Verlängerung	72°C, 240 s	72°C, 120 s	72°C, 100 s
Zyklenzahl		*- Jeweils 30 -*	
Letzte Verlängerung		*- 10 min -*	

2.3.1.3 RT-PCR nach der Promega-Methode

Mit der RT-PCR wird cDNA von einer RNA-Matrize hergestellt und amplifiziert. Für die Durchführung dieser Technik gelten die besprochenen Maßnahmen für Arbeiten mit RNA (siehe 2.3.10). Die Promega Methode der RT-PCR verwendet die Tth-DNA-Polymerase. Diese funktioniert in einem Puffersystem mit Mangan als RNA-abhängige DNA-Polymerase und amplifiziert in einem Puffersystem mit Magnesium die cDNA weiter. In der ersten Reaktion wird die cDNA synthetisiert:

Reaktionsansatz 1

500 ng Gesamt-RNA (2.3.10)	
2 µl	10 × RT-Puffer ($MnCl_2$-haltig)
2 µl	$MnCl_2$ 10 mM
4 µl	dXTP je 1 mM
15 pm	3'-Primer
4-6 U	Tth-DNA-Polymerase
mit DEPC-behandeltem H_2O auf 20 µl auffüllen	

Reaktionsansatz 2

8 µl	Chelat 10 × Puffer
15 pmol	5'-Primer
8 µl	$MgCl_2$
mit DEPC-behandeltem H_2O auf 80 µl auffüllen	

Zur Bindung der Primer an die Matrize wird Ansatz 1 für eine Minute bei 50 °C inkubiert. Danach wird für 20 Minuten bei 70 °C erhitzt, was der Aktivitätstemperatur der Polymerase entspricht. Vor der zweiten Reaktion (der Amplifizierung der cDNA) wird ein Chelatreagenz zur Entfernung des Mangans und gleichzeitig das notwendige Magnesium zugeführt. Reaktionsansatz 1 wird daraufhin mit Reaktionsansatz 2 gemischt und beides fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Dadurch werden RNA-DNA-Hybride denaturiert. Im Folgenden schließt sich eine zyklische Reaktion zur Amplifizierung der cDNA an. Die Reaktionsbedingungen werden analog der PCR (siehe 1.3.1.2) gewählt.

Chelat 10 × Puffer (im Set enthalten)	
100 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
1 mM	KCl
7,5 mM	EGTA
0,5 %	Tween 20
50 %	Glycerin

RT 10 × Puffer (im Set enthalten)	
100 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
900 mM	KCl

2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wird in allen Maxipräps (siehe 2.3.4), in den Präparationen chromosomaler DNA (siehe 2.3.9.1 und 2.3.9.2) und der Gesamt-RNA (2.3.10) bestimmt. In Verdünnungen von 1:200 wird die Absorption der Nukleinsäuren in Quarzküvetten im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Um größere Verunreinigungen durch Proteine auszuschließen, wird ebenso die Absorption bei 280 nm gemessen. Für unverschmutzte DNA Lösungen gilt: OD_{260}/OD_{280} = 1,8 - 2,0. Bei signifikant geringerem Quotienten ist eine akkurate quantitative Aussage nicht möglich. Nach Abzug des mit reinem Aqua dest. ermittelten Leerwertes werden zur Umrechnung folgende Werte herangezogen:

Doppelsträngige DNA: OD_{260} = 1 für eine 50 µg/ml Lösung

Einzelsträngige DNA: OD_{260} = 1 für eine 33 µg/ml Lösung

RNA: OD_{260} = 1 für eine 40 µg/ml Lösung

Daraus ergibt sich die Berechnung (Beispiel ds DNA):

$$OD_{260} \times 50\ \mu g/ml \times \text{Verdünnungsfaktor } 200 = \text{DNA Konzentration in } \mu g/ml$$

2.3.3 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen, Markerstandards

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgt in Agarosegelen mit einem Agarosegehalt von 0,7 % (Sambrook *et al.*, 1989). Als Gel- und Laufpuffer wird ein Loehning-Puffer verwendet. Die Gele werden in Flachbett-Apparaturen verschiedener Größen gegossen (4 cm x 7 cm, 20 cm x 20 cm, Eigenbau). Vor dem Beladen wird die DNA-Probe mit 0,25 Vol DNA-Probenpuffer versetzt. Die Trennung geschieht unter folgender Spannung: 2V/(cm Gellänge) für Gele zum Blot nach Southern und 5V/(cm Gellänge) für alle anderen Trenngele. Nach der Elektrophorese wird das Gel in Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) für eine bis drei Minuten gefärbt und für 30 Minuten in Wasser entfärbt. Die Ergebnisse werden mit dem EagleEye-System fotografisch bei UV-Licht (312 nm) dokumentiert.

Loehning-Puffer pH7:		DNA-Probenpuffer:	
0,036 M	Tris	40 %	Saccharose
0,343 M	NaH_2PO_4	0,5 %	SDS
0,001 M	EDTA	0,25 %	Bromphenolblau
ad H_2O (Gesamtvolumen 1l)		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.

1kB Marker: 10000 Bp, 8000 Bp, 6000Bp, 5000 Bp, 4000Bp, 3500 Bp, 3000 Bp, 2500 Bp, 2000 Bp, 1500 Bp, 1000 Bp, 750 Bp, 500 Bp, 250 Bp.

2.3.4 Präparation von Plasmid-DNA nach der Qiagen-Methode

Das Prinzip der DNA-Gewinnung bei der Qiagen-Methode besteht in einer DNA-Bindung an Anionen-Austauschgranulat in Zentrifugationsröhrchen bei niedrigen Salzkonzentrationen. Zur Beseitigung von RNA und Proteinen wird mit mittleren Salzkonzentrationen gewaschen. Das Ernten der DNA erfolgt durch Auswaschung mit einem Puffer hoher Salzkonzentration. Dann wird eine Isopropanol-Präzipitierung der DNA vorgenommen. Zur Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA wird das Mini-Kit, für größere Mengen das nachfolgend beschriebene Qiagen-Maxi-Kit verwendet.

Eine Bakterienkultur wird in 150 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in 10 ml P1 resuspendiert. Durch Zugabe

von 10 ml P2 werden die Zellen einer alkalischen Lyse unterzogen. Die Ansätze werden durch Invertieren gemischt und für fünf Minuten bei RT inkubiert. Um Proteine und Zellbruchstücke zu sedimentieren werden anschließend 10 ml eisgekühlten Puffers P3 zugegeben, wiederum durch Invertieren gemischt und die Proben abzentrifugiert (JA20 Rotor, 17 000 Upm, 30 min, 4°C). Das Sediment wird verworfen und der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, durch einen zweiten Zentrifugationsschritt (zehn Minuten) gereinigt. Der klare Überstand wird nun auf eine zuvor mit 5 ml Puffer QBT äquilibrierte 'tip 100'-Säule (Qiagen) aufgetragen. Anschließend wird zweifach mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wird mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (JA20 Rotor, 12.000 Upm, 30 min, 4 °C). Der Überstand wird 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	Puffer P2	Puffer P3
50 mM Tris/HCl (pH 8,0)	200 mM NaOH	3 mM K-Acetat (pH 5,5)
10 mM EDTA	1 % SDS	
100 µg/ml RNase A		

Puffer QBT	Puffer QC	Puffer QF
750 mM NaCl	1 M NaCl	1,25 M NaCl
50 mM MOPS (pH 7,0)	50 mM MOPS (pH 7,0)	50 mM Tris/HCl (pH 8,5)
15 % Ethanol		15 % Ethanol
0,15 % Triton X-100		

2.3.5 Fragmentisolierung aus DNA-Gelen nach der Qiagen-Methode

Dieses System der DNA-Gewinnung aus Agarosegelen funktioniert durch eine DNA-Bindung an Silica Gel in Zentrifugationsröhrchen bei hohen Salzkonzentrationen, während RNA und Proteine bereits bei mittleren Salzkonzentrationen ausgewaschen werden.

Die Bande mit der zu extrahierenden DNA wird nach der Elektrophorese mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Der Agarose werden drei Volumen QG-Puffer zugesetzt, wobei gilt: 100 mg Agarose ~ 100 µl. Beides wird in einem Eppendorf-Gefäß zehn Minuten bei 50° C beheizt, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Die Farbe der Lösung muss gelb sein. Bei violetter Farbe wird mit QG-Puffer austitriert. Man fügt nun ein Gelvolumen

Isopropanol hinzu, wobei die Lösung klar bleiben muss. Bei Trübung ist die DNA teilweise präzipitiert. Man fügt in diesem Fall etwas QG-Puffer hinzu, was die DNA wieder in Lösung bringt. Die ganze Flüssigkeit wird nun mit Zentrifugation fraktioniert, durch das gleiche Sammelsäulchen gebracht, wobei stets nachgeladen und der Durchfluss verworfen wird. Es schließt sich ein Waschdurchlauf mit 0,75 ml PE-Puffer an. Der Durchfluss wird verworfen und das Säulchen nochmals zentrifugiert, um Pufferreste vollständig zu entfernen. Eluiert wird mit 50 µl H_2O, das man auf die Silica-Membran pipettiert und eine Minute inkubiert, bevor man in ein neues Eppendorf-Gefäß zentrifugiert.

2.3.6 Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA erfolgt für alle verwendeten Restriktionsenzyme in den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen und jeweils bei 37 °C. Pro µg DNA werden 2 bis 10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Ein 50 µl Ansatz mit 1 bis 5 µg Plasmid-DNA wird für ein bis fünf Stunden inkubiert. Chromosomale DNA wird in einem 100 bis 200 µl Ansatz für drei bis 12 Stunden verdaut. Die Vollständigkeit der Restriktion wird auf einem Agarosegel dokumentiert.

2.3.7 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA

2.3.7.1 Phosphatase-Behandlung

Um die Religation von linearisierten Vektoren zu verhindern, werden die Phosphatgruppen am 5´-Ende mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) entfernt. Die Methode wird nach Sambrook und Mitarbeitern (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt:

Standardansatz		10 x CIAP-Puffer (pH 9,0)	
1-5 µg	linearisierter Vektor	500,0 mM	Tris/HCl
2 U	alkalische Phosphatase	10,0 mM	$MgCl_2$
10 µl	Phosphatase-Puffer	1,0 mM	$ZnCl_2$
mit H_2O auf 100 µl auffüllen		10,0 mM	Spermidin

Zur Dephosphorylierung wird für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert sowie anschließend zur irreversiblen Denaturierung des Enzyms für zehn Minuten bei 65 °C. Der dephosphorylierte Vektor kann eingefroren und für weitere Ligationen verwendet werden.

2.3.7.2 DNA-Ligase-Reaktion

DNA-Fragmente werden mit T4-DNA-Ligase verbunden. Überstehende Enden werden 12 bis 16 Stunden bei 16 °C, glatte Enden 24 Stunden bei 16 °C ligiert. Die verwendeten Vektoren sind stets mit Phosphatase behandelt. Alle ligierten Inserts sind kleine Fragmente (< 3000 bp), für die ein ca. 10-facher molarer Überschuss eingesetzt wird. Die Konzentrationen von Insert und Vektor werden anhand eines Agarosegels abgeschätzt. Die in der Ligation einzusetzenden DNA-Mengen werden mit folgender Formel berechnet:

((Vektor [ng] x Insert [kB])/Vektor [kB]) x molares Verhältnis (Insert/Vektor) = Insert [ng].

Reaktionsansatz		10 x Ligationspuffer (pH 7,6)	
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 H_2O auf 15 µl auffüllen		500 µg/ml	BSA

2.3.8 Glätten von Restriktionsschnittstellen

Die verwendeten Restriktionsenzyme erzeugen überstehende Enden am 3' oder 5' Ende. Zum Auffüllen von 5' überstehenden Enden wird das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I verwendet.

Reaktionsansatz

1 µg	DNA
2 µl	10 × NT-Puffer (siehe 1.8.13)
2 µl	XTP (siehe 1.8.1.2)
1 U	Klenow Enzym

mit H_2O auf 20 µl auffüllen

Der Ansatz wird 15 Minuten bei Raumtemperatur, fünf Minuten bei 37 °C und zehn Minuten bei 60 °C inkubiert. Der letzte Schritt führt zur irreversiblen Denaturierung des Enzyms.

2.3.9 Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

2.3.9.1 Präparation chromosomaler DNA aus angereicherten Zellkernen

D. discoideum besitzt einen hohen Gehalt an Kohlenhydraten und RNA, welche die chromosomale DNA bei der Isolierung verunreinigen. Deshalb wird die DNA aus angereicherten Zellkernen isoliert (Noegel *et al.*, 1985). Im Verlauf der Präparation wird durch vorsichtiges Invertieren und nicht durch Vortexen gemischt, um Scherkräfte zu vermindern, die eine physikalische Schädigung der DNA hervorrufen können. Ferner werden an Pipetten die Spitzen entfernt, um deren Öffnungen zu vergrößern.

Es werden 1 bis 2 x 10^8 Zellen einer Schüttelkultur zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und das Zellpellet in 50 ml Kernlysepuffer resuspendiert. Durch diese Behandlung lysieren die Zellen, die Zellkerne bleiben jedoch intakt. Diese werden dann bei 6 000 g abzentrifugiert (JA20, 7 500 Upm, 10 min, 4 °C). Das weißliche Zellkern-Sediment wird in 500 µl SDS-Lysispuffer aufgenommen, mit 100 µl Proteinase K Lösung versetzt und zwei bis drei Stunden bei 60 °C inkubiert. Das Lysat wird nun zwei- bis dreimal mit je einem Volumen Phenol/Chloroform durch vorsichtiges Mischen extrahiert. Die Nukleinsäure wird durch Zugabe von 1/10 Vol. 2 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Vol. Ethanol zur wässrigen Phase präzipitiert. Sie wird anschließend mit einem Glashaken ausgedreht und in Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen an der Luft wird die DNA in etwa 500 µl 1/10 TE-Puffer gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 1.3.2).

Kernlysepuffer	SDS-Lysispuffer
10 mM Mg-Acetat	0,7 % SDS in TE-Puffer
10 mM NaCl	
30 mM HEPES (pH 7,5)	Proteinase K
10 % Saccharose	14,7 mg/ml, vor Gebrauch
2 % Nonidet P40	30 min bei 37 °C inkubieren

2.3.9.2 Präparation chromosomaler DNA mit der Roche-Methode

Es werden 10^5 Zellen einer Schüttelkultur geerntet und in PBS zu einem Volumen von 200 µl resuspendiert. Zu Beginn werden 200 µl Bindungspuffer und 40 µl Proteinase K hinzugefügt und der Ansatz für zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. Dann werden 100 µl Isopropanol hinzu pipettiert, das Ganze gut gemixt und in das obere Reservoir eines mit einem Sammelgefäß kombinierten Filtertubus pipettiert. Es erfolgt dann eine Zentrifugation für eine Minute bei

8000 Upm. Das Sammelgefäß mit dem Durchlauf wird nun verworfen und der Filtertubus in ein neues Sammelröhrchen gesteckt. Nach Zugabe von 500 µl Inhibitor-Entfernungspuffer wird eine Minute bei 8 000 Upm zentrifugiert. Erneut wird die Sammelhülse mit Durchfluss verworfen und die obige Prozedur zweimal mit je einem neuen Sammelröhrchen und je 500 µl Waschpuffer durchgeführt. Nach dem letzten Waschschritt wird der Durchlauf verworfen und mit der gleichen Sammelhülse zehn Sekunden bei 14 000 Upm zentrifugiert, um die letzten Pufferreste zu entfernen. Dann werden 200 µl Elutionspuffer, der auf 70 °C vorgewärmt ist, hinzugegeben und in eine neue Sammelhülse zentrifugiert, die dann die gewünschte DNA enthält. Zuletzt wird zehn Minuten bei 37 °C mit RNAse A behandelt, um Verunreinigungen mit RNA zu minimieren.

Mitgelieferte Komponenten des Systems

Filterröhrchen und Sammelhülsen	Inhibitor-Entfernungspuffer
Bindungspuffer	Waschpuffer
Proteinase K	Elutionspuffer

2.3.10 Isolierung der Gesamt-RNA aus *D. discoideum* mit der Qiagen-Methode

Allgemeine Bemerkungen zum Arbeiten mit RNA:

Es wird darauf geachtet, Kontaminationen mit RNAse zu minimieren. Bei allen Arbeitsschritten werden Einmalhandschuhe getragen. Die Probenröhrchen werden nach Möglichkeit verschlossen gehalten und alle Arbeiten auf Eis durchgeführt. Nach Möglichkeit wird nur Einwegplastikzubehör benutzt. Alle wiederverwendbaren Gerätschaften werden mit 0,5 % SDS-Lösung und DEPC behandeltem H_2O gewaschen. Letzteres wird aus Aqua bidest mit 0,1 % DEPC, einem starken RNAse-Inhibitor, hergestellt. Dabei erfolgt nach einer Inkubation über Nacht ein Autoklavieren über mindestens 15 Minuten, wodurch DEPC eliminiert wird.

Bei der Qiagen-RNA-Isolierung wird eine entsprechende Zellprobe lysiert und mit Protein denaturierendem Guanidin-Isothiocyanat haltigem Puffer homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol wird die RNA an eine Membran im Zentrifugationsröhrchen gebunden, die auf Silica Gel basiert. Mit vorbehandeltem H_2O wird die RNA schließlich eluiert.

Es werden 1 bis 1,5 x 10^7 Zellen geerntet, einmal mit kaltem, sterilem H_2O sowie einmal mit DEPC-H_2O gewaschen. Die Zellen werden mit 600 µl RLT-Puffer lysiert und zentrifugiert (14 000 Upm, 1 min, RT). Alle Zentrifugationsschritte des Protokolls erfolgen in einer

Eppendorf-Tischzentrifuge. Der Überstand wird dann in ein frisches Eppendorf-Gefäß pipettiert und weitere drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum in ein frisches Reaktionsgefäß gebracht und mit einem Volumen 70 % Ethanol (in DEPC- H_2O) gemischt. Diese Lösung wird durch ein Säulchen zentrifugiert und die Säulenmatrix erst mit 700 µl RW1-Puffer sowie anschließend zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Nach Entfernung des Durchflusses wird nochmals zentrifugiert, um Pufferreste vollständig zu entfernen. Die RNA wird nun mit 30 bis 50 µl RNase freien Wassers in ein neues Eppendorf-Gefäß eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.3.11 Southern-Blot

Im Southern Blot (Southern, 1975) werden DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Trennung auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Dabei werden die Positionen der DNA-Fragmente im Agarosegel auf der Nitrozellulosemembran fixiert. Hier können sie mit ^{32}P-markierten DNA-Sonden lokalisiert werden.

In einem 200 ml Agarosegel werden Restriktionsansätze aus genomischer DNA unter 35 mV Spannung aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Lineal bei UV-Licht (312 nm) fotografiert. Anschließend wird das Gel 30 Minuten in 1 M NaOH, dann 60 Minuten in 1 M Tris pH 7,4 + HCl und 20 Minuten in 20 x SSC inkubiert. Das Agarosegel wird nun auf fünf Lagen Whatman-Papier gelegt, welche überstehen und in einen Vorrat aus SSC reichen. Darüber werden die Nitrozellulosemembran (zuvor jeweils 20 Minuten in H_2O und 20 Minuten in 20 x SSC inkubiert) und dann wieder fünf Lagen Whatman-Papier aufgebracht. Hierauf folgt eine 10 cm dicke Lage aus saugfähigen Papiertüchern, welche gleichmäßig beschwert werden. Das Blotten geschieht durch Kapillarkräfte, welche das SSC aus dem Vorrat durch alle Schichten bis in die Papiertücher wandern lassen. Nach 10 Stunden wird die Nitrozellulosemembran markiert, 10 Minuten mit 5 x SSC gewaschen und zwischen zwei Whatman-Papieren für zwei Stunden bei 60 °C erhitzt. Anschließend wird die Nitrozellulosemembran umgehend weiterverarbeitet (siehe 1.8.14).

2.3.12 Elektrophorese von RNA in Agarosegelen

Zur Herstellung der Trenngele wird Agarose (Endkonzentration 1,2 %) mit 148 ml DEPC-H_2O und 20 ml 10 × RNA-Gelpuffer aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt. Dann werden 32 ml einer 36 %-igen Formaldehydlösung hinzugegeben. Die Mischung wird in eine DEPC-H_2O-gespülte Flachbett-Gelapparatur (20 cm × 20 cm) gegossen und das Gel nach Erhärten

mit RNA-Laufpuffer überschichtet. Die RNA wird mit etwa einem Volumen RNA-Probenpuffer versetzt, zehn Minuten bei 65 °C denaturiert und nach Zugabe von 1/10 Volumen RNA-Farbmarker sofort auf das Gel aufgetragen. Zur Elektrophorese werden 2 V/cm Spannung angelegt (Lehrach *et al.*, 1977).

10 × RNA-Gelpuffer (pH 8,0)		10 x RNA-Laufpuffer (pH 7,0)	
20 mM	MOPS/NaOH	20 mM	MOPS/NaOH
5 mM	Na-Acetat	5 mM	Na-Acetat
1 mM	EDTA	1 mM	EDTA

Die Puffer werden autoklaviert, wobei ein gelblicher Farbton entsteht.

RNA-Probenpuffer		RNA-Farbmarker	RNA-Größenstandard
50 %	Formamid	50 % Saccharose (RNase frei)	26S rRNA (4,1 kB)
6 %	Formaldehyd	0,25 % Bromphenolblau	17S rRNA (1,9 kB)
10 µg/ml	Ethidiumbromid	in DEPC-Wasser	
in 1 x RNA-Gelpuffer, pH 8,0			

2.3.13 ^{32}P-Markierung von DNA-Proben durch 'nick-translation'

Doppelsträngige DNA wird zunächst mit DNAse I behandelt, um Einzelstrangbrüche zu setzen. Im zweiten Schritt folgt eine Behandlung mit DNA-Polymerase I, deren 5'-3'-Exonuklease-Aktivität diese Einzelstrangbrüche erweitert und deren 5'-3'-Polymeraseaktivität die Lücken mit radioaktiv markierten Nukleotiden schließt.

Reaktionsansatz:		10x NT-Puffer (pH 7,5):	
0,2-0,1 µg	ds DNA (Gelextrakt)	500 mM	Tris/HCl, pH7,5
2 µl	10 x NT-Puffer	100 mM	$MgSO_4$
2 µl	d(GTP/TTP/CTP) je 330 µM	1 mM	DTT
4 µl	DNAse I (1mg/ml 1 : 10^4 in NT-Puffer)	0,5 mg/ml	Rinderserumalbumin
1 U	DNA-Polymerase I		
5 µl	α-^{32}P-dATP		
ad H_2O (Gesamtvolumen 20µl)			

2.3.14 Hybridisierung mit ^{32}P markierten Sonden

Die Nitrozellulosemembran wird unmittelbar nach dem Erhitzen bei 60 °C in einer Plastiktüte bei 37 °C mit 50 ml Vorhybridisierungspuffer behandelt. Nach einer Stunde wird der Puffer entfernt und die ^{32}P markierte Probe zusammen mit 10 ml Vorhybridisierungspuffer hinzugegeben. Die Plastiktüte wird nun verschweißt und zehn Stunden bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Hierauf wird die radioaktive Lösung sachgerecht entsorgt und die Nitrozellulose bei Raumtemperatur zweimal zehn Minuten in 2 x SSC und dann bei 37 °C für 60 Minuten in Hybridisierungspuffer gewaschen. Nach dem Trocknen auf Whatman-Papier wird die Membran mit PVC-Folie bedeckt und bei –70 °C in einer Filmkassette auf einem Röntgenfilm exponiert.

Hybridisierungspuffer:

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

Hybridisierungswaschpuffer:

Dem Hybridisierungspuffer entsprechend, ohne 4 x Denhardts Reagenz angesetzt.

2.3.15 Transformation von *D. discoideum*-Zellen durch Elektroporation

AX2-Zellen in axenischer Kultur werden bei einer Dichte von 2 bis 3 x 10^6 Zellen/ml geerntet. Die Zellen werden einmal in kaltem Soerensen-Phosphatpuffer, zweimal in kaltem Elektroporationspuffer gewaschen und dann mit dem Elektroporationspuffer auf eine Dichte von 10^8 Zellen/m^3 eingestellt. Von dieser Suspension pipettiert man 0,5 ml zusammen mit 30 µg des zu transformierenden Plasmids in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 4 mm). In einer Elektroporationsapparatur wird nun ein Puls von 3 µF Kondensatorkapazität und 1,2 kV Spannung appliziert. Die Suspension wird daraufhin in einer Petrischale zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden $CaCl_2$ und $MgCl_2$ in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und durch Schwenken verteilt. Hierauf wird 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor man mit 10 ml AX2 Medium verdünnt. Nach 24 Stunden bei 21 °C kann Selektionsdruck, je nach Plasmid mit Blasticidin bzw. Geneticin, ausgeübt werden.

2.3.16 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

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

2.3.17 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock

Für jede Plasmidprobe werden 200 µl transformationskompetente Zellen langsam aufgetaut. Die 20 µl DNA-Lösung werden mit 30 µl TCM Puffer vermischt, danach gibt man die Zellsuspension hinzu und inkubiert das Gemisch eine Stunde auf Eis. Der Hitzeschock wird anschließend durchgeführt, indem man den Ansatz eine Minute lang in einem Heizblock bei 42 °C beheizt und danach für eine Minute zurück in das Eis stellt. Nun gibt man 800 µl LB-Medium hinzu und beheizt für eine Stunde in einem Heizblock bei 37 °C. Dann kann man jeweils 330 µl des Ansatzes auf einer LB-Amp-Platte ausstreichen und bebrüten.

TCM Puffer

0,1 M	$MgCl_2$
0,1 M	$CaCl_2$

2.3.18 *E. coli*-Dauerkulturen

Es werden 930 µl einer stationären *E. coli*-Kultur in das beschriftete Einfriergefäß vorgelegt. Dazu gibt man 70 µl DMSO und mixt mehrfach mit der Pipette. Die Dauerkulturen werden nun in einer Gefriertruhe bei –70 °C gelagert. Um neue Kulturen anzuimpfen, wird eine Impföse in der Flamme erhitzt und kurz in die gefrorene Dauerkultur gesteckt. Es bleibt dadurch ein wenig Suspension an der Impföse haften, die in vorbereitetem LB-Medium weiter inkubiert werden kann. Die Dauerkultur lagert man möglichst rasch wieder in der Gefriertruhe ein. Sie kann weiterhin zum Animpfen neuer Kulturen verwendet werden.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE (Lämmli, 1970) wird mit 7,5 %- und 10 %-Trenngelen und 3 %-Sammelgelen durchgeführt (7,5 cm x 10 cm x 0,05 cm). Die aufzutrennende Proteinlösung wird mit 1/3 Volumen 3 x SDS-Probenpuffer gemischt und drei Minuten gekocht. Die Elektrophorese erfolgt bei 150 V konstanter Spannung.

Sammelgel		Trenngel	
125 mM	Tris/Glycin (pH 6,8)	380 mM	Tris/Glycin (pH 8,8)
0,1 %	SDS	0,1 %	SDS
3,3 %	Acrylamid (38:1 Bisacrylamid)	15 %	Acrylamid (38:1 Bisacrylamid)
pro 16 ml:		pro 42 ml:	
240 µl	Ammoniumperoxodisulfat (APS), 20 %ig	480 µl	APS, 20 %ig
8 µl	TEMED	12 µl	TEMED

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer	3 x SDS-Probenpuffer	
250 mM Tris	65 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
1,9 M Glycin	10 %	Glycerin
1 % SDS	2,3 %	SDS
	5 %	β-Mercaptoethanol
	Bromphenolblau a.l.	

Markerstandard

'Low-Molecular-Weight-Marker' Biorad: 92,5 kDa, 68 kDa, 45 kDa, 33 kDa, 20 kDa, 14 kDa

2.4.2 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen

SDS-PAGE-Gele werden mindestens 30 Minuten in Färbelösung geschüttelt. Nicht-gebundener Farbstoff wird durch Schütteln in einer Entfärbelösung ausgewaschen.

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

2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976) erfolgt mit Coomassie-Blau G-250. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes verschiebt sich nach der Bindung von Proteinen von 465 nm auf 595 nm. Zur Messung verdünnt man Proteinlösungen mit H_2O auf ein Volumen von 800 µl und gibt 200 µl Bradford Reagenz hinzu. Um Referenzwerte zu erhalten, wird zunächst eine Eichgerade mit dem Standardprotein BSA hergestellt. Man misst hierfür BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 0,01-1 mg/ml bei 595 nm. Mit Hilfe der Eichgeraden errechnet sich die Proteinkonzentration nach folgender Formel:

Proteinkonzentration = OD/(Steigung + y-Achsenabschnitt)

Um statistisch zuverlässige Werte zu erhalten, erstellt man eine Verdünnungsreihe mit 5, 10, 15 und 20 µl der Probe. Die errechneten Proteinkonzentrationen werden dann gemittelt.

Bradford Reagenz

0,1 g	Coomassie Blue G
50 ml	EtOH
100 ml	85 % H_3PO_4

mit H_2O auf 250 ml auffüllen

2.4.4 Western-Blot

Mit dem Westernblot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine vom Polyacrylamidgel (siehe 1.4.1) auf Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell BA 85) überführt. Zum Blotten wird eine 'semi-dry' Elektrophorese Apparatur (Biorad Trans-Blot SD) verwendet. In der Reihenfolge von der Kathode zur Anode werden drei Lagen Whatman-Papier, die Nitrozellulose, das Polyacrylamidgel und wieder 3 Lagen Whatman-Papier aufgelegt. Die Whatman-Papiere werden in Transferpuffer getränkt und beim Auflegen mit einem Handroller angedrückt, um Lufteinschlüsse zu beseitigen. Am Gerät werden für 60 Minuten 12 V bei 2 A eingestellt, danach kann die Nitrozellulose entnommen und in einer flachen Schale auf einem langsamen Schüttler für eine Stunde abgesättigt werden. Dies beseitigt die verbliebene Bindungskapazität für Fremdproteine und wird mit 0,5 % BSA abgesättigtem NCP-Sättigungspuffer durchgeführt.

Transferpuffer		Sättigungspuffer 10 × NCP-Puffer (pH 8,0)	
25 mM	Tris/HCl (pH 8,5)	100 mM	Tris/HCl
190 mM	Glycin	1,5 M	NaCl
20 %	Methanol	5 ml	Tween 20
0,02 %	SDS	*ad* 1 l mit bid. H_2O	

2.4.5 Reinigung rekombinanter Proteine

Verschiedene Fragmente von Trix werden rekombinant mit dem pMalc2-Vektor im *E. coli*-Stamm DH5α exprimiert. Die Fragmente sind jeweils meist durch BamH1- und Sal1-Schnittstellen in den Expressionsvektor kloniert. Die *E. coli*-Kulturen werden in LB-Amp-Medium bei 37 °C inkubiert, bei einer OD600 von 0,6 mit 1 mM IPTG induziert und über Nacht weiter inkubiert. Das Ernten der Zellen und alle weiteren Schritte erfolgen in einer vorgekühlten Zentrifuge bzw. streng auf Eis. Jeweils 500 ml Zellen werden abzentrifugiert, das Pellet in 8 ml Lysepuffer aufgenommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dazu werden jeweils 150 µl Proteaseinhibitorcoctail und Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) gegeben. Zum Aufschließen der Zellen wird daraufhin ein Ultraschallstab verwendet, wobei in jeweils 2 Zyklen, mit einem Output von 8 (Geräteskala bis 10) und einer Aktivität von 50 % der Zeit beschallt wird. Das Zelllysat wird mit 18 × 10³ Upm und bei 4 °C für 60 Minuten zentrifugiert, bis der Überstand klar und etwa bernsteinfarben ist. Die Aufreinigung erfolgt durch Affinitätschromatographie über Amylose-Matrizes. Das Zelllysat wird in einer Endlosschleife über Nacht auf eine entsprechende Affinitätssäule geladen. Die Säule wird danach mit 2 × 100 ml des Lysepuffers gewaschen, bevor mit dem Elutionspuffer überschichtet wird. Anschließend werden Fraktionen von 100 Tropfen eluiert und die Konzentration an Protein mit der Bradford Reagenz ermittelt.

Lysepuffer		Elutionspuffer	
30 mM	Tris/HCl (pH 7,5)	10 mM	Maltose
50 mM	NaCl	in Lysepuffer	
1 mM	EDTA		
5 mM	Benzamidin		
1 mM	DTT		

2.4.6 Einfrieren gereinigter Proteine

Die proteinreichen Fraktionen der rekombinant exprimierten Proteine werden in eine Schale mit flüssigem Stickstoff getropft. Die entstehenden Eisperlen werden mit einem Löffel herausgefischt und in ein Falcon-Röhrchen gefüllt. Dieses wird bei –70 °C in der Gefriertruhe aufbewahrt.

2.4.7 Fluoreszenzspektroskopische Aktivitätsmessung

Wie in der Einleitung (1.4.2) dargelegt, werden Rac-GTPasen durch den Austausch von gebundenem GDP durch GTP aktiviert. Dieser Austausch wird in vivo durch eine von den GEF-Proteinen erleichterte Abgabe des gebundenen GDP von der GTPase beschleunigt. Durch Vorhandensein eines GTP-Überschusses im zellulären Milieu geschieht dann eine rasche GTP-Bindung durch die GTPase.

Im Versuch wird ein Überschuss an 2'(3')-O-(N-Methylanthraniloyl)-(MANT) substituiertem Guanosindiphosphat, MANT-GDP, vorgelegt. Das Experiment basiert auf der Messung einer Fluoreszenzzunahme nach Bindung von MANT-GDP in der nukleotidbindenden Tasche einer Rac-GTPase (360 nm Anregung und 440 nm Emission). Die Bindung von MANT-GDP an eine Rac-GTPase erfolgt dabei mit einer gewissen Spontanrate. Bei Vorliegen eines aktiven Guaninnukleotid-Austauschfaktors ist jedoch ein steilerer Anstieg der gemessenen Fluoreszenz durch einen rascheren Austausch von GDP gegen MANT-GDP zu erwarten.

Das Experiment wird mit Quarzküvetten und einem FP-6500 Spektralfluorimeter von Jasco durchgeführt. Die Quarzküvetten werden vor der Messung mit EtOH gereinigt und mit dem Puffer zur Fluoreszenzspektroskopie gespült. MANT-GDP wird dem Ansatz zuletzt zugegeben, danach wird unmittelbar mit der Messung begonnen.

Messansätze auf Eis pipettieren		Puffer zur Fluoreszenzspektroskopie	
0,1 mM	MANT-GDP	30 mM	Tris/HCl pH 7,4
1 µM	GTPase	5 mM	$MgCl_2$
1 µM	GEF-Protein	10 mM	KH_2PO_4
mit Puffer bis zum Edvolumen 1 ml auffüllen		3 mM	DTT

2.4.8 Immunisierung und Gewinnung polyklonaler Antikörper

Hierfür wird einem Kaninchen rekombinantes Protein subkutan injiziert und nach Antikörperbildung Serum entnommen. Für die Immunisierungen werden die besonders angereicher-

ten Fraktionen aus der Expression des rekombinanten Maltoseprotein gebundenen GEF-Fragments von Trix verwendet. Um eine möglichst gute Immunreaktion des Tieres zu erreichen, wird jeweils 1 ml Proteinlösung mit Hilfe eines Ultraschallgerätes aufgeschäumt. Das so aufbereitete Antigen wird über eine großlumige Kanüle in eine Ein-Milliliter-Spritze gesaugt und mit einer feinen Kanüle dem Kaninchen an einigen Stellen subkutan injiziert. Durch weitere Injektionen wird die Immunantwort verstärkt. Nach Antikörperbildung werden an einem Blutgefäß am Ohr des Tieres einige Milliliter Blut abgenommen. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wird durch Zentrifugation das Serum mit den gewünschten Antikörpern gewonnen, welches bei –20 °C eingefroren wird.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz wird zur zellulären Lokalisierung von Proteinen in fixierten Zellen benutzt. Die Bindungsstellen primärer Antikörper werden mit fluoreszierenden zweiten Antikörpern sichtbar gemacht. Bei allen Markierungen werden sterilisierte Puffer und durch Zentrifugation geklärte Antikörperlösungen verwendet.

D. discoideum-Zellen werden bei einer Dichte von 3 bis 4 x 10^6 Zellen/ml geerntet und mit kaltem Soerensen-Puffer zweimal gewaschen. Jeweils 5 x 10^5 Zellen werden auf vorher mit 0,1 M Salzsäure gereinigte Deckgläschen pipettiert. Nach 20 Minuten Wartezeit, in der sich die Zellen absetzen und an die Glasoberfläche adhärieren, wird die überschüssige Lösung abgesaugt. Unmittelbar im Anschluss werden die vegetativen Zellen mit einer der folgenden Methoden fixiert.

Methanol-Fixierung

Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit werden die Deckgläschen für zehn Minuten in -20 °C kaltes Methanol gestellt, um die Zellen zu fixieren. Die Deckgläser werden kurz Luft getrocknet und mit den Zellen nach oben auf einen Parafilm gelegt. Anschließend wird ein bis zwei Stunden mit PBG abgesättigt.

Fixierung mit Pikrinsäure/Paraformaldehyd

Das Fixativ wird direkt vor der Fixierung angemischt. Dazu werden 0,4 g Paraformaldehyd in 6 ml H_2O versetzt und auf 40 °C erhitzt. Das Paraformaldehyd wird unter Zugabe von zwei bis drei Tropfen 2 M NaOH gelöst. Mit H_2O wird auf 7 ml aufgefüllt; es werden weiterhin 10

ml einer 20 mM PIPES-Lösung (pH 6,0; sterilisiert) sowie 3 ml gesättigte Pikrinsäure (3 g/l über Nacht bei 80 °C gelöst) hinzugegeben und der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Die Deckgläschen werden mit den Zellen nach unten für 30 Minuten auf einem Tropfen Fixativ auf Parafilm platziert und danach mehrfach mit PBS/Glycin gespült, um freie Aldehydgruppen zu reduzieren. Zuletzt wird eine Nachfixierung in Methanol über zehn Minuten durchgeführt, bevor die Antikörper hinzugegeben werden.

Inkubation mit Antikörpern

Nach Fixierung und Absättigung wird zwei bis 12 Stunden mit Verdünnungen des ersten Antikörpers in PBG inkubiert. Nach Entfernen des ersten Antikörpers werden die Präparate fünfmal zehn Minuten mit PBG gewaschen und der zweite fluoreszierende Antikörper in PBG für eine Stunde aufgetragen. Zum Einsatz kommen FITC oder Cy3 gekoppeltes Ziege-anti-Maus-IgG bzw. Ziege-anti-Kaninchen-IgG (1:100-1:2000). Zur Färbung der Zellkerne wird DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol, Sigma) in einer 1:1000 Verdünnung (0,25 µg/ml Endkonzentration) verwendet. Zur Markierung des Aktinzytoskeletts wird TRITC-Phalloidin (Molecular Probes) verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und kurzem Abspülen mit H_2O werden die Präparate in Gelvatol eingebettet und zum Aushärten über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

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

1,37 M	NaCl
27 mM	KCl
81 mM	Na_2HPO_4
15 mM	KH_2PO_4

in H_2O, autoklavieren

PBS/Glycin

100 mM Glycin in PBS pH 7,4

sterilisieren

PBG

0,5 %	BSA
0,045 %	Fischgelatine

in 1 x PBS, sterilfiltriert

PIPES-Puffer pH6,0

20 mMPIPES (Piperazine-N,N'-bis-2-Ethansulfonsäure, Sigma P-6757)

in H_2O, autoklavieren

Gelvatol

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

40 ml	Glycerin zugeben, nochmals 16 Stunden rühren, zentrifugieren (12 000 g, 15 min, RT), Überstand abnehmen
25 ng/ml	DABCO (Diazabicyclo(2,2,2)oktan) zum Überstand geben und aliquotiert in Spritzen bei -20 °C lagern.

2.5.2 Phototaxis

Mit dem Phototaxisassay wird die Fähigkeit der Zellen zur Wanderung in Richtung einer Lichtquelle während der Slug-Phase untersucht (Newell *et al*., 1969). *D. discoideum*-Zellen aus der log-Phase einer Schüttelkultur werden in Phosphatpuffer gewaschen, randständig auf Phosphatagarplatten pipettiert und leicht angetrocknet. Man stellt nun zehn Platten übereinander und deckt sie vollständig ab, wobei ein Spalt von wenigen Millimetern Breite an einer Seite über die gesamte Höhe des Stapels ausgespart bleibt. Es ist darauf zu achten, dass die Zellmasse am anderen Rand der Platte, also dem Spalt gegenüber, liegt. Die Platten werden 40 bis 48 Stunden bei 21 °C gegenüber einer Lichtquelle inkubiert. Zur Dokumentation werden Nitrozellulosemembranen verwendet, die jeweils gleichmäßig auf die Agarplatten gedrückt werden, um etwas Zellmaterial aufzunehmen. Die Membranen werden dann dreimal bei –80 °C eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellen aufzubrechen. Mit einem monoklonalen Antikörper gegen Aktin können die Laufspuren phototaktisch aktiver Zellen hervorgehoben werden.

2.5.3 Chemotaxis

Chemotaxisstudien können Defekte in der dynamischen Reorganisation des Aktinzytoskeletts verdeutlichen. Die chemotaktische Stimulation erfolgt mit cAMP an *D. discoideum*-Zellen im Hungerstadium. Dazu wird eine Schüttelkultur von 300 ml auf eine Zelldichte von ca. 5×10^5 Zellen/ml gebracht, die Zellen geerntet, einmal mit Phosphatpuffer gewaschen und in Phosphatpuffer auf 10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Suspension wird dann 6 Stunden inkubiert, bis die Zellen das Aggregationsstadium erreicht haben. Zur Mikroskopie werden 15 µl der Suspension auf 2 ml Phosphatpuffer verdünnt und in einer zur Beobachtung von Zellen in Flüssigmedium geeigneten kleinen Petrischale mit Deckglas-Einsatz am Boden zur Betrachtung am inversen Mikroskop ausgebracht. Das cAMP wird mit H_2O auf 10^{-4} M verdünnt und mit einem speziellen Pipettenaufsatz in eine Mikroinjektorspitze aus Glas pipettiert. Die Injektorspitze wird mit einem Mikromanipulator an die *D. discoideum*-Zellen im Medium herangeführt, wobei das cAMP spontan ausdiffundiert. Die Glaskapillare muss

umgesetzt werden, sobald sich die Zellen ihr zu sehr nähern, um ein Verstopfen durch Zellen zu verhindern. Die Dokumentation erfolgt mit Bildaufnahmen im Abstand von jeweils zwei Sekunden, die in Filmsequenzen umgewandelt werden können.

2.5.4 Bestimmung der Phagozytoserate

Zur Quantifizierung der Phagozytoserate werden hitzeinaktivierte, mit TRITC (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat) markierte Hefezellen verwendet (Maniak *et al.*, 1995). Trypan Blau (2 mg/ml, Merck) (Hed, 1986), gereinigt durch einen 0,45 µm Porenfilter, wird zur Unterdrückung der Fluoreszenz nicht phagozytierter Hefepartikel herangezogen. Es werden 1,2 x 10^7 Hefezellen pro 1 ml *D. discoideum*-Zellen (1,2 x 10^6/ml, gewaschen in Phosphatpuffer und resuspendiert in Medium) hinzugegeben. Aliquots von 10 ml der Zellen (jeweils Trix$^-$-Mutanten und AX2-Wildtypzellen mit der markierten Hefe) werden bei 150 Upm in 25 ml Kolben geschüttelt. Jeweils 1 ml wird in bestimmten zeitlichen Intervallen entnommen, für drei Minuten mit 100 µl der Trypan Blau-Lösung inkubiert und für drei Minuten bei 500 x g zentrifgiert. Das Pellet wird in 1 ml Phosphatpuffer resuspendiert und unmittelbar im Fluoreszenzspektrometer bei 544 nm Anregung und 574 nm Emission gemessen.

2.5.5 Bestimmung der intrazellulären Verweildauer phagozytierter Partikel

Es werden 10 ml Zellaliquots einer Konzentration von 1 x 10^7 Zellen verwendet, die in 25 ml Erlenmeyerkolben bei 150 Upm geschüttelt werden (Jenne *et al.*, 1998). Für 15 Minuten wird fluoreszierendes TRITC-Dextran mit einer Endkonzentration von 4 mg/ml hinzugegeben. Danach werden die Zellen einmal gewaschen und in Medium resuspendiert. Aliquots von 1 ml werden nach jeweils 15 Minuten abgenommen, mit 100 µl Trypan Blau-Lösung zur Unterdrückung extrazellulärer Fluoreszenz versetzt (Hed, 1986) und für drei Minuten bei 500 g abzentrifugiert. Das Pellet wird dann in 1 ml Phosphatpuffer resuspendiert und die in den Zellen verbliebene TRITC-Fluoreszenz wird bei 544 nm Anregung und 574 nm Emission gemessen.

2.5.6 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wird an fixierten Immunfluoreszenzpräparaten und lebenden GFP-Transformantenzellen durchgeführt. Die Präparate werden am Zeiss LSM 510 Meta-Mikroskop durch Ölimmersionsobjektive aufgenommen. Folgende Laserwellenlängen werden dabei verwendet: 488 nm (FITC) und 515 nm (Cy3). Bei Doppelfärbungen werden beide

Farbstoffe separat gemessen und die Datensätze anschließend digital zusammengesetzt, um Interferenzen zu vermeiden. Zur Verarbeitung der Daten werden am PC die Programme NIH Image und Adobe Photoshop verwendet.

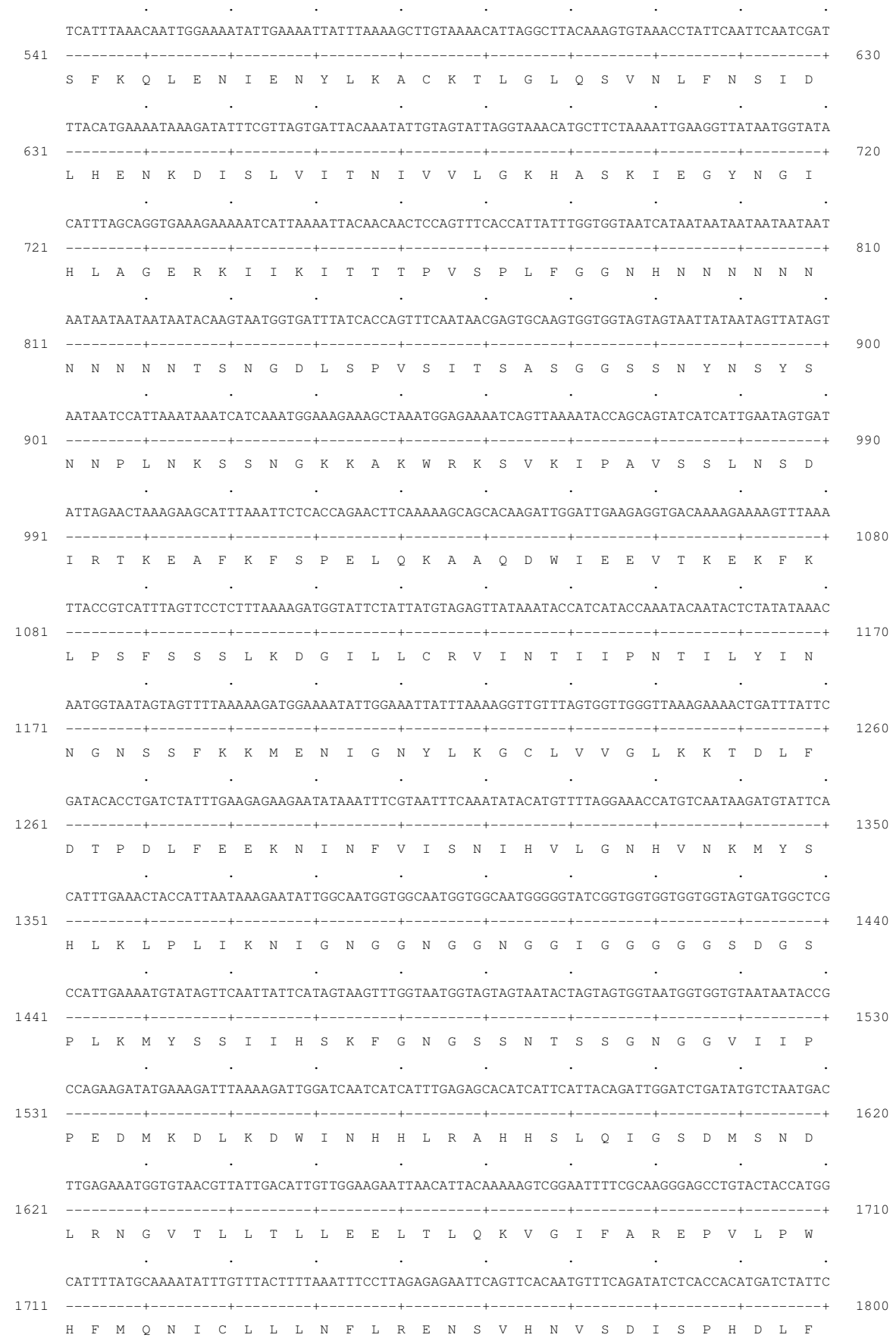
3 ERGEBNISSE

3.1 Klonierung eines neuen Guaninnukleotid-Austauschfaktors

3.1.1 Datenbankrecherche

Die Suche nach regulatorischen Proteinen für GTPasen der Rho-Gruppe erfolgte mit dem 'Preliminary Directory of *Dictyostelium* Genes – version 2.1'. Mit der Schlüsselwortsuche (http://dicty.sdsc.edu/cgi-bin/clone-search.cgi) wurden die im Rahmen des laufenden *D. discoideum*-Genomprojektes sequenzierten, uncharakterisierten GEF-Proteine für Rho-GTPasen in *D. discoideum* ermittelt. Die Eingabe des Suchbegriffes 'RhoGEF' lieferte 29 Gene in *D. discoideum* mit Homologien zu bislang bekannten Genen für Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren. Von besonderem Interesse waren Gene, die zusätzlich zu den für Rho-GEF-Proteinen typischen Domänen ebenso Kodierungen für mögliche Aktin bindende Domänen aufwiesen. Es wurde für die weiteren Untersuchungen ein nicht-charakterisiertes GEF-Protein mit einer zusätzlichen Kodierung für drei Calponin-Homologie-Domänen ausgewählt. Das Vorhandensein von **drei** Calponin-Homologie-Domänen in einem Guaninnukleotid-E**X**change- Faktor ist die Grundlage der Bezeichnung '**Trix**' für das Genprodukt. Das Gen liegt auf Chromosom 1, Crick-Strang, Bp 2728046-2731827 und wird unter der NCBI Katalogisierung CAJ57479.1 sowie EMBL Katalogisierung AM181592.1 geführt.

```
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
    ATGTTTTCAAATTTTTTTGGTAGTTCAAAAAGAAATACCATTGCTAGTAGTAGTAGTAGTAGCAAAAAAGATAAAGATAATGGTAAAGAC
  1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+   90
    M  F  S  N  F  F  G  S  S  K  R  N  T  I  A  S  S  S  S  S  S  K  K  D  K  D  N  G  K  D
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
    GAATCATCTAAATTAAAGAATAGTGGTAGTTCAACATTACCAAAACCAATTACAAACAATGAGAGTGGTAATAATTTTATAACATCACCA
 91 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+  180
    E  S  S  K  L  K  N  S  G  S  S  T  L  P  K  P  I  T  N  N  E  S  G  N  N  F  I  T  S  P
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
    TCGGTTTCAAGTCCATTGATATCACCATTATCATCATCACCATCACCATTATTATCATCAAGTAGTAATAGTATTCAATCAACATCACAT
181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+  270
    S  V  S  S  P  L  I  S  P  L  S  S  S  P  S  P  L  L  S  S  S  S  N  S  I  Q  S  T  S  H
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
    CAACAACAGCAACAACATCAAGGTGTTATAACATCATTACAAATGAAACCATCATGTACAAGTTTAACAGATGATATTGAAAAGAAGAAA
271 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+  360
    Q  Q  Q  Q  Q  H  Q  G  V  I  T  S  L  Q  M  K  P  S  C  T  S  L  T  D  D  I  E  K  K  K
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
    CAAGCTAAATATGATTCATCATTGGAACAAACCGCTAGAAAATGGGTTTGTGATGTATTGGAGATTCAATTGGAGGATGATAAAACTTTT
361 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+  450
    Q  A  K  Y  D  S  S  L  E  Q  T  A  R  K  W  V  C  D  V  L  E  I  Q  L  E  D  D  K  T  F
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
    TATGAGTTATTTAAAAATGGTGTATTATTATGTAGATTAATTAATAAATTAAGAGGTGGTACAATTAAGAGAATCAATGAAAGTACAATA
451 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+  540
    Y  E  L  F  K  N  G  V  L  L  C  R  L  I  N  K  L  R  G  G  T  I  K  R  I  N  E  S  T  I
```


TCATTTAAACAATTGGAAAATATTGAAAATTATTTAAAAGCTTGTAAAACATTAGGCTTACAAAGTGTAAACCTATTCAATTCAATCGAT
S F K Q L E N I E N Y L K A C K T L G L Q S V N L F N S I D
TTACATGAAAATAAAGATATTTCGTTAGTGATTACAAATATTGTAGTATTAGGTAAACATGCTTCTAAAATTGAAGGTTATAATGGTATA
L H E N K D I S L V I T N I V V L G K H A S K I E G Y N G I
CATTTAGCAGGTGAAAGAAAAATCATTAAAATTACAACAACTCCAGTTTCACCATTATTTGGTGGTAATCATAATAATAATAATAATAAT
H L A G E R K I I K I T T T P V S P L F G G N H N N N N N N
AATAATAATAATAATACAAGTAATGGTGATTTATCACCAGTTTCAATAACGAGTGCAAGTGGTGGTAGTAGTAATTATAATAGTTATAGT
N N N N N T S N G D L S P V S I T S A S G G S S N Y N S Y S
AATAATCCATTAAATAAATCATCAAATGGAAAGAAAGCTAAATGGAGAAAATCAGTTAAAATACCAGCAGTATCATCATTGAATAGTGAT
N N P L N K S S N G K K A K W R K S V K I P A V S S L N S D
ATTAGAACTAAAGAAGCATTTAAATTCTCACCAGAACTTCAAAAAGCAGCACAAGATTGGATTGAAGAGGTGACAAAAGAAAAGTTTAAA
I R T K E A F K F S P E L Q K A A Q D W I E E V T K E K F K
TTACCGTCATTTAGTTCCTCTTTAAAAGATGGTATTCTATTATGTAGAGTTATAAATACCATCATACCAAATACAATACTCTATATAAAC
L P S F S S S L K D G I L L C R V I N T I I P N T I L Y I N
AATGGTAATAGTAGTTTTAAAAAGATGGAAAATATTGGAAATTATTTAAAAGGTTGTTTAGTGGTTGGGTTAAAGAAAACTGATTTATTC
N G N S S F K K M E N I G N Y L K G C L V V G L K K T D L F
GATACACCTGATCTATTTGAAGAGAAGAATATAAATTTCGTAATTTCAAATATACATGTTTTAGGAAACCATGTCAATAAGATGTATTCA
D T P D L F E E K N I N F V I S N I H V L G N H V N K M Y S
CATTTGAAACTACCATTAATAAAGAATATTGGCAATGGTGGCAATGGTGGCAATGGGGGTATCGGTGGTGGTGGTGGTAGTGATGGCTCG
H L K L P L I K N I G N G G N G G N G G I G G G G G S D G S
CCATTGAAAATGTATAGTTCAATTATTCATAGTAAGTTTGGTAATGGTAGTAGTAATACTAGTAGTGGTAATGGTGGTGTAATAATACCG
P L K M Y S S I I H S K F G N G S S N T S S G N G G V I I P
CCAGAAGATATGAAAGATTTAAAAGATTGGATCAATCATCATTTGAGAGCACATCATTCATTACAGATTGGATCTGATATGTCTAATGAC
P E D M K D L K D W I N H H L R A H H S L Q I G S D M S N D
TTGAGAAATGGTGTAACGTTATTGACATTGTTGGAAGAATTAACATTACAAAAAGTCGGAATTTTCGCAAGGGAGCCTGTACTACCATGG
L R N G V T L L T L L E E L T L Q K V G I F A R E P V L P W
CATTTTATGCAAAATATTTGTTTACTTTTAAATTTCCTTAGAGAGAATTCAGTTCACAATGTTTCAGATATCTCACCACATGATCTATTC
H F M Q N I C L L L N F L R E N S V H N V S D I S P H D L F

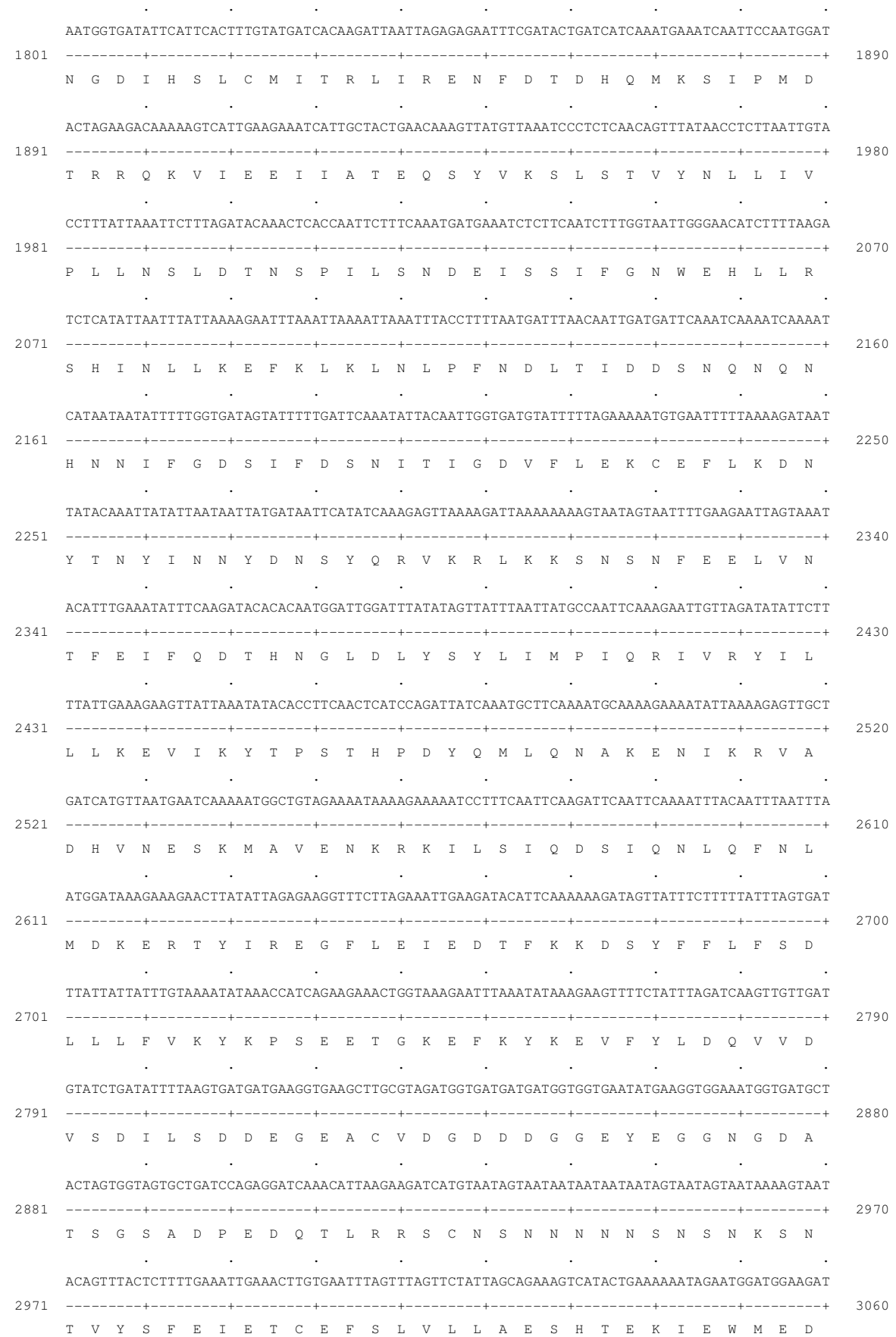

AATGGTGATATTCATTCACTTTGTATGATCACAAGATTAATTAGAGAGAATTTCGATACTGATCATCAAATGAAATCAATTCCAATGGAT
1801 1890
N G D I H S L C M I T R L I R E N F D T D H Q M K S I P M D
ACTAGAAGACAAAAAGTCATTGAAGAAATCATTGCTACTGAACAAAGTTATGTTAAATCCCTCTCAACAGTTTATAACCTCTTAATTGTA
1891 1980
T R R Q K V I E E I I A T E Q S Y V K S L S T V Y N L L I V
CCTTTATTAAATTCTTTAGATACAAACTCACCAATTCTTTCAAATGATGAAATCTCTTCAATCTTTGGTAATTGGGAACATCTTTTAAGA
1981 2070
P L L N S L D T N S P I L S N D E I S S I F G N W E H L L R
TCTCATATTAATTTATTAAAAGAATTTAAATTAAAATTAAATTTACCTTTTAATGATTTAACAATTGATGATTCAAATCAAAATCAAAAT
2071 2160
S H I N L L K E F K L K L N L P F N D L T I D D S N Q N Q N
CATAATAATATTTTTGGTGATAGTATTTTTGATTCAAATATTACAATTGGTGATGTATTTTTAGAAAAATGTGAATTTTTAAAAGATAAT
2161 2250
H N N I F G D S I F D S N I T I G D V F L E K C E F L K D N
TATACAAATTATATTAATAATTATGATAATTCATATCAAAGAGTTAAAAGATTAAAAAAAAGTAATAGTAATTTTGAAGAATTAGTAAAT
2251 2340
Y T N Y I N N Y D N S Y Q R V K R L K K S N S N F E E L V N
ACATTTGAAATATTTCAAGATACACACAATGGATTGGATTTATATAGTTATTTAATTATGCCAATTCAAAGAATTGTTAGATATATTCTT
2341 2430
T F E I F Q D T H N G L D L Y S Y L I M P I Q R I V R Y I L
TTATTGAAAGAAGTTATTAAATATACACCTTCAACTCATCCAGATTATCAAATGCTTCAAAATGCAAAAGAAAATATTAAAAGAGTTGCT
2431 2520
L L K E V I K Y T P S T H P D Y Q M L Q N A K E N I K R V A
GATCATGTTAATGAATCAAAAATGGCTGTAGAAAATAAAAGAAAAATCCTTTCAATTCAAGATTCAATTCAAAATTTACAATTTAATTTA
2521 2610
D H V N E S K M A V E N K R K I L S I Q D S I Q N L Q F N L
ATGGATAAAGAAAGAACTTATATTAGAGAAGGTTTCTTAGAAATTGAAGATACATTCAAAAAAGATAGTTATTTCTTTTTATTTAGTGAT
2611 2700
M D K E R T Y I R E G F L E I E D T F K K D S Y F F L F S D
TTATTATTATTTGTAAAATATAAACCATCAGAAGAAACTGGTAAAGAATTTAAATATAAAGAAGTTTTCTATTTAGATCAAGTTGTTGAT
2701 2790
L L L F V K Y K P S E E T G K E F K Y K E V F Y L D Q V V D
GTATCTGATATTTTAAGTGATGATGAAGGTGAAGCTTGCGTAGATGGTGATGATGATGGTGGTGAATATGAAGGTGGAAATGGTGATGCT
2791 2880
V S D I L S D D E G E A C V D G D D D G G E Y E G G N G D A
ACTAGTGGTAGTGCTGATCCAGAGGATCAAACATTAAGAAGATCATGTAATAGTAATAATAATAATAATAGTAATAGTAATAAAAGTAAT
2881 2970
T S G S A D P E D Q T L R R S C N S N N N N N S N S N K S N
ACAGTTTACTCTTTTGAAATTGAAACTTGTGAATTTAGTTTAGTTCTATTAGCAGAAAGTCATACTGAAAAAATAGAATGGATGGAAGAT
2971 3060
T V Y S F E I E T C E F S L V L L A E S H T E K I E W M E D

Abbildung 4: CDNA Sequenz von Trix mit abgeleiteter Proteinsequenz.
Die vom *D. discoideum*-Genomprojekt veröffentlichte Sequenz von Trix (NCBI Katalogisierung AM181592) umfasst eine kodierende Sequenz von 3597Bp, die sich aus einer genomischen Sequenz von 3782 Bp ableitet, welche zwei Introns von 90 Bp (Bp 2230-2319) und 95 Bp (Bp 2695-2789) enthält. Das Trix-Protein besteht aus 1198 Aminosäuren.

3.1.2 Klonierung des Gens aus Teilkonstrukten

Zunächst war vom *D. discoideum*-Genomprojekt nur eine unvollständige Sequenz veröffentlicht worden (2,7 kB der 5'-Sequenz), die aus genomischer DNA des *D. discoideum*-Stammes AX2 amplifiziert worden war. Dabei erhielt man jedoch nur eine relativ geringe Menge des PCR-Produktes, weshalb eine stufenweise Klonierung des Gens aus Teilstücken erfolgte. Zuerst wurden 1 884 bp der 5'-Sequenz des Gens in den pUC19 Vektor kloniert (Restriktionsschnittstellen Bam HI, Sal I). Im zweiten Schritt wurde ein überlappendes Fragment der 3'-Sequenz der ursprünglich inkompletten Sequenz amplifiziert und an einer endogenen Restriktionsschnittstelle zum ersten Konstrukt ergänzt (endogene Restriktionsschnittstelle Eco RI, Vektorrestriktionsschnittstelle Sal I). Da die genomische Sequenz hier ein Intron beinhaltet, wurde mit RT-PCR ein überlappendes Fragment amplifiziert und über eine weitere endogene Restriktionsschnittstelle dem vorhandenen Konstrukt zugefügt (endogene Restriktionsschnittstelle Bgl I, Vektorrestriktionsschnittstelle Sal I). Dies entsprach der bis dahin bekannten cDNA-Sequenz des Gens. Für die RT-PCR wurde gepoolte Gesamt-

RNA aus den frühen Entwicklungsstadien von *D. discoideum* verwendet (RNA-Isolierung wie in 2.3.10 beschrieben).

Eine Bestätigung der 5'- und 3'-Termini aus der Sequenz des Genomprojektes erfolgte für die 5'-Sequenz durch Sequenzierung eines die 5'-Sequenz des Gens überlappenden Fragmentes, welches als Teil des Knockout-Konstruktes verwendet wurde (siehe 3.3.3). Das 3'-Ende des Gens sollte durch eine PCR unter Verwendung von Poly-A-Primern zur Hybridisierung mit der Polyadenylierungssequenz entsprechender cDNA bestätigt werden, wobei jedoch keine Amplifizierung erreicht wurde. Schließlich wurde vor Abschluss des Genomprojektes eine weitere Sequenz für das Gen veröffentlicht, die eine verlängerte 3'-Sequenz aufwies, welche zuletzt ebenfalls mit RT-PCR amplifiziert, dem Konstrukt zugefügt und sequenziert wurde (endogene Restriktionsschnittstelle Bgl I, Vektorrestriktionsschnittstelle Sal I). Verschiedene Fragmente der kodierenden Sequenz wurden zur Proteinexpression und GFP-Expression in entsprechende Vektoren kloniert (siehe 3.3.2.1, 3.3.3.2 und 3.3.3.3).

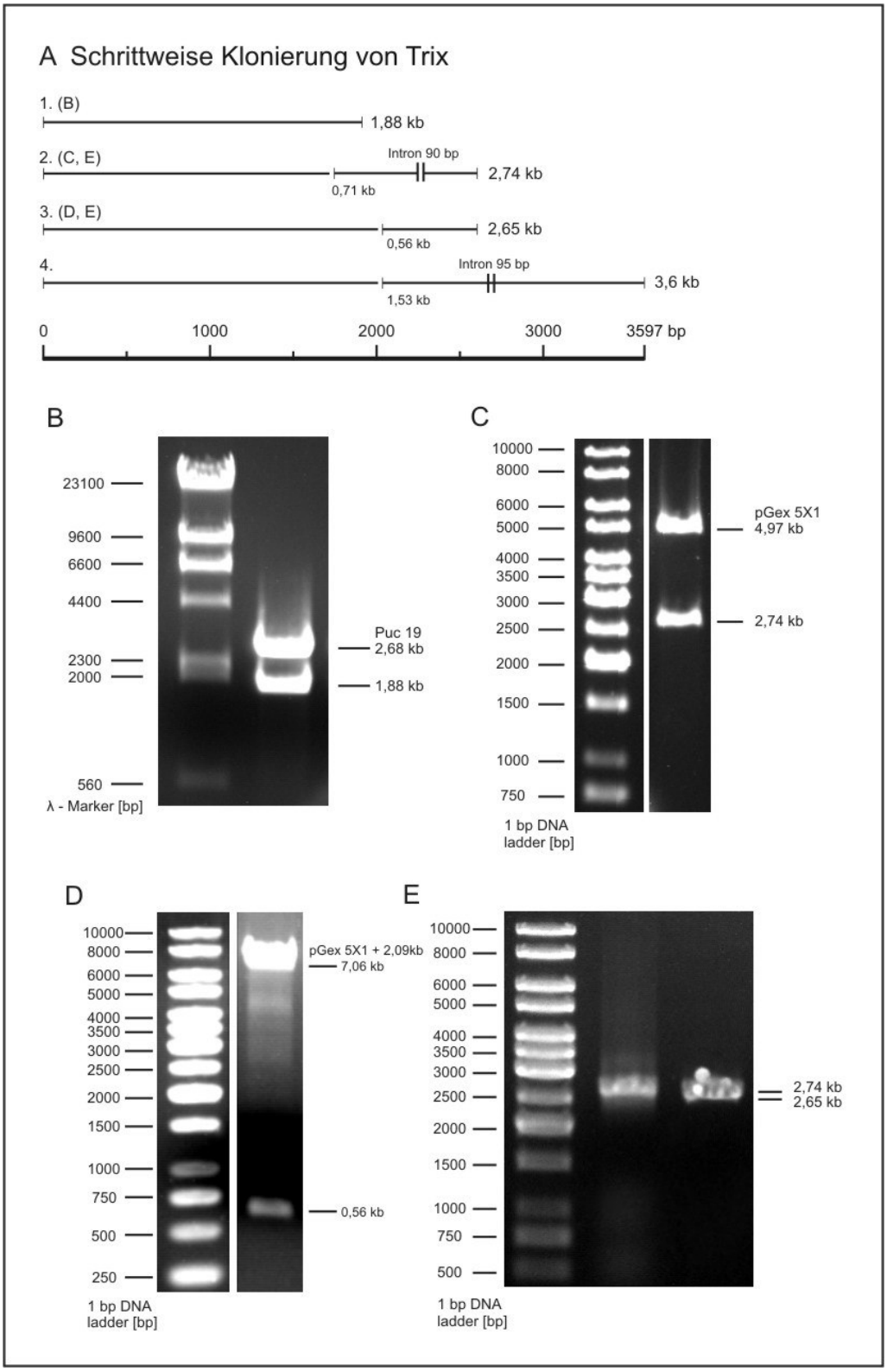


Abbildung 5: Klonierung der kodierenden Sequenz von Trix.
A: Die Klonierung der zunächst nur unvollständig bekannten kodierenden Sequenz erfolgte abschnittsweise, da eine vollständige Amplifizierung der Sequenz aus cDNA nicht zuverlässig gelungen war. **B:** Anfangs wurde ein von genomischer DNA amplifiziertes Fragment von 1,88 kB in Puc19 (2,68 kB) kloniert (Bam H1/Sal 1). **C:** Anschließend wurde ein von genomischer DNA amplifiziertes Fragment der 3'-Sequenz über eine endogene Restriktions-

schnittstelle ergänzt (Eco R1/Sal 1). Dieser sowie die weiteren Klonierungsschritte wurden im pGex 5X1 Vektor (4,97 kB) ausgeführt. **D:** Um das erste Intron der Sequenz zu eliminieren (90 Bp), wurde ein durch RT-PCR amplifiziertes Fragment (560 bp) über eine endogene Restriktionsschnittstelle in das Konstrukt eingeschleust (Bgl II/Sal 1). **E:** Vergleich des kodierenden Fragments (2,65 kB) mit der entsprechenden genomischen Sequenz, die ein Intron von 90 kB trägt (2,74 kB). Nach Veröffentlichung der vollständigen genomischen Sequenz wurde der verbleibende Sequenzabschnitt der 3'-Sequenz über die bereits verwendete endogene Restriktionsschnittstelle ergänzt (Bgl II/Sal 1).

3.1.3 Sequenzanalyse

Die vom Genomprojekt veröffentlichte Sequenz des Gens umfasst 3782 Bp und beinhaltet zwei Introns von 90 Bp (Bp 2230-2319) und 95 Bp (Bp 2695-2789). Aus der kodierenden Sequenz von 3597 Bp leitet sich ein Protein mit 1198 Aminosäuren ab. Das Molekulargewicht beträgt 134,48 kDa, der isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,58. Die Domänenstruktur der Proteinsequenz wurde mit verschiedenen Datenbanken analysiert (siehe 2.1.12). In der Sequenz des Proteins sind vom Aminoterminus (N-Terminus) zum Carboxyterminus (C-Terminus) 3 Calponin-Homologie-Domänen (CH) sowie ein für GEF-Proteine typisches Tandem aus einer Dbl-Homologie-Domäne (**D**iffuses-**B**-Zell-**L**ymphom-Homologie-Domäne) mit einer Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) angeordnet. Die Angabe der Aminosäurepositionen der einzelnen Domänen erfolgte bei den jeweiligen Datenbanken geringfügig unterschiedlich. Die weiteren Sequenzvergleiche erfolgten mit den beim 'Prosite'-Server ermittelten Aminosäurepositionen.

Domänen des Trix-Proteins

	CH #1	**CH #2**	**CH #3**	**DH**	**PH**
Prosite	126 – 231	341 – 445	511 – 618	632 – 846	876 – 1026
PFAM	128 – 227	343 – 441	513 – 614	636 – 845	877 – 1028

Tabelle 1: Lokalisation der Domänen in der abgeleiteten Proteinsequenz von Trix.
Die Lokalisation einzelner Domänen von Trix erfolgte in Abhängigkeit von den jeweils verwendeten Internetressourcen mit geringen Unterschieden der Aminosäurepositionen.

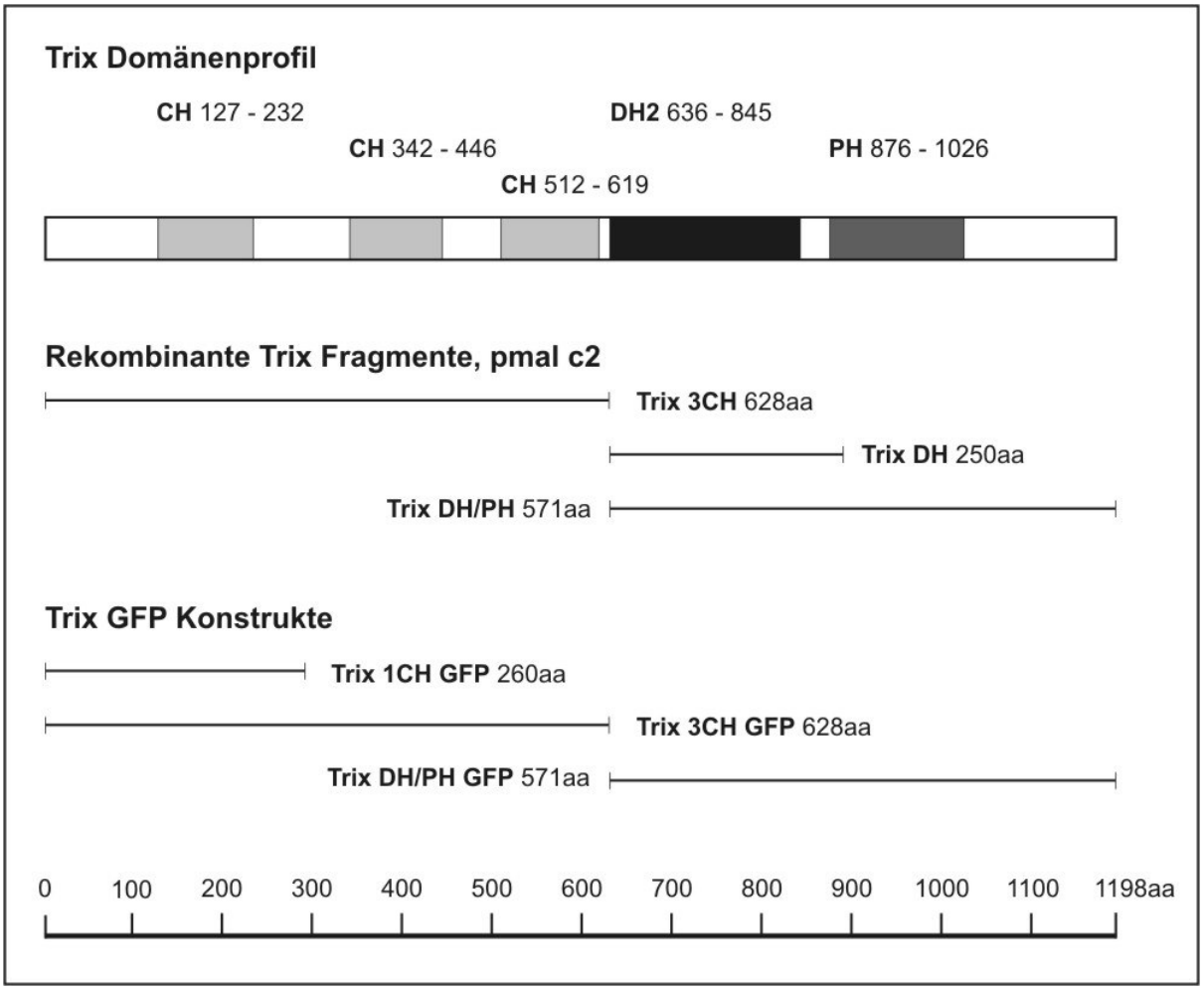


Abbildung 6: Domänenarchitektur von Trix (AM181592).
Das Protein besitzt drei Calponin-Homologie-Domänen, gefolgt von einer Dbl-Homologie/ Pleckstrin-Homologie-Tandemdomäne. Verschiedene Fragmente des Proteins wurden mit dem Maltose-Bindungsprotein fusioniert und in *E. coli* sowie als GFP-Fusionsproteine in *D. discoideum* exprimiert.

3.1.3.1 Klassifizierung der Calponin-Homologie-Domänen

Neben dem für GEF-Proteine typischen Tandem aus einer Dbl-Homologie-Domäne und einer Pleckstrin-Homologie-Domäne zeichnen sich GEF-Proteine typischerweise durch eine Vielzahl weiterer Module und verschiedener Proteindomänen aus, die vielfältige Wechselwirkungen im zellulären Milieu ermöglichen. Eichinger und Mitarbeiter beschreiben die Domänenarchitektur zahlreicher *D. discoideum* Proteine als bislang einzigartig, wobei auch die Domänenarchitektur von Trix im Hinblick auf die Aneinanderreihung von drei Calponin-Homologie-Domänen als neuartig herausgestellt wird (Eichinger *et al.*, 2005). Die Autoren beschreiben zum einen die Kombinationen einer Rho-GEF-Domäne mit einer CH-Domäne,

die nicht den Typ-3-CH-Domänen angehört (s. u.), als auch die Kombination einer Rho-GEF-Domäne mit mehr als einer CH-Domäne als einzigartig.

Die bislang bekannten Rho-GEF-Proteine wurden über den Server der 'EMBL' (Europäische Organisation für Molekularbiologie) recherchiert. Es sind mittlerweile ca. 2 130 eukaryontische Rho-GEF-Proteine gelistet (Suchbegriffe 'RhoGEF' und 'Eukaryota'), die zumeist Vielzellern entstammen (Abgleich mit der Suchkombination 'RhoGEF' und 'Metazoa'). Ca. 100 dieser Proteine besitzen Calponin-Homologie-Domänen. Die einzigen zwei bekannten Rho-GEF-Proteine mit mehr als einer CH-Domäne sind *D. discoideum* Proteine: Trix (CH Typ 3-CH Typ 3-CH Typ 1) sowie das bislang uncharakterisierte Rac-GEF DDB0218148, welches eine CH Typ 1- und eine CH Typ 2-Domäne beinhaltet.

Die Calponin-Homologie-Domäne ist ein Proteinmodul von ca. 100 Aminosäureresten (34 kDa), welches erstmals am N-Terminus des Aktin bindenden Proteins Calponin beschrieben wurde (Korenbaum und Rivero, 2002). Calponin interagiert mit F-Aktin und reguliert zusammen mit Proteinen wie Calmodulin und Caldesmon die Kontraktion glatter Muskelzellen durch eine Calcium anhängige Kontrolle der Aktin-Myosin-ATPase-Aktivität. Calponin und die assoziierten Proteine führen in glatten Muskelzellen somit regulatorische Funktionen aus, die denen des Troponinkomplexes in der quergestreiften Muskulatur sehr ähnlich sind. Die Proteindomänen mit Homologie zu der ursprünglich im Protein Calponin beschriebenen Domäne bilden eine konservierte Gruppe von Proteindomänen, die in vielen Signal- und Zytoskelettproteinen von Einzellern bis hin zu Vertebraten vorkommen. Die grundlegenden Funktionen dieser Domänen bestehen in der Bindung von Aktin sowie in verschiedenen Funktionen beim intrazellulären Signalgeschehen (siehe Abb. 7). Nach Gimona und Mitarbeitern (Gimona *et al.*, 2002) werden die Calponin-Homologie-Domänen (CH) in fünf Gruppen gegliedert. Die drei Calponin-Homologie-Domänen in der Sequenz von Trix wurden anhand eines multiplen Sequenzabgleichs diesen definierten Untergruppen zugeordnet. Mit dem internetbasierten Programm ClustalW2 wurden die Sequenzen im Hinblick auf Identität und phylogenetische Konservierung graphisch dargestellt. Die vom Programm vorgegebenen Standardeinstellungen wurden dabei unverändert übernommen. Die beiden ersten Calponin-Homologie-Domänen in der Sequenz von Trix werden den Typ-3-CH-Domänen zugeordnet, die dritte Domäne dem Typ 1.

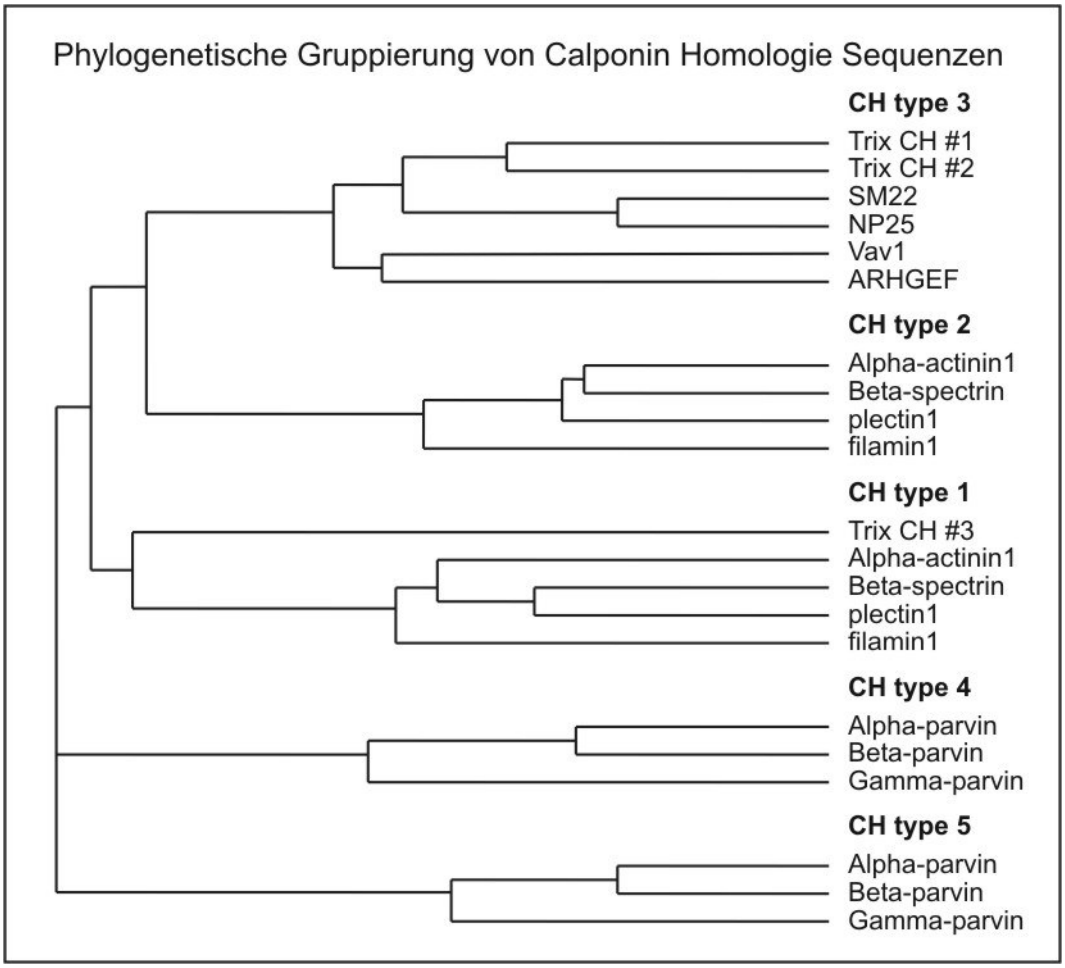


Abbildung 7: Phylogenetische Gruppierung bereits definierter Calponin-Homologie-Sequenzen der Typen 1-5 und der Calponin-Homologie-Sequenzen aus Trix auf der Basis von Sequenzhomologien.

Trix besitzt drei CH-Domänen. Die ersten beiden CH-Domänen werden den Typ-3-CH-Domänen zugeordnet, die dritte Domäne den Typ-1-CH-Domänen. Der mit ClustalW2 dargestellte Grad phylogenetischer Verwandtschaft der verwendeten Calponin-Homologie-Sequenzen korrespondiert mit der bislang beschriebenen Gruppierung der Calponin-Homologie-Domänen (Banuelos *et al.*, 1998; Gimona *et al.*, 2002). Für diese phylogenetische Gruppierung wurden von Gimona und Mitarbeitern zusammengestellte Sequenzen verwendet. Die Calponin-Homologie-Domänen Typ 1 und Typ 2 entstammen jeweils Tandemdomänen von Aktin bindenden Proteinen. Typ-3-Calponin-Homologie-Domänen finden sich zumeist als einzelne Domänen in unterschiedlichen Proteinen von Zytoskelett- bis Signalproteinen. Die Calponin-Homologie-Domänen vom Typ 4 und Typ 5, die ebenfalls Teil von Tandemdomänen sind, wurden erst in wenigen Proteinen beschrieben. Ihre Funktionen sind bislang nicht ausführlich charakterisiert. Die Proteine mit Tandemdomänen werden im Schaubild jeweils bei beiden Untergruppen aufgeführt. Alle Sequenzen entstammen *H. sapiens* Proteinen (siehe jeweilige NCBI Codenummer): α-Actinin1 (P12814) ist Hauptvertreter einer heterogenen Familie Aktin vernetzender und Aktin bündelnder Proteine mit multiplen Aufgaben innerhalb der Zelle. Das Protein bildet ein antiparalleles Dimer mit einem Aktin bindenden Kopf, der am N-Terminus eines jeden Monomers liegt und aus zwei Calponin-Homologie-Domänen besteht. β-Spectrin (XP 039511) besitzt als zentrales Strukturmerkmal ein Bündel aus Trihelizes. Dieses Modul findet sich in vielen stabilisierenden Strukturproteinen

des Zytoskeletts. Mit Spectrin werden nahe der Plasmamembran gelegene dreidimensionale Aktingerüste aufgebaut, wobei Spectrin-Multimere als Knotenpunkte mit kurzen Aktinfilamenten assoziieren und größere hexagonale Strukturen bilden. Plectin1 (Q15149) ist eines der größten bekannten Proteine. Plectin stellt eine Verbindungsstelle zwischen den drei Hauptkomponenten des Zytoskeletts (Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamente) dar und ist Teil von Membrankomplexen, die Zell-Zell-Verbindungen ausbilden. Das Protein besteht aus einem Dimer mit einer zentralen 'coiled-coil' aus α-Helizes sowie großen flankierenden Domänen, welche für die Protein-Interaktionen verantwortlich sind. Die Aktin bindende Region von Plectin basiert auf zwei Aktin bindenden Calponin-Homologie-Domänen. Filamin1 (XP 048404) ist eines der ersten beschriebenen, nicht aus Muskelgewebe isolierten Aktin bindenden Proteine. Es stellt ein Dimer dar und bildet Netzwerke aus orthogonalen Aktin-Strukturen im Bereich des Zellkortex, wobei Filamin mit Integrinen, Transmembranrezeptoren und 'Second messenger'-Stoffen interagiert. SM22 (JS0774) wird fast ausschließlich in glatten Muskelzellen exprimiert und stellt dort eines der häufigsten Proteine dar. SM22 ist ein hoch konserviertes Protein mit einer starken Sequenzhomologie seines C-Terminus zu dem von Calponin. Der genaue Mechanismus der Aktin-Bindung von SM22 sowie die genauen Funktionen des Proteines sind bislang jedoch nicht ausreichend charakterisiert. NP25 (Q9UI15) wird überwiegend in Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert. NP25 kolokalisiert mit Aktin auf Stressfasern und kosedimentiert mit Aktinfilamenten. Die genauen Funktionen des Proteins sind bislang jedoch nicht ausführlich charakterisiert. Vav1 (P005419) besitzt eine einzelne Calponin-Homologie-Domäne die als Aktin bindende Domäne des Proteins diskutiert wird. Vav ist ein GEF-Protein für Rho-GTPasen, ist in die T-Zell- und B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung involviert und besitzt bei Säugetieren Bedeutung als Protoonkogen. Darüber hinaus ist das Protein ein spezifischer Bindungspartner des Nef-Proteins von HIV-1. ARHGEF 6 (BAA04985) ist ebenso ein GEF-Protein für Rho-GTPasen. ARHGEF 6 gilt als membranassoziiertes Protein, das u. a. an Integrin involvierenden Signalwegen beteiligt ist. Mutationen des Proteins wurden beim Krankheitsbild der X-chromosomalen mentalen Retardierung beschrieben. α-Parvin (XP 043987), β-Parvin (XP 043616) und γ-Parvin (XP_043623); Mitglieder der Parvin-Proteinfamilie sind F-Aktin bindende Proteine mit einer Aktin bindenden Region aus zwei Calponin-Homologie-Domänen. Parvine sind mit fokalen Zell-Zell-Kontakten assoziiert, wofür die zweite Calponin-Homologie-Domäne besondere Bedeutung besitzt.

3.1.3.2 Sequenzhomologie und Struktur der Dbl-Homologie-Domäne

Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren sind durch ein typisches Tandem aus einer Dbl-Homologie-Domäne und einer Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) gekennzeichnet. Aus einem humanen Diffusen B-Zell-Lymphom konnte 1985 das Dbl-Onkogen (**D**iffuses **B**-Zell **L**ymphom) als transformierender Faktor isoliert werden. Das Dbl-Protoonkogen agiert als Guaninnukleotid-Austauschfaktor für Cdc42, einem der Hauptvertreter der Rho-GTPasen. Mittlerweile wurde eine große Zahl von Rho-GEF-Proteinen beschrieben, die fast ausnahmslos die für Guaninnukleotid-Austauschfaktoren typische Kombination einer Dbl-Homologie-Domäne mit einer Pleckstrin-Homologie-Domäne besitzen (Hoffmann und Cerione, 2002).

Die Dbl-Homologie-Domäne bildet eine hochkonservierte, strukturell einzigartige Struktur, die keine Sequenzhomologie zu anderen Gruppen von Aktivatoren kleiner GTPasen zeigt

(Zhu *et al.*, 2000). Der Kern dieser Domäne wird von drei Sequenzabschnitten gebildet, die als lange α- Helizes auftreten und eine Anzahl hochkonservierter Reste beinhalten. Diese Sequenzabschnitte wurden als konservierte Regionen ('conserved regions', CR) bezeichnet (Whitehead *et al.*, 1997; Soisson *et al.*, 1998; Schmidt und Hall, 2002). Mit weiteren Helixanteilen wird eine elongierte fünfhelikale Struktur gebildet (Liu *et al.*, 1998). Bei der Bindung einer Rho-GTPase werden verschiedene Konformationsänderungen am GTPase-Molekül bewirkt, die u. a. die Mg^{2+}-Bindungsstelle der GTPase beeinflussen, welche eine Rolle bei der kinetischen Regulation der Nukleotidbindung und -hydrolyse spielt. Durch eine gezielte Mutagenese der konservierten Regionen CR1 und CR3 kann die Guaninnukleotid-Austauschaktivität von GEF-Proteinen beeinträchtigt (Zhang *et al.*, 2000) werden.

Die Pleckstrin-Homologie-Domänen (PH-Domänen) sind insgesamt weniger strukturkonserviert. Sie sind mit der Dbl-Homologie-Domäne über eine mobile Linkerregion verbunden und bilden keine feste globuläre Struktur mit der Dbl-Homologie-Domäne (Aghazadeh *et al.*, 1998). Die Aufgaben der PH-Domänen sind bislang nur unvollständig charakterisiert. Obwohl sie in der festen sequentiellen Kombination mit Dbl-Homologie-Domänen in den Guaninnukleotid-Austauschfaktoren auftreten, sind die PH-Domänen nicht für die Guaninnukleotid-Austauschaktivität notwendig. Es wurde jedoch gezeigt, dass die transformierende Aktivität vieler onkogener Dbl-Proteine auch von den PH-Domänen abhängt. Die PH-Domänen spielen weiterhin eine wichtige Rolle bei der Regulation der Guaninnukleotid-Austauschaktivität, wobei zum einen Mechanismen der intramolekularen Inhibition, zum anderen eine Stimulation der Guaninnukleotid-Austauschaktivität durch die Bindung von Phosphoinositiden diskutiert werden. Durch die Bindung von Phosphoinositiden wird auch die subzelluläre Lokalisierung der GEF-Proteine in membranständigen Positionen ermöglicht.

Ein Vergleich der Dbl-Homologie-Sequenz von Trix mit Sequenzen charakterisierter Rho-GEF-Proteine (nach Soisson *et al.*, 1998) belegt die Konservierung mehrerer Teile der Domäne. Es werden insbesondere die drei als 'conserved regions' beschriebenen Abschnitte deutlich. Hier zeigen sich auch in der Trix-Sequenz Häufungen konservierter Aminosäurereste (siehe Abb. 8). Für mehrere Abschnitte der Trix-Sequenz sind nach Berechnung der Sekundärstruktur α-Helizes wahrscheinlich. Diese treten auch in den Bereichen der 'conserved regions' auf. Eine Berechnung der Tertiärstruktur für die Trix-Dbl-Homologie-Domäne erfolgte mit dem Programm CPHmodels 2.0 anhand der 'Template'-Datei mit den Strukturinformationen zur Guaninnukleotid-Austauschregion des *H. sapiens* Rho-GEF-Proteins Intersectin (25,1 % Sequenzidentität). Die errechnete Tertiärstruktur besteht aus einer fünfhe-

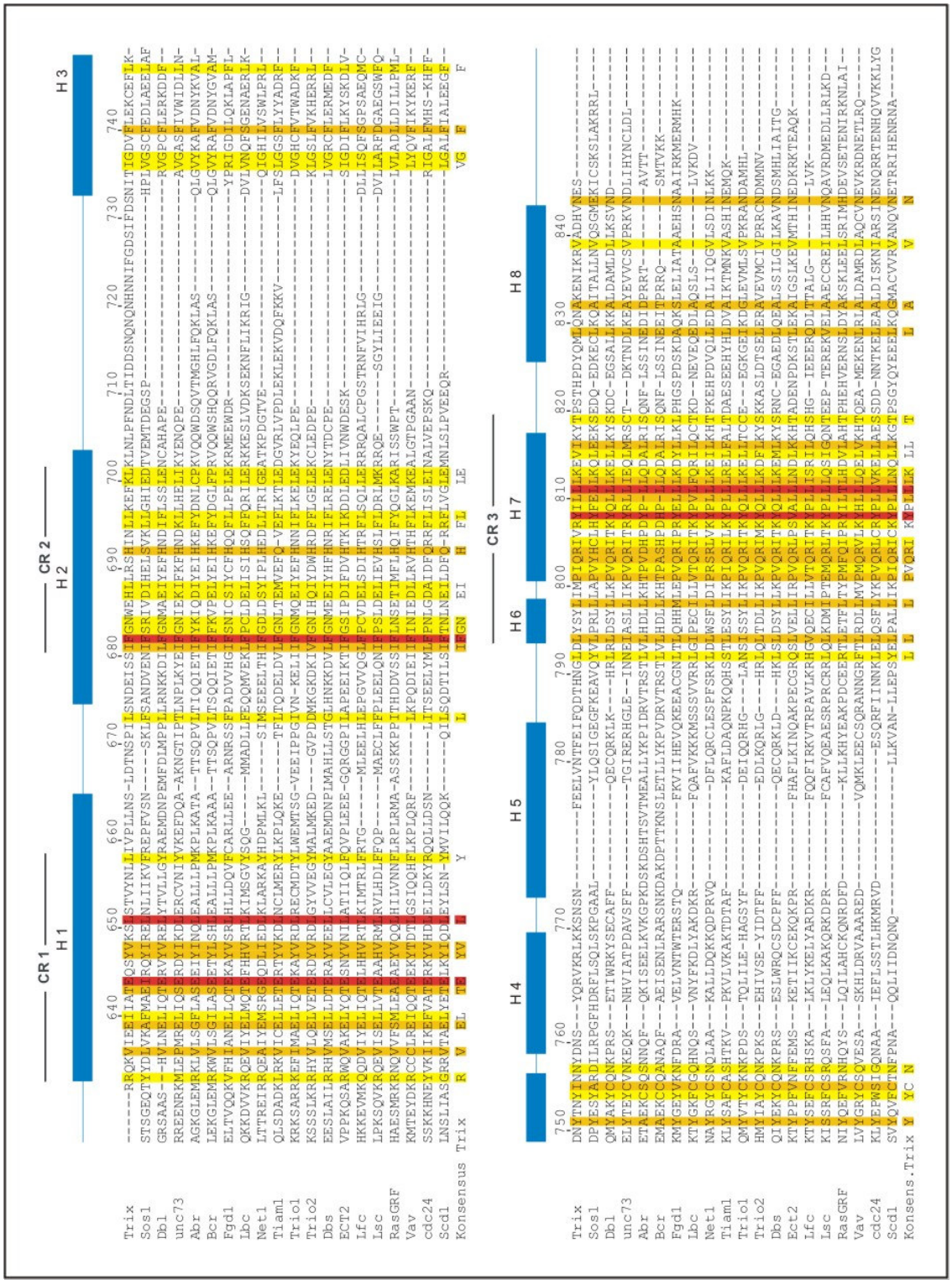


Abbildung 8: Sequenzalignment der Trix Dbl-Homologie-Domäne und homologer Sequenzen.

Das Sequenzalignment wurde nach Soisson und Mitarbeitern erstellt (Soisson *et al.*, 1998) wie im Methodenteil beschrieben (siehe 2.1.13). Die prozentuale Verteilung der häufigsten Aminosäure ist für jede Position ab 45 % markiert (45-60 % gelb, 65-80 % orange, 85-100 % rot) und die Konsensuspositionen für Trix sind hervorgehoben. Die Nummerierung der Aminosäurepositionen bezieht sich auf die Sequenz von Trix. Der

Vergleich zu den überwiegend humanen GEF-Proteinen zeigt die deutliche Sequenzhomologie von Trix. Entsprechend bereits veröffentlichter Dbl-Strukturen kommen in drei Bereichen gehäuft konservierte Aminosäurereste vor. Diese Bereiche wurden als konservierte Regionen CR1-3 ('conserved regions') beschrieben. Im Diagramm sind diese Bereiche als CR1 bis CR3 markiert. Berechnete Sekundärstrukturmerkmale der Trix-Sequenz sind mit Balken für Helizes und Linien für 'coil'-Regionen verdeutlicht.

likalen Struktur, die homolog zu bisher beschriebenen Rho-GEF-Dbl-Strukturen ist (siehe Abb. 9). Im Oberflächenmodell wird weiterhin eine Anzahl konservierter Aminosäuren aus den 'conserved regions' CR1 und CR3 deutlich, die einen Teil der Moleküloberfläche bilden (an der dargestellten Vorderseite des Moleküls, siehe Abb. 9). Bei Dbl-Homologie-Domänen mit bereits definierten Strukturen konnte insbesondere für konservierte Aminosäuren der CR1 und CR3 eine Beteiligung bei der Ausbildung einer Kontaktstelle zu den entsprechenden Rho-GTPasen gezeigt werden (Aghazadeh *et al.*, 1998). Somit bestehen Hinweise für eine Austauschaktivität der Trix-Dbl-Homologie-Domäne, die sich aus einer möglicherweise bereits bei *D. discoideum* konservierten Struktur für die Dbl-Homologie-Domäne ableiten lassen.

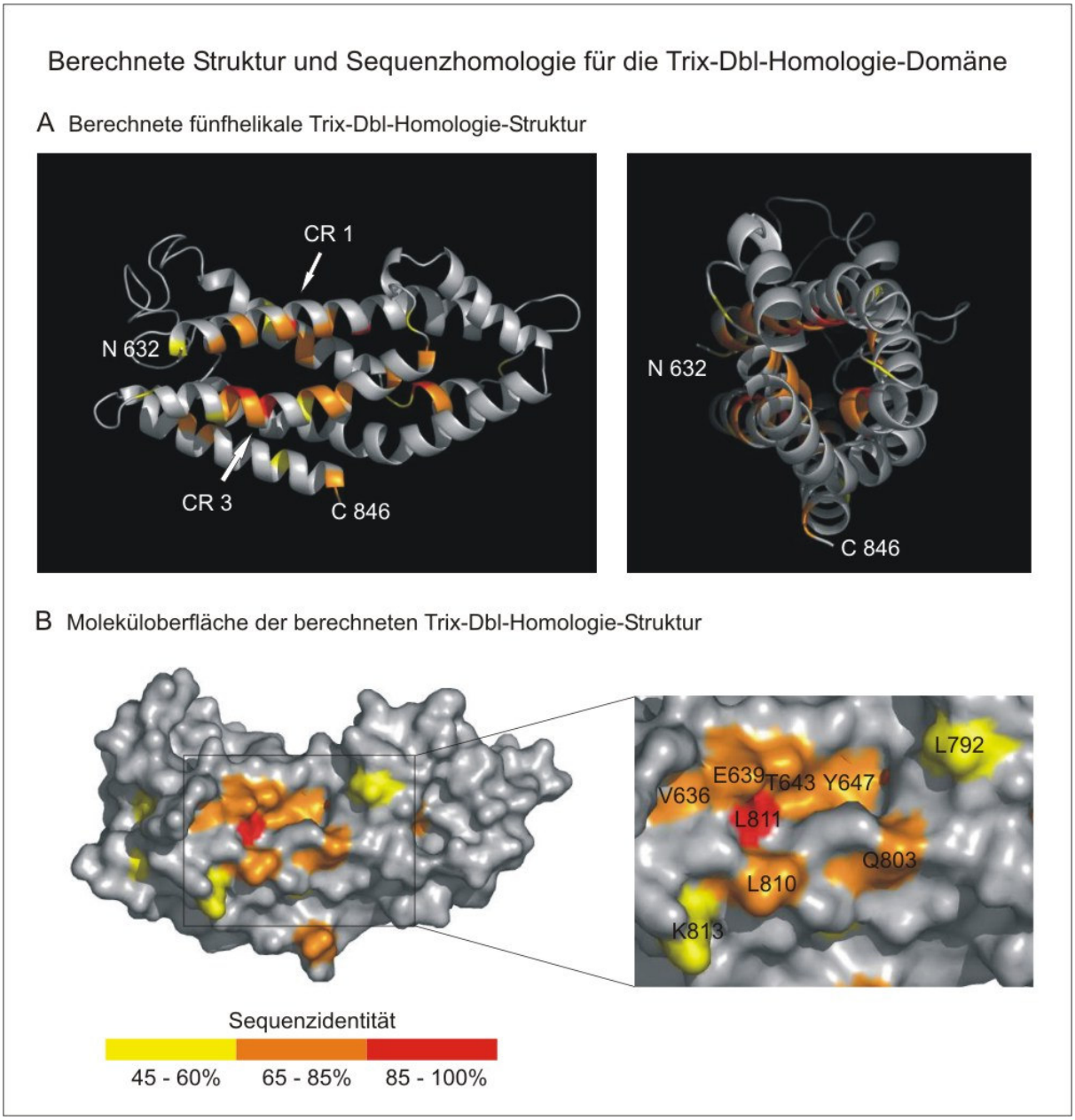


Abbildung 9: Errechnete Tertiärstruktur für die Dbl-Homologie-Domäne von Trix als Schleifenmodell und Oberflächenmodell.
Zur Berechnung und grafischen Darstellung der Modelle siehe 2.1.13. **A:** Die Helixanteile in der berechneten Tertiärstruktur sind nicht völlig mit den Helixanteilen aus der gesonderten Berechnung der Sekundärstruktur deckungsgleich (siehe Abb. 8). Somit wurde auf eine durchgehende farbliche Markierung der einzelnen Helizes verzichtet. Es sind jedoch die konservierten Reste entsprechend Abb. 8 farblich markiert. Für die Trix-Dbl-Homologie-Domäne wird eine fünfhelikale Struktur abgebildet, die homolog zu bisher beschriebenen Dbl-Strukturen ist. **B:** Die einzige markante Häufung von Oberflächen bildenden konservierten Aminosäuren findet sich an der dargestellten Vorderseite des errechneten Moleküls. Diese Aminosäuren befinden sich in den konservierten Regionen CR1 und CR3 der Trix-Sequenz.

3.2 Biochemische Charakterisierung von Trix

3.2.1 Expression rekombinanter Trix-Fragmente

Die Expression von Trix-Fragmenten als 'GST-Tag-Fusion'-Proteine erzielte nur geringe Mengen rekombinanter Proteine. Eine Expression von 'Maltose-Binding-Protein'-Fusionsproteinen (MBP-Fusinsproteinen) über eine Amylose-Säule lieferte jedoch eine gute Ausbeute rekombinanter Proteine. Ein Fragment des N-Terminus mit den drei Calponin-Homologie-Domänen diente zur Bestimmung der Aktin-Bindefähigkeit. Mit Fragmenten des C-Terminus, mit der isolierten Dbl-Homologie-Domäne sowie mit der vollständigen Dbl-Homologie/PH-Homologie-Tandemdomäne, wurde die Guaninnukleotid-Austauschaktivität untersucht. Rekombinante Fragmente wurden auch zur Gewinnung polyklonaler Antikörper verwendet.

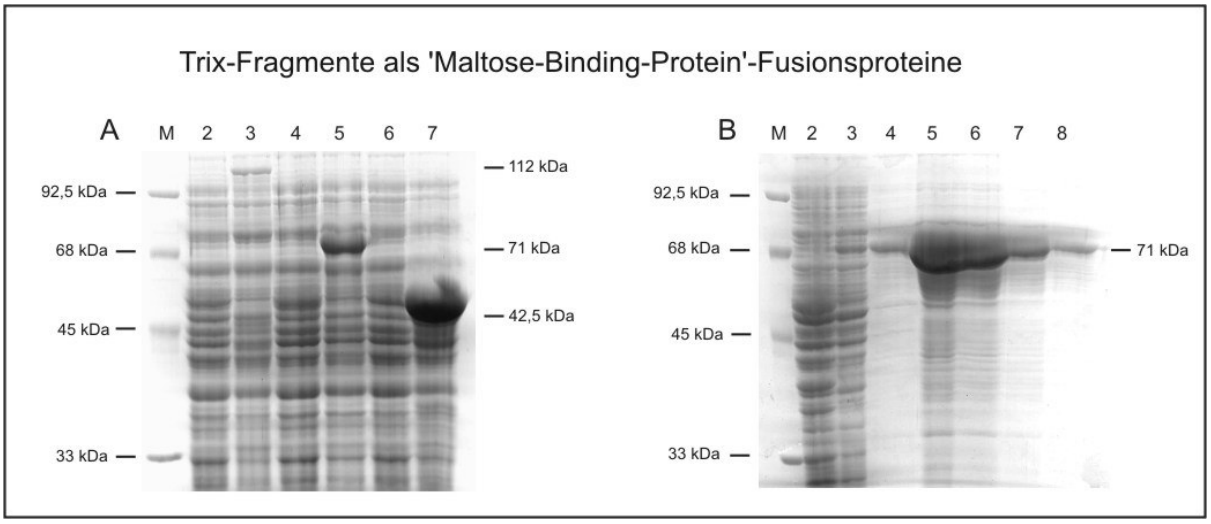


Abbildung 10: Expression und Aufreinigung von Trix-Fragmenten als MBP-Fusionsproteine.
A: *E. coli*-Zelllysate nach Expression verschiedener Fragmente des Trix-Proteins als rekombinante MBP-Fusionsproteine. M: Markerbanden. Spuren 2, 4, 6: *E. coli*-Zelllysate ohne Expression rekombinanter Proteine als Negativkontrollen. Spur 3: Fragment der drei Calponin-Homologie-Domänen von Trix (112 kDa). Spur 5: Fragment der Dbl-Homologie-Domäne (71 kDa). Spur 7: MBP (42,5 kDa). MBP liegt oberhalb der Markerbande von 45 kDa, was durch eine Beeinflussung der elektrophoretischen Eigenschaften des Gels durch die relativ große Proteinmenge bedingt ist. **B:** Aufreinigung der MBP gekoppelten Dbl-Homologie-Domäne des Trix-Proteins (71 kDa) über eine Amylose-Säule. M: Markerbanden. Spur 2: *E. coli*-Zelllysat ohne Expression des rekombinanten Proteins als Negativkontrolle. Spur 3: *E. coli*-Zelllysat nach Expression des rekombinanten 71 kDa Proteins. Spuren 4-8: angereicherte Fraktionen des rekombinanten Proteins nach Aufreinigung über die Amylose-Säule. Degradationsprodukte des Fusionsproteins liegen unterhalb der 71 kDa-Bande.

3.2.2 Aktin-Bindung durch die Trix Calponin-Homologie-Domänen

Das MBP-Fusionsprotein des N-Terminus von Trix mit den drei CH-Domänen des Proteins wurde in Sedimentationsexperimenten auf die Fähigkeit untersucht, Aktin zu binden und zu bündeln. Aktinfilamente werden bei 100 000 bis 150 000 x g sedimentiert, wobei auch assoziierte Proteine kosedimentieren und durch SDS-PAGE nachgewiesen werden können. Falls Filament-Bündel gebildet werden, reichen niedrigere Beschleunigungen von 10 000 bis 15 000 x g für eine Sedimentation.

Für das rekombinante Trix-Fragment mit den drei CH-Domänen konnte eine Aktin bindende und eine Aktin bündelnde Funktion nachgewiesen werden. Nach einer Inkubation mit Aktinfilamenten in Aktin-Polymerisationspuffer sedimentierte das rekombinante Fragment bei hoher Geschwindigkeit zusammen mit den Aktinfilamenten, womit die Aktin bindende Funktion nachgewiesen wurde. Nach einer Zentrifugation mit niedrigerer Umdrehungszahl war sowohl ein signifikanter Anteil der Aktinfilamente als auch des Fusionsproteins im Pellet nachweisbar, wodurch auch die Fähigkeit zur Bündelung von Aktinfilamenten demonstriert wurde. Degradationsprodukte des MBP-Fusionsproteins verblieben nach der Zentrifugation im Überstand, entsprechend der zahlreichen Banden unterhalb der 71 kDa-Bande des MBP-Fusionsproteins. Somit wurde eine Spezifität der Bindung des rekombinanten Trix-Fragments belegt. Das verwendete MBP bindet selbst nicht an Aktin (Menkel *et al.*, 1994).

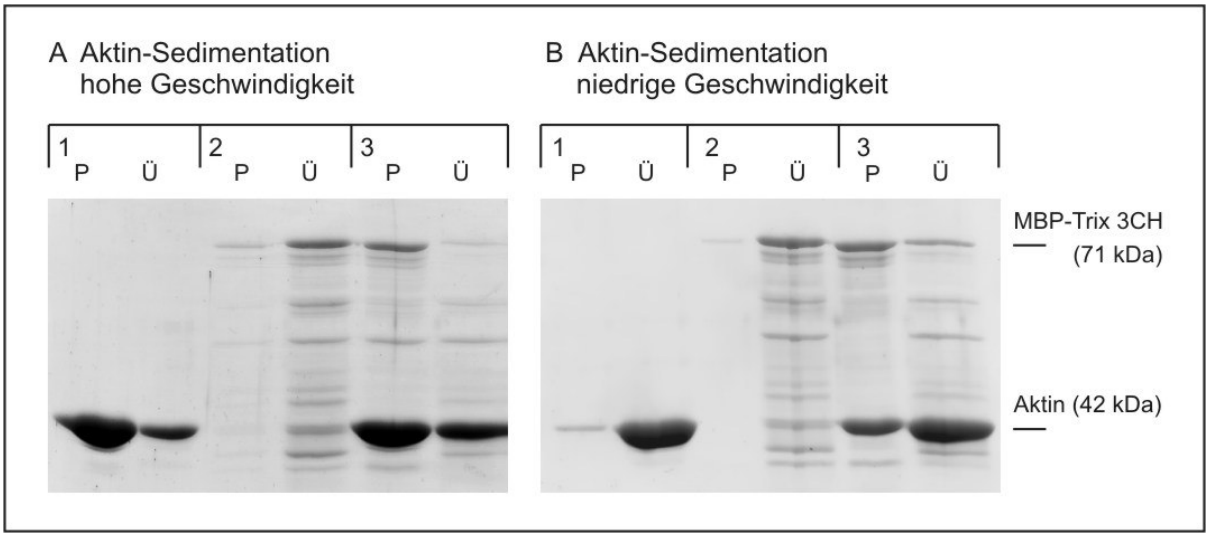


Abbildung 11: Die drei CH-Domänen von Trix binden und bündeln Aktinfilamente.
A: Pellet (P) und Überstand (Ü) nach Zentrifugation mit 100 000 x g. (1) Aktin ohne MPB-Fusionsprotein. Aktin wechselt nach der Zentrifugation mit hoher Geschwindigkeit zum großen Teil in das Pellet. (2) MPB-Fusionsprotein ohne Aktin. Das rekombinante Trix-Fragment verbleibt nach der Zentrifugation im Überstand. (3) Aktin und MPB-Fusionsprotein

nach Inkubation. Durch eine Bindung an Aktin ist das rekombinante Trix-Fragment nach der Zentrifugation nicht weiter im Überstand nachweisbar und wechselt fast vollständig in das Pellet. Dies belegt die Aktin bindende Aktivität des Trix-Fragments. **B:** Pellet (P) und Überstand (Ü) nach Zentrifugation mit 15 000 x g. (1) Aktin ohne MPB-Fusionsprotein. Durch die Zentrifugation mit niedriger Geschwindigkeit verbleibt das gesamte Aktin im Überstand. (2) Das MPB-Fusionsprotein ohne Aktin verbleibt weiter im Überstand. (3) Aktin und MPB-Fusionsprotein nach Inkubation. Es wird ein signifikanter Anteil des Aktin im Pellet nachweisbar. Bei der niedrigeren Beschleunigung von 15 000 x g sedimentieren vorrangig nur größere Bündel von F-Aktin, was eine Aktin bündelnde Aktivität des Trix-Fragments zeigt.

3.2.3 Wechselwirkung der Dbl-Homologie-Domäne mit Rac-GTPasen

Die GTP-Austauschaktivität der rekombinant exprimierten Dbl-Homologie-Domäne von Trix wurde fluoreszenzspektroskopisch gemessen, um potentielle Rac-Wirkungspartner zu identifizieren. Beim GDP-GTP-Zyklus der kleinen GTPasen wird gebundenes GDP unter Mitwirkung eines aktiven Guaninnukleotid-Austauschfaktors gegen GTP ausgetauscht. Im Versuch wurde anstatt des GTP ein Überschuss an 2'(3')-O-(N-Methylanthraniloyl)-(MANT) substituiertem Guanosindiphosphat (MANT-GDP) vorgelegt. Dieses wurde mit einer gewissen Spontanrate ausgetauscht (langsamer Kurvenanstieg), wobei ein steilerer Kurvenanstieg bei Vorliegen eines aktiven Guaninnukleotid-Austauschfaktors durch einen rascheren GDP/MANT-GDP-Austausch erwartet wurde.

Die Messungen zeigten nur eine durch Tiam1 beschleunigte MANT-GDP-Bindung bei Rac1A (Positivkontrolle), jedoch keine nachweisbare Beschleunigung der MANT-GDP-Bindung bei Rac 1A, RacC oder RacE durch Trix-Fragmente (sowohl der isolierten rekombinant exprimierten Dbl-Homologie-Domäne, als auch einer Kombination der Dbl-Homologie-Domäne mit der Pleckstrin-Homologie-Domäne).

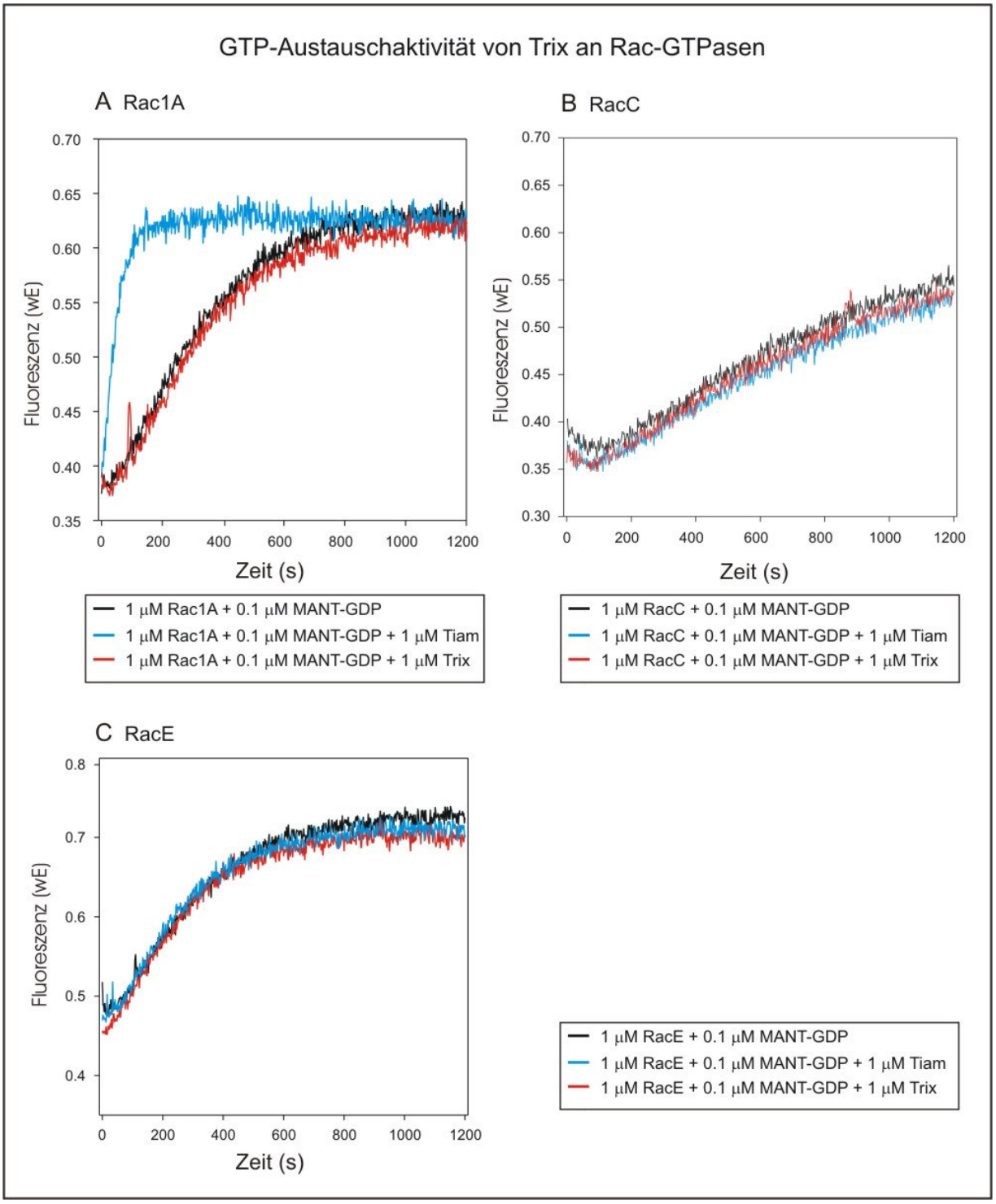


Abbildung 12: Fluoreszenzspektroskopische Messung der GDP/MANT-GDP-Austauschaktivität.
A-C: Dargestellt sind jeweils der spontane Bindungsverlauf von MANT-GDP (schwarz), die GTP-Bindung nach Zugabe der rekombinant exprimierten Dbl-Homologie-Domäne von Trix (rot) und der Reaktionsverlauf mit TIAM 1 (blau), einem humanen Guaninnukleotid-Austauschfaktor mit breitem GTPase-Wirkungsspektrum, welcher als Positivkontrolle verwendet wurde. Die drei GTPasen Rac 1A, RacC und RacE binden jeweils spontan MANT-GDP und die Fluoreszenz erreicht für alle GTPasen einen Plateauzustand. Dies belegt die

grundsätzliche Aktivität der GTPasen. **A:** Tiam1 verursacht eine raschere MANT-GDP Bindung bei Rac1A und damit einen steilen Anstieg der Fluoreszenz, so dass hier der Plateauzustand bereits nach weniger als 200 s erreicht wird. **B** und **C:** Tiam1 zeigt keine Wirkung auf RacC und RacE. **A-C:** Die verwendeten Trix-Fragmente bewirken keine Beschleunigung der MANT-GDP-Bindung bei Rac 1A, RacC oder RacE.

3.3 Zellbiologische Charakterisierung von Trix

3.3.1 Expression von Trix während des Entwicklungszyklus

Die Expression von Trix während des Entwicklungszyklus von *D. discoideum* wurde im Westernblot unter Verwendung polyklonaler Antikörper gegen das Dbl-Homologie-Fragment (siehe 3.2.1 und 1.4.8) durchgeführt. Das Protein Trix wird hauptsächlich während der frühen Entwicklungsstadien von der vegetativen Wachstumsphase bis zum frühen Aggregationsstadium (6-12 Stunden) exprimiert. Bei t = 15 Stunden sinkt der Expressionslevel deutlich. Das Protein ist jedoch bis zum Ende des Entwicklungszyklus nachweisbar, wobei im Westernblot eine 134,5 kDa Bande auch bei t = 24 Stunden sichtbar bleibt. In der Negativkontrolle (Trix$^-$-Mutanten bei t = 0 Stunden) ist Trix erwartungsgemäß nicht vorhanden und eine zweite Bande mit einem etwas tiefer laufenden Protein erweist sich als unspezifische Kreuzreaktion.

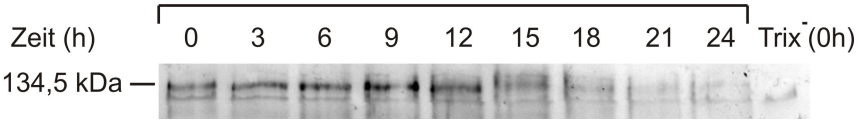


Abbildung 13: Westernblotanalyse der Expression von Trix während des *D. discoideum* Entwicklungszyklus.
AX2-Wildtypzellen wurden durch Umsetzen in Phosphatpuffer entwickelt, die Zelllysate nach den angegebenen Zeiten durch SDS-PAGE aufgetrennt (2 x 10^5 Zellen pro Spur), auf Nitrozellulose übertragen und mit einem polyklonalen Anti-Trix-Antikörper analysiert. Das Trix-Protein wird überwiegend während der frühen Entwicklungsstadien exprimiert, bleibt jedoch bis zum Ende des Entwicklungszyklus nachweisbar. In der Negativkontrolle (Trix$^-$-Mutanten bei t = 0 Stunden) ist Trix nicht vorhanden.

3.3.2 Subzelluläre Lokalisierung von Trix

3.3.2.1 Die erste CH-Domäne als GFP-Fusionsprotein

Die Lokalisierung von Trix wurde durch In-vivo-Expression verschiedener GFP gekoppelter Trix-Fragmente untersucht (siehe Abb. 14-16). In AX2-Wildtypzellen zeigte die erste CH-Domäne eine Anreicherung an der Zellmembran und im Bereich des Zellkortex. Da nur eine schwache Expression des Fusionsproteins erreicht wurde, erfolgte die Aufnahme an fixierten Zellen, wobei das GFP-Signal durch eine Anfärbung mit Anti-GFP-Antikörpern verstärkt

wurde. Es wurden zahlreiche intrazelluläre Vesikelstrukturen mit angefärbt, was bis zur detaillierten Klärung als Artefakt angesehen werden muss.

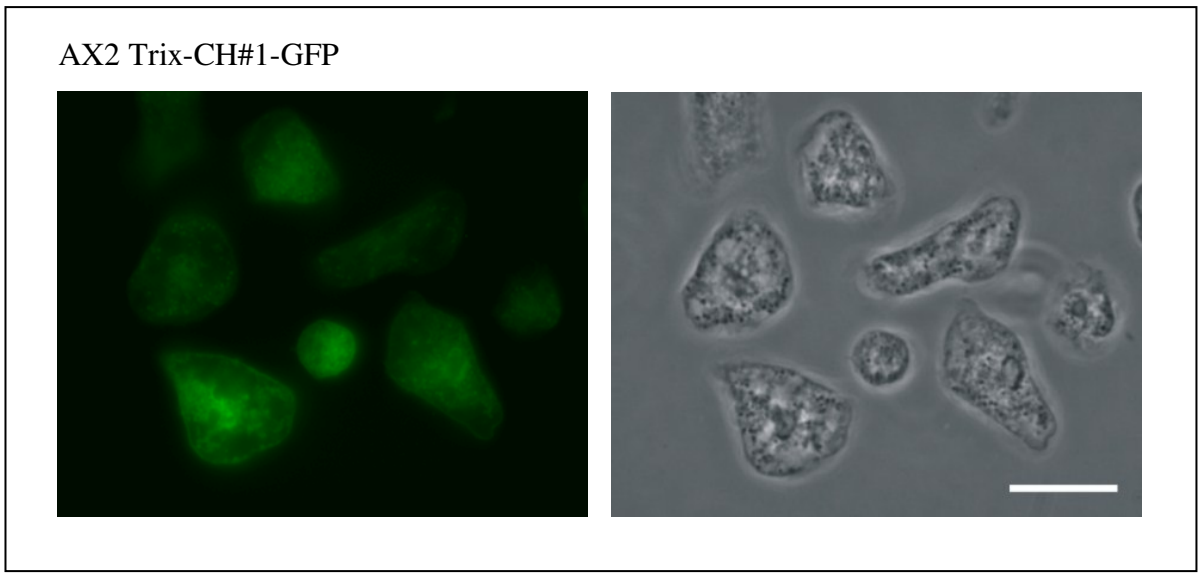


Abbildung 14: Expression der ersten CH-Domäne als GFP-Fusionsprotein in AX2-Wildtypzellen.
Auf Grund eines schwachen GFP-Signals wurden die Zellen methanolfixiert und unter Verwendung von Anti-GFP-Antikörpern mit indirekter Immunfluoreszenz nachgefärbt. Es zeigen sich eine leichte Färbung im Bereich der Zellmembran sowie fixationsbedingt zahlreiche vesikuläre Strukturen des Zytoplasma (Balken entspricht 7,5 µm).

3.3.2.2 Das vollständige Trix-Protein als GFP-Fusionsprotein

Neben der ersten CH-Domäne wurde auch ein Fragment mit allen drei CH-Domänen (Daten nicht gezeigt) sowie das gesamte Protein als GFP-Fusionsprotein verwendet. Dabei zeigten sich für die verschiedenen Trix-Fragmente jeweils ähnliche Resultate bei der subzellulären Lokalisation. Die exprimierten Fragmente und das exprimierte vollständige Protein reicherten sich im Berich der ganzen Zelle an der Plasmamembran und dicht unterhalb der Plasmamembran an. Während die erste CH-Domäne eine sehr schwache Aufhellung bewirkte, zeigte sich bei dem Fragment mit den drei CH-Domänen sowie beim vollständigen Protein jedoch eine intensivere Färbung, besonders in membrannahen Zonen. Es fällt auf, dass eine sich frisch entwickelnde Ausstülpung, evtl. der Vorläufer eines neuen Pseudopodiums, nicht angefärbt ist.

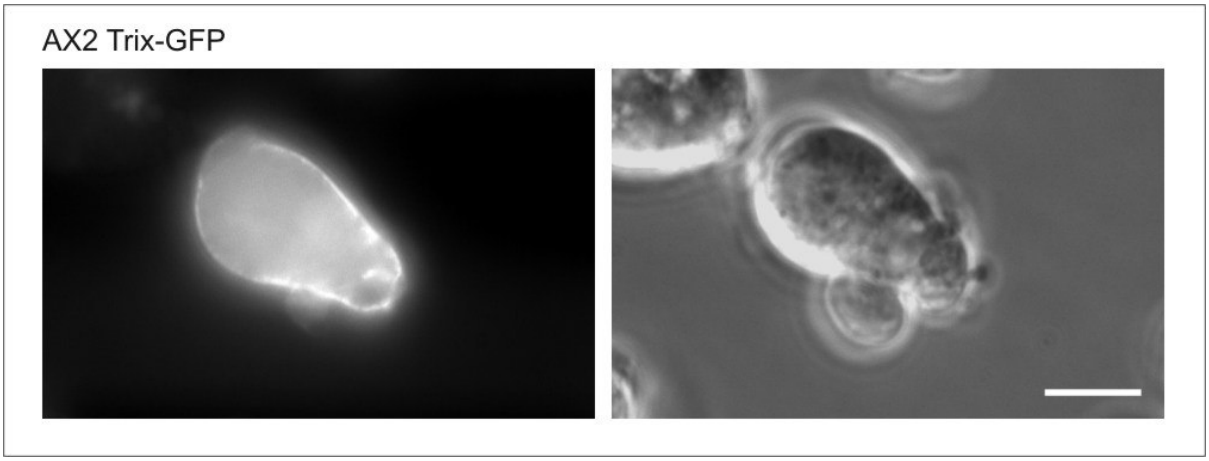


Abbildung 15: Das vollständige Trix-Protein als GFP-Fusionsprotein in lebenden AX2-Wildtypzellen.
Es zeigte sich ähnlich wie bei der Darstellung anderer GFP gekoppelter Trix-Fragmente eine Belegung der Membran sowie membranassoziierter Strukturen (Balken entspricht 5 µm).

3.3.2.3 Lokalisation von Trix während der Phagozytose

Die Untersuchung der Lokalisierung des Trix-Proteins während des endovesikulären Zyklus wurde an AX2-Zellen untersucht, die ein GFP gekoppeltes Fragment der drei CH-Domänen in Trix exprimierten. Dieses Konstrukt, ohne die GEF-Tandemdomäne, wurde gewählt, um eine Beeinflussung des endovesikulären Zyklus durch eine Überexpression der funktionellen GEF-Domäne zu vermeiden. Den AX2-Zellen wurden zur Phagozytose TRITC-markierte Hefezellen gefüttert. Dabei zeigte sich keine Anreicherung des GFP-Proteins während der Ausbildung einer phagozytischen Tasche in der frühen Phase der Phagozytose. Im späten endovesikulären Zyklus, der mit einer Exozytose abschließt, zeigte sich jedoch eine zunehmende Anfärbung des Endovesikels.

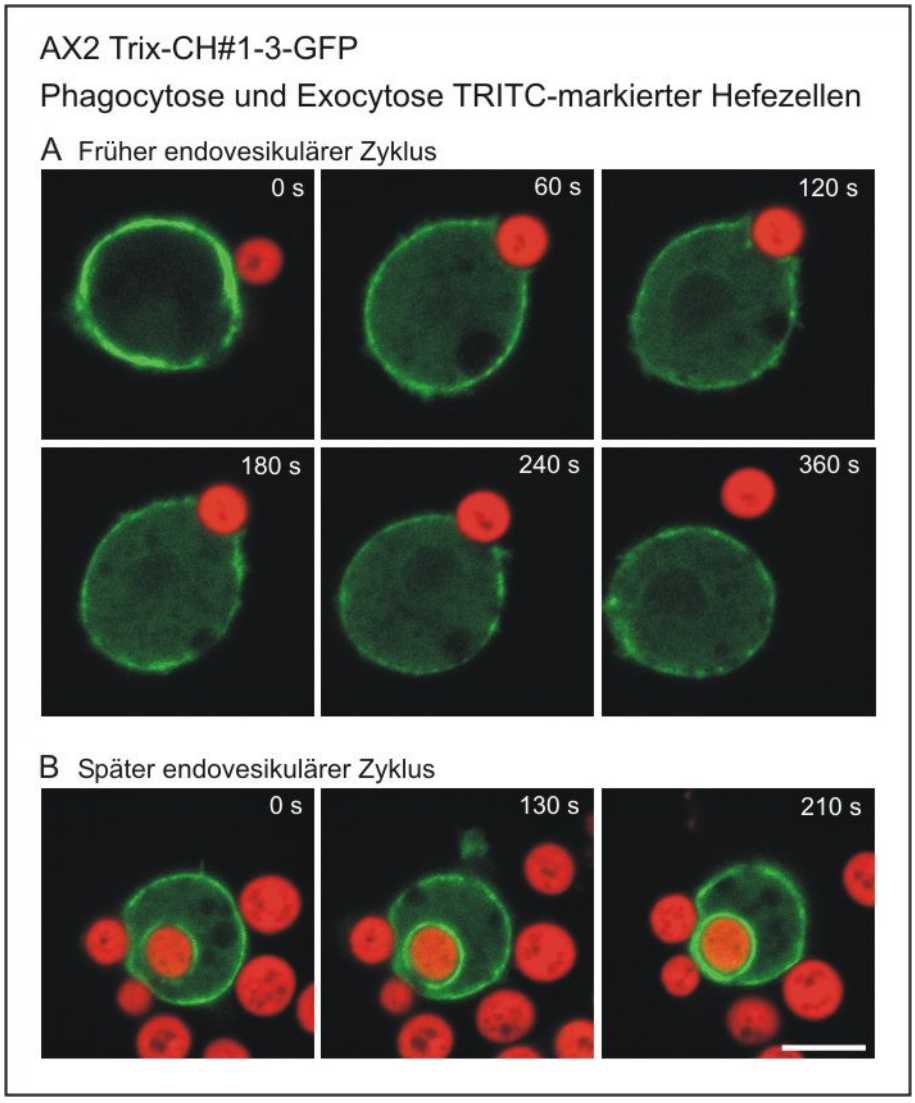


Abbildung 16: Lokalisation der drei CH-Domänen von Trix während der Phagozytose als GFP-Fusionsprotein in AX2-Zellen.
A: Bei der frühen Phagozytose zeigte sich eine gleichmäßige Anreicherung des GFP-Trix-CH#1-3-Fusionsproteins an der Zellmembran, jedoch keine verstärkte Anreicherung an der entstehenden phagozytischen Tasche oder an membranassoziierten Strukturen. **B:** Während des späten endovesikulären Zyklus zeigte sich eine zunehmende Anreicherung des GFP-Trix-CH#1-3-Fusionsproteins der Membran des Endovesikels (Balken entspricht 5 µm).

3.3.3 Knockout des Trix-Gens

Das Trix-Gen wurde mit Hilfe des Floxed-Bsr-Vektors (Faix *et al.*, 2004) zerstört. Im Knockout-Konstrukt war eine Bsr-Resistenzkassette (Blasticidin-S-Resistenz) beiderseits von Abschnitten genomischer Sequenz des Trix-Gens flankiert. Nach Transfektion von AX2-Zellen wurde durch homologe Rekombination des Vektorkonstrukts mit dem Genom eine Disruption des Gens erreicht (siehe Abb. 17 A). Trix$^-$-Mutanten wurden mit 0,01 mg/ml Blasticidin S selektiert und durch Routinemethoden kloniert (siehe 1.7.3). Zur Identifizierung

von Trix$^-$-Mutanten wurde ein PCR-Ansatz verwendet, wobei genomische DNA mutmaßlicher Trix$^-$-Mutantenklone (siehe 1.3.9.2) mit je zwei Primerpaaren analysiert wurde (siehe Abb. 17 A und B). Mit Primern 2 und 3 war nur bei rekombinanter DNA eine Amplifikation möglich, da die komplementäre Bindungsstelle von Primer 2 in der BSR-Kassette liegt. Primer 1 und 3 tragen genomische Sequenzen, welche bei der mutierten DNA das eingeschleuste BSR-Gen (1,2 kB) flankieren. Somit zeigte sich bei der mutierten DNA ein im Vergleich zur AX2-Wildtyp-DNA um 1,2 kB größeres PCR-Produkt. Die ausbleibende Trix-Expression wurde mit polyklonalen Anti-Trix-Antikörpern im Westernblot bestätigt (siehe Abb. 17 C). Zur weiteren Dokumentation erfolgte eine Southern-Blot-Analyse an EcoRI-verdauter DNA mit einem ^{32}P-markierten Fragment von 1,88 kB der 5'-Sequenz des Gens als markierende Sonde. Für das Genom der Trix$^-$-Mutanten zeigte sich dabei eine Bande von 4 kB, im Vergleich zu einer Bande von 2,7 kB beim AX2-Wildtypgenom.

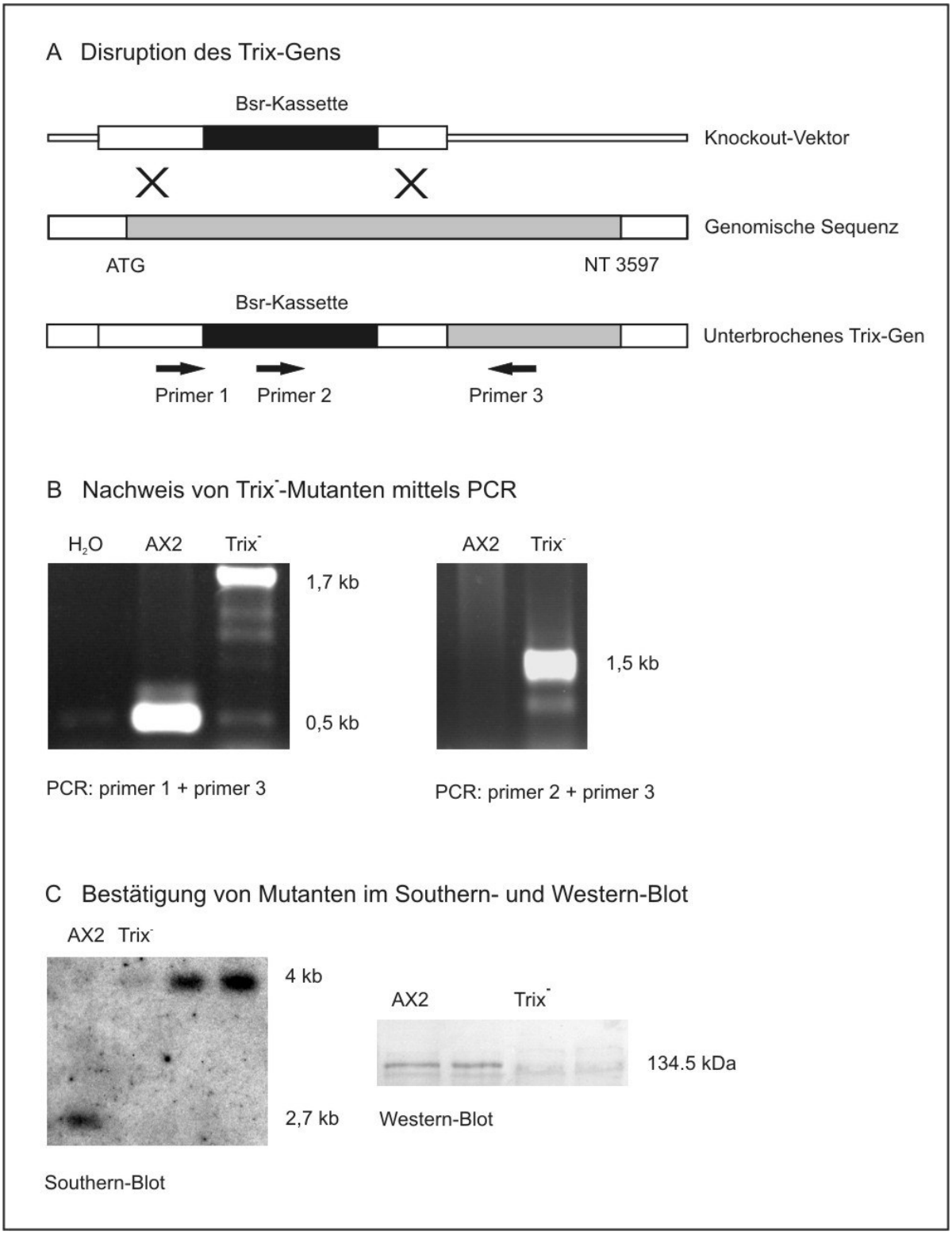


Abbildung 17: Disruption des Gens mit homologer Rekombination eines Knockout-Konstrukts und Bestätigung der Disruption durch Amplifikation der veränderten Gensequenz.

A: Homologe Rekombination des Knockout-Konstrukts, welches eine von genomischen Sequenzen flankierte Bsr-Resistenzkassette trägt, mit dem Genom eines AX2-Wildtyps, mit resultierender Disruption des Gens. **B:** Vergleich von PCR-Produkten bei Verwendung verschiedener Primer-Kombinationen: Mit den Primern 1 und 3 wird nach Insertion der BSR-

Kassette ein um 1,2 kB größeres Produkt amplifiziert; Primer 2 und 3 bestätigen dieses Ergebnis, da im AX2-Wildtyp kein PCR-Produkt auftreten kann. **C:** Southern-Blot-Analyse von AX2-Wildtyp-DNA und rekombinanter DNA nach EcoRI-Restriktionsverdau mit einem ^{32}P-markierten Fragment vom 5'-Ende des Gens als markierende Sonde. Das Genom der Trix$^-$-Mutanten zeigt im Vergleich zum AX2-Wildtypgenom (2,7 kB Bande) eine Bande von 4 kB. Der Westernblot mit polyklonalen Anti-Trix-Antikörpern belegt die ausbleibende Expression des Gens.

3.3.4 Charakterisierung von Trix$^-$-Mutanten

3.3.4.1 Morphologie unfixierter Zellen

Die Morphologie unfixierter Zellen wurde mit dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Bei unstimulierten Zellen stellten sich leichte Unterschiede für die Zelllinien des AX2-Wildtyps und der Trix$^-$-Mutanten dar. Die Trix$^-$-Mutanten produzieren zahlreiche Filopodien, deren Struktur gröber und deren Anordnung weniger geordnet erscheinen als beim AX2-Wildtyp. Zum anderen zeigen sich multiple Pseudopodien, die gleichzeitig und teilweise an verschiedenen Polen der Zellen ausgebildet werden. Insgesamt waren die beobachteten Unterschiede bei deutlichen morphologischen Variationsbreiten beider Zelllinien jedoch nur tendenziell zu werten.

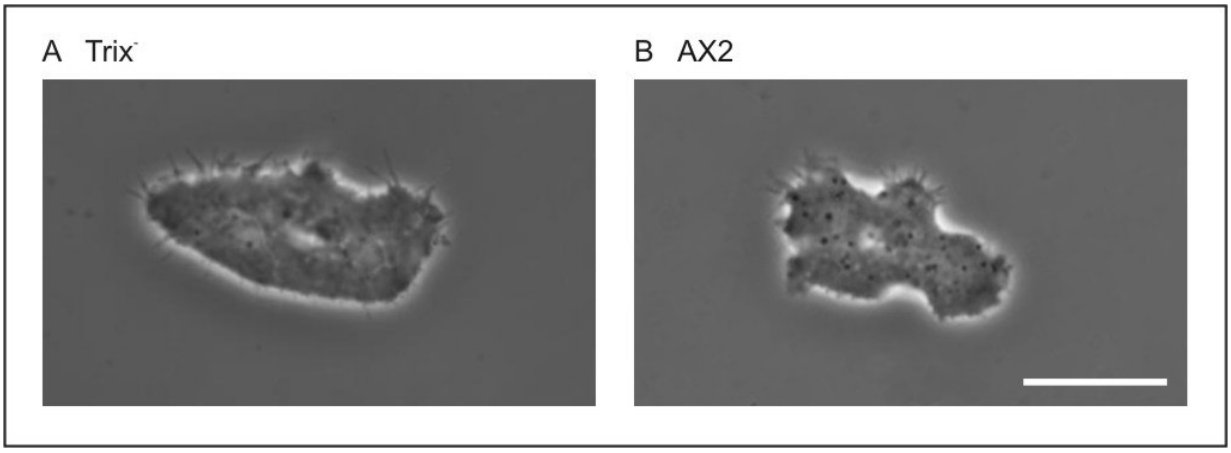


Abbildung 18: Morphologievergleich von unstimulierten Trix$^-$-Mutanten und AX2-Zellen.
A: Unstimulierte Trix$^-$-Mutanten zeigten zahlreiche ausgeprägte Filopodien. **B:** Bei einer insgesamt großen morphologischen Variationsbreite der Zelllinien bestanden keine eindeutigen morphologischen Unterschiede im Vergleich zu den AX2-Wildtypzellen (Balken entspricht 5 µm).

3.3.4.2 Verteilungsmuster von Aktin

Das Aktin ist zu einem großen Teil im sog. Zellkortex konzentriert, der einen nicht genau definierten Bereich nahe der Zellmembran einnimmt. Die Organisation des Aktin wurde an Pikrinsäure fixierten Trix$^-$-Mutanten nach einer standardmäßigen Phalloidinfärbung des Aktin untersucht. Im Vergleich zu AX2-Wildtypzellen zeigen sich nur subtile Unterschiede der kortikalen Aktin-Organisation. Ähnlich den AX2-Wildtypzellen ist das Aktin der Trix$^-$-Mutanten kortikal lokalisiert, wobei sich jedoch eine weniger gleichmäßige Anfärbung der

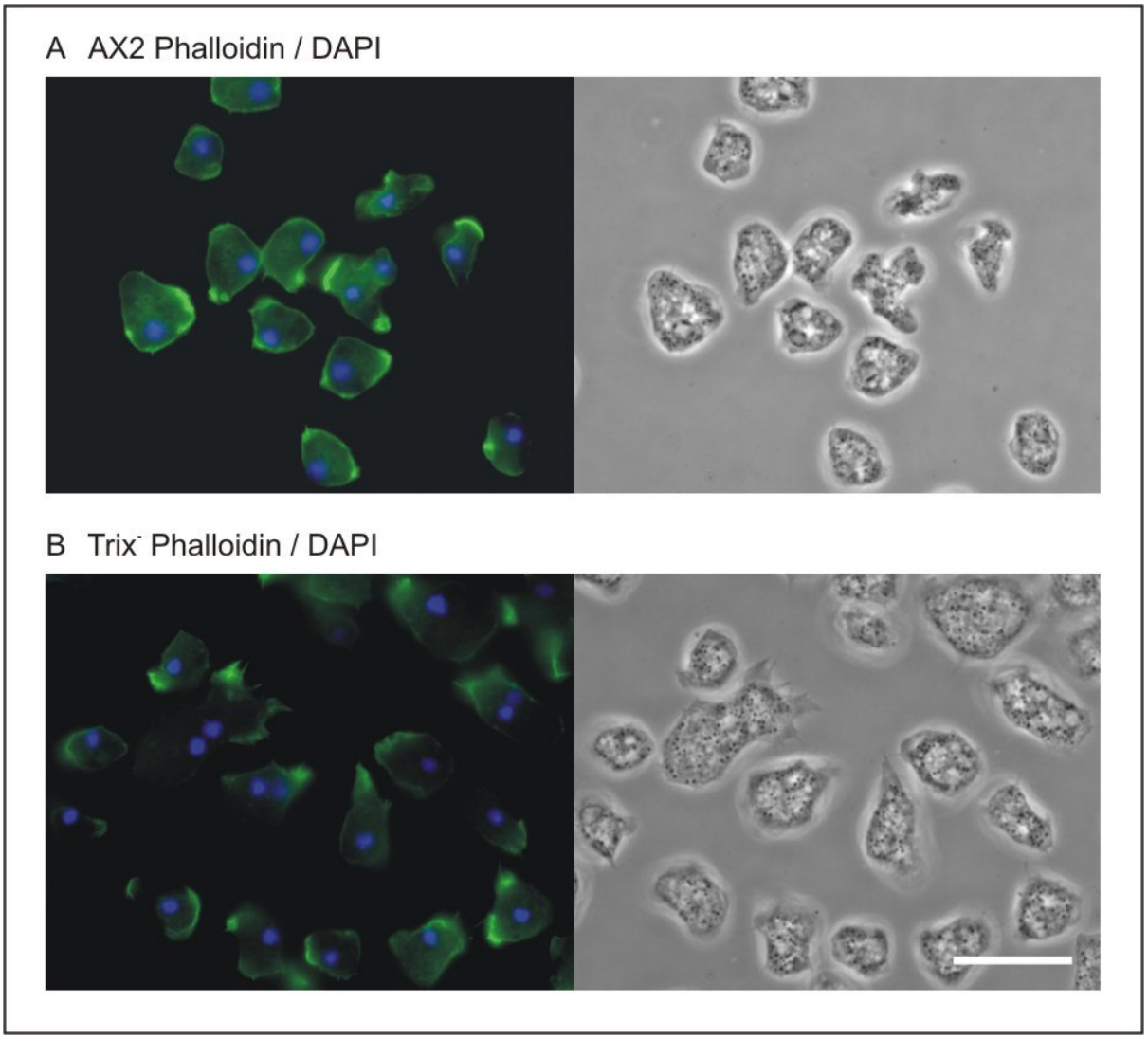


Abbildung 19: Aktin-Phalloidin-Färbung an Pikrinsäure fixierten AX2-Wildtypzellen und Trix$^-$-Mutanten.
A und **B:** Das Aktin im Zellkortex in Bereichen aktiver Pseudopodien zeigt bei Trix$^-$-Mutanten eine weniger gleichmäßige Anordnung im Vergleich zu den AX2-Wildtypzellen. Insgesamt bestehen jedoch nur geringe Unterschiede zwischen den Zelllinien. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (Balken entspricht 15 µm).

aktiven Pseudopodien darstellt. Dadurch scheinen die Trix$^-$-Mutanten eine insgesamt größere Variationsbreite zu besitzen. Da die Unterschiede nur geringer Art sind, muss jedoch auch die Beeinflussung durch Unregelmäßigkeiten bei der Fixation bzw. Färbung in Betracht gezogen werden.

3.3.4.3 In-vivo-Aktin-Organisation in Trix$^-$-Mutanten

Die Organisation von Aktin wurde ebenso an unfixierten GFP-Aktin transformierten Trix$^-$-Mutanten durch konfokalmikroskopische Darstellung untersucht. In unstimulierten Zellen lassen sich während spontaner Motilität wellenartige Aktinanhäufungen beobachten, die sich ohne deutlichen Bezug zu den aktiven Pseudopodien durch das Zytoplasma bewegen. Derartige Aktin-Wellen wurden auch für *D. discoideum* Wildtypzellen beschrieben. Gerisch und Mitarbeiter (Gerisch *et al.*, 2004) beobachteten ähnliche Aktin-Wellen gehäuft in Wildtypzellen nach einer F-Aktin depolymerisierenden Latrunculinbehandlung. Die Funktion dieser Aktin-Wellen ist weiterhin nicht ausreichend geklärt und wird u. a. im Zusammenhang mit F-Aktin reorganisierenden Prozessen bei der Fortbewegung der Zellen gesehen (Vicker, 2002).

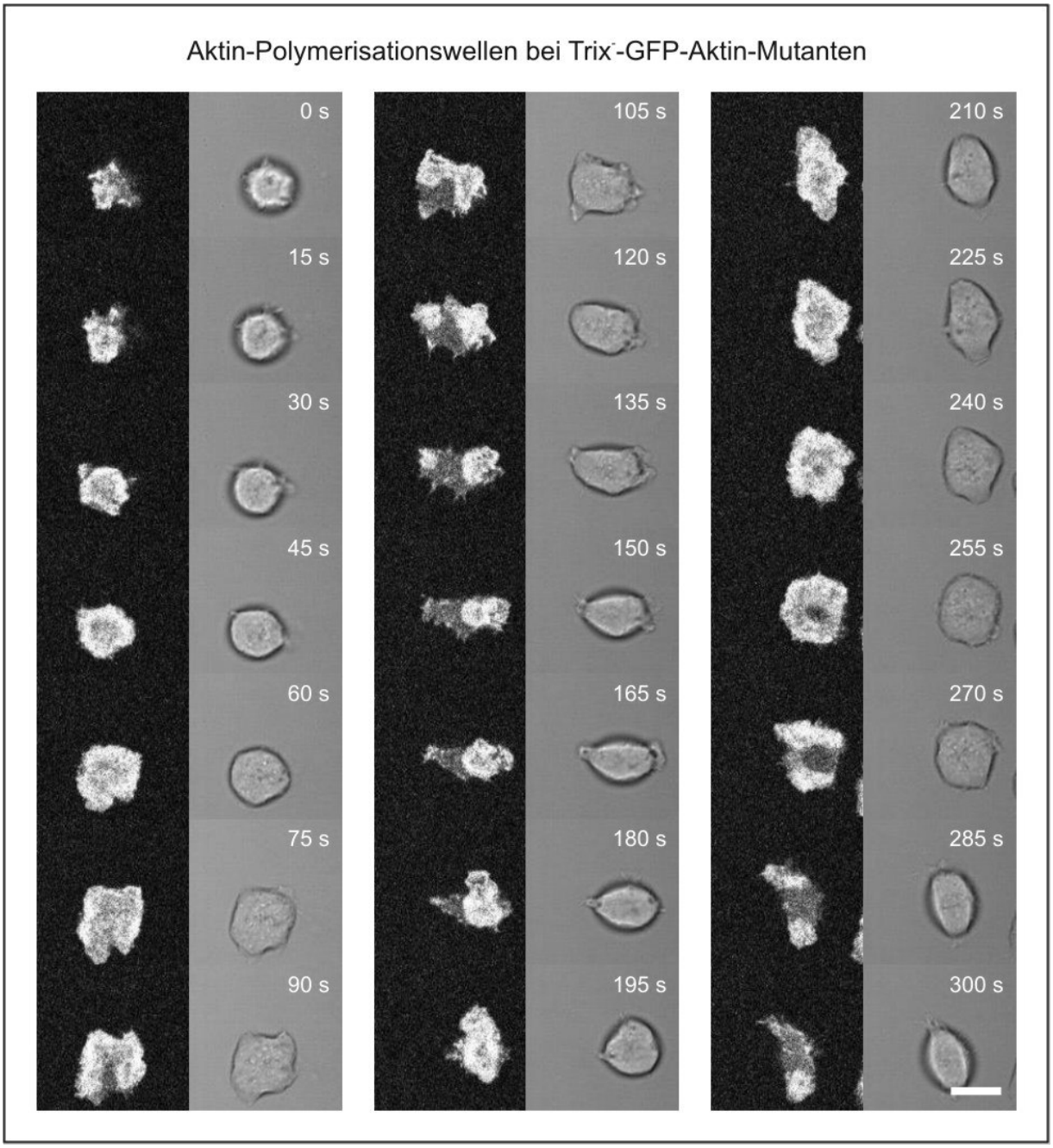


Abbildung 20: Unstimulierte Trix-GFP-Aktin-Mutanten zeigen Polymerisationswellen von Aktin.
In GFP-Aktin transformierten Trix-Mutanten lassen sich durch das gesamte Zytoplasma wandernde Polymerisationswellen von Aktin beobachten. Die Funktion solcher Aktin-Wellen ist bislang unklar. Es wurde postuliert dass sie eine Rolle bei der Fortbewegung der Zellen durch eine Propulsion der Zellmembran spielen (Vicker, 2002), (Balken entspricht 5 µm).

3.3.4.4 Multinukleäre Zellen

Anhand der Phalloidin und DAPI gefärbten Zellen wurde der jeweilige prozentuale Anteil an Zellen mit einer bestimmten Anzahl an Zellkernen erfasst. Bei insgesamt 500 ausgezählten

Zellkernen zeigte sich ein nur tendenziell vermehrtes Auftreten multinukleärer Zellen in der Knockout Population, wenn diese in Flüssigkulturen auf Petrischale kultiviert wurden.

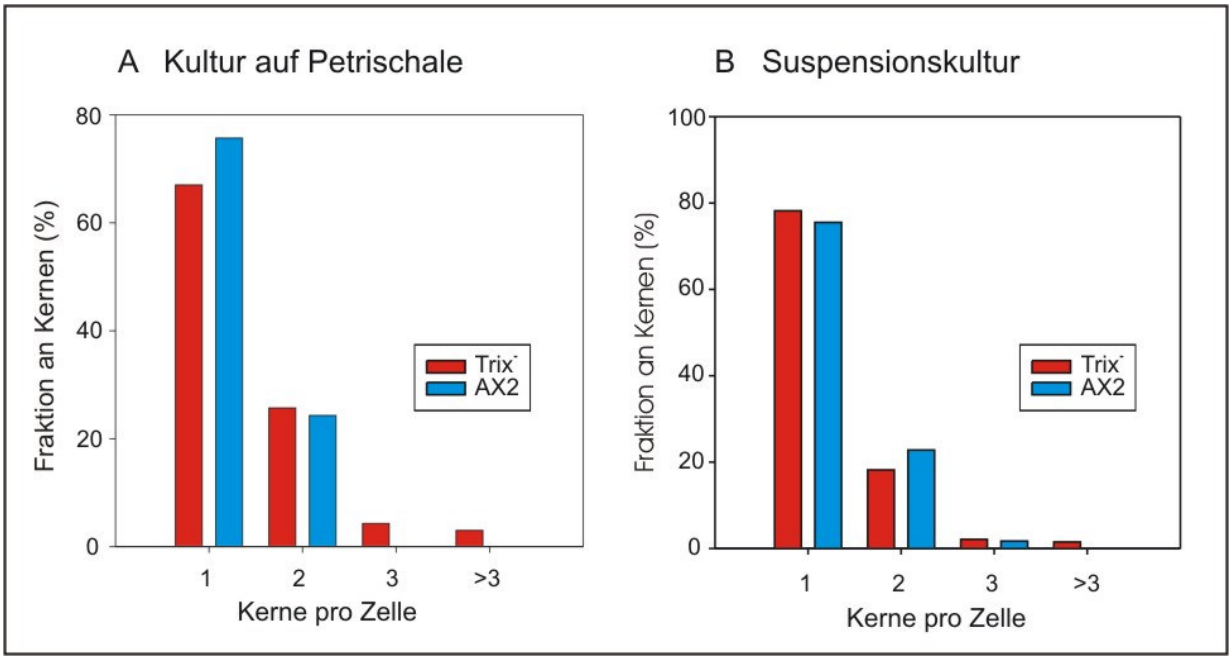


Abbildung 21: Prozentuale Verteilung von Zellen nach Anzahl der Zellkerne.
A: In Flüssigkultur auf Petrischale zeigten sich bei den Trix⁻-Mutanten vereinzelt multinukleäre Zellen mit >2 Zellkernen. **B:** In Suspensionskultur zeigen sich keine Unterschiede hinsichtlich multinukleärer Zellen.

3.3.4.5 Wachstumsgeschwindigkeit und Phagozytoseverhalten

Axenische Schüttelkulturen von Trix⁻-Mutanten und AX2-Wildtypzellen zeigten während der exponentiellen Wachstumsphase keine Unterschiede der Wachstumsgeschwindigkeit. Ebenso lässt die gleich schnelle Entwicklung auf einem Rasen aus *K. aerogenes* auf ein identisches Phagozytoseverhalten von Trix⁻-Mutanten (dargestellt sind zwei Klone) und AX2-Wildtypzellen schließen.

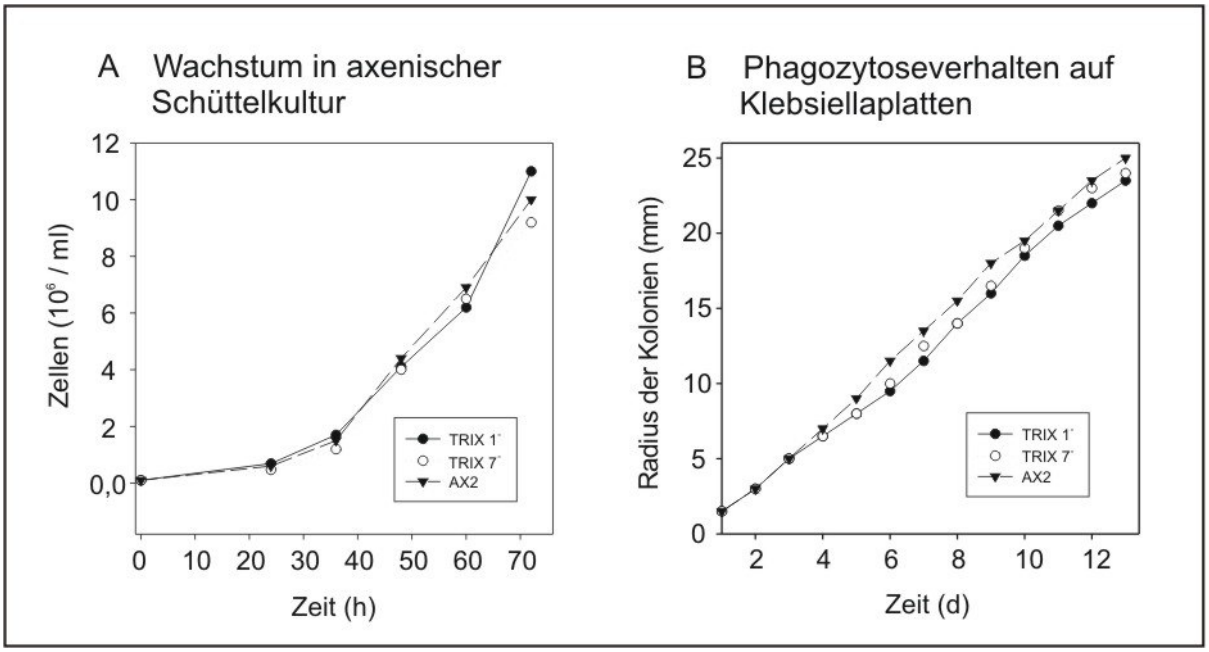


Abbildung 22: Wachstumsgeschwindigkeit und Phagozytoseverhalten von Trix⁻-Mutanten und AX2-Wildtypzellen.
A: Die exponentielle Wachstumsphase in axenischer Schüttelkultur verläuft bei Trix⁻-Mutanten und AX2-Wildtypzellen identisch. Dargestellt ist die exponentielle Wachstumsphase von einer AX2-Wildtypkultur und zwei Trix⁻-Mutanten-Kulturen. **B:** Identische Fresshöfe von Trix⁻-Mutanten und AX2-Wildtypzellen auf Klebsiella-Rasen lassen auf ein identisches Phagozytoseverhalten schließen.

3.3.4.6 Geschwindigkeit des Entwicklungszyklus

Der Entwicklungszyklus von Trix⁻-Mutanten und AX2-Wildtypzellen wurde durch Entwicklung von Zellen (jeweils 10^8 Zellen) auf Phosphatagarplatten verglichen und in Intervallen von drei Stunden mit einem Auflichtbinokular photographisch dokumentiert.

Trix⁻-Mutanten durchlaufen den Entwicklungszyklus insgesamt langsamer als AX2-Wildtypzellen. Bei t = 9 Stunden sind die Trix⁻-Mutanten weniger deutlich aggregiert und erreichen das Aggregationsstadium erst bei ca. t = 12 Stunden, während die AX2-Wildtypzellen zu diesem Zeitpunkt bereits mit der Ausbildung des Fruchtstieles beginnen. Ab dem Zeitpunkt t = 15 Stunden wird weiterhin deutlich, dass sich bei den Trix⁻-Mutanten kleinere Fruchtstiele und Sporen ausbilden.

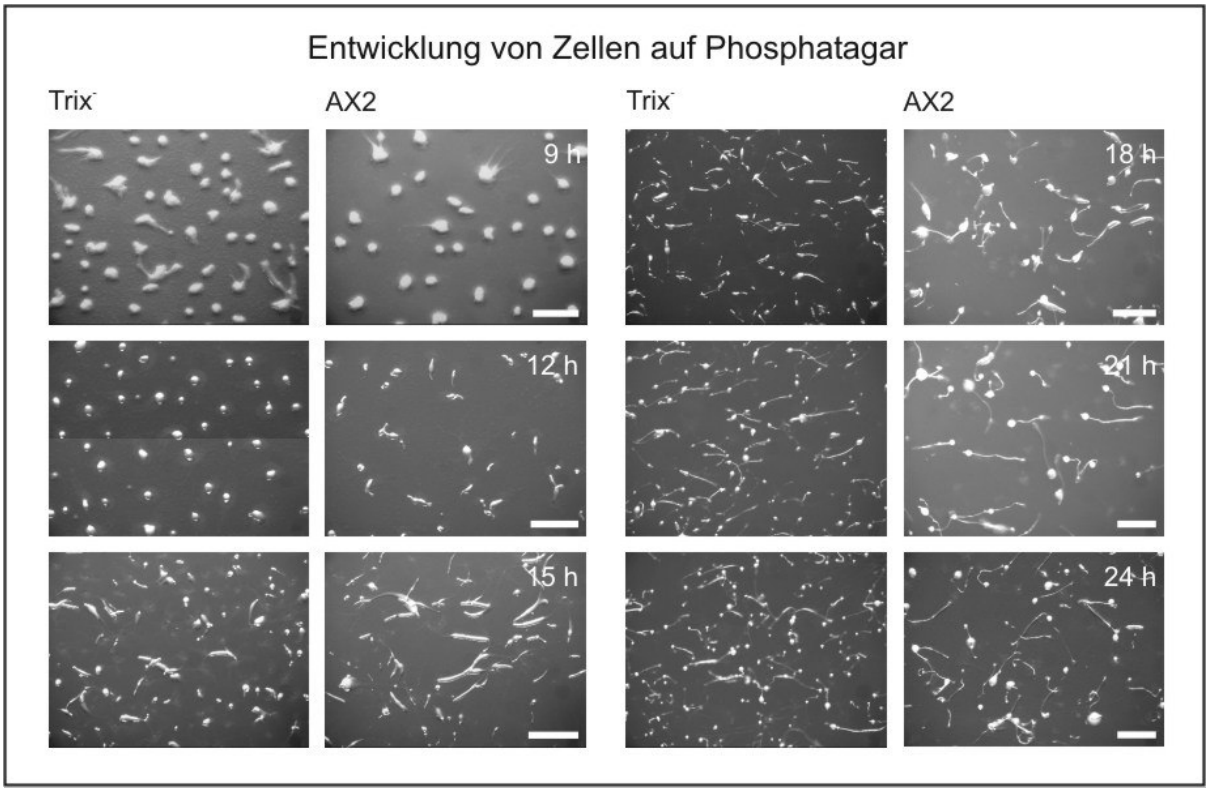


Abbildung 23: Der Entwicklungszyklus von Trix$^-$-Zellen und AX2-Wildtypzellen auf Phosphatagarplatten.
Trix$^-$-Mutanten durchlaufen den Entwicklungszyklus insgesamt langsamer und bilden kleinere Fruchtstiele und Sporen aus (Balken entsprechen jeweils 0,5 mm).

3.3.4.7 Expression von Markerproteinen

Die Differenzierung der Zellen während des Entwicklungszyklus wurde anhand von zwei Markerproteinen durch eine Westernblot-Expressionsanalyse untersucht. Mud1, ein während des Präsporenstadiums sowie während der reifen Sporulation exprimiertes Protein, vermittelt Slug-Matrix-Interaktionen und wurde mit dem monoklonalen Anti-MUD1-Antikörper dargestellt (Gregg *et al.*, 1982; Early *et al.*, 1988). Die Contact Site A, dargestellt mit dem monoklonalen Anti-CSA-Antikörper, ist ein während des Aggregationsstadiums exprimiertes Zelladhäsionsmolekül (Faix *et al.*, 1990). Das Expressionsmuster dieser Markerproteine unterscheidet sich bei Trix$^-$-Mutanten nicht von dem der AX2-Wildtypzellen.

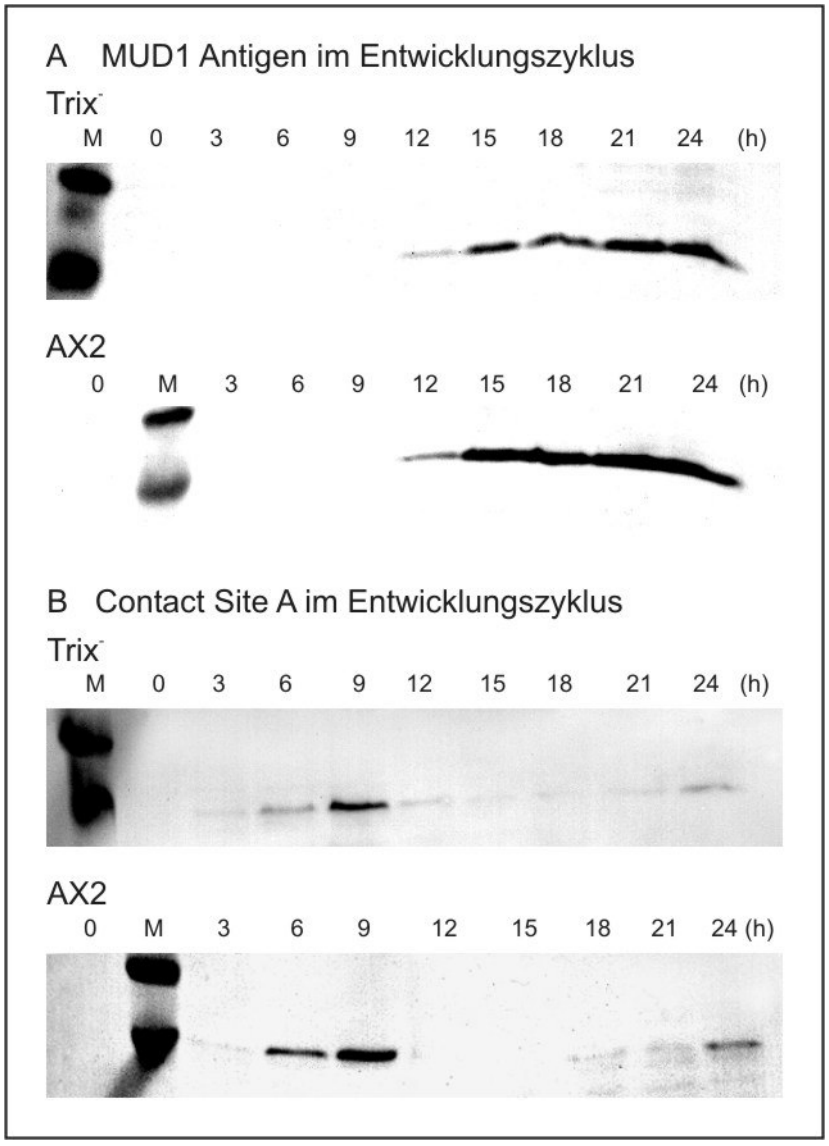


Abbildung 24: Expression der Markerproteine MUD1 und Contact Site A während des Entwicklungszyklus.
Die Expression der beiden wichtigen Markerproteine MUD1 und CSA, die in verschiedenen Entwicklungsstadien von *D. discoideum* exprimiert werden, unterscheidet sich bei Trix$^-$-Mutanten nicht von der bei AX2-Wildtypzellen.

3.3.4.8 Phototaktische Stimulation

Die Darstellung phototaktisch stimulierter Trix$^-$-Mutanten sowie AX2-Wildtypzellen erfolgte durch Immunfärbung von Abklatsch-Nitrozellulosemembranen mit Anti-Aktin-Antikörpern. Trix$^-$-Mutanten wiesen keinen phototaktischen Defekt auf.

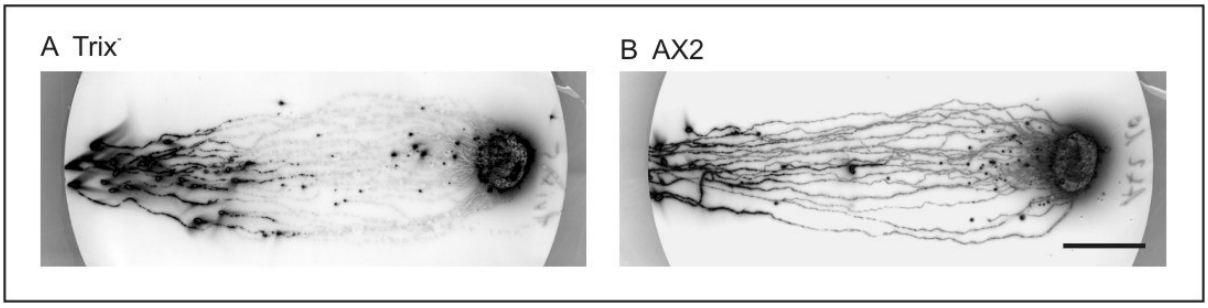


Abbildung 25: Phototaxisassay nach Stimulation durch eine randständige Lichtquelle.
A und **B:** Trix$^-$-Mutanten zeigen eine normale phototaktische Stimulierbarkeit. Die Darstellung der Laufspuren erfolgte durch Übertragung auf Nitrozellulosemembranen, Zelllyse durch Einfrieren/Auftauen und Färbung mit monoklonalem Anti-Aktin-Antikörper. Die Lichtquelle befindet sich auf der linken Seite (Balken entspricht 1,5 cm).

3.3.4.9 Chemotaktische Stimulation

Zellen wurden in Flüssigmedium mit cAMP [10^{-4} M] aus einer Mikroinjektorspitze chemotaktisch stimuliert und am Phasenkontrastmikroskop in Abständen von zehn Sekunden photographisch dokumentiert. Die Trix$^-$-Mutanten zeigten im Vergleich zum AX2-Wildtyp ein nahezu identisches morphologisches Verhalten.

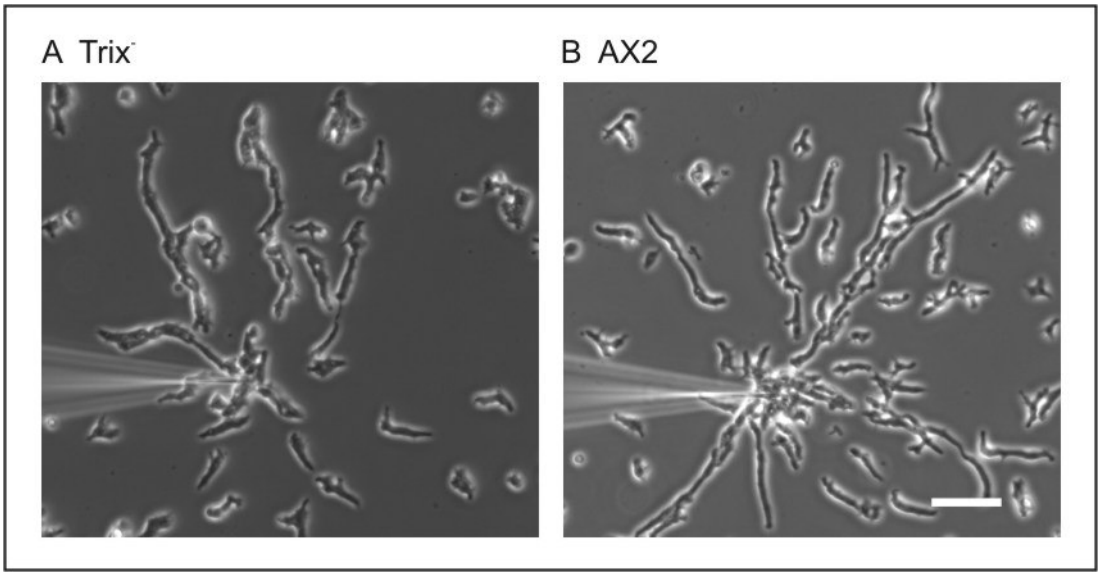


Abbildung 26: Chemotaktische Stimulation von Zellen in Flüssigmedium.
A und **B:** Bei der chemotaktischen Stimulation mit cAMP zeigten sich keine morphologischen Unterschiede zwischen Trix$^-$-Mutanten und AX2-Wildtypzellen (Balken entspricht 30 µm).

3.3.4.10 Phagozytoserate und Transitrate

Die Phagozytoserate wurde mit hitzeinaktivierten TRITC markierten Hefezellen gemessen (Maniak *et al.*, 1995), wobei sich für die Trix$^-$-Mutanten und die AX2-Wildtypzellen identische Phagozytoseraten zeigten (siehe Abb. 27 A).

Die intrazelluläre Verweildauer phagozytierter Partikel bis zur Exozytose (Transitzeit) wurde nach Inkubation der *D. discoideum*-Zellen mit TRITC-Dextran nach verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Jenne *et al.*, 1988). Hier bestand eine Verzögerung der Exozytose von intrazellulärem TRITC-Dextran bei den Trix$^-$-Mutanten (siehe Abb. 27 B), was einer längeren intrazellulären Verweildauer der Partikel entspricht. Beide Kurven erreichten ein Plateau, wobei sich zeigte, dass ca. 30 % des markierten Dextrans in den Trix$^-$-Mutanten verbleibt und nicht, oder nur sehr langsam, exozytiert wird.

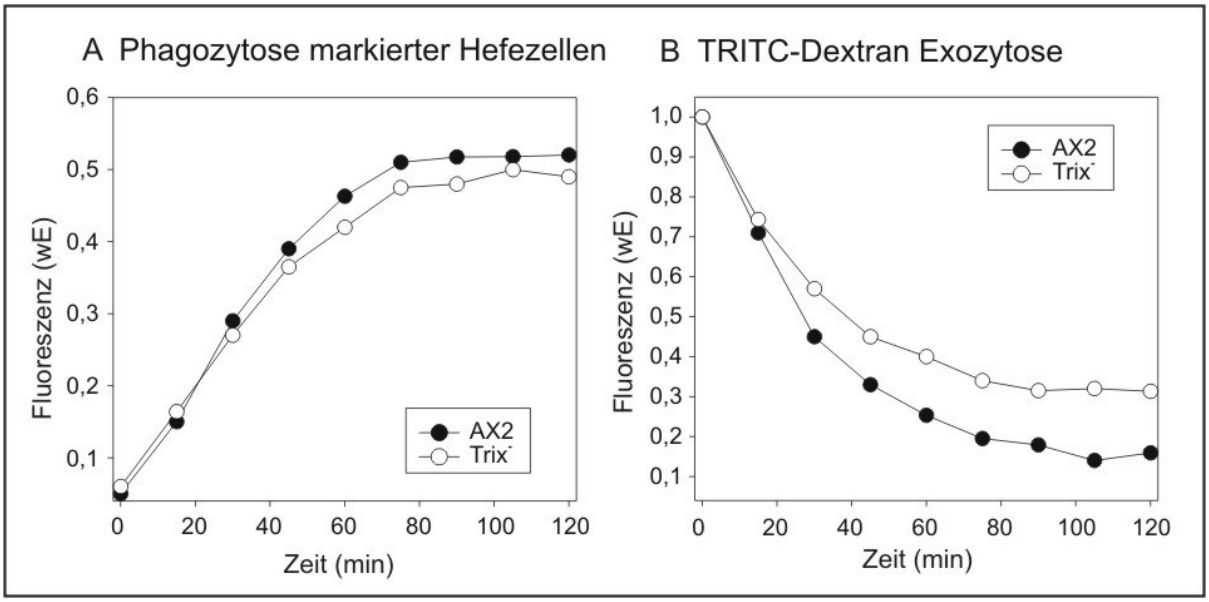


Abbildung 27: Phagozytose von markierten Hefezellen und Exozytoserate von TRITC-Dextran.
A: Die Phagozytoserate von Trix$^-$-Mutanten entspricht weitgehend der von AX2-Wildtypzellen. **B:** Bei Trix$^-$-Mutanten zeigt sich eine signifikante Verzögerung der Exozytose von TRITC-Dextran.

4 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor für Rac-GTPasen charakterisiert. Die Domänenarchitektur des Proteins beinhaltet am N-Terminus eine ungewöhnliche Aneinanderreihung von drei CH-Domänen (Calponin-Homologie). Am C-Terminus liegt das für Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren typische Tandem aus einer Dbl-Homologie-Domäne (Diffuses-B-Zell-Lymphom-Homologie) und einer PH-Domäne (Pleckstrin-Homologie). Das Protein wurde sowohl biochemisch im Hinblick auf seine Interaktion mit dem Aktinzytoskelett oder GTPasen als auch zellbiologisch durch Gendisruption und Expression von GFP-Fusionsproteinen untersucht.

4.1 Ein neuer Aktin bindender Rac-Guaninnukleotid-Austauschfaktor

Ursprünglich als Teil des glattmuskulären Proteins Calponin beschrieben (Takahashi *et al.*, 1988; Castresana und Saraste, 1995), werden fünf Subtypen der Calponin-Homologie-Domänen (CH-Domänen) unterschieden (Banuelos *et al.*, 1998; Gimona *et al.*, 2002). Viele Aktin bindende Proteine tragen zwei in Tandemform angeordnete CH-Domänen, welche in die Gruppen 1 und 2 eingeordnet werden. Typ-3-CH-Domänen sind als singuläre Domänen Teil regulatorischer Proteine der Signaltransduktion (z. B. Vav und IQGAP) sowie von Muskelproteinen (z. B. Calponin und 'smooth-muscle-protein-22-alpha'). Für Typ-3-CH-Domänen wurde u. a. eine Mitwirkung bei Protein-Wechselwirkungen sowie bei intramolekularer Regulation postuliert. Sie scheinen dagegen nicht an der Aktin-Bindung beteiligt zu sein (Stradal *et al.*, 1998). Es sind erst wenige Proteine mit den Subtypen 4 und 5 der CH-Domänen beschrieben, deren Funktionen bislang nicht ausführlich charakterisiert sind.

Eine phylogenetische Gruppierung der CH-Domänen in Trix zeigte eine unerwartete Klassifizierung der ersten beiden Domänen als Typ-3-CH-Domänen sowie der dritten als Typ-1-CH-Domäne. Bei Rho-GEF-Proteinen aller Spezies waren bislang nur einzelne Typ-3-CH-Domänen bekannt (z. B. in Vav, α-PIX und Cdc24). Als untypisch gilt zudem, dass die Typ-1-CH-Domäne C-terminal zu den beiden anderen CH-Domänen liegt. Dies entspricht nach bisherigem Kenntnisstand einer inkompletten Aktin bindenden Region. In Sedimentationsexperimenten konnte für ein rekombinantes Proteinfragment des N-Terminus mit den drei CH-Domänen dennoch eine Bindung und Bündelung von Aktinfilamenten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind eindeutig, stehen jedoch nicht im Einklang mit den für CH-Domänen bisher beschriebenen Eigenschaften.

CH-Domänen sind durch hochkonservierte Aminosäurereste definiert, welche die dreidimensionale Struktur der Domäne bestimmen. Die Aktin-Bindung durch die bereits erwähnten Typ-1/Typ-2-CH-Tandemdomänen basiert auf drei Aktin bindenden Abschnitten ('actin binding sites', ABS), welche sich von der Typ-1-Domäne (ABS 1 und 2) bis zur nachfolgenden Typ-2-Domäne (ABS 3) erstrecken (Gimona *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass nur isolierte Typ-1-CH-Domänen Aktin binden (Way *et al.*, 1992). Typ-2-CH-Domänen festigen dann die Bindung der Typ-1-CH-Domänen, so dass Typ-1/Typ-2-CH-Tandemdomänen ca. zehnfach stärker an Aktin binden als isolierte Typ-1-CH-Domänen (Gimona *et al.*, 2002).
Die Eigenschaften der Aktin-Bindung und -Bündelung der Typ-3/Typ-3/Typ-1-Calponin-Homologie-Domänen in Trix lassen sich also nicht direkt aus den bisher für CH-Domänen bekannten Funktionen ableiten. Zum einen erfordert die Aktin-Kosedimentation eine starke Aktin-Bindung, die durch eine einzelne Typ-1-CH-Domäne wenig wahrscheinlich ist. Ebenso ist die Ausbildung großer, leicht sedimentierbarer Aktinbündel durch eine einzelne CH-Domäne nicht befriedigend erklärt.
In der Sequenzanalyse wurden keine weiteren ausgeprägten Aktin bindenden Motive in der Proteinsequenz gefunden. Zwischen den CH-Domänen treten jedoch Bereiche positiv geladener Aminosäurereste auf, die an der Aktin-Bindung und -Bündelung beteiligt sein könnten. So wurde z. B. eine Mitwirkung von Poly-L-Lysin oder der sehr basischen Reste am C-Terminus des Aktin bündelnden Proteins Cortexillin I bei der Bündelung von Aktinfilamenten gezeigt (Stock *et al.*, 1999; Kakugo *et al.*, 2003). Insgesamt erscheint aber auch die Mitwirkung der Typ-3-CH-Domänen bei der Bindung und Bündelung von Aktinfilamenten plausibel. Eichinger und Mitarbeiter (Eichiger *et al.*, 2006) haben im Rahmen des *D. discoideum*-Genomprojektes zahlreiche Proteine identifiziert, die zum Teil neuartige Kombinationen von CH-Domänen tragen. Die Autoren sehen die Entwicklung dieser Vielfalt in der Überlebenstaktik des einzelligen Organismus begründet, die entscheidend von einer exakten Kontrolle der Phototaxis und Chemotaxis während der Nahrungssuche abhängt. Weitere Hinweise auf eine Rolle der Typ-3-CH-Domänen bei der Aktin-Bindung könnte die Stöchiometrie der Aktin-Bündelung liefern. Bislang ist keine multiple Aktinfilament-Bindung einer einzelnen Typ-1-CH-Domäne beschrieben.

4.2 Lokalisierung an späten Endosomen und Aktin-Bindung des Proteins

Die subzelluläre Verteilung von Trix wurde durch Expression GFP gekoppelter Trix-Fragmente in vivo untersucht. Entsprechende Fusionsproteine aus der vollständigen Trix-

Sequenz sowie aus einem Fragment mit den drei CH-Domänen wurden im Bereich des Aktin reichen Zellkortex lokalisiert. Untersuchungen des Phagozytosezyklus durch das GFP gekoppelte CH-Teilfragment zeigten des Weiteren eine zunehmende Anreicherung an den Membranen fortgeschrittener endozytischer Vesikel.

Die Endozytose ist der einzige Mechanismus zur Nahrungsaufnahme für *D. discoideum*-Amöben (Rauchenberger *et al.*, 1997). Der endovesikuläre Zyklus von *D. discoideum* dauert ca. 60 bis 90 Minuten. Nach der Phagozytose oder Makropinozytose geschieht grob skizziert die Azidifizierung der primären Endosomen durch Fusion mit frühen Endosomen, die pH-Neutralisierung nach Verdau des Endosomeninhaltes und schließlich die Exozytose unverdaulicher Reste. Weitere Schritte intrazellulären Transportes und vesikulärer Fusionen erfolgen während des gesamten endovesikulären Zyklus. Primäre Vakuolen mit Partikeln oder Flüssigkeiten sind kurzzeitig von F-Aktin umlagert, welches vor der rasch folgenden Azidifizierung verschwindet. Ein Mantel aus F-Aktin lässt sich dann erneut während des gesamten post-lysosomalen Ablaufes nachweisen. Es wurde gezeigt, dass eine (F-Aktin depolymerisierende) Cytochalasin-A-Behandlung die Exozytose blockiert (Rauchenberger *et al.*, 1997). Die elegante selektive Disruption des F-Aktin-Mantels im späten vakuolären Zyklus durch die Expression eines Hybridproteins aus Cofilin, einem Aktin depolymerisiernden Faktor des Zellkortex, sowie Vacuolin A, einem Marker des späten vakuolären Zyklus (Drengk *et al.*, 2003), führte dagegen nur zur Verklumpung später endozytischer Vesikel, ohne die Exozytoserate eines pinozytierten Flüssigmarkers zu beeinflussen. Dennoch scheint das Aktinzytoskelett eine zentrale Rolle bei der Exozytose zu besitzen, wobei die Assoziierung der späten Vakuolen mit dem Zellkortex als zentrale Aufgabe des im späteren phagozytischen Zyklus auftretenden Aktin-Mantels postuliert wurde (Rauchenberger *et al.*, 1997). Trix könnte als GEF-Protein für eine Rac-GTPase an der Assemblierung oder dem Abbau des Aktin-Mantels während des späten endozytären Zyklus beteiligt sein. Die starke Expression von Trix während der Wachstumsphase des Organismus ist mit dieser Annahme grundsätzlich im Einklang.

Eine Beteiligung mehrerer *D. discoideum*-Rac-GTPasen an der Endozytose wurde bereits gezeigt, z. B. für RacC und Rac1A (Seastone *et al.*, 1998; Dumontier *et al.*, 2000). An diesen beiden GTPasen konnte allerdings keine Beschleunigung der GDP/MANT-GDP-Austauschaktivität durch Trix nachgewiesen werden. Für eine Assoziation einzelner Rac-GTPasen speziell mit späten endozytären Vesikeln in *D. discoideum* liegen bislang noch keine Erkenntnisse vor, wobei nach Identifizierung entsprechender Proteine weitere Analysen lohnenswert erscheinen.

4.3 GDP/MANT-GDP-Austauschaktivität

Für Trix konnte keine Zuordnung des Proteins als Wirkungspartner spezifischer Rac-GTPasen erfolgen. In fluorimetrischen Assays zeigte sich für die Rac-GTPasen Rac1a, RacC und RacE jeweils ein spontaner GDP/MANT-GDP-Austausch, welcher jedoch nicht durch rekombinante Trix-Fragmente beschleunigt wurde. Es wurde die Dbl-Homologie-Domäne wie auch die gesamte funktionelle Dbl-Homologie/Pleckstrin-Homologie-Tandemdomäne von Trix verwendet. Park und Mitarbeiter (Park *et al.*, 2004) berichten, dass bereits eine einzige isolierte Dbl-Homologie-Domäne ohne die in der Tandemdomäne vorhandene PH-Domäne einen GDP/GTP-Austausch katalysieren kann.

Wie im Einleitungsteil bemerkt (siehe 1.4.4) zeigen sich in bisherigen Studien zu *D. discoideum*-Rho-GEF-Proteinen teils ausgeprägte Spezifitäten der einzelnen Austauschfaktoren für bestimmte Rac-GTPasen, beispielsweise die selektive Austauschaktivität von DDRacGAP1 (DRG) für Rac1A, nicht jedoch für RacC oder RacE (Ludbrook *et al.*, 1997; Knetsch *et al.*, 2001). Eine potentielle Aktivität von Trix könnte demnach sehr spezifisch auf Rac-GTPasen gerichtet sein, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch nicht getestet werden konnten. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass bislang nicht identifizierte regulatorische Koproteine für eine Aktivierung von Trix notwendig sind. Die ungewöhnliche Anordnung der CH-Domänen deutet auf mögliche Protein-Wechselwirkungen hin. Abschließend sei angemerkt, dass die Ergebnisse unter In-vitro-Bedingungen nicht zwangsläufig den In-vivo-Bedingungen entsprechen müssen. So wurde für das humane Tiam1 gezeigt, dass es eine Austauschaktivität an Cdc42, Rac und Rho in vitro, unter In-vivo-Bedingungen jedoch nur an Rac besitzt (Michiels *et al.*, 1995).

Weitere mögliche Wirkungspartner für Trix könnten besonders im Hinblick auf eine vermutete Funktion des Proteins bei der Regulation des endozytischen Zyklus getestet werden. Hier sind besonders die GTPasen RacF1 sowie RacB von Interesse. RacF1 ist mit frühen Pinosomen und Phagosomen assoziiert (Rivero *et al.*, 1999), wobei RacB$^-$-Mutanten Defekte bei der Endozytose sowie der Exozytoserate eines pinozytierten Flüssigmarkers aufwiesen (Lee *et al.*, 2003).

4.4 Hinweise auf die In-vivo-Funktion von Trix durch Charakterisierung von Trix$^-$-Mutanten

Hinweise auf die In-vivo-Funktion von Trix wurden durch Disruption des Gens im AX2-Wildtyp gewonnen. Trix ist kein essentielles Protein. Es zeigten sich keine phänotypischen

Defekte bei der Expression wichtiger Markerproteine, bei der Phototaxis, Chemotaxis, Phagozytose und Zytokinese sowie hinsichtlich des Wachstumsverhaltens der Trix⁻-Mutanten. Es wurden leichte Unregelmäßigkeiten bei der Organisation des Mikrofilamentsystems sowie eine leichte zeitliche Verzögerung beim Durchschreiten des Entwicklungszyklus beobachtet. Weiterhin bestanden in der Gesamtdarstellung des Aktinzytoskeletts durch Phalloidin geringe Unterschiede zwischen AX2-Wildtyp und Minusmutante im Sinne leicht aufgeraut erscheinender Aktin-Strukturen bei erhaltener, jedoch inhomogener Klusterung von Aktin an den aktiven Zellpolen. Bei morphologisch geringen Unterschieden ergeben sich somit nur Hinweise auf eine Beteiligung von Trix an der Organisation der kortikalen Aktin-Strukturen von *D. discoideum*.

Die markanteste phänotypische Abweichung bestand jedoch hinsichtlich der Exozytoserate eines pinozytierten Flüssigmarkers, welche bei Trix⁻-Mutanten um 30 % reduziert war. Dies spricht als weiteres Argument für eine regulatorische Beteiligung des Proteins an der Exozytose und lässt sich mit den Ergebnissen zur Lokalisierung der GFP gekoppelten Fragmente vereinbaren. Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich möglicher Interaktionspartner für Trix erscheinen also auch unter diesem Aspekt lohnenswert. Wie bereits dargelegt, wären besonders die GTPasen RacF1 sowie RacB von Interesse. Zudem kann die Komplementation des Exozytose-Defekts durch Expression des gesamten Proteins oder ausgewählter Domänen eine genaue Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen in Trix ermöglichen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Aghazadeh, B., K. Zhu, T. J. Kubiseski, G. A. Liu, T. Pawson, Y. Zheng und M. K. Rosen (1998). Structure and mutagenesis of the Dbl homology domain. Nat Struct Biol 5(12): 1098-107.

Al-Chalabi, A. und C. C. Miller (2003). Neurofilaments and neurological disease. Bioessays 25(4): 346-55.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und P. Walter (2002). Molecular biology of the cell. New York, Garland Science.

Ascough, K. R. (2004). Endocytosis: Actin in the driving seat. Curr Biol 14(3): R124-6.

Banuelos, S., M. Saraste und K. D. Carugo (1998). Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding. Structure 6(11): 1419-31.

Bement, W. M., A. L. Miller und G. von Dassow (2006). Rho GTPase activity zones and transient contractile arrays. Bioessays 28(10): 983-93.

Benitah, S. A., P. F. Valeron, L. van Aelst, C. J. Marshall und J. C. Lacal (2004). Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. Biochim Biophys Acta 1705(2): 121-32.

Berg, J. S., B. C. Powell und R. E. Cheney (2001). A millennial myosin census. Mol Biol Cell 12(4): 780-94.

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.

Bohne-Lang, A., W. D. Groch und R. Ranzinger (2005). AISMIG--an interactive server-side molecule image generator. Nucleic Acids Res 33(Web Server issue): W705-9.

Borisy, G., G. und Svitkina, T., M. (2000). Actin machinery: pushing the envelope. Current Opinion in Cell Biology (12): 104–112.

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.

Brown, J. H. und C. Cohen (2005). Regulation of muscle contraction by tropomyosin and troponin: how structure illuminates function. Adv Protein Chem 71: 121-59.

Bush, J., K. Franek und J. Cardelli (1993). Cloning and characterization of seven novel *Dictyostelium discoideum* rac-related genes belonging to the rho family of GTPases. Gene 136(1-2): 61-8.

Carlier, M., F. und Borisy G. G. (2000). Molecular hardware in action, Editorial overview. Current Opinion in Cell Biology(12): 17-19.

Castresana, J. und M. Saraste (1995). Does Vav bind to F-actin through a CH domain? FEBS Lett 374(2): 149-51.

Chan, A. M., E. S. McGovern, G. Catalano, T. P. Fleming und T. Miki (1994). Expression cDNA cloning of a novel oncogene with sequence similarity to regulators of small GTP-binding proteins. Oncogene 9(4): 1057-63.

Chan, A. M., S. Takai, K. Yamada und T. Miki (1996). Isolation of a novel oncogene, NET1, from neuroepithelioma cells by expression cDNA cloning. Oncogene 12(6): 1259-66.

Clamp, M., J. Cuff, S. M. Searle und G. J. Barton (2004). The Jalview Java alignment editor. Bioinformatics 20(3): 426-7.

Critchley, D. R. (2000). Focal adhesions - the cytoskeletal connection. Curr Opin Cell Biol 12(1): 133-9.

De Lozanne, A. und J. A. Spudich (1987). Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. Science 236(4805): 1086-91.

DerMardirossian, C. und G. M. Bokoch (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. Trends Cell Biol 15(7): 356-63.

Dominguez, R. (2004). Actin-binding proteins--a unifying hypothesis. Trends Biochem Sci 29(11): 572-8.

dos Remedios, C. G., D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. A. Berry und N. J. Nosworthy (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. Physiol Rev 83(2): 433-73.

Doussau, F. und G. J. Augustine (2000). The actin cytoskeleton and neurotransmitter release: an overview. Biochimie 82(4): 353-63.

Dovas, A. und J. R. Couchman (2005). RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. Biochem J 390(Pt 1): 1-9.

Drengk, A., J. Fritsch, C. Schmauch, H. Ruhling und M. Maniak (2003). A coat of filamentous actin prevents clustering of late-endosomal vacuoles in vivo. Curr Biol 13(20): 1814-9.

Dumontier, M., P. Hocht, U. Mintert und J. Faix (2000). Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in *Dictyostelium*. J Cell Sci 113 (Pt 12): 2253-65.

Early, A., S. J. McRobbie, K. T. Duffy, K. A. Jermyn, R. Tilly, A. Ceccarelli und J. G. Williams (1988). Structural and functional characterization of genes encoding *Dictyostelium* prestalk and prespore cell-specific proteins. Dev Genet 9(4-5): 383-402.

Eichinger, L., 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., J. A. Pachebat, G. Glockner, M. A. Rajandream, R. Sucgang, M. Berriman, J. Song, R. Olsen, K. Szafranski, Q. Xu, B. Tunggal, S. Kummerfeld, M. Madera, B. A. Konfortov, F. Rivero, A. T. Bankier, R. Lehmann, N. Hamlin, R. Davies, P. Gaudet, P. Fey,

K. Pilcher, G. Chen, D. Saunders, E. Sodergren, P. Davis, A. Kerhornou, X. Nie, N. Hall, C. Anjard, L. Hemphill, N. Bason, P. Farbrother, B. Desany, E. Just, T. Morio, R. Rost, C. Churcher, J. Cooper, S. Haydock, N. van Driessche, A. Cronin, I. Goodhead, D. Muzny, T. Mourier, A. Pain, M. Lu, D. Harper, R. Lindsay, H. Hauser, K. James, M. Quiles, M. Madan Babu, T. Saito, C. Buchrieser, A. Wardroper, M. Felder, M. Thangavelu, D. Johnson, A. Knights, H. Loulseged, K. Mungall, K. Oliver, C. Price, M. A. Quail, H. Urushihara, J. Hernandez, E. Rabbinowitsch, D. Steffen, M. Sanders, J. Ma, Y. Kohara, S. Sharp, M. Simmonds, S. Spiegler, A. Tivey, S. Sugano, B. White, D. Walker, J. Woodward, T. Winckler, Y. Tanaka, G. Shaulsky, M. Schleicher, G. Weinstock, A. Rosenthal, E. C. Cox, R. L. Chisholm, R. Gibbs, W. F. Loomis, M. Platzer, R. R. Kay, J. Williams, P. H. Dear, A. A. Noegel, B. Barrell und A. Kuspa (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. Nature 435(7038): 43-57.

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.

Etienne-Manneville, S. und A. Hall (2002). Rho GTPases in cell biology. Nature 420(6916): 629-35.

Eva, A. und S. A. Aaronson (1985). Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. Nature 316(6025): 273-5.

Faix, J., G. Gerisch und A. A. Noegel (1990). Constitutive overexpression of the contact site A glycoprotein enables growth-phase cells of *Dictyostelium discoideum* to aggregate. Embo J 9(9): 2709-16.

Faix, J., L. Kreppel, G. Shaulsky, M. Schleicher und A. R. Kimmel (2004). A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. Nucleic Acids Res 32(19): e143.

Faix, J. und K. Rottner (2006). The making of filopodia. Curr Opin Cell Biol 18(1): 18-25.

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.

Fukata, M., M. Nakagawa und K. Kaibuchi (2003). Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. Curr Opin Cell Biol 15(5): 590-7.

Fukui, Y. (1993). Toward a new concept of cell motility: cytoskeletal dynamics in amoeboid movement and cell division. Int Rev Cytol 144: 85-127.

Gardner, M. K. und D. J. Odde (2006). Modeling of chromosome motility during mitosis. Curr Opin Cell Biol 18(6): 639-47.

Geissler, H., R. Ullmann und T. Soldati (2000). The tail domain of myosin M catalyses nucleotide exchange on Rac1 GTPases and can induce actin-driven surface protrusions. Traffic 1(5): 399-410.

Gerisch, G., T. Bretschneider, A. Muller-Taubenberger, E. Simmeth, M. Ecke, S. Diez und K. Anderson (2004). Mobile actin clusters and traveling waves in cells recovering from actin depolymerization. Biophys J 87(5): 3493-503.

Gimona, M., K. Djinovic-Carugo, W. J. Kranewitter und S. J. Winder (2002). Functional plasticity of CH domains. FEBS Lett 513(1): 98-106.

Glaven, J. A., I. P. Whitehead, T. Nomanbhoy, R. Kay und R. A. Cerione (1996). Lfc and Lsc oncoproteins represent two new guanine nucleotide exchange factors for the Rho GTP-binding protein. J Biol Chem 271(44): 27374-81.

Goley, E. D. und M. D. Welch (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. Nat Rev Mol Cell Biol 7(10): 713-26.

Gordon, A. M., M. Regnier und E. Homsher (2001). Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin rocks and rolls. News Physiol Sci 16: 49-55.

Gotthardt, D., H. J. Warnatz, O. Henschel, F. Bruckert, M. Schleicher und T. Soldati (2002). High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. Mol Biol Cell 13(10): 3508-20.

Gregg, J. H., M. Krefft, A. Haas-Kraus und K. L. Williams (1982). Antigenic differences detected between prespore cells of *Dictyostelium discoideum* and *Dictyostelium* mucoroides using monoclonal antibodies. Exp Cell Res 142(1): 229-33.

Hed, J. (1986). Methods for distinguishing ingested from adhering particles. Methods Enzymol 132: 198-204.

Herrmann, H. und U. Aebi (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. Annu Rev Biochem 73: 749-89.

Hoffman, G. R. und R. A. Cerione (2002). Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. FEBS Lett 513(1): 85-91.

Horii, Y., J. F. Beeler, K. Sakaguchi, M. Tachibana und T. Miki (1994). A novel oncogene, ost, encodes a guanine nucleotide exchange factor that potentially links Rho and Rac signaling pathways. Embo J 13(20): 4776-86.

Hubberstey, A. V. und E. P. Mottillo (2002). Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. Faseb J 16(6): 487-99.

Huff, T., C. S. Muller, A. M. Otto, R. Netzker und E. Hannappel (2001). beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. Int J Biochem Cell Biol 33(3): 205-20.

Husi, H., M. A. Ward, J. S. Choudhary, W. P. Blackstock und S. G. Grant (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. Nat Neurosci 3(7): 661-9.

Jaffe, A. B. und A. Hall (2002). Rho GTPases in transformation and metastasis. Adv Cancer Res 84: 57-80.

Janssen, K. P. und M. Schleicher (2001). *Dictyostelium discoideum*: a genetic model system for the study of professional phagocytes. Profilin, phosphoinositides and the lmp gene family in *Dictyostelium*. Biochim Biophys Acta 1525(3): 228-33.

Jenne, N., R. Rauchenberger, U. Hacker, T. Kast und M. Maniak (1998). Targeted gene disruption reveals a role for vacuolin B in the late endocytic pathway and exocytosis. J Cell Sci 111 (Pt 1): 61-70.

Jordan, J. D., E. M. Landau und R. Iyengar (2000). Signaling networks: the origins of cellular multitasking. Cell 103(2): 193-200.

Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai und K. C. Holmes (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. Nature 347(6288): 37-44.

Kakugo, A., K. Shikinaka, K. Matsumoto, J. P. Gong und Y. Osada (2003). Growth of large polymer-actin complexes. Bioconjug Chem 14(6): 1185-90.

Kamijo, K., N. Ohara, M. Abe, T. Uchimura, H. Hosoya, J. S. Lee und T. Miki (2006). Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation. Mol Biol Cell 17(1): 43-55.

Katzav, S., D. Martin-Zanca und M. Barbacid (1989). vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. Embo J 8(8): 2283-90.

Kholodenko, B. N. (2006). Cell-signalling dynamics in time and space. Nat Rev Mol Cell Biol 7(3): 165-76.

Knetsch, M. L., N. Schafers, H. Horstmann und D. J. Manstein (2001). The *Dictyostelium* Bcr/Abr-related protein DRG regulates both Rac- and Rab-dependent pathways. Embo J 20(7): 1620-9.

Korn, E. D. (1982). Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. Physiol Rev 62(2): 672-737.

Kozma, R., S. Ahmed, A. Best und L. Lim (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. Mol Cell Biol 15(4): 1942-52.

Kuznetsov, S. A., G. M. Langford und D. G. Weiss (1992). Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. Nature 356(6371): 722-5.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680-5.

Lariviere, R. C. und J. P. Julien (2004). Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. J Neurobiol 58(1): 131-48.

Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson und D. G. Higgins (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23(21): 2947-8.

Lee, E., D. J. Seastone, E. Harris, J. A. Cardelli und D. A. Knecht (2003). RacB regulates cytoskeletal function in *Dictyostelium* spp. Eukaryot Cell 2(3): 474-85.

Lehrach, H., D. Diamond, J. M. Wozney und H. Boedtker (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry 16(21): 4743-51.

Letunic, I., R. R. Copley, S. Schmidt, F. D. Ciccarelli, T. Doerks, J. Schultz, C. P. Ponting und P. Bork (2004). SMART 4.0: towards genomic data integration. Nucleic Acids Res 32(Database issue): D142-4.

Li, H. Y., K. Cao und Y. Zheng (2003). Ran in the spindle checkpoint: a new function for a versatile GTPase. Trends Cell Biol 13(11): 553-7.

Linder, S. und M. Aepfelbacher (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. Trends Cell Biol 13(7): 376-85.

Liu, X., H. Wang, M. Eberstadt, A. Schnuchel, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, J. M. Schkeryantz, D. A. Janowick, J. E. Harlan, E. A. Harris, D. E. Staunton und S. W. Fesik (1998). NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio. Cell 95(2): 269-77.

Ludbrook, S. B., J. F. Eccleston und M. Strom (1997). Cloning and characterization of a rhoGAP homolog from *Dictyostelium discoideum*. J Biol Chem 272(25): 15682-6.

Lund, O., M. Nielsen, C. Lundegaard, P. Worning (2002). CPHmodels 2.0: X3M a Computer Program to Extract 3D Models. Abstract at the CASP5 conferenceA102.

Maina, C. V., P. D. Riggs, A. G. Grandea, 3rd, 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.

Mandelkow, E. und E. M. Mandelkow (1989). Microtubular structure and tubulin polymerization. Curr Opin Cell Biol 1(1): 5-9.

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.

Menkel, A. R., M. Kroemker, P. Bubeck, M. Ronsiek, G. Nikolai und B. M. Jockusch (1994). Characterization of an F-actin-binding domain in the cytoskeletal protein vinculin. J Cell Biol 126(5): 1231-40.

Michiels, F., G. G. Habets, J. C. Stam, R. A. van der Kammen und J. G. Collard (1995). A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. Nature 375(6529): 338-40.

Miki, T., C. L. Smith, J. E. Long, A. Eva und T. P. Fleming (1993). Oncogene ect2 is related to regulators of small GTP-binding proteins. Nature 362(6419): 462-5.

Murray, J. W. und A. W. Wolkoff (2003). Roles of the cytoskeleton and motor proteins in endocytic sorting. Adv Drug Deliv Rev 55(11): 1385-403.

Newell, P. C., A. Telser und M. Sussman (1969). Alternative developmental pathways determined by environmental conditions in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. J Bacteriol 100(2): 763-8.

Nobes, C. D. und A. Hall (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell 81(1): 53-62.

Noegel, 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., F. Rivero, R. Albrecht, K. P. Janssen, J. Kohler, C. A. Parent und M. Schleicher (1999). Assessing the role of the ASP56/CAP homologue of *Dictyostelium discoideum* and the requirements for subcellular localization. J Cell Sci 112 (Pt 19): 3195-203.

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.

Ono, S. (2007). Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. Int Rev Cytol 258: 1-82.

Otey, C. A. und O. Carpen (2004). Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. Cell Motil Cytoskeleton 58(2): 104-11.

Park, K. C., F. Rivero, R. Meili, S. Lee, F. Apone und R. A. Firtel (2004). Rac regulation of chemotaxis and morphogenesis in *Dictyostelium*. Embo J 23(21): 4177-89.

Pasqualato, S., L. Renault und J. Cherfils (2002). Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. EMBO Rep 3(11): 1035-41.

Pereira-Leal, J. B. und M. C. Seabra (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. J Mol Biol 313(4): 889-901.

Popowicz, G. M., M. Schleicher, A. A. Noegel und T. A. Holak (2006). Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. Trends Biochem Sci 31(7): 411-9.

Raftopoulou, M. und A. Hall (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. Dev Biol 265(1): 23-32.

Raper, K. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. J. Agr. Res. 50,135-147.

Rauchenberger, R., U. Hacker, J. Murphy, J. Niewohner und M. Maniak (1997). Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. Curr Biol 7(3): 215-8.

Repasky, G. A., E. J. Chenette und C. J. Der (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? Trends Cell Biol 14(11): 639-47.

Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. Trends Cell Biol 16(10): 522-9.

Ridley, A. J. und A. Hall (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell 70(3): 389-99.

Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann und A. Hall (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell 70(3): 401-10.

Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons und A. R. Horwitz (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. Science 302(5651): 1704-9.

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.

Rivero, F., H. Dislich, G. Glockner und A. A. Noegel (2001). The *Dictyostelium discoideum* family of Rho-related proteins. Nucleic Acids Res 29(5): 1068-79.

Rivero, F. und B. P. Somesh (2002). Signal transduction pathways regulated by Rho GTPases in *Dictyostelium*. J Muscle Res Cell Motil 23(7-8): 737-49.

Rossman, K. L., C. J. Der und J. Sondek (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat Rev Mol Cell Biol 6(2): 167-80.

Rost, B. und C. Sander (1994). Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. Proteins 19(1): 55-72.

Sahai, E. und C. J. Marshall (2002). RHO-GTPases and cancer. Nat Rev Cancer 2(2): 133-42.

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230(4732): 1350-4.

Sambrook, J., T. Maniatis und E. F. Fritsch (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanders, M. C., A. L. Goldstein und Y. L. Wang (1992). Thymosin beta 4 (Fx peptide) is a potent regulator of actin polymerization in living cells. Proc Natl Acad Sci U S A 89(10): 4678-82.

Schleicher, M., B. Andre, C. Andreoli, L. Eichinger, M. Haugwitz, A. Hofmann, J. Karakesisoglou, M. Stockelhuber und A. A. Noegel (1995). Structure/function studies on cytoskeletal proteins in *Dictyostelium* amoebae as a paradigm. FEBS Lett 369(1): 38-42.

Schleicher, M., Gerisch, G.,Isenberg, G. (1984). New actin binding proteins from *Dictyostelium discoideum*. EMBO J 3: 2095-2100.

Schmidt, A. und A. Hall (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. Genes Dev 16(13): 1587-609.

Seastone, D. J., E. Lee, J. Bush, D. Knecht und J. Cardelli (1998). Overexpression of a novel rho family GTPase, RacC, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. Mol Biol Cell 9(10): 2891-904.

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(1 Pt 1): 287-95.

Soisson, S. M., A. S. Nimnual, M. Uy, D. Bar-Sagi und J. Kuriyan (1998). Crystal structure of the Dbl and pleckstrin homology domains from the human Son of sevenless protein. Cell 95(2): 259-68.

Somlyo, A. V., A. S. Khromov, M. R. Webb, M. A. Ferenczi, D. R. Trentham, Z. H. He, S. Sheng, Z. Shao und A. P. Somlyo (2004). Smooth muscle myosin: regulation and properties. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 359(1452): 1921-30.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98(3): 503-17.

Stamnes, M. (2002). Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport. Curr Opin Cell Biol 14(4): 428-33.

Stock, A., M. O. Steinmetz, P. A. Janmey, U. Aebi, G. Gerisch, R. A. Kammerer, I. Weber und J. Faix (1999). Domain analysis of cortexillin I: actin-bundling, PIP(2)-binding and the rescue of cytokinesis. Embo J 18(19): 5274-84.

Stradal, T., W. Kranewitter, S. J. Winder und M. Gimona (1998). CH domains revisited. FEBS Lett 431(2): 134-7.

Strehle, A., M. Schleicher und J. Faix (2003). Characterisation of Trix, a novel Rho guanine-nucleotide exchange factor in *Dictyostelium discoideum*. Eur J Cell Biol 82(Suppl. 53): 75.

Strehle, A., M. Schleicher und J. Faix (2006). Trix, a novel Rac guanine-nucleotide exchange factor from *Dictyostelium discoideum* is an actin-binding protein and accumulates at endosomes. Eur J Cell Biol 85(9-10): 1035-45.

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 beta 2-microglobulin. Proc Natl Acad Sci U S A 78(11): 6613-7.

Summerscales, J. und J. F. Dawson (2004). Probing *Dictyostelium* severin structure and function by cross linking to actin. Biochem Cell Biol 82(2): 343-50.

Takahashi, K., K. Hiwada und T. Kokubu (1988). Vascular smooth muscle calponin. A novel troponin T-like protein. Hypertension 11(6 Pt 2): 620-6.

Tcherkezian, J. und N. Lamarche-Vane (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. Biol Cell 99(2): 67-86.

Toksoz, D. und D. A. Williams (1994). Novel human oncogene lbc detected by transfection with distinct homology regions to signal transduction products. Oncogene 9(2): 621-8.

Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G.

Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh und X. Zhu (2001). The sequence of the human genome. Science 291(5507): 1304-51.

Vicker, M. G. (2002). Eukaryotic cell locomotion depends on the propagation of self-organized reaction-diffusion waves and oscillations of actin filament assembly. Exp Cell Res 275(1): 54-66.

Vieira, J. und J. Messing (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19(3): 259-68.

Vithalani, K. K., C. A. Parent, E. M. Thorn, M. Penn, D. A. Larochelle, P. N. Devreotes und A. De Lozanne (1998). Identification of darlin, a *Dictyostelium* protein with Armadillo-like repeats that binds to small GTPases and is important for the proper aggregation of developing cells. Mol Biol Cell 9(11): 3095-106.

Way, M., B. Pope und A. G. Weeds (1992). Evidence for functional homology in the F-actin binding domains of gelsolin and alpha-actinin: implications for the requirements of severing and capping. J Cell Biol 119(4): 835-42.

Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. Cell 112(4): 441-51.

Welte, M. A. (2004). Bidirectional transport along microtubules. Curr Biol 14(13): R525-37.

Wennerberg, K., K. L. Rossman und C. J. Der (2005). The Ras superfamily at a glance. J Cell Sci 118(Pt 5): 843-6.

Whitehead, I., H. Kirk und R. Kay (1995 a). Retroviral transduction and oncogenic selection of a cDNA encoding Dbs, a homolog of the Dbl guanine nucleotide exchange factor. Oncogene 10(4): 713-21.

Whitehead, I., H. Kirk, C. Tognon, G. Trigo-Gonzalez und R. Kay (1995 b). Expression cloning of lfc, a novel oncogene with structural similarities to guanine nucleotide exchange factors and to the regulatory region of protein kinase C. J Biol Chem 270(31): 18388-95.

Whitehead, I. P., S. Campbell, K. L. Rossman und C. J. Der (1997). Dbl family proteins. Biochim Biophys Acta 1332(1): F1-23.

Williams, K. L. und P. C. Newell (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. Genetics 82(2): 287-307.

Witke, W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. Trends Cell Biol 14(8): 461-9.

Witke, W., W. Nellen und A. A. Noegel (1987). Homologous recombination in the *Dictyostelium* alpha-actinin gene leads to an altered mRNA and lack of the protein. Embo J 6(13): 4143-8.

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.

Yamaguchi, H. und J. Condeelis (2006). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. Biochim Biophys Acta.

Yamashita, A., K. Maeda und Y. Maeda (2003). Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. Embo J 22(7): 1529-38.

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.

Zerial, M. und H. McBride (2001). Rab proteins as membrane organizers. Nat Rev Mol Cell Biol 2(2): 107-17.

Zhang, B., Y. Zhang, Z. Wang und Y. Zheng (2000). The role of Mg2+ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. J Biol Chem 275(33): 25299-307.

Zheng, Y. (2004). G protein control of microtubule assembly. Annu Rev Cell Dev Biol 20: 867-94.

Zhu, K., B. Debreceni, R. Li und Y. Zheng (2000). Identification of Rho GTPase-dependent sites in the Dbl homology domain of oncogenic Dbl that are required for transformation. J Biol Chem 275(34): 25993-6001.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: GDP-GTP-Zyklus der kleinen GTPasen 8

Abbildung 2: Funktionszyklus stimulierender heterotrimerischer G-Proteine und GTP-bindender Moleküle bei der Proteinsynthese. 10

Abbildung 3: Entwicklungszyklus von *D. discoideum*. 13

Abbildung 4: CDNA Sequenz von Trix mit abgeleiteter Proteinsequenz. 51

Abbildung 5: Klonierung der kodierenden Sequenz von Trix 53

Abbildung 6: Domänenarchitektur von Trix (AM181592) 55

Abbildung 7: Phylogenetische Gruppierung bereits definierter Calponin-Homologie-Sequenzen der Typen 1-5 und der Calponin-Homologie-Sequenzen aus Trix auf der Basis von Sequenzhomologien 57

Abbildung 8: Sequenzalignment der Trix Dbl-Homologie-Domäne und homologer Sequenzen 60

Abbildung 9: Errechnete Tertiärstruktur für die Dbl-Homologie-Domäne von Trix als Schleifenmodell und Oberflächenmodell 62

Abbildung 10: Expression und Aufreinigung von Trix-Fragmenten als MBP-Fusionsproteine 63

Abbildung 11: Die drei CH-Domänen von Trix binden und bündeln Aktinfilamente. 64

Abbildung 12: Fluoreszenzspektroskopische Messung der GDP/MANT-GDP-Austauschaktivität 66

Abbildung 13: Westernblotanalyse der Expression von Trix während des *D. discoideum* Entwicklungszyklus 67

Abbildung 14: Expression der ersten CH-Domäne als GFP-Fusionsprotein in AX2-Wildtypzellen 68

Abbildung 15: Das vollständige Trix-Protein als GFP-Fusionsprotein in lebenden AX2-Wildtypzellen 69

Abbildung 16: Lokalisation der drei CH-Domänen von Trix während der Phagozytose als GFP-Fusionsprotein in AX2-Zellen 70

Abbildung 17: Disruption des Gens mit homologer Rekombination eines Knockout-Konstrukts und Bestätigung der Disruption durch Amplifikation der veränderten Gensequenz 72

Abbildung 18: Morphologievergleich von unstimulierten Trix$^-$-Mutanten und AX2-Zellen 73

Abbildung 19: Aktin-Phalloidin-Färbung an Pikrinsäure fixierten AX2-Wildtypzellen und Trix$^-$-Mutanten 74

Abbildung 20: Unstimulierte Trix$^-$-GFP-Aktin-Mutanten zeigen Polymerisationswellen von Aktin 76

Abbildung 21: Prozentuale Verteilung von Zellen nach Anzahl der Zellkerne 77

Abbildung 22: Wachstumsgeschwindigkeit und Phagozytoseverhalten von Trix$^-$-Mutanten und AX2-Wildtypzellen 78

Abbildung 23: Der Entwicklungszyklus von Trix$^-$-Zellen und AX2-Wildtypzellen auf Phosphatagarplatten 79

Abbildung 24: Expression der Markerproteine MUD1 und Contact Site A während des Entwicklungszyklus 80

Abbildung 25: Phototaxisassay nach Stimulation durch eine randständige Lichtquelle....81

Abbildung 26: Chemotaktische Stimulation von Zellen in Flüssigmedium....81

Abbildung 27: Phagozytose von markierten Hefezellen und Exozytoserate von TRITC-Dextran 82

Tabelle 1: Lokalisation der Domänen in der abgeleiteten Proteinsequenz von Trix 54

7 ABKÜRZUNGEN

A	
A	Ampere
Abb.	Abbildung(en)
ad.	auf
A	Adenosin, Desoxyadenosin
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
autokl.	autoklaviert
B	
bid.	bidestilliert
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	
C	Cytidin, Desoxycytidin
c	Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophoshat (cyclic Adenosinetriphosphate)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
°C	Grad Celsius
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)
cm	Zentimeter
C-term.	carboxyterminal
D	
3D	dreidimensional
d	Tag(e)
Da	Dalton
D.d./DD	*Dictyostelium discoideum*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleinacid)
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
E	
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
evtl.	eventuell
F	
F-Actin	filamentöses Actin
G	
G	Guanosin, Desoxyguanosin
g	Gramm oder Vielfaches der Erdbeschleiniging
G418	Geneticin 418
G-Actin	globuläres Actin
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
H	
H. sapiens	Homo sapiens
h	Stunde

H His-Tag	Peptid mit 6 Histidin-Resten, bindet an $Ni2^+$
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazid - N'-ethansulfonsäure
HA	Hydroxyapatit
H2O	Wasser
I	
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalacto-Pyranosid
in vitro	'im Reagenzglas'
in vivo	'im lebenden Organismus'
K	
kB	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	
l	Liter
LMW	Low Molecular Weight
M	
M	molar, Mol/Liter
mA	Milliampere
MANT	2'(3')-O-(N-Methylanthraniloyl)
mAk	monoklonaler Antikörper
max.	maximal
mg	Milligramm
µF	Mikrofarad
µl	Mikroliter
µM	mikromolar, Mikromol/Liter
µm	Mikrometer
min	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	millimolar, Millimol/Liter
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MW	Molekulargewicht
N	
Nt	Nukleotide
N-term.	aminoterminal
O	
OD	Optische Dichte
P	
P	Pellet
p. a.	*per analysis* (zur Analyse)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper (polyclonal Antibody)
PCR	Polymerasekettenreaktion Polymerase Chain Reaction
R	
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannte
s. u.	siehe unten
T	
T	Temperatur

t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
tRNA	Transfer RNA
U	
u. a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
Üs	Überstand
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	
V	Volt
vgl.	vergleiche
Varia	
~	etwa
×	fach, z.B. '2 ×' = zweifach;
>	größer
<	kleiner
#	Nummer
%	Prozent

LEBENSLAUF

Axel Strehle

Geboren am 07.02.1977 in Höchstädt a. d. Donau

Schulbildung:

1987 – 1997	Gymnasium Donauwörth, Abitur 1997
1994 – 1995	Austauschschuljahr an der Paintsville Highschool, KY, USA

Zivildienst

1997 – 1998	Pflegedienst im Klinikum Josephinum, München

Medizinstudium

1999 – 2001	Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt, Physikum 2001
2001 – 2004	Technische Universität München, Staatsexamen 2002 und 2004
2004 – 2005	Ludwig-Maximilians-Universität München, drittes Staatsexamen 2005

Promotion

2002 – 2005	Adolf-Butenandt-Institut für Zellbiologie der LMU München, bei Prof. Dr. rer. nat. M. Schleicher, Mitbetreuung PD Dr. rer. nat. J. Faix

Facharztausbildung

seit 2006	Medizinische Klinik II, Kardiologie und Pulmologie, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin, bei Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiss

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich herzlich Prof. Dr. Michael Schleicher für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten und für seine großzügige und geduldige Unterstützung der Doktorarbeit zu jeder Zeit. Einen herzlichen Dank auch für seine sehr freundschaftliche Betreuung mit unermüdlicher Bereitschaft zur Antwort auf alle Fragen, zur Diskussion und zum Rat in vielen fachlichen und darüber hinausgehenden Dingen.

Ich danke besonders auch Herrn Prof. Dr. Manfred Schliwa für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Institut und für eine immer freundliche Atmosphäre.

Meinem Betreuer PD Dr. Jan 'Hans' Faix, der mich mit seiner Erfahrung und seinen Ideen angeleitet hat, gebührt der Dank für das Fortkommen der Arbeit. Ohne sein Geschick, seinen Eifer und Ergeiz, die mich sehr beeindruckt haben, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Besonders lieben Dank für die engagierten täglichen Lehrstunden für einen fachfremden Schützling und für den Witz und geistreichen Humor während der Labortage.

Vielen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter des Labors die mir mit Rat und Tat beim Kultivieren der Zellen, bis zum Umgang mit Computern stets hilfreich zur Seite standen, an Daniela Rieger und Marc Borath, an Drs. und Doktoranden Rajesh Arasada, Annette Vogel, Lars Israel, Meino Rohlfs, René Rost, Jibi Jacob, Nagendran Ramalingam, Andreas Schneider und Christian Horn. PD Dr. Ralph Gräf danke ich für die zahlreichen nützlichen Tipps und speziell die Unterweisungen am konfokalen Mikroskop. Vielen Dank an Dr. Mario Gimona für seine Hilfe als Fachmann für Calponin-Homologie-Domänen.

Jibi, Rajesh und Nagendran danke ich auch für ein geweckte Interesse an ihrem wunderbaren Indien.

Den guten Geistern des Labors Maria und Sepp ein großes Dankeschön für ihre Hilfe.

Vielen Dank der unvergleichlichen Dorit Schlimbach für die Korrekturen am Text.

Ein herzliches Dankeschön sage ich meinen Eltern, deren Unterstützung mich im Studium immer begleitet hat, die mir stets Vorbild sind und denen diese Arbeit gewidmet ist.

Danke auch allen Freunden und Verwandten die meinen Weg bis hierher begleitet haben.