

**Manipulation der Aktin-Hülle später Endosomen
durch ektopisches Protein-Targeting
und
Etablierung einer *in vivo*-Hierarchie cytoplasmatischer
Targeting-Signalstärken**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich 18 Naturwissenschaften
der Universität Kassel**

**vorgelegt von Christian Schmauch
Kassel, im Mai 2007**

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als in der Dissertation angegeben Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, im Mai 2007

Christian Schmauch

Publikationen:

Während der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden Beiträge zu folgenden, im Text zitierten, Veröffentlichungen beigesteuert:

Kypri, E., C. Schmauch, M. Maniak, and A. De Lozanne. 2007. The BEACH protein LvsB is localized on lysosomes and postlysosomes and limits their fusion with early endosomes. *Traffic*. in press.

Wienke, D., A. Drengk, C. Schmauch, N. Jenne, and M. Maniak. 2006. Vacuolin, a flotillin/reggie-related protein from *Dictyostelium* oligomerizes for endosome association. *Eur J Cell Biol.* 85:991-1000.

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

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Der endocytotische Transit in <i>Dictyostelium discoideum</i>	1
1.1.1. Initiale Ereignisse der Endocytose	2
1.1.2. Die Internalisierung an der Plasmamembran	4
1.1.3. Die frühe, saure Phase	5
1.1.4. Die späte neutrale Phase	6
1.1.5. Die Exocytose	7
1.1.6. Vacuolin	8
1.1.7. Mögliche Funktionen der endosomalen Aktin-Hülle	10
1.2. Aktin und Aktin-interagierende Proteine	12
1.2.1. Cofilin und DAip1	14
1.2.2. Coronin	15
1.2.3. ABP34	17
1.2.4. VASP	17
1.3. Proteinsortierung in der Zelle	20
1.3.1. Peroxisomales Targeting	22
1.3.2. Proteinimport in den Kern	24
1.4. Aufgabenstellung	26
2. Ergebnisse Teil I – Manipulation der Aktin-Hülle später Endosomen durch ektopisches Protein-Targeting	27
2.1. Targeting von DAip1 an späte Endosomen	27
2.1.1. Das Vac-Myc-DAip1-Hybrid rekrutiert Cofilin an die endosomale Membran und depolymerisiert deren Aktin-Hülle	29
2.1.2. Die Expression des Vac-Myc-DAip1-Hybrids induziert eine Verzögerung im endocytotischen Transit der Zellen	32
2.1.3. Die Sekretion lysosomaler Hydrolasen ist in Vac-Myc-DAip1-Zellen reduziert	33
2.2. Targeting von Coronin an späte Endosomen	34
2.2.1. Die Sekretion lysosomaler Enzyme in den Vac-Myc-Cor-Mutanten	37
2.3. Targeting von Scar an die endosomale Membran	37
2.4. Targeting von ABP34 an späte Endosomen	39
2.4.1. Die Sekretion lysosomaler Enzyme in Vac-Myc-ABP34-Mutanten	41
2.5. Targeting von VASP an späte Endosomen	42
2.5.1. Die Expression des Vac-Myc-VASP Hybrids induziert die Ausbildung F-Aktin angereicherter Strukturen	44
2.5.2. Zellen mit Aktin-Bällen weisen einen erhöhten F-Aktin-Gehalt auf	46
2.5.3. Der Effekt Aktin-depolymerisierender Drogen	49
2.5.4. Die starke Expression des Vac-Myc-VASP-Hybrids induziert unterschiedliche Wachstumsdefekte	50
2.5.5. Die Aktin-Bälle sind vom Endocytoseweg der Zelle entkoppelt	52
2.5.6. Die Ausbildung von Aktin-Bällen reduziert die Endocytoserate	56
2.5.7. Vorläufiges Modell zur Entstehung der Aktin-Bälle	57
2.6. Targeting von VASP an die Membran neu gebildeter Endosomen	59
3. Diskussion Teil I	63
3.1. Die Wirkung des Vac-Myc-DAip1-Hybrids auf Vorgänge des endocytotischen Transits	63
3.2. Coronin an späten Endosomen	65
3.3. Versuche zur Verstärkung der endosomalen Aktin-Hülle	67
3.4. ABP34 induziert keine offensichtlichen Veränderungen an späten Endosomen	69
3.5. VASP an endosomalen Membranen	70
3.5.1. Sind die Aktin-Bälle Hirano Bodies?	71
3.5.2. Mögliche Mechanismen der VASP-induzierten Aktin-Polymerisation	72
3.5.3. Späte Endosomen und Aktin-Bälle	73
3.5.4. VASP an frühen Endosomen	75

4.	Ergebnisse Teil II - Etablierung einer <i>in vivo</i> -Hierarchie cytoplasmatischer Targeting-Signalstärken	77
4.1.	Targeting von Coronin in den Kern.....	78
4.2.	Targeting von ABP34 in die peroxisomale Matrix	79
4.3.	Targeting von Cofilin in die peroxisomale Matrix	81
4.3.1.	Die Lokalisation von DAip1 in Myc-Cof-PTS1-Zellen	82
4.4.	Vacuolin-PTS1-Konstrukte	82
5.	Diskussion Teil II.....	85
5.1.	Grundannahmen des Hybridprotein-Ansatzes.....	85
5.2.	Einordnung des SV40-NLS	86
5.3.	Einordnung des PTS1	87
5.4.	Unterschiede im peroxisomalen Import-Verhalten von ABP34 und Cofilin.....	88
5.5.	Vergleich der <i>in vivo</i> ermittelten Targeting-Potenzial-Hierarchie mit <i>in vitro</i> -Daten	89
6.	Zusammenfassung	91
7.	Material	93
7.1.	Geräte.....	93
7.2.	Verbrauchsmaterialien	94
7.3.	Reagenzien.....	95
7.4.	Puffer und Lösungen.....	97
7.5.	Medien	101
7.5.1.	<i>Escherichia coli</i> -Medien	101
7.5.2.	<i>Dictyostelium discoideum</i> -Medien.....	102
7.6.	Enzyme und Kits	103
7.7.	Längen- und Größenstandards	104
7.8.	Plasmide	104
7.9.	Oligonukleotide	108
7.10.	Antikörper	109
7.10.1.	Monoklonale Primär-Antikörper	109
7.10.2.	Polyklonale Primär-Antikörper	109
7.10.3.	Sekundär-Antikörper	109
7.11.	Fluoreszenzfarbstoffe.....	109
7.12.	Biologische Stämme	110
7.13.	Online-Programme.....	110
8.	Methoden	111
8.1.	Molekularbiologische Methoden.....	111
8.1.1	Präparation von DNA	111
8.1.1.1.	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	111
8.1.1.2.	Midipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	111
8.1.1.3.	Präparation chromosomaler DNA aus <i>D. discoideum</i>	111
8.1.2.	Aufreinigung, Anreicherung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	112
8.1.2.1.	Ethanol-fällung.....	112
8.1.2.2.	Isopropanol-fällung	112
8.1.2.3.	PCIA-Extraktion.....	112
8.1.2.4.	DNA-Aufreinigungs-Kits.....	113
8.1.2.5.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	113
8.1.2.6.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	113
8.1.2.7.	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	114
8.1.3	Enzymatische Reaktionen.....	114
8.1.3.1.	DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen	114
8.1.3.2.	Die Erzeugung von „blunt ends“	114
8.1.3.3.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	114
8.1.3.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	115
8.1.3.5.	Ligation von DNA-Fragmenten	116
8.1.3.6.	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	117
8.1.3.7.	DNA-Sequenzierung.....	117

8.2.	Transformationstechniken	119
8.2.1.	Bakterielle Transformationstechniken	119
8.2.1.1.	Herstellung kompetenter Bakterienzellen nach der Mehr-Ionen-Technik	119
8.2.1.2.	Hitzeschock-Transformation	119
8.2.1.3.	Elektroporation	120
8.2.2.	Transformationstechniken für <i>Dictyostelium discoideum</i>	120
8.2.2.1.	Klassische Transformation	120
8.2.2.2.	Elektroporation	121
8.3.	Zellkultur und Endocytose-Assays	122
8.3.1	Anzucht in Flüssigmedium	122
8.3.2.	Subklonierung von Transformanden	122
8.3.3.	Sporengewinnung und Konservierung	122
8.3.4.	Bestimmung der Phagocytoseaktivität, Phagocytose-Assay.....	123
8.3.4.1.	Herstellung TRITC-markierter Hefen	123
8.3.5.	Bestimmung der Pinocytoseaktivität, Pinocytose-Assay	124
8.3.6.	Transit-Assay	125
8.4.	Mikroskopische Methoden	125
8.4.1.	Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen	125
8.4.2.	Fixierung und Präparation von Zellen für die Immunfluoreszenz	125
8.4.3.	Beobachtung und Dokumentation Fluoreszenz-markierter Zellen	126
8.4.4.	Präparation von Dictyostelium-Zellen für die TEM	127
8.5.	Proteinbiochemische Methoden.....	128
8.5.1.	Entnahme und Vorbereitung von Proteinproben	128
8.5.2.	Gesamtproteinextraktion aus Dictyostelium-Zellen	128
8.5.3.	Proteinmengen-Bestimmung mit Pierce BCA-Kit	128
8.5.4.	Präparation des Triton-unlöslichen Cytoskeletts	129
8.5.5.	PAGE, Westernblot und der Nachweis von Proteinen	129
8.5.5.1.	Herstellen von Polyacrylamidgelen.....	129
8.5.5.2.	Westernblot	130
8.5.5.3.	Immundetektion von Proteinen	131
8.5.5.4.	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	131
8.5.6.	Enzym-Aktivitätsmessungen	131
9.	Literaturverzeichnis	133
10.	Danksagungen	146

1. Einleitung

1.1. Der endocytotische Transit in *Dictyostelium discoideum*

Unter Endocytose wird allgemein die vesikuläre Aufnahme von Partikeln, Makromolekülen und Flüssigkeit gemeinsam mit Plasmamembran-Komponenten in das Zellinnere zusammengefasst (Cohn *et al.*, 1963). Man unterscheidet dabei zwischen den beiden Formen Phagozytose und Pinocytose. Unter Phagozytose wird die Aufnahme von Partikeln, wie beispielsweise Mikroorganismen verstanden. Die Pinocytose umfasst die Aufnahme von Flüssigkeit zusammen mit darin gelösten Makromolekülen und Salzen. Während die Pinocytose unter eukaryotischen Zellen ein weit verbreiteter Prozess ist, bleibt die Möglichkeit der Phagozytose nur wenigen Zelltypen vorbehalten. Zu diesen als Phagozyten bezeichneten Zellen gehören neben Vertretern des Immunsystems von Säugern, wie beispielsweise Neutrophile oder Makrophagen, auch die Bodenamoeben der Gattung *Dictyostelium*.

Dictyostelium discoideum zählt zur Klasse der Mycetozoa, die sich evolutionär zwischen der Aufspaltung von Pflanzen und Tieren, aber noch vor Entstehung der Pilze herausbildete (Baptiste *et al.*, 2002, Eichinger *et al.*, 2005). Das natürliche Habitat dieser amöboiden Einzelzellen ist die Humusschicht der Wälder, in der sie sich durch Phagozytose chemotaktisch aufgespürter Bakterien ernähren. Die Vermehrung in diesem als vegetativ bezeichneten Abschnitt des Lebenszyklus erfolgt mitotisch. Ist die Nahrungsquelle erschöpft, wird in den Zellen ein Entwicklungsprogramm eingeleitet. Durch die Ausschüttung periodischer cAMP-Pulse entsteht in einer chemotaktischen Reaktion ein Pseudoplasmodium aus bis zu 100.000 aggregierten Zellen (Bonner & Hoffman, 1963). In einer mehrstündigen Entwicklung erfolgt über definierte Zwischenstadien die Ausbildung eines Fruchtkörpers, der sich aus unterschiedlich differenzierten Zellen, den Stiel- und den Sporenzellen, zusammensetzt. Die in dem Fruchtkörper enthaltenen Sporen stellen eine beständige Überdauerungsform dar, aus der unter günstigen Umweltbedingungen erneut amöboide Einzelzellen auskeimen.

Der in der vorliegenden Arbeit als Wildtyp bezeichnete Stamm AX-2 erlangte durch Mutagenese die Fähigkeit, axenisch, also durch Aufnahme von standardisiertem Flüssigmedium, zu wachsen (Watts & Ashworth, 1970). Die Flüssigkeitsaufnahme dieser Zellen ist dabei gegenüber der des Wildtyps NC-4 um das Sechzigfache erhöht, wobei die Befähigung zur Phagozytose in den Zellen nahezu unverändert ist (Clarke & Kayman, 1987; Aguado-Velasco & Bretscher, 1999). Die gesteigerte Flüssigkeitsaufnahme wird über den Prozess der Makropinocytose bewirkt, der sich von der Clathrin vermittelten (Mikro-) Pinocytose vor allem durch die Beteiligung von Aktin während der Internalisierung, sowie durch die Größe der sich abschnürenden Endosomen unterscheidet. Diese liegt mit einem

Durchmesser von bis zu $>2 \mu\text{m}$ deutlich über der mit $<500 \text{ nm}$ angegebenen Größe Clathrin umhüllter Vesikel (Hacker *et al.*, 1997). Anders als Phagozyten aus Säugern vollführt *D. discoideum* einen endocytotischen Transit an dessen Ende die obligatorische Abgabe unverdauter Überreste in den extrazellulären Raum steht (Padh *et al.*, 1993). Die einzelnen Schritte dieses Endocytosewegs sollen nachfolgend genauer beschrieben werden.

1.1.1. Initiale Ereignisse der Endocytose

Obwohl sich Phagozytose und Makropinocytose in *D. discoideum* morphologisch stark ähneln, werden beide Prozesse zumindest zum Teil unterschiedlich reguliert. Während die Makropinocytose ohne offensichtlichen Stimulus erfolgt, wird für die Phagozytose die Beteiligung von Rezeptoren postuliert. Derzeit werden mehrere Kandidaten als potentielle Rezeptoren diskutiert. Bei allen Kandidaten handelt es sich um Transmembranproteine, deren jeweilige Defizienz in den korrespondierenden Zellen Defekte in der Zelladhäsion und in der Phagozytose bewirkt. Namentlich sind das Phg1 (Cornillon *et al.*, 2000), sadA (substrate adhesion deficient; Fey *et al.*, 2002) und sibA (similar to integrin β; Cornillon *et al.*, 2006), wobei für sadA defiziente Zellen zusätzliche Defekte in der Cytokinese und in der Aktin-Organisation der Zellen beschrieben wurden. Ein verständliches Gesamtbild hat sich bislang allerdings noch nicht ergeben.

Eine essentielle Voraussetzung für die Internalisierung ist die Polymerisation von Aktin unterhalb der Plasmamembran, wodurch es zur Ausbildung von „Phagocytic Cups“ bzw. von „Crowns“ in der Makropinocytose kommt. Die Regulation, die diesem Prozess zugrunde liegt, ist für Dictyostelium im Detail noch wenig verstanden und wird zum jetzigen Zeitpunkt erneut diskutiert. In Säugern ist bekannt, dass die Phagozytose über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Mitglieder der Rho-Familie, wie Cdc42, reguliert wird (Simon, 2000). In Dictyostelium konnten jedoch keine entsprechenden Homologe dieser Säuger-Proteine identifiziert werden. Dennoch sprechen unterschiedliche Untersuchungen für die Beteiligung monomerer G-Proteine an der Regulation der endocytotischen Aufnahme, wenngleich sich auch hier noch kein einheitliches Bild ergibt. Beispielsweise zeigen die beiden Rho-Familienmitglieder RacF1 und RacG eine ähnliche Lokalisation und Dynamik an der Plasmamembran wie das Signalmolekül Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) und F-Aktin (Dormann *et al.*, 2004; Rupper, 2001c), so dass beide Proteine potentielle Mitglieder des Signalweges darstellen. Die Überexpression von RacG stimuliert außerdem die Phagozytose und dieser Effekt ist PI3-Kinase abhängig. Andererseits zeigen weder RacG noch RacF1 defiziente Zellen einen Defekt in der Phagozytose bzw. Makropinocytose (Rivero *et al.*, 1999b; Somesh *et al.*, 2006).

Neben dem Einfluss monomerer G-Proteine konnte auch die Beteiligung trimerer G-Proteine in der Phagozytose nachgewiesen werden. Dictyostelium besitzt 14 α -Untereinheiten aber

lediglich je eine β - und γ -Untereinheit (Eichinger *et al.*, 2005). Sowohl das Fehlen von $G\alpha_4$, als auch von $G\beta$ induziert eine drastische Abnahme der Phagozytoserate in den entsprechenden Zellen (Gotthardt *et al.*, 2006; Peracino *et al.*, 1998). Der in den $G\beta$ defizienten Zellen beobachtete Effekt geht jedoch nicht auf die fehlerhafte Ausbildung von Phagocytic Cups zurück, sondern beruht auf dem Ausbleiben der Schließung beziehungsweise der Abschnürung der gebildeten Cups in das Zellinnere (Peracino *et al.*, 1998). Den trimeren G-Proteinen kommt demnach eher eine nachgeschaltete Aufgabe während der Initiation der Endocytose zu.

In einem von Cardelli im Jahr 2001 veröffentlichten Übersichtsartikel wird die Verwendung unterschiedlicher Signalwege für Phagozytose und Makropinocytose postuliert. Den Ausgangspunkt beider Signalwege stellt darin Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat ($PI(4,5)P_2$) dar. Die Spaltung von $PI(4,5)P_2$ durch Phospholipase C in Diacylglycerol und Inositol-3,4,5-trisphosphat initiiert dabei die Phagozytose, wohingegen die Phosphorylierung durch PI3-Kinase-Aktivität zu $PI(3,4,5)P_3$ die Makropinocytose einleitet. Eine Grundvoraussetzung für dieses Modell war die Beobachtung, dass der Prozess der Phagozytose in Dictyostelium, anders als in Säugerzellen, unabhängig von PI3-Kinase-Aktivität stattfindet. Diese Annahme stützte sich auf die Beobachtungen zweier vorangegangener Untersuchungen. Zum einen führte der Doppelknockout von DdPIK1 und DdPIK2, zwei der insgesamt drei bekannten Klasse1 PI3-Kinasen in Dictyostelium, zu einer deutlichen Verringerung der Pinocytose-, nicht aber der Phagozytoserate (Zhou *et al.*, 1995; Buczynski *et al.*, 1997). Zum anderen wirkte sich der Einsatz der PI3-Kinase-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 inhibierend auf die Pinocytose aus, wobei auch hier unter den gegebenen Bedingungen kein Einfluss auf die Phagozytose zu beobachten war (Peracino *et al.*, 1998; Seastone *et al.*, 1998; Rupper *et al.*, 2001a). In einer neueren Untersuchung, in der höhere Konzentrationen des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 eingesetzt wurden, konnte dagegen eine deutliche, konzentrationsabhängige Inhibierung der Phagozytose nachgewiesen werden, wie sie auch für Säugerzellen beschrieben wurde (Dormann *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 1999). Unterstützt wird diese Beobachtung durch eine Untersuchung mit GFP markierten Phosphoinositid-spezifischen PH-Domänen. Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl während der Ausbildung von Crowns, als auch bei der Bildung von Phagocytic Cups eine starke Anreicherung des PI3-Kinase-Produkts $PI(3,4,5)P_3$ an den entsprechenden Membranbereichen auftritt, wobei benachbarte Bereiche der Plasmamembran nahezu frei von GFP-Markierungen waren. Das zeitliche Erscheinungsbild von PIP_3 korreliert außerdem mit der Dynamik von F-Aktin und dem Arp2/3-Komplex in Crowns und Phagocytic Cups (Dormann *et al.*, 2004). Zusammengenommen lassen diese Untersuchungen also auch bei der Initiation der Phagozytose auf eine Beteiligung von PI3-Kinase-Aktivität schließen, womit das von Cardelli, 2001 vorgestellte Modell zumindest teilweise zu überdenken ist.

1.1.2. Die Internalisierung an der Plasmamembran

Während die initiale Regulation der unterschiedlichen endocytotischen Prozesse noch kein einheitliches Bild ergibt, sind die nachfolgenden Schritte während der Internalisierung bereits genauer charakterisiert und verlaufen für Phagozytose und Makropinocytose weitestgehend ähnlich. Zur Aufnahme eines Partikels oder eines Flüssigkeitaliquots aus dem extrazellulären Raum, kommt es an den entsprechenden Stellen der Plasmamembran zu einer lokalen Umorganisation des kortikalen Aktin-Cytoskeletts. Eingeleitet wird dieser Prozess durch die Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes an die Plasmamembran. Zu den Proteinen, die an der Rekrutierung beteiligt sind, zählen vermutlich Scar/WASP (Seastone *et al.*, 2001; Ibarra *et al.*, 2005) und auch Vertreter der Klasse I Myosine, wie MyoIB, MyoIC oder MyoIE. Aus fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass der Rekrutierung von Arp2/3 in Crowns eine lokale Anreicherung von MyoIB vorausgeht (Clarke *et al.*, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MyoIB Bindungsstellen für Lipide und Aktin aufweist und darüber hinaus über Interaktion mit dem Adapterprotein CARMIL auch den Arp2/3-Komplex binden kann (Senda *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2001). Auch für MyoIE konnte eine Lokalisation in Phagocytic Cups und Crowns nachgewiesen werden. Die Überexpression von MyoIB, sowie von MyoIE induziert außerdem eine verringerte Pinocytose-Rate, wobei die Phagozytoserate in MyoIE defizienten Zellen erhöht ist (Novak & Titus, 1997; Dürrwang *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass MyoIB und MyoIC defiziente Zellen keine phänotypischen Veränderungen in der Pinocytose aufweisen, die doppeldefiziente Mutante aber eine deutliche Reduktion zeigt (Temesvari *et al.*, 1996a), könnte ein Indiz für die partielle funktionelle Redundanz der Klasse I Myosine darstellen.

Unter dem Einfluss des an die Membran rekrutierten Arp2/3-Komplexes kommt es im Zusammenspiel mit weiteren Aktin-assoziierten Proteinen zu einer lokal begrenzten Polymerisation von F-Aktin. Getrieben von den dabei entstehenden Kräften erfährt die Plasmamembran eine trichterförmige Ausstülpung, durch die das extrazelluläre Material umfließen wird. Schließlich fusionieren die distalen Membranbereiche und ein neu gebildetes Endosom wird in das Zellinnere abgegeben (Maniak *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 1997; Insall *et al.*, 2001). Ausgehend von der dem Zellinneren zugewandten Seite der endosomalen Membran beginnt nun die Hülle aus F-Aktin, Arp2/3, Coronin und anderen Aktin-assoziierten Proteinen zu dissoziieren. Damit einhergehend tritt an der Plasmamembran erneut eine lokale Anreicherung von Arp2/3, Coronin und F-Aktin auf, die zur Ausbildung eines F-Aktin-haltigen „comet tail“ führt (Dormann *et al.*, 2004; Insall *et al.*, 2001). Getrieben durch die Kraft des von der Membranseite her anwachsenden „comet tail“ wird das Endosom nun aktiv in das Zellinnere transportiert (Clarke *et al.*, 2006). All diese Vorgänge sind innerhalb der ersten 90 Sekunden nach Abschnürung des Endosoms weitestgehend abgeschlossen (Hacker *et al.*, 1997; Maniak *et al.*, 1995; Insall *et al.*, 2001).

Durch den Verlust der Aktinhülle wird die endosomale Membran für nachfolgende Fusions- und Abschnürungsereignisse freigegeben.

1.1.3. Die frühe, saure Phase

Innerhalb weniger Minuten nach der Abschnürung wird das endosomale Lumen auf einen pH-Wert von ~5 angesäuert (Aubry *et al.*, 1993; Padh *et al.*, 1993; Maniak, 1999). Dies geschieht über die Anlieferung der vacuolären H⁺-ATPase in die endosomale Membran und wird zumindest zum Teil über die Fusion des neu gebildeten Endosoms mit präexistierenden sauren Kompartimenten herbeigeführt (Clarke & Maddera, 2006). Alternativ könnte auch eine direkte Anlieferung ausgehend von der kontraktile Vacuole oder dem Golgi erfolgen. Das Aufeinandertreffen und Fusionieren von präexistierenden sauren Kompartimenten und neu gebildeten Endosomen wird dabei durch den Transport beider Kompartiment-Klassen entlang von Mikrotubuli initiiert oder begünstigt (Neuhaus, 2002; Clarke & Maddera, 2006). Ein weiteres frühes Ereignis in dieser Phase ist das Aussortieren bzw. Recycling molekularer Komponenten, wie beispielsweise Rezeptoren, vom frühen Endosom zurück an die Plasmamembran. Dieser Prozess verläuft offensichtlich über ein durch das Protein p25 markiertes Recycling-Kompartiment, das sich im Bereich des Centrosoms in Kernnähe befindet. Dabei ist der Rücktransport von Proteinen über dieses Kompartiment Adaptor-Protein-3 (AP-3) abhängig, was auf die Beteiligung von Clathrin schließen lässt (Ravanel *et al.*, 2001; Charette *et al.*, 2006).

Einhergehend mit der luminalen Ansäuerung erfolgt die erste Anlieferung lysosomaler Enzyme in das neu gebildeten Endosom, wodurch die Degradation der aufgenommenen Nahrung eingeleitet wird. Derzeit sind vier unterschiedliche Sets lysosomaler Enzyme bekannt, die sich durch abweichende post-translationale Modifikationen und durch zeitlich differenziertes Auftreten im endocytotischen Transit unterscheiden. Innerhalb der ersten Minuten nach der Internalisierung erreichen Enzyme mit einer GlcNAc-1-P-Modifikation das endosomale Lumen. Zu einem späteren Zeitpunkt werden dann Man-6-P-OCH₃-modifizierte Enzyme, wie beispielsweise α -Mannosidase, angeliefert. Da ein gemeinsames Auftreten beider Modifikationen innerhalb desselben Kompartiments nicht beobachtet werden konnte, werden Sortierungs- bzw. Recycling-Vorgänge postuliert (Souza *et al.*, 1997). Das dritte lysosomale Set wird durch das Lysozym AlyA gekennzeichnet, wobei auch hier eine Anlieferung in separaten Vesikeln erfolgt (Müller *et al.*, 2004). Stellvertretend für das vierte Set lysosomaler Enzyme steht die Esterase gp70, die erst zu einem späteren Zeitpunkt, vermutlich in der nachfolgenden neutralen Phase, das endosomale Lumen erreicht (Yuan & Chia, 2000).

Die vesikuläre Anlieferung lysosomaler Enzyme wird zumindest teilweise durch die GTPase Rab7 reguliert. In Zellen die eine dominant negative Form von Rab7 exprimieren ist die

Anlieferung von α -Mannosidase und LmpA (Lysosomal integral membrane protein) zu den frühen Endosomen blockiert. Außerdem kommt es in diesen Zellen zu einer verzögerten Neutralisierung des endosomalen Lumens, was auf die Beteiligung von Rab7 während mehrerer Schritte der Endosomen-Reifung schließen lässt (Rupper *et al.*, 2001b). Über die am Recycling lysosomaler Enzyme beteiligten Komponenten ist derzeit noch wenig bekannt. Offensichtlich ist die Funktion von Klasse I Myosinen (s.o.) aber auch an diesen Vorgängen beteiligt, da MyoIA und MyoIB defiziente Zellen eine um ein Vielfaches gesteigerte Sezernierung von murenen lysosomalen Enzymen aufweisen (Temesvari *et al.*, 1996a) und zumindest für MyoIB eine Funktion während der Bildung oder Abschnürung von Recycling-Vesikeln an frühen Endosomen postuliert wird (Neuhaus & Soldati, 2000).

1.1.4. Die späte neutrale Phase

Der Übergang von der sauren in die neutrale Phase ist durch den Abtransport der vacuolären H^+ -ATPase von der endosomalen Membran gekennzeichnet (Nolta *et al.*, 1994; Jenne *et al.*, 1998). Der pH des endosomalen Lumens wird dadurch auf einen Wert von $\sim 6,5$ angehoben. Dieser Vorgang beginnt etwa 30 bis 45 Minuten nach der Abschnürung des Endosoms von der Plasmamembran und ist innerhalb weniger Minuten abgeschlossen (Padh *et al.*, 1993; Aubry *et al.*, 1993). Anschließend treten homotypische Fusionen unter den neutralen Endosomen auf, wodurch die Anzahl gleichaltriger Endosomen verringert wird (Temesvari *et al.*, 1996b; Neuhaus *et al.*, 2002). Daran beteiligte Proteine sind PI3-Kinasen und Protein-Kinase B (PKB). Sowohl in PI3-Kinase-, als auch in PKB-defizienten Zellen werden während des endocytotischen Transits keine neutralen Endosomen ausgebildet. Anders als im Wildtyp verbleiben in diesen Zellen phagozytierte Partikel auch nach einem Zeitraum von zwei Stunden getrennt voneinander in angesäuerten Endosomen, anstatt in wenigen voluminöseren, neutralen Endosomen zu akkumulieren. Dieselbe Beobachtung konnte auch in mit PI3-Kinase-Inhibitoren behandelten Zellen gemacht werden. In letzteren Zellen konnte der beschriebene Phänotyp durch artifizielle Erhöhung des luminalen pH-Wertes aufgehoben werden (Rupper *et al.*, 2001a). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die Neutralisierung des endosomalen Lumens eine Voraussetzung für die homotypische Fusion später endosomaler Kompartimente darstellt (Maniak, 2002; Rupper *et al.*, 2001a). Gleichzeitig könnte dieser Mechanismus auch heterotypische Membranfusion zwischen sauren und neutralen Endosomen verhindern. Der luminale pH-Wert stellt jedoch nicht den einzigen Schutz vor heterotypischen Fusionsereignissen im endocytotischen Transit dar. Auch LvsB, dem Dictyostelium-Homolog des im Chediak-Higashi-Syndrom von Säugern involvierten Proteins Lyst, kommt eine Rolle als negativer Regulator heterotypischer Membranfusionen zu. LvsB lokalisiert an späten Endosomen, und LvsB-defiziente Zellen weisen einen Pool stark vergrößerter, überwiegend saurer Endosomen auf, die aus

unkontrollierten Fusionsereignissen früher, saurer und später, neutraler Endosomen hervorgehen (Harris *et al.*, 2002; Kypri *et al.*, 2007).

Neben Fusionsereignissen treten an neutralen Endosomen auch Abschnürungsereignisse auf. Diese dienen neben dem Abtransport der vacuolären H⁺-ATPase (s.o.) auch dem Recycling lysosomaler Enzyme, bevor diese der Zelle durch die anschließende Exocytose verloren gehen (Dimond *et al.*, 1981; Neuhaus *et al.*, 2002; Gotthardt *et al.*, 2002). Die Abschnürung der Recycling-Vesikel von der endosomalen Membran erfolgt Dynamin-vermittelt (Wienke *et al.*, 1999). Weitere an diesem Prozess potentiell beteiligte Proteine sind die Klasse Myosine MyoIA und MyoIB, sowie Rab7 und LvsB. Der Verlust der jeweiligen Proteinfunktion bewirkt eine deutlich erhöhte Sezernierung lysosomaler Enzyme in den entsprechenden Mutanten (Temesvari *et al.*, 1996a; Buczynski *et al.*, 1997; Cornillon *et al.*, 2002).

Im weiteren Verlauf der neutralen Phase wird das Endosom erneut von einer Hülle aus F-Aktin umgeben. An diesem Vorgang beteiligte Komponenten sind wiederum Scar, der Arp2/3-Komplex und Coronin (Seastone *et al.*, 2001; Insall *et al.*, 2001; Rauchenberger *et al.*, 1997). Vermutlich wird der Arp2/3-Komplex über Scar erneut an die endosomale Membran rekrutiert und induziert dort die Nucleation von Aktin, die zur Ausbildung einer das Endosom gleichmäßig umgebenden Aktinhülle führt. Coronin kommt in diesem Prozess eine Funktion als negativer Regulator des Arp2/3-Komplexes zu (Humphries *et al.*, 2002; Rodal *et al.*, 2005). Die gebildete Aktin-Hülle verbleibt bis zur Exocytose an der Membran des nun auch als Postlysosom bezeichneten Kompartiments. Andere an der Ausbildung der Hülle beteiligte Proteine, wie Coronin, assoziieren dagegen nur transient mit der endosomalen Membran (Rauchenberger *et al.*, 1997). Einhergehend mit dem graduellen Verlust von Coronin lokalisiert nun erstmals das Protein Vacuolin an den Postlysosomen. Vacuolin ist der derzeit späteste bekannte Marker im endocytotischen Transit von Dictyostelium und verbleibt zusammen mit der Aktin-Hülle bis zur Exocytose an der postlysosomalen Membran (s.u.; Jenne *et al.*, 1998). Auch in NRK-Zellen aus der Rattenleber wurden kürzlich postlysosomale Kompartimente beschrieben, die sich durch einen neutralen luminalen pH-Wert und die Anreicherung von unverdaubaren Materialien deutlich von den Lysosomen, aus denen sie offensichtlich hervorgehen, unterscheiden (Hirota *et al.*, 2004). Ob ausgehend von diesen Kompartimenten auch die Exocytose dieses Materials erfolgen kann, ist derzeit aber noch nicht untersucht.

1.1.5. Die Exocytose

Der Ausbildung der Aktin-Hülle und der Rekrutierung von Vacuolin an die endosomale Membran folgt schließlich die als Exocytose bezeichnete Fusion des Endosoms mit der Plasmamembran. Dieser Prozess findet etwa 60 Minuten bis 90 Minuten nach Abschnürung

des Endosoms in das Zellinnere statt. Die Fusion erfolgt dabei stets mit Bereichen der Plasmamembran, die nicht an der Ausbildung dynamischer Strukturen, wie etwa Pseudopodien, Phagocytic Cups oder Crowns teilhaben. Die zum Teil postulierte direkte Beteiligung von später endosomaler Membran an der Ausbildung neuer endocytotischer Strukturen kann demnach in *Dictyostelium* ausgeschlossen werden (Charette & Cosson, 2006). Dennoch stellt die Exocytose einen wichtigen Mechanismus im Membrangleichgewicht der Zelle dar, da hierbei der Plasmamembran zuvor entzogenes Material zurückgeführt wird. Durch die Fusion wird außerdem der Inhalt des endosomalen Lumens in den extrazellulären Raum abgegeben. Durch diesen Prozess entledigt sich die Zelle unverdaubarer Nahrungsrückstände, verliert aber gleichzeitig auch die Fraktion der bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht recycelten lysosomalen Enzyme. Die soweit beschriebenen Vorgänge sind vereinfacht in Abb. 1 zusammengefasst.

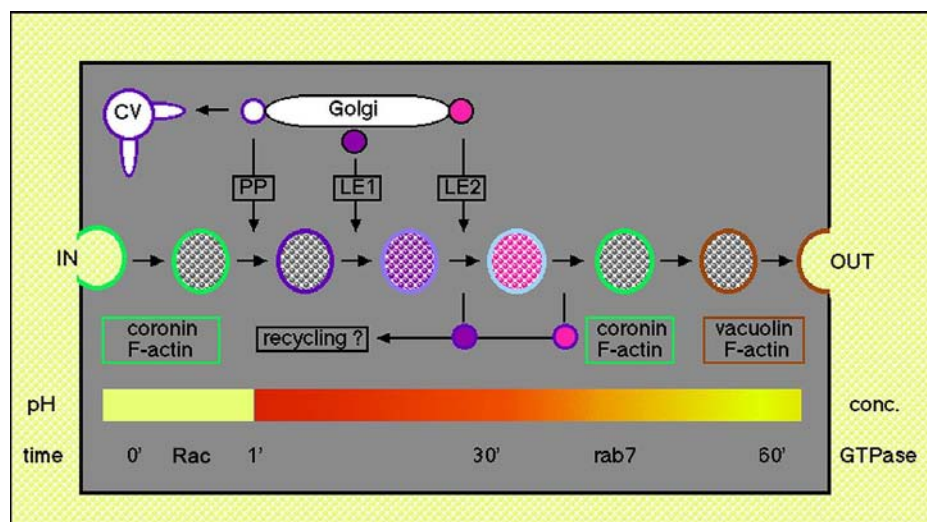


Abb. 1: Schematische Darstellung des endocytotischen Transits in *Dictyostelium discoideum*. In der als grauen Box dargestellten Zelle sind chronologisch von links (IN) nach rechts (OUT) unterschiedliche endosomale Reifestadien dargestellt. Die farbigen Umrandungen der Kompartimente entsprechen dem jeweils angezeigten charakteristischen Proteinbesatz. Im darunter liegenden Balken werden korrespondierende pH-Wert- und luminal Konzentrationen angezeigt (gelb = neutral; rot = sauer; Gelbintensität). Die untere Reihe markiert den zeitlichen Verlauf in Minuten und verweist auf weitere an den jeweiligen Reifestadien beteiligte Proteine. Abkürzungen: CV: Kontraktile Vacuole; PP: Protonenpumpe; LE1: lysosomale Enzyme mit Glc-Nac-1-P-Modifikation; LE2: lysosomale Enzyme mit Man-6-P-OCH₃-Modifikation. (verändert aus Maniak, 1999)

1.1.6. Vacuolin

Vacuolin ist ein Mitglied der derzeit noch wenig charakterisierten PHB (Prohibitin Homology)-Domänen-Proteine (Wienke *et. al.*, 2006). Vertreter dieser Proteinklasse finden sich in nahezu allen Zelltypen, von Prokaryoten bis hin zu Säugern. Die überwiegend beobachtete Assoziation dieser Proteine mit Membranen lässt auf eine Funktion der PHB-Domäne in der Lipid-Erkennung oder -Bindung schließen (Morrow & Parton, 2005). Bezüglich der Domänenorganisation und der intrazellulären Lokalisation an endosomalen Kompartimenten zeigt Vacuolin die größte Ähnlichkeit zu Flotillin1 aus Säugern. Neben dem Vorhandensein eines offensichtlich für die Membraninteraktion benötigten kurzen hydrophoben

Sequenzbereichs innerhalb der PHB-Domäne weisen beide Proteine zusätzlich ein weiteres am C-Terminus gelegenes Coiled-Coil-Motiv auf (Abb. 2).

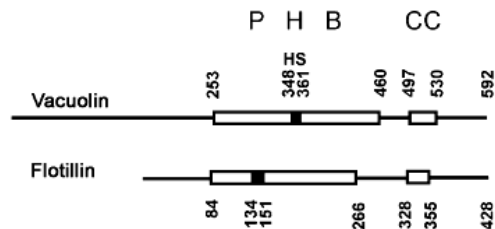


Abb. 2: Vergleich der Domänenorganisation von Vacuolin und Flotillin der Maus. Angezeigt werden die PHB-Domäne mit dem hydrophoben Sequenzbereich (HS) und der Coiled-Coil-Bereich. Die angegebenen Nummern geben die flankierenden Aminosäurepositionen an. (verändert aus: Wienke *et al.*, 2006)

Vacuolin ist ein Endosomen-assoziiertes Protein (Rauchenberger *et al.*, 1997). Für die korrekte Lokalisation an späten endosomalen Membranen ist sowohl die PHB-Domäne, als auch der Coiled-Coil-Bereich notwendig. Gemäß einem von Wienke *et al.* im Jahr 2006 vorgestellten Modell dient dabei die PHB-Domäne der eigentlichen Membran-Assoziation, ist als alleiniges Motiv aber nicht ausreichend. Erst durch die über den Coiled-Coil-Bereich vermittelte Oligomerisierung von mindestens drei Vacuolin-Molekülen erlangen die oligomerisierten PHB-Domänen die Fähigkeit, ausreichend stark an der endosomalen Oberfläche zu binden und damit das Protein korrekt zu lokalisieren. Belegt wird dieses Modell durch die in Yeast-Two-Hybrid-Untersuchungen und mittels Immunpräzipitation nachgewiesene Selbst-Interaktion von Vacuolin-Molekülen. Außerdem führt die ektopische Expression des Coiled-Coil-Bereichs in Wildtypzellen zu einer Fehllokalisierung des endogenen Proteins im Cytosol. Gemäß dem postulierten Modell werden dabei Oligomere bestehend aus endogenem Vacuolin und den ektopischen Coiled-Coil-Peptiden ausgebildet. Aufgrund der reduzierten Anzahl von PHB-Domänen in diesen Oligomeren verlieren diese ihre Affinität zur postlysosomalen Membran und lokalisieren folglich unspezifisch im Cytosol (Wienke *et al.*, 2006). Auch für Flotillin1 und Flotillin2 wurde eine verstärkte Membranbindung durch Homo-Oligomerisierung beschrieben, was die weitere Verwandtschaft dieser Proteine mit Vacuolin bekräftigt (Morrow *et al.*, 2002; Neumann-Giesen *et al.*, 2004).

In der Dictyostelium Genom-Datenbank (www.dictybase.org) werden drei von unterschiedlichen Gen-Loci codierte Isoformen von Vacuolin, genannt A, B und C, aufgelistet. Die Isoformen weisen dabei untereinander Homologien von 75 % bis 82 % auf der vorhergesagten Aminosäuresequenzebene auf. Zwei der drei Isoformen wurden bereits eingehender charakterisiert.

Vacuolin A lokalisiert exklusiv an den Membranen später, neutraler Endosomen und wird während der vegetativen Wachstumsphase und zu Beginn der multizellulären Entwicklung stark exprimiert, bleibt aber auch während der gesamten multizellulären Entwicklung detektierbar. Sowohl der Knockout des korrespondierenden *vacA*-Gens, als auch die

Überexpression von GFP- oder Myc-Epitop-markierten Versionen des Proteins führen zu keinerlei phänotypischen Veränderungen bezüglich der endosomalen Morphologie und des Ablaufs des endocytotischen Transits (Jenne *et al.*, 1998; Maniak, persönliche Mitteilung).

Vacuolin B lokalisiert neben späten endosomalen Membranen zusätzlich auch vereinzelt an Bereichen der Plasmamembran, die vermutlich Orte vorangegangener Exocytose-Ereignisse markieren. Die Expression von Vacuolin B ist auf die vegetative Phase und die frühe Entwicklung beschränkt. Während die Überexpression des Proteins als GFP-markierte Form keine offensichtlichen phänotypischen Abweichungen bewirkt, induziert der Knockout des korrespondierenden *vacB*-Gens drastische Veränderungen im endocytotischen Transit. Bei unveränderter Endocytoserate zeigen die defizienten Zellen eine stark verzögerte Neutralisierung des endosomalen Lumens und eine auf 60% des Wildtyp-Niveaus reduzierte Exocytoserate. Anstelle der im Wildtyp typischerweise beobachteten acht bis zwölf dispers verteilten Postlysosomen, ist in diesen Zellen lediglich ein einzelnes, stark vergrößertes postlysosomales Kompartiment zu beobachten, in dessen Lumen eine starke Ankonzentrierung von Flüssigphasenmarker auftritt (Jenne *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Befunde lassen sich für Vacuolin B zwei mögliche Funktionen postulieren. Zum einen eine Rolle als Fusionsinhibitor postlysosomaler Kompartimente. Zum anderen eine Funktion als Signalmolekül, welches die Postlysosomen zur Fusion mit der Plasmamembran, also für die Exocytose, kennzeichnet.

Zu der dritten in der Datenbank angegebenen Isoform, Vacuolin C, wurden bisher noch keine Untersuchungen durchgeführt.

1.1.7. Mögliche Funktionen der endosomalen Aktin-Hülle

Während die Funktion von Aktin während der Internalisierung eindeutig in der Bereitstellung mechanischer Kraft zur Verformung der Plasmamembran liegt, ist die Bedeutung von Aktin in späteren Stadien des Endocytose-Verlaufes noch weitestgehend unverstanden. Die diskutierten Funktionen dieser Aktin-Hülle sind vielfältig und zum Teil kontrovers.

Eine Möglichkeit besteht in der Beteiligung an Transportvorgängen in der Zelle. In Dictyostelium kann beispielsweise die Ausbildung einer asymmetrischen Aktin-Hülle um Endosomen induziert werden, indem die Zellen durch mechanischen Druck flach zusammengepresst werden. Dadurch gelangen die endosomalen Membranen in unmittelbare Nähe zum cortikalen Aktin-Netzwerk. Als Folge werden diese Kompartimente von einer asymmetrischen Aktin-Hülle umgeben, die an ihrer dem Zellcortex zugewandten Seite ein Aktin Comet Tail ausbildet. Durch diesen auch als „Rocketing“ bezeichneten Prozess wird das Endosom aktiv vom Zellcortex zurück in das Zellinnere transportiert. Vermutlich wird über diesen Mechanismus ein Schutz vor der verfrühten Fusion unreifer Endosomen mit der Plasmamembran bereitgestellt (Clarke *et al.*, 2006). Auch an

Endosomen aus Säugerzellen konnten vergleichbare Vorgänge beobachtet werden. In Podocyten der Maus zeigte sich der Transport später Endosomen als ein durch die Polymerisation von Aktin angetriebener Prozess (Welsch *et al.*, 2005) und auch an endosomalen Membranen von Makrophagen konnte in unterschiedlichen Versuchen Rocketing induziert werden (Merrifield *et al.*, 1999; Southwick *et al.*, 2003).

Eine zweite mögliche Funktion der Aktin-Hülle besteht in der Ausbildung von polaren Transportwegen. Aus Studien mit isolierten endosomalen Membranen aus Makrophagen ist bekannt, dass diese in der Lage sind Aktin-Polymerisation zu induzieren (Defacque *et al.*, 2000). Die dabei entstehenden Aktin-Filamente weisen eine polare Ausrichtung auf, in der das Plusende zur endosomalen Membran ausgerichtet ist, wohingegen das Minusende in das umgebende Cytosol weist. Es wird postuliert, dass diese polaren Aktin-Filamente Transportrouten darstellen, entlang derer weitere Endosomen oder Vesikel mittels Myosin-vermittelter Bewegung gezielt zur endosomalen Membran transportiert werden, um nachfolgend zu fusionieren (Kjeken *et al.*, 2004). Ob diese polare Form der endosomalen Aktin-Organisation auch in Dictyostelium vorliegt ist allerdings nicht bekannt.

Unabhängig von der möglichen Transportfunktion der Aktin-Filamente wurde in anderen Untersuchungen eine direkte Beteiligung von Aktin am Fusionsgeschehen postuliert. Diese konnte bisher an Hefe-Vacuolen (Eitzen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003), an isolierten Phagosomen von Säugern (Kjeken *et al.*, 2004) und an späten endosomalen Kompartimenten in HeLa-Zellen (Höltta-Vuori *et al.*, 2005) nachgewiesen werden, wobei der molekulare Mechanismus noch unverstanden ist.

Im Gegensatz dazu steht die mögliche Funktion der Aktin-Hülle als sterische Fusionsbarriere. Die Fusion zweier Membranen setzt die unmittelbare räumliche Nähe voraus, so dass sich nachfolgend eine SNARE-vermittelte Fusionspore ausbilden kann (Übersicht in Mayer, 2002). Gemäß dieser Hypothese könnte die sterische Ausprägung einer Aktin-Hülle um eine der beteiligten Membranen diesen Prozess möglicherweise inhibieren (Trifaro *et al.*, 1992).

In Zellen von Dictyostelium ist es gelungen die Aktin-Hülle später Endosomen gezielt zu zerstören, ohne dabei das übrige zelluläre Aktin-Cytoskelett zu beeinträchtigen (Drengk *et al.*, 2003). In diesen Zellen liegen die ansonsten dispers über das gesamte Cytoplasma verteilten späten Endosomen als traubenartiges Aggregat vor, ohne dabei zu fusionieren. Erstaunlicherweise induzierte diese Aggregation in den betroffenen Zellen keine Veränderungen im Ablauf des endocytotischen Transits und im Exocytose-Verhalten (Drengk *et al.*, 2003; s.u.). Daher bleibt die bisher verstandene Funktion der endosomalen Aktin-Hülle in Dictyostelium vorerst auf die Verhinderung der Aggregation später endosomaler Kompartimente beschränkt.

1.2. Aktin und Aktin-interagierende Proteine

Aktin ist ein in Eukaryoten ubiquitäres Protein, das je nach Zelltyp zwischen 5% und 10% der gesamten Proteinmenge einer Zelle ausmacht. In spezialisierten Zelltypen, wie beispielsweise Muskelzellen, kann der Anteil auf bis zu 20% erhöht sein. In *Dictyostelium* liegt der Anteil bei ~8% der Gesamtproteinmenge und wird von insgesamt 30 Aktin-Genen codiert (Podolski & Steck, 1990; Eichinger *et al.*, 2005).

Prinzipiell unterscheidet man in der Zelle zwei verschiedene Zustände von Aktin: Monomeres G-Aktin und zu Filamenten polymerisiertes F-Aktin. Dabei polymerisieren Aktin-Monomere in 8 nm breite, unverzweigte, polare Filamente, in denen jedes Monomer Kontakt zu vier benachbarten Untereinheiten aufweist. Ein solches Filament stellt eine zweisträngige, rechtsgängige Doppelhelix dar, die sich alle 37 nm einmal um sich selbst windet (Bamburg *et al.*, 1999). Beide Formen von Aktin liegen in einem Gleichgewicht vor, welches unter physiologischen Bedingungen deutlich auf der Seite von F-Aktin liegt. Dennoch lagert die Zelle etwa 50% ihres Aktins in Form von G-Aktin, indem sie Aktin-Monomere durch Bindung an weitere Proteine, wie beispielsweise Profilin, dem Gleichgewicht entzieht. Auf diese Weise entsteht ein Pool von Aktin-Monomeren, der bei Bedarf schnell für die Ausbildung neuer oder zur Verlängerung bereits bestehender Aktin-Filamente verwendet werden kann.

Die Bildung eines neuen Aktin-Filaments geht von einem so genannten Nucleationskeim aus, in dem mindestens drei Aktin-Monomere aneinandergelagert vorliegen. Jedes Aktin-Monomer das neu an ein Filament angelagert wird verfügt über ein gebundenes ATP-Molekül. Die Bindung von ATP erhöht die Affinität der polymerisierten Untereinheiten zueinander und stabilisiert somit das Filament. Aktin-Monomere weisen jedoch eine intrinsische ATPase-Aktivität auf, so dass bereits kurz nach der Inkorporation des Monomers in ein Filament die Hydrolyse von ATP zu ADP erfolgt, die eine Konformationsänderung des Aktin-Moleküls bewirkt. Durch diese Veränderung verringert sich die Affinität der Aktin-Untereinheiten eines Filaments zueinander und die Monomere können von den Enden abdissoziieren. Aktin-Filamente sind also nur stabil solange sie sich entweder im Wachstum befinden und fortlaufend neue ATP-Aktin-Untereinheiten anlagern, oder ihre Enden durch so genannte Capping-Proteine vor dem Abdissoziieren der Untereinheiten geschützt werden. Die Anlagerung von Aktin-Untereinheiten an ein Filament erfolgt polar, so dass alle in einem Filament inkorporierten Untereinheiten dieselbe Ausrichtung aufweisen. Dadurch erhält auch jedes Filament eine Polarität durch die zwei Enden mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften entstehen. So erfolgt die Anlagerung neuer Untereinheiten bevorzugt am so genannten Plusende, wohingegen am Minusende verstärkt Depolymerisation auftritt. Eine Übersicht über die bisher beschriebenen Vorgänge ist in Abb. 3 gezeigt.

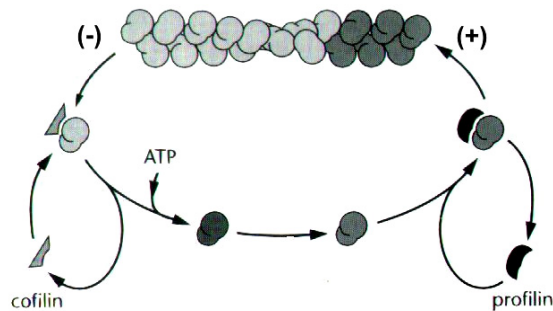


Abb. 3: Dynamische Vorgänge an einem Aktin-Filament. Dargestellt sind die (durch Profilin vermittelte) Anlagerung neuer ATP-Aktin-Untereinheiten (dunkel) am Plusende und der (durch Cofilin (s.u.) vermittelte) Verlust von ADP-Aktin-Untereinheiten (hell) am Minusende eines Filaments. (aus: Bray, 2001)

Durch all diese Eigenschaften verfügt das zelluläre Aktin-Cytoskelett über eine hohe Dynamik, die den schnellen lokalen Auf- und Abbau von Filamenten erlaubt. Jedoch ermöglicht erst die durch weitere Proteine bewirkte, gezielte Steuerung dieser Dynamik ein koordiniertes Zusammenspiel des Aktin-Cytoskeletts im zellulären Kontext. Allein für Dictyostelium werden in der Genomdatenbank 138 Proteine beschrieben, die eine direkte Interaktion mit einer der beiden Aktin-Formen aufweisen (Eichinger *et al.*, 2005). In dieser Zahl nicht enthalten sind weitere Proteine, denen ein indirekter Einfluss in diesem Geschehen, wie beispielsweise während der Signaltransduktion, zukommt. Eine Übersicht der wichtigsten Klassen Aktin-interagierender Proteine ist in Abb. 4 dargestellt.

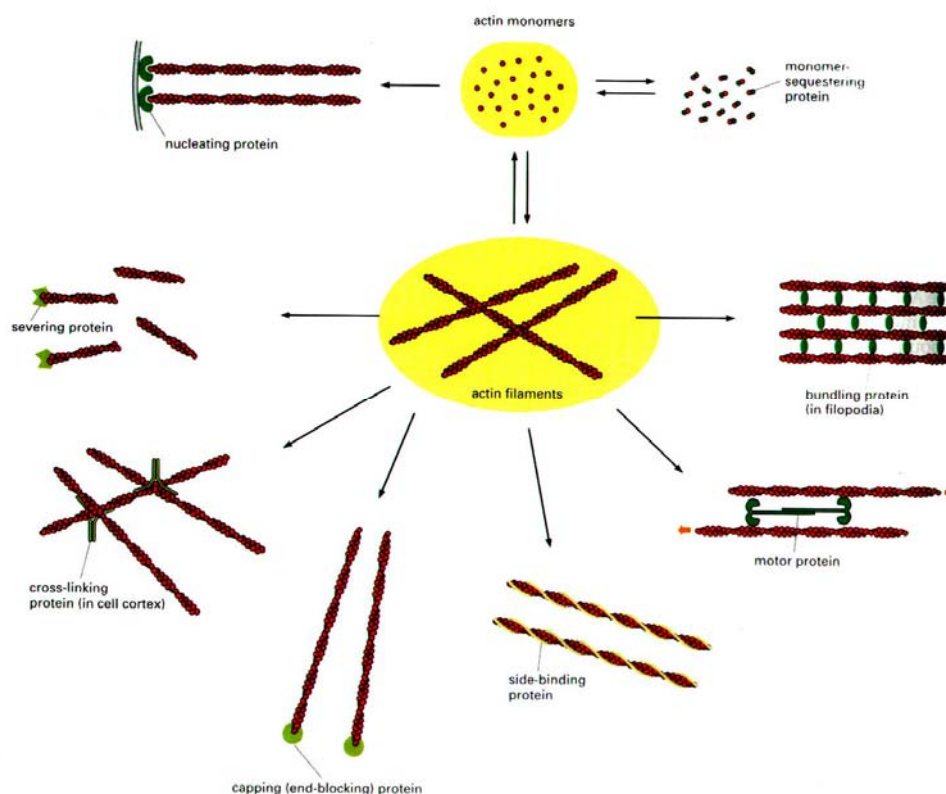


Abb. 4: Übersicht Aktin-interagierender Proteine. Dargestellt sind die wichtigsten Klassen, die direkt entweder auf den Auf- und Abbau (monomer sequestering; nucleating; severing), die Stabilität (capping, side-binding) oder auf die Organisationsform (bundling; cross-linking) von Aktin-Filamenten einwirken. (aus: Alberts *et al.*, 1998)

1.2.1. Cofilin und DAip1

Um eine hohe Dynamik des Aktin-Cytoskeletts zu gewährleisten ist eine regulierte, beschleunigte Depolymerisation bestehender Aktin-Filamenten erforderlich. Tatsächlich erfolgt die Aktin-Depolymerisation *in vivo* rund 100mal schneller als die *in vitro* beobachtete Dissoziation der Untereinheiten von den Enden isolierter Filamente (Zigmond, 1993). Hauptverantwortlich für diese Diskrepanz sind die Mitglieder der ADF/Cofilin-Familie. Cofilin ist ein niedermolekulares, hochkonserviertes Protein mit einem Molekulargewicht von rund 15 kDa. Für *Dictyostelium* werden insgesamt sechs Cofilin-Gene vorhergesagt, von denen aber offensichtlich lediglich *cofA* (DCOF1) für das essentielle *Dictyostelium*-Homolog codiert (Eichinger *et al.*, 2005; Aizawa *et al.*, 1995). In höheren Eukaryoten wurde eine Regulation der Cofilin-Aktivität über Phosphorylierung, pH-Wert und Phosphoinositide beschrieben (DesMarais *et al.*, 2005). Für *Dictyostelium* Cofilin ist bisher lediglich eine Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert *in vitro* beschrieben (Aizawa *et al.*, 1995). Die Aktin-depolymerisierende Wirkung von Cofilin geht auf zwei Eigenschaften des Proteins zurück. Einerseits erhöht Cofilin die Dissoziationsrate von Aktin-Untereinheiten am Minusende der Filamente und bleibt danach vorübergehend an diese gebunden. Andererseits bindet Cofilin in einem molaren 1:1 Verhältnis an Aktin-Untereinheiten bereits existierender Aktin-Filamente (Rodal *et al.*, 1999; Bamburg, 1999; Carlier *et al.*, 1999). Diese laterale Bindung induziert vermutlich eine Veränderung in der Windungszahl der helikalen Aktin-Filamente und bewirkt dadurch eine Abschwächung der Wechselwirkung der inkorporierten Untereinheiten zueinander. Als Folge dieser Destabilisierung zerfällt das Filament in mehrere kürzere Fragmente, wodurch eine größere Anzahl freier Minusenden bereitgestellt wird von denen ausgehend die Dissoziation weiterer Untereinheiten erfolgt (McGough *et al.*, 1997; Bobkov *et al.*, 2002; McGough & Chiu., 1999). Die Depolymerisation eines langen Filaments wird dadurch drastisch beschleunigt. Interessanterweise können die bei diesem Prozess entstehenden freien Plusenden aber auch für erneute Polymerisation, also für die Verlängerung der Fragmente verwendet werden, woraus insgesamt eine gesteigerte Polymerisationsrate resultieren kann (Chan *et al.*, 2000). Welche Wirkung der von Cofilin induzierte Zerfall eines Filaments letztendlich hat ist also von der Anwesenheit weiterer regulatorischer Proteine abhängig.

In *Dictyostelium* ist der Knockout von *cofA* letal. Die Überexpression von Cofilin (DCOF1) führt dagegen zu einem erhöhten F-Aktin-Gehalt, gesteigerter Zellbewegung und der verstärkten Ausbildung von Aktin-Bündeln (Aizawa *et al.*, 1996).

Ein weiteres an der Depolymerisation von Aktin-Filamenten beteiligtes, ubiquitäres Protein ist Aip1 (Actin interacting protein 1). Das einzige *Dictyostelium*-Homolog weist ein Molekulargewicht von 64 kDa auf und wird durch das *wdpa*-Gen codiert. Bezüglich der

Namensgebung herrscht derzeit noch Uneinigkeit. In dieser Arbeit wird das entsprechende Genprodukt im Weiteren als DAip1 bezeichnet.

Anders als Cofilin verfügt (D)Aip1 über keine intrinsische Aktin-depolymerisierende Aktivität. Aus *in vitro* und *in vivo* Studien ist aber bekannt, dass die Anwesenheit von Aip1 die Depolymerisation Cofilin dekorierte Aktin-Filamente um ein Vielfaches beschleunigt. Aip1 bindet sowohl lateral an Cofilin dekorierte Filamente, als auch an die Plusenden fragmentierter Filamente (Amberg *et al.*, 1995; Rodal *et al.*, 1999). Der Mechanismus, über den Aip1 einen beschleunigenden Einfluss auf die Filament-Depolymerisation ausübt, ist derzeit noch nicht genau charakterisiert. Prinzipiell werden zwei potentielle Modelle diskutiert, die möglicherweise auch in Kombination auftreten. Im ersten Modell fördert Aip1 über die laterale Bindung an F-Aktin-Cofilin die Filament-fragmentierende Wirkung von Cofilin (Okada *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2004). Im zweiten Modell dient Aip1 als Capping-Protein für die nach der Cofilin-induzierten Fragmentierung von Aktin-Filamenten neu entstehenden Plusenden. Durch die Bindung von Aip1 wird eine erneute Polymerisation an den Plusenden unterbunden und somit die vom Minusende ausgehende Depolymerisation der Fragmente unterstützt (Ono *et al.*, 2003). Eine schematische Zusammenfassung des postulierten Zusammenspiels von Cofilin und Aip1 während der Depolymerisation von F-Aktin ist in Abb. 5 dargestellt.

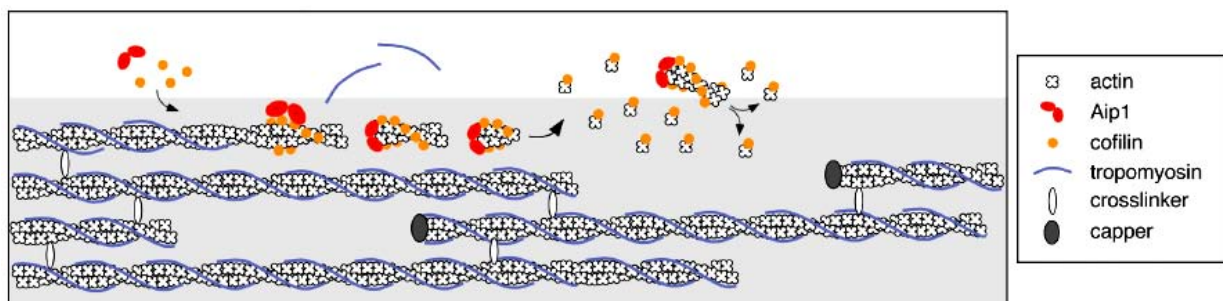


Abb. 5: Modell der Cofilin/Aip1 induzierten Aktin-Depolymerisation. Die laterale Bindung von Cofilin (orange) bewirkt die Fragmentierung der Aktin-Filamente. Die zusätzliche laterale Bindung von Aip1 (rot) verstärkt diesen Effekt. Die erneute Polymerisation an den entstehenden freien Plusenden wird durch die Anlagerung von Aip1 verhindert, während Cofilin die Dissoziation weiterer Untereinheiten vom Minusende unterstützt. (verändert aus: Okada *et al.*, 2006)

In *Dictyostelium* führt der Knockout des *wdpa*-Gens zu einem Wachstumsdefekt, verlangsamer Motilität und zu einer verringerten Endocytoserate. Die zwanzigfache Überexpression von DAip1 resultiert in einer gegenüber dem Wildtyp um 50% gesteigerten Phagozytoserate, zeigt jedoch nur einen geringen Einfluss auf andere Aktin-abhängige zelluläre Prozesse (Konzok *et al.*, 1999).

1.2.2. Coronin

In eukaryotischen Zellen sind zwei unterschiedliche Organisationsformen von F-Aktin anzutreffen: Aktin-Bündel und Aktin-Netzwerke. Nach heutigem Wissensstand liegen diesen

beiden Strukturformen unterschiedliche Nucleations-Maschinerien zugrunde. Bündel werden demnach durch Formine polymerisiert. In ihnen sind lange, unverzweigte, parallel ausgerichtet Aktin-Filamente anzutreffen. Typische Beispiele sind Aktin-Kabel und Filopodien (Übersicht in Kovar, 2006). Aktin-Netzwerke sind dagegen überwiegend im Zellcortex anzutreffen, wo sie an der Ausbildung von Lamellipodien oder von endocytotischen Strukturen, wie Phagocytic Cups, beteiligt sind. Diese Netzwerke bestehen aus mehr oder weniger stark verzweigten Einzelfilamenten, die in ihrer Summe ein stabiles, aber dennoch sehr dynamisches Gerüst ausbilden. Diese verzweigte, dreidimensionale Ausprägung von F-Aktin geht auf die durch den Arp2/3-Komplexes vermittelte Polymerisation, sowie auf die Aktivität von Aktin-quervernetzenden Proteinen (Crosslinkern) zurück (Übersicht in Pollard & Borisy, 2003; Winder, 2003).

Der Arp2/3-Komplex setzt sich aus den beiden Aktin-verwandten Proteinen Arp2 und Arp3, sowie fünf weiteren Protein-Untereinheiten zusammen. Nach der lateralen Bindung an ein bereits existierendes Aktin-Filament induziert der aktivierte Komplex die Polymerisation eines neuen, seitlich vom Ursprungsfilament abzweigenden Filaments. In der Folge mehrerer solcher Abläufe entsteht so ein verzweigtes, schnell wachsendes Aktin-Netzwerk, das durch die zusätzliche Quervernetzung durch Aktin-Crosslinker verstärkt und moduliert wird.

Eine genaue Regulation dieser Polymerisations-Maschinerie ist für die geordnete Zellfunktion unabdingbar. Neben unterschiedlichen Aktivatoren, wie Scar/WASP und Abp1 wurde Coronin als negativer Regulator des Arp2/3-Komplexes identifiziert (Übersicht in Millard *et al.*, 2004). Vermutlich wird die Aktivität des Arp2/3-Komplexes über eine von der Aktivator-Bindung abhängigen Konformationsänderung reguliert. Durch Bindung eines Aktivators nimmt der Komplex eine „geschlossene“ Konformation ein, in der die beiden Aktin-verwandten Untereinheiten Arp2 und Arp3 in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Zusammen mit einer rekrutierten Aktin-Untereinheit entsteht so ein Nucleationskeim, von dem ausgehend ein neues Aktin-Filament polymerisiert werden kann. Die Bindung von Coronin an die ARPC2-Untereinheit des Komplexes verhindert die Aktivator-induzierte Konformationsänderung und inhibiert somit die Aktin-Polymerisation (Humphries *et al.*, 2002; Rodal *et al.*, 2004). Faktoren, die die Aktivität von Coronin regulieren, sind derzeit noch nicht genauer beschrieben.

Dictyostelium Coronin wird durch das *corA*-Gen codiert. Daneben existiert noch ein weiteres putatives Coronin-Gen, *corB*, dessen Genprodukt derzeit noch nicht näher charakterisiert wurde. Entsprechend seiner postulierten Funktion lokalisiert Coronin in Dictyostelium zusammen mit dem Arp2/3-Komplex an Orten hoher Aktin-Dynamik, wie Lamellipodien, Phagocytic Cups und auch vorübergehend an späten Endosomen (de Hostos *et al.*, 1993; Maniak *et al.*, 1995; Insall *et al.*, 2001; s.o.). Der Knockout von *corA* induziert schwerwiegende Defekte in unterschiedlichen Aktin-abhängigen Prozessen. So zeigen die

korrespondierenden Zellen eine deutlich verringerte Motilität, Defekte in der Cytokinese mit daraus resultierender Vielkernigkeit und eine gegenüber dem Wildtyp um 70% reduzierte Phagozytoserate (de Hostos *et al.*, 1993, Maniak *et al.*, 1995).

1.2.3. ABP34

ABP34, zuvor auch als 34.000 Da bundling protein oder ABP30 bezeichnet, zählt zur Gruppe der Aktin quervernetzenden Proteine. Diese haben die Funktion vorgeformte Aktin-Filamente zu Strukturen höherer Ordnung zu formieren oder aber diese Strukturen zu stabilisieren. In *in vitro* Untersuchungen induziert ABP34 aus Aktin-Filamenten die Formation von Aktin-Bündeln (Lim & Fechheimer, 1997). Die Bündelung erfolgt vermutlich über drei über die gesamte Länge des Proteins verteilte Aktin-Bindungs-Bereiche, von denen allerdings keiner ein klassisches Aktin-Bindungsmotiv repräsentiert (Lim *et al.*, 1999a). Sowohl die Aktin-Bindung, als auch die Bündelungsaktivität des Proteins sind Calcium-sensitiv und werden mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration inhibiert. Während dieser Regulation fungiert der N-Terminus des Proteins (As 1-123) als autoinhibitorische Domäne (Lim *et al.*, 1999b).

In *Dictyostelium* lokalisiert ABP34 überwiegend im Zellcortex mit Anreicherungen in Filopodien und Pseudopodien (Fechheimer, 1987; Furukawa *et al.*, 1994). Der Knockout des korrespondierenden *abpB*-Gens bewirkt nur geringfügige phänotypische Veränderungen in den entsprechenden Zellen. Wachstum, Pinocytoserate und die multizelluläre Entwicklung sind gegenüber dem Wildtyp unverändert. Lediglich die von diesen Zellen ausgebildeten Filopodien sind länger als die der Wildtypzellen und weisen zum Teil Verzweigungen auf (Rivero *et al.*, 1996). Da auch der Funktionsverlust anderer Aktin-Crosslinker, wie α -Actinin und ABP120, lediglich leichte Defekte in den betroffenen Zellen induziert, wird von einer funktionellen Redundanz dieser Proteine ausgegangen (Rivero *et al.*, 1999a).

1.2.4. VASP

Dictyostelium VASP (Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein) zählt zur Ena/VASP-Proteinfamilie. Weitere Mitglieder dieser Familie wurden bisher in Säugern, *Drosophila* und *Caenorhabditis* beschrieben (Übersicht in Kwiatkowski *et al.*, 2003). Eine Zuordnung von VASP zu einer der in Abb. 4 aufgeführten Gruppen Aktin-interagierender Proteine ist derzeit schwierig, da unterschiedliche Funktionen des Proteins diskutiert werden (s.u.).

Alle Mitglieder der Ena/VASP-Familie weisen eine konservierte Domänenstruktur auf (Abb. 6). Den N-Terminus des Proteins bildet die so genannte EVH1 (Ena/VASP-Homologie)-Domäne. Über sie erfolgt die Bindung an Prolin-reiche Sequenzen anderer Proteine, die offensichtlich überwiegend der korrekten Lokalisation von VASP in der Zelle dient (Übersicht in Krause *et al.*, 2003). Der Mittelteil des Proteins wird von einer Prolin-reichen-Domäne (PRD) gebildet, welche die größte Divergenz innerhalb der unterschiedlichen

Familienmitglieder aufweist. Für einzelne Vertreter wurden Interaktionen mit unterschiedlichen SH3-Domäne-Proteinen postuliert, deren physiologische Relevanz aber noch nicht nachgewiesen wurde. Eine gemeinsame Eigenschaft der PRD-Domäne aller Familienmitglieder ist die Bindung von Aktin-gebundenem Profilin (Übersicht in Kwiatkowski *et al.*, 2003). An Profilin gebundenes ATP-Aktin stellt vermutlich den Großteil der an Filament-Plusenden inkorporierten Aktin-Monomere bereit (Kaiser *et al.*, 1999). Den C-terminalen Bereich des VASP-Proteins bildet die EVH2-Domäne, welche drei hoch konservierte Bereiche umfasst: Einen G-Aktin bindenden Bereich, einen F-Aktin-bindenden Bereich und ein Coiled-Coil-Motiv, welches die Tetramerisierung von Ena/VASP bewirkt (Bachmann *et al.*, 1999; Gertler *et al.*, 1996). Daneben wurden für die Familienmitglieder aus Säugern und *Drosophila* PKA- und PKG-, bzw. D-Abl-abhängige Phosphorylierungsstellen identifiziert (Übersicht in Krause *et al.*, 2003). Für die beiden Homologe aus *Dictyostelium* und *Caenorhabditis* wurde bisher aber kein Nachweis für eine mögliche Phosphorylierung beschrieben.



Abb. 6: Domänenorganisation von VASP.
Abkürzungen: G: G-Aktin bindende Domäne; F: F-Aktin bindende Domäne; T: Tetramerisierungsdomäne (aus Schirenbeck *et al.*, 2005)

Bezüglich ihrer Rolle in der Regulation der zellulären Aktin-Dynamik wurden unterschiedliche mögliche Funktionen der Ena/VASP-Proteine beschrieben. In *in vitro* Experimenten wurde sowohl die Fähigkeit zur Nukleation neuer Aktin-Filamente, als auch die Bündelung von Aktin-Filamenten beschrieben (Huttelmaier *et al.*, 1999; Bachmann *et al.*, 1999). Andere Studien belegen eine modulierende oder fördernde Wirkung in der Arp2/3-Komplex vermittelten Aktin-Polymerisation. Während der intrazellulären Infektion kapert das pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* die zelluläre Aktin-Maschinerie und verwendet sie für die durch Aktin-Polymerisation angetriebene Fortbewegung in den Wirtszellen. Die Geschwindigkeit dieser Bakterien wird dabei durch die Anwesenheit von Ena/VASP in Verbindung mit Profilin deutlich erhöht (Geese *et al.*, 2002; Loisel *et al.*, 1999). *In vitro* ist die alleinige Anwesenheit von VASP an der bakteriellen Oberfläche für die Aktin-Polymerisation allerdings nicht ausreichend, sondern erfordert die zusätzliche Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes (May *et al.*, 1999). Eine genauere Untersuchung der von den Bakterien ausgebildeten Comet Tails zeigte, dass in Abwesenheit von VASP stärker verzweigte Aktin-Filamente ausgebildet werden, wohingegen die Anwesenheit von VASP die Bildung weniger stark verzweigter, gebündelter Filamente induziert (Skoble *et al.*, 2001). Ein ähnlicher Einfluss von Ena/VASP wurde auch bei der Ausbildung des Aktin-Netzwerks in Lamellipodien motiler Fibroblasten beobachtet. Hier entstehen unter dem Einfluss von Ena/VASP längere Filamente mit weniger Verzweigungen, während der Verlust von Ena/VASP die Ausbildung kurzer, stark verzweigter Filamente bewirkte (Bear *et al.*, 2002).

Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse auf zwei mögliche Rollen von Ena/VASP in der Arp2/3-Komplex vermittelten Aktin-Polymerisation schließen. Zum einen eine modulierende Funktion, in der Ena/VASP den Grad der Verzweigung der Aktin-Filamente reguliert und zum anderen eine polymerisationsfördernde Funktion, die die Ausbildung längerer Bereiche zwischen den einzelnen Filamentverzweigungen bewirkt.

In Einklang mit letzterer Hypothese konnte gezeigt werden, dass Ena/VASP die Anlagerung unterschiedlicher Capping-Proteine an Plusenden von Filamenten verhindert und dadurch deren verstärktes Wachstum begünstigt (Bear *et al.*, 2002; Barzik *et al.*, 2005). In einem von Chereau und Dominguez im Jahr 2006 vorgestellten Modell kommt Ena/VASP eine aktivere Rolle während der Elongation der Filamente zu. Die Autoren postulieren einen Mechanismus in dem der Einbau von Aktin-Monomeren an die Plusenden direkt durch Ena/VASP-Tetramere vermittelt wird. Dabei binden die Tetramere zunächst über ihre F-Aktin-Bindedomänen an die ATP-Aktin-Bereiche nahe dem Plusende eines Filaments. Über die Prolin-reiche Domäne wird nun Profilin-Aktin rekrutiert. Anschließend erfolgt die zusätzliche Bindung des an Profilin-gebundenen Aktins an die G-Aktin-Bindedomäne. In einem nächsten Schritt wird dann das monomere Aktin von Profilin auf das gebundene Filamentende übertragen. Die anschließende Freisetzung von Profilin, oder aber die durch die Hydrolyse von ATP im Aktin-Filament ausgelöste Konformationsänderung könnten dabei mögliche Schritte während die Prozessivität des Vorgangs darstellen (Chereau & Dominguez, 2006). Da die Tetramerisierung von Ena/VASP die Nukleations-Aktivität drastisch erhöht, wäre das kooperative Zusammenwirken der vier Untereinheiten in diesem Prozess nahe liegend (Walders-Harbeck *et al.*, 2002).

Im Widerspruch zu den bisher beschriebenen Ergebnissen steht eine neuere Veröffentlichung über Dictyostelium VASP und humanes VASP. In dieser Studie konnte weder die antagonistische Wirkung zu Capping-Proteinen, noch die Fähigkeit zur Filament-Verlängerung bestätigt werden. Weiterhin wurde für beide Homologe gezeigt, dass weder die durch sie induzierte Nukleation neuer Aktin-Filamente, noch ihre zelluläre Lokalisation von der F-Aktin-Bindedomäne abhängig sind (Schirenbeck *et al.*, 2006).

Die genaue Rolle der Ena/VASP Proteine in der Regulation der Aktin-Dynamik bleibt also derzeit noch unbestimmt und offeriert Funktionen als Nukleator, Elongator, Capping-Antagonist oder Bündelungsprotein. Weitere Untersuchungen werden zeigen, welche der postulierten Funktionen *in vivo* tatsächlich relevant sind und ob Ena/VASP-Proteinen in Abhängigkeit ihrer jeweiligen zellulären Lokalisation möglicherweise unterschiedliche Funktionen zukommen.

Dictyostelium verfügt über ein einziges Ena/VASP-Homolog, genannt DdVASP oder VASP. In vegetativen Zellen lokalisiert das Protein überwiegend im Cytoplasma mit Anreicherungen in Pseudopodien und an den Spitzen von Filopodien. In aggregationskompetenten Zellen

translociert ein Großteil des Proteins nach einem cAMP-Stimulus an die Plasmamembran, wo unter diesen Bedingungen verstärkt Aktin-Polymerisation auftritt. Der Knockout des korrespondierenden *vasP*-Gens führt in den entsprechenden Zellen zum Verlust von Filopodien und zu einer verminderten Effektivität der Chemotaxis. Der Phänotyp kann jedoch durch die erneute Expression von VASP, GFP-VASP oder einem verkürzten PRD-EVH2-Konstrukt gerettet werden. Die Überexpression von VASP induziert die Ausbildung einer erhöhten Anzahl von Filopodien und einen insgesamt höheren F-Aktin-Gehalt in den Zellen (Han *et al.*, 2002). Im Einklang mit diesen Beobachtungen stehen die Ergebnisse einer neueren Studie, in der die Autoren eine Funktion von VASP als essentielles Bündelungsprotein während der Ausbildung von Filopodien in *Dictyostelium* postulieren, wobei die Aktin-Polymerisation durch das Formin dDia2 bewirkt wird (Schirenbeck *et al.*, 2006).

1.3. Proteinsortierung in der Zelle

Da die Grundkenntnis der zellulären Sortierungswege eine Voraussetzung zum Verständnis der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellung ist, sollen sie im Folgenden kurz beschrieben werden. Soweit nicht anders angegeben beziehen sich die gemachten Angaben auf allgemein anerkanntes Lehrbuchwissen, wobei an dieser Stelle besonders auf Dalbey & von Heijne, 2002 als Literaturquelle verwiesen sei.

Zur Gewährleistung aller zellulären Funktionen ist nicht nur die genaue Kontrolle der Genregulation, sondern ebenso die korrekte Lokalisation der jeweiligen Genprodukte innerhalb der Zelle erforderlich. Proteine ohne eine spezifische Signalsequenz liegen frei im Cytoplasma vor, wo sie über die Interaktion mit anderen Proteinen, Proteinkomplexen oder Lipiden transient oder permanent an unterschiedliche cytoplasmatische Lokalisationen dirigiert werden können. Dagegen bewirkt die Anwesenheit von Signalsequenzen die Sortierung der Proteine in die unterschiedlichen membranumhüllten Zellorganellen. Schätzungen zufolge lokalisiert nur etwa die Hälfte des Gesamtproteinanteils einer Zelle frei im Cytoplasma. Dagegen befinden sich rund 20% in durch Membranen vom Cytosol abgegrenzten Kompartimenten und weitere 25% bis 30% liegen gebunden als integrale Membranproteine vor. Die möglichen Kompartimente in deren Membran oder Lumen ein Protein hinein sortiert werden kann, sind das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi, die Endosomen und Lysosomen, unterschiedliche Vesikel, die Mitochondrien, der Kern, die Peroxisomen, die Plasmamembran, der extrazelluläre Raum und in Pflanzen zusätzlich die Chloroplasten. Zur Ausführung dieser vielfältigen Aufgaben bedient sich die Zelle unterschiedlicher Sortierungswege, die in Abb. 7 als Übersicht dargestellt sind.

Dabei beginnt der Weg eines jeden Proteins mit der Initiation der Translation der korrespondierenden mRNA an freien Ribosomen im Cytoplasma. Proteine, die für eine

Lokalisation im Lumen oder in der Membran des ERs, des Golgi, der Endosomen und Lysosomen, oder aber der Plasmamembran und den extrazellulären Raum bestimmt sind, werden zunächst SRP (Signal Recognition Particle) vermittelt co-translational in die Membran oder das Lumen des rauen ERs synthetisiert und von dort aus ihrer endgültigen Destination zugeführt. Ein im Zusammenhang mit dieser Arbeit wichtiges Merkmal dieses Sortierungsweges ist, dass die durch ihn sortierten Proteine zu keiner Zeit frei und vollständig translatiert im Cytoplasma anzutreffen sind, sondern in der Zelle stets membrangebunden oder membranumhüllt vorliegen. Kerncodierte Proteine, die für eine Lokalisation innerhalb der Mitochondrien bestimmt sind, weisen in der Regel eine N-terminale Matrix-Targeting-Sequenz auf. Die Translation dieser Proteine erfolgt vollständig an freien Ribosomen. Die Signalsequenz bewirkt jedoch die Anlagerung cytosolischer Chaperone, wie Hsp70 oder MSF (Mitochondrial Import Stimulating Factor), an die naszierende Polypeptidkette, so dass die Faltung dieser Proteine in ihre mature Konformation verhindert wird. Diese Faltungsinhibition stellt einen essentiellen Schritt während der mitochondrialen Sortierung dar, da nur ungefaltete Proteine durch die als Tom und Tim bezeichneten Translocasen der beiden Mitochondrienmembranen importiert werden können. Demnach sind also auch mitochondriale Proteine zu keiner Zeit als freie, vollständig gefaltete Proteine im Cytoplasma anzutreffen.

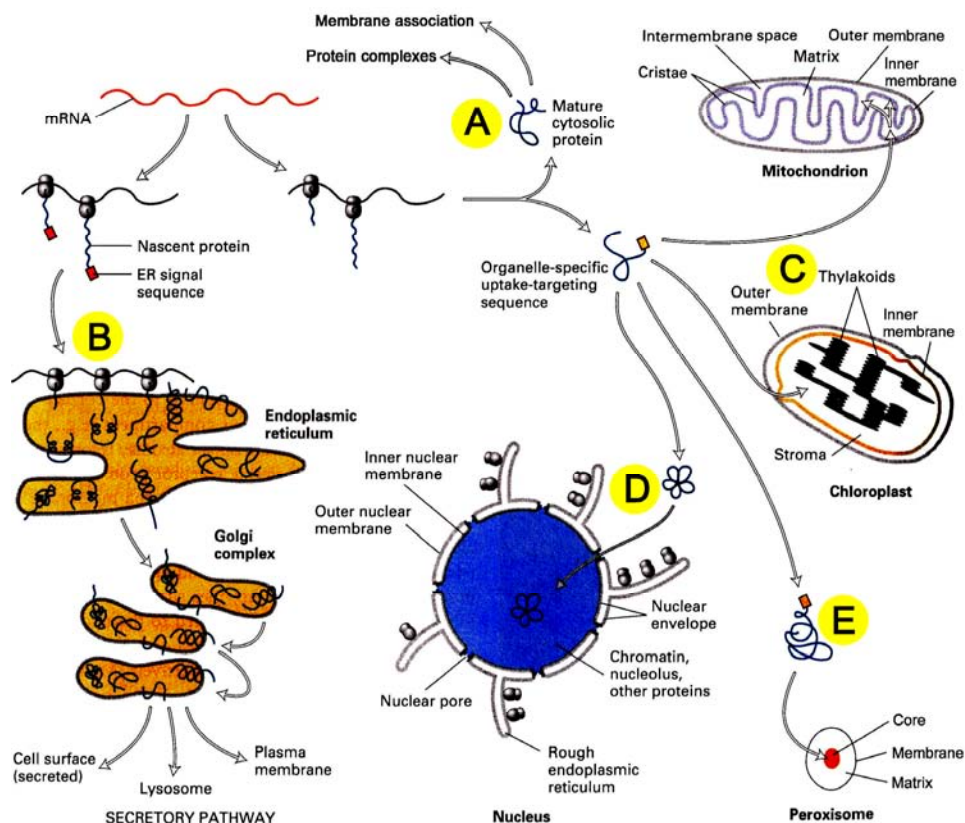


Abb. 7: Proteinsortierungswege der eukaryotischen Zelle. (A) Proteine ohne spezifische Signalsequenz verbleiben im Cytoplasma; (B) eine ER-Signalsequenz dirigiert Proteine cotranslational in den „secretory pathway“; (C) der Proteinimport in Mitochondrien und Chloroplasten erfolgt in ungefalteter Form; (D) und (E) der Import in den Kern und die Peroxisomen erfolgt in gefalteter Form. (verändert aus: Lodish *et al.*, 2001)

Alle übrigen kerncodierten Proteine erfahren ihre vollständige Faltung in die vorläufig endgültige Konformation im Cytosol, in dem sie entweder verbleiben oder in gefalteter Form in den Kern oder die Peroxisomen sortiert werden. Nachfolgend sollen diese beiden für die vorliegende Arbeit relevanten Sortierungswege näher beschrieben werden.

1.3.1. Peroxisomales Targeting

Peroxisomen zählen zu den bisher am wenigsten charakterisierten zellulären Kompartimenten und das, obwohl sie in Verbindung mit einigen menschlichen Erkrankungen stehen, von denen die wohl populärste das Zellweger-Syndrom ist. Anders als Mitochondrien oder Chloroplasten werden Peroxisomen von lediglich einer Membran umgeben und weisen keine eigene DNA auf. Daher sind alle am Aufbau beteiligten Proteine kerncodiert und werden an freien Ribosomen im Cytosol translatiert, wobei die Beteiligung des ERs an der Biogenese dieser Kompartimente derzeit diskutiert wird (Hoepfner *et al.*, 2005). Die biochemischen Aufgaben der Peroxisomen variieren in Abhängigkeit vom Zelltyp und den jeweiligen Wachstumsbedingungen und umfassen Funktionen im Lipidstoffwechsel, wie die α - und β -Oxidation von Fettsäuren, die Synthese von Isoprenoiden und mehrfach ungesättigter Fettsäuren, sowie den namensgebenden Peroxid-Metabolismus (Wanders & Tager, 1998). In der Zelle liegen sie dispers verteilt als 0,1 μm bis 1 μm große, zumeist kugelförmige Organellen vor.

Proteine die für eine Lokalisation in der peroxisomalen Matrix bestimmt sind, weisen so genannte „Peroxisomale Targeting Signale“, oder kurz PTS, auf. Derzeit sind zwei unterschiedliche, in nahezu allen Eukaryoten konservierte PTS bekannt, die vermutlich für den Import aller peroxisomalen Matrixproteine verantwortlich sind. Sie werden als PTS1 und PTS2 bezeichnet. Das PTS1 ist dabei das häufiger verwendete Sortierungssignal. Es besteht in den meisten Fällen aus den drei Aminosäureresten Ser - Lys - Leu, die sich jeweils am äußersten C-terminalen Ende des entsprechenden Proteins befinden (Gould *et al.*, 1988 & 1989). Aber auch unterschiedliche Abwandlungen dieser Tripeptidsequenz können den Import in Peroxisomen bedingen (Lametschwandtner *et al.*, 1998).

Die zweite, weitaus weniger häufig verwendete Sequenz, wird als PTS2 bezeichnet. Hierbei handelt es sich um ein Nonapeptid, welches überwiegend innerhalb der ersten 20 N-terminalen Aminosäurereste eines Proteins lokalisiert ist. Es umfasst die weniger stark konservierte Konsensussequenz Arg/Lys - Leu/Val/Ile – X₅ – His/Glu – Leu/Ala (Legakis & Terlecky, 2001).

Die am Import von Proteinen in die Peroxisomen beteiligten Proteine werden als Peroxine, oder kurz Pex-Proteine bezeichnet. Derzeit sind 23 unterschiedliche Pex-Proteine bekannt. Den initialen Schritt während des Imports eines Proteins in die Peroxisomen bildet die Bindung an cytosolische PTS-Rezeptoren. In allen bisher diesbezüglich untersuchten

Organismen wurden jeweils nur ein PTS1- und ein PTS2-Rezeptor identifiziert. Dabei stellt Pex5 den Rezeptor für das PTS1 und Pex7 den Rezeptor für das PTS2 dar. Nach der Bindung an das jeweilige PTS binden diese Rezeptoren zusammen mit dem gebundenen Protein an einen Docking-Komplex an der peroxisomalen Membran. Bisher identifizierte Proteine dieses Komplexes sind Pex13, Pex14 und Pex17 (Agne *et al.*, 2003; Abb. 8). Offensichtlich binden beide PTS-Rezeptoren an den gleichen Docking-Komplex, wobei Pex5 sowohl an Pex13 als auch an Pex14 binden kann, wohingegen für Pex7 bisher nur die Bindung an Pex13 nachgewiesen wurde (Otera *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2003).

Die nachfolgende Translokation in das peroxisomale Lumen ist derzeit noch wenig verstanden. In biochemischen Isolationsexperimenten konnten zwei Subkomplexe der peroxisomalen Importmaschinerie identifiziert werden. Der eine wurde als der bereits beschriebene Docking-Komplex erkannt, der andere setzte sich aus einem heteromeren Komplex aus den drei RING-Finger-Proteinen Pex2, Pex10 und Pex12 zusammen (Agne *et al.*, 2003). Sowohl Pex10 als auch Pex12 können den PTS1-Rezeptor binden, nehmen jedoch keinen direkten Einfluss auf das initiale Docking (Chang *et al.*, 1999).

Nach dem aktuellen Modell werden die beiden Subkomplexe über Interaktion mit dem mitochondrialen Matrixprotein Pex8 miteinander verbunden und bilden so den als Importomer bezeichneten Translokations-Komplex. Das Importomer vermittelt nun die eigentliche Translokation durch die peroxisomale Membran, bei der entsprechend dem „extended shuttle“ Modell der gesamte Komplex aus PTS-Rezeptor und gebundenem Protein in die peroxisomale Matrix importiert wird (Kunau, 2001; Brown & Baker, 2003). Im Anschluss erfolgt die Dissoziation des Rezeptor-Cargo-Komplexes, wodurch das importierte Protein in der mitochondrialen Matrix freigesetzt wird und nachfolgend der Export des Rezeptors zurück in das Cytosol stattfindet. Diese beiden Schritte involvieren vermutlich für Pex5 die beiden AAA-ATPasen Pex1 und Pex6, sowie möglicherweise eine Ubiquitinierung durch Pex4/Pex22 (Platta *et al.*, 2005; van der Klei *et al.*, 1998).

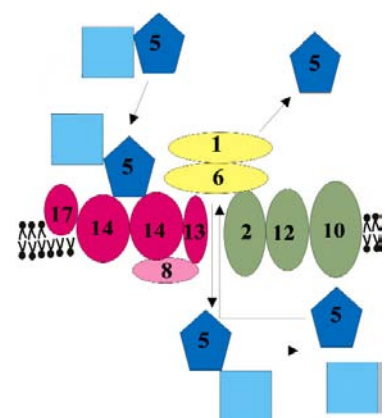


Abb. 8: Der Import peroxisomaler Matrixproteine dargestellt für PTS1. Die beteiligten PEX-Proteine sind als Nummern, das PTS1 tragende importierte Protein als hellblaue Box dargestellt. Für nähere Erläuterungen siehe Text. (verändert aus: Brown & Baker, 2003)

Eine Besonderheit des hier beschriebenen peroxisomalen Imports ist die Tatsache, dass nicht nur einzelne gefaltete Proteine, sondern auch ganze Proteinaggregate importiert

werden können (Mc New & Goodman, 1994). So ist es beispielsweise möglich Proteine ohne Signalsequenz in einem „Huckepack“-Verfahren durch Interaktion mit PTS-tragenden Proteinen in die peroxisomale Matrix zu transportieren (Lee *et al.*, 1997).

Der Import peroxisomaler Membranproteine ist derzeit weitestgehend unverstanden und liefert noch kein allgemeines Modell. Diskutiert werden sowohl der cytosolische Import, als auch eine Beteiligung des ERs. Zurzeit sind weder Konsensus-Signalsequenzen, noch entsprechende cytosolische Rezeptoren beschrieben. Bisher identifizierte Komponenten der Importmaschinerie sind Pex3, Pex16 und Pex19 (Übersicht in Fujiki *et al.*, 2006). Da der Import peroxisomaler Membranproteine für das Verständnis der vorliegenden Arbeit nicht zwingend relevant ist, wird von einer näheren Beschreibung des aktuellen Forschungsstandes an dieser Stelle abgesehen.

1.3.2. Proteinimport in den Kern

Der Proteintransport in und aus dem Kern erfolgt über die so genannten „Nuclear Pore Complexes“, oder kurz NPCs. Die NPCs sind große Proteinaggregate mit einem Molekulargewicht von rund 125 MDa und setzen sich aus geschätzten 1000 Proteinuntereinheiten, den Nucleoporinen, zusammen. Je nach Größe der Zelle und der Kernaktivität variiert ihre Anzahl pro Kern von rund 200 in Hefe bis zu geschätzten 50 Millionen in reifen *Xenopus*-Eizellen (Maul *et al.*, 1972; Cordes *et al.*, 1995).

Die durch den NPC gebildete Pore durchspannt beide Kernmembranen und ist für Proteine mit einem Molekulargewicht von bis zu 40 kDa frei passierbar. Der Transport größerer Proteine erfolgt ausschließlich in Abhängigkeit spezifischer Signalsequenzen. Die für den Import verantwortlichen Signalsequenzen werden als NLS (Nuclear Localization Signal), die für den Export verantwortlichen als NES (Nuclear Export Signal) bezeichnet. Das klassische NLS wurde erstmals für das große T-Antigen des SV40-Virus beschrieben (Kalderon *et al.*, 1984). Es umfasst die Sequenz Pro – Lys – Lys – Lys – Arg – Lys - Val, also eine kurze Ansammlung basischer Aminosäurereste. Verwandte Sequenzen sind vermutlich für den Import des Großteils aller zellulären Kernproteine verantwortlich, wobei auch Ausnahmen beschrieben wurden.

Das klassische NLS eines Kernproteins wird im Cytosol von einem Adapterprotein, das als Importin α oder Karyopherin α bezeichnet wird, erkannt und gebunden (Abb. 9). Die Bindung der NLS an Importin α ermöglicht die Anlagerung von Importin β an das gebildete Dimer. Dabei stellt Importin β den eigentlichen „Shuttle“-Rezeptor, der für den Kernimport notwendig ist, dar. Vermittelt durch die Interaktion von Importin β mit verschiedenen Nucleoporinen im NPC findet nun die Translokation des gesamten Komplexes in das Nucleoplasma statt. Der gesamte bis hierher beschriebene Translokationsprozess verläuft ohne die Aufwendung von Energie.

Im Inneren des Kerns bindet nun Ran-GTP an die Importin β -Untereinheit des importierten Komplexes. Ran ist eine Ras-verwandte GTPase und stellt ein zentrales Molekül im Kerntransport dar. Wie alle GTPasen liegt auch Ran in zwei unterschiedlichen Formen vor, Ran-GTP und Ran-GDP. Durch die Aktivität von an Histonen verankertem Ran-GEF (Guanosin Exchange Factor) wird Ran-GDP zu Ran-GTP umgewandelt und dadurch die Konzentration von Ran-GTP im Nucleoplasma hoch gehalten (Nemergut *et al.*, 2001). Dagegen wird die Ran-GTP Konzentration außerhalb des Kerns durch so genannte Ran-GAPs (GTPase Activating Protein) niedrig gehalten. Dabei stimuliert das Ran-GAP die ansonsten eher schwache, intrinsische GTPase-Aktivität von Ran (Bischoff *et al.*, 1994). Auf diese Weise entsteht ein etwa 100facher Konzentrationsgradient von Ran-GTP zwischen Nucleoplasma und Cytoplasma (Kalab *et al.*, 2002).

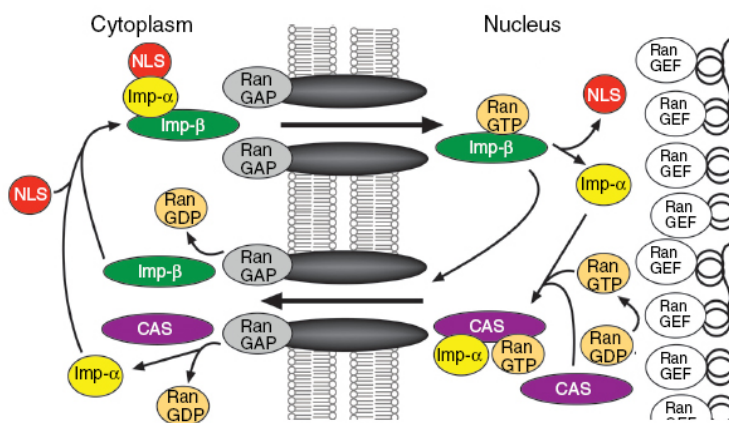


Abb. 9: Übersicht Kernimport. Für nähere Erläuterungen siehe Text. (aus: Pemberton & Paschal, 2005)

Die Bindung von Ran-GTP an Importin β bewirkt die Dissoziation des importierten Komplexes in seine Einzelkomponenten, so dass das transportierte NLS-Protein im Kern freigesetzt wird. Die beiden Importine werden nachfolgend in das Cytoplasma zurücktransportiert. Dabei bleibt Ran-GTP zunächst an Importin β gebunden und bewirkt dadurch dessen Export in das Cytoplasma. Der Export von Importin α findet indes in einem Komplex zusammen mit dem Exportin CAS und Ran-GTP statt.

Im Cytosol erfolgt nun die durch Ran-GAPs eingeleitete Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP. Dadurch wird die Dissoziation des Komplexes aus Importin α , CAS und Ran, bzw. von Importin β und Ran eingeleitet, so dass beide Importine einer weiteren Runde des Kernimports zur Verfügung gestellt werden. Ungebundenes CAS wird nach der Dissoziation des Komplexes zurück in Kern importiert. Das cytoplasmatische Ran-GDP bindet an den Importfaktor NTF2 (Nuclear Transport Factor 2) und wird zusammen mit diesem zurück in den Kern transportiert. Hier bewirken die Histon-gebundenen GEFs erneut den Austausch von GDP gegen GTP, wodurch NTF2 seine Affinität zu Ran verliert und als Folge aus dem Kern zurück in das Cytoplasma recycelt wird. Da der Kerntransport in beide Richtungen mit einem stetigen Verlust von Ran-GTP aus dem Nucleoplasma verbunden ist, stellt der beschriebene Re-Import von Ran eine essentielle Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des Ran-GTP-

Gradienten und damit des gesamten Transportgeschehens dar (Übersicht in Pemberton & Paschal, 2005).

1.4. Aufgabenstellung

Die späten Endosomen in Dictyostelium weisen eine Hülle aus filamentösem Aktin auf. Die biologische Funktion dieser Aktin-Hülle ist weitestgehend unverstanden. Der Einsatz Aktin-interagierender Drogen scheidet zur Untersuchung dieser Fragestellung aus, da aufgrund der globalen Wirkung dieser Substanzen das gesamte zelluläre Cytoskelett beeinträchtigt wird. Zum besseren Verständnis sollten in der vorliegenden Arbeit daher gezielte Manipulationen an der endosomalen Aktin-Hülle vorgenommen werden.

In einem in Drengk *et al.*, 2003 vorgestellten Ansatz wurde erstmals ein Aktin-interagierendes Protein über die Fusion an Vacuolin erfolgreich an die endosomale Membran transportiert. Das in dieser Studie verwendete Protein Cofilin bewirkte den vollständigen Verlust der endosomalen Aktin-Hülle und eine Aggregation der betroffenen Kompartimente. Überraschenderweise resultierte daraus keine offensichtliche Beeinträchtigung des endocytotischen Transits, so dass die Funktion der Aktin-Hülle im endocytotischen Ablauf nach wie vor unklar blieb.

In ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten daher analog zu dem oben genannten Hybridprotein-Ansatz weitere Aktin-interagierende Proteine mit unterschiedlichen Funktionen an die späte endosomale Membran dirigiert werden. Aus den daraus in den Zellen resultierenden Veränderungen sollten Rückschlüsse auf die Rolle der Aktin-Hülle im endocytotischen Transit, sowie den damit verbundenen Vorgängen an der endosomalen Membran gezogen werden.

Durch die Fusion zweier Proteine, wie sie im oben verwendeten Ansatz vollzogen wird, werden auch deren intrinsische Lokalisations-Informationen in einem Molekül vereint. Dadurch entsteht in der exprimierenden Zelle eine Art „molekulares Tauziehen“ der fusionierten Proteine. In der Folge wird die Lokalisation eines Hybridproteins durch den Partner mit der stärkeren Targeting-Information bestimmt.

Im Verlauf der Arbeit mit den unterschiedlichen Hybridproteinen wurde deutlich, dass die eingesetzten Aktin-interagierenden Proteine unterschiedliche Affinitäten für das Cytoskelett aufweisen. Da durch die Fusion an Vacuolin eine definierte Referenzgröße gegeben war, ermöglichte der Vergleich der zellulären Lokalisationen eine hierarchische Anordnung der Targeting-Signalstärken der in den Hybriden fusionierten Aktin-interagierenden Proteine. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die so erstellte Signalstärken-Hierarchie unter Verwendung des Hybridprotein-Ansatzes um die cytoplasmatischen Targeting-Signale für den Zellkern (NLS) und die Peroxisomen (PTS1) erweitert werden.

2. Ergebnisse Teil I – Manipulation der Aktin-Hülle später Endosomen durch ektopisches Protein-Targeting

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte durch gezielte Manipulation der endosomalen Aktinhülle deren biologische Funktion näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck sollten mittels des bereits in Drengk *et al.*, 2003 beschriebenen Systems unterschiedliche Aktin-interagierende Proteine über die Fusion mit Vacuolin an die endosomale Membran dirigiert werden, um speziell in dieser Lokalisation ihre spezifische Funktion auszuüben. Es wurden sowohl an der Polymerisation und Depolymerisation, als auch an der Modulation von Aktin beteiligte Proteine verwendet.

Dabei ist während der Untersuchung von Hybridproteinen zunächst auf deren zelluläre Lokalisation zu achten, da beide in einem Hybrid fusionierten Proteine in der Regel unterschiedliche Affinitäten innerhalb der Zelle aufweisen. Ob ein Protein durch die Fusion an Vacuolin erfolgreich an die Membranen später Endosomen dirigiert werden kann oder nicht, richtet sich also nach der Stärke seiner intrinsischen Lokalisationsinformation und ob diese der endosomalen Affinität von Vacuolin unterliegt.

Nur die unter gegebenen Umständen exklusive Lokalisation des Hybrids in einer bestimmten zellulären Lokalisation, im vorliegendem Fall an späten Endosomen, ermöglicht die spätere Zuordnung auftretender phänotypischer Veränderungen zu den durch das Hybridprotein verursachten Modifikationen an diesen Strukturen.

2.1. Targeting von DAip1 an späte Endosomen

Analog zu dem in Drengk *et al.*, 2003 für Cofilin vorgestellten Ansatz sollte hier DAip1 über Fusion mit Vacuolin an die späte endosomale Membran dirigiert werden. Bei der Auswahl der Vacuolin Isoform wurde die A-Isoform der B-Isoform vorgezogen, da weder für den Knockout, noch für die Überexpression von Vacuolin A ein vom Wildtyp abweichender Phänotyp beobachtet wurde (Jenne *et al.*, 1998; M. Maniak, persönliche Mitteilung). Für DAip1 war bereits bekannt, dass die Fusion von GFP am N-Terminus weder mit der Lokalisation, noch mit der Funktion des Proteins interferiert. Die C-terminale GFP-Fusion zeigte dagegen lediglich die korrekte Lokalisation, konnte den Knockout-Phänotyp aber nicht retten (Konzok *et al.*, 1999). Ein Fusionsprotein mit Vacuolin A als N-terminalen und DAip1 als C-terminalen Partner bot sich also als vielversprechendster Ansatz an. Zur Realisierung wurde das Plasmid Vac-Myc-DAip1 (#377) erstellt, in dem die DAip1 cDNA hinter die am 3'-Ende mit einer Myc-Epitop-Sequenz versehenen Vacuolin A cDNA Sequenz kloniert wurde (Abb. 11 A). Dabei sollte das eingefügte Myc-Epitop der späteren Detektion des Fusionsproteins in der Immunfluoreszenz dienen, da aufgrund der endogenen Expression

beider Proteine hierfür weder Antikörper gegen Vacuolin, noch gegen DAip1 verwendet werden konnten.

In einem Vorversuch wurde zunächst die zelluläre Lokalisation von endogenem DAip1, sowie von einer exogenen, am N-Terminus mit dem Myc-Epitop fusionierten Version von DAip1 untersucht. Zu letzterem Zweck wurde das Plasmid pB15-Myc-DAip1 Δ (#492) erstellt und in Wildtypzellen transformiert. Es wurden mehrere Klone aus unabhängigen Transformationen bezüglich ihres mikroskopischen Erscheinungsbildes begutachtet und der Klon 3B-6 stellvertretend für weitere Untersuchungen ausgewählt.

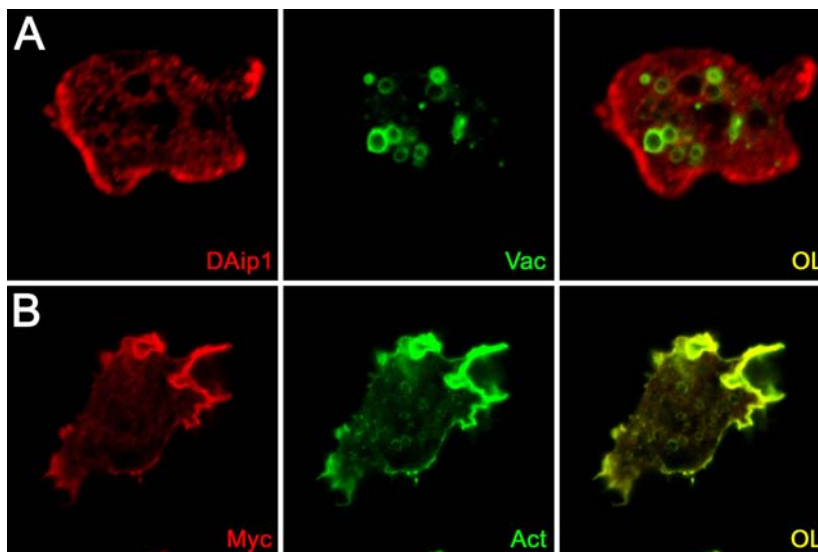


Abb. 10: Untersuchung der zellulären Lokalisation von endogenem und Myc-fusioniertem DAip1. (A) Vergleich der zellulären Lokalisation von endogenem DAip1 (mAK 246-153-2, rot) und Vacuolin A-GFP (grün); Bildbreite: 19 μ m. (B) Vergleich der Myc-fusionierten Version von DAip1 (pAK α Myc, rot) mit Aktin (mAK Act-1-11, grün), Bildbreite: 33 μ m. (OL) zeigte die jeweiligen Überlagerungsbilder an. Alle Bilder wurden im CLSM aufgenommen.

Wie in Abb. 10 dargestellt lokalisiert sowohl das endogene DAip1 (Abb. 10 A), als auch die ektopische Myc-markierte Version des Proteins (Abb. 10 B) überwiegend im Aktin-reichen Zellcortex. In beiden Präparaten ließen die jeweiligen Färbungen jedoch auch ansatzweise die Umrisse der durch Vacuolin beziehungsweise Aktin markierten späten Endosomen erkennen. Die Lokalisation zumindest eines geringen Anteils beider Proteine an späten Endosomen konnte also nicht gänzlich ausgeschlossen werden, war jedoch um ein Vielfaches schwächer als im Cortex. Da beide Proteine in der Zelle dieselbe Verteilung aufwiesen kann ein negativer Einfluss durch das am N-Terminus angefügte Myc-Epitop ausgeschlossen werden.

Im Folgenden wurden nun Wildtypzellen mit dem Vacuolin A-Myc-DAip1 (Vac-Myc-DAip1)-Konstrukt transformiert und Klone aus unabhängigen Transformationen isoliert. Alle untersuchten Klone zeigten entsprechend ihrer Expressionsrate einen vergleichbaren Phänotyp, so dass im Weiteren drei Klone für die nähere Charakterisierung ausgewählt wurden. Darunter waren die beiden schwachen Expriemierer, B1-7 und VII-9, sowie der starke Expriemierer 5A-2 (Abb. 11 D).

In einer ersten mikroskopischen Analyse wurde die zelluläre Lokalisation des Fusionsproteins in unterschiedlich starken Expriemierern untersucht (Abb. 11 B & C). Die Betrachtung der mikroskopischen Präparate zeigte deutlich ein von der Expressionsstärke

des Fusionsproteins abhängiges Lokalisationsverhalten. Der schwache Exprimierer zeigte eine exklusive Markierung von Vacuolen, wohingegen im starken Exprimierer zusätzlich auch eine cortikale Lokalisation des Hybrids vorzufinden war. Eine Interpretation dieser Beobachtung ist, dass Vacuolin offensichtlich eine stärkere Affinität zu späten Endosomen aufweist, als DAip1 zum cortikalen Aktin-Cytoskelett. Daher lokalisiert das Fusionsprotein zunächst an den Membranen später Endosomen. Erst wenn durch die gesteigerte Expression des Hybrids sämtliche Bindungsstellen für Vacuolin am Endosom abgesättigt sind erfolgt die zusätzliche, auf die Affinität von DAip1 zurückgehende, Lokalisation im Aktin-Cortex.

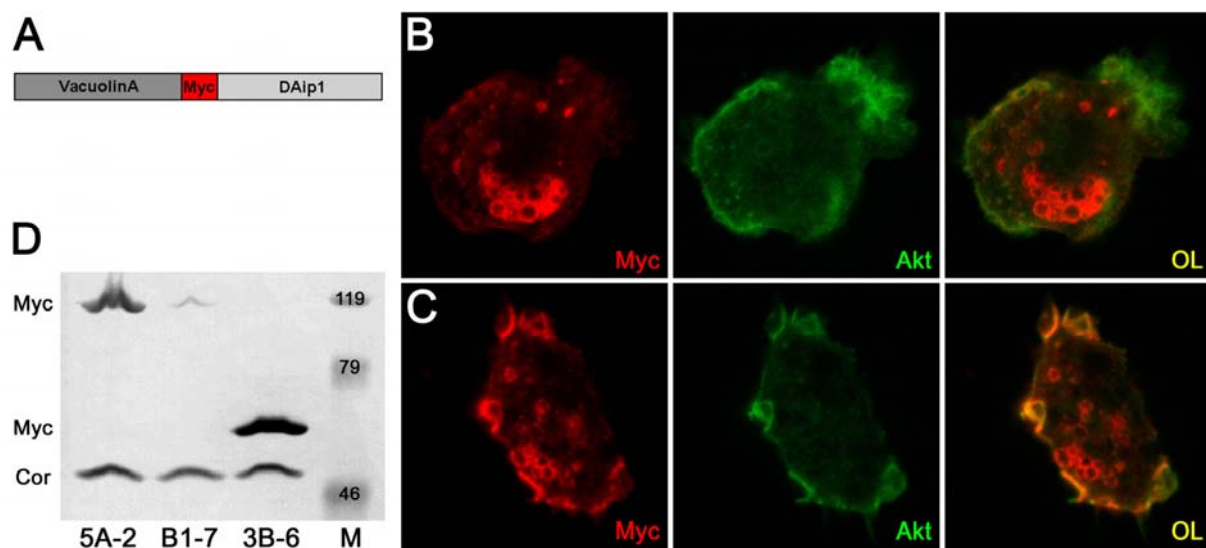


Abb. 11: Expression des Vac-Myc-DAip1-Hybrids. (A) Schematische Darstellung des Hybridproteins. Vacuolin und DAip1 sind maßstabsgerecht, das Myc-Epitop vergrößert dargestellt. (B) und (C) Zelluläre Verteilung des Hybrids (mAK 9-E-10, rot) im schwachen Exprimierer B1-7 (B) und im starken Exprimierer 5A-2 (C). In Grün ist die jeweilige F-Aktin-Färbung (Alexa 488-Phalloidin, grün) der Zellen angezeigt. Aufnahmen entstanden im CLSM. Bildbreiten in B: 24 μm und in C: 22 μm . (D) Kontrolle der Expressionsstärken durch Westernblot-Analyse. Zum Nachweis des Vac-Myc-DAip1-Hybrids (ca. 130 kDa) und von Myc-DAip1 (ca. 67 kDa) wurde ein Myc-Antikörper (mAK 9-E-10), zur Kontrolle gleicher Gesamteproteinmengen wurde ein Coronin-Antikörper (176-3D-6, untere Banden) verwendet. Der Blot zeigt deutlich die unterschiedlichen Expressionslevel des Hybrids in den beiden Vac-Myc-DAip1-Exprimierern, sowie die starke Expression von Myc-DAip1 im Klon 3B-6. Die angezeigten Zahlen geben das korrespondierende Molekulargewicht der Größenmarkerbanden (M) an.

2.1.1. Das Vac-Myc-DAip1-Hybrid rekrutiert Cofilin an die endosomale Membran und depolymerisiert deren Aktin-Hülle

Die weitere Beobachtung der mikroskopischen Präparate in Abb. 11 erbrachte außerdem den Befund, dass die durch das Hybrid markierten späten Endosomen in den meisten Zellen aggregiert vorliegen, wohingegen im Wildtyp eine disperse Verteilung anzutreffen ist. Dieselbe Beobachtung wurde auch in Drengk *et al.*, 2003 für die Expression des Vacuolin A-Myc-Cofilin Hybrids beschrieben. In diesem Fall gingen wir davon aus, dass die Aggregation eine Folge des durch die Anwesenheit von Cofilin induzierten Verlustes der Aktin-Hülle um die späten Endosomen ist. Anders als für Cofilin wurde für DAip1 aber keine intrinsische Aktin-depolymerisierende Aktivität beschrieben, die den Verlust der Aktinhülle in den gezeigten Mutanten hätte bewirken können.

Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurde im Weiteren zunächst eine neue Aktin-Färbung der Mutanten mit einem gegenüber der bisher verwendeten Phalloidinfärbung wesentlich sensitiverem Antikörper durchgeführt. Die Betrachtung dieser Präparate zeigte deutlich einzelne Aktin-umhüllte Endosomen im Inneren der Zelle (Abb. 12 A, Pfeile). Diese wiesen jedoch keine Markierung für das Vac-Myc-DAip1-Hybrid auf und repräsentieren daher vermutlich ein spätes endosomales Reifestadium vor der Assoziation mit Vacuolin. Die zweite Möglichkeit, dass es sich bei diesen Vacuolen um kürzlich von der Plasmamembran abgeschnürte Endosomen handelt besteht zwar prinzipiell, ist aber aufgrund der sehr kurz andauernden Aktin-Umhüllung dieser Kompartimente von weniger als einer Minute eher unwahrscheinlich (s. Einleitung). Die durch das Hybridprotein markierten, aggregierten Vacuolen wiesen dagegen keine Aktinfärbung auf (Abb. 12 A). Demnach geht vermutlich auch in diesen Mutanten die beobachtete Aggregation auf die Depolymerisation der endosomalen Aktin-Hülle zurück.

Wie aber wird der Verlust der endosomalen Aktin-Hülle durch DAip1 induziert? In unterschiedlichen Untersuchungen wurde bereits die molekulare Interaktion von (D)Aip1 und Cofilin bei der Depolymerisation von F-Aktin beschrieben (s. Einleitung). Da DAip1 allein für die Depolymerisation nicht ausreichend ist, war es also nahe liegend die Lokalisation von endogenem Cofilin in den Vac-Myc-DAip1-Mutanten zu überprüfen. Tatsächlich zeigte die Immunfluoreszenz mit einem α -Cofilin-Antikörper eine deutliche Anreicherung des endogenen Cofilins an den aggregierten Vacuolen, die sich eindeutig von der ansonsten eher cytoplasmatischen und zum Teil corticalen Färbung absetzte (Abb. 12 B). Da eine vergleichbare Anreicherung von Cofilin an späten Endosomen in Wildtypzellen nicht beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass das veränderte Lokalisationsverhalten durch die Anwesenheit des an die Endosomen dirigierten DAip1 hervorgerufen wird (Abb. 12 C).

Demnach wird also endogenes Cofilin durch das von Vacuolin an die späten Endosomen dirigierte DAip1 ebenfalls an diese Kompartimente rekrutiert. Die offensichtliche Folge der Anwesenheit beider Proteine ist die Depolymerisation der endosomalen Aktinhülle und die daraus resultierende Aggregation der betroffenen späten Endosomen. Da DAip1 die zelluläre Lokalisation von Cofilin beeinflusst war es nun im Weiteren interessant zu sehen, ob auch umgekehrt an Vacuolen dirigiertes Cofilin das Lokalisationsverhalten von endogenem DAip1 in diesen Zellen verändert.

Zu diesem Zweck wurde der bereits publizierte Vacuolin A-Myc-Cofilin (VMC)-Klon A14 (Drengk *et al.*, 2003) erneut kultiviert und in einer Immunfluoreszenz die Lokalisation von endogenem DAip1 mittels einer Antikörperfärbung bestimmt (Abb. 12 D). Wie erwartet wiesen die begutachteten Zellen die bereits beschriebenen, vom Hybridprotein markierten, aggregierten Vacuolen auf. In der Gegenfärbung der Zellen mit dem DAip1-Antikörper zeigte

sich neben der corticalen Lokalisation des endogenen Proteins zusätzlich eine deutliche Anreicherung an den aggregierten Vacuolen. Da eine solche Anreicherung an späten Endosomen in Kontrollzellen (Abb. 10 A) nicht beobachtet werden konnte ist davon auszugehen, dass das veränderte Lokalisationsverhalten durch die Interaktion mit dem an die Vacuolen dirigierten Cofilin bedingt wird.

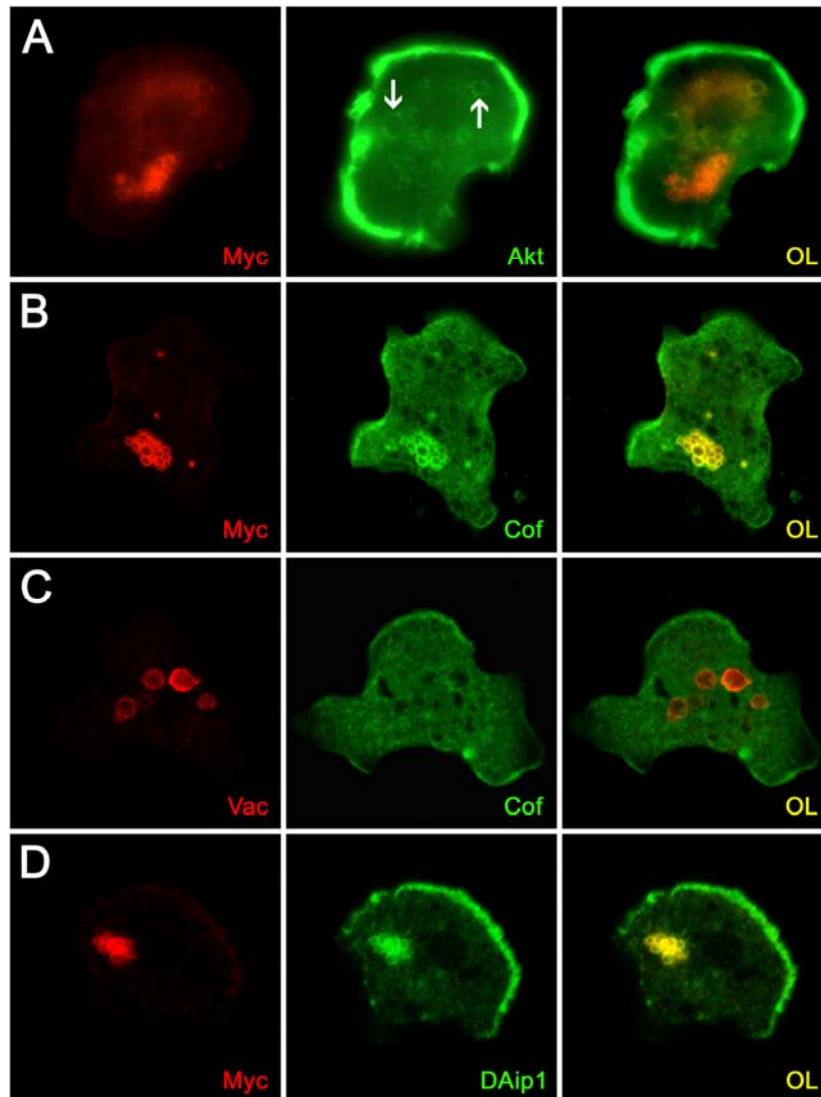


Abb. 12: Das Zusammenspiel von DAip1 und Cofilin während der Depolymerisation der endosomalen Aktinhülle. (A) und (B) Vac-Myc-DAip1-exprimierende Zellen: (A) Die durch das Hybrid (mAK 9-E-10, rot) markierten, aggregierten Endosomen sind frei von Aktin (mAK Act-1-11, grün). (B) Aggregierte Endosomen (mAK 9-E-10, rot) weisen eine Anreicherung von endogenem Cofilin (pAK α -Cof, grün) auf. (C) Wildtypzellen angefärbt für endogenes Vacuolin (mAK 263-79-2, rot) und Cofilin (pAK α -Cof, grün). (D) Vac-Myc-Cofilin-exprimierende Zellen zeigen eine Anreicherung von endogenem DAip1 (mAK 246-153-2, grün) an den durch das Hybrid markierten, aggregierten Endosomen (pAK α Myc, rot). Bilder in A wurden im FM, in B bis D im CLSM aufgenommen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Bilder in B und C in Falschfarbe (rot/grün) dargestellt. Bildbreiten: A: 21 μ m; B: 33 μ m; C: 31 μ m; D: 21 μ m.

Zusammengenommen belegen die hier dargestellten Beobachtungen eindeutig, dass DAip1 und Cofilin gegenseitig ihre Rekrutierung an F-Aktin-haltige Strukturen bedingen können und unterstützen das Modell eines Zusammenspiels beider Proteine während der Depolymerisation von F-Aktin.

2.1.2. Die Expression des Vac-Myc-DAip1-Hybrids induziert eine Verzögerung im endocytotischen Transit der Zellen

Die Aggregation der späten Endosomen legt Veränderungen im Verlauf des endocytotischen Transits nahe. Vor allem im Bezug auf die Exocytose könnten Abweichungen vom Wildtypverhalten zu erwarten sein, da die von Vacuolin dekorierten Endosomen die spätesten und damit exocytosekompetenten Kompartimente im endocytotischen Verlauf markieren. Sowohl deren Aggregation, als auch der Verlust ihrer Aktinhülle könnten dabei einen negativen Einfluss auf die Fusion mit der Plasmamembran ausüben. Aus diesem Grund sollte der Verlauf des endocytotischen Transits in den Vac-Myc-DAip1-Mutanten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die endocytotischen Kompartimente der Zellen in einem „Puls“ mit einer Mischung aus TRITC- und FITC-Dextran-haltigem Medium beladen und die Ausscheidung dieses Mediums über die Zeit quantifiziert. Die Verwendung des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes FITC ermöglichte überdies die Aufzeichnung der endosomalen pH-Wert-Veränderungen in den Zellen.

Die Auswertung dieser Transit-Assays zeigte für die Vac-Myc-DAip1-Mutanten eine von der Expression des Hybrids abhängige Verringerung der Exocytoserate. So wies der starke Exprimierer 5A-2 eine gegenüber dem Wildtyp um ca. 20 Minuten und der schwache Exprimierer B1-7 eine um ca. 13 Minuten verzögerte Ausscheidung des internalisierten Flüssigphasenmarkers auf (Abb. 13 A).

Die Betrachtung des über den FITC/TRITC-Quotienten ermittelten endosomalen pH-Verlaufs zeigte, dass beide Mutanten von Beginn an einen von der Expressionsrate des Hybrids abhängigen, erhöhten endosomalen pH-Wert aufweisen, der sich erst über den gemessen Zeitraum von 120 Minuten dem des Wildtyps angleich (Abb. 13 B). Diese Beobachtungen lassen entweder auf eine verringerte Ansäuerung oder aber auf eine vorzeitige Neutralisierung der frühen Endosomen in den Mutanten schließen.

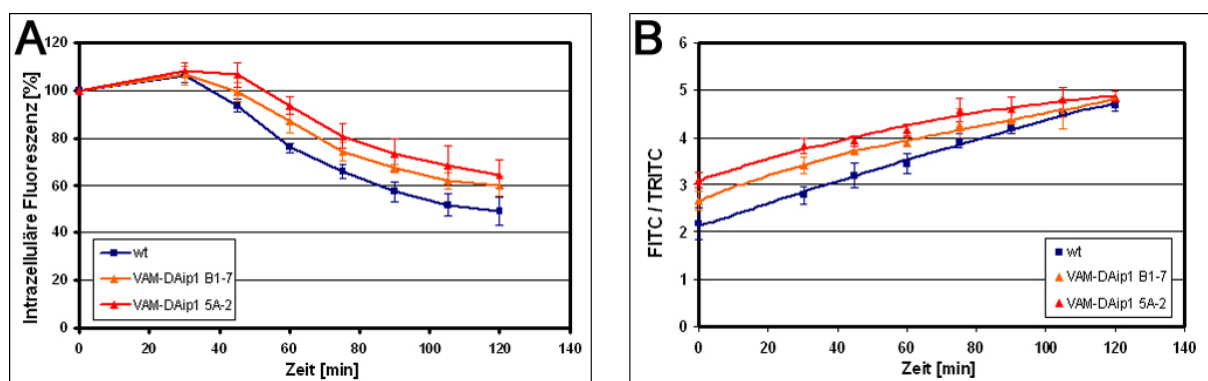


Abb. 13: Transit-Assays der Vac-Myc-DAip1-Mutanten. (A) Zeitlicher Verlauf der Ausscheidung des internalisierten Flüssigphasenmarkers, gemessen an der in den Zellen verbleibenden TRITC-Fluoreszenz. (B) pH-Verlauf während des endocytotischen Transits, ermittelt durch den FITC/TRITC-Quotient. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar.

2.1.3. Die Sekretion lysosomaler Hydrolasen ist in Vac-Myc-DAip1-Zellen reduziert

Während der Exocytose werden neben unverdaubaren Nahrungsrückständen auch die zu diesem Zeitpunkt nicht recycelten lysosomalen Enzyme in das umgebende Medium ausgeschieden. Dabei ist bekannt, dass unterschiedliche Enzyme unterschiedlich stark in der Zelle zurückgehalten werden. Saure Phosphatase lokalisiert vermutlich entsprechend ihres pH-Optimums in frühen, sauren Endosomen und wird im weiteren Verlauf des endocytotischen Transits effektiv recycelt, so dass nur ein geringer Anteil von weniger als 10% des Enzyms in das umgebende Medium abgegeben wird. Dagegen sind andere Hydrolasen, wie α -Mannosidase oder β -Glucosidase auch in späten, neutralen Endosomen anzutreffen und werden während der Exocytose vermehrt ausgeschieden, so dass nur etwa 50% der Enzymaktivität in den Zellen verbleibt (Dimond *et al.*, 1981; Ebert *et al.*, 1990; Temesvari *et al.*, 1996a).

Die gemessene Verzögerung im endocytotischen Transit, sowie die Aggregation der späten Endosomen oder der Verlust ihrer Aktinhülle könnte in Vac-Myc-DAip1-Zellen eine Veränderung der Sekretionsrate lysosomaler Enzyme bewirken. Daher wurde im Weiteren die in den Zellen verbleibende Enzymaktivität von Saurer Phosphatase, sowie von α -Mannosidase prozentual bestimmt und mit unterschiedlichen Kontrollzellen verglichen (Abb. 14 A & B). Dabei wurde der ermittelte prozentuale Wert des Wildtyps für jede Messreihe gleich 100% gesetzt und die Werte der Mutanten diesem Wert angeglichen. Da eine solche Untersuchung auch mit den Vac-Myc-Cofilin exprimierenden Zellen noch nicht durchgeführt wurde, sollten diese im Rahmen dieser Messreihe ebenfalls analysiert werden. Aus Verfügbarkeitsgründen wurde hier der schwach exprimierende Vac-Myc-DAip1-Klon VII-9 verwendet, der sich jedoch in Bezug auf sein mikroskopisches Erscheinungsbild und der Expressionsstärke des Hybrids nicht wesentlich von dem in den vorherigen Untersuchungen verwendeten Klon B1-7 unterschied (Abb. 14 C).

Die Auswertung dieser Untersuchungen zeigte, dass im starken Vac-Myc-DAip1-Expriemierer 5A-2, sowie in Vac-Myc-Cofilin exprimierenden Zellen eine leicht verstärkte Retention von Saurer Phosphatase auftritt (Abb. 14 A). Größere Abweichungen vom Wildtyp waren in dieser Messreihe nicht zu erwarten, da der Wert für die in den Zellen zurückgehaltene Aktivität für den Wildtyp in den Messungen bereits bei über 90% lag (s.o.). Der schwache Vac-Myc-DAip1-Expriemierer VII-9, sowie die entsprechenden Myc-fusionierten Überexpriemierer beider Proteine wiesen dagegen keine signifikanten Veränderungen gegenüber dem Wildtyp auf (Abb. 14 A).

Für die stärker ausfallende Sekretion der α -Mannosidase zeigten sich deutlichere Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp (Abb. 14 B). Hier konnte für beide Vac-Myc-DAip1-Expriemierer, sowie den Vac-Myc-Cofilin-Expriemierer eine signifikant verstärkte Retention von α -Mannosidase in den Zellen nachgewiesen werden. Dabei ist der

Effekt offensichtlich abhängig von der Expressionsstärke des Vac-Myc-DAip1-Hybrids, da der starke Exprimerer deutlich mehr Enzymaktivität zurückhielt.

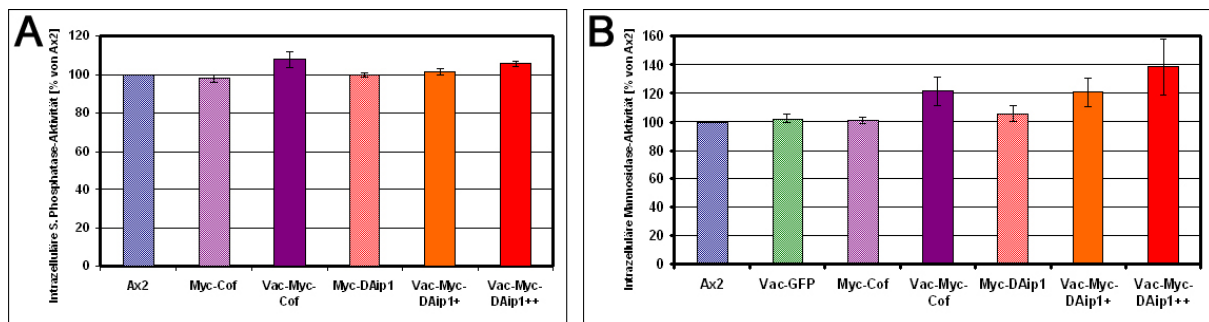


Abb. 14: Intrazellulär verbleibende Enzymaktivität lysosomaler Enzyme. (A) Saure Phosphatase (B) α -Mannosidase. In den Messungen verwendet wurden Zellen des Wildtyps Ax-2 (4/5), sowie die Mutanten Myc-Cofilin (aus Drengk *et al.*, 2003; 3/2), Vacuolin A-GFP 13C13 (-/2), Vac-Myc-Cofilin A14 (5/4), Myc-DAip1 3B-6 (2/2), Vac-Myc-DAip1 VII-9 (+;3/2) und Vac-Myc-DAip1 5A-2 (++;4/5). Die Anzahl unabhängiger Messungen aus denen die dargestellten gemittelten Werte hervorgingen sind für die einzelnen Zelltypen in Klammern angegeben (A/B). (C) Der Westernblot mit einem Antikörper gegen Vacuolin (mAK 263-79-2) zeigt vergleichbare Mengen des Hybridproteins (ca. 130 kDa) in den beiden schwachen Vac-Myc-DAip1-Exprimierern B1-7 und VII-9. Die untere Bande markiert das endogene Vacuolin und dient als Auftragskontrolle. Zahlen geben die korrespondierenden Molekulargewichte der Markerbanden (M) an.

Da weder die zusätzliche Expression von Vacuolin A-GFP, noch die der Myc-markierten Versionen von DAip1 und Cofilin in den entsprechenden Zellen ein abweichendes Sekretionsverhalten induzierten, ist ein auf die reine Überexpression eines dieser Proteine zurückzuführender Einfluss während dieses Prozesses auszuschließen. Es ist daher wahrscheinlich, dass die in Vac-Myc-DAip1- und Vac-Myc-Cofilin-Zellen beobachteten Abweichungen eine direkte Folge der beschriebenen Veränderungen an den späten Endosomen darstellen.

2.2. Targeting von Coronin an späte Endosomen

In einem nächsten Ansatz sollte Coronin über die Fusion an Vacuolin A-Myc an die Membran später Endosomen dirigiert werden. Da für Coronin bereits eine N-terminale Fusion mit GFP als korrekt lokalisierend und funktionell beschrieben wurde (Fukui *et al.*, 1997), konnte von einer diesbezüglichen Voruntersuchung abgesehen werden.

Zur Erstellung des Vacuolin A-Myc-Coronin-Konstruktes wurde die Coronin cDNA hinter die VacuolinA-Myc-Sequenz im Plasmid #331 kloniert (Abb. 15 A). Das daraus resultierende Plasmid #376 wurde in Wildtypzellen transformiert und unabhängige Klone mit unterschiedlichem Expressionsniveaus des Hybrids isoliert und verglichen. Zur weiteren Charakterisierung wurden stellvertretend ein schwacher (Vac-Myc-Cor B8) und ein starker Exprimerer (Vac-Myc-Cor B7) ausgewählt (Abb. 15 B).

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Lokalisationsstudie waren auf den ersten Blick weniger leicht zu interpretieren als im Fall des zuvor beschriebenen Hybridproteins, da

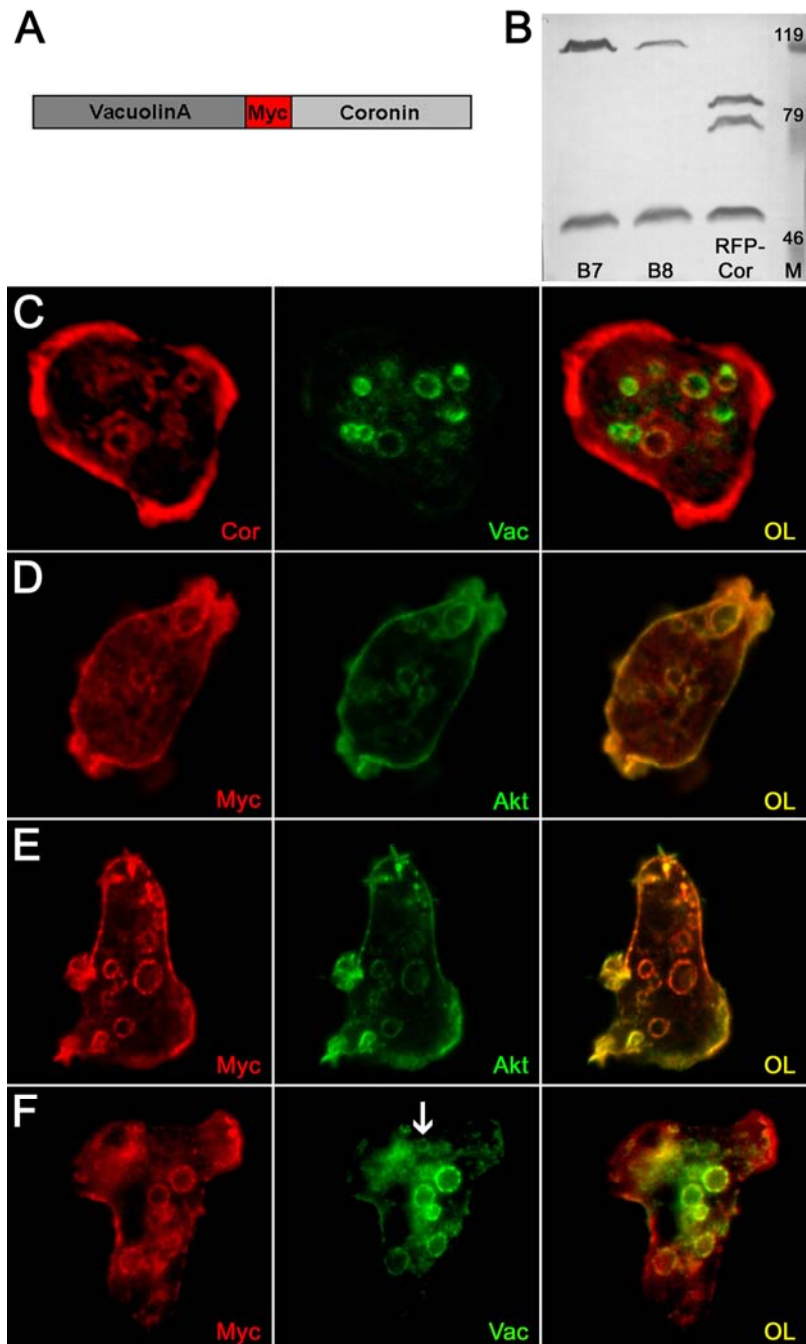
Coronin neben dem Cortex auch an der Oberfläche von Endosomen lokalisiert und dort während der weiteren endosomalen Reifung graduell durch Vacuolin ersetzt wird (Rauchenberger *et al.*, 1997; s. Einleitung). Dementsprechend zeigte auch die in Vacuolin-GFP Zellen durchgeführte Kontrollfärbung neben der cortikalen Anreicherung eine Colokalisation mit einigen der GFP markierten späten Endosomen (Abb. 15 C). Aufgrund dieser partiell übereinstimmenden Affinität von Coronin und Vacuolin war es im Folgenden schwieriger die beobachtete Hybridlokalisation einem der beiden fusionierten Proteine zuzuordnen.

Im schwachen Vac-Myc-Cor Expressierer B8 lokalisierte das Hybridprotein sowohl im Cortex, als auch an Endosomen. Die beobachtbare Verteilung des Hybrids war dabei mit der von filamentösem Aktin nahezu identisch, was auf eine durch Coronin bedingte Lokalisation des Hybrids unter diesen Bedingungen schließen ließ (Abb. 15 D). Die etwa fünffach stärkere Expression im Klon B7 induzierte eine deutliche Verschiebung dieser Verteilung, wobei eine zusätzliche Anreicherung des Hybrids an den Endosomen zu beobachten war. Diese wurde besonders im direkten Vergleich mit der entsprechenden Aktin-Färbung der Zellen erkennbar, zu deren endosomaler Farbintensität hier eine deutliche Diskrepanz auftrat (Abb. 15 E).

Soweit sprechen diese Beobachtungen also für eine überwiegend durch Coronin bestimmte Lokalisation des Vac-Myc-Cor-Hybrids. Die partielle Beteiligung von Vacuolin an der endosomalen Lokalisation kann jedoch auch im schwachen Expressierer B8 nicht ausgeschlossen werden. Für eine genauere Bestimmung der Affinitätsverhältnisse im Hybrid war die Unterscheidung unterschiedlicher später endosomaler Reifestadien, also von Coronin- und Vacuolin-positiven Endosomen, notwendig. Allerdings konnte die Verwendung von Antikörpern zum selektiven Nachweis der endogenen Proteine aufgrund der Zusammensetzung des Hybrids nicht herangezogen werden. Daher wurden im Weiteren Wildtypzellen mit einem Vacuolin A-GFP- (Plasmid # 128-4) und dem Vac-Myc-Cor-Konstrukt cotransformiert. Die erhaltenen Klone wurden mittels Westernblot auf die Expression beider Konstrukte überprüft (ohne Abb.) und Klon #17, der eine moderate Expression des Hybrids bei starker Vacuolin A-GFP-Expression aufwies, wurde für eine genauere mikroskopische Begutachtung ausgewählt (Abb. 15 F).

Die Betrachtung der Zellen zeigte in der Myc-Färbung das erwartete Lokalisationsmuster des Vac-Myc-Cor-Hybrids mit deutlicher Markierung von Cortex und Endosomen. Der Vergleich mit GFP-Vacuolin A offenbarte, dass zwar die meisten, aber nicht alle der Vacuolin-positiven Endosomen eine Myc-Markierung aufwiesen (s. Pfeil in Abb. 15 F). Demnach wird die beobachtete endosomale Lokalisation des Hybrids in diesen Zellen überwiegend durch die Affinität von Coronin bestimmt, da anderenfalls eine komplette Colokalisation mit Vacuolin A-GFP zu erwarten gewesen wäre.

Abb. 15: (A) Schematische Darstellung des Vac-Myc-Cor-Hybridproteins. Vacuolin und Coronin sind maßstabsgerecht, das Myc-Epitop vergrößert dargestellt. (B) Westernblot-Analyse der verwendeten Vac-Myc-Cor-Expriemier B7 und B8, sowie des RFP-Coronin-Expriemierers #2 mittels eines Coronin-Antikörpers (mAK 176-3D-6). Die Banden zeigen deutlich das erwartete Hybridprotein (ca. 121 kDa), RFP-Coronin (ca. 85 kDa), sowie in allen Spuren endogenes Coronin, das gleichzeitig als Ladekontrolle diente (ca. 55 kDa). Die Herkunft der Doppelbande bei ~80 kDa in der RFP-Coronin Spur konnte nicht eindeutig geklärt werden, stellt aber möglicherweise ein Abbauprodukt dar. Zahlen geben das korrespondierende Molekulargewicht der Markerbanden (M) wider. (C) Lokalisation von endogenem Coronin (mAK 176-3D-6, rot) in Vacuolin A-GFP (grün)-expriemierenden Zellen. (D) und (E) Lokalisation des Vac-Myc-Cor-Hybrids (mAK 9-E-19, rot) im schwachen Expriemier B8 (D) und im starken Expriemier B7 (E). In Grün ist die Lokalisation von F-Aktin (Alexa 488-Phalloidin) dargetellt. Die Bilder in D und E wurden unter denselben Bedingungen am CLSM aufgenommen, was den direkten Vergleich der beiden Reihen ermöglicht. (F) Die Lokalisation des Hybrids (mAK 9-E-10, rot) in mit Vacuolin A-GFP (grün) cotransformierten Zellen. Die Bilder in C bis E entstanden im CLSM, in F im FM. Bildbreiten: C: 24 µm; D: 19 µm; E und F: 27 µm.



Zusammengenommen sprechen die bisherigen Untersuchungen also dafür, dass das Vac-Myc-Cor-Hybrid zunächst der Affinität von Coronin folgt. Erst die Saturation der Coronin-Bindungsstellen im stärkeren Expriemier B7 bewirkt die zusätzliche, auf die Affinität von Vacuolin zurückgehende, Anreicherung des Hybrids an späten Endosomen. Demnach stellt Coronin also den stärkeren Partner im Hybridprotein dar, der die Affiniät von Vacuolin dominiert.

Bezogen auf die Aktinhülle der Endosomen, sowie deren übriges Erscheinungsbild ließen sich in den beiden Expriemierern B7 und B8 keine mikroskopisch erkennbaren Unterschiede untereinander, sowie gegenüber dem Wildtyp feststellen (Abb. 15 D + E, ohne Abb.). Ein

offensichtlicher Einfluss durch das zumindest im starken Exprimierer zusätzlich an die späten Endosomen dirigierte Coronin war also nicht erkennbar.

2.2.1. Die Sekretion lysosomaler Enzyme in den Vac-Myc-Cor-Mutanten

Da die Lokalisation des Hybrids offensichtlich überwiegend durch die Eigenschaften von Coronin bestimmt wird, ist die Zuordnung eines etwaigen Phänotyps zu Veränderungen an der endosomalen Hülle nicht direkt möglich. Eine gemessene Veränderung könnte auch das Resultat überexprimierten Coronins oder aber der Mislokalisierung von Vacuolin im Zellcortex darstellen.

Trotzdem sollten die Zellen bezüglich ihrer Enzymsekretion untersucht werden, um einen möglichen Anhaltspunkt für etwaige Veränderung an den späten endosomalen Kompartimenten zu erhalten. Um einen auf der Überexpression von Coronin beruhenden Effekt erkennen zu können, wurden in der Messung RFP-Coronin -exprimierende Zellen (Abb. 15 B; Plasmid #524) als Kontrolle mitgeführt.

Die Auswertung dieser Versuche (Abb. 16) erbrachte weder für die beiden Vac-Myc-Cor-Exprimierer B7 und B8, noch für die RFP-Coronin Kontrollzellen signifikante Abweichungen vom Wildtypverhalten. Aufgrund dieser, sowie der Ergebnisse aus der Lokalisationsstudie wurde von einer weiteren Untersuchung der Mutanten abgesehen.

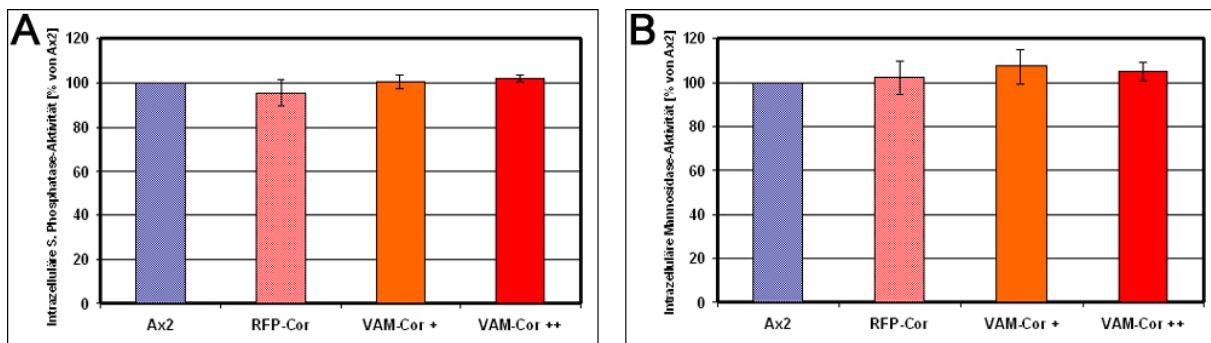


Abb. 16: Intrazellulär verbleibende Enzymaktivität lysosomaler Enzyme. (A) Saure Phosphatase (B) α -Mannosidase. Verwendet wurden Zellen des Wildtyps Ax-2 (5/6), sowie die Mutanten RFP-Coronin #5 (4/5), Vac-Myc-Cor B8 (+; 5/6) und B7 (++; 5/6). Die Anzahl unabhängiger Messungen aus denen die dargestellten gemittelten Werte hervorgingen sind für die einzelnen Zelltypen in Klammern angegeben (A/B).

2.3. Targeting von Scar an die endosomale Membran

Nachdem nun bereits auf unterschiedlichen Wegen versucht wurde die endosomale Aktinhülle zu schwächen oder zu zerstören, sollte in diesem Ansatz eine Verstärkung derselben erfolgen. Zu diesem Zweck war geplant das Protein Scar, welches einer der Hauptaktivatoren des Arp2/3-Komplexes ist, durch die Fusion mit Vacuolin A an späte Endosomen zu dirigieren.

Zum Erstellen eines Vacuolin A-Myc-Scar Konstrukts wurde die Scar-Sequenz aus genomischer Wildtyp-DNA amplifiziert und in einem Expressionsvektor hinter die Vacuolin A-

Myc-Sequenz einkloniert. Die korrekte Insertion der Sequenz wurde durch Sequenzierungen überprüft. Der daraus resultierende Vektor #416 wurde in zahlreichen Ansätzen, sowohl durch klassische Transformation, als auch durch Elektroporation, in Wildtypzellen transformiert. Aus keiner dieser Transformationen konnte ein das Hybridprotein dauerhaft exprimierender Klon isoliert werden. Zwar zeigten sich auf den entsprechenden Platten nach Zugabe des Selektionsdrucks anfänglich überlebende Zellen, diese wiesen jedoch eine stark veränderte Morphologie auf, teilten sich nur sehr langsam und starben schließlich innerhalb weniger Tage ab.

Diese Beobachtungen legten eine cytotoxische Wirkung des exprimierten Vac-Myc-Scar-Hybridproteins nahe. Um dennoch Zellen mit einer zumindest vorübergehenden Expression des Hybrids zu erhalten sollte das von Blaauw *et al.*, 2000 beschriebene Tetrazyklin-abhängige Expressionssystem eingesetzt werden. Dazu wurde die komplette Vac-Myc-Scar-Sequenz über PCR aus Plasmid #416 amplifiziert und in den Vektor MB38 einkloniert. Der resultierende Vektor MB38-VAM-Scar (#515) wurde anschließend in MB35-Zellen transformiert und die anwachsenden Klone unter repressiven Bedingungen (3 µg Tetrazyklin/ml Medium) angezogen und isoliert. Die isolierten Klone wurden daraufhin dupliziert. Die eine Tochterkultur wurde als Stammkultur unter repressiven Bedingungen weiter kultiviert, die andere durch Tetrazyklin-Entzug induziert. Nach mehrstündiger Induktion wurden Proteinproben der Klone genommen und in einer Westernblot-Analyse auf Expression des Hybrids untersucht (Abb. 17 A). Aus den Klonen die eine deutliche, wenn auch stets schwache Expression des Hybrids zeigten wurden drei für eine nähere Charakterisierung in einer Immunfluoreszenz ausgewählt. Nach 15stündiger Induktion wurden verschiedenen Präparate der Zellen angelegt, in denen jeweils ein Myc-Antikörper in Kombination mit einem Vacuolin-Antikörper oder einer Aktin-Färbung verwendet wurden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung fielen widersprüchlich aus. Die erste Begutachtung der Präparate zeigte, dass in lediglich weniger als 1% der Zellen eines Klons eine durch ein erkennbares Myc-Signal nachweisbare Induktion des Hybrids auftrat. Hinzu kam außerdem, dass die durch die Farbintensität des Myc-Signals abgeschätzte Expressionsstärke des Hybrids auch zwischen den induzierten Zellen stark variierte.

In den Zellen lokalisierte das Hybridprotein überwiegend cytoplasmatisch, ohne dabei erkennbar endosomale Strukturen zu markieren. Vereinzelt konnte auch eine schwache cortikale Anreicherung beobachtet werden (Abb. 17 B). In einigen der Zellen war in der korrespondierenden Phalloidin-Färbung eine deutliche Zunahme von F-Aktin im Zellcortex zu beobachten (o. Abb). Die Beobachtungen der Vacuolin-Färbung fielen noch uneindeutiger aus. Hier zeigte sich keinerlei Übereinstimmung mit der Lokalisation des Hybrids, und dass, obwohl Vacuolin eine Komponente des Hybrids darstellt und dieses daher auch durch den Vacuolin-Antikörper hätte erkannt werden sollen (Abb. 17 B).

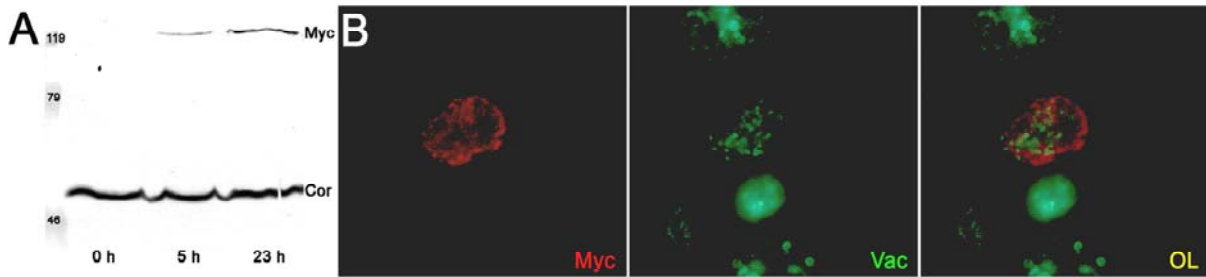


Abb. 17: Induzierte Expression des Vac-Myc-Scar-Hybrids. (A) Westernblot-Analyse mittels Myc-Antikörper (mAK 9-E-10) und Coronin-Antikörper (mAK 176-3D-6) als Ladekontrolle. Zeiten (h) geben die Dauer der Induktion in Stunden an. Deutlich ist die steigende Expression des Hybrids (ca. 116 kDa) mit zunehmender Induktionszeit erkennbar. Zahlen entsprechen den Molekulargewichten der gezeigten Markerbanden. (B) Immunfluoreszenz des MB38-Vac-Myc-Scar-Klons #11 mit Myc- (pAK α -Myc, rot) und Vacuolin-Färbung (mAK 263-79-2, grün). Erstaunlicherweise zeigten die beiden Färbungen keine Colokalisation. Bilder entstanden im FM. Bildbreite: 45,5 μ m.

In einigen der induzierten Zellen konnte außerdem eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Anzahl von Vacuolin-positiven Endosomen beobachtet werden (Abb. 17 B). Da dieser Effekt aber vereinzelt auch in gleichbehandelten MB35-Kontrollzellen auftrat, könnte es sich hierbei auch um eine Folge der Expression des tTA (Tetrazyklin-kontrollierter Transkriptionsaktivator), oder aber der vorangegangenen Tetrazyklin-Exposition handeln. Aufgrund der nicht-endosomalen Lokalisation des Hybrids, sowie der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung und der schwierigen Auffindung exprimierender Zellen wurde von einer weiteren Untersuchungen dieser Klone abgesehen.

2.4. Targeting von ABP34 an späte Endosomen

In einem weiteren Manipulationsversuch sollte nun das Aktin bündelnde Protein ABP34 über die Fusion mit Vacuolin an die Membran später Endosomen dirigiert werden. Da in der Literatur bisher nur C-terminale Fusionen des Proteins beschrieben wurden (Maselli *et al.*, 2002), sollte zunächst eine am N-Terminus mit dem Myc-Epitop versehene Version des Proteins erstellt und deren Lokalisationsverhalten mit dem des endogenen Proteins verglichen werden. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pB15-Myc-ABP34 (#516) erzeugt und in Wildtypzellen transformiert. Mehrere unabhängige Klone mit einheitlichem Erscheinungsbild wurden isoliert und der stark exprimierende Klon Myc-ABP34 2B-3 exemplarisch für weitere Untersuchungen ausgewählt (Abb. 19 B & Abb. 18 B).

Wie in Abb. 18 A dargestellt, lokalisiert das endogene ABP34 überwiegend im aktinreichen Zellcortex, wobei zusätzlich eine schwache diffuse Färbung des Cytoplasmas zu beobachten ist. Da die in Abb. 18 B gezeigte Myc-markierte Version des Proteins ein nicht unterscheidbares Erscheinungsbild aufwies, konnte zumindest in Bezug auf das Lokalisationsverhalten ein negativer Einfluss durch die am N-Terminus angefügte Komponente ausgeschlossen werden. Daher war es wahrscheinlich, dass auch die geplante

N-terminale Fusion mit der Vacuolin A-Myc-Sequenz nicht mit der Proteinlokalisierung interferieren würde.

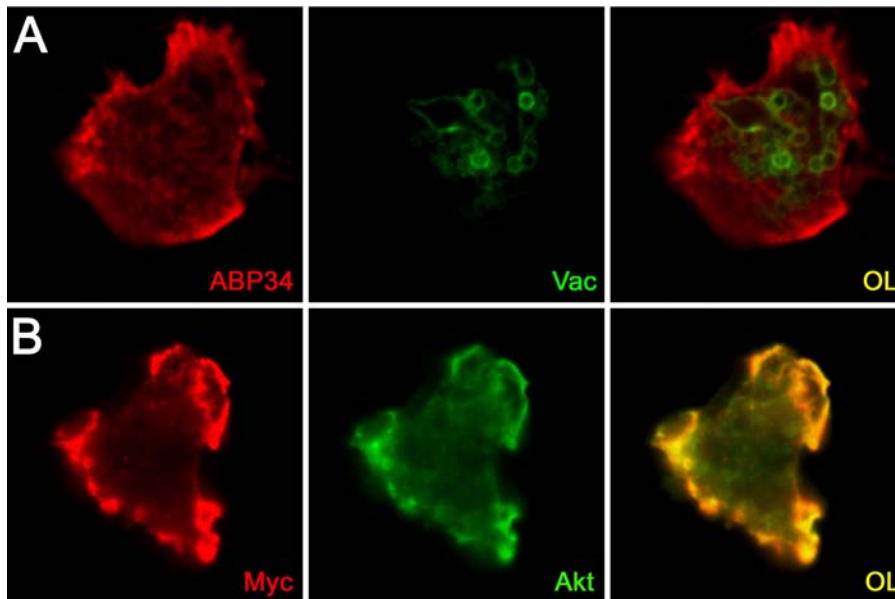


Abb. 18: Lokalisation des endogenen und einer Myc-markierten Version von ABP34.

(A) Lokalisation des endogenen Proteins (mAK 159-291-1, rot) in einer Vacuolin A-GFP (grün) exprimierenden Zelle. (B) Lokalisation von Myc-ABP34 (mAK 9-E-10, rot) und Aktin (mAK Act1-11, grün) im Klon pB15-Myc-ABP34 2B-3. Bilder entstanden im CLSM. Bildbreiten in A: 19 μm und B: 21 μm .

Zur Erstellung eines solchen Konstruktes wurde die ABP34-Sequenz aus genomischer DNA amplifiziert und in einem Expressionvektor hinter die Vacuolin A-Myc-Sequenz einkloniert. Mit dem daraus resultierenden Plasmid pVAM-ABP34 (#374) wurden nachfolgend Wildtypzellen transformiert und unabhängige Klone mit unterschiedlichen Expressionsniveaus des Hybrids isoliert. Aus diesen wurden ein schwacher (Vac-Myc-ABP34 A) und ein starker Expriemierer (Vac-Myc-ABP34 B2) für die weitere Charakterisierung ausgewählt (Abb. 19 B).

In der Immunfluoreszenz zeigten die beiden Expriemierer ein unterschiedliches Erscheinungsbild. Im schwachen Expriemierer lokalisiert das Hybridprotein bevorzugt an Aktin-positiven Vacuolen, wobei eine zusätzliche cortikale Anreicherung nur selten beobachtet werden konnte (Abb. 19 C). Die stärkere Expression im Klon B2 führt dagegen zu einer verstärkten Lokalisation des Hybrids im Cortex. Daneben blieben aber im ansonsten eher diffus gefärbten Cytoplasma weiterhin deutlich die Umrisse markierter Vacuolen erkennbar (Abb. 19 D). Bezogen auf die Affinitäten der beiden im Hybrid fusionierten Proteine bedeutet dies, dass Vacuolin den stärkeren Partner darstellt, durch den der ABP34-Teil zunächst an die endosomale Membran dirigiert wird.

Im Hinblick auf das Erscheinungsbild der markierten späten Endosomen konnten in beiden Mutanten keine offensichtlichen Veränderungen in der Anzahl, der zellulären Verteilung und der Ausprägung der Aktinhülle gegenüber dem Wildtyp erkannt werden.

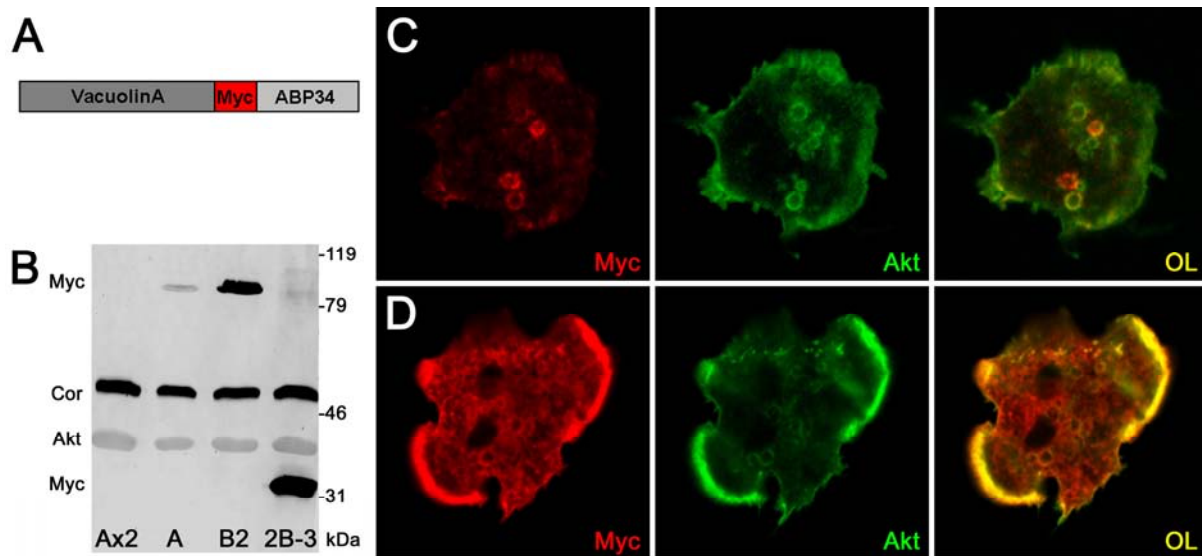


Abb. 19: Expression des Vac-Myc-ABP34-Hybrids. (A) Schematische Darstellung des Hybrids. Vacuolin und ABP34 sind maßstabsgerecht, das Myc-Epitop vergrößert dargestellt. (B) Westernblot-Analyse der beiden Vac-Myc-ABP34-Expriemierer, sowie des Myc-ABP34-Expriemierers. Deutlich sind die für die Hybridproteine erwarteten Banden auf ca. 100 kDa und ca. 36 kDa zu erkennen (beide mAK 9-E-10). Als Ladekontrolle diente Coronin (mAK 176-3D-6) bzw. Aktin (mAK Act-1-11). (C) und (D) Lokalisation des Hybridproteins (mAK 9-E-10, rot) im schwachen Expriemierer A (C) und im starken Expriemierer B2 (D) und korrespondierende F-Aktin-Färbungen (Alexa 488-Phalloidin, grün). Bilder entstanden im CLSM. Bildbreiten in C: 21 μ m und in D: 30 μ m.

2.4.1. Die Sekretion lysosomaler Enzyme in Vac-Myc-ABP34-Mutanten

Trotz des soweit unauffälligen mikroskopischen Phänotyps der beiden Mutanten sollte ein möglicher Einfluss des Hybridproteins auf die Vorgänge an den späten Endosomen untersucht werden. Sowohl eine Veränderung im endocytotischen Transit, als auch ein modifizierter Membranverkehr an den späten Endosomen sollten sich in einem abweichenden Sekretionsverhalten der Zellen widerspiegeln. Daher wurde im Folgenden wiederum die Ausscheidungsrate unterschiedlicher lysosomaler Enzyme untersucht.

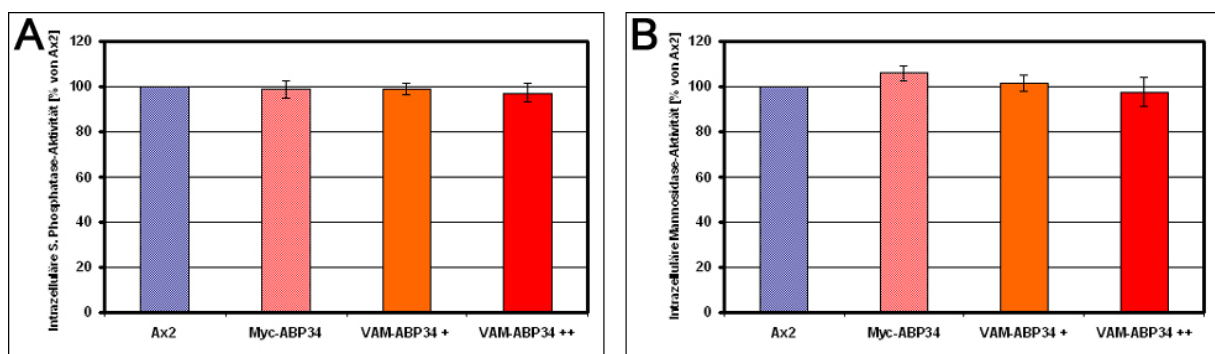


Abb. 20: Intrazellulär verbleibende Enzymaktivität lysosomaler Enzyme. (A) Saure Phosphatase (B) α -Mannosidase. Verwendet wurden Zellen des Wildtyps Ax-2 (5/6), sowie die Mutanten Myc-ABP34 2B-3 (4/5), Vac-Myc-ABP34 A (+; 5/6) und B2 (++; 5/6). Die Anzahl unabhängiger Messungen aus denen die dargestellten gemittelten Werte hervorgingen sind für die einzelnen Zelltypen in Klammern angegeben (A/B).

Die Auswertung dieser Versuche erbrachte, dass keine signifikanten Abweichungen im Sekretionsverhalten der beiden Vac-Myc-ABP34-Mutanten, sowie des Myc-ABP34-

Exprimierers gegenüber dem Wildtyp vorliegen (Abb. 20). Offensichtlich nimmt das an die späten Endosomen dirigierte ABP34 trotz seiner ektopischen Lokalisation keinen gravierenden Einfluss auf die dortigen Vorgänge. Von weiteren Untersuchungen dieser Mutanten wurde daher abgesehen.

2.5. Targeting von VASP an späte Endosomen

In einem weiteren Targeting-Experiment wurde die Volllänge cDNA des Aktin-interagierenden Proteins VASP an den C-Terminus der VacuolinA-Myc-Sequenz kloniert. Zunächst wurde jedoch die bereits beschriebene zelluläre Lokalisation eines GFP-markierten VASP-Proteins (Schirenbeck *et al.*, 2006) im Mikroskop auf eine mögliche Colokalisation mit Vacuolin hin überprüft.

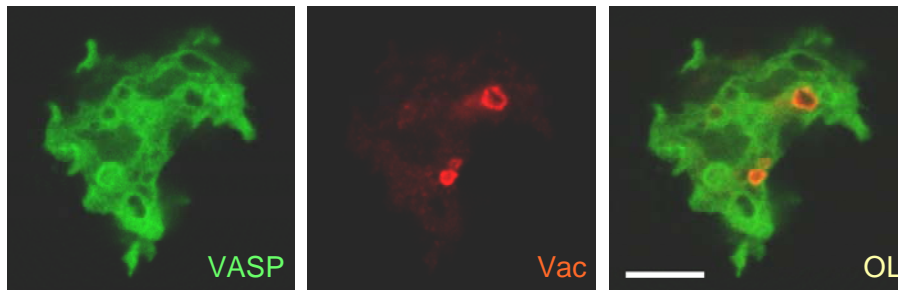


Abb. 21: Zelluläre Lokalisation von GFP-VASP. GFP-VASP (grün) exprimierende Zellen wurden mit einem Vacuolin-Antikörper (mAK 263-79-2, rot) gegengefärbt. Bilder entstanden im CLSM. Balken entspricht 5 μm .

Das funktionelle GFP-VASP-Protein zeigte eine mit dem endogenen Protein vergleichbare, überwiegend cytoplasmatische Lokalisation mit leicht erhöhter Affinität zu Orten erhöhter Aktin-Dynamik, wie etwa an den Spitzen von Filopodien, in Lammelipodien und in Crowns (Abb. 21). Eine gegenüber dem Rest des Cytoplasmas bevorzugte Lokalisation an Vacuolin-positiven Kompartimenten konnte in dieser Untersuchung nicht beobachtet werden.

Um nun die möglichen Auswirkungen der Lokalisation von VASP an der Oberfläche später Endosomen zu untersuchen wurden Wildtyp-Zellen mit dem Vacuolin A-Myc-VASP-Konstrukt (Plasmid #519) transformiert. In mehreren unabhängigen Transformationen wurden diverse Klone mit unterschiedlichem Expressionsniveau des Hybridproteins erzeugt. Im Folgenden wurden drei unabhängige Klone für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Der schwache Exprimierer B-21, sowie die beiden starken Exprimierer 2B-1 und 40-1, die sich bezüglich der Expressionsstärke des Hybrids und in ihrem mikroskopischen Erscheinungsbild nicht unterschieden.

In Abb. 22 A wurden Proteinproben der unabhängigen Klone B-21 und 2B-1 in einer Westernblot-Analyse auf die Expression des Volllänge-Proteins hin untersucht. In beiden Klonen konnte das Hybridprotein mit dem vorhergesagten Molekulargewicht von rund 107 kDa nachgewiesen werden. Unterhalb der Banden mit der erwarteten Größe zeigten sich in beiden Proben außerdem noch weitere, deutlich schwächere Banden, die vermutlich Degradationsprodukte des Hybrids darstellen.

In einer ersten mikroskopischen Untersuchung wurde zunächst die Lokalisation des Hybrids in Zellen des schwachen Exprimerers B-21 und des starken Exprimerers 2B-1 untersucht (Abb. 22 B - E). In Zellen des schwachen Exprimerers B-21 lokalisierte das Hybridprotein ausschließlich an der Oberfläche der durch die Vacuolin-Färbung markierten späten Endosomen (Abb. 22 B & C). Die markierten Endosomen entsprachen dabei in Form, Größe und Anzahl den Vacuolin-positiven späten Endosomen des Wildtyps (o. Abb.). In einigen dieser Zellen konnte auch ein Aggregation der markierten Endosomen beobachtet werden (Abb. 22 C). Die Gegenfärbung mit dem Vacuolin-Antikörper zeigt, dass in diesen Zellen offensichtlich keine weiteren Vacuolin-positiven Endosomen auftreten, die nicht auch Myc-positiv waren (Abb. 22 B & C). Demnach war das Targeting des Vac-Myc-VASP-Hybrids an die Oberfläche der späten Endosomen in diesen Zellen erfolgreich.

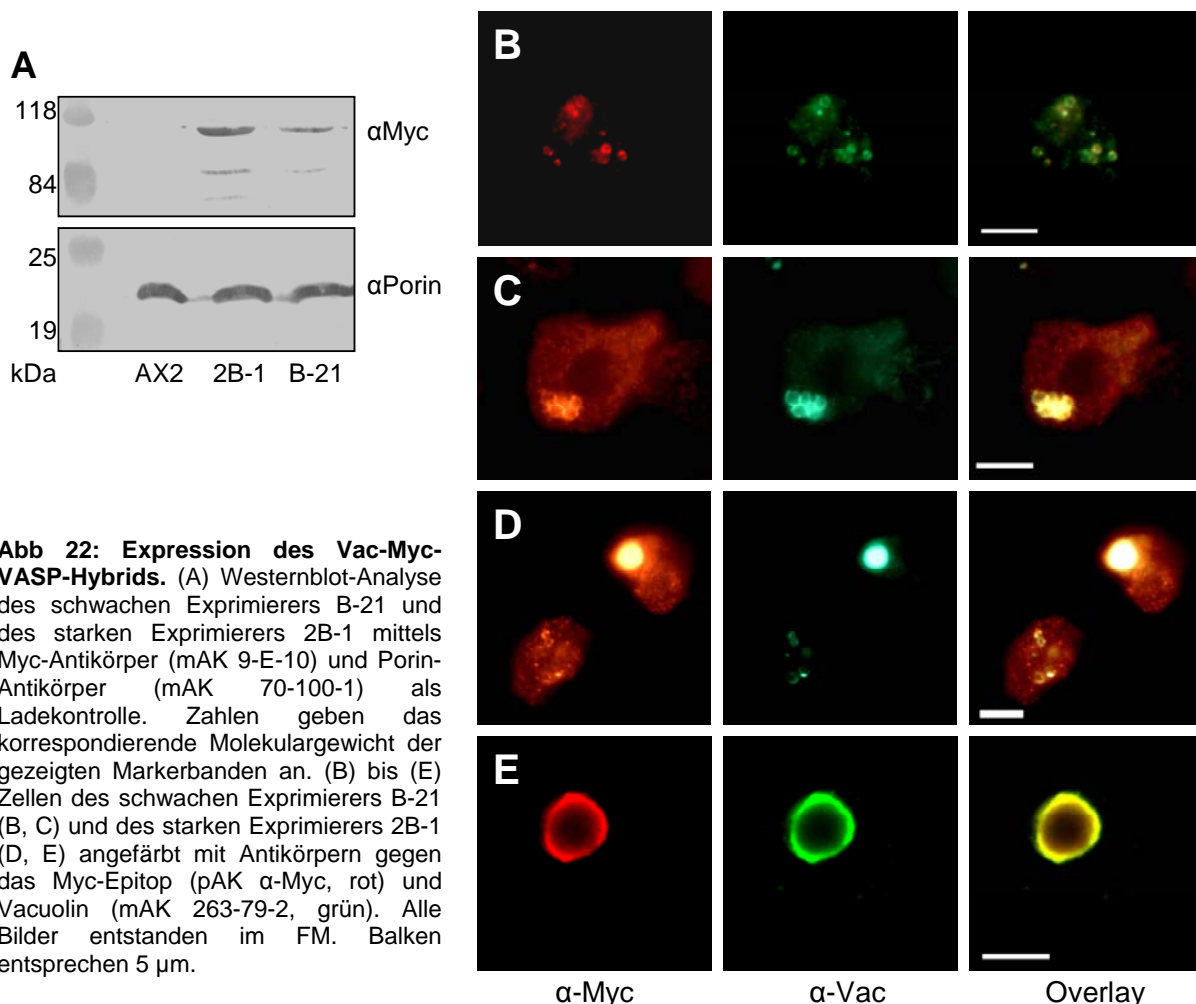


Abb 22: Expression des Vac-Myc-VASP-Hybrids. (A) Westernblot-Analyse des schwachen Exprimerers B-21 und des starken Exprimerers 2B-1 mittels Myc-Antikörper (mAK 9-E-10) und Porin-Antikörper (mAK 70-100-1) als Ladekontrolle. Zahlen geben das korrespondierende Molekulargewicht der gezeigten Markerbanden an. (B) bis (E) Zellen des schwachen Exprimerers B-21 (B, C) und des starken Exprimerers 2B-1 (D, E) angefärbt mit Antikörpern gegen das Myc-Epitop (pAK α -Myc, rot) und Vacuolin (mAK 263-79-2, grün). Alle Bilder entstanden im FM. Balken entsprechen 5 μ m.

In Zellen mit einer stärkeren Expression des Hybrids änderte sich der beobachtete Phänotyp drastisch. In über 90% der Zellen des Klons 2B-1 waren keine markierten endosomalen Einzelvacuolen mehr zu beobachten (Abb. 22 D & E). Vielmehr wurde in diesen Zellen nur noch eine einzelne, relativ große und zumeist kreisrunde Strukturen angefärbt, deren Durchmesser 5 μ m deutlich überschreiten konnte. Die seitliche Darstellung im CLSM zeigt ebenfalls einen runden Querschnitt, so dass von einer kugelförmigen Gestalt ausgegangen

werden kann (o. Abb). In unterschiedlichen Zellpräparationen zeigten sich diese Strukturen entweder komplett (Abb. 22 D), oder aber lediglich in ihren äußeren Bereichen durch den Antikörper angefärbt (Abb. 22 E). Die Gegenfärbung mit dem Vacuolin-Antikörper stimmte erwartungsgemäß mit der Myc-Färbung überein. Eine wichtige zusätzliche Beobachtung hierbei war, dass in Zellen mit einer ausgebildeten Riesenstruktur offensichtlich keine normal ausgeprägten Vacuolin-positiven Kompartimente mehr im Cytoplasma anzutreffen waren (vergl. Zellen in Abb. 22 D).

2.5.1. Die Expression des Vac-Myc-VASP-Hybrids induziert die Ausbildung F-Aktin angereicherter Strukturen

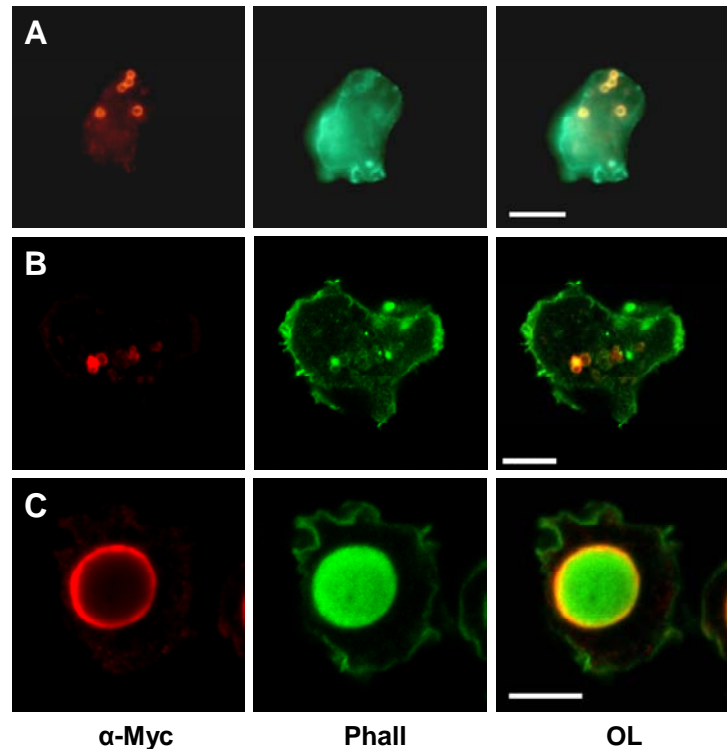
Um nun mehr über den Einfluss des Hybridproteins auf die endosomale Aktin-Hülle und über den Aufbau der markierten Riesenstrukturen zu erfahren, wurden Zellen der Klone B-21 und 2B-1 in einer weiteren Immunfluoreszenz einer F-Aktin-Färbung mit Phalloidin unterzogen.

In Zellen des schwachen Exprimierers B-21 zeigte die Aktin-Färbung neben der Markierung des Zellcortex eine deutliche Aktin-Hülle an den durch den Myc-Antikörper markierten Endosomen (Abb. 23 A). Diese wies in den meisten Zellen bezüglich ihrer Ausprägung keine offensichtlichen Unterschiede zur Wildtypsituation auf (o. Abb.) und war sowohl an einzeln liegenden, als auch aggregierten Endosomen zu beobachten (Abb. 23 A). In einigen Zellen mit aggregierten Endosomen traten jedoch an den jeweiligen Berührungspunkten deutlich verstärkte Myc- und F-Aktin-Signale auf, welche zum einen auf eine verstärkte Anlagerung des Hybrids und zum anderen auf eine gesteigerte Aktin-Polymerisation in diesen Bereichen schließen ließen (Abb. 23 B). Möglicherweise stellen solche Bereiche den Ausgangspunkt der Bildung der Riesenstrukturen dar.

Die Betrachtung der Zellen des starken Exprimierers 2B-1 zeigte eine deutliche Anreicherung von F-Aktin in den Strukturen (Abb. 23 C). Dabei war die Aktin-Färbung gleichmäßig über das gesamte Areal der Struktur verteilt und erschien wesentlich intensiver als die des Zellcortex. Im Einklang mit der Beobachtung aus der vorangegangenen Vacuolin-Färbung dieser Zellen konnten auch hier im Cytoplasma keine weiteren Aktin-positiven Strukturen erkannt werden, was erneut auf den Verlust normal ausgeprägter später Endosomen in den betroffenen Zellen hindeutete.

Die Tatsache, dass die Myc-Färbung hier lediglich den äußeren Saum der ausgeprägten Struktur markierte, die Phalloidinfärbung aber auch das gesamte Innere, kann entweder die tatsächliche Verteilung der angefärbten Proteine widerspiegeln, oder aber ein färberisches Artefakt darstellen. Dabei könnten die für die Myc-Färbung verwendeten Erst- und Zweitantikörper möglicherweise langsamer in die voluminöse Riesenstruktur hinein diffundieren als das wesentlich kleinere Alexa-Phalloidin-Molekül, so dass als Folge der ungleichen Eindringtiefe eine abweichende Anfärbung erfolgte.

Abb. 23: F-Aktin-Verteilung in den Vac-Myc-VASP-Mutanten. Zellen der Klone B-21 (B, C) und 2B-1 (C) angefärbt für das Hybrid (mAK 9-E-10, rot) und F-Aktin (Alexa488-Phalloidin, grün). (B) Deutlich ist die Anreicherung des Hybrids und von F-Aktin an den Berührungspunkten aggregierter Endosomen zu erkennen. Bilder in A und C aus FM, in B aus CLSM. Balken entsprechen 5 μ m.



Zum endgültigen Nachweis der Beteiligung von F-Aktin am Aufbau der im starken Exprimierer ausgebildeten Strukturen wurden Wildtypzellen mit dem Vacuolin A-Myc-VASP- und einem GFP-Aktin-Konstrukt (Plasmid #168) cotransformiert. Daraus wurden mehrere Zelllinien isoliert, die große Mengen des Vacuolin-Myc-VASP-Hybrids exprimierten und gleichzeitig ein deutliches GFP-Signal aufwiesen. Abb. 24 A zeigt die Westernblot-Analyse des aus einer dieser Cotransformationen hervorgegangenen, exemplarisch ausgewählten Klons 2-16. Deutlich sind die erwarteten Banden für das Vac-Myc-VASP-Hybrid bei ca. 107 kDa und für GFP-Aktin bei ca. 70 kDa zu erkennen.

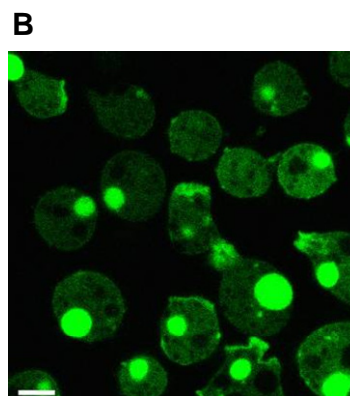
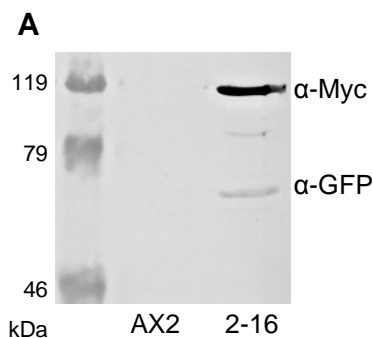


Abb. 24: Coexpression von Vac-Myc-VASP und GFP-Aktin im Klon 2-16. (A) Westernblot-Analyse mittels Myc- (mAK 9-E-10) und GFP-Antikörper (264-449-2). (B) Aufnahme lebender Zellen unter GFP-Anregung. Bild entstand im CLSM. Balken entspricht 5 μ m.

In der mikroskopischen Analyse dieser Zellen wurde die Beteiligung von Aktin am Aufbau der Riesenstrukturen bestätigt. Die in Abb. 24 B dargestellten lebenden Zellen zeigten neben dem in den meisten Zellen angefärbten Zellcortex eine deutliche Anreicherung von GFP-Aktin in Strukturen, die in Form und Größe denen der Phalloidinfärbung aus Abb. 23

entsprachen. Eine Gegenfärbung dieser Zellen mit dem Myc-Antikörper zeigte außerdem die erwartete Colokalisation beider Färbungen in diesen Strukturen (o. Abb.). Aufgrund des äußeren Erscheinungsbildes werden diese Strukturen im Weiteren als „Aktin-Bälle“ bezeichnet.

In der Zelle liegt F-Aktin überwiegend in Verbindung mit Aktin-assoziierten oder -interagierenden Proteinen vor. Daher war es nun interessant zu prüfen, ob typische Vertreter dieser Proteinklassen auch in den Aktin-Bällen anzutreffen sind. Zu diesem Zweck wurden Zellen des starken Vac-Myc-VASP-Expriemierers 40-1 mit Antikörpern gegen Coronin, ABP34 und DAip1 gegengefärbt.

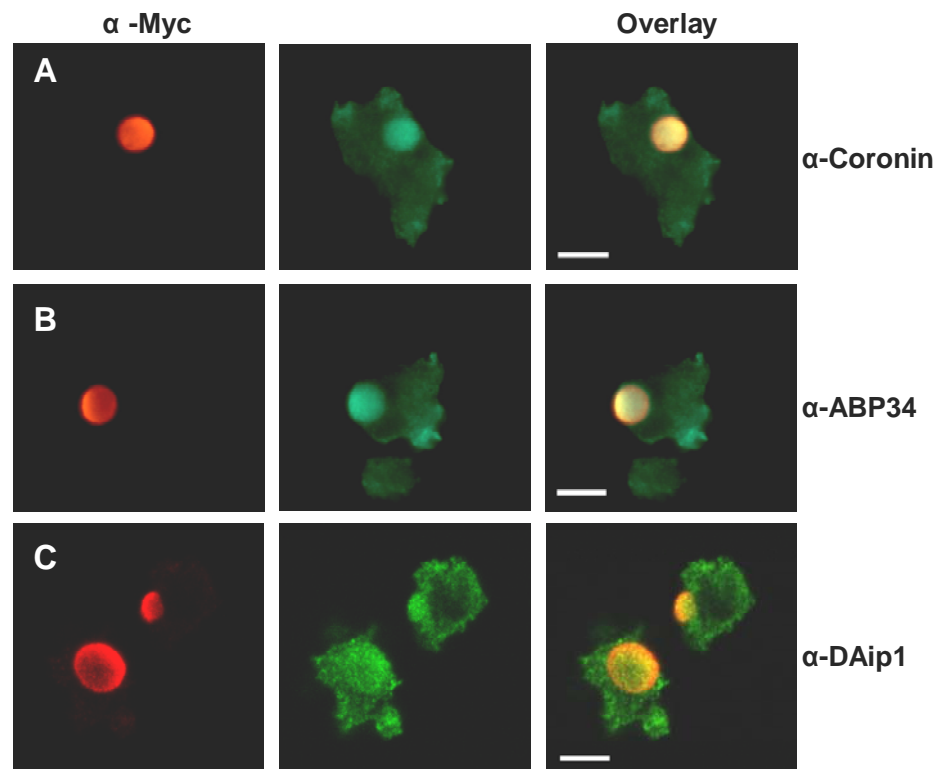


Abb. 25: Lokalisation unterschiedlicher Aktin-interagierender Proteine in Vac-Myc-VASP-Zellen. Zellen des starken Expriemierers 40-1 wurden mit Antikörpern gegen (A) Coronin (mAK176-3D-6, grün), (B) ABP34 (mAK 159-291-1, grün) und (C) DAip1 (mAK 246-153-2, grün) angefärbt. Bilder in A und B entstanden im FM, in C im CLSM. Balken entsprechen 5 μm .

Die drei Antikörper-Färbungen zeigten jeweils zusätzlich zu der erwarteten Lokalisation dieser Proteine im Zellcortex eine mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Colokalisation mit den Myc-markierten Aktin-Bällen (Abb. 25).

2.5.2. Zellen mit Aktin-Bällen weisen einen erhöhten F-Aktin-Gehalt auf

In den meisten eukaryotischen Zellen liegt das gesamte zelluläre Aktin in einem dynamischen Gleichgewicht aufgeteilt in etwa gleiche Anteile von G- und F-Aktin vor. Eine ähnliche Aufteilung wurde auch für Zellen von *D. discoideum* beschrieben (McRobbie & Newell, 1983).

Die Betrachtung der Immunfluoreszenzen und auch der lebenden mit GFP-Aktin cotransformierten Zellen lässt auf eine erhöhte Menge von F-Aktin in starken Expriemierern von Vac-Myc-VASP schließen. Über die Menge von G-Aktin in diesen Zellen lässt sich

dadurch jedoch keine Aussage treffen. Bezogen auf das Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin kommen zur Erklärung des beobachteten Phänomens mindestens vier Möglichkeiten in Betracht: Die Zellen könnten eine insgesamt höhere Menge Gesamt-Aktin aufweisen und diese wiederum zu etwa gleichen Anteilen auf die beiden Aktin-Fraktionen verteilen. Das Gleichgewicht wäre in diesem Fall unverändert. Eine zweite Möglichkeit wäre die Kompensation des durch die Aktin-Bälle induzierten erhöhten F-Aktin-Gehalts durch Aktin-Depolymerisation in anderen Bereichen der Zelle, wie beispielsweise dem Zellcortex. Auch in diesem Fall bliebe das Gleichgewicht der Aktin-Fraktionen untereinander insgesamt unverändert. Die dritte Möglichkeit wäre eine bei gleichbleibender Menge von Gesamt-Aktin auftretende Verschiebung des Gleichgewichtes hin zu F-Aktin, wobei der G-Aktin-Gehalt der Zelle sinkt. Die vierte Möglichkeit wäre schließlich eine Verbindung aus den zuvor genannten Optionen, in der die Zelle den Verlust von freiem G-Aktin durch die zusätzliche Expression von Aktin kompensiert. In diesem Fall wäre der Anteil des G-Aktins im Gleichgewicht zwar immernoch verringert, der verfügbare Gesamtgehalt bliebe aber auf Wildtypniveau.

Um zu untersuchen welche der oben genannten Möglichkeiten in den starken Exprimierern von Vac-Myc-VASP vorliegt wurden unterschiedliche Versuche durchgeführt. In einem ersten Experiment wurde ein Gemisch aus Vac-Myc-VASP-exprimierenden Zellen und GFP-Tubulin produzierenden Kontrollzellen in einer Immunfluoreszenz mit einem Aktin-Antikörper angefärbt und die Intensität der zellulären Aktin-Färbung beider Zelltypen qualitativ verglichen. Ein Zellgemisch wurde hier den jeweiligen Einzelpräparationen der beiden Zelltypen vorgezogen, da die Zellen im selben Präparat in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander unter konstanten Bedingungen beobachtet werden können. Von verschiedenen Arealen des Präparates wurden im CLSM mindestens zwei unterschiedliche Höhenebenen dokumentiert und anschließend begutachtet.

Wie in Abb. 26 exemplarisch dargestellt, zeigte der optische Vergleich des cortikalen Aktins beider Zelltypen keine offensichtlichen Unterschiede, weder in Bezug auf die Struktur, noch in der Färbungsintensität.

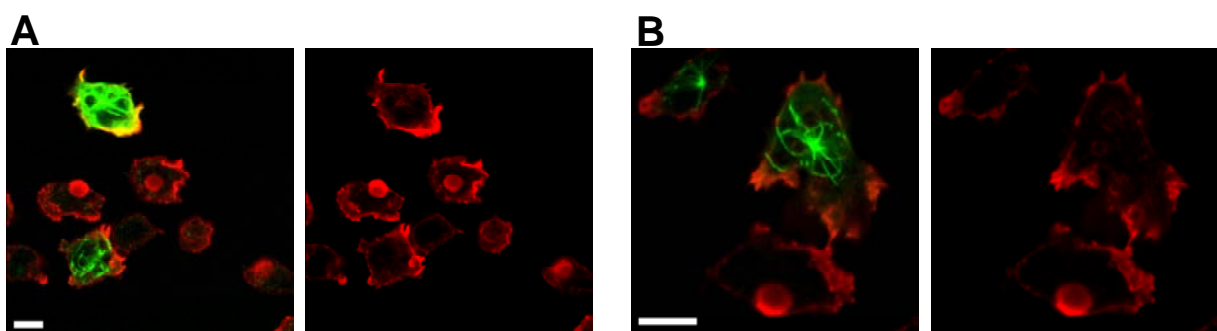


Abb. 26: Qualitativer Vergleich der F-Aktin-Verteilung in Vac-Myc-VASP- und Kontrollzellen. (A) und (B) Exemplarische Bilder der im CLSM aufgenommenen Bildreihen. Links ist jeweils das Überlagerungsbild zur Identifizierung der Kontrollzellen (GFP-Tubulin, grün), rechts das für den eigentlichen Vergleich der Aktin-Verteilung (mAK Act-1-11, rot) verwendete Bild dargestellt. Balken entsprechen 5 μm .

Dieser Beobachtung zu Folge tritt also keine Kompensation der durch die Ausbildung der Aktin-Bälle bedingten Erhöhung des F-Aktin-Gehaltes durch Depolymerisation von Aktin an anderer Stelle in Zelle auf. Demnach sollten Zellen mit ausgebildeten Aktin-Bällen einen insgesamt höheren F-Aktin-Gehalt aufweisen als die Kontrollzellen bzw. der Wildtyp Ax-2.

Zur Klärung der Frage, ob sich nun das Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin in Vacuolin-Myc-VASP exprimierenden Zellen gegenüber dem Wildtyp verschoben hat wurde das Triton unlösliche F-Aktin aus Zellextrakten ausgefällt und abzentrifugiert (McRobbie & Newell, 1983). Die so erhaltenen Fraktionen aus Überstand und Pellet wurden dann mittels Westernblot-Analyse miteinander verglichen (Abb. 27).

Der Blot in Abb. 27 zeigte in der F-Aktin repräsentierenden Pellet-Fraktion des starken Exprimierers 2B-1 eine deutlich stärkere Aktin-Bande als der Wildtyp Ax-2 und der schwächere Exprimierer B-21, der keine Aktin-Bälle ausbildet. Die Aktin-Menge im Überstand ist dagegen in allen drei Proben nahezu identisch. Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtungen aus der Immunfluoreszenz, die ebenfalls auf einen insgesamt erhöhten Anteil von F-Aktin in dem starken Exprimierer schließen ließ. Außerdem wurde deutlich, dass der Gesamt-Gehalt von Aktin in den Zellen des Klons 2B-1 erhöht sein muss, da im Überstand keine Reduktion der Aktin-Menge beobachtet wurde. Die geeignetste Erklärung dieses Ergebnisses ist demnach, dass der Verlust von G-Aktin durch eine insgesamt stärkere Aktin-Expression kompensiert wird.

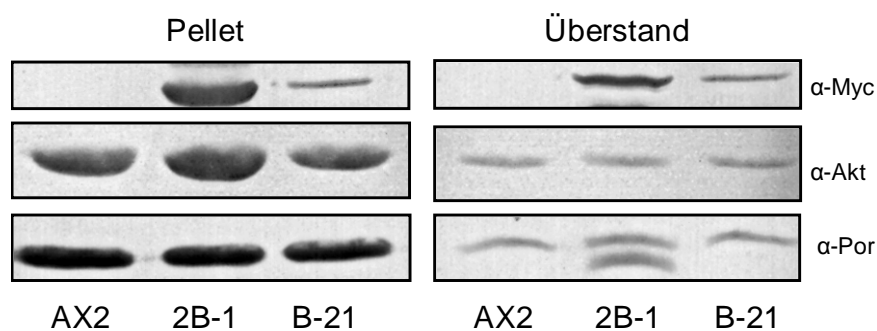


Abb. 27: Westernblot-Analyse zum quantitativen Vergleich der zellulären Aktin-Fraktionen. Gleiche Zelläquivalente der Fraktionen von Pellet- und Überstand des Wildtyps und der Vac-Myc-VASP-Klone 2B-1 und B-21 wurden auf einer PAGE aufgetrennt und geblotet. Der Blot wurde sukzessiv mit Antikörpern gegen Aktin (mAK Act-1-11), Porin als Ladekontrolle (mAK 70-100-1) und das Myc-Epitop (mAK 9-E-10) angefärbt. Die in der Ladekontrolle des Überstandes sichtbare zweite Bande in der 2B-1 Probe entstand erst nach der Inkubation des Blots mit dem Myc-Antikörper und markiert vermutlich ein niedermolekulares Abbauprodukt des stark exprimierten Hybridproteins.

Betrachtet man die Myc-Banden im obigen Westernblot, so wird deutlich, dass im schwachen Exprimierer B-21 die Verteilung des Hybridproteins auf die beiden Fraktionen zu ähnlichen Anteilen erfolgte. Im starken Exprimierer 2B-1 liegt dagegen ein deutlich größerer Anteil des Hybrids in der Pellet-Fraktion vor. Dies stellt neben den Beobachtungen aus der Immunfluoreszenz einen weiteren Hinweis auf die molekulare Assoziation des Hybridproteins mit dem F-Aktin der Aktin-Bälle dar.

2.5.3. Der Effekt Aktin-depolymerisierender Drogen

Das Aktin-Cytoskelett ist eine dynamische Struktur, die sich in einem fortwährenden Umbau befindet. Unterschiedliche Drogen können diese Dynamik beeinflussen, indem sie entweder stabilisierend oder aber destabilisierend auf die ausgebildeten F-Aktin-Strukturen einwirken. Zu den Substanzen die eine destabilisierende Wirkung aufweisen gehören u. a. Latrunculine und Cytochalasine. Im Folgenden sollte der Einfluss dieser beiden Drogen auf die Gestalt der Aktin-Bälle untersucht werden. Dazu wurden Zellen des Klons 40-1 mit 20 μM Latrunculin B versetzt und nach einer 30minütigen Inkubation für die Immunfluoreszenz präpariert (Abb. 28 B). In einem zweiten Ansatz wurden Zellen aus der Vacuolin-Myc-VASP/GFP-Aktin Cotransformation für 45 Minuten mit 100 μM Cytochalasin A inkubiert und lebend dokumentiert (Abb. 28 C).

Abb. 28 B zeigt, dass das cortikale Aktin-Netzwerk der Zelle unter dem Einfluss von Latrunculin B nahezu vollständig depolymerisierte. Die Zelle verlor dadurch ihre amöboide Form und rundete ab. Der Aktin-Ball erscheint dagegen unverändert. Es konnte weder eine offensichtliche Abnahme der Größe, noch der Farbtintensität beobachtet werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden in den lebenden, mit Cytochalasin A behandelten Cotransformanten gemacht. Auch hier trat eine deutliche Abrundung der Zellen zusammen mit dem Verlust der corticalen Aktin-Färbung ein, ohne dass sich das Erscheinungsbild der GFP markierten Aktin-Bälle ersichtlich veränderte (Abb. 28 C).

Beide hier verwendeten Drogen können ihre depolymerisierende Wirkung nur unter dynamischen Bedingungen, also während des andauernden Auf- und Abbaus von filamentösem Aktin, erzielen. Zusammen mit den Ergebnissen der vorherigen Untersuchung des F-Aktin-Gehalts könnte die hier gezeigte Resistenz gegenüber dieser Drogen ein Indiz dafür sein, dass die Aktin-Bälle stabile, statische Strukturen sind, die nicht mehr am dynamischen Gleichgewicht des zellulären Aktins teilnehmen.

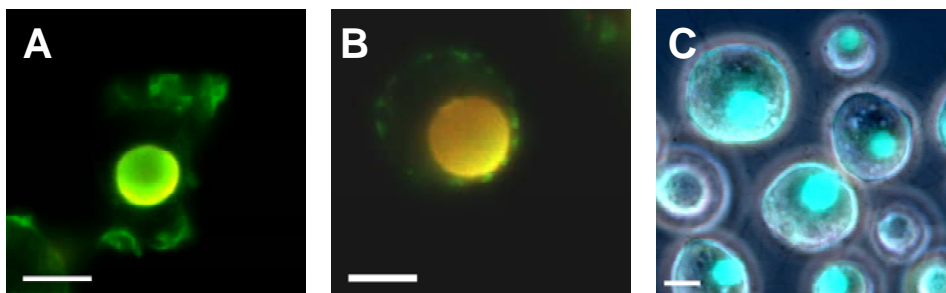


Abb. 28: Der Einfluss unterschiedlicher Aktin-depolymerisierender Drogen auf die Ausprägung der Aktin-Bälle. (A) und (B) Zellen des Klons 40-1 vor (A) und nach (B) der Inkubation mit Latrunculin B. Die Zellen wurden mit einem Myc-Antikörper (mAK 9-E-19, rot) und Alexa488-Phalloidin (grün) angefärbt. Dargestellt sind die Überlagerungsbilder. (C) Aufnahme lebender Zellen des Vac-Myc-VASP/GFP-Aktin Klons 2-16 nach Cytochalasin A-Exposition. Zur besseren Darstellung der Zellumrisse ist ein Überlagerungsbild aus GFP-Anregung und Durchlicht-Phasenkontrast gezeigt. Bilder entstanden im FM. Balken entsprechen 5 μm .

2.5.4. Die starke Expression des Vac-Myc-VASP-Hybrids induziert unterschiedliche Wachstumsdefekte

Für viele Cytoskelett-Mutanten von *D. discoideum* wurden Wachstumsdefekte beschrieben. (Übersicht in Noegel & Schleicher, 2000). Auch die Ausbildung der Aktin-Bälle in den Vacuolin-Myc-VASP exprimierenden Zellen stellt einen massiven Eingriff in das Cytoskelett der Zelle dar. Zum einen ist das Gleichgewicht von G- zu F-Aktin in den Zellen verschoben (s.o.), zum anderen könnten sich die voluminösen Aktin-Bälle auch aus sterischen Gründen negativ auf dynamische Prozesse der Zelle auswirken. Daher sollte im Weiteren der Einfluss des Hybridproteins auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen untersucht werden.

Untersucht wurde das Wachstum adhärenter Zellen auf Petrischale, sowie in Schüttelkultur (Tab. 1). Der schwache Vac-Myc-VASP-Expriemierer B-21, der keine Aktin-Bälle ausbildete, zeigte unter beiden Bedingungen kein signifikant vom Wildtyp abweichendes Wachstumsverhalten. Der starke Expriemierer 2B-1 zeigte dagegen unter beiden Bedingungen ein deutlich verzögertes Wachstum, wobei die Verzögerung unter nicht-adhärenten Bedingungen in Schüttelkultur noch stärker ausgeprägt vorlag (Tab. 1 „Faktor“). Die Tatsache, dass der schwache Expriemierer kein verändertes Wachstumsverhalten aufwies legt die Vermutung nahe, dass die alleinige Anwesenheit des Hybrids im Cytoplasma keinen negativen Einfluss auf diesen Prozess ausübt. Möglicherweise führt erst die durch die stärkere Expression induzierte Ausbildung der Aktin-Bälle zu den beobachtbaren Defekten.

Wachstum	Stamm	Generationszeit [h]	Faktor	n
Petrischale	Ax-2	13,7 ± 0,68	1	3
	B-21	14,2 ± 0,56	1,04	3
	2B-1	16,8 ± 0,81	1,23	3
Schüttelkultur	Ax-2	10,1 ± 0,04	1	2
	B-21	10,2 ± 0,45	1,01	2
	2B-1	13,8 ± 0,21	1,37	2

Tabelle 1: Wachstumsverhalten der Vac-Myc-VASP-Klone. „Faktor“ gibt den jeweiligen Verzögerungsfaktor gemessen am Wildtyp an. „n“ gibt die Anzahl der Messungswiederholungen aus denen die angegebenen Mittelwerte gebildet wurden an.

Der gemessenen Wachstumsverzögerung können unterschiedliche Ursachen zu Grunde liegen. Zum einen könnten die Zellen beispielsweise auf Grund einer verringerten Endocytoserate einen langsameren Zuwachs an Zellmasse erzielen, so dass daraus eine entsprechend verringerte Teilungsaktivität resultiert. Andererseits könnte aber auch ein Cytokinesedefekt die Ursache für das verzögerte Wachstum sein. In letzterem Fall sollten die Zellen eine deutlich erhöhte Anzahl von Kernen und ein vergrößertes Volumen aufweisen.

Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen wurden von Petrischale und in Schüttelkultur gewachsene Zellen einer Kern-Färbung mit DAPI unterzogen und die durchschnittliche Kernzahl pro Zelle bestimmt (Tab. 2). Die Auszählung der Präparate von auf Schale gewachsenen Zellen lieferte gleiche durchschnittliche Kernzahlen für den Wildtyp und den

starken Exprimierer 40-1. Demnach scheidet ein Cytokinesedefekt als Ursache für die unter diesen Bedingungen beobachtete Wachstumsverzögerung aus.

Unter nicht-adhärenenten Bedingungen in Schüttelkultur gewachsen neigten sowohl der schwache Exprimierer B-21, als auch der starke Exprimierer 2B-1 zu einer stärker ausgeprägten Mehrkernigkeit als der Wildtyp. Dabei zeigte der schwache Exprimierer B-21 eine nur leichte Zunahme, wohingegen im starken Exprimierer eine drastische Erhöhung der Kernzahl zu verzeichnen war.

Möglicherweise ist dieser konditionale Cytokinesedefekt der Grund für die stärker ausgeprägte Wachstumsverzögerung des starken Exprimierers 2B-1 in Schüttelkultur gegenüber dem Wachstum auf Petrischale (s.Tab. 1 „Faktor“).

Wachstum	Stamm	Kerne/Zelle	n
Petrischale	Ax-2	1,4	118
	40-1	1,4	166
Schüttelkultur	Ax-2	1,6	150
	B-21	2,1	223
	2B-1	3,4	150

Tabelle 2: Bestimmung der Kernzahl in den Vac-Myc-VASP-Klonen. „n“ gibt die Anzahl der ausgezählten Zellen aus denen die angegebenen Mittelwerte bestimmt wurden an. Aus Verfügbarkeitsgründen wurde zur Bestimmung der Kernzahl unter adhärenenten Bedingungen (Schale) der stark exprimierende Klon 40-1 anstelle des Klons 2B-1 verwendet.

Die nähere mikroskopische Betrachtung der Zellen zeigte außerdem die erwartete Volumenzunahme der mehrkernigen Zellen (Abb. 29). Des Weiteren konnte auch hier eine Korrelation zwischen der Ausbildung der Aktin-Bälle und dem Cytokinesedefekt beobachtet werden, da Zellen mit einer deutlich erhöhten Kernzahl meist auch einen sehr stark ausgeprägten Aktin-Ball aufwiesen (Vergl. hierzu 2B-1 Zellen in Abb. 29).

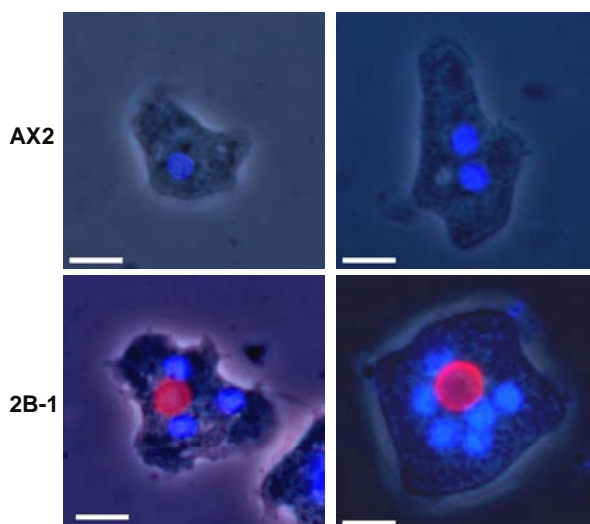


Abb. 29: Kernfärbung mit DAPI. Exemplarisch abgebildet sind repräsentative Zellen des Wildtyps (obere Reihe) und des starken Vac-Myc-VASP-Exprimierers 2B-1 (untere Reihe). Dargestellt sind Überlagerungsbilder der Kernfärbung mit DAPI (blau), der Färbung mit Myc-Antikörper (mAK 9-E-10, rot) und Phasenkontrast-Durchlicht. Balken entsprechen 5 μ m.

Zusammengenommen sprechen die hier gemachten Beobachtungen also für eine von der Ausbildung der Aktin-Bälle abhängigen Wachstumsverzögerung, die beim Wachstum unter nicht-adhärenenten Bedingungen durch einen zusätzlichen konditionalen Cytokinesedefekt verstärkt wird.

2.5.5. Die Aktin-Bälle sind vom Endocytoseweg der Zelle entkoppelt

In schwachen Expressieren des Klons B-21 lokalisiert das Vac-Myc-VASP-Hybridprotein an der Oberfläche normal ausgebildeter später Endosomen (Abb. 22 B). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Entstehung der Aktin-Bälle dort ihren Ursprung nimmt. Zusammen mit dem überwiegend runden Erscheinungsbild legt dies die Vermutung nahe, dass es sich bei den Aktin-Bällen möglicherweise um membranumhüllte Strukturen endosomaler Herkunft handelt.

Die mikroskopische Untersuchung der starken Expressierer des Hybrids hatte gezeigt, dass das Cytoplasma dieser Zellen neben den Aktin-Bällen frei von weiteren Vacuolin-positiven Kompartimenten ist (Abb. 22 D). Demnach lokalisiert endogenes Vacuolin offensichtlich zusammen mit dem Hybridprotein in diesen Strukturen. Dieser Beobachtungen könnten mindestens zwei Ursachen zu Grunde liegen. Einerseits könnte es sich bei den Aktin-Bällen um eine stark modifizierte Form der späten Endosomen handeln. In diesem Fall sollten die Aktin-Bälle Membranen enthalten und Vacuolin würde nach wie vor an an einem endosomalen Kompartiment, wenn auch stark abgewandelter Struktur, lokalisieren. Andererseits ist Vacuolin lediglich membranassoziiert, wobei die korrekte Lokalisation die Oligomerisierung mit weiteren Vacuolin-Molekülen voraussetzt (s. Einleitung). Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit und in Wienke *et al.*, 2006 haben gezeigt, dass es möglich ist, endogenes Vacuolin durch Inkorporation in Oligomeren mit rekombinaten Vacuolin-Molekülen von der endosomalen Membran abzuziehen und in andere Strukturen der Zelle oder das Cytosol zu dirigieren. Das Vorhandensein des endogenen Vacuolins in den Aktin-Bällen könnte also auch aus einer Mislokalisierung des Proteins, hervorgerufen durch die Ausbildung von Heterooligomeren zusammen mit dem stark überexprimierten Vac-Myc-VASP-Hybrid, hervorgehen. In diesem Fall würden die Aktin-Bälle weder eine Modifikation der späten Endosomen darstellen, noch notwendigerweise Membranen aufweisen. Die Lokalisation von endogenem Vacuolin an den Aktin-Bällen stellt also keinen zwingenden Beweis für eine Beteiligung dieser Strukturen am Endocytoseweg der Zelle dar. Um der Frage nach der möglichen Beteiligung am Endocytoseweg weiter nachzugehen wurden im Weiteren unterschiedliche mikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Neben Vacuolin stellt p80 ein weiteres Markerprotein für endosomale Kompartimente in *D. discoideum* dar. Anders als Vacuolin ist p80 ein Transmembranprotein und kann somit nicht von Membranen abdissoziieren. In der Zelle kommt dem Protein vermutlich eine Funktion als Kupfertransporter zu. Seine Lokalisation ist über den gesamten Endocytoseweg verteilt und weist eine verstärkte Anreicherung an späten endosomalen Kompartimenten auf (Ravel et al., 2001). Die in der Referenz erwähnte, aber nicht dargestellte, partielle Colokalisation des p80-Antikörpers mit Vacuolin-positiven Endosomen konnte in eigenen Untersuchungen mit GFP-Vacuolin B exprimierenden Zellen bestätigt werden (Abb 30 A). Diese Erkenntnis

machte p80 zu einem guten Kandidaten um die Anwesenheit von Membranen endosomaler Herkunft an oder in den Aktin-Bällen nachzuweisen. Daher wurden Zellen des starken Expressierers 40-1 in einer Immunfluoreszenz auf die Lokalisation von p80 untersucht (Abb. 30 B & C).

Die mikroskopische Betrachtung der Zellen zeigte ein überwiegend einheitliches Erscheinungsbild. In keiner der analysierten Zellen konnte eine eindeutige p80-Färbung im Inneren der Aktin-Bälle beobachtet werden. Eine Anlagerung von p80-positiven Endosomen an der Oberfläche der Aktin-Bälle wurde zwar in vielen Zellen festgestellt, war aber auf Grund der räumlichen Größe der Bälle auch bei einer zufälligen Verteilung der Endosomen zu erwarten (Abb. 30 B). Im Gegensatz zu diesem überwiegenden Erscheinungsbild zeigten die Aktin-Bälle in einer sehr geringen Anzahl der beobachteten Zellen an ihrer Oberfläche eine nahezu durchgängige p80-Markierung, die als Indiz für das Vorhandensein einer limitierenden Membran gewertet werden könnte (Abb. 30 C). Die Spezifität dieser Colokalisation blieb durch die geringe Anzahl beobachteter Fälle fraglich, konnte aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

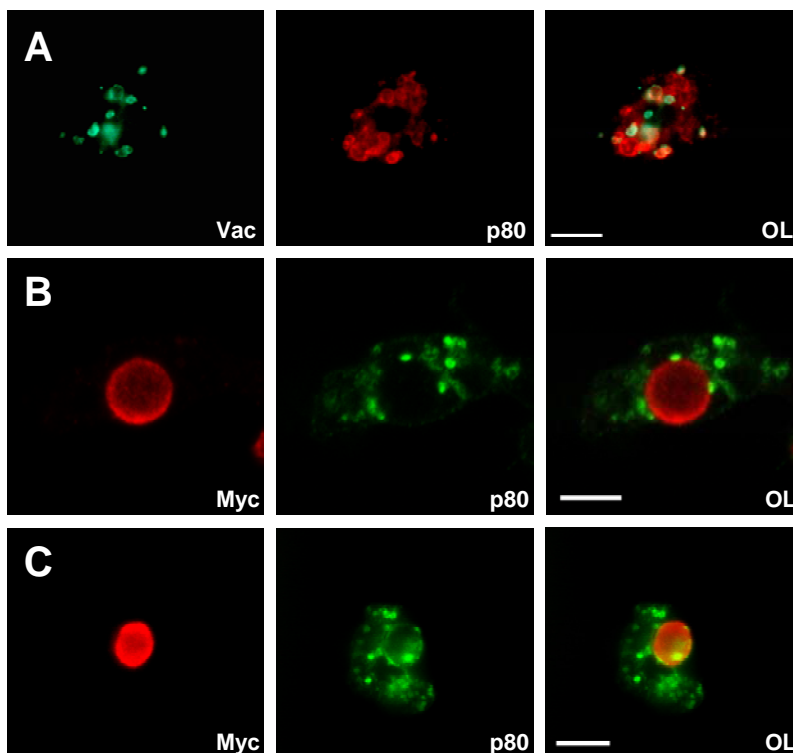


Abb. 30: p80-Colokalisationsstudie. (A) GFP-Vacuolin B (grün) exprimierende Zellen wurden mit dem p80 Antikörper (mAK H161, rot) gefärbt. Einige der markierten Endosomen weisen eine deutlich Colokalisation beider Proteine auf. (B) und (C) Zellen des Vac-Myc-VASP Klons 40-1 wurden mit Myc- (9-E-10, rot) und p80-Antikörper (mAK H161, grün) angefärbt. Die Zelle in (B) ist repräsentativ für das überwiegende Erscheinungsbild. Bilder entstanden im FM. Balken entsprechen 5 μ m.

Eine weitere Möglichkeit die Anwesenheit von Membranen endosomalen Ursprungs an oder in den Aktin-Bällen nachzuweisen besteht in der Beobachtung der Verteilung von endocytisiertem Material in der Zelle. Kann ein internalisierter Marker in den Aktin-Bällen nachgewiesen werden sind diese dadurch eindeutig als Teil des endocytischen Membransystems gekennzeichnet. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Zellen aus der Cotransformation mit GFP-Aktin verwendet, da die Aktin-Bälle hier auch in lebenden Zellen eindeutig zu identifizieren sind.

In einem ersten Ansatz wurden die Zellen für drei Stunden in fluoreszierendem TRITC-Medium inkubiert und nachfolgend im CLSM dokumentiert. Die Dauer des endocytotischen Transits wird für Wildtyp-Zellen von *D. discoideum* mit rund 60 Minuten angegeben. Der in diesem Versuch für die Inkubation mit Flüssigphasenmarker gewählte Zeitraum von mehreren Stunden sollte also auch in Zellen mit einem möglicherweise verzögerten Endocytoseverlauf zum Beladen von späten endosomalen Kompartimenten ausreichend sein. Abb. 31 A zeigt Zellen nach 170minütiger Inkubation mit dem Flüssigphasenmarker. Deutlich sind die mit TRITC-Medium beladenen Endosomen im Cytoplasma der Zellen zu erkennen. Ein Beweis dafür, dass die Ausbildung von Aktin-Bällen den Prozess der Makropinocytose nicht unterbindet. Eine Anreicherung bzw. Colokalisation des Flüssigphasenmarkers mit den GFP-markierten Aktin-Bällen konnte in dieser Untersuchung aber nicht beobachtet werden (Abb. 31 A *).

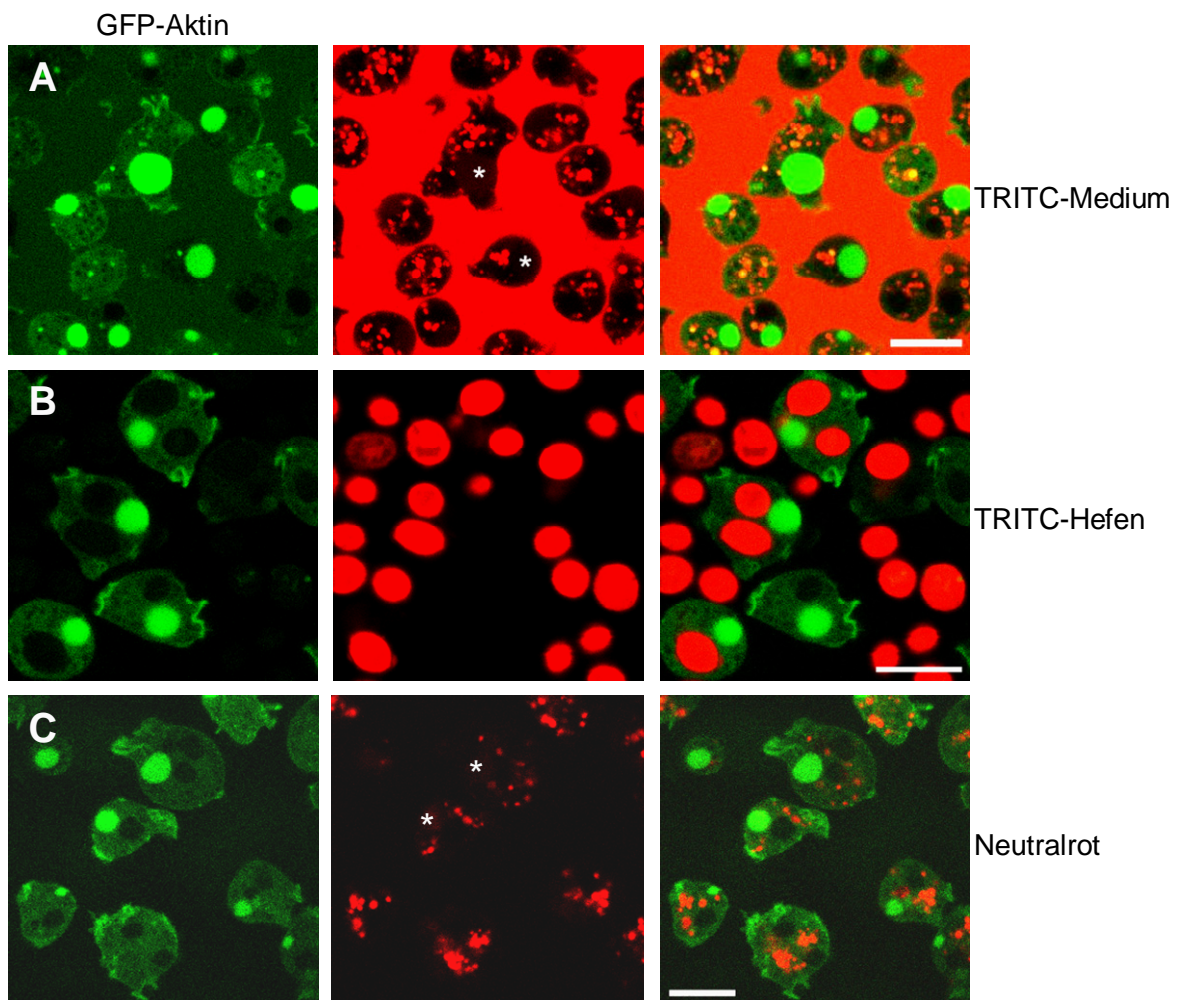


Abb. 31: Aktin-Bälle im endocytotischen Geschehen. Gezeigt sind Zellen des Klons Vac-Myc-VASP/GFP-Aktin 2-16. Die Zellen wurden (A) für 170 min in rotfluoreszierendem TRITC-Medium [2 mg/ml], (B) für 130 min mit TRITC markierten Hefen [~8 Hefepartikel/Zelle] und (C) für wenige Minuten mit 1 μ M Neutralrot inkubiert und repräsentative Ausschnitte im CLSM dokumentiert. (*) in den mittleren Bildern von A und C verweisen auf die Positionen von Aktin-Bällen. Balken entsprechen 10 μ m.

In einem zweiten Ansatz wurden den Zellen TRITC-markierte Hefen zur Phagocytose angeboten. Abb. 31 B zeigt diese Zellen nach 130minütiger Inkubation mit den Hefen. Im Cytoplasma einiger der abgebildeten Zellen sind in der ausgewählten Ebene mehrere internalisierte Hefepartikel zu beobachten. Demnach ist auch der Prozess der Phagocytose in diesen Zellen nicht inhibiert. Eine Colokalisation des endocytierten Materials mit den Aktin-Bällen konnte aber auch in dieser Untersuchung nicht beobachtet werden.

Zuletzt wurden die Zellen für 15 Minuten mit einer 1 μ M Neutralrot-Lösung inkubiert. Der Farbstoff Neutralrot wird selektiv in sauren Kompartimenten der Zelle angereichert und markiert diese mit einer Rotfluoreszenz. In *D. discoideum* werden dadurch hauptsächlich frühe Endosomen mit einem Alter von bis zu 40 Minuten angefärbt. Sollten die Aktin-Bälle sauren Endosomen entsprechen, oder aber im Inneren einen vom übrigen Cytoplasma abweichenden, niedrigeren pH-Wert aufweisen, würden sie also angefärbt werden. In keiner der in Abb. 31 C exemplarisch dargestellten Zellen konnte eine Anreicherung von Neutralrot in den Bereichen der Aktin-Bällen beobachtet werden. Diese entsprechen somit weder frühen Endosomen, noch einem anderen sauren Kompartiment der Zelle.

Da die Aktin-Bälle offensichtlich keine endosomalen Strukturen darstellen und neben ihnen keine weiteren Vacuolin-positiven Kompartimente im Cytoplasma beobachtet werden konnten, war es nun interessant zu prüfen, ob dennoch normal ausgebildete, neutrale Endosomen in diesen Zellen vorliegen. Zu diesem Zweck wurden Zellen des Vac-Myc-VASP Klons 2B-1 für mehrere Stunden mit einer Mischung aus TRITC- und FITC-Dextran inkubiert und lebend im CLSM dokumentiert (Abb. 32). Die Verwendung des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs FITC ermöglichte dabei die selektive Markierung neutraler Endosomen. Die Betrachtung der Zellen zeigte normal ausgebildete neutrale Endosomen, deren Größe und geschätzte Anzahl keine offensichtlichen Unterschiede zur Situation im Wildtyp (o. Abb.) erkennen ließen.

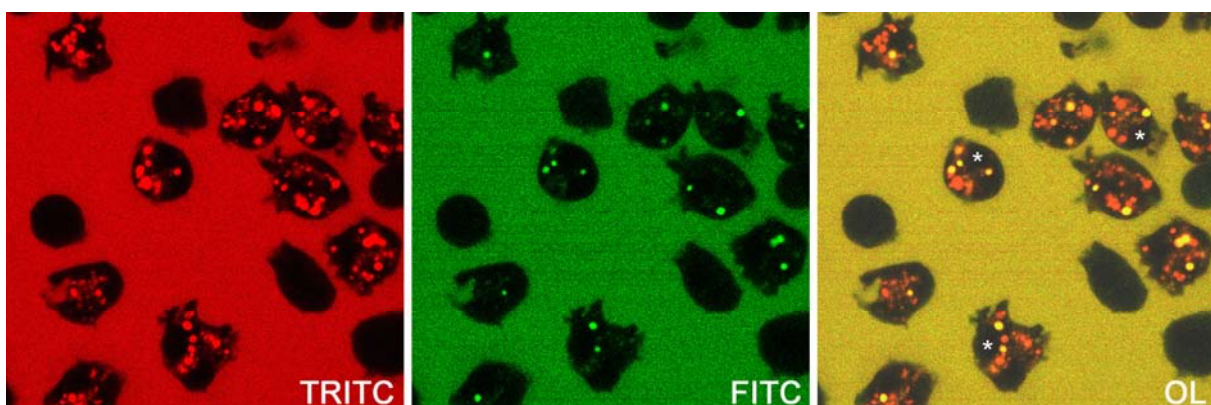


Abb. 32: Neutrale Endosomen in Vac-Myc-VASP-exprimierenden Zellen. Zellen des Klons 2B-1 wurden zur Beladung der endosomalen Kompartimente für mehrere Stunden in FITC- [0,4 mg/ml] und TRITC-Dextran [4 mg/ml]-haltigem Medium inkubiert und lebend im CLSM dokumentiert. Die Bilder zeigen dasselbe Areal mit den jeweils vermerkten unterschiedlichen Färbungen. (OL) zeigt das Überlagerungsbild beider Färbungen. Neutrale Kompartimente erscheinen gelb. (*) in OL markieren die vermuteten Positionen von Aktin-Bällen. Bildbreite entspricht ca. 70 μ m.

Zur weiteren Untersuchung der möglichen Beteiligung von Membranen am Aufbau der Aktin-Bälle wurden Zellen des Vac-Myc-VASP-Klons 40-1 für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) präpariert. Da in dieser Präparation keine spezifischen Markierungen, wie beispielsweise Immunogold, verwendet wurden, erfolgte die Zuordnung der dargestellten Strukturen ausschließlich über das Erscheinungsbild. Ein weiteres Problem in dieser Untersuchung stellte die schwache Kontrastierung der Präparate, sowie die zum Teil unscharfe Bilderzeugung am verwendeten Mikroskop dar. Diese Umstände führten dazu, dass die hier gewonnenen Erkenntnisse eher Indizien als endgültige Aussagen darstellen.

Die Betrachtung der Präparate zeigte in einigen der Zellen elektronendichte Areale, die in Form und Größe den Aktin-Bällen entsprachen und sich durch das Fehlen von Kernkappen von Zellkernen unterschieden (Abb. 33). Das Innere dieser Areale wies eine einheitliche Strukturierung auf. Erkennbare strukturelle Abweichungen, die auf die Anwesenheit von internen Membranen oder auf andere Einschlüsse hindeuteten, waren nicht zu beobachten. Weiterhin ließen auch die Randbereiche der Areale keine deutliche Membranstruktur erkennen, so dass auch in dieser Untersuchung kein Hinweis auf die Beteiligung von Membranen am Aufbau der Aktin-Bälle gefunden wurde.

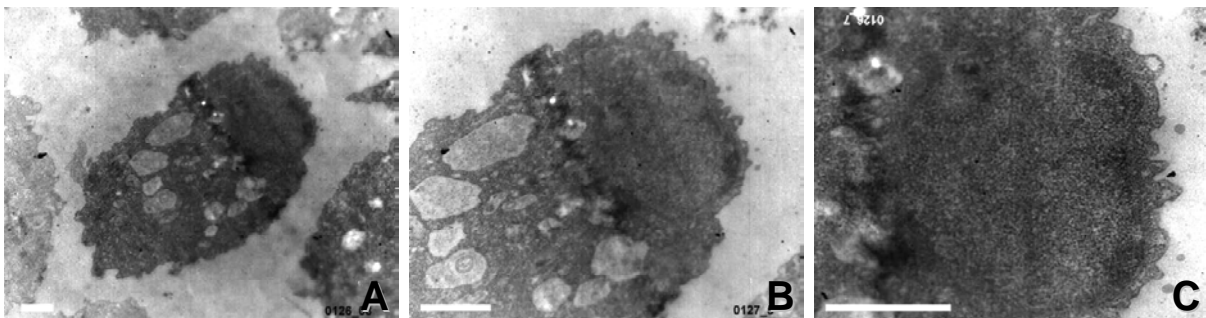


Abb. 33: TEM-Aufnahmen einer Vac-Myc-VASP-Zelle. (A) bis (C) zeigen verschiedene Vergrößerungen einer Zelle des Klons 40-1. Der in B und C vergrößerte Zellabschnitt enthält den potentiellen Aktin-Ball. Balken entsprechen einer Länge von 1 μm .

Zusammengenommen sprechen die in diesem Abschnitt beschriebenen Beobachtungen eindeutig gegen eine Beteiligung der Aktin-Bälle am endocytotischen Transit der Zellen und auch weitestgehend gegen die Beteiligung endosomaler Membranen am Aufbau dieser Strukturen.

2.5.6. Die Ausbildung von Aktin-Bällen reduziert die Endocytoserate

In der zuletzt durchgeführten Untersuchung wurde deutlich, dass die Ausbildung eines Aktin-Balles prinzipiell weder die Phagozytose noch die Makropinocytose unterbindet. Darüber, ob diese Prozesse in den Zellen noch in vollem Umfang ablaufen, konnte anhand der mikroskopischen Begutachtung aber keine Aussage getroffen werden. Daher sollten in

weiteren Untersuchungen die Phagozytose- und Pinocytoserate der Mutanten untersucht werden. Aus vorangegangenen Beobachtungen war bekannt, dass die Expression des Vac-Myc-VASP-Hybrids unter nicht-adhärenenten Bedingungen einen Cytokinesedefekt induziert (s. 2.5.4.). Zur Vermeidung möglicher daraus resultierender Einflüsse wurden die nachfolgenden Assays entgegen der üblichen Handhabung nicht in Schüttelkultur, sondern von Kulturplatte durchgeführt.

Beide Assays zeigten für die starken Expressierer des Hybrids eine gegenüber dem Wildtyp um ca. 50% verringerte Aufnahme rate. Demnach sind Phago- und Pinocytose in diesen Zellen gleichermaßen beeinträchtigt. (Abb. 34). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem unter Punkt 2.5.4. beschriebenen Wachstumsdefekt der Mutanten, der demnach zumindest teilweise auf die verringerte Endocytoseaktivität zurückgeführt werden kann.

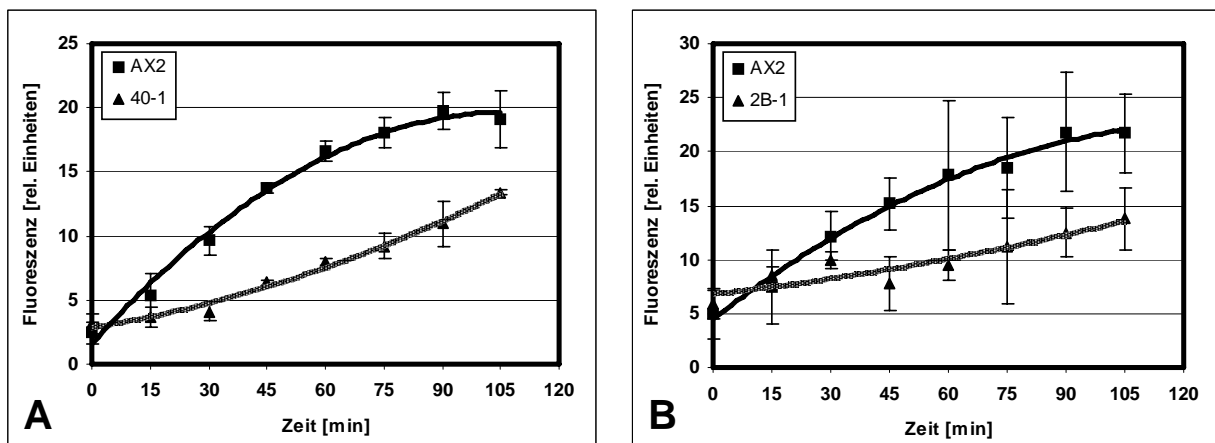


Abb. 34: Bestimmung der Phago- und Pinocytoserate starker Vac-Myc-VASP-Expressierer. (A) Phagozytose-Assay und (B) Pinocytose-Assay mit Wildtyp-Zellen (■) und den starken Vac-Myc-VASP-Expressierern (▲) 40-1 in A und 2B-1 in B. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte aus je drei unabhängigen Messungen.

2.5.7. Vorläufiges Modell zur Entstehung der Aktin-Bälle

Nicht alle Zellen in der Population eines Klon weisen das gleiche phänotypische Erscheinungsbild auf. Vereinzelt sind immer wieder Zellen zu beobachten, die sich durch die verminderte oder verstärkte Expression eines exogenen Proteins vom Rest der Population abheben, obwohl sie denselben Genotyp aufweisen. Dieses Phänomen war auch in Zellen des schwachen Vac-Myc-VASP-Expressierers B-21 zu beobachten. Neben Zellen mit dem bereits beschriebenen Erscheinungsbild waren vereinzelt auch solche mit einer offensichtlich gesteigerten Expression des Hybrids zu erkennen, die sich durch eine intensivere Färbung in der Immunfluoreszenz und vor allem durch ein abweichendes Erscheinungsbild der markierten späten Endosomen auszeichneten. Dabei besteht die Möglichkeit, dass diese abweichenden Erscheinungsformen Übergangsstadien auf dem Entstehungsweg der Aktin-Bälle darstellen. Ausgehend von solchen Strukturen wurde schließlich ein vorläufiges Entstehungsmodell der Aktin-Bälle erstellt, in dem die einzelnen beobachteten Stadien chronologisch angeordnet wurden.

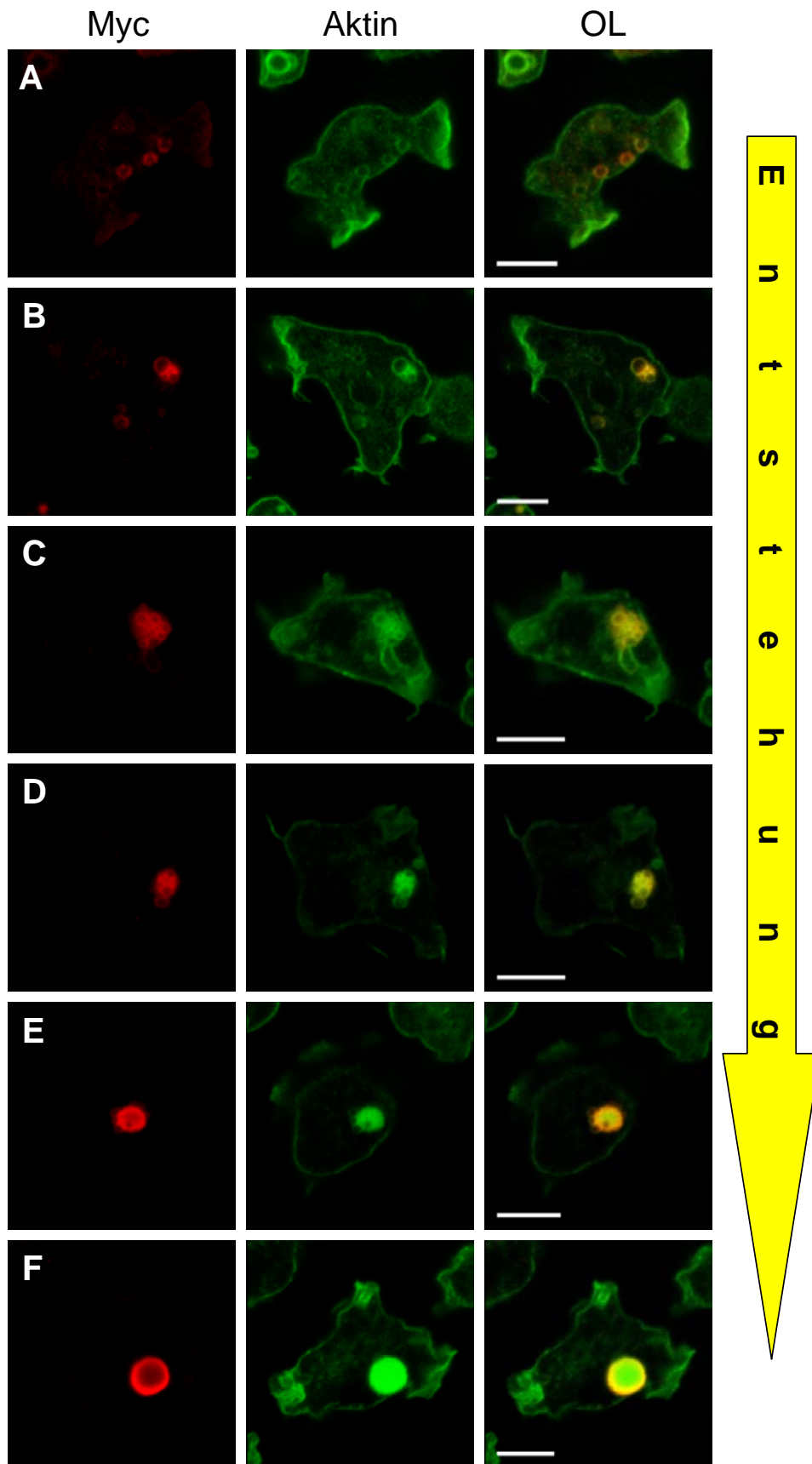


Abb. 35: Mögliche Reihenfolge der Ereignisse während der Entstehung der Aktin-Bälle. (A) bis (E) Zellen des Vac-Myc-VASP Klons B-21, (F) Zelle des Klons 40-1. Angefärbt wurden das Hybrid (mAK 9-E-10, rot) und Aktin (Alexa488-Phalloidin, grün). Balken entsprechen 5 μ m.

Ausgangspunkt stellt dabei die Anlagerung des Hybridproteins an der Oberfläche der späten Endosomen dar, wobei die Expression moderater Hybridmengen keinen offensichtlichen Einfluss auf das mikroskopische Erscheinungsbild der Endosomen ausübt (Abb. 35 A). Die Anlagerung größerer Mengen des Hybrids in stärker exprimierenden Zellen führt dagegen zur Aggregation einiger später Endosomen. Hierbei ist an den Berührungspunkten eine verstärkte Anreicherung des Hybrids und von F-Aktin zu beobachten (Abb. 35 B).

Die weiter zunehmende Expression führt schließlich zur Aggregation sämtlicher durch das Hybrid markierter Endosomen. Gleichzeitig erfährt die Aktin-Hülle der aggregierten Kompartimente einen deutlichen Zuwachs und erscheint in der Immunfluoreszenz nun wesentlich intensiver gefärbt als der Cortex (Abb. 35 C).

Im weiteren Verlauf nimmt die Verdickung der endosomalen Hülle aus Aktin und dem Hybridprotein stetig zu, so dass sich der Anteil dieser Proteine in den Aggregaten drastisch erhöht. Zugleich nimmt die Zahl der erkennbaren endosomalen Lumen im Inneren dieser Strukturen stark ab (Abb. 35 D & E).

Die Zellen in Abb. 35 D und E zeigen, dass sich vergleichsweise schwach durch das Myc-Epitop markierte Endosomen an der Außenseite entstehender Aktin-Bälle anlagern. An den „reifen“ Aktin-Bällen stark exprimierender Zellen konnten solche Anlagerung dagegen nicht beobachtet werden (Abb. 35 F). Im letzten postulierten Entstehungsschritt erfolgt schließlich die Ausprägung einer nahezu kugelförmigen Form zusammen mit dem Verlust sämtlicher beobachtbarer Hohlräume im Inneren der Struktur (Abb. 35 F & E).

2.6. Targeting von VASP an die Membran neu gebildeter Endosomen

Die in den Vac-Myc-VASP-exprimierenden Zellen beobachteten Aktin-Bälle sind nicht das Resultat der reinen Überexpression von VASP. Anderenfalls hätten Aktin-Bälle auch in VASP oder GFP-VASP überexprimierenden Zellen auftreten müssen. Eine solche Beobachtung wurde aber weder in der Literatur beschrieben (Han *et al.*, 2002), noch konnte sie in eigenen Untersuchungen gemacht werden (Abb. 21). Demnach ist die Ausbildung der Aktin-Bälle also entweder eine Folge der Fusion von VASP an Vacuolin, oder aber der dadurch bewirkten Anreicherung von VASP an der endosomalen Membranen. Um den letztgenannten Punkt zu überprüfen sollte VASP in diesem Versuchsteil an die Membranen neu gebildeter Endosomen dirigiert und die daraus resultierenden Effekte beobachtet werden. Neu gebildete Endosomen stellen für diese Untersuchung die zweckmäßigsten Kompartimente dar, da sie, neben allen biochemischen Unterschieden, ähnlich den Vacuolin dekorierten, späten Endosomen gleichfalls eine Hülle aus filamentösem Aktin aufweisen. Die Aktin-Hülle dieser Kompartimente ist zwar nur kurzlebig (s. Einleitung), sollte dem

angelagerten VASP-Protein aber dennoch die Möglichkeit einer für die Ausbildung von Aktin-Bällen eventuell essentiellen Interaktion bieten.

Um VASP an die frühen Endosomen zu dirigieren wurde es mit der C-terminalen PH-Domäne des TAPP-2 Proteins (Tandem PH-Domain containing Protein) der Maus fusioniert. TAPP-Proteine binden selektiv an $PI(3,4)P_2$ (Dowler *et al.*, 2000). Dieses stellt das überwiegende Abbauprodukt des während der Internalisierung an der Plasmamembran gebildeten Signalmoleküls $PI(3,4,5)P_3$ dar. Entsprechend dieser Bindungsaffinität akkumuliert TAPP an den Membranen sich formender Endosomen, von deren Oberfläche es im Verlauf weniger Minuten nach der Abschnürung des Endosoms in das Zellinnere abdissoziiert (Dormann *et al.*, 2004).

Zur Erstellung eines TAPP-Myc-VASP-Konstruktes (Abb. 36 A) wurde die Vacuolin-Sequenz im Vac-Myc-VASP-Plasmid durch die TAPP-2 PH-Domänen-Sequenz ausgetauscht. Das daraus resultierende TAPP-Myc-VASP-Plasmid (#527) wurde wiederholt in Wildtypzellen transformiert und die daraus resultierenden Klone mittels Westernblot-Analyse auf die Expression des Hybrids hin untersucht. In den meisten der gewonnen Klone konnte kein Nachweis des Hybridproteins erbracht werden. Nur wenige Klone zeigten nach einer verlängerten Farbreaktion des Blots sehr schwache Banden auf der erwarteten Höhe von ca. 70 kDa (Abb. 36 B). Die Betrachtung der Klone in der Immunfluoreszenz mittels Myc-Antikörper bestätigte dieses Ergebnis. Hier waren in den meisten Klonen keine spezifischen Myc-Signale erkennbar und auch in solchen Klonen, die in der Westernblot-Analyse eine schwache Bande aufwiesen, waren lediglich < 5 % der Zellen durch ein eindeutiges Myc-Signal gekennzeichnet. Trotz des geringen Prozentsatzes exprimierender Zellen wurde der Klon #14-5 für einen mikroskopischen Vergleich mit Kontrollzellen herangezogen. Als Kontrolle dienten TAPP-PH-GFP-Zellen, deren mikroskopisches Erscheinungsbild bereits in Dormann *et al.*, 2004 beschrieben wurde. Aufgrund der geringen Anzahl TAPP-Myc-VASP-exprimierender Zellen konnte nur eine begrenzte Anzahl von Zellen verglichen werden. Daher ist der im Folgenden dargestellte Vergleich lediglich bedingt repräsentativ.

Für den Vergleich wurden neben axenisch gewachsenen auch Zellen nach 20minütiger Inkubation mit abgetöteten Hefen verwendet. Letzterer Ansatz wurde gewählt, da zum einen die voluminösen Hefepartikel umgebenden endosomalen Membranen gut mikroskopisch darstellbar sind und zum anderen, da durch den gewählten kurzen Inkubationszeitraum ausschließlich frühe endosomale Kompartimente durch die Hefen markiert sein sollten.

Eine erste mikroskopische Begutachtung zeigte, dass in keiner der TAPP-Myc-VASP-exprimierenden Zellen die Ausbildung eines Aktin-Balls erfolgt war (Abb. 35 D, F & H). Im Vergleich mit den Kontrollzellen (Abb. 35 C, E & G) wurde deutlich, dass beide Hybridproteine eine übereinstimmende zelluläre Lokalisation an frühen endocytotischen Membranen aufweisen.

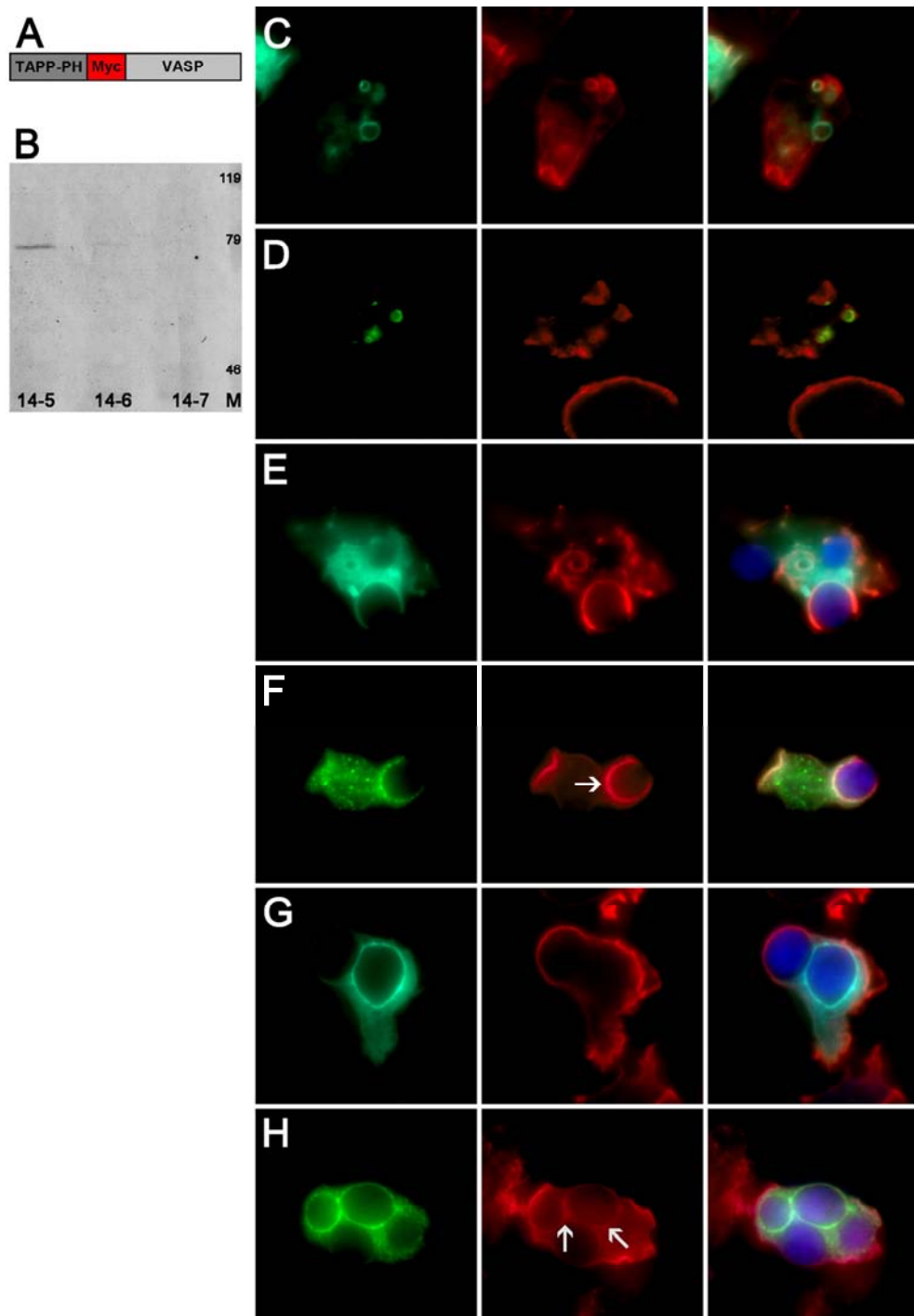


Abb. 36: TAPP-Myc-VASP-exprimierende Zellen im mikroskopischen Vergleich. (A) Schematische Darstellung des TAPP-Myc-VASP-Konstruktes. Die TAPP-PH-Domäne und VASP sind maßstabsgerecht, das Myc-Epitop vergrößert dargestellt. (B) Westernblot-Analyse einiger TAPP-Myc-VASP-Klone mittels Myc-Antikörper (mAK9-E-10). Im Klon #14-5 ist deutlich eine schwache Bande auf der für das Hybridprotein erwarteten Höhe von ca. 70 kDa erkennbar. Zahlen geben das Molekulargewicht der gezeigten Markerbanden (M) an. (C) bis (H) Mikroskopischer Vergleich von fixierten TAPP-PH-GFP- und TAPP-Myc-VASP-Zellen. (C),(E) und (G) zeigen Zellen des TAPP-PH-GFP-Klons #2, gefärbt sind TAPP-PH-GFP (grün) und Aktin (mAK Act-1-11, rot). (D), (F) und (H) zeigen jeweils vergleichbare Situationen in Zellen des TAPP-Myc-VASP Klons #14-5, angefärbt für das Hybrid (mAK 9-E-10, grün) und F-Aktin (Alexa488-Phalloidin, rot), Falschfarbendarstellung (rot/grün). Blau zeigt die unter UV-Anregung auftretende Autofluoreszenz der Hefepartikel. (C) und (D) zeigen axenisch gewachsene Zellen; (E) bis (H) zeigen Zellen nach 20 min Inkubation mit abgetöteten Hefen, wobei in (E) und (F) Internalisierungsstadien und in (G) und (H) deutlich markierte, neu gebildete Endosomen dargestellt sind. Bilder entstanden im FM. Die Bildbreite in (D) entpricht 26 μm , in allen anderen Bildern 21 μm .

Die Verweildauer der Hybridproteine an diesen Membranen erwies sich, wie erwartet, als begrenzt, was aus der Anwesenheit von internalisierten Hefepartikeln ohne erkennbare Hybridmarkierung abzuleiten war (Abb. 35 G & H). Demnach war das Targeting von VASP an diese Membranen also erfolgreich.

Der direkte Vergleich beider Hybridproteine ließ also keine Unterschiede in den Zellen erkennen. Eine genauere Begutachtung der jeweiligen Aktin-Färbungen zeigte aber, dass in Vac-Myc-VASP-exprimierenden Zellen sämtliche durch das Hybrid markierten endosomalen Membranen ein deutliches Aktin-Signal aufwiesen (Abb. 35 D, F & H), wobei in den meisten der beobachteten Fälle eine positive Korrelation beider Proteine vorlag (s. Pfeile in Abb. 35 F & H). Dies steht im Gegensatz zu der in den Kontrollzellen beobachtbaren und in der Literatur beschriebenen Situation (Dormann *et al.*, 2004), in der die Anreicherung von TAPP-PH-GFP mit der Depolymerisation von filamentösem Aktin an diesen Membranen korreliert und dementsprechend viele der in den Kontrollzellen markierten internen Membranen bereits ohne Aktin-Umhüllung vorlagen (Abb. 35 C & G).

3. Diskussion Teil I

In einer im Jahr 2003 von Drengk *et al.* veröffentlichten Arbeit wurde erstmals ein Aktin-interagierendes Protein über die Fusion an Vacuolin an die späte endosomale Membran dirigiert. Das darin verwendete Aktin-depolymerisierende Protein Cofilin bewirkte in dieser Lokalisation die gezielte Zerstörung der endosomalen Aktin-Hülle, in deren Folge eine Aggregation der betroffenen Kompartimente auftrat.

Analog zu diesem Ansatz wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Aktin-interagierende Proteine mit unterschiedlichen Funktionen an die endosomale Membran rekrutiert. Aus den sich daraus ergebenden Veränderungen in den jeweiligen Zellen sollten Rückschlüsse auf die bisher wenig charakterisierte biologische Funktion der endosomalen Aktin-Hülle gezogen werden.

3.1. Die Wirkung des Vac-Myc-DAip1-Hybrids auf Vorgänge des endocytotischen Transits

Mit der Fusion von DAip1 an Vacuolin A wurde ein weiteres an der Aktin-Depolymerisation beteiligtes Protein an die späten Endosomen dirigiert. Aus den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen ging hervor, dass das Targeting des Proteins an diese Kompartimente erfolgreich war (Abb. 11 B). Gleichzeitig wurde aber auch deutlich, dass die endosomale Oberfläche offenbar nur eine begrenzte Anzahl Bindungsstellen für Vacuolin bereithält, so dass überschüssiges Hybridprotein entsprechend der Affinität von DAip1 eine zusätzliche Lokalisation im Zellcortex aufzeigte (Abb. 11 C).

Das Resultat des an die späten Endosomen dirigierten DAip1 war die traubenartige Aggregation dieser Kompartimente, als deren Ursache der Verlust der endosomalen Aktin-Hülle identifiziert werden konnte, wobei das übrige zelluläre Aktin offenbar unbeeinflusst blieb (Abb. 12 A). Dabei wird die Depolymerisation der endosomalen Aktin-Hülle offensichtlich durch das Zusammenwirken von Vac-Myc-DAip1 und rekrutiertem endogenem Cofilin bewirkt (Abb. 12 B). Durch diese Beobachtung ließ sich auch die Parallelität zu dem für Vacuolin A-Myc-Cofilin-Zellen beschriebenen, vergleichbaren mikroskopischen Phänotyp erklären (Drengk *et al.*, 2003), wobei in diesen Zellen umgekehrt DAip1 durch Cofilin an die späten Endosomen rekrutiert wird (Abb. 12 D).

Die Vermessung des endocytotischen Transits zeigte für die Vac-Myc-DAip1-Mutanten eine von der Expressionsstärke des Hybridproteins abhängige Verzögerung (Abb. 13 A). Die korrespondierenden pH-Wert-Kurven ließen außerdem auf einen ebenfalls vom Expressionsniveau des Hybridproteins abhängigen Anstieg des luminalen pH-Wertes schließen. Hierbei fiel die Diskrepanz zur Wildtyp-Situation während der frühen Messpunkte am größten aus und mit zunehmender Neutralisierung des endosomalen Lumens trat eine

stetige Annäherung der Werte auf (Abb. 13 B). Dabei könnten der Anhebung des endosomalen pH-Wertes mindestens zwei unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. Zum einen die Inhibition der Ansäuerung neu gebildeter Endosomen und zum anderen die Fusion saurer und neutraler Endosomen.

Der Einfluss des Vac-Myc-DAip1-Hybrids auf Vorgänge an neu gebildeten Endosomen scheint zunächst nicht offensichtlich. Eine genaue Betrachtung der zellulären Lokalisation zeigt aber, dass ein geringer Anteil des Hybridproteins auch in vielen der schwach exprimierenden Zellen gemäß der Affinität von DAip1 am Zellcortex lokalisiert, wodurch das Hybridprotein vermutlich auch transient an der Oberfläche sich bildender Endosomen angereichert vorliegt. Durch die Fusion an DAip1 könnte Vacuolin A also zumindest kurzfristig zu dem Zeitpunkt, an dem die Anlieferung der vacuolären Protonenpumpe erfolgt, an die frühen endosomalen Membranen gelangen. Über die für Vacuolin-Proteine beschriebene Oligomerisierung (Wienke *et al.*, 2006) könnte so auch Vacuolin B, welches als Markerprotein und Fusions-Inhibitor später endosomaler Membranen gilt (Jenne *et al.*, 1998), rekrutiert werden. Möglicherweise könnte diese Misslokalisierung von Vacuolin B an den Membranen neu gebildeter Endosomen mit der vesikulären Anlieferung der Protonenpumpe und damit der Ansäuerung interferieren. In der Folge würden nur weniger stark angesäuerte Endosomen den endocytotischen Transit durchlaufen. Dabei ist zu erwähnen, dass dieser postulierte Mechanismus lediglich den angehobenen pH-Wert, nicht aber die Transit-Verzögerung erklären kann, da ein erhöhter luminaler pH-Wert der Exocytose prinzipiell nicht entgegen wirken sollte.

Die zweite erwähnte Möglichkeit besteht in der unkontrollierten Fusion früher saurer und später neutraler Endosomen. Hierbei könnte durch den Verlust der als sterischen Fusions-Barriere wirkenden endosomalen Aktin-Hülle die Fusion mit Endosomen eines früheren Reifestadiums begünstigt werden, wobei durch die Vereinigung der Inhalte eine Anhebung des luminalen pH-Wertes, sowie eine Zurückführung später endosomaler Inhalte in frühere Endosomen erfolgt. Mit diesem Modell könnte auch die verlängerte Transit-Zeit und die ebenfalls beobachtete verstärkte Retention lysosomaler Enzyme in den Vac-Myc-DAip1-Zellen erklärt werden (Abb. 14 A & B).

In der vorliegenden Arbeit wurde in Vac-Myc-Cof exprimierenden Zellen ebenfalls eine verstärkte Retention lysosomaler Enzyme gemessen (Abb. 14 A & B). Interessanterweise konnte in einer vorangegangenen Studie aber weder eine statistisch signifikante Transit-Verzögerung, noch eine Anhebung des endosomalen pH-Wertes in diesen Zellen beobachtet werden (Drengk *et al.*, 2003; Drengk, 2003). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den beiden oben aufgestellten Theorien, da auch in Vac-Myc-Cof-Zellen die endosomale Aktin-Hülle zerstört vorliegt und zumindest in starken Exprimierern ebenfalls von einer Misslokalisierung von Vacuolin im Zellcortex ausgegangen werden kann. Folglich sollten

ähnliche Defekte im endocytotischen Transit wie in den Vac-Myc-DAip1-Zellen hervorgerufen werden. Die Diskrepanz zu der in Vac-Myc-DAip1-Zellen beobachteten Situation konnte an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden.

Eine mögliche Erklärung dieser Unterschiede könnte sich darin begründen, dass die Retention lysosomaler Enzyme in den Zellen eventuell deutlicher messbar ist als der ihr zugrunde liegende Transit-Defekt. In diesem Fall könnte in den Vac-Myc-Cof-Zellen trotz eines schwachen, statistisch nicht haltbaren Transit-Defekts dennoch eine offensichtliche Verzögerung bei der Sezernierung lysosomaler Hydrolasen nachweisbar sein.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die in Vac-Myc-DAip1- und Vac-Myc-Cof-Zellen gemessene verstärkte Retention lysosomaler Enzyme möglicherweise unabhängig von den in Vac-Myc-DAip1-Zellen zusätzlich beobachteten Transit-Defekten erfolgt. Eventuell stellt sie das Resultat einer durch den Verlust der als sterischen Abschnürungs-Barriere wirkenden Aktin-Hülle induzierten verlängerten Recycling-Phase lysosomaler Enzyme an den späten Endosomen dar. In Vac-Myc-DAip1-Zellen könnte der zusätzliche Transit-Defekt dann noch eine weitere Verstärkung der Retention lysosomaler Enzyme bewirken. Dadurch könnte auch die in den starken Vac-Myc-DAip1 Expressierern beobachtete Zunahme dieses Effektes erklärt werden (Abb. 14 A & B).

Welcher, oder ob überhaupt einer der hier diskutierten Prozesse dem veränderten Sekretionsverhalten in den Vac-Myc-DAip1-Zellen zugrunde liegt, konnte anhand der vorliegenden Studie nicht endgültig geklärt werden. Die hier gezeigten Ergebnisse legen aber nahe, dass der endosomalen Aktin-Hülle in Dictyostelium neben der bisher beschriebenen Funktion als Aggregations-Barriere später endosomaler Kompartimente (Drengk *et al.*, 2003) möglicherweise eine weitere Aufgabe in der Regulation von Recycling-Prozessen lysosomaler Enzyme an diesen Kompartimenten zukommt.

3.2. Coronin an späten Endosomen

Coronin gilt als Deaktivator des Arp2/3-Komplexes (Rodal *et al.*, 2005). Der Arp2/3-Komplex ist eine zentrale Komponente im endocytotischen Geschehen von Dictyostelium. Neben seiner Beteiligung an der Internalisierung konnte auch die erneute Anreicherung des Komplexes an der Oberfläche neutraler Endosomen beobachtet werden (Insall *et al.*, 2001). Entsprechend seiner Funktion als Aktin-Nucleator (Übersicht in Goley & Welch, 2006) kommt ihm hier vermutlich eine Rolle in der Ausbildung der endosomalen Aktin-Hülle zu. Da auch Coronin zu einem ähnlichen Zeitpunkt erneut an der endosomalen Membran akkumuliert (Rauchenberger *et al.*, 1997), ist es wahrscheinlich, dass die Polymerisation der Aktin-Hülle durch die Interaktion von Coronin mit dem Arp2/3-Komplex negativ reguliert wird. Dabei wird durch Coronin, anders als durch Cofilin oder DAip1, keine Aktin-Depolymerisation induziert, sondern lediglich die weitere oder erneute Polymerisation verhindert.

Für Coronin wurde beschrieben, dass es lediglich transient an der endosomalen Oberfläche verweilt und nach wenigen Minuten graduell von dieser abdissoziiert, wobei zeitgleich die vermehrte Anlagerung von Vacuolin erfolgt (Rauchenberger *et al.*, 1997). Über die Verweilzeit des Arp2/3-Komplexes an den späten Endosomen ist dagegen derzeit nichts bekannt. Daher ist auch noch unklar, ob nach der Ausbildung der Aktin-Hülle weitere durch den Arp2/3-Komplex vermittelte Polymerisationsschritte an der endosomalen Membran erfolgen. Ein Indiz für einen solchen Prozess liefert die Beobachtung, dass die endosomale Aktin-Hülle zum Zeitpunkt der Exocytose einen deutlichen Zuwachs an F-Aktin erfährt (Lee & Knecht, 2002). Durch die Fusion an Vacuolin sollte die Verweilzeit von Coronin an den späten Endosomen verlängert werden und dadurch mögliche nachfolgende Arp2/3-Komplex-abhängige Prozesse inhibiert werden.

Wie die in 2.2. dargestellte Lokalisationsstudie offenbarte, zeigte das dafür verwendete Vac-Myc-Cor-Hybridprotein eine überwiegend Coronin-artige Verteilung in den Zellen. Trotzdem konnte in starken Exprimierern auch eine deutliche Anreicherung des Hybrids an späten Endosomen beobachtet werden, so dass in diesen Zellen die ursprünglich vorgesehene verlängerte Verweilzeit von Coronin an der endosomalen Oberfläche gegeben war (Abb. 15 E). Obwohl das mikroskopische Erscheinungsbild der markierten Endosomen unauffällig war, wurden zur Ermittlung etwaiger Veränderungen im endocytotischen Transit der Zellen die in 2.2.1. dargestellten Enzym-Aktivitäts-Tests durchgeführt. Darin konnten keine vom Wildtyp-Verhalten signifikant abweichenden Veränderungen festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten zwar auf einen ungestörten Ablauf des endocytotischen Transits und der Exocytose in diesen Zellen hin, zur endgültigen Klärung wäre aber eine ausführlichere Analyse, beispielsweise mittels Transit-Assays, erforderlich gewesen.

Das Ziehen von Rückschlüssen aus den oben beschriebenen Ergebnissen ist aus unterschiedlichen Gründen problematisch. Zum einen zeigte das Vac-Myc-Cor-Hybrid eine bevorzugte Lokalisation im Zellcortex. Die dadurch möglicherweise hervorgerufenen Veränderungen in der Zelle wurden nicht untersucht und stellen daher einen nicht abschätzbaren Faktor dar, der möglicherweise etwaigen durch die Lokalisation des Hybrids an der endosomalen Membran hervorgerufenen Effekten entgegenwirken könnte. Zum anderen konnte die Funktionalität des an Vacuolin fusionierten Coronins nicht überprüft werden. Zwar ist die N-terminale Fusion von Coronin mit GFP offenbar funktionell (Fukui *et al.*, 1997), ob der Funktionserhalt aber auch im Hybrid mit Vacuolin gegeben ist, bleibt letztendlich unbekannt. Schließlich stellt auch die größtenteils noch unverstandene Regulation der Coronin-Aktivität einen kritischen Punkt dar. Für Säuger-Coronin 1B wurde eine Regulation über Protein-Kinase C (Cai *et al.*, 2005) und Slingshot-Phosphatase (Cai *et al.*, 2007) beschrieben. Über welche Mechanismen Dictyostelium Coronin reguliert wird ist aber derzeit noch unbekannt.

Geht man trotz der unsicheren Ergebnislage von einem normal verlaufenden endocytotischen Transit und der endosomalen Anreicherung von Coronin in einer funktionellen Form aus, könnten die oben beschriebenen Ergebnisse bedeuten, dass nach der Ausbildung der endosomalen Aktin-Hülle keine weiteren essentiellen Arp2/3-induzierten Polymerisationsvorgänge mehr an der endosomalen Membran stattfinden. Bezüglich der in Lee & Knecht, 2002 beobachteten verstärkten Anreicherung filamentösen Aktins während der Exocytose könnten daraus zwei Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum einen stellt diese Anreicherung möglicherweise keinen für die Exocytose zwingend notwendigen Prozess dar. Zum anderen findet die Anreicherung eventuell erst nach der eigentlichen Exocytose, also zu einem Zeitpunkt, an dem das Hybrid die endosomale Membran vermutlich bereits verlassen hat, statt.

3.3. Versuche zur Verstärkung der endosomalen Aktin-Hülle

Nachdem bereits mit unterschiedlichen Hybridproteinen die Zerstörung der endosomalen Aktin-Hülle herbeigeführt wurde, sollte in diesem Versuchsteil durch lokal gesteigerte Aktin-Polymerisation eine Verstärkung derselben erzielt werden. Mögliche Veränderungen im endocytotischen Ablauf solcher Zellen sollten weitere Hinweise bezüglich der Funktion der endosomalen Aktin-Hülle liefern. Zu diesem Zweck wurde das Vac-Myc-Scar-Konstrukt erstellt. Scar ist das Dictyostelium WAVE-Homolog. Zusammen mit WASP und N-WASP zählen diese Proteine zu den am besten charakterisierten Aktivatoren des Arp2/3-Komplexes und stellen die Verbindung zwischen der durch Rho-GTPasen vermittelten Signaltransduktion und dem Arp2/3-Komplex dar (Übersicht in Stradal *et al.*, 2004).

In der Dictyostelium-Datenbank (www.dictybase.org) werden Scar (Bear *et al.*, 1998) und ein putatives WASP-Homolog (Eichinger *et al.*, 2005) als einzige Vertreter dieser Protein-Familie angegeben. In der Zelle liegt das durch das *scrA*-Gen codierte Scar-Protein in einem Komplex zusammen mit *pirA* (auch als PIR121 bezeichnet), Nap1 und Abi1 vor, wobei das genaue regulatorische Zusammenwirken dieser Proteine derzeit noch diskutiert wird (Ibarra *et al.*, 2005). Der Knockout von Scar führt in Dictyostelium zu einer verminderten Zellgröße, Defekten in der Zellmotilität, einer verringerten Phagozytose-Rate, einer Transit-Verzögerung, sowie zu einem insgesamt verringerten F-Aktin-Gehalt (Bear *et al.*, 1998; Seastone *et al.*, 2001).

Die Tatsache, dass es trotz mehrerer Versuche nicht gelang das Vac-Myc-Scar-Hybrid unter der Kontrolle des starken Aktin15-Promotors in Zellen zu exprimieren, ließ auf einen cytotoxischen Effekt des Hybridproteins schließen (s. 2.3.). Unterstützt wird diese Vermutung durch die von Seastone *et al.*, 2003 beschriebene Beobachtung, in der sich die starke Expression einer GFP-markierten Version von Scar ebenfalls als letal erwies. Möglicherweise induziert die Überexpression von Scar in der Zelle eine Fehlregulation der

Arp2/3-Komplex-Aktivität. In der Folge könnten schwerwiegende Defekte in essentiellen Aktin-abhängigen Prozessen, wie der Cytokinese, der Zellmotilität und der Endocytose, auftreten, die letztlich das Absterben der Zellen bewirken.

Die ebenfalls durchgeführte Expression des Vac-Myc-Scar-Hybrids unter Tetrazyklin-abhängiger Kontrolle führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einerseits konnte in den wenigen exprimierenden Zellen kein einheitliches Erscheinungsbild bezüglich der Lokalisation des Hybridproteins und der dadurch am Cytoskelett hervorgerufenen Veränderungen beobachtet werden. Andererseits zeigte die Färbung mittels Vacuolin-Antikörper keinerlei Übereinstimmung mit dem durch das Myc-Epitop markierte Hybrid (Abb. 17 B). Da aufgrund der Westernblot-Analyse von der Expression des Volllänge Proteins ausgegangen werden kann (Abb. 17 A), ist der Grund der letzteren Beobachtung vermutlich in einer gestörten Anlagerung des verwendeten Vacuolin-Antikörpers an das im Hybrid fusionierten Vacuolin zu suchen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine durch die Bindung an Scar bewirkte Fehlfaltung des vom Vacuolin-Antikörper erkannten Epitops darstellen. Da die Faltung von Vacuolin in einer Reihe anderer Hybridproteine aber offensichtlich nicht beeinflusst ist (s. z.B. Abb. 17 F & Abb. 19 C), scheint diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich. Eine weitere Erklärung könnte die sterische Maskierung des vom Antikörper erkannten Epitops darstellen. Die Blockierung des Epitops könnte hierbei entweder direkt durch die angefügte Scar-Sequenz erfolgen, oder aber möglicherweise durch die Inkorporation des Vac-Myc-Scar-Hybrids in den oben beschriebenen regulatorischen Komplex zusammen mit PirA, Nap1 und Abi1 hervorgerufen werden. Zur Klärung dieses Phänomens hätten eventuell weitere zur Verfügung stehende Vacuolin-Antikörper mit anderer Epitop-Erkennung innerhalb des Vacuolin-Moleküls verwendet werden können. Aufgrund der ohnehin wenig aussagekräftigen Beobachtungen wurde aber von diesbezüglichen Untersuchungen abgesehen.

Über das hier eingesetzte, von Blaauw *et al.*, 2000 für *Dicystostelium* beschriebene Tetrazyklin-abhängige Expressionssystem ist zu erwähnen, dass die beobachtete Zahl induzierter Zellen auch nach längerer Induktionszeit relativ gering war. Selbst unter der Annahme, dass stark exprimierende Zellen aufgrund des postulierten cytotoxischen Effekts des Vac-Myc-Scar-Hybrids in der mikroskopischen Analyse nicht berücksichtigt wurden, lag der geschätzte Anteil induzierter Zellen bei deutlich unter 10%. Daher eignet sich dieses System eher für die Einzelzellen-Analyse, als für die Untersuchung von Gesamtpopulationen.

Neben dem im Ergebnisteil dargestellten Ansatz mit Vac-Myc-Scar wurden noch weitere Versuche unternommen, die endosomale Aktin-Hülle zu verstärken. In diesen Versuchen wurden Sequenzbereiche zweier unterschiedlicher Formine an die Vacuolin A-Myc-Sequenz fusioniert. Neben dem Arp2/3-Komplex sind Formine die am besten charakterisierten Aktin-

Nucleatoren der Zelle. Unter ihrem Einfluss erfolgt die Ausbildung überwiegend parallel angeordneter, unverzweigter F-Aktin-Strukturen, wie sie beispielsweise in Filopodien oder Aktin-Kabeln vorzufinden sind (Übersicht in Kovar, 2006; Faix & Grosse, 2006). Verantwortlich für die Polymerisation ist dabei die für alle Formine charakteristische FH2-Domäne, deren Polymerisations-Aktivität durch die benachbarte Profilin-Aktin-bindende FH1-Domäne verstärkt wird. Daneben existieren noch weitere regulatorische und die Lokalisation bestimmende Domänen, die den unterschiedlichen Forminen einer Zelle ihre abweichenden Spezifitäten verleihen. Verkürzte Proteinversionen, die lediglich die Domänen FH2 oder FH1-FH2 umfassen, sind konstitutiv aktiv (Evangelista *et al.*, 2002; Pruyne *et al.*, 2002; Hans Faix, persönliche Mitteilung). In den im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten Versuchen die endosomale Aktin-Hülle zu verstärken, wurden die FH1-FH2-Sequenz des Formins Bni1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Pruyne *et al.*, 2002), sowie die FH2- und FH1-FH2-Sequenz des Formins F aus *Dictyostelium discoideum* (Rivero *et al.*, 2005) an die Vacuolin A-Myc-Sequenz angefügt (Plasmide #417; #522, #523). Trotz mehrerer Transformationsversuche in Wildtypzellen wurde keines der drei Konstrukte nachweislich in den Zellen exprimiert. Diese Beobachtungen ließen auch hier auf einen cytotoxischen Effekt der Hybridproteine schließen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Feststellung, dass auch die alleinige Expression der FH2-Domäne des Dictyostelium Formins dDia2 letal ist (Hans Faix, persönliche Mitteilung).

Letztendlich konnte durch keinen der durchgeführten Ansätze eine Verstärkung der endosomalen Aktin-Hülle bewirkt werden. Gleichzeitig zeigten die hier gemachten Beobachtungen aber, wie sensibel die Zelle auf Veränderungen am Aktin-Cytoskelett reagiert und wie groß daher die Notwendigkeit für eine fein abgestimmte Regulation der zellulären Aktin-Dynamik ist.

3.4. ABP34 induziert keine offensichtlichen Veränderungen an späten Endosomen

Mit der Fusion von ABP34 an die Vacuolin A-Myc-Sequenz wurde ein Aktin-bündelndes Protein erfolgreich an die endosomale Oberfläche dirigiert (s. 2.4.1). Dadurch hätten unterschiedliche Effekte in den betroffenen Zellen erwartet werden können. Zum einen hätte möglicherweise über die Bündelung von Aktin-Filamenten unterschiedlicher endosomaler Kompartimente eine Aggregation erfolgen können. Weiterhin hätte über einen vergleichbaren Mechanismus auch eine Anlagerung oder Verankerung der Endosomen am Aktin-reichen Zellcortex auftreten können.

Neben der strukturellen Veränderung wird durch die Bündelung von Aktin-Filamenten aber auch deren Stabilität beeinflusst. In unterschiedlichen Zelltypen wurde eine durch die Formation von Aktin-Bündeln bedingte deutliche Verlangsamung der Aktin-Depolymerisation

beschrieben, wodurch die gebündelten Filamente stabilisiert werden (Loomis *et al.*, 2003; Tilney *et al.*, 2003). Die Expression der Aktin-bündelnden Domäne von Espin in CL-4 Zellen bewirkte sogar eine Verlängerung der gebündelten Filamente (Loomis *et al.*, 2003). Einen ähnlichen Effekt könnte auch die durch ABP34 induzierte Bündelung des endosomalen F-Aktins in Vac-Myc-ABP34-Zellen hervorrufen. In Pankreas-Zellen der Ratte wurde die lokale Depolymerisation des kortikalen Aktin-Cytoskeletts als essentielle Voraussetzung für die Exocytose beschrieben (Muallem *et al.*, 1995). Analog dazu könnte auch in Dictyostelium die lokale Depolymerisation der endosomalen Aktin-Hülle und des kortikalen Aktins zur Ausbildung einer Fusionspore während der Exocytose erforderlich sein. Eine durch die Bündelung hervorgerufene Stabilisierung der endosomalen Aktin-Hülle könnte diese Depolymerisation verzögern und damit der Exocytose entgegenwirken.

Die Untersuchung der Vac-Myc-AB34-Zellen ließ aber weder in der mikroskopischen Begutachtung der Endosomen-Lokalisation (Abb. 14 C & D), noch in der Vermessung der in den Zellen verbleibenden Enzymaktivität lysosomaler Hydrolasen (Abb. 20) auf Veränderungen gegenüber dem Wildtyp schließen. Neben einem möglicherweise durch die Fusion an Vacuolin hervorgerufenen Funktionsverlust von ABP34 könnte auch die Ca^{2+} -Sensitivität des Proteins (Lim *et al.*, 1999a) eine mögliche Ursache dafür darstellen. In vielen nicht-sekretorischen Säugerzellen wird die Exocytose von Lysosomen durch einen Anstieg der freien Ca^{2+} -Konzentration hervorgerufen bzw. reguliert (Coorsen *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 2001; Jaiswal *et al.*, 2002). Ähnlich könnte auch in Dictyostelium die Exocytose durch die Mobilisierung von zellulärem Ca^{2+} ausgelöst werden. Ein der Exocytose vorausgehender lokaler Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration könnte dabei die Inaktivierung von ABP34 an der endosomalen Oberfläche und damit die Auflösung der Bündel-Struktur des endosomalen Aktins bewirken. In der Folge würden die Aktin-Filamente keine zusätzliche Stabilisierung mehr erfahren und die der Exocytose vorausgehende Depolymerisation könnte ungehindert ablaufen. Unter diesen Voraussetzungen sollte der Verlauf der Exocytose trotz der Anwesenheit von funktionellem ABP34 unbeeinträchtigt sein. Die in Erwägung gezogene Überprüfung dieser Annahme durch den Einsatz der Calcium-Ionophore A23187 erschien wenig aussagekräftig, da diese Droge in den behandelten Zellen ohnehin eine Exocytose-Verzögerung bewirkt (Drengk, 2003).

Schließlich besteht noch die Möglichkeit, dass auch die fortbestehende Aktivierung von ABP34 und die dauerhafte Bündelung des endosomalen Aktins keinen oder einen lediglich geringen Einfluss auf das Depolymerisationsverhalten, sowie die Exocytose ausüben.

3.5. VASP an endosomalen Membranen

Die Expression des Vac-Myc-VASP-Konstruktes führte zu verschiedenen Phänotypen in schwach und stark exprimierenden Zellen. In schwachen Exprimierern zeigte das Hybrid

eine endosomale Lokalisation, wobei zum Teil eine Aggregation der markierten Kompartimente mit einer damit einhergehenden Anreicherung von F-Aktin an den betroffenen Endosomen auftrat (Abb. 22 B & C; Abb. 35 B & C). Offensichtliche Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Zellen konnten aber nicht beobachtet werden (Tab. 1). In stark exprimierenden Zellen induziert das Hybrid dagegen die Ausbildung der als Aktin-Bälle bezeichneten Strukturen (s. Abb. 23 C) und bewirkte darüber die für diese Zellen beschriebenen Wachstums-, Cytokinese- (2.5.4.) und Endocytose-Defekte (s. 2.5.6.).

3.5.1 Sind die Aktin-Bälle Hirano Bodies?

Bezüglich ihrer ermittelten Eigenschaften weisen die hier beschriebenen Aktin-Bälle Paralleltät zu so genannten „Hirano Bodies“ (Hirano *et al.*, 1968) auf. Diese werden mit unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Alzheimer (Gibson & Tomlinson, 1977), Parkinson (Hirano *et al.*, 1968) oder Creutzfeld-Jakob (Cartier *et al.*, 1985), in Verbindung gebracht, wurden aber auch in Zelltypen außerhalb des Nervensystems beobachtet (Gibson, 1978; Fernandez *et al.*, 1999; Setoguti *et al.*, 1974). Gemeinsame Merkmale beider Strukturen sind neben der Anreicherung von filamentösem Aktin die ellipsoide bis kugelige Form (Abb. 23 C ; Hirano, 1994), die gegenüber dem übrigen zellulären F-Aktin ungewöhnlich hohe Stabilität (2.5.3.; Peterson *et al.*, 1986), sowie die Anreicherung Aktin-assoziiertes Proteins im Inneren (Abb. 25; Maselli *et al.*, 2002). Dabei wurde für Hirano Bodies eine Anreicherung von Cofilin beschrieben. Diese wurde für die Aktin-Bälle der Vac-Myc-VASP-Zellen nicht explizit untersucht, erscheint aber aufgrund der hier beobachteten Anreicherung des mit Cofilin interagierenden Proteins DAip1 ebenfalls wahrscheinlich (Abb. 25 C). Eine weitere mögliche Übereinstimmung ist die Abwesenheit einer umgebenden Membran. Zwar kann deren Existenz an den Aktin-Bällen aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht gänzlich ausgeschlossen werden, erscheint aber unwahrscheinlich (2.5.5.).

Interessanterweise induziert auch die Expression unterschiedlicher, dauerhaft aktivierter Formen des Aktin-bündelnden Proteins ABP34 in *Dictyostelium* die Bildung von cytoplasmatischen Strukturen, die mit Hirano-Bodies vergleichbar sind (Maselli *et al.*, 2002; Maselli *et al.*, 2003). Aus diesen Untersuchungen wurde geschlossen, dass die Ausbildung von Hirano Bodies vermutlich durch die Fehlregulation der Aktivität Aktin-bündelnder Proteine ausgelöst wird, wobei durch die unkontrollierte Bündelung von Aktin-Filamenten deren Abbau verhindert wird. Im Zusammenwirken mit weiteren Proteinen resultiert daraus schließlich eine starke Anreicherung von zu höherer Struktur organisiertem F-Aktin. Die molekularen Mechanismen, die zur Ausbildung der überwiegend kugeligen Form führen, sind jedoch unverstanden (Maselli *et al.*, 2002; Maselli *et al.*, 2003).

3.5.2. Mögliche Mechanismen der VASP-induzierten Aktin-Polymerisation

Die Ähnlichkeit von Hirano-Bodies zu den in Vac-Myc-VASP-Zellen auftretenden Aktin-Bällen legt einen vergleichbaren Mechanismus in der Entstehung dieser Strukturen nahe. Dabei könnte die Formation der Aktin-Bälle möglicherweise über die für VASP beschriebene Aktin-Bündelung (Bachmann *et al.*, 1999) erfolgen. Da aber weder die Überexpression von Wildtyp-VASP, noch von funktionellem GFP-VASP in den entsprechenden Zellen einen vergleichbaren Phänotyp hervorruft (Han *et al.*, 2002), ist die Formation der Aktin-Bälle in Vac-Myc-VASP-Zellen offensichtlich von der durch die Fusion an Vacuolin bewirkten Rekrutierung des Proteins an die endosomale Membran abhängig. Diesbezüglich liegt also ein Unterschied zur Situation in Zellen mit aktiviertem ABP34-Protein vor.

In diesem Zusammenhang interessant sind die Beobachtungen, dass weder durch eine Myristoyl-Modifikation an die Plasmamembran dirigiertes VASP in Dicytostelium-Zellen (Han *et al.*, 2002), noch an die mitochondriale Membran rekrutiertes VASP in Fibroblasten (Bear *et al.*, 2000) die Formation von Hirano Bodies oder Aktin-Bällen induziert. In ersterem Fall wurde eine offensichtlich durch VASP hervorgerufene verstärkte Bildung von Filopodien an der Plasmamembran beobachtet. Dagegen ließ die Rekrutierung von VASP an Mitochondrien keine Hinweise auf Aktin-Polymerisation an diesen Kompartimenten erkennen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen könnte sein, dass dirigiertes VASP zur Ausübung eines Effektes auf das Aktin-Cytoskelett auf weitere, in der jeweiligen Lokalisation vorhandene Proteine und Faktoren zurückgreifen muss und selbst nicht in der Lage diese zu rekrutieren. So könnte an der Plasmamembran das von Schirenbeck *et al.*, 2006 postulierte Zusammenwirken mit dem dort lokalisierten Formin dDia2 die verstärkte Ausbildung von Filopodien bewirken. An der mitochondrialen Membran tritt dagegen aufgrund der Abwesenheit weiterer Aktin-interagierender Proteine kein Effekt auf.

Die Lokalisation des Vac-Myc-VASP-Hybrids an späten Endosomen könnte eine Interaktion von VASP mit dem dort ebenfalls nachgewiesenen Arp2/3-Komplex bewirken (Insall *et al.*, 2001). Dabei könnten die Aktin-Bälle möglicherweise das Resultat einer durch die Anreicherung von VASP hervorgerufenen Hyperaktivierung des Komplexes an der endosomalen Membran darstellen. Diese Möglichkeit wird zum einen durch den bereits beschriebenen fördernden Einfluss von VASP auf die Polymerisationsrate des Arp2/3-Komplexes (s. Einleitung) und zum anderen durch die starke Anreicherung des mit dem Arp2/3-Komplex interagierenden Proteins Coronin (Rodal *et al.*, 2005) in den Aktin-Bällen (Abb. 25 A) unterstützt. Die fortlaufende Polymerisation einerseits und die gleichzeitige durch VASP vermittelte Bündelung der entstandenen Filamente andererseits könnte dabei die Ausbildung größerer Aktin-Strukturen höherer Ordnung und damit gesteigerter Stabilität (2.5.3.) auslösen.

Eine andere mögliche Ursache für die Formation der Aktin-Bälle besteht in der alternativ postulierten Funktion von VASP als eigenständiger Aktin-Polymerisator (Chereau & Dominguez, 2006). In unterschiedlichen Untersuchungen wurde für diese Funktion eine Anhängigkeit von der Oligomerisierung von VASP mittels der C-terminalen Tetramerisierungs-Domäne beschrieben (Bachmann *et al.*, 1999; Walders-Harbeck *et al.*, 2002). Möglicherweise bewirkt die über Vacuolin vermittelte zusätzliche Oligomerisierung des Vac-Myc-VASP-Hybrids die Ausbildung eines „Super-Aggregates“, in dem es zu einer verstärkten Aktivierung der Polymerisations-Aktivität der oligomerisierten VASP-Proteine kommt, in deren Folge die Ausbildung der Aktin-Bälle induziert wird. Die Formation der Aktin-Bälle würde in diesem Fall nur zufällig an der endosomalen Membran stattfinden. Ein entsprechendes Kontrollexperiment, in dem VASP mit dem für die Oligomerisierung verantwortlichen Coiled-Coil-Bereich von Vacuolin fusioniert ist, wird derzeit durchgeführt.

3.5.3. Späte Endosomen und Aktin-Bälle

In schwach exprimierenden Vac-Myc-VASP-Zellen wurde zum Teil eine Aggregation der durch das Hybridprotein markierten Endosomen beobachtet, die vermutlich einen Zwischenschritt während der Formation der Aktin-Bälle darstellt (2.5.6.). Über die molekulare Ursache dieser Aggregation kann momentan nur spekuliert werden. Möglicherweise erfolgt die initiale Aneinanderlagerung der Endosomen über die Tetramerisierungs-Domäne der VASP-Proteine (Abb. 35 B) und wird im weiteren Verlauf durch die Ausbildung einer gemeinsamen Aktin-Hülle (Abb. 35 D) gefestigt. Im Zuge der fortschreitenden Verdickung der gemeinsamen endosomalen Hülle aus Hybridprotein und F-Aktin werden die beobachtbaren Lumen im Inneren der sich formierende Aktin-Bälle zunehmend kleiner und seltener (vergl. Abb. 35 C & E). Im Einklang mit dieser Beobachtung steht, dass endosomale Lumen in voll ausgebildeten Aktin-Bällen überhaupt nicht mehr anzutreffen sind (Abb. 35 F). Über das weitere Schicksal der endosomalen Membranen konnten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen keinen Aufschluss geben. Möglicherweise werden sie durch die bei der Aktin-Polymerisation im Inneren der Aggregate freiwerdenden Kräfte aus diesen herausgepresst und lassen dabei ihren Besitz aus Aktin, Vacuolin und dem Hybridprotein zurück. Daraus resultierend wären sie durch Antikörper gegen diese Proteine nicht mehr nachweisbar. Dies könnte erklären warum in Zellen mit Aktin-Bällen trotz der Abwesenheit Vacuolin-positiver endosomaler Kompartimente (Abb. 22 D) dennoch neutrale Endosomen vorzufinden sind (Abb. 32).

Aus Westernblot-Analysen ging hervor, dass die Expression von endogenem Vacuolin in starken Vac-Myc-VASP-Expriemern mit der des Wildtyps vergleichbar ist (o. Abb.). Demnach liegt das endogene Vacuolin in diesen Zellen offensichtlich zusammen mit dem Vac-Myc-VASP Hybrid angereichert in den Aktin-Bällen vor. Entsprechend dieser

Beobachtungen weist endogenes Vacuolin also eine höhere Affinität zu den Aktin-Bällen als zu den Membranen neutraler Endosomen auf. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das in Wienke *et al.*, 2006 vorgestellte Lokalisations-Modell für Vacuolin-Proteine liefern, in dem die endosomale Lokalisation in Abhängigkeit zur Oligomerisierung mit weiteren Vacuolin-Molekülen gesetzt wird. Entsprechend würde ein neu synthetisiertes Vacuolin-Protein in der Zelle vor seiner endosomalen Lokalisation zunächst mit weiteren verfügbaren Vacuolin-Molekülen oligomerisieren. In starken Vac-Myc-VASP Expressierern ist dabei die Bildung eines Oligomers zusammen mit mindestens einem der zahlenmäßig weitaus häufigeren Hybridproteine sehr wahrscheinlich. Möglicherweise wird das gesamte Oligomer nachfolgend über die in ihm vorhandene Tetramerisierungs-Domäne von VASP an die Aktin-Bälle dirigiert und das endogene Vacuolin so an der endosomalen Lokalisation gehindert. Unterstützt werden könnte dieser Effekt außerdem auch über die Oligomerisierung der Vacuolin-Moleküle untereinander, die gleichfalls eine Anreicherung an den Aktin-Bällen unterstützen könnte.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass endogenes Vacuolin zusammen mit dem Hybrid zumindest kurzzeitig an der Oberfläche von Endosomen lokalisiert. Sowohl in der Immunfluoreszenz (Abb. 35 E), als auch in der Beobachtung lebender Zellen in TRITC/FITC-Medium (o. Abb.) konnte eine zum Teil mehrminütige Anlagerung neutraler bzw. Hybrid-markierter Endosomen an der Oberfläche der Aktin-Bälle beobachtet werden. Möglicherweise kommt es während dieser Berührungen zu einer Interaktion zwischen den endosomalen Proteinen und dem in den Aktin-Bällen angereicherten Hybridprotein. Als Folge daraus werden sowohl das endogene, endosomale Vacuolin, als auch das endosomale Hybridprotein von der Membran abgezogen und ebenfalls am Aktin-Ball angelagert. Das „nackte“ neutrale Endosomen verliert daraufhin die Affinität zu den Bällen und wird ins Cytoplasma entlassen.

Es ist nahe liegend, dass der vollständige Verlust von Vacuolin an der endosomalen Membran einen dem Knockout von Vacuolin vergleichbaren Phänotyp induzieren könnte. Für Vacuolin B defiziente Zellen wurde neben anderen Defekten die Ausbildung eines einzigen, stark vergrößerten späten endosomalen Kompartiments beschrieben (Jenne *et al.*, 1998). Vergleichbare Beobachtungen konnten in starken Vac-Myc-VASP-Expressierern nicht gemacht werden (Abb. 32). Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass ein geringer, immunocytochemisch nicht mehr nachweisbarer Anteil des endogenen Vacuolins trotz der überwiegenden Anreicherung in den Aktin-Bällen dennoch an späten endosomalen Membranen lokalisiert. Dadurch könnte der Ausprägung des im Knockout beobachteten Phänotyps entgegengewirkt werden. Zur Überprüfung dieser Annahme könnten Untersuchungen an Vacuolin B Knockdown-Zellen hilfreich sein. Entsprechende Zellen wurden aber noch nicht generiert. Übereinstimmend mit den obigen Beobachtungen sind

auch Untersuchungen an Zellen, in denen endogenes Vacuolin durch die zusätzliche Expression des Coiled-Coil-Bereichs von Vacuolin teilweise von der endosomalen Membran abgezogen wurde (Wienke *et al.*, 2006; Drengk, 2003). Auch hier wurde keine auffällige Vergrößerung der späten Endosomen beobachtet. Einen möglichen Hinweis für einen durch die Reduktion des Vacuolin-Besatzes an neutralen Endosomen hervorgerufenen Effekt liefert die von Susan Claußner in starken Vac-Myc-VASP exprimierenden gemessene Verzögerung der Neutralisierung endosomaler Kompartimente, sowie der Exocytose. Ähnliche Bedingungen wurden auch für Vacuolin B defiziente Zellen beschrieben (Jenne *et al.*, 1998).

3.5.4. VASP an frühen Endosomen

Der in Abb. 36 dargestellte Vergleich von TAPP-Myc-VASP- und TAPP-GFP-Zellen zeigte, dass unter dem Einfluss von VASP ein vergleichsweise erhöhter F-Aktin-Gehalt an den frühen endosomalen Membranen zu verzeichnen war. Dieser Beobachtung zu Folge interagiert VASP auch in dieser Lokalisation mit dem vorhandenen Cytoskelett und bewirkt eine Stabilisierung der diese Kompartimente umgebenden Aktin-Hülle (Abb. 36 H & F). Dieser Einfluss könnte durch eine von VASP bedingte Bündelung der Aktin-Filamente und der dadurch bewirkten Verzögerung der unter normalen Bedingungen auftretenden Aktin-Depolymerisation hervorgerufen werden. Andererseits wäre auch eine Verstärkung der endosomalen Hülle durch eine zusätzliche Aktivierung des Arp2/3-Komplexes und damit einer gesteigerten Aktin-Polymerisation möglich. Welcher dieser beiden Mechanismen letztendlich in den Zellen vorliegt, konnte anhand der hier durchgeführten Untersuchungen nicht geklärt werden.

Gemäß den unter 4.5.2. diskutierten Wirkungsmechanismen von VASP sollten auch die Membranen früher Endosomen die Ausbildung von Aktin-Bällen ermöglichen. Auch hier sind der Arp2/3-Komplex, sowie eine bereits vorhandene Aktin-Hülle als potentielle Interaktionspartner für das dirigierte VASP-Protein anzutreffen (Insall *et al.*, 2001; Dormann *et al.*, 2004). Die Beobachtung, dass in keiner der TAPP-Myc-VASP exprimierenden Zellen die Formation eines Aktin-Balls erfolgte, könnte unterschiedliche Ursachen haben.

Zum einen wurde eine mögliche Aktivierung von VASP über die zusätzliche Oligomerisierung durch Vacuolin diskutiert. Eine vergleichbare Oligomerisierung wird durch die PH-Domäne von TAPP vermutlich nicht initiiert. Ein weiterer Punkt ist, dass neben den oben genannten möglicherweise weitere Proteine an der Ausbildung der Aktin-Bälle beteiligt sind. Ob unter diesem Aspekt tatsächlich vergleichbare Bedingungen an frühen und späten endosomalen Membranen vorherrschen ist nicht bekannt. Ein offensichtlicherer Unterschied zur Situation in Vac-Myc-VASP-Zellen liegt in der vergleichsweise kurzen Verweilzeit des TAPP-Myc-VASP-Hybrids an der Ziel-Membran, sowie in der wesentlich geringeren Anzahl gleichzeitig

durch das Hybrid markierter Endosomen. Beide Faktoren könnten möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Formation der Aktin-Bälle ausüben.

Weiterhin haben die Untersuchungen der Vac-Myc-VASP-Zellen gezeigt, dass die Formation der Aktin-Bälle eindeutig von der Expressionsstärke des Hybridproteins abhängig ist. Aufgrund der heterogenen Expression des TAPP-Myc-VASP-Hybrids in dem untersuchten Klon können darüber keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Anhand der Signalstärke in der Immunfluoreszenz ist aber von einer eher schwachen Expression in den begutachteten Zellen auszugehen (Abb. 36 D, F & H). Die mögliche Formation von Aktin-Bällen an frühen endosomalen Membranen kann daher, trotz fehlenden Nachweises, nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden

4. Ergebnisse Teil II - Etablierung einer *in vivo*-Hierarchie cytoplasmatischer Targeting-Signalstärken

Durch die Fusion zweier Proteine werden auch deren intrinsische Lokalisations-Informationen in einem Molekül vereint. Daraus ergibt sich eine konkurrierende Situation der unterschiedlichen Affinitäten, die in Form eines „molekularen Tauziehens“ ausgetragen wird, wobei das stärkere Targeting-Signal letztlich die bevorzugte Lokalisation des Hybridproteins bestimmt. Demnach ist es also möglich, anhand der Lokalisation eines Hybridproteins die Targeting-Potenziale der in ihm fusionierten Proteine miteinander zu vergleichen. Dieser Ansatz wurde verwendet, um die Affinitäten unterschiedlicher Proteine und Signal-Sequenzen zu ihren jeweiligen zellulären Lokalisationen miteinander zu vergleichen und gemäß ihrer daraus abgeleiteten Targeting-Potenziale anzuordnen.

Im ersten Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Aktin-assoziierte Proteine an Vacuolin fusioniert, um die daraus resultierenden Veränderungen an späten Endosomen zu untersuchen. Neben den jeweiligen Effekten auf die endosomale Aktin-Hülle wurde dabei auch die zelluläre Lokalisation der eingesetzten Hybridproteine eingehend untersucht. Die Ergebnisse dieser Lokalisationsstudien sind in Tabelle 3 zusammengefasst dargestellt.

Protein	Lokalisation		gezeigt in
	Endogenes Protein	Vac-Myc-Hybrid	
DAip1	Cort	sE > Cort	2.1.
Coronin	Cort > sE	Cort > sE	2.2.
ABP34	Cort	sE > Cort	2.4.
VASP	Cort > Cp	sE + Bälle	2.5.
Cofilin	Cort > Cp	sE > Cort	Ref.*

Tabelle 3: Übersicht der Ergebnisse aus den Lokalisationsstudien. Abkürzungen: Cort: Cortex; sE: späte Endosomen; Cp: Cytoplasma; Ref.*: Referenz in: Drengk *et al.*, 2003. In der rechten Spalte sind die als Referenz relevanten Kapitel dieser Arbeit, sowie der entsprechende Literaturverweis angegeben.

Anhand der bevorzugten Lokalisation der jeweiligen Hybridproteine ließen sich nun die Targeting-Signalstärken der fusionierten Proteine miteinander vergleichen, wobei Vacuolin jeweils als Referenzgröße diente. Eine unter diesen Kriterien angelegte Reihenfolge ergab das größte Targeting-Potenzial für Coronin, gefolgt von Vacuolin und schließlich DAip1 (s. 2.1.), ABP34 (s. 2.4.), VASP (s. 2.6.) und Cofilin (Drengk *et al.*, 2003), wobei die vier letztgenannten bezüglich ihres Potenzials untereinander nicht unterscheidbar waren (Abb. 37). Zur genaueren Aufschlüsselung dieses Sachverhalts, sowie zur Erweiterung der angegebenen Rangfolge (Abb. 37) sollten im Folgenden Targeting-Signale für weitere zelluläre Kompartimente eingesetzt werden.

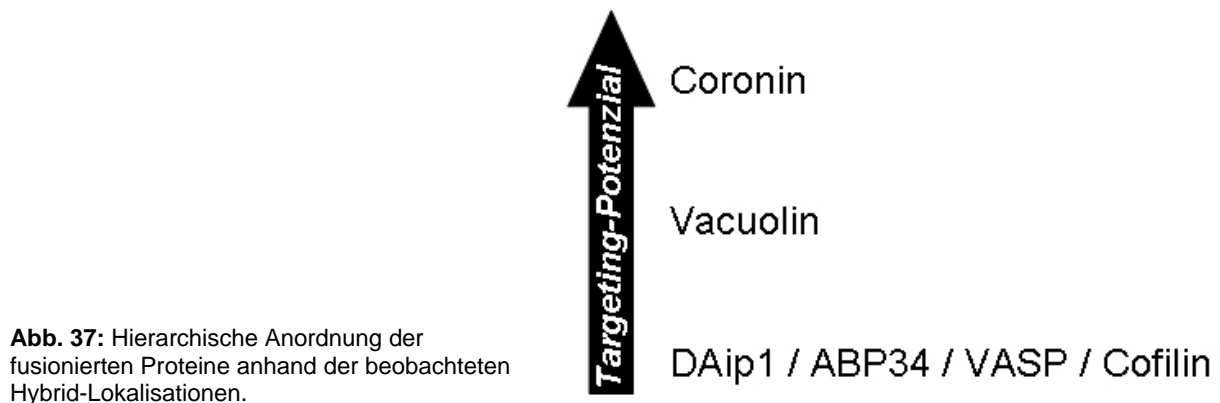


Abb. 37: Hierarchische Anordnung der fusionierten Proteine anhand der beobachteten Hybrid-Lokalisationen.

4.1. Targeting von Coronin in den Kern

In dieser Untersuchung sollte ein Nucleäres Lokalisations Signal (NLS) bezüglich seines Targeting-Potenzials in der in Abb. 37 dargestellten Hierarchie eingeordnet werden. Zu diesem Zweck wurde das NLS des SV40 T-Antigens zusammen mit dem Myc-Epitop an den N-Terminus von Coronin fusioniert (Abb. 38 A). Das daraus resultierende Plasmid Myc-NLS-Cor (#500) wurde in Wildtypzellen transformiert und die erhaltenen Klone mittels Westernblot-Analyse auf die Expression des Hybrids hin untersucht (Abb. 38 B).

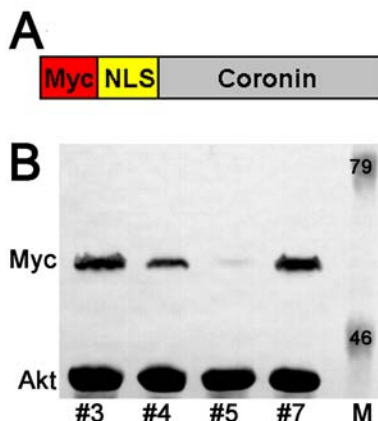


Abb. 38: Expression des Myc-NLS-Coronin-Hybrids. (A) Schematische Darstellung des Hybridproteins. (B) Westernblot-Analyse der Myc-NLS-Cor-Klone mittels Myc-(mAK 9-E-10) und Aktin-Antikörper (mAK Act-1-11) als Ladekontrolle. In allen Klone konnte das Hybrid mit der erwarteten Größe von ca. 59 kDa nachgewiesen werden. Zahlen geben das Molekulargewicht der dargestellten Markerbanden (M) an.

Aus den erhaltenen Klone wurden der schwach exprimierende Klon #5 und der stark exprimierende Klon #3 ausgewählt und in einer Immunfluoreszenz das Lokalisationsverhalten des Myc-NLS-Coronin-Hybrids untersucht. Im schwachen Exprimierer #5 zeigte das Hybrid eine exklusive Lokalisation im Zellkern, ohne erkennbare Anreicherung in anderen Bereichen der Zelle (Abb. 39 A). Demnach wies das verwendete SV40-NLS ein höheres Targeting-Potenzial für den Kern auf als Coronin für das Aktin-Cytoskelett. Die um ein Vielfaches stärkere Expression im Klon #3 führte dagegen zu einer zusätzlichen Lokalisation des Hybrids im Zellcortex (Abb. 39 B).

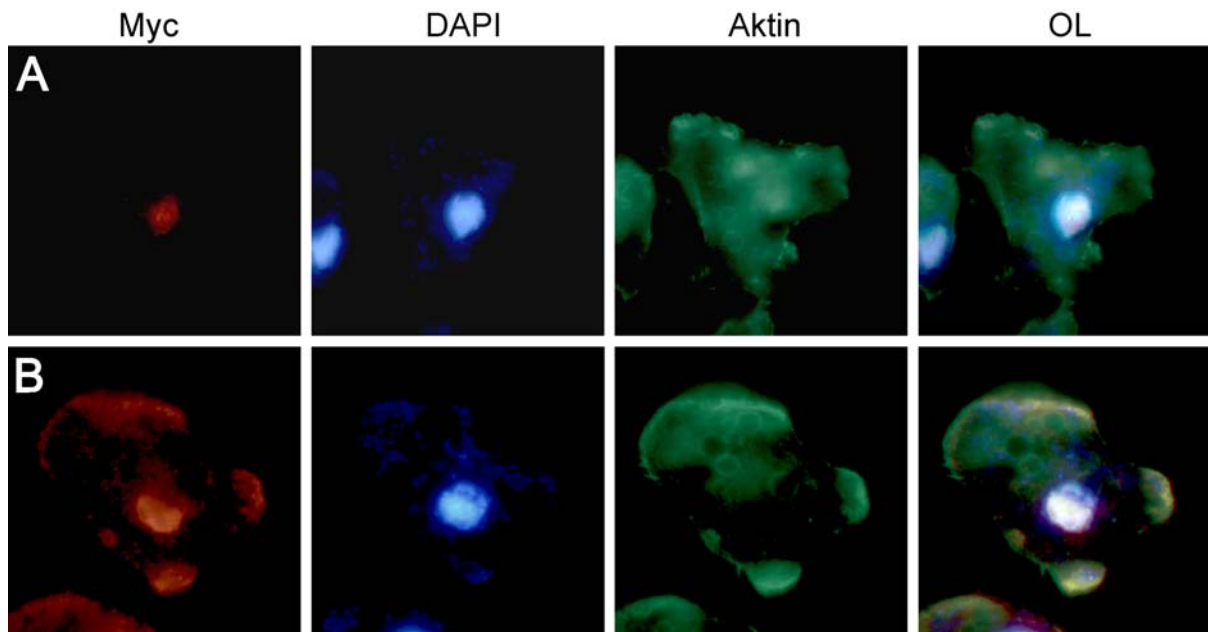


Abb. 39: Lokalisation des Myc-NLS-Cor-Hybrids in unterschiedlich starken Expriemern. In Zellen des schwachen Expriemers #5 (A) und des starken Expriemers #3 (B) wurde die Lokalisation des Hybrids (mAK 9-E-10, rot) mit einer Kernfärbung (DAPI, blau) und einer Aktin-Färbung (Alexa488-Phalloidin, grün) verglichen. (OL) zeigt das jeweilige Überlagerungsbild. Bilder entstanden im FM. Bildbreiten in A und B sind 24 µm.

4.2. Targeting von ABP34 in die peroxisomale Matrix

In diesem Versuchsteil sollte das Targeting-Potenzial des „Peroxisomal Targeting Signal 1“ (PTS1) mit dem von ABP34 verglichen werden. Zu diesem Zweck wurde der Myc-ABP34-Sequenz mittels PCR am 3'-Ende die PTS1-Sequenz angefügt, so dass das codierte Protein am C-Terminus eine Erweiterung um die drei Aminosäuren Ser-Lys-Leu aufwies (Abb. 40 A). Das daraus resultierende Plasmid Myc-ABP34-PTS1 (#497) wurde in Wildtypzellen transformiert und unabhängige Klone mit unterschiedlichen Expressionsniveaus des Hybrids isoliert (Abb. 40 B).

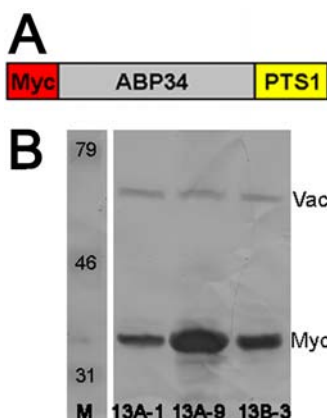


Abb. 40: Expression des Myc-ABP34-PTS1-Hybrids. (A) Schematische Darstellung des Hybridproteins. (B) Westernblot-Analyse verschiedener Myc-ABP34-PTS1-Klone mittels Myc- (mAK9-E-10) und Vacuolin-Antikörper (mAK 263-79-2) als Ladekontrolle. Alle Klone zeigen eine deutliche Expression des Hybridproteins mit der erwarteten Größe von ca. 36 kDa. Zahlen geben das Molekulargewicht der angezeigten Markerbanden (M) an.

Zur weiteren Analyse wurden der schwache Expriemer 13A-1, sowie der starke Expriemer 13A-9 ausgewählt und in beiden Zelllinien die Lokalisation des Myc-ABP34-PTS1-Hybrids mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Im schwachen Exprimierer 13A-1 färbte das Hybridprotein über das gesamte Cytoplasma verteilt liegende, kleine, überwiegend ellipsoide Strukturen an. Eine Anreicherung im Cortex konnte nicht beobachtet werden. Bezüglich der Form, der Anzahl, sowie der zellulären Verteilung entsprachen die angefärbten Strukturen dem beschriebenen Erscheinungsbild von Peroxisomen in Dictyostelium. Zur Überprüfung dieser postulierten Organellen-Identität wurden die Zellen des Klons 13A-1 zusätzlich mit einem PTS1-fusionierten Rot-Fluoreszierenden-Protein (RFP-PTS1, Plasmid #498) transformiert und in den daraus erhaltenen Zellen die Lokalisation beider exogener Proteine miteinander verglichen (Abb. 41 A). Der Vergleich in der Immunfluoreszenz erbrachte eine nahezu vollständige Übereinstimmung beider Proteine, so dass die peroxisomalen Lokalisation des Myc-ABP34-PTS1-Hybrids bestätigt wurde.

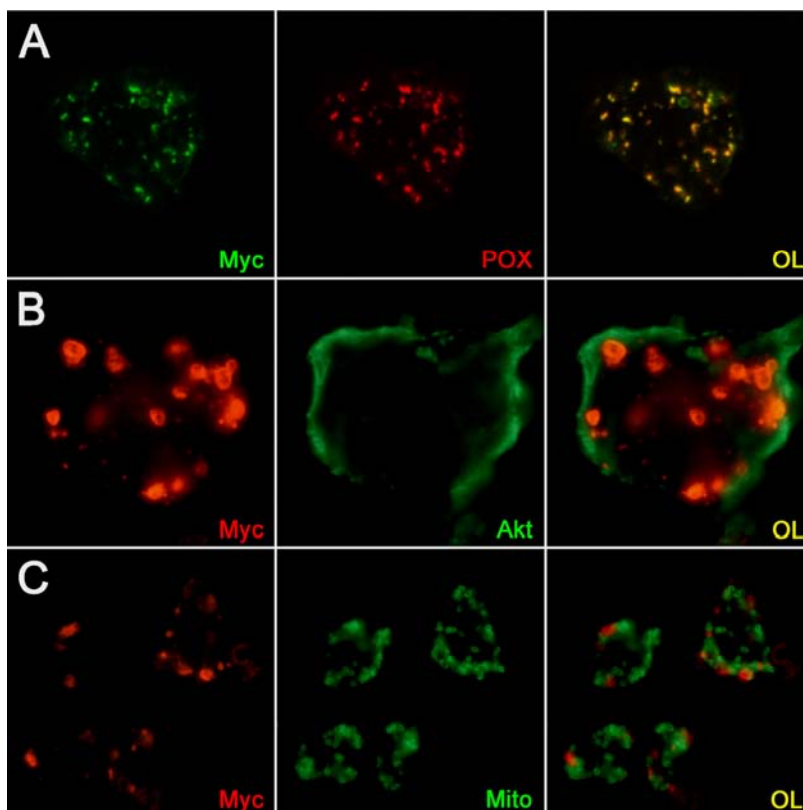


Abb. 41: Lokalisation des Myc-ABP34-PTS1-Hybrids. (A) Zelle des Klons 13A-1 cotransformiert mit einem RFP-PTS1 Konstrukt. Dargestellt sind das Hybrid (mAK 9-E-10, grün), sowie die RFP-Fluoreszenz (rot). (B) und (C) Zellen des Klons 13A-9, angefärbt sind das Hybrid (mAK 9-E-10, rot) und (B) Aktin (Alexa 488-Phalloidin, grün), sowie (C) Mitochondrien (mAK 70-100-1, grün). (OL) zeigt die jeweiligen Überlagerungsbilder. Bilder in A entstanden im CLSM, in B und C im FM. Bildbreiten in A: 23 μm ; in B: 25 μm und in C: ~ 50 μm .

Im starken Exprimierer 13A-9 zeigte das Hybridprotein ein abweichendes mikroskopisches Erscheinungsbild. Hier waren neben kleinen, Peroxisomen-ähnlichen auch viele weitaus größere Strukturen durch das Hybridprotein markiert. Mit einem Durchmesser von zum Teil mehr als drei μm entsprachen diese Strukturen bezüglich ihrer Größe eher Mitochondrien als Peroxisomen.

Zur Erklärung dieser Beobachtung kommen mindestens zwei Möglichkeiten in Betracht. Die erste mögliche Erklärung wäre, dass die peroxisomale Importmaschinerie durch den enormen Ansturm zu importierender Hybridproteine überlastet ist und in Folge dessen eine Fehllokalisierung der PTS1-tragenden Proteine in die Mitochondrien auftritt (Michael Schrader,

persönliche Mitteilung). Die zweite Möglichkeit könnte darin bestehen, dass diese Strukturen ebenfalls Peroxisomen darstellen, die jedoch, aufgrund der großen Menge importierten Hybridproteins, stark vergrößert vorliegen. Zur Überprüfung des Sachverhalts wurden die Zellen in einer weiteren Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen mitochondriales Porin gefärbt (Abb. 41 C). Die Begutachtung der angefärbten Zellen zeigte deutlich, dass es sich bei den durch das Hybridprotein markierten Organellen nicht um Mitochondrien handelt. Demnach ist auch im starken Expriemier 13A-9 von einer ausschließlich peroxisomalen Lokalisation des Myc-ABP34-PTS1 Hybrids auszugehen. Folglich verfügt das PTS1 über ein höheres Targeting-Potenzial als das ABP34-Protein.

4.3. Targeting von Cofilin in die peroxisomale Matrix

In diesem Versuchsansatz sollte das Targeting-Potenzial des PTS1 mit dem von Cofilin verglichen werden. Dafür wurde der Myc-Cofilin-Sequenz über PCR das PTS1 angehängt (Abb. 42 A). Das resultierende Plasmid Myc-Cof-PTS1 (#442) wurde in Wildtypzellen transformiert und Klone mit unterschiedlichen Expressionsniveaus des Hybrids mittels Westernblot-Analyse identifiziert (Abb. 42 B). Für die weitere Untersuchung wurden der schwache Expriemier B2 und der starke Expriemier B6 ausgewählt.

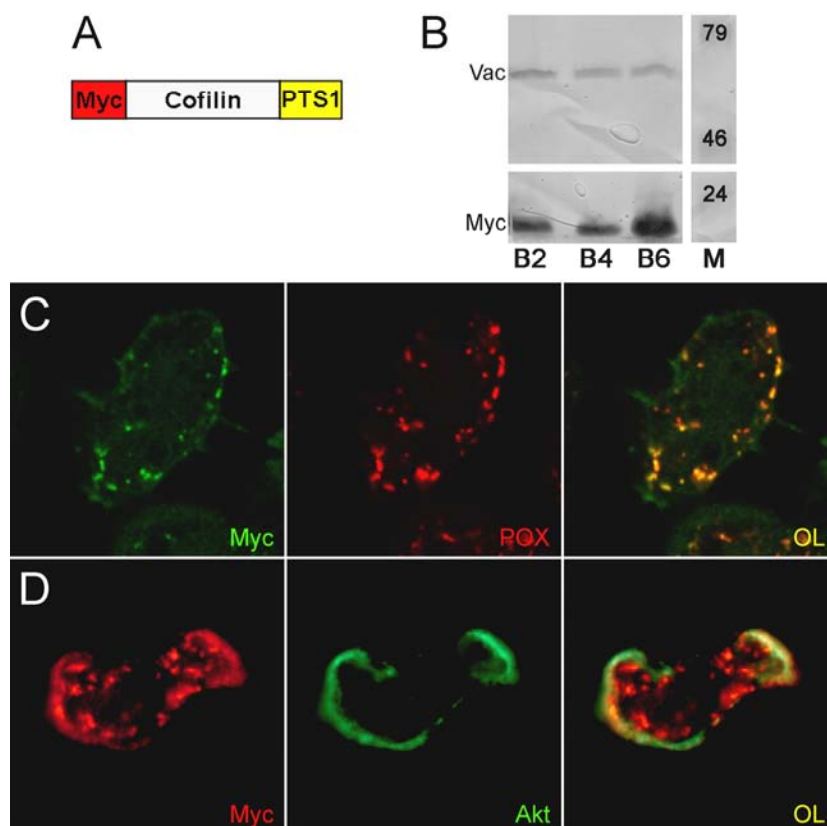


Abb. 42: Expression des Myc-Cof-PTS1-Hybrids. (A) Schematische Darstellung des Hybridproteins. (B) Westernblot-Analyse unterschiedlicher Myc-COF-PTS1 Klone mittels Antikörper gegen das Myc-Epitop (mAK 9-E-10), sowie gegen Vacuolin (mAK 263-79-2) als Ladekontrolle. In allen Klonen ist deutlich das Hybridprotein mit der erwarteten Größe von ca. 19 kDa nachweisbar. Zahlen geben das Molekulargewicht der angezeigten Markerbanden (M) an. (C) Lokalisation des Myc-Cof-PTS1 Hybrids (mAK 9-E-10, grün) und von RFP-PTS1 (rot) in Zellen des cotransformierten schwachen Expriemiers B2. (D) Lokalisation des Myc-Cof-PTS1 Hybrids (mAK 9-E-10, rot) und F-Aktin Alexa488-Phalloidin, grün) im starken Expriemier B6. OL zeigt die jeweiligen Überlagerungsbilder. Bilder in C entstanden im CLSM, in D im FM. Bildbreiten in C und D entsprechen 24 µm.

In der Immunfluoreszenz zeigte das Hybridprotein im schwachen Expriemier ein peroxisomales Lokalisationsmuster. Zur Überprüfung dieser Beobachtung wurden die Zellen

mit einem RFP-PTS1 Plasmid (#498) cotransformiert und die zelluläre Lokalisation beider exogener Proteine miteinander verglichen (Abb. 42 C). Die Begutachtung dieser Zellen erbrachte eine nahezu vollständige Colokalisation beider Proteine, womit die peroxisomale Identität bestätigt wurde. Aus diesen Ergebnissen war zu schließen, dass das PTS1 ein höheres Targeting-Potenzial aufweist als Cofilin.

Im starken Expressierer zeigte sich dagegen ein divergentes Lokalisationsmuster. Zwar waren auch hier peroxisomale Strukturen markiert, daneben war jedoch auch eine deutliche Anreicherung des Hybridproteins im Zellcortex zu verzeichnen (Abb. 42 D). Eine beträchtliche Vergrößerung der markierten Peroxisomen, wie sie in den starken Expressierern des Myc-ABP34-PTS1-Hybrids vorgefunden wurde, konnte hier nicht beobachtet werden. Demnach wird unter starken Expressionsbedingungen ein Teil des Hybrids durch die Affinität von Cofilin an das cortikale Aktin-Cytoskelett dirigiert.

4.3.1. Die Lokalisation von DAip1 in Myc-Cof-PTS1-Zellen

Cofilin und DAip1 können ihre zelluläre Lokalisation gegenseitig bedingen. In 2.1.1. konnte gezeigt werden, dass DAip1 der Lokalisation des an späte Endosomen dirigierten Cofilins folgt. Daher war es nun interessant zu überprüfen, ob in Myc-Cof-PTS1 exprimierenden Zellen ein ähnlicher Effekt auftritt und sich DAip1 hier der peroxisomalen Lokalisation von Cofilin anschließt. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Zellen mit einem Antikörper gegen DAip1 gegengefärbt (Abb. 43).

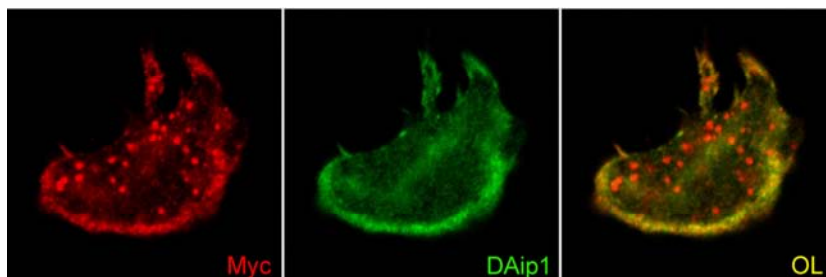


Abb. 43: Cofilin-DAip1-Colokalisationsstudie. Myc-Cof-PTS1 (mAK 9-E-10, rot) exprimierende Zellen wurden mit einem DAip1-Antikörper (246-153-2, grün) gegengefärbt. (OL) zeigt das Überlagerungsbild. Bilder entstanden im CLSM. Bildgröße entspricht 23 µm.

Die mikroskopische Betrachtung zeigte eine deutliche Colokalisation beider Proteine in corticalen Bereichen der Zelle. Eine Anreicherung von DAip1 in den durch das Myc-Cof-PTS1 Hybrid markierten Peroxisomen konnte dagegen nicht beobachtet werden.

4.4. Vacuolin-PTS1-Konstrukte

Da das Targeting-Potenzial des PTS1 sowohl das von ABP34, als auch das von Cofilin übertraf, sollte es in diesem Ansatz mit dem von Vacuolin verglichen werden. Dafür wurde der Sequenz von Vacuolin A am 3'-Ende eine GFP-PTS1-Sequenz angefügt. Das daraus resultierende Vac-GFP-PTS1-Konstrukt (Plasmid #495; Abb. 44 D) wurde mehrfach in

Wildtypzellen transformiert und daraus insgesamt drei unabhängige Klone isoliert. Die Westernblot-Analyse mittels Vacuolin-Antikörper zeigte, dass in allen Klonen etwa vergleichbare Mengen des Hybridproteins exprimiert wurden (Abb. 44 F). Die Banden des endogenen Vacuolins fielen jedoch in den Klonen #4 und #24 wesentlich schwächer aus als im Klon #19, so dass in diesen Klonen möglicherweise ein „knock-in“ des Vac-GFP-PTS1-Konstruktes in einen der drei endogenen Vacuolin-Gen-Loci stattgefunden hatte. Um die sich daraus möglicherweise ergebenden Einflüssen zu umgehen, wurde für die weitere Analyse lediglich der Klon #19, der eine mit dem Wildtyp vergleichbare Bandenstärke des endogenen Proteins aufwies (o. Abb.), verwendet. Dieser Klon zeigte eine sehr heterogene Expressionsstärke des exogenen Hybridproteins auf, so dass auch hier die Beobachtung von schwach und stark exprimierenden Zellen möglich war. Dabei wurde die jeweilige Expressionsstärke des Hybrids aus der Signalintensität der GFP-Fluoreszenz in den Zellen abgeleitet.

In offensichtlich schwach exprimierenden Zellen zeigte das Hybridprotein eine überwiegend endosomale Lokalisation, ohne deutlich erkennbare Markierung peroxisomaler Strukturen (Abb. 44 A). Zum Nachweis der endosomalen Identität wurden die Zellen einer zusätzlichen Aktin-Färbung unterzogen. Diese zeigte eine deutliche Aktin-Hülle an den durch das Hybrid markierten Strukturen, wodurch diese als späte Endosomen gekennzeichnet wurden.

In stärker exprimierenden Zellen war ein abweichendes Lokalisationsverhalten des Hybridproteins zu beobachten. Neben markierten endosomalen Strukturen wiesen diese Zellen zusätzliche Markierungen an der Plasmamembran, sowie in über das gesamte Cytoplasma verteilt auftretenden, punktförmigen Strukturen auf, was zunächst die zusätzliche Anreicherung des Hybrids in Peroxisomen vermuten ließ. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden die Zellen des Klons #19 mit dem RFP-PTS1-Konstrukt (#498) cotransformiert und die Lokalisation beider exogener Proteine miteinander verglichen (Abb. 44 B). Der Vergleich beider Markierungen zeigte überraschenderweise keinerlei Übereinstimmung. Demnach stellten die durch das Vac-GFP-PTS1-Hybrid markierten, punktförmigen Strukturen keine Peroxisomen dar. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Strukturen um cytoplasmatische Aggregate des Hybridproteins.

Um einen eventuellen negativen Einfluss dieser postulierten cytoplasmatischen Aggregation auf den Vergleich der Targeting-Potenziale ausschließen zu können, wurde ein Vacuolin-Myc-PTS1-Konstrukt (#525) erstellt (Abb. 44 E) und in Wildtypzellen transformiert. Die Expression des Hybrids wurde mittels Westernblot analysiert (o. Abb) und die Lokalisation in einer Immunfluoreszenz überprüft. Die Betrachtung dieser Zellen zeigte eine bevorzugte Anreicherung des Hybridproteins an endosomalen Strukturen. In offensichtlich stärker exprimierenden Zellen war überdies eine zusätzliche Markierung der Plasmamembran und des Cytoplasmas zu verzeichnen (Abb. 44 C). Die cytoplasmatische Färbung wirkte

überwiegend diffus, ließ aber vereinzelt auf schwache, punktförmige Markierungen schließen, die in ihrer Intensität aber wesentlich schwächer als die in den Vac-GFP-PTS1-Zellen war. Demnach überwiegt in beiden Hybridvarianten das Targeting-Potenzial von Vacuolin gegenüber dem des PTS1.

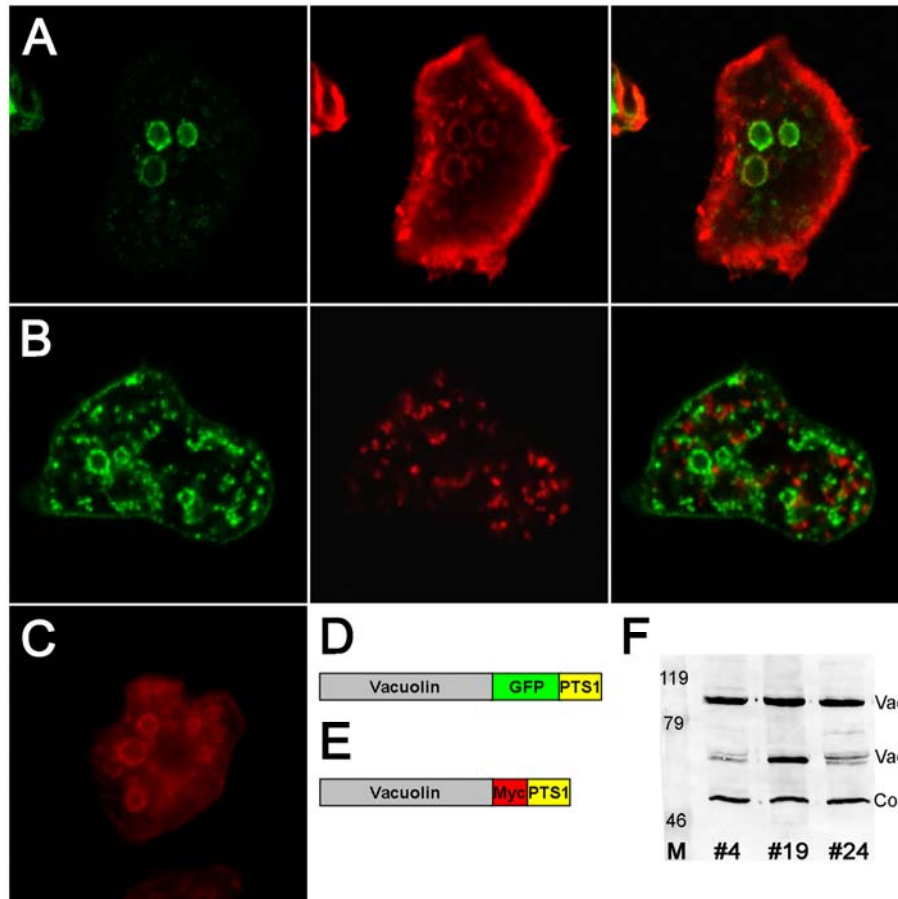


Abb. 44: Lokalisation unterschiedlicher PTS1 fusionierter Hybridprotein-Varianten. (A) Lokalisation des Vac-GFP-PTS1-Hybrids (grün) und von Aktin (mAK Act-1-11, rot) in einer schwach exprimierenden Zelle des Klons #19. (B) Lokalisation des Vac-GFP-PTS1-Hybrids (grün) und von RFP-PTS1 (rot) in einer stark exprimierenden, cotransformierten Zelle des Klons #19. (OL) zeigt die jeweiligen Überlagerungsbilder an. (C) Lokalisation des Vacuolin-Myc-PTS1-Hybrids (mAK 9-E-10, rot), gezeigt in einer repräsentativen Zellen des Klons Vac-Myc-PTS1 A2. Bilder in A und B entstanden im CLSM, in C im FM. Bildbreiten in A und B entsprechen 24 μm , in C 23 μm . (D) und (E) Schematische Darstellung der verwendeten Hybridproteine (nicht maßstabsgerecht). (F) Westernblot-Analyse der Vac-GFP-PTS1 Klone mittels Antikörpern gegen Vacuolin (mAK 263-79-2) und Coronin (mAK176-3D-6) als Ladekontrolle. Zahlen geben die Molekulargewichte der gezeigten Markerbanden (M) an.

5. Diskussion Teil II

Nachdem anhand der Lokalisationsstudien mit Vacuolin-Hybriden (Tab. 3) eine vorläufige Hierarchie der Targeting-Potenziale unterschiedlicher Aktin-interagierender Proteine erstellt wurde (Abb. 37), sollten nachfolgend die Affinitäten eines Nucleären-Lokalisations-Signals (SV40-NLS) und des klassischen Peroxisomalen-Targeting-Signals 1 (PTS1) in die erstellte Reihenfolge eingeordnet werden.

5.1. Grundannahmen des Hybridprotein-Ansatzes

Anders als in Studien mit isolierten Proteinen bietet der hier vorgenommene Ansatz die Möglichkeit, Targeting-Stärken unterschiedlicher Proteine und Signal-Sequenzen im cytoplasmatischen Umfeld miteinander zu vergleichen. Dies ist insofern interessant, da das Lokalisationsverhalten der meisten Proteine vermutlich durch mehr als nur die Interaktion mit einem einzigen Zielmolekül beeinflusst wird. Zutreffend ist dies sicherlich für das PTS1 und das NLS, die nach Bindung an ihre cytoplasmatischen Rezeptoren Pex5 bzw. Importin α an die jeweiligen Importmaschinerien weitergeleitet werden (s. 1.3.1. & 1.3.2.). Weiterhin wurde für Cofilin und DAip1 eine Interaktion beschrieben (s. 1.2.1.) und im ersten Teil der vorliegenden Arbeit weiter belegt (Abb. 12). Für Coronin wurde neben der Bindung an F-Aktin auch die Interaktion mit der ARPC2-Untereinheit des Arp2/3-Komplexes beschrieben (1.2.2.) und die F-Aktin-Bindung von ABP34 ist Ca^{2+} -sensitiv (s. 1.2.3.). Der Bindungspartner von Vacuolin an der endosomalen Membran ist derzeit noch unbekannt. Es ist aber wahrscheinlich, dass es sich hierbei eher um Lipide als um ein Protein handelt (s. 1.1.6.).

Der hier vorgenommene direkte Vergleich von Targeting-Potenzialen zweier in einem Hybrid fusionierten Proteine könnte durch unterschiedliche Umstände beeinträchtigt werden. Ein mögliches Problem stellen post-translationale Modifikationen, wie beispielsweise die Membranverankerung, an einem der beteiligten Proteine dar, in deren Folge kein repräsentativer Vergleich der Lokalisationsstärken mehr möglich wäre. Für die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Proteine scheint dies aber unwahrscheinlich. Viele der verwendeten Hybride zeigten unter entsprechenden Umständen eine Lokalisation an zwei unterschiedlichen Orten der Zelle. Daher ist eine durch post-translationale Modifikationen hervorgerufene, irreversible Festlegung an einer bestimmten Lokalisation auszuschließen.

Eine weitere Beeinträchtigung des direkten Vergleichs könnte durch die fehlerhafte Proteinfaltung eines oder beider der fusionierten Partner hervorgerufen werden. Diese Möglichkeit kann hier nicht gänzlich ausgeschlossen werden, erscheint aber aufgrund unterschiedlicher Voruntersuchungen ebenfalls sehr unwahrscheinlich. Für alle der eingesetzten Aktin-interagierenden Proteine wurden entweder bereits N-terminale Fusionen beschrieben (Fukui *et al.*, 1997; Aizawa *et al.*, 1997; Konzok *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2002),

oder aber im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt (Abb. 10 B; Abb. 18 B; Abb. 21). Dabei zeigten all diese Proteine eine mit dem jeweiligen endogenen Protein vergleichbare Lokalisation innerhalb der Zelle. Dies ließ sowohl in Bezug auf die Faltung, als auch auf die Lokalisation auf die Toleranz von Fusionen an den N-Termini der Proteine schließen. Überdies konnte für die an Vacuolin fusionierten Proteine Cofilin und DAip1 auch der Funktionserhalt nachgewiesen werden (Drengk *et al.*, 2003; Abb. 12). Auch für Vacuolin A wurden bereits C-terminale Fusionen als korrekt lokalisierend beschrieben (Drengk *et al.*, 2003; Maniak, persönliche Mitteilung). Ferner wiesen alle der in dieser Arbeit gezeigten Fusionsproteine mit Vacuolin unter entsprechenden Bedingungen eine endosomale Lokalisation auf, weshalb auch hier von der korrekten Faltung des Proteins ausgegangen werden kann.

In diesem Ansatz wurden unterschiedlichen Proteinen auch kürzere Targeting-Sequenzen für die Peroxisomen und den Zellkern angefügt. Aufgrund ihrer geringen Größe von nur wenigen Aminosäuren könnten diese möglicherweise vom angefügten Protein sterisch maskiert und somit für die entsprechenden Importfaktoren nicht zugänglich sein. Mit Ausnahme von Vacuolin (s.u.) lokalisierten jedoch all diese Proteine innerhalb der erwarteten Ziel-Kompartimente, so dass von einer freien Zugänglichkeit der Targeting-Sequenzen ausgegangen werden kann.

5.2. Einordnung des SV40-NLS

Die Fusion des SV40-NLS an Coronin bewirkte dessen Lokalisation im Zellkern (Abb. 38 A). Unter stärkeren Expressionsbedingungen zeigte das Myc-NLS-Cor-Hybrid neben der Kern-Lokalisation eine zusätzliche Anreicherung im Cortex (Abb. 38 B), die vermutlich eine direkte Folge der konkurrierenden Lokalisationsinformationen innerhalb des Hybrids darstellt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die nukleäre Importmaschinerie durch die große Anzahl zu importierender Hybride überlastet ist und infolge dessen die Lokalisation des Hybrids im Cortex begünstigt wird. Aufgrund der sehr hohen Transportkapazität der Kern-Import-Maschinerie (Ribbeck & Görlich, 2001) ist diese Möglichkeit aber eher unwahrscheinlich. Außerdem wäre in diesem Fall gleichfalls von einer Unterversorgung des Kerns mit möglicherweise essentiellen NLS-tragenden Proteinen auszugehen, in deren Folge vermutlich gravierende physiologische Defekte in den Zellen auftreten würden. Ein offensichtlich verändertes Wachstumsverhalten der betroffenen Zellen konnte aber nicht beobachtet werden.

Insgesamt sprechen diese Beobachtungen eindeutig dafür, dass das verwendete NLS ein höheres Targeting-Potenzial für den Kern aufweist als Coronin für das Cytoskelett. Da Coronin gemäß der in Tab. 3 ermittelten Reihenfolge das höchste Targeting-Potenzial

zukommt, ist davon auszugehen, dass auch die übrigen aufgelisteten Proteine der nucleären Affinität des NLS unterliegen.

5.3. Einordnung des PTS1

Das Anfügen der PTS1-Sequenz an ABP34 und Cofilin bewirkte den Import beider Proteine in die peroxisomale Matrix (Abb. 41; Abb. 42 C). Demnach überwog in beiden Hybriden das Targeting-Potenzial des PTS1 der jeweiligen Information für das Cytoskelett. In einem weiteren Versuch erfolgte daher der Vergleich mit dem in der Hierarchie (Abb. 37) als stärker eingestuften Vacuolin. Das dafür zunächst erstellte Vac-GFP-PTS1-Hybrid zeigte in offensichtlich schwach exprimierenden Zellen eine bevorzugte, nahezu exklusive endosomale Lokalisation (Abb. 44 A). Die in stärker exprimierenden Zellen zusätzlich beobachtete Markierung punktförmiger Strukturen wies überraschenderweise keine Colokalisation mit den durch RFP-PTS1 markierten Peroxisomen auf (Abb. 44 B). Da diese punktförmigen Markierungen morphologisch keinen der bekannten Zellorganellen entsprachen, in die eventuell eine Fehlsortierung hätte stattfinden können, handelt es sich hierbei vermutlich um cytoplasmatische Protein-Aggregate. Da auch in Vacuolin A-GFP exprimierenden Zellen zum Teil cytoplasmatische Aggregate beobachtet wurden, handelt es sich hierbei möglicherweise um einen unspezifischen Effekt (Rauchenberger et al., 1997). Dennoch ist davon auszugehen, dass das PTS1 zumindest in nicht aggregierten, endosomal lokalisierten Hybriden für die peroxisomale Importmaschinerie frei zugänglich sein sollte, da, gemäß seiner beobachtbaren Fluoreszenz, der GFP-Anteil des Fusionsproteins offensichtlich unbeeinträchtigt ist.

Eine weitere mögliche Erklärung für die beobachtete Aggregation des Hybrids liefert das so genannte „Preimplex“-Modell (Gould & Collins, 2002). In diesem wird die Ausbildung cytoplasmatischer Oligomere bestehend aus PTS1-tragenden Proteinen und dem peroxisomalen Import-Rezeptor Pex5 als normale Erscheinung während des peroxisomalen Importvorganges postuliert. Möglicherweise wird über die Oligomerisierung von Pex5 einerseits und von Vacuolin andererseits die Ausbildung von „Super-Aggregaten“ des Vac-GFP-PTS1-Hybrids bedingt. Zwar wurde für Peroxisomen der Import von Protein-Oligomeren (Glover et al., 1994; Nilsen et al., 2004) und sogar von bis zu 9 nm großen Goldpartikeln (Walton et al., 1995) beschrieben, die hier beobachtbaren Aggregate überschreiten diese Dimensionen aber möglicherweise und könnten sich daher dem peroxisomalen Import entziehen. Trotzdem sollte auch unter diesen Bedingungen ein geringer Anteil des Hybrids eine peroxisomale Lokalisation aufweisen, sofern das Targeting-Potenzial des PTS1 mit dem von Vacuolin konkurrieren kann.

Zur Überprüfung des Sachverhaltes wurde schließlich das Vac-Myc-PTS1-Hybrid erstellt. Die mikroskopische Begutachtung dieser Zellen erbrachte erneut eine bevorzugt endosomale

Lokalisation des Hybrids. In stärker exprimierenden Zellen lokalisierte das Hybrid zusätzlich an der Plasmamembran, sowie im Cytoplasma (Abb. 44 C). In der überwiegend diffusen cytoplasmatischen Färbung ließen sich zwar vereinzelt schwach markierte, punktförmige Strukturen erkennen, eine mit der in Vac-GFP-PTS1-Zellen vergleichbare Anreicherung konnte aber nicht beobachtet werden. Demnach stellten die in diesen Zellen beobachteten cytoplasmatischen Aggregate vermutlich nicht das Resultat einer durch das PTS1 und Pex5 vermittelten zusätzlichen Oligomerisierung dar. Anderenfalls wäre diese in vergleichbarem Umfang auch in Vac-Myc-PTS1 exprimierenden Zellen zu erwarten gewesen.

Da das Vac-Myc-PTS1-Hybrid offensichtlich nicht zur unspezifischen Aggregation neigt, könnten die hier beobachteten punktförmigen Markierungen ein Indiz für die schwache Anreicherung des Hybrids in Peroxisomen darstellen. Doch auch unter diesen Bedingungen wäre die endosomale Lokalisation in jedem Fall dominant. Daher verfügt Vacuolin offensichtlich über ein höheres Targeting-Potenzial als das PTS1, welches somit bezüglich seiner Stärke in der Hierarchie zwischen Vacuolin und den Aktin-interagierenden Proteinen Cofilin und ABP34 einzuordnen ist.

5.4. Unterschiede im peroxisomalen Import-Verhalten von ABP34 und Cofilin

Anhand der Hybridproteine mit Vacuolin ließen sich die Targeting-Potenziale von ABP34 und Cofilin nicht näher unterscheiden (Abb. 37). Auch die Begutachtung schwach exprimierender Zellen der jeweiligen Hybride mit PTS1 ließ keine offensichtlichen Unterschiede im Lokalisationsverhalten beider Proteine erkennen (Abb. 41 A; Abb. 42 C). Anders erwies sich die Situation dagegen in den jeweils starken Exprimierern der PTS1-Hybride. Hier zeigte das Myc-ABP34-PTS1-Protein auch unter starken Expressionsbedingungen eine exklusiv peroxisomale Lokalisation (Abb. 41 B). Da eine Fehllokalisation in Mitochondrien ausgeschlossen werden konnte (Abb. 41 C), stellt die in diesen Zellen beobachtete starke Vergrößerung der Peroxisomen vermutlich eine Folge der großen Anzahl importierter Hybridproteine dar. Aus dieser Beobachtung können mindestens zwei Rückschlüsse bezüglich des peroxisomalen Imports gezogen werden. Zum einen ist die peroxisomale Import-Kapazität offensichtlich hoch, so dass sie auch durch den Ansturm der zahlreichen Myc-ABP34-PTS1-Hybride nicht überlastet ist. Zum anderen stellt das peroxisomale Lumen offenbar keinen limitierenden Faktor im peroxisomalen Import-Prozess dar. Die hier gemachten Beobachtungen lassen im Gegenteil sogar auf eine durch die Anzahl importierter Proteine regulierte Organellengröße schließen. Vergleichbare Umstände müssen auch bei der Begutachtung der Situation in stark exprimierenden Myc-Cof-PTS1-Zellen vorausgesetzt werden (Abb. 42 D). Die hier beobachtete zusätzliche Anreicherung des Hybrids im Cortex stellt demnach nicht das Resultat der Auslastung der peroxisomalen Importmaschinerie oder

der Saturierung des peroxisomalen Lumens dar. Unter diesem Aspekt lassen die beobachteten Lokalisations-Unterschiede eindeutig auf ein höheres Targeting-Potenzial von Cofilin schließen.

Die Tatsache, dass DAip1 der peroxisomalen Lokalisation von Cofilin nicht folgt (Abb. 43), ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Interaktion beider Proteine nicht frei im Cytoplasma auftritt, sondern über die Ausbildung eines ternären Komplexes zusammen mit F-Aktin erfolgt (Rodal *et al.*, 1999). Hierbei besteht die Möglichkeit, dass beide Proteine ihre Affinität zum Cytoskelett gegenseitig beeinflussen und das Targeting-Potenzial somit durch den Interaktionspartner gesteigert wird. Obwohl keine genaueren Untersuchungen zur Einordnung von DAip1 in die Hierarchie-Liste unternommen wurden, erscheint es aufgrund der starken Interaktion mit an F-Aktin lokalisiertem Cofilin wahrscheinlich, dass die Ausbildung des ternären Komplexes stark begünstigt wird. Zusammen mit der Beobachtung, dass das Vac-Myc-DAip1-Hybrid auch in schwach exprimierenden Zellen eine tendenziell stärkere Affinität zum Cytoskelett aufwies als Vac-Myc-Cof, könnte diese Überlegung nahe legen, dass auch DAip1 über ein höheres Targeting-Potenzial verfügt als das ABP34 Protein. Letztendlich wäre zur genaueren Überprüfung dieses Sachverhaltes aber die Erstellung einer PTS1-gekoppelten Version des Proteins notwendig gewesen.

5.5. Vergleich der *in vivo* ermittelten Targeting-Potenzial-Hierarchie mit *in vitro*-Daten

Aus den oben diskutierten Beobachtungen ließ sich schließlich eine Hierarchie der untersuchten Targeting-Potenziale ableiten. Diese beginnt mit dem NLS, gefolgt von Coronin und der oligomerisierten PHB-Domäne von Vacuolin, im Anschluss daran das PTS1, welches das Interaktionspaar Cofilin/DAip1 dominiert und endet mit ABP34 (Abb. 45). In dieser Liste nicht berücksichtigt wurde das VASP-Protein, da aufgrund der in starken Exprimierern auftretenden Veränderungen (Aktin-Bälle) kein repräsentativer Vergleich mit der Situation in den übrigen Mutanten und dem Wildtyp gegeben war.

Mit Ausnahme von Vacuolin wurden mit Vertretern aller weiteren hier verwendeten Proteine und Targeting-Signal-Sequenzen bereits *in vitro*-Interaktionsstudien mit entsprechenden Zielproteinen durchgeführt. Dabei wurde für die Bindung des SV40-NLS an Importin α aus Säugern eine K_d von 9 nM ermittelt (Hodel *et al.*, 2006). Die Dissoziationskonstante von Physarum Coronin und F-Aktin wurde mit 40 nM bestimmt (Ishikawa *et al.*, 1995). Für die Interaktion des PTS1 mit humanem Pex5 wurde eine K_d von 200 nM beschrieben (Gatto *et al.*, 2003). DAip1 bindet mit einer K_d von 15 μ M an Kaninchen F-Aktin (Aizawa *et al.*, 1999). Für die gleiche Bindung wurden für Arabidopsis Cofilin und Dictyostelium ABP34 Werte im unteren mikromolaren Bereich ermittelt (Carlier *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 1999a).

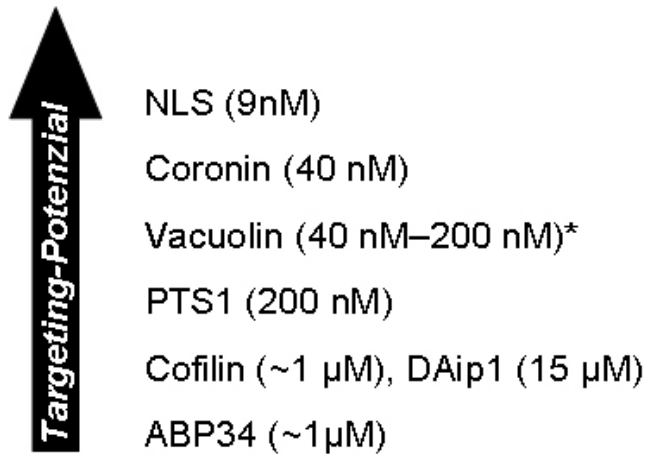


Abb. 45: Hierarchische Anordnung der ermittelten Targeting-Stärken. Die Angaben in Klammern entsprechen den in der Literatur angegebenen K_d -Werten der Proteine und Targeting-Signale (s.o.). Der mit * markierte Wert für Vacuolin wurde aus den benachbarten Werten für das NLS und Coronin abgeleitet.

Obwohl die *in vitro*-Bindungsstudien mit Proteinen aus unterschiedlichsten Organismen durchgeführt wurden, korrelieren die darin ermittelten Werte erstaunlich gut mit den in der vorliegenden Untersuchung *in vivo* ermittelten Daten für *Dictyostelium*. Diese Beobachtung lässt auf vergleichbare Targeting-Affinitäten innerhalb der Eukaryoten schließen. Einzig die hier festgelegte Reihenfolge von Cofilin, DAip1 und ABP34 hätte nicht eindeutig aus den *in vitro*-Daten abgeleitet werden können. Dazu ist allerdings zu erwähnen, dass die für diese Proteine in der Literatur angegebenen K_d -Werte lediglich Näherungen darstellen und dass die Stärke der kooperativen Bindung von Cofilin und DAip1 an F-Aktin die für die einzelnen Proteine ermittelten Affinitäten möglicherweise übersteigt (s.o.).

Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die zelluläre Lokalisation eines Proteins relativ sicher anhand der in ihm vorhandenen Bindungs-Affinitäten vorhergesagt werden kann. Die Übereinstimmung mit den aus *in vitro*-Untersuchungen stammenden Daten empfiehlt den hier vorgestellten *in vivo*-Ansatz außerdem für weitere Affinitäts- und Targeting-Studien. Durch die Kombination beider Datensätze war es auch ohne Kenntnis des Oligomerisierungsgrades und des Interaktionspartners erstmals möglich, die Bindungsstärke von Vacuolin an der endosomalen Membran auf einen definierten Bereich (*in Abb. 45) einzugrenzen.

6. Zusammenfassung

Der Endocytoseweg in *Dictyostelium* verläuft über definierte endosomale Reifestadien. Dabei werden die reifenden Endosomen im letzten Stadium durch eine Schicht aus filamentösem Aktin umhüllt. Über die biologische Funktion dieser Aktin-Hülle ist derzeit wenig bekannt.

Zum weiteren Erkenntnisgewinn sollten daher unterschiedliche Aktin-interagierende Proteine an die endosomale Aktin-Hülle dirigiert und die sich daraus ergebenden Folgen untersucht werden. Dabei wurde der in Drengk *et al.*, 2003 beschriebene Ansatz aufgegriffen, in dem Proteine durch die Fusion an Vacuolin an die späte endosomale Membran transportiert wurden.

Die endosomale Lokalisation von DAip1 bewirkte den vollständigen Verlust der endosomalen Aktin-Hülle, ohne dabei das restliche zelluläre Cytoskelett zu beeinträchtigen. Dabei wird die Depolymerisation vermutlich über die nachgewiesene Interaktion von DAip1 mit dem Aktin-depolymerisierenden Protein Cofilin bewirkt. Einhergehend damit trat eine Aggregation der betroffenen Kompartimente, eine Verzögerung des endocytotischen Transits, sowie eine verstärkte Retention lysosomaler Enzyme auf. Diese Ergebnisse ließen auf eine Funktion der endosomalen Aktin-Hülle als Fusionsinhibitor oder in der Regulation von Recycling-Prozessen an späten Endosomen schließen.

Die Verlängerung der endosomalen Verweilzeit des den Arp2/3-Komplex negativ regulierenden Proteins Coronin bewirkte dagegen keine offensichtlichen Veränderungen in den betroffenen Zellen. Diese Beobachtung könnte ein Indiz dafür sein, dass nach der Ausbildung der Aktin-Hülle keine weiteren essentiellen Arp2/3-abhängigen mehr an der endosomalen Membran auftreten.

Die endosomale Lokalisation des Aktin-Crosslinkers ABP34 induzierte ebenfalls keine Abweichungen vom Wildtyp-Verhalten. Hierbei besteht allerdings die Möglichkeit, dass die Aktivität des Proteins durch die bereits zuvor beschriebene Calcium-Sensitivität beeinträchtigt vorliegt.

Eine Verstärkung der endosomalen Hülle konnte trotz der Verwendung unterschiedlicher Ansätze nicht hervorgerufen werden. Offensichtlich wirkt die zusätzliche Expression zentraler Regulatoren der Aktin-Polymerisation in der Zelle cytotoxisch.

Die Bindung von VASP an die endosomale Membran bewirkte in den Zellen die Ausbildung voluminöser, cytoplasmatischer „Aktin-Bälle“. Diese riefen in den betroffenen Zellen Defekte in unterschiedlichen Aktin-abhängigen Prozessen, wie der Phago- und Pinocytose, sowie der Cytokinese hervor. Dabei gehen die beobachteten Veränderungen vermutlich auf die nachgewiesene Störung im Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin zurück. Obwohl die Aktin-Bälle an der endosomalen Membran entstehen, weisen sie nach vollendeter Entstehung keine inneren oder äußeren Membranen mehr auf und nehmen nicht mehr aktiv am endocytotischen Geschehen teil. Die nähere Charakterisierung offenbarte große

Ähnlichkeit zu den mit unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen assoziierten Hirano-Bodies.

Über das beobachtbare Lokalisationsverhalten der unterschiedlichen im ersten Teil der Arbeit eingesetzten Vacuolin-Hybridproteine ließ sich die Stärke der Lokalisationsinformationen der fusionierten Aktin-interagierenden Proteine miteinander vergleichen. Dies wurde verwendet, um die einzelnen Proteine gemäß ihres Targeting-Potenzials hierarchisch anzuordnen. Im zweiten Teil der Arbeit wurden dieser Hierarchie die beiden cytoplasmatischen Targeting-Signale für Peroxisomen (PTS1) und den Zellkern (SV40-NLS) hinzugefügt.

Der vorgenommene Vergleich dieser *in vivo* gewonnenen Daten aus Dictyostelium mit unterschiedlichen *in vitro*-Bindungsstudien mit homologen Proteinen anderer Organismen zeigte eine erstaunlich gute Übereinstimmung. Diese Beobachtung lässt auf vergleichbare Targeting-Affinitäten innerhalb der Eukaryoten schließen und belegt, dass die zelluläre Lokalisation eines Proteins relativ sicher anhand der in ihm vorhandenen Bindungs-Affinitäten vorhergesagt werden kann. Durch die Kombination der *in vivo*- und *in vitro*-Daten war es auch ohne Kenntnis des Oligomerisierungsgrades und des Interaktionspartners erstmals möglich, die Bindungsstärke von Vacuolin an der endosomalen Membran auf einen definierten Bereich einzugrenzen.

7. Material

7.1. Geräte

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Binokular	Zeiss, Göttingen
Blot-Kammern	Werkstatt, MPI Martinsried
Cell Cracker	EMBL, Heidelberg
Coulter Counter	Beckmann Coulter, Krefeld
Elektrophorese-Kammern	Biometra, Göttingen
Fluorimeter SFM 25	Katron-Instruments, Eichingen
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-70°C)	Heraeus, Osterode
GelDoc II	Biometra, Göttingen
Gelkammern	Glastech. Werkstatt, UniKassel
GenePulser®	Bio-Rad, Kanada
Glaswaren	Schott, Mainz
Glaspipetten	Brand, Wertheim/Main
Hamiltonspritze	Hamilton, Schweiz
Heizblock	Werkstatt, MPI Martinsried
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Kühlschränke (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Küvetten (Quarz)	Hellma, Müllheim
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA, Staufen im Breisgau
Mikroskope	
-Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen
-Fluoreszenzmikroskop (invers), DM IRB mit DFC480 Digital-Kamera	Leica, Bensheim
-CLSM, TCS SP2	Leica, Bensheim
-TEM, EM 109	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	Daewoo, Korea
Multipette®	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main
PCR-Thermocycler	
-PCR-Express	Hybaid, Heidelberg
-TGradient	Biometra, Göttingen
pH-Meter 523	WTW
Pipettierhilfen	

-Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald
-Accu Jet	Brand, Wertheim/Main
Pipetten (2 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl)	Gilson, Frankreich
Photometer Ultrospec 3000pro	Amersham Pharmacia, Freiburg
Powersupplies, diverse	Amersham Pharmacia, Freiburg
	Biometra, Göttingen
Werkstatt, MPI Martinsried	
Schüttelinkubatoren Lab Shaker	Adolf Kühner AG, Schweiz
Schwenkplatte	Biometra, Göttingen
Speed Vac Concentrator	Eppendorf, Hamburg
Sterile Werkbänke	Holten, Dänemark
Thermo-Mixer	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie	Bender & Hohbein AG, Schweiz
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	B. Braun, Melsungen
Zentrifugen	
-Biofuge pico	Heraeus, Osterode
-Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
-Biofuge Stratos	Heraeus, Osterode
-Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
-MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
-Rotanta/R	Hettich, Tuttlingen
-Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen

7.2. Verbrauchsmaterialien

Costar-Platten (24-Loch)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen (50 mm x 50 mm)	Assistent
1,5 ml und 2 ml Plastikkuvetten	Greiner Labortechnik
Einmalhandschuhe	
-Nitril	Ansell, Belgien
-Latex	Servoprax GmbH, Wesel
Einwegtücher	Kimberly-Clark, England
Einwegspritzen	B. Braun, Melsungen
Elektroporationskuvetten	PeqLab, Erlangen
Falconröhrchen (15 ml; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier 3MM	Whatman, Göttingen
Kanülen	B. Braun AG, Melsungen

Parafilm M	American National Can, USA
Petrischalen (Ø 10 cm; Ø 5 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Gilson, Frankreich
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5ml, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (0,45µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	Bayha GmbH, Tuttlingen
Transfermembran PROTRAN	Schleicher & Schuell, Dassel

7.3. Reagenzien

Die aufgeführten Chemikalien haben, soweit nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad p.a..

Agarose Standard	Amersham Pharmacia, Freiburg
APS	Roth, Karlsruhe
Bacto–Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
BCIP	Roth, Karlsruhe
Benzamidin	Fluka, Buchs
Blasticidin S	ICN, Eschwege
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Brillant-Blau R 250	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Cytochalasin A	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
Dithiotreit (DTT)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fischgelantine	Amersham Life Science, Freiburg
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Gelvatol Typ II	Sigma, Deisenhofen
Geneticin (G418) [100 mg/ml]	ICN, Eschwege
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glutardialdehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe

Hefeextrakt	Oxoid, England
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (KAc)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Latrunculin B	Sigma, Deisenhofen
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (blotting grade)	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (NaCO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
N-Laurylsarcosin	USB, USA
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxidplättchen (NaOH)	Roth, Karlsruhe
NBT	Roth, Karlsruhe
NP-40	Roth, Karlsruhe
PNPP (p-Nitrophenylphosphat)	Roth, Karlsruhe
PNPαM (p-Nitrophenyl-α- D-mannopyranosid)	Sigma, Deisenhofen
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG) 8000	Fluka, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin [10.000 U/ml]	Gibco BRL, Eggenstein
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PCIA	Roth, Karlsruhe
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
PIPIES	Roth, Karlsruhe
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt
Proteose-Pepton	Oxoid, England
Rotiphorese® Gel 30 (30 %ige Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung)	Roth, Karlsruhe

Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Krefeld
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Tween® 20	Roth, Karlsruhe

7.4. Puffer und Lösungen

Alle hier genannten Puffer und Lösungen wurden mit sterilem bidest. H₂O angesetzt.

Puffer 6.6.2	6 mM	Tris-HCl; pH, 7,4
	6 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	pH auf 7,2 einstellen	
Blocking-Lösung	5 % [w/v]	Milchpulver
	in 1 x PBS lösen, optional eine Spatelspitze NaN ₃ zugeben	
Carbonatpuffer (pH 10,5) (BCIP Substratpuffer)	100mM	Na ₂ CO ₃
Coomassie-Färbelösung	45 % [v/v]	Ethanol
	10 % [w/v]	Essigsäure
	0,5 % [w/v]	Brillant Blau R-250
Coomassie-Entfärbelösung	10 % [v/v]	Methanol
	15 % [v/v]	Essigsäure
DNA-Auftragspuffer	5 x DNA BlueRun™ der Firma Hybaid	

EP-Puffer	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	50 mM	Saccharose
	mit konz. HCl auf pH 6,1 einstellen und sterilfiltrieren	
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/10 ml H ₂ O	
2 x HBS	4,0 g	NaCl
	0,18 g	KCl
	0,05 g	NaH ₂ PO ₄
	2,5 g	HEPES
	0,5 g	Glucose
	H ₂ O ad 250 ml, mit NaOH auf pH 7,05 einstellen, sterilfiltrieren, auf -20 °C lagern	
Kernlysepuffer	0,05 M	HEPES
	0,04 M	MgCl ₂
	0,2 M	KCl
	5 % [w/v]	Sucrose
	14 mM	β-Mercaptoethanol
Lösung I (für Plasmidpräparation)	25 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	10 mM	EDTA
	15 %	Saccharose
Lösung II (für Plasmidpräparation)	200 mM	NaOH
	1 mM	SDS
Lösung III (für Plasmidpräparation) (pH 4,6)	3 M	NaAc
Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0) (Malchow <i>et al.</i> , 1972)	2 mM	Na ₂ HPO ₄
	15 mM	KH ₂ PO ₄

PBG	wie 1xPBS mit Zugabe von: 0,5 % [w/v] BSA 0,045 % [w/v] Fischgelatine	
10 x PBS-Puffer (pH 7,4)	160,1 g NaCl 15,3 g Na ₂ HPO ₄ (2xH ₂ O) 4,02 g KCl 3,82 g KH ₂ PO ₄ H ₂ O ad 1 l	
PBS/Glycin	100 mM Glycin in 1 x PBS lösen	
10 x Protein-Laufpuffer	0,25 M Tris 1,9 M Glycin 1 % [w/v] SDS	
10 x SDS-Probenpuffer (pH 6,8) (Lämmli, 1970)	0.2 M Tris-HCl 6,7 % SDS 28,9 % [v/v] Glycerin 16,7 % [v/v] β-Mercaptoethanol 10 mg/100 ml Bromphenolblau	
SDS-Sammelgepuffer (pH 6,8) (4xTris-HCl/SDS-Puffer)	0,5 M Tris 14 mM SDS	
SDS-Trenngel-Puffer (pH 8,8) (4xTris-HCl/SDS)	1,5 M Tris 14 mM SDS	
Semidry-Transferpuffer (pH 8,2 - 8,4)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,04 % [w/v] SDS 20 % [v/v] Methanol	

10 x TBE-Puffer	1 M	Tris-HCl, pH 8,3
	0,83 M	Borsäure
	10 mM	EDTA
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
	0,045 % [w/v]	Fischgelatine
TfB I-Puffer	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl ₂
	10 mM	CaCl ₂
	30 mM	Kaliumacetat
	15% [v/v]	Glycerin
	pH mit 0,2 M Essigsäure auf 5,8 einstellen, sterilfiltrieren	
TfB II-Puffer	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂
	15 % [v/v]	Glycerin
	pH mit NaOH auf 7,0 einstellen, sterilfiltrieren	
2xTriton-Stammlösung	2 % [v/v]	Triton X-100
	20 mM	KCl
	20 mM	Imidazol
	20 mM	EGTA
	4 mM	NaN ₃
	auf pH 7,0 einstellen	
Trypanblau-Lösung	0,087 g	NaCl
	0,058 g	Citrat
	0,02 g	Trypanblau
	H ₂ O ad 10 ml ; pH 4,4	
	durch Faltenfilter filtrieren, dann sterilfiltrieren	

7.5. Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Medien mit deionisiertem H₂O angesetzt und bei 120°C autoklaviert; nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden gegebenenfalls Antibiotika hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte bei 6°C.

7.5.1. *Escherichia coli*-Medien

LB-Medium (pH 7,0)	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	H ₂ O ad 1 l	
LB_{Amp}-Medium	wie LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin	
LB-Agar	wie LB-Medium +15 g Bacto-Agar / 1 l	
LB_{Amp}-Agar	wie LB-Agar + 50 µg/ml Ampicillin	
M9-Medium (Minimalmedium)	850 ml	H ₂ O
	100 ml	10 x M9-Salze (s. u.)
	2 ml	1 M MgSO ₄
	10 ml	20 % [w/v] Glucose
	0,1 ml	1 M CaCl ₂
	1 ml	1 % [w/v] Thiamin
	H ₂ O ad 1 l. Alle Lösungen mit Ausnahmen von Glucose und Thiamin (stattdessen sterilfiltriert) zuvor autoklaviert.	
10 x M9-Salze (pH 7,4)	60 g	Na ₂ HPO ₄
	30 g	KH ₂ PO ₄
	5 g	NaCl
	10 g	NH ₄ Cl
	H ₂ O ad 1 l, autoklavieren	

7.5.2. *Dictyostelium discoideum*-Medien

HL-5 Medium (pH 6,7) (Watts and Ashworth, 1970)	2,5 g	Bacto-Trypton
	2,5 g	Pepton aus Casein
	5,0 g	Proteose-Pepton
	5,0 g	Hefeextrakt
	10,0 g	Glucose
	1,2 g	KH ₂ PO ₄
	0,35 g	Na ₂ HPO ₄ (x 2H ₂ O)
	H ₂ O ad 1 l	
G₀-Medium	wie AX-Medium + Penicillin/Streptomycin, auf eine Endkonzentration von [100 U/ml].	
G₁₀-Medium	wie G ₀ -Medium + Genitacin (G418), auf eine Endkonzentration von [10 µg/ml].	
G₂₀-Medium	wie G ₀ -Medium + Genitacin (G418), auf eine Endkonzentration von [20 µg/ml].	
B₁₀-Medium	wie G ₀ -Medium + Blasticidin S, auf eine Endkonzentration von [10 µg/ml].	
G₁₀/B₁₀-Medium	wie G ₁₀ -Medium + Blasticidin S, auf eine Endkonzentration von [10 µg/ml].	
KA-Platten	mit <i>Klebsiella aerogenes</i> bewachsene SM- Platte Die Platten werden nach ausplattieren von KA- Suspension auf 30°C inkubiert.	

SM-Agarplatten (pH 6,5) (Singleton <i>et al.</i> , 1987)	15 g	Bacto-Agar
	10 g	Pepton
	10 g	Glucose
	1 g	Hefeextrakt
	1 g	MgSO ₄ (x 7 H ₂ O)
	2,2 g	KH ₂ PO ₄
	1 g	K ₂ HPO ₄
	H ₂ O ad 1 l	

pro Platte werden 20 ml benötigt

Phosphat-Agarplatten (pH 6,0) 15 g Bacto-Agar mit Soerensen-Phosphatpuffer auf 1 l auffüllen.

MES-HL5 Medium (pH 7,2)	5,0 g	Hefeextrakt
	10,0 g	Glucose
	10,0 g	Proteose-Pepton
	1,32 g	MOPS
	H ₂ O ad 1 l	

7.6. Enzyme und Kits

Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
CIP (Calf Intestinal Phosphatase)	NEB, Schwalbach/Taunus
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-Polymerase (proof reading)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion™-High-Fidelity PCR-Kit	Finnzymes, über NEB
Proteinase K	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Roth, Karlsruhe
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA Ligase	Hybaid, Freiburg oder MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T7-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Hybaid, Freiburg MBI Fermentas, St. Leon-Rot
ABI-Prism DNA Sequencing Kit	Abteilung Genetik, UniKassel Perkin Elmer, Großbritannien

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford USA
PCR Aufreinigungs-Kit Charge Switch	Invitrogen, Karlsruhe
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hamburg
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hamburg
QIAGEN Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen, Hamburg

7.7. Längen- und Größenstandards

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNA Ladder High Range	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

7.8. Plasmide

#168 pDBsr-GFP-Actin: aus Plasmid-Stock, Abt. Zellbiologie, UniKassel

#376 VAM-Cor: Volllänge-Coronin wurde über PCR mit den Primern #75 und #76 von einem Coronin-GFP-Plasmid #17 (pCor-GFP; Gerisch *et al.*, 1995) amplifiziert, Xba I und Xho I verdaut und über dieselben Schnittstellen in Plasmid #330 (pIC-Myc-Cof, Drengk *et al.*, 2003) einkloniert, wodurch die Cofilin-Sequenz dieses Plasmids ersetzt wurde und Plasmid #357 (pIC-Myc-Cor) generiert wurde. Aus diesem wurde die Coronin-Sequenz erneut über Xba I und Xho I ausgeschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor #331 (pVMC, Drengk *et al.*, 2003) einkloniert.

#374 VAM-ABP30: Die genomische ABP34-Sequenz wurde über PCR mit den Primern #87 und #88 von genomischer Ax-2-DNA amplifiziert, Xba I und Hin dIII geschnitten und in Plasmid #330 (pIC-Myc-Cof, Drengk *et al.*, 2003) einkloniert, wodurch hier die Cofilin-Sequenz ersetzt wurde und Plasmid #373 (pIC-Myc-ABP30) generiert wurde. Daraus wurde die ABP34-Sequenz mittels Xba I und Xho I ausgeschnitten und über dieselben Schnittstellen in Plasmid #331 (pVMC, Drengk *et al.*, 2003) eingefügt, wodurch Plasmid #374 (pVAM-ABP30) erstellt wurde.

#377 VAM-DAip1: Die DAip1-Sequenz wurde über PCR mittels der Primer #93 und #94 von Plasmid #343 (pDEX-GFP-DAip1, Konzok *et al.*, 1999) amplifiziert, mit Xba I und Xho I verdaut und in den ebenfalls Xba I und Xho I geschnittenen Vektor #331 (pVMC, Drengk *et*

al., 2003) einkloniert. Dadurch wurden Cofilin und das nicht translatierte 3'-GFP ersetzt und es resultierte Plasmid #377 (VAM-DAip1).

#404 GFP-TAPP2-PH: bezogen über C. J. Weijer (Dormann *et al.*, 2004)

#416 VAM-Scar: Die genomischer Scar-Sequenz wurde über PCR mit den Primern #143 und #144 von genomischer Ax-2-DNA (zur Verfügung gestellt von B. Borisova-Todorova) amplifiziert und über TA-Klonierung in Plasmid pGEM-Teasy (Promega, Mannheim) eingefügt, wodurch Plasmid #423 (Teasy-Scar) erzeugt wurde. Aus diesem wurde die Scar-Sequenz über Xba I und Xho I ausgeschnitten und in das ebenso geschnittenen Plasmid #331 (pVMC, Dreng *et al.*, 2003) einkloniert, wodurch Plasmid #416 (VAM Scar (fl)) erzeugt wurde.

#417 VAM-FH: Die FH1-FH2-Domänen umfassende Sequenz von *Saccharomyces Bni1p* wurde über PCR mit den Primern #140 und #139 aus genomischer *Saccharomyces* DNA amplifiziert, mit Spe I und Xho I geschnitten und in das mit Xba I und Xho I geschnittene Plasmid #331 (pVMC, Drengk *et al.*, 2003) eingefügt, woraus Plasmid #417 (VAM-FH) resultierte.

#424 MB35: von M. Blaauw (Blaauw *et al.*, 2000), bezogen über M. Kaller, Abt. Genetik UniKassel

#425 MB38: von M. Blaauw (Blaauw *et al.*, 2000), bezogen über M. Kaller, Abt. Genetik UniKassel

#442 Myc-Cof-PTS1: Die Cofilin-Sequenz wurde durch PCR mit den Primern #137 und #138 von Plasmid #331 (Drengk *et al.*, 2003) amplifiziert, wodurch ihr die PTS1-Sequenz angefügt wurde. Das PCR Produkt wurde nachfolgend Sal I und Sac I geschnitten und in das ebenso geschnittene Plasmid #340 (pMC, Drengk *et al.*, 2003) eingefügt, wodurch darin die Cofilin-Sequenz durch die Cofilin-PTS1-Sequenz ausgetauscht wurde, woraus Plasmid #442 (Myc-Cof-PTS1) hervorging.

#492 pB15-Myc-DAip1Δ: Die DAip1-Sequenz wurde durch Bam HI und Xho I Verdau aus Plasmid #377 ausgeschnitten und in den gleichfalls mit Bam HI und Xho I geschnittenen Vektor #151 (pB15 bzw. pDXA3C; Manstein *et al.*, 1995) einkloniert. Das daraus resultierende Plasmid #421 (pB15-Myc-DAip1) wurde zur Eliminierung einer für spätere

Klonierungen hinderlichen zweiten Xba I Schnittstelle 3' vom Polylinker partiell mit Xba I verdaut, geblunted und religiert, woraus Plasmid #492 (pB15-Myc-DAip1Δ) resultierte.

#495 Vac-GFP-PTS1: Durch PCR an Plasmid #68 (pDNeoGFP, Fukui *et al.*, 1997) mit den Primern #37 und #38 wurde der GFP-Sequenz die PTS1-Sequenz angefügt und über TA-Klonierung in den pGEMTeasy-Vektor (Promega, Mannheim) eingefügt, wodurch das Plasmid #494 (pGEM-GFP-PTS1) erzeugt wurde. Die GFP-PTS1-Sequenz wurde über Spe I und Sal I ausgeschnitten und in das mit Xba I und Sal I geschnitten Plasmid #331 (pVMC, Drengk *et al.*, 2003) eingefügt, woraus Plasmid #495 (Vac-Myc-GFP-PTS1) erzeugt wurde.

#497 pB15-Myc-ABP34-PTS1: Zur Generierung eines PTS1-Anhangs wurde die ABP34-Sequenz mit den Primern #87 und #208 von Plasmid #373 (pIC-Myc-ABP30) amplifiziert, wodurch der Sequenz die Tripeptid SKL-Sequenz und ein STOP-Codon angefügt wurden. Das PCR-Produkt wurde Xba I und Xho I geschnitten und in das ebenso geschnittene Plasmid #492 (pB15-Myc-DAip1Δ) inkloniert, wodurch die DAip1-Sequenz darin durch die ABP34-PTS1-Sequenz ersetzt wurde und Plasmid #497 (pB15 Myc-ABP30-PTS1) hervorging.

#498 RFP-PTS1: Die mRFP-Sequenz wurde über PCR mit den Primern #211 und #212 von Plasmid #395 (mRFPmars, bezogen über A. Müller-Taubenberger; Fischer *et al.*, 2004) amplifiziert, wodurch am 3'-Ende die PTS1-Sequenz angefügt wurde. Das PCR-Produkt wurde mit Hin dIII und Eco RI geschnitten und in das ebenso geschnittene Plasmid #395 eingefügt, wodurch die mRFP-Sequenz durch die mRFP-PTS1-Sequenz ausgetauscht wurde und Plasmid #498 (mRFP-PTS1) generiert wurde.

#500 Myc-NLS-Cor: Zur Generierung dieses Plasmids wurden die Oligonukleotide #209 und #210 aneinandergelagert, wodurch ein doppelsträngiger Bereich, der das SV40NLS (PKKKRKV) codierte, eine interne Xba I-Schnittstelle und 5' -CTGA und -TGCA-Überhänge aufwies, erzeugt. Dieser wurde in das mit Xba I und Xho I geschnittene Plasmid #492 (pB15-Myc-DAip1Δ) einligiert, wodurch die DAip1-Sequenz durch die NLS-Sequenz ersetzt wurde und Plasmid #499 (pB15-Myc-NLS) entstand. Die Coronin-Sequenz wurde aus Plasmid #357 (pIC-Myc-Cor) über Xba I und Xho I ausgeschnitten und in das ebenso geschnittenen Plasmid #499 einligiert, woraus Plasmid #500 (pB15-Myc-NLS-Cor) hervorging.

#515 MB38-VAM-Scar: Die gesamte Vac-Myc-Scar-Sequenz wurde über PCR mit den Primern #16 und #143 von Plasmid #416 (VAM-Scar) amplifiziert und in einer Blunt-Ligation

in das mit mit Bgl II aufgeschnittene und anschließend gebluntete Plasmid MB38 inkliniert, woraus Plasmid #515 (MB38-VAM-Scar) resultierte.

#516 pB15-Myc-ABP34: Die ABP34-Sequenz wurde über Xba I und Xho I aus Plasmid #373 (pIC-Myc-ABP30) ausgeschnitten und in das ebenso geschnittene Plasmid #492 (pB15-Myc-DAip1 Δ) inkliniert, wodurch die DAip1-Sequenz durch ABP34 ersetzt wurde und Plasmid #516 (pB15-Myc-ABP34) resultierte.

#527 TAPP-Myc-VASP: Der die zweite PH-Domäne von TAPP2 umfassende Sequenzbereich wurde über PCR mit den Primern #206 und #207 von Plasmid #404 (GFP-TAPP2-PH-domain) amplifiziert und über TA-Klonierung in pGEM-Teasy (Promega, Mannheim) inkliniert, woraus Plasmid #517 (pGEM-TAPP) resultierte. Daraus wurde die TAPP2-PH-Sequenz über Bam HI und Bgl II ausgeschnitten und in das ebenso geschnittene Plasmid #331 (pVMC, Drengk *et al.*, 2003) inkliniert, wodurch hier die Vacuolin A-Sequenz durch die TAPP2-PH-Sequenz ersetzt wurde und Plasmid #527 (pTAPP-Myc-VASP) resultierte.

#519 VAM-VASP: Die VASP-Sequenz wurde aus dem #520 (GFP-VASP-Plasmid; zur Verfügung gestellt von Hans Faix; Schirenbeck *et al.*, 2006) mit den Primern #171 und #172 amplifiziert und über TA-Klonierung in Plasmid pGEM-Teasy (Promega, Mannheim) inkliniert, woraus Plasmid #521 (pGEM-VASP) resultierte. Aus diesem wurde die VASP-Sequenz über Xba I und Xho I ausgeschnitten und in das ebenso geschnittene Plasmid #331 (pVMC, Drengk *et al.*, 2003) inkliniert, woraus Plasmid #519 (VAM-VASP) resultierte.

#520 GFP-VASP: bezogen über H. Faix (Schirenbeck *et al.*, 2006)

#522 VAM-ForFH2: Die FH2-Domänen-Sequenz von Formin F wurde über PCR von Plasmid #523 (VAM-ForFH1+2 #19) mit den Primern #164 und #165 amplifiziert, mit mit Xba I und Xho I geschnitten und in das ebenso geschnittene Plasmid #331 (pVMC, Drengk *et al.*, 2003) eingefügt, woraus Plasmid #522 (VAM-ForFH2) resultierte.

#523 VAM-ForFH1+2: Die FH1-FH2-Domänen umfassende Sequenz von Dictyostelium Formin F wurde über PCR aus genomischer Ax-2 DNA (zur Verfügung gestellt von B. Borisova-Todorova) mit den Primern #163 und #165 amplifiziert, mit Xba I und Xho I geschnitten und in das ebenso geschnittene Plasmid #331 (pVMC, Drengk *et al.*, 2003) eingefügt, woraus Plasmid #523 (VAM-ForF1+2) resultierte.

#524 RFP-Cor: Diese Klonierung wurde von Susan Claußner im Rahmen eines von mir betreuten Praktikums durchgeführt. Die Myc-Coronin-Sequenz wurde über Bam HI und Bgl II aus Plasmid #357 (pIC-Myc-Cor) ausgeschnitten und in das mit Bam HI aufgeschnitene Plasmid #395 (mRFPmars; Fischer *et al.*, 2004) hinter die RFP-Sequenz eingefügt, woraus Plasmid #524 (RFP-Coronin) resultierte.

#525 Vac-Myc-PTS1: Die Vacuolin A-Myc-Sequenz wurde von Plasmid #331 (pVMC, Drengk *et al.*, 2003) mit den Primern #16 und #213 amplifiziert, mit Bgl II und Xho I geschnitten und in das ebenso geschnittene Plasmid #331 (pVMC, Drengk *et al.*, 2003) einkloniert, wodurch hier die Vacuolin A-Myc-Cofilin-Sequenz durch Vacuolin A-Myc-PTS1 ersetzt wurde und Plasmid #525 (Vac-Myc-PTS1) resultierte.

7.9. Oligonukleotide

#16 VacA-5':	5'-TGAAGATCTAAAATGATTGAAGGTAGTGGTAGTAAACTCCAAAGAG-3'
#37 GFP5ATG:	5'-GCGGCATGCCCATGAGTAAAGGAGAAG-3'
#38 GFP3PTS:	5'-GCGTCGACTTATAATTTTGAACCACCTTTGTATAGTTTCATCCATGCC-3'
#75 COR-5':	5'-CGATCTAGAAAAATGTCTAAAGTAGTCCGTAGTAG-3'
#76 COR3':	5'-GACTCGAGTTAGTTGGTGAGTTCTTTGAT-3'
#87 ABP30-5':	5'-CCTTCTAGAATGGCAGAAACAAAAGTTGCACC-3'
#88 ABP30-3':	5'-CCTCAAGCTTATTTCTTTTGTGGACCGTATCTC-3'
#93 DAip1-5':	5'-CGTGTCTAGAAAAATGTCTGTAACCTTTAAAAAATATT-3'
#94 DAip1-3':	5'-GGTACTCGAGTTAATTTGATACATACCAAATTTTAATAG-3'
#137 Cof-SKL-5':	5'-CCTTGTGACAAAATGTCTTCAGGTATTGCTTTAGC-3'
#138 Cof-SKL-3':	5'-CTGAGCTCTTATAATTTTGTAGATTTTGGTACATTTTTTCATAGAAACATGAATC -3'
#139 Bni1p-3':	5'-CTTACTCGAGTTATCTCTTTCTGGCGGAAGATGGGTAC-3'
#140 Bni1p-5':	5'-GGTAACTAGTAAAATGGCTGTGAGTAACTGAATAATACAGATGG -3'
#143 Scar-3':	5'-GTTACTCGAGTTAATCCCAATCAGAATCATCAG-3'
#144 Scar-5':	5'-CGTGTCTAGAAAAATGGTATTAATTACAAGATATTTACC -3'
#163 FH1-5':	5'-CCTGTCTAGACCAATTGTAACAACACCACCACCTGCACC-3'
#164 FH2-5':	5'-CCTGTCTAGACCAGCAAATGCACCAAATTACAGTATCAAACC-3'
#165 FH2-3':	5'-CCTCTCGAGTTAACCATTCTCTTTAATTGTTGAGCTTTCTTTGC-3'
#171 VASP-5':	5'-CGTGTCTAGAATGAGTGAAACAGCAATTTT TAATGC-3'
#172 VASP-3':	5'-CGTCTCGAGTTAATGTTGAGATGCTCTGATTGC-3'
#206 TAPP2-5':	5'-GGTAGATCTAAAATGGGGACTCACGCCTTCTGCGAAGG-3'
#207 TAPP2-3':	5'-GCAGGATCCCACATCAGAGTTTCGTATGTTTTCGTCATC-3'
#208 ABP30-3'-SKL:	5'-GGTACTCGAGTTATAATTTTGTATTTCTTTTGTGGACCGTA TCTC-3'
#209 Oligo1-NLS:	5'-CTAGTCCAAAAAAGAAACGTAAAGTTTCTAGATAA C-3'

#210 Oligo2-NLS: 5'-TCGAGTTATCTAGAACTTTACGTTTCTTTTTTGGGA-3'
 #211 RFP-PTS1-5': 5'-GGTAAGCTTAAAATGGCATCATCAGAAGATGTTATTAAG-3'
 #212 RFP-PTS1-3': 5'-CTGAATTCTATAATTTTGATGCACCTGTTGAATGTCTACC-3'
 #213 VacA-PTS1: 5'-CAAAAATTAATTCAGAAGAAGATTTAAATTCAAATTATAACTCGAGAG-3'

7.10. Antikörper

7.10.1. Monoklonale Primär-Antikörper (aus der Maus)

αABP34	mAK159-291-1 (über G. Gerisch)
αDAip1	mAK246-153-2 (Konzok <i>et al.</i> , 1999)
αCoronin	mAK 176-3D-6 (de Hostos <i>et al.</i> , 1991)
αMyc	mAK9-E-10 (Ewan <i>et al.</i> , 1985)
αPorin	mAK70-100-1 (Troll <i>et al.</i> , 1992)
αGFP	mAK264-449-2 (Chemicon, Temecula, USA)
αAktin	mAKAct-1-11 (Simpson <i>et al.</i> , 1984)
αVacuolin	mAK263-79-2 (Wienke <i>et al.</i> , 2006)
αp80	mAKH151 (Ravanel <i>et al.</i> , 2001; über P. Cosson)

7.10.2. Polyklonale Primär-Antikörper (aus Kaninchen)

αCofilin	von H. Aizawa, bezogen über A. Müller-Taubenberger
αMyc	von Delta Biolabs

7.10.3. Sekundär-Antikörper

Kaninchen-anti-Maus IgG	
konjugiert mit Alkalischer Phosphatase	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG	
konjugiert mit CY3	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG	
konjugiert mit TRITC	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG	
konjugiert mit Oregon Green	Molecular Probes, Leiden, NL
Ziege-anti-Kaninchen IgG	
konjugiert mit CY3	Dianova, Hamburg

7.11. Fluoreszenzfarbstoffe

Alexa488-Palloidin	Molecular Probes, Leiden, NL
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma, Deisenhofen

FITC (Fluorescein Isothiocyanat)	Sigma, Deisenhofen
FITC-Dextran (MW ~60.000)	Sigma, Deisenhofen
Neutralrot	Sigma, Deisenhofen
TRITC (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat)	Sigma, Deisenhofen
TRITC-Dextran (MW ~150.000)	Sigma, Deisenhofen
Oregon-Green-Phalloidin	Molecular Probes, Leiden, NL

7.12. Biologische Stämme

Bakterien Stämme: *Escherichia coli* JM105
 Escherichia coli JM109
 Escherichia coli DH5 α
 Escherichia coli XL1-blue
 Klebsiella aerogenes

Hefe-Zellen: Cat. # Ysc-2, Sigma, Deisenhofen

Dictyostelium Stämme: Ax-2 (Watts and Ashworth, 1970)
 GFP-Tubulin (Stock, Abt Zellbiologie, UniKassel)

7.13. Online-Programme

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
<http://www.dictybase.org/>
<http://smart.embl-heidelberg.de/>
<http://psort.hgc.jp>
<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED>
http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html
http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html

8. Methoden

Die Beschreibungen der Methoden wurden zum Teil aus meiner Diplomarbeit übernommen.

8.1. Molekularbiologische Methoden

8.1.1 Präparation von DNA

8.1.1.1. Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Birnboim & Doly, 1979)

1,5 ml LB_{Amp}-Medium wurden mit Bakterien beimpft, über Nacht unter Schütteln auf 37°C inkubiert und für 4 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Medium wurde vollständig abgenommen und das Zellpellet vollständig in 200µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl Lösung II und vorsichtigem Mischen wurde für fünf Minuten bei RT inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Es folgte die Zugabe von 200 µl Lösung III und nach erneutem vorsichtigen Mischen eine fünfminütige Inkubation des Ansatzes auf Eis, wodurch sowohl Proteine als auch genomische DNA ausgefällt wurden. Nun wurde bei 14.000 rpm 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (optional kann zur besseren Aufreinigung der Präparation an dieser Stelle eine PCIA-Extraktion erfolgen), mit 0,7 Volumen Isopropanol bei RT gefällt und für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das DNA-haltige Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Der resultierende Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet für wenige Minuten in der Speed Vac getrocknet und schließlich in 30 µl bidest. H₂O oder TE-Puffer bei 65°C unter Schütteln resuspendiert

8.1.1.2. Midipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA in reiner Form wurde das QIAGEN Plasmid-Midi-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Präparation erfolgte dabei nach Herstellervorschriften unter Verwendung der mitgelieferten Lösungen.

Bei dieser Art der Präparation wurde die DNA zusätzlich über eine Anionenaustauscher-Säule gereinigt. Aus einer 30 ml Bakterienkultur konnten so ca. 100 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Die Ausbeute der Präparation wurde entweder mittels Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt oder aber photometrisch bestimmt.

8.1.1.3. Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

Dictyostelium Zellen wurden in 10 ml Petrischalen kultiviert (max. 2×10^7 Zellen), das Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml Soerensen-Phosphatpuffer abgespült und durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 min geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Kernlysepuffer resuspendiert und einige Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 60 µl

20% NP-40 und gutem Durchmischen durch Vortexen erfolgte eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Der Reaktionsansatz klarte dabei auf. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 8 min bei 4000 rpm. Das Zellkernpellet wurde erneut in 1 ml Kernlysepuffer resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 200 µl Puffer 6.6.2 aufgenommen. Nach Zugabe von 7 µl einer 10 %igen SDS Lösung und 20 µl der Proteinase K Lösung erfolgte eine Inkubation für mindestens 2 Stunden oder über Nacht bei 65°C. Hierbei wurden die Kerne lysiert und die noch in Lösung befindlichen Proteine zerstört. Die chromosomale DNA wurde anschließend über eine 2fache PCIA-Fällung aus der Lösung extrahiert. Im Anschluss erfolgte eine Isopropanolfällung und das Pellet wurde vorsichtig in 30 µl bidest. H₂O aufgenommen.

8.1.2. Aufreinigung, Anreicherung und Nachweis von Nukleinsäuren

8.1.2.1. Ethanolfällung

Die Ethanolfällung ist für RNA und DNA mit einer Kettenlänge von mehr als 8-10 Nukleotiden anwendbar. Nach Volumenbestimmung wurde die wässrige Nukleinsäurelösung mit 1/10 Volumen 8 M LiCl oder 3M NaAcetat und 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol versetzt. Bei sehr geringer Nukleinsäurekonzentration wurde mindestens 2 h, besser über Nacht, bei -20°C oder 1 h bei -70°C inkubiert. Die gefällte Nukleinsäure wurde bei 12.000 x g und 4°C 30 min abzentrifugiert, mit dem zweifachen Volumen 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, getrocknet und in bidest. H₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

8.1.2.2. Isopropanolfällung

DNA-Moleküle mit einer Größe von über 70 bp werden mit Isopropanol nahezu quantitativ gefällt, während DNA-Fragmente, die kürzer als 30 bp sind, sowie Mononukleotide nicht gefällt werden. Um ein Mitfällen von Salzen zu verhindern, sollte während der Isopropanolfällung nicht gekühlt werden. Nach Volumenbestimmung wurden zur DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat und 0,7 Volumen Isopropanol (Raumtemperatur) gegeben. Das DNA-Präzipitat wurde bei Raumtemperatur abzentrifugiert und wie bei der Ethanolfällung gewaschen, getrocknet und in bidest. H₂O oder TE-Puffer resuspendiert.

8.1.2.3. PCIA-Extraktion

Um Nukleinsäuren von Proteinen oder organischen Lösungsmitteln zu trennen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt (bei zu kleinen Volumina wurde mit bidest. H₂O auf mindestens 100 µl aufgefüllt), intensiv gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert (12.000 rpm, Raumtemperatur, 5 min). In der phenolischen Phase befanden sich organische Verunreinigungen, an der Interphase denaturierte Proteine

und in der wässrigen Phase die Nukleinsäuren. Diese wurde vorsichtig abgenommen und die Extraktion mit PCIA, wenn nötig, wiederholt. Anschließend wurde die Nukleinsäure gefällt, getrocknet und in bidest. H₂O oder TE-Puffer resuspendiert.

8.1.2.4. DNA-Aufreinigungs-Kits

Neben den oben beschriebenen Fällungsreaktionen wurden DNA-Fragmente aus verschiedenen Anwendungen, wie beispielsweise Restriktionsverdau, PCR oder Agarose-Gelen, mittels unterschiedlicher kommerzieller Kits aufgereinigt, entsalzt und/oder angereichert. Dabei wurden Anionenaustauscher-Säulchen (QIAquick), Glasmilch (QIAEX II) oder aber magnetische Beads (PCR-Kit, Invitrogen) verwendet. Die Anwendung erfolgte dabei gemäß den jeweiligen Herstellerangaben.

8.1.2.5. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Anhand eines UV-Spektrums wurden die Konzentration und der Reinheitsgrad von DNA-Proben gemessen. Aus dem Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm kann die Reinheit der Probe abgeschätzt werden. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 spricht für eine nahezu reine Probe, ohne nennenswerte Protein-Kontaminationen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht etwa einer Konzentration 50 µg DNA /ml Probe. Zur besseren Reproduzierbarkeit wurden die Messungen in Verdünnung mit TE-Puffer durchgeführt.

8.1.2.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gele unterschiedlicher Konzentration (0,7%-1,5% [w/v] Agarose) verwendet. Die Auftrennung kleinerer Fragmente erfolgte dabei in höherprozentigen, die Auftrennung größerer Fragmente in niederprozentigen Gelen. Zur Erstellung der Gele wurde die Agarose im entsprechenden Prozentsatz ([w/v]) in 1 x TBE gegeben, mehrmals aufgekocht und mit 3 µl/100 ml EtBr-Lösung versetzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurde die flüssige Agarose in horizontale, zuvor abgedichtete Gelkammer mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde die Kammer mit 1 x TBE-Puffer gefüllt und der Kamm vorsichtig entfernt. Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Auftragspuffer vermischt und in die Probenaschen pipettiert. Zusätzlich zu den Proben wurde ebenfalls ein DNA-Längenstandard aufgetragen. Das Gel wurde bei max. 10 V/cm Gellänge für 1-5 h laufen gelassen. Das im Gel enthaltene EtBr interkaliert zwischen den Basen der DNA und fluoresziert unter UV-Anregung (366 nm) orange. So konnten die im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente in der GelDoc II Apparatur sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

8.1.2.7. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Enzymatisch geschnittene DNA oder PCR-Produkte wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt und die gewünschte Bande unter UV-Licht (366 nm) mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Das Gelstück wurde dann in eine Konstruktion aus zwei ineinander gesteckten 1,5 ml Reaktionsgefäßen überführt. Im oberen Gefäß befand sich ein mit bidest. H₂O angefeuchtetes Whatman-Papier 3MM. Das Filterpapier war dabei kegelförmig zusammengerollt und an der unteren spitzen Seite abgeknickt. In das Innere des Filter-Kegels wurde nun das ausgeschnittene Gelstück überführt und die gesamte Konstruktion für 30 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Papier hielt dabei die Agarose zurück und trennte so den flüssigen Bestandteil mitsamt der DNA ab. Über eine Öffnung an der Spitze des oberen Gefäßes gelangte der flüssige Anteil in das untere Reaktionsgefäß. Der Durchfluss wurde mit PCIA extrahiert, gefällt, getrocknet und in bidest. H₂O oder TE-Puffer aufgenommen. Alternativ wurde die Gelelution mittels Anionenaustauscher-Säulchen oder Glasmilch (s.o.) gemäß den jeweiligen Herstellervorschriften durchgeführt.

8.1.3 Enzymatische Reaktionen

8.1.3.1. DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Temperaturbedingungen und Inkubationszeiten. Pro µg DNA wurden 2-5 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Dabei war zu beachten, dass das eingesetzte Enzymvolumen 10% vom Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes nicht überschritt, da sich ansonsten das Glycerin der Enzymlösung inhibierend auf die Reaktion auswirkte. Plasmid-DNA wurde 1-2 h, und die Vollständigkeit der Reaktion durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

8.1.3.2. Die Erzeugung von „blunt ends“

Die meisten Restriktionsendonukleasen erzeugen kohäsive Enden mit entweder 5'- oder 3'-Überhängen. Beide Überhangsformen können nachträglich in glatte Enden, so genannte „blunt ends“, überführt werden. Zum Blunting von 5'-Überhängen wurde die Klenow-Polymerase und von 3'-Überhängen die T4-Polymerase, beide von MBI Fermentas, verwendet. Die Anwendung erfolgte dabei nach den vom Hersteller empfohlenen Angaben.

8.1.3.3. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Wird eine DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten, so verbleibt eine Phosphatgruppe an den 3'-Enden der entstehenden Restriktionsfragmente. Dieser Phosphatrest kann durch spezifische Phosphatasen entfernt werden, wodurch die spätere

Religation der Fragmente verhindert wird. Zum Einsatz kam diese Technik bei der Präparation von Plasmid-DNA für nachfolgende Ligationsreaktionen, in der die Religation der geschnittenen Plasmide unterbunden werden sollte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck sowohl CIP (Calf Intesine Phosphatase, NEB) als auch SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, MBI Fermentas) verwendet, wobei zur Reaktionsdurchführung die jeweiligen Herstellerangaben befolgt wurden.

8.1.3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (Saiki et al., 1985) können DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden. Unter Verwendung einer doppelsträngigen DNA-Matrize und zweier, begrenzender Oligonukleotid-Primer wird in Gegenwart von dNTPs durch hitzeresistente DNA-Polymerasen in Zyklen von Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer ("Annealing") und Synthese des jeweiligen komplementären Stranges ("Elongation") der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt amplifiziert. Durch die Verwendung von Primern mit nicht komplementären, überhängenden 5'-Enden können den amplifizierten DNA-Abschnitten zusätzliche oder veränderte Sequenzbereiche angehängt werden. Durch diese Technik eingefügte Restriktionsschnittstellen ermöglichen beispielsweise die spätere Ligation dieser Fragmente in geschnittene Plasmide. Auch die direkte Ligation unmodifizierter, durch Taq-Polymerase synthetisierter DNA-Fragmente ist über die so genannte TA-Klonierung möglich, wobei die präferentielle Ausbildung von A-Überhängen an den entstehenden PCR-Produkten unter diesen Bedingungen ausgenutzt wird (Marchuk et al., 1991).

Nachfolgend ist ein Standard-Reaktionsansatz für die PCR aufgeführt, der in Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Matrize, der Produktausbeute oder der eingesetzten DNA-Polymerase modifiziert wurde.

Standard-Reaktionsansatz:

x µl	Matrizen DNA (ca. 100 ng)
2-4 µl	5'Primer (10 pM/µL)
2-4µl	3`Primer (10 pM/µL)
5 µl	10x PCR-Puffer (+ x mM MgCl ₂)
5 µl	dNTP Mix (jeweils 2mM)
2 µl	Taq (Pwo)-Polymerase
	ad 50 µl H ₂ O

Für analytische Zwecke wurde ein Reaktionsgesamtvolumen von 20 µl gewählt. Die Zugabe der einzelnen Komponenten verringerte sich dementsprechend.

Das nachfolgend beschriebene PCR-Programm stellt lediglich ein Standard-Programm dar, das bezüglich der Zyklenanzahl, sowie Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte den jeweiligen Anforderungen, wie Primerkombination, verwendeter Polymerase oder Länge des zu amplifizierenden Fragments, angepasst wurde.

Standard-PCR-Programm:

1 x	Schritt 1	1-5 min, 95°C	Initialdenaturierung
25 x	Schritt 2	20 s, 95°C	Denaturierung
		20 s, 50°C	Annealing
		60 s, 72°C	Elongation
1 x	Schritt 3	5 min, 72°C	finale Elongation
		Kühlen auf 4°C	

Sollte das PCR-Produkt für nachfolgende Klonierungen verwendet werden, wurde es im Weiteren über Agarose-Gelelektrophorese und entsprechende Kits (s.) aufgereinigt, bevor es in weiteren Reaktionen eingesetzt wurde.

8.1.3.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligase-Reaktion dient der kovalenten Verknüpfung von DNA-Enden. Dabei können freie Enden unterschiedlicher oder desselben Fragments miteinander verbunden werden. Die Reaktion wird durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert und benötigt ATP als Coenzym und Energiequelle. Da monomolekulare Reaktionen, also Religationen, energetisch begünstigt sind, ist es sinnvoll, das zu klonierende Insert in 3- bis 5fachem molaren Überschuss in den Ansatz einzubringen.

Reaktionsansatz Ligation:

x µl	geschnittene, gereinigte (ggf. dephosphorylierte) Plasmid-DNA (200ng)
y µl	Insert (3 – 5facher molarer Überschuss)
2 µl	10x Ligationspuffer
0,5 µl	T4-Ligase (1-5 u)
ad 20 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde für drei bis 16 Stunden bei 22°C inkubiert und hinterher für 10 min bei 65°C inaktiviert. Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* oder aber die mittelfristige Lagerung bei -20°C.

8.1.3.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Gensequenzen kloniert. Ursprung der zu klonierenden Fragmente war in den überwiegenden Fällen die PCR, bei der die gewünschte Sequenz entweder ausgehend von genomischer oder von Plasmid-DNA amplifiziert wurde. Die Methode der PCR bietet den Vorteil, dass sie das Einbringen von neuen oder weiteren Restriktionsschnittstellen oder aber Start- oder Stop-Codons an den Fragmentenden ermöglicht, was die weitere Klonierung oftmals erheblich vereinfacht oder gar erst ermöglicht. Die entstandenen PCR-Produkte wurden zunächst über Gelelektrophorese von den übrigen Reaktionskomponenten getrennt und anschließend mittels eines der oben genannten kommerziellen Kits aufgereinigt. Ein solches PCR-Produkte konnte nun entweder direkt mittels „Blunt End“- oder TA-Klonierung in einen entsprechend vorbereiteten Vektor eingebracht, oder aber zunächst durch passende Restriktionsendonukleasen an den Enden zugeschnitten werden.

Eine weitere Möglichkeit ein zu klonierendes Fragment zu gewinnen ist das direkte Ausschneiden der entsprechenden Sequenz aus einem bereits bestehenden Vektor mittels Restriktionsverdau, wobei in diesem Fall nur auf die bereits vorhandenen Schnittstellen zurückgegriffen werden kann.

Die entsprechenden Zielvektoren wurden ebenfalls mit kompatiblen Restriktionsendonukleasen geschnitten und die dadurch freiwerdenden Enden gegebenenfalls zur Vermeidung der späteren Religation dephosphoryliert.

Die so gewonnenen Fragmente und linearisierten Vektoren wurden in der Regel zunächst erneut aufgereinigt und anschließend in einem Ligationsansatz vereint, wobei die einzusetzenden DNA-Mengen zuvor mittels Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt wurden.

Die erhaltenen Ligationsansätze wurden nun meist komplett zur Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen verwendet. Klonkolonien mit dem gewünschten Konstrukt wurden mittels Plasmid-DNA-Präparation mit anschließendem Nachweis durch Restriktionsverdau oder PCR identifiziert.

In vielen Fällen wurde die richtige Insertion des Fragments im Vektor, sowie dessen Identität zusätzlich durch die partielle Sequenzierung des Konstruktes überprüft.

8.1.3.7. DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierung von klonierten DNA-Konstrukten wurde nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode nach Sanger durchgeführt. Sie basiert auf der enzymatischen Neusynthese eines markierten DNA-Einzelstranges, die basenspezifisch unterbrochen wird. Die basenspezifische Unterbrechung wird dabei durch Zugabe einer bestimmten Menge von 2',3'-Dideoxynukleotiden zum Reaktionsansatz erreicht. Dideoxynukleotide werden von

der verwendeten Polymerase entsprechend den dNTPs in den wachsenden DNA-Strang eingebaut. Aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe bei den ddNTPs kann jedoch kein weiteres dNTP angelagert werden, es kommt an dieser Stelle zum Kettenabbruch. Die ddNTP-Konzentration in dem Reaktionsgemisch ist so eingestellt, dass statistisch an jeder Stelle der betreffenden Sequenz während der Synthese ein solches Nukleotid eingebaut wird.

In dem von mir verwendeten ABI-Prism BigDye Terminator Sequencing Kit (PE) waren an die einzelnen ddNTPs verschiedene Farbstoffe gekoppelt, über die, nach einer vorherigen Längenauftrennung der Reaktionsprodukte, eine Bestimmung der Sequenz möglich war. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass für die gesamte Sequenzierung lediglich ein Ansatz vorbereitet werden muss und die Produkte maschinell analysiert werden können.

In einem 200 µl Reaktionsgefäß wurde folgender Ansatz für die Sequenzierungsreaktion vorbereitet (halbierter Ansatz nach Herstellerangaben):

4 µl	Terminator Ready Reaction Mix
x µl	Template ds-DNA (200-500 ng)
y µl	Primer (ca. 3,2 pmol)
	H ₂ O ad 10 µl

Im Terminator Ready Reaction Mix waren Polymerase, Puffer, dNTPs und die markierten ddNTPs enthalten. Der Reaktion wurde in einem PCR-Thermocycler bei folgendem Programm durchgeführt:

1 x	Schritt 1	10 min, 95°C
25 x	Schritt 2	30 s, 96°C
		15 s, 50°C
		4 min, 60°C

Kühlen auf 4°C

Der Ansatz wurde nun mit 10 µl bidest H₂O aufgefüllt, mit 80 µl 75% Isopropanol versetzt und in ein farbloses 500 µl Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 30minütigen Fällung bei RT wurde für 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 250 µl 75% Isopropanol gewaschen und einige min in der Speed Vac getrocknet bevor es in 20 µl „Template Supression Reagent“ (TSR) aufgenommen wurde. Es folgte eine 10minütige Denaturierung der Probe bei 95°C im PCR-Thermocycler (beheizter Deckel!). Danach wurde der Ansatz gekühlt in die Abteilung Molekularpathologie des Klinikum Kassel gebracht, wo die eigentliche Sequenzanalyse im

Sequenzierautomaten (Perkin Elmer) durchgeführt wurde. Für diese Arbeit sei an dieser Stelle Dr. Kurt Beyser besonders gedankt.

Ab dem Jahr 2006 wurden sämtliche Sequenzierungsreaktionen komplett durch die MWG Biotech AG durchgeführt.

8.2. Transformationstechniken

8.2.1. Bakterielle Transformationstechniken

8.2.1.1. Herstellung kompetenter Bakterienzellen nach der Mehr-Ionen-Technik

(Hanahan, 1983)

5 ml M9-Medium wurden mit einem entsprechenden *E. coli* Stamm angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (280 rpm) inkubiert. Ausgehend von dieser Kultur wurden 100 ml LB-Medium beimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₅₅₀ von 0,3 bis 0,4 erreicht war. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt, geerntet (5.100 x g, 5 min, 4°C, Hettich Rotanta/R) und in 15 ml eiskaltem TfB I-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 10-15 min auf Eis inkubiert und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml gekühltem TfB II-Puffer aufgenommen und erneut 15 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend konnten die Zellen für die Transformation eingesetzt werden oder wurden bis zu ihrer Verwendung in Aliquots von 200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

8.2.1.2. Hitzeschock-Transformation

Je nach Qualität der kompetenten Zellen wurden pro Transformation 100-200 µl eingesetzt. Eine adäquate Menge kompetenter Zellen wurde langsam auf Eis aufgetaut und mit 10-100 ng des zu transferierenden Plasmids bzw. einem vollständigen Ligationsansatz versetzt und sehr vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden dann 40 min auf Eis gelagert. Es folgte ein 30-90 s andauernder Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C nach dem die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt wurden. Nach wenigen Minuten erfolgte die Zugabe von 1 ml vorgewärmten LB-Medium zur Zellsuspension. Es folgte eine einstündige Inkubation auf 37°C unter leichtem Schütteln. Danach wurden die Zellen 1 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert und das Medium bis auf ca. 200µl abgenommen. Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Nach erfolgreicher Transformation waren am nächsten Tag deutlich anwachsende Kolonien sichtbar.

8.2.1.3. Elektroporation (Dower et al., 1988)

Auch durch Elektroporation können Plasmide in *E. coli* eingeführt werden. Dazu wurden die Zellen zunächst in 250 ml LB-Medium bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 1,0 angezogen. Nach 15 min Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 4.000 x g und 4°C geerntet. Anschließend wurde zweimal mit einem Volumen kaltem, destilliertem Wasser und zweimal mit 10 ml kaltem, 10%igem Glycerin [v/v] gewaschen. Die Waschschrte wurden schnell durchgeführt, um einer Lyse der Zellen vorzubeugen. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml kaltem 10%igem Glycerin [v/v] aufgenommen. Die Zellsuspension wurde entweder frisch für die Elektroporation eingesetzt oder aliquotiert bei -70°C gelagert. Die eingefrorenen Zellen wurden vor der Elektroporation vollständig für ca. 15 min auf Eis aufgetaut. Die Elektroporation erfolgte im Gene Pulser der Firma Bio-Rad. In einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) wurden zunächst 40 µl *E. coli*-Zellen mit 160 µl eiskaltem H₂O versetzt. Dazu wurde ein vollständiger Ligationsansatz pipettiert und vorsichtig gemischt. Für den Elektropuls wurden folgende Einstellungen gewählt: 25 µF Kapazität; 2,5 kV Spannung; 200 Ω externer Widerstand. Die Zeitkonstante sollte möglichst zwischen 4 und 5 ms liegen. Anschließend wurden die Zellen sofort mit 1 ml LB-Medium vermischt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert, in 200 µl Restmedium resuspendiert und auf LB-Agar mit Selektionsdruck ausplattiert.

8.2.2. Transformationstechniken für *Dictyostelium discoideum*

8.2.2.1. Klassische Transformation

10 ml einer Flüssigkultur von *D. discoideum* mit einer Zelldichte von 3-8 x 10⁶ Zellen/ml wurden auf eine Petrischale (Ø 10 cm) überführt und man ließ die Zellen für mind. 45 min absitzen. Das HL-5-Medium wurde nun vorsichtig entnommen und durch MES-HI-5-Medium ersetzt. Während die Zellen adaptierten wurde die DNA-Präzipitation vorbereitet.

Hierfür wurden 10 µg bis 30 µg des zu transferierenden Plasmids in 600 µl 1 x HBS-Puffer gelöst und in ein steriles 5 ml Glasröhrchen überführt. Dem Ansatz wurden 38 µl 2 M CaCl₂ zugegeben, kräftig gevortext und für 25 min bei RT gefällt.

Das MES-HI-5-Medium wurde nun vorsichtig von der Platte entfernt und das vorbereitete DNA-Präzipitat tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt. Der Ansatz wurde für 25 min ruhig stehen gelassen. Ohne die DNA vorher zu entfernen erfolgte nun erneut die Zugabe von 10 ml MES-HI-5-Medium, diesmal zusammen mit Ampicillin (Endkonzentration: 40 µg/ml) und optional Amphotericin (Endkonzentration: 0,3 µg/ml). Es folgte eine Inkubation für 3 h. Danach wurde das Medium vollständig abgenommen und durch 2 ml 18% [v/v] Glycerin in 1 x HBS-Puffer ersetzt. Dabei wurde die Petrischale bei der Zugabe auf einer Seite leicht angehoben, so dass sich die

Lösung langsam und gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Nach 5-7 min wurde die Glycerin-Lösung so vollständig wie möglich abgenommen und durch 10 ml G₀-Medium ersetzt. Nach einer Inkubation über Nacht bei fand ein Austausch des G₀-Mediums gegen ein entsprechendes Selektionsmedium statt. Alle 2-3 Tage wurde das Medium mit den toten Zellen abgenommen und erneuert.

Nach spätestens 10 Tagen waren bei erfolgreicher Transformation sichtbare Klonekolonien in der Petrischale angewachsen.

18% Glycerin in 1 x HBS-Puffer	3 ml	60% [v/v] Glycerin
	2 ml	H ₂ O
	5 ml	2 x HBS

8.2.2.2. Elektroporation

D. discoideum Zellen wurden axenisch auf eine Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml angezogen. Pro Elektroporationsansatz wurden 2×10^7 Zellen benötigt. Entsprechende Volumina wurden der Flüssigkultur entnommen, in ein Falconröhrchen überführt und 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden daraufhin durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 1.500 rpm und 4°C geerntet und danach erst in vorgekühltem Soerensen-Phosphatpuffer, dann zweimal mit eiskaltem EP-Puffer gewaschen (jeweils 1.500 rpm, 10 min, 4°C). Nach erneuter Zentrifugation wurde die Zellen in 600 µl (pro 2×10^7 Zellen) EP-Puffer aufgenommen, mit 15-20 µg DNA versetzt, resuspendiert und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 4 mm) pipettiert. Diese wurden verschlossen und samt Inhalt zehn Minuten auf Eis gestellt.

Danach erfolgte der Elektropuls im Gene Pulser von Bio Rad bei folgenden Einstellungen: 25 µF Kapazität; 1 kV Spannung; ohne externen Widerstand. Die Zeitkonstante sollte dabei möglichst zwischen 2 und 3 ms liegen. Pro Elektroporationsansatz wurde nur einmal gepulst. Danach wurden die Küvetten erneut für 10 min auf Eis gestellt.

In der Zwischenzeit wurden Petrischalen (Ø 10 cm) durch Zugabe von 8 µl 100 mM CaCl₂ und 8µl 100 mM MgCl₂ (beide Lösungen sterilfiltriert) vorbereitet und die Zellen nach der zehnminütigen Inkubation auf Eis in diese überführt, so dass sie sich mit den Salzlösungen vermischten. Nach 15-minütiger Inkubation bei 22°C wurden 10 ml G₀-Medium zugegeben und die Zellen durch Schwenken verteilt. Einen Tag später erfolgte der Austausch des Medium gegen ein entsprechendes Selektionsmedium.

Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium mit den toten Zellen abgenommen und erneuert. Nach spätestens 2 Wochen waren bei erfolgreicher Transformation deutlich sichtbare Klonekolonien angewachsen.

8.3. Zellkultur und Endocytose-Assays

8.3.1 Anzucht in Flüssigmedium

Im Gegensatz zum Freilandisolat kann der Laborstamm Ax-2, bedingt durch Mutationen (Clarke & Kayman, 1987), in axenischem Medium (HL-5-Medium) kultiviert werden (Watts & Ashworth, 1970). Ax-2 und Transformanten wurden aus Vorkulturen, Sporen oder von SM-Platten (mit *Klebsiella aerogenes*) in HL-5-Medium angeimpft. Die Zell- bzw. Sporenzahl sollte dabei nicht unter 10^4 /ml liegen. Um Kulturen von *Klebsiella aerogenes* zu befreien, wurden die *D. discoideum*-Zellen in Penicillin/Streptomycin enthaltendes Medium (100 U/ml) überführt. Für die Kultivierung von Transformanten wurden dem Medium entsprechende Mengen des jeweiligen Selektionsantibiotikums zugesetzt. Die Anzucht von adhärennten Zellen erfolgte in 24 Loch-Costarplatten oder Petrischalen (\varnothing 5 & 10 cm). Suspendierte Zellen wurden in 30-80 ml Medium bei 150 rpm geschüttelt (Lab-Shaker). Bei 22°C betrug die Generationszeit von Ax-2 in Schüttelkultur etwa 10 h. Für alle zellbiologischen Untersuchungen wurden die Zellen maximal bis zu einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml angezogen. Ab einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml beginnt die Wachstumskurve in die stationäre Phase überzugehen.

8.3.2. Subklonierung von Transformanden

Um Klone einzelner Transformanten in Reinkultur zu erhalten wurde wie folgt vorgegangen. Ausgehend von einer bewachsenen SM-Platte wurden *Klebsiella aerogenes* mit Soerensen-Phosphatpuffer abgespült. Die KA-Suspension wurde derart mit abgespülten *Dictyostelium*-Zellen einer Transformationsplatte beimpft, dass die Konzentration ca. 100 Zellen/100 μ l Suspension betrug. Davon wurden 100 μ l auf eine vorgetrocknete SM-Platte ausplattiert und diese bei 22°C bebrütet. Da die Klebsiellen eine wesentlich kürzere Generationszeit besitzen als *Dictyostelium* Zellen wurde zunächst ein Bakterienrasen sichtbar. Die Generationszeit von *Dictyostelium* betrug hierbei 3-4 h. Nach 3 Tagen waren in den meisten Fällen bereits deutliche Fresshöfe ("Plaques") im Bakterienrasen zu sehen. Vom Rand dieser Fresshöfe wurden mit einem sterilen Zahnstocher vegetative Zellen entnommen und in eine 24-Loch Costar-Platte mit entsprechendem Selektionsmedium überführt.

8.3.3. Sporengewinnung und Konservierung

Axenisch gewachsene Zellen wurden zweimal mit einem 1/2- bis 1/3-Volumen kaltem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und auf eine Dichte von $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden pro Phosphat-Agarplatte je 500 μ l ausplattiert und die Platten bei 22°C inkubiert. Innerhalb von zwei Tagen entwickelten sich die Zellen und bildeten Fruchtkörper. Die Sporen und Stiele wurden mit 3 ml Soerensen-Phosphatpuffer pro Platte abgespült und die so erhaltene Suspension in 1 ml Aliquots in Einfrierröhrchen in

flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -70°C . Zum Animpfen einer neuen Kultur wurde ein Aliquot bei Raumtemperatur angetaut und 100-200 μl in eine Petrischale mit G_0 -Medium gegeben, bevor gegebenenfalls einige Tage später Selektionsdruck zugegeben wurde.

8.3.4. Bestimmung der Phagocytoseaktivität, Phagocytose-Assay

[Maniak *et al.*, 1995]

Zur Quantifizierung der Phagocytoseaktivität wird die Aufnahme von hitzeinaktivierten, TRITC-markierten *S. cerevisiae*-Zellen verfolgt. Extrazelluläre Hefe-Zellen können von phagocytierten Hefen durch Fluoreszenzquenching mit Trypanblau, das nicht in lebende Zellen eindringen kann, unterschieden werden.

Anders als in Maniak *et al.*, 1995 beschrieben wurden die Phagocytose-Assays der Vac-Myc-VASP-Zellen aufgrund des beobachteten konditionalen Cytokinesedefekts nicht aus Schüttelkultur, sondern unter adhärennten Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden in G_0 -Medium auf Petrischalen angezogene Zellen ab gespült, ihre Zelldichte vermessen und je 1×10^6 Zellen in die Wells einer 24er Costar-Platte überführt. Nach einstündigem Absitzen der Zellen wurde das überstehende Medium vorsichtig abgenommen und durch 1 ml frisches, mit TRITC-Hefen versetztes Medium ersetzt. Dabei wurde die Hefen so konzentriert, dass je Dictyostelium-Zelle sechs Hefepartikel zugegeben wurden (6 μl TRITC-Hefen auf 1 ml Medium bzw. pro Well, s.u.). Der Zeitpunkt der Hefezugabe wurde gleich t_0 gesetzt und im Weiteren im Abstand von 15 min ein weiterer Messwert bestimmt.

Dazu wurden je Messwert die Zellen aus einem Well so vorsichtig und vollständig wie möglich ab gespült, in einem Eppi mit 100 μl Trypanblau versetzt und für 3 min auf einem Rüttler vermischt. Durch diesen Schritt wird die Fluoreszenz nicht-internalisierter Hefen gequencht, sowie die Ablösung von an der Zelloberfläche anhaftenden Hefen bewirkt. Im Anschluss erfolgte eine 2minütige Zentrifugation bei 3000 rpm. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml Phosphatpuffer resuspendiert und anschließend im Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 574 nm vermessen. Die Fluorimeter-Einstellung wurde auf 550 Volt voreingestellt, wobei dieser Wert in Abhängigkeit von der TRITC-Kopplung der verwendeten Hefen variieren konnte.

8.3.4.1. Herstellung TRITC-markierter Hefen

5 g Hefen wurden in 50 ml 1xPBS für 30 min in einem kochenden Wasserbad gerührt und so abgetötet. Anschließend erfolgte eine fünfmalige Waschung mit 1xPBS, gefolgt von zweimaligem Waschen mit Phosphatpuffer. Die Hefezellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^9 Zellen/ml in Phosphatpuffer eingestellt und konnten dann bei -20°C gelagert

werden. 2×10^9 Hefezellen (Pellet) wurden zum Labeln in 20 ml einer Lösung, bestehend aus 50 mM Dinatriumhydrogenphosphat Puffer (Na_2HPO_4), pH 9,2 und 2 mg TRITC, aufgenommen und für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 50 mM Dinatriumhydrogenphosphat Puffer, pH 9,2, und mindesten 4 mal mit Phosphatpuffer gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C , nachdem die Zellen mit Phosphatpuffer auf eine Dichte von 1×10^9 Zellen/ml eingestellt und aliquotiert wurden.

8.3.5. Bestimmung der Pinocytoseaktivität, Pinocytose-Assay [Hacker *et al.*, 1997]

Dieser Assay stellt eine Modifizierung des zuvor beschriebenen Phagozytose-Assays dar. Es wird hier die Aufnahme des Flüssigphasenmarkers TRITC-Dextran fluoreszenzspektroskopisch quantitativ verfolgt.

Anders als in Hacker *et al.*, 1997 beschrieben wurden die Pinocytose-Assays der Vac-Myc-VASP-Zellen aufgrund des beobachteten konditionalen Cytokinesedefekts nicht aus Schüttelkultur, sondern unter adhärennten Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden in G_0 -Medium auf Petrischalen angezogene Zellen ab gespült, ihre Zelldichte vermessen und je 6×10^6 Zellen in 5 ml Petrischalen überführt. Nach dreistündigem Absitzen der Zellen wurde das überstehende Medium vorsichtig abgenommen und durch 1200 μl TRITC-Dextran-Medium (2,5 mg TRITC-Dextran in 1 ml G_0 -Medium) ersetzt. Der Zeitpunkt der Zugabe wurde gleich t_0 gesetzt und in Abständen von 15 min weitere Messwerte bestimmt.

Zur Messung wurden die Zellen einer Platte mit dem überstehenden Medium so vorsichtig und vollständig wie möglich ab gespült, in ein mit 100 μl Trypanblau vorbereitetes Eppi überführt und durch fünfmaliges Schwenken mit diesem vermischt. Nach der anschließenden zweiminütigen Zentrifugation bei 3000 rpm wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen und das Zellpellet in 1 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Die in den Zellen vorhandene TRITC-Fluoreszenz wurde im Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 574 nm gemessen und notiert. Die Fluorimeter-Einstellung wurde auf 600 Volt voreingestellt.

In einigen Fällen wurde eine gegenüber dem Wildtyp verringerte Adhäsion der Vac-Myc-VASP-Mutanten am Boden der 5 ml Petrischalen beobachtet, wodurch beim Mediumswechsel möglicherweise eine erhöhte Anzahl von Mutantenzellen abgenommen und damit der Messung entzogen wurde. Um einen auf diesen Sachverhalt zurückgehenden Unterschied in den Messwerten auszugleichen wurden die Werte nachträglich den Gesamtproteinmengen der Proben angepasst.

8.3.6. Transit-Assay [Jenne *et al.*, 1998]

Bei diesem Assay wird zum einen die Verweildauer des Flüssigphasenmarkers TRITC-Dextran, zum anderen der anhand des FITC/TRITC-Quotienten ermittelte pH-Verlauf während des endocytotischen Transits bestimmt.

Hierzu wurden Zellen in G₀-Medium auf eine Dichte von max. 5×10^6 Zellen/ml anwachsen gelassen und geerntet. Je Zelltyp wurden 1×10^8 Zellen in 10 ml TRITC-FITC-Medium (40 mg TRITC-Dextran und 4 mg FITC-Dextran in 10 ml G₀) resuspendiert, in einen silanisierten 25 ml Erlenmeyer-Kolben überführt und für 20 min unter Schütteln bei 150 rpm inkubiert. Während dieses Pulses wird der angebotene Flüssigphasenmarker von den Zellen endocytiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 1200 rpm (Hettich Rotanta). Das überstehende TRITC-FITC-Medium wurde abgenommen, das Zellpellet vorsichtig in 10 ml frischem G₀-Medium resuspendiert und erneut in einem silanisierten 25 ml Kolben unter Schütteln inkubiert. Nach jeweils 0, 30, 45, 60...120 min wurde dem Kolben ein 1 ml Aliquot entnommen, durch Schwenken mit 100 µl Trypanblau vermischt und für 2 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen und das Zellpellet in 1 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Die Messung der in den Zellen enthaltenen TRITC- und FITC-Fluoreszenz erfolgte im Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm bzw. 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 574 nm bzw. 520 nm. Das Fluorimeter wurde auf 700 Volt voreingestellt, wurde aber gegebenenfalls während der ersten Messung für einen der Farbstoffe nachjustiert.

8.4. Mikroskopische Methoden

8.4.1. Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen

Zur Beobachtung von lebenden Zellen, z.B. GFP-Expriemierer oder Zellen in TRITC/FITC-Medium, unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde auf einem Deckglas (50 mm x 50 mm) ein Plastikring mit einem Innendurchmesser von 40 mm mit Paraffin dicht abschließend befestigt und ~1 ml einer Zellkultur (1×10^6 Zellen/ml) auf das Deckglas pipettiert. Nach Absitzen der Zellen für 30 min wurde das Deckglas auf dem Tisch des inversen Fluoreszenzmikroskops befestigt und bei entsprechender Wellenlänge mikroskopiert.

8.4.2. Fixierung und Präparation von Zellen für die Immunfluoreszenz

300 µl einer Suspension von 1×10^6 Zellen/ml in HL-5-Medium wurden auf ein HCl-gereinigtes Deckglas (Ø 18 mm) gebracht. Nach Absitzen der Zellen für 30 min wurde das Medium abgesaugt, sofort 300 µl Pikrinsäure/Paraformaldehyd-Fixativ zugegeben und für 30 min abgedeckt in einer feuchten Kammer fixiert. Das Deckglas wurde durch Eintauchen in 10 mM PIPES, pH 6,0 und PBS/Glycin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen nach

erneutem Waschen mit 300 µl PBS/Glycin (5 min) für 15 min mit 70% [v/v] Ethanol nachfixiert. Es wurde daraufhin zweimal 5 min mit 300 µl PBS/Glycin und zweimal 15 min mit 300 µl PBG gewaschen, bevor die Zugabe des Primär-Antikörpers für mind. 3h oder über Nacht bei RT erfolgte.

Nach Entfernen des Primär-Antikörpers wurde 6 x 5 min mit 300 µl PBG gewaschen und daraufhin für 2 h bei 37°C mit einem Sekundär-Antikörper (1:1000 in PBG) und optional DAPI (Stammlösung 1 mg/ml in 70% Ethanol; 1:1000 in PBG) oder Alexa488- Phalloidin (7 µl je Deckglas) inkubiert. Nach Entfernung des Sekundärantikörpers wurde 2 x 5 min mit PBG und 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann, nach kurzem Schwenken in H₂O, auf einem Objektträger mit Gelvatol eingebettet und das Präparat zum Aushärten bei 4°C dunkel gelagert.

Entfielen die Fluoreszenz-Markierungen, so wurden die Zellen nach der Nachfixierung 2 x 5 min mit PBS/Glycin und 2 x 5 min mit PBS gewaschen und danach eingebettet.

Alle Antikörperlösungen wurden vor Gebrauch 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Puffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert oder autoklaviert.

Pikrinsäure/Paraformaldehyd-Fixativ

0,2 g Paraformaldehyd wurden in 3,5 ml Wasser nach Zugabe von 4 Tropfen 2 M NaOH und Erwärmen auf 40°C gelöst. Anschließend wurden 5 ml 20 mM PIPES, pH 6,0 und 1,5 ml gesättigte Pikrinsäure-Lösung zugegeben. Der pH-Wert des Fixativs wurde auf 6,0 eingestellt. Bis zur Verwendung wurde dunkel gelagert.

Gelvatol

10 ml einer 0.1 M KH₂PO₄-Lösung wurden mit einer 0.1 M Na₂HPO₄-Lösung auf pH 7,2 eingestellt. Hiernach folgte eine 1:10 Verdünnung und der Zusatz von 20 g Polyvinylalkohol, das über Nacht durch Rühren gelöst wurde. Nun gab man 40 ml Glycerin zu und ließ die Lösung wieder über Nacht rühren. Nach 15 min Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde der Überstand entnommen und mit 25 µg/ml DABCO (Antibleichmittel) versetzt. Nach Aliquotieren in Spritzen lagerte man diese bei -20°C.

8.4.3. Beobachtung und Dokumentation Fluoreszenz-markierter Zellen

Für die Darstellung und Aufnahmen im CLSM und im konventionellen Fluoreszenzmikroskop wurden jeweils 100 x Ölimmersions-Objektive verwendet.

Im CLSM wurden FITC, GFP, Oregon Green, sowie Alexa488 über einen Ar-Laser (488 nm), und TRITC, CY3 und RFP über einen HeNe-Laser (543 nm) angeregt. Die genaueren Einstellungen wurden den jeweils verwendeten Farbstoffen bzw. Farbstoffkombinationen

angepasst. Das Übersprechen einzelner Kanäle wurde überprüft und durch Nachbesserung der Einstellungen oder getrennte Bilderzeugung eliminiert.

Im konventionellen Fluoreszenzmikroskop wurden FITC, GFP, Oregon Green und Alexa488 bei Blau-Anregung, TRITC, CY3 und RFP bei Grün-Anregung und DAPI, sowie unmarkierte Hefen bei UV-Anregung dokumentiert.

Aufgenommene Bildpaare wurden gegebenenfalls entweder mit der Leica Software LCS oder der DIPS Software überlagert. Zum Teil erfolgte eine weitere Nachbearbeitung der Bilder mittels Adobe Photoshop 5.0, wobei jedoch zu keiner Zeit die Veränderung einzelner Bildbereiche vorgenommen wurde.

8.4.4. Präparation von Dictyostelium-Zellen für die TEM

2×10^7 Zellen wurden geerntet, in 10 ml HL-5-Medium resuspendiert und für 5 min unter leichter Bewegung mit 1/10 Vol 25%ig Glutardialdehyd versetzt. Danach wurde für 5 min bei 2000g abzentrifugiert und das Pellet für 10 min unter leichter Bewegung in 5 ml Fixativ inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet ein zweites Mal in Fixativ (größtmögliches Volumen) resuspendiert und bei 3000 g für 3 min abzentrifugiert. Daran schloss sich zweimaliges Waschen mit Phosphatpuffer an.

Zur Nachfixierung wurden die Zellen für mind. 90 min mit 1%iger OsO_4 -Lösung in Phosphatpuffer auf Eis inkubiert und anschließend 6 x gekühlt mit eiskaltem bidest. H_2O gewaschen.

Zur Kontrastierung wurden die Zellen für mind. 90 min auf Eis mit 2%iger Uranylacetat-Lösung versetzt und daraufhin 6 x gekühlt mit eiskaltem bidest. H_2O gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Zellen mittels einer in 10%-Schritten aufsteigenden Ethanolreihe, wobei zwischen jedem Schritt bei 3333g für 3 min abzentrifugiert wurde. Dem 70%igem Ethanol-Schritt wurde 1% Phosphorwolframsäure zugesetzt und für 90 min inkubiert. Danach wurde die Entwässerungsreihe bis zur 100% Ethanolstufe wie zuvor beschrieben vorgesetzt. Nach Erreichen der 100%-Stufe wurde die Zellen noch zwei weitere Male mit 100% Ethanol gewaschen bis zur weiteren Verarbeitung dunkel in Ethanol gelagert.

Die Einbettung der Zellen in Kunstharz, das Trimmen der Präparatblöcke, sowie das Aufziehen auf Objektträger erfolgte in der AG Lymphologie der UniKassel und wurde von Heidemarie Gärtner und Hellmuth Zöltzer durchgeführt. Alle hier verwendeten Schwermetall-Chemikalien wurden von H. Zöltzer zu Verfügung gestellt.

TEM-Fixativ	2,5%	Glutardialdehyd
	0,2 %	Pikrinsäure
	5 mM	EGTA
	5 mM	NaN ₃
	5 mM	MgCl ₂
	mit NaOH auf pH 6,8 einstellen; (EGTA löst sich erst nach pH-Einstellung)	

8.5. Proteinbiochemische Methoden

8.5.1. Entnahme und Vorbereitung von Proteinproben

2 x 10⁶ Zellen einer *Dictyostelium*-Kultur wurden bei 4°C und 2000 rpm (Biofuge) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 30 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben für 5 min unter Schütteln bei 90°C vollständig lysiert und denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Optional wurde dieser Ansatz auch auf eine größere Zellmenge aufgestockt. In der PAGE wurde in der Regel pro Spur ein Zelläquivalent von 2 x 10⁶, eingesetzt.

8.5.2. Gesamtproteinextraktion aus Dictyostelium-Zellen

Aus einer Dictyostelium-Kultur wurden Zellen entnommen und abzentrifugiert (2000 rpm Biofuge, 3 min, 4°C) und zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert, und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgebrochen. Die Zellbestandteile wurden dann bei 14000 x g für 60 min bei 4°C abzentrifugiert, und der Überstand mit den gelösten Proteinen in ein neues Eppi überführt.

8.5.3. Proteinmengen-Bestimmung mit Pierce BCA-Kit

Das BCA Protein Assay Kit dient der kolorimetrischen Detektion und Quantifizierung von Proteinen. Ein „Working Reagenz“ wurde nach Angaben des Herstellers vorbereitet (50 Teile Reagenz A und 1 Teil Teil Reagenz B). 2 ml dieser Lösung wurden mit 50-100 µl der zu bestimmenden Proteinprobe in einer Plastikkuvette vermischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde danach auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption bei 562 nm gegen Wasser gemessen. Die Absorption bei 562 nm ist nahezu linear mit der Proteinkonzentration in einem Bereich von 20-2000 µg Protein /ml. Die aus einzelnen Proben gewonnenen Werte konnten entweder miteinander verglichen oder unter Zuhilfenahme einer mit BSA erstellten Eichgeraden quantifiziert werden.

8.5.4. Präparation des Triton-unlöslichen Cytoskeletts

[nach McRobbie & Newell, 1983]

1 x 10⁸ Zellen einer Dicytostelium-Kultur wurden geerntet und in 1 ml HL-5-Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 150 µl mit gleichem Volumen einer 2xTriton-Stammlösung vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe für 10 min auf RT erwärmt und für 4 min bei 8000 rpm (Biofuge) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Volumen bestimmt und auf Eis verwahrt und das Pellet in identischem Volumen einer 1:1 Mischung aus HL-5-Medium und 2xTriton-Stammlösung resuspendiert. Beide Proben wurden daraufhin mit 1/5 Vol 10xSDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 90°C denaturiert. Bis zur weiteren Verwendung in der PAGE konnten die Proben bei -20°C gelagert werden.

8.5.5. PAGE, Westernblot und der Nachweis von Proteinen

Zur Größenaufftrennung von Proteinproben wurde die diskontinuierliche denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) eingesetzt. Die aufgetrennten Proteine wurden über ein Blot-Verfahren (Western-Blot) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und einzelne Proteine spezifisch über immunologische Methoden nachgewiesen. Die nach dem Transfer auf die Membran im Gel verbliebenen Proteine wurden zur Abschätzung der Proteinmengen in den einzelnen Proben mit Coomassie gefärbt.

8.5.5.1. Herstellen von Polyacrylamidgelen

Zunächst wurden die benötigten Glasplatten (18 cm x 14 cm) und Spacer mit Spülmittel und Ethanol gereinigt. Die Spacer wurden nun an den äußeren Rändern zwischen den beiden Glasplatten platziert und in ihrer Position durch Anbringen von Metallklammern fixiert. Der zwischen den Glasplatten entstandene Hohlraum wurde innen mit aufgekochter 0,5 %iger Agarose abgedichtet. In den Hohlraum wurden nun nacheinander die beiden unterschiedlich konzentrierten Gele gegossen. Zuerst wurde das noch unpolymerisierte Trenngel (10% PAA) eingefüllt und mit Isobutanol überschichtet (scharfe Trenngelkante). Nach der Polymerisation wurde das Isobutanol abgegossen und das noch unpolymerisierte Sammelgel (3,4% PAA) eingefüllt in das von oben her ein Probenkamm eingeführt wurde. Nach der Polymerisation des Trenngels konnte das Gel nach Entnahme des Kamms und des unteren Spacers in der PAGE verwendet werden.

Zur Bereitung der Gele wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge in ein Becherglas gegeben und vermischt:

Trenngel (10% PAA)	17,6 ml	Rotiphorese® Gel 30
	10,7 ml	SDS-Trenngel-Puffer
	13,5 ml	H ₂ O
	10,7 µl	TEMED
	480 µl	20 % APS
Sammelgel (3,4% PAA)	1,8 ml	Rotiphorese® Gel 30
	4 ml	SDS-Sammelgel-Puffer
	10,1 ml	H ₂ O
	80 µl	EDTA 200mM
	8 µl	TEMED
	240 µl	20 % APS

Die Polymerisation setzte dabei erst nach Zugabe von TEMED und APS allmählich ein. Nach Aufbau der Gel-Apparatur und dem Auftragen der Proteinproben (2×10^6 Zelläquivalente/Spur) und des Längenstandards in die Geltaschen wurden die Proben zunächst bei 120 V durch das Sammelgel laufen gelassen. Nach Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf max. 210 V erhöht und bis zum Ende des Laufs, nach ca. 3-4 h, beibehalten. Das Trenngel wurde nun vorsichtig entnommen und für weitere Anwendungen verwendet.

8.5.5.2. Westernblot

Die effizienteste und schnellste Methode, um Proteine aus einem PAA-Gel auf eine Membran zu transferieren, ist der Elektrobplot.

Die durch SDS negativ geladenen Proteine lassen sich aus einem ungefärbten Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran nach dem Semidry-Verfahren von Kyhse-Andersen, 1984 transferieren. Für diesen Zweck verwendete man eine entsprechende Blot-Apparatur, die sich aus zwei flächigen Elektroden zusammensetzte. Auf die untere Elektrode (Anode) wurden nacheinander in Semidry-Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere 3MM, die Membran, das Gel, sowie weitere Lagen von Whatman-Papier 3MM blasenfrei aufgelegt. Nach Aufsetzen des Deckels (obere Elektrode=Kathode) wurde nun eine Stromstärke von max. 5 mA/cm^2 Gel angelegt und damit der 30 min Elektrotransfer gestartet. Das im Puffer vorhandene Methanol erleichterte dabei das Herauslösen der Proteine aus dem Gel. Nach Beendigung des Transfers wurden Membran und Gel entnommen. Das Gel wurde nun optional mit Coomassie gefärbt und die Membran für den immunologischen Nachweis bestimmter Proteine verwendet.

8.5.5.3. Immundetektion von Proteinen

Zur Angleichung an neue Pufferbedingungen nach dem Elektrotransfer wusch man die Nitrocellulose-Membran zunächst dreimal kurz unter Schwenken in 1 x PBS. Hiernach wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch eine 30 min Inkubation in Blocking-Lösung abgesättigt. Eine zu hohe Konzentration des Blockierungsreagenzes oder eine zu lange Blockierungszeit kann dabei zur Ablösung oder zur Überdeckung der transferierten Proteine führen. Es folgte die Zugabe des Primär-Antikörpers (Hybridoma-Überstand) in einer 1:5 Verdünnung in frischer Blocking-Lösung. Die Inkubation erfolgte unter Schwenken über Nacht. Die AK-Lösung wurde entnommen und die Membran zur Entfernung ungebundener Antikörper dreimal in 1 x PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (Kaninchen-anti-Maus IgG, konjugiert mit alk. Phosphatase). Der Antikörper lag dabei 1:5000 verdünnt in Blocking-Lösung vor. Nach mind. 2 h Inkubation unter Schwenken bei Raumtemperatur wurde der sekundäre Antikörper entfernt, die Membran zweimal in 1 x PBS gewaschen und in Carbonatpuffer, pH10,5 äquilibriert. Durch Zugabe von 20 ml frischem Carbonatpuffer zusammen mit 37,5 µl BCIP (50 mg/ml Dimethylformamid) als Substrat und 12,5 µl NBT (75 mg/ml 70% Dimethylformamid) wurde nun die dem indirekten Proteinnachweis dienende Farbreaktion initiiert, wobei das Substrat an Orten der Antikörperbindung unter blaugrauer Farbentwicklung enzymatisch gespalten wurde und präzipitierte. Die Reaktion wurde durch Austausch des Puffers gegen deionisiertes Wasser gestoppt und die angefärbte Membran zur Dokumentation am PC eingescannt.

8.5.5.4. Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Um nach der SDS-PAGE das Proteinmuster der einzelnen Fraktionen darzustellen, wurde das Gel über Nacht in einer Coomassie-Färbelösung geschwenkt. In dieser Zeit kommt es zur Bindung des Farbstoffes an die hydrophoben Proteindomänen. Die Entfernung überschüssigen Farbstoffes erfolgte die sukzessive Inkubation in der Entfärberlösung, bis ein nahezu farbfreier Gelhintergrund erschien. Das Gel wurde nun kurz in H₂O geschwenkt und schließlich in Folie eingeschweißt.

Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 1-2 µg Protein pro Bande. Coomassie-Färbelösung und Entfärberlösung konnten mehrmals verwendet werden.

8.5.6. Enzym-Aktivitätsmessungen [verändert nach Dimond *et al.*, 1981]

1 x 10⁵ Zellen wurden auf einer 5 ml-Petrischale in Kultur gebracht und für drei Tage wachsen gelassen. Nach der mikroskopischen Überprüfungen eines auf allen Platten vergleichbaren nahezu konfluenten Bewuchses (~5 x 10⁶ Zellen) wurde das überstehende Medium vollständig entfernt, das Volumen bestimmt und auf Eis gelagert. Die in der Schale

verbliebenen Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml einer wässrigen 0,5% Triton X-100 Lösung lysiert und der Extrakt ebenfalls gekühlt gelagert.

Zur Bestimmung der Sauren Phosphatase-Aktivität wurden je 20 µl der Zell- und Überstand-Fraktion mit 480 µl PNPP-Substratpuffer (16,4 mM p-Nitrophenylphosphat in 37 mM Natriumacetat, 1mM EDTA, pH 5,0) versetzt.

Zur Bestimmung der α -Mannosidase-Aktivität wurden je 200 µl der Zell- und Überstand-Fraktion mit 300 µl PNP α M-Substratpuffer (5 mM p-Nitrophenyl- α - D-mannopyranosid in 5 mM Natriumacetat, pH 5,0) versetzt. In beiden Messungen wurden Nullwert-Proben mit Kulturmedium und 0,5%iger Triton X-100-Lösung mitgeführt.

Die Proben wurden für 30 min bei 35°C inkubiert und die Enzymreaktion daraufhin durch Zugabe von 500 µl 1M Na₂CO₃ gestoppt. Das bei beiden Reaktionen gebildete p-Nitrophenol liegt unter basischen Bedingungen als Anion vor und bewirkt eine Gelbfärbung der Reaktionslösung. Diese wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm quantifiziert und gegen die jeweiligen Nullwert-Proben abgeglichen. Die gemessenen Werte der Überstands-Fraktionen wurden ihrem jeweiligen Ausgangsvolumen angeglichen.

Die Gesamtaktivität aus Zell- und Überstandfraktion einer Probe (Petrischale) wurde gleich 100% gesetzt und der jeweilige prozentuale Anteil beider Fraktionen bestimmt.

Der für die Zellfraktion des Wildtyps Ax-2 in einer Messreihe bestimmte anteilige Prozentsatz wurde gleich 100% gesetzt und die ermittelten anteiligen Prozentsätze der in derselben Messreihe mitgeführten Mutanten wurden diesem Wert zugeordnet.

Alternativ wurden Zellen in Schüttelkultur zu einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml angezogen und 1 ml dieser Kultur für die Messungen verwendet. In diesem Fall wurden die Zellen abzentrifugiert (2000 rpm, 3 min, Biofuge) und das Pellet, sowie der Überstand entsprechend der obigen Beschreibung weiterbehandelt, wobei in diesem Fall eine Anpassung an das Überstands-Volumen entfiel.

9. Literaturverzeichnis

- Agne, B., N.M. Meindl, K. Niederhoff, H. Einwachter, P. Rehling, A. Sickmann, H.E. Meyer, W. Girzalsky, and W.H. Kunau. 2003. Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol Cell*. 11:635-46.
- Aguado-Velasco, C., and M.S. Bretscher. 1999. Circulation of the plasma membrane in Dictyostelium. *Mol Biol Cell*. 10:4419-27.
- Aizawa, H., Y. Fukui, and I. Yahara. 1997. Live dynamics of Dictyostelium cofilin suggests a role in remodeling actin latticework into bundles. *J Cell Sci*. 110 (Pt 19):2333-44.
- Aizawa, H., M. Katadae, M. Maruya, M. Sameshima, K. Murakami-Murofushi, and I. Yahara. 1999. Hyperosmotic stress-induced reorganization of actin bundles in Dictyostelium cells over-expressing cofilin. *Genes Cells*. 4:311-24.
- Aizawa, H., K. Sutoh, S. Tsubuki, S. Kawashima, A. Ishii, and I. Yahara. 1995. Identification, characterization, and intracellular distribution of cofilin in Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem*. 270:10923-32.
- Aizawa, H., K. Sutoh, and I. Yahara. 1996. Overexpression of cofilin stimulates bundling of actin filaments, membrane ruffling, and cell movement in Dictyostelium. *J Cell Biol*. 132:335-44.
- Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, L. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 1998. Essential Cell Biology - An Introduction to the Molecular Biology of the Cell. *Garland Publishing*.
- Amberg, D.C., E. Basart, and D. Botstein. 1995. Defining protein interactions with yeast actin in vivo. *Nat Struct Biol*. 2:28-35.
- Aubry, L., G. Klein, J.L. Martiel, and M. Satre. 1993. Kinetics of endosomal pH evolution in Dictyostelium discoideum amoebae. Study by fluorescence spectroscopy. *J Cell Sci*. 105 (Pt 3):861-6.
- Bachmann, C., L. Fischer, U. Walter, and M. Reinhard. 1999. The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem*. 274:23549-57.
- Bamburg, J.R. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15:185-230.
- Bamburg, J.R., A. McGough, and S. Ono. 1999. Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol*. 9:364-70.
- Baptiste, E., H. Brinkmann, J.A. Lee, D.V. Moore, C.W. Sensen, P. Gordon, L. Durufle, T. Gaasterland, P. Lopez, M. Muller, and H. Philippe. 2002. The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: Dictyostelium, Entamoeba, and Mastigamoeba. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:1414-9.
- Barzik, M., T.I. Kotova, H.N. Higgs, L. Hazelwood, D. Hanein, F.B. Gertler, and D.A. Schafer. 2005. Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem*. 280:28653-62.
- Bear, J.E., J.J. Loureiro, I. Libova, R. Fassler, J. Wehland, and F.B. Gertler. 2000. Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell*. 101:717-28.
- Bear, J.E., J.F. Rawls, and C.L. Saxe, 3rd. 1998. SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J Cell Biol*. 142:1325-35.
- Bear, J.E., T.M. Svitkina, M. Krause, D.A. Schafer, J.J. Loureiro, G.A. Strasser, I.V. Maly, O.Y. Chaga, J.A. Cooper, G.G. Borisy, and F.B. Gertler. 2002. Antagonism between

- Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*. 109:509-21.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Bischoff, F.R., C. Klebe, J. Kretschmer, A. Wittinghofer, and H. Ponstingl. 1994. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:2587-91.
- Blaauw, M., M.H. Linskens, and P.J. van Haastert. 2000. Efficient control of gene expression by a tetracycline-dependent transactivator in single *Dictyostelium discoideum* cells. *Gene*. 252:71-82.
- Bobkov, A.A., A. Muhlrads, K. Kokabi, S. Vorobiev, S.C. Almo, and E. Reisler. 2002. Structural effects of cofilin on longitudinal contacts in F-actin. *J Mol Biol.* 323:739-50.
- Bonner, J.T., and M.E. Hoffman. 1963. Evidence for a Substance Responsible for the Spacing Pattern of Aggregation and Fruiting in the Cellular Slime Molds. *J Embryol Exp Morphol.* 11:571-89.
- Bray, D. 2001. Cell Movements - from molecules to motility, 2nd Edition. *Garland Publishing*.
- Brown, L.A., and A. Baker. 2003. Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med.* 7:388-400.
- Buczynski, G., B. Grove, A. Nomura, M. Kleve, J. Bush, R.A. Firtel, and J. Cardelli. 1997. Inactivation of two *Dictyostelium discoideum* genes, DdPIK1 and DdPIK2, encoding proteins related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinases, results in defects in endocytosis, lysosome to postlysosome transport, and actin cytoskeleton organization. *J Cell Biol.* 136:1271-86.
- Cai, L., N. Holoweckyj, M.D. Schaller, and J.E. Bear. 2005. Phosphorylation of coronin 1B by protein kinase C regulates interaction with Arp2/3 and cell motility. *J Biol Chem.* 280:31913-23.
- Cai, L., T.W. Marshall, A.C. Uetrecht, D.A. Schafer, and J.E. Bear. 2007. Coronin 1B coordinates Arp2/3 complex and cofilin activities at the leading edge. *Cell*. 128:915-29.
- Cardelli, J. 2001. Phagocytosis and macropinocytosis in *Dictyostelium*: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic*. 2:311-20.
- Carlier, M.F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G.X. Xia, Y. Hong, N.H. Chua, and D. Pantaloni. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* 136:1307-22.
- Carlier, M.F., F. Ressayre, and D. Pantaloni. 1999. Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *J Biol Chem.* 274:33827-30.
- Cartier, L., S. Galvez, and D.C. Gajdusek. 1985. Familial clustering of the ataxic form of Creutzfeldt-Jakob disease with Hirano bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 48:234-8.
- Chan, A.Y., M. Bailly, N. Zebda, J.E. Segall, and J.S. Condeelis. 2000. Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J Cell Biol.* 148:531-42.
- Chang, C.C., D.S. Warren, K.A. Sacksteder, and S.J. Gould. 1999. PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. *J Cell Biol.* 147:761-74.
- Charette, S.J., and P. Cosson. 2006. Exocytosis of late endosomes does not directly contribute membrane to the formation of phagocytic cups or pseudopods in *Dictyostelium*. *FEBS Lett.* 580:4923-8.

- Charette, S.J., V. Mercanti, F. Letourneur, N. Bennett, and P. Cosson. 2006. A role for adaptor protein-3 complex in the organization of the endocytic pathway in *Dictyostelium*. *Traffic*. 7:1528-38.
- Chereau, D., and R. Dominguez. 2006. Understanding the role of the G-actin-binding domain of Ena/VASP in actin assembly. *J Struct Biol*. 155:195-201.
- Clarke, M., and S.C. Kayman. 1987. The axenic mutations and endocytosis in *Dictyostelium*. *Methods Cell Biol*. 28:157-76.
- Clarke, M., and L. Maddera. 2006. Phagocyte meets prey: uptake, internalization, and killing of bacteria by *Dictyostelium* amoebae. *Eur J Cell Biol*. 85:1001-10.
- Clarke, M., A. Muller-Taubenberger, K.I. Anderson, U. Engel, and G. Gerisch. 2006. Mechanically induced actin-mediated rocketing of phagosomes. *Mol Biol Cell*. 17:4866-75.
- Cohn, Z.A., Hirsch, J. G. and Wiener, E. 1963. In "Ciba Foundation Symposium Lysosomes " (A. V. S. De Reuck and M. P. Cameron, eds.). *J. & A. Churchill, London.*:126-150.
- Coorsen, J.R., H. Schmitt, and W. Almers. 1996. Ca²⁺ triggers massive exocytosis in Chinese hamster ovary cells. *Embo J*. 15:3787-91.
- Cordes, V.C., S. Reidenbach, and W.W. Franke. 1995. High content of a nuclear pore complex protein in cytoplasmic annulate lamellae of *Xenopus* oocytes. *Eur J Cell Biol*. 68:240-55.
- Cornillon, S., A. Dubois, F. Bruckert, Y. Lefkir, A. Marchetti, M. Benghezal, A. De Lozanne, F. Letourneur, and P. Cosson. 2002. Two members of the beige/CHS (BEACH) family are involved at different stages in the organization of the endocytic pathway in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*. 115:737-44.
- Cornillon, S., L. Gebbie, M. Benghezal, P. Nair, S. Keller, B. Wehrle-Haller, S.J. Charette, F. Bruckert, F. Letourneur, and P. Cosson. 2006. An adhesion molecule in free-living *Dictyostelium* amoebae with integrin beta features. *EMBO Rep*. 7:617-21.
- Cornillon, S., E. Pech, M. Benghezal, K. Ravanel, E. Gaynor, F. Letourneur, F. Bruckert, and P. Cosson. 2000. Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in *dictyostelium* adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem*. 275:34287-92.
- Cox, D., C.C. Tseng, G. Bjekic, and S. Greenberg. 1999. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem*. 274:1240-7.
- Dalbey, R., E., and G. von Heijne. 2002. Protein Targeting Transport & Translocation. *Academic Press, Elsevier Science*.
- de Hostos, E.L., B. Bradtke, F. Lottspeich, R. Guggenheim, and G. Gerisch. 1991. Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *Embo J*. 10:4097-104.
- de Hostos, E.L., C. Rehfuess, B. Bradtke, D.R. Waddell, R. Albrecht, J. Murphy, and G. Gerisch. 1993. *Dictyostelium* mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. *J Cell Biol*. 120:163-73.
- Defacque, H., M. Egeberg, A. Habermann, M. Diakonova, C. Roy, P. Mangeat, W. Voelter, G. Marriott, J. Pfannstiel, H. Faulstich, and G. Griffiths. 2000. Involvement of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes. *Embo J*. 19:199-212.
- DesMarais, V., M. Ghosh, R. Eddy, and J. Condeelis. 2005. Cofilin takes the lead. *J Cell Sci*. 118:19-26.
- Dimond, R.L., R.A. Burns, and K.B. Jordan. 1981. Secretion of Lysosomal enzymes in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*. 256:6565-72.

- Dormann, D., G. Weijer, S. Dowler, and C.J. Weijer. 2004. In vivo analysis of 3-phosphoinositide dynamics during Dictyostelium phagocytosis and chemotaxis. *J Cell Sci.* 117:6497-509.
- Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127-45.
- Dowler, S., L. Montalvo, D. Cantrell, N. Morrice, and D.R. Alessi. 2000. Phosphoinositide 3-kinase-dependent phosphorylation of the dual adaptor for phosphotyrosine and 3-phosphoinositides by the Src family of tyrosine kinase. *Biochem J.* 349:605-10.
- Drengk, A. 2003. Funktionsanalysen der Domänen des Vacuolin B und die Rolle des filamentösen Actins am Vacuolin B-positiven Kompartiment im endocytotischen Transit in Dictyostelium discoideum. *Dissertation, Fachbereich 19, Universität Kassel.*
- Drengk, A., J. Fritsch, C. Schmauch, H. Ruhling, and M. Maniak. 2003. A coat of filamentous actin prevents clustering of late-endosomal vacuoles in vivo. *Curr Biol.* 13:1814-9.
- Durrwang, U., S. Fujita-Becker, M. Erent, F.J. Kull, G. Tsiavaliaris, M.A. Geeves, and D.J. Manstein. 2006. Dictyostelium myosin-1E is a fast molecular motor involved in phagocytosis. *J Cell Sci.* 119:550-8.
- Ebert, D.L., K.B. Jordan, and R.L. Dimond. 1990. Lysosomal enzyme secretory mutants of Dictyostelium discoideum. *J Cell Sci.* 96 (Pt 3):491-500.
- Eichinger, L., J.A. Pachebat, G. Glockner, M.A. Rajandream, R. Sugang, 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. Louseged, 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, and A. Kuspa. 2005. The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature.* 435:43-57.
- Eitzen, G., L. Wang, N. Thorngren, and W. Wickner. 2002. Remodeling of organelle-bound actin is required for yeast vacuole fusion. *J Cell Biol.* 158:669-79.
- Evan, G.I., G.K. Lewis, G. Ramsay, and J.M. Bishop. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol.* 5:3610-6.
- Evangelista, M., D. Pruyne, D.C. Amberg, C. Boone, and A. Bretscher. 2002. Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol.* 4:260-9.
- Faix, J., and R. Grosse. 2006. Staying in shape with formins. *Dev Cell.* 10:693-706.
- Fechheimer, M. 1987. The Dictyostelium discoideum 30,000-dalton protein is an actin filament-bundling protein that is selectively present in filopodia. *J Cell Biol.* 104:1539-51.
- Fernandez, R., J.M. Fernandez, C. Cervera, S. Teijeira, A. Teijeiro, C. Dominguez, and C. Navarro. 1999. Adult glycogenosis II with paracrystalline mitochondrial inclusions and Hirano bodies in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord.* 9:136-43.

- Fey, P., S. Stephens, M.A. Titus, and R.L. Chisholm. 2002. SadA, a novel adhesion receptor in Dictyostelium. *J Cell Biol.* 159:1109-19.
- Fischer, M., I. Haase, E. Simmeth, G. Gerisch, and A. Muller-Taubenberger. 2004. A brilliant monomeric red fluorescent protein to visualize cytoskeleton dynamics in Dictyostelium. *FEBS Lett.* 577:227-32.
- Fujiki, Y., Y. Matsuzono, T. Matsuzaki, and M. Fransen. 2006. Import of peroxisomal membrane proteins: the interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1763:1639-46.
- Fukui, Y., E.L. de Hostos, and S. Inoue. 1997. Dynamics of GFP-coronin and eupodia in live Dictyostelium observed with real-time confocal optics. *Biol Bull.* 193:224-5.
- Furukawa, R., and M. Fechheimer. 1994. Differential localization of alpha-actinin and the 30 kD actin-bundling protein in the cleavage furrow, phagocytic cup, and contractile vacuole of Dictyostelium discoideum. *Cell Motil Cytoskeleton.* 29:46-56.
- Gatto, G.J., Jr., E.L. Maynard, A.L. Guerrero, B.V. Geisbrecht, S.J. Gould, and J.M. Berg. 2003. Correlating structure and affinity for PEX5:PTS1 complexes. *Biochemistry.* 42:1660-6.
- Geese, M., J.J. Loureiro, J.E. Bear, J. Wehland, F.B. Gertler, and A.S. Sechi. 2002. Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of listeria requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Mol Biol Cell.* 13:2383-96.
- Gerisch, G., R. Albrecht, C. Heizer, S. Hodgkinson, and M. Maniak. 1995. Chemoattractant-controlled accumulation of coronin at the leading edge of Dictyostelium cells monitored using a green fluorescent protein-coronin fusion protein. *Curr Biol.* 5:1280-5.
- Gertler, F.B., K. Niebuhr, M. Reinhard, J. Wehland, and P. Soriano. 1996. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell.* 87:227-39.
- Gibson, P.H. 1978. Light and electron microscopic observations on the relationship between Hirano bodies, neuron and glial perikarya in the human hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl).* 42:165-71.
- Gibson, P.H., and B.E. Tomlinson. 1977. Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 33:199-206.
- Glover, J.R., D.W. Andrews, and R.A. Rachubinski. 1994. Saccharomyces cerevisiae peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:10541-5.
- Goley, E.D., and M.D. Welch. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:713-26.
- Gordon, S.B., G.R. Irving, R.A. Lawson, M.E. Lee, and R.C. Read. 2000. Intracellular trafficking and killing of Streptococcus pneumoniae by human alveolar macrophages are influenced by opsonins. *Infect Immun.* 68:2286-93.
- Gotthardt, D., V. Blancheteau, A. Bosserhoff, T. Ruppert, M. Delorenzi, and T. Soldati. 2006. Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Mol Cell Proteomics.* 5:2228-43.
- Gotthardt, D., H.J. Warnatz, O. Henschel, F. Bruckert, M. Schleicher, and T. Soldati. 2002. High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. *Mol Biol Cell.* 13:3508-20.
- Gould, S.J., and C.S. Collins. 2002. Opinion: peroxisomal-protein import: is it really that complex? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:382-9.

- Gould, S.J., G.A. Keller, N. Hosken, J. Wilkinson, and S. Subramani. 1989. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol.* 108:1657-64.
- Gould, S.J., G.A. Keller, and S. Subramani. 1988. Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J Cell Biol.* 107:897-905.
- Hacker, U., R. Albrecht, and M. Maniak. 1997. Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* 110:105-12.
- Han, Y.H., C.Y. Chung, D. Wessels, S. Stephens, M.A. Titus, D.R. Soll, and R.A. Firtel. 2002. Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in *dictyostelium*. *J Biol Chem.* 277:49877-87.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-80.
- Harris, E., N. Wang, W.L. Wu, A. Weatherford, A. De Lozanne, and J. Cardelli. 2002. *Dictyostelium* LvsB mutants model the lysosomal defects associated with Chediak-Higashi syndrome. *Mol Biol Cell.* 13:656-69.
- Hirano, A. 1994. Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 20:3-11.
- Hirano, A., H.M. Dembitzer, L.T. Kurland, and H.M. Zimmerman. 1968. The fine structure of some intraganglionic alterations. Neurofibrillary tangles, granulovacuolar bodies and "rod-like" structures as seen in Guam amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex. *J Neuropathol Exp Neurol.* 27:167-82.
- Hirota, Y., N. Masuyama, T. Kuronita, H. Fujita, M. Himeno, and Y. Tanaka. 2004. Analysis of post-lysosomal compartments. *Biochem Biophys Res Commun.* 314:306-12.
- Hodel, A.E., M.T. Harreman, K.F. Pulliam, M.E. Harben, J.S. Holmes, M.R. Hodel, K.M. Berland, and A.H. Corbett. 2006. Nuclear localization signal receptor affinity correlates with in vivo localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 281:23545-56.
- Hoepfner, D., D. Schildknecht, I. Braakman, P. Philippsen, and H.F. Tabak. 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell.* 122:85-95.
- Holtta-Vuori, M., F. Alpy, K. Tanhuanpaa, E. Jokitalo, A.L. Mutka, and E. Ikonen. 2005. MLN64 is involved in actin-mediated dynamics of late endocytic organelles. *Mol Biol Cell.* 16:3873-86.
- Humphries, C.L., H.I. Balcer, J.L. D'Agostino, B. Winsor, D.G. Drubin, G. Barnes, B.J. Andrews, and B.L. Goode. 2002. Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin. *J Cell Biol.* 159:993-1004.
- Huttelmaier, S., B. Harbeck, O. Steffens, T. Messerschmidt, S. Illenberger, and B.M. Jockusch. 1999. Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett.* 451:68-74.
- Ibarra, N., A. Pollitt, and R.H. Insall. 2005. Regulation of actin assembly by SCAR/WAVE proteins. *Biochem Soc Trans.* 33:1243-6.
- Insall, R., A. Muller-Taubenberger, L. Machesky, J. Kohler, E. Simmeth, S.J. Atkinson, I. Weber, and G. Gerisch. 2001. Dynamics of the *Dictyostelium* Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 50:115-28.
- Ishikawa, R., Y. Sasaki, A. Nakamura, T. Takagi, and K. Kohama. 1995. Purification of an ATP-dependent actin-binding protein from a lower eukaryote, *Physarum polycephalum*. *Biochem Biophys Res Commun.* 212:347-52.

- Jaiswal, J.K., N.W. Andrews, and S.M. Simon. 2002. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J Cell Biol.* 159:625-35.
- Jenne, N., R. Rauchenberger, U. Hacker, T. Kast, and 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.
- Jung, G., K. Remmert, X. Wu, J.M. Volosky, and J.A. Hammer, 3rd. 2001. The Dictyostelium CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *J Cell Biol.* 153:1479-97.
- Kaiser, D.A., V.K. Vinson, D.B. Murphy, and T.D. Pollard. 1999. Profilin is predominantly associated with monomeric actin in *Acanthamoeba*. *J Cell Sci.* 112 (Pt 21):3779-90.
- Kalab, P., K. Weis, and R. Heald. 2002. Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science.* 295:2452-6.
- Kalderon, D., W.D. Richardson, A.F. Markham, and A.E. Smith. 1984. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature.* 311:33-8.
- Kjeken, R., M. Egeberg, A. Habermann, M. Kuehnel, P. Peyron, M. Floetenmeyer, P. Walther, A. Jahraus, H. Defacque, S.A. Kuznetsov, and G. Griffiths. 2004. Fusion between phagosomes, early and late endosomes: a role for actin in fusion between late, but not early endocytic organelles. *Mol Biol Cell.* 15:345-58.
- Konzok, A., I. Weber, E. Simmeth, U. Hacker, M. Maniak, and A. Muller-Taubenberger. 1999. DAip1, a Dictyostelium homologue of the yeast actin-interacting protein 1, is involved in endocytosis, cytokinesis, and motility. *J Cell Biol.* 146:453-64.
- Kovar, D.R. 2006. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 18:11-7.
- Krause, M., E.W. Dent, J.E. Bear, J.J. Loureiro, and F.B. Gertler. 2003. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:541-64.
- Kunau, W.H. 2001. Peroxisomes: the extended shuttle to the peroxisome matrix. *Curr Biol.* 11:R659-62.
- Kwiatkowski, A.V., F.B. Gertler, and J.J. Loureiro. 2003. Function and regulation of Ena/VASP proteins. *Trends Cell Biol.* 13:386-92.
- Kyhse-Andersen, J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* 10:203-9.
- Kypri, E., C. Schmauch, M. Maniak, and A. De Lozanne. 2007. The BEACH protein LvsB is localized on lysosomes and postlysosomes and limits their fusion with early endosomes. *Traffic.* in press.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lametschwandtner, G., C. Brocard, M. Fransen, P. Van Veldhoven, J. Berger, and A. Hartig. 1998. The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J Biol Chem.* 273:33635-43.
- Lee, E., and D.A. Knecht. 2002. Visualization of actin dynamics during macropinocytosis and exocytosis. *Traffic.* 3:186-92.

- Lee, M.S., R.T. Mullen, and R.N. Trelease. 1997. Oilseed isocitrate lyases lacking their essential type 1 peroxisomal targeting signal are piggybacked to glyoxysomes. *Plant Cell*. 9:185-97.
- Legakis, J.E., and S.R. Terlecky. 2001. PTS2 protein import into mammalian peroxisomes. *Traffic*. 2:252-60.
- Lim, R.W., and M. Fechheimer. 1997. Overexpression, purification, and characterization of recombinant Dictyostelium discoideum calcium-regulated 34,000-dalton F-actin bundling protein from Escherichia coli. *Protein Expr Purif*. 9:182-90.
- Lim, R.W., R. Furukawa, S. Eagle, R.C. Cartwright, and M. Fechheimer. 1999a. Three distinct F-actin binding sites in the Dictyostelium discoideum 34,000 dalton actin bundling protein. *Biochemistry*. 38:800-12.
- Lim, R.W., R. Furukawa, and M. Fechheimer. 1999b. Evidence of intramolecular regulation of the Dictyostelium discoideum 34 000 Da F-actin-bundling protein. *Biochemistry*. 38:16323-32.
- Lodish, H., A. Berk, S. Zipursky, L., P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell. 2001. Molecular Cell Biology, 4th Edition. *W. H. Freeman and Company*.
- Loisel, T.P., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M.F. Carlier. 1999. Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins. *Nature*. 401:613-6.
- Loomis, P.A., L. Zheng, G. Sekerkova, B. Changyaleket, E. Mugnaini, and J.R. Bartles. 2003. Espin cross-links cause the elongation of microvillus-type parallel actin bundles in vivo. *J Cell Biol*. 163:1045-55.
- Malchow, D., B. Nagele, H. Schwarz, and G. Gerisch. 1972. Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of Dictyostelium discoideum. *Eur J Biochem*. 28:136-42.
- Maniak, M. 1999. Green fluorescent protein in the visualization of particle uptake and fluid-phase endocytosis. *Methods Enzymol*. 302:43-50.
- Maniak, M. 2002. Conserved features of endocytosis in Dictyostelium. *Int Rev Cytol*. 221:257-87.
- Maniak, M., R. Rauchenberger, R. Albrecht, J. Murphy, and G. Gerisch. 1995. Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell*. 83:915-24.
- Manstein, D.J., H.P. Schuster, P. Morandini, and D.M. Hunt. 1995. Cloning vectors for the production of proteins in Dictyostelium discoideum. *Gene*. 162:129-34.
- Maselli, A., R. Furukawa, S.A. Thomson, R.C. Davis, and M. Fechheimer. 2003. Formation of Hirano bodies induced by expression of an actin cross-linking protein with a gain-of-function mutation. *Eukaryot Cell*. 2:778-87.
- Maselli, A.G., R. Davis, R. Furukawa, and M. Fechheimer. 2002. Formation of Hirano bodies in Dictyostelium and mammalian cells induced by expression of a modified form of an actin-crosslinking protein. *J Cell Sci*. 115:1939-49.
- Maul, G.G., H.M. Maul, J.E. Scogna, M.W. Lieberman, G.S. Stein, B.Y. Hsu, and T.W. Borun. 1972. Time sequence of nuclear pore formation in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes and in HeLa cells during the cell cycle. *J Cell Biol*. 55:433-47.
- May, R.C., M.E. Hall, H.N. Higgs, T.D. Pollard, T. Chakraborty, J. Wehland, L.M. Machesky, and A.S. Sechi. 1999. The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of Listeria monocytogenes. *Curr Biol*. 9:759-62.
- Mayer, A. 2002. Membrane fusion in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 18:289-314.

- McGough, A., and W. Chiu. 1999. ADF/cofilin weakens lateral contacts in the actin filament. *J Mol Biol.* 291:513-9.
- McGough, A., B. Pope, W. Chiu, and A. Weeds. 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol.* 138:771-81.
- McNew, J.A., and J.M. Goodman. 1994. An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J Cell Biol.* 127:1245-57.
- McRobbie, S.J., and P.C. Newell. 1983. Changes in actin associated with the cytoskeleton following chemotactic stimulation of dictyostelium discoideum. *Biochem Biophys Res Commun.* 115:351-9.
- Merrifield, C.J., S.E. Moss, C. Ballestrem, B.A. Imhof, G. Giese, I. Wunderlich, and W. Almers. 1999. Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol.* 1:72-4.
- Millard, T.H., S.J. Sharp, and L.M. Machesky. 2004. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J.* 380:1-17.
- Morrow, I.C., and R.G. Parton. 2005. Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic.* 6:725-40.
- Morrow, I.C., S. Rea, S. Martin, I.A. Prior, R. Prohaska, J.F. Hancock, D.E. James, and R.G. Parton. 2002. Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *J Biol Chem.* 277:48834-41.
- Muallem, S., K. Kwiatkowska, X. Xu, and H.L. Yin. 1995. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol.* 128:589-98.
- Muller, I., N. Subert, H. Otto, R. Herbst, H. Ruhling, M. Maniak, and M. Leippe. 2005. A Dictyostelium mutant with reduced lysozyme levels compensates by increased phagocytic activity. *J Biol Chem.* 280:10435-43.
- Nemergut, M.E., C.A. Mizzen, T. Stukenberg, C.D. Allis, and I.G. Macara. 2001. Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science.* 292:1540-3.
- Neuhaus, E.M., W. Almers, and T. Soldati. 2002. Morphology and dynamics of the endocytic pathway in Dictyostelium discoideum. *Mol Biol Cell.* 13:1390-407.
- Neuhaus, E.M., and T. Soldati. 2000. A myosin I is involved in membrane recycling from early endosomes. *J Cell Biol.* 150:1013-26.
- Neumann-Giesen, C., B. Falkenbach, P. Beicht, S. Claasen, G. Luers, C.A. Stuermer, V. Herzog, and R. Tikkanen. 2004. Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem J.* 378:509-18.
- Nilsen, T., T. Slagsvold, C.S. Skjerpen, A. Brech, H. Stenmark, and S. Olsnes. 2004. Peroxisomal targeting as a tool for assaying protein-protein interactions in the living cell: cytokine-independent survival kinase (CISK) binds PDK-1 in vivo in a phosphorylation-dependent manner. *J Biol Chem.* 279:4794-801.
- Noegel, A.A., and M. Schleicher. 2000. The actin cytoskeleton of Dictyostelium: a story told by mutants. *J Cell Sci.* 113 (Pt 5):759-66.
- Nolta, K.V., J.M. Rodriguez-Paris, and T.L. Steck. 1994. Analysis of successive endocytic compartments isolated from Dictyostelium discoideum by magnetic fractionation. *Biochim Biophys Acta.* 1224:237-46.
- Novak, K.D., and M.A. Titus. 1997. Myosin I overexpression impairs cell migration. *J Cell Biol.* 136:633-47.

- Okada, K., H. Ravi, E.M. Smith, and B.L. Goode. 2006. Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol Biol Cell*. 17:2855-68.
- Ono, S. 2003. Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments. *Biochemistry*. 42:13363-70.
- Ono, S., K. Mohri, and K. Ono. 2004. Microscopic evidence that actin-interacting protein 1 actively disassembles actin-depolymerizing factor/Cofilin-bound actin filaments. *J Biol Chem*. 279:14207-12.
- Otera, H., K. Setoguchi, M. Hamasaki, T. Kumashiro, N. Shimizu, and Y. Fujiki. 2002. Peroxisomal targeting signal receptor Pex5p interacts with cargoes and import machinery components in a spatiotemporally differentiated manner: conserved Pex5p WXXXF/Y motifs are critical for matrix protein import. *Mol Cell Biol*. 22:1639-55.
- Padh, H., J. Ha, M. Lavasa, and T.L. Steck. 1993a. A post-lysosomal compartment in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*. 268:6742-7.
- Padh, H., J. Ha, M. Lavasa, and T.L. Steck. 1993b. A post-lysosomal compartment in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*. 268:6742-7.
- Pemberton, L.F., and B.M. Paschal. 2005. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*. 6:187-98.
- Peracino, B., J. Borleis, T. Jin, M. Westphal, J.M. Schwartz, L. Wu, E. Bracco, G. Gerisch, P. Devreotes, and S. Bozzaro. 1998. G protein beta subunit-null mutants are impaired in phagocytosis and chemotaxis due to inappropriate regulation of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*. 141:1529-37.
- Peterson, C., K. Suzuki, Y. Kress, and J.E. Goldman. 1986. Abnormalities of dendritic actin organization in the brindled mouse. *Brain Res*. 382:205-12.
- Pires, J.R., X. Hong, C. Brockmann, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, H. Oschkinat, and R. Erdmann. 2003. The ScPex13p SH3 domain exposes two distinct binding sites for Pex5p and Pex14p. *J Mol Biol*. 326:1427-35.
- Platta, H.W., S. Grunau, K. Rosenkranz, W. Girzalsky, and R. Erdmann. 2005. Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat Cell Biol*. 7:817-22.
- Podolski, J.L., and T.L. Steck. 1990. Length distribution of F-actin in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*. 265:1312-8.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-65.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmund, A. Bretscher, and C. Boone. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*. 297:612-5.
- Rauchenberger, R., U. Hacker, J. Murphy, J. Niewohner, and M. Maniak. 1997. Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Curr Biol*. 7:215-8.
- Ravanel, K., B. de Chasse, S. Cornillon, M. Benghezal, L. Zulianello, L. Gebbie, F. Letourneur, and P. Cosson. 2001. Membrane sorting in the endocytic and phagocytic pathway of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Cell Biol*. 80:754-64.
- Reddy, A., E.V. Caler, and N.W. Andrews. 2001. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*. 106:157-69.
- Ribbeck, K., and D. Gorlich. 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J*. 20:1320-30.

- Rivero, F., R. Albrecht, H. Dislich, E. Bracco, L. Graciotti, S. Bozzaro, and A.A. Noegel. 1999b. RacF1, a novel member of the Rho protein family in *Dictyostelium discoideum*, associates transiently with cell contact areas, macropinosomes, and phagosomes. *Mol Biol Cell*. 10:1205-19.
- Rivero, F., R. Furukawa, M. Fechheimer, and A.A. Noegel. 1999a. Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein, alpha-actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of *Dictyostelium*. *J Cell Sci*. 112 (Pt 16):2737-51.
- Rivero, F., R. Furukawa, A.A. Noegel, and M. Fechheimer. 1996. *Dictyostelium discoideum* cells lacking the 34,000-dalton actin-binding protein can grow, locomote, and develop, but exhibit defects in regulation of cell structure and movement: a case of partial redundancy. *J Cell Biol*. 135:965-80.
- Rivero, F., T. Muramoto, A.K. Meyer, H. Urushihara, T.Q. Uyeda, and C. Kitayama. 2005. A comparative sequence analysis reveals a common GBD/FH3-FH1-FH2-DAD architecture in formins from *Dictyostelium*, fungi and metazoa. *BMC Genomics*. 6:28.
- Rodal, A.A., O. Sokolova, D.B. Robins, K.M. Daugherty, S. Hippenmeyer, H. Riezman, N. Grigorieff, and B.L. Goode. 2005. Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat Struct Mol Biol*. 12:26-31.
- Rodal, A.A., J.W. Tetreault, P. Lappalainen, D.G. Drubin, and D.C. Amberg. 1999. Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments. *J Cell Biol*. 145:1251-64.
- Rupper, A., B. Grove, and J. Cardelli. 2001b. Rab7 regulates phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*. 114:2449-60.
- Rupper, A., K. Lee, D. Knecht, and J. Cardelli. 2001c. Sequential activities of phosphoinositide 3-kinase, PKB/Akt, and Rab7 during macropinosome formation in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell*. 12:2813-24.
- Rupper, A.C., J.M. Rodriguez-Paris, B.D. Grove, and J.A. Cardelli. 2001a. p110-related PI 3-kinases regulate phagosome-phagosome fusion and phagosomal pH through a PKB/Akt dependent pathway in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*. 114:1283-95.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463-7.
- Schirenbeck, A., R. Arasada, T. Bretschneider, T.E. Stradal, M. Schleicher, and J. Faix. 2006. The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:7694-9.
- Seastone, D.J., E. Harris, L.A. Temesvari, J.E. Bear, C.L. Saxe, and J. Cardelli. 2001. The WASp-like protein scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*. 114:2673-83.
- Seastone, D.J., E. Lee, J. Bush, D. Knecht, and 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*. 9:2891-904.
- Senda, S., S.F. Lee, G.P. Cote, and M.A. Titus. 2001. Recruitment of a specific amoeboid myosin I isoform to the plasma membrane in chemotactic *Dictyostelium* cells. *J Biol Chem*. 276:2898-904.
- Setoguti, T., H. Esumi, and T. Shimizu. 1974. Specific organization of intracytoplasmic filaments in the dog testicular interstitial cell. *Cell Tissue Res*. 148:493-7.
- Simon. 2000. Phagocytosis. *The host*. Stamford, CT: JAI Press.
- Simpson, P.A., J.A. Spudich, and P. Parham. 1984. Monoclonal antibodies prepared against *Dictyostelium* actin: characterization and interactions with actin. *J Cell Biol*. 99:287-95.

- Singleton, C.K., R.L. Delude, and C.E. McPherson. 1987. Characterization of genes which are deactivated upon the onset of development in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol.* 119:433-41.
- Skoble, J., V. Auerbuch, E.D. Goley, M.D. Welch, and D.A. Portnoy. 2001. Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol.* 155:89-100.
- Somesh, B.P., G. Vlahou, M. Iijima, R.H. Insall, P. Devreotes, and F. Rivero. 2006. RacG regulates morphology, phagocytosis, and chemotaxis. *Eukaryot Cell.* 5:1648-63.
- Southwick, F.S., W. Li, F. Zhang, W.L. Zeile, and D.L. Purich. 2003. Actin-based endosome and phagosome rocketing in macrophages: activation by the secretagogue antagonists lanthanum and zinc. *Cell Motil Cytoskeleton.* 54:41-55.
- Souza, G.M., D.P. Mehta, M. Lammertz, J. Rodriguez-Paris, R. Wu, J.A. Cardelli, and H.H. Freeze. 1997. *Dictyostelium* lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J Cell Sci.* 110 (Pt 18):2239-48.
- Stradal, T.E., K. Rottner, A. Disanza, S. Confalonieri, M. Innocenti, and G. Scita. 2004. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14:303-11.
- Temesvari, L.A., J.M. Bush, M.D. Peterson, K.D. Novak, M.A. Titus, and J.A. Cardelli. 1996a. Examination of the endosomal and lysosomal pathways in *Dictyostelium discoideum* myosin I mutants. *J Cell Sci.* 109 (Pt 3):663-73.
- Temesvari, L.A., J.M. Rodriguez-Paris, J.M. Bush, L. Zhang, and J.A. Cardelli. 1996b. Involvement of the vacuolar proton-translocating ATPase in multiple steps of the endo-lysosomal system and in the contractile vacuole system of *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci.* 109 (Pt 6):1479-95.
- Tilney, L.G., P.S. Connelly, L. Ruggiero, K.A. Vranich, and G.M. Guild. 2003. Actin filament turnover regulated by cross-linking accounts for the size, shape, location, and number of actin bundles in *Drosophila* bristles. *Mol Biol Cell.* 14:3953-66.
- Trifaro, J.M., M.L. Vitale, and A. Rodriguez Del Castillo. 1992. Cytoskeleton and molecular mechanisms in neurotransmitter release by neurosecretory cells. *Eur J Pharmacol.* 225:83-104.
- Troll, H., D. Malchow, A. Muller-Taubenberger, B. Humbel, F. Lottspeich, M. Ecke, G. Gerisch, A. Schmid, and R. Benz. 1992. Purification, functional characterization, and cDNA sequencing of mitochondrial porin from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem.* 267:21072-9.
- van der Klei, I.J., R.E. Hilbrands, J.A. Kiel, S.W. Rasmussen, J.M. Cregg, and M. Veenhuis. 1998. The ubiquitin-conjugating enzyme Pex4p of *Hansenula polymorpha* is required for efficient functioning of the PTS1 import machinery. *Embo J.* 17:3608-18.
- Walders-Harbeck, B., S.Y. Khaitlina, H. Hinssen, B.M. Jockusch, and S. Illenberger. 2002. The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett.* 529:275-80.
- Walton, P.A., P.E. Hill, and S. Subramani. 1995. Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell.* 6:675-83.
- Wanders, R.J., and J.M. Tager. 1998. Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease. *Mol Aspects Med.* 19:69-154.
- Wang, L., A.J. Merz, K.M. Collins, and W. Wickner. 2003. Hierarchy of protein assembly at the vertex ring domain for yeast vacuole docking and fusion. *J Cell Biol.* 160:365-74.
- Watts, D.J., and J.M. Ashworth. 1970. Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J.* 119:171-4.

- Welsch, T., N. Endlich, G. Gokce, E. Doroshenko, J.C. Simpson, W. Kriz, A.S. Shaw, and K. Endlich. 2005. Association of CD2AP with dynamic actin on vesicles in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289:F1134-43.
- Wienke, D., A. Drengk, C. Schmauch, N. Jenne, and M. Maniak. 2006. Vacuolin, a flotillin/reggie-related protein from Dictyostelium oligomerizes for endosome association. *Eur J Cell Biol.* 85:991-1000.
- Wienke, D.C., M.L. Knetsch, E.M. Neuhaus, M.C. Reedy, and D.J. Manstein. 1999. Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in Dictyostelium discoideum. *Mol Biol Cell.* 10:225-43.
- Winder, S.J. 2003. Structural insights into actin-binding, branching and bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 15:14-22.
- Yuan, A., and C.P. Chia. 2000. Role of esterase gp70 and its influence on growth and development of Dictyostelium discoideum. *Exp Cell Res.* 261:336-47.
- Zhou, K., K. Takegawa, S.D. Emr, and R.A. Firtel. 1995. A phosphatidylinositol (PI) kinase gene family in Dictyostelium discoideum: biological roles of putative mammalian p110 and yeast Vps34p PI 3-kinase homologs during growth and development. *Mol Cell Biol.* 15:5645-56.
- Zigmond, S.H. 1993. Recent quantitative studies of actin filament turnover during cell locomotion. *Cell Motil Cytoskeleton.* 25:309-16.

10. Danksagungen

Bei meinem Doktorvater Markus Maniak bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für viele hilfreiche Anregungen und Diskussionen in einer für mich sehr lehrreichen Zeit.

Wolfgang Nellen danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie einige nützliche Tipps im Laboralltag.

Für ein zweijähriges Stipendium zur weiteren Finanzierung meiner Promotionsarbeit möchte ich mich bei den Otto-Braun-Fonds bedanken.

Anja Drengk danke ich für nützliche Vorarbeiten am Hybridprotein-Ansatz.

Bei Harald Rühling möchte ich mich für die ausdauernde Geduld bedanken, mit der er mir an unterschiedlichsten Mikroskopen zur Seite gestanden hat.

Kerstin Richter und Heike Otto danke ich für die vielen kleinen und großen Handgriffe, die sie mir im Laboralltag abgenommen haben.

Heidemarie Gärtner und Hellmuth Zöltzer sei für die Hilfen bei der TEM-Untersuchung gedankt.

Bei meinen Kollegen aus den Abteilungen Zellbiologie, Genetik und Entwicklungsbiologie möchte ich mich für die materiellen und intellektuellen Hilfen, sowie der Schaffung eines angenehmen Arbeitsumfeldes herzlich bedanken.

Susan Claußner danke ich für die Klonierung des RFP-Coronin-Plasmids.

Meinen Eltern danke ich für die fortwährende Unterstützung in meiner Promotionszeit.

Nicole danke ich in vielerlei Hinsicht, vor allem aber für ihre Geduld und ihr Verständnis.