

Susan Claußner

# Die Ausbildung von Proteinaggregaten durch ektopisch lokalisierte, oligomerisierende, Aktin-bindende Proteine

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) im Fachbereich 10, Mathematik und  
Naturwissenschaften; Universität Kassel

Datum der Disputation: 30.09.2011

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, Juli 2011

---

Susan Claußner

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>7</b>
1.1 Einheiten	7
1.2 Sonstiges	8
<b>2. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>9</b>
<b>3. EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
3.1 Dictyostelium discoideum	10
3.2 Endosomen und assoziierte Proteine	12
3.2.1 Die Phago- und (Makro-)Pinozytose	12
3.2.2 Der Transit	13
3.2.3 Die Exozytose	14
3.2.4 Vacuolin	15
3.2.5 ALDH	16
3.3 Aktin und Aktin-interagierende Proteine	16
3.3.1 Die Nukleation von Aktin-Filamenten: Arp2/3, WASP	17
3.3.2 Die Elongation und der Erhalt von Aktin-Filamenten: VASP, Coactosin	19
3.3.3 Das <i>Crosslinking</i> von Aktin-Filamenten: $\alpha$ -Actinin, Filamin, Abp34	20
3.3.4 An der Membran lokalisierende Proteine: Ponticulin, Hisactophilin	22
3.3.5 Protein mit möglicher Aktin-Interaktion: Ssj758	23
3.4 Die Ubiquitin-abhängige Proteindegradation	23
3.4.1 Der proteasomale Abbau	24
3.4.2 Der lysosomale Abbau	25
3.5 Hirano Bodies als Folge anormaler Proteinaggregation	26
3.6 Aufgabenstellung	27
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>30</b>
4.1 VAM-VASP bildet Aktin-positive Aggregate aus	30
4.1.1 Die ektopische Lokalisation von VASP an ALDH-Vesikel	30
4.1.2 Die ektopische Lokalisation von VASP an Aktin-freie Organellen	32
4.1.3 Die Deletion der FAB-Domäne nimmt keinen Einfluss auf die Aggregate	37
4.1.4 Die Deletion der GAB-Domäne verhindert die Aktin-Akkumulation	39
4.1.5 Die Deletion der TETRA-Domäne führt zu keiner Bildung von Aggregaten	42
4.2 Ein Großteil an VAM-Proteinen hat keine Aggregatbildung zur Folge	45
4.3 VAM- $\alpha$ -Actinin und VAM-Filamin induzieren Aktin-freie Aggregate	52
4.3.1 Weder Aktin noch Aktin-interagierende Proteine sind nachzuweisen	52

4.3.2 Die ektopische Lokalisation von $\alpha$ -Actinin und Filamin an ALDH-Vesikel	64
4.3.3 Die ektopische Lokalisation von $\alpha$ -Actinin und Filamin an Aktin-freie Organellen	66
4.3.4 Die Deletion der CH-Domänen nimmt keinen Einfluss auf die Aggregate	68
4.3.5 Die Deletionen der Oligomerisierungsdomänen	71
<b>4.4 Alle VAM-Aggregate zeigen strukturelle Ähnlichkeit zueinander</b>	<b>74</b>
4.4.1 Die TEM-Aufnahmen heben die Homogenität der verschiedenen VAM-Aggregate hervor	74
4.4.2 Einige Proteine der VAM-Aggregate sind für den proteolytischen Abbau markiert	75
<b>4.5 Die VAM-Aggregate üben negativen Einfluss auf die Zelle aus</b>	<b>78</b>
4.5.1 Die VAM-Aggregate haben Wachstumsdefekte zur Folge	79
4.5.2 Die VAM-Aggregate nehmen Einfluss auf den endozytotischen Transit	81
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>85</b>
<b>5.1 Klassifizierung der verschiedenen VAM-Aggregate</b>	<b>86</b>
5.1.1 Aktin-haltige Aggregate	86
5.1.2 Aktin-freie Aggregate	91
<b>5.2 Die VAM-Aggregate sind ein sterisches und kein molekulares Problem</b>	<b>96</b>
<b>5.3 Die ektopische Lokalisation ist wichtig aber nicht entscheidend für die Ausbildung der VAM-Aggregate</b>	<b>102</b>
<b>5.4 Aktin wird aktiv in die VAM-VASP-Aggregate eingelagert</b>	<b>105</b>
5.4.1 Die F-Aktin-Bindung allein reicht für die Ausbildung der VAM-VASP-Aggregate nicht aus	105
5.4.2 Die Aktin-Akkumulation erfolgt aufgrund neu polymerisierter Aktin-Filamente	107
5.4.3 Die GAB-Domäne vermittelt die Aktin-Polymerisation	112
<b>5.5 Ektopisch lokalisierte, zur Oligomerisierung fähige Proteine führen zur Aggregatbildung</b>	<b>114</b>
5.5.1 Von mehreren Organellen zu einem einzigen Aggregat	115
5.5.2 Abp34: ein Monomer, Dimer und Oligomer	124
<b>6. MATERIAL</b>	<b>129</b>
<b>6.1 Geräte</b>	<b>129</b>
<b>6.2 Verbrauchsmaterialien</b>	<b>131</b>
<b>6.3 Reagenzien</b>	<b>132</b>
<b>6.4 Fluoreszenzfarbstoffe</b>	<b>134</b>
<b>6.5 Antibiotika</b>	<b>134</b>
<b>6.6 Enzyme</b>	<b>135</b>
<b>6.7 Längen- und Größenstandards</b>	<b>135</b>
<b>6.8 Kits</b>	<b>135</b>
<b>6.9 Antikörper</b>	<b>136</b>

6.9.1 Primärantikörper	136
6.9.2 Sekundärantikörper	137
<b>6.10 Puffer und Lösungen</b>	<b>137</b>
<b>6.11 Medien</b>	<b>140</b>
6.11.1 <i>Escherichia coli</i>	140
6.11.2 <i>Dictyostelium discoideum</i>	140
<b>6.12 Plasmide</b>	<b>141</b>
<b>6.13 Oligonukleotide</b>	<b>149</b>
<b>6.14 Online-Programme</b>	<b>150</b>
<b>6.15 Biologische Materialien</b>	<b>150</b>
<b>7. METHODEN</b>	<b>151</b>
<b>7.1 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>151</b>
7.1.1 Präparation von Nukleinsäuren aus <i>Escherichia coli</i>	151
7.1.2 Präparation von Nukleinsäuren aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	152
7.1.3 Enzymatische Reaktionen	153
7.1.4 Gelelektrophorese	157
<b>7.2 Transformationstechniken</b>	<b>158</b>
7.2.1 <i>Escherichia coli</i>	158
7.2.2 <i>Dictyostelium discoideum</i>	159
<b>7.3 Zellbiologische Methoden</b>	<b>160</b>
7.3.1 Anzucht in Flüssigmedium	160
7.3.2 Subklonierung	161
7.3.3 Sporengewinnung	161
7.3.4 Aufreinigung der Aggregate aus <i>Dictyostelium</i> -Zellen	161
7.3.5 Transit-Assay	162
7.3.6 Phagozytose-Assay von Platte	163
<b>7.4 Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>164</b>
7.4.1 Gewinnung von Proteinproben	164
7.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (264)	164
7.4.3 Western Blot	165
7.4.4 Immundetektion von Proteinen	165
7.4.5 Proteinbestimmung mittels Pierce BCA Kit	166
<b>7.5 Mikroskopische Methoden</b>	<b>166</b>
7.5.1 Zellfixierung für Immunfluoreszenzen	166
7.5.2 Beobachtung und Dokumentation fluoreszenzmarkierter Zellen	168
7.5.3 TEM-Präparation	168
<b>8. ANHANG</b>	<b>170</b>

<b>9. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>176</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b>	<b>190</b>

# 1. Abkürzungsverzeichnis

## 1.1 Einheiten

[v/v]	Volumenprozent
[w/v]	Gewichtsprozent
cm	Zentimeter
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
s	Sekunde
u	Unit
V	Volt
$\mu$ F	Mikrofarad
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
mA	Milliampere
OD	optische Dichte
Vol	Volumen

## 1.2 Sonstiges

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AX	axenisch
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cy3	Carbocyanin 3
<i>Dd</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Glc-Nac-1P	<i>N</i> -acetylglucosamine-1-phosphate
<i>h</i>	<i>human</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBS	HEPES gepuffertes Salz
HL5	axenisches Medium
LB	Lysogeny broth
mk	monoklonal
PBS	Phosphat gepuffertes Salz
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pk	polyklonal
P-Puffer	Soerensen-Phosphatpuffer
OI	<i>Overlay</i>
RT	Raumtemperatur
UV	Ultraviolett



## 2. Zusammenfassung

Die ektopische Lokalisation des Aktin-bündelnden Proteins VASP an die späten Endosomen mittels VacuolinA-Myc (VAM) führt zur Ausbildung von Aktin-haltigen Aggregaten, die Ähnlichkeiten mit *Hirano Bodies* haben, welche neurodegenerativen Krankheiten in verschiedenen Organen entstehen. VAM-VASP-Aggregate haben neben Aktin noch einige Aktin-interagierende Proteine sequestriert und nehmen Einfluss auf unterschiedliche physiologische Prozesse der Zelle, wie z. B. das Wachstum, die Zytokinese oder den endozytotischen Transit.

Mit dem Ziel, Ursachen für die Aggregatentstehung zu finden, wurden im Rahmen dieser Arbeit andere Aktin-interagierende Proteine an späte Endosomen lokalisiert. So führt VAM-Abp34 ebenfalls zur Ausbildung Aktin-haltiger Aggregate während VAM- $\alpha$ -Actinin und VAM-Filamin die Bildung Aktin-freier Aggregate zur Folge haben. Letztere sind hauptsächlich aus den Proteinhybriden und den jeweiligen endogenen Bindungspartnern aufgebaut und ähneln sogenannten Aggresomen. Dennoch führen die Aktin-freien VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate zu vergleichbaren physiologischen Defekten in der Zelle wie die Aktin-haltigen VAM-VASP-Aggregate.

Der Aktin-Gehalt der VAM-VASP-Aggregate ist auf das VASP-Protein zurückzuführen. Dieses Protein ist fähig, die Elongation von Aktin-Filamenten voranzutreiben und erreicht, ektopisch lokalisiert an Endosomen, Peroxisomen und *Lipid Droplets* eine Anreicherung von F-Aktin an diesen Organellen.

Ein Vergleich der Proteine VASP, Abp34,  $\alpha$ -Actinin und Filamin führt zu dem Schluss, dass die Fähigkeit der Proteine, Oligomere bilden zu können, einen relevanten Faktor in der Ausbildung der VAM-Aggregate spielt.

Die VAM-Aggregate sind sehr kompakt und stabil. Die Untersuchungen in dieser Arbeit führen zu der Annahme, dass die Aggregate durch die Überlastung der zellulären Proteindegradationsmaschinerie entstehen.

### 3. Einleitung

#### 3.1 *Dictyostelium discoideum*

Zur Klasse der Eumycetozoa gehörend wurde die Gattung *Dictyostelium* erstmalig 1869 beschrieben (1). Der heutzutage bekannteste und als Modellorganismus weit verbreitetste Vertreter in der Zell- und Entwicklungsbiologie ist *Dictyostelium discoideum*, ein Isolat aus *North Carolina* (2). Mit der Entdeckung von kontraktile und an der Verdauung beteiligten Vakuolen in diesem Organismus wurden bereits 1937 erste Schritte zur Analyse des endozytotischen Transits unternommen (Einleitung: 3.2) (3). Jedoch dient er seither vor allem der Erforschung der Zellentwicklung und damit verbundenen grundlegenden Vorgängen wie beispielsweise Zellbewegung, -teilung, -differenzierung, Signalaufnahme, -übertragung, usw. Aufgrund der Morphologie, der Fortbewegung und der Fähigkeit zur Phagozytose zeigt dieser Organismus große Ähnlichkeit mit Zellen des angeborenen Immunsystems, wodurch sich *D. discoideum* zusätzlich immer mehr zu einem System für Untersuchungen der molekularen Pathogenese, speziell der krankheitsbedingten Infektion, entwickelt (4, 5). Doch auch für Analysen bezüglich genetischen und idiopathischen Defekten, beispielsweise mitochondrialer oder neurodegenerativer Erkrankungen, und ebenso für therapeutische Studien gewinnt der Einzeller immer mehr an Bedeutung (6-8). Von großem Vorteil zeigt sich hierbei die geringe Komplexität und die Homologie vieler Proteine des Eukaryoten im Vergleich zu höher entwickelten Organismen, sowie die recht unkomplizierte genetische Manipulierbarkeit. Was diese Untersuchungen ergänzend erleichtert und *D. discoideum* für die Grundlagenforschung prädestiniert, sind zudem das haploide und vollständig sequenzierte 34 Mb-große Genom und die einfache Handhabung dieses Organismus im Labor, bedingt durch zügig ablaufenden Teilungs- und Entwicklungszyklen (9). So ist beispielsweise der vegetative, mitotische Lebenszyklus (Wachstumsphase) einer wildtypischen Zelle durch Zellteilungen, die innerhalb von nur ~9 h abgeschlossen sind, charakterisiert.

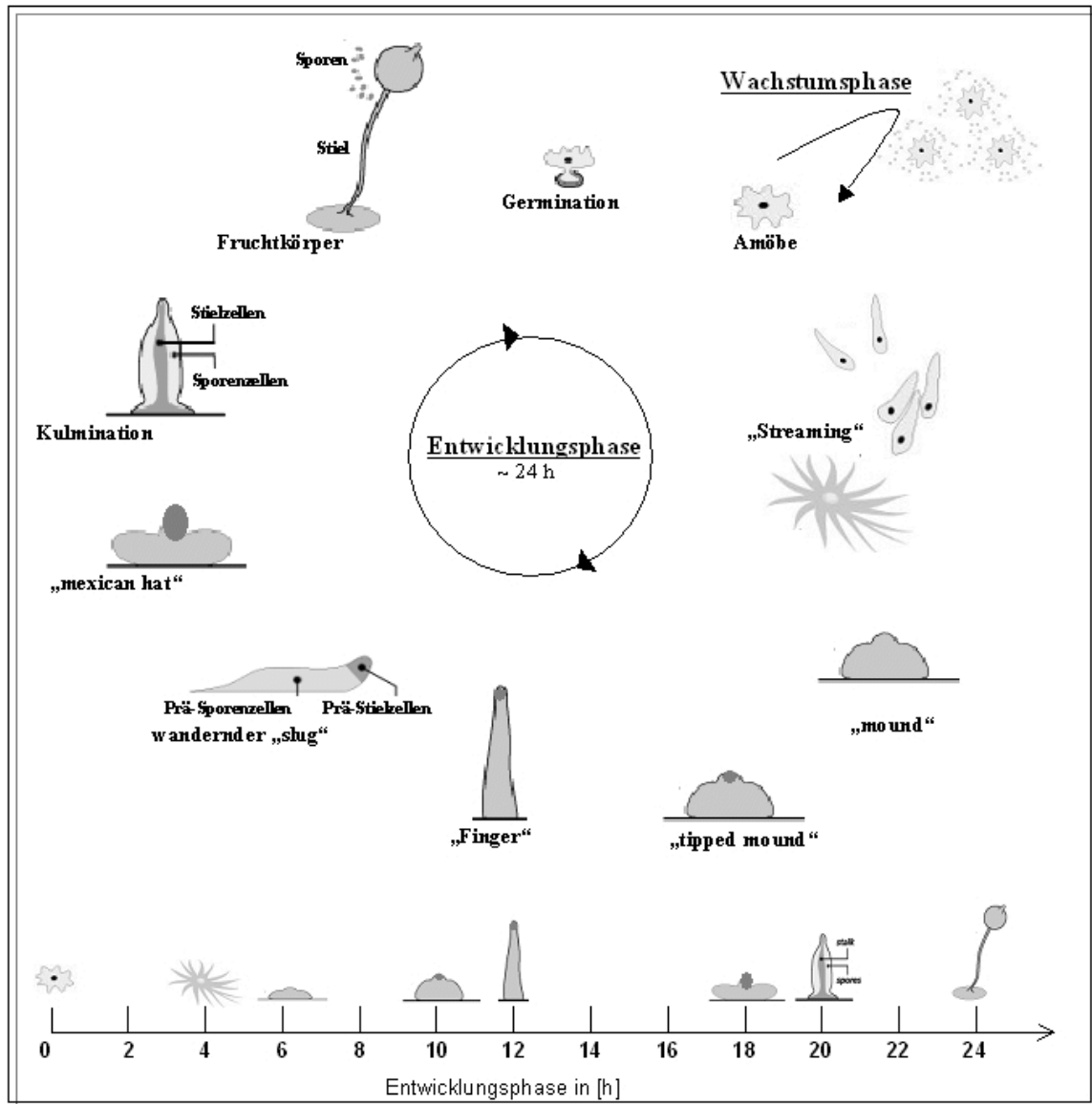


Abb. 01 – Entwicklungszyklus von *D. discoideum* (10)

Unter optimalen Bedingungen lebt der Organismus als Einzeller und vermehrt sich hauptsächlich vegetativ, auch wenn er zur sexuellen Fortpflanzung fähig ist. Wird eine gewisse Menge an verfügbarer Nahrung unterschritten, so kommt es zur Aggregation von bis zu 100.000 Zellen („Streaming“). Im multizellulären Verband („Mounds“) beginnt bereits die Differenzierung der Zellen in Prä-Sporen- und Prä-Stielzellen. Der zelluläre Verband richtet sich fingerförmig auf („Finger“) und bildet schließlich einen „Slug“, welcher während der Suche nach einer geeigneten Stelle für die Kulmination umherwandern kann. Im Slug stellt sich ein Gleichgewicht der Prä-Sporen- und Prä-Stielzellen ein: 20 % der Zellen werden zu Prä-Stielzellen und lokalisieren im vorderen Slug-Bereich, während sich die restlichen 80 % zu Prä-Sporenzellen entwickeln und im restlichen Slug zu finden sind. Ist eine geeignete Position gefunden, so wird die Kulmination des Slugs ausgelöst: An der Basis bildet sich eine Stielröhre aus, an deren Kopfende sich die Prä-Stielzellen befinden („Mexican hat“). Letztere schwellen an und sterben ab, während die Prä-Sporenzellen in die Höhe gehoben werden. Der fertige Fruchtkörper besteht aus einer verankerungsfähigen Basalscheibe, aus toten Stielzellen und aus keimungsfähigen Sporen.

Für die Ausbildung einer dauerhaften Überlebensform werden Zellen unter Nahrungsmangel kultiviert. Als Folge davon differenzieren sich die Zellen innerhalb von etwa 24 h über mehrere definierte Zwischenstadien und entwickeln sich zu sporenhaltenden Fruchtkörpern (Entwicklungsphase) (Abb. 01). Innerhalb von weiteren circa 24 h keimen die Sporen, sofern Nahrung vorhanden ist, zum Großteil bereits wieder aus.

### 3.2 Endosomen und assoziierte Proteine

Endosomen sind Organellen, die im Rahmen des endozytotischen Transits gebildet werden. Der endozytotische Zyklus in *D. discoideum* lässt sich in drei Phasen unterteilen, in 1) die Phago- bzw. Pinozytose, 2) die Transzytose und 3) die Exozytose. Die Phago- bzw. Pinozytose bezeichnen die Aufnahme von Partikeln und Flüssigkeiten aus dem extrazellulären Raum (altgriechisch; „*phagein*“: essen; „*pinos*“: trinken), während der Transit den Verdau und das Recycling des aufgenommenen Materials umfasst. Die Exozytose dient dem Ausscheiden von unverdaulichem Material aus der Zelle. Diese Phasen werden im Folgenden kurz beschrieben. Die Nummern und Kennzeichnungen in den eckigen Klammern beziehen sich dabei auf die in Abb. 02 vereinfacht dargestellten Stadien.

Zudem werden im Anschluss speziell zwei Proteine näher vorgestellt, die charakteristisch für post-lysosomale Vesikel sind und eine wichtige Rolle in der vorliegenden Arbeit spielen.

#### 3.2.1 Die Phago- und (Makro-)Pinozytose

Die Endozytose umfasst die Phago- und die Pinozytose, wobei letztere, je nach Vesikelgröße, nochmals in Mikro- ( $\emptyset = 0,1 \mu\text{m}$ ) und Makropinozytose ( $\emptyset = 2-3 \mu\text{m}$ ) unterteilt wird (11, 12). Im Fall der Phagozytose wird die Internalisierung durch das Binden eines Partikels und dem Auslösen eines Signalwegs gestartet. Durch die Rekrutierung von Aktin und Aktin-bindenden Protein, wie z. B. Coronin und Talin, kommt es zur lokalen Ausbildung von Pseudopodien, die das Partikel umschließen und durch Membranverschmelzung nach innen abschnüren (13, 14). Die Endosomen sind zu

diesem Zeitpunkt durch eine Aktin-Hülle, auch als Aktin-*Coat* bezeichnet, charakterisiert [#1].

Durch den Erwerb von drei Mutationen ist es allen Laborstämmen von *D. discoideum*, wie beispielsweise dem in dieser Abteilung verwendeten AX2, möglich, in axenischem Flüssigmedium zu wachsen (15, 16). Die Mikropinozytose ist ein Aktin-unabhängiger Clathrin-vermittelter Abschnürungsprozess (17). Bei der Makropinozytose kommt es, ähnlich wie bei der Phagozytose, zur Ausbildung von Aktin-haltigen, membranösen Fortsätzen, die hier jedoch wahllos Flüssigkeit umschließen und diese nach innen aufnehmen, indem die Membranspitzen der Ausläufer miteinander verschmelzen und so ein Endosom formen (18). Allerdings ist hierfür, anders als bei der Phagozytose, kein äußerer Stimulus notwendig (19).

### 3.2.2 Der Transit

Sind die frühen Endosomen abgeschnürt, so erfolgt der sofortige Abbau des bestehenden Aktin-*Coats* (Dauer: ~1 min), was diverse Fusions- [rote Pfeile] und Spaltungsprozesse [blaue Pfeile] begünstigt, die wiederum der Reifung der Endosomen [schwarze Pfeile] dienen (20, 21). Beispielsweise kommt es durch die Anlieferung der H<sup>+</sup>-ATPase [#2] zur Ansäuerung der Vesikel auf einen pH von ~5, was die spätere Aktivierung diverser Verdauungsenzyme und folglich den Abbau des aufgenommenen Materials mit sich ziehen (22). Des Weiteren kommt es zu Abschnürungsprozessen [#3], die dem Recycling von wieder verwendbaren Komponenten dienen und Fragmentierungen [grüne Pfeile, #4], die die Materialsortierung begünstigen (23). Neben homotypischen Fusionen [punktierter Pfeile, #5] kommt es auch zu Vesikelfusionen, die nun die Bereitstellung von Verdauungsenzymen, speziell Glc-NAc-1-P- und M-6-P-modifizierter Enzyme, ermöglichen (24). Im Verlauf der weiteren Reifung werden diese wieder in Form von Vesikeln abgeschnürt und recycelt [#6]. Da es sich hierbei um die markantesten Ereignisse in den ersten 30-45 min des Transits handelt, spricht man von der frühen, sauren Phase.

Sind die im sauren Milieu ablaufenden Prozesse abgeschlossen, so erfolgt durch den Abtransport der Protonenpumpe die Neutralisierung der Vesikel [#7], welche in Folge dessen als post-lysosomale Endosomen bezeichnet werden (22, 25, 26). Es schließen sich

andere lysosomale Abbauprozesse, vermittelt durch Proteinasen und Glykosidasen, sowie weitere homotypische Fusionen [#8], die die Anzahl an späten Endosomen reduzieren, an (27). Spezifische Proteine, die diese späte, neutrale Phase des Transits charakterisieren sind beispielsweise Aktin (Einleitung: 3.3), Coronin, Arp2/3 (Einleitung: 3.3.1), ALDH (Einleitung: 3.2.5) und Vacuolin (Einleitung: 3.2.4), die während der Vesikelreifung peripher an die Membran binden (28-30). Der neu aufgebaute F-Aktin-*Coat* inhibiert zwar weitere Membranfusionsprozesse, er erlaubt aber die Ausbildung von internen Vesikeln, resultierend in *Multivesicular bodies* (MVBs) [#9]. Zudem scheint die Aktin-Hülle wichtig für die Assoziation der späten Endosomen an den Zellkortex zu sein (28, 31). Innerhalb von 60-90 min ist der Transit abgeschlossen.

### 3.2.3 Die Exozytose

Durch die Verschmelzung der späten Endosomen [#10] mit der Zellmembran ist es der Zelle möglich, unverdautes und nicht recycelbares Material in den extrazellulären Raum abzugeben (32, 33). Der zurückbleibende Aktin-*Coat* und die assoziierten Proteine stehen der Zelle für Prozesse, wie z. B. dem endozytotischen Transit, erneut zur Verfügung (33, 34).

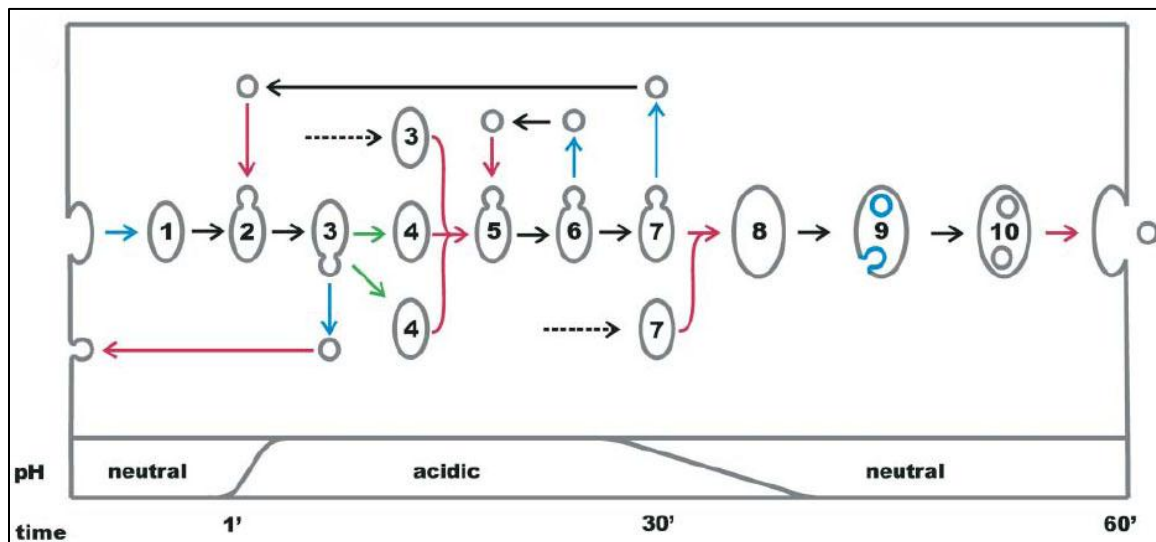


Abb. 02 – Schema des endozytotischen Transits in *D. discoideum* (23)

Dargestellt ist der Transit in einer Zelle, beginnend bei der Aufnahme von Material (linke Seite) und endend bei der Abgabe u. a. der Verdauungsreste (rechte Seite). Alle beschriebenen Prozesse (Pfeile) laufen innerhalb bzw. zwischen verschiedenen Endosomen (Nummern) ab. Die detaillierte Beschreibung der einzelnen Schritte ist unter den Punkten 1.2.1 – 1.2.3 zu finden.

### 3.2.4 Vacuolin

Vacuolin ist ein Markerprotein für späte Endosomen in *D. discoideum* und existiert in 3 Isoformen: A, B und C. Vacuolin C (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0279307) ist bisher kaum erforscht und wird im Weiteren vernachlässigt. Vacuolin A und B zeigen eine post-lysosomale periphere Assoziation, wobei für die Isoform B zusätzlich eine Lokalisation an der Plasmamembran nachgewiesen ist (29). Während die Deletion von Vacuolin A (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0289485) keinen Effekt in der Zelle zur Folge hat, führt die Entfernung von Vacuolin B (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0279191) zur Beeinflussung des endozytotischen Transits (29). So zeigen sich Defekte in der Reifung vom sauren zum neutralen Endosomen und in der Exozytose. Ein einzeln vorliegendes und stark vergrößertes Post-Lysosom hat eine reduzierte Exozytoserate zur Folge. Der Einfluss auf die Exozytose in VacuolinB-Knockout-Mutanten führt zur Annahme, dass Vacuolin eine Funktion als negativer Regulator in der Vesikelverschmelzung besitzt (35). Aufgrund der in diesem Protein enthaltenen Prohibitin-Homologie (PHB)-Domäne, auch bekannt als SPFH-Domäne, wird Vacuolin den PHB-Domäne-Proteinen zugeordnet (Abb. 03) (36). Die Gemeinsamkeiten entsprechender Proteine zeigen sich in der Lokalisation an der Plasmamembran und, allerdings nur im Fall der höheren Eukaryoten, in der Assoziation mit *Lipid Rafts*, Cholesterin-reichen Mikrodomänen (37). Letztere ist für *D. discoideum* bisher nicht untersucht worden. Speziell für die Säugerproteine Flotillin, Prohibitin und Stomatin sind zudem Lokalisationen an biochemisch aufgereinigten Phagosomen und Lysosomen nachgewiesen worden (38, 39).



Abb. 03 – Proteindomänen von Vacuolin (35)

Die PHB-Domäne ist notwendig, wenn auch nicht ausreichend, für die korrekte Positionierung des Vacuolinproteins an späte Endosomen (35). Die Lokalisation wird zudem durch die Oligomerisierung der Proteine, vermittelt durch das C-terminale Coiled-Coil-Motiv (CC), unterstützt.

### 3.2.5 ALDH

Die Aldehyd-Dehydrogenase (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0292270) katalysiert die Reaktion von  $[\text{Aldehyd} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} = \text{Säure} + \text{NADH} + \text{H}^+]$  und spielt damit eine zentrale Rolle bei Entgiftungsprozessen. In *D. discoideum* gibt es 10 Gene, die für ALDHs codieren. Das in dieser Arbeit verwendete Protein, welches durch das *comG*-Gen codiert wird, zeigt in der Fusion mit GFP eine Lokalisation an mittelspäten Endosomen. Dies basiert höchstwahrscheinlich auf ionische Wechselwirkungen, denn eine erhöhte Salzkonzentration bzw. ein erhöhter pH-Wert führt zur Delokalisierung des Hybrids von der Membran (40). Folglich handelt es sich bei ALDH um ein peripher bindendes Protein.

Die endosomale Lokalisation lässt vermuten, dass es eine Rolle bei der Phagozytose oder der Transzytose spielt. Ein Knockout hat allerdings keinen Einfluss auf die Phagozytoserate. Die Transzytoserate wurde nicht untersucht. Jedoch zeigt der Knockout einen deutlichen Entwicklungsdefekt: Statt wildtypische 24 h brauchte er fast 48 h für die Ausbildung von Sporenköpfen, welche teilweise keinen Stiel aufweisen (40).

### 3.3 Aktin und Aktin-interagierende Proteine

Aktin ist stark konserviert und eins der meist vertretenen Proteine in eukaryotischen Zellen. So sind in vegetativen Zellen von *D. discoideum* ~8 % des gesamten Proteinpools auf Aktin zurückzuführen (41). Diese Fraktion setzt sich aus 41 Aktin-Molekülen (Act) und Aktin-verwandten Proteinen (Arp) zusammen: 17 konventionelle Aktin-Proteine, die zwar durch verschiedene Gene codiert werden aber identische Aminosäuresequenz aufweisen (Act8-Gruppe), 16 Aktin-Proteine, die sich durch kleine Varietäten von den Konventionellen unterscheiden und 8 Arps, die z. B. wichtige Rollen in der Aktin-Polymerisation und Chromatinorganisation übernehmen (42). Circa 95 % des Aktin-Pools von *D. discoideum* bestehen ausschließlich aus Proteine der Act8-Gruppe.

Die einfachste vorkommende Form von Aktin ist das globuläre Monomer (G-Aktin). Durch Polymerisationsprozesse werden diese zu Filamenten (F-Aktin) aufgebaut, welche durch einen Durchmesser von ~8 nm und durch zwei verschiedene Enden, nämlich einem *plus*- und einem *minus*-Ende, charakterisiert sind (43). Letztere besitzen unterschiedliche Bindungsaffinitäten für ATP-Aktin (ATP: Adenosintriphosphat). So erfolgt die



Anlagerung solcher Moleküle hauptsächlich am *plus*-Ende, während am *minus*-Ende die Dissoziation von ADP-Aktin (ADP: Adenosindiphosphat) überwiegt. Letzteres entsteht durch die Hydrolyse von ATP zu ADP aufgrund einer intrinsischen ATPase-Aktivität in den Aktin-Monomeren.

Die wichtigste Funktion des Proteins findet sich im Aufbau des Aktin-Zytoskeletts und somit in Prozessen wie der Strukturhaltung, Zellbewegung, Chemotaxis, Zytokinese, intrazelluläre Transportprozesse, Entwicklung, usw. (44). Diese große Varietät an Vorgängen in der Zelle erfordert zum einen eine konstante Stabilität, zum anderen aber auch eine hohe Dynamik der Aktin-Strukturen. Letztere bedarf wiederum einer strengen und koordinierten Kontrolle und Regulation, vermittelt durch viele verschiedene Aktin-interagierende Proteine (45). So sind in *D. discoideum* 138 Proteine beschrieben, die u. a. Einfluss auf die Nukleation, Polymerisation, Depolymerisation, Bündelung und die Vernetzung von polymeren Aktin-Filamenten nehmen (9). Gemäß ihrer nachgewiesenen oder vorhergesagten Funktion werden diese in folgende Gruppen unterteilt: G-Aktin-bindende Proteine (z. B. Profilin), *Capping* oder/und fragmentierende Proteine (z. B. Cap32/34, Severin, Cofilin), Elongations- und Nukleationsproteine (z. B. Arp2/3, Scar, WASP, VASP), Aktin-*Crosslinking* Proteine (z. B.  $\alpha$ -Actinin, Filamin, Abp34), lateral an F-Aktin-bindende Proteine (z. B. Coronin, Daip1, Coactosin), membranassoziierte Proteine (z. B. Talin, Ponticulin, Hisactophilin) und schließlich Motorproteine (z. B. Myosin II).

In Säugetieren führen Mutationen in diesen Proteinen und Fehlregulation dieser Vorgänge zu schweren Folgen im Organismus und damit zu einer Vielzahl an Krankheiten, die z. B. das Immunsystem, die Neurodegeneration oder die Krebsentwicklung betreffen (46).

Einige der klassifizierten *D. discoideum*-Proteine werden in Zusammenhang mit ihrer Funktion bezüglich Aktin im Folgenden näher vorgestellt.

### 3.3.1 Die Nukleation von Aktin-Filamenten: Arp2/3, WASP

Der limitierende Schritt der Aktin-Filamentbildung ist die Nukleation. Ein Nukleationskeim wird aktiv durch verschiedene Proteine induziert, indem drei ATP-Aktin-Moleküle aneinander gelagert werden. Der **Arp2/3-Komplex**, bestehend aus

sieben Untereinheiten, ahmt einen Nukleationskeim nach (47). Lokalisiert u. a. in Lamellipodien und Pseudopodien, vermittelt er dort den Aufbau eines verzweigten Zytoskellets: Durch die Anlagerung an bereits bestehende Filamente startet er die Polymerisation von neuen Aktin-Filamenten. Zudem ist er nachweisbar an Stellen, an denen ein Partikel an die Außenseite der Zellmembran bindet und ein phagozytischer *Cup* Aktin-abhängig ausgebildet wird (30). Er dissoziiert mit der Vollendung des Endosoms ab und reassoziert an post-lysosomale Vesikel zum Aufbau einer neuen Aktin-Hülle. Aktiviert wird der Komplex durch Proteine, die der Scar-WAVE-Familie angehören, wie z. B. **WASP** (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0293834). Dieses Protein wurde erstmals 1994 beschrieben (48, 49). Charakterisiert sind die WASP-Proteine durch die katalytische C-terminale VCA-Domäne, zusammengesetzt aus dem Verprolin-Homologie-Motiv (auch WH2 (WASP Homology 2) genannt), der *Central*- und der *Acidic*-Region (Abb. 04) (50).

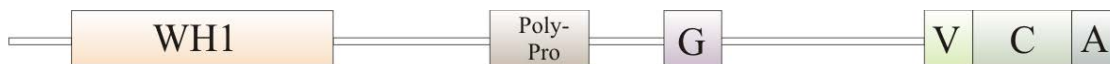


Abb. 04 – Proteindomänen von *DdWASP* (<http://www.uniprot.org/>)

Die *Acidic*-Region (A) ist verantwortlich für die Arp2/3-Bindung, während das WH2-Motiv (V) Aktin-Monomere bindet und die *Central*-Region (C) eine Rolle beim Transfer dieser Moleküle zum Arp2/3-Komplex spielt (51, 52).

In Säugetierzellen wird WASP ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Bei dem Protein handelt es sich um ein Schlüsselprotein, welches wichtig für die Übertragung und Integrierung von Aktin-regulierenden Signalen ist und so Einfluss auf die Bewegung und auf Zellformveränderungen nimmt (53, 54). Seinen Namen trägt das Protein nach dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS), an dem Patienten leiden, bei denen dieses Gen mutiert ist, was eine verminderte oder ausbleibende Expression zur Folge hat (55, 56). Hierbei handelt es sich um eine X-chromosomal rezessiv vererbte Immunschwäche-Krankheit, die sich in Ekzemen, Thrombozytopenie und wiederkehrenden Infektionen äußert (57). Die betroffenen Zellen zeigen eine reduzierte Fähigkeit für Phagozytose und Defekte in der Aktin-Akkumulation an phagozytischen Strukturen (58).

### 3.3.2 Die Elongation und der Erhalt von Aktin-Filamenten: VASP, Coactosin

Der Nukleation folgt die Elongation der Aktin-Filamente (59). Dies geschieht an den *plus*-Enden. Die Elongation erfolgt solange bis der freie Pool an monomerem Aktin erschöpft ist oder die Elongation aktiv durch sogenannte *Capping* Proteine inhibiert wird. Das *Capping* von Filamenten kann jedoch verhindert werden: zum einen durch die lokale Inaktivierung dieser Proteine und zum anderen durch die Anlagerung von sogenannten Aktin-Elongationsfaktoren. Letztere binden an die *plus*-Enden und verhindern die Assoziation der *Capping* Proteine. Folglich kann die Elongation aktiv vorangetrieben werden. Solche Prozesse sind wichtig, um u. a. die Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien zu unterstützen. Ein Beispiel hierfür sind die Proteine der Ena/VASP-Familie. Vertreter dieser Proteine sind in Säugern (Mena, EVL, *hVASP*), in *Drosophila melanogaster* (Ena) und in *D. discoideum* (**VASP** ([http://dictybase.org/DDB\\_G0289541](http://dictybase.org/DDB_G0289541))) zu finden (60-65). Bezüglich des Aufbaus ähneln sich diese Proteine in ihrer Domänenstruktur, dreigeteilt in EVH1, EVH2 und Poly-Pro (Abb. 05).

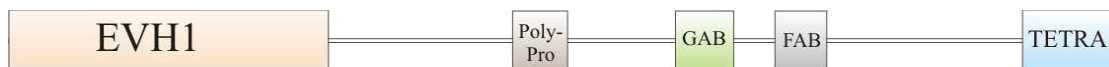


Abb. 05 – Proteindomänen von *DdVASP* (<http://www.uniprot.org/>)

Die N-terminal gelegene Ena/VASP-Homologie 1 (EVH1)-Region lokalisiert das Protein durch Interaktion mit entsprechenden prolinreichen Bindungspartnern an Fokaladhäsionen, Lamellipodien und Filopodien (66-71). Die C-terminal lokalisierte EVH2 umfasst die G-Aktin-bindende (GAB), die F-Aktin-bindende (FAB) und die oligomerisierende Region (TETRA) (72-74). Der GAB-Domäne wird eine Funktion in der Vermittlung der Komplexbildung zwischen Ena/VASP, Profilin-Aktin und dem Aktin-Filament zugeschrieben (75-77). Die Tetramerisierung, vermittelt durch die TETRA-Domäne, unterstützt die Bindung an Aktin-Filamente, welche hauptsächlich durch die FAB-Domäne ermöglicht wird (74). Zwischen beiden EVH-Domänen ist die prolinreiche Region (Poly-Pro) von VASP lokalisiert, die sich in drei verschiedene Bereiche unterteilen lässt: die rekrutierende, die ladende und die regulierende Prolinregion (78).

In sich fort bewegenden Zellen lokalisieren die Ena/VASP-Proteine an den Spitzen von Lamellipodien und nehmen Einfluss auf die Ausbildung und die Länge von Filopodien in Säugetieren und in *D. discoideum* (73, 79-81). Eine Assoziation mit „Comet tails“ von *Listeria monozytogenes*, wodurch sie deren Aktin-abhängigen Antrieb erhöhen, ist ebenfalls nachgewiesen (82-85). Zudem spielen sie eine Rolle in der Neuriten-Entstehung, bei der Entwicklung des Kortex und bei der Tumorentwicklung (86-90).

Für **Coactosin** (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0293898) sind nur wenige und auch nur *in vitro*-Daten vorhanden (91, 92). Jedoch wird dem Protein ebenfalls eine Funktion im Erhalt der Aktin-Filamente unter depolymerisierenden Bedingungen zugeschrieben: Durch die laterale Bindung entlang dieser Strukturen beeinflusst es die Funktion der *Capping* Proteinen (z. B. CP, Severin), indem es deren Bindung an die *plus*-Enden von Aktin-Filamenten sterisch verhindert. Die Polymerisation von Aktin-Filamenten wird dadurch nicht beeinflusst. Das Protein zeigt keinerlei Aktin-bündelnde und *-crosslinking* Aktivität. Coactosin wurde zusammen mit Profilin in einer proteomischen Studie, assoziiert an Prä-Sporen-Vesikeln, identifiziert (93). Es konnte auch als Komponente von isolierten Phagosomen nachgewiesen werden (94). Allerdings gibt es keine detaillierten Untersuchungen bezüglich der subzellulären Lokalisation und Funktion dieses Proteins.

### 3.3.3 Das *Crosslinking* von Aktin-Filamenten: $\alpha$ -Actinin, Filamin, Abp34

*Crosslinking* Proteine lokalisieren an den Seiten von zwei verschiedenen Aktin-Filamenten und bilden so physikalische Verbindungen, die in einem dreidimensionalen Netzwerk resultieren.  **$\alpha$ -Actinin** (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0268632) und **Filamin** (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0269100) werden in der Literatur als die bisher stärksten Aktin-*Crosslinking* Proteine in *D. discoideum* beschrieben (Abb. 06). Beide besitzen zwei Aktin-bindende Regionen (Calponin-Homologie (CH)-Domänen), die sie dazu befähigen, mit Aktin-Filamenten zu assoziieren und diese stabil in Bündel bzw. Netzwerken zu verbinden.  $\alpha$ -Actinin besitzt zudem vier *spectrin-repeats* und zwei *EF-hands*. Die *spectrin-repeats* werden in verschiedenen Proteinen gefunden, die an der Organisation der Zytoskelettstruktur beteiligt sind. Außerdem ist bewiesen, dass diese Domänen in Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind und im Fall von  $\alpha$ -Actinin die Dimerisierung vermitteln (95, 96). Die beiden *EF-hands* verleihen  $\alpha$ -Actinin seine Calciumabhängigkeit, wobei der Ersten die regulatorische Funktion zukommt. Diese besitzt nur eine schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität, die jedoch durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die zweite *EF-hand*, welche eine starke Affinität für dieses Ion besitzt, erhöht wird (97, 98).  $\alpha$ -Actinin liegt diffus und ungleichmäßig im Zytoplasma vor und zeigt sich angereichert in Pseudopodien an der Zellfront (99). Auch Kollokalisierung mit Phagosomen und mit der kontraktilen Vakuole sind beschrieben (100).

Filamin besitzt neben den zwei CH-Domänen noch sechs 100AS-*repeats*, die u. a. die Homodimerisierungen des Proteins ermöglichen (101). Es agiert als ein *Crosslinker* zwischen Aktin und Plasmamembranproteinen, was auch zu dessen Anreicherung am Zellkortex, speziell auch in Pseudopodien und Filopodien führt (102). Zudem beeinflusst Filamin u. a. die Form, die Polarität und die Bewegung von Zellen (103, 104). Nähere Untersuchungen des humanen Filamin-Proteins weisen zudem auf einen Mechanismus der multiplen Ligandenbindungen hin, wodurch z. B. das *Clustering* und der *Crosstalk* von Rezeptoren, die Regulation des Zytoskeletts und andere zelluläre Aktivitäten beeinflusst werden (105).

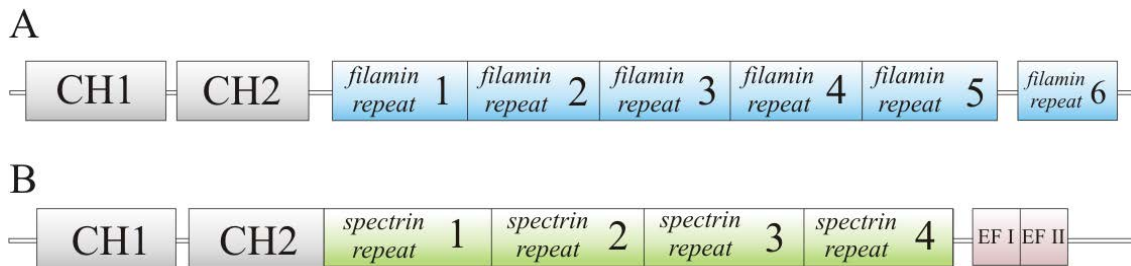


Abb. 06 – Proteindomänen von  $\alpha$ -Actinin und Filamin (<http://www.uniprot.org/>)  
Schematische Darstellung der *D. discoideum*-Proteine Filamin (A) und  $\alpha$ -Actinin (B).  
CH: Calponin-Homologie-Domäne; EF: *EF-hand*

Während  $\alpha$ -Actinin und Filamin unter den Eukaryoten weit verbreitet vorkommen, ist **Abp34** (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0279081) einzigartig in *Dictyostelium* und verwandten Arten und ein weiteres der elf Aktin-verknüpfenden Proteinen in *D. discoideum* (Abb. 07) (106, 107). Das 34 kDa schwere Protein besitzt drei Aktin-bindende Regionen (AS 1-123, 193-254 und 279-295), zwei calciumbindende *EF-hand* Motive (AS 82-112 und 135-163), zwei intramolekulare Interaktionszonen (AS 71-123 und 193-254), sowie eine N-terminale inhibierende Domäne (AS 1-76) (107). Das Protein unterliegt dem Mechanismus der Autoinhibition: Als Folge der Calciumbindung kommt es im Protein zur Rückfaltung der inhibierenden Domäne. Durch die daraus resultierende Interaktion des N-Terminus mit der stark F-Aktin-bindenden Domäne (AS 193-254) wird die Aktin-Bündelung verhindert (108). Abp34 lokalisiert an beiden Enden von sich fortbewegenden Zellen, an phagozytischen *Cups*, in Filopodien, in Teilungsfurchen und an Zell-Zell-Kontakten (100, 109, 110, 111).

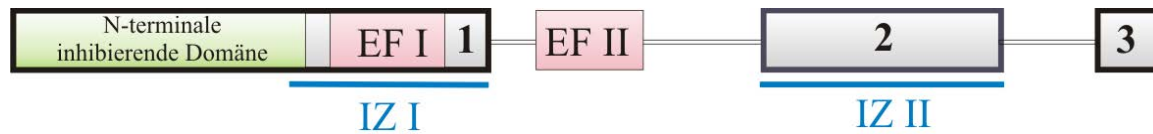


Abb. 07 – Schematische Darstellung der Proteindomänen von Abp34 (<http://www.uniprot.org/>)  
 Die Zahlen markieren die drei F-Aktin-bindenden Regionen (schwarz umrahmte Kästen), wobei #2 die stark F-Aktin-bindende Domäne ist.  
 EF: *EF-hand*; IZ: Interaktionszone

### 3.3.4 An der Membran lokalisierende Proteine: Ponticulin, Hisactophilin

**Ponticulin** (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0293522) ist ein Membranprotein und bindet filamentöse Aktin-Strukturen: Es dient, wie der Name schon sagt, als „Brücke“ zwischen der Plasmamembran und dem Aktin-Kortex. Laut *in vitro*-Studien gehen in *D. discoideum* bis zu 97 % derartiger Verbindungen allein auf dieses Protein zurück (112). Neben je einer N- und C-terminalen Transmembrandomäne (*SMART*-Datenbank) besitzt Ponticulin zusätzlich einen GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Anker, das es zu einem eher seltenen Proteintyp macht (113). Warum es Proteine gibt, die beides besitzen, ist unklar. Es wird vermutet, dass der GPI-Anker für posttranslationale Prozessierung nützlich sein kann, um die  $\beta$ -Stränge in eine stabile membranassoziierte Form zu bringen (113). Alternativ könnte der Anker die Lokalisation von Ponticulin in bestimmten Subdomänen der Plasmamembran bestimmen, den Protein-*Turnover* regulieren oder aber auch die Interaktionen mit anderen Proteinen beeinflussen. Neben der Aktin-Bindung schreibt man Ponticulin auch eine Funktion in der Aktin-Nukleation zu (114, 115).

**Hisactophilin** (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0282143) liegt in der Zelle in drei Isoformen vor (I, II, III). Es ist ein weiteres Protein, das Aktin-Filamente an die Plasmamembran von *D. discoideum* bindet (116). Das Protein selbst inseriert über ein kovalent gebundenes Lipid in der Membran (117). Bei einer Gesamtlänge von 118 Aminosäuren ist es mit 31 Histidinen ein sehr Histidin-reiches Protein und besitzt zudem eine pH-abhängige Aktivität (118). In *D. discoideum* variiert der zytoplasmatische pH-Wert zwischen 6.3 und 7.3 und kann damit zur Signalübertragung dienen. Beeinflusst durch beispielsweise cAMP-Pulse (cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat) können pH-Änderungen Einfluss auf Zellbewegung und –differenzierung nehmen (118, 119). Folglich könnte Hisactophilin als ein pH-reguliertes Verbindungsprotein zwischen Aktin und der Plasmamembran entsprechende Prozesse in der Zelle regulieren (119).

### 3.3.5 Protein mit möglicher Aktin-Interaktion: Ssj758

**Ssj758** (<http://dictybase.org/>: DDB\_G0274423) ist ein bisher wenig charakterisiertes Protein. Entsprechende Überexpressionen und Knockouts ergaben keinen Aufschluss über die Funktion des Proteins in der Zelle (120). Interessant war jedoch die Tatsache, dass das Protein sowohl am MTOC (*microtubule organizing center*) als auch am Aktin-Kortex lokalisiert. Letztere lässt eine Aktin-bindende, vielleicht auch -modifizierende Funktion vermuten. Unterstützt wird dies durch einen Sequenzvergleich mittels der *SMART*-Datenbank, die drei SH3-Domänen im Protein voraussagt.

*Src*-Homologie (SH)-Domänen binden mit mäßiger Affinität und Selektivität an prolinreiche Liganden (121, 122). In vielen Fällen charakterisieren sie Proteine, die in Signalkaskaden agieren, welche u. a. Um- oder Neuorganisationen des Zytoskeletts zur Folge haben. So spielen sie eine Rolle in der Regulation von Aktin, indem sie beispielsweise mit Mitgliedern der WASP-Proteinfamilie interagieren: Der Nck-SH2/SH3-Adaptor rekrutiert N-WASP und den Arp2/3-Komplex und induziert so die Ausbildung von Aktin-haltigen „*Comet tails*“ auf der Oberfläche des Vaccinia-Virus (123, 124). Im Fall von Myo3 und Myo5 binden die SH3-Domänen die prolinreichen Motive von Bee1p (das WASP-Homolog in der Hefe) und von Vrp1p (Verprolin). Letzteres ist in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (125-127). Entfernt man beide Myosine oder führt Mutationen in deren SH3-Domänen ein, so hat das schwere Defekte des Aktin-Zytoskeletts zur Folge.

### 3.4 Die Ubiquitin-abhängige Proteindegradation

Damit die zellulären Prozesse ungestört ablaufen können, ist es wichtig, dass die Proteine entsprechend ihrer Funktion in der Zelle agieren. Um letzteres zu gewährleisten, unterliegen die zellulären Proteine einem Auf- und Abbau. Die Expression und Degradierung der Proteine variiert hierbei in Abhängigkeit extrinsischer und intrinsischer Faktoren. So erfolgt die selektive Proteindegradation, um die Konzentration an zellulären, funktionellen Proteinen im Gleichgewicht zu halten. Das ermöglicht es der Zelle, sich vor denaturierten oder stressgeschädigten (z. B. Hitze, Oxidation, UV-Licht) Proteinen zu schützen oder um den korrekten Ablauf sämtlicher zellulärer Prozesse wie z. B. Proliferation, Proteinexpression und Signaltransduktion zu gewährleisten. Der

proteolytische Abbau wird durch Ubiquitinierung an Lysinresten der abzubauenen Proteine induziert. Dies erfolgt mittels eines Konjugationssystems und kann in einer Monoubiquitinierung oder, je nach Anzahl der Reaktionsrunden, in einer Ubiquitinkette resultieren. Die Ubiquitin-Konjugation erfolgt durch drei verschiedenen Ligasen (128): Im ersten Schritt wird das Ubiquitin-Molekül aktiviert, indem es an das Enzym E1 gebunden wird. Als nächstes erfolgt die Übertragung auf E2, um anschließend - im dritten und letzten Schritt - mittels der E3-Ligase auf das Substrat übertragen zu werden. E4 unterstützt die Zusammensetzung von Multiubiquitinketten (129). Es folgt der Abbau in einem von zwei wichtigen Proteindegradationsorten in der Zelle, dem Lysosom oder dem Proteasom (Abb. 08).

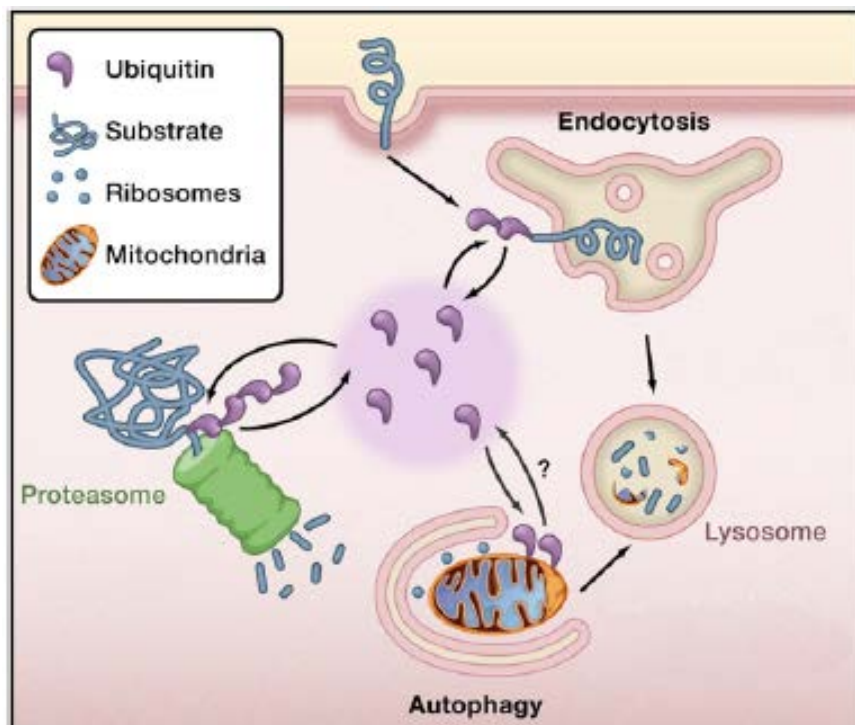


Abb. 08 – Ubiquitin als ein Marker für verschiedene Degradationswege (130)

Mit jedem Degradationsweg (Endozytose, Autophagie und Abbau im Proteasom) sind spezifische Ubiquitin-Rezeptoren assoziiert, die schließlich zum Abbau der Substrate im Lysosom oder Proteasom führen.

### 3.4.1 Der proteasomale Abbau

Das 26S-Proteasom besteht zum einen aus einer multikatalytischen Proteinase, der 20S-Untereinheit, die ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen vorkommt und zum anderen



aus zwei regulatorischen Partikeln, den 19S-Untereinheiten (131). Letztere dienen der Erkennung ubiquitiniertes Proteine und deren Entfaltung als Vorbereitung für den Import ins Proteasom (Abb. 08). Nach dem Abbau der Polypeptidketten durch die katalytische Untereinheit erfolgt die Freigabe der kleinen Peptide sowie der wiederverwendbaren Ubiquitine.

### 3.4.2 Der lysosomale Abbau

Der lysosomale Abbau dient vor allem der Umsetzung von vielen Zellmembranproteinen, wie Rezeptoren oder Kanäle. Falls diese nicht recycelt werden, erfolgt deren Endozytose und Transit ins Lysosom, wo sie schließlich abgebaut werden (Abb. 08). Dies erfolgt hauptsächlich aufgrund von Polyubiquitinierungen über Lysin 63, was sich als wichtig für die korrekte Sortierung im Endosomen durch sogenannten ESCRTs (*endosomal sorting complexes required for transport*) zeigt (132). Die ESCRT-Maschinerie besteht aus fünf Komplexen (O, I, II, III und Vps4-Vta1) und mehreren assoziierten Proteinen (133). Diese dienen (1.) der Erkennung von ubiquitinierten Proteinen und der Verhinderung deren Wiederverwertung und retrogradem Transport. (2.) führen sie zur Verformung der endosomalen Membran, was in endosomalen Invaginationen resultiert. Und schließlich (3.) vermitteln sie die Abschnürung der invaginierten Membranen, was in der Ausbildung von *Multivesicular bodies* endet (134). Die luminalen Vesikel der MVBs enthalten das für den Abbau sortierte Material, dessen lysosomaler Abbau durch die direkte Fusion der MVBs mit den Lysosomen ermöglicht wird.

#### 3.4.1.2 Autophagie

Bei der Autophagie handelt es sich ebenfalls um eine schützende Zellfunktion, bei der fehlgefaltete oder aggregierte Proteine abgebaut, defekte Organellen entsorgt und intrazelluläre Pathogene beseitigt werden (zusammengefasst in (135)). Es werden drei definierte Typen der Autophagie unterschieden: Makro-, Mikro- und chaperonvermittelte Autophagie. Weiterhin ist die selektive Ubiquitin-vermittelte Autophagie beschrieben (Abb. 08) (zusammengefasst in (136)). In diesem Fall werden die ubiquitinierten Strukturen mittels des Adaptermoleküls p62 an prä-autophagosomale Membranen gebunden, die reich an Atg8/LC3 sind (Atg8 ist das Hefe-Homolog; LC3 ist das humane

Homolog). Es folgen die Ausbildung der Autophagosomen, indem das abzubauen Material von einer Membran umschlossen wird, die Reifung dieser Organellen zu Lysosomen und schließlich der Verdauung des Materials durch lysosomale Hydrolasen.

Es ist gezeigt, dass orthologe Autophagogene (*atg1*, *atg6* und *atg8*) auch in *D. discoideum* exprimiert werden und eine Rolle in der Makroautophagie spielen (137). Mutationen in diesen Genen zeigen negativen Einfluss auf die Entwicklung und auf den Protein-Turnover in hungernden Zellen.

### 3.5 Hirano Bodies als Folge anormaler Proteinaggregation

Veränderungen der Integrität des Aktin-Zytoskeletts kann eine anormale Aggregation von Peptiden oder Proteinen im Zytoplasma zur Folge haben. Die Aggregate können sich zum einen durch Akkumulation fehlgefalteter und zum anderen durch unspezifische Interaktionen verschiedener Proteine ausbilden.

*Hirano Bodies* werden beispielsweise als eine Konsequenz von anormalen Veränderungen bzw. Fehlregulationen des Aktin-Zytoskeletts gesehen, die vor allem in Verbindung mit dem neuronalen Altern auftreten (138). Hirano *et al.* beschreiben diese Aggregate als eosinophile und zirkuläre oder stabähnliche Strukturen (RLS, *rod-like structures*), die aus geschichteten Filamenten, mit 6-10 nm im Durchmesser, bestehen (139-143). Diese Aggregate sind im Nervengewebe von älteren nicht-dementen Personen bereits nachzuweisen. Sie zeigen aber verstärkte Anhäufung in Nervengewebe von Patienten, die unter neurodegenerativen Krankheiten leiden, wie beispielsweise Alzheimer (144-147). Was zur Ausbildung der *Hirano Bodies* führt und welchen Einfluss sie auf die Nervenzellen haben, ist nicht bekannt. Derzeit gibt es viele Versuche, diese Aggregate in verschiedenen Zelltypen zu induzieren. Ziel dieser Studien ist es, Informationen über die Ursache, den Aufbau und das Schicksal der *Hirano Bodies* in der Zelle zu gewinnen.

### 3.6 Aufgabenstellung

Mit dem Ziel den Aktin-Coat um späte Endosomen in *D. discoideum* zu manipulieren, wurde das Protein VASP an diese Organellen lokalisiert (148). Die ektopische Lokalisation von VASP an die späten Endosomen erfolgt durch das Protein Vacuolin. Hierbei wurde für die C-terminale Fusion von VASP an Vacuolin die Vacuolin-Isoform A verwendet. Da N-terminale Proteinfusionen an Vacuolin A zu untypischen Verklumpungen des Hybrids führten, wird in diesen Fällen alternativ auf die Vacuolin-Isoform B zurückgegriffen.

Eine starke Expression des Fusionskonstrukts VAM-VASP (VacuolinA-Myc-VASP) in AX2-Zellen führt zur Ausbildung von großen, kugeligen Aggregaten ( $\text{\O} = 2,8 \mu\text{m}$ ; Abb. 09-A). Diese VAM-VASP-Aggregate liegen statisch in der Zelle vor und weisen keine membranösen Anteile auf, die auf späte Endosomen zurückzuführen sind. Zudem sind letztere nicht mehr über Vacuolin A oder Aktin in den VAM-VASP-Zellen zu identifizieren.

Die VAM-VASP-Aggregate sind gefüllt mit Aktin und Aktin-interagierenden Proteinen und beeinträchtigen Wachstum, Zytokinese, Phagozytose, wie auch Pinozytose.

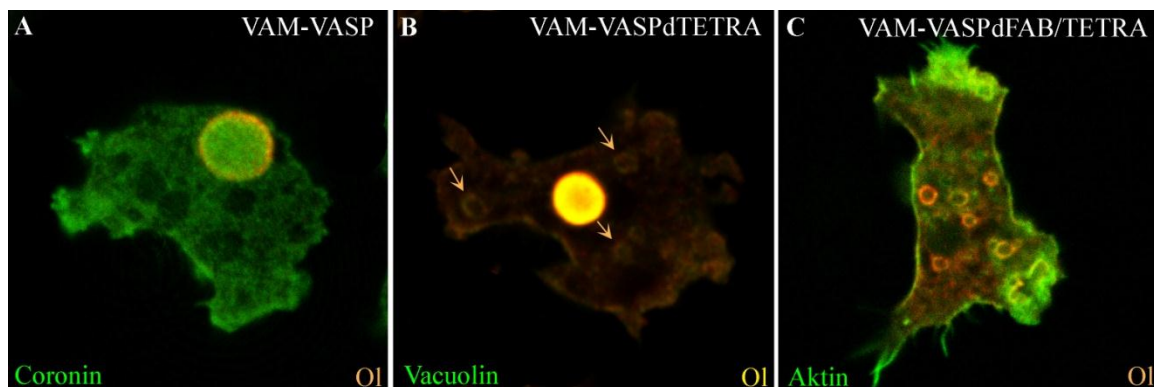


Abb. 09 – Expression verschiedener VAM-VASP-Konstrukte in AX2-Zellen (149)

Die Rotfluoreszenzen beruhen auf Antikörperfärbungen für Myc (pk oder mk: 9E10). Die Coroninstrukturen wurden mit dem Antikörper 176-3D6 (mk), die Vacuolin-Strukturen mit dem Antikörper 263-79-2 (mk) und das Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin-Alexa-Fluor-488 markiert. Bildbreiten: (A) (Klon 2B-1): 29  $\mu\text{m}$ ; (B) (Klon VV $\Delta$ TETRA #11): 21  $\mu\text{m}$ ; (C) (Klon VV $\Delta$ FAB/TETRA #21): 30  $\mu\text{m}$

In meiner Diplomarbeit machte ich es mir zum Ziel, die Gründe für die Ausbildung der VAM-VASP-Aggregate zu definieren (149). Die Deletion der FAB- oder der TETRA-Domäne des VASP-Proteins im VAM-VASP-Hybrid, resultierend in VAM-VASP $\Delta$ FAB

und VAM-VASP $\Delta$ TETRA, führte zu der Schlussfolgerung, dass beide Domänen eine wichtige Rolle für die Ausbildung des VAM-VASP-Phänotyps spielen: Entfernt man die TETRA-Domäne, bilden sich im Vergleich zu den VAM-VASP-Aggregaten kleinere Aggregate aus ( $\varnothing = 1,7 \mu\text{m}$ ; Abb. 09-B). Zudem liegen in den VAM-VASP $\Delta$ TETRA-Zellen zusätzlich einzelne späte Endosomen vor (Pfeile in Abb. 09-B). Fehlt die FAB-Domäne im VAM-VASP-Konstrukt, so ändert sich zwar nichts am Aggregat, doch wird die FAB-Domäne zusammen mit der TETRA-Domäne deletiert (VAM-VASP $\Delta$ FAB/TETRA), so unterscheiden sich die VAM-VASP $\Delta$ FAB/TETRA-Zellen phänotypisch nicht von AX2-Zellen (Abb. 09-C).

Die Untersuchungen an VAM-VASP zeigten auch, dass die Reihenfolge der miteinander fusionierten Proteine sowie die Lokalisation an späte Endosomen wichtige Rollen spielen: Ligiert man VASP N-terminal an Vacuolin B (Myc-VASP-VacuolinB), so erhält man nur eine Verklumpung der späten Endosomen (Abb. 10-A). Durch die Entfernung der PHB-Domäne von Vacuolin (VacB(CC)-Myc-VASP) erfolgt die Ausbildung von kleineren Aggregaten ( $\varnothing = 1,9 \mu\text{m}$ ; Abb. 10-B).

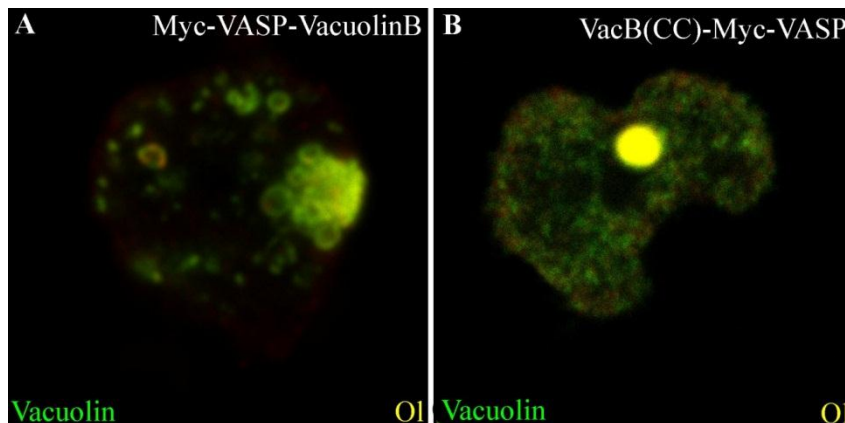


Abb. 10 - Expression verschiedener VAM-VASP-Konstrukte (149)  
Die Färbung von Myc erfolgte mittels des polyklonalen Antikörpers (rot). Vacuolin wurde durch den Antikörper 263-79-2 (mk) markiert (grün). Bildbreiten: (A) (Klon VVB #7): 14  $\mu\text{m}$ ; (B) (VacB(CC)-Myc-VASP #5): 18  $\mu\text{m}$

Zusammen mit dem starken Aktin-Vorkommen ergab sich die Schlussfolgerung, dass die VAM-VASP-Aggregate durch die Bindung und Vernetzung von Aktin-Filamenten an späten Endosomen gebildet und aufrechterhalten werden. Was mit den Organellen passiert, konnte nicht geklärt werden. Auch nicht, was die späten Endosomen so speziell für die Ausbildung der VAM-VASP-Aggregate macht. In Frage kommen hierfür die Aktin-haltige Oberfläche der Organellen, das Oligomerisierungsverhalten von Vacuolin

oder die endosomale Lokalisation von VASP. Aufbauend auf diesen Vermutungen soll die vorliegende Arbeit weiteres Verständnis der Ursache und Entwicklung der VAM-VASP-Aggregate bringen. Die Lokalisation von VASP an andere Organellen sowie die Suche nach weiteren aggregatauslösenden Proteinen soll helfen, charakteristische Eigenschaften zu erkennen, die Proteine für die Ausbildung vergleichbarer Aggregate prädestinieren.

## 4. Ergebnisse

Die durchgeführten ektopischen Lokalisationen, d. h. Lokalisationen von Proteinen entgegen ihrer wildtypischen Positionen in der Zelle, geht auf die von Drenck *et al.* beschriebene Vorgehensweise zurück (31). Hierbei werden die Proteine mit gewünschter Funktion an Proteine fusioniert, die nachweislich am gewünschten *Target*-Organell lokalisieren. Voraussetzung ist, dass letztere die stärkeren *Targeting*-Signale besitzen und so den Bindungspartner mit sich ziehen. Durch das Zufügen eines *Myc-Tags* bzw. durch die Ligation an GFP (grün fluoreszierendes Protein) oder RFP (rot fluoreszierendes Protein) können die Expressionen und die Lokalisationen der Fusionskonstrukte in der Zelle nachgewiesen und bestimmt werden. Markieren die fluoreszierenden Signale die gewünschten Bestimmungsorte, so werden die Mutanten gegebenenfalls weiteren Untersuchungen unterzogen.

Die Herstellung aller im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Konstrukte ist jeweils unter Punkt 6.12 beschrieben. Deren Transformationen erfolgen, wenn nicht anders beschrieben, jeweils in AX2-Zellen. Die Selektion unabhängiger Klone aus mindestens zwei Transformationen erfolgt mittels Western Blots. Die dargestellten Bilder sind Ergebnisse von Pikrinsäure-Fixierungen und entsprechenden immunhistochemischen Färbungen. Alle Fluoreszenzaufnahmen, die in dieser Arbeit gezeigt werden, sind am CLSM entstanden.

### 4.1 VAM-VASP bildet Aktin-positive Aggregate aus

#### 4.1.1 Die ektopische Lokalisation von VASP an ALDH-Vesikel

Durch die Expression von VAM-VASP (Klon 2B-1) haben sich in 88 % (n = 200) der Zellen große, runde Aggregate ausgebildet (148). Wenn nicht anders erwähnt, so wird sich im Folgenden stets auf diesen stark exprimierenden VAM-VASP-Klon 2B-1 bezogen (148). In den VAM-VASP-Aggregaten werden Aktin, verschiedene Aktin-interagierende Proteine und endogenes Vacuolin-Protein akkumuliert (150). Vacuolin-positive Endosomen sind nicht in den VAM-VASP-Zellen nachzuweisen (148). Um auszuschließen, dass das Vacuolin-Protein einen entscheidenden Einfluss auf die

Ausbildung der VAM-VASP-Aggregate hat, wird VASP an die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) ligiert, welche peripher an mittelspäte Endosomen lokalisiert.

Bisher existieren nur Fusionsprodukte, in denen Proteine an den N-Terminus von ALDH fusioniert wurden (40). Allerdings sind im ALDH-Protein keine Domänen bekannt, die durch C-terminale Fusionen behindert werden. Aus diesem Grund, und um die Bedingungen für VASP bezüglich der ektopischen Lokalisation beizubehalten, wurde VASP C-terminal an ALDH ligiert, resultierend in Plasmid #745 (pB15-ALDH-Myc-VASP).

Die Expression von ALDH-Myc-VASP (Klon 745I; Abb. 11-A) führt zur Ausbildung von VAM-VASP-ähnlichen ALDH-Myc-VASP-Aggregaten: Die gewählten Klone der ALDH-Myc-VASP und der VAM-VASP-Zelllinien weisen ein vergleichbaren Expressions-*Level* auf (Abb. 62) und die für diese Zellen charakteristischen Aggregate ähneln sich in der runden Form und dem hohem Aktin-Vorkommen. Die ALDH-Myc-VASP-Aggregate sind jedoch größer ( $\text{Ø} = 3,9 \mu\text{m}$ ) als die VAM-VASP-Aggregate ( $\text{Ø} = 2,8 \mu\text{m}$ ) (150). Zudem ist im Unterschied zu den VAM-VASP-Zellen das Vacuolin-Protein nicht in die Aggregate der ALDH-Myc-VASP-Zellen integriert: Freie Vacuolin-positive Endosomen sind nachweisbar (Pfeile in Abb. 11) (148).

Die ALDH-Myc-VASP-Zellen zeigen, dass Vacuolin für die Ausbildung der kugeligen Aggregate keine Rolle spielt. Zwar liegen in AX2-Zellen einige ALDH-Vesikel kolokalisierend mit dem Vacuolin-Protein vor (40), doch die Tatsache, dass Vacuolin in den ALDH-Myc-VASP-Zellen trotz der Aggregatbildung wildtypisch lokalisiert, zeigt, dass der aggregatauslösende Faktor ein anderer als das Vacuolin-Protein selbst sein muss. Die starke Anhäufung von F-Aktin in den Aggregaten der VAM-VASP- und der ALDH-Myc-VASP-Zelllinien führt zur Vermutung, dass dem Aktin-Protein eine wichtige Rolle in der Aggregatbildung zukommt: So könnte F-Aktin als eine Art Gerüst dienen, welches durch die VASP-Bindung aufgebaut wird. Andere Aktin-bindende Proteine, die zusätzlich durch die Bindung an die Aktin-Filamente sequestriert werden, verdichten und stabilisieren die Filamente und es kommt zur Ausbildung der kugeligen Aktin-Aggregate (150).

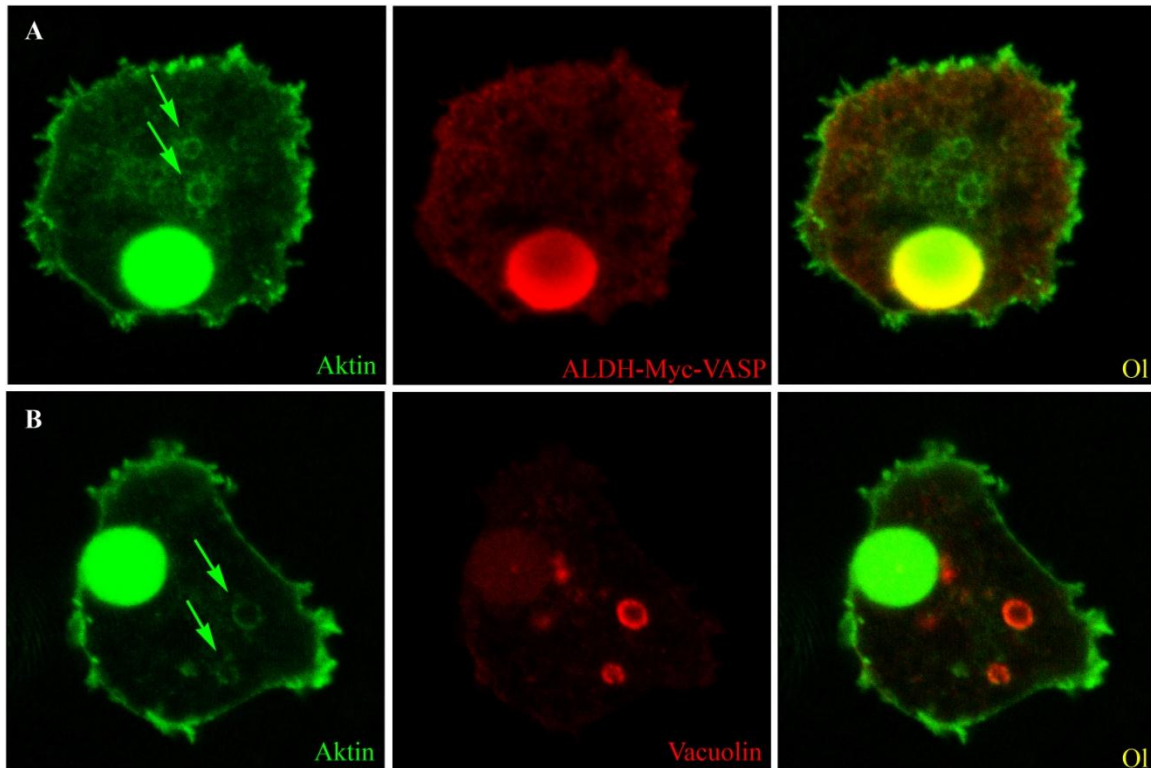


Abb. 11 – Expression von ALDH-MYC-VASP (Klon 745I)

Zum Nachweis des Myc-Konstrukts (A) erfolgte die Färbung mit dem Antikörper 9E10 (mk, rot) und zum Nachweis von Vacuolin (B) erfolgte die Färbung mit dem Antikörper 263-79-2 (mk, rot). F-Aktin (A, B) wurde mit Phalloidin-Alexa-Fluor 488 (grün) gefärbt. Die Pfeile markieren Aktin- und Vacuolin-positive, späte Endosomen. Bildbreiten: je 25  $\mu\text{m}$

Für die ALDH-Endosomen (ohne Abb.) und für die Vacuolin-Endosomen (28) ist gezeigt, dass denen ein Aktin-*Coat* aufliegt. Sowohl in den ALDH-Myc-VASP- als auch in den VAM-VASP-Zellen können zum Aufbau der Aktin-Aggregate folglich die Aktin-Filamente dienen, die die Endosomen als Hülle umgeben.

Werden für die ektopische Lokalisation von VASP Organellen gewählt, denen keine Aktin-Filamente aufliegen, so sollte, sofern Aktin einen relevanten Faktor darstellt, die Ausbildung von Proteinaggregaten ausbleiben. Um dies zu überprüfen, wird VASP in einem nächsten Schritt an Peroxisomen und *Lipid Droplets* lokalisiert.

#### 4.1.2 Die ektopische Lokalisation von VASP an Aktin-freie Organellen

Peroxisomen ( $\text{Ø} = 0,2 - 1 \mu\text{m}$ ) liegen im Zytoplasma fast aller eukaryotischen Zellen vor und sind von einem Phospholipid-*Bilayer* umgeben. Sie dienen dem Abbau von toxischen Molekülen, reaktiven Sauerstoffspezies und in einigen Organismen auch zusätzlich dem Metabolismus von Fettsäuren durch  $\beta$ -Oxidation. Das peroxisomale *Targeting* von VASP



erfolgt durch die Ligation des Proteins an SLB350 ([http://dictybase.org/DDB\\_G0283911](http://dictybase.org/DDB_G0283911)). SLB350 lokalisiert nachweislich an Peroxisomen (151), jedoch besitzt es weder eine Transmembrandomäne, noch ein peroxisomales *Targeting*-Signal. Folglich wird es peripher an Peroxisomen angelagert. Das Protein ist biochemisch weitestgehend uncharakterisiert, es sind z. B. keine weiteren Domänen und zellulären Funktionen bekannt.

Um Energie in Zeiten des Nahrungsmangels zur Verfügung zu haben, nutzt der Organismus u. a. die Speicherung von Fetten in Form von Lipidtröpfchen bzw. *Lipid Droplets* ( $\emptyset = 0,2 - 0,5 \mu\text{m}$ ; (152)). Diese Organellen zeichnen sich durch einen hydrophoben Kern aus, welcher aus veresterten Lipiden besteht und von einem *Monolayer* aus amphiphilen Phospholipiden sowie einer Reihe damit assoziierter Proteine umgeben ist (153, 154). Die Lokalisation von VASP an die Lipidtröpfchen soll durch die Fusion des Proteins an das *Lipid Storage Droplet* Protein (LSD; [http://dictybase.org/DDB\\_G0279791](http://dictybase.org/DDB_G0279791)) erreicht werden. Die Isoform in *D. discoideum*, LSD1, lokalisiert peripher an *Lipid Droplets* (155). LSD gehört zur Familie der PAT-Proteine: diese Proteine ähneln sich in den 150 N-terminalen Aminosäuren, weshalb dieser Bereich auch als PAT-Domäne bezeichnet wird (156). Sind keine Lipidtröpfchen in der Zelle vorhanden, wird die Transkription des endogenen LSD-Proteins reduziert und das exogene GFP-LSD1 abgebaut (152). Aus diesem Grund wird das Protein in die Kategorie der CPAT, *constitutively* PAT-Proteine eingeordnet (157): CPAT-Proteine lokalisieren entweder an *Lipid Droplets* oder werden ubiquitiniert und degradiert. Es wird postuliert, dass *DdLSD1* zum Schutz der *Lipid Droplets* vor dem Abbau durch Lipasen beiträgt (152).

Sowohl für SLB350 als auch für LSD sind bereits C-terminale Proteinfusionen durchgeführt worden ((151), P. Paschke: Daten nicht veröffentlicht). Die daraus resultierenden Proteinhybride beweisen, dass die Fusionen keinen Einfluss auf die wildtypische Lokalisation und Funktionalität von SLB350 und LSD nehmen. Aus diesem Grund wurde die VASP-cDNA in beiden Fällen jeweils an das 3'-Ende der oben genannten Gene ligiert, wodurch die Vektoren #698 (GFP-LSD-VASP) und #699 (pDneo2a-SLB350-Myc-VASP) entstanden.

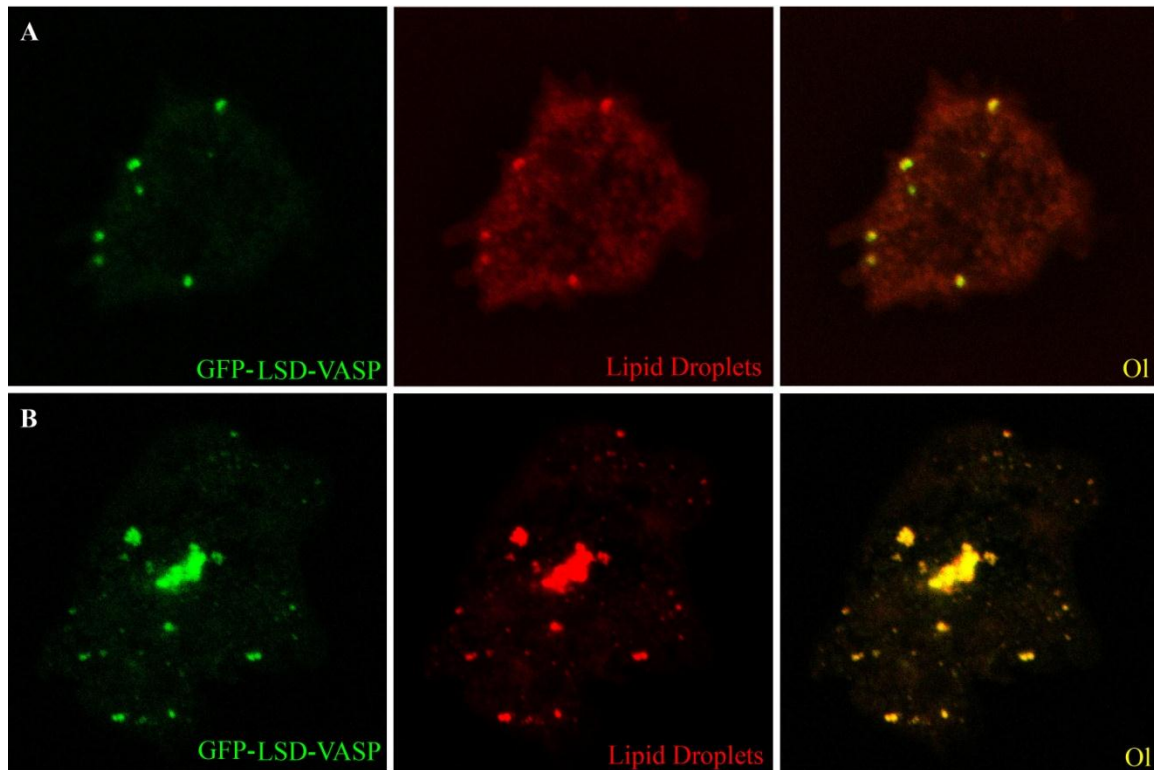


Abb. 12 – Expression von GFP-LSD-VASP (Klon 698I)

Der Nachweis der *Lipid Droplets* erfolgte durch die Färbung mit dem lipophilen Farbstoff LD540 (rot). (A) zeigt unbehandelte Zellen und (B) zeigt Zellen, die 3 h unter dem Einfluss von 200  $\mu$ M Palmitinsäure standen. Die Grünfluoreszenz basiert auf dem grün fluoreszierenden Protein im GFP-LSD-VASP-Konstrukt. Bildbreiten: A: 29  $\mu$ m; B: 40  $\mu$ m

Die Expression von GFP-LSD-VASP in Zellen, die im herkömmlichen Selektionsmedium kultiviert werden, führt zur Markierung einzelner, weniger *Lipid Droplets* (Abb. 12-A). Durch die Zugabe von langkettiger, gesättigter Palmitinsäure zum Nährmedium der GFP-LSD-VASP-Zellen wird eine große Anzahl an *Lipid Droplets* in den Zellen induziert, was mit der Zunahme des GFP-Signals korreliert (Abb. 12-B). Zudem erfolgt teilweise die Verklumpung der Lipidtröpfchen. Das ist jedoch nicht auf das Protein VASP zurückzuführen, denn verklumpte *Lipid Droplets* sind auch in AX2-Zellen ohne Überexpression jeglicher Fusionsproteine zu sehen (152). Ein homogenes, kugeliges Aggregat, wie es durch VAM- und ALDH-Myc-VASP ausgelöst wird, wird nicht gebildet.

Immunfluoreszenzen zum Nachweis von Aktin in AX2-Zellen führen zur Markierung des Kortex, der frühen und der späten Endosomen. Wildtypische *Lipid Droplets* weisen keinerlei Aktin-Anlagerungen auf. Markiert man jedoch Aktin in den GFP-LSD-VASP-Zellen, so zeigt sich neben dem Aktin-Signal im Kortex ein zusätzliches, deutliches

Signal an den akkumulierten *Lipid Droplets* (Abb. 13). Aufgrund der ektopischen Lokalisation von VASP wird folglich auch die ektopische Lokalisation von Aktin erreicht. Dass es sich hierbei um Aktin in filamentöser Form handelt, beweist die positive Färbung mit Phalloidin-TRITC (ohne Abb.).

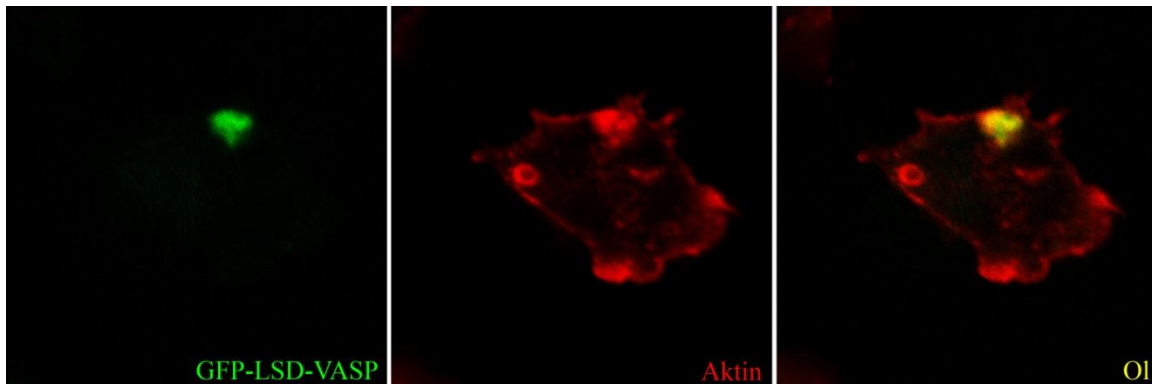


Abb. 13 – GFP-LSD-VASP (Klon 698I)

Die Zelle stand unter dem 3-stündigen Einfluss von 200  $\mu$ M Palmitinsäure. Die Färbung für Aktin erfolgte mit dem Antikörper ACT-1-11 (mk, rot). Die Grünfluoreszenz basiert auf dem grün fluoreszierenden Protein im GFP-LSD-VASP-Konstrukt. Bildbreite: 25  $\mu$ m

Dass dieser Effekt kein Artefakt ist, zeigt sich in der Lokalisation von VASP an Peroxisomen. Die Transformation von SLB350-Myc-VASP erfolgt zusammen mit dem peroxisomalen Marker RFP-SKL (#498). Die Konstrukte kolokalisieren in der Zelle: Das VASP-Hybrid wird erfolgreich an die Peroxisomen lokalisiert (Abb. 14).

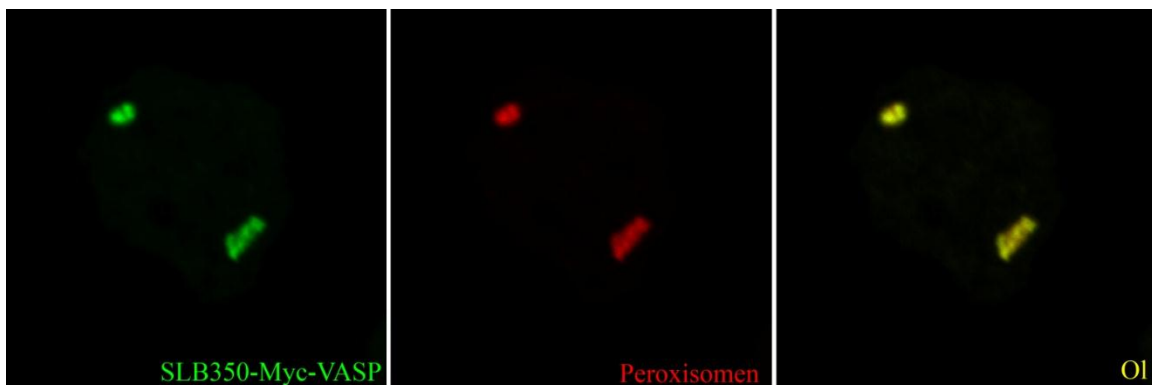


Abb. 14 – SLB350-Myc-VASP (Klon 699/498II)

Der Nachweis des Myc-Konstrukts erfolgt durch die Antikörperfärbung mit 9E10 (mk, grün). Die Rotfluoreszenz der Peroxisomen basiert auf dem rot fluoreszierenden Protein im RFP-SKL-Konstrukt. Bildbreite: 25  $\mu$ m

Die Expression von SLB350-Myc-VASP hat die Verklumpung der Peroxisomen zur Folge. In diesem Fall ist das Phänomen jedoch eindeutig auf VASP zurückzuführen, denn

eine alleinige Überexpressionen von SLB350-6xMyc oder SLB350-GFP führt zu keinem derartigen Phänotyp (151). Die Ausbildung eines einheitlich runden, homogenen Aggregats erfolgt nicht.

Färbt man die Aktin-Strukturen in SLB350-Myc-VASP-Zellen an, so zeigen sich deutliche Überlagerungen mit dem RFP-Signal (Abb. 15). Aktin wird folglich auch an die Peroxisomen ektopisch lokalisiert.

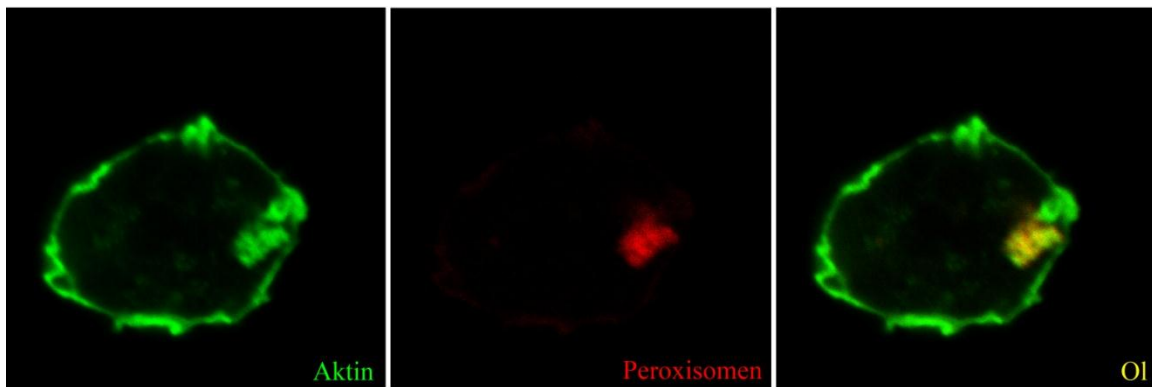


Abb. 15 – SLB350-Myc-VASP (Klon 699/498II)

Die Aktin-Färbung (A) erfolgt mittels des Antikörpers ACT-1-11 (mk, grün). Die Rotfluoreszenz der Peroxisomen basiert auf dem rot fluoreszierenden Protein im RFP-SKL-Konstrukt. Bildbreite: 25 µm

Sowohl GFP-LSD-VASP als auch SLB350-Myc-VASP werden im Vergleich zu VAM- und ALDH-Myc-VASP nur sehr schwach in den Zellen exprimiert (Abb. 62). So ist anzunehmen, dass die Menge an Hybridproteinen Einfluss auf die Form und Größe der Proteinaggregate in den Zellen nehmen kann. Stärkere Expressionen von GFP-LSD-VASP und SLB350-Myc-VASP könnten folglich zur Ausbildung großer, homogener Aggregate führen.

Weder LSD noch SLB350 weisen eine bekannte Aktin-bindende oder Aktin-modifizierende Domäne auf. Zudem sind keine Aktin-abhängigen Prozesse bekannt, in die die beiden Proteine involviert sind, so dass auch eine indirekte Interaktion von SLB350 und LSD mit Aktin unwahrscheinlich ist. Aus diesem Grund sind die Aktin-Akkumulationen an den verklumpten Peroxisomen und *Lipid Droplets* in SLB350-Myc-VASP- und GFP-LSD-VASP-Zellen allein auf das Protein VASP zurückzuführen. Zum einen ist anzunehmen, dass das ektopisch lokalisierte VASP willkürlich bestehende Aktin-Filamente an die Peroxisomen und *Lipid Droplets* bindet, was in den Aktin-Akkumulationen an den Organellen resultieren würde. Zum anderen ist es möglich, dass

VASP die Polymerisierung neuer Aktin-Filamente an diesen Organellen startet, was ebenfalls die Aktin-Akkumulation zur Folge hätte.

Die Bindung von VASP an Aktin-Filamente und an monomere Aktin-Proteine basiert auf dem Zusammenspiel der F-Aktin-bindenden (FAB), der G-Aktin-bindenden (GAB) und der Tetramerisierungs-Domäne (TETRA) (73, 74, 80).

Es wird erwartet, dass das Entfernen der FAB-Domäne die Bindung von VASP an Aktin-Filamente verhindert. Die ektopische Lokalisation von VASP hätte dann keine ektopische Aktin-Akkumulation zur Folge. Übernimmt Aktin, wie bereits oben erwähnt, im Fall der VAM-VASP-Aggregate eine Art „Gerüstfunktion“, so sollte durch die Vermeidung der VASP-Aktin-Filament-Interaktion die Aggregatbildung ausbleiben.

#### 4.1.3 Die Deletion der FAB-Domäne nimmt keinen Einfluss auf die Aggregate

Die Deletion der FAB-Domäne von VAM-VASP (VAM-VASP- $\Delta$ FABstr (#502)) führte ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit durch (149). Durch die Expression von VAM-VASP- $\Delta$ FABstr in AX2-Zellen kam es wider Erwarten zur Ausbildung von Aktin-Aggregaten. Möglich ist jedoch, dass diese Ausbildung durch die funktionelle FAB-Domäne des endogenen VASP-Proteins ermöglicht wird. Schließlich können exogenes VAM-VASP- $\Delta$ FABstr und endogenes VASP über deren TETRA-Domänen gemischte Proteinkomplexe bilden. Endogenes VASP wird so, zusammen mit F-Aktin, in den VAM-VASP- $\Delta$ FABstr-Aggregaten lokalisiert.

Durch die Expression von VAM-VASP $\Delta$ FABstr in VASP-Knockout-Zellen steht kein endogenes VASP für die Interaktion mit dem Proteinhybrid zur Verfügung. Somit ist anzunehmen, dass keine Aktin-Filamente rekrutiert werden können, was die Ausbildung von Aktin-positiven VAM-VASP- $\Delta$ FABstr<sup>VASP-KO</sup>-Aggregaten verhindern würde. Im Gegensatz dazu sollte die Expression des VAM-VASP-Volllänge-Konstrukts in VASP-Knockout-Zellen durch die vorhandene FAB-Domäne von VASP im VAM-VASP-Protein die Ausbildung von Aktin-Aggregaten ermöglichen.

Die Expressionen von VAM-VASP $\Delta$ FABstr und VAM-VASP erfolgen in der VASP-Knockout-Zelllinie VASP: *strain* DBS0237034 (bezogen über *Dicty Stock Center*).

Die Expression von VAM-VASP im VASP-Knockout-Hintergrund induziert, wie erwartet, die Ausbildung rundlicher, Aktin-positiver VAM-VASP<sup>VASP-KO</sup>-Aggregate

(Abb. 16, obere Bildreihe). Dieser Phänotyp gleicht dem der VAM-VASP-Mutante 2B-1 (148). Der Verlust von endogenem VASP spielt für die VAM-VASP<sup>VASP-KO</sup>-Aggregatausbildung folglich keine Rolle.

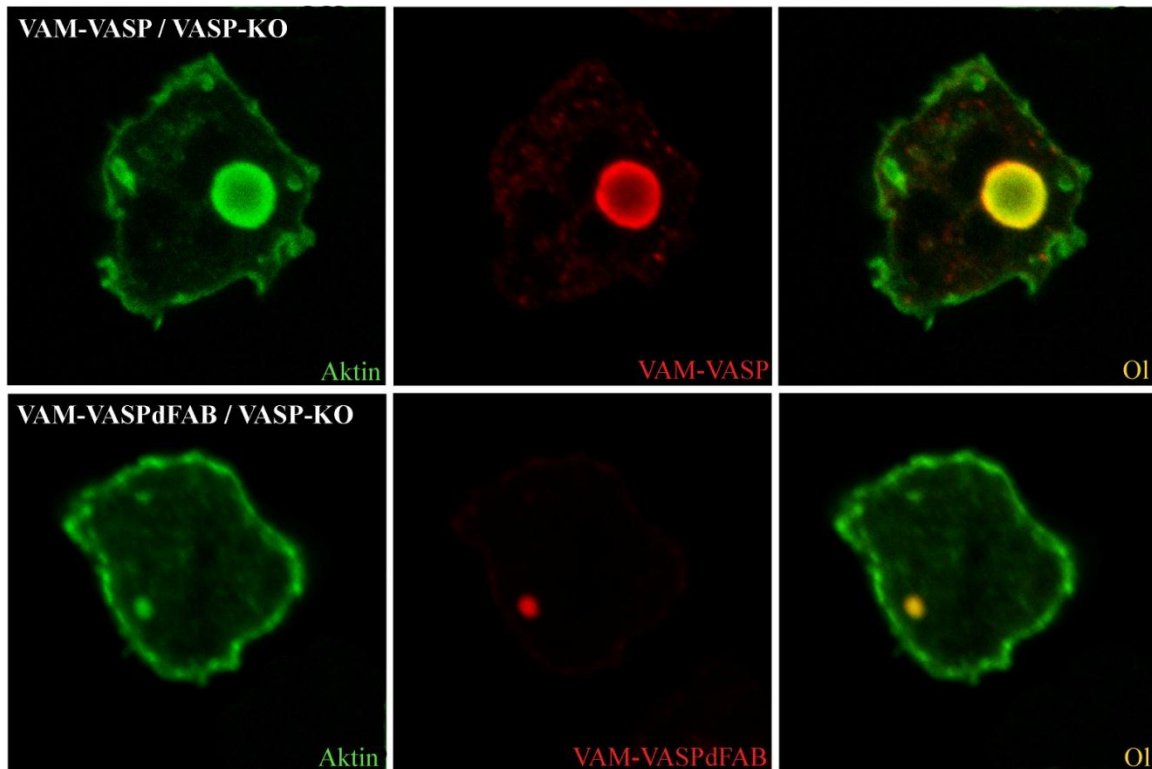


Abb. 16 – Expression diverser VASP-Konstrukte im VASP-Knockout-Hintergrund

Die Aktin-Färbung erfolgt mittels Phalloidin-Alexa-Fluor 488 (grün) und die Myc-Färbung mittels des Antikörpers 9E10 (mk, rot). Bildbreiten: VAM-VASP (Klon 519/VASP/III): 25  $\mu$ m; VAM-VASP $\Delta$ FAB (Klon 502/VASP/II): 20  $\mu$ m

Die Transformation von VAM-VASP $\Delta$ FABstr im VASP-Knockout-Stamm führt wider Erwarten ebenfalls zur Bildung von Aktin-positiven VAM-VASP $\Delta$ FABstr<sup>VASP-KO</sup>-Aggregaten (Abb. 16, untere Bildreihe). Diese sind jedoch sehr klein.

Betrachtet man die Expressionsstärke von VAM-VASP $\Delta$ FABstr in Knockout-Zellen im Vergleich zu der Expressionsstärke des Konstruktes im AX2-Hintergrund, so fällt auf, dass die Ausbildung der punktförmigen VAM-VASP $\Delta$ FABstr<sup>VASP-KO</sup>-Aggregate mit einer geringen Expression des Hybrids korreliert (Abb. 67). Es ist anzunehmen, dass eine stärkere Expression von VAM-VASP $\Delta$ FABstr in Knockout-Zellen die Ausbildung von VAM-VASP- $\Delta$ FABstr-ähnlichen Aggregaten zur Folge hat (149).

Neben der FAB-Domäne ermöglicht auch die G-Aktin-bindende (GAB) Domäne von VASP einen Kontakt mit Aktin, in diesem Fall monomerem Aktin. Im Rahmen meiner Diplomarbeit entstand bereits ein Deletionskonstrukt, in der die GAB-Domäne im VAM-VASP-Protein entfernt ist: VAM-VASP $\Delta$ GAB (Plasmid #512) (149). Die Expression von VAM-VASP $\Delta$ GAB in VASP-Knockout-Zellen erfolgt mit dem Ziel, herauszufinden, welchen Einfluss die GAB-vermittelte Aktin-Bindung auf die Ausbildung der VAM-VASP-Aggregate hat.

#### 4.1.4 Die Deletion der GAB-Domäne verhindert die Aktin-Akkumulation

Die Expression von VAM-VASP $\Delta$ GAB in AX2-Zellen, durchgeführt während meiner Diplomarbeit, führt zu einem sehr heterogenen Phänotyp: Von einzelnen Vesikel über kleine unförmige Aggregate bis hin zu kugeligen Aggregaten ist alles in VAM-VASP $\Delta$ GAB-Zellen eines einzigen Klons vertreten (Abb. 17) (149).

Es existiert nur ein VAM-VASP $\Delta$ GAB-Klon, auf den zurückgegriffen werden kann. Versuche, dieses Konstrukt erneut in AX2-Zellen zu transformieren, blieben erfolglos.

Wie die Intensitäten der Myc-Färbungen zeigen, ist die phänotypische Heterogenität der VAM-VASP $\Delta$ GAB-Zellen auf den unterschiedlichen Expressions-*Level* des Fusionsproteins zurückzuführen, welches von Zelle zu Zelle offensichtlich schwankt: Eine schwache VAM-VASP $\Delta$ GAB-Expression führt zur Markierung von Vesikeln (Abb. 17-A). Mit steigender Expression des Hybrids kommt es zu Aggregatbildungen (Abb. 17-B). Eine große Menge an in der Zelle vorliegendem VAM-VASP $\Delta$ GAB-Protein führt schließlich zum Aufbau einer rundlichen und homogenen VAM-VASP $\Delta$ GAB-Aggregats (Abb. 17-C).

Die Kolokalisation von Aktin mit dem VAM-VASP $\Delta$ GAB-Konstrukt ist ebenfalls sehr heterogen. Es zeigt sich größtenteils auch hier eine Korrelation zwischen der Intensität des Aktin-Signals in den VAM-VASP $\Delta$ GAB-Aggregaten und der Menge des vorliegenden VAM-VASP $\Delta$ GAB-Konstrukts in der Zelle: Je ausgeprägter die VAM-VASP $\Delta$ GAB-Aggregate sind, desto stärker zeigt sich das Überlagerungssignal von Aktin mit dem VAM-VASP $\Delta$ GAB-Konstrukt (Vgl. Abb. 17-B und 17-C). In einigen Zellen ist jedoch, unabhängig von der Menge des in der Zelle vorhandenen VAM-VASP $\Delta$ GAB-Proteins, kein akkumuliertes Aktin zu sehen (ohne Abb.).

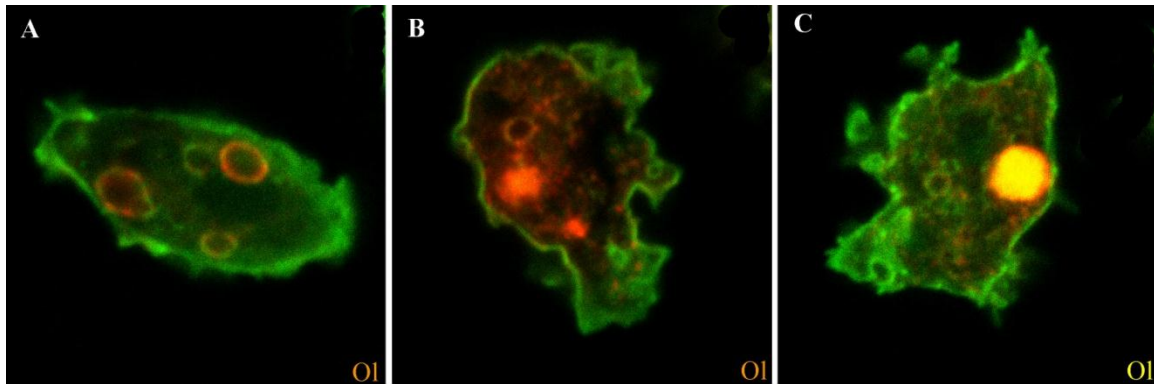


Abb. 17 – Expression von VAM-VASP $\Delta$ GAB in AX2-Zellen (Klon VV $\Delta$ GAB) (149)  
 Der Aktin-Nachweis erfolgt mittels Phalloidin-Alexa-Fluor 488 (grün). Für die Markierung der Myc-Konstrukte wird der Antikörper 9E10 (mk, rot) genutzt. Bildbreiten: A: 15  $\mu$ m; B und C: je 20  $\mu$ m

Exprimiert man VAM-VASP $\Delta$ GAB in VASP-Knockout-Zellen (Abb. 68), so zeigen sich unterschiedliche Phänotypen: Beispielsweise zeigt Klon 512/VASP $\Delta$ I eine sehr deutliche und homogene Verklumpung von Vacuolin-positiven Endosomen (Abb. 18).

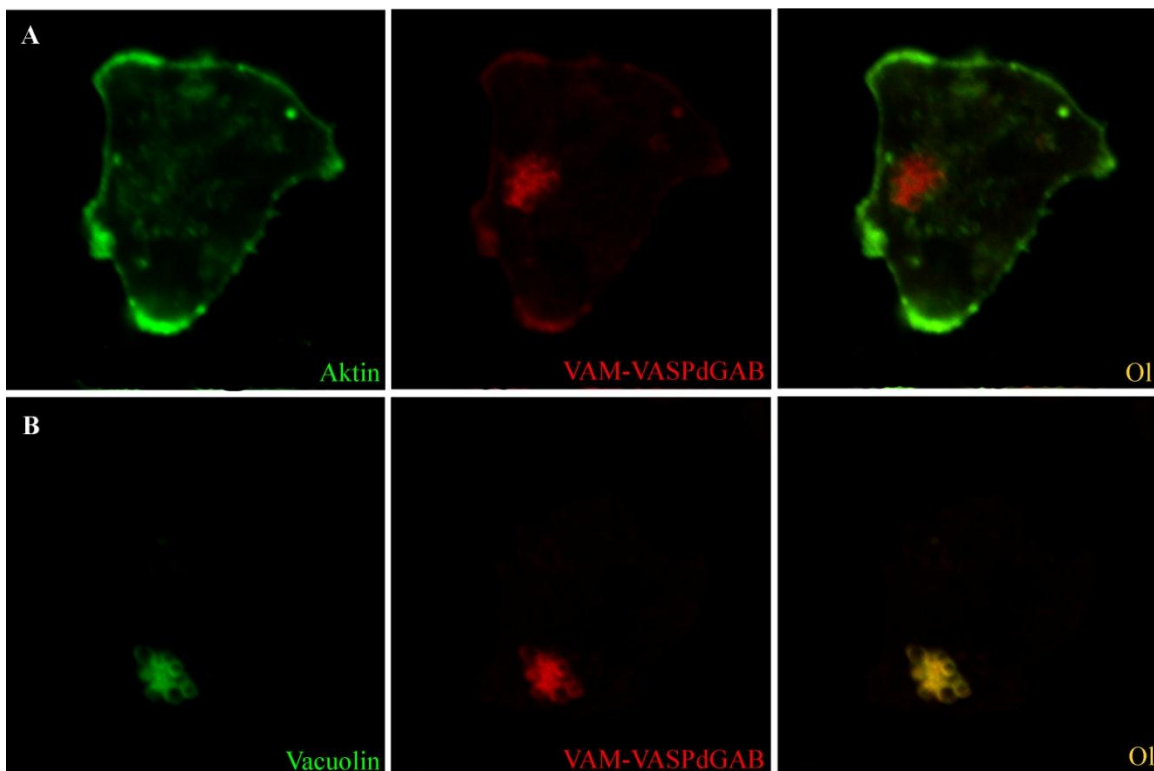


Abb. 18 - Expression von VAM-VASP $\Delta$ GAB in VASP-Knockout-Zellen (Klon 512/VASP $\Delta$ I)  
 Für die Färbung der Aktin-Strukturen (A) wurde der Antikörper ACT-1-11 (mk, grün), für Vacuolin (B) der Antikörper 263-79-2 (mk, grün) und für die Myc-Strukturen der Antikörper 9E10 (mk, rot) verwendet. Bildbreiten: A und B: je 25  $\mu$ m



Es liegen keine zusätzlichen, freien Endosomen vor. Bezüglich Aktin ist kein bzw. nur ein sehr schwaches Signal in den Endosomen-*Clustern* des VAM-VASP $\Delta$ GAB<sup>VASP-KO</sup>-Klons 512/VASP<sup>I</sup> zu erkennen, wohingegen der Zellkortex ein deutliches Aktin-Signal aufweist (Abb. 18-A). Das schwache Aktin-Signal dieser Endosomen-*Cluster* weist daraufhin, dass offensichtlich kein Aktin an diesen Organellen angehäuft wird (Abb. 18-B). Das endogene Vacuolin-Protein liegt in allen Fällen vollständig sequestriert in den VAM-VASP $\Delta$ GAB<sup>VASP-KO</sup>-Aggregaten vor (ohne Abb.).

Innerhalb der Zelllinien der VAM-VASP $\Delta$ GAB<sup>VASP-KO</sup>-Klone 512/VASP<sup>II</sup> und 512/VASP<sup>III</sup> zeigen sich hingegen wiederum sehr heterogene Phänotypen: von einzelnen Vesikeln (Pfeil in Abb. 19-A) bis hin zu verschiedenförmigen Aggregaten (Abb. 19, obere Bildreihe) ist alles vertreten. Letztere zeigen sich mit nur sehr schwachen Aktin-Signalen kolokalisierend (Abb. 19, untere Bildreihe). In einigen wenigen Fällen sind jedoch deutliche Aktin-Akkumulationen in den VAM-VASP $\Delta$ GAB<sup>VASP-KO</sup>-Aggregaten zu sehen (Abb. 56).

Durch die Expressionen von VAM-VASP $\Delta$ FABstr und VAM-VASP $\Delta$ GAB in AX2- und VASP-Knockout-Zellen wird offensichtlich, dass die in einer Zelle vorliegende Anzahl an Fusionsproteinen, die Aktin-Aggregate induzieren können, eine Bedeutung zu haben scheint. Die Anzahl an exprimierten Fusionsproteinen ist abhängig von den im Zellgenom eingebauten Vektorkopien, die die für die Hybride codierenden Gene tragen. Die Expressionsmenge an endogenen Proteinen unterliegt der Regulierung durch die Zelle selbst. Die Menge an zellulären endogenen und exogenen Proteinen ist für die funktionellen Moleküle sowohl von monomeren als auch von oligomeren Proteinen entscheidend.

Die Interaktion von endogenem und exogenem VASP wird durch die jeweilige oligomerisierende (TETRA) Domäne ermöglicht. Die Tetramerisierung von VASP unterstützt die Bindung des Proteins an Aktin-Filamente (74). Wird die TETRA-Domäne des VASP-Proteins im VAM-VASP-Konstrukt entfernt und das daraus resultierende VAM-VASP $\Delta$ TETRA-Konstrukt (Plasmid #503, (149)) in VASP-Knockout-Zellen transformiert, so wird die Tetramerisierung von VASP verhindert. Letzteres nimmt negativen Einfluss auf die Bindung von VASP an F-Aktin. Der Aufbau eines VAM-VASP $\Delta$ TETRA<sup>VASP-KO</sup>-Aggregates sollte nicht möglich sein.

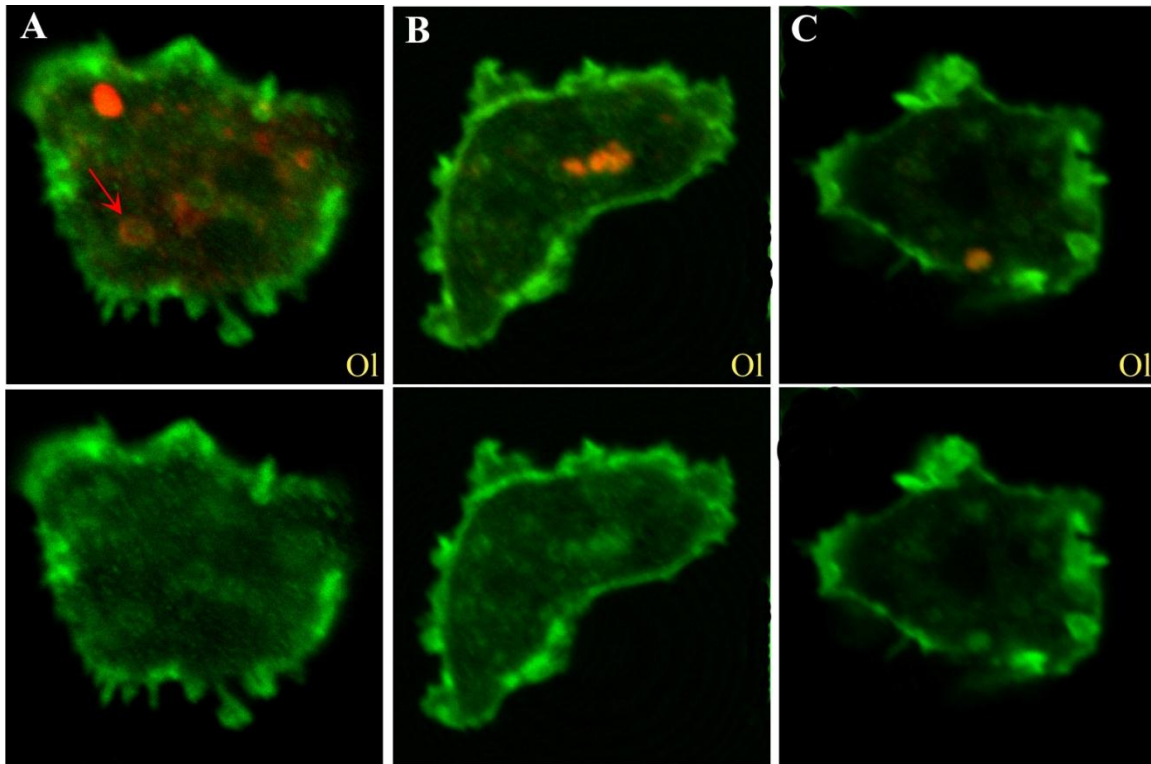


Abb. 19 – Aktin-Lokalisationen von VAM-VASP $\Delta$ GAB-Expressionen in VASP-Knockout-Zellen  
 Für die Färbung der Aktin-Strukturen (grün) wurden Phalloidin-Alexa-Fluor 488 oder der Antikörper ACT-1-11 (mk) verwendet. Die Myc-Konstrukte wurden durch Inkubationen mit dem polyklonalen oder dem monoklonalen Myc-Antikörper 9E10 (mk, rot) kenntlich gemacht. (A) und (B) zeigen Zellen des Klons Klon 512/VASP<sup>II</sup> und (C) Zellen des Klons Klon 512/VASP<sup>III</sup>. Bildbreiten: A: 17  $\mu$ m; B und C: je 20  $\mu$ m

#### 4.1.5 Die Deletion der TETRA-Domäne führt zu keiner Bildung von Aggregaten

Eine Transformation des VAM-VASP $\Delta$ TETRA-Plasmids in AX2-Zellen führte ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit durch (149). In diesem Fall wurden VAM-VASP $\Delta$ TETRA-Aggregate ausgebildet. Durch die Expression von VAM-VASP $\Delta$ TETRA im AX2-Hintergrund ist trotz der fehlenden TETRA-Domäne nicht auszuschließen, dass VAM-VASP $\Delta$ TETRA mit endogenem VASP interagieren kann: So ist anzunehmen, dass der Kontakt des exogenen und des endogenen VASP-Proteins durch eine indirekte Interaktion mittels Aktin-Filamente ermöglicht wird. Schließlich können beide Proteine über deren F-Aktin-bindenden Domänen an Aktin-Filamente binden. VAM-VASP $\Delta$ TETRA und endogenes VASP gelangen so in eine räumliche Nähe zueinander, was eine Interaktion beider Proteine und folglich die Ausbildung Aktin-positiver Aggregate ermöglicht.

Die Expressionsstärke von VAM-VASP $\Delta$ TETRA in VASP-Knockout-Zellen ist annähernd mit der von VAM-VASP $\Delta$ TETRA in AX2-Zellen zu vergleichen (Abb. 67). Die Bildung von VAM-VASP $\Delta$ TETRA<sup>VASP-KO</sup>-Aktin-Aggregaten bleibt erwartungsgemäß aus (Abb. 20). Aktin-positive Myc-Strukturen sind nur noch in Form von einzeln vorliegenden, späten Endosomen sichtbar (Pfeile in Abb. 20).

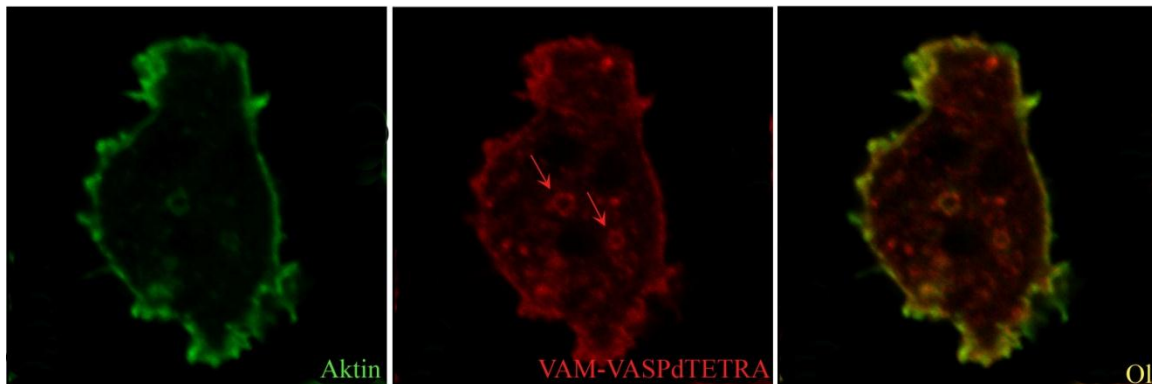


Abb. 20 – Expression von VAM-VASP $\Delta$ TETRA in VASP-Knockout-Zellen (Klon 503/VASP-KO III)  
Die Rotfluoreszenzen erfolgt durch die Färbung der Myc-Strukturen mit dem polyklonalen Myc-Antikörper. Die Grünfluoreszenzen beruhen auf der Färbung für Aktin (ACT-1-11). Die Pfeile markieren späte Endosomen. Bildbreite: 25  $\mu$ m

Die bisherigen Untersuchungen basieren auf die SLB350-, LSD-, Vacuolin- und ALDH-vermittelten ektopischen Lokalisationen des VASP-Proteins. Die Lokalisation von VASP an Peroxisomen (SLB350-Myc-VASP) und an *Lipid Droplets* (GFP-LSD-VASP) führt zu entsprechenden Organellen-*Clustern*, wobei nur im Fall der Peroxisomen die Ursache für die verklumpten Organellen eindeutig dem VASP-Protein zugeschrieben werden kann. ALDH-Myc-VASP und VAM-VASP führen zu kugeligen homogenen Aggregaten. Endosomale ALDH- oder VacuolinA-Strukturen sind nicht nachweisbar.

Unabhängig davon an welches Organell das Volllängeprotein VASP lokalisiert wird, kommt es zur parallelen ektopischen Lokalisation von Aktin. Letzteres zeigt Abhängigkeit von den Aktin-bindenden Domänen im VAM-VASP-Protein und von der Anzahl der in der Zelle vorliegenden funktionellen VAM-VASP-Moleküle: Entfernt man die GAB-Domäne im VAM-VASP-Protein so reduziert sich die Aktin-Anhäufung im VAM-VASP $\Delta$ GAB-Aggregat. Wird die Bildung eines VAM-VASP-Tetramers durch die Deletion der TETRA-Domäne (VAM-VASP $\Delta$ TETRA) und durch das Entfernen von

endogenem VASP verhindert, so wird die Bindung an F-Aktin negativ beeinträchtigt. Es wird kein VAM-VASP $\Delta$ TETRA<sup>VASP-KO</sup>-Aggregat ausgebildet.

In einem nächsten Schritt werden verschiedene Aktin-bindende Proteine mittels VacuolinA-Myc an späte Endosomen ektopisch lokalisiert. Ziel ist es, herauszufinden, ob VAM-VASP-ähnliche Aggregate mit anderen endosomal lokalisierten, Aktin-interagierenden Proteinen induziert werden können. Sind die bisher beschriebenen VAM-VASP-Phänotypen allein auf die durch VASP vermittelte, spezifische Aktin-Bindung zurückzuführen, so sind in den Fällen der folgenden Proteine keine Aktin-Aggregate zu erwarten. Handelt es sich bei den VAM-VASP-Aggregaten hingegen um ein unspezifisches Phänomen, so besteht die Möglichkeit, dass Aktin-Aggregate auch durch beliebige Aktin-bindende Proteine induziert werden können.

## 4.2 Ein Großteil an VAM-Proteinen hat keine Aggregatbildung zur Folge

Für die ektopische Lokalisation an späte Endosomen werden Coactosin, Hisactophilin II, Ponticulin (-2TMD), das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP), Ssj758, Abp34,  $\alpha$ -Actinin und Filamin gewählt. Diese Proteine werden C-terminal an VacuolinA-Myc fusioniert, resultierend in den Plasmiden #537 (pB15-VAM-Coactosin), #536 (pB15-VAM-HisactophilinII), #678 (pB15-VAM-WASP), #644 (pB15-VAM-Ssj758), #841 (pB15-VAM-Abp34), #648 (pB15-VAM-Filamin) und #682 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin). Um eine wildtypische Plasmamembranlokalisierung des Fusionsproteins VAM-Ponticulin zu vermeiden, werden dem Ponticulin-Protein in der Fusion mit VacuolinA-Myc die Transmembrandomänen entfernt, resultierend in dem Plasmid #674 (pB15-VAM-Ponticulin (-2TMD)).

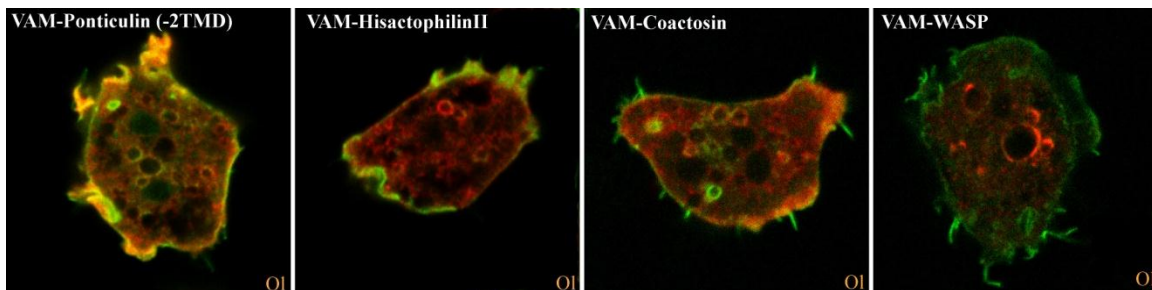


Abb. 21 – Diverse VAM-Konstrukte

Die Aktin-Strukturen wurden mit Phalloidin-Alexa-Fluor 488 (grün) gefärbt. Die Myc-Strukturen wurden mit dem Antikörper 9E10 (mk, rot) markiert. Bildbreiten: VAM-Ponticulin (-2TMD) (Klon 674(61)) und VAM-WASP (Klon 678IIa): je 29  $\mu\text{m}$ ; VAM-HisactophilinII (Klon 536) und VAM-Coactosin (Klon 535 #4): je 25  $\mu\text{m}$

Die Proteine VAM-Coactosin, VAM-HisactophilinII und VAM-Ponticulin liegen in den Zellen um ein Vielfaches häufiger vor als das VAM-VASP-Protein (Abb. 66). Jedoch zeigen sich in entsprechend exprimierenden Zellen neben Zytoplasma- und dominanter Kortexfärbung nur schwächere vesikuläre Färbungen (Abb. 21). Es sind keine morphologischen Veränderungen in den VAM-Coactosin-, VAM-HisactophilinII- und VAM-Ponticulin-Zellen zu sehen. Das Gleiche zeigt sich für VAM-WASP, welches jedoch nur in sehr geringer Menge in der Zelle vorliegt (Abb. 66): VAM-WASP kann durch Vacuolin zwar vollständig an die späten Endosomen lokalisiert werden, aber das hat keine Verklumpung der Organellen zur Folge (Abb. 21).

Abp34 wurde bereits von C. Schmauch mit VacuolinA-Myc, resultierend in VAM-Abp34, fusioniert (150). C. Schmauch beobachtete jedoch keinen auffälligen Phänotyp: Die Expression des Hybrids bedingte, neben der Markierung von Aktin-positiven Vesikel, hauptsächlich eine membranständige Lokalisation. Die Vesikel waren weder in ihrer Form und Anzahl noch in ihrer Ausprägung der Aktin-Hülle verändert (148).

Mit der Absicht, eine stärkere VAM-Abp34-Expression zu erreichen, die eventuell eine Aggregatausbildung zur Folge hat, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Ligation und Transformation von VAM-Abp34 erneut durchgeführt. Und tatsächlich: In einigen Zellen, wenn auch wenigen, sind rundliche, Aktin-positive Aggregate vorliegend (Abb. 22). Zusätzlich erfolgt die Lokalisation des VAM-Abp34-Hybrids im Zellkortex. Zudem sind wenige Aktin-positive, späte Endosomen sichtbar (Pfeil in Abb. 22).

Die VAM-Abp34-Aggregate ähneln den VAM-VASP-Aggregaten, jedoch erscheinen die VAM-Abp34-Aggregate nicht so kompakt.

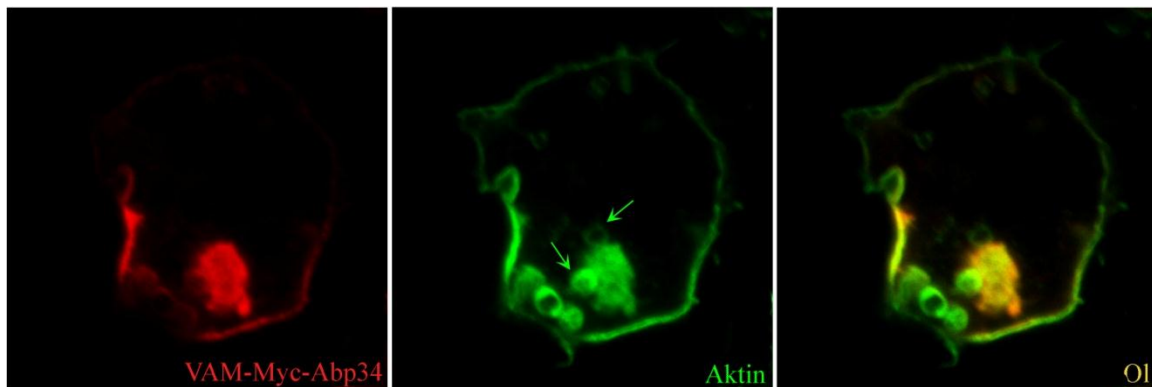


Abb. 22 – VAM-Abp34 (Klon 841 #7)

Die Färbung des Myc-Epitops wurde mittels des Antikörpers 9E10 (mk, rot) erreicht. Die Aktin-Strukturen wurden mit Phalloidin-Alexa-Fluor 488 (grün) markiert. Bildbreite: 25 µm

Die Expression von VAM-Ssj758 führt zur Ausbildung von sehr kleinen, rundlichen Punktstrukturen, in denen das gesamte endogene Vacuolin sequestriert vorliegt (Abb. 23-B). Es sind keine Vacuolin-positiven Endosomen sichtbar.

Aktin zeigt kein mit VAM-Ssj758 kolocalisierendes Signal (Abb. 23-A). Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass auch keine Aktin-bindenden Proteine in den VAM-Ssj758-Strukturen nachzuweisen sind.

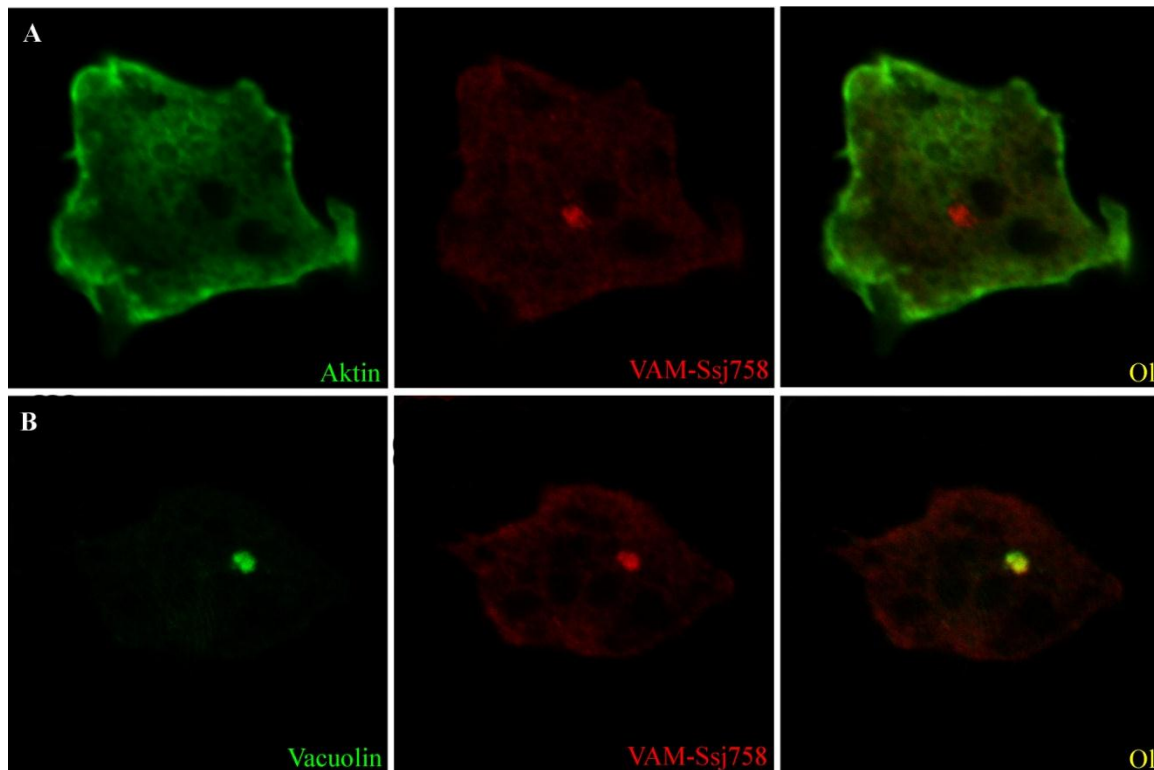


Abb. 23 – VAM-Ssj758 (Klon 644I)

Die Färbung von Aktin (A) wurde mittels des Antikörpers ACT-1-11 (mk, grün), die Färbung von Vacuolin mittels des Antikörpers 263-79-2 (mk, grün) und die Färbung des Myc-Epitops mittels des Antikörpers 9E10 (mk, rot) erreicht. Bildbreiten: A und B: je 25 µm

Da für das VAM-Ssj758-Konstrukt nur ein Klon aus circa zehn Transformationen gewonnen werden konnte, wurde Ssj758 zusätzlich an ALDH ligiert, resultierend in Plasmid #767 (pB15-ALDH-Myc-VASP). Erwartet wird ein ähnlicher Einfluss von Ssj758 auf die ALDH-Endosomen, wie er bereits für die Vacuolin-Vesikel beobachtet werden konnte.

ALDH-Myc-Ssj758-Zellen zeigen einen zu VAM-Ssj758-Zellen annähernd ähnlichen Phänotyp: Die ALDH-Myc-VASP-Strukturen sind klein und rundlich (Abb. 24). Jedoch scheinen diese vesikulär zu sein, d.h. die ALDH-Myc-Ssj758-Proteine werden an ein einziges Vesikel lokalisiert (Abb. 24-B). Weder Aktin noch Vacuolin liegen akkumuliert in diesen Myc-positiven Strukturen vor (Abb. 24).

Durch die Expression von VAM-Ssj758 und ALDH-Myc-Ssj758 und die daraus folgende Ausbildung kleiner aggregatähnlicher Strukturen ergibt sich die Vermutung, dass die Anhäufung von endogenen Proteinen in Form von Aggregaten Aktin-unabhängig ist.

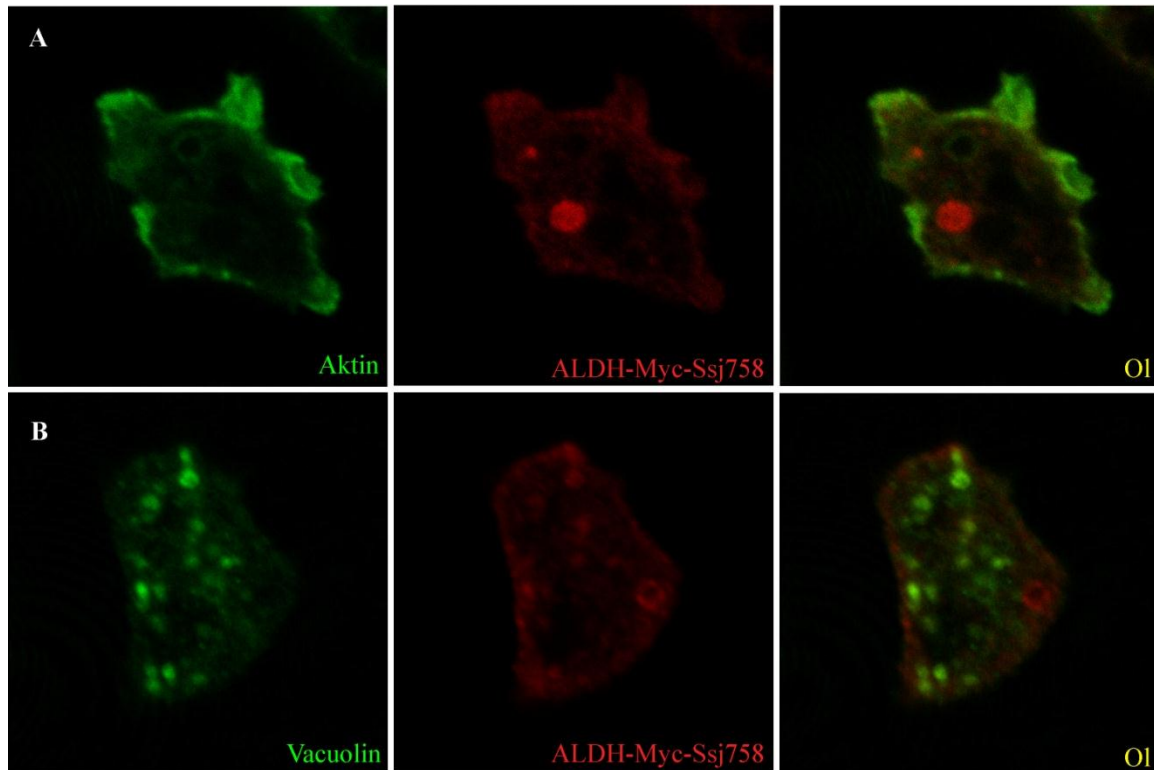


Abb. 24 – ALDH-Myc-Ssj758 (Klon 767II)

Für die Färbung der Aktin-Strukturen (A) wurde der Antikörper ACT-1-11 (mk, grün), für Vacuolin (B) der Antikörper 263-79-2 (mk, grün) und für die Myc-Strukturen der Antikörper 9E10 (mk, rot) verwendet. Bildbreiten: A: 22  $\mu\text{m}$ ; B: 20  $\mu\text{m}$

Die Expressionen von VAM- $\alpha$ -Actinin und VAM-Filamin führen zur Ausbildung kugelartiger Aggregate (Abb. 25). Der VAM- $\alpha$ -Actinin-Klon 682II und VAM-Filamin-Klon 648-23 weisen ein annähernd gleichen Expressions-Level wie der VAM-VASP-Klon 2B-1 auf (Abb. 69). In 98 % (n = 202) der VAM- $\alpha$ -Actinin-Zellen ( $\text{\O} = 5,08 \mu\text{m}$  (n = 97)) und in 92 % (n = 201) der VAM-Filamin-Zellen ( $\text{\O} = 5,58 \mu\text{m}$  (n = 90)) sind entsprechende Aggregate zu sehen. Im Gegensatz und den VAM-VASP-Klonen sind in Zellen der VAM-Filamin- und VAM- $\alpha$ -Actinin-Klone zusätzlich lokale Myc-Färbungen der Plasmamembran zu sehen (Abb. 24: am Beispiel von VAM-Filamin zu sehen). Einige der VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Fusionsproteine werden offensichtlich entsprechend der wildtypischen Lokalisationen von  $\alpha$ -Actinin und Filamin im Zellkortex lokalisiert.



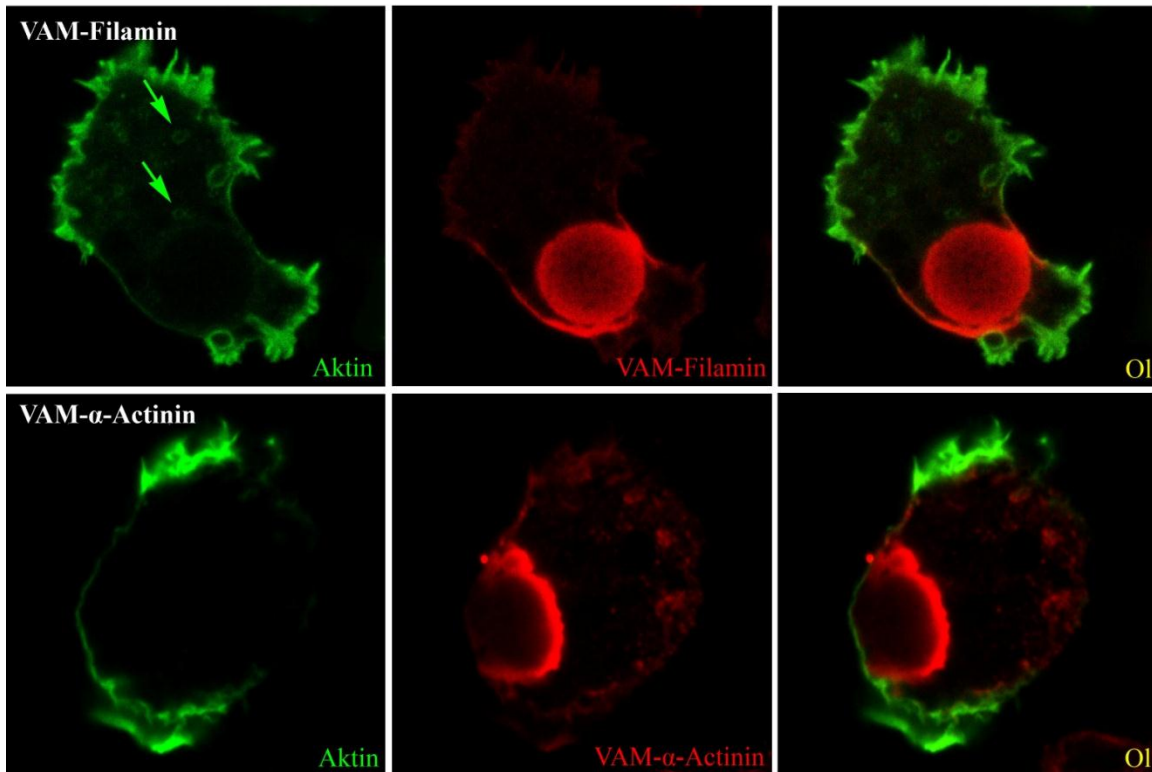


Abb. 25 – Expressionen der VAM-Filamin- (Klon 648-23) und der VAM- $\alpha$ -Actinin-Hybride (Klon 682II2)  
 Die Färbungen zum Nachweis der Myc-Konstrukte erfolgten mit 9E10 (mk, rot) und zum Nachweis von F-Aktin mit Phalloidin-Alexa-Fluor-488 (grün). Die Pfeile markieren späte Endosomen.  
 Bildbreiten: VAM-Filamin: 33  $\mu$ m; VAM- $\alpha$ -Actinin: 25  $\mu$ m

Ein weiterer markanter Unterschied zu den VAM-VASP-Zellen zeigt sich in der Aktin-Lokalisation: Während die VAM-VASP-Aggregate deutlich aus Aktin aufgebaut sind (148), führen Aktin-Färbungen der VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Zellen nur zur Fluoreszenzsignalen im Zellkortex. Die VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate erscheinen Aktin-frei (Abb. 25).

Die Färbung von Vacuolin beweist die Akkumulation des endogenen Vacuolin-Proteins in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregaten (Abb. 26, am Beispiel von VAM-Filamin gezeigt). Koexpressionen von GFP-VacuolinA mit VAM- $\alpha$ -Actinin oder VAM-Filamin bestätigen das (ohne Abb.): In allen Fällen ist ausschließlich eine grüne Fluoreszenzfärbung der Aggregate zu beobachten. Folglich geht das endogene Vacuolin-Protein mit dem exogenen Vacuolin im Fusionskonstrukt eine Komplexbildung ein. Eine direkte Interaktion zwischen endogenem und exogenem Protein konnte bisher nicht nachgewiesen werden, sie scheint aber sehr wahrscheinlich, da Vacuolin mindestens als Trimer in der Zelle agiert (35).

Nur in wenigen VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Zellen sind zusätzlich Vacuolin-positive, späte Endosomen zu erkennen (Pfeile in Abb. 25 und 26), die in ihrer Intensität und Anzahl aber nicht denen des Wildtyps entsprechen.

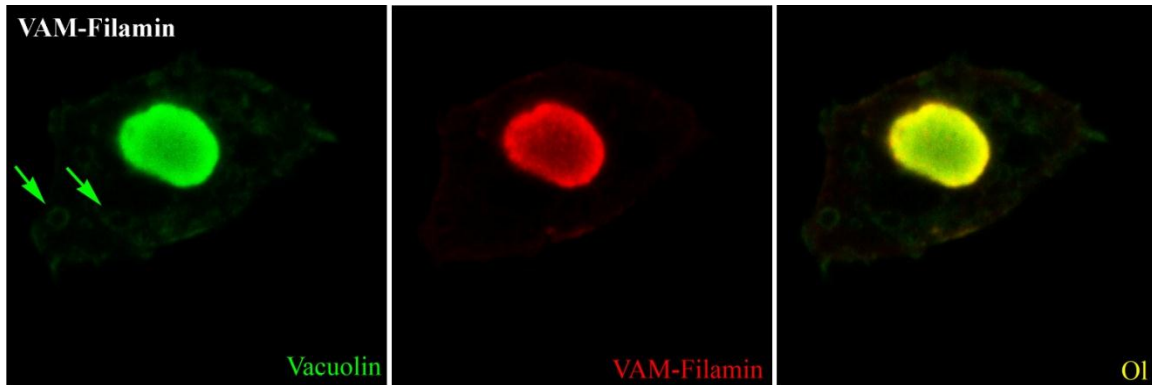


Abb. 26 – Nachweis von Vacuolin (Klon 648-23)

Zellen des starken VAM-Filamin-Expriemiers wurden mit den Antikörpern 263-79-2 (mk, grün) gegen Vacuolin und mit 9E10 (mk, rot) gegen Myc angefärbt. Die Pfeile markieren späte Endosomen.

Bildbreite: 25  $\mu$ m

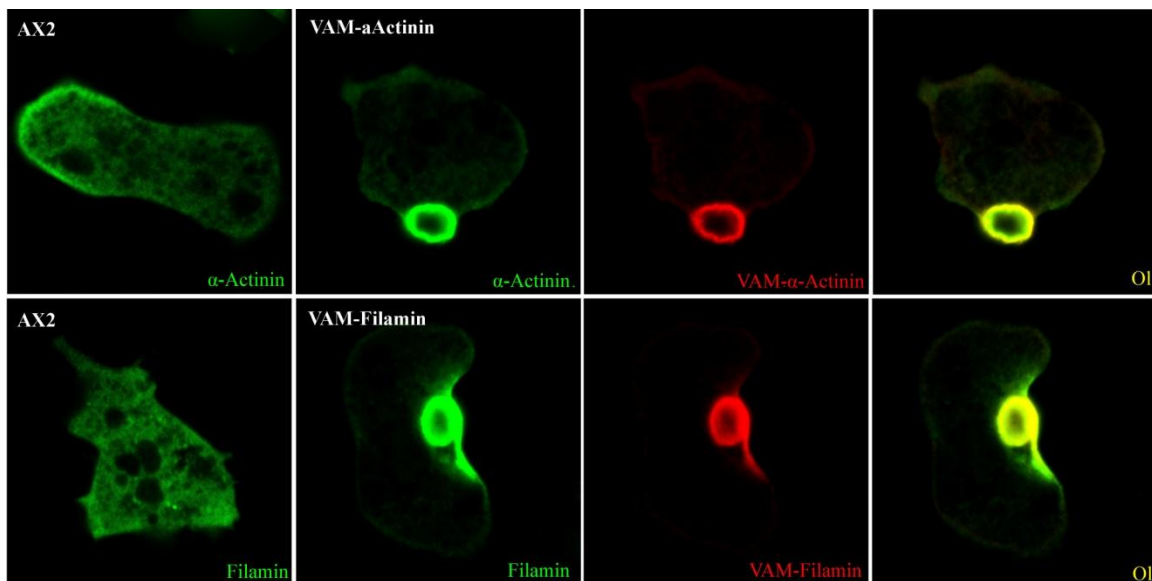


Abb. 27 – Färbung von endogenem  $\alpha$ -Actinin und Filamin

Die Färbung von Filamin erfolgte in AX2- und VAM-Filamin-Zellen (Klon 648-23) mittels des monoklonalen Antikörpers 82-471-14 (grün). Die Färbung von  $\alpha$ -Actinin erfolgte in AX2- und VAM- $\alpha$ -Actinin-Zellen (Klon 682II2) mittels des monoklonalen Antikörpers 47-19-2 (grün). Die Myc-Strukturen wurden mit dem polyklonalem Antikörper markiert (rot). Im Vergleich zu den Mutanten ist jeweils die wildtypische Lokalisation von  $\alpha$ -Actinin und Filamin in AX2-Zellen gezeigt (linke Bildreihe). Bildbreiten: je 25  $\mu$ m

Sowohl  $\alpha$ -Actinin als auch Filamin liegen als Dimer in der Zelle vor. Um zu prüfen, ob die endogenen Proteine  $\alpha$ -Actinin und Filamin mit den entsprechenden exogenen Proteinen in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Hybriden eine Komplexbildung eingehen, erfolgen Färbungen mit monoklonalen Antikörpern (Abb. 27). Sowohl in den VAM- $\alpha$ -Actinin-Aggregaten als auch in den VAM- $\alpha$ -Filamin-Aggregaten liegen die entsprechenden endogenen Bindungspartner vor: Es zeigen sich deutliche Kollokalisierungen der endogenen  $\alpha$ -Actinin- und Filamin-Proteine mit den entsprechenden exogenen Myc-Konstrukten (Abb. 27).

Besonders auffällig sind die großen, kugeligen Aggregate, die durch die Expression von VAM- $\alpha$ -Actinin und VAM-Filamin induziert werden (Abb. 25). Im Gegensatz zu den VAM-VASP-Aggregaten weisen die VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate jedoch keine Aktin-Anhäufungen auf. Aktin scheint folglich nicht essentiell für den Aufbau von Proteinaggregaten zu sein.

Um diese Annahme zu bestätigen, soll zunächst eindeutig gezeigt werden, dass in den Aggregaten der VAM- $\alpha$ -Actinin- und der VAM-Filamin-Zellen kein Aktin und keine Aktin-interagierende Proteine angehäuft vorliegen.

### 4.3 VAM- $\alpha$ -Actinin und VAM-Filamin induzieren Aktin-freie Aggregate

Weder globuläres noch filamentöses Aktin war bisher in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregaten nachzuweisen. Nimmt man an, dass die *Crosslinking*-Aktivität von  $\alpha$ -Actinin und Filamin in den Hybriden so stark ist, dass der Vernetzungsgrad der Aktin-Filamente zu hoch ist, so hätte das zur Folge, dass eine Bindung von F-Aktin durch Antikörper oder anderer Moleküle wie Phalloidin nicht möglich ist. Für das Protein Cofilin sind solche Fälle bekannt (158-160): Cofilin bindet zwischen zwei Aktin-Untereinheiten im Filament und führt so zu einer Biegung von F-Aktin. Diese strukturelle Veränderung des Aktin-Filaments hat zur Folge, dass Phalloidin nicht mehr an dieses binden kann. Um ähnliches im vorliegenden Fall auszuschließen, erfolgen unterschiedliche Experimente, um die Frage nach dem Vorhandensein von Aktin eindeutig zu beantworten. Wenn nicht anders erwähnt, werden hierfür stets der stark exprimierende VAM- $\alpha$ -Actinin-Klon 682II2 und der stark exprimierende VAM-Filamin-Klon 648-23 verwendet. Zum Vergleich werden zusätzlich die VAM-VASP-Zellen des Klons 2B-1 einbezogen.

#### 4.3.1 Weder Aktin noch Aktin-interagierende Proteine sind nachzuweisen

##### 4.3.1.1 Die Hitzedenaturierung als Alternative zur chemischen Fixierung

Durch eine chemische Fixierung, wie sie für die bisherigen Abbildungen verwendet wurde, kann eine stark vernetzte Proteinstruktur eventuell nicht aufgebrochen werden. Die Formaldehyde im Fixativ verbinden die Proteine über ihre Aminogruppen. Die Proteine wahren so ihre natürliche Faltung und Position in der Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung. Um den Zugang von Antikörpern zu den einzelnen Proteinkomponenten zu erleichtern, kann die Hitzedenaturierung verwendet werden: Die zu fixierenden und zu färbenden Zellen werden auf Deckgläschen abgesetzt und kurz durch eine Flamme gezogen. Im Anschluss unterliegen die fixierten Zellen den Antikörperinkubationen und der Vorbereitung für die mikroskopische Analyse.

Mithilfe eines anderen Myc-Konstrukts konnte ich zeigen, dass die Hitzefixierung zum Erfolg führt. In diesem Fall führte der Austausch einer N-terminalen SH3-Domäne eines Proteins durch einen Myc-Tag offensichtlich dazu, dass die Faltung des betroffenen Proteins beeinflusst wurde. Der N-terminale Myc-Tag gelangte ins Innere des gefalteten

Proteins oder wurde so durch die Proteinfaltung maskiert, dass der *Tag* nicht mehr durch Myc-Antikörper erkannt werden konnte. Erst der thermische Aufbruch der mutierten Proteinstruktur machte das Myc-Epitop für Antikörper wieder zugänglich (ohne Abb.).

Entsprechend erfolgen die Hitzefixierungen von AX2-, VAM-VASP-, VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Zellen. In allen vier Zelllinien sollte durch die Färbung von Aktin ein Signal im Kortex erhalten werden. Das bestätigt sich für jede Zelllinie (Abb. 28).

Späte Endosomen, die einen Aktin-*Coat* tragen, konnten bei den bisherigen chemischen Fixierungen in AX2-Zellen und vereinzelt in VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Zellen beobachtet werden. Bei den Hitzedenaturierungen dieser Zelllinien bleibt der Nachweis von Endosomen aus (Abb. 28). Für diese Organellen ist die Methode der Hitzefixierung offensichtlich zu aggressiv.

Die Positivkontrolle VAM-VASP zeigt neben einem Aktin-abhängigen Fluoreszenzsignal im Zellkortex zusätzlich ein deutliches Aktin-positives Signal in den VAM-VASP-Aggregaten (Abb. 28). In den Fällen von VAM- $\alpha$ -Actinin und VAM-Filamin sind allerdings selbst durch den hitzeabhängigen Aufbruch der Proteinstrukturen keine Aktin-Moleküle in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregaten nachweisbar (Abb. 28).

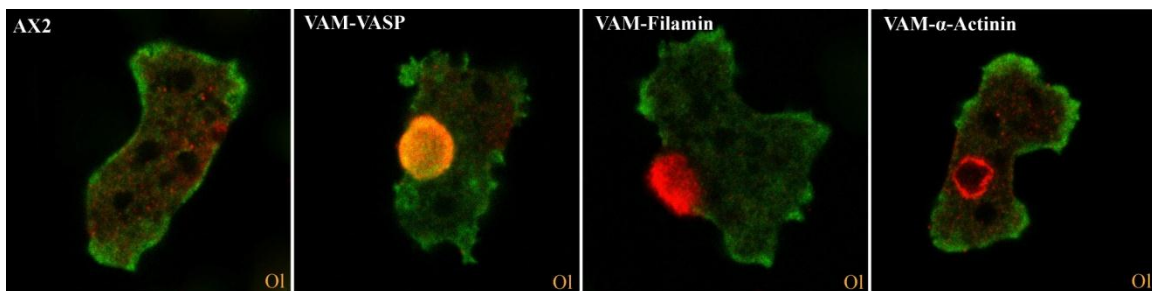


Abb. 28 – Hitzefixierung diverser Zelllinien

Aktin wurde mit dem Antikörper ACT-1-11(mk, grün) und das Myc-Epitop mit dem polyklonalen Antikörper (rot) markiert. Bildgrößen: AX2: 29  $\mu\text{m}$ ; VAM-VASP (Klon 2B-1): 25  $\mu\text{m}$ ; VAM-Filamin (Klon 648-23): 29  $\mu\text{m}$ ; VAM- $\alpha$ -Actinin (Klon 682II2): 33  $\mu\text{m}$ .

4.3.1.2 Es sind keine Aktin-interagierende Proteine in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregaten akkumuliert

Das Fehlen von Aktin in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregaten lässt sich durch die Abwesenheit von Aktin-bindenden oder -modifizierenden Proteine weiter untermauern. Für diesen Versuch wurden Proteine gewählt, die in den VAM-VASP-Aggregaten eindeutig sequestriert vorliegen (150): Die Einlagerung von Aktin-interagierenden Proteinen, wie z. B. Coronin, Severin oder Abp34, erscheint aufgrund des in den VAM-VASP-Aggregaten vorliegenden F-Aktins plausibel (Tab. 01).

	<u>VAM-VASP</u>	<u>VAM-Filamin</u>	<u>VAM-<math>\alpha</math>-Actinin</u>
<u><i>Aktin-interagierende Proteine</i></u>			
Aktin	+	-	-
$\alpha$ -Actinin	+	-	+
ABP34	+	-	-
Cap34 (Untereinheit von Cap32/34)	+	-	-
Coactosin	+/-	+/-	+/-
Coronin	+	-	-
Daip1	+	-	-
Filamin	+	+	-
Myosin II	+/-	-	-
RFP-Aktin	+	-	-
Severin	+	-	-
Talin	-	-	-
Profilin	+	-	-
<u><i>Andere Proteine</i></u>			
GFP-VacuolinA	+	+	+
H <sup>+</sup> -ATPase	-	-	-
Porin	-	-	-
Proteindisulfidisomerase	-	-	-
RFP-Apg8	-	-	-
Tubulin	-	-	-
Ubiquitin	+	+	+

Tab. 01 – Auflistung verschiedener Proteine, auf die die VAM-VASP-, die VAM- $\alpha$ -Actinin- und die VAM-Filamin-Aggregate untersucht worden

(+) weist auf ein positives Signal bezüglich der Fluoreszenz in den VAM-Aggregaten hin, d. h. das Fluoreszenzsignal hebt sich eindeutig von dem des Zytoplasmas ab. (-) weist auf eine fehlende Fluoreszenz in den VAM-Aggregaten hin, d. h. die Fluoreszenz des Zytoplasmas überwiegt der der VAM-Aggregate. (+/-) weist auf mittelmäßige, also nicht eindeutige Fluoreszenzsignale hin, d. h. die Fluoreszenz der VAM-Aggregate entspricht meist der des Zytoplasmas oder hebt sich nur gering von dieser ab (siehe Beispiel Coactosin (Abb. 29)).

Für die VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate sind keine dieser Proteine nachzuweisen, wie am Beispiel von Coronin gezeigt (Abb. 29). In *D. discoideum* sind zwei Coronin-Isoformen bekannt, CRN12 (*corA*) und CRN7 (*corB*) ([http://dictybase.org/DDB\\_G0267382](http://dictybase.org/DDB_G0267382) und [DDB\\_G0269388](http://dictybase.org/DDB_G0269388)) (161). Beide Proteine assoziieren mit dem Aktin-Zytoskelett und zeigen größtenteils überlappende Lokalisationen in der Zellperipherie und an Makropinosomen auf (161).

Werden AX2-Zellen, VAM-VASP-, VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Zellen für Coronin CRN12 gefärbt, so zeigt sich in allen Zelllinien eine deutliche Fluoreszenz im Kortextbereich (Abb. 29). Schaut man sich hingegen die verschiedenen VAM-Aggregate an, so erscheint nur in den VAM-VASP-Aggregaten ein deutliches Grünsignal, in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und den -Filamin-Aggregaten fehlt dieses.

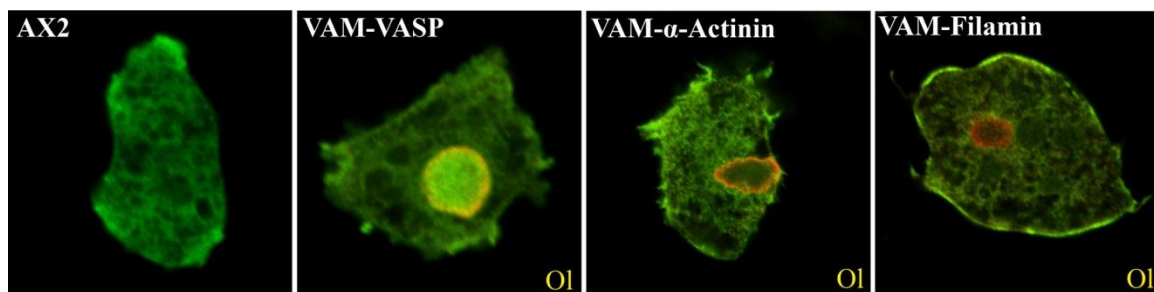


Abb. 29 – Färbung diverser Zellen zum Nachweis von Coronin

Coronin wurde mit einem Antikörpermischung aus 194-62-7 und 176-3D6 (beide mk, grün) und das Myc-Epitop mit dem polyklonalen Antikörper (rot) markiert. Bildgrößen: AX2 und VAM-VASP (Klon 2B-1): je 25  $\mu$ m; VAM-Filamin (Klon 648-23): 40  $\mu$ m; VAM- $\alpha$ -Actinin (Klon 682II2): 50  $\mu$ m.

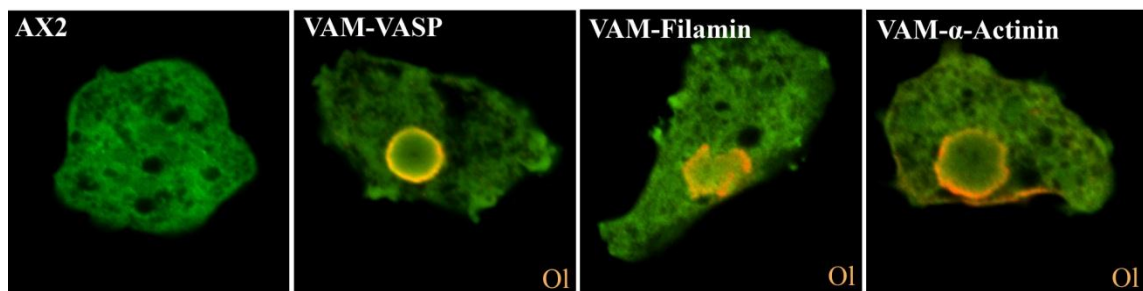


Abb. 30 – Färbung diverser Zellen zum Nachweis von Coactosin

Coactosin wurde mit dem Antikörper 177-29-B2-8 (mk, grün) und das Myc-Epitop mit dem polyklonalen Antikörper (rot) markiert. Bildgrößen: AX2 und VAM- $\alpha$ -Actinin (Klon 682II2): je 25  $\mu$ m; VAM-VASP (Klon 2B-1): 29  $\mu$ m; VAM-Filamin (Klon 648-23): 33  $\mu$ m

Bei einigen Proteinen, ist keine klare Aussage bezüglich deren Anhäufung in allen VAM-Aggregaten zu treffen. Beispielsweise zeigt die Färbung für das Coactosin-Protein ein

sehr schwaches Lokalisationssignal in den VAM-Aggregaten: Die Fluoreszenz von Coactosin in den VAM-Aggregate hebt sich kaum von der im Zytoplasma ab (Abb. 30). Massenspektrometrischen Analysen der aufgereinigten VAM-Aggregate zeigen allerdings keine Coactosin-Identifikationen (Ergebnisse: 4.3.1.5).

#### 4.3.1.3 RFP-Aktin lokalisiert nicht in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregaten

Eine andere Möglichkeit, der Frage bezüglich des Aktin-Vorkommens in den VAM-Aggregaten nachzugehen, ist die Überexpression von RFP-markierten Aktin-Molekülen (Plasmid #781) in den VAM-VASP-, VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Zellen. Wird Aktin zum Aufbau der kugligen VAM-Aggregate gebraucht, so werden neben den endogenen auch die fluoreszierenden Aktin-Proteine eingebaut. Die VAM-Aggregate erhalten dadurch eine nachweisbare Fluoreszenz.

Die alleinige Überexpression von RFP-Aktin in AX2-Zellen führt zu einer deutlichen Rotfluoreszenz des Aktin-Kortex (Abb. 31). Folglich inkorporiert die Zelle RFP-Aktin, dem endogenen Aktin entsprechend, in die kortikalen Aktin-Filamente.

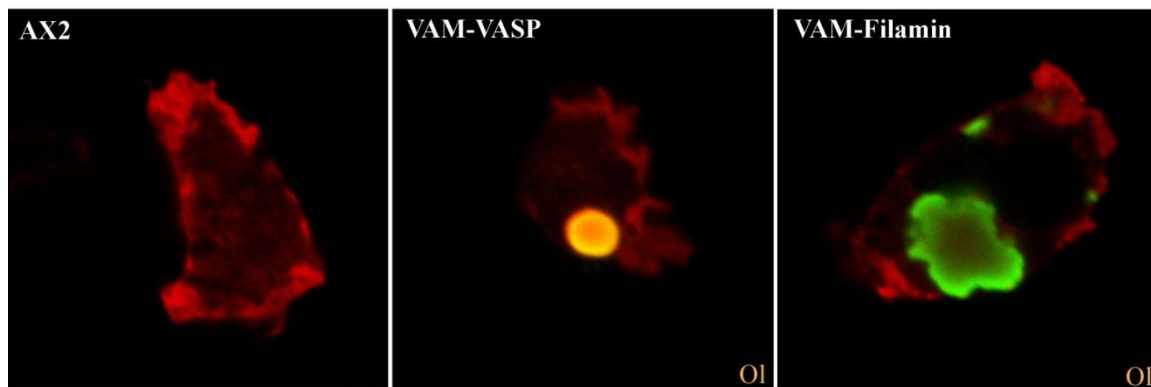


Abb. 31 – Kotransformation diverser Zelllinien mit RFP-Aktin

Die jeweiligen Aufnahmen entstanden aus Zellgemischen kurz nach den Elektroporationen. Selektierte positive Klone konnten leider nicht gewonnen werden. Die Färbung der Myc-Konstrukte erfolgte mit dem Antikörper 9E10 (mk, grün). Bildbreiten: AX2 und VAM-Filamin: je 25  $\mu$ m; VAM-VASP: 20  $\mu$ m

In einer Koexpression mit VAM-VASP führt RFP-Aktin zusätzlich zur Fluoreszenz der zelltypischen Aggregate (Abb. 31). Ähnliches wurde auch schon für die Koexpression von VAM-VASP mit GFP-Aktin gezeigt (148). In Koexpression mit VAM-Filamin führt RFP-Aktin zu keinem überlappenden Fluoreszenzsignal mit dem Myc-Konstrukt (Abb.



31). Nur im Kortex der VAM-Filamin-Zellen zeigt sich eine Aktin-abhängige Rotfluoreszenz. Die VAM-Filamin-Aggregate sind Aktin-frei.

Versuche, VAM- $\alpha$ -Actinin zusammen mit RFP-Aktin in Zellen zu exprimieren, wurden nach einigen Fehltransformationen eingestellt: Es konnte keine Zelle, die sowohl das VAM- $\alpha$ -Actinin- als auch das RFP-Aktin-Gen trägt, gewonnen werden. Zu erwarten wäre allerdings ein, den VAM-Filamin-Zellen entsprechender Phänotyp.

Proteine, die keine Aktin-interagierenden Funktionen besitzen, wurden, bis auf zwei Ausnahmen, weder in den VAM-VASP- noch in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregaten gefunden (Tab. 01). Eine Ausnahme bildet das Ubiquitin-Protein (Ergebnisse: 4.4.2). Die andere Ausnahme bildet das GFP-VacuolinA-Hybrid, welches durch die Interaktion mit den Vacuolin-Proteinen der jeweiligen VAM-Fusionsproteine in den VAM-Aggregaten vorliegt (ohne Abb.). Die Lokalisation von GFP-VacuolinA in den Aggregaten beweist, dass exogen exprimiertes Protein in die VAM-Aggregate integriert wird.

Vielleicht übernimmt Aktin in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregaten auch nur eine Basisfunktion: Nimmt man an, dass Aktin nur zu Beginn der Aggregatbildungen, sozusagen als „Startpunkt“ gebraucht wird, so wird es möglicherweise im Laufe der Aggregatentstehung wieder verdrängt. Wenn dem so ist, sollte Aktin wenigstens in der Anfangsphase des Aufbaus der VAM- $\alpha$ -Actinin- und der VAM-Filamin-Aggregate nachzuweisen sein.

#### 4.3.1.4 Aktin spielt zu keiner Zeit eine Rolle in der Entwicklung der VAM- $\alpha$ -Actinin- und der VAM-Filamin-Aggregate

Für den folgenden Versuch wird das von Blaauw *et al.* beschriebene Tetrazyklin-abhängige Expressionssystem genutzt (162). Dieses System, bestehend aus zwei Plasmiden, ermöglicht es, eine gewünschte Proteinexpression in Zellen durch die Zugabe von Tetrazyklin zum Nährmedium bis zu einem willkürlichen Zeitpunkt zu inhibieren. Das eine Plasmid (#424 (MB35)) codiert für ein Tetrazyklin-kontrolliertes Transkription-Aktivatorprotein (tTA), wohingegen das andere (#425 (MB38)) das gewünschte zu transkribierende Gen enthält, dem ein induzierbarer Promotor vorangeht. Dieser Promotor besitzt eine Bindungsstelle für das tTA. Solange Tetrazyklin im Nährmedium

der Zellen anwesend ist, wird die Bindung des tTAs an die entsprechende Stelle im induzierbaren Promotor verhindert, wodurch der Promotor inaktiv bleibt. Wird Tetrazyklin aus dem Medium entfernt, so wird die Genexpression gestartet.

VAM-VASP bzw. VAM-Filamin wurden in den MB38-Vektor kloniert und die daraus resultierenden Plasmide #744 (MB38-VAM-VASP) und #762 (MB38-VAM-Filamin) in MB35-Zellen transformiert. Die ersten derartigen Klonierungsversuche von VAM- $\alpha$ -Actinin blieben erfolglos und wurden schließlich eingestellt. Da die unter Punkt 4.2 beschriebenen ektopischen VAM-Lokalisationen von  $\alpha$ -Actinin und Filamin identisches Verhalten zeigen, ist anzunehmen, dass die Ergebnisse aus diesem Versuch für VAM- $\alpha$ -Actinin auch repräsentativ für VAM-Filamin gewertet werden können.

Die Expressionen von VAM-VASP und VAM-Filamin werden bis zum eigentlichen Versuch durch die Zugabe von 3  $\mu$ g Tetrazyklin / ml Selektivmedium inhibiert. Die Zellen werden in Schüttelkulturen auf eine Dichte von maximal  $2 \times 10^6$  Zellen / ml Medium angezogen. An diesem Punkt werden  $3 \times 10^7$  Zellen in einem Falconröhrchen bei 1200 rpm abzentrifugiert und in 30 ml Tetrazyklin-freiem Medium aufgenommen. Durch das Auswaschen von Tetrazyklin werden die Expressionen der VAM-Konstrukte gestartet.

In Vorversuchen zeigte sich, dass sich erste Myc-positive Strukturen nach circa 2 h sowohl in den VAM-VASP- als auch in den VAM-Filamin-Zellen nachweisen lassen. Aus diesem Grund werden alle zwei Stunden über einen Zeitraum von insgesamt 8 h Zellproben beider Zelllinien auf Deckgläschen übertragen und für Immunfluoreszenzen präpariert.

In den VAM-VASP-Zellen ist bereits in den ersten kleinsten Myc-Anhäufungen Aktin zu beobachten (Abb. 32). Zu sehen ist auch, dass in den ersten Stunden der VAM-VASP-Expression noch Vacuolin-markierte späte Endosomen nachzuweisen sind. Sind die VAM-VASP-Aggregate voll ausgebildet, verschwinden diese Endosomen. Diese Beobachtung wurde bereits von C. Schmauch diskutiert (148). Er geht davon aus, dass sich späte Endosomen aneinanderlagern, was einen Zwischenschritt in der Ausbildung der VAM-VASP-Aggregate darstellt. Im weiteren Verlauf der VAM-VASP-Aggregatbildung werden die späten Endosomen aus diesen heraus gepresst. Die Hülle aus

Aktin, Vacuolin und dem Hybridprotein lassen die Endosomen in den kugeligen VAM-VASP-Aggregaten zurück (148).

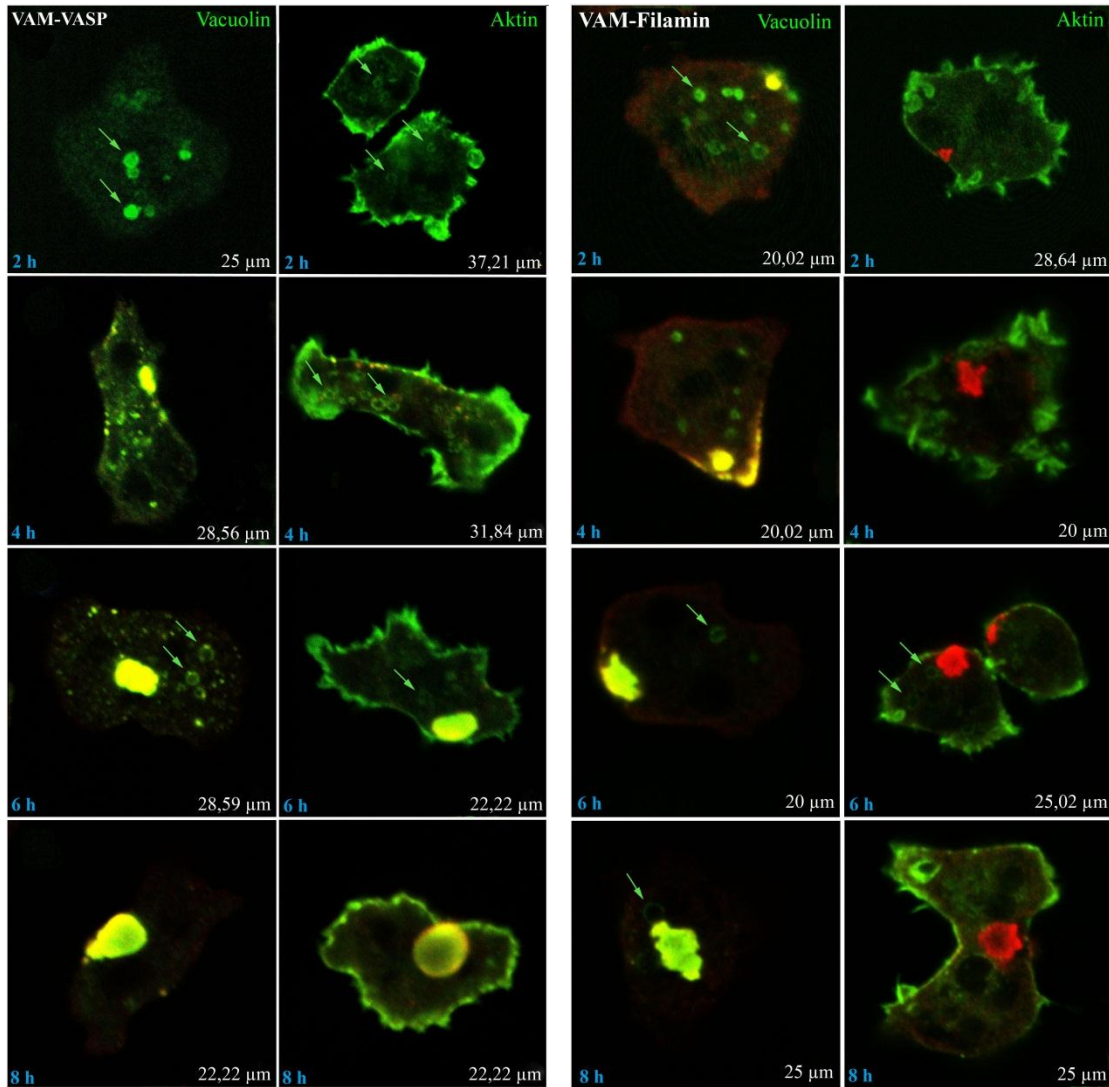


Abb. 32 – Tetrazyklin-abhängige Aggregatentwicklung in VAM-VASP- (Klon 424/VVI) und VAM-Filamin-Zellen (Klon 424/VFI)

Die Grünfluoreszenzen beruhen auf Färbungen mit dem Antikörper ACT-1-11 für die Aktin-Strukturen und dem Antikörper 263-79-2 (mk) für die Vacuolin-Strukturen. Die Myc-Konstrukte werden durch die Färbung mit dem polyklonalen Antikörper sichtbar gemacht. Zu sehen sind *Overlay*-Bilder, in denen übereinstimmende Strukturen gelblich-grün erscheinen.

In VAM-Filamin-Zellen sind dagegen nach 8 h neben den voll ausgebildeten VAM-Filamin-Aggregaten noch einige Vacuolin-positive Vesikel nachzuweisen, wenn auch nur vereinzelt (Abb. 32). Allerdings ist der Nachweis von Aktin in den VAM-Filamin-Aggregaten zu keinem Zeitpunkt möglich.

Unter der Annahme, dass in den Aggregaten der VAM-Filamin-Zellen kein Aktin vorliegt, dürfte der Einfluss des Gifts Latrunculin keine Rolle spielen. Latrunculin wird aus dem Pracht-Feuerschwamm *Latrunculia magnifica* gewonnen. Dieses Toxin bindet globuläres Aktin in einem Verhältnis von 1 : 1 und entzieht es somit den Polymerisationsprozessen von F-Aktin. Folglich wird mit der Zeit der G-Aktin-Pool völlig sequestriert und die Zelle u. a. in ihrer Mobilität, Chemotaxis oder auch Phagozytose gehemmt. Die Zelle stirbt nach ein paar Stunden.

Die Induzierung der VAM-VASP- und der VAM-Filamin-Aggregate unter dem Einfluss von Latrunculin erfolgt wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass sowohl für die VAM-VASP- als auch für die VAM-Filamin-Zelllinie zwei Kolben angesetzt werden: in dem einem Kolben befinden sich die Zellen in reinem Tetrazyklin-freiem G0-Medium, in dem anderen Kolben wird das Medium der Zellen zusätzlich mit Latrunculin versetzt (30  $\mu\text{M}$ ). Die Kontroll-Zellproben werden direkt nach der Umsetzung der Zellen aus dem Tetrazyklin-haltigen Medium in die soeben beschriebenen Nährmedien entnommen ( $t = 0$ ) und diese für Immunfluoreszenzen vorbereitet. Nach 8 h erfolgt eine weitere Probenentnahme.

In Abbildung 33 sind Beispielzellen aus dem Versuchsverlauf dargestellt: Zum Zeitpunkt  $t = 0$  sind weder in den VAM-VASP- noch in den VAM-Filamin-Zellen die entsprechenden Myc-Konstrukte nachzuweisen. Durch das Tetrazyklin erfolgt eine vollständige Inhibition der Expressionen von VAM-VASP und VAM-Filamin. Nach acht Stunden zeigt ein Großteil der VAM-VASP- und der VAM-Filamin-Zellen unter dem Einfluss von Latrunculin entsprechende Folgen: Durch die Bindung des freien G-Aktins mittels Latrunculin und die daraus folgende allmähliche „Auflösung“ der F-Aktin-Strukturen baut sich der Aktin-Kortex ab und die VAM-VASP- und die VAM-Filamin-Zellen runden sich ab. Der Aktin-Kortex zeigt als Folge auf die Zerstörung des dynamischen Gleichgewichts zum Großteil nur noch Aktin-Patches. Zudem zeigt die Mehrheit der VAM-VASP- und der VAM-Filamin-Zellen keinerlei Aggregatbildung, was im Fall von VAM-Filamin verwunderlich ist. Aufgrund des Fehlens von Aktin, wurde erwartet, dass sich die VAM-Filamin-Aggregate trotz Latrunculin ausbilden würden.

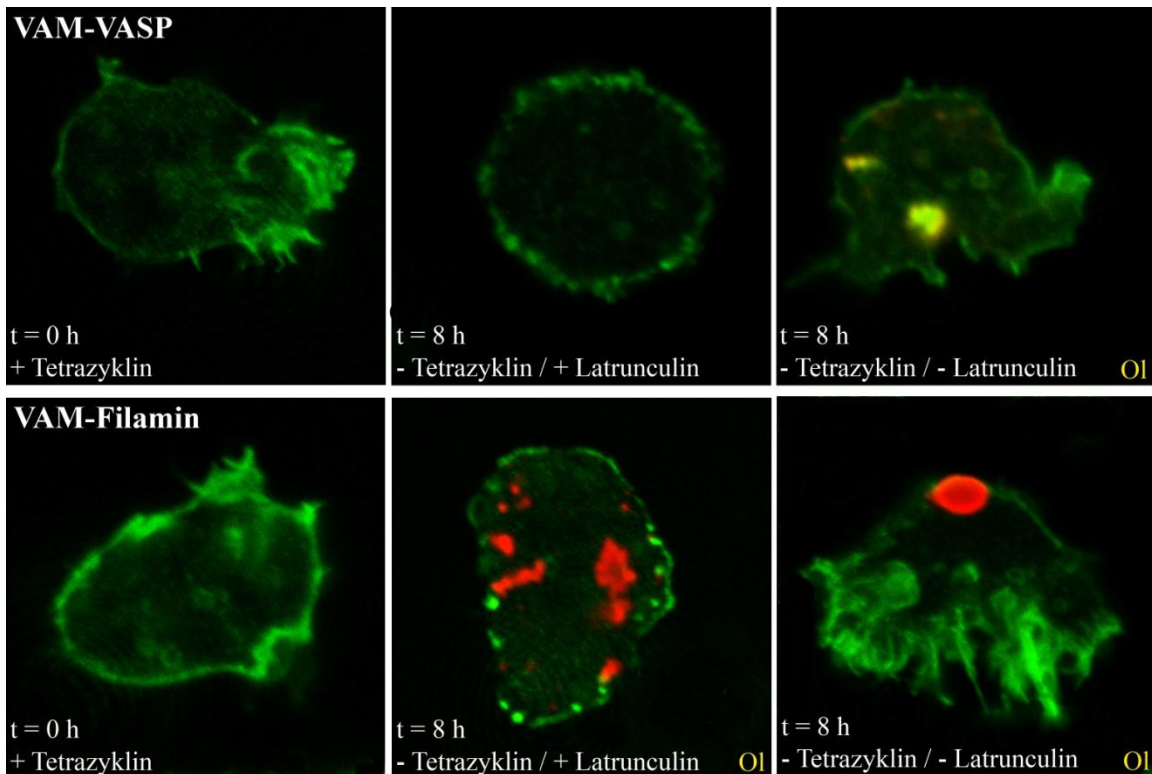


Abb. 33 – Einfluss von Latrunculin auf die Aggregatentwicklung in VAM-VASP- (Klon 424-VVI) und VAM-Filamin-Zellen (Klon 424-VFI)

Alle Grünfluoreszenzen kennzeichnen Aktin-Strukturen, basierend auf der Färbung mit Phalloidin-Alexa-Fluor-488. Die Rotfluoreszenzen markieren die Myc-Konstrukte, basierend auf der Färbung mit dem Antikörper 9E10. Bildgrößen: VAM-VASP: linkes Bild: 25  $\mu\text{m}$ ; mittleres und rechtes Bild: je 20  $\mu\text{m}$ ; VAM-Filamin: linkes Bild: 20  $\mu\text{m}$ ; mittleres und rechtes Bild: je 25  $\mu\text{m}$

Doch weisen nach 8 h nur knapp 31 % (n = 201) der Latrunculin-behandelten VAM-Filamin-Zellen Myc-Signale in Form von kleinen bis mittleren, teils recht unförmigen VAM-Filamin-Aggregaten auf (Abb. 33). In den VAM-VASP-Zellen sind es rund 12 % (n = 206), die kleine und unförmige VAM-VASP-Aggregate aufweisen. Alle anderen Zellen zeigen keine Myc-Signale. Die Bildung der entsprechenden VAM-Aggregate erscheint in beiden Zelllinien durch den Einfluss von Latrunculin offensichtlich gestört. Denn ohne Latrunculin sind es nach 8 h in den VAM-Filamin-Zellen immerhin rund 49 % (n = 202) und in den VAM-VASP-Zellen knapp 51% (n = 200), die entsprechende VAM-Aggregate aufweisen (Abb. 33). Auch erscheinen diese in den kompakten und rundlichen Formen, wie es von den jeweiligen Zellen unter Latrunculin-freien Bedingungen bekannt ist.

Bezüglich der VAM-VASP-Zellen erscheinen die Latrunculin-abhängigen Verzögerungen der VAM-VASP-Aggregatbildungen logisch: Wird das Aktin an weiterer

Polymerisation gehindert, so werden keine Aktin-Filamente aufgebaut, die für den Aufbau des VAM-VASP-Aggregates verwendet werden könnten. Warum auch die Aggregate der VAM-Filamin-Zellen negativ beeinflusst werden, bleibt unklar. Es ist jedoch anzunehmen, dass der Einfluss von Latrunculin zu einer generellen Zellschädigung führt.

#### 4.3.1.5 Die massenspektrometrischen Analysen ergeben keine aufschlussreiche Aussage

Eine letzte Untersuchung bezüglich Aktin soll mittels der Massenspektrometrie erfolgen. Hierfür erfolgt zunächst die Isolierung der entsprechenden VAM-Aggregate aus den VAM-VASP-, den VAM- $\alpha$ -Actinin- und den VAM-Filamin-Zellen. Die einzelnen Proteinproben mit den aufgereinigten Aggregaten werden nun der Abteilung der Biochemie übergeben, wo die weitere Bearbeitung der Proben als Vorbereitung für den Lauf im Spektrometer erfolgt.

Die Präparation der Proteinproben erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen: In dem einen Fall werden die Proben über ein SDS-Gel aufgetrennt, einzelne Banden ausgeschnitten, die Proteine isoliert, verdaut und im Massenspektrometer vermessen. Im anderen Fall erfolgt mithilfe eines Filters zuerst eine Aufkonzentrierung der Proteine (Membranaufreinigung). Diese werden im nächsten Schritt als Gesamtpräparat verdaut und schließlich ebenfalls vermessen. Die Methode der Membranaufreinigung ermöglicht eine Auflistung von Proteinen, die in der Probe mengenmäßig dominieren. Proteine, die dagegen nur schwach vertreten sind, werden allerdings größtenteils ignoriert. Hier greift wiederum das erste Verfahren der SDS-Gelauftrennung. Denn dadurch, dass stets nur ein Teil der Gesamtproteinmenge untersucht wird, können auch Proteine registriert werden, die vergleichsweise nur in geringer Konzentration vorkommen.

Die gewonnenen Daten aus beiden Vorgehensweisen werden hinsichtlich dem Aktin-Vorkommen ausgewertet. Es zeigt sich, dass in allen Proteinproben ein signifikanter Aktin-Score ( $\geq 50$ ) zu verzeichnen ist, auch in denen der AX2-Zellen (Tab. 02).

Betrachtet man die Ergebnisse aus der Analyse, die mittels SDS-Gelelektrophorese präpariert wurden, so erscheinen in einer Vielzahl von Banden diverse Aktin-Isomere (actXX) (Tab. 02-B). Sind die jeweiligen Scores signifikant, so werden diese für jedes Aktin-Isomer addiert und die Gesamtheit der entsprechenden Scores in der Tabelle

dargestellt. Vergleicht man dann den Gesamtgehalt an Aktin (*SUMME* in Tab. 02-B) der VAM-VASP-, der VAM- $\alpha$ -Actinin- und der VAM-Filamin-Probe mit dem der AX2-Probe, so gewinnt man den Eindruck, dass Aktin in einer großen Menge in allen untersuchten VAM-Aggregaten vorliegt. Bezüglich VAM-VASP würden sich bisherige Ergebnisse bestätigen: Die VAM-VASP-Aggregate sind deutlich mit Aktin angereichert. Für VAM-Filamin und VAM- $\alpha$ -Actinin ergibt sich hier allerdings ein Widerspruch, da in keinem der vorangegangenen Experimente ein Aktin-Vorkommen in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und den VAM-Filamin-Aggregaten nachgewiesen werden konnte.

<i>SCORES</i>	<u>AX2</u>	<u>VAM-VASP</u>	<u>VAM-Filamin</u>	<u>VAM-<math>\alpha</math>-Actinin</u>
act3	/	161	/	/
act15	150	207	391	208
act17	80	157	217	/
act18	/	/	173	/
act24	59	/	/	/
act25	/	/	88	63
<u>SUMME</u>	= 217	= 525	= 869	= 271

(A)

<i>SCORES</i>	<u>AX2</u>	<u>VAM-VASP</u>	<u>VAM-Filamin</u>	<u>VAM-<math>\alpha</math>-Actinin</u>
act3	180	464	796	394
act10	/	277	/	/
act15	/	961	674	1103
act17	58	456	376	590
act18	/	461	472	485
act22	/	730	556	984
act23	/	312	/	95
act24	/	99	225	281
act25	50	137	102	350
<u>SUMME</u>	= 388	= 3897	= 3201	= 4282

(B)

Tab. 02 - Auflistung der Aktin-Scores

Die Auflistung erfolgt entsprechend der detektierten Aktin-Isoformen (act). (A) zeigt die Aktin-Scores der Proben aus der Membranaufreinigung. (B) zeigt für jedes Aktin-Isomer die Gesamtheit der Aktin-Scores aller Banden aus der SDS-Gelelektrophorese. Zusätzlich ist in beiden Tabellen die Summe der Scores aller Aktin-Isomere dargestellt (*SUMME*)

Kontrovers zeigen sich dazu die Ergebnisse der Proteinproben, die durch die Aufkonzentration über eine Membran gewonnen wurden (Tab. 02-A): Zwar zeigt sich für die VAM-VASP- und VAM-Filamin-Aggregate ein erhöhter Gesamtgehalt an Aktin im

Vergleich zur AX2-Probe (*SUMME* in Tab. 02-A), aber die Unterschiede sind nicht wirklich herausragend. Zudem weist die VAM- $\alpha$ -Actinin-Probe eine zur AX2-Probe vergleichbare Aktin-Menge auf (*SUMME* in Tab. 02-A). Diese Daten würden die bisherige Annahme, dass die VAM- $\alpha$ -Actinin- und die VAM-Filamin-Aggregate Aktin-frei sind, bestätigen. Hier ergibt sich allerdings der Widerspruch für die VASP-Aggregate: Diese scheinen ebenfalls kein Aktin angehäuft zu haben.

In allen untersuchten Proteinfractionen befinden sich ribosomale Proteine, Histone und andere nicht Aktin-relevante Proteine mit signifikanten *Scores*. Folglich werden durch die Art der Aufreinigung automatisch zytoplasmatische Anteile und Komponenten der AX2- und der verschiedenen VAM-Zellen isoliert. So könnten die hohen Aktin-*Scores* in den Proteinproben, die der SDS-Gelaufreinigung unterlagen, auf zytoplasmatische Verunreinigungen der gewonnenen Proben hinweisen. Schließlich ist nicht bekannt, mit was die VAM-Aggregate in der Zelle interagieren oder durch was sie vom Rest der Zelle abgegrenzt sind. Möglich ist z. B., dass Aktin-Filamente durch die Interaktion mit den VAM- $\alpha$ -Actinin- und den VAM-Filamin-Hybriden den VAM-Aggregaten nur aufgelagert aber nicht in diese integriert sind.

Diese kontroversen Ergebnisse geben wenig Aufschluss hinsichtlich der Aktin-Frage. Der Großteil der in diesem Kapitel vorgestellten Experimente weist jedoch darauf hin, dass die VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate für deren Aufbau kein Aktin benötigen oder sequestrieren.

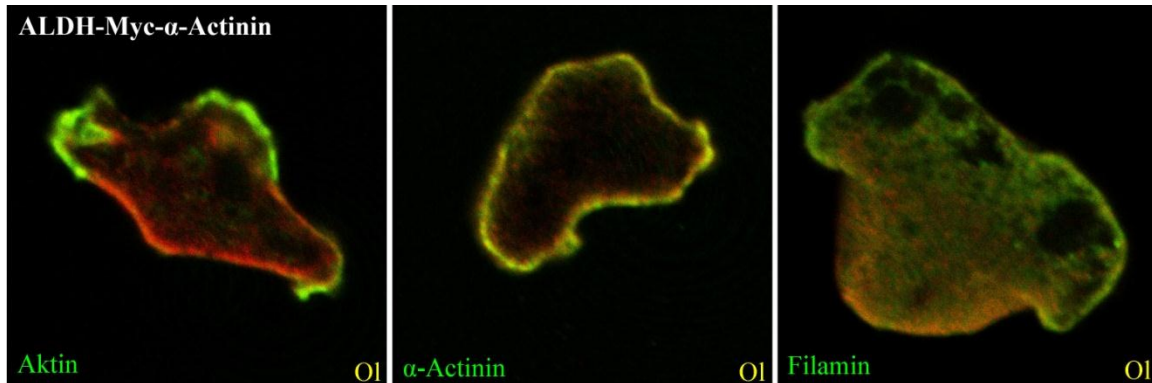
#### 4.3.2 Die ektopische Lokalisation von $\alpha$ -Actinin und Filamin an ALDH-Vesikel

Um zu prüfen, ob der Effekt, den  $\alpha$ -Actinin und Filamin auf die späten, Vacuolin-positiven Endosomen haben auch bei den mittelspäten Endosomen zu wiederholen ist, werden beide Proteine an die endosomal lokalisierte Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) ligiert. Die Fusionen von  $\alpha$ -Actinin und Filamin an ALDH erfolgen C-terminal, resultierend in den Plasmiden #792 (pB15-ALDH-Myc- $\alpha$ -Actinin) und #795 (pB15-ALDH-Myc-Filamin).

Die Expressionen von ALDH-Myc- $\alpha$ -Actinin und ALDH-Myc-Filamin führen im Vergleich zu entsprechenden VacuolinA-Konstrukten zu anderen Phänotypen. Bezüglich  $\alpha$ -Actinin scheint das *Targeting*-Signal von ALDH nicht stark genug zu sein, um  $\alpha$ -



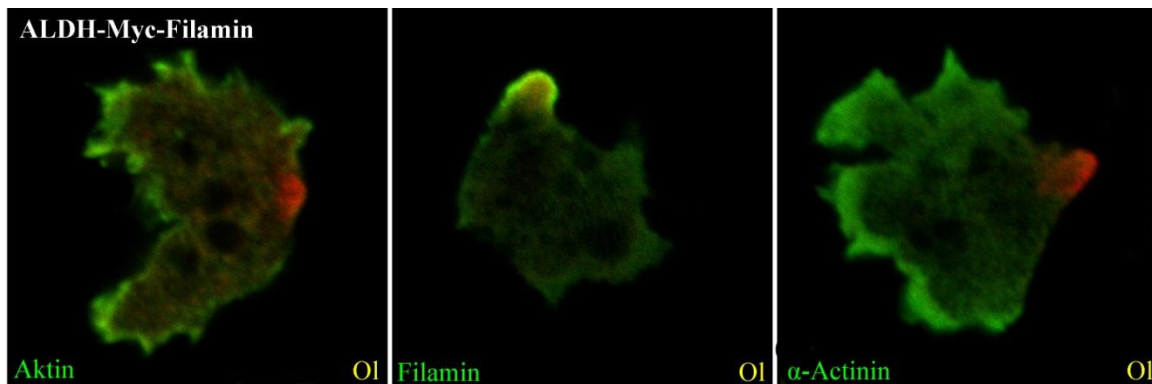
Actinin ektopisch zu lokalisieren (Abb. 34). Das Fusionskonstrukt ALDH-Myc- $\alpha$ -Actinin zeigt eine, entsprechend dem endogenen  $\alpha$ -Actinin, wildtypische Kortexlokalisation.



**Abb. 34 – Verschiedene Färbungen der ALDH-Myc- $\alpha$ -Actinin-Zellen (Klon 7921)**

Die Rotfluoreszenz erfolgt durch die Färbung der Myc-Strukturen mit dem polyklonalen Antikörper. Die Grünfluoreszenzen beruhen auf Färbungen für Aktin (ACT-1-11 (mk)), für  $\alpha$ -Actinin (47-19-2 (mk)) und für Filamin (82-471-14 (mk)). Bildbreiten: je 25  $\mu$ m

Die Expression von ALDH-Myc-Filamin führt ebenfalls zur Lokalisation unterhalb der Plasmamembran (Abb. 35). Allerdings ist diese Lokalisation im Unterschied zu der von ALDH-Myc- $\alpha$ -Actinin lokal konzentrierter: Es sind kleine rundliche Anhäufungen von ALDH-Myc-Filamin zu erkennen, die keine scharfen Begrenzungen zum Umfeld aufweisen. Die schwache Expression von ALDH-Myc-Filamin (Abb. 65-B) hat lediglich eine lockere Aufkonzentrierung des Fusionskonstrukts zur Folge (Abb. 35). Es ist anzunehmen, dass eine stärkere Expression von ALDH-Myc-Filamin zur Ausprägung markanter ALDH-Myc-Filamin-Aggregaten fähig ist.



**Abb. 35 – Verschiedene Färbungen der ALDH-Myc-Filamin-Zellen (Klon 7951)**

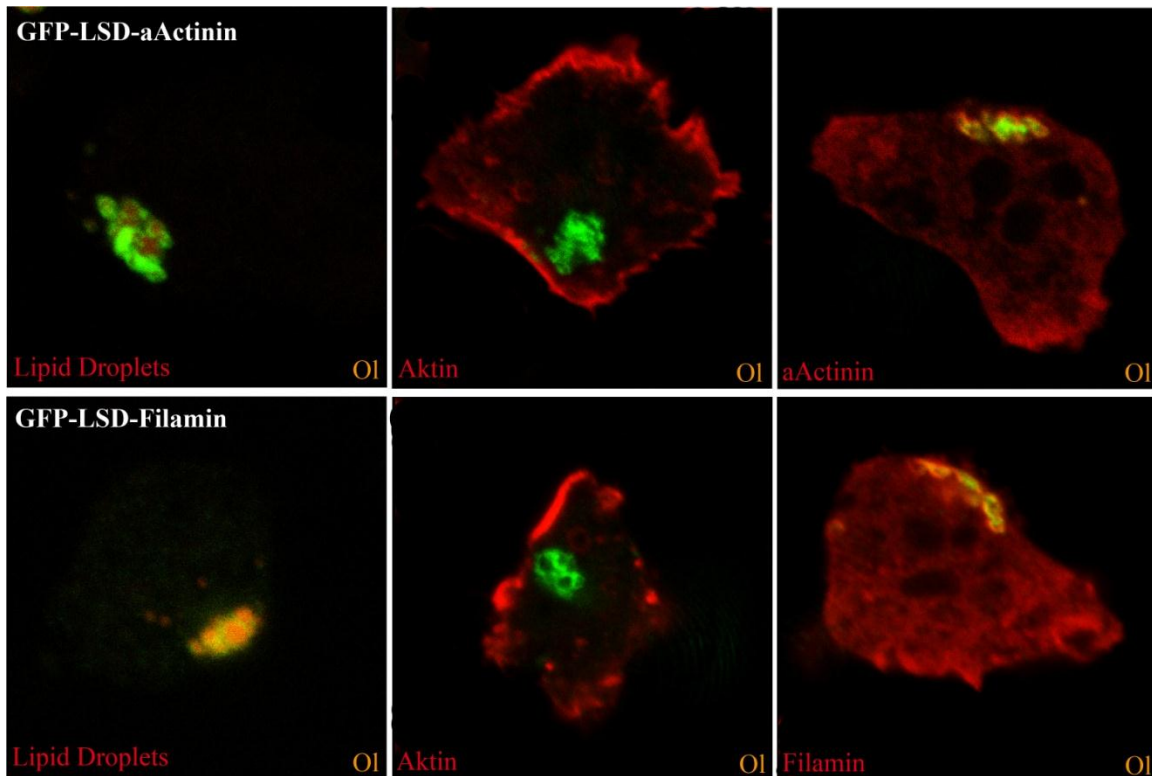
Die Rotfluoreszenz erfolgt durch die Färbung der Myc-Strukturen mit dem polyklonalen Antikörper. Die Grünfluoreszenzen beruhen auf Färbungen für Aktin (ACT-1-11 (mk)), für  $\alpha$ -Actinin (47-19-2 (mk)) und für Filamin (82-471-14 (mk)). Bildbreiten: je 25  $\mu$ m

### 4.3.3 Die ektopische Lokalisation von $\alpha$ -Actinin und Filamin an Aktin-freie Organellen

Zur ektopischen Lokalisation von  $\alpha$ -Actinin und Filamin an *Lipid Droplets* und Peroxisomen werden hier, wie auch schon im Fall von VASP, die Proteine LSD (*Lipid Droplets*) und SLB350 (Peroxisomen) genutzt. Die Fusionen von  $\alpha$ -Actinin und Filamin erfolgen jeweils C-terminal an LSD und SLB350, resultierend in den Plasmiden #837 (GFP-LSD- $\alpha$ -Actinin), #838 (GFP-LSD-Filamin), #695 (SLB350-Myc-Filamin) und #697 (SLB350-Myc- $\alpha$ -Actinin). Dass N-terminale Fusionen keinen Einfluss auf die wildtypischen Lokalisationen und Funktionalitäten von  $\alpha$ -Actinin und Filamin haben, lässt sich durch Studien von Washington und Knecht vermuten (163).

Die folgenden Abbildungen zeigen die erfolgreichen ektopischen Lokalisationen von  $\alpha$ -Actinin und Filamin sowohl an *Lipid Droplets* (Abb. 36) als auch an Peroxisomen (Abb. 37). In jeder Bildreihe der Abbildungen von 36 und 37 sind stets *Overlays* von Färbungen zum Nachweis des *Target*-Organells, von Aktin und von  $\alpha$ -Actinin oder Filamin, entsprechend des jeweiligen Fusionskonstrukts, gezeigt. Die Phänotypen, resultierend aus den ektopischen Lokalisationen von  $\alpha$ -Actinin und Filamin an die Peroxisomen und *Lipid Droplets*, ähneln auf den ersten Blick denen, die schon durch VASP an Peroxisomen und *Lipid Droplets* hervorgerufen worden: In allen Fällen erhält man eine Verklumpung der Organellen (Abb. 36 und 37), wobei die der Peroxisomen auf die zwei Aktin-*Crosslinking* Proteine  $\alpha$ -Actinin und Filamin zurückzuführen ist (Abb. 37). Die Verklumpung der *Lipid Droplets* wird schließlich auch in Zellen beobachtet, in denen kein exogenes Protein überexprimiert wird (Abb. 36) (152).

Schaut man sich die Aktin-Färbungen an, so zeigen sich keine Kolo-kalisation mit den Fluoreszenzsignalen der  $\alpha$ -Actinin- und Filamin-Fusionsproteine: Die akkumulierten Peroxisomen und *Lipid Droplets* sind Aktin-frei. Ektopisch lokalisiert, sind  $\alpha$ -Actinin und Filamin offensichtlich nicht fähig, F-Aktin zu binden und zu verknüpfen.



**Abb. 36 – GFP-LSD- $\alpha$ -Actinin/-Filamin**

Für GFP-LSD- $\alpha$ -Actinin sind Beispielzellen des Klons 837II und für GFP-LSD-Filamin sind Beispielzellen der Klone 838I (linkes Bild) und 838II (mittleres und rechtes Bild) gezeigt. Alle Zellen standen 3 h unter dem Einfluss von 200  $\mu$ M Palmitinsäure. Die Grünfluoreszenzen beruhen auf dem GFP-Signal der jeweiligen Fusionskonstrukte. Die Rotfluoreszenzen beruhen auf Färbungen mit folgenden Antikörpern: Aktin: ACT-1-11 (mk); Myc: 9E10 (mk);  $\alpha$ -Actinin: 47-19-2 (mk); Filamin: 82-471-14 (mk). Die *Lipid Droplet*-Färbung beruht auf der Inkubation der Zellen mit LD540. Bildbreiten: GFP-LSD- $\alpha$ -Actinin: linkes Bild: 20  $\mu$ m; mittleres und rechtes Bild: je 25  $\mu$ m; GFP-LSD-Filamin: linkes Bild: 20  $\mu$ m; mittleres und rechtes Bild: je 25  $\mu$ m

Die Fluoreszenzsignale zum Nachweis der endogen und exogen exprimierten Aktin-*Crosslinking* Proteine  $\alpha$ -Actinin und Filamin zeigen Kolokalisationen an den verklumpten Organellen (Abb. 36 und 37). In den Zellen der verklumpten *Lipid Droplets* zeigen  $\alpha$ -Actinin und Filamin zusätzlich wildtypische, am Kortex liegende, Lokalisationen (Abb. 36). In den Zellen der aggregierten Peroxisomen ist die wildtypische Lokalisation von  $\alpha$ -Actinin und Filamin nicht nachweisbar (Abb. 37).

Aufgrund der Tatsache, dass Aktin nicht durch die ektopischen Lokalisationen von  $\alpha$ -Actinin und Filamin ebenfalls ektopisch in den Zellen lokalisiert werden konnte, sollte eine Deletion der Aktin-bindenden CH-Domänen sowohl in  $\alpha$ -Actinin als auch in Filamin demzufolge keinen Einfluss auf die bisher beobachteten Phänotypen haben. Diese

Vermutung wird am Beispiel der Vacuolin-abhängigen, endosomalen Lokalisation von  $\alpha$ -Actinin und Filamin geprüft.

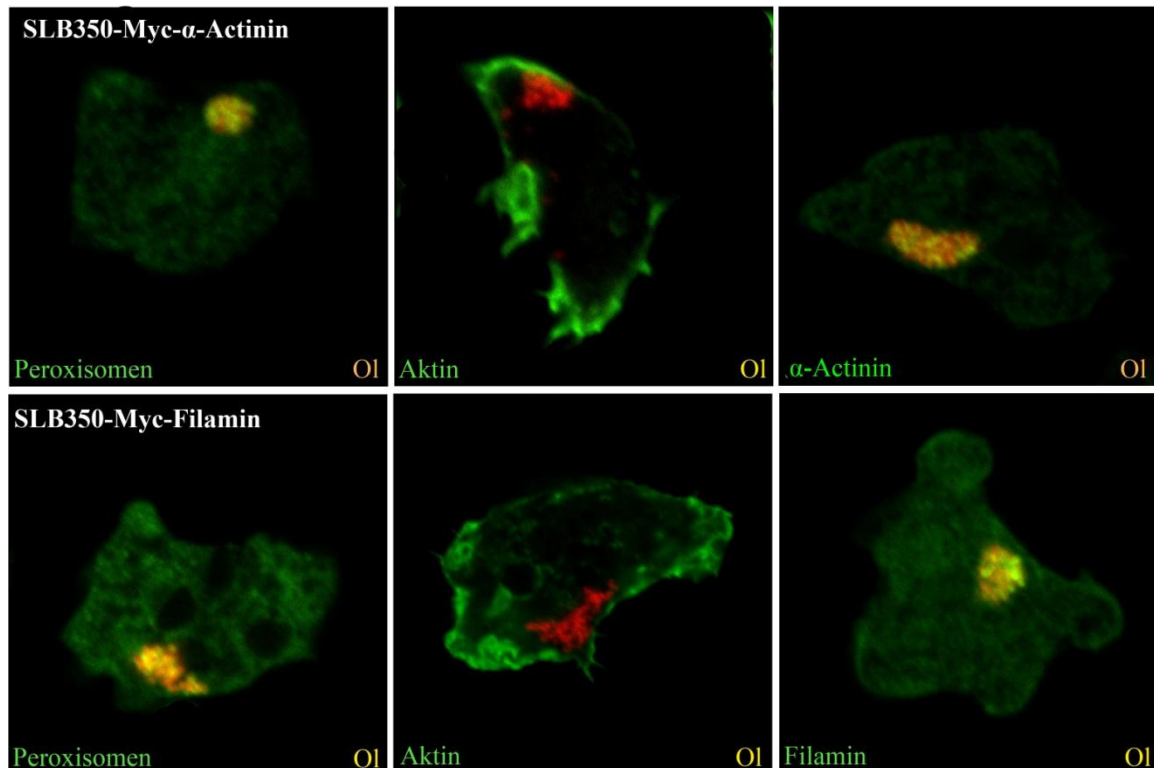


Abb. 37 – SLB350-Myc-  $\alpha$ -Actinin/-Filamin

Für SLB350-Myc- $\alpha$ -Actinin sind Beispielzellen des Klons 695/498II und für SLB350-Myc-Filamin sind Beispielzellen des Klons 697/498III gezeigt. Die Rotfluoreszenzen beruhen auf dem RFP-Signal des RFP-SKL-Konstrukts. Die Grünfluoreszenzen beruhen auf Färbungen mit folgenden Antikörpern: Aktin: ACT-1-11 (mk); Myc: 9E10 (mk);  $\alpha$ -Actinin: 47-19-2 (mk); Filamin: 82-471-14 (mk). Bildbreiten: SLB350-Myc- $\alpha$ -Actinin: linkes und mittleres Bild: je 20  $\mu$ m; rechtes Bild: 25  $\mu$ m; SLB350-Myc-Filamin: linkes und rechtes Bild: je 25  $\mu$ m; mittleres Bild: 33  $\mu$ m

#### 4.3.4 Die Deletion der CH-Domänen nimmt keinen Einfluss auf die Aggregate

Die Deletionen der Calponin-Homologie-Domänen ( $\Delta$ CH) von  $\alpha$ -Actinin und Filamin in den VAM-Hybriden sind in den Konstrukten #740 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ CH) und #741 (pB15-VAM-Filamin $\Delta$ CH) realisiert. Erwartungsgemäß führen die jeweiligen Expressionen zu Phänotypen, die denen ähneln, die aus Expressionen der jeweils vollständigen Fusionskonstrukte hervorgehen (Abb. 38). VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ CH- und VAM-Filamin $\Delta$ CH-Aggregate werden ausgebildet und weisen annähernd ähnliche Größen auf (VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ CH (Klon 740I):  $\varnothing = 3,1 \mu$ m; VAM-Filamin $\Delta$ CH (Klon 741I):  $\varnothing = 4,1 \mu$ m).

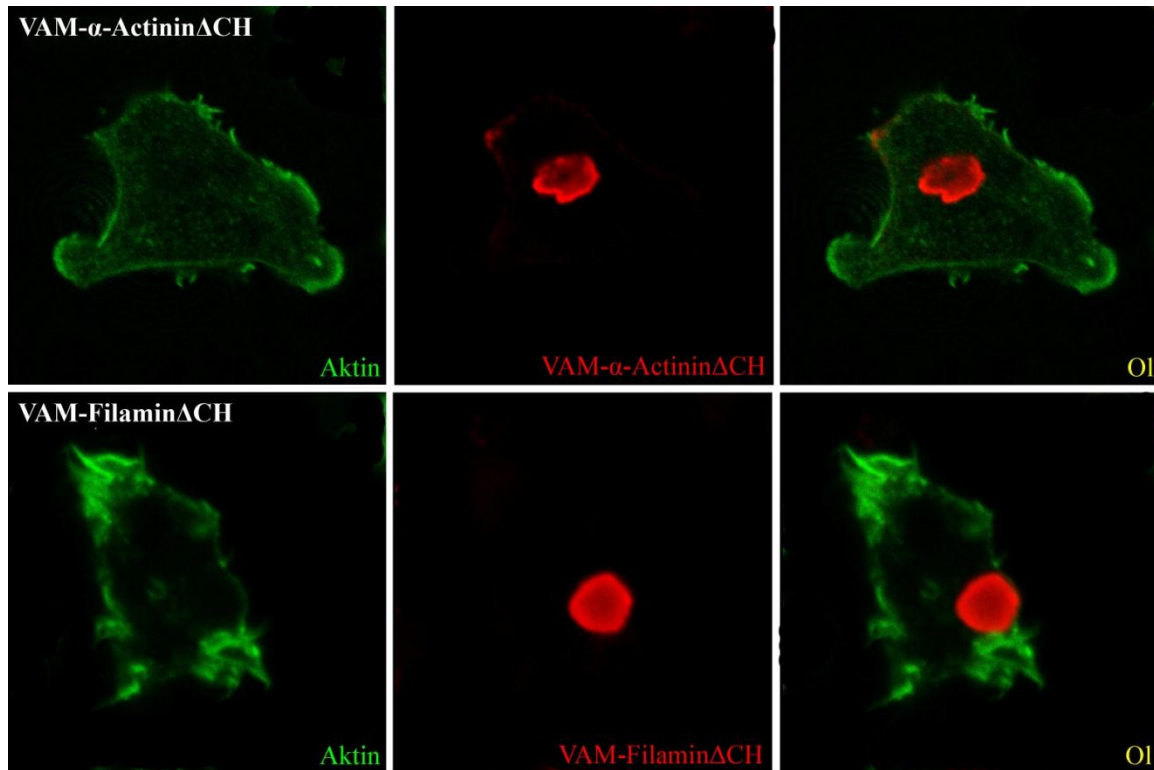
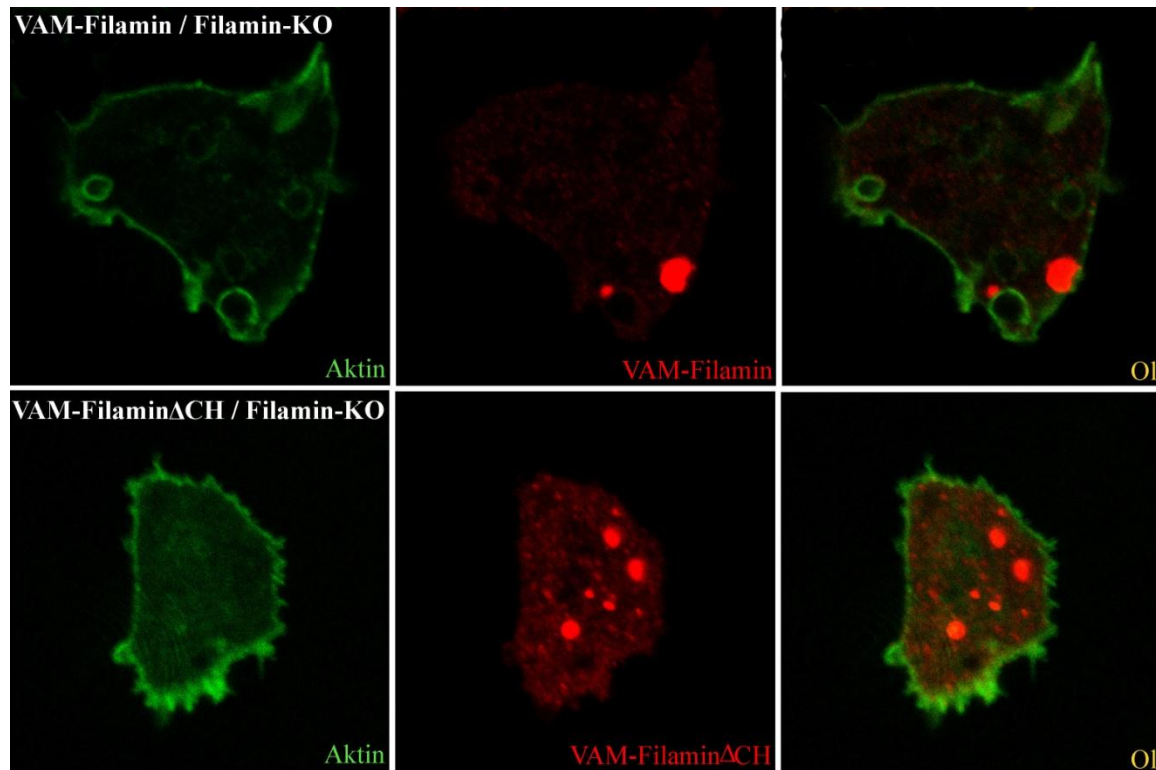


Abb. 38 – Deletion der Aktin-bindenden Domänen von  $\alpha$ -Actinin und Filamin

Aktin wurde mit dem Antikörper ACT-1-11(mk, grün) und das Myc-Epitop mit dem Antikörper 9E10 (mk, rot) markiert. Bildbreiten: VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ CH (Klon 740I): 36  $\mu$ m ; VAM-Filamin $\Delta$ CH (Klon 741Ib): 25  $\mu$ m

Durch die Expressionen von VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ CH und VAM-Filamin $\Delta$ CH im wildtypischen Hintergrund besteht die Wahrscheinlichkeit, dass mögliche Defekte durch Dimerisierung der verkürzten Proteinhybride mit den jeweils endogenen  $\alpha$ -Actinin- und Filamin-Proteinen maskiert werden. Um das zu überprüfen, wird VAM-Filamin $\Delta$ CH in einen Filamin-Knockout-Stamm transformiert: *AbpC*<sup>-</sup> (*strain* DBS0236077, bezogen über *Dicty Stock Center*). Zur Kontrolle erfolgt zusätzlich die Transformation von VAM-Filamin in die *AbpC*<sup>-</sup>-Zellen. Bezüglich  $\alpha$ -Actinin liegt der *DictyBase*-Organisation zwar ein in Frage kommender Knockout-Stamm vor. Aber dieser konnte mir aus Kultivierungsgründen nicht rechtzeitig zugeschickt werden.

Der Filamin-Knockout-Stamm *AbpC*<sup>-</sup> besitzt eine Geneticin-Resistenz. Um die Transformationseffizienzen von VAM-Filamin und VAM-Filamin $\Delta$ CH in diesen Zellen zu erhöhen, werden beide Konstrukte jeweils in einen Blasticidinvektor ligiert, resultierend in den Plasmiden #796 (pDBsrXP-VAM-Filamin) und #793 (pDBsrXP-VAM-Filamin $\Delta$ CH).



**Abb. 39 – Expression diverser Filamin-Konstrukte im Filamin-Knockout-Hintergrund**

Die Aktin-Färbung erfolgt mittels Phalloidin-Alexa-Fluor 488 (grün) und die Myc-Färbung mittels des Antikörpers 9E10 (mk, rot). Bildbreiten: VAM-Filamin (Klon 796/AbpC1): 29  $\mu\text{m}$ ; VAM-Filamin $\Delta\text{CH}$  (Klon 793/AbpC1): 25  $\mu\text{m}$

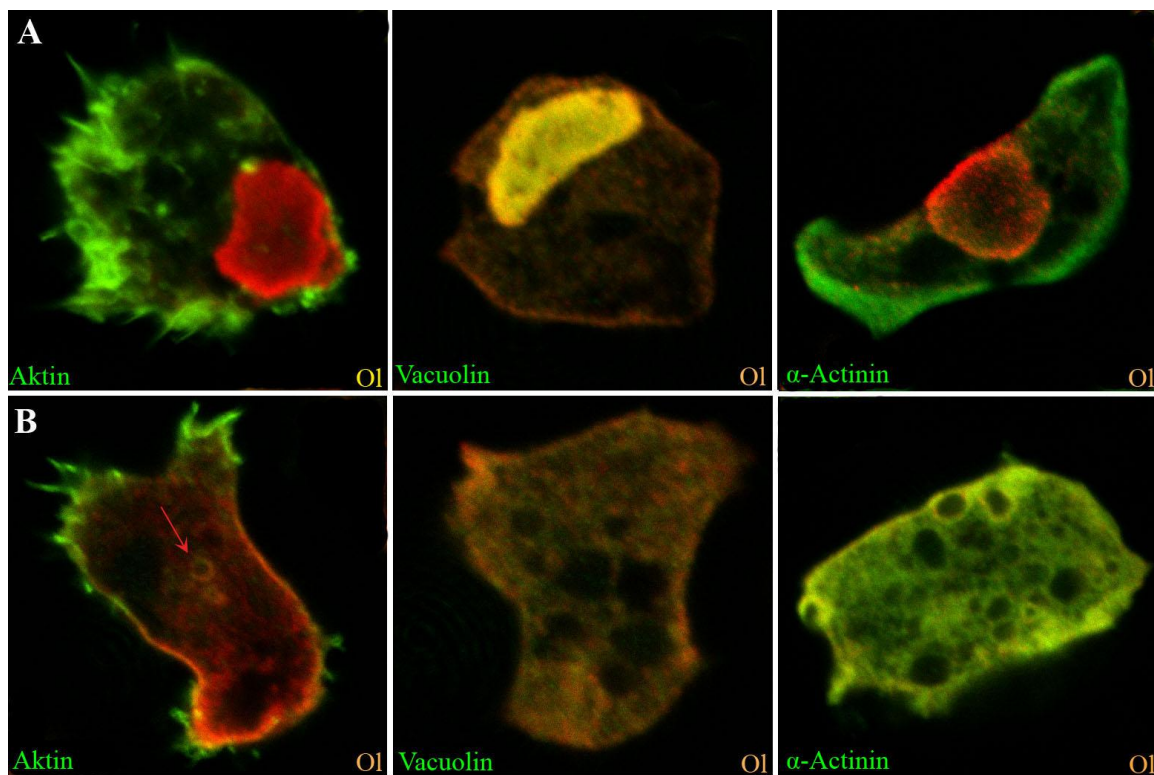
Die Transformationen von VAM-Filamin und VAM-Filamin $\Delta\text{CH}$  in AbpC<sup>-</sup>-Zellen führen zur Ausbildung von nur sehr kleinen VAM-Filamin<sup>Filamin-KO</sup>- und VAM-Filamin $\Delta\text{CH}$ <sup>Filamin-KO</sup>-Aggregaten, die aber in erhöhter Anzahl in der Zelle vorliegen können (Abb. 39). Aktin wird nicht in die Aggregate eingelagert.

Sowohl VAM-Filamin als auch VAM-Filamin $\Delta\text{CH}$  werden nur sehr schwach in Filamin-Knockout-Zellen exprimiert (Abb. 65-D). Ein Signal für VAM-Filamin<sup>Filamin-KO</sup> ist per Western Blot kaum nachzuweisen (ohne Abb.). Vermutlich führt eine starke Expression beider Konstrukte zu vergleichbaren VAM-Filamin- und VAM-Filamin $\Delta\text{CH}$ -Aggregaten, wie sie im AX2-Hintergrund ausgebildet werden (Abb. 25 und 38).

Aufgrund der Tatsache, dass  $\alpha$ -Actinin und Filamin in der Zelle als Dimer vorliegen, ist anzunehmen, dass die Deletionen der oligomerisierenden Domänen beider Proteine ein Ausbleiben der VAM- $\alpha$ -Actinin- und der VAM-Filamin-Aggregate zur Folge haben. Schließlich können weder das verkürzte  $\alpha$ -Actinin- noch das verkürzte Filamin-Protein, welche folglich monomer bleiben, als funktionelle Moleküle in der Zelle agieren.

#### 4.3.5 Die Deletionen der Oligomerisierungsdomänen

Die vier *spectrin repeats* und die zwei *EF-hands* von  $\alpha$ -Actinin sowie die sechs *filamin repeats* von Filamin werden entfernt, resultierend in den Plasmiden #842 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo) und #843 (pB15-VAM-Filamin $\Delta$ Oligo). Die Expressionen der Konstrukte in AX2-Zellen führen überraschenderweise zu unterschiedlichen Phänotypen, sowohl zwischen den VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo- und den VAM-Filamin $\Delta$ Oligo-Zelllinien als auch zwischen den zwei unabhängigen VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Klonen 842I und 842II.



**Abb. 40 – Verschiedene Färbungen von unterschiedlich phänotypischen VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Zellen**  
 Die Rotfluoreszenzen erfolgen durch die Färbung der Myc-Strukturen mit dem mk (9E10) oder dem pk Myc-Antikörper. Die Grünfluoreszenzen beruhen auf Färbungen für Aktin (Alexa Fluor 488 Phalloidin), für Vacuolin (263-79-2 (mk)) und für  $\alpha$ -Actinin (47-19-2 (mk)). In (A) sind Beispielzellen des Exprimerers 842I und in (B) Beispielzellen des Exprimerers 842II dargestellt. Bildbreiten: (A): Aktin und Vacuolin: je 22  $\mu$ m; Filamin: 27  $\mu$ m; (B): Aktin: 22  $\mu$ m; Vacuolin: 18  $\mu$ m; Filamin: 27  $\mu$ m

Beide VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Klone zeigen ein annähernd identisches Expressionsniveau wie das Volllängekonstrukt VAM- $\alpha$ -Actinin in AX2-Zellen (Abb. 64-B) und entsprechen phänotypisch den Zellen, die am Beispiel des VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Klons 842II gezeigt sind (Abb. 40-B): VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo lokalisiert hauptsächlich im

Kortextbereich der Zellen. Zusätzlich zeigt sich die Lokalisation des Konstrukts an Vesikeln (Pfeil in Abb. 40-B). Doch weisen 28 % (n = 205) der Zellen des VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Klons 842I zusätzlich die bereits bekannten rundlichen, VAM- $\alpha$ -Actinin-ähnliche Aggregate auf (Abb. 40-A).

In allen Fällen erfolgt die vollständige Kolokalisation des VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Konstrukts mit endogenem Vacuolin (Abb. 40). Eine Überlagerung von VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo mit Aktin-Strukturen liegt nur bedingt im Zellkortex vor (Abb. 40). Endogenes  $\alpha$ -Actinin ist hauptsächlich im Zellkortex zu finden. Das Protein scheint zudem teilweise in den VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Aggregaten angereichert zu sein. Es ist möglich, dass der Antikörper für  $\alpha$ -Actinin die CH-Domänen im Protein erkennt und folglich nur das exogene Protein des VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Konstrukts markiert. Jedoch ist das aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten des Myc- und des  $\alpha$ -Actinin-Signals auszuschließen (Vgl. Abb. 40 und 59).

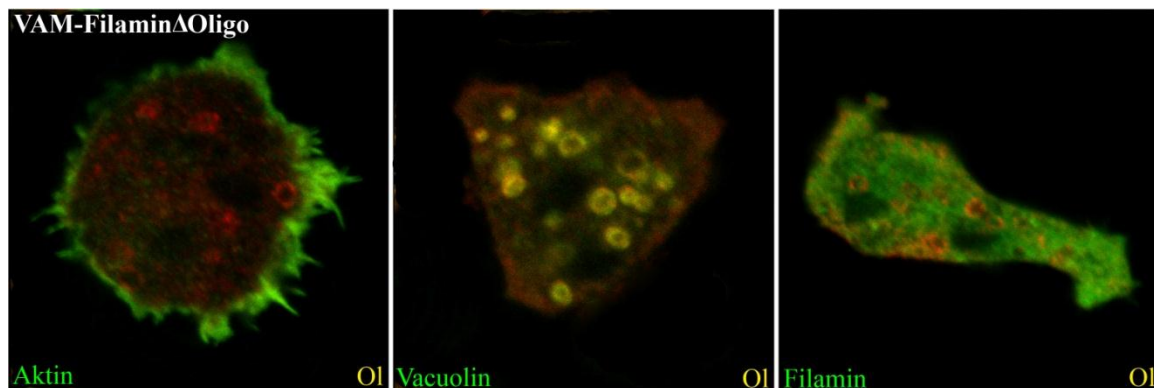


Abb. 41 – Verschiedene Färbungen von VAM-Filamin $\Delta$ Oligo-Zellen (Klon 843III)

Die Rotfluoreszenzen erfolgen durch die Färbung der Myc-Strukturen mit dem mk (9E10) oder dem pk Myc-Antikörper. Die Grünfluoreszenzen beruhen auf Färbungen für Aktin (Alexa Fluor 488 Phalloidin), für Vacuolin (263-79-2 (mk)) und für Filamin (82-471-14 (mk)). Bildbreiten: Aktin: 25  $\mu$ m; Vacuolin: 20  $\mu$ m; Filamin: 28  $\mu$ m

Die Expression von VAM-Filamin $\Delta$ Oligo (Abb. 65-C) führt hingegen ausschließlich zur Lokalisation an Vacuolin-positive Endosomen (Abb. 41). Es zeigen sich keine Überlagerungen von VAM-Filamin $\Delta$ Oligo mit endogenem Filamin oder Aktin (Abb. 41). Die VAM-VASP-Aggregate ähneln den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregaten bezüglich der kugeligen Form und der annähernd gleichen Größe. Jedoch weisen die VAM-VASP-Aggregate, im Gegensatz zu den anderen Aggregaten, Anhäufungen von Aktin und einigen anderen Proteinen auf (Tab. 01). In den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-



Filamin-Aggregaten konnten neben den jeweiligen Fusionsproteinen nur sehr wenige, zusätzlich sequestrierte Proteine nachgewiesen werden (Tab. 01). Die Unterschiede der VAM-Aggregate in ihrem molekularen Aufbau lassen vermuten, dass die Aggregate unterschiedlichen Einfluss auf die Zelle nehmen. Für VAM-VASP-Zellen wurden bereits gezeigt, dass die Rate der Phagozytose, der Pinozytose und des Transits sowie das Wachstum und die Zytokinese negativ reguliert sind (148, 149). Welchen physiologischen Einfluss die VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate auf die Zelle haben, wird im Folgenden untersucht. Zunächst werden sich noch die strukturelle Beschaffenheit der VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate im Vergleich zu den VAM-VASP-Aggregaten angeschaut.

#### 4.4 Alle VAM-Aggregate zeigen strukturelle Ähnlichkeit zueinander

##### 4.4.1 Die TEM-Aufnahmen heben die Homogenität der verschiedenen VAM-Aggregate hervor

Je nach Aufbau und Bestandteil der VAM-Aggregate sollten Unterschiede in der Dichte oder auch Beschaffenheit sichtbar werden. TEM-Aufnahmen von VAM-VASP-Zellen zeigen sehr kompakte und homogene VAM-VASP-Aggregate, was auf die gleichmäßige Vernetzung der Aktin-Filamente durch die Vielzahl F-Aktin-bindender Proteine zurückzuführen ist (149). In VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregaten wäre diesbezüglich eine weniger kompakte Struktur zu erwarten, da entsprechende Aktin-Filamente nicht nachgewiesen werden konnten (Ergebnisse: 4.3.1). Schaut man sich jedoch mittels Transmissionselektronenmikroskopie die VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate näher an, so zeigt sich hier wider Erwarten ein ähnliches Bild wie bei den Aggregaten der VAM-VASP-Zellen (Abb. 42) (149): Alle VAM-Aggregate sind verhältnismäßig homogen. Zusätzlich sind kleine Einschlüsse an Partikeln und Vesikeln zu sehen. Bei den Vesikeln könnte es sich auch um kleine zytoplasmatische Einschlüsse handeln, während die Partikel sehr wahrscheinlich auf Fixativreste zurückzuführen sind.

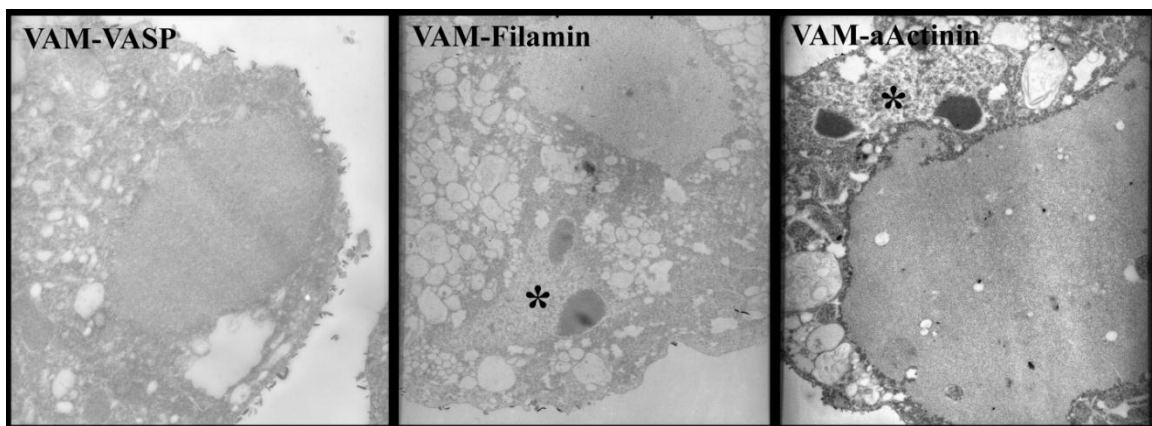


Abb. 42 – Transelektronenmikroskopische Aufnahmen der VAM-Aggregate

Vergleichend nebeneinander dargestellt sind Aufnahmen jeweils vergrößerter Bereiche aus einer VAM-VASP- (Klon 2B-1), einer VAM-Filamin- (Klon 648-23) und einer VAM- $\alpha$ -Actinin-Zelle (Klon 682II2). Ein Zellkern ist durch (\*) markiert. Bildgrößen: VAM-VASP: 7  $\mu\text{m}$ ; VAM-Filamin: 9  $\mu\text{m}$ ; VAM- $\alpha$ -Actinin: 9  $\mu\text{m}$

Wodurch die homogene Beschaffenheit der VAM- $\alpha$ -Actinin- und der VAM-Filamin-Aggregate erreicht wird, ist fraglich. Bisher konnten kaum andere Komponenten als die

Fusionsproteine selbst und deren exogenen und endogenen Bindungspartner Vacuolin,  $\alpha$ -Actinin und Filamin in den jeweiligen VAM-Aggregaten nachgewiesen werden. Zudem zeigt sich keine die VAM- $\alpha$ -Actinin- und die VAM-Filamin-Aggregate umschließende Membran. Zum Vergleich dienen Zellkerne (\*), die hingegen deutlich von einer Doppelmembran umgeben sind.

#### 4.4.2 Einige Proteine der VAM-Aggregate sind für den proteolytischen Abbau markiert

Warum sowohl die VAM-VASP- als auch die VAM- $\alpha$ -Actinin- und die VAM-Filamin-Zellen derartige Aggregate ausbilden, ist nicht klar. Die VAM-Aggregate sind sehr stabil und unterliegen keinen dynamischen Ab- oder Aufbauprozessen. Versuche mit Latrunculin bestätigen dies (ohne Abb.): Nach mehreren Stunden unter dem Einfluss dieses Giftes runden sich die verschiedenen VAM-Zellen ab und der Aktin-Kortex verliert seine filamentöse Form. Die VAM-Aggregate selbst bleiben jedoch in ihrer Größe und Form erhalten.

Die Tatsache, dass es sich bei den VAM-Aggregaten um eine Ansammlung der jeweiligen Fusionsproteine handelt, könnte zum Grund haben, dass die verschiedenen VAM-Zellen mit dem Abbau der zahlreich überexprimierten VAM-Proteine überfordert sind. Als Folge kommt es zu Aggregatbildungen.

Die eukaryotische Zelle hat verschiedene Wege, um Proteine abzubauen. Neben der lysosomvermittelten Proteolyse, überwiegend von exogenem Material, ist es der Zelle möglich, Proteine auch im Proteasom oder mittels Autophagie abzubauen. Jeder dieser Wege ist auch für *D. discoideum* beschrieben (27, 137, 164). Bei all diesen Abbauprozessen spielt das kleine regulatorische Protein Ubiquitin eine Rolle (130).

Ubiquitin ist ein in allen eukaryotischen Zellen stark konserviertes Protein. Das Ubiquitin in *D. discoideum* unterscheidet sich nur in zwei Aminosäuren von dem humanen Ortholog (165). Der verwendete Ubiquitin-Antikörper wurde gegen das Volllänge-Ubiquitin (76 AS) der Kuh hergestellt.

Um sicher zu gehen, dass der Antikörper auch in *D. discoideum* spezifisch Ubiquitin erkennt, werden AX2-Zellen einem 60 minütigen Hitzeschock bei 30 °C unterzogen. Schließlich wurde schon 1988 gezeigt, dass ein Hitzeschock zu einer starken Ubiquitin-Expression in *D. discoideum* führt (166). Folglich ist in den Hitzeschock-behandelten

Zellen ein ausgeprägteres Ubiquitin-Vorkommen zu erwarten als in Hitzeschock-unbehandelten Zellen: Unter Normalbedingungen sind in AX2-Zellen keine bzw. nur vereinzelt kleine Pünktchen zu sehen (Abb. 43-A). Diese spiegeln den proteolytischen Abbau in unbehandelten, wildtypischen Zellen wieder. Durch das Aussetzen der AX2-Zellen einer erhöhten Temperatur verstärken sich hingegen die Ubiquitin-Signale (Abb. 43-B).

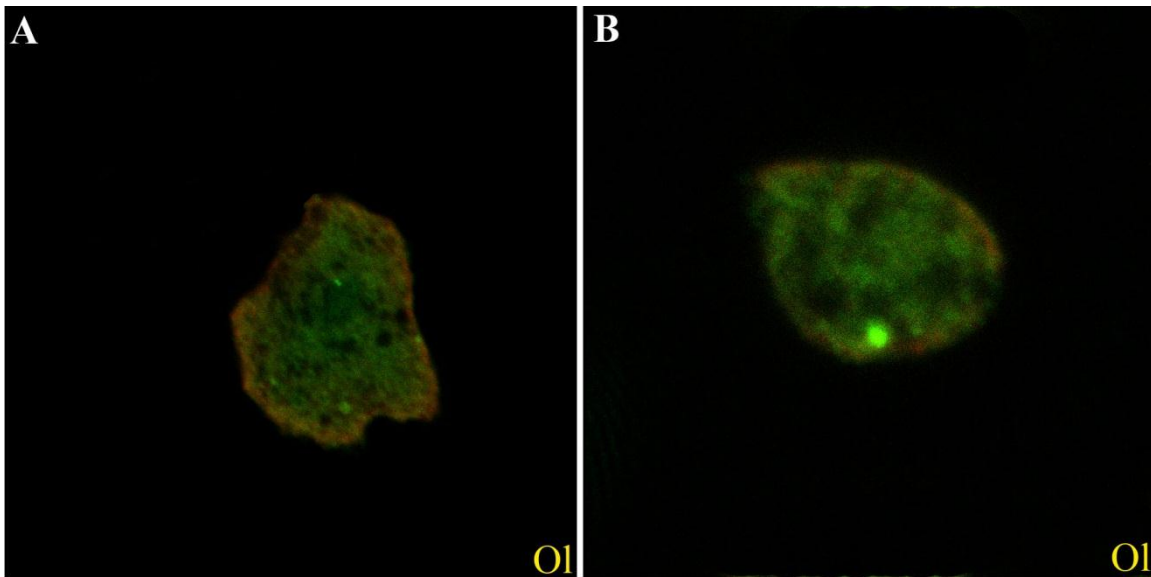


Abb. 43 – Ubiquitin-Färbung von AX2-Zellen

Die Färbung der Myc-Strukturen erfolgte mittels des Antikörpers 9E10 (mk, rot). Die Färbung von Ubiquitin wurde durch den Antikörper Ub (P4D1): sc-8017 erreicht. Bildbreiten: linkes Bild: 40  $\mu\text{m}$ ; rechtes Bild: 20  $\mu\text{m}$

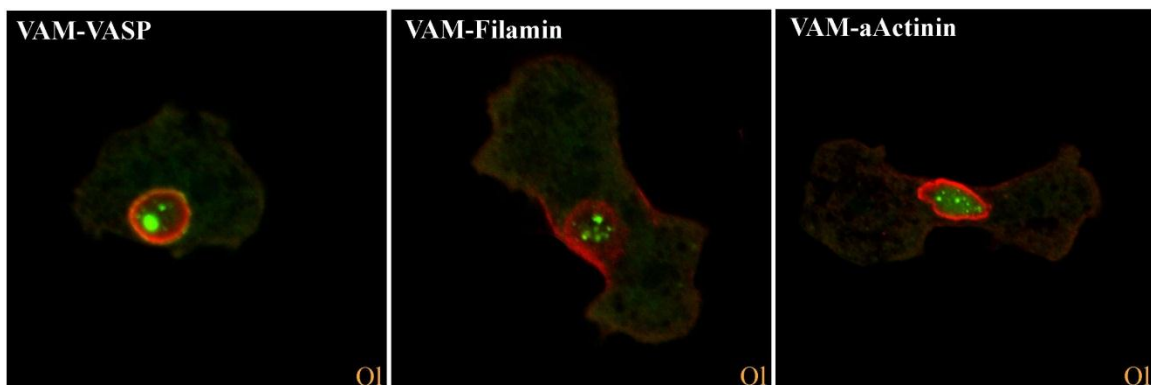


Abb. 44 – Ubiquitin-Färbung diverser VAM-Zelllinien

Die Färbung der Myc-Strukturen erfolgte mittels des Antikörpers 9E10 (mk, rot). Die Färbung von Ubiquitin wurde durch den Antikörper Ub (P4D1): sc-8017 erreicht. Bildbreiten: VAM-VASP (Klon 2B-1) und VAM- $\alpha$ -Actinin (Klon 682II2): je 20  $\mu\text{m}$ ; VAM-Filamin (Klon 648-23): 25  $\mu\text{m}$

Sind die Aggregate in den VAM-VASP-, VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Zellen u. a. ein Ergebnis der Überlastung der unterschiedlichen proteolytischen Abbauege, so sollten in den VAM-Aggregaten Ubiquitin-Signale zu sehen sein. Und tatsächlich, schaut man sich die fixierten VAM-Mutanten an, so sind in allen VAM-Aggregaten deutliche Fluoreszenzsignale, die auf Ubiquitin zurückzuführen sind, zu sehen (Abb. 44). Vereinzelt sind Ubiquitin-Signale im Zytoplasma sichtbar.

Um nachzuprüfen, ob die VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate eventuell auch der Autophagie unterliegen, werden die entsprechenden VAM-Hybridproteine jeweils zusammen mit RFP-Apg8 (*autophagy gene 8*) exprimiert. Der RFP-Apg8-Vektor (#764) trägt eine Blastizidin-Resistenz, was die Kotransformationen mit den VAM-Filamin- und VAM- $\alpha$ -Actinin-Vektoren ermöglicht. Letztere codieren für ein Protein, das Geneticin abbaut. Versuche, RFP-Apg8 zusammen mit VAM-VASP zu exprimieren, blieben erfolglos und wurden eingestellt.

Mittels der Expression von GFP-Apg8 wurden bereits in einer anderen Arbeitsgruppe erste Lokalisationsuntersuchungen dieser Art in *D. discoideum* gemacht. Es wurden zytoplasmatische, punktförmige Strukturen, die prä-autophagosomale Komplexe und/oder ausgebildete Autophagosomen darstellen könnten, nachgewiesen (Abb. 45) (167).

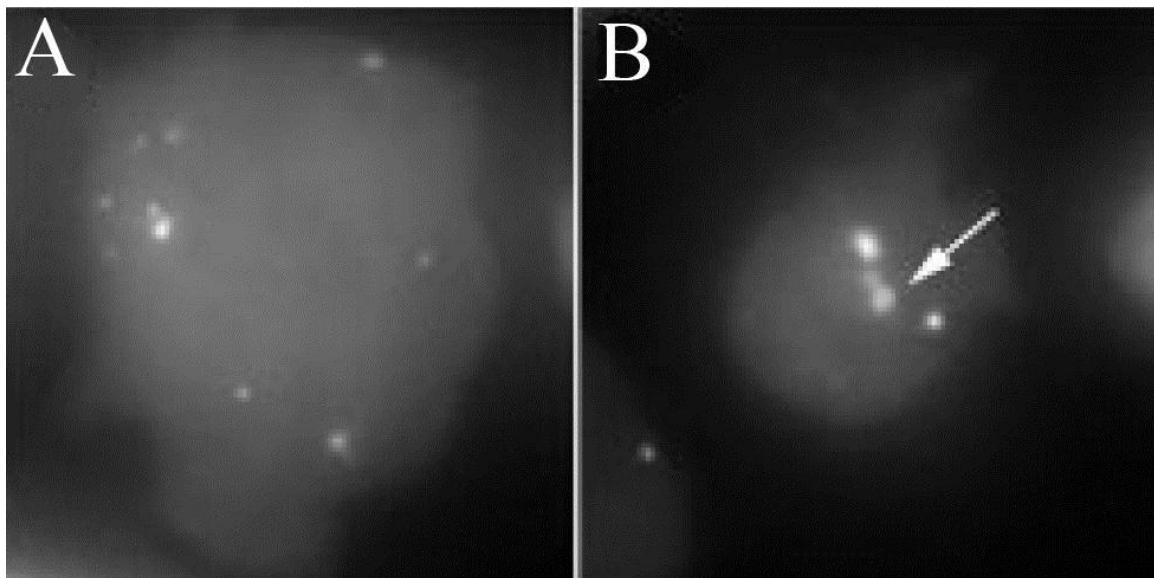


Abb. 45 – GFP-Apg8-Expression in *D. discoideum* (167)

Die Abbildung zeigt die Expression von GFP-Apg8 in lebenden und hungernden Wildtyp-Zellen (DH1). Zu sehen sind kleine punktförmige Strukturen (A) und größere, vesikuläre Organellen, die die Autophagosomen darstellen (Pfeil in B).

Die Koexpression von RFP-Apg8 zusammen mit VAM- $\alpha$ -Actinin oder VAM-Filamin zeigt einen ähnlichen Phänotyp: Punktartige, rotfluoreszierende Strukturen, die hauptsächlich im Zytoplasma lokalisieren (Abb. 46). Nur vereinzelt sind RFP-Signale zusätzlich in den VAM-Aggregaten zu beobachten (Abb. 46, am Beispiel von VAM- $\alpha$ -Actinin zu sehen). Die autophagosomalen Vesikel sind weder in ihrer wildtypischen Anzahl auffällig erhöht noch in ihrer natürlichen Form stark verändert. Es ist somit auszuschließen, dass autophagosomale Prozesse in einem versuchten Abbau der VAM-Filamin- und der VAM- $\alpha$ -Actinin-Aggregate involviert sind.

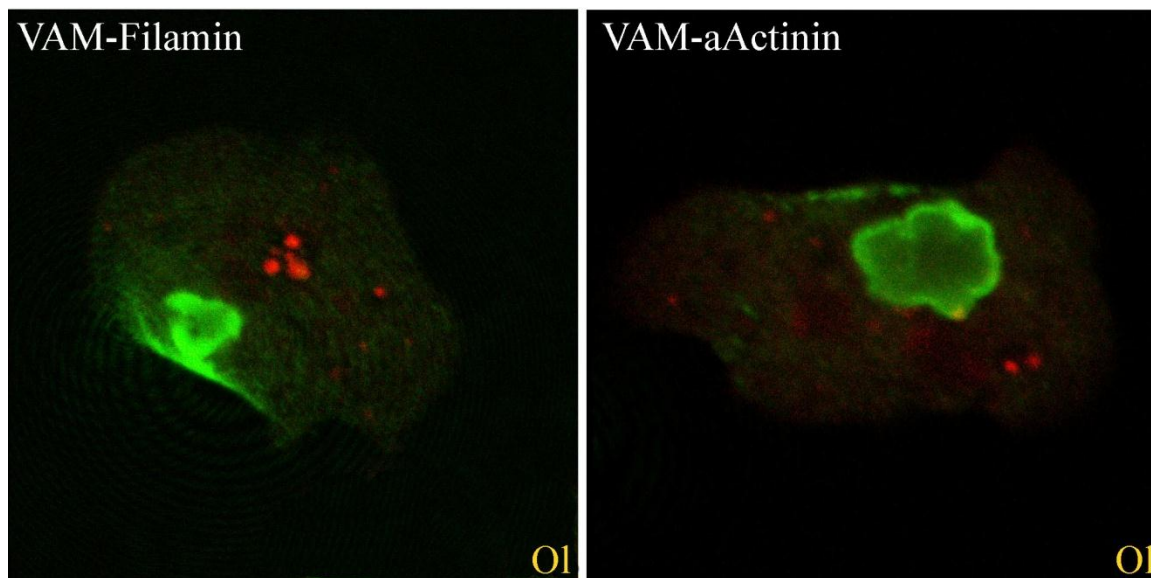


Abb. 46 – Expression von RFP-Apg8 in diversen VAM-Mutanten

Die Myc-Konstrukte wurden mit dem entsprechenden Antikörper 9E10 (mk, grün) markiert.

Bildbreiten: VAM-Filamin (Klon 648/764a): 33  $\mu$ m; VAM- $\alpha$ -Actinin (Klon 682/764b): 25  $\mu$ m

#### 4.5 Die VAM-Aggregate üben negativen Einfluss auf die Zelle aus

Schon VAM-VASP-Zellen zeigten teilweise erhebliche Defekte in deren Physiologie (148, 149). Um entsprechende Vergleiche zwischen den Zellen von AX2 und denen von VAM-Filamin und VAM- $\alpha$ -Actinin anstellen zu können, werden die Versuche bezüglich Wachstum, Zytokinese und endozytotischen Transit unter den gleichen Bedingungen wie schon bei VAM-VASP-Zellen durchgeführt (148, 149).

4.5.1 Die VAM-Aggregate haben Wachstumsdefekte zur Folge

Das Wachstum der VAM- $\alpha$ -Actinin- und der VAM-Filamin-Zellen wurde unter den zwei Standardkultivierungsbedingungen bestimmt. Die jeweiligen Zellen wurden vor Versuchsbeginn mindestens 48 h schüttelnd oder adhärenz vorkultiviert.

Für die Schüttelkulturen wurden anfänglich jeweils  $0,6 \times 10^6$  Zellen / ml G0-Medium angesetzt und in einem Zeitraum von 31 h vermessen. Die Entnahme der Zellproben erfolgte alle zwei Stunden in den Zeiträumen 0 - 8 h und 23 - 31 h. Der Startwert bei den Plattenkulturen lag bei einer Zellanzahl von  $0,6 \times 10^5$  Zellen. Die Probenentnahmen erfolgten ebenfalls alle 2 - 3 h in den Zeiträumen von 0 - 8 h und 24 - 27 h, in dem die jeweilige gesamte Kultivierungsplatte vorsichtig aber vollständig abgespült wurde. Hierfür wurden zuvor entsprechend viele Petrischalen ( $\varnothing = 5$  cm) mit je 5 ml Medium vorbereitet und die abgezählten Zellmengen zugegeben.

Der VAM- $\alpha$ -Actinin-Stamm zeigt in seinem Wachstum unter adhärenz Bedingungen (Platte) nur eine geringe Abweichung von AX2-Zellen (Tab. 03). Die Zellen wachsen sogar minimal schneller als die des Wildtyps. Ein gegensätzlicher und stärker ausgeprägter Effekt zeigt sich bei den VAM- $\alpha$ -Actinin-Zellen unter nicht-adhärenz Wachstumsbedingungen (Schüttler). Im Vergleich zu den VAM- $\alpha$ -Actinin-Zellen zeigen VAM-Filamin-Zellen schon unter adhärenz Bedingungen eine erhebliche Wachstumsverzögerung. In Schüttelkultur ist das Wachstum der VAM-Filamin-Zellen drastisch reduziert: Deren Generationszeit ist mehr als doppelt so lang wie die des AX2-Stamms.

<i>t in h</i>	<u>AX2</u>	<u>VAM-Filamin</u>	<u>VAM-<math>\alpha</math>-Actinin</u>	<u>VAM-VASP</u>
Schüttler	$9,2 \pm 0,21$ (n = 3)	$20,1 \pm 1,97$ (n = 3)	$12,9 \pm 1,05$ (n = 3)	(148)
<i>Faktor</i>	1	2,2	1,4	1,37
Platte	$8,6 \pm 0,11$ (n = 2)	$11,1 \pm 1,1$ (n = 2)	$7,6 \pm 0,24$ (n = 2)	(148)
<i>Faktor</i>	1	1,3	0,9	1,23

Tab. 03 – Generationszeiten der Mutanten im Vergleich zu AX2-Zellen

Aufgelistet sind die errechneten Mittelwerte der Verdopplungszeiten in h, bestimmt aus „n“ Messungen. Der „Faktor“ gibt den jeweiligen Verzögerungsfaktor bezüglich des Wachstums, gemessen an AX2, an.

VAM-VASP-Zellen erreichen unter schüttelnden Bedingungen eine Generationszeit von  $13,8 \pm 0,21$  h und auf Platte eine von  $16,8 \pm 0,81$  h (148). Kontrovers ist, dass diese

Mutante unter adhärennten Bedingungen langsamer wächst als unter nicht-adhärennten Bedingungen. Dies ist auch bei den AX2-Zellen, die von C. Schmauch getestet wurden der Fall: Die AX2-Zellen verdoppeln sich auf Platte alle  $13,7 \pm 0,68$  h und im Schüttler alle  $10,1 \pm 0,04$  h (148). Warum sich die Zellen im Vergleich zu den in der Tabelle gezeigten AX2-Werten so entgegengesetzt verhalten ist unklar. Jedoch weisen auch bei C. Schmauch die ermittelten Wachstums-Faktoren auf ein verlangsamtes Wachstum der VAM-VASP-Mutante im Vergleich zu AX2 hin (Tab. 03) (148).

Dass die Wachstumsverzögerungen der VAM-Filamin und VAM- $\alpha$ -Actinin-Zellen auf Zytokinesedefekte zurückzuführen sind, zeigt sich in der Anzahl der Kerne pro Zelle (Tab. 04). Hierfür wurden die AX2-, die VAM- $\alpha$ -Actinin- und die VAM-Filamin-Zellen ebenfalls mindestens 48 h unter entsprechenden Wachstumsbedingungen vorkultiviert, anschließend fixiert und der Kernfärbung mit DAPI unterzogen (Methoden: 7.5.1).

<b><i>Kernanzahl</i></b>	<b><u>AX2</u></b>	<b><u>VAM-Filamin</u></b>	<b><u>VAM-<math>\alpha</math>-Actinin</u></b>	<b><u>VAM-VASP</u></b>
Schüttler	2,0 (n = 105)	6,6 (n = 124)	6,0 (n = 114)	3,4 (148)
Platte	1,2 (n = 132)	1,7 (n = 118)	1,5 (n = 129)	1,4 (148)

Tab. 04 – Durchschnittlichen Anzahl der Kerne pro Zelle

„n“ bezeichnet die Anzahl der ausgezählten Zellen, die für die Mittelwertbestimmung genutzt wurden.

Unter schüttelnden Kultivierungsbedingungen zeigt sich, im Vergleich zum Plattenwachstum, die Kernanzahl in allen untersuchten Zelllinien erhöht (Tab. 04). Ein schüttelnd kultivierter AX2 besitzt fast doppelt so viele Kerne, wie ein AX2, der auf Platte hochgezogen wurde. Schüttelnd kultivierte VAM-Filamin und VAM- $\alpha$ -Actinin zeigen vierfach so viele Kerne wie die entsprechend adhärennt gewachsenen Mutanten. Einzelne dieser VAM-Zellen enthalten sogar bis zu 30 Kerne, was sich auch im stark vergrößerten Zellvolumen widerspiegelt (ohne Abb.): Zellen mit solch hoher Kernanzahl weisen Größen um die  $44 \mu\text{m}$  ( $n = 9$ ) auf. Die auf Platte herangezogenen VAM-Zellen enthalten eine annähernd wildtypische Anzahl an Kernen.

Adhärennt gewachsene VAM-VASP-Zellen liegen mit einer durchschnittlichen Kernanzahl von 1,4 ebenfalls auf wildtypischem Niveau (148). Schüttelnd kultiviert liegen sie mit 3,4 Kernen pro Zelle zwischen den AX2-Zellen und den anderen Mutanten (148).



Vergleicht man VAM- $\alpha$ -Actinin- mit VAM-Filamin-Zellen, so scheinen, hinsichtlich des Wachstums, erstere generell besser mit den Zytokinesedefekten zurechtzukommen.

#### 4.5.2 Die VAM-Aggregate nehmen Einfluss auf den endozytotischen Transit

Auch die endozytotischen Vorgänge sind in allen VAM-Zellen durch die riesigen VAM-Aggregate beeinflusst. In VAM-VASP-Zellen wurde der Transit bereits näher untersucht (148, 149): Auch wenn die Prozesse der Partikelaufnahme, der Ansäuerung und Neutralisierung von Endosomen und der Abgabe unverdauten Materials noch stattfinden, laufen sie nur eingeschränkt ab.

Die Bestimmungen der Phagozytoseraten (Methoden: 7.3.6) der VAM-Zellen wurden, aufgrund der offensichtlichen Zytokinesedefekte, mit Plattenkulturen durchgeführt. Der Zeitraum der phagozytischen Betrachtung beträgt 120 min. Die einzelnen Messwerte wurden entsprechend der jeweiligen Proteinkonzentrationen normiert und an einer geeigneten AX2-Kurve geeicht.

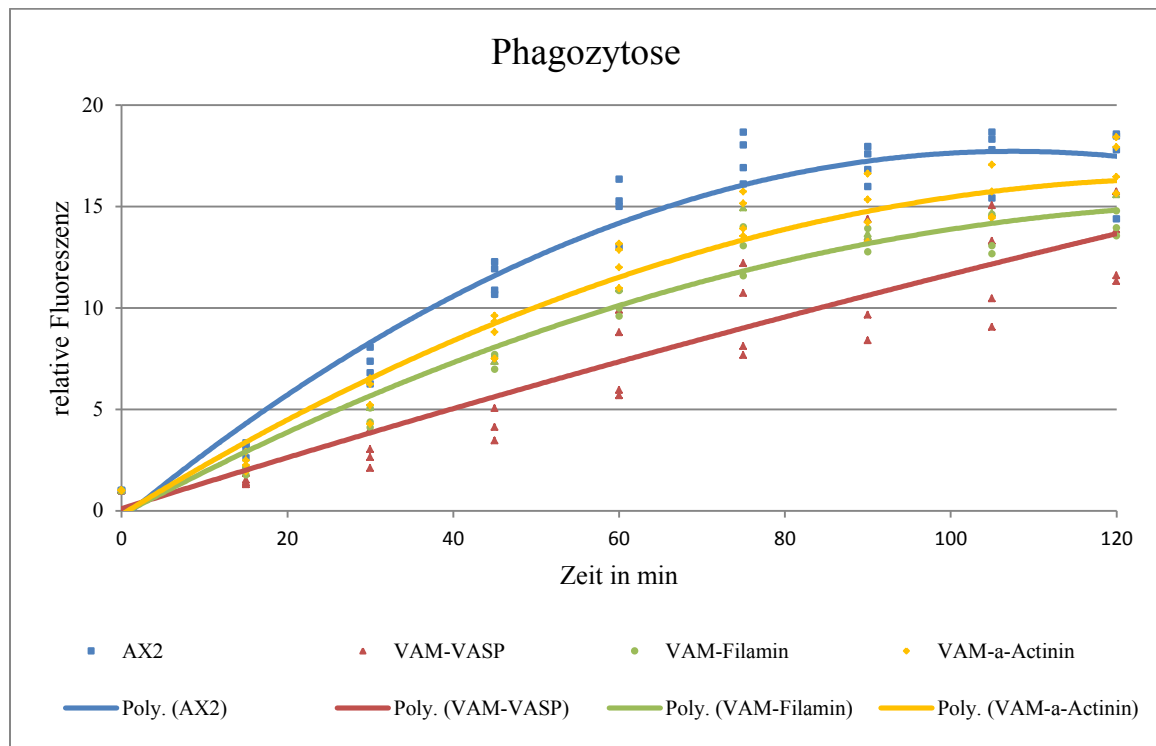


Abb. 47 – Phagozytoserate verschiedener adhärenz gewachsener Zelllinien  
 Dargestellt sind die gemittelten Phagozytoseraten von VAM-VASP-, VAM-Filamin- und VAM- $\alpha$ -Actinin-Zellen im Vergleich zu AX2-Zellen aus vier unabhängigen Messungen. „Poly.“ = polynomisch

Alle VAM-Zelllinien weisen im Vergleich zu AX2 eine verlangsamte Phagozytoserate auf, wobei der Effekt nach 120 min bei den VAM-VASP-Zellen mit einer negativen Beeinträchtigung von ~24 % am gravierendsten erscheint (Abb. 47). VAM- $\alpha$ -Actinin-Zellen zeigen zwar auch eine um ~7 % verringerte Partikelaufnahme, allerdings nicht so auffällig wie VAM-Filamin-Zellen (~16 %) (Abb. 47). Diese Tendenzen stimmen in etwa mit denen der verringerten Wachstums- und Zytokinesedefekte unter adhärennten Bedingungen überein (Tab. 03 und 04).

Auch der Transit (Methoden: 7.3.5) zeigt sich in allen untersuchten VAM-Zelllinien beeinträchtigt (Abb. 48). Vorversuche mit adhärennt kultivierten AX2-Zellen lassen vermuten, dass die Zellen den aufgenommenen FITC/TRITC-Marker nicht dem endozytotischen Transit der Zelle zuführen sondern sofort wieder ausscheiden (149). Aus diesem Grund erfolgte die Durchführung der Transit-*Assays* bei AX2- und allen VAM-Zelllinien mit schüttelnd kultivierten Zellen.

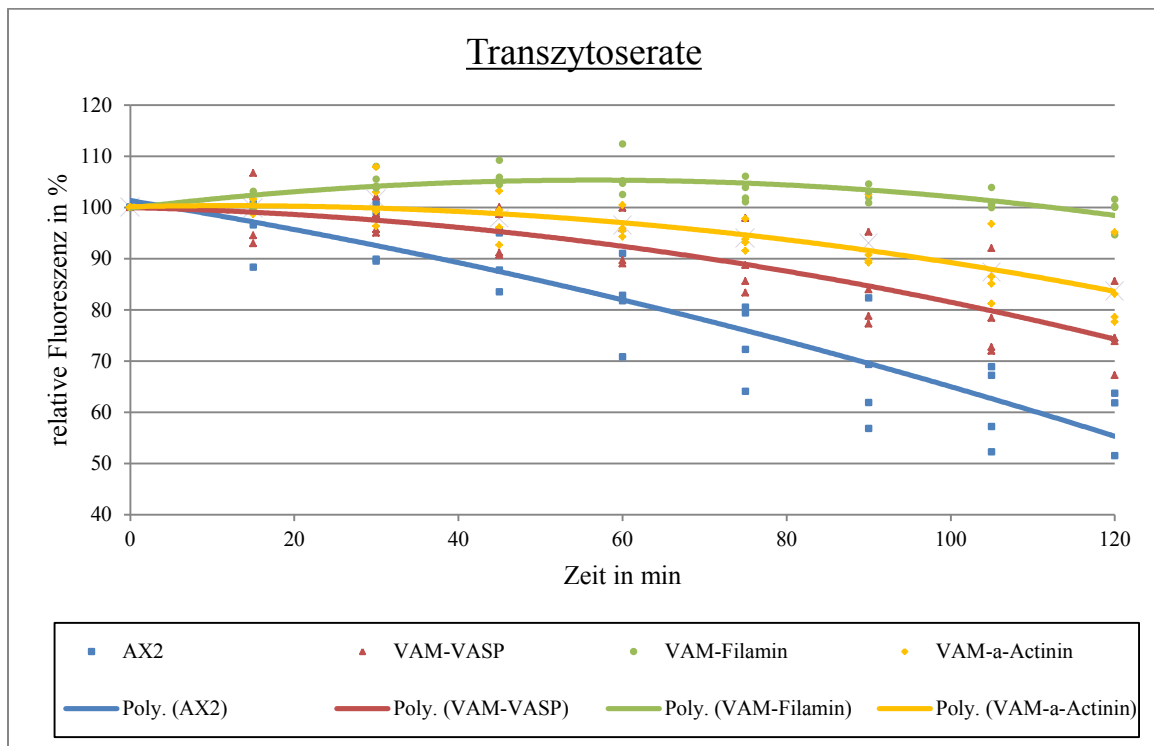


Abb. 48 – Der endozytotische Transit in verschiedenen Zelllinien

Schüttelnd kultivierte VAM-VASP-, VAM-Filamin- und VAM- $\alpha$ -Actinin-Zellen zeigen einen verzögerten Transit im Vergleich zu AX2-Zellen. Die jeweiligen Mittelwerte ergeben sich aus vier unabhängigen Messungen. „Poly.“ = polynomisch

Entsprechend der beobachteten Wachstumsverzögerungen der VAM-Filamin-Mutante unter schüttelnden Bedingungen zeigen die Zellen die größte Abweichung vom wildtypischen Transit-Verhalten (Vergleich Abb. 48 mit Tab. 03): Der Prozess des endozytischen Transits erscheint, zumindest im Zeitraum von 2 h, stagnierend. Das erklärt die sehr lange Generationszeit der VAM-Filamin-Zellen: Durch die extrem verlangsamte Nährstoffverwertung von Proteinen, Fetten und Zuckern werden entsprechende Aufbauprozesse von Molekülen, wie sie für die Zytokinese und das Wachstum der Zelle gebraucht werden, gehemmt. Folglich kann die VAM-Filamin-Zelle kaum an Masse zunehmen und sich keiner Teilung unterziehen, die Zellkultur wächst nicht.

In VAM-VASP-Zellen laufen die Transitvorgänge, mit einer Verzögerung von ~28 %, im Vergleich zu VAM- $\alpha$ -Actinin, deren Transit um ~44 % reduziert ist, zügiger ab. Diese Unterschiede sind kongruent mit den unterschiedlich beeinträchtigten Generationszeiten der entsprechend schüttelnd kultivierten VAM-VASP und VAM- $\alpha$ -Actinin-Zellen (Tab. 03).

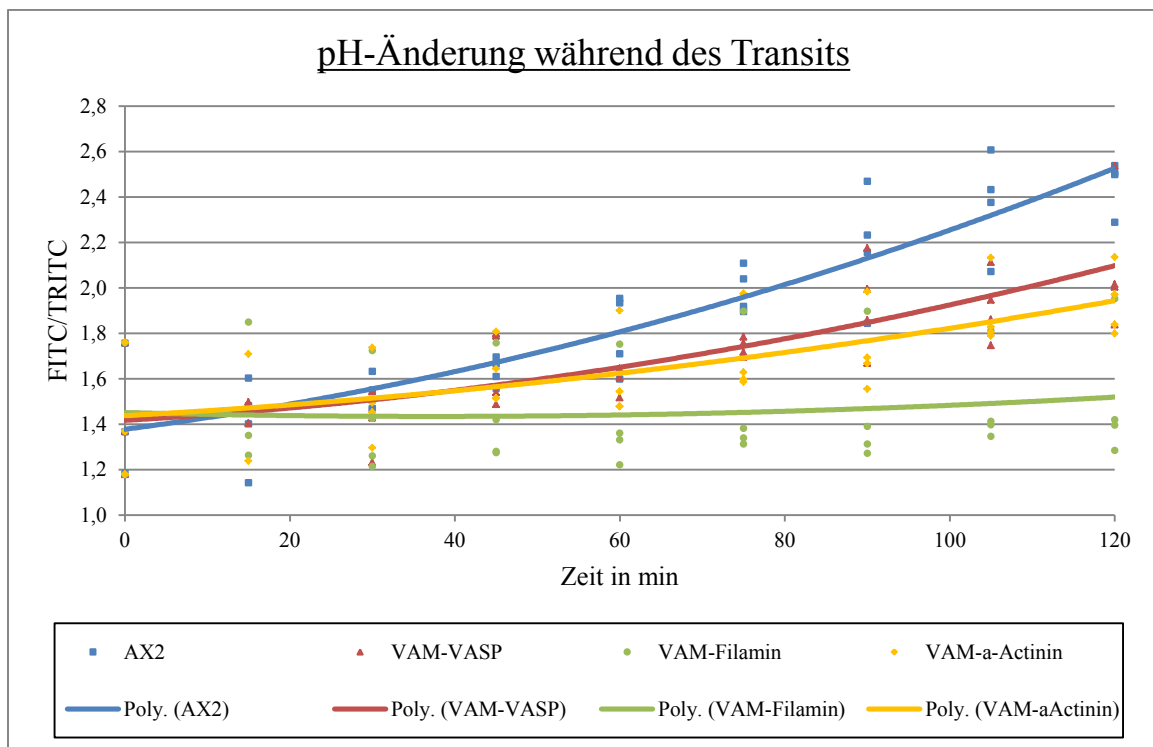


Abb. 49 – pH-Wertänderung in Endosomen verschiedener Zelllinien  
Gezeigt ist die gemittelte Neutralisierung von Endosomen unter nicht-adhärennten Bedingungen von VAM-VASP-, VAM-Filamin-, VAM- $\alpha$ -Actinin- und AX2-Zellen. Der pH-Anstieg ist, im Vergleich zu AX2, in allen Mutanten verlangsamt. Es wird sich auf die Daten des Transit-Assays bezogen (Abb. 48). „Poly.“ = polynomisch

Die Beeinträchtigungen des endozytischen Transits in den VAM-Zellen beruhen höchstwahrscheinlich auf die verzögerten Neutralisierungsvorgänge der angesäuerten Vesikel (Abb. 49). Schließlich bilden neutrale Endosomen die Voraussetzung für die Exozytose von unverdaulichem Material.

## 5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine Ponticulin, Coactosin, Hisactophilin II, WASP, Filamin,  $\alpha$ -Actinin, Ssj758 und Abp34 mittels VacuolinA-Myc ektopisch an späte Endosomen lokalisiert. Ziel war hierbei die Forcierung ähnlicher Aggregate, wie sie durch das Fusionsprotein VAM-VASP ausgelöst wurden. In den Fällen einer Aggregatausbildung bestünde durch den Vergleich der aggregatinduzierenden Proteine die Möglichkeit, die Fähigkeit der Proteine auf bestimmte Eigenschaften einzugrenzen. C. Schmauch führte die ektopische Lokalisation an späte Endosomen zudem mit den Proteinen Scar, Cofilin, DAip1 und Coronin durch (148). Scar ist, lokalisiert an späten Endosomen, anscheinend toxisch für die Zelle. Es konnten keine dauerhaft VAM-Scar-exprimierende Klone gewonnen werden. VAM-Cofilin führt zum Abbau der endosomalen Aktin-Hülle. VAM-DAip1 zeigt als Regulator- und Bindeprotein von Cofilin den gleichen Phänotyp wie VAM-Cofilin: Infolge des fehlenden Actin-*Coats* kommt es zur *Clusterung* der späten Endosomen. Die endosomalen Lokalisationen von Ponticulin (-2TMD), Hisactophilin II, WASP sowie die von Coactosin zeigen keinen Einfluss auf die Endosomen. VAM-Ssj758 führt zur Ausbildung von kleinen, punktförmigen Aggregaten der Fusionskonstrukte. Vacuolin-positive Endosomen sind in den VAM-Ssj758-Zellen nicht mehr nachzuweisen. Das zeigt sich auch für die ektopische Lokalisation von Filamin und  $\alpha$ -Actinin an diese Organellen. VAM-Abp34 liegt im Großteil der Zellen membranständig vor. Jedoch führt die Expression von VAM- $\alpha$ -Actinin und VAM-Filamin in bis zu 98 % der Zellen zur Ausbildung von VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregaten. Bezüglich VAM-Abp34 trifft dieses Phänomen auf gerade mal 5 % entsprechender Zellen zu. Allerdings unterscheiden sich die VAM-Aggregate deutlich in ihrem Aktin-Gehalt: während in den VAM-Abp34-Aggregaten, ähnlich wie bei den VAM-VASP-Aggregaten (148) Aktin in Form von Filamenten enthalten ist, sind in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und in den VAM-Filamin-Aggregaten weder G-Aktin noch F-Aktin nachzuweisen.

Viele Arbeitsgruppen erreichten durch die Verwendung verschiedener Proteine und Zellmodelle sowie durch unterschiedliche Vorgehensweisen ähnliche Phänotypen: Die

entstandenen aggregatähnlichen Strukturen werden in den kommenden Abschnitten (5.1 und 5.2) zunächst kurz vorgestellt und mit den während dieser Arbeit induzierten VAM-Aggregaten verglichen. In den darauffolgenden Diskussionspunkten (5.3 - 5.5) werden die unterschiedlichen Erscheinungsformen der VAM-Aggregate sowie eine mögliche Entstehungsursache dieser, analysiert.

## 5.1 Klassifizierung der verschiedenen VAM-Aggregate

### 5.1.1 Aktin-haltige Aggregate

#### 5.1.1.1 *Hirano Bodies* und *Hirano Body*-ähnliche Aggregate

Interesse haben die VAM-VASP-Aggregate ursprünglich durch ihre Ähnlichkeiten mit sogenannten *Hirano Bodies* geweckt (139, 148). Die Ähnlichkeiten beziehen sich in erster Linie auf die rundliche bis ellipsoide Form der Aggregate und deren kompakte Anreicherung von filamentösen Aktin. Mittlerweile konnten *Hirano Body*-ähnliche Aggregate in den unterschiedlichsten Zelltypen induziert werden, mit dem Ziel, ein einfaches Modellsystem für weitere Studien der *Hirano Bodies* zu finden. Beispielsweise erreichen Maselli *et al.* die Forcierung derart rundlicher Aggregate in *D. discoideum* durch das Protein Abp34 (168, 169). Zum einen gelingt ihnen dies durch die alleinige Expression des C-terminalen Bereichs von Abp34, wodurch der N-terminale Proteinbereich samt der ersten Interaktionszone verloren geht (CT-Myc, Abb. 50-A) (168). Im anderen Fall führt eine Punktmutation im ersten *EF-hand*-Motiv des Proteins (34 kDa- $\Delta$ EF1) zu einer Aggregatbildung (Abb. 50-B) (169). Dieses mutierte *EF-hand*-Motiv 1 kann Calcium zwar noch regulär binden, allerdings hat die Bindung keinen Einfluss mehr auf die Interaktion von Abp34 mit Aktin: Die Calciumbindung ist von der F-Aktin-bindenden Funktion von Abp34 entkoppelt. Grund dafür ist die Zerstörung der intramolekularen Interaktionszone I (IZ I), als Folge der Mutation im *EF-hand*-Motiv 1, welches in der IZ I lokalisiert ist (Abb. 50-B).

Sowohl bei dem CT-Myc- als auch bei dem 34 kDa- $\Delta$ EF1-Fragment ist die interne Rückfaltung des N-terminalen Bereichs von Abp34 und daraus folgend die Inhibition der F-Aktin-Bindung nicht mehr gewährleistet. Diese fehlende Selbstregulation von Abp34 führt offensichtlich zu der Entstehung der zellulären elliptischen, parakristallinen Aktin-

Einschlüsse, in denen die Aktin-Filamente mehr oder weniger geordnet vorliegen (168, 169).

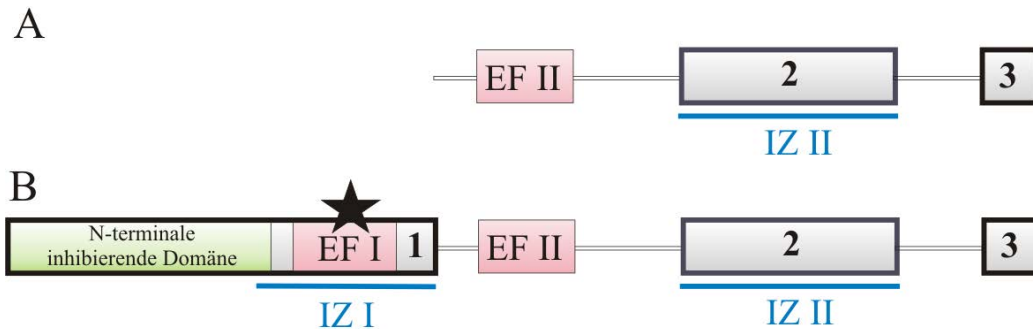


Abb. 50 – Darstellung der Maselli-Konstrukte, die zur Ausbildung von *Hirano Body*-ähnlichen Aggregaten führen

(A) zeigt das verwendete CT-Myc-Fragment von Abp34 (AS 124-295) (168). (B) entspricht dem Abp34-Volllängeprotein, allerdings mit einer Mutation (Stern) im *EF-hand*-Motiv 1 (34 kDa- $\Delta$ EF1) (169).

Davis *et al.*, bestätigen mittels des CT-Myc-Konstrukts von Abp34, dass entsprechende Phänotypen nicht spezifisch für *D. discoideum* sind (170): Mit der Expression von CT-Myc in kultivierten Säugerzellen (HEK 293 cells, HeLa, COS7) und in Nervenzellen (C8-S mouse astrocytes, oligodendogial cells) erreichen sie ebenfalls die Ausbildung *Hirano Body*-ähnlicher Aggregate (Davis-Aggregate). Das entspricht der Tatsache, dass die pathologischen *Hirano Bodies* in den verschiedensten Organen, wie z. B. Muskel, Auge, Hoden oder Krebszellen vorkommen (141). Während Aktin in allen induzierten Davis-Aggregaten nachzuweisen ist, können andere Proteine stets in nur einigen der Aggregate bestätigt werden. Jedoch zeigt sich in allen Fällen, entsprechend den pathologischen *Hirano Bodies*, beispielsweise die Anreicherung der Proteine Vinculin, Tropomyosin, Talin, Tau, Cofilin und  $\alpha$ -Actinin und die Abwesenheit von Tubulin (138, 171-174). Zusätzlich zeigen die Davis-Aggregate, entgegen den *Hirano Bodies* aus Patienten, positive Signale für Myosin II. Allerdings wurden für die Untersuchungen der *Hirano Bodies* keine entsprechend gewebstypischen Antikörper verwendet, d. h. keine Antikörper, die spezifisch für die Myosin II-Isoform des Gehirns sind (170).

Alle CT-Myc-Aggregate, sowohl die von Davis *et al.* als auch die von Maselli *et al.*, ähneln sich im Einfluss der Aktin-Umlagerungen auf die Zelle: Zugunsten der Aktin-

Anhäufung in Form von rundlichen Aggregaten zeigt sich der Verlust von Stressfasern (168, 170).

In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt, dass auch das Volllänge-Abp34 zur Ausbildung derartiger Aktin-Aggregate fähig ist, wenn es im Verbund mit VacuolinA-Myc vorliegt. Allerdings führt VAM-Abp34 nur in bis zu 5 % entsprechender Zellen zur Bildung von VAM-Abp34-Aggregaten. Sie sequestrieren, ähnlich den VAM-VASP- und ALDH-VASP-Aggregaten, verschiedene Aktin-bindende Proteine, die sich allerdings von den *Hirano-Bodies* und den verschiedenen CT-Myc-Aggregaten in wenigen Proteinen unterscheiden (Tab. 05).

	<b>VAM-VASP (Schmauch, (150))</b>	<b>CT-Myc (Maselli, (168))</b>	<b>CT-Myc (Davis, (170))</b>	<b><i>Hirano Bodies</i></b>
<b>ORGANISMUS</b>	<i>D. discoideum</i>	<i>D. discoideum</i>	div. Säugerzellen	div. Säugerzellen
Aktin	+	+	+	+
$\alpha$ -Actinin	+	+	+	+
Cofilin	n. u.	+	+	+
Myosin II	+/-	+	+	-
Talin	-	n. u.	+	+
Tau	n. u.	n. u.	+	+
Tubulin	-	-	-	-
Ubiquitin	+	n. u.	+	-

Tab. 05 – Vergleich der verschiedenen Aggregate durch den Nachweis akkumulierter Proteine

Aufgelistet sind Proteine, die größtenteils in allen Aggregaten mit entsprechenden Antikörpern auf deren Vorkommen überprüft worden. Die VAM-Abp34 und die ALDH-VASP-Ergebnisse sind, aufgrund der Kongruenz mit denen von VAM-VASP, nicht aufgelistet, wobei anzumerken ist, dass  $\alpha$ -Actinin nur in den VAM-VASP-Aggregaten nachzuweisen ist.

„+“ = vorhanden; „-“, = nicht vorhanden; „+/-“, = keine eindeutige Aussage möglich;

„n. u.“ = nicht untersucht

Durch das Protein WASP, das als ein Arp2/3-Aktivator Einfluss auf die Aktin-Polymerisation nimmt, sind ebenfalls Aktin-Akkumulationen auslösbar: Symons *et al.* erreichen das mit der Überexpression von FLAG-WASP in NRK-Zellen (*normal rat kidney epithelial cells*) (175). Im Großteil der Zellen führt die Expression von FLAG-WASP zur zytoplasmatischen Lokalisation. In weniger als 5 % der Zellen markiert FLAG-WASP nur den Zellkern. Eine geringe Expression des Fusionsproteins hat ein punktförmiges, zytoplasmatisches Muster der WASP-Färbung zur Folge. Größere Mengen an FLAG-WASP führen zur Ausbildung von FLAG-WASP-*Clustern*. Wird der C-terminale Bereich (59 AS) des Proteins entfernt (FLAG-WASP $\Delta$ C, Abb. 51-A), so



bleibt eine *Cluster*-Bildung von FLAG-WASP $\Delta$ C aus. Nur bei einer sehr starken Expression dieses Konstruktes werden FLAG-WASP $\Delta$ C-*Cluster* erreicht, die jedoch frei von Aktin sind (175).

Der deletierte Bereich im FLAG-WASP $\Delta$ C-Hybrid umfasst die VCA-Domäne (Verprolin-like, *Central*- und *Acidic*-Region), welche wichtig für die Arp2/3-Bindung und -Aktivierung ist (Abb. 04) (49, 176, 177). Die Aktivität der VCA-Domäne wird, ähnlich wie die FAB-Domäne von Abp34, durch eine Autoinhibition im Protein reguliert: Durch die Rückfaltung der N-terminalen GTPase-bindenden Domäne (GBD) ist die GBD fähig, mit der VCA-Domäne zu interagieren und diese zu inhibieren (178). Das Ausbleiben der Aktin-Aggregate in FLAG-WASP $\Delta$ C-Zellen zeigt, dass die Arp2/3-Bindung, vermittelt durch die VCA-Domäne, wichtig für die Bildung von Aktin-Aggregaten ist.

Hüfner *et al.* gelangen mit den alleinigen Expressionen der VCA- und der VC-Domänen von WASP (Abb. 51-B) in Makrophagen oder HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) die Ausbildung von Aktin-reichen Aggregaten (177). Durch die verkürzten WASP-Konstrukte fehlt die inhibierende Regulation der VCA- und VC-Domänen. Der Arp2/3-Komplex unterliegt folglich einer kontinuierlichen Bindung und Aktivierung an diese Domänen. Es erfolgt die Ausbildung der VCA- und der VC-Aktin-Aggregate (177). Schließlich liegt der Arp2/3-Komplex nachweislich, im Gegensatz zum endogenem WASP, in den VCA- und der VC-Aktin-Aggregaten vor (177). Vermutlich führt eine ähnliche Arp2/3-abhängige Ursache zur Induzierung der FLAG-WASP-Aggregate: Durch die Fusion von WASP an FLAG wird die Rückfaltung des N-terminalen Bereichs von WASP verhindert. Die Autoinhibition des Proteins bleibt aus. Die Folge ist eine fortwährende Bindung und Stimulierung des Arp2/3-Komplexes durch die VCA-Domäne. Die daraus resultierende unkontrollierte Aktin-Polymerisation führt zum Aufbau der FLAG-WASP-Aktin-Aggregate (175).

Durch die Lokalisation des WASP-Volllänge Proteins an späte Endosomen von *D. discoideum* bestand die Absicht, einen vergleichbaren Phänotyp wie für FLAG-WASP zu induzieren. Jedoch konnte in der Praxis nichts Derartiges beobachtet werden. Die Delokalisation von WASP an späte Endosomen nimmt keinen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett der Zelle (Abb. 21): Es werden keine VAM-WASP-Aggregate ausgebildet.

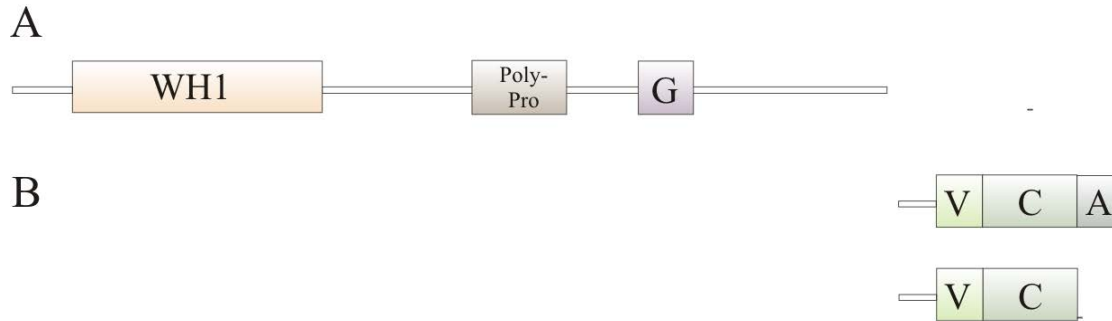


Abb. 51 – Im Vergleich sind die Konstrukte von Symons *et al.* und Hübner *et al.* dargestellt  
 In (A) ist das verwendete FLAG-WASP $\Delta$ C nach Symons *et al.* dargestellt (175). (B) zeigt hingegen den Vergleich der verkürzten C-Termini nach Hübner *et al.* (177).

### 5.1.1.2 Toxin-induzierte Aktin-Aggregate

Bezüglich der *Hirano Body*-ähnlichen Aktin-Aggregate ist es interessant zu sehen, dass die Ausbildung nicht unbedingt auf einem mutierten Protein basieren muss. So erzeugen Lee *et al.* Aktin-Aggregate in *Dictyostelium*-Zellen durch die Verwendung von Phalloidin und Jasplakinolide (179). Sowohl Phalloidin als auch Jasplakinolide sind Gifte, die Aktin-Filamente binden und stabilisieren, indem sie deren Depolymerisation inhibieren. Folglich ist es naheliegend, dass die Ausbildung der Aktin-Aggregate auf die Unfähigkeit der mit diesen Giften behandelten Zellen zurückzuführen ist, bestehende Aktin-Filamente abzubauen. Eine hohe Dosis von injiziertem Phalloidin in Fibroblasten hat den gleichen Effekt (180). Zwar sind die Aggregate kleiner aber dennoch markant.

Wichtig für die Ausbildung der Phalloidin- und Jasplakinolide-abhängigen Aktin-Aggregate in *D. discoideum* sind das Vorhandensein von filamentösen Aktin und funktionellen Mikrotubuli (179). ABP-120 und Myosin II sind nicht in den Aktin-Aggregaten nachweisbar (179). In den Phalloidin- und Jasplakinolide-abhängigen Aktin-Strukturen ist folglich wieder eine andere Proteinzusammensetzung zu beobachten, als bei den bisher beschriebenen *Hirano Body*-ähnlichen Aggregaten (Tab. 05).

## 5.1.2 Aktin-freie Aggregate

### 5.1.2.1 VAM-Filamin-, VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Ssj748-Aggregate

Filamin und  $\alpha$ -Actinin führen, in der Lokalisation mit VacuolinA-Myc, zu großen, rundlichen und homogenen Aggregaten (Abb. 25). Allerdings weichen die VAM- $\alpha$ -Actinin- und die VAM-Filamin-Aggregate, aufgrund des Fehlens von Aktin und Aktin-bindenden Proteinen stark von *Hirano Bodies* und *Hirano Body*-ähnlichen Aggregaten ab und werden folglich auch nicht als solche klassifiziert.

Die einzige Beobachtung, die die Aussage bezüglich der Aktin-Freiheit der VAM- $\alpha$ -Actinin- und der VAM-Filamin-Aggregate in Frage stellt, ist der beschriebene inhibierende Latrunculin-Einfluss auf die Entwicklung der VAM-Filamin-Aggregate (Ergebnisse: 4.3.1.4). Die Ausbildung der VAM-Filamin-Aggregate zeigt gleiche Latrunculin-abhängige Beeinträchtigungen wie die der VAM-VASP-Aggregate: Nur eine geringe Anzahl an entsprechenden Zellen bildet in Gegenwart des Giftes mehrere, kleine VAM-Aggregate aus (Abb. 26). Dieser Phänotyp erscheint bezüglich der VAM-VASP-Aggregate aufgrund deren Aktin-Gehalts auch plausibel: Die Polymerisation von Aktin zu Filamenten wird durch die Latrunculin-vermittelte Aktin-Sequestrierung blockiert. Dem Protein VAM-VASP stehen keine Aktin-Filamente zur Bündelung und Anhäufung zur Verfügung. Folglich werden keine Aktin-Aggregate ausgebildet. Doch welche Erklärung gibt es für die VAM-Filamin-Aggregate?

Aktin liegt nachweislich auch im Zellkern von *D. discoideum* vor (181, 182). So bilden sich beispielsweise filamentöse Aktin-Strukturen im Kern aus, wenn die Zelle mit DMSO behandelt wird (182). Gleiches gilt auch für Protozoen und Säugerzellen (183, 184). Der Einfluss von Latrunculin auf diese Zellen führt zur Inhibierung des Exports von RNA und Proteinen, des Zusammenbaus der Kernhülle, der Transkription und der transkriptionsinduzierte interchromosomale Interaktionen (185-188). Mittlerweile ist durch verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander bewiesen worden, dass Aktin eine Rolle im Zellkern bei der Chromatinorganisation, der Transkription, der RNA-Prozessierung und dem nukleären Export zuteilwird (189-192). Bestätigt ist auch, dass Aktin mit allen drei RNA-Polymerasen interagiert und Einfluss auf die Effizienz der Transkription nimmt (193-196). Folglich kann hier die Ursache für die Latrunculin-

abhängige, eingeschränkte Ausbildung der kugeligen Aggregate in den VAM-Filamin-Zellen von *D. discoideum* gefunden werden: Latrunculin bindet u. a. das Aktin im Zellkern und nimmt so negativen Einfluss auf die Transkription des VAM-Filamin-Fusionsproteins, was jedoch essentiell für die Ausbildung der VAM-Filamin-Aggregate ist. Letztere bleibt folglich aus. Ein Versuch, bei dem die Proteinexpression von VAM-Filamin und vergleichsweise auch von VAM-VASP unter verschiedenen Latrunculin-Bedingungen verglichen wird, bestätigt das (Abb. 72): Zellen, die 8 h im Beisein des Aktin-sequestrierenden Gifts kultiviert werden, weisen in einem Western Blot keine VAM-Filamin- oder VAM-VASP-Expressionssignale auf. In Zellen, die nicht unter dem Einfluss von Latrunculin stehen, zeigt sich im Western Blot hingegen nach gleicher Zeit eine deutliches Myc-Signal sowohl des VAM-Filamin- als auch des VAM-VASP-Proteins (Abb. 72). Die ausbleibende VAM-Filamin-Aggregatbildung in Latrunculin-behandelten Zellen geht folglich auf den negativen Einfluss von Latrunculin auf alle Aktin-abhängigen Transkriptionsprozesse im Kern zurück. Gleiches gilt für VAM-VASP: Das Ausbleiben der VAM-VASP-Aggregate in Zellen, die mit Latrunculin behandelt worden (Abb. 26), ist folglich nicht primär auf das Ausbleiben der zytoplasmatischen Aktin-Polymerisation, wie zuerst angenommen, zurückzuführen.

Für Ssj758 ist eine Funktion bezüglich Aktin nicht erforscht. Dessen drei SH3-Domänen, sowie die nachgewiesene Kollokalisierung mit kortikalem Aktin lassen aber entsprechende Proteininteraktionen vermuten (120). Aus diesem Grund wurde in verschiedenen Konstrukten jeweils eine der drei SH3-Domänen deletiert (Daten nicht gezeigt). Ziel war es, Einflüsse der Domänen auf die Ssj758- und auf die Aktin-Lokalisation nachzuweisen. Jedoch konnten keine hilfreichen Aussagen gewonnen werden: Die SH3-Deletionen im Ssj758-Protein erhöhen scheinbar den zytoplasmatischen Anteil des Ssj758-Proteins, markante physiologische Effekte, besonders auf die kortikalen Aktin-Strukturen, sind mittels Immunfluoreszenzen allerdings nicht zu erkennen. Eine andere Möglichkeit, dem Ssj758-Protein einen Einfluss auf Aktin nachzuweisen, bestand in der Idee, dieses Protein an Aktin-positive Endosomen zu lokalisieren. Zeigt sich beispielsweise durch die Expression von VAM-Ssj758 ein zu VAM-VASP vergleichbarer Phänotyp, so kann auf einen positiven Aktin-Einfluss von Ssj758 geschlossen werden.

Die endosomale Lokalisation von Ssj758 hat eine aggregierende Wirkung auf die späten und mittelspäten Endosomen: Eine Fusion von Ssj758 an Vacuolin A oder an ALDH führt zur Bildung kleiner punktförmiger Aggregate (VAM-Ssj758, Abb. 45) und zur Markierung einer einzelnen, vesikelähnlichen Struktur (ALDH-Myc-Ssj758, Abb. 46). Eine Kolokalisation der VAM-Ssj758- und ALDH-Myc-Ssj758-Strukturen mit Aktin bleibt jeweils aus. Die Aktin-freien Ssj758-Strukturen bedeuten jedoch nicht, dass Ssj758 keinen Einfluss auf Aktin nehmen kann. Schließlich sind die VAM-Aggregate, ausgelöst durch die beiden Aktin-Crosslinking-Proteine  $\alpha$ -Actinin und Filamin, ebenfalls Aktin-frei. Letztere sind im Vergleich zu den VAM-Ssj758- und den ALDH-Myc-Ssj758-Strukturen eindeutig größer. Jedoch sind die Expressionen von VAM- $\alpha$ -Actinin und VAM-Filamin auch um ein Vielfaches stärker als die der verschiedenen Ssj758-Konstrukte (Abb. 66 und 70).

Andererseits ist es möglich, dass Ssj758 gar keine Aktin-interagierenden Funktionen besitzt. Schließlich zeigen Proteine mit SH3-Domänen eine große Vielfalt in ihren biologischen Funktionen (121): So nehmen SH3-haltige Proteine Einfluss auf Aktin-unabhängige Prozesse, wie beispielsweise die Regulation von Enzymen, die Veränderung der lokalen Konzentration und Lokalisation von Komponenten bestimmter Signalwege und sie regulieren den Zusammenbau von Multiproteinkomplexen. Folglich könnte Ssj758, aufgrund der Membranlokalisation, für die Weitergabe von externen Signalen und damit für die Aktivierung verschiedener Signalwege verantwortlich sein.

#### 5.1.2.2 Aggresomen

Die Aktin-freien VAM- $\alpha$ -Actinin- und die VAM-Filamin-Aggregate zeigen Ähnlichkeiten mit sogenannten Aggresomen, die erstmalig als solche 1998 von Johnston *et al.* beschrieben wurden (197). Auslöser dieser Aggresomen waren Arbeiten mit dem *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR). Unter wildtypischen Bedingungen wird der CFTR in der Zelle zu 60-80 % ineffizient gefaltet und im Proteasom abgebaut. Durch die Überexpression des Proteins oder durch die Inhibierung des Proteasoms in humanen embryonalen Nierenzellen kommt es zu Akkumulationen von stabilen, hochmolekularen Formen des CFTRs. Diese CFTR-Anhäufungen sind, wie auch die VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate, durch eine fehlende Membran

und eine recht geordnete, elektronendichte Struktur gekennzeichnet (Abb. 42). Die CFTR-Aggregate zeigen zusätzlich eine deutliche MTOC-Lokalisation und sind durch eine Ummantelung aus Intermediärfilamentproteinen, speziell Vimentin, charakterisiert (197). Für die VAM-Filamin- und VAM- $\alpha$ -Actinin-Zellen können hinsichtlich dieser Charakteristiken keine konkreten Aussagen getroffen werden: Lokalisationen der VAM-Aggregate am MTOC sind zwar nicht auszuschließen. Jedoch erscheinen diese aufgrund der Größe der VAM-Aggregate und aufgrund der Zytokinesedefekte der Zellen, die zu zahlreichen Zentrosomen in der Zelle führen, artifiziell. Eine Aussage bezüglich einer direkten Abhängigkeit der VAM-Aggregate vom MTOC ist nicht möglich. Des Weiteren ist für *D. discoideum* kein Intermediärfilamentsystem beschrieben.

Seither sind für einige Proteine aggresomale Strukturen beschrieben worden, die sich scheinbar als Folge von nicht korrekt gefalteten Proteinketten bilden: Beispielsweise führen die Überexpressionen von Presenilin-1 (PS1), TCR $\alpha$ -Ketten (T-Zell-Antigen-Rezeptor) oder GFP-Fusion mit einem 250-AS-Fragment von p115 (GFP-250) zu derartigen Aggregaten (197-199). In einigen dieser Experimente ist die Aggresombildungen abhängig von der zusätzlichen Inhibition der Proteasomen. Gemeinsamkeiten aller induzierten Aggregate, sofern untersucht, finden sich in der Umverteilung von Vimentin, in der Anreicherung von Hitzeschockproteinen sowie in der Abhängigkeit vom Mikrotubuli-System (197-199). Die Notwendigkeit eines intakten Mikrotubuli-System beruht auf der Zentralisierung sich akkumulierender Polypeptidketten: Diese werden über die Zelle verteilt ausgebildet. Entlang der Mikrotubuli erfolgt der Transport der Polypeptidketten in MTOC-Nähe, wo sich diese schließlich zu einem Aggresom vereinen. Dieser Vorgang der Aggresom-Bildung erscheint logisch, führt man die Aussagen von Wigley *et al.* und Johnston *et al.* zusammen: So zeigten Wigley *et al.*, dass Proteasomen, diverse Hitzeschockproteine und Ubiquitine unter natürlichen Bedingungen in Zentrosomennähe lokalisiert sind (200). Das Zentrosom wird als eine Art Gerüst beschrieben, das die Komponenten jenes Systems vereint, welches für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Proteinfaltung, -aggregation und -degradation zuständig ist (200). Und Johnston *et al.* kamen schließlich zu der Schlussfolgerung, dass die Bildung der Aggresomen eine Reaktion der Zelle ist, mit der sie auf zytoplasmatische Akkumulationen von missgefalteten Proteinen, als Folge einer

Überbelastung des Proteasoms, reagiert (197). Ausgebildete Proteinaggregate können nicht mehr proteasomal abgebaut werden, da die Proteine für den Transport ins Proteasom einzeln und im entfalteten Zustand vorliegen müssen (201).

Die teilweise Ent- oder Missfaltung von Proteinen kann u. a. durch thermischen oder oxidativen Stress sowie durch Veränderungen in der Primärstruktur, aufgrund von Mutationen, Transkriptions- oder Translationsfehlern ausgelöst werden. Als Folge kommt es zu Akkumulationen der nicht korrekt faltbaren Proteinketten. Solche Aggregate sind mittlerweile mit diversen neuronalen Krankheiten, wie z. B. Alzheimer, Parkinson und Huntington assoziiert (zusammengefasst in (202, 203)). Alle Aggresomen sind durch recht spezifische Interaktionen gekennzeichnet: Sie sind hauptsächlich durch die Anhäufung von charakteristischen, die Aggregation verursachenden Polypeptidketten aufgebaut: z. B. ist es das  $\beta$ -Amyloid bei Alzheimer-Aggresomen, das  $\alpha$ -Synuclein bei Parkinson-Aggresomen und das abnorm verlängerte Glutamin-Repeat bei Huntington-Aggregaten (203). Die VAM- $\alpha$ -Actinin- und die VAM-Filamin-Aggregate zeigen ebenfalls kaum andere Bestandteile als die Fusionsproteine und die endogenen Bindungspartner der Proteine im Hybrid (Tab. 01). In einem Misch-Aggregations-Experiment am Beispiel von zwei verschiedenen Proteinen der P22-Bakteriophagen wurde gezeigt, dass entsprechende Faltungsintermediate nicht untereinander aggregieren sondern stets nur mit den Gleichen (204). *In vivo* und *in vitro*-Faltungsstudien beweisen zudem, dass oligomere Proteine eine viel höhere Affinität für eigene als für andere Proteine haben (205).

Unterschiedliche Aussagen gibt es bezüglich der Ubiquitin-Vorkommen in den Aggregaten: So zeigen beispielsweise die CFTR- (197), wie auch die VAM- $\alpha$ -Actinin- und die VAM-Filamin-Aggregate (Abb. 44) eine deutliche Anreicherung des Ubiquitin-Proteins, wohingegen die Aggregate, ausgelöst durch TCR $\alpha$  und GFP-250 keine positiven Signale aufweisen (198, 199). Die Mehrheit an Proteinen, die für den proteasomalen Abbau bestimmt sind, werden ubiquitiniert (zusammengefasst in (131)). So ist auch in einigen *Hirano Body*-ähnlichen Aggregaten, wie auch in den VAM-VASP-Aggregaten, Ubiquitin nachweisbar, wohingegen für die pathologischen *Hirano Bodies* keine derartigen Proteinmarkierungen bekannt sind (Tab. 05) (170, 173).

Das Ubiquitin-Vorkommen in jeglichen exogen induzierten Aggregaten dokumentiert den Versuch der Zelle, die unnatürlichen Polypeptidketten mittels des Proteasoms abzubauen. Doch die kontinuierliche Herstellung der Proteine und die schnelle Aggregation der Polypeptidketten verhindern den proteasomalen Abbau, wie bereits von Johnson *et al.* für die CFTR-Aggresomen postuliert (197).

Neuere Studien gehen davon aus, dass Proteinaggregate sogar durch autophagozytotische Prozesse entsorgt werden können. Beispielsweise ist gezeigt, dass Huntingtin-Aggregate mTOR, einen negativen Regulator der Autophagie, sequestrieren und so inhibieren (206). Als Folge davon wird die Autophagie in Zellen, die die Huntingtin-Aggregate beinhalten, induziert. Bezüglich der VAM- $\alpha$ -Actinin- und der VAM-Filamin-Zellen gibt es keine Auffälligkeiten in der Größe, der Lokalisation oder der Anzahl an Autophagosomen (Abb. 46). Es ist fraglich, ob diese VAM-Aggregate wenigstens zu Beginn ihrer Entwicklung dem Versuch eines autophagozytotischen Abbaus unterlagen.

Die Eigenschaften, die Aggresomen aufgrund falsch gefalteter Proteine aufzeigen, legen es nahe, die VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate als Aggresomen-ähnliche Strukturen zu bezeichnen. Mutationen oder fehlerhafte Prozesse im Aufbau der VAM-Fusionsproteine, sind allerdings aufgrund von Sequenzanalysen sowie den zahlreich reproduzierbaren VAM-Aggregaten auszuschließen. Auch die Tatsache, dass die endogenen Proteine Vacuolin,  $\alpha$ -Actinin und Filamin in den entsprechenden VAM-Aggregaten vorliegen, lässt an fehlgefalteten Polypeptidketten der Fusionsproteine zweifeln. Schließlich erfordern Proteinkomplexbildungen korrekte Tertiärstrukturen der Proteine.

## 5.2 Die VAM-Aggregate sind ein sterisches und kein molekulares Problem

Die Klassifizierung der VAM-VASP-, der VAM- $\alpha$ -Actinin- und der VAM-Filamin-Aggregate unter Punkt 5.1 ist sehr einfach gehalten worden: Aktin-haltig oder nicht. Eine feinere Aufteilung ist kaum möglich. Zum einen unterscheiden sich alle beschriebenen Aktin-positiven Aggregate in einigen Komponenten, was ihre Zusammensetzung aus Proteinen betrifft (Tab. 05). Zum anderen zeigen entsprechende Zellen auch wenige verschiedene physiologische Beeinträchtigungen (Tab. 06), obwohl die Ähnlichkeiten überwiegen.



Nur für die VAM-VASP-, VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Zellen, nicht aber für die CT-Myc- und 34 kDa $\Delta$ EF1-Aggregate in *D. discoideum*-Zellen sind reduzierte Raten bei der Phagozytose und beim endozytischen Transit beschrieben (168, 169): Die Aufnahme von Partikeln ist in den VAM-Mutanten, im Vergleich zum AX2, zwischen 7 % und 24 % reduziert (Abb. 47) (148). Die Effizienz des endozytischen Transits der VAM-Zellen ist, gemessen an der von AX2, um 28 – 44 % herabgesetzt, wobei der Transit in VAM-Filamin-Zellen völlig still zu stehen scheint (Abb. 48). Die VAM-VASP-Zellen zeigen zusätzlich eine um 50 % verlangsamte Pinozytoserate (148). VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Klone wurden diesbezüglich nicht getestet.

Negative Beeinflussungen der VAM-Aggregate auf das Wachstum und auf die Zytokinese aller VAM-Zellen sind ebenfalls zu beobachten (Tab. 03 und Tab. 04). Die 9-stündige Generationszeit von wildtypischen *D. discoideum*-Zellen ist in den mutanten Zelllinien unter adhärennten Kultivierungsbedingungen um bis zu 3 h und unter schüttelnden Bedingungen um bis zu 11 h verlängert (Tab. 03). Wachstumsverzögerungen beruhen auch auf den CT-Myc- und den 34 kDa- $\Delta$ EF1-Aggregaten in *D. discoideum* (168, 169). Eine drastische Beeinflussung des Zellwachstums von 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP-exprimierenden *D. discoideum*-Zellen wurde nur beobachtet, wenn zusätzlich das Autophagie-Gen Atg5 ausgeknockt (Atg5-Knockout) wurde (207). Säugerzellen, die das CT-Myc-Fragment exprimieren, weisen keine derartigen Folgen auf (170).

Kim *et al.* vermuten die Ursache der 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP-abhängigen Wachstumsverzögerung in den Atg5-Knockout-Mutanten in einer Überforderung der zellulären Degradationsmaschinerien, denn Atg5 spielt eine Rolle bei der Autophagosomenausbildung (207). Schließlich wiesen sie nach, dass sowohl die Autophagie als auch das Proteasom am Umsatz der 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP-Aggregate beteiligt sind: Normalerweise führte die Expression von Atg8-GFP zu einer Kolokalisation mit den 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP-Aggregaten in AX2-Zellen. In Atg5-Knockout-Mutanten bleibt hingegen eine Kolokalisation der Aggregate mit Atg8-GFP aus (207). Allerdings ist es fraglich, ob es sich bei den Beobachtungen in Atg5-Mutanten wirklich um einen Effekt der inhibierten Autophagie oder nur um einen Effekt der Größe der 34 kDa- $\Delta$ EF1- GFP<sup>ATG5-KO</sup>-Aggregate handelt. Denn im Vergleich zu den 34 kDa-

$\Delta$ EF1-GFP-Aggregaten im wildtypischen Hintergrund wirken die 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP<sup>ATG5-KO</sup>-Aggregate im Atg5-Knockout-Hintergrund neunfach größer (207). Die 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP-Aggregate könnten folglich aufgrund der kleinen Größe noch von Autophagosomen aufgenommen bzw. umschlossen werden. Jedoch ist es vorstellbar, dass das Autophagie-System ab einer bestimmten Größe von Aggregaten, wie z. B. im Fall der großen 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP<sup>ATG5-KO</sup>-Aggregate nicht mehr fähig ist, für deren Abbau zu sorgen: autophagosomale Marker sind in den Aggregaten nicht nachweisbar (207).

Diese Möglichkeit trifft auch auf die VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate zu. Die VAM-Aggregate weisen zur Zelle ein ähnliches Größenverhältnis auf wie die 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP<sup>ATG5-KO</sup>-Aggregate zu den Atg5-Knockout-Mutanten. Die Koexpression von RFP-Apg8 führt zu keiner Kolo-kalisation mit den VAM-Aggregaten (Abb. 46). Die in den VAM-Zellen beobachteten Autophagosomen (Abb. 46) ähneln in ihrer Struktur, ihrer Lokalisation und ihrer Anzahl denen von Wildtyp-Zellen (Abb. 45). Eine Verbindung der VAM-Aggregate zur Autophagie liegt folglich nicht vor.

Der proteasomale Abbau ist, laut Kim *et al.*, ebenfalls am Abbau *Hirano Body*-ähnlicher Aggregate beteiligt (207): Ein Expressionsstopp von 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP führt zur starken Abnahme der Menge an Fusionsprotein in der Zelle. Durch das Zufügen von Lactazystin, einem Proteasomeninhibitor, wird die Abnahme verhindert. Des Weiteren vermuten Kim *et al.*, dass der durch Exozytose vermittelte, aktive Ausscheidung der 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP-Aggregate eine wichtige Rolle zukommt (207). Diese Aussage basiert jedoch nur auf Beobachtungen von solchen Aggregaten im extrazellulären Medium. Der eigentliche Vorgang der Exozytose der Aggregate ist nicht beschrieben. Diese Beobachtungen gleichen Dokumentationen von extrazellulär vorliegenden, pathologischen *Hirano Bodies* im Gehirn (208). Unterstützt wird der Einfluss von Autophagie- und Exozytosefunktionen zudem durch Beispiele von Säugerzellen, in denen *Hirano Bodies* membrangebunden und sogar membranumschlossen beobachtet worden (143, 209, 210). Das deckt sich mit Nachweisen von Kim *et al.*, die von einigen, wenigen membranummantelten 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP-Aggregaten in Säugerzellen berichten (207). Zwar sind auch im extrazellulären Raum von fixierten VAM-Zellen einige Aggregate zu finden (ohne Abb.). Jedoch kann es sich dabei um Artefakte der Zellfixierungen handeln:

Die frei liegenden VAM-Aggregate können Reste aufgeplatzter VAM-Zellen sein. Zudem ist es möglich, dass VAM-Zellen während der Prozesse zur Vorbereitung dauerhafter Mikroskop-Präparate mechanisch zerstört werden. Insofern ist eine Aussage in Anlehnung an exozytotische Prozesse sehr schwierig. Jedoch sind in keinem Fall der VAM-Aggregate in Membranen eingeschlossene Aggregate zu erkennen gewesen: Das ist durch TEM-Aufnahmen (Abb. 42) und p80-Färbungen (ohne Abb.) bestätigt und erweist sich kongruent mit Berichten über *Hirano Bodies* (141) und *Hirano Body*-ähnlicher Aggregate in *D. discoideum*-Zellen (148, 169). Es ist anzunehmen, dass die Membranbeobachtungen ein Säugerzellen-spezifisches Phänomen darstellen.

Bis auf den 34 kDa- $\Delta$ EF1-GFP-Aggregaten in Säugerzellen, die angeblich einem ständigen Auf- und Abbau unterliegen, wird allen anderen *Hirano-Body*-ähnlichen Aggregaten keine entsprechende Dynamik zugesprochen (Tab. 06) (168-170). Die ausgebildeten Aktin-haltigen VAM-VASP-Aggregate unterliegen keiner Veränderung unter dem Einfluss von Latrunculin, was die fehlende Dynamik der Aggregate unterstützt (148). Andernfalls wäre über die Zeit ein Verschwinden der VAM-VASP-Aggregate zu erwarten gewesen.

	Organismus	Membran	Stabilität	Zelltod	Wachstum	Pinozytose	Phagozytose	Transit
<b>VAM-VASP</b> (Schmauch, (148))	<i>D. discoideum</i>	-	+	-	↓	↓	↓	↓
<b>VAM-<math>\alpha</math>-Actinin</b>	<i>D. discoideum</i>	-	+	-	↓	↓	↓	↓
<b>VAM-Filamin</b>	<i>D. discoideum</i>	-	+	-	↓	↓	↓	↓
<b>CT-Myc</b> (Maselli, (168))	<i>D. discoideum</i>	-	+	-	↓	-	-	n. u.
<b>CT-Myc</b> (Davis, (170))	div. Säugerzellen	n. u.	+	-	-	n. u.	n. u.	n. u.
<b>34 kDa-<math>\Delta</math>EF1</b> (Maselli (169))	<i>D. discoideum</i>	-	+	-	↓	n. u.	n. u.	n. u.
<b>34 kDa-<math>\Delta</math>EF1</b> (Kim (207))	div. Säugerzellen	+/-	-	-	↓	n. u.	n. u.	n. u.
<b><i>Hirano Body</i></b>	div. Säugerzellen	+/-	n. u.	-	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.

Tab. 06 – Vergleich der verschiedenen Aktin-Aggregate durch den Nachweis beeinflusster physiologischer Eigenschaften

„+“ = vorhanden; „-“, = nicht vorhanden bzw. nimmt keinen Einfluss; „+/-“, = nur teilweise beobachtet;  
 „n. u.“ = nicht untersucht; „↓“ = reduziert/verlangsamt

Der unterschiedliche Anteil sequestrierter Proteine in den beschriebenen verschiedenen *Hirano Body*-ähnlichen Aggregaten macht es schwierig, entsprechende Zellen bezüglich deren physiologischer Beeinträchtigungen zu vergleichen. Es ist möglich, dass die

physiologischen Defekte mit Proteinakkumulationen in entsprechenden Aggregaten korrelieren.

Die VAM-Aggregate liegen stabil in den entsprechenden Zellen vor. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die in diesen Aggregaten sequestrierten Proteine der Zelle nicht zur Verfügung stehen. Folglich können die VAM-VASP-, VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Zellen mit entsprechenden Knockout-Mutanten oder Zellen, in denen entsprechende Proteine runter reguliert sind, verglichen werden.

Schon die VAM-VASP-Aggregate erweckten den Eindruck, dass die Sequestrierung diverser Aktin-interagierender Proteine zur Störung entsprechender Zellfunktionen führt (149). Beispielsweise wurden die negativ regulierten Prozesse der Zytokinese, der Pino- und der Phagozytose u. a. auf die teilweise Entfernung von Coronin aus dem endogenen Proteinpool zurückgeführt. Doch die Tatsache, dass, bis auf endogenes Filamin und  $\alpha$ -Actinin, keine weiteren Aktin-bindende Proteine in den VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate angehäuft sind, lässt Zweifel an der Theorie aufkommen. Schließlich sind die physiologischen Auswirkungen der VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate auf die Zelle vergleichbar mit denen der VAM-VASP-Aggregate. Teilweise haben erstere sogar erheblich gravierendere Defekte zur Folge.

Ein negativer Einfluss der in den VAM-Filamin- bzw. VAM- $\alpha$ -Actinin-Aggregaten sequestrierten endogenen Filamin- bzw.  $\alpha$ -Actinin-Proteine auf die Zellphysiologie ist fraglich. Grund dafür sind die unterschiedlichen Funktionen, die den Proteinen in Säuger- und *D. discoideum*-Zellen zukommen: Für embryonale Kükenzellen ist berichtet, dass Filamin notwendig für die Zellteilung ist (211). So liegt es teilweise angereichert in der Teilungsfurche vor, jedoch wurde das nur in 16 % der untersuchten Zellen beobachtet. Es gibt keine weiteren Referenzen, die das bestätigen oder in Frage stellen. Die Lokalisation von  $\alpha$ -Actinin in der Teilungsfurche von Säugern ist hingegen ausführlich beschrieben (212, 213). Während der Zytokinese dissoziiert  $\alpha$ -Actinin sukzessiv von der Teilungsfurche ab (213). Eine Überexpression des Proteins führt zu Inhibition der Teilung und damit zu multinukleären Zellen (213). Für *D. discoideum* gibt es keine derartigen Beobachtungen: Weder Filamin noch  $\alpha$ -Actinin sind in der Teilungsfurche angereichert (100). Filamin scheint jedoch indirekt Einfluss auf die Zytokinese von *D. discoideum* zu nehmen: GAPA spielt eine wichtige Rolle in der späten Phase der

Zytokinese (214). Die Deletion des GAPA-Proteins führt zu riesigen multinukleären Zellen. Die Überexpression von Filamin in GAPA-Knockout-Zellen kann diesen Zytokinesedefekt retten (215). Wie genau Filamin die Zytokinese reguliert, bedarf weiterer Forschung. Ein Einfluss von  $\alpha$ -Actinin auf die Zellteilung in *D. discoideum* ist nicht erforscht, folglich auch nicht auszuschließen. Die Kernanzahl in  $\alpha$ -Actinin-Knockout-Zellen, wie auch in Filamin-Knockout-Zellen von *D. discoideum* ist jedoch mit denen von AX2-Zellen vergleichbar (216).

Für Filamin-Knockout-Zellen gibt es kontroverse Aussagen, was den Einfluss auf die Phagozytose betrifft (217). Das beruht auf vergleichenden Untersuchungen von chemischen Mutanten zu Knockout-Zellen, die durch homologe Rekombination hergestellt worden. Jedoch zeigen weder Filamin-Knockout- noch  $\alpha$ -Actinin-Knockout-Zellen Beeinträchtigungen der Pinozytoserate, des Wachstum oder der Zellgröße (216). Letztere beiden Eigenschaften werden auch nicht durch Vacuolin-Deletionen beeinflusst (29). Jedoch ist es möglich, die verlangsamte Neutralisierung von Endosomen und der daraus resultierenden verzögerten Exozytose auf die vollständig akkumulierten Vacuolin-Proteine in den VAM-VASP-, den VAM- $\alpha$ -Actinin- und den VAM-Filamin-Aggregaten zu begründen. Schließlich zeigen VacuolinB-Knockout-Zellen Beeinträchtigungen in der Exozytose (29).

Zusammenfassend ist es zweifelhaft, dass die jeweilige molekulare Beschaffenheit der verschiedenen Aggregate die Ursache für die zahlreichen physiologischen Defekte ist. Es scheint plausibler, dass die Aggregate aufgrund ihrer immensen Größe einen negativen sterischen Einfluss auf die Zelle haben. Beispielsweise nehmen die VAM-VASP-, die VAM- $\alpha$ -Actinin- und die VAM-Filamin-Aggregate bis zu einem Drittel der Zelle ein. Damit sind die Reaktionsräume in den jeweiligen Zellen sehr stark eingeengt. Als Folge davon kann es zur Hemmung der Ausbildung von Teilungsfurchen, der Abschnürung von Endosomen, des Transport und der Fusion von Vesikel sowie der Abgabe von verdautem Material kommen. Ein weiteres Argument für die sterische Hinderung von Aggregaten in Zellen findet sich im Vergleich der CT-Myc- mit den VAM-VASP-Aggregaten: In den CT-Myc-Aggregaten, exprimiert in *D. discoideum*, liegt eine größere Varietät an sequestrierten Proteinen als in den VAM-VASP-Aggregaten vor (Tab. 05). Jedoch sind die beeinflussten physiologischen Vorgänge in den CT-Myc-Zellen geringer (Tab. 06).

Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass die physiologischen Defekte in den aggregathaltigen Zellen auf molekularer Ebene beeinflusst werden, indem die sequestrierten Proteine diese beispielsweise verstärken. So könnte die um 24 % beeinträchtigte Phagozytoserate der VAM-VASP-Zellen tatsächlich eine Folge von in den VAM-VASP-Aggregaten akkumulierten Proteinen sein, die an der Regulation der Phagozytose beteiligt sind.

Doch wodurch kommt es, dass die bisher vorgestellten Aktin-Aggregate in der Sequestrierung von Proteinen so variieren? Zum einen kann der Grund in der Verwendung der verschiedenen Modellorganismen (*D. discoideum*, div. Säugerzellen) liegen. Zum anderen ist es jedoch möglich, dass es einen Mechanismus gibt, wodurch die in Aggregaten akkumulierten, Aktin-bindenden Proteine entscheiden können, an welche Aktin-Filamente sie binden (179). Versuche mit isolierten Aktin-bindenden Domänen unterstützen die These der Selektivität: So zeigen die isolierten Calponin-Homologie-Domänen der  $\alpha$ -Actinin- und Filamin-Proteine identische Lokalisationen wie die jeweiligen Volllängeproteine in der Zelle (163). Folglich spielen die Aktin-bindenden CH-Domänen entscheidende Rollen in Bezug auf die zellulären Lokalisationen von  $\alpha$ -Actinin und Filamin. Dadurch lässt sich erklären, warum z. B. Myosin II, Talin und  $\alpha$ -Actinin nicht sowohl in den *Hirano Bodies* als auch in allen *Hirano Body*-ähnlichen Aggregaten angehäuft vorliegen (Tab. 05): Je nach Ursache der Aggregatausbildung und beteiligtem Protein kommt es zur Bündelung spezifischer Aktin-Filamente, die eine entsprechend unterschiedliche Sequestrierung von anderen Proteinen zur Folge hat.

### 5.3 Die ektopische Lokalisation ist wichtig aber nicht entscheidend für die Ausbildung der VAM-Aggregate

Was die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte gemein haben und worauf diese Arbeit basiert, sind die erzwungenen Fehllokalisationen von Proteinen innerhalb der Zelle. Dass die endosomalen Lokalisationen von VASP,  $\alpha$ -Actinin und Filamin für die Ausbildung entsprechender VAM-Aggregate von Bedeutung sind, zeigt sich darin, dass alleinige Überexpressionen von VASP,  $\alpha$ -Actinin und Filamin nicht zur Ausbildung derartiger Aggregate führen (65, 163).

Bisher bestand die Annahme, dass die spezifische Fusion von VASP an VacuolinA-Myc und der daraus folgenden Lokalisation an späte Endosomen ein essentieller Faktor in der Ursache der VAM-VASP-Aggregate ist (149). Durch die Bildung anderer Aggregate verliert diese Annahme jedoch an Bedeutung: Beispielsweise führt die Fusion von VASP an ALDH-Myc zu VAM-VASP-ähnlichen, kugeligen und Aktin-haltigen Aggregaten. Zwar handelt es sich bei den ALDH-Vesikeln um mittelspäte Endosomen, jedoch sind die ALDH-Myc-VASP-Aggregate, entgegen den VAM-VASP-Aggregaten, Vacuolin-frei (Abb. 11). Folglich spielt Vacuolin keine Rolle in der Aggregatbildung. Dass zudem die endosomale Lokalisation von VASP nicht entscheidend ist, zeigt u. a. die Fusion von VASP an SLB350: Die peroxisomale Lokalisation von VASP (SLB350-Myc-VASP) hat zwar keine einheitlich rundlichen, homogenen Aggregate zur Folge (Abb. 14), allerdings wird das Konstrukt im Vergleich zu VAM- und ALDH-VASP nur sehr schwach exprimiert (Abb. 63). Es ist anzunehmen, dass bei einer ähnlichen Expressionsstärke von SLB350-Myc-VASP wie bei VAM- oder ALDH-VASP, alle Peroxisomen in einer einzigen, aggregatähnlichen Struktur zusammenfinden würden. Gleiches gilt für die ektopische Lokalisation von VASP an *Lipid Droplets*: Die Lipidtröpfchen liegen in GFP-LSD-VASP-Zellen akkumuliert vor (Abb. 12). Dieser Phänotyp der verklumpten Organellen ist auch in AX2-Zellen, in denen kein Fusionsprotein exprimiert wird, zu beobachten, es ist aber anzunehmen, dass eine starke Expression von GFP-LSD-VASP zur Ausbildung eines homogenen Aggregats führen wird.

Ähnliches zeigt sich bei den Proteinen  $\alpha$ -Actinin und Filamin. Diese erzeugen, lokalisiert an die Oberfläche von Peroxisomen und *Lipid Droplets*, ebenfalls teilweise Verklumpungen der jeweiligen Organelle. Die Expressionen entsprechender Fusionsproteine sind sehr niedrig und mittels Western Blots kaum detektierbar (Vgl. Abb. 64-A und Abb. 65-A, am Beispiel von GFP-LSD- $\alpha$ -Actinin und SLB350-Myc-Filamin gezeigt). Ssj758 führt, lokalisiert an Peroxisomen (SLB350-Myc-Ssj758) und an *Lipid Droplets* (GFP-LSD-Ssj758) zu ähnlichen Phänotypen: Die Expression der Hybride haben die Organellenverklumpungen zur Folge (ohne Abb.). Die phänotypischen Auswirkungen von Ssj758 an späten bzw. mittelspäten Endosomen (Abb. 22 und 23) sind nicht so gravierend wie sie durch die jeweiligen Lokalisationen der Proteine VASP (Abb. 11),  $\alpha$ -Actinin oder Filamin (Abb. 25, 34, und 35) ausgelöst werden. Allerdings sind

die Expression von VAM-Ssj758 und von ALDH-Ssj758 im Vergleich zu den Expressionen der VAM- und ALDH-Fusionen mit VASP,  $\alpha$ -Actinin und Filamin sehr niedrig (Vgl. Abb. 63, 64-A, 65-B und 66).

Als wichtig zeigen sich diverse Eigenschaften der ektopisch lokalisierten Proteine. Nicht jedes Protein ist zur Aggregatbildung fähig. Beispielsweise lokalisiert WASP in der Fusion mit VacuolinA-Myc (VAM-WASP) zwar an späte Endosomen, jedoch erfolgt keine Verklumpung der Organellen (Abb. 21).

Die ektopische Lokalisation ist abhängig davon, wie stark die *Targeting*-Signale der Proteinanteile in einem Fusionsprotein sind. Das zeigt sich am Beispiel von  $\alpha$ -Actinin: In der Fusion des Proteins mit VacuolinA-Myc lokalisiert es an späten Endosomen und induziert dort eine Aggregatbildung (Abb. 25). Hingegen zeigt es in der Fusion mit ALDH (ALDH-Myc- $\alpha$ -Actinin), trotz einer stärkeren Proteinexpression (Abb. 64-A), keine entsprechende Lokalisation: ALDH-Myc- $\alpha$ -Actinin wird zur Zellmembran gezogen (Abb. 34).

C. Schmauch erstellte durch *in vivo-Targeting*-Versuche eine Hierarchie von Bindungsaffinitäten (148). Beispielsweise überwiegt die Lokalisation von VAM-Coronin im Zellkortex der Bindung an späte Endosomen. Folglich besitzt Coronin im Vergleich zu Vacuolin ein höheres *Targeting*-Potenzial (Abb. 52) (148).

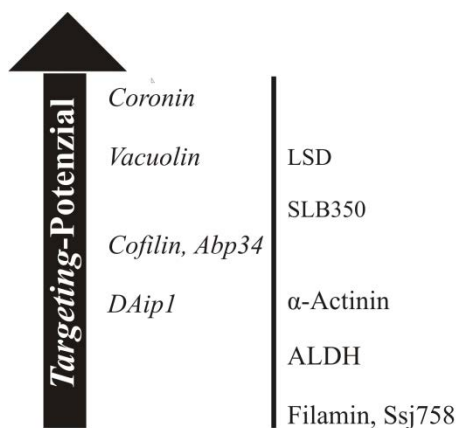


Abb. 52 – Hierarische Anordnung verschiedener Proteine, erweitert nach C. Schmauch (148)

Je nach *Targeting*-Stärke der Proteine in einem Proteinhybrid erfolgt die Lokalisation des Fusionsproteins entsprechend des Proteins mit dem stärkeren Lokalisationssignal. Die bereits von C. Schmauch eingeordneten Proteine (kursiv) werden durch die in dieser Arbeit verwendeten Proteine (normal) erweitert. Die Einordnung von LSD und SLB350 beruht u. a. auf Studien von P. Paschke (Uni Kassel, Daten nicht veröffentlicht). Da nicht zwischen den *Targeting*-Potenzialen der Proteine DAip1 und  $\alpha$ -Actinin unterschieden werden kann, sind beide auf ein Niveau gestellt.



Die Gemeinsamkeit der verschiedenen VASP-,  $\alpha$ -Actinin- und Filamin-Konstrukte besteht in den Lokalisationen der Proteine an verschiedene Organellenmembranen. Das jeweilige *Targeting* erfolgt mittels dem Zytoplasma zugewandten, peripher an den Endosomen, Peroxisomen und *Lipid Droplets* lokalisierten Proteinen. Fusionsproteine, in denen die Lokalisationssignale der *Target*-Proteine für bestimmte Organellen nicht stark genug sind, folgen dem anderen Bindungspartner im Hybrid: Beispielsweise lokalisieren ALDH-Myc- $\alpha$ -Actinin (Abb. 34), VAM-Ponticulin (-2TMD), VAM-Hisactophilin II oder VAM-Coactosin (Abb. 21) im Zellkortex bzw. an der Zellmembran. Organellen sind im zytoplasmatischen Raum beweglich. Das ermöglicht theoretisch die Interaktion von gleichen Fusionsproteinen, die auf verschiedenen Organellen lokalisiert sind. Als Folge kommt es zur Verklumpung von Endosomen, Peroxisomen oder *Lipid Droplets*. Ein entsprechender Kontakt zwischen Hybridproteinen, die ektopisch zur Plasmamembran dirigiert werden, ist dagegen nur bedingt möglich. Überdies erfolgt eine Reduzierung des 3D-Freiheitsgrads der Interaktion zwischen Proteinen an Organellen auf 2D zwischen Proteinen an der Plasmamembran. Ein Beispiel hierfür stellen die VAM-Abp34-Zellen dar: In nur wenigen Zellen, werden rundliche Aggregate ausgebildet (ohne Abb.). In anderen Zellen des gleichen Klons, die keine VAM-Abp34-Aggregate aufweisen, wird das Konstrukt lediglich an der Zellmembran lokalisiert (148). Ob Fusionen mit zytoplasmatischen Proteinen zu vergleichbaren Proteinaggregaten führen, wurde nicht untersucht, ist aber fraglich. Jedoch erweist sich das ektopische *Targeting* von Proteinen an Organellen als ein entscheidender Faktor in der Ausbildung von Aggregaten.

Letztlich führt die unnatürliche Positionierung eines Proteins in der Zelle zum Entzug des Proteins aus dessen wildtypischer, streng kontrollierter und regulierter Umgebung. Ein „molekularer Amoklauf“, resultierend in der Ausbildung der VAM-Aggregate, ist dadurch begünstigt.

## 5.4 Aktin wird aktiv in die VAM-VASP-Aggregate eingelagert

### 5.4.1 Die F-Aktin-Bindung allein reicht für die Ausbildung der VAM-VASP-Aggregate nicht aus

Bisher bestand die Theorie, dass neben Vacuolin A auch dem Aktin eine wichtige Rolle für die Bildung der kugeligen VAM-VASP-Aggregate zuteilwird (149). Zum einen

besteht die Möglichkeit, dass VAM-VASP bestehende Aktin-Filamente anreichert und bündelt, als Folge dessen sich die Aggregate ausbilden. Zum anderen ist durch die ektopische Lokalisation von VASP an späte Endosomen ein aktivierender Einfluss des Proteins auf den endosomal vorliegenden Arp2/3-Komplex möglich (148, 149). Die Folge sind *de novo* hergestellte Aktin-Filamente.

Begünstigt wird die Interaktion des endosomal lokalisierten VASP mit Arp2/3 und filamentösen Aktin durch die fehlende Regulation der Aktivität von VASP, der dieses Protein in seiner natürlichen Umgebung in der Zelle unterstellt ist. Nimmt man beispielsweise an, dass VAM-VASP stimulierend auf den Arp2/3-Komplex wirkt, so ist es möglich, dass nicht verwertbare Mengen an Aktin-Filamenten hergestellt werden. Die Bindung der Filamente durch VAM-VASP und die Anreicherung weiterer Aktin-interagierender und Aktin-modifizierender Proteine führt zur Bündelung und zur Verknüpfung des F-Aktins. Es resultieren der Aufbau und die Stabilität der VAM-VASP-Aggregate.

Die Aktin-Akkumulation der VAM-VASP-Aggregate sowie der verklumpten Peroxisomen und *Lipid Droplets*, hervorgerufen durch VAM-VASP, SLB350-Myc-VASP und GFP-LSD-VASP, beruht nicht auf einem Zusammenspiel verschiedener Ursachen, sondern ist einzig und allein auf das jeweils ektopisch lokalisierte Protein VASP zurückzuführen. Schließlich weisen Peroxisomen und *Lipid Droplets* unter wildtypischen Bedingungen keine Aktin-Anlagerungen auf. Folglich sind dort weder der Arp2/3-Komplex noch andere Aktin-interagierende Proteine, die durch VASP beeinflusst oder stimuliert werden können, zu erwarten. Also ist die Ausbildung von Aktin-haltigen Aggregaten nicht von Aktin-positiven Membranoberflächen abhängig.

Die Wichtigkeit von Aktin für eine Aggregatbildung wurde im Rahmen dieser Arbeit durch zwei verschiedene Teilversuche verworfen: Erstens ist trotz entfernter FAB-Domäne die Ausbildung von, wenn auch nur punktförmigen, VAM-VASP $\Delta$ FABstr<sup>VASP-KO</sup>-Aktin-Aggregaten möglich (Abb. 16). Durch die Deletion der F-Aktin-bindenden Domäne und der damit fehlenden Fähigkeit zur Aktin-Bündelung wurde das Ausbleiben von Aktin-Aggregaten erwartet. Zweitens ist an dieser Stelle erneut auf die ektopisch Lokalisation von  $\alpha$ -Actinin und Filamin mittels VacuolinA-Myc an die späten Endosomen zu verweisen. Sowohl VAM- $\alpha$ -Actinin als auch VAM-Filamin induzieren

kugelige, homogene Aggregate, jedoch liegt in diesen kein angehäuften Aktin vor. Die Aktin-Filamente und deren Vernetzung durch entsprechende Bindungspartner sind also nicht notwendig für den Aufbau kugeliger Aggregate in der Zelle.

Des Weiteren entsprechen die Einflüsse auf die Zelle, die durch die Aktin-freien VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Aggregate entstehen, denen, die durch die Aktin-haltigen VAM-VASP-Aggregate herbeigeführt werden. Darin zeigt sich, dass die Sequestrierung von Aktin in letztere keinen sonderlichen Defekt der VAM-VASP-Zelle zur Folge hat. Es bleibt die Frage, warum sich die VAM-Aggregate in ihrem Aktin-Gehalt so drastisch unterscheiden.

#### 5.4.2 Die Aktin-Akkumulation erfolgt aufgrund neu polymerisierter Aktin-Filamente

Die VAM-VASP-Zellen weisen im Vergleich zu AX2 einen erhöhten Anteil an F-Aktin auf, wohingegen die Menge an G-Aktin wildtypisches Niveau zeigt (148). Aktin wird in diesen Mutanten folglich verstärkt polymerisiert und zu Filamenten aufgebaut. Der dadurch schrumpfende G-Aktin-Pool wird vermutlich durch eine hoch regulierte Expression von Aktin-Genen in der Zelle ausgeglichen (148).

Die Aktin-Sequestrierung in den VAM-VASP-Aggregaten kann zum einen von bereits aufgebauten Aktin-Filamenten, wie sie z. B. als Aktin-*Coat* um die späten Endosomen zu finden sind, erfolgen. Zum anderen besteht die Möglichkeit dass die Aktin-Filamente *de novo* polymerisiert und direkt in die kugeligen Aggregate eingebaut werden. Die Akkumulation von existierenden Aktin-Filamenten ist eher fraglich: In diesem Fall wird zwar eine Aktin-bindende Fähigkeit von Proteinen vorausgesetzt. Eine derartige Bindung ist jedoch sowohl bei VASP als auch bei  $\alpha$ -Actinin und Filamin gegeben. Dennoch resultiert die endosomale Lokalisation von  $\alpha$ -Actinin und Filamin nicht in Aktin-haltigen Aggregaten.

Die *de novo*-Polymerisation von Aktin-Filamenten erscheint dagegen möglich. Im Unterschied zu  $\alpha$ -Actinin und Filamin wird für VASP eine Aktin-polymerisierende Fähigkeit diskutiert. Diese kann auf der Initiierung eines neuen Aktin-Filaments (Nukleation) oder auf der Elongation eines bereits bestehenden Nukleationskeims basieren.

Die Nukleation von Aktin-Filamenten ist mittels des *in vitro* Pyren-Aktin-Polymerisations-*Assays* für Ena/VASP-Proteine verschiedener Organismen beschrieben (73, 218, 219). Der *Assay* ermöglicht die Messung der Aktin-Polymerisation, deren Fluoreszenz steigt, wenn pyrengekoppeltes G-Aktin in Filamente inkorporiert wird. Nachteilig ist jedoch, dass durch den *Assay* die Prozesse der Aktin-Nukleation, der Aktin-Elongation und der Aktin-Verzweigung, die alle steigende Fluoreszenzsignale zur Folge haben, nicht voneinander unterschieden werden (220). Zudem basiert die beobachtete Nukleationsfähigkeit der Ena/VASP-Proteine auf Untersuchungen unter sub-physiologischen Salzkonzentrationen ( $\leq 50$  mM) (221). Unter physiologischen Salzkonzentrationen kann beispielsweise murines VASP keine Aktin-Polymerisation starten (77, 219). Folglich erweist sich die *in vitro*-Nukleationsfähigkeit von Ena/VASP-Proteinen als nicht relevant. Das Säugerprotein EVL ist eine Ausnahme: Dieses Protein ist fähig, unter physiologischen Salzkonzentrationen eine Aktin-Polymerisation zu starten (222).

Einige *in vivo*-Versuche widerlegen ebenfalls eine mögliche Nukleationsfähigkeit der Ena/VASP-Proteine. Wird murines VASP an Mitochondrien in Rat2-Zellen ektopisch lokalisiert, so sind keine Aktin-Anlagerungen an diese Organellen zu beobachten (223). Die mitochondriale Lokalisation ist durch ActA erreicht, einem Protein des gram-positiven Bakteriums *Listeria monocytogenes*: Der C-Terminus von ActA bindet über die prolinreiche Region das Protein VASP, der N-Terminus interagiert mit dem Proteinkomplex Arp2/3 (223). Ähnliche Ergebnisse sind für verschiedene mutierte ActA-Formen gezeigt: Diese binden die Proteine Mena oder *hVASP*, jedoch sind die ActA-Proteine nicht fähig, zusätzlich den Arp2/3-Komplex zu rekrutieren (224, 225). In keinem Fall zeigten sich Aktin-Anhäufungen oder ähnliche Beobachtungen. Daraus ergibt sich zunächst die Schlussfolgerung, dass die Aktin-Rekrutierungen unter *in vivo*-Bedingungen nicht durch VASP sondern durch den Arp2/3-Komplex vollzogen werden (224).

Andere Versuche unterstützen hingegen die Fähigkeit der Ena/VASP-Proteine, Aktin-Polymerisierungen zu initiieren: Wird das humane Protein Zyxin *in vivo* an Mitochondrien von HeLa-Zellen lokalisiert, so kommt es in Abhängigkeit von *hVASP* zu einer Aktin-Lokalisation an diesen Organellen (226). Der Arp2/3-Komplexes liegt hingegen nicht an den Aktin-positiven Mitochondrien vor. Der N-terminale Bereich von

Zyxin zeigt eine vergleichbare Aktivität mit der prolinreichen Domäne von ActA, d. h., es bindet VASP (226). Dass es sich in diesem Versuch um *de novo* polymerisierte Aktin-Filamente handelt, ist durch die Fluoreszenz des F-Aktins bewiesen: Die Fluoreszenz basiert auf dem Einbau von Rhodamin-markierten Aktin-Monomeren (226). Jedoch kann nicht geklärt werden, ob die VASP-abhängige Aktin-Polymerisation durch die Nukleation neuer oder durch das *Uncapping* von bereits existierenden Aktin-Filamenten verursacht wird (226).

Auch die Bindung des C-terminalen Bereiches von ActA an Polystyrol-Kügelchen in zellfreien Extrakten (*in vitro*) führt zum Aufbau von ektopisch lokalisierten Aktin-Filamenten an diesen Kügelchen (226). Der Arp2/3-Komplex ist in diesem Fall ebenfalls nicht anwesend.

Aus den bisher beschriebenen Beispielen wird ersichtlich, dass die Proteine innerhalb der Ena/VASP-Familie nur bedingt miteinander vergleichbar sind. Andererseits kann auch die Verwendung verschiedener Systeme, Methoden etc. die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Nukleationsfähigkeit von Ena/VASP zur Folge haben. Aufgrund der schwachen und widersprüchlichen Ergebnisse kann dem für uns interessanten Protein *DdVASP* jedoch keine Fähigkeit als eigenständiger Nukleator zugeschrieben werden.

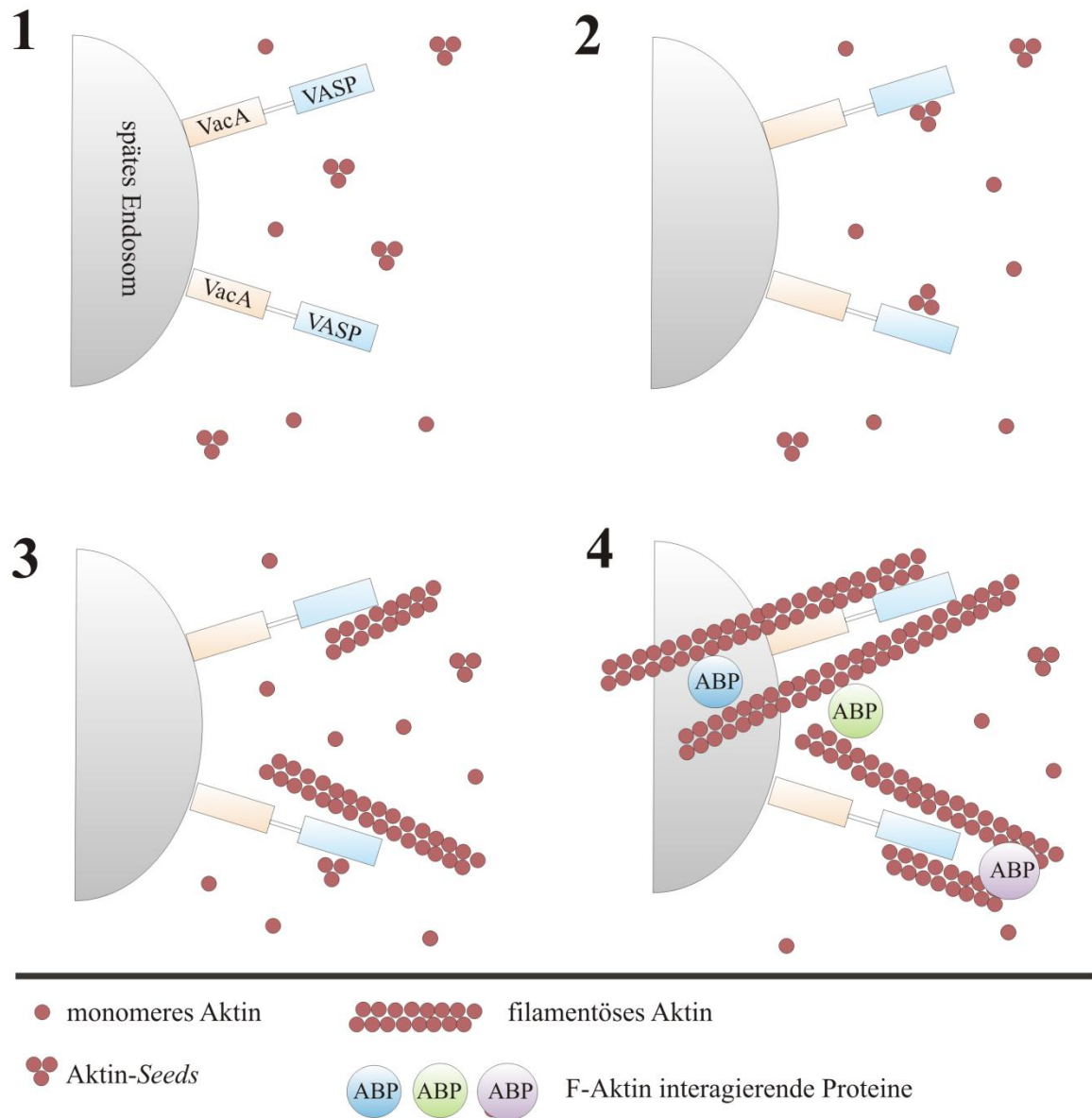
Die Möglichkeit, dass Ena/VASP Einfluss auf die Elongation von bestehenden Filamenten nimmt, wird dadurch jedoch nicht in Frage gestellt. Schon Trichet *et al.* äußerten den Gedanken, dass Ena/VASP Aktin-*Seeds* aus dem Zytosol rekrutiert und deren Elongationen aktiv beeinflusst (220).

Je nach Versuchsaufbau ergeben sich unterschiedliche Aussagen. Einige Studien beschreiben durch die Verwendung des Pyren-Aktin-Polymerisations-*Assay* keine bzw. nur sehr geringe Ena/VASP-abhängige Elongationseffekte (77, 227). Diese Versuche sind unter physiologischen Salzkonzentrationen durchgeführt worden, um umstrittene Nukleationseffekte von VASP zu vermeiden. Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF)-Studien führen zu kontroversen Ergebnissen. TIRF ermöglicht durch die direkte Beobachtung der Ausbildung von einzelnen Aktin-Filamenten konkrete Aussagen bezüglich der Aktin-Polymerisation (221). Diese Methode ist folglich gegenüber dem Pyren-Aktin-Polymerisations-*Assay* von Vorteil. So zeigt murines VASP keinen Einfluss auf die Veränderung der Länge von Aktin-Filamenten, wohingegen sowohl *hVASP* als

auch *DdVASP* deutlich die Filamentelongation beschleunigen (228, 229). Allerdings steigert *hVASP* die Aktin-Polymerisation gerade mal um das zweifache, wohingegen *DdVASP* eine fast achtfache Steigerung erreicht (230). Aus neuesten Versuchen mit VASP-Chimeren geht hervor, dass diese Unterschiede auf einen auf Affinität basierenden Mechanismus zurückzuführen sind (230): *hVASP*, dessen GAB-Domäne durch die von *D. discoideum* ausgetauscht ist, resultierend in *hVASPDdGAB*, ist im Vergleich zum wildtypischen *hVASP* zu einer vier- bis fünffachen Steigerung der Elongationsrate der Aktin-Filamente fähig. Dieser Effekt ist in der viel höheren Affinität von *DdGAB* für G-Aktin begründet (230). Daraus wird deutlich, dass die Elongationsrate der Aktin-Filamente von der direkten Bindung und Inkorporation von monomeren Aktin in die Filamente durch GAB resultiert (230).

Kontroverse Aussagen gibt es auch bezüglich des Einflusses von Profilin. So gibt es Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass die Polymerisation von F-Aktin von Profilin-Aktin abhängig ist bzw. durch diese begünstigt wird (77, 78, 228, 231). Andere beobachten hingegen keinen positiven Einfluss von Profilin (229). Die widersprüchlichen Aussagen beruhen zum einen auf den unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine innerhalb der Ena/VASP-Familie und zum anderen auf die verschiedenen Salzkonzentrationen in den verwendeten Puffern. Letzteres wird durch TIRF-Studien bestätigt: So zeigte sich bei niedrigem Ionengehalt der Puffer, dass *hVASP* die Polymerisation von Aktin-Filamenten beschleunigt, unabhängig davon, ob Profilin anwesend ist oder nicht (232). Unter höheren Ionenkonzentrationen wird die Filamentelongation nur im Beisein von Profilin-Aktin erreicht. Ist Aktin allein vorliegend, bleibt die Elongation von F-Aktin aus (232). Begründet werden die Beobachtungen auf unterschiedlichen Bindungsarten: Die Interaktion zwischen monomerem Aktin und der GAB-Domäne beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen, wohingegen Profilin die prolinreiche Domäne durch hydrophobe Wechselwirkungen bindet (233). Die Affinität zwischen Profilin und Aktin ist ebenfalls salzunabhängig (234). Zudem liegt in amöboiden Zellen das zelluläre G-Aktin durch Profilin gebunden vor (235, 236). Folglich ist die salzunabhängige F-Aktin-Polymerisationsaktivität von Ena/VASP in der Präsenz von Profilin-Aktin von größerer physiologischer Relevanz (232).

Bewiesen ist, dass Ena/VASP fähig ist, die Elongation von Aktin-Filamenten voranzutreiben. Aus dieser Tatsache ergibt sich folgende Theorie für den *DdVASP*-abhängigen Aktin-Gehalt der VAM-VASP-Aggregate und der aggregierten Peroxisomen



**Abb. 53 – Schematische Darstellung der Theorie zur VASP-abhängigen ektopischen Lokalisation von F-Aktin am Beispiel später Endosomen**

Die ektopische Lokalisation von VASP an späte Endosomen mittels des Proteins Vacuolin A (VacA) [#1] führt zur Rekrutierung von Aktin-Seeds an dieses Organell [#2]. Der weitere Einbau von monomerem Aktin führt zur Bildung langer Filamente [#3], die durch andere F-Aktin-bindende Proteine gebunden und zum stabilen Aufbau der VAM-VASP-Aggregate führen. Die detaillierte Beschreibung der Abbildung ist unter Punkt 5.4.2 beschrieben.

und *Lipid Droplets* (Modell: Abb. 53): Unabhängig von der Organellenoberfläche, an die *DdVASP* ektopisch lokalisiert wird [#1], bindet das Protein, vermittelt durch die FAB-Domäne, existierende Aktin-*Seeds* aus dem Zytosol [#2]. *DdVASP* vermittelt die Elongation der Aktin-*Seeds*, indem es monomeres Aktin aus dem Zytosol den Aktin-*Seeds* anfügt. Es kommt zum Aufbau von Aktin-Filamenten [#3]. Durch die Fähigkeit von *DdVASP*, F-Aktin zu bündeln, werden die neu polymerisierten Aktin-Filamente zusammengehalten und durch die Sequestrierung weiterer Aktin-bindender Proteine vernetzt [#4]. Der Aufbau des VAM-VASP-Aktin-Aggregats ist die Folge.

#### 5.4.3 Die GAB-Domäne vermittelt die Aktin-Polymerisation

Einen Unterschied zu den VAM-VASP-Zellen zeigen die VASP-Knockout-Mutanten, in denen VAM-VASP $\Delta$ GAB exprimiert wird. Durch das Fehlen der G-Aktin-bindenden Domäne werden zwar VAM-VASP $\Delta$ GAB<sup>VASP-KO</sup>-Aggregate ausgebildet, jedoch ist deren Aktin-Gehalt im Vergleich zu den VAM-VASP-Aggregaten (148) teilweise deutlich verringert (Abb. 20).

Wie das soeben unter Punkt 5.4.2 beschriebene VASP-Chimeren-Experiment (*hVASPDdGAB*) zeigt, kommt der GAB-Domäne eine wichtige Funktion in der Polymerisation von F-Aktin zu (230). Die Deletion der GAB-Domäne in murinem VASP unterstützt diese Annahme (76): Die Inkorporation von monomeren Aktin in das durch murines VASP gebundene Aktin-Filament ist verhindert. Ursache scheint die Folge eines gehemmten Transfers von G-Aktin aus dem Profilin-Aktin-Komplex an die *plus*-Enden der Aktin-Filamente zu sein (72, 78). Weitere Studien belegen ebenfalls am Beispiel von murinem VASP, dass die GAB-Domäne sogar essentiell für die stabile Bindung von Ena/VASP an Aktin-Filamente ist (80). Allerdings spricht eine Expression von *DdVASP* $\Delta$ GAB in VASP-Knockout-Zellen gegen einen positiven Einfluss der GAB-Domäne (229): Das mutierte Protein ist fähig an Aktin-Filamente in Filopodien spitzen zu binden und deren Elongation zu unterstützen. Ein anderes Beispiel zeigt, dass die *in vitro*-Bindung von murinem VASP an die *plus*-Enden von F-Aktin unabhängig sowohl von der GAB- als auch von der FAB-Domäne ist (228). Jedoch können diese kontroversen Aussagen wieder auf der Problematik der unterschiedlich verwendeten Salzkonzentration beruhen.



Aktuelle *in vitro*-Studien, durchgeführt mit TIRF, sprechen für die Wichtigkeit der GAB-Domäne (232): So verhindern Mutationen in der GAB- aber auch in der FAB-Domäne von *hVASP* Aktin-abhängige Lokalisationen, wohingegen erstere zusätzlich die Affinität von *hVASP* für G-Aktin reduzieren (Modell: Abb. 54) (232).

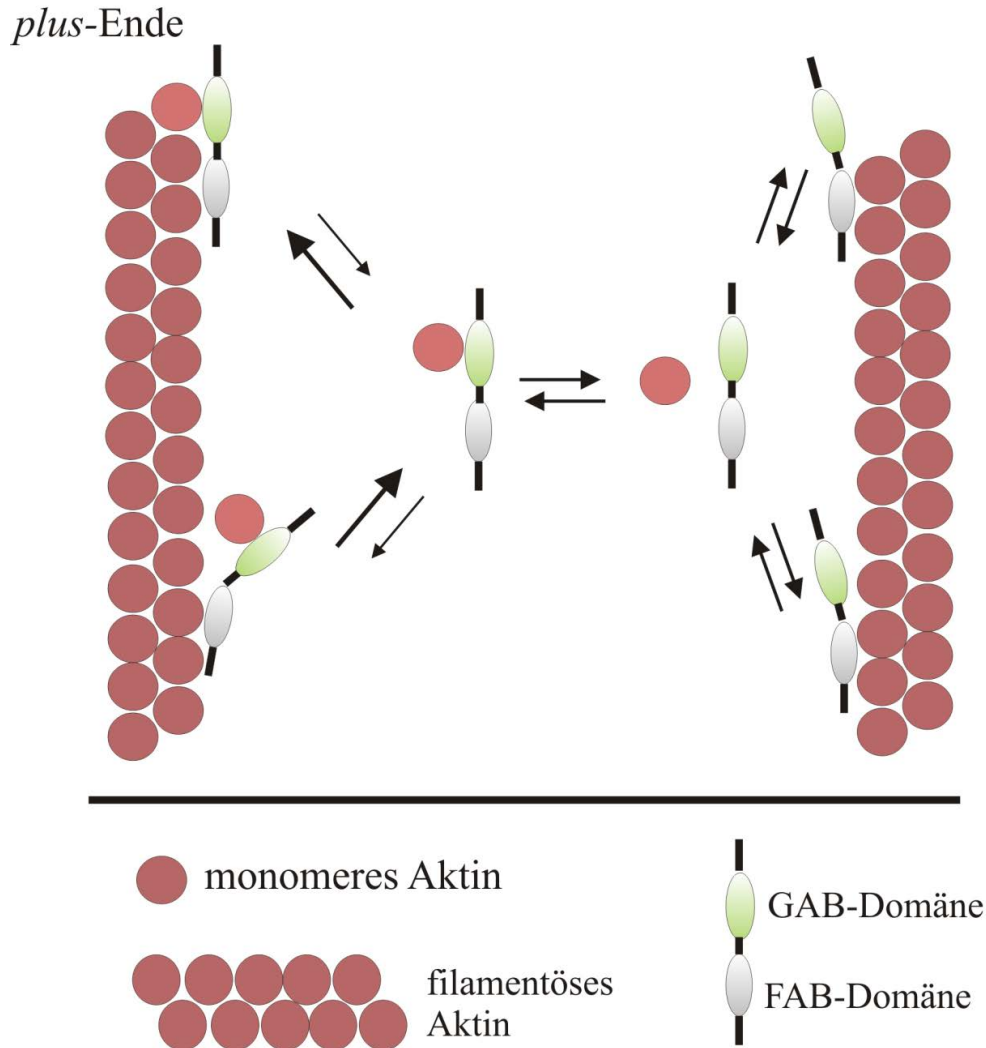


Abb. 54 – Schematische Darstellung der Theorie bezüglich der GAB-abhängigen Aktin-Polymerisation (verändert nach (232))

Ist kein monomeres Aktin verfügbar (rechte Seite), so bindet Ena/VASP gleichermaßen entlang der Seite wie auch an das *plus*-Ende eines Aktin-Filaments. In Anwesenheit von monomeren Aktin und der daraus resultierenden Bindung von G-Aktin an die GAB-Domäne (linke Seite) wird die Ena/VASP-Bindung an das Aktin-Filament geschwächt. Erst durch die Lokalisation des Proteins an das *plus*-Ende, wo das gebundene G-Aktin ins Filament inkorporiert werden kann, wird die Ena/VASP-Aktin-Filament-Interaktion wieder unterstützt. Die frei werdende GAB-Domäne bindet neues G-Aktin und setzt so die Polymerisation des Aktin-Filaments fort. Die Reaktionen, die durch die dicken Pfeile gekennzeichnet sind, geschehen bevorzugt.

In Bezug auf die vorliegende Arbeit ist es möglich, dass die niedrigen Aktin-Akkumulationen in VAM-VASP $\Delta$ GAB<sup>VASP-KO</sup>-Aggregaten auf der deletierten GAB-Domäne basiert. So besteht die Möglichkeit, dass VAM-VASP $\Delta$ GAB<sup>VASP-KO</sup> zwar Aktin-*Seeds* jedoch kein monomeres Aktin binden kann. Die Polymerisation von Aktin-Filamenten bleibt aus und die schwache Aktin-Färbung der VAM-VASP $\Delta$ GAB<sup>VASP-KO</sup>-Aggregate (Abb. 20) beruht auf den gebundenen und damit markierten Aktin-*Seeds*. Folglich ist ein den VAM-VASP-Zellen entsprechend erhöhter F-Aktin-Anteil in den VAM-VASP $\Delta$ GAB<sup>VASP-KO</sup>-Zellen nicht zu erwarten.

Weder für  $\alpha$ -Actinin noch für Filamin sind zur GAB-Domäne von VASP vergleichbare Motive beschrieben. Ein Einfluss von  $\alpha$ -Actinin und Filamin auf die Elongation von Aktin-Filamenten ist damit auszuschließen.

### 5.5 Ektopisch lokalisierte, zur Oligomerisierung fähige Proteine führen zur Aggregatbildung

Eine weitere Eigenschaft, die die Proteine VASP,  $\alpha$ -Actinin und Filamin gemein haben und die bisher außer Acht gelassen wurde, ist die Möglichkeit der Proteine, Oligomere zu bilden. Werden die Proteine VASP,  $\alpha$ -Actinin oder Filamin in Fusion mit VacuolinA-Myc durch die Deletionen oligomerisierender Domänen in ihrer Komplexbildung inhibiert, so wird die Ausbildung von VAM- und Aggresomen-ähnlichen Aggregaten verhindert: Die Expressionen von VAM-VASP $\Delta$ TETRA und VAM-Filamin $\Delta$ Oligo führen in der Zelle lediglich zur Markierung von späten Endosomen (Abb. 17 und 41). Die Expression von VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo reduziert die Ausbildung von Aggregate im Vergleich zu VAM- $\alpha$ -Actinin um immerhin um  $\sim 70\%$  (Ergebnisse: 4.3.5). Das zeigt, dass der Eigenschaft von Proteinen, Homooligomere bilden zu können, eine entscheidende Rolle in der Ausbildung von Proteinaggregaten zukommt.

Die Oligomerisierung von Fusionsproteinen ist abhängig von der Reihenfolge der fusionierten Proteine im Hybrid. Das zeigt die Expression des in meiner Diplomarbeit verwendeten Konstrukts Myc-VASP-VacuolinB (149): Das Hybrid lokalisiert an späte Endosomen, jedoch führt das, trotz der mit VAM-VASP vergleichbaren Expression, lediglich zur *Clusterung* der späten Endosomen (Abb. 10) (149). Vermutlich wird die Tetramerisierungsdomäne von VASP durch die C-terminale Fusion von Vacuolin sterisch

beeinträchtigt. Die Interaktion von Myc-VASP-VacuolinB mit anderen VASP-Molekülen ist beeinträchtigt und der Oligomerisierungsgrad reduziert. Die späten Endosomen werden nicht so stark vernetzt, dass daraus der Aufbau eines homogenen Myc-VASP-VacuolinB-Aggregats resultieren kann. Daraus folgt, dass Vacuolin trotz eines *Coiled-Coil*-Motivs nicht fähig ist, die Ausbildung derartiger Aggregate zu induzieren. Anzumerken ist, dass das Vacuolin-Protein keiner ektopischen Lokalisation unterliegt.

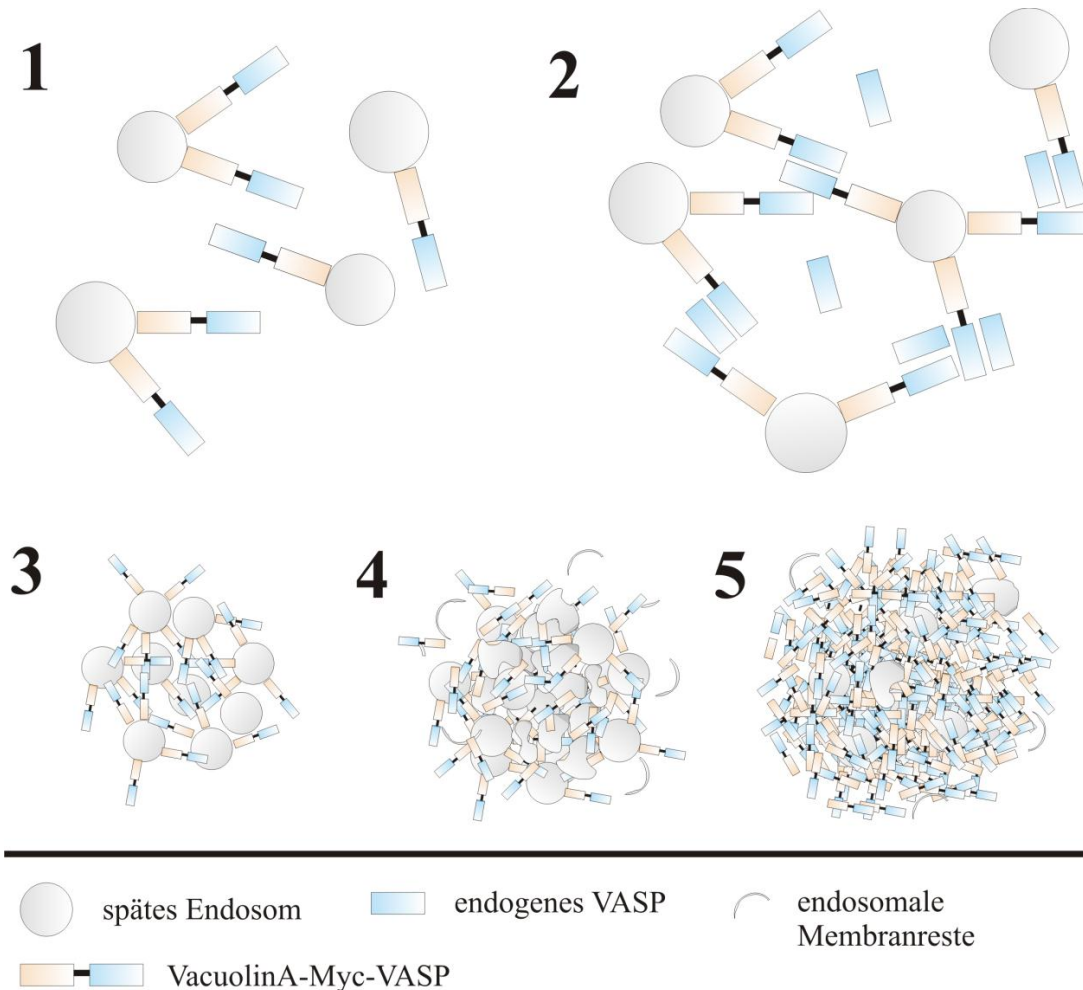
### 5.5.1 Von mehreren Organellen zu einem einzigen Aggregat

Davis *et al.* sprechen bei der Entwicklung der CT-Myc-Aggregate in Säugerzellen von Intermediaten, also von vielen kleinen Aggregaten, die sich über die Zeit zusammenschließen und sich in einem einzigen kugeligen und geordneten Aggregat rearrangieren (170). Ähnliches zeigt sich bei den CT-Myc-Aggregaten in *D. discoideum*: Unter der Verwendung eines UV-abhängigen induzierbaren Systems ist die Ausbildung eines einzigen, runden Aggregats aus dem Zusammenschluss vieler kleiner im Zeitraum von 3 h zu beobachten (237). C. Schmauch unterstützt diese Theorie, wobei er vermutet, dass im Fall der VAM-VASP-Aggregate die Zwischenformen auf akkumulierten Endosomen beruhen (148). Diese Annahme basiert auf Beobachtungen des schwachen VAM-VASP-Expriemierers B-21 (Abb. 71-B) (148): Die Endosomen dieses Klons unterliegen einer *Cluster*-Bildung. Jedoch zeigen die mikroskopischen Aufnahmen eines vergleichbar schwachen, Tetrazyklin-abhängigen VAM-VASP-Expriemierers (Klon 424/VVI, Abb. 71-A) keine derart verklumpten Organellen: Schon nach kürzester Zeit nach Beginn der Expression von VAM-VASP in der Zelle sind solide VAM-VASP-Aggregate zu erkennen, die sich mit der Zeit zusammenschließen und an Masse zunehmen (Abb. 32).

In VAM-Filamin-Zellen führen die anfänglich niedrigen Expressionen im Tetrazyklin-abhängigen Entwicklungsversuch ebenso zu parallel vorkommenden, kleinen VAM-Filamin-Aggregaten (Abb. 32). Diese Aggregate lagern sich über die Zeit, mit steigender Expression zu einer rundlichen Aggresomen-ähnlichen Struktur zusammen (Abb. 32).

Bezüglich der Aggresomen geht man zwar hauptsächlich von einer polymeren Struktur aus, die durch die ständige Akkumulation nicht korrekt gefalteter Proteinmonomere

wächst (202). Die mögliche Ausbildung vieler kleiner Aggregate, die sich über die Zeit zu einem Einzigem formieren, ist jedoch nicht ausgeschlossen (202).



**Abb. 55 – Schematische Darstellung der „Oligomerisierungstheorie“ am Beispiel von VAM-VASP**

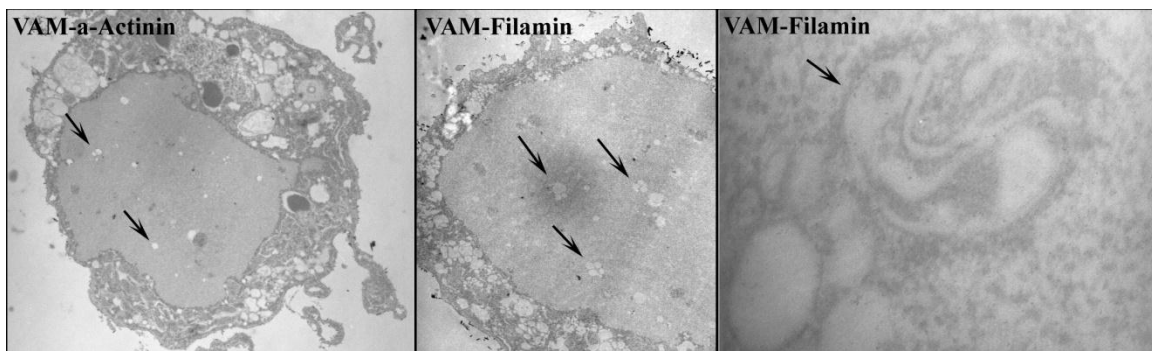
Da VAM-VASP zunächst an den späten Endosomen lokalisiert vorliegt [#1], kann es zur Komplexbildung sowohl zwischen Hybriden eines Endosoms als auch zwischen Hybriden verschiedener Endosomen kommen [#2]. Letztere führt zu engen Kontakt der Organellen [#3]. Das wiederum kann sich in der Kraft spiegeln, die durch die Oligomerisierung von VAM-VASP auf die Endosomen einwirkt: Werden die Organellen auf engsten Raum zusammengebracht, so ist vorstellbar, dass parallel zum steigendem Oligomerisierungsgrad von VAM-VASP die auf die Endosomen einwirkende Kraft so groß wird, dass als Folge davon die Organellen deformiert und schließlich zerstört werden [#4]. Zurück bleiben die VAM-VASP-Fusionsproteine in Form des VAM-VASP-Aggregates [#5]. Eine detaillierte Beschreibung ist unter Punkt 5.5.1. zu finden. Die in den VAM-VASP-Aggregaten sequestrierten Aktin-Filamente und Aktin-interagierende Proteine wurden zur Vereinfachung der Darstellung nicht eingezeichnet.

Sowohl in den VAM-VASP- als auch in den VAM-Filamin-Zellen nimmt parallel zur Ausbildung der VAM-Aggregate die Anzahl an Vacuolin-positiven Endosomen deutlich ab (Abb. 32). Das lässt keinen Zweifel daran, dass die späten Endosomen zugunsten der

kugeligen VAM-Aggregate verschwinden. Doch was genau passiert mit den Endosomen? Die VAM-Aggregate sind kaum von Membranen durchzogen oder ummantelt, die auf Endosomen als Entstehungsursprung hindeuten. Und was ist der auslösende Faktor, der bewirkt, dass sich aus den Endosomen entweder ein homogenes Aggregat ausbildet oder diese nur einer *Clusterung* unterliegen?

Der Expressionsvergleich der beiden VAM-VASP-Klone B-21 und 2B-1 (Abb. 71-B) lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Menge an exprimierten Fusionsproteinen in der Zelle entscheidend ist. Daraus ergibt sich eine Abhängigkeit vom Oligomerisierungsgrad der Hybride, denn schließlich agiert beispielsweise das Protein VASP als Tetramer (Abb. 55) (74): Je mehr Protein exprimiert wird, desto größer wird die mögliche Anzahl entsprechender Proteininteraktionen. So können die VAM-VASP-Proteine, lokalisiert an unterschiedlichen späten Endosomen [#1], miteinander interagieren, was die Verklumpung der Endosomen zur Folge hat [#2]. Mit steigender Menge an VAM-VASP in der Zelle, nimmt die mögliche Komplexbildung des Fusionsproteins zu [#3]: Die endosomale *Clusterung* wird fortgesetzt, welche schließlich in der Zerstörung der Organellen [#4] und daraus folgend in der Entstehung des VAM-VASP-Aggregates mündet [#5]. Das Modell der „Oligomerisierungstheorie“ ist gleichermaßen auf die Fusionsproteine VAM- $\alpha$ -Actinin und VAM-Filamin zutreffend (Abb. 55).

Einige TEM-Aufnahmen unterstützen die These der „Oligomerisierungstheorie“ (Abb. 56): Sie zeigen in den riesigen VAM-Aggregaten vesikuläre Einschlüsse, von denen einige auffällig deformiert sind (Pfeile in Abb. 56).



**Abb. 56 – Vesikuläre Einschlüsse in den kugeligen Aggregaten**

Gezeigt sind Aufnahmen von Zellen des VAM-Filamin-Klons 648-23 und des VAM- $\alpha$ -Actinin-Klons 682II2. Die Pfeile markieren vesikuläre Strukturen, die höchstwahrscheinlich auf eingeschlossene Endosomen zurückzuführen sind. Das rechte Bild zeigt zudem deutlich die Deformation von membranösen Organellen. Bildgrößen: linke Aufnahme: 23  $\mu\text{m}$ ; mittlere Aufnahme: 13  $\mu\text{m}$ ; rechte Aufnahme: 1  $\mu\text{m}$

Die Membranstücke, die aus der Zerstörung der Endosomen resultieren, können zum Teil verteilt in den VAM-Aggregaten vorliegen oder werden womöglich aus den VAM-Aggregaten verdrängt und degradiert. Gleiches könnte für die Aktin-Filamente des Aktin-*Coat* beteiligter Endosomen gelten, die durch die Zerstörung der Organellen ebenfalls fragmentiert werden. Die Fusionskonstrukte bleiben hingegen komplexiert im Verbund zurück, was im Aufbau der recht homogenen VAM-Aggregate mündet.

Die in den VAM-Aggregaten nachgewiesenen Ubiquitin-Signale gehen höchstwahrscheinlich einzig und allein auf die VAM-Fusionsproteine zurück: Die ubiquitinäre Markierung der VAM-Proteine könnte bereits im Anschluss an deren Translation erfolgen. Schließlich handelt es sich bei den Hybriden um unnatürliche Proteine, die von der Zelle als solches erkannt und degradiert werden könnten. Da die Degradationsmaschinerie der Zelle jedoch aufgrund der kontinuierlichen Expression der Hybride überfordert ist, erfolgt die Aggregation der Ubiquitin-markierten VAM-Konstrukte.

Logischerweise wird sich der Großteil an Interaktionen zwischen den VAM-Proteinen aus räumlichen Gründen hauptsächlich zwischen den Molekülen des gleichen Endosoms abspielen. Allerdings steigt mit zunehmender Anzahl der VAM-Proteine auch die Wahrscheinlichkeit der interorganellen Kontakte. Theoretisch könnten im Fall von einem einzigen VASP-Molekül vier verschiedene Endosomen geclustert werden. Bezüglich  $\alpha$ -Actinin und Filamin jeweils zwei und im Fall von Vacuolin mindestens drei Endosomen. Die Lokalisation von VASP,  $\alpha$ -Actinin und Filamin an Peroxisomen und *Lipid Droplets* führt nur zur Verklumpung der Organellen, einige liegen noch einzeln in der Zelle vor. Die SLB350- und die LSD-Konstrukte werden nur sehr schwach in der Zelle exprimiert (Abb. 63 (beide VASP-Konstrukte), 64-A (GFP-LSD- $\alpha$ -Actinin) und 65-A (SLB350-Myc-Filamin)). Die Proteinmengen reichen wahrscheinlich nicht aus, um einen derart starken Vernetzungsgrad der verschiedenen Organellen zu forcieren, dass es zur deren Zerstörung kommt: Sowohl die Peroxisomen als auch die *Lipid Droplets* liegen trotz deren Verklumpungen intakt in den entsprechenden Zellen vor (Abb. 12, 14, 36 und 37). In Peroxisomen zeigt sich das durch die luminale Anhäufung des RFP-SKL-Konstrukts, in *Lipid Droplets* durch die luminale Anhäufung des LD540-Farbstoffes. Es ist anzunehmen, dass entsprechend starke Genexpressionen und daraus folgend steigende

Verlinkungen der jeweiligen Fusionsproteine, schließlich in der Zerstörung der Organellen resultieren würden. Die luminalen Fluoreszenzstoffe der Peroxisomen und *Lipid Droplets* wären im Zytoplasma verteilt und kaum nachweisbar. Erschwerend kommt bezüglich beider Organellen hinzu, dass sie im Vergleich zu Endosomen ein viel größeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis haben. Folglich sind Peroxisomen und *Lipid Droplets* nicht so anfällig, was Membrandeformationen im Fall von ausgeprägten Organellen-Cluster betrifft. Zudem sind Peroxisomen und *Lipid Droplets* solide gefüllt: In einigen Peroxisomen sind kristalline Strukturen nachweisbar, die *Lipid Droplets* enthalten einen Kern aus unpolaren Triglyceriden und Sterolestern (238).

Die Expression von VAM-Coronin und VAM-HisactophilinII führt zur Lokalisation der Hybride an späten Endosomen und im Zellkortex. Aggregate werden nicht ausgebildet, obwohl Coronin und Hisactophilin II in der Zelle nachweislich als Dimer agieren (116, 239). Die „Oligomerisierungstheorie“ (Abb. 55) erklärt den phänotypischen Unterschied von aggregatfreien VAM-Coronin- und VAM-HisactophilinII-Zellen im Vergleich zu den aggregathaltigen VAM-VASP-, VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Zellen. Während die aggregatauslösenden Proteinhybride ausschließlich in entsprechenden Aggregaten zu finden sind, zeigen VAM-Coronin und VAM-HisactophilinII trotz starker Expression (Abb. 67) neben der endosomalen Lokalisation eine deutliche Membranlokalisation (Abb. 21) (148). Folglich ist anzunehmen, dass in beiden Fällen die Menge an endosomalen Proteinhybriden zu gering ist: Eine Verklumpung der späten Endosomen und darauf aufbauend die Ausbildung von VAM-Coronin- und VAM-HisactophilinII-Aggregaten wird nicht erreicht.

VAM-VASP, VAM- $\alpha$ -Actinin und VAM-Filamin führen in 88 – 98 % der Zellen zur Ausbildung von entsprechenden VAM-Aggregaten. Die kugeligen VAM-Aggregate werden bei einer Zellteilung auf eine der beiden Tochterzellen übertragen. Die andere Zelle erscheint wildtypisch, also aggregatfrei (Abb. 57). Letztere baut infolge der weiteren Expression des Fusionskonstrukts ein neues VAM-Aggregat auf. Die jeweiligen prozentualen Anteile der VAM-Aggregate in den VAM-VASP-, VAM- $\alpha$ -Actinin- und VAM-Filamin-Zellen könnten somit ein Maß für die Geschwindigkeit des Aggregataufbaus relativ zur Generationszeit der jeweiligen Zelllinien darstellen.

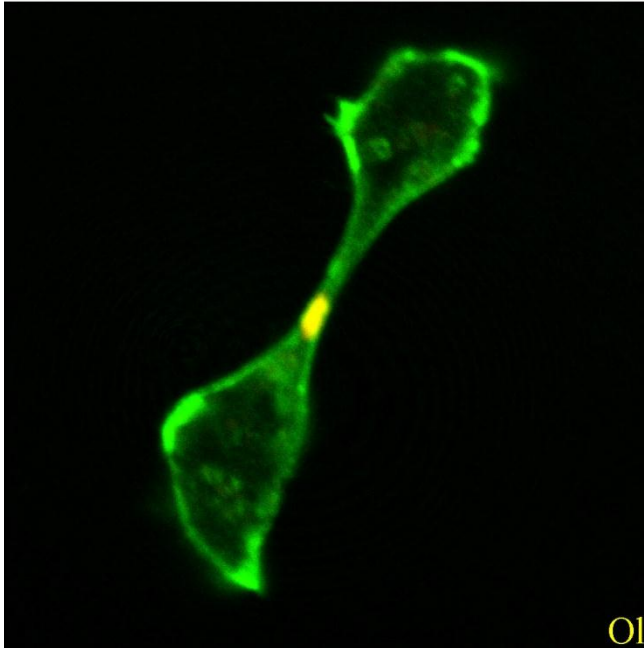


Abb. 57 – Teilung von Zellen, die VAM-Strukturen ausbilden

Die Rotfluoreszenz markiert die Myc-Konstrukte, basierend auf der Färbung mit dem Antikörper 9E10 (mk). Die Aktin-Strukturen fluoreszieren durch die Färbung mit Phalloidin-Alexa-Fluor-488 grün. Bildbreite: 512/VASP/III: 33  $\mu\text{m}$

Die Deletion der TETRA-Domäne im VAM-VASP $\Delta$ TETRA-Protein führt wider Erwarten in AX2-Zellen zur Ausbildung von kleinen Aggregaten (149). Eigentlich wurde keine Aggregate erwartet, zumal das Protein parallele Oligomere bildet (74). Zieht man die Spezifität von Aktin-Filamenten in Betracht (Diskussion: 5.2), so ist die VAM-VASP $\Delta$ TETRA-Aggregatbildung jedoch plausibel: Dem verkürzten VAM-VASP $\Delta$ TETRA ist es aufgrund der vorhandenen GAB- und FAB-Domäne möglich, Aktin-*Seeds* im Zytoplasma zu binden (Diskussion: 5.4.2). Durch die entfernte TETRA-Domäne ist der Oligomerisierungsgrad der Fusionskonstrukte sowohl untereinander als auch mit endogenem VASP heruntersetzt. Die ausbleibende VAM-VASP $\Delta$ TETRA-Komplexbildung schwächt die Fähigkeit des Hybrids Aktin-Filamente zu polymerisieren (74). Es ist aber möglich, dass endogenes VASP durch die Bindung an die gleichen Aktin-*Seeds*, an die bereits VAM-VASP $\Delta$ TETRA gebunden ist, in räumliche Nähe mit dem Hybrid kommt. So könnte endogenes VASP durch indirekten Kontakt mit dem Hybrid die Aggregatausbildung und Aktin-Polymerisierung unterstützen. Der kleine Durchmesser der VAM-VASP $\Delta$ TETRA-Aggregate ( $\text{\O} = 1,7 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zu dem der VAM-VASP-Aggregate ( $\text{\O} = 2,8 \mu\text{m}$ ) ist die Folge (150). Abhängig von der Menge an exprimierten GFP-VASP-Proteinen wäre in einer Koexpression von GFP-VASP mit



VAM-VASP $\Delta$ TETRA zu erwarten, dass ein Teil des GFP-VASP in den Aggregaten lokalisiert, während der andere Teil wildtypisch in der Zelle verteilt vorliegt.

Die Expression von VAM-VASP $\Delta$ TETRA in VASP-Knockout-Zellen hat keine Aggregatbildung zur Folge (Abb. 17).

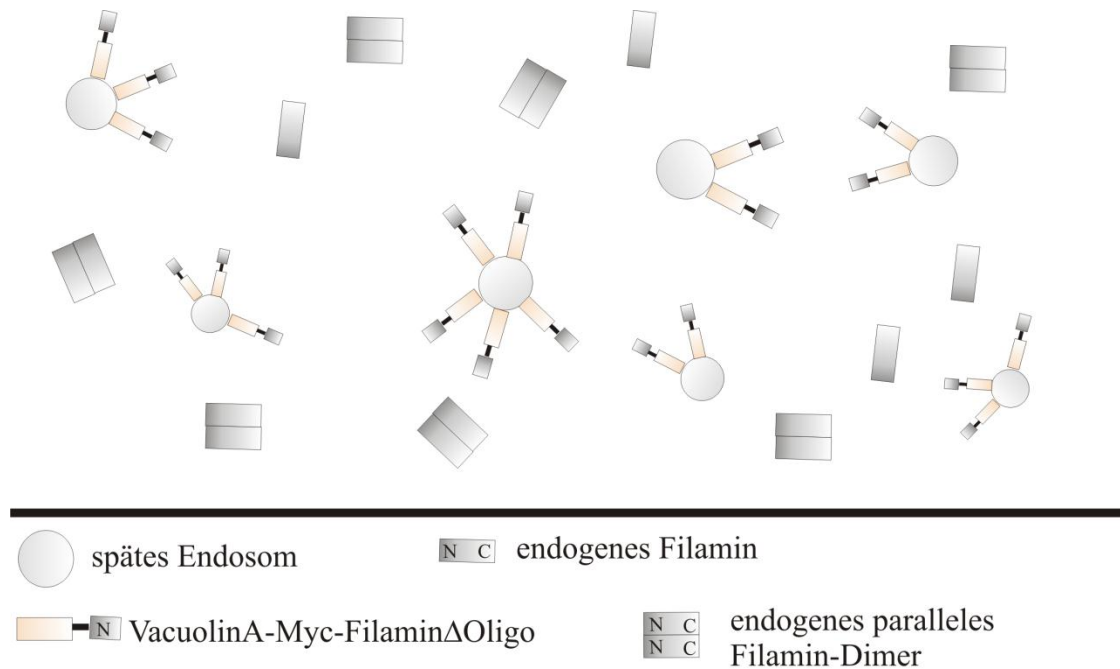


Abb. 58 – Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen von exogenen und endogenen Filamin-Proteinen in VAM-Filamin $\Delta$ Oligo-Zellen

Nur dem endogenen Filamin ist es möglich mit anderen endogenen, aber nicht exogenen Filamin-Proteinen Interaktionen einzugehen. Das exogene Filamin-Protein im VAM-Filamin $\Delta$ Oligo-Hybrid bleibt als Monomer vorliegend.

Die Deletion der Oligo-Domäne im VAM-Filamin $\Delta$ Oligo-Protein führt in AX2-Zellen zum Ausbleiben von VAM-Aggregaten (Abb. 41). Filamin bildet ein paralleles Dimer, welches durch die Interaktionen des jeweils sechsten *filamin repeats* vermittelt wird (240). Im VAM-Filamin $\Delta$ Oligo-Konstrukt fehlt das sechste *filamin repeat* (Abb. 58). Folglich kann endogenes Filamin nicht mit exogenem VAM-Filamin $\Delta$ Oligo komplexieren (Abb. 58). Unterstützt wird diese Tatsache durch die Färbung von endogenem Filamin in VAM-Filamin $\Delta$ Oligo-Zellen: Eine Kolo-kalisation von endogenem Filamin mit exogenem VAM-Filamin $\Delta$ Oligo findet nicht statt (Vgl. Abb. 41 und 60-B). Selbst bei einer stärkeren Expression von VAM-Filamin $\Delta$ Oligo ist die Ausbildung von VAM-Filamin $\Delta$ Oligo-Aggregaten nicht zu erwarten. Dafür sprechen die kleinen VAM-

Filamin<sup>Filamin-KO</sup>-Aggregate, die sich durch die Expression von VAM-Filamin in Filamin-Knockout-Zellen ausbilden (Abb. 39): Die Proteinnmenge von VAM-Filamin in diesen Zellen ist per Western Blot kaum zu detektieren (ohne Abb.), dennoch reichen die Oligomerisierungsdomänen von VAM-Filamin aus, um entsprechende, wenn auch kleine Aggregate zu forcieren (Abb. 39).

Verwunderlich ist die Heterogenität der zwei ähnlich stark exprimierenden VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Klone (Abb. 64-B): Der VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Klon 842II zeigt hauptsächlich eine vesikuläre und kortikale Lokalisation des Hybrids, während der Klon 842I zusätzlich in 28 % der Zellen VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Aggregate aufweist (Abb. 40). Die Expression von VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo erfolgt im wildtypischen Hintergrund, d. h., endogenes und damit funktionelles  $\alpha$ -Actinin ist vorhanden. Durch die Deletion der Oligomerisierungsdomäne im VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Konstrukt wurde allerdings erwartet, dass eine Interaktion von VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo mit endogenem  $\alpha$ -Actinin und folglich die Ausbildung von VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Aggregaten ausbleibt. Jedoch bildet  $\alpha$ -Actinin ein antiparalleles Dimer (241): Der N-Terminus des einen  $\alpha$ -Actinin-Proteins lokalisiert mit dem C-Terminus des anderen  $\alpha$ -Actinin-Proteins.

Durch die Bindung des verkürzten VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Moleküls an den C-terminalen Bereich des endogenen  $\alpha$ -Actinin-Volllängeproteins wird nicht der gesamte für die Dimerisierung relevante Interaktionsbereich des endogenen Proteins durch das exogene Proteine abgedeckt. Angenommen der Interaktionsbereich ist repetitiv, so besteht theoretisch die Möglichkeit, dass zusätzlich ein zweites VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Molekül an das endogene  $\alpha$ -Actinin-Protein binden kann. Die Aggregatbildung in VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Zellen wird dadurch ermöglicht (Abb. 59): Durch die Bindung von mindestens zwei Proteinhybriden an ein endogenes  $\alpha$ -Actinin-Protein kann die Verklumpung der späten Endosomen, an denen VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo lokalisiert, stattfinden, resultierend in der Ausbildung der VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Aggregate. Die Anzahl der möglichen intermolekularen Bindungen zwischen den exogenen  $\alpha$ -Actinin-Proteinen sind jedoch durch die fehlenden Oligomerisierungs-Domänen im VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Konstrukt reduziert. Demgemäß erfolgt die Ausbildung der Aggregate in VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo-Zellen nicht so effektiv wie in VAM- $\alpha$ -Actinin-Zellen bzw. bleibt ganz aus.



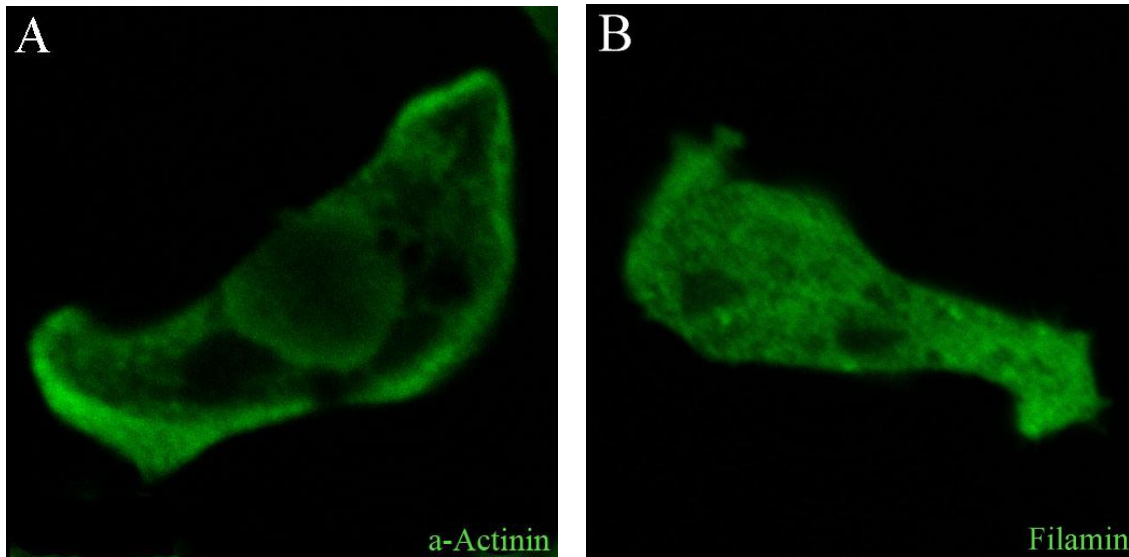


Abb. 60 – Die Lokalisation von endogenem  $\alpha$ -Actinin bzw. Filamin in VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo- bzw. VAM-Filamin $\Delta$ Oligo-Zellen

Die gezeigten Immunfluoreszenzen der VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo- und VAM-Filamin $\Delta$ Oligo-Zellen sind bereits unter Punkt 4.3.5 (Ergebnisse) einzeln abgehandelt. Aus diesem Grund werden sie an dieser Stelle vereinfacht gegenübergestellt. Die Grünfluoreszenz beruhen auf Färbung mit dem Antikörper für  $\alpha$ -Actinin 47-19-2 (mk) bzw. für Filamin (82-471-14 (mk). Zum Vergleich sind unter Abb. 38-A und 39 die entsprechenden *Overlays* gezeigt, die aus den Kofärbungen mit dem polyklonalen Myc-Antikörper resultieren. Bildgröße:  $\alpha$ -Actinin: 27  $\mu$ m; Filamin: 28  $\mu$ m

### 5.5.2 Abp34: ein Monomer, Dimer und Oligomer

Sowohl Abp34 als auch WASP besitzen keine bekannten CC-Motive oder andere Oligomerisierungsdomänen (<http://www.uniprot.org/>), sie liegen in der Zelle folglich als Monomere vor. Zudem sind weder für Abp34 noch für WASP Funktionen als Aktin-Nukleator oder Aktin-Elongator bekannt. Verschiedene Arbeitsgruppen erreichen jedoch durch die Expression mutierter Abp34- und WASP-Proteine die Ausbildung von Aktin-haltigen Aggregaten (Diskussion: 5.1.1) (168-170, 175, 177, 207).

Die Ligation von FLAG an den N-Terminus von WASP führt erfolgreich zur Bildung von rundlichen Aktin-Aggregaten in Säugerzellen (175). Diesbezüglich scheint der VCA-Domäne eine wichtige Rolle zuzukommen, denn wird die VCA-Domäne im Fusionskonstrukt entfernt (FLAG-WASP $\Delta$ C), so bleibt der Phänotyp aus (175). Vermutlich wird durch die Fusion von FLAG N-terminal an WASP die Autoinhibition des Proteins verhindert, wodurch die VCA-Domäne eine Homointeraktion mit der Domäne eines anderen FLAG-WASP-Hybrids eingehen kann.

Gleiches zeigt sich bei den Expressionen der VCA- und VC- Domänen in Säugerzellen (177): Die inhibierende Aktivität durch den N-terminalen Bereich von WASP bleibt aus, eine unkontrollierte Proteinoligomerisierung kann stattfinden und als Folge dessen kommt es zur Ausbildung von VCA- und VC-Aggregaten. In den VC-Aggregaten liegt kein endogenes WASP akkumuliert vor (177). Die VC-Aggregatbildung scheint allein auf VC-Interaktionen zu beruhen. Die VCA-Domäne wurde bisher nicht auf mögliche intermolekulare Homointeraktionen überprüft.

In den VC-Aggregaten ist nachweislich der Arp2/3-Komplex vorliegend. Durch die fehlende Regulation der WASP-abhängigen Aktivierung des Arp2/3-Komplexes erfolgt die kontinuierliche Polymerisierung von F-Aktin in den Aggregaten (177). Die VCA-Aggregate wurden bezüglich des Vorhandenseins von Arp2/3 nicht untersucht, jedoch ist anzunehmen, dass der Proteinkomplex auch in den Aktin-haltigen VCA-Aggregaten (177) angereichert ist. Durch die Aktin-Polymerisierung ist zu erwarten, dass der F-Aktin-Level in den VC- und VCA-Zellen im Vergleich zu dem von AX2-Zellen erhöht ist.

Durch die Ligation von WASP C-terminal an VacuolinA-Myc war es Ziel, einen zu FLAG-WASP vergleichbaren Phänotyp in *D. discoideum* zu schaffen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine ausschließliche Lokalisation von VAM-WASP an die Vesikelmembran erreicht werden (Abb. 21), was Voraussetzung für die „Oligomerisierungstheorie“ ist (Abb. 55). VAM-WASP-Aggregate werden nicht ausgebildet. Einen entsprechenden Beweis könnte die Herstellung eines sehr stark exprimierenden VAM-WASP-Klons mit sich bringen: Wird durch die höhere Expression eine vollständigen Lokalisation von VAM-WASP an späten Endosomen erreicht, so ist die Ausbildung von VAM-WASP-Aggregaten zu erwarten.

Um Hinweise für den regulatorischen Mechanismus des Abp34-Proteins zu gewinnen, wurden verschiedene, verkürzte Proteinformen untersucht (107). U. a. entstand das CT-Fragment (AS 124-295), welches später in der Version des CT-Myc-Fragments für die Studien von Maselli *et al.* verwendet wurde (168). Dieses CT-Fragment von Abp34 umfasst das zweite *EF-hand*-Motiv, die zwei C-terminal gelegenen, F-Aktin-bindenden Regionen und die zweite Interaktionszone (IZ II) (Abb. 50).

Alle verkürzten Abp34-Proteinversionen, sofern sie die vollständige, starke F-Aktin-bindende Region beinhalten, zeigen eine gesteigerte Affinität und Bündlungsaktivität bezüglich F-Aktin (107). Diese Beobachtungen basieren vermutlich auf der fehlenden, regulierten Autoinhibition von Abp34 (Einleitung: 3.3.3) (107): Es ist postuliert, dass die Autoinhibition von Abp34 durch die Rückfaltung des Proteins und der daraus resultierenden Bindung des N-Terminus an die starke F-Aktin-Bindungsregion erfolgt, sofern  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden vorliegt. Ein Kontakt von Abp34 zu F-Aktin bleibt aus. Die Fähigkeit der Aktin-Bindung des Proteins wird erst wieder durch die Entfernung von  $\text{Ca}^{2+}$  ermöglicht: Es folgt eine Konformationsänderung des Proteins, die die Verbindung der Interaktionszonen I und II untereinander ermöglicht. Abp34 kann Aktin-Filamente binden (107). Fehlt der inhibierende, N-terminale Bereich von Abp34, so kommt es zur gesteigerten Bindung an F-Aktin.

Das Modell der Autoinhibition von Abp34 zeigt, dass theoretisch beide IZs in der Lage sind, mit der jeweils anderen eines weiteren Abp34-Moleküls zu interagieren. Die Dimerbildung ist für die verkürzten Abp34-Proteine, die noch mindestens eine Interaktionszone umfassen, bewiesen (107): Alle verkürzten Abp34-Proteine sind durch das Fehlen der N-terminalen inhibitorischen Domäne und durch das Vorhandensein von mindestens einer Interaktionszone (IZ) gekennzeichnet. Durch Gelfiltrationen wurde gezeigt, dass einige der verkürzten Abp34-Proteine, im Gegensatz zum Abp34-Volllängeprotein, als Dimer vorliegen, darunter auch das CT-Fragment (107).

Auch in den Fällen von 34 kDa- $\Delta\text{EF1}$  (169) und VAM-Abp34 sind Bindungen der Hybride an ein anderes exogenes und endogenes Abp34-Molekül nicht auszuschließen: Das *EF-hand*-Motiv 1 von Abp34 ist Teil der ersten Interaktionszone in diesem Protein (Abb. 07). Durch eine Mutation in diesem Bereich (Abb. 50), resultierend in 34 kDa- $\Delta\text{EF1}$ , ist anzunehmen, dass die korrekte Bindung zur zweiten IZ im gleichen Molekül verhindert wird. Das Protein nimmt folglich nur eine „offene“ Konformation ein. Die Möglichkeit der Bildung von Homodimeren oder gar -oligomeren ist gegeben. Gleiches gilt für VAM-Abp34 (Abb. 62): Durch die Fusion mit VacuolinA-Myc wird der N-Terminus von Abp34 an einer Rückfaltung sterisch gehindert. Die zwei Interaktionszonen im VAM-Abp34-Protein liegen frei und können mit denen anderer exogener VAM-Abp34-Moleküle interagieren. So ist es möglich, dass in bis zu 5 % der

Zellen zu VAM-VASP vergleichbare Aktin-Aggregate auftreten (Abb. 24), während im Großteil der VAM-Abp34-Zellen das Fusionskonstrukt ausschließlich an späten Endosomen und im Kortex lokalisiert (148).

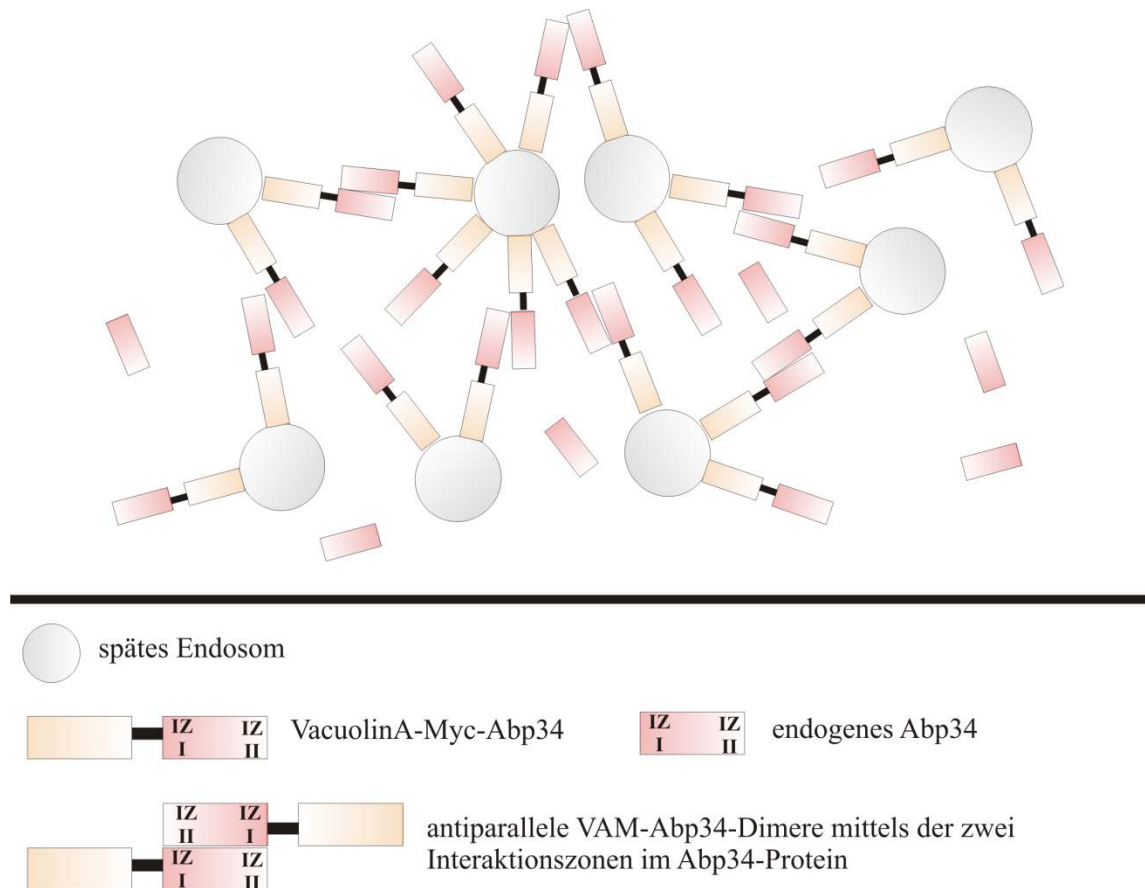


Abb. 62 Schematische Darstellung der Ausbildung der VAM-Abp34-Aggregate

Endogenes Abp34 liegt, aufgrund fehlender Oligomerisierungs-Motive (<http://www.uniprot.org/>) in der Zelle als Monomer vor. Die Lokalisation des endogenen Proteins in den VAM-Abp34 erfolgt vermutlich durch die selektive Bindung an die in den VAM-Abp34-Aggregaten sequestrierten Aktin-Filamente (Diskussion 5.2). Die in den VAM-Abp34-Aggregaten sequestrierten Aktin-Filamente und Aktin-interagierende Proteine wurden zur Vereinfachung der Darstellung nicht eingezeichnet.

Weder das CT-Myc-Fragment, noch 34 kDa- $\Delta$ EF1 und VAM-Abp34 unterliegen einer regulierten Autoinhibition. Die Folgen dieser mutierten Abp34-Proteine sind die unkontrollierte F-Aktin-Bindung und die Akkumulation weiterer Aktin-interagierender Proteine, was schließlich im Aufbau der jeweiligen Aggregate resultiert (168 , 169).

Der Aktin-Level von *D. discoideum*-Zellen, die das CT-Myc-Fragment exprimieren, ist äquivalent zu dem von AX2-Zellen (168). Die Aktin-Sequestrierung in den CT-Myc-

Aggregaten geht folglich mit einem reduzierten G-Aktin-Pool einher. Daraus ist zu schließen, dass die Aktin-Akkumulation in den CT-Myc-Aggregaten allein auf der Bindung von existierenden und nicht, wie im Fall von VAM-VASP, auf *de novo* polymerisierten Aktin-Filamenten basiert. Schließlich ist für Abp34, im Gegensatz zu VASP, auch keine Fähigkeit, Aktin-Filamente polymerisieren zu können, beschrieben (Diskussion: 5.4).



## 6. Material

### 6.1 Geräte

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Blot-Kammern	Biometra, Göttingen
Coulter Counter Beckman	Coulter, Krefeld
Z2™ Coulter Counter® Beckman	Coulter, Krefeld
Elektrophorese-Kammern	MPI Martinsried
Fireboy eco	Integra Bioscience, Fernwald
Fluorometer	
-Kontron SFM 25	KontronInstruments, Eichingen
-Hitachi F-2700	Hitachi, Willich
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-70°C)	Heraeus, Osterode
GelDoc II	Biometra, Göttingen
Gelkammern	Metallwerkstatt, Uni Kassel MPI, Martinsried
GenePulser®	Bio-Rad, Kanada
Glaswaren	Schott, Mainz
Glaspipetten	Hirschmann, Deutschland
Hamiltonspritze	Hamilton, Schweiz
Kühlschränke (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA, Staufen im Breisgau
Mikroskope und Zusatzgeräte	
-Binokular	Zeiss, Göttingen
-CLSM, TCS SP2	Leica, Bensheim
-Fluoreszenzmikroskop (invers), DM IRB	Leica, Bensheim
-Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen
-Kaltlichtquelle KL1500 electronic	Leica, Bensheim
-Wild M3	Heerbrugg, Schweiz

-TEM	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	Daewoo, Korea
Multipette®	Gilson, Frankreich
PCR-Thermocycler PCR-Express	Hybaid, Heidelberg
PCR TGradient	Biometra, Göttingen
pH-Meter 523	WTW
Pipetboy (acu, comfort)	Integra Bioscience, Fernwald
Pipetten (2 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl)	Gilson, Frankreich
Photometer Ultrospec 3000pro	Amersham Pharmacia, Freiburg
Powersupplies	Amersham Pharmacia, Freiburg
Quarz-Küvetten	Biometra, Göttingen
Schüttelinkubatoren Lab Shaker	Werkstatt, MPI Martinsried Hellma, Müllheim Adolf Kühner AG, Schweiz
Schwenkplatte	Infors AG, Bottmingen
Speed Vac Concentrator 5301	Biometra, Göttingen
Sterilbänke	Eppendorf, Hamburg
Thermomix® ME	Holten, Dänemark
Thermomixer (comfort, compact)	B. Braun, Melsungen
Ultraschallbad Sonorex TK 52	Eppendorf, Hamburg
Waagen	Bandelin, Berlin
Wasserbad	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Mettler, Giessen
-Biofuge 15	B. Braun, Melsungen
-Biofuge stratos	Heraeus, Osterode
-Centrifuge 5415 C, 5810 R	Heraeus, Osterode
-MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
	Eppendorf, Hamburg

-Rotanta/R

Hettich, Tuttlingen

-Rotina 48R

Hettich, Tuttlingen

## 6.2 Verbrauchsmaterialien

Costar-Platten (24-Loch)

Sarstedt, Nümbrecht

Deckgläschen (Ø 18 mm)

Menzelgläser, Braunschweig

Deckgläschen (50 mm x 50 mm)

Assistent, Sondheim

Einmalhandschuhe (Nitril, Supervinyl)

Nobaglove®, Wetter

Einwegspritzen und Injektionsnadeln

B. Braun, Melsungen

Einwegtücher

Kimberly-Clark, England

Elektroporationsküvetten

Eurogentec, Belgien

Falconröhrchen (15 ml; 50 ml)

Sarstedt, Nümbrecht

Filterpapier 3MM

Whatman, Göttingen

Flaschenfilter

Sarstedt, Nümbrecht

Objektträger

Menzelgläser, Braunschweig

Parafilm M

American National Can, USA

Petrischalen (Ø 10 cm; Ø 5 cm)

Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitzen

Gilson, Frankreich

Plastikküvetten

-1,5 ml

Sarstedt, Nümbrecht

-4 ml

Ratiolab®, Dreieich

Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5ml, 2ml)

Sarstedt, Nümbrecht

Skalpelle

C. Bruno Bayha GmbH,  
Tuttlingen

Sterilfilter (0,45µm)

Sarstedt, Nümbrecht

Transfermembran Nitrocellulose PROTRAN®

Schleicher & Schuell, Dassel

## 6.3 Reagenzien

(Reinheitsgrad p.a.)

Agarose	Invitrogen, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, München
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Borsäure	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan (DABCO)	Sigma-Aldrich, München
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr) (1 %ige Stammlsg. (10 mg / ml))	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fischgelatine (G7765, 45 %)	Sigma-Aldrich, München
Gelvatol Typ II	Sigma-Aldrich, München
Glucose (D-)	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd (25 %ige Lösung)	Serva, Heidelberg
Glycerin	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, England
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (KAc)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Latrunculin B	ICN, Eschwege
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (blotting grade)	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (NaCO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxidplättchen (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumlauroylsarcosin	Affymetrix/USB, USA
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
NP40-Lösung	CALBIOCHEM, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (16 %ige Lösung)	Science Services, München
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol (PCIA)	Roth, Karlsruhe
Phosphorwolframsäure	Merck, Darmstadt
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Roth, Karlsruhe
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt

Polyvinylalkohol	Roth, Karlsruhe
	Sigma-Aldrich, München
Proteose-Pepton	Oxoid, England
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Repel-Silane ES	Amersham, Freiburg
Rotiphorese® Gel 30 (30 %ige Acrylamid-Stammlösung)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Linde, Pullach
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

## 6.4 Fluoreszenzfarbstoffe

Alexa Fluor 488 Phalloidin	Mo Bi Tec, Göttingen
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, München
FITC-Dextran (Fluoresceinisothiocyanat)	Sigma-Aldrich, München
LD540	(242)
Phalloidin 5/6-TRITC mixed isomers labeled	Sigma-Aldrich, München
5/6-TRITC (Tetramethylrhodamin-5/6-isothiocyanat)	Sigma-Aldrich, München
TRITC-Dextran	Sigma-Aldrich, München

## 6.5 Antibiotika

Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Blasticidin	ICN, Eschwege
Geneticindisulfat (G418)	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA, Österreich
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, München

## 6.6 Enzyme

Complete, Mini (Protease Inhibitor Tabletten)	Roche, Mannheim
DNaseI (RNase-frei)	Fermentas, St. Leon-Rot
FastAP (Alkalische Phosphatase)	Fermentas, St. Leon-Rot
Klenow-Fragment	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase und Puffer	Finnzymes, Finnland
Proteinase K	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme und jeweilige Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Roth, Karlsruhe
T4 DNA Ligase und Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Polymerase und Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Polynukleotidkinase und Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq DNA Polymerase und Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot

## 6.7 Längen- und Größenstandards

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St-Leon-Roth
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St-Leon-Roth
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St-Leon-Roth
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, St-Leon-Roth
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas, St-Leon-Roth

## 6.8 Kits

BCA Protein Assay Kit	Novagen, USA
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen, USA
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega, USA
PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit	Invitrogen, USA
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hamburg

QIAquick® PCR-Purification Kit

Qiagen, Hamburg

## 6.9 Antikörper

### 6.9.1 Primärantikörper

120 kDa gelation factor (mk)	82-471-14	(243)
$\alpha$ ABP34	159-291-1	(244)
$\alpha$ Aktin (mk)	ACT-1-11; 224-236-1 (für WB)	((245); (246))
$\alpha\alpha$ -Actinin (mk)	47-19-2	(241)
$\alpha$ Hefe $\alpha$ Tubulin (mk)	YL1/2	
$\alpha$ CP 224 (Centrosom; mk)	2/165	(247)
$\alpha$ Cap34 (mk)	135-409-16	(248)
$\alpha$ Coactosin (mk)	177-29-B2-8	(91)
$\alpha$ Coronin (mk)	194-62-7; 176-3D6	(249)
$\alpha$ DAiP1 (mk)	246-466-6	(250)
$\alpha$ Filamin (mk)	siehe 120 kDa gelation factor (mk)	
$\alpha$ GFP (mk)	264-449-2	(Chemicon, USA)
$\alpha$ Myc (mk)	9E10	(251)
$\alpha$ Myc (pk)	(Cell Signaling Technology, USA)	
$\alpha$ Myosin II (mk)	56-396-5	(252)
$\alpha$ p80 (mk)	H151	((253); über P.Cosson)
$\alpha$ PDI (mk)	221-402-9; 221-64-1	(254)
$\alpha$ Porin (mk)	70-100-1	(255)
$\alpha$ Profilin (mk)	153-246-10	(256)
$\alpha$ Severin (mk)	42-65-11	(257)
$\alpha$ Talin (mk)	227-341-4	(14)
$\alpha$ Ubiquitin	Ub (P4D1): sc-8017	SCBT, Heidelberg
$\alpha$ Vacuolin (mk)	263-79-2; 263-279-7	(35)
$\alpha$ V-H <sup>+</sup> -ATPase (mk)	221-35-2; 224-256-2	(258, 259)



### 6.9.2 Sekundärantikörper

Kaninchen-anti-Maus IgG (konjugiert mit Alkalischer Phosphatase)	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Hase IgG (konjugiert mit Cy3)	Novagen, USA
Kaninchen-anti-Maus IgG (konjugiert mit Cy3)	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG (konjugiert mit Oregon Green 488)	Molecular Probes, USA

### 6.10 Puffer und Lösungen

Blockierlösung	5 % Milchpulver [w/v] in 1x PBS, Zugabe von Spatelspitze NaN <sub>3</sub>
CaCl <sub>2</sub> -Puffer (pH 7,0)	60 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerol 10 mM PIPES (autoklavieren)
Carbonatpuffer (pH 10,2)	0,1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
DNA-Auftragspuffer, 5x	30 % Glycerin [v/v] 50 mM EDTA 0,001 % Bromphenolblau [w/v] 0,001 % Xylencyanol [w/v]
Elektroporationspuffer	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50 mM Saccharose ddH <sub>2</sub> O ad 1 l (steril filtrieren)
Ethidiumbromidlösung	10 mg / 10 ml

HBS, 2x (pH 7,05)	4 g NaCl 0,18 g KCL 0,062 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 2,5 g HEPES 0,5 g D-Glucose ddH <sub>2</sub> O ad 250 ml (steril filtrieren), -20 °C
Glycerin, 18%	18 ml 50 % Glycerol [v/v] 7 ml ddH <sub>2</sub> O 25 ml 2x HBS
Kernlyse-Puffer	0,05 M HEPES 0,04 M MgCl <sub>2</sub> 0,2 M KCl 5 % Sucrose [w/v] 14 mM β-Mercaptoethanol
Laemmli, 10x (pH 6,8)	0,2 M Tris-HCl 33 % Glycin [v/v] 6,7 % SDS [w/v] 16,7 % Mercaptoethanol [v/v] 10 mg / ml Bromphenolblau
Lösung I (pH 8,0)	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100µg / ml RNase A
Lösung II	200 mM NaOH 1 % SDS
Lösung III (pH 5,5)	3 M KAc
MES-HL5 (pH 7,2)	5,0 g Hefeextrakt 10,0 g Glucose 10,0 g Proteose-Pepton 1,32 g MOPS ddH <sub>2</sub> O ad 1 l
PAA-Laufpuffer, 10x	0,25 M Tris 1,9 M Glycin 1 % SDS [w/v]

PBG	0,045 % Fischgelatine [v/v] 0,5 % BSA [w/v] 1x PBS ad 1 l
PBS, 10x (pH 7,4)	1370 mM NaCl 81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 27 mM KCl 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS/Glycin	3,75 g Glycin 1x PBS ad 500 ml
Puffer 6.6.2 (pH 7,2)	6 mM Tris-HCl (pH 7,4) 6 mM NaCl 0,2 mM EDTA
SDS-Sammelgelpuffer, 4x (pH 6,8)	0,5 M Tris-HCl 0,4 % SDS
SDS-Trenngelpuffer, 4x (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl 0,4 % SDS
Semidry-Blotpuffer (pH 8,2-8,4)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,0375 % SDS [w/v] 20 % Methanol [v/v]
Soerensen-Phosphatpuffer (P-Puffer)	2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (autoklavieren)
Solution D	4 M Guanidinium- Isothiocyanat 25 mM Natriumcitrat 5 % Natriumlauroylsarcosin [v/v] 0,1 M β-Mercaptoethanol
TBE-Puffer, 10x (pH 8,3)	1 M Tris-HCl 0,83 M Borsäure 10 mM EDTA
Trypanblau	0,087 g NaCl 0,058 g Natriumcitrat 0,02 g Trypanblau ddH <sub>2</sub> O ad 10 ml

## 6.11 Medien

### 6.11.1 *Escherichia coli*

LB-Medium (pH 7,0)	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCL ddH <sub>2</sub> O ad 1 l
LB <sub>Amp</sub> -Medium	wie LB-Medium + 50 µg / ml Ampicillin
LB-Agar	wie LB-Medium + 13 g Bacto-Agar
LB <sub>Amp</sub> -Agar	wie LB-Medium + 13 g Bacto-Agar + 50 µg / ml Ampicillin

### 6.11.2 *Dictyostelium discoideum*

AX-Medium (HL5) (pH 6,7)	2,5 g Bacto-Trypton 2,5 g Pepton aus Casein 5 g Protease-Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g D-Glucose 1,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,35 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O ddH <sub>2</sub> O ad 1 l
MES-HL5 (pH 7,1)	5 g Hefeextrakt 10 g D-Glucose 10 g Protease-Pepton 1,32 g MOPS ddH <sub>2</sub> O ad 1 l
G <sub>0</sub> -Medium	wie AX-Medium Penicillin/Streptomycin auf eine Endkonzentration von [100 U / ml] + 50 µg / ml Ampicillin

G <sub>10</sub> -Medium	wie G <sub>0</sub> -Medium Geneticin (G418) auf eine Endkonzentration von [10 µg / ml]
B <sub>10</sub> -Medium	wie G <sub>0</sub> -Medium Blasticidin auf eine Endkonzentration von [10 µg / ml]
G <sub>10</sub> /B <sub>10</sub> -Medium	wie G <sub>0</sub> -Medium Geneticin (G418) und Blasticidin auf eine Endkonzentration von jeweils [10 µg / ml]
SM-Agarplatten (pH 6,5)	15 g Bacto-Agar 10 g Pepton 10 g D-Glucose 1 g Hefeextrakt 1 g MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 2,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ddH <sub>2</sub> O ad 1 l
KA-Platten	mit <i>Klebsiella aerogenes</i> bewachsene SM-Platte
Phosphat-Agarplatten (pH 6,0)	15 g Bacto-Agar Soerensen-Phosphatpuffer ad 1 l

## 6.12 Plasmide

Alle klonierten Fragmente wurden mittels der Sequenzierung durch die Firma MWG Biotech AG auf deren korrekte Sequenz untersucht. Alle Vektoren, ausgenommen #425, #498, #764 und #781, besitzen ein Resistenzgen für Geneticin (G418). Die anderen verleihen den Zellen eine Blasticidin-Resistenz.

#112 – pDNeo-GFP-VacuolinB	(Ulrike Hacker, MPI für BC, Martinsried)
#406 – GFP-Ssj758	(I. Müller, Uni Kassel, (120))

- #424 – MB35 (bezogen über Abt. Genetik, UniKassel; (162))
- #425 – MB38 (bezogen über Abt. Genetik, UniKassel; (162))
- #498 – pBsrH-mRFPmars-PTS1 (C. Schmauch, Uni Kassel, (148))
- #502 – pVAM-VASP $\Delta$ FABstr (S. Claußner, Uni Kassel, (149))
- #503 – pVAM-VASP $\Delta$ TETRA (S. Claußner, Uni Kassel, (149))
- #512 – pVAM-VASP $\Delta$ GAB (S. Claußner, Uni Kassel, (149))
- #519 – pVAM-VASP (C. Schmauch, Uni Kassel, (150))
- #520 – GFP-VASP (Hans Faix, MH Hannover, (73))

#535 – pB15-VAM-Coactosin

Das Amplifikat Coactosin wurde durch eine PCR mit den Primern #264 und #265 auf das Plasmid #69 (p17-cDNA-Coactosin, (91)) gewonnen und mittels Xba I und Xho I verdaut. Vektor #519 (pVAM-VASP) wurde ebenfalls mit diesen beiden Enzymen geschnitten, wodurch das Insert VASP verloren ging und durch Coactosin ersetzt werden konnte, resultierend in Plasmid #535 (pB15-VacuolinA-Myc-Coactosin).

#536 – pB15-VAM-HisactophilinII

HisactophilinII wurde durch eine PCR mit den Primern #296 und #270 auf genomische DNA von *D. discoideum* amplifiziert, mit Xba I und Xho I verdaut und über die gleichen Schnittstellen in den Vektor #519 (pVAM-VASP) ligiert, nachdem zuvor aus diesem Vektor durch den Xba I / Xho I-Doppelverdau VASP ausgeschnitten wurde. Die Ligation resultierte in Vektor #536 (pB15-VAM-HisactophilinII).

#644 – pB15-VAM-Ssj758

Ssj758 wurde zunächst über eine PCR mit den Primern #434 und #288 auf Plasmid #555 (pB15-Myc-Ssj758, I. Müller, Uni Kassel, (120)) amplifiziert und nach einem A-Tailing in den pGEM-Teasy-Vector ligiert, wodurch Plasmid #684 (pGEM-Teasy-Ssj758) entstand. Dieser wurde im nächsten Schritt mit Xba I und Xho I verdaut und in den ebenso verdauten Vektor #519 (VAM-VASP) ligiert,

wodurch VASP verloren ging und der Vektor #644 (pB15-VAM-Ssj758) entstand.

#645 – pDN120GFP (David Knecht, Uni Connecticut)

#646 – AHD741da-Actinin cDNA (David Knecht, Uni Connecticut)

#648 – pB15-VAM-Filamin

Durch eine PCR auf Plasmid #645 (pDN120GFP) mit den Primern #448 und #449 wurde Filamin amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen Xba I und Xho I in den Vektor #519 (VAM-VASP) ligiert, wodurch VASP verloren ging und das Plasmid #648 (pB15-VAM-Filamin) erzeugt wurde.

#668 – pDneo2a-SLB350-6xMyc (G. Konotrop, Uni Kassel, (151))

#674 – pB15-VAM-Ponticulin (-2TMD)

Auf Plasmid #537 (pB15-VAM-Ponticulin, S. Claußner, Uni Kassel) wurde mit den Primern #391 und #392 eine PCR gefahren, um Ponticulin (-2TMD) zu amplifizieren. Nach einem Xba I / Xho I-Doppelverdau wurde das Insert in den ebenso verdauten Vektor #519 (pVAM-VASP) ligiert, nachdem aus diesem Vektor zuvor VASP durch den gleichen Verdau entfernt wurde. Daraus resultierte Plasmid #674 (pB15-VAM-Ponticulin (-2TMD)).

#678 – pB15-VAM-WASP

WASP wurde zunächst mittels einer PCR auf aufgereinigte cDNA aus *D. discoideum* mit den Primern #477 und #478 gewonnen und in pGEM-Teasy-Vector ligiert, resultierend in Plasmid #681 (pGEM-Teasy-WASP). Durch eine PCR auf dieses Plasmid unter der Verwendung der Primer #477 und #496 wurde WASP erneut amplifiziert und über die Schnittstellen Xba I und Xho I in Plasmid #519 (VAM-VASP) ligiert, wodurch VASP verloren ging und der Vektor #678 (VAM-WASP) entstand.

#682 – pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin

Eine PCR auf Vektor #646 (AHD741da-Actinin cDNA) mit den Primern #446 und #447 diente der Amplifizierung von  $\alpha$ -Actinin, das über die Schnittstellen Xba I und Xho I in Vektor #519 (VAM-VASP) ligiert wurde, wodurch das bereits vorhandene Insert VASP verloren ging und der Vektor #682 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin) erzeugt wurde.

#695 – pDneo2a-SLB350-Myc-Filamin

Für die Ligation von Myc-Filamin C-terminal an SLB350 wurden die Vektoren #648 (pB15-VAM-Filamin) und #699 (pDneo2a-SLB350-Myc-VASP) mit BamH I und Xho I verdaut. Mittels Gelaufreinigung wurde aus Plasmid #648 das Insert Myc-Filamin und aus Plasmid #699 der Restvektor pDneo2a-SLB350 gewonnen. Beide Fragmente wurden anschließend in einer Ligation miteinander fusioniert, resultierend in Plasmid #695 (pDneo2a-SLB350-Myc-Filamin).

#697 – pDneo2a-SLB350-Myc- $\alpha$ -Actinin

Für die Ligation von Myc- $\alpha$ -Actinin C-terminal an SLB350 wurden die Vektoren #682 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin) und #699 (pDneo2a-SLB350-Myc-VASP) mit BamH I und Xho I verdaut. Mittels Gelaufreinigung wurde aus Plasmid #682 das Insert Myc- $\alpha$ -Actinin und aus Plasmid #699 der Restvektor pDneo2a-SLB350 gewonnen. Beide Fragmente wurden anschließend in einer Ligation miteinander fusioniert, resultierend in Plasmid #697 (pDneo2a-SLB350-Myc- $\alpha$ -Actinin).

#698 – GFP-LSD-VASP

Mit den Primern #504 und #505 wurde VASP durch eine PCR auf Plasmid #519 (VAM-VASP) amplifiziert, im Anschluss daran mit BamH I und Bgl II verdaut und in die BamH I-Schnittstelle des Vektors #739 (GFP-LSD (-Stop-Codon)) ligiert, wodurch Vektor #698 (GFP-LSD-VASP) entstand.

#699 – pDneo2a-SLB350-Myc-VASP

Myc-VASP wurde mittels einer PCR auf Vektor #519 (VAM-VASP) mit den Primern #331 und #172 amplifiziert und über BamH I und Xho I in den Vektor #668 (pDneo2a-SLB350-6xMyc) ligiert, der mit den gleichen Enzymen verdaut wurde.

#739 – GFP-LSD (-Stop-Codon)

Das LSD (-Stop-Codon) ersetzt das LSD im Vektor #438 (pDNeo-GFP-LSD1, N. Pawolleck, Uni Kassel, (155)), indem es durch eine PCR mit den Primern #159 und #506 auf diesen Vektor gewonnen und über die Schnittstellen Sal I und BamH in diesen Vektor kloniert wurde, wodurch LSD verloren ging und Plasmid #739 (GFP-LSD (-Stop-Codon)) entstand.



#740 – pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ CH

$\alpha$ -Actinin $\Delta$ CH wurde mittels der Primer #537 und #447 aus Plasmid #682 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin) amplifiziert und über Xba I und Xho I wiederum in dieses Plasmid ligiert, wodurch  $\alpha$ -Actinin verloren ging und das Plasmid #740 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ CH) entstand.

#741 – pB15-VAM-Filamin $\Delta$ CH

Filamin $\Delta$ CH wurde durch eine PCR auf Plasmid #648 (pB15-VAM-Filamin) mittels der Primer #536 und #449 amplifiziert und über Xba I und Xho I wiederum in dieses Plasmid ligiert, wodurch Filamin verloren ging und das Plasmid #741 (pB15-VAM-Filamin $\Delta$ CH) generiert wurde.

#742 – pB15-ALDH (-Stop-Codon)

ALDH (-Stop-Codon) wurde durch eine PCR mit den Primern #533 und #534 auf Plasmid #654 (pB15-Myc-ALDH, O. Kuhnert, Uni Kassel, (40)) amplifiziert, mit den Enzymen Sac I und Xho I verdaut und in den ebenso verdauten Vektor #151 (pB15 bzw. pDXA3C, (260)) kloniert, wodurch Plasmid #742 (pB15-ALDH (-Stop-Codon)) erzeugt wurde.

#744 – MB38-VAM-VASP

VAM-VASP wurde aus dem Vektor #519 (VAM-VASP) mittels einer PCR unter Verwendung der Primer #16 und #505 amplifiziert, mit Bgl II verdaut und durch die Klenow-Polymerase gebluntet. Die Ligation erfolgte in den ebenfalls mit Bgl II verdauten und mit Klenow geblunteten Vektor #425 (MB38), woraus Plasmid #744 (MB38-VAM-VASP) resultierte.

#745 – pB15-ALDH-Myc-VASP

Myc-VASP wurde zunächst durch eine PCR mit den Primern #497 und #172 auf Plasmid #519 (VAM-VASP) amplifiziert und nach einem A-Tailing in pGEM-Teasy-Vector ligiert, resultierend in Plasmid #747 (pGEM-Teasy-Myc-VASP). Mittels einem Xho I-Verdau wurde Myc-VASP aus dem Vektor #747 ausgeschnitten und in den ebenfalls mit Xho I verdauten Vektor #742 (pB15-ALDH (-Stop-Codon)) ligiert, wodurch Plasmid #745 (pB15-ALDH-Myc-VASP) entstand.

## #762 – MB38-VAM-Filamin

VAM-Filamin wurde durch PCR auf Plasmid #648 (pB15-VAM-Filamin) mittels der Primer #561 und #562 gewonnen, mit Mlu I verdaut und durch das Klenow-Fragment gebluntet. Der MB38-Vektor (#425) wurde mit Bgl II verdaut, ebenfalls durch eine Klenow-Reaktion gebluntet und nach einer Dephosphorylierung mittels FastAP mit dem Insert ligiert, resultierend in Plasmid #762 (MB38-VAM-Filamin).

#764 – pA15-RFP-Apg8 (bezogen von Tony Kowal, Dicty Stock Center)

#765 – pDBsrXP-mRFP (Manu Dubin, Uni Kassel, (261))

## #767 – pB15-ALDH-Myc-Ssj758

Durch eine PCR mit den Primern #497 und #288 auf Plasmid #644 (pB15-VAM-Ssj758) wurde Myc-Ssj758 amplifiziert und nach einem Xho I-Verdau in den ebenso verdauten Vektor #745 (pB15-ALDH-Myc-VASP) ligiert, wodurch Myc-VASP verloren ging und der Vektor #767 (pB15-ALDH-Myc-Ssj758) entstand.

#792 – pB15-ALDH-Myc- $\alpha$ -Actinin

Myc- $\alpha$ -Actinin wurde zunächst über eine PCR mit den Primern #497 und #447 auf Plasmid #682 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin) amplifiziert und nach einem A-Tailing in den pGEM-Teasy-Vektor kloniert, resultierend in Plasmid #835 (pGEM-Teasy-Myc- $\alpha$ -Actinin). Ausgeschnitten wurde das Insert mit Xho I und über die gleiche Schnittstelle in Vektor #742 (pB15-ALDH (-Stop-Codon)) ligiert, resultierend in Plasmid #792 (pB15-ALDH-Myc- $\alpha$ -Actinin).

#793 – pDBsrXP-VAM-Filamin $\Delta$ CH

VAM-Filamin $\Delta$ CH wurde mittels der Enzyme Bgl II und Xho I aus Vektor #741 (pB15-VAM-Filamin $\Delta$ CH) ausgeschnitten und über BamH I und Xho I in Vektor #765 (pDBsrXP-mRFP) ligiert, resultierend in Vektor #793 (pDBsr-XP-VAM-Filamin $\Delta$ CH).

## #794 – pDneo2a-SLB350-Myc-Ssj758

Für die Ligation von Myc-Ssj758 C-terminal von SLB350 wurden die Vektoren #644 (pB15-VAM-Ssj758) und #699 (pDneo2a-SLB350-Myc-VASP) mit BamH I und Xho I verdaut. Mittels Gelaufreinigung wurde aus Plasmid #644 das Insert Myc-Ssj758 und aus Plasmid #699 der Restvektor pDneo2a-SLB350

gewonnen. Beide Fragmente wurden anschließend in einer Ligation miteinander fusioniert, resultierend in Plasmid #794 (pDneo2a-SLB350-Myc-Ssj758).

#795 – pB15-ALDH-Myc-Filamin

Durch eine PCR mit den Primern #497 und #449 auf Plasmid #648 (pB15-VAM-Filamin) wurde Myc-Filamin amplifiziert. Nach einem A-Tailing erfolgte die Ligation in pGEM-Teasy, wodurch der Vektor pGEM-Teasy-Myc-Filamin entstand (#834). Mittels Xho I erfolgte die Isolierung des Insert aus Plasmid #834 und die Ligation in Vektor #742 (pB15-ALDH (-Stop-Codon)), der mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten wurde. Daraus resultierte Plasmid #795 (pB15-ALDH-Myc-Filamin).

#796 – pDBsrXP-VAM-Filamin

In getrennten Verdauansätzen wurde aus Vektor #648 (pB15-VAM-Filamin) zum einen VacuolinA mittels Bgl II und BamH I und zum anderen Myc-Filamin mittels BamH I und Xho I isoliert. Aus Plasmid #765 (pDBsrXP-mRFP) wurde durch einen Verdau mit BamH I und Xho I mRFP ausgeschnitten und zunächst nur mit VacuolinA ligiert. Nach einer Stunde wurde auch Filamin zum Ligationsansatz zugegeben und für eine weitere Stunde ligiert. Es entstand Plasmid #796 (pDBsrXP-VAM-Filamin).

#836 – GFP-LSD-Ssj758

Mittels PCR (Primer #129 und #130) auf Plasmid #406 wurde Ssj758 amplifiziert und nach einem A-Tailing in den pGEM-Teasy-Vektor ligiert, resultierend in Plasmid #547 (pGEM-Teasy-Ssj758). Mittels BamH I und Bgl II wurde Ssj758 aus #547 ausgeschnitten und über die BamH I-Schnittstelle in Vektor #739 (GFP-LSD (-Stop-Codon)) ligiert, wodurch Plasmid #836 (GFP-LSD-Ssj758) entstand.

#837 – GFP-LSD- $\alpha$ -Actinin

Auf Vektor #682 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin) erfolgte mittels der Primer #621 und #662 eine PCR, um  $\alpha$ -Actinin zu amplifizieren und nach einem BamH I-Verdau in Vektor #739 (GFP-LSD (-Stop-Codon)) zu ligieren, was in Plasmid #837 (GFP-LSD- $\alpha$ -Actinin) resultierte.

## #838 – GFP-LSD-Filamin

Auf Vektor #648 (pB15-VAM-Filamin) erfolgte mittels der Primer #620 und #661 eine PCR, um Filamin zu amplifizieren und nach einem BamH I-Verdau in Vektor #739 (GFP-LSD (-Stop-Codon)) zu ligieren, was in Plasmid #838 (GFP-LSD-Filamin) resultierte.

## #841 – pB15-VAM-Abp34

Abp34 wird mittels den Primern #672 und #673 auf aufgereinigte cDNA aus *D. discoideum* gewonnen und dem A-Tailing folgend zunächst in den pGEM-Teasy-Vektor ligiert, resultierend in Plasmid #844 (pGEM-Teasy-Abp34). Mittels einem Xba I / Xho I-Restriktionsverdau wird das Insert aus diesem Vektor gewonnen und in #519 (pVAM-VASP), der mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde, wodurch VASP verloren geht, resultierend in Plasmid #841 (pB15-VAM-Abp34).

#842 - pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo

Durch eine PCR mittels der Primer #446 und #690 auf Plasmid #682 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin) wurde  $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo gewonnen und nach einem Xba I / Xho I-Doppelverdau in das ebenso verdaute Plasmid #519 (pVAM-VASP), wodurch VASP verloren geht, ligiert. Es entstand Plasmid #842 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo).

#843 - pB15-VAM-Filamin $\Delta$ Oligo

Durch eine PCR mit den Primern #448 und #691 auf Plasmid #682 (pB15-VAM- $\alpha$ -Actinin) wurde das Insert Filamin $\Delta$ Oligo gewonnen, welches mit Xba I und Xho I verdaut wurde, um mit Vektor #519 (pVAM-VASP) ligiert zu werden, aus dem zuvor mittels der gleichen Enzyme VASP entfernt wurde. Daraus resultiere Vektor #843 (pB15-VAM-Filamin $\Delta$ Oligo).

## 6.13 Oligonukleotide

Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma MWG und Invitrogen.

Annealing-Temperatur: 55-58 °C

#16	5'-tgaagatctaaatgattgaaggtaggtagtaaaactccaaagag-3'
#159	5'-cgtctcgacatgtcatctcaagaacaacaaaaatcaaagc-3'
#172	5'-cgtctcgagtaatggtgagatgctctgattgc-3'
#264	5'-cgctactctagagccgatgtttcc-3'
#265	5'-gcgatgctcgagttagttggtgattgttacc-3'
#270	5'-ccgtgactcgagttataagatgtgtcttcg-3'
#288	5'-ggctactcgagtaattatattatattctttg-3'
#296	5'-ggtgtaatggtggtgg-3'
#331	5'-cgatcggatcctctagtgaaacaaaaattaattcag-3'
#391	5'-cgattctagatccgttcaaatcagcc-3'
#392	5'-cgatctcgagtaacttgaggaatcgg-3'
#434	5'-ccattctagaatagcaagttatgtgaagtagtcgc-3'
#446	5'-gctattctagatcagaagaaccaacccag-3'
#447	5'-cgtatctcgagttattggtataattttcagc-3'
#448	5'-gctattctagagctgctgctccaagtgg-3'
#449	5'-gctatctcgagtaattggcagtagcag-3'
#477	5'-cgtatctagaatggtagtccaactattagtg-3'
#478	5'-cgattctagattaataatctgaccattcatcatcg-3'
#496	5'-cgatctcgagtaataatctgaccattcatcatcg -3'
#497	5'-cgatcctcgagatgcttagtgaacaaaaattaattcag-3'
#504	5'-cgatggatccatgagtgaacagcaatttttaatgc-3'
#505	5'-cgatagatcttaatggtgagatgctctgattgc-3'
#506	5'-cgtaggatccattggtgagttatcattgaagatgaag-3'
#533	5'-cgtagagctcatgtcaacatcagcagc-3'
#534	5'-cgtactcgagccaaccagaacc-3'
#536	5'-cgtatctagacgtgattatgactcaac-3'

#537 5'-cgtatctagattttctgcctctagaaaagc-3'  
 #561 5'-cgtaacgcgtagattgaaggtagg-3'  
 #562 5'-ggtaacgcgttaattggcagtag-3'  
 #620 5'-ccgtggatccatggctgctccaagtgg-3'  
 #621 5'-ccgtggatccatgacagaagaaccaacccag-3'  
 #661 5'-cgatggatccttaattggcagtag-3'  
 #662 5'-cgtaggacctattggtataattttcagc-3'  
 #672 5'-cgtatctagaatggcagaaacaaaagttgcacc-3'  
 #673 5'-cgtactcgagttattctttgtggaccgtatctcttttctttcttc-3'  
 #690 5'-cgtaactcgagttatctagaggcagaaaagtgatgtagtattgag-3'  
 #691 5'-cgtaactcgagttagaataagagacgtaggtgatg-3'

## 6.14 Online-Programme

- *Dictyostelium*-Datenbank: <http://dictybase.org/>
- Multalign (Sequenzvergleich): <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>
- Fermentas: <http://www.fermentas.com>
- Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>
- SMART: <http://smart.embl-heidelberg.de/>

## 6.15 Biologische Materialien

Bakterien-Stämme: *Escherichia coli JM105*  
*Escherichia coli DH5a*  
 Top Ten *E.coli* (Invitrogen, USA)  
*Klebsiella aerogenes*

Hefe-Zellen: Cat. # Ysc-2, Sigma-Aldrich, München

*Dictyostelium*-Stämme: AX2 (Watts & Ashworth, 1970)  
 VASP<sup>-</sup> (Strain DBS0237034; Dicty Stock Center; (65))  
 AbpC<sup>-</sup> (Strain DBS0236077; Dicty Stock Center; (262))

## 7. Methoden

Ein Großteil der Methoden wurde aus meiner Diplomarbeit übernommen und unter Umständen überarbeitet (149).

### 7.1 Molekularbiologische Methoden

#### 7.1.1 Präparation von Nukleinsäuren aus *Escherichia coli*

##### 7.1.1.1 Minipräparationen von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus einem einzelnen Klon werden zunächst 1,5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Zellen angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C bebrütet. Am Folgetag werden die Zellen für 3 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und in 200 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II werden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgt das vorsichtige Mischen mit 200 µl Lösung III und eine 5minütige Inkubationszeit auf Eis. Die Bildung eines weißen Niederschlages ist zu beobachten, der für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert wird. Dieser, sowie alle folgenden Zentrifugationsschritte werden bei 4 °C durchgeführt, um die Ausbeute von kleinen DNA-Mengen zu erhöhen. Der Überstand wird in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0.7 Vol Isopropanol vermischt. Die dadurch ausfallende Plasmid-DNA wird für 10 min bei 13.000 rpm pelletiert und mit 300 µl 70 %igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wird in einer Vakuumzentrifuge für einige Minuten getrocknet und in 30 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst, unterstützt durch eine 10minütige Inkubation bei 60 °C. Für die Analyse der DNA mittels eines Kontrollverdaus (7.1.3.5) werden 10 µl DNA verwendet.

##### 7.1.1.2 Midipräparationen von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus einer 30 ml Zellkultur erfolgt mittels des PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit der Firma Invitrogen. Zur Vorbereitung wird am Vortag die gewünschte Kultur in einem Erlenmeyerkolben angesetzt und über Nacht bei 37 °C angezogen. Für die weitere Durchführung wird sich an die Angaben des Herstellers gehalten, unter Verwendung der mitgelieferten Lösungen. Die isolierte und getrocknete DNA wird in 200 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und unter leichtem Schütteln bei 60 °C für 10 min gelöst. Es folgt die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.

## 7.1.2 Präparation von Nukleinsäuren aus *Dictyostelium discoideum*

### 7.1.2.1 Isolierung von RNA

Bis auf die erste Zentrifugation erfolgen alle Weiteren bei 13000 rpm und RT.

Zellen, die auf einer 10 cm (Ø) Petrischale angewachsen wurden, werden mit 10 ml P-Puffer abgespült und für 3 min bei 1200 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µl Solution D gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach der Zugabe von 50 µl 3 M NaAc (pH4.7) und 500 µl PCIA für 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach einer 10minütigen Zentrifugation wird die transparente Phase in ein neues Reaktionsgefäß gebracht, mit 1 Vol Isopropanol überdeckt und erneut für 1 h bei -20 °C gelagert. Dem 30minütigen Pelletieren folgt das Resuspendieren des Pellets in 300 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 30 µl 8 M LiCl und 750 µl 100 %igen Ethanol. Es folgen eine 10minütige Zentrifugation und das Trocknen des Pellets in der Speed-Vac. Die gereinigte RNA wird in 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 7.1.2.2 Isolierung von genomischer DNA

Die ersten Schritte werden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt.

Eine bewachsene Petrischale (Ø 10 cm) wird mit 10 ml Medium abgespült, die Zellen 3 min bei 1200 rpm pelletiert, einmal mit P-Puffer gewaschen und in 1 ml Kernlyse-Puffer resuspendiert. Die Probe wird für einige Minuten auf Eis gekühlt. Es folgen die Zugabe von 60 µl 20 % NP40-Lösung und eine erneute Kühlung der Probe für wenige Minuten auf Eis. Die Pelletierung der Zellkerne wird für 8 min bei 4000 rpm durchgeführt und in 1 ml Kernlyse-Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt werden die Kerne in 200 µl Puffer 6.6.2 aufgenommen und zusammen mit 7 µl 10 %iger SDS-Lösung und 15 µl Proteinase K für 2 h bei 65 °C in ihrer Struktur zerstört. Die nächsten Handlungen erfolgen bei RT. Es folgt eine zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion wobei stets mit der oberen Phase gearbeitet wird: Zugabe von 2 Vol PCIA, 30 min taumelnd inkubieren und im Anschluss 5 min abzentrifugieren. Ist die obere Phase nach dem zweiten Durchgang noch trüb, so kann die Extraktion wiederholt werden. Ansonsten wird die obere Phase nun mit 0,6 Vol Isopropanol und 0,1 V LiCl leicht vermischt, 30 min bei 13400 rpm zentrifugiert und mit 200 µl 70 %igen Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wird in 100 µl ddH<sub>2</sub>O und 10 min bei 65 °C gelöst. Die Konzentration wird mittels eines Photometers bestimmt und sollte zwischen 200-500 µg / µl liegen.



### 7.1.2.3 Gewinnung von cDNA

Hierfür werden 1 µg der aufgereinigten RNA (7.1.2.1) zusammen mit 1 µl 10 x Reaktionspuffer mit MgCl<sub>2</sub>, 1 µl DNaseI (RNase-frei), 0,25 µl RiboLock RNase Inhibitor und DEPC-Wasser (aufgefüllt auf 9 µl) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 25 mM EDTA wird der Mix für 10 min bei 65 °C gehalten und im Anschluss sofort auf Eis abgekühlt. Die präparierte RNA kann als Template für die Reverse Transkriptase verwendet werden. Hierfür werden wiederum circa 440 ng der RNA zusammen mit je 2 µl (10 µM) Primer (15-20 pmol) mit DEPC-Wasser auf 12,5 µl aufgefüllt und für 5 min bei 65 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und vorsichtig gemischt. Es folgt die Zugabe von 4 µl Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix (jedes 10 mM), 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor und 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase. Nach einer 60minütigen Inkubation bei 42 °C und einer 10minütigen Stoppreaktion bei 70 °C können 2 µl der Reaktionsmischung für eine PCR (7.1.3.1) verwendet werden.

## 7.1.3 Enzymatische Reaktionen

### 7.1.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten *in vitro* erfolgt mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion, die erstmalig 1985 von Saiki *et al.* beschrieben wurde (263).

Unter Verwendung einer doppelsträngigen DNA-Matrize, einem N-terminal und einem C-terminal begrenzenden Oligonukleotidprimer, dNTPs, einer DNA-Polymerase und des entsprechenden Puffers, werden circa 20 PCR-Zyklen durchlaufen (Tab. 07). Diese bestehen aus DNA-Denaturierung, Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige Template-DNA (Annealing) und Verlängerung der Primer (Elongation), so dass am Ende der PCR eine Vielzahl an gewünschter doppelsträngiger DNA vorliegt. Die hierfür verwendete hitzestabile KOD Hot Start DNA Polymerase der Firma Novagen gewährleistet ausgezeichnete Genauigkeit bei der Amplifikation und eine hohe Prozessivität, ermöglicht durch die Fusion eines *Pyrococcus*-ähnlichen Enzyms und einer doppelsträngigen DNA-bindenden Domäne. Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme stützen sich auf folgendes Standard-Programm und können durch Veränderung einzelner Parameter jederzeit den erforderlichen Bedingungen angepasst werden:

Anzahl der Zyklen	PCR-Schritt	Zeit	Temperatur
1	Initiale Denaturierung	2 min	95 °C
19	Denaturierung	20 s	95 °C
	Annealing	10 s	55-58 °C
	Elongation*	10-25 s / 1 kb	70 °C
1	Finale Elongation	5 min	70 °C
	Kühlen		4 °C

Tab. 07 – PCR-Programm der KOD Hot Start DNA Polymerase

\*Elongations-Zeiten: <500bp: 10 s / kb  
500bp-1kb: 15 s / kb  
1kb-3kb: 20 s / kb  
>3kb: 25 s / kb

Für analytische Zwecke wird ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt, von dem 2 µl, zusammen mit 1 µl 5x DNA-Auftragspuffer auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen werden.

Wird das zu amplifizierende Fragment für weitere enzymatische Reaktionen, wie A-Tailing (7.1.3.2), Phosphorylierung (7.1.3.4), Verdau (7.1.3.5), Blunten (7.1.3.6; 7.1.3.7) oder Ligation (7.1.3.9) weiter verwendet, so wird ein Ansatz von 50 µl vorbereitet und die DNA nach erfolgter PCR mittels dem QIAquick® PCR-Purification Kit von Qiagen oder dem NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt.

### 7.1.3.2 A-Tailing von PCR-Fragmenten und Ligation in pGEM®-T Easy Vector

Um PCR-Fragmente für das pGEM®-T Easy Vector System von der Firma Promega verwenden zu können, müssen diese einem A-Tailing unterzogen werden. Hierfür wird die charakteristische Eigenschaft der *Taq* DNA Polymerase ausgenutzt, templateunabhängig polymerisieren zu können. Dies äußert sich in dem Anhängen einer zusätzlichen Base, die nicht im Matrizenstrang codiert ist. Meist handelt es sich hierbei um ein Adenosin. Für den Reaktionsansatz werden 2 µl des gereinigten PCR-Fragmentes, 1 µl *Taq* DNA Polymerase Reaction 10x Buffer, 1 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 1 mM ATP und 5 u der *Taq* DNA Polymerase gemischt und für 30 min bei 70 °C inkubiert. Für die anschließende Ligation werden 2 µl Insert und 1 µl ddH<sub>2</sub>O zusammen mit 5 µl 2x Rapid Ligation Buffer, 1 µl pGEM®-T Easy Vector und 1 µl T4 DNA Ligase (die letzten drei Reagenzien entstammen dem pGEM®-T Easy Vector System I) für 1-2 h bei RT stehen gelassen und anschließend sofort in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert. Der Nachweis von positiven Klonen erfolgt mittels der Blau-Weiß-Selektion (7.1.3.3).

### 7.1.3.3 Blau-Weiß-Selektion

Grundlage dieses Tests ist die relative Unspezifität des  $\beta$ -Galactosidase-Enzyms, das durch das *lacZ*-Gen auf dem pGEM®-T Easy Vector codiert ist. Dieses Enzym spaltet neben dem natürlichen Substrat Laktose auch eine Reihe synthetischer Stoffe, wie z. B. das hier verwendete X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid). Bei der Hydrolyse von X-Gal entstehen der farblose Stoff Galaktose und das blaue Präzipitat 4-chloro-3-brom-indigo. Ist eine Kolonie fähig das  $\beta$ -Galaktosidase-Enzym zu produzieren, so erscheint diese in Anwesenheit von X-Gal blau. Ist allerdings die Aktivität durch eine Insertion von Fremd-DNA in das enzymcodierende Gen zerstört, so bleibt die Spaltung von X-Gal aus und die Kolonie erscheint weiß. Zum Nachweis einer erfolgreichen Transformation eines klonierten pGEM®-T Easy Vectors wird der Transformationsansatz auf Selektionsplatten, zusammen mit 20  $\mu$ l 100 mM IPTG und 35  $\mu$ l X-Gal (50 mg / 1 ml DMF) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. IPTG ist ein synthetisches Analog der Laktose und induziert die Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase durch Bindung an den *lac*-Repressor, wodurch dieser inaktiviert wird. Weiße Kolonien werden gepickt, in 1,5 ml Selektionsmedium bei 37 °C inkubiert und am Folgetag einer Minipräparation (7.1.1.1) unterzogen. Mittels eines analytischen Restriktionsverdaus (7.1.3.5) wird die Ligation überprüft.

### 7.1.3.4 Phosphorylierung von 5'-OH-Gruppen

Die Fähigkeit der T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK), nämlich den Transfer des  $\gamma$ -Phosphats von ATP auf eine 5'-OH-Gruppe einer einzel- oder doppelsträngigen DNA bzw. eines Oligonukleotids katalysieren zu können, wird in dieser Arbeit benötigt, um zwei verschiedene DNA-Fragmente, für deren Amplifizierung Primer ohne flankierende Schnittstellen verwendet werden, für eine „blunt end“-Ligation nutzen zu können. Die bei der Firma MWG angeforderten Primer werden ohne zusätzliche Modifikationen geliefert und besitzen somit nach der Produktion kein 5'-Phosphat, das für eine Ligation mittels der T4 DNA Ligase notwendig ist. Hierfür werden 15  $\mu$ l des aufgereinigten PCR-Ansatzes zusammen mit 2  $\mu$ l 10x Reaction Buffer A für T4 PNK, 2  $\mu$ l 10 mM ATP und 1  $\mu$ l T4 PNK für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer erneuten Aufreinigung der DNA mittels dem QIAquick® PCR-Purification Kit von Qiagen oder dem NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel können die DNA-Fragmente für eine Ligation verwendet werden.

#### 7.1.3.5 Verdau von Plasmiden und PCR-Fragmenten

Für den analytischen Verdau von Plasmiden werden 0,5-1 µg DNA, zusammen mit 4 u des erforderlichen Restriktionsenzym pro 1 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Hierbei ist zu beachten, dass die Enzymmenge maximal 10 % des Gesamtvolumens beträgt, um negative Einflüsse des Glycerins zu vermeiden. Die Art und Menge des Puffers richtet sich nach den Enzymen und wird entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Nach einer 1-2-stündigen Inkubation bei 37 °C wird der gesamte Ansatz, zusammen mit 4 µl 5x DNA-Auftragspuffer auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und analysiert. Für den Verdau von Plasmiden, als Vorbereitung für eine Ligation, werden 3-5 µg DNA eingesetzt und für 1-2 h mit den entsprechenden Enzymen inkubiert. Um PCR-Fragmente (7.1.3.1) zu verdauen, wird der gesamte PCR-Ansatz mittels dem QIAquick® PCR-Purification Kit von Qiagen oder dem NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel gereinigt, in 30 µl Elutionspuffer gelöst und in einem Gesamtvolumen von 40-50 µl verdaut.

#### 7.1.3.6 Blunten mittels der T4 DNA Polymerase

Um „sticky ends“ einer „blunt end“-Ligation unterziehen zu können, müssen die ungepaarten Basen zunächst entfernt werden. Dies erfolgt mithilfe der T4 DNA Polymerase, die neben einer 3'→5' Exonukleaseaktivität die Fähigkeit besitzt, die 5'→3' Synthesen einer gepreimten einzelsträngigen DNA zu katalysieren. Der Reaktionsansatz wird gemäß dem Herstellerprotokoll vorbereitet und für 20 min bei 20 °C inkubiert, bevor die DNA mittels dem QIAquick® PCR-Purification Kit von Qiagen oder dem NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt und für weitere Reaktion eingesetzt wird.

#### 7.1.3.7 Blunten mittels dem Klenow-Fragment

Für das Auffüllen von 5'-Überhängen wird mit dem Klenow-Fragment gearbeitet. Hierbei handelt es sich um die große Einheit der DNA Polymerase I, die eine 5'→3'-Polymerase- und eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität besitzt. Für den Ansatz wird die gereinigte DNA mit 10x Reaktionspuffer, 1-2 µl dNTP-Mix (jeweils 2 mM) und 1-5 u des Enzyms gemischt und je nach Gesamtvolumen entsprechend mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Reaktion erfolgt für 10-20 min bei 37 °C und wird durch ein 10minütiges Erwärmen auf 75 °C gestoppt.

#### 7.1.3.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Für eine Ligation von einem Plasmid mit einem Insert wird, um eine Religation mit sich selbst zu verhindern, das linearisierte Plasmid dephosphoryliert, sofern es mit nur einem einzigen Enzym geschnitten wurde. Hierfür wird ca. eine Stunde nach Ansetzen des Verdau die alkalische Phosphatase FastAP zugegeben und für bis zu einer weiteren Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einer Aufreinigung mittels dem QIAquick<sup>®</sup> PCR-Purification Kit von Qiagen oder dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit von Macherey-Nagel kann das Plasmid für Ligationsprozesse (7.1.3.9) verwendet werden.

#### 7.1.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von 2 DNA-Fragmenten erfolgt in einem Gesamtvolumen von 20 µl, wobei das Insert in einem 3-5fach molaren Überschuss in Bezug auf den Vektor eingesetzt wird. Die Menge der einzusetzenden T4 DNA Ligase und des dazu gehörenden Puffers erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers. Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur: 20 min für eine „sticky end“-Ligation und 30 min für eine „blunt end“-Ligation. Der Ansatz wird ohne weitere Aufreinigung oder Deaktivierung der Ligase für die Transformation in *E.coli*-Zellen verwendet.

### 7.1.4 Gelelektrophorese

#### 7.1.4.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine sehr effektive Methode, durch verschiedene Agarosekonzentrationen unterschiedlich große DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen. Für die Herstellung der Gele wird die Agarose im gewünschten Prozentsatz ([w/v]) abgewogen und in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Die Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (EtBr) / 500 ml geschmolzener Agarose ermöglicht das Sichtbarmachen der DNA im Gel. Ist die erhitzte Agarose etwas abgekühlt, so wird sie in eine zuvor mit Agarose abgedichteter Gelkammer gegossen, die wiederum mit einem Probenkamm versehen wird. Dieser dient der Bildung der Taschen, in die nach der Erhärtung der Agarose und Entfernung des Kamms die DNA-Proben eingebracht werden. Bevor die Proben aufgetragen werden, wird die Kammer mit 1x TBE-Puffer gefüllt, so dass das Gel gut überschichtet ist. Die DNA-Proben werden mit 5x DNA-Auftragspuffer (Endkonzentration: 1fach) versehen. Das zusätzliche Auftragen eines DNA-Längenstandards ermöglicht die Größenbestimmung der einzelnen Fragmente. An die Gelkammer wird für 30-60 min (je nach gewünschtem Auftrennungsgrad) eine Spannung von 5-10 V / cm Elektrodenabstand

angelegt. Durch den Einfluss des elektrischen Felds wandert die negativ geladene DNA in Richtung der positiv geladenen Anode, während das im Gel enthaltene EtBr in der doppelsträngigen DNA interkaliert. Durch diese Interaktion ändert sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs, nicht aber das Emissionsspektrum, und fluoresziert sehr stark bei Anregung mit UV-Licht (366 nm). Dies ist erkennbar durch orange erscheinende Banden, wobei die Intensität der Banden mit der Größe der Fragmente, sowie deren Konzentrationen korreliert. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Größen von 1-10 kb werden 1 %ige Agarosegele, für Fragmente im Größenbereich 100-1000 kb hingegen 2 %ige Gele gegossen.

#### 7.1.4.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA im Gel wird mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel geschnitten. Dabei sollte drauf geachtet werden, dass die UV-Exposition so gering wie möglich bleibt, um der Bildung von Thymindimeren in der DNA entgegen zu wirken. Die Aufreinigung erfolgt mit dem QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit der Firma Qiagen oder mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel. Bei der Verwendung der mitgelieferten Puffer wird sich an die Angaben der Hersteller gehalten. Die DNA wird mit 30 µl Elutionspuffer eluiert und die DNA-Ausbeute über Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt.

## 7.2 Transformationstechniken

Alle Durchführungen erfolgen unter sterilen Bedingungen.

### 7.2.1 *Escherichia coli*

#### 7.2.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen werden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie eines *Escherichia coli* – Stamms angeimpft und über Nacht unter leichtem Schütteln (~250 rpm) bei 37 °C inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur werden am Folgetag 100 ml LB-Medium angeimpft und unter den bereits erwähnten Bedingungen gehalten, bis die Kultur bei einer Wellenlänge von 550 nm eine optische Dichte von 0.3-0.4 erreicht hat. Die Zellen werden in sterile und vorgekühlte Falconröhrchen überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgt das Pelletieren für 7 min bei 2500 rpm und 4 °C und das Resuspendieren in 10 ml eisgekühlten CaCl<sub>2</sub>-Puffer. Dieser Vorgang wird wiederholt, um im Anschluss daran die Bakterien für weitere 30 min auf Eis zu inkubieren. Die Zellen werden für 5 min pelletiert und in 4 ml

CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert, um in einem letzten Schritt in 200 µl Aliquots aufgeteilt zu werden. Diese Aliquots werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können bis zu einem Jahr bei -70 °C aufbewahrt werden.

#### 7.2.1.2 Klassische Transformation

Für die Transformation in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , JM-109 oder Top Ten werden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und zusammen mit der zu transformierenden DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 90sekündigen Hitzeschock bei 42 °C (Wasserbad oder Thermomixer) und einer 2-3minütigen Abkühlung auf Eis werden die Zellen direkt auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gehalten. Für die erstmalige Transformation einer neu ligierten DNA (7.1.3.9) wird der gesamte Ligationsansatz verwendet. Für eine Retransformation eines schon existierenden Vektors werden circa 1 µg DNA eingesetzt.

### 7.2.2 Dictyostelium discoideum

#### 7.2.2.1 Klassische Transformation

Diese Transformationstechnik wird verwendet, wenn die Elektroporation (7.2.2.2) auf Dauer keinen Erfolg bringt.

Insgesamt  $1 \times 10^6$  *Dictyostelium*-Zellen einer Schüttelkultur der Dichte  $1-3 \times 10^6$  Zellen / ml Medium werden in eine sterile Petrischale überführt und dort für 1 h bei 22 °C belassen. Das Medium wird durch 10 ml MES-HL5 (pH 7.1) ersetzt und für weitere 30 min inkubiert. In der Zwischenzeit werden 12 µg der zu transformierenden DNA mit 1x HBS auf ein Gesamtvolumen von 600 µl gebracht und unter Zugabe von 38 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> 10 s gut gemischt und für 25 min bei RT stehen gelassen. Das Medium wird von den Zellen entfernt und vorsichtig durch tropfenweise Zugabe der DNA-Lösung ersetzt und durch vorsichtiges Schwenken auf alle Zellen verteilt. Nach 25 min werden 10 ml MES-HL5 (pH 7.1) mit Ampicillin (40 µg / ml) hinzugefügt und für 3 h inkubiert. Nach der Entfernung des Mediums werden vorsichtig 2 ml 18 %ige Glycerin-Lösung (in 1x HBS) auf die Platte pipettiert und für maximal 5 min auf den Zellen belassen. Es folgt ein Austausch durch 10 ml G0-Medium. Am nächsten Tag werden die Zellen unter Selektionsdruck gesetzt. Das Medium wird alle 2-3 Tage durch Frisches ersetzt und nach circa 5-10 Tagen werden je nach Selektionsdruck die ersten Klone sichtbar sein.

### 7.2.2.2 Elektroporation

Zunächst werden  $2 \times 10^7$  axenisch gewachsene *Dictyostelium*-Zellen aus einer Schüttelkultur mit einer Dichte von  $1-2 \times 10^6$  c / ml Medium in ein Falconröhrchen überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden für 3 min bei 1200 rpm und 4 °C abzentrifugiert und einmal in eiskaltem Soerensen-Phosphatpuffer und zweimal in eiskaltem Elektroporationspuffer (EP-Puffer) gewaschen. Es folgt das Aufnehmen der Zellen in circa 700 µl EP-Puffer und die Zugabe von 20-40 µg Plasmid-DNA, wobei das Gesamtvolumen 800 µl betragen sollte. Das Gemisch wird in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 4 mm überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation selbst erfolgt im Gene Pulser von Bio Rad unter folgenden Einstellungen: 25 µF Kapazität; 1 kV Spannung; ohne externen Widerstand. Die Zeitkonstante sollte zwischen 2 und 3 ms liegen. Nach dem erfolgten Elektropuls wird die Küvette für weitere 10 min auf Eis gekühlt. Zur Regeneration werden die Zellen auf einer Petrischale (Ø 10 cm) in 8 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub> und 8 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub> inkubiert und nach 15 min mit 10 ml G0-Medium vorsichtig überschichtet. Am Folgetag wird das G0-Medium durch entsprechendes Selektionsmedium ersetzt und jeden 2.-3.Tag erneuert, um die Kultur von bereits abgestorbenen Zellen zu reinigen. Bei erfolgreicher Transformation sollten, je nach Selektionsdruck, nach 5-10 Tagen deutlich Kolonien zu sehen sein.

## 7.3 Zellbiologische Methoden

Alle Durchführungen erfolgen unter sterilen Bedingungen.

### 7.3.1 Anzucht in Flüssigmedium

Der wildtypische Laborstamm AX2 kann aufgrund entsprechender Mutationen entgegen des Freilandstammes in axenischem Medium (G0-Medium) kultiviert werden. Das Anziehen einer *Dictyostelium*-Kultur kann – bei 22 °C und Dauerlicht – entweder in 24-Well Costar-Platten, in Petrischalen (Ø 5 cm, 10 cm) oder in Kolben erfolgen, wobei letztere nur zu 1/3 mit Medium gefüllt wird, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Zudem erfolgt die Inkubation im Kolben unter permanentem und leichtem Schütteln auf einem Lab-Shaker bei ~150 rpm. Das Animpfen einer Kultur erfolgt entweder mit Zellen aus einer Vorkultur oder durch Sporen. Dabei sollte eine Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen bzw. Sporen pro 1 ml Kultur nicht unterschritten werden. Die Anzucht von Transformanten erfolgt unter dem Zusatz von entsprechenden Selektionsantibiotika. Die Generationszeit von AX2 beträgt



circa 10 h. Die der Transformanten weicht, je nach Defekt, mehr oder weniger davon ab und sollte für jede Mutante – sofern notwendig – extra bestimmt werden.

### 7.3.2 Subklonierung

Abhängig von der Anzahl der Klone auf einer Elektroporationsplatte werden diese mit 200-1000 µl Soerensen-Phosphatpuffer (P-Puffer) ab gespült und eine Verdünnungsreihe (1:100; 1:1000; 1:10000 – je circa 200 µl) angesetzt. Die Verdünnung erfolgt mit einer *Klebsiella aerogenes*-Suspension, bei der die Bakterien ebenfalls mit P-Puffer von bewachsenen SM-Platten ab gespült werden. Die Lösungen werden auf SM-Platten ausplattiert und solange bei 22 °C bebrütet, bis deutliche Fresshöfe zu sehen sind, was meist schon nach 3 Tagen der Fall ist. Mit einem Zahnstocher werden vegetative Zellen von den Fressrändern in 24-Well Costar-Platten mit entsprechendem Selektionsmedium überführt und weiterhin bei 22 °C inkubiert. Wenn notwendig (kein Anwachsen von Zellen) werden die Klone nach dem Picken direkt in G0-Medium gebracht und erst nach 1-2 Tagen dem Selektionsdruck ausgesetzt.

### 7.3.3 Sporengewinnung

30 ml einer Schüttelkultur mit einer Zellzahl von  $\sim 4 \times 10^6$  c / ml Medium werden 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und mit ½ Volumen Soerensen-Phosphatpuffer (P-Puffer) zweimal gewaschen. Das Pellet wird in 500 µl P-Puffer gelöst und auf einer Phosphat-Agarplatte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgt bei 22 °C. Nach 2 Tagen haben die Zellen Fruchtkörper ausgebildet. Um die Sporen zu ernten wird die Platte mit 3-5 ml P-Puffer ab gespült, wodurch sowohl Sporenköpfe als auch Stiele gewonnen werden, in Einfrierröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgt bei -70 °C. Zur Animpfung einer frischen Kultur wird die gewünschte Menge an Sporen (100-200 µl) aufgetaut und über Nacht in G0-Medium bei 22 °C inkubiert. Sind am Folgetag schon einige *Dictyostelium*-Zellen zu sehen, so kann das Medium durch Selektivmedium ersetzt werden.

### 7.3.4 Aufreinigung der Aggregate aus *Dictyostelium*-Zellen

Alle Schritte erfolgen bei 4 °C und mit eiskalten Lösungen.

Um die Aggregate für massenspektrometrische und immunhistochemische Analysen aus den *Dictyostelium*-Mutanten zu isolieren werden zunächst  $2 \times 10^7$  Zellen in einem Falcon-Röhrchen für 10 min auf Eis abgekühlt. Nach einer 3minütigen Zentrifugation bei 1200 rpm wird das Pellet in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis gehalten. Im Folgenden werden die Zellen in einem Ultraschallbad in 3 Zyklen homogenisiert: 30 s

Sonifizierung, 30 s Abkühlung auf Eis. Die Aggregate werden für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und erneut in Lysispuffer aufgenommen. Dieser Vorgang wird noch insgesamt 3mal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wird das Pellet zur Weiterverarbeitung für die massenspektrochemischen Untersuchung in die Abteilung Biochemie gegeben. Für die Analyse mittels Western Blot (7.4.3) wird das Pellets in 50 µl Laemmli gelöst und 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Die fertigen Proben können direkt auf ein SDS-Gel (7.4.2) aufgetragen oder bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren werden.

Lysispuffer:

20 mM HEPES pH 7.5

40 mM MgCl<sub>2</sub>

20 % Sucrose

14 mM β-Mercaptoethanol

frische Zugabe von: 1 % Triton-X-100 und 1 Tablette Complete, Mini (Protease Inhibitor Tabletten)

7.3.5 Transit-Assay

Zu Beginn werden  $1 \times 10^8$  Zellen einer *Dictyostelium*-Kultur mit einer maximalen Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen pro 1 ml bei 1200 rpm für 3 min geerntet und vorsichtig aber zügig in einem Gemisch aus 40 mg TRITC-Dextran (gelöst in 10 ml G0-Medium) und 4 mg FITC-Dextran (gelöst in 1 ml G0-Medium) resuspendiert. Unter leichtem Schütteln (~150 rpm) wird die Kultur bei 22 °C inkubiert. Nach 20 min werden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 10 ml axenischem Medium aufgenommen und in einen frisch silanisierten 25 ml Kolben überführt, in dem sie während der gesamten Versuchszeit weiterhin bei ~150 rpm leicht geschüttelt werden. Zu diesem Zeitpunkt ( $t = 0$ ) erfolgt die erste Entnahme einer 1 ml-Probe. Diese wird in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl Trypanblau versetzt (dieser Farbstoff dient der Überdeckung der zellexternen Fluoreszenz) und nach kurzem Mischen für 2 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, um die pelletierten Zellen im Anschluss in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer vorsichtig wieder zu resuspendieren. Es folgt die sofortige Überführung in eine Küvette und die Bestimmung der TRITC-, sowie der FITC-Fluoreszenz im Fluorimeter. Die zweite Probenentnahme folgt nach 30 min, alle weiteren in Intervallen von 15 min. Nach 120 min ist der Versuch abgeschlossen.

In einem Transit-Assay können zum einen die Ausscheidung von TRITC-haltigem Medium und zum anderen die pH-Änderungen in FITC-haltigen Endosomen jeweils über die Zeit bestimmt werden. FITC-Dextran ist ein pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff, der umso stärker

fluoresziert, je höher der pH-Wert ist. Der Quotient aus den relativen Fluoreszenzmesswerten von FITC und TRITC zu jedem Zeitpunkt ist ein Äquivalent zum pH-Wert und gibt somit Informationen über den pH-Verlauf in Endosomen. Die Messungen erfolgen bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm (TRITC) bzw. 480 nm (FITC) und einer Emissionswellenlänge von 574 nm (TRITC) bzw. 520 nm (FITC).

### 7.3.6 Phagozytose-Assay von Platte

Der Phagozytoseverlauf einer Zelle kann über die messbare Fluoreszenz von aufgenommenen TRITC-markierten Hefen ermittelt werden. Die Fluoreszenz extrazellulärer Hefen wird mittels Trypanblau gequenchet. Die Fluoreszenzbestimmung erfolgt bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 574 nm. Diese Fluoreszenzen werden später entsprechend der Proteinmengen umgerechnet. Dafür werden vor Versuchsbeginn die Zellen aus 3 Wells mit je 1 ml Phosphatpuffer ab gespült, für 3 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet kann bis zur Bestimmung der Proteinmenge mittels des Pierce BCA Kits bei -20 °C weg gefroren werden (siehe 7.4.6). Aufgrund des Zytokinesedefekts der zu untersuchenden Zellen wird der *Assay* nicht mit Schüttelkulturen sondern mit adhärent angewachsenen Zellen durchgeführt. Für den Phagozytose-*Assay* werden die Zellen mindestens 48 h auf Platte in G0-Medium angezogen. Vor Versuchsbeginn werden die Zellen mit G0 von der Platte ab gespült, in einen Kolben überführt, gezählt und auf eine 24er Costar-Platte überführt, mit jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well. Nach einem einstündigen Absitzen der Zellen, wird das Medium vorsichtig abgezogen und durch 1 ml frisches mit TRITC-Hefen versetztes G0-Medium ersetzt (6 Hefezellen pro *Dicty*-Zelle). Es wird sofort der Nullwert genommen, indem von jeweils einem Well pro Zelllinie die Zellen vorsichtig ab gespült und so vollständig wie nur möglich in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl vorgelegtem Trypanblau überführt werden. Es folgen ein 3minütiges Schütteln auf einem Rüttler und eine 2minütige Zentrifugation bei 3000 rpm. Der Überstand wird vorsichtig abgezogen und das Pellet in 1 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Diese Probe wird in die Küvette des Fluorimeters überführt und sofort gemessen. Alle weiteren Messungen erfolgen alle 15 min über einen Gesamtzeitraum von 2 h bzw. bis die Kurve des Phagozytoseverlaufs wieder abfällt.

#### 7.3.6.1 Herstellung TRITC-markierter Hefen

Hierfür werden 5 g Hefen in 50 ml PBS für 30 min rührend in einem kochenden Wasserbad inkubiert und anschließend 5mal mit PBS und 2mal mit Phosphatpuffer für jeweils 5 min bei

2500 rpm gewaschen. Darauffolgend wird die Hefekonzentration auf  $1 \times 10^9$  Hefen / ml Phosphatpuffer eingestellt. Die Hefen könne bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert werden. Für das Labeling werden  $2 \times 10^{10}$  Hefen geerntet und in 20 ml 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 9,2) resuspendiert. Nach der Zugabe der TRITC-Lösung (2 mg TRITC / 200  $\mu\text{l}$  DMSO), erfolgt eine 30minütige schüttelnde Inkubation bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Es folgen 2maliges Waschen mit 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 9,2) und 4maliges Waschen mit Phosphatpuffer für jeweils 5 min bei 2500 rpm. Die Konzentration der Hefen wird auf  $1 \times 10^9$  Hefen / ml Phosphatpuffer eingestellt. Diese werden in 1 ml Aliquots aufgeteilt und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

## 7.4 Proteinbiochemische Methoden

### 7.4.1 Gewinnung von Proteinproben

Für die Identifizierung von Klonen werden Proteinproben gewonnen, die mittels SDS-Gelen (7.4.2) der Größe nach aufgetrennt und mit Hilfe von entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (7.4.3 Western Blot). Die Gewinnung der Proteine erfolgt aus  $3 \times 10^6$  Zellen, die für 3 min bei 4000 rpm abzentrifugiert werden. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 50  $\mu\text{l}$  2-4fach Laemmli aufgenommen. Zur Unterstützung des Denaturierungsvorganges werden die Proben für 10 min bei  $95\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Die abgekühlten Proben können direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen oder bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden.

### 7.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (264)

Zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels werden zunächst die dafür benötigten Komponenten mit Spülmittel gereinigt und mit Ethanol nachpoliert: Dazu gehören zwei Glasplatten der Größe 20 cm x 16 cm und 20 cm x 14 cm und 3 Spacer mit einer Stärke von 1,5 mm. Diese Abstandhalter werden an den äußeren Seiten und am unteren Ende zwischen den beiden aufeinander liegenden Glasplatten mit Metallklammern fixiert und innerhalb der Platten mit 0,2 %iger geschmolzener Agarose abgedichtet. Ist diese ausgehärtet, folgt das vorsichtige Einlaufen des noch unpolymerisierten Trenngels (10 % PAA, siehe Tab. 08), das mit Isopropanol überschichtet wird, um eine gerade, luftblasenfreie Trenngelkante zu erhalten. Nach der Polymerisation des Trenngels wird der Alkohol abgenommen, das noch unpolymerisierte Sammelgel (3 % PAA, siehe Tab. 08) eingefüllt und der Probenkamm zwischen den Platten platziert. Ist auch das Sammelgel vollständig polymerisiert, so werden der Kamm und der untere Spacer vorsichtig entfernt und das fertige Gel in die Gelapparatur eingesetzt, die mit 1x PAA-Laufpuffer gefüllt wird. Nach dem Auftragen der Proteinproben

und eines geeigneten Längenstandards wird für die Elektrophorese der Proteine im Bereich des Sammelgels eine Spannung von 120 V und im Bereich des Trenngels eine Spannung von 200 V angelegt. Ist der Gellauf beendet, so wird das Trenngel aus der Apparatur isoliert und für den nachfolgenden Western Blot präpariert.

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Rotiphorese® Gel 30 (30 %ige Acrylamid-Stammlösung)	22 ml	3,6 ml
ddH <sub>2</sub> O	25,5 ml	20,7 ml
Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer	16 ml	8 ml
TEMED	16 µl	16 µl
APS	720 µl	480 µl

Tab. 08: Zusammensetzung für 10 %iges Trenn- und 3 %iges Sammelgel

Die angesetzte Menge kann für 3 Proteingele genutzt werden.

### 7.4.3 Western Blot

Bei diesem Verfahren werden die Proteine eines SDS-Gels (7.4.2) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die dort für verschiedene Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Die hierfür verwendete Apparatur besteht aus zwei Graphitelektroden, zwischen denen die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran stattfindet. Entsprechend der Größe des Trenngels werden 4 Lagen Whatman Filter 3MM und eine Lage Nitrozellulosemembran zugeschnitten und – wie auch das Gel – in Semidry-Blotpuffer getränkt. Es folgt das blasenfreie Auflegen auf die Elektroden, wobei die Schichtung von Anode zu Kathode wie folgt auszusehen hat:

- 2 Lagen Whatman Filter
- Membran
- Gel
- 2 Lagen Whatman Filter

Das Blotten erfolgt für 30 min bei einer Stromstärke von 5 mA / 1 cm<sup>2</sup> Gel. Im Anschluss wird die Membran zweimal mit 1x PBS gewaschen und für Antikörperreaktionen (7.4.4) zum Nachweis bestimmter Proteine vorbereitet.

### 7.4.4 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Waschen der Nitrozellulosemembran im Anschluss an den Western Blot (7.4.3), werden zunächst unspezifische Bindungsstellen an der Membran durch eine 30minütige Inkubation in Blockierlösung abgesättigt. Über Nacht (mindestens 7 h) erfolgt das Schwenken der Membran in frischer Blockierlösung, in der der gewünschte anti-Antigen-Antikörper (1.

Antikörper) 1 : 5 verdünnt ist. Am Folgetag wird die Membran nach dreimaligem Waschen für je 5 min in 1x PBS für 2 h mit einem Antikörper inkubiert, der den anti-Antigen-Antikörper binden kann. Dieser Zweitantikörper ist mit alkalischer Phosphatase (AP) markiert und wird 1 : 5000 in Blockierlösung verdünnt. Es folgen zwei Waschungen in 1x PBS und die Äquilibration in Carbonatpuffer (pH 10.2). Für die AP-Reaktion werden 30 ml Carbonatpuffer mit 60 µl NBT (75 mg / ml 70 % DMF) und 112,5 µl BCIP (50 mg / ml DMF) versetzt und die Membran mit diesem Gemisch inkubiert. Wird das Substrat BCIP durch die alkalische Phosphatase zu Indoxyl und Phosphat hydrolysiert, so wird das Indoxyl vom Sauerstoff der Luft über Indigoweiß zum tiefblauen Farbstoff Indigo oxidiert. Zusammen mit dem durch die AP-Aktivität reduzierten NBT ergeben beide Farbstoffe ein blauviolett-Präzipitat und erzeugen überall dort, wo Alkalische Phosphatase indirekt an ein Protein gekoppelt ist, eine blauviolette Färbung in Form von Banden. Diese Reaktion wird mit deionisiertem Wasser gestoppt und dient dem indirekten Nachweis der gewünschten Proteine.

#### 7.4.5 Proteinbestimmung mittels Pierce BCA Kit

2 x 10<sup>6</sup> Zellen einer *Dictyostelium*-Kultur werden pelletiert (3 min; 4000 rpm) und einmal mit P-Puffer gewaschen (nicht bei vorher eingefrorenem Pellet). Es folgt das Resuspendieren in 300 µl P-Puffer und das dreimalige Einfrieren in flüssigem Stickstoff mit jeweils anschließendem Auftauen bei 37 °C, um die Zellen zu zerstören. Nach dem Zentrifugieren für 1 h bei 4 °C und 14000 rpm wird der Überstand mit 1 ml BCA Working Reagenz (50 Teile Reagenz A, 1 Teil Reagenz B) gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 3minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur werden die Proben im Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Als Referenz dient P-Puffer.

### 7.5 Mikroskopische Methoden

#### 7.5.1 Zellfixierung für Immunfluoreszenzen

300 µl einer Kultur mit der Dichte von 1-2 x 10<sup>6</sup> *Dictyostelium*-Zellen pro ml Medium werden auf ein HCl-gereinigtes Deckgläschen (Ø 18 mm) aufgetragen und für 45-60 min bei 22 °C in einer lichtdurchlässigen feuchten Kammer stehen gelassen. Haben sich die Zellen abgesetzt, so wird das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 200 µl Fixativ ersetzt. Nach 30minütiger Inkubation in einer von nun an dunklen und feuchten Kammer bei RT, wird das Fixativ abgenommen und das Deckgläschen durch kurzes Schwenken zuerst in 10 mM PIPES und anschließend in PBS/Glycin gespült. Die Gläschen werden zurück in die Kammer gelegt und

sofort mit 300 µl PBS/Glycin überschichtet. Nach einer weiteren Waschung mit 300 µl PBS/Glycin werden die Zellen 10 min mit 200 µl 70 %igen Ethanol nachfixiert. Es schließen sich zwei 5minütige Waschungen mit PBS/Glycin und zwei 15minütige Waschungen mit PBG an. Die Inkubation über Nacht erfolgt mit circa 200 µl Antikörper enthaltenden Hybridomakulturüberstand, der zuvor bei 14000 rpm für 3 min zentrifugiert wird. Nach sechsmaligem Waschen mit PBG für jeweils 5 min, läuft die Zweitantikörperreaktion (1 : 1000 in PBG verdünnt) für 1-2 h bei 37 °C ab. Optional erfolgt zusätzlich die Inkubation mit DAPI (Stammlösung: 1 mg / ml in 70 % Ethanol; 1 : 1000 in PBG) für 1-2 h bei 37 °C, Alexa-Fluor-488-Phalloidin (10–15 µl pro Deckgläschen) 1-2 h bei 37 °C oder LD540 (Stammlösung: 0,5 mg / ml in Ethanol; 1,2 µl auf 1 ml PBG) für 30 min bei RT. Die Reaktionen werden durch zweimaliges Waschen mit PBG und dreimaliges Waschen mit PBS (jeweils für 5 min) gestoppt. Zum Schluss werden die Deckgläschen noch einmal kurz in bidestilliertem Wasser geschwenkt und nach dem Abtropfen der Flüssigkeit mit den Zellen nach unten auf einem Objektträger in Gelvatol eingebettet. Die Aushärtung erfolgt über Nacht bei 4 °C.

#### Fixativ (Pikrinsäure/Paraformaldehyd):

Zur Herstellung des Fixativs werden 0,2 g Paraformaldehyd in 3,2 ml ddH<sub>2</sub>O unter leichter Erwärmung auf maximal 40 °C und unter Zugabe von 3-4 Tropfen 2 M NaOH gelöst. Es folgen die Zugabe von 5 ml 20 mM PIPES-Puffer (pH 6.0) und 1,5 ml gesättigte Pikrinsäure. Die Einstellung des pH-Wertes auf 6.0 erfolgt mittels 3,7 % HCl.

#### Gelvatol:

Mittels einer 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung werden 10 ml 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und 1 : 10 verdünnt. In diesem Puffer werden über Nacht 20 g Polyvinylalkohol durch ständiges Rühren gelöst. Das Gleiche erfolgt für eine weitere Nacht mit 40 ml Glycerin. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 12.000 rpm wird der Überstand mit 25 µg / ml DABCO (Antibleichmittel) versetzt, in Spritzen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

#### Pikrinsäure:

Zur Herstellung der Pikrinsäure erfolgt zunächst eine Erwärmung von ddH<sub>2</sub>O auf 50 °C, bevorzugt im Wasserbad. Unter Rühren wird nun langsam die Pikrinsäure dazugegeben, bis sich gerade nichts mehr löst. Dies sollte mit großer Vorsicht passieren, da die Pikrinsäure im trockenen Zustand sehr explosiv ist. Das Wasserbad

wird unter ständigem Rühren der Säure auf 80 °C hoch geheizt und für mehrere Stunden dabei belassen. Im Anschluss erfolgt ein langsames Abkühlen auf Raumtemperatur.

### 7.5.2 Beobachtung und Dokumentation fluoreszenzmarkierter Zellen

Für die Darstellung und Aufnahmen im Konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) und im konventionellen Fluoreszenzmikroskop (FM) erfolgt die Verwendung von jeweils 100 x Ölimmersions-Objektiven. Im CLSM werden Cy3, Rhodamin und RFP über einen HeNe-Laser (543 nm) und GFP, Oregon Green, sowie Alexa-Fluor-488 über einen Ar-Laser (488 nm) angeregt. Im konventionellen FM erfolgt die Anregung von Cy3, Rhodamin und RFP mit Grünlicht und die Anregung von GFP, Oregon Green und Alexa-Fluor-488 mit Blau- oder UV-Licht. Die Überlagerung von Bildpaaren erfolgt mittels der Leica Software LCS. Für die Bildbearbeitung und -formatierung wird die Software Adobe Photoshop 5.0 verwendet. Hierbei werden zu keiner Zeit Veränderungen einzelner Bildbereiche vorgenommen.

### 7.5.3 TEM-Präparation

Für die Präparation von *Dictyostelium*-Zellen für das Transmissionselektronenmikroskop werden zunächst  $8 \times 10^7$  Zellen aus einer Schüttelkultur für 5 min bei 3500 rpm und RT abzentrifugiert und in einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung (gelöst in HL5) für 30 min bei RT schüttelnd inkubiert. Diese chemische Verbindung tötet die Zellen sehr schnell und verknüpft Aminogruppen tragende Moleküle miteinander durch Bildung von Iminbindungen, wodurch die Proteine vernetzt und verhärtet werden. Es erfolgt eine weitere 30minütige Inkubation in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung (gelöst in P-Puffer). Nach einer Waschung mit P-Puffer werden die Zellen in 2 %iger Glutaraldehyd-Lösung (gelöst in P-Puffer) resuspendiert. In einem 2. Durchgang werden zusätzlich 0,3 %  $\text{OsO}_4$  zugegeben.  $\text{OsO}_4$  dient der Fixierung und der Schwarzfärbung der Lipide. Die folgenden Schritte erfolgen stets bei 4 °C, die Zentrifugationsschritte jeweils für 7 min bei 3800 rpm. Nach einer Waschung mit P-Puffer werden die Zellen für 1 h mit 2 %igen  $\text{OsO}_4$  versetzt und im Folgenden zweimal mit P-Puffer gewaschen. Über Nacht werden die Zellen in einer 2 %igen Uranylacetat-Lösung (gelöst in  $\text{ddH}_2\text{O}$ ) gehalten. Uranylacetat reagiert mit Nukleinsäuren und färbt sehr gut Proteine – Uran-Atome (wie auch Blei-Atome) streuen Elektronen stärker als leichte Atome und erhöhen so den Kontrast. Der Waschprozess mit P-Puffer wird zweimal wiederholt, bevor die Präparation mit der Dehydrierung mittels einer Ethanolreihe abgeschlossen wird. Begonnen wird hierfür mit einer 5minütigen Inkubation in 10 ml 10 %igen Ethanol und



fortgesetzt in 10er Schritten bis schließlich noch 2-3mal mit 100 %igen Ethanol gewaschen wird. Die Inkubation in 70 %igen Alkohol erfolgt für 1,5 h zusätzlich mit 1 % Phosphorwolframsäure. In 100 %igem Ethanol sind die fixierten Zellen lagerfähig. Die Einbettung der Zellen in Kunstharz, das Trimmen der Präparatblöcke, sowie das Aufziehen auf Objektträger erfolgt in der Arbeitsgruppe Lymphologie (UniKassel). Da die meisten der hier verwendeten Schwermetallverbindungen lichtsensitiv sind, sollte die Probe stets dunkel gehalten werden.

P-Puffer:

Zunächst erfolgt die Herstellung von einer 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Stammlösung A)- und einer 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung (Stammlösung B). Letztere wird mit Hilfe von Lösung A auf den gewünschten pH eingestellt und für eine 0,1 M Lösung 1 : 2 verdünnt.

## 8. Anhang

Der Phänotyp einer Zelle, in der ein Fusionsprotein überexprimiert wird, ist u. a. abhängig von der Expressionsstärke des Hybrids. Um die Expressionsstärken darstellen zu können, wurden Western Blots (Methoden: 7.4.3) durchgeführt. Ein Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen, wodurch deren Menge in einer bestimmten Anzahl an Zellen qualitativ bestimmt werden kann.

Für eine Proteinprobe werden stets  $2 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Blots sind untereinander nur bedingt zu vergleichen, da die Gele unterschiedlich weit aufgetrennt und die Myc-, die Aktin- und die Porin-Banden stets nacheinander und unterschiedlich lang entwickelt wurden. Folgende monoklonale Antikörper wurden verwendet: Myc: 9E10; Aktin: 224-236-1; Porin: 70-100-1; GFP: 264-449-2. Porin ist ca. 30 kDa und Aktin ca. 42 kDa schwer. Die gerundeten kDa-Werte der einzelnen Konstrukte sind jeweils unter den Abbildungen zu finden. Die schwachen Banden, die in einigen Western Blots zusätzlich unter der Fusionsproteinbande zu sehen sind, stellen Degradationsbanden dar.

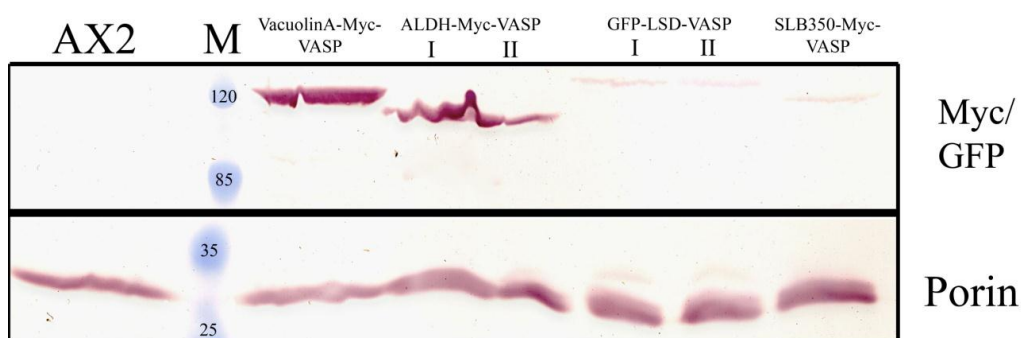


Abb. 63 – Expressionsvergleich diverser VASP-Konstrukte

VAM-VASP: 110 kDa

ALDH-Myc-VASP: 96 kDa

GFP-LSD-VASP: 113 kDa

SLB350-Myc-VASP: 109 kDa

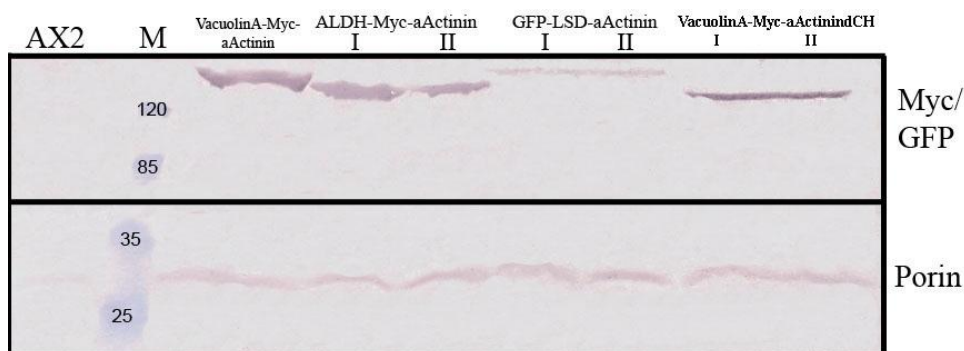


Abb. 64-A – Expressionsvergleich diverser  $\alpha$ -Actinin-Konstrukte

VAM- $\alpha$ -Actinin: 160 kDa

ALDH-Myc- $\alpha$ -Actinin: 149 kDa

GFP-LSD- $\alpha$ -Actinin: 165 kDa

VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ CH: 136 kDa

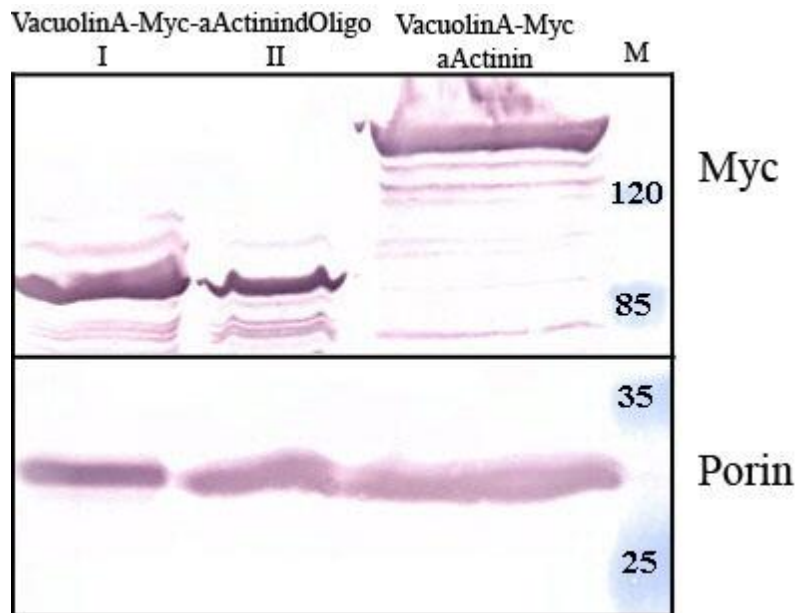


Abb. 64-B – Expressionsvergleich diverser  $\alpha$ -Actinin-Konstrukte  
 VAM- $\alpha$ -Actinin $\Delta$ Oligo: 92 kDa  
 VAM- $\alpha$ -Actinin: 160 kDa

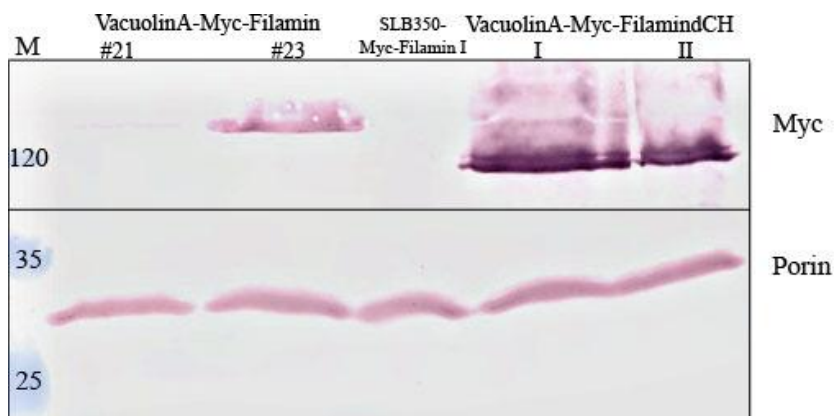


Abb. 65-A – Expressionsvergleich diverser Filamin-Konstrukte  
 VAM-Filamin: 163 kDa  
 SLB350-Myc-Filamin: 161 kDa  
 VAM-Filamin $\Delta$ CH: 138 kDa

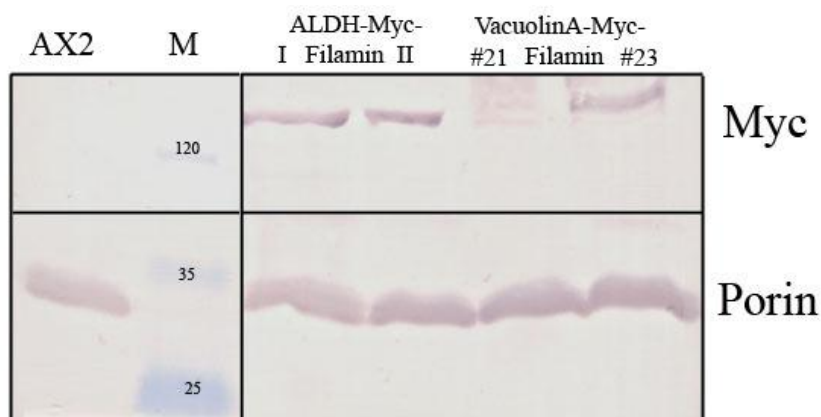


Abb. 65-B – Expressionsvergleich diverser Filamin-Konstrukte  
 ALDH-Myc-Filamin: 149 kDa  
 VAM-Filamin: 163 kDa

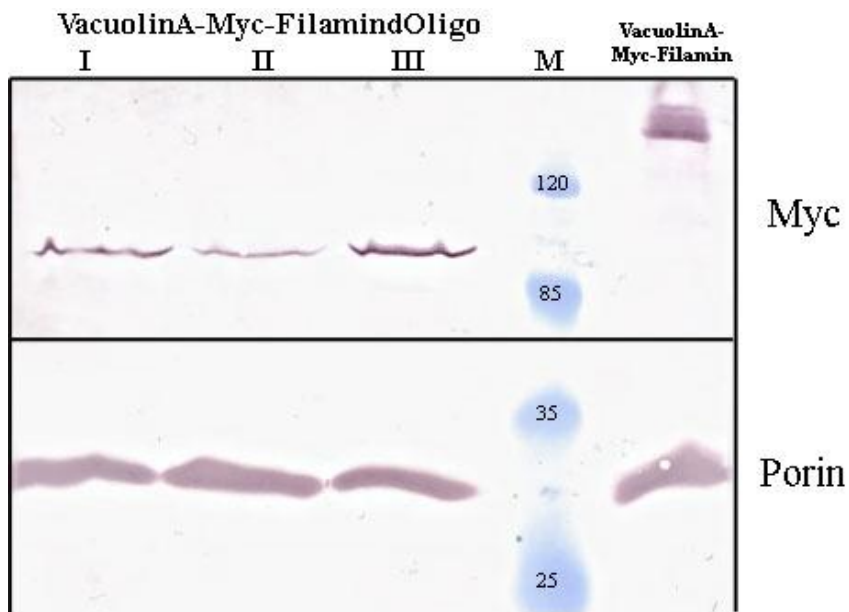


Abb. 65-C – Expressionsvergleich diverser Filamin-Konstrukte  
 VAM-Filamin $\Delta$ Oligo: 93 kDa  
 VAM-Filamin: 163 kDa

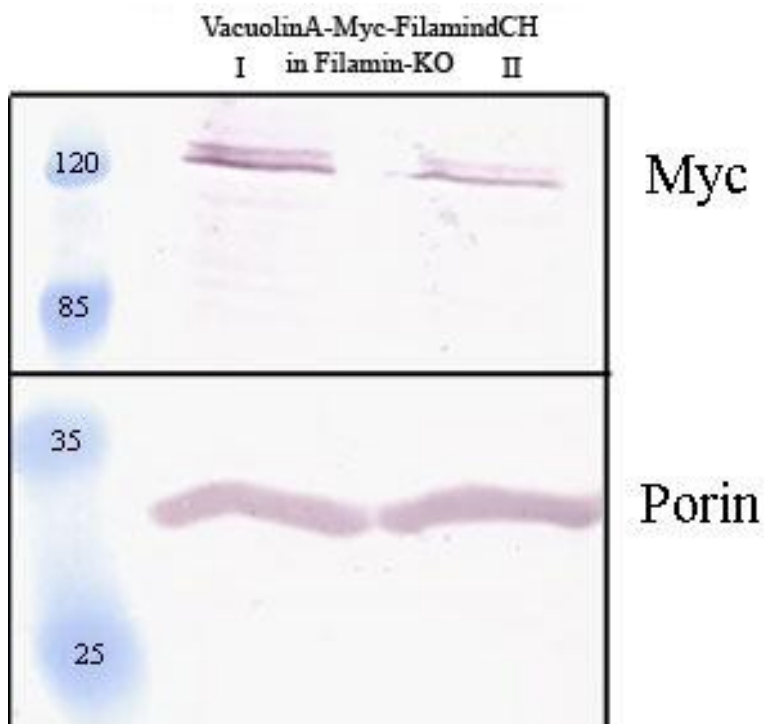


Abb. 65-D – Expressionsvergleich diverser Filamin-Konstrukte  
 VAM-Filamin $\Delta$ CH: 138 kDa

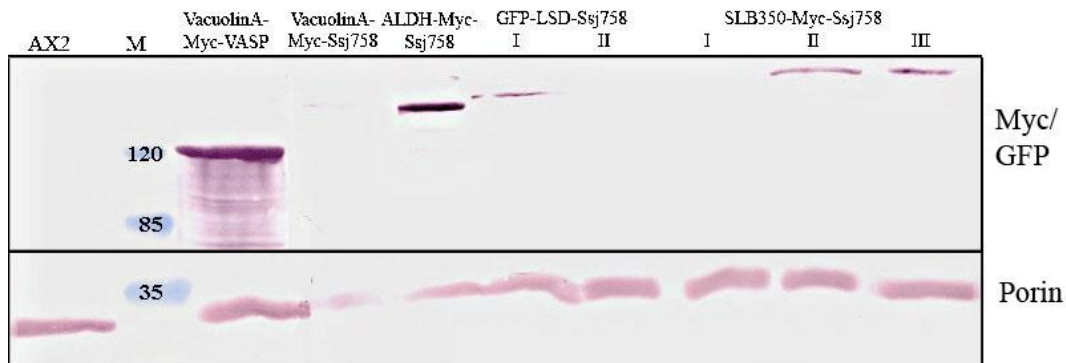


Abb. 66 – Expressionsvergleich diverser Ssj758-Konstrukte

VAM-VASP: 110 kDa  
 ALDH-MYC-Ssj758: 131 kDa  
 SLB350-Myc-Ssj758: 144 kDa  
 VAM-Ssj758: 142 kDa  
 GFP-LSD-Ssj758: 147 kDa

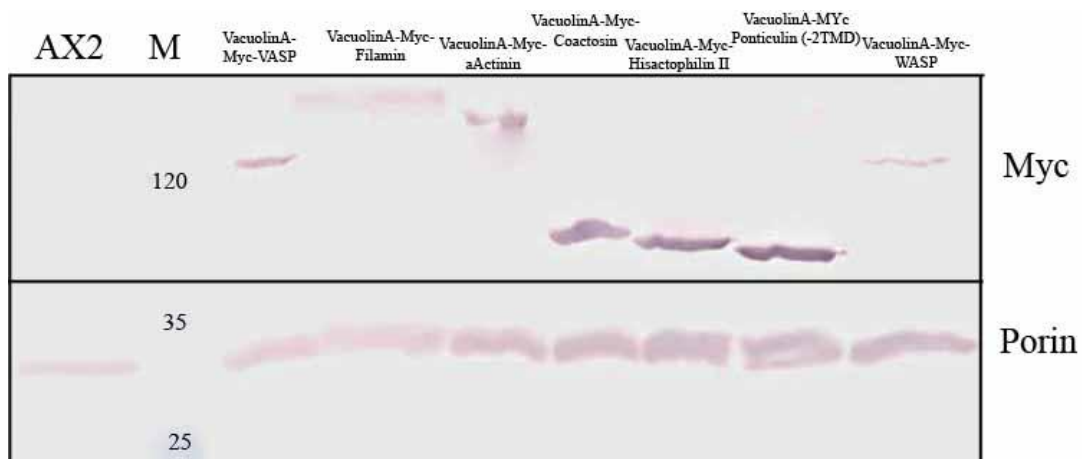


Abb. 67 – Expressionsvergleich diverser VacuolinA-Konstrukte

VAM-VASP: 110 kDa  
 VAM- $\alpha$ -Actinin: 160 kDa  
 VAM-HisactophilinII: 79 kDa  
 VAM-WASP: 110 kDa  
 VAM-Filamin: 163 kDa  
 VAM-Coactosin: 82 kDa  
 VAM-Ponticulin(-2TMD): 76 kDa

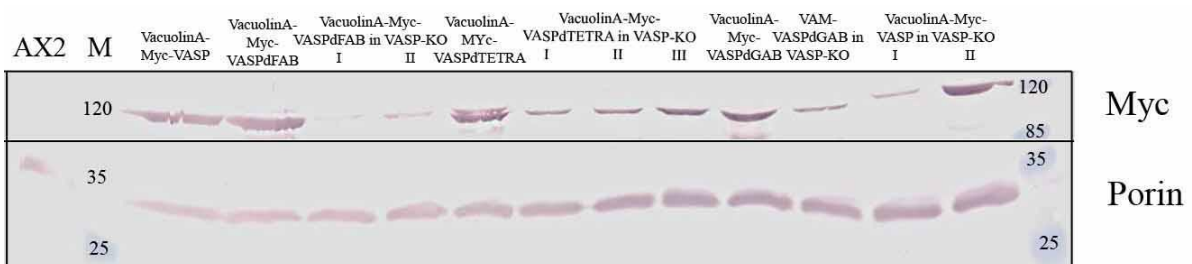


Abb. 68 – Expressionsvergleich diverser VASP-Deletionskonstrukte

VAM-VASP: 110 kDa  
 VAM-VASP $\Delta$ TETRA: 103 kDa  
 VAM-VASP $\Delta$ FAB: 105 kDa  
 VAM-VASP $\Delta$ GAB: 103 kDa

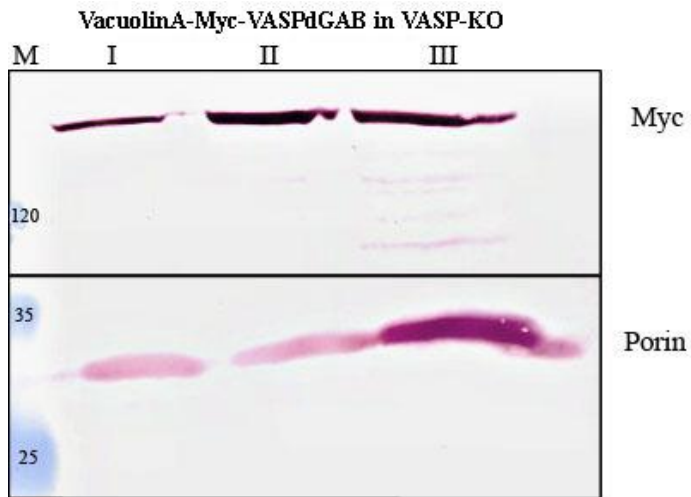


Abb. 69 –Expressionsvergleich von VAM-VASP $\Delta$ GAB in VASP-KO  
 VAM-VASP $\Delta$ GAB: 103 kDa

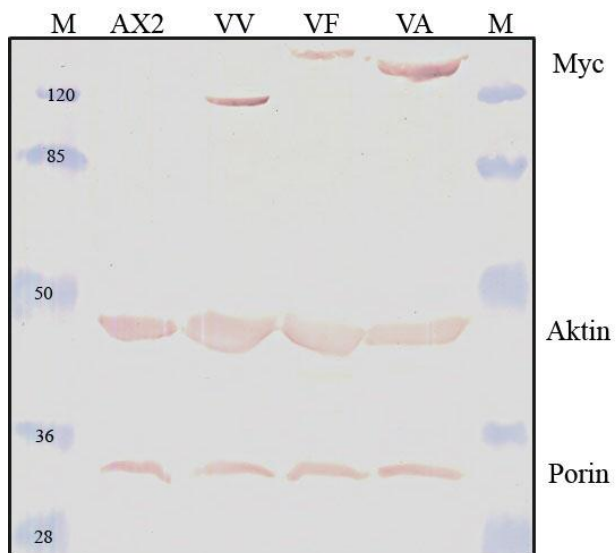
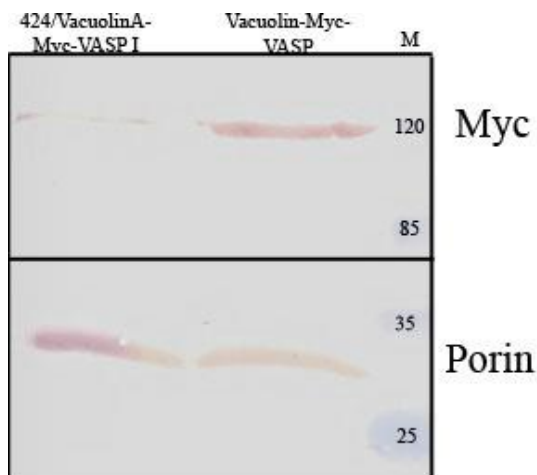
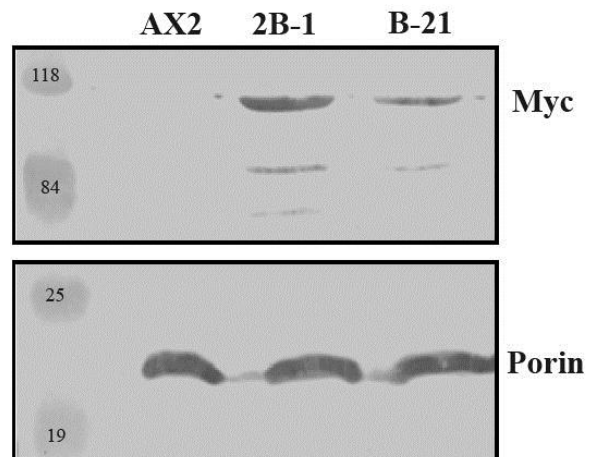


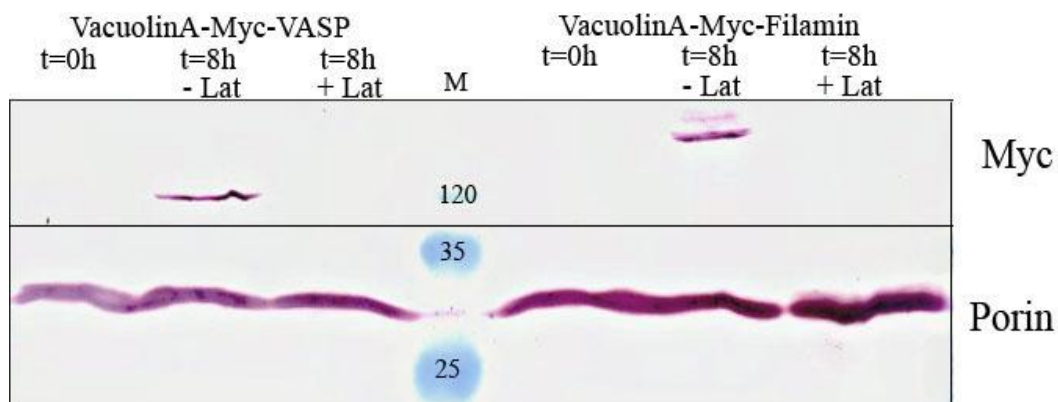
Abb. 70 – Aktin-Vergleich  
 VAM-VASP (VV): 110 kDa  
 VAM-Filamin (VF): 163 kDa  
 VAM- $\alpha$ -Actinin (VA): 160 kDa



**Abb. 71-A – Vergleich von VAM-VASP**  
 Dargestellt ist die Expression des 424/VacuolinA-Myc-VASPI-Klons nach mindestens 48-stündiger Kultivierung in Tetrazyklin-freiem Medium.



**Abb. 71-B – Vergleich von VAM-VASP-Klonen (148)**  
 Im Vergleich sind der starke 2B-1- und der schwache B-21-Expriemierer zu sehen.



**Abb. 72 – Einfluss von Latrunculin**

Für diesen Versuch wurden entsprechende VAM-VASP- und VAM-Filamin-Zellen unter dem Einfluss von Tetrazyklin herangezogen, um die Expressionen der Konstrukte zu verhindern. Nach einem Auswaschen von Tetrazyklin (t = 0) erfolgte eine 8-stündige Inkubation der Zellen mit Latrunculin (t = 8 h; +Lat). Zur Kontrolle dienten Zellen, die parallel dazu frei von Latrunculin kultiviert wurden (t = 8 h; -Lat).

VAM-VASP: 110 kDa

VAM-Filamin: 163 kDa

## 9. Literaturverzeichnis

1. Brefeld O. *Dictyostelium mucoroides*. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abhandlung der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft Frankfurt* 1869;7:85-107.
2. Raper KB. *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* 1935(50):135-147.
3. Raper KB. Growth and development of *Dictyostelium discoideum* with different bacterial associates. *J. Agr. Res.* 1937;55:289-316.
4. Steinert M. Pathogen-host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Semin Cell Dev Biol*;22(1):70-6.
5. Lima WC, Lelong E, Cosson P. What can *Dictyostelium* bring to the study of *Pseudomonas* infections? *Semin Cell Dev Biol*;22(1):77-81.
6. Annesley SJ, Fisher PR. *Dictyostelium discoideum*--a model for many reasons. *Mol Cell Biochem* 2009;329(1-2):73-91.
7. Williams RS, Boeckeler K, Graf R, Muller-Taubenberger A, Li Z, Isberg RR, et al. Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends Mol Med* 2006;12(9):415-24.
8. Maniak M. *Dictyostelium* as a model for human lysosomal and trafficking diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2010;22(1):114-9.
9. Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sugang R, Berriman M, et al. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 2005;435(7038):43-57.
10. Baik MU. Einfluss von CbfA auf Wachstum und Entwicklung in *Dictyostelium discoideum*. *Dissertation* 2004;bezogen über WIKIPEDIA: *Dictyostelium*.
11. Silverstein SC, Steinman RM, Cohn ZA. Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 1977;46:669-722.
12. Swanson JA, Watts C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* 1995;5(11):424-8.
13. Maniak M, Rauchenberger R, Albrecht R, Murphy J, Gerisch G. Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* 1995;83(6):915-24.
14. Niewohner J, Weber I, Maniak M, Muller-Taubenberger A, Gerisch G. Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J Cell Biol* 1997;138(2):349-61.
15. Watts DJ, Ashworth JM. Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J* 1970;119(2):171-4.
16. Clarke M, Kayman SC. The axenic mutations and endocytosis in *Dictyostelium*. *Methods Cell Biol* 1987;28:157-76.
17. O'Halloran TJ, Anderson RG. Clathrin heavy chain is required for pinocytosis, the presence of large vacuoles, and development in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* 1992;118(6):1371-7.
18. Hacker U, Albrecht R, Maniak M. Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 1997;110 ( Pt 2):105-12.
19. Swanson JA, Baer SC. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol* 1995;5(3):89-93.
20. de Chastellier C, Ryter A, Thilo L. Membrane shuttle between plasma membrane, phagosomes, and pinosomes in *Dictyostelium discoideum* amoeboid cells. *Eur J Cell Biol* 1983;30(2):233-43.



21. Padh H, Lavasa M, Steck TL. Prelysosomal acidic vacuoles in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol* 1989;108(3):865-74.
22. Aubry L, Klein G, Martiel JL, Satre M. Kinetics of endosomal pH evolution in *Dictyostelium discoideum* amoebae. Study by fluorescence spectroscopy. *J Cell Sci* 1993;105 ( Pt 3):861-6.
23. Maniak M. Fusion and fission events in the endocytic pathway of *Dictyostelium*. *Traffic* 2003;4(1):1-5.
24. Souza GM, Mehta DP, Lammertz M, Rodriguez-Paris J, Wu R, Cardelli JA, et al. *Dictyostelium* lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J Cell Sci* 1997;110 ( Pt 18):2239-48.
25. Padh H, Ha J, Lavasa M, Steck TL. A post-lysosomal compartment in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 1993;268(9):6742-7.
26. Nolta KV, Rodriguez-Paris JM, Steck TL. Analysis of successive endocytic compartments isolated from *Dictyostelium discoideum* by magnetic fractionation. *Biochim Biophys Acta* 1994;1224(2):237-46.
27. Maniak M. Endocytic transit in *Dictyostelium discoideum*. *Protoplasma* 1999;210:25-30.
28. Rauchenberger R, Hacker U, Murphy J, Niewohner J, Maniak M. Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Curr Biol* 1997;7(3):215-8.
29. Jenne N, Rauchenberger R, Hacker U, Kast T, Maniak M. Targeted gene disruption reveals a role for vacuolin B in the late endocytic pathway and exocytosis. *J Cell Sci* 1998;111 ( Pt 1):61-70.
30. Insall R, Muller-Taubenberger A, Machesky L, Kohler J, Simmeth E, Atkinson SJ, et al. Dynamics of the *Dictyostelium* Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001;50(3):115-28.
31. Drengk A, Fritsch J, Schmauch C, Ruhling H, Maniak M. A coat of filamentous actin prevents clustering of late-endosomal vacuoles in vivo. *Curr Biol* 2003;13(20):1814-9.
32. Dimond RL, Burns RA, Jordan KB. Secretion of Lysosomal enzymes in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 1981;256(13):6565-72.
33. Neuhaus EM, Almers W, Soldati T. Morphology and dynamics of the endocytic pathway in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* 2002;13(4):1390-407.
34. Lee E, Knecht DA. Visualization of actin dynamics during macropinocytosis and exocytosis. *Traffic* 2002;3(3):186-92.
35. Wienke D, Drengk A, Schmauch C, Jenne N, Maniak M. Vacuolin, a flotillin/reggie-related protein from *Dictyostelium* oligomerizes for endosome association. *Eur J Cell Biol* 2006;85(9-10):991-1000.
36. Tavernarakis N, Driscoll M, Kyrpides NC. The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci* 1999;24(11):425-7.
37. Morrow IC, Parton RG. Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic* 2005;6(9):725-40.
38. Bagshaw RD, Mahuran DJ, Callahan JW. A proteomic analysis of lysosomal integral membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle. *Mol Cell Proteomics* 2005;4(2):133-43.
39. Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, et al. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 2001;152(1):165-80.
40. Kuhnert O. Charakterisierung Lipid Droplet assoziierter Proteine in *Dictyostelium discoideum*. *Diplomarbeit; Fachbereich 10; Universität Kassel* 2008.
41. Alton TH, Lodish HF. Developmental changes in messenger RNAs and protein synthesis in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* 1977;60(1):180-206.

42. Joseph JM, Fey P, Ramalingam N, Liu XI, Rohlf M, Noegel AA, et al. The actinome of *Dictyostelium discoideum* in comparison to actins and actin-related proteins from other organisms. *PLoS One* 2008;3(7):e2654.
43. Pollard TD, Cooper JA. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem* 1986;55:987-1035.
44. Noegel AA, Schleicher M. The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *J Cell Sci* 2000;113 ( Pt 5):759-66.
45. Insall RH, Machesky LM. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell* 2009;17(3):310-22.
46. Carnell MJ, Insall RH. Actin on disease--studying the pathobiology of cell motility using *Dictyostelium discoideum*. *Semin Cell Dev Biol*;22(1):82-8.
47. Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(10):713-26.
48. Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 1994;79(5):following 922.
49. Machesky LM, Insall RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 1998;8(25):1347-56.
50. Miki H, Takenawa T. Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243(1):73-8.
51. Marchand JB, Kaiser DA, Pollard TD, Higgs HN. Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* 2001;3(1):76-82.
52. Paunola E, Mattila PK, Lappalainen P. WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett* 2002;513(1):92-7.
53. Burns S, Cory GO, Vainchenker W, Thrasher AJ. Mechanisms of WASp-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood* 2004;104(12):3454-62.
54. Thrasher AJ. WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2(9):635-46.
55. Sullivan KE, Mullen CA, Blaese RM, Winkelstein JA. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr* 1994;125(6 Pt 1):876-85.
56. Aldrich RA, Steinberg AG, Campbell DC. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics* 1954;13(2):133-9.
57. Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(4):725-38; quiz 739.
58. Lorenzi R, Brickell PM, Katz DR, Kinnon C, Thrasher AJ. Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood* 2000;95(9):2943-6.
59. Chesarone MA, Goode BL. Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21(1):28-37.
60. Halbrugge M, Walter U. Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem* 1989;185(1):41-50.
61. Halbrugge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P, Walter U. Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem* 1990;265(6):3088-93.
62. Gertler FB, Doctor JS, Hoffmann FM. Genetic suppression of mutations in the *Drosophila* *abl* proto-oncogene homolog. *Science* 1990;248(4957):857-60.

63. Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, Soriano P. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 1996;87(2):227-39.
64. Lanier LM, Gates MA, Witke W, Menzies AS, Wehman AM, Macklis JD, et al. Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* 1999;22(2):313-25.
65. Han YH, Chung CY, Wessels D, Stephens S, Titus MA, Soll DR, et al. Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in dictyostelium. *J Biol Chem* 2002;277(51):49877-87.
66. Boukhelifa M, Parast MM, Bear JE, Gertler FB, Otey CA. Palladin is a novel binding partner for Ena/VASP family members. *Cell Motil Cytoskeleton* 2004;58(1):17-29.
67. Zhang Y, Tu Y, Gkretsi V, Wu C. Migfilin interacts with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) and regulates VASP localization to cell-matrix adhesions and migration. *J Biol Chem* 2006;281(18):12397-407.
68. Krause M, Leslie JD, Stewart M, Lafuente EM, Valderrama F, Jagannathan R, et al. Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Dev Cell* 2004;7(4):571-83.
69. Brindle NP, Holt MR, Davies JE, Price CJ, Critchley DR. The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem J* 1996;318 ( Pt 3):753-7.
70. Reinhard M, Jouvenal K, Tripier D, Walter U. Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(17):7956-60.
71. Reinhard M, Rudiger M, Jockusch BM, Walter U. VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett* 1996;399(1-2):103-7.
72. Chereau D, Dominguez R. Understanding the role of the G-actin-binding domain of Ena/VASP in actin assembly. *J Struct Biol* 2006;155(2):195-201.
73. Schirenbeck A, Arasada R, Bretschneider T, Stradal TE, Schleicher M, Faix J. The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(20):7694-9.
74. Bachmann C, Fischer L, Walter U, Reinhard M. The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem* 1999;274(33):23549-57.
75. Harbeck B, Huttelmaier S, Schluter K, Jockusch BM, Illenberger S. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem* 2000;275(40):30817-25.
76. Walders-Harbeck B, Khaitlina SY, Hinssen H, Jockusch BM, Illenberger S. The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett* 2002;529(2-3):275-80.
77. Barzik M, Kotova TI, Higgs HN, Hazelwood L, Hanein D, Gertler FB, et al. Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem* 2005;280(31):28653-62.
78. Ferron F, Rebowski G, Lee SH, Dominguez R. Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *Embo J* 2007;26(21):4597-606.
79. Rottner K, Behrendt B, Small JV, Wehland J. VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol* 1999;1(5):321-2.

80. Applewhite DA, Barzik M, Kojima S, Svitkina TM, Gertler FB, Borisy GG. Ena/VASP proteins have an anti-capping independent function in filopodia formation. *Mol Biol Cell* 2007;18(7):2579-91.
81. Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, Philippar U, Barzik M, Rubinson DA, et al. Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat Cell Biol* 2007;9(12):1347-59.
82. Plastino J, Olivier S, Sykes C. Actin filaments align into hollow comets for rapid VASP-mediated propulsion. *Curr Biol* 2004;14(19):1766-71.
83. Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Grobe L, Jockusch BM, et al. Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 1999;144(6):1245-58.
84. Loisel TP, Boujema R, Pantaloni D, Carlier MF. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 1999;401(6753):613-6.
85. Geese M, Loureiro JJ, Bear JE, Wehland J, Gertler FB, Sechi AS. 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* 2002;13(7):2383-96.
86. Kwiatkowski AV, Rubinson DA, Dent EW, Edward van Veen J, Leslie JD, Zhang J, et al. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex. *Neuron* 2007;56(3):441-55.
87. Han G, Fan B, Zhang Y, Zhou X, Wang Y, Dong H, et al. Positive regulation of migration and invasion by vasodilator-stimulated phosphoprotein via Rac1 pathway in human breast cancer cells. *Oncol Rep* 2008;20(4):929-39.
88. Hu LD, Zou HF, Zhan SX, Cao KM. EVL (Ena/VASP-like) expression is up-regulated in human breast cancer and its relative expression level is correlated with clinical stages. *Oncol Rep* 2008;19(4):1015-20.
89. Philippar U, Roussos ET, Oser M, Yamaguchi H, Kim HD, Giampieri S, et al. A Mena invasion isoform potentiates EGF-induced carcinoma cell invasion and metastasis. *Dev Cell* 2008;15(6):813-28.
90. Kwiatkowski AV, Garner CC, Nelson WJ, Gertler FB. Cell autonomous defects in cortical development revealed by two-color chimera analysis. *Mol Cell Neurosci* 2009;41(1):44-50.
91. de Hostos EL, Bradtke B, Lottspeich F, Gerisch G. Coactosin, a 17 kDa F-actin binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskeleton* 1993;26(3):181-91.
92. Rohrig U, Gerisch G, Morozova L, Schleicher M, Wegner A. Coactosin interferes with the capping of actin filaments. *FEBS Lett* 1995;374(2):284-6.
93. Srinivasan S, Traini M, Herbert B, Sexton D, Harry J, Alexander H, et al. Proteomic analysis of a developmentally regulated secretory vesicle. *Proteomics* 2001;1(9):1119-27.
94. Gotthardt D, Blancheteau V, Bosserhoff A, Ruppert T, Delorenzi M, Soldati T. Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of  $\alpha$ Galpha during uptake. *Mol Cell Proteomics* 2006;5(12):2228-43.
95. Imamura M, Endo T, Kuroda M, Tanaka T, Masaki T. Substructure and higher structure of chicken smooth muscle  $\alpha$ -actinin molecule. *J Biol Chem* 1988;263(16):7800-5.
96. Flood G, Rowe AJ, Critchley DR, Gratzer WB. Further analysis of the role of spectrin repeat motifs in  $\alpha$ -actinin dimer formation. *Eur Biophys J* 1997;25(5-6):431-5.
97. Noegel A, Witke W, Schleicher M. Calcium-sensitive non-muscle  $\alpha$ -actinin contains EF-hand structures and highly conserved regions. *FEBS Lett* 1987;221(2):391-6.

98. Witke W, Hofmann A, Koppel B, Schleicher M, Noegel AA. The Ca(2+)-binding domains in non-muscle type alpha-actinin: biochemical and genetic analysis. *J Cell Biol* 1993;121(3):599-606.
99. Brier J, Fechheimer M, Swanson J, Taylor DL. Abundance, relative gelation activity, and distribution of the 95,000-dalton actin-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol* 1983;97(1):178-85.
100. Furukawa R, Fechheimer M. 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* 1994;29(1):46-56.
101. Noegel AA, Rapp S, Lottspeich F, Schleicher M, Stewart M. The *Dictyostelium* gelation factor shares a putative actin binding site with alpha-actinins and dystrophin and also has a rod domain containing six 100-residue motifs that appear to have a cross-beta conformation. *J Cell Biol* 1989;109(2):607-18.
102. Ogiwara S, Carboni J, Condeelis J. Electron microscopic localization of myosin II and ABP-120 in the cortical actin matrix of *Dictyostelium amoebae* using IgG-gold conjugates. *Dev Genet* 1988;9(4-5):505-20.
103. Condeelis J, Hall A, Bresnick A, Warren V, Hock R, Bennett H, et al. Actin polymerization and pseudopod extension during amoeboid chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988;10(1-2):77-90.
104. Cox D, Condeelis J, Wessels D, Soll D, Kern H, Knecht DA. Targeted disruption of the ABP-120 gene leads to cells with altered motility. *J Cell Biol* 1992;116(4):943-55.
105. Ithychanda SS, Hsu D, Li H, Yan L, Liu DD, Das M, et al. Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin: implication on filamin-mediated receptor clustering and cross-talk. *J Biol Chem* 2009;284(50):35113-21.
106. Furukawa R, Fechheimer M. The structure, function, and assembly of actin filament bundles. *Int Rev Cytol* 1997;175:29-90.
107. Lim RW, Furukawa R, Fechheimer M. Evidence of intramolecular regulation of the *Dictyostelium discoideum* 34 000 Da F-actin-bundling protein. *Biochemistry* 1999;38(49):16323-32.
108. Fechheimer M, Taylor DL. Isolation and characterization of a 30,000-dalton calcium-sensitive actin cross-linking protein from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 1984;259(7):4514-20.
109. Johns JA, Brock AM, Pardee JD. Colocalization of F-actin and 34-kilodalton actin bundling protein in *Dictyostelium amoebae* and cultured fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988;9(3):205-18.
110. Fechheimer M. The *Dictyostelium discoideum* 30,000-dalton protein is an actin filament-bundling protein that is selectively present in filopodia. *J Cell Biol* 1987;104(6):1539-51.
111. Fechheimer M, Ingalls HM, Furukawa R, Luna EJ. Association of the *Dictyostelium* 30 kDa actin bundling protein with contact regions. *J Cell Sci* 1994;107 ( Pt 9):2393-401.
112. Wuestehube LJ, Luna EJ. F-actin binds to the cytoplasmic surface of ponticulin, a 17-kD integral glycoprotein from *Dictyostelium discoideum* plasma membranes. *J Cell Biol* 1987;105(4):1741-51.
113. Hitt AL, Hartwig JH, Luna EJ. Ponticulin is the major high affinity link between the plasma membrane and the cortical actin network in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* 1994;126(6):1433-44.
114. Shariff A, Luna EJ. *Dictyostelium discoideum* plasma membranes contain an actin-nucleating activity that requires ponticulin, an integral membrane glycoprotein. *J Cell Biol* 1990;110(3):681-92.

115. Chia CP, Shariff A, Savage SA, Luna EJ. The integral membrane protein, ponticulin, acts as a monomer in nucleating actin assembly. *J Cell Biol* 1993;120(4):909-22.
116. Hanakam F, Eckerskorn C, Lottspeich F, Muller-Taubenberger A, Schafer W, Gerish G. The pH-sensitive actin-binding protein hisactophilin of *Dictyostelium* exists in two isoforms which both are myristoylated and distributed between plasma membrane and cytoplasm. *J Biol Chem* 1995;270(2):596-602.
117. Stoeckelhuber M, Noegel AA, Eckerskorn C, Kohler J, Rieger D, Schleicher M. Structure/function studies on the pH-dependent actin-binding protein hisactophilin in *Dictyostelium* mutants. *J Cell Sci* 1996;109 ( Pt 7):1825-35.
118. Scheel J, Ziegelbauer K, Kupke T, Humbel BM, Noegel AA, Gerisch G, et al. Hisactophilin, a histidine-rich actin-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 1989;264(5):2832-9.
119. Hanakam F, Gerisch G, Lotz S, Alt T, Seelig A. Binding of hisactophilin I and II to lipid membranes is controlled by a pH-dependent myristoyl-histidine switch. *Biochemistry* 1996;35(34):11036-44.
120. Müller I. Mögliche Komponenten in einem Signalweg zwischen endosomaler Verdauung und Partikelaufnahme in *Dictyostelium discoideum*. *Dissertation; Fachbereich 10; Universität Kassel* 2006.
121. Mayer BJ. SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 7):1253-63.
122. Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 1993;259(5098):1157-61.
123. Frischknecht F, Moreau V, Rottger S, Gonfloni S, Reckmann I, Superti-Furga G, et al. Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* 1999;401(6756):926-9.
124. Moreau V, Frischknecht F, Reckmann I, Vincentelli R, Rabut G, Stewart D, et al. A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat Cell Biol* 2000;2(7):441-8.
125. Anderson BL, Boldogh I, Evangelista M, Boone C, Greene LA, Pon LA. The Src homology domain 3 (SH3) of a yeast type I myosin, Myo5p, binds to verprolin and is required for targeting to sites of actin polarization. *J Cell Biol* 1998;141(6):1357-70.
126. Evangelista M, Klebl BM, Tong AH, Webb BA, Leeuw T, Leberer E, et al. A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 2000;148(2):353-62.
127. Geli MI, Lombardi R, Schmelzl B, Riezman H. An intact SH3 domain is required for myosin I-induced actin polymerization. *Embo J* 2000;19(16):4281-91.
128. Hochstrasser M. Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* 1996;84(6):813-5.
129. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 1999;96(5):635-44.
130. Clague MJ, Urbe S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell* 2010;143(5):682-5.
131. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002;82(2):373-428.
132. Lauwers E, Jacob C, Andre B. K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *J Cell Biol* 2009;185(3):493-502.
133. Wollert T, Yang D, Ren X, Lee HH, Im YJ, Hurley JH. The ESCRT machinery at a glance. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 13):2163-6.
134. Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 2009;458(7237):445-52.

135. Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* 2005;12 Suppl 2:1535-41.
136. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 2009;34(3):259-69.
137. Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH. Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 2003;278(20):17636-45.
138. Galloway PG, Perry G, Gambetti P. Hirano body filaments contain actin and actin-associated proteins. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987;46(2):185-99.
139. Hirano A, Dembitzer HM, Kurland LT, Zimmerman HM. 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* 1968;27(2):167-82.
140. Hirano A. The role of electron microscopy in neuropathology. *Acta Neuropathol* 2005;109(1):115-23.
141. Hirano A. Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994;20(1):3-11.
142. Schochet SS, Jr., Lampert PW, Lindenberg R. Fine structure of the Pick and Hirano bodies in a case of Pick's disease. *Acta Neuropathol* 1968;11(4):330-7.
143. Schochet SS, Jr., McCormick WF. Ultrastructure of Hirano bodies. *Acta Neuropathol* 1972;21(1):50-60.
144. Gibson PH, Tomlinson BE. Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1977;33(1-2):199-206.
145. Ogata J, Budzilovich GN, Cravioto H. A study of rod-like structures (Hirano bodies) in 240 normal and pathological brains. *Acta Neuropathol* 1972;21(1):61-7.
146. Hirano A. A guide to neuropathology. New York: Igaku-Shoin. 1981:151-4 1981.
147. Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ. Analysis of epitopes shared by Hirano bodies and neurofilament proteins in normal and Alzheimer's disease hippocampus. *Lab Invest* 1989;60(4):513-22.
148. Schmauch C. Manipulation der Aktin-Hülle später Endosomen durch ektopisches Protein-Targeting und Etablierung einer *in vivo*-Hierarchie cytoplasmatischer Targeting-Signalstärken. *Dissertation; Fachbereich 19; Universität Kassel* 2007.
149. Claussner S. Funktionelle Charakterisierung eines VacuolinA-Myc-VASP-Hybrids. *Diplomarbeit; Fachbereich 10; Universität Kassel* 2007.
150. Schmauch C, Claussner S, Zoltzer H, Maniak M. Targeting the actin-binding protein VASP to late endosomes induces the formation of giant actin aggregates. *Eur J Cell Biol* 2009;88(7):385-96.
151. Konotop G. Unveiling the components of the signaling pathway between endosomes and the phagocytic uptake machinery in *Dictyostelium discoideum*. *Dissertation, Fachbereich 10, Universität Kassel* 2010.
152. Barisch C. Lipid Droplets in *Dictyostelium discoideum*. *Dissertation, Fachbereich 10, Universität Kassel* 2010.
153. Ducharme NA, Bickel PE. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* 2008;149(3):942-9.
154. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 2007;27:79-101.
155. Pawolleck N. Biologische Charakterisierung von LC-FACS-Proteinen in *Dictyostelium discoideum*. *Dissertation, Fachbereich 10, Universität Kassel* 2006.
156. Lu X, Gruia-Gray J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Londos C, et al. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-

- specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm Genome* 2001;12(9):741-9.
157. Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791(6):419-40.
  158. Nishida E, Iida K, Yonezawa N, Koyasu S, Yahara I, Sakai H. Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(15):5262-6.
  159. Yonezawa N, Nishida E, Maekawa S, Sakai H. Studies on the interaction between actin and cofilin purified by a new method. *Biochem J* 1988;251(1):121-7.
  160. McGough A, Pope B, Chiu W, Weeds A. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol* 1997;138(4):771-81.
  161. Shina MC, Muller-Taubenberger A, Unal C, Schleicher M, Steinert M, Eichinger L, et al. Redundant and unique roles of coronin proteins in *Dictyostelium*. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(2):303-13.
  162. Blaauw M, Linskens MH, van Haastert PJ. Efficient control of gene expression by a tetracycline-dependent transactivator in single *Dictyostelium discoideum* cells. *Gene* 2000;252(1-2):71-82.
  163. Washington RW, Knecht DA. Actin binding domains direct actin-binding proteins to different cytoskeletal locations. *BMC Cell Biol* 2008;9:10.
  164. Schauer TM, Nesper M, Kehl M, Lottspeich F, Muller-Taubenberger A, Gerisch G, et al. Proteasomes from *Dictyostelium discoideum*: characterization of structure and function. *J Struct Biol* 1993;111(2):135-47.
  165. Giorda R, Ennis HL. Structure of two developmentally regulated *Dictyostelium discoideum* ubiquitin genes. *Mol Cell Biol* 1987;7(6):2097-103.
  166. Muller-Taubenberger A, Hagmann J, Noegel A, Gerisch G. Ubiquitin gene expression in *Dictyostelium* is induced by heat and cold shock, cadmium, and inhibitors of protein synthesis. *J Cell Sci* 1988;90 ( Pt 1):51-8.
  167. Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH. *Dictyostelium* macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects. *J Biol Chem* 2004;279(15):15621-9.
  168. Maselli AG, Davis R, Furukawa R, Fechheimer M. Formation of Hirano bodies in *Dictyostelium* and mammalian cells induced by expression of a modified form of an actin-crosslinking protein. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 9):1939-49.
  169. Maselli A, Furukawa R, Thomson SA, Davis RC, Fechheimer M. Formation of Hirano bodies induced by expression of an actin cross-linking protein with a gain-of-function mutation. *Eukaryot Cell* 2003;2(4):778-87.
  170. Davis RC, Furukawa R, Fechheimer M. A cell culture model for investigation of Hirano bodies. *Acta Neuropathol* 2008;115(2):205-17.
  171. Galloway PG, Perry G, Kosik KS, Gambetti P. Hirano bodies contain tau protein. *Brain Res* 1987;403(2):337-40.
  172. Goldman JE. The association of actin with Hirano bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1983;42(2):146-52.
  173. Maciver SK, Harrington CR. Two actin binding proteins, actin depolymerizing factor and cofilin, are associated with Hirano bodies. *Neuroreport* 1995;6(15):1985-8.
  174. Peterson C, Kress Y, Vallee R, Goldman JE. High molecular weight microtubule-associated proteins bind to actin lattices (Hirano bodies). *Acta Neuropathol* 1988;77(2):168-74.



175. Symons M, Derry JM, Karlak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick F, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 1996;84(5):723-34.
176. Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, et al. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(7):3739-44.
177. Hufner K, Higgs HN, Pollard TD, Jacobi C, Aepfelbacher M, Linder S. The verprolin-like central (vc) region of Wiskott-Aldrich syndrome protein induces Arp2/3 complex-dependent actin nucleation. *J Biol Chem* 2001;276(38):35761-7.
178. Kim AS, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu GA, Rosen MK. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* 2000;404(6774):151-8.
179. Lee E, Shelden EA, Knecht DA. Formation of F-actin aggregates in cells treated with actin stabilizing drugs. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998;39(2):122-33.
180. Wehland J, Osborn M, Weber K. Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5613-7.
181. Pederson T. Isolation and characterization of chromatin from the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *Biochemistry* 1977;16(12):2771-7.
182. Fukui Y. Intranuclear actin bundles induced by dimethyl sulfoxide in interphase nucleus of *Dictyostelium*. *J Cell Biol* 1978;76(1):146-57.
183. Osborn M, Weber K. Dimethylsulfoxide and the ionophore A23187 affect the arrangement of actin and induce nuclear actin paracrystals in PtK2 cells. *Exp Cell Res* 1980;129(1):103-14.
184. Fukui Y, Katsumaru H. Nuclear actin bundles in *Amoeba*, *Dictyostelium* and human HeLa cells induced by dimethyl sulfoxide. *Exp Cell Res* 1979;120(2):451-5.
185. McDonald D, Carrero G, Andrin C, de Vries G, Hendzel MJ. Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J Cell Biol* 2006;172(4):541-52.
186. Hofmann W, Reichart B, Ewald A, Muller E, Schmitt I, Stauber RH, et al. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol* 2001;152(5):895-910.
187. Krauss SW, Chen C, Penman S, Heald R. Nuclear actin and protein 4.1: essential interactions during nuclear assembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(19):10752-7.
188. Nunez E, Kwon YS, Hutt KR, Hu Q, Cardamone MD, Ohgi KA, et al. Nuclear receptor-enhanced transcription requires motor- and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Cell* 2008;132(6):996-1010.
189. de Lanerolle P, Johnson T, Hofmann WA. Actin and myosin I in the nucleus: what next? *Nat Struct Mol Biol* 2005;12(9):742-6.
190. Grummt I. Actin and myosin as transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16(2):191-6.
191. Percipalle P, Fomproix N, Cavellan E, Voit R, Reimer G, Kruger T, et al. The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO Rep* 2006;7(5):525-30.
192. Percipalle P, Visa N. Molecular functions of nuclear actin in transcription. *J Cell Biol* 2006;172(7):967-71.
193. Fomproix N, Percipalle P. An actin-myosin complex on actively transcribing genes. *Exp Cell Res* 2004;294(1):140-8.

194. Philimonenko VV, Zhao J, Iben S, Dingova H, Kysela K, Kahle M, et al. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 2004;6(12):1165-72.
195. Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, et al. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 2004;6(11):1094-101.
196. Hu P, Wu S, Hernandez N. A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* 2004;18(24):3010-5.
197. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 1998;143(7):1883-98.
198. Yu H, Kaung G, Kobayashi S, Kopito RR. Cytosolic degradation of T-cell receptor alpha chains by the proteasome. *J Biol Chem* 1997;272(33):20800-4.
199. Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, Sztul ES. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* 1999;146(6):1239-54.
200. Wigley WC, Fabunmi RP, Lee MG, Marino CR, Muallem S, DeMartino GN, et al. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol* 1999;145(3):481-90.
201. Verhoef LG, Lindsten K, Masucci MG, Dantuma NP. Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum Mol Genet* 2002;11(22):2689-700.
202. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 2000;10(12):524-30.
203. Tran PB, Miller RJ. Aggregates in neurodegenerative disease: crowds and power? *Trends Neurosci* 1999;22(5):194-7.
204. Speed MA, Wang DI, King J. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. *Nat Biotechnol* 1996;14(10):1283-7.
205. Jaenicke R, Rudolph R. Refolding and association of oligomeric proteins. *Methods Enzymol* 1986;131:218-50.
206. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004;36(6):585-95.
207. Kim DH, Davis RC, Furukawa R, Fehheimer M. Autophagy contributes to degradation of Hirano bodies. *Autophagy* 2009;5(1):44-51.
208. Gibson PH. Light and electron microscopic observations on the relationship between Hirano bodies, neuron and glial perikarya in the human hippocampus. *Acta Neuropathol* 1978;42(3):165-71.
209. Izumiyama N, Ohtsubo K, Tachikawa T, Nakamura H. Elucidation of three-dimensional ultrastructure of Hirano bodies by the quick-freeze, deep-etch and replica method. *Acta Neuropathol* 1991;81(3):248-54.
210. Tomonaga M. Ultrastructure of Hirano bodies. *Acta Neuropathol* 1974;28(4):365-6.
211. Nunnally MH, D'Angelo JM, Craig SW. Filamin concentration in cleavage furrow and midbody region: frequency of occurrence compared with that of alpha-actinin and myosin. *J Cell Biol* 1980;87(1):219-26.
212. Fujiwara K, Porter ME, Pollard TD. Alpha-actinin localization in the cleavage furrow during cytokinesis. *J Cell Biol* 1978;79(1):268-75.
213. Mukhina S, Wang YL, Murata-Hori M. Alpha-actinin is required for tightly regulated remodeling of the actin cortical network during cytokinesis. *Dev Cell* 2007;13(4):554-65.

214. Adachi H, Takahashi Y, Hasebe T, Shirouzu M, Yokoyama S, Sutoh K. Dictyostelium IQGAP-related protein specifically involved in the completion of cytokinesis. *J Cell Biol* 1997;137(4):891-8.
215. Mondal S, Burgute B, Rieger D, Muller R, Rivero F, Faix J, et al. Regulation of the actin cytoskeleton by an interaction of IQGAP related protein GAPA with filamin and cortexillin I. *PLoS One* 2010;5(11):e15440.
216. Rivero F, Furukawa R, Fechheimer M, Noegel AA. 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* 1999;112 ( Pt 16):2737-51.
217. Cox D, Wessels D, Soll DR, Hartwig J, Condeelis J. Re-expression of ABP-120 rescues cytoskeletal, motility, and phagocytosis defects of ABP-120- Dictyostelium mutants. *Mol Biol Cell* 1996;7(5):803-23.
218. Skoble J, Auerbuch V, Goley ED, Welch MD, Portnoy DA. Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol* 2001;155(1):89-100.
219. Huttelmaier S, Harbeck B, Steffens O, Messerschmidt T, Illenberger S, Jockusch BM. Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett* 1999;451(1):68-74.
220. Trichet L, Sykes C, Plastino J. Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP. *J Cell Biol* 2008;181(1):19-25.
221. Bear JE, Gertler FB. Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 12):1947-53.
222. Lambrechts A, Kwiatkowski AV, Lanier LM, Bear JE, Vandekerckhove J, Ampe C, et al. cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. *J Biol Chem* 2000;275(46):36143-51.
223. Bear JE, Loureiro JJ, Libova I, Fassler R, Wehland J, Gertler FB. Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell* 2000;101(7):717-28.
224. Pistor S, Grobe L, Sechi AS, Domann E, Gerstel B, Machesky LM, et al. Mutations of arginine residues within the 146-KKRRK-150 motif of the ActA protein of *Listeria monocytogenes* abolish intracellular motility by interfering with the recruitment of the Arp2/3 complex. *J Cell Sci* 2000;113 ( Pt 18):3277-87.
225. Skoble J, Portnoy DA, Welch MD. Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol* 2000;150(3):527-38.
226. Fradelizi J, Noireaux V, Plastino J, Menichi B, Louvard D, Sykes C, et al. ActA and human zyxin harbour Arp2/3-independent actin-polymerization activity. *Nat Cell Biol* 2001;3(8):699-707.
227. Bear JE, Svitkina TM, Krause M, Schafer DA, Loureiro JJ, Strasser GA, et al. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 2002;109(4):509-21.
228. Pasic L, Kotova T, Schafer DA. Ena/VASP proteins capture actin filament barbed ends. *J Biol Chem* 2008;283(15):9814-9.
229. Breitsprecher D, Kiesewetter AK, Linkner J, Urbanke C, Resch GP, Small JV, et al. Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *Embo J* 2008;27(22):2943-54.
230. Breitsprecher D, Kiesewetter AK, Linkner J, Vinzenz M, Stradal TE, Small JV, et al. Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *Embo J* 2011;30(3):456-67.

231. Kursula P, Kursula I, Massimi M, Song YH, Downer J, Stanley WA, et al. High-resolution structural analysis of mammalian profilin 2a complex formation with two physiological ligands: the formin homology 1 domain of mDia1 and the proline-rich domain of VASP. *J Mol Biol* 2008;375(1):270-90.
232. Hansen SD, Mullins RD. VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *J Cell Biol* 2010;191(3):571-84.
233. Petrella EC, Machesky LM, Kaiser DA, Pollard TD. Structural requirements and thermodynamics of the interaction of proline peptides with profilin. *Biochemistry* 1996;35(51):16535-43.
234. Vinson VK, De La Cruz EM, Higgs HN, Pollard TD. Interactions of *Acanthamoeba* profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry* 1998;37(31):10871-80.
235. Kaiser DA, Vinson VK, Murphy DB, Pollard TD. Profilin is predominantly associated with monomeric actin in *Acanthamoeba*. *J Cell Sci* 1999;112 ( Pt 21):3779-90.
236. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003;112(4):453-65.
237. Reyes JF, Stone K, Ramos J, Maselli A. Formation of Hirano bodies after inducible expression of a modified form of an actin-cross-linking protein. *Eukaryot Cell* 2009;8(6):852-7.
238. Farese RV, Jr., Walther TC. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 2009;139(5):855-60.
239. Asano S, Mishima M, Nishida E. Coronin forms a stable dimer through its C-terminal coiled coil region: an implicated role in its localization to cell periphery. *Genes Cells* 2001;6(3):225-35.
240. McCoy AJ, Fucini P, Noegel AA, Stewart M. Structural basis for dimerization of the Dictyostelium gelation factor (ABP120) rod. *Nat Struct Biol* 1999;6(9):836-41.
241. Wallraff E, Schleicher M, Modersitzki M, Rieger D, Isenberg G, Gerisch G. Selection of Dictyostelium mutants defective in cytoskeletal proteins: use of an antibody that binds to the ends of alpha-actinin rods. *Embo J* 1986;5(1):61-7.
242. Spandl J, White DJ, Peychl J, Thiele C. Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540. *Traffic* 2009;10(11):1579-84.
243. Brink M, Gerisch G, Isenberg G, Noegel AA, Segall JE, Wallraff E, et al. A Dictyostelium mutant lacking an F-actin cross-linking protein, the 120-kD gelation factor. *J Cell Biol* 1990;111(4):1477-89.
244. Weber I, Gerisch G, Heizer C, Murphy J, Badelt K, Stock A, et al. Cytokinesis mediated through the recruitment of cortexillins into the cleavage furrow. *Embo J* 1999;18(3):586-94.
245. Simpson PA, Spudich JA, Parham P. Monoclonal antibodies prepared against Dictyostelium actin: characterization and interactions with actin. *J Cell Biol* 1984;99(1 Pt 1):287-95.
246. Westphal M, Jungbluth A, Heidecker M, Muhlbauer B, Heizer C, Schwartz JM, et al. Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr Biol* 1997;7(3):176-83.
247. Graf R, Dauderer C, Schliwa M. Dictyostelium DdCP224 is a microtubule-associated protein and a permanent centrosomal resident involved in centrosome duplication. *J Cell Sci* 2000;113 ( Pt 10):1747-58.
248. Hartmann H, Noegel AA, Eckerskorn C, Rapp S, Schleicher M. Ca<sup>2+</sup>-independent F-actin capping proteins. Cap 32/34, a capping protein from Dictyostelium discoideum, does not share sequence homologies with known actin-binding proteins. *J Biol Chem* 1989;264(21):12639-47.

249. de Hostos EL, Bradtke B, Lottspeich F, Guggenheim R, Gerisch G. Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *Embo J* 1991;10(13):4097-104.
250. Konzok A, Weber I, Simmeth E, Hacker U, Maniak M, Muller-Taubenberger A. DAip1, a *Dictyostelium* homologue of the yeast actin-interacting protein 1, is involved in endocytosis, cytokinesis, and motility. *J Cell Biol* 1999;146(2):453-64.
251. Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 1985;5(12):3610-6.
252. Pagh K, Gerisch G. Monoclonal antibodies binding to the tail of *Dictyostelium discoideum* myosin: their effects on antiparallel and parallel assembly and actin-activated ATPase activity. *J Cell Biol* 1986;103(4):1527-38.
253. Ravanel K, de Chasse B, Cornillon S, Benghezal M, Zulianello L, Gebbie L, et al. Membrane sorting in the endocytic and phagocytic pathway of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Cell Biol* 2001;80(12):754-64.
254. Monnat J, Hacker U, Geissler H, Rauchenberger R, Neuhaus EM, Maniak M, et al. *Dictyostelium discoideum* protein disulfide isomerase, an endoplasmic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal. *FEBS Lett* 1997;418(3):357-62.
255. Troll H, Malchow D, Muller-Taubenberger A, Humbel B, Lottspeich F, Ecke M, et al. Purification, functional characterization, and cDNA sequencing of mitochondrial porin from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 1992;267(29):21072-9.
256. Haugwitz M, Noegel AA, Rieger D, Lottspeich F, Schleicher M. *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J Cell Sci* 1991;100 ( Pt 3):481-9.
257. Schleicher M, Gerisch G, Isenberg G. New actin-binding proteins from *Dictyostelium discoideum*. *Embo J* 1984;3(9):2095-100.
258. Neuhaus EM, Horstmann H, Almers W, Maniak M, Soldati T. Ethane-freezing/methanol-fixation of cell monolayers: a procedure for improved preservation of structure and antigenicity for light and electron microscopies. *J Struct Biol* 1998;121(3):326-42.
259. Journet A, Chapel A, Jehan S, Adessi C, Freeze H, Klein G, et al. Characterization of *Dictyostelium discoideum* cathepsin D. *J Cell Sci* 1999;112 ( Pt 21):3833-43.
260. Manstein DJ, Schuster HP, Morandini P, Hunt DM. Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene* 1995;162(1):129-34.
261. Dubin M. Nuclear organisation and epigenetic regulation of gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Diplomarbeit; Fachbereich 10; Universität Kassel* 2010.
262. Fisher PR, Noegel AA, Fechheimer M, Rivero F, Prassler J, Gerisch G. Photosensory and thermosensory responses in *Dictyostelium* slugs are specifically impaired by absence of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120). *Curr Biol* 1997;7(11):889-92.
263. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350-4.
264. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.

## 10. Danksagung

Für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Abteilung Zellbiologie durchführen zu können und für die zahlreichen und hilfreichen Anregungen und Diskussionen während meiner lehrreichen Promotionszeit möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Maniak bedanken.

Bei Prof. Dr. Frau Mireille Schäfer möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Prof. Dr. Hellmuth Zöltzer und Prof. Dr. Wolfgang Nellen danke ich, dass sie sich für die Prüfungskommission zur Verfügung gestellt haben.

Für ein dreijähriges Promotionsstipendium zur Finanzierung meiner Arbeit möchte ich mich bei der Universität Kassel bedanken.

Mein Dank gilt Harald Rühling für die Unterstützung und die Geduld bezüglich der Arbeiten am CLSM sowie Prof. Dr. Hellmuth Zöltzer und Heidemarie Gärtner für die Hilfen bei den TEM-Untersuchungen.

Meinen Kollegen aus der Abteilung Zellbiologie, vor allem Xiaoli Du, Frauke Hänel, Peggy Paschke, Caro Barisch, Gleb Konotop und Patrick Holz danke ich für die viele Unterstützung im praktischen sowie theoretischen Bereich und vor allem für das Schaffen einer so angenehmen und lustigen Arbeitsatmosphäre. Ein besonders großer Dank geht in diesem Zusammenhang an meine Kollegin Heike Otto, die mir über die gesamte Promotionszeit hinweg mit größter Zuverlässigkeit und ausdauernder Geduld zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke meinen Kollegen aus den Abteilungen Genetik und Biochemie für die materiellen und intellektuellen Hilfen sowie für das freundliche Arbeitsklima.

Birgit Simon, Lydia Sand, Monika Winneknecht und Carmen Demme danke ich für die treue Versorgung mit den unterschiedlichsten Laborressourcen.

Ich danke Ralf Rethmeier, Eva von der Heide und Peter Thul für die hilfreichen Hinweise zum Manuskript der vorliegenden Dissertation.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Mam und Ralph, die mich fortwährend in vielerlei Hinsicht während meiner gesamten Promotionszeit unterstützten. Mein Dank gilt auch allen Freunden, die mich während dieser Zeit begleiteten.