

Zusammenfassung

Die Proteine der CAP Familie sind G-Aktin bindende Proteine, die bisher in allen untersuchten eukaryotischen Organismen identifiziert werden konnten. Das erste Mitglied dieser Familie wurde in *S. cerevisiae* als Bestandteil des Adenylatzyklasekomplexes entdeckt, später konnten CAP Homologe in einer Vielzahl von Pflanzen, Tieren und Pilzen identifiziert werden. In Säugetieren werden zwei Homologe, CAP1 und CAP2, exprimiert.

Hier wurde ein Knockout-Vektor für CAP1 aus der Maus konstruiert und die Expression von CAP1 in verschiedenen Organen sowie dessen subzelluläre Lokalisierung untersucht. Die Arme des Knockout-Vektors wurden mit einer DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (*PfuTurbo*[®]-DNA-Polymerase) aus genomischer ES-Zell DNA amplifiziert und zusammen mit einer Neomycinresistenzkassette in einen pBS-Vektor ligiert. Die homologe Rekombination des Knockout-Konstruktes mit der genomischen Zielsequenz sollte das dritte Exon des CAP1 Gens, bis auf wenige Basen am 5´ und 3´ Ende des Exons gegen die Neomycinresistenzkassette austauschen. Dadurch kommt es zu einer Leserasterverschiebung, die zu einem funktionslosen CAP1 Allel führt. Mögliche alternative Spleißvorgänge hätten ein verkürztes CAP1 Protein hervorbringen können, dem aber der N-Terminus gefehlt hätte. Nach der Transfektion der ES-Zellen mit dem knockout-Vektor wurden 450 ES-Zell Klone isoliert. Die Durchmusterung dieser Klone nach homologer Rekombination erbrachte bei Southernblot Analysen aber keine positiven Ergebnisse.

In Westernblot Analysen von Gewebehomogenaten wurde hier die CAP1 Expression in der Maus untersucht. Dabei wurden in Homogenaten von Thymus, Milz und Lunge die größten Mengen detektiert. Die zweitgrößten Mengen wurden in Hoden, Leber und Magen nachgewiesen. Die geringsten CAP1 Spiegel waren in Herz, Skelettmuskel, Gehirn, Haut und Niere vorhanden. Genauer wurde die Expression für CAP1 im Gehirn untersucht. Bei neugeborenen Mäusen konnte mehr CAP1 in den Homogenaten von *Cortex cerebri* und *Bulbus olfactorius* als in den Homogenaten von Thalamus/ Striatum, Hirnstamm und *Cerebellum* nachgewiesen werden. Für die adulten Tiere wurden Thalamus und Striatum separat und zusätzlich noch das Homogenat der *Medulla oblongata* analysiert. Für fast alle Gehirnbereiche konnte das gleiche Expressionsniveau für CAP1 gezeigt werden, nur im Thalamus und der

Medulla oblongata konnten etwas höhere CAP1 Spiegel nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte CAP1 im *Bulbus olfactorius*, im *Cortex cerebri*, in der Hippokampusformation, im Striatum, in der *Capsula interna* und im *Cerebellum* mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

In Northernblot Analysen wurde hier eine gleichmäßige Expression von CAP1 während der Entwicklung von Tag 7-17 gezeigt. Gleichzeitig machten indirekten Immunfluoreszenzstudien an Paraffinschnitten deutlich, daß die CAP1 Expression auf bestimmte Organe beschränkt ist.

Die subzelluläre Lokalisation wurde mit indirekter Immunfluoreszenz und mit einem GFP-CAP1 Fusionsprotein an Zellen und zusätzlich durch subzelluläre Fraktionierungen von Zellhomogenaten im Saccharosegradienten untersucht.

In Fibroblasten und Keratinozyten kolokalisierte CAP1 mit F-Aktin am Leitsaum. Gleichzeitig war GFP-CAP1 im Wachstumskegel differenzierter Neuroblastomzellen konzentriert. Auch bei Wundheilungsexperimenten, die mit Fibroblasten und Keratinozyten durchgeführt wurden konnte die Lokalisation von CAP1 am Leitsaum der Zellen gezeigt werden. Damit war CAP1 in allen untersuchten Zellen in den Bereichen mit größter Aktindynamik angereichert.

In der subzellulären Fraktionierung konnte für CAP1 aber keine Membranassoziation über F-Aktin gezeigt werden. Statt dessen wurde gezeigt, daß CAP1 als Multimer vorliegt.