

**Studien zur Funktion des aktinbindenden Proteins Fimbrin:
Generierung einer L-Plastin-defizienten Maus-ES-Zelllinie
und Analyse von Fimbrin-Mutanten von
*Dictyostelium discoideum***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Claudia Pikzack

aus Solingen

Köln
2001

Berichtersteller:

Frau Prof. Dr. A. A. Noegel

Herr Prof. Dr. H. W. Klein

Tag der mündlichen Prüfung:

6. Februar 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1998 bis August 2001 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel am Biochemischen Institut I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.

Abkürzungsverzeichnis

³² P	radioaktives Phosphoratom
A	Adenin
ABP	aktinbindendes Protein
ABP 34	34 kDa aktinbindendes Protein
AS	Aminosäure(n)
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rindersrumalbumin
Bt	<i>Bos taurus</i>
<i>B. Taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
C	Cytosin
CH	Calponin-Homologie
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA (revers von RNA transkribierte DNA)
Ce	<i>Coenorhabditis elegans</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Coenorhabditis elegans</i>
Cg	<i>Cricetulus griseus</i>
<i>C. griseus</i>	<i>Cricetulus griseus</i>
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	calciumbindende Domäne
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERM-Domäne	Ezrin-Radixin-Moesin-Homologie-Domäne
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gg	<i>Gallus gallus</i>
<i>G. gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
Gp	<i>Giberella pulicaris</i>
<i>G. pulicaris</i>	<i>Giberella pulicaris</i>
Hs	<i>Homo sapiens</i>

<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
<i>K. aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
kB	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
KLH	engl.: keyhole limpet haemocyanine
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
min	Minuten
Mm	<i>Mus Musculus</i>
<i>M. musculus</i>	<i>Mus Musculus</i>
MOPS	Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin-Homologie
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
Pp	<i>Polysphondylium pallidum</i>
<i>P. pallidum</i>	<i>Polysphondylium pallidum</i>
Rn	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Sc	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
T	Thymidin
Ta	<i>Triticum aestivum</i>
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tt	<i>Tetrahymena thermophila</i>
<i>T. thermophila</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Chemische Elemente und Verbindungen, physikalische Größen und Einheiten werden entsprechend den internationalen Richtlinien abgekürzt.

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1.	Das Zytoskelett	1
2.	Aktinbindende Proteine	2
3.	Plastine und Fimbrine	4
4.	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus	5
5.	Herstellung transgener embryonaler Stammzellen durch „Gene Targeting“	7
6.	Zielsetzung der Arbeit	8
B	Ergebnisse	9
1.	Generierung einer L-Plastin defizienten ES-Zelllinie	9
1.1.	Kartierung und Sequenzierung des L-Plastin-Gens	9
1.1.1	Klonierung und Amplifizierung von Fragmenten genomischer DNA, Erstellung einer Restriktionskarte mit Southern-Blot-Analyse	10
1.1.2	Organisation des L-Plastin-Gens von <i>Homo sapiens</i> und <i>Mus musculus</i> im Vergleich	14
1.2.	„Knockout-Targeting“-Konstrukt	16
1.3.	Herstellung rekombinanter ES-Zellklone	17
2.	Herstellung polyklonaler anti-Peptid-Antikörper gegen die Isoformen des Plastins der Maus	19
3.	Analyse von Fimbrin-Mutanten von <i>Dictyostelium discoideum</i>	21
3.1.	Northern-Blot-Analyse der Fimbrin-Mutanten	22
3.2.	Western-Blot-Analyse der Fimbrin-Mutanten	23
3.3.	Zellbiologische Untersuchungen der Fimbrin-Mutanten	24
3.3.1	Wachstum	24
3.3.2	Bestimmung der Zellgröße	27
3.3.3	Endozytose	27
3.3.4	Exozytose	29
3.3.5	Phagozytose	30
3.4.	Lokalisation von Fimbrin und Aktin in fixierten <i>D. discoideum</i> -Zellen	31
3.4.1	Vergleich der verschiedenen Fimbrin-Mutanten bei Verwendung unterschiedlicher Fixierungsmethoden	31
3.4.2	Lokalisation von Fimbrin in Aktin-GFP-Zellen	34
3.4.3	Expression von murinem L-Plastin in <i>D. discoideum</i>	35
3.5.	Verhalten von Fimbrin-Mutanten unter osmotischem Stress	37
4.	Suche nach zu Fimbrin homologen Proteinen in <i>D. discoideum</i> und Vergleich zu anderen Proteinen der Plastin-Familie	41
4.1.	Suche nach fimbrinähnlichen Proteinen	41
4.2.	Struktur der fimbrinähnlichen Proteine	42
4.3.	Homologie der fimbrinähnlichen Proteine aus <i>D. discoideum</i> zu anderen Fimbrinen und Plastinen	43
4.3.1	Sequenzvergleich	43
4.3.2	Phylogenetischer Stammbaum	46
4.4.	Analyse des fimbrinähnlichen Proteins F02091	48
4.4.1	Der zu Talin ähnliche Sequenzbereich	48
4.4.2	Die Pleckstrin-Homologie-Domäne	48
C	Diskussion	50
1.	Generierung einer L-Plastin defizienten ES-Zelllinie	50
2.	Zellbiologische Untersuchungen der Fimbrin-Mutanten aus <i>D. discoideum</i>	51
2.1.	Die Mutanten Δ EF und S? A	52
2.2.	Die Mutanten B1, B3 und FG2	53

3.	Lokalisation von Fimbrin in der Zelle	55
4.	Neue fimbrinähnliche Proteine aus <i>D. discoideum</i>	57
D	Zusammenfassung	59
E	Material und Methoden	61
1.	Material	61
1.1.	Labormaterialien	61
1.2.	Geräte	61
1.3.	Software	62
1.4.	Für phylogenetische Analysen verwendete Sequenzen	63
1.5.	Kits	63
1.6.	Enzyme, Inhibitoren, Antikörper und Antibiotika	64
1.7.	Chemikalien und Reagenzien	65
1.8.	Vektoren	67
1.9.	Oligonukleotide	67
1.10.	Puffer und andere Lösungen	69
1.11.	Medien	70
1.11.1	Medien für <i>E. coli</i> -Kulturen [Sambroock <i>et al.</i> , 1989]	70
1.11.2	Medien für <i>D. discoideum</i> -Kulturen	71
1.12.	Bakterien und <i>D. discoideum</i> -Stämme, Kulturzellen	71
2.	Molekularbiologische Methoden	72
2.1.	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> [Holmes und Quigley, 1981]	72
2.2.	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel	73
2.3.	Aufreinigung von Plasmid-DNA für die Transfektion von ES-Zellen gemäß Qiagen	73
2.4.	Präparation chromosomaler DNA au ES-Zellen [Hogan <i>et al.</i> , 1994]	74
2.5.	Isolierung genomischer DNA Schwanzspitzenbiopsien [Hogan <i>et al.</i> , 1994]	75
2.6.	DNA-Agarosegelelektrophorese [Sambroock <i>et al.</i> , 1989]	75
2.7.	Southern-Blot-Analyse [Southern, 1975]	76
2.8.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Maus-Geweben	76
2.9.	RNA-Agarosegelelektrophorese [Lehrach <i>et al.</i> , 1977]	77
2.10.	Northern-Blot-Analyse	77
2.11.	Radioaktive Markierung von DNA-Proben mit dem Stratagene Prime [®] It II-Kit	78
2.12.	Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden	78
2.13.	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	79
2.14.	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	80
2.15.	<i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	80
2.15.1	Verdau mit Restriktionsendonukleasen	80
2.15.2	Phosphatase-Behandlung	80
2.15.3	Überführung überstehender Enden in glatte Enden	81
2.15.4	Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten	81
2.16.	Saccharosegradient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe [Sambroock <i>et al.</i> , 1989]	82
2.17.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	83
2.18.	Reverse Transkriptase Reaktion	84
2.19.	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	84
2.19.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation	84
2.19.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroporation	85
2.19.3	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen	85
3.	Proteinchemische und immunologische Methoden	85
3.1.	Induktion und Extraktion rekombinanter Proteine	85
3.1.1	Reinigung rekombinanter Proteine nach Qiagen (pQE-System)	86

3.1.2	Reinigung rekombinanter Proteine mit pGEX-2T-Expressionssystem [Smith, 1993]	86
3.2.	Herstellung von Proteinhomogenaten aus Organen der Maus	87
3.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration	87
3.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970]	88
3.5.	Western Blot	89
3.6.	Protein-Färbung	89
3.7.	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrozellulose	90
3.8.	Produktion und Reinigung polyklonaler anti-Peptid-Antikörper [Walter <i>et al.</i> , 1980]	90
3.8.1	Kopplung von Peptiden an KLH	90
3.8.2	Immunisierung	91
3.8.3	Reinigung	91
4.	Kultur von <i>Dictyostelium discoideum</i>	94
4.1.	Anzucht in Flüssigmedium	94
4.2.	Anzucht auf Agarplatten	94
4.3.	Anzucht in Bakteriensuspension	94
4.4.	Einfrieren von <i>D. discoideum</i> -Zellen	94
4.5	Transformation von <i>D. discoideum</i>	95
5.	Zellbiologische Methoden	95
5.1.	Indirekte Immunfluoreszenz von <i>D. discoideum</i> -Zellen	95
5.2.	Indirekte Immunfluoreszenz von <i>D. discoideum</i> -Zellen mit phagozytierten Hefen	97
5.3.	Hyper- und hypoosmotischer Schock	97
5.4.	Fluoreszenzmikroskopie	97
5.5.	Phagozytose von fluoreszenzmarkierten Hefen [Maniak <i>et al.</i> , 1995]	98
5.6.	Endozytose von FITC-Dextran [Thilo und Vogel, 1980]	98
5.7.	Exozytose von FITC-Dextran [Thilo und Vogel, 1980]	99
5.8.	Bestimmung der Zellgröße	99
6.	Methoden zum „Gene-Targeting“	100
6.1.	Präparation embryonaler Fibroblasten	100
6.2.	Kultur von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Ma	101
6.3.	Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen	101
F	Literatur	103
G	Summary	114

A Einleitung

1. Das Zytoskelett

Das Zytoskelett, ein Netzwerk aus filamentären Strukturen, gibt eukaryontischen Zellen ihre Form, es ermöglicht neben Bewegung und Nahrungsaufnahme zahlreiche essentielle Abläufe innerhalb einer Zelle. Die verschiedenen Filamente werden entsprechend ihres Durchmessers den Mikrofilamenten (5-6 nm), Intermediärfilamenten (7-10 nm) oder Mikrotubuli (25 nm) zugeordnet.

Mikrofilamente bestehen aus dem 43 kDa globulären Protein Aktin, welches unter Verbrauch von ATP Filamente bildet. In vitro ist eine Konzentration mono- oder divalenter Kationen wie K^+ oder Mg^{2+} von 0,1 μM erforderlich, um die Polymerisation von Aktin auszulösen. Dabei bewirkt die Bindung der Kationen an globuläres Aktin eine Konformationsänderung des Proteins, welche die Filamentbildung ermöglicht. Geschwindigkeitsbestimmend ist dabei die Bildung von Aktintrimeren, die Nukleation. Die Verlängerung des Nukleus kann an beiden Enden des Filaments erfolgen, allerdings mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die Filamente sind polar und besitzen ein schnell wachsendes (+)-Ende und ein langsam wachsendes (-)-Ende. Reguliert wird die Nukleation und Polymerisation von zahlreichen Proteinen und Proteinkomplexen. So ist der aus sieben Proteinen bestehende Arp 2/3 Komplex für die Nukleation von Verzweigungen an bereits bestehenden Aktinfilamenten verantwortlich [Bear *et al.*, 2001; Gärtner *et al.*, 1998; Wegner und Isenberg, 1983].

Die Proteine des Intermediärfilamentsystems lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Zytokeratine, Lamine, Vimentin und vimentinähnliche Proteine. Alle zu diesen drei Familien gehörenden Proteine weisen gemeinsame Strukturmerkmale auf. Sie besitzen eine zentrale α -helikale Domäne, die durch Bildung von Doppelhelizes aus den Monomeren Protofilamente bildet. Intermediärfilamente sind aus mehreren Protofilamenten zusammengesetzt. Sie sind an der mechanischen Stabilisierung der Zelle beteiligt. Bisher konnten Intermediärfilamente ausschließlich in höheren Eukaryonten nachgewiesen werden. In Hefe, *Dictyostelium discoideum* und in Protozoen fehlen sie [Franke, 1993].

Heterodimere Untereinheiten aus α - und β -Tubulin bilden die röhrenförmigen Mikrotubuli. Die gerichtete Polymerisation der Tubulin-Dimere geht vom Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) aus; unter Verbrauch von GTP werden Protofilamente gebildet. 13 dieser Protofilamente bilden dann Mikrotubuli, welche die ganze Zelle durchspannen und mit dem schnell wachsenden Ende in Richtung der Zellperipherie weisen. Während der Mitose sind

Mikrotubuli für den Aufbau des Spindelapparates verantwortlich, welcher die Chromosomen auf die Tochterzellen verteilt [Mandelkow und Mandelkow, 1995]. Weiterhin werden Vesikel und Organellen entlang der Mikrotubuli durch Dynein und Kinesin transportiert.

2. Aktinbindende Proteine

Zahlreiche Protein-Protein-Wechselwirkungen sind erforderlich, damit das Zytoskelett zu jedem Zeitpunkt die notwendige Form annehmen kann. So wird das Gleichgewicht zwischen globulärem und filamentösem Aktin nicht nur durch ionische Komponenten sondern auch durch eine Vielzahl aktinbindender Proteine reguliert [Pollard und Cooper, 1986; Stossel *et al.*, 1985]

Entsprechend ihrer Funktionen werden aktinbindende Proteine in Gruppen zusammengefasst (s. Abb. A 2.1). Zu den Proteinen, die Aktin-Monomere binden, gehören CAP [Gottwald *et al.*, 1996], Profilin [Haugwitz *et al.*, 1991] und Cofilin [Toshima *et al.*, 2001]. Diese Proteine verlangsamen die Aktin-Polymerisation indem sie einen Komplex mit globulärem Aktin bilden, der es dem Gleichgewicht entzieht. Sogenannte „Capping“-Proteine binden an das (+)-Ende der Filamente und verhindern so die Verlängerung. Hierzu zählen CAP Z in Muskelzellen [Casella *et al.*, 1986] und Cap 32/34 aus *D. discoideum* [Eddy *et al.*, 1996; Haus *et al.*, 1993]. So findet eine Filamentverlängerung nur noch an den langsamer wachsenden (-)-Enden statt. Andere Proteine wie z.B. Gelsolin aus Säugerzellen [Yin und Stossel, 1997] oder Severin aus *D. discoideum* [Eichinger *et al.*, 1998] bewirken eine Depolymerisierung von Aktinfilamenten. Sie binden an die (+)-Enden fragmentierter Filamente um die erneute Verlängerung zu verhindern. Verschiedene Funktionen werden von membranassoziierten aktinbindenden Proteinen übernommen. So stellt Comitin [Weiner *et al.*, 1993] eine Verbindung zwischen Aktin-Zytoskelett und den Membranen des Golgi-Apparates her, Talin [Kreitmeier *et al.*, 1995; Martel *et al.*, 2001] hingegen ist mit der Plasmamembran assoziiert und interagiert mit Integrinen. Ein Großteil der Aktinfilamente liegt in der Zelle als Netzwerk oder in Bündeln paralleler Filamente vor. Für den Aufbau und Erhalt dieser Strukturen sind aktinbündelnde Proteine wie Fimbrin [De Arruda *et al.*, 1990] und quervernetzende Proteine wie Spektrin [Brenner und Korn, 1979] oder α -Aktinin [Noegel *et al.*, 1987] verantwortlich. Um Aktinfilamente vernetzen zu können, müssen zwei aktinbindende Domänen vorhanden sein. Diese können wie im Falle von Fimbrin auf einer Polypeptidkette lokalisiert sein oder es kommt zu einer antiparallelen Assoziation von zwei Polypeptiden mit jeweils einer

aktinbindenden Untereinheit. Letzteres ist beispielsweise bei Filamin [Gorlin *et al.*, 1990; Hock *et al.*, 1990] der Fall. Einige der aktinquevernetzenden oder bündelnden Proteine werden aufgrund ihrer sehr ähnliche, hoch konservierten aktinbindenden Domänen in der α -Aktinin-Familie zusammengefasst. Hierzu gehören neben α -Aktinin z.B. Dystrophin, Spektrin, Filamin und Fimbrin.

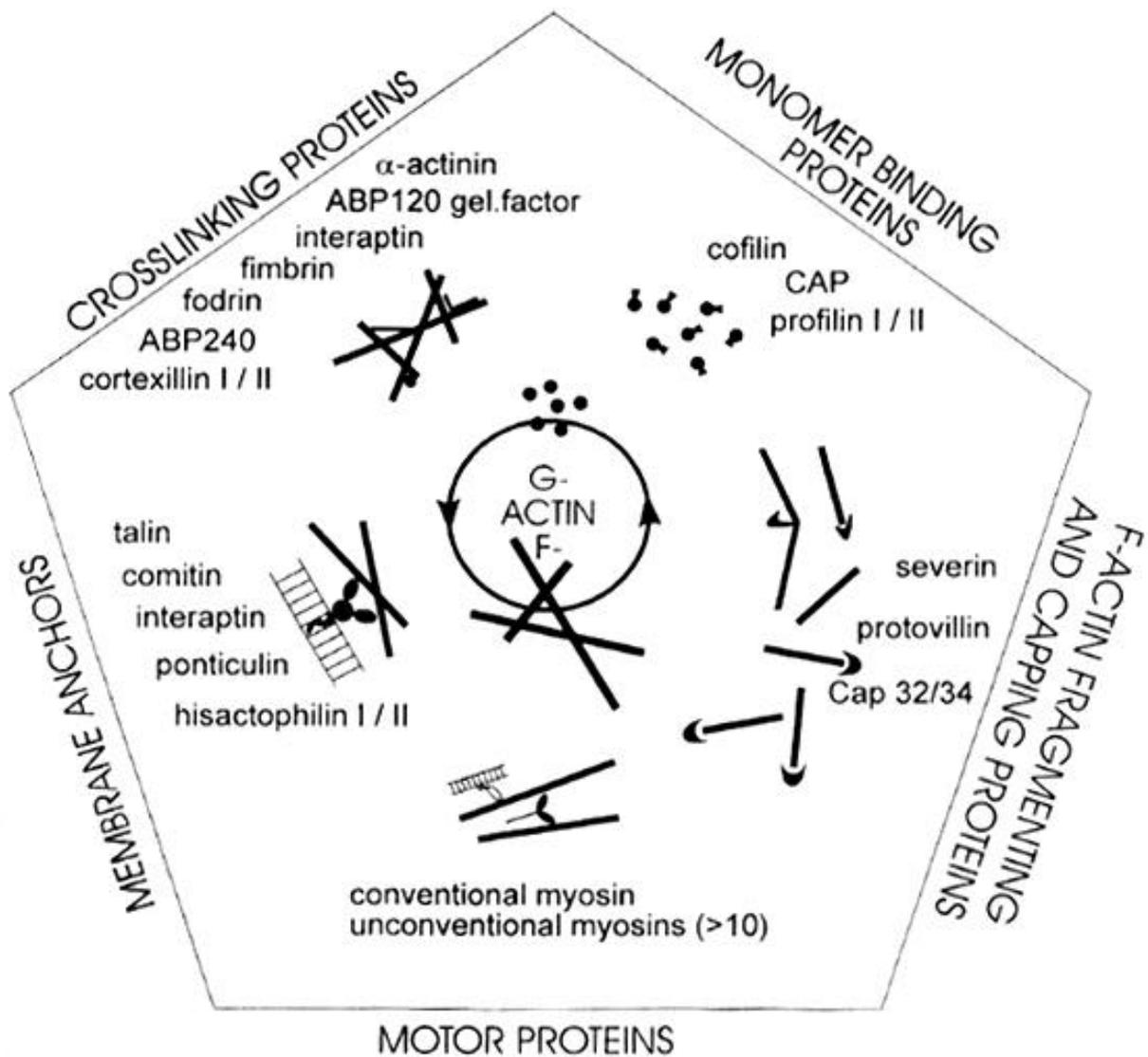


Abb. A 2.1: Übersicht über aktinbindende Proteine in *D. discoideum* [aus Eichinger *et al.*, 1999]

3. Plastine und Fimbrine

Bei Fimbrin, auch Plastin genannt, handelt es sich um ein aktinbindendes Protein aus der α -Aktinin-Familie. Es wurde erstmals 1980 von **A. Bretscher** und **K. Weber** aus intestinalen Epithelzellen des Huhns isoliert und konnte bis heute in zahlreichen Eukaryonten nachgewiesen werden. Dazu gehören neben Amöben und Hefen auch verschiedene Pilze, Pflanzen, Insekten, und Vertebraten. In Prokaryonten wurden Fimbrine bislang nicht gefunden. In der Pflanze *Arabidopsis thaliana* und in Vertebraten konnten verschiedene Isoformen nachgewiesen werden, deren spezifische Funktionen bislang ungeklärt sind. In *A. thaliana* wurde nur eine Isoform näher untersucht [Kovar *et al.*, 2001]. Die drei bekannten Isoformen der Vertebraten werden gewebespezifisch exprimiert und sind entsprechend benannt worden: I-Plastin kommt in Mikrovilli von Dünndarm, Dickdarm und Niere vor, L-Plastin in hämatopoetischen Zellen wie Leukozyten, T-Plastin ist in allen übrigen Geweben vorhanden. L-Plastin konnte ebenfalls in Tumorzellen nicht-hämatopetischen Ursprungs nachgewiesen werden [Lin *et al.*, 1988; Goldstein *et al.*, 1985].

Fimbrine besitzen ein Molekulargewicht von 65-68 kDa und bestehen aus 610-630 Aminosäuren. Kodiert sind sie im Falle der humanen Plastine auf Genen, welche aus 16 Exons bestehen. Sie sind auf den Chromosomen 3 (I-Plastin), 13 (L-Plastin) und X (T-Plastin) lokalisiert [Lin *et al.*, 1993, 1994]. Die Proteinsequenz beinhaltet zwei zu Calmodulin ähnliche calciumbindende-Domänen am N-Terminus gefolgt von zwei aktinbindenden Domänen aus je ~250 Aminosäuren. Beide aktinbindenden Domänen bestehen aus zwei Calponin-Homologie-Domänen deren Tertiärstruktur sich jeweils aus einem Bündel von drei α -Helices und einer vierten dazu senkrechten α -Helix zusammensetzt. Die aktinbindenden Domänen enthalten einen hoch konservierten Abschnitt aus 27 Aminosäuren, der für die Bindung von F-Aktin erforderlich ist [Van Troys, *et al.*, 1999; Prassler *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 1991].

In vitro konnte für I-, T- und L-Plastin [Aripin *et al.*, 1994; Glenney *et al.*, 1981] nachgewiesen werden, dass es Aktin bündelt; vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit Fimbrin aus *D. discoideum* und *S. cerevisiae* erzielt [Prassler *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 1991]. Ob Ca^{2+} einen Einfluss auf die Aktin-Bündelung durch Fimbrin hat, wird in verschiedenen Publikationen kontrovers diskutiert [Bretscher, 1981; Glenney *et al.*, 1981]. Bei humanem I-Plastin und Fimbrin aus *D. discoideum* konnte eine Inhibierung durch 1 mM bzw. 0,2 mM Ca^{2+} gezeigt werden [Lin *et al.*, 1994; Prassler *et al.*, 1997], hingegen Fimbrin aus *S. cerevisiae* ist bezüglich der Aktin-bündelung Ca^{2+} -insensitiv [Adams *et al.*, 1991].

Die Lokalisation von Fimbrin/Plastin wurde in verschiedenen Zelltypen untersucht. Fimbrin aus *D. discoideum* lokalisiert wie Aktin entlang der Zellmembran und zusätzlich an diffusen netzwerkartigen Strukturen, welche die ganze Zelle durchziehen [Prassler, 1995]. Immunfluoreszenzstudien von Dickdarm-Schnitten zeigen eine Lokalisation von I-Plastin am äußeren Rand der Epithelien und Immunoelektronenmikroskopie ergeben eine exakte Lokalisation in den Mikrovilli entlang der zentralen Aktinbündel und an deren Wurzel [Drenckhahn und Dermietzel, 1988]. In Osteoklasten erscheint L-Plastin als punktierte Struktur an der Zellperipherie [Babb *et al.*, 1997]. T-Plastin lokalisiert in fibroblastenähnlichen Zellen punktiert an den Spitzen von Aktin-„Stress-Fibers“ [Arpin *et al.*, 1994]. Zahlreiche Effektoren wie beispielsweise der Wachstumsfaktor Interleukin 2 oder bakterielles Lipopolysaccharid (Endotoxin) [Shinomiya *et al.*, 1995; Zu *et al.*, 1990] und die Adhäsion an Immun-Komplexe und Phagozytose [Jones und Brown, 1996] führen zu einer Phosphorylierung von L-Plastin an den N-terminalen Serinresten 5 und 7 [Lin *et al.*, 1998]. Vermutlich erfolgt die Phosphorylierung durch die Protein Kinase C [Lin *et al.*, 1998], welche rezeptorabhängig aktiviert wird. So ist bei der durch Interleukin 2 induzierten Phosphorylierung der Interleukin 2 Rezeptor beteiligt und bei der Phagozytose IgG-beschichteter Polystyrol-Kügelchen der IgGFc_γRII-Rezeptor. Dieser Reaktionsweg lässt darauf schließen, das L-Plastin an der Signaltransduktion beteiligt ist. In Killer-Zellen ist die Phosphorylierung von L-Plastin für die Abtötung von Tumoren erforderlich [Frederick *et al.*, 1996]. Es konnte gezeigt werden, dass T-Plastin nicht phosphoryliert wird [Lin *et al.*, 1998]. Ob dies auch bei I-Plastin oder den Fimbrinen anderer Organismen der Fall ist, wurde bislang nicht berichtet.

Über weitere biologische Funktionen von Fimbrinen/Plastinen ist bislang nicht viel bekannt. Eine Fimbrin-defiziente Mutante von *S. cerevisiae* weist deutlich weniger und verkürzte Aktin-Bündel auf als Wildtyp-Zellen. Außerdem ist die rezeptorvermittelte Endozytose stark beeinträchtigt. Dies entspricht den Befunden der Phosphorylierung von L-Plastin, welche auf eine Bedeutung des Proteins für die rezeptorvermittelte Phagozytose hinweisen.

4. *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

Dictyostelium discoideum wurde erstmals 1935 von **K. B. Raper** isoliert und den Acrasiomyceten zugeordnet, welche sich von Myxomyceten durch das Fehlen eines echten Plasmodiums unterscheiden. In der Natur kommt *D. discoideum* zum Beispiel auf Waldboden, verrottenden Pflanzen oder Tierdung vor. In der vegetativen, einzelligen Form

ernähren sich die Amöben durch Phagozytose von Mikroorganismen und vermehren sich durch Teilung der Zellen. Bei Nahrungsmangel werden DNA-Synthese und Zellteilung eingestellt und cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) pulsartig sezerniert. Durch die cAMP-Ausschüttung von einer Zelle beginnen Nachbarzellen chemotaktisch auf diese Zelle zuzuwandern, es entstehen Aggregationszentren aus etwa 10^5 Zellen. Etwa nach 14 Stunden bildet sich eine vertikale konusförmige Struktur, der sogenannte „Slug“, welcher fototaktisch zu wandern vermag. Nun setzt die Differenzierung der Zellen zu Stiel- und Sporenzellen ein. Dieser Prozess endet etwa 24 Stunden nach Bildung der Aggregate mit Bildung des Fruchtkörpers. Bei günstigen Umweltbedingungen und ausreichendem Nahrungsangebot keimen die Sporen aus (s. Abb. A 4.1).

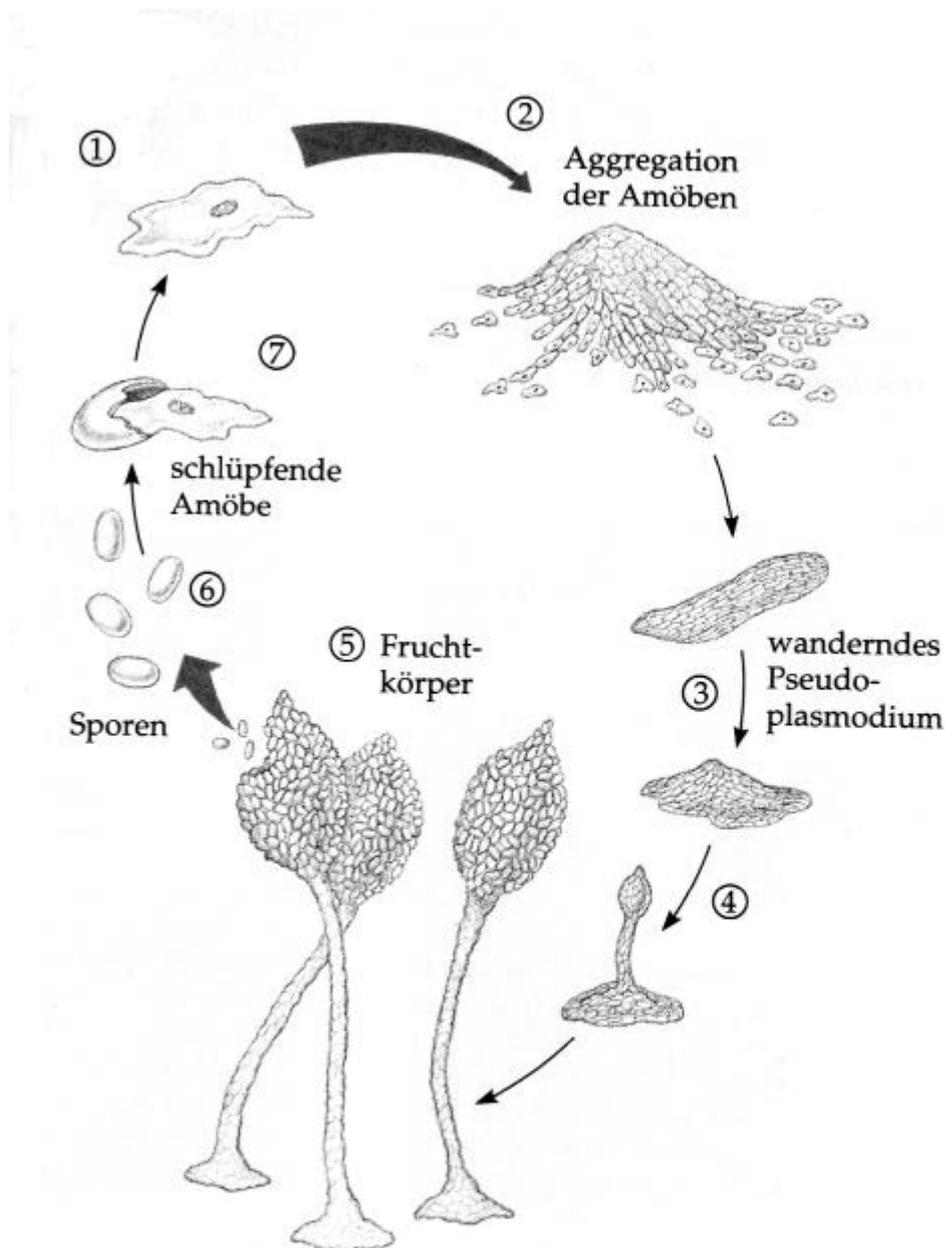


Abb. A 4.1: Entwicklungszyklus von *D. discoideum* [adaptiert aus Campbell: Biologie, 1997]

D. discoideum ist vor allem zur Untersuchung des Zytoskeletts ein etablierter Modelorganismus und bietet zahlreiche Vorteile. Neben der unproblematischen Anzucht in axenischem Medium ist der Organismus einer Vielzahl molekularbiologischer Methoden zugänglich [Noegel und Schleicher, 2000]. Außerdem weisen die Zellen im vegetativen Stadium viele Ähnlichkeiten zu tierischen Zellen auf. So sind in Leukozyten wie auch in *D. discoideum* Rezeptoren und G-Protein-Untereinheiten über die Zellmembran verteilt und Chemoattraktantien lösen über Signaltransduktionskaskaden Reaktionen aus, die zu gerichteter Bewegung führen [Parent und Devreotes, 1999]. Es gibt aber auch Ähnlichkeiten zu Pflanzenzellen: während der Differenzierung wird der für Tiere typische Speicherstoff Glycogen in die für Pflanzen typische Zellulose umgewandelt [Hames *et al.*, 1972]. Die Bildung des Fruchtkörpers und der Sporen zeigt wiederum deutliche Ähnlichkeit zu Pilzen.

5. Herstellung transgener embryonaler Stammzellen durch „Gene Targeting“

Unter einer transgenen Zelllinie versteht man Zellen, die ein Segment fremder DNA so in ihrem Genom integriert haben, dass es weitervererbt wird. Transgene embryonale Stammzellen (ES-) sind die Voraussetzung um gezielt transgene Tiermodelle oder „Embryoid Bodies“ herstellen zu können, da sie totipotent sind und sich in jede Art von Gewebe entwickeln können.

Um eine transgene ES-Zelllinie zu erhalten, wird endogene Sequenz durch von homologen Sequenzabschnitten flankierte Fremd-DNA substituiert, man spricht von „Gene-Targeting“. Diese homologe Rekombination erfolgt unter doppeltem „Crossing Over“ und Enzymkatalysierter Ausbildung einer Heteroduplex mit sog. Holliday-Verbindung [Capecchi, 1994; Haber, 1999; Rafferty, *et al.*, 1996].

Linearisierte DNA wird durch Elektroporation in die Zellen eingefügt. Dabei wird die DNA 100 bis 10000 mal häufiger heterolog rekombiniert, als dass es zu einer homologen Integration kommt [Thomas und Capecchi, 1986]. Von allen Transfektanden weisen letztendlich 10^{-3} bis 10^{-7} ein homologes Rekombinationsereignis auf. Es hat sich außerdem gezeigt, dass mit zunehmender Länge der homologen Sequenz die Wahrscheinlichkeit für eine homologe Rekombination steigt, mindestens 1,7 kb sind aber unabdingbar [Hasty *et al.*, 1992]. Um genetisch veränderte Zellen effizient anreichern zu können, werden Selektionsmarker in das „Targeting“-Konstrukt integriert. Häufig wird das Neomycin-

Phosphotransferase (neo)-Gen als Bestandteil des Transgens in das Genom der Zielzelle bei homologer Rekombination eingebaut. Dies führt zu einer Resistenz gegen dem Neomycinderivat G418, welches zur Selektion dem Kulturmedium beigefügt wird. Ein weiterer Selektionsmarker ist das Herpesvirus-Thymidin-Kinase-Gen, dieses ist so in das „Targeting“-Konstrukt integriert, dass es nur bei heterologer Rekombination in das Genom eingebaut wird. Resultierende Zellen sind empfindlich gegen Gancyclovir. Die Verwendung beider Selektionsmarker bewirkt, dass nur Zellen mit homologen Rekombinationsereignis überleben [Mansour *et al.*, 1988].

Um transgene Tiere zu erhalten, werden die homolog rekombinierten ES-Zellen in Blastozysten injiziert und in scheinchwangere Mäuse eingesetzt.

6. Zielsetzung der Arbeit

Während über die Struktur von Fimbrinen und Plastinen wie auch über ihre Lokalisation in der Zelle und ihre Abhängigkeit von Calcium vieles bekannt ist, bedarf die biologische Funktion dieser Proteine weiterer Untersuchung. Dazu soll im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des „Gene-Targeting“ eine L-Plastin-defiziente murine ES-Zelllinie generiert werden, die später zur Herstellung einer transgenen Mauszelllinie dienen kann.

Des weiteren sollen Mutanten des Fimbrins aus *D. discoideum* zellbiologischen Studien unterzogen werden, um Einblick in die Funktion des Proteins zu gewinnen. Es sollen Prozesse untersucht werden, welche essentiell von einem intakten Aktin-Zytoskelett abhängen: Zellwachstum und Größe, Endo- und Exozytose sowie Phagozytose.

Für Immunfluoreszenzstudien soll zunächst eine Fixierungsmethode für *D. discoideum*-Zellen ermittelt werden, welche die Lokalisation von Fimbrin *in vivo* wiedergibt. Außerdem ist zu überprüfen, ob die Verteilung von Aktin und Fimbrin in Fimbrin-Mutanten verändert ist. Des weiteren soll festgestellt werden, ob Fimbrin an phagozytotischer Nahrungsaufnahme beteiligt ist. Die Verteilung verschiedener Zellkompartimente und deren Reaktion auf hyper- und hypoosmotischen Stress soll in fimbrindefizienten Mutanten mit dem Wildtyp verglichen werden.

B Ergebnisse

1. Generierung einer L-Plastin defizienten ES-Zelllinie

Die generelle Strategie zur Generierung transgener Nullmutanten basiert auf dem Austausch einer Gensequenz gegen einen geeigneten *in vitro* mutierten Genabschnitt. Eine korrekte Transkription der Originalsequenz und anschließende Translation derselben wird dadurch unterbunden. Dazu werden in der Regel bakterielle Antibiotikum-Resistenz-Gene so als Selektionsmarker in Transfektionsvektoren kloniert, dass bei homologer Rekombination entscheidende Gensegmente unterbrochen oder ausgetauscht werden. Gleichzeitig können durch die Antibiotika-Resistenz transfizierte Klone identifiziert werden. Hierzu wird häufig das Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Neo-Gen) eingesetzt, welches Resistenz gegenüber Neomycin und seinen Derivaten, z.B. G418, verleiht.

Ein Transfektionsvektor wird so konstruiert, dass neben dem beschriebenen Marker ausreichend lange Sequenzbereiche für die homologe Rekombination und geeignete Möglichkeiten zum Nachweis des korrekten Einbaus vorhanden sind. Dieser Nachweis wird entweder unter Verwendung spezifischer Primer mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder durch Southern-Blot-Analyse geführt. Letztere setzt das Vorhandensein geeigneter Restriktionschnittstellen voraus, um einen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus zwischen Wildtyp-Sequenz und homolog rekombinierter Sequenz detektieren zu können.

1.1 Kartierung und Sequenzierung des L-Plastin-Gens

Das L-Plastin-Gen ist in *Homo sapiens* auf Chromosom 13 lokalisiert und umfasst 16 Exons [Lin *et al.*, 1993]. Das Startcodon befindet sich in Exon 2, die N-terminalen calciumbindenden Domänen werden von Exon 2-4 kodiert. Exon 5-16 kodieren für Calponin-Homologie-Domänen am C-Terminus. Die Lokalisation und Organisation des Gens in *Mus musculus* ist nicht publiziert, jedoch die Sequenz der cDNA [Shinomiya *et al.*, 1995].

Aufgrund der hohen Homologie der cDNAs von L-Plastin in *H. sapiens* und *M. musculus* ist eine ähnliche Struktur der Gene anzunehmen, was teilweise im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (s. Abschnitt B 1.1.2).

Um die für die Kartierung, Sequenzierung und Klonierung des L-Plastin-Gens notwendige genomische DNA zu erhalten, wurde zunächst mit RT-PCR (s. Abschnitt E 2.18) unter Verwendung von RNA aus Makrophagen des Peritoneums ein cDNA-Fragment von 0,5 kb

(N-terminaler Bereich) amplifiziert. Die Firma GenomeSystemsIncTM wurde beauftragt, mit dieser cDNA als Sonde eine „Bacterial Artificial Chromosome“-Bibliothek [Pierce *et al.*, 1982, Sternberg *et al.*, 1994] zu durchsuchen. Diese Bibliothek wurde durch Ligation mit der Restriktionsendonuklease HindIII partiell verdauter genomischer DNA in den Vektor pBeloBAC11 und Elektroporation in den *E. coli*-Stamm DH10B generiert. Die Größe der in den Klonen enthaltenen genomischen DNA beträgt durchschnittlich 120 kb.

Es wurden die Klone BACM-335E7 18168 und 18169 gefunden und käuflich erworben.

1.1.1 Klonierung und Amplifizierung von Fragmenten genomischer DNA, Erstellung einer Restriktionskarte mit Southern-Blot-Analyse

Zur Erstellung des Transfektionsvektors müssen zunächst Fragmente genomischer DNA in geeigneter Größe vorhanden sein, welche die homologe Rekombination im gewünschten Bereich des Gens erlauben. Um solche Fragmente zu erhalten, wurde einerseits die PCR-Methode mit der DNA des BAC-Klons als DNA-Vorlage durchgeführt. Auf diese Weise wurde Klon E 4-5 erhalten (s. Abb. B 1.2). Andererseits wurde mit Hilfe der Southern-Blot-Analyse eine vorläufige Restriktionskarte erstellt. Dazu wurde die mit dem Kit Nucleobond AX 500 (s. Abschnitt E 2.2) gewonnene DNA der BAC-Klone zur näheren Charakterisierung des L-Plastin-Gens zunächst mit verschiedenen Restriktionsenzymen oder Kombinationen derselben behandelt, um Southern-Blot-Analysen durchzuführen. Die so erhaltenen Nylonmembranen wurden mit verschiedenen radioaktiven Sonden hybridisiert (s. Tab B 1.1 und Abb. B 1.1). Da die beiden Klone in ersten Tests keine wesentlichen Unterschiede aufwiesen, wurde für diese und alle weiteren Experimente ausschließlich die DNA des BAC-Klons 18169 verwendet.

Die DNA-Fragmente für die Sonden wurden mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als DNA-Vorlage diente die vollständige L-Plastin cDNA (mit Hilfe von RT-PCR amplifiziert) und ein Fragment genomischer DNA, welches ebenfalls mit PCR von BAC-Klon 18169 erhalten wurde.

Name der Sonde	Enthaltenes Fragment	Größe [b]	Ursprung
E2-4	Exon 2-4	320	cDNA
E5/6	Exon 5-6	190	cDNA
I4	Teile von Intron 4	320	Genomische DNA

Tab. B 1.1: Sonden für die Kartierung des L-Plastin-Gens

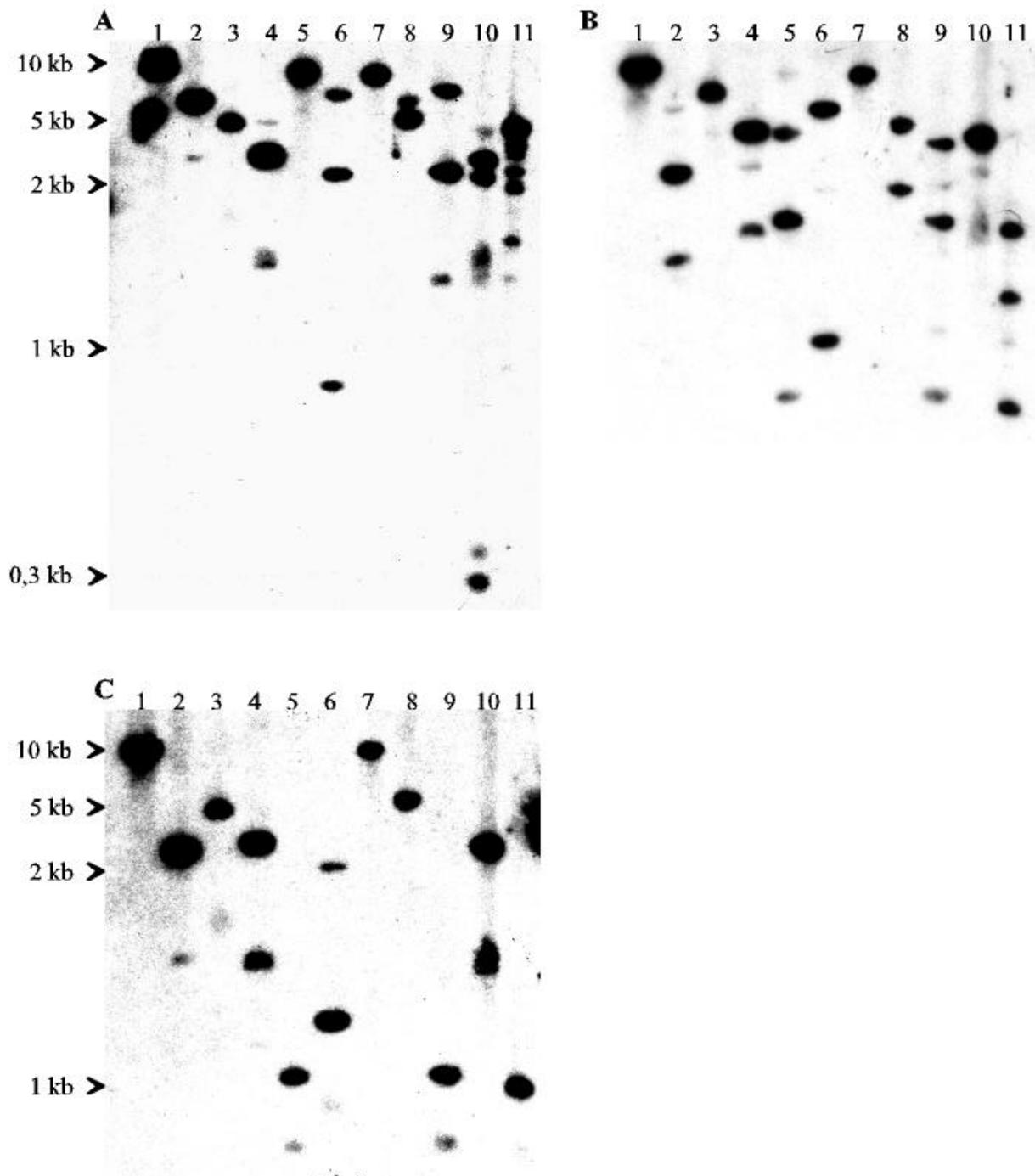
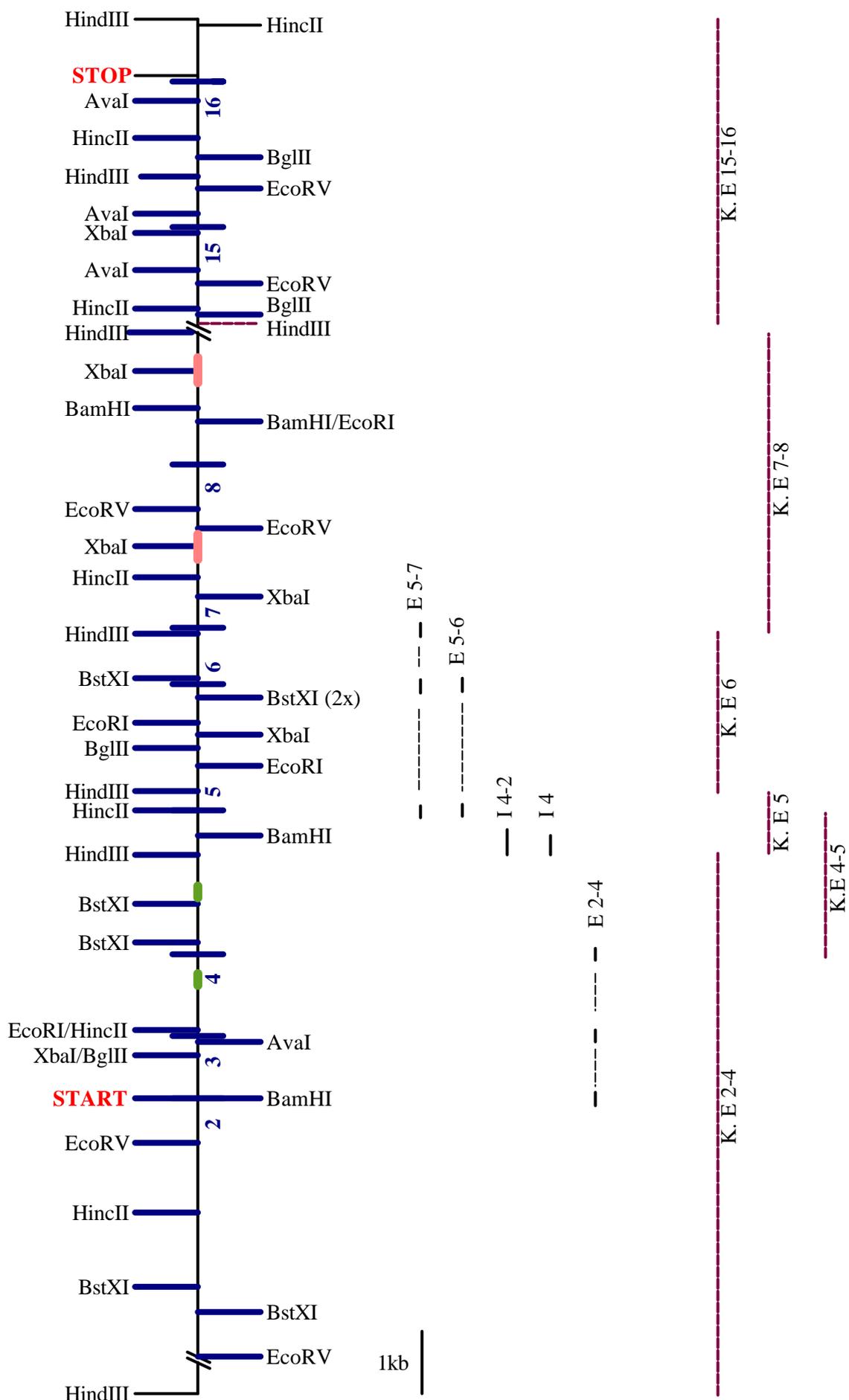


Abb. B 1.1: Southern-Blot-Analysen genomischer DNA aus BAC-Klon 18169. Als Sonden wurden verwendet (s. Tab. B 1.1 und Abb. B 1.2): **A)** E2-4, **B)** E5-6, **C)** I4. Verwendete Restriktionsendonukleasen: 1, *Ava*I; 2, *Bst*XI; 3, *Bam*HI; 4, *Hinc*II; 5, *Hind*III; 6, *Eco*RI; 7, *Eco*RV; 8, *Xba*I; 9, *Ava*I/*Hind*III; 10, *Ava*I/*Hinc*II; 11, *Eco*RV/*Hind*III. Einige Banden resultieren aus unvollständig verdauter DNA, dies ist der Fall bei **A)** Verdau 11, **B)** Verdau 5 und 11 und **C)** Verdau 4.

Dabei zeigte sich, dass die Restriktionsendonuklease HindIII im Bereich von Exon 2 bis 5 schneidet und Fragmente von 2 bis 10 kb liefert. Um diese Fragmente für Klonierungsschritte zur Verfügung zu haben, wurde die genomische DNA mit HindIII verdaut und mit Hilfe eines Saccharosegradienten (s. Abschnitt E 2.16) fraktioniert. Nach Southern-Blot-Analyse und Hybridisierung mit der cDNA-Sonde E2-5 (s. Abb. B 1.2) wurden Fraktionen, die einzelne Banden in der Größe von 3-10 kb zeigten zur Klonierung in den Vektor pUC 19 eingesetzt. Die erhaltenen Klone (s. Abb. B 1.2) wurden vollständig oder teilweise durch das Service-labor des Zentrums für molekulare Medizin der Universität zu Köln (ZMMK) sequenziert. Hierdurch konnten die bereits durch Southern-Blot-Analyse nachgewiesenen Restriktionsschnittstellen bestätigt werden. Genaue Analyse der Einzelklone ergab auch, dass einige mit Southern-Blot-Analyse nachweisbare Banden auf Partialverdau zurückgehen (s. Legende zu Abb. B 1.1). Außerdem wurden in Intron 3 und 4 wie auch in Intron 7 und 8 repetitive Bereiche gefunden. In Intron 3 und 4 sind 0,2 kb der Sequenz identisch, bei Intron 7 und 8 sind es 0,4 kb (s. Abb. B 1.2).

Abb. B 1.2 (nachfolgende Seite): Karte und für die Kartierung verwendete Sonden und Klone des L-Plastins: Die durchgezogene schwarze waagerechte Linie entspricht den sequenzierten Bereichen der genomischen DNA, Exons sind als blaue senkrechte Balken eingezeichnet, Start- und Stopkodon sind leuchtend rot markiert. Repetitive Sequenzbereiche in Intron 3 und 4 bzw. 7 und 8 sind hellgrün bzw. hellrot unterlegt. Unterhalb ist die Lage der verwendeten Sonden eingezeichnet, im Falle von cDNA-Sonden ist der Bereich zwischen den Exons mit gestrichelten Linien dargestellt. Genomische Klone des L-Plastins sind weinrot dargestellt.



1.1.2 Organisation des L-Plastin-Gens von *Homo sapiens* und *Mus musculus* im Vergleich

Die 96prozentige Homologie der L-Plastin cDNA von Maus und Mensch (s. Abschnitt B 4.2) lässt eine hohe Ähnlichkeit der genomischen Sequenzen vermuten. So ergibt der Vergleich der Promotorsequenzen des L-Plastin-Gens der Maus und des homologen Gens von *H. sapiens* eine Homologie von etwa 60 % auf einer Länge von etwa 1 kb im Bereich der TATA-Box und des ersten Exons [Lin *et al.*, 1997]. Zwischen Exon 1 und dem Startcodon in Exon 2 liegen im Gen der Maus etwa 10 kb und in dem des Menschen 20 kb.

Nach Sequenzierung der oben aufgeführten genomischen Klone kann zumindest für den Bereich, den diese abdecken, die Organisation des L-Plastin-Gens genauer analysiert werden. Die Übergänge der Exons zu den Introns wurden bestimmt und mit denen des homologen Gens von *H. sapiens* [Lin *et al.*, 1993] verglichen. Die jeweiligen Exons sind genauso groß wie im Vergleichsorganismus (s. Tab. B 1.3). Die Homologie im Bereich der bekannten Exon-Intronverbindungen liegt bei 86 %, lediglich die Größe der Introns weicht um einige hundert bp bis 10 kb (Intron 1) voneinander ab. Alle Introns beginnen mit der Konsensus-Sequenz GT und enden mit AG. Im Falle beider Gene ist das Stopcodon in Exon 16 lokalisiert. Es ist anzunehmen, dass auch der nicht sequenzierte Teil des Gens der Maus eine ähnlich hohe Homologie zu dem des Menschen aufweist.

Tab. B 1.3 (nachfolgende Seite): DNA-Sequenz an Exon-Intronverbindungen des L-Plastin-Gens von Mensch (blau) und Maus (rot) im Vergleich. Exon-Sequenz ist in Großbuchstaben, Intron-Sequenz in Kleinbuchstaben geschrieben. Für Exon 16 wurde nur der kodierende Teil berücksichtigt, der nachfolgende Poly-A-Schwanz vernachlässigt.

Exon Nr.	Größe [bp]	Sequenz an Exon-Intron-Verbindungen		Introngröße [kb]
		5' Spleiß-Donor	3' Spleiß-Akzeptor	
1	139	TACCAG / gtaaac TGCAAG / gtaaat	/ GTCTGT ctccag / ATCTGT	10 20
	88	AAGTCG / AAGTTG / gtgagt	tcacag / ATACCG ttacag / ATACTG	0,6
3	164	ATCAAG / gtgacg ATCAAG / gtgagt	tagcag / GTCTTC ttgcag / ATTTTC	1,1 0,2
	130	ACTCAG / gtaagc ATTCAG / gtaggc	ctatag / AGGAAG ttgcag / AGGAAG	2,2 2,0
5	133	TCTTTG / gtaaat CCTTTG / gtaaat	ttttag / TAAAAT tttcag / TAAAAT	1,8 1,6
	82	ATTCAG / gtgggt ATTCAG / gatatag	cctcag / GAAAAC cctcag / GAAAAT	0,9 2
7	166	ATGAAG / gtaaga ATGAAG / gtaaga	cttcag / CTCTGA cttcag / CTCTGA	2,2 1,8
	143	ATCAAG / gtaggc ATCAAG / gtagga	/ GACTCA tcacag / GACTCA	~2,3 2,3
9	96	CTGAGG / CTGCGG / gtaagg	/ GAGAAG ttgcag / GAGAAG	1,6
	196	TCGAAG / TTGAAG / gtaact	/ GAGAAG atctag / GTGAGA	2
11	79	GTACAG / GTACAG / gtagga	/ CGACTT gttcag / TGACTT	1
	115	AAAAAG / AAGAAG / gtaaac	/ CTGGAG attcag / CTGAG	0,6
13	133	GAGAAG / GAGAAG / gtagta	acttag / GTACAC gttcag / GTATAC	8
	124	TTCAAG / TTCAAG / gtaaaa	/ GACCCA gcatag / GACCCG	8
15	125	TGCAAA / gtatgt TGCAAA / gtacgt	tttcag / GTATGC tttttag / ATATGC	2,1 2,6
	133	GTGTAA* GTGTGA*		

1.2 „Knockout-Targeting“-Konstrukt

Bei der Planung des „Knockout-Targeting“-Konstrukts sind zwei Aspekte zu berücksichtigen. Einerseits soll es so entwickelt werden, dass durch das Einsetzen eines Selektionsmarkers die Translation vollständig unterbunden wird. Andererseits sollte die homologe Rekombination einfach nachweisbar sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Strategie gewählt, bei der die Transkription durch Entfernen des Startcodons verhindert wird. Dementsprechend wurden Sequenzbereiche für die Klonierung des „Knockout-Targeting“-Konstrukts ausgesucht und aufgrund der vorhandenen Restriktionsschnittstellen in den Vektor pUC 19 kloniert. Zunächst wurde ein 3 kb großes Fragment genomischer DNA aus Intron 1 mit der Restriktionsendonuklease EcoRV ausgeschnitten und in die mit Klenow behandelte EcoRI-Schnittstelle von pUC 19 eingesetzt. Die EcoRV-Schnittstellen wurden dabei zerstört. Danach wurde ein ebenfalls 3 kb großes, in Intron 2 beginnendes und in Intron 4 endendes Fragment aus Klon E 2-4 (s. Abb. B 1.2) mit XbaI und HindIII ausgeschnitten und auf der Seite des 3'-Endes des Fragments aus Intron 1 in Leserichtung zwischen die XbaI und HindIII-Schnittstellen des Vektors kloniert. Anschließend wurde das aus dem Vektor pPNT ausgeschnittene Neo-Gen zwischen die beiden Abschnitte genomischer DNA in die XhoI und XbaI-Schnittstelle in Leserichtung eingefügt. Das resultierende „Knockout-Targeting“-Konstrukt hat eine Länge von etwa 9 kb. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalysen überprüft.

Durch die homologe Rekombination ersetzt das 1,7 kb große Neo-Gen ein 1,4 kb großes Fragment genomischer DNA, welches neben Teilen von Intron 1 und 2 auch Exon 2 und somit das Startcodon enthält. Hierdurch sollte die Translation des Proteins vollständig unterbunden werden (siehe Abb. B 1.3).

Das Neo-Gen enthält eine EcoRV-Schnittstelle, die den spezifischen Nachweis der homologen Integration des „Targeting“-Konstrukts durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus ermöglicht. Das Fragment des rekombinanten Allels sollte in der Southern-Blot-Analyse mit einer externen 5'-Sonde ein Fragment von 8,6 kb liefern, während das ursprüngliche Fragment mit 9,6 kb um 1,2 kb größer ist.

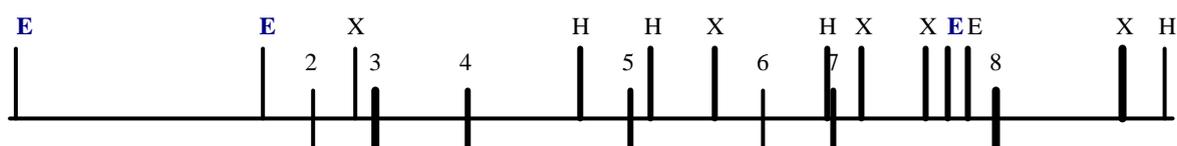
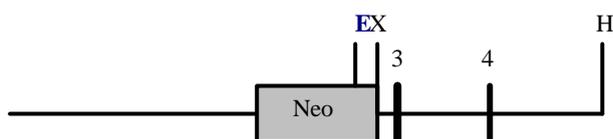
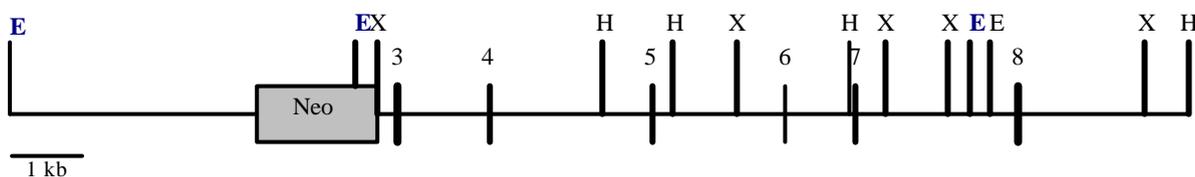
A L-Plastin-Lokus**B Targeting-Vektor****C Homolog rekombinierter L-Plastin-Lokus**

Abb. B 1.3: **A)** Organisation des N-terminalen Bereichs des L-Plastin-Gens der Maus. **B)** Targeting Vektor mit eingefügtem Neo-Gen als Selektionsmarker und zur Unterbindung der Translation des Proteins. **C)** Homolog rekombinierter L-Plastin-Lokus. Durchgezogene wagerechte Linien entsprechen der genomischen L-Plastin-Sequenz. Exons sind als dicke senkrechte Striche und das Neo-Gen als graues Kästchen dargestellt. Restriktionsendonukleasen sind mit folgenden Abkürzungen aufgeführt: E: EcoRV; H: HindIII; X: XbaI. Für den Nachweis des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus relevante Schnittstellen sind blau dargestellt.

1.3 Herstellung rekombinanter ES-Zellklone

Die Einführung der Vektor-DNA in ES-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Durch kurze elektrische Impulse hoher Feldstärke wird die Zellmembran der Empfängerzellen für hochmolekulare Moleküle durchlässig gemacht. Die ES-Zellen befinden sich in einem undifferenzierten Zustand, damit sie sich nach einer Injektion in Blastozysten zur Generierung einer transgenen Mauslinie in jede Art von Gewebe entwickeln können.

Verschiedene ES-Zelllinien sind für die Transfektion gebräuchlich. Da der männliche Karyotyp (X/Y) stabiler zu sein scheint, wird dieser häufiger eingesetzt. So liefern männliche Individuen, die von ES-Zellen abstammen, mehr Nachkommen als weibliche. Zudem scheinen embryonale Stammzellen des X/Y-Karyotyps die Fähigkeit zur „sex-conversion“ zu besitzen, so dass sie die Umwandlung von X/X-Blastozysten zu X/Y-Blastozysten bewirken können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ES-Zelllinie IB10 (X/Y-Karyotyp, Abkömmling der Zelllinie E14 aus Mausstamm 129 OLA) verwendet. Es wurden $1-2 \times 10^7$ ES-Zellen für eine Elektroporation mit 30 μg des mit HindIII linearisierten „Knockout-Targeting“-Vektors eingesetzt. Anschließend wurde 7-10 Tage unter selektiven Bedingungen kultiviert. G418-resistente Klone wurden isoliert und in 48-Well-Platten bis zur Konfluenz expandiert. Danach wurde ein Teil der Zellen eingefroren, die übrigen wurden zur Isolierung genomischer DNA weiter kultiviert. Nach zwei Elektroporationen wurden insgesamt 822 Klone isoliert.

Als Sonde für den Nachweis des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus wurden verschiedene DNA-Fragmente eingesetzt (s. Abb. B 1.2). Alle wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Zunächst wurde die cDNA-Sonde E 5-7 getestet, welche die Exons 5-7 beinhaltet. Genomische DNA von Mausschwanz-Biopsien und aus ES-Zellen wurde mit EcoRV geschnitten und nach Southern-Blot-Analyse mit dieser Sonde hybridisiert. Da keine Bande erkennbar war, wurde eine cDNA Sonde getestet, die nur Exon 5 und Exon 6 beinhaltet. Hiermit werden in IB10-DNA mehrere Fragmente markiert (s. Abb. B 1.4). Neben einer Bande bei etwa 9 kb sind zwei Banden im Bereich von 3-4 kb und eine weitere bei 1,6 kb erkennbar. Das Vorhandensein mehrerer Signale basiert möglicherweise auf der hohen Homologie, die im Bereich der verwendeten Sonden zu T-Plastin besteht, so dass beide Isoformen erkannt werden. Vermutlich handelt es sich bei der Bande bei etwa 9 kb um das gesuchte Fragment. Das Erkennen des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus würde allerdings durch die weiteren Signale beeinträchtigt. Daher wurden zwei weitere Sonden getestet, die in Intron 4 gelegen sind. Da die Sonde I4 keine klaren Signale lieferte, wurde diese um 200 bp verlängert, aber auch diese Sonde, I4-2, liefert kein deutliches Ergebnis (s. Abb. B 1.2).



Abb. B 1.4: Southern-Blot-Analyse einer IB10-DNA-Präparation, mit EcoRV geschnitten, auf Nylonmembran transferiert und mit Sonde E5-6 hybridisiert

2. Herstellung polyklonaler anti-Peptid-Antikörper gegen die Isoformen des Plastins der Maus

Spezifische Antikörper sind ein notwendiges Mittel, um mit Hilfe von Wester-Blot-Analysen oder Immunfluoreszenzen transgene Zelllinien oder die Gewebe transgener Tiere zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden polyklonale Antikörper gegen die drei Plastin-Isoformen der Maus, I-Plastin, T-Plastin und L-Plastin hergestellt. Aufgrund der hohen Homologie der drei Isoformen (s. Abschnitt B 4.1) wurden Peptide aus dem N-Terminalen Bereich der Proteine für die Immunisierung verwendet, da sich ausschließlich dort die Proteine so stark unterscheiden, dass bei den resultierenden Antikörpern keine Kreuzreaktionen zu erwarten sind. Bei der Auswahl des Sequenzbereichs wurde dem Beispiel von **C.-S. Lin et al. (1994)** gefolgt:

L-Plastin: MARGSVSDEEMMELREAF

I-Plastin: MENSTTTISRREELEELQE

T-Plastin: MATTQISKDELDELKE

Für die Immunisierung wurden diese Peptide an KLH gekoppelt, da nur durch ein ausreichend großes Protein eine Immunantwort hervorgerufen kann. Es wurden zwei Kaninchen je Antigen immunisiert.

Zunächst wurden die Antiseren ungereinigt mit Western-Blot-Analyse an Zell- und Gewebeextrakten und an Extrakten Plastin-exprimierender *E. coli*-Stämme getestet (siehe Abb. B 2.1). Dabei zeigte sich, dass alle Antiseren neben dem Antigen auch noch andere Proteine erkennen. So weist ein Extrakt der Leber, in welcher eigentlich nur TPlastin exprimiert wird, mit L-Plastin-Antiserum eine Bande von etwa 32 kDa und mit I-Plastin-Antiserum mehrere Banden auf. Extrakte von *E. coli*-Zellen, welche I-Plastin exprimieren, zeigen ebenfalls mit allen Antiseren eine oder mehrere Banden, die sowohl auf I-Plastin, aber auch auf bakterielle Proteine zurückgehen könnten.

Folglich ist eine Reinigung der Antikörper unabdingbar. Hierzu wurden die in den Antiseren enthaltenen Proteine zunächst mit Ammoniumsulfat gefällt und anschließend die Immunglobuline mit ProteinA-Sepharose abgetrennt. Aus diesen Fraktionen sollten unter Verwendung der rekombinant exprimierten Plastin-Isoformen die jeweiligen Antikörper affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Die Proteinbestimmung der gereinigten Fraktionen verlief jedoch negativ. Es konnte kein gereinigtes Protein von dem Säulenmaterial eluiert werden.

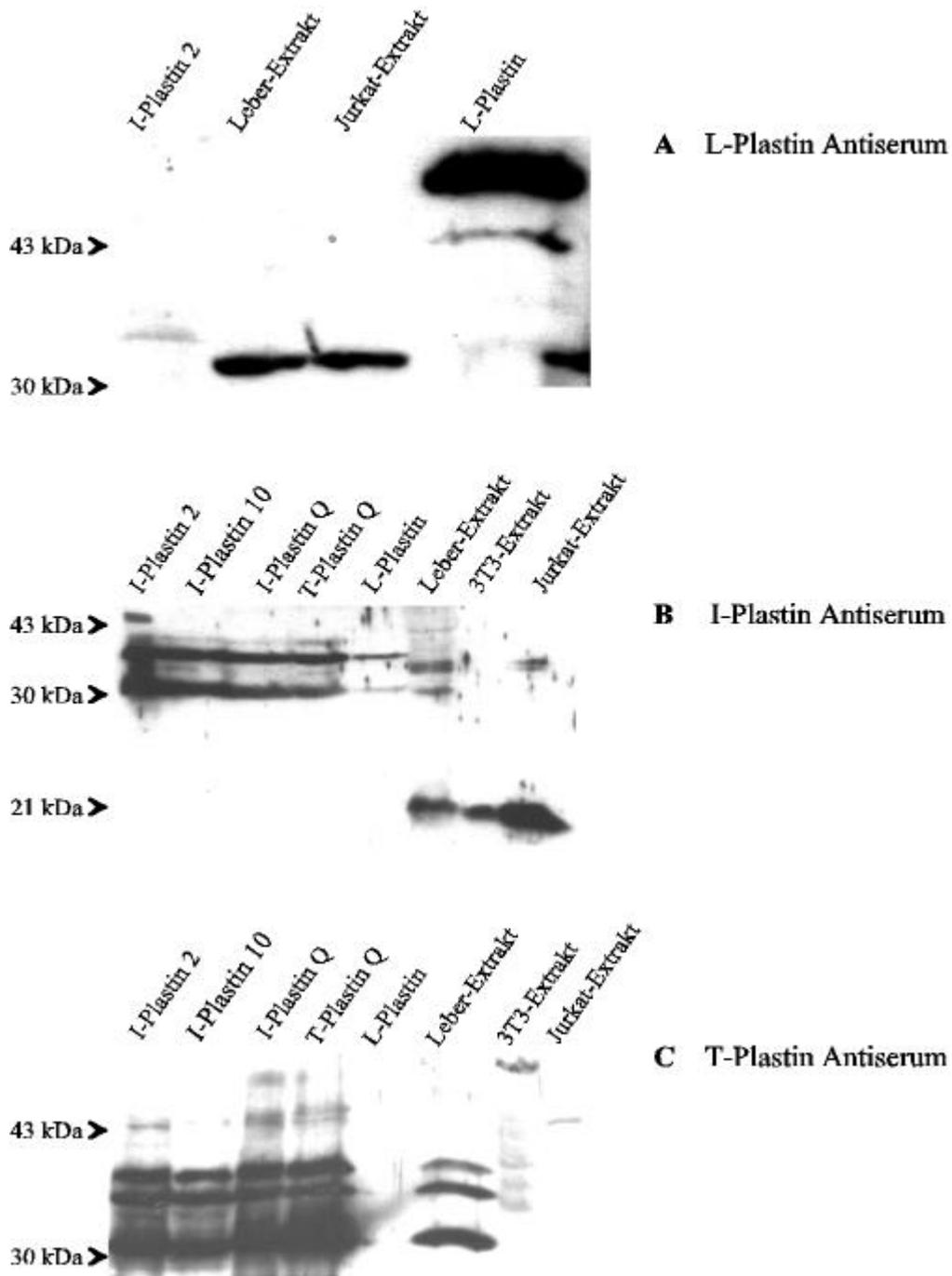


Abb. B 2.1: Western-Blot-Analyse mit **A)** L-Plastin Antiserum **B)** I-Plastin Antiserum und **C)** T-Plastin Antiserum (Endblutungen), detektiert mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG-Antikörper und Luminollösung. Verwendete Proteinextrakte: IPlastin 2 und 10: *E. coli*-Extrakte von mit Vektor pGEX 2T exprimiertem vollängen-I-Plastin (verschiedene Klone); LPlastin: *E. coli*-Extrakte von mit Vektor pGEX 2T exprimiertem L-Plastin (1 kb, N-terminal); IPlastin Q und TPlastin Q: *E. coli*-Extrakte von mit Vektor pQE 40 exprimiertem I und T-Plastin (60 bp, N-terminal); Leber-Extrakt: Extrakt aus Maus-Leber; 3T3- und Jurkat-Extrakt: Extrakte von Kulturzellen: 3T3-Fibroblasten (Maus) exprimieren T-Plastin, Jurkat-Zellen (Maus) exprimieren L-Plastin.

3. Analyse von Fimbrin-Mutanten von *Dictyostelium discoideum*

Wie viele andere Organismen exprimiert auch die Amöbe *Dictyostelium discoideum* ein homologes Protein aus der Fimbrin/Plastin-Familie [Prassler *et al.*, 1997]. Zur näheren Untersuchung der Funktion von Fimbrin in *D. discoideum* wurden verschiedene Mutanten dieses Proteins generiert. Zwei der resultierenden Zelllinien basieren auf 34 kDa aktin-bindendem Protein (ABP 34) defizienten Mutanten (34⁻) [Rivero *et al.*, 1996], die übrigen auf der axenisch wachsende Wildtyp-Zelllinie AX2.

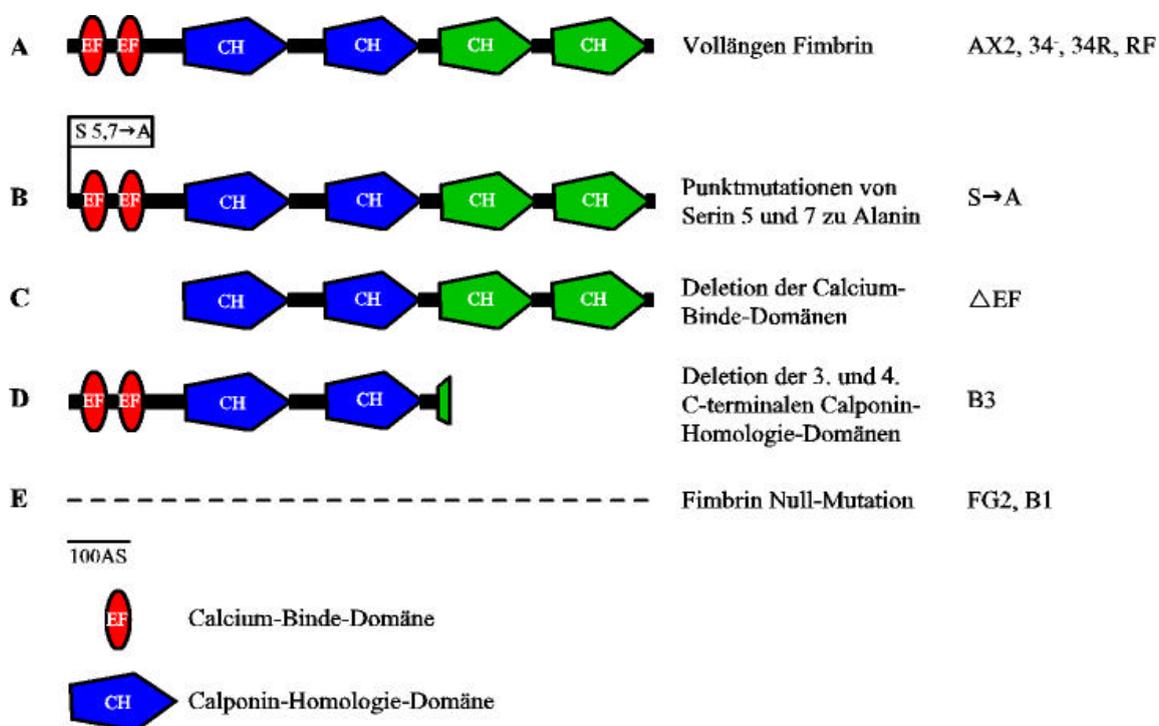


Abb. B 3.1: Schematische Übersicht der Fimbrin Mutanten in *D. discoideum*. **A)** Vollständiges Fimbrin, in Wildtypzellen (AX2) wie auch in den Mutanten RF, 34⁻ und 34R exprimiert. **B)** Mutante mit Punktmutationen S 5, 7→A **C)** Mutante mit deletierten Calcium-binde-Domänen **D)** Mutante mit Deletion der 3 C-terminalen CH-Domänen **E)** Mutanten mit vollständiger Deletion des Fimbrins.

Die Fimbrin-Null-Mutante FG2 wurde 1995 von **J. Prassler** in Wildtyp-Zellen (AX2) generiert. In 34⁻-Zellen wurde Fimbrin ebenfalls ausgeschaltet, um zu klären, ob die partielle Redundanz des ebenfalls calciumbindenden ABP 34 auf Fimbrin zurückgeht [Rivero *et al.*, 1996]. Beim „Screening“ der 34⁻/Fimbrin⁻-Mutanten wurde ein Klon isoliert, welcher noch einen Teil von Fimbrin exprimiert. Northern-Blot-Analyse (s. Abschnitt B 3.1) ergab, dass in dieser als B3 bezeichneten Mutante der N-Terminus des Proteins, welcher die calciumbindenden Domänen und die erste aktinbindende Domäne enthält, exprimiert wird.

Ausgehend von der Mutante FG2 wurden die Reexpressionsmutanten RF, S→A und ΔEF erhalten. Die Mutante RF exprimiert unmutiertes vollängen Fimbrin, S→A weist Punktmutationen der Serinreste 5 und 7, welche als potentielle Phosphorylierungsstellen gelten, zu Alanin auf. In der Mutante ΔEF wurde ein Teil des N-Terminus deletiert, der die calciumbindende Domänen beinhaltet (s. Abb. B 3.1). Bei der Mutante 34R handelt es sich um 34 Zellen, in die ABP 34 als „Rescue“ reintegriert wurde. Die CH-Domänen wurden im Schema mit verschiedenen Farben unterlegt, da je zwei der Domänen paarweise (blau oder grün) eine aktinbindende Domäne bilden.

3.1 Northern-Blot-Analyse der Fimbrin-Mutanten

Die Expression des Fimbrin-Gens wurde mit Northern-Blot-Analyse überprüft. Hierzu wurde die Gesamt-RNA axenisch gewachsener Zellen verwendet. Als Sonden wurden cDNA-Fragmente eingesetzt, pla 12 und pla 6. Bei pla 12 handelt es sich um ein Fragment aus dem N-terminalen Bereich des Gens mit einer Größe von etwa 1,2 kb; pla 6 ist im C-terminalen Bereich des Gens gelegen und umfasst etwa 0,6 kb. Zwischen diesen beiden Fragmenten lag im „Targeting“-Vektor die Neomycin-Resistenz-Kassette.

Beide Sonden erkennen in RNA aus AX2 eine Bande bei 1,9 kb, die Vollängen Fimbrin entspricht, diese Bande ist bei den untersuchten Mutanten FG2, B1 und B3 nicht nachweisbar. Bei der in B3-RNA mit der Sonde pla 12 erkennbaren Bande handelt es sich um den N-terminalen Bereich des Plastins, den diese Mutante exprimiert, dieser wird nicht von der Sonde pla 6 erkannt (s. Abb. B 3.2). Dies ist darauf zurückzuführen, dass nur der hintere Teil des „Targeting“-Vektors mit dem Gen rekombiniert hat.

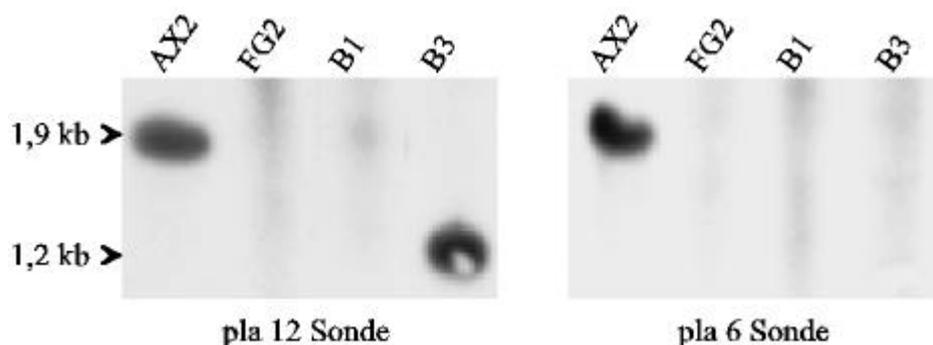


Abb. B 3.2: Northern-Blot-Analysen der *D. discoideum*-Stämme AX2, FG2, B1 und B3. Als Sonden wurden pla 12 (1,2 kb, N-terminaler Bereich des Gens) und pla 6 (0,6 kb, C-terminaler Bereich) verwendet.

3.2 Western-Blot-Analyse der Fimbrin-Mutanten

Die Western-Blot-Analyse erfolgte unter Verwendung des monoklonalen anti-Fimbrin-Antikörpers 210-183-1, der gegen Vollängen-Fimbrin generiert wurde [Prassler *et al.*, 1997].

Im AX2-Homogenat erkennt der Antikörper Fimbrin bei etwa 67 kDa. Diese Bande fehlt in den Extrakten der Fimbrin-Null-Mutanten FG2 und B1. Es ist auch keine kleinere Bande zu erkennen, wie bei den Mutanten B3 und Δ EF. Das Homogenat von B3 zeigt eine Bande von etwa 40 kDa und jenes von Δ EF eine von etwa 60 kDa. Dies entspricht den ersten 390 Aminosäuren (B3) beziehungsweise der Deletion der calciumbindenden Domänen. Eine dem Vollängen-Fimbrin entsprechende Bande weisen die Extrakte der Mutanten S \rightarrow A und RF auf. Im Falle von RF ist diese allerdings deutlich schwächer als die der übrigen Mutanten. Zum Vergleich wurden dieselben Extrakte mit anti-Aktin-Antikörper Act 1-7 getestet. Alle Homogenate zeigen eine gleich starke Aktin-Bande bei etwa 43 kDa. Dies bestätigt, dass vergleichbare Mengen aufgetragen wurden. Die schwache Fimbrin-Bande der Mutante RF geht also auf eine geringere Expression des Proteins verglichen mit den anderen Zelllinien zurück (s. Abb. B3.3).

Um die Ausschaltung des 34 kDa aktinbindenden Proteins zu zeigen, wurde der monoklonale Antikörper 159-291-1 gegen dieses Protein zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Wie zu erwarten zeigen die Homogenate von AX2 und FG2 eine Bande bei 34 kDa, die bei den Mutanten 34⁻, B1 und B3 fehlt (s. Abb. B 3.3).

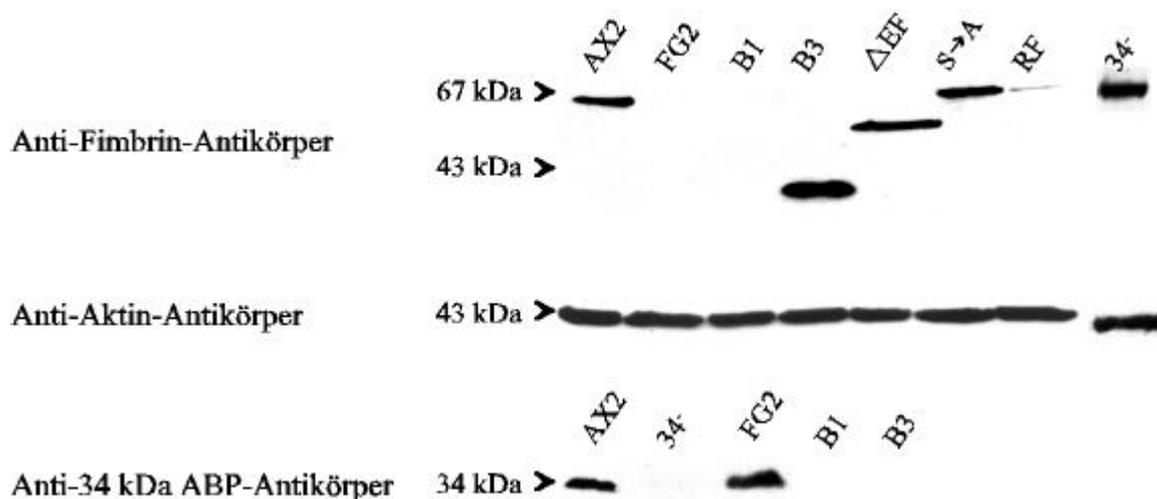


Abb. B 3.3: Western-Blot-Analyse der Fimbrin Mutanten mit anti-Fimbrin mAk 210-183-1, anti-Aktin- mAk Act 1-7 und anti- 34 kDa ABP-mAk 159-291-1. Es wurden je 5 μ l von Gesamthomogenaten aus 1×10^5 Zellen auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches für die Western-Blot-Analyse verwendet wurde (s. Abschnitt E 3.5 und E 3.7).

3.3 Zellbiologische Untersuchungen der Fimbrin-Mutanten

Die Funktion des aktinbindenden Proteins Fimbrin in *D. discoideum* ist derzeit weitgehend unbekannt. Das Aktin-Zytoskelett nimmt jedoch bei zahlreichen Zellfunktionen eine zentrale Stellung ein. Das Ausschalten oder die Mutation eines aktinbindenden Proteins kann daher einzelne zelluläre Funktionen beeinflussen, wie es beispielsweise für Myosin [Knecht *et al.*, 1987; De Lozanne und Spudich, 1987] oder für das 34 kDa aktinbindende Protein [Rivero *et al.*, 1996] in *D. discoideum* gezeigt werden konnte. Die vorgenommenen Fimbrin-Mutationen könnten also Aufschluss bezüglich der Funktionalität des Proteins geben. Dabei ist insbesondere die Bedeutung der potentiellen Phosphorylierungsstellen, der Effekt der vollständigen Deletion des Proteins und ein Zusammenwirken mit ABP 34 hinsichtlich der Doppeldelation beider Proteine von Interesse.

Nachfolgend werden Experimente zum Wachstumsverhalten und zur Zellgröße der Fimbrin-Mutanten beschrieben, sowie Versuche zu Endo- und Exozytose und zur Fähigkeit, osmotischem Stress zu widerstehen. Immunfluoreszenzen zeigen die Lokalisation des Proteins in AX2-Zellen wie auch in den Mutanten im Vergleich zu Aktin.

3.3.1 Wachstum

Zellwachstum setzt das Zusammenspiel verschiedener zellulärer Vorgänge wie Rezeptor-vermittelter Phagozytose und Zytokinese voraus. Das Aktin-Zytoskelett ist dabei einer ständigen Reorganisation unterworfen. Die Mutation eines aktinbindenden Proteins oder dessen Ausschaltung könnte daher zu einer Veränderung des Wachstums führen. Eine α -Actinin und ABP-120 defiziente Mutante von *D. discoideum* zeigen beispielsweise ein stark verlangsamtes axenisches Wachstum [Rivero *et al.*, 1999] wie auch eine Talin defiziente Mutante beim Wachstum in Suspension mit *E. coli* B/r [Niewöhner *et al.*, 1997].

Getestet wurde das Wachstum in Schüttelkultur in axenischem Medium und in Suspension mit abgetöteten *K. aerogenes* oder lebenden *E. coli* als Nahrungsquelle in Sörensen-Phosphat-Puffer.

In axenischem Medium unterscheidet sich das Wachstum der Mutanten Δ EF, FG2 und RF nicht von dem des Wildtyps. Im Falle der Mutante S \rightarrow A entspricht die erreichte maximale Zelldichte mit etwa $1,2 \times 10^7$ Zellen/ml und die Verdopplungszeit von zehn Stunden der von AX2, jedoch beginnt die logarithmische Wachstumsphase etwa 15 Stunden früher. Die Mutanten B1 und B3 wachsen mit Verdopplungszeiten von 13 beziehungsweise 15 Stunden langsamer als der Wildtyp. Außerdem liegt der Übergang dieser Zelllinien in die stationäre

Phase bereits bei einer Zelldichte von $0,9 \times 10^7$ Zellen/ml im Falle von B1 und $0,8 \times 10^7$ Zellen/ml bei B3 (s. Tab. B 3.1 und Abb. B 3.4 A und B).

Im Gegensatz zur endozytotischen Nahrungsaufnahme in axenischem Medium findet beim Wachstum in Bakteriensuspension Phagozytose statt. Beide Mechanismen unterscheiden sich im Ablauf und auch in der Verwendung der verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts. Daher ist es denkbar, dass die einzelnen Zelllinien im Wachstum unter den verschiedenen Bedingungen Unterschiede aufweisen.

Tatsächlich sind bei Wachstum mit abgetöteten *K. aerogenes* als Nahrungsquelle mit Ausnahme der Mutante S→A bei allen Zelllinien Unterschiede zu axenischem Wachstum festzustellen. Die maximal erreichten Zelldichten sind erhöht, die Verdopplungszeiten ebenfalls verändert. Besonders auffällig sind die Unterschiede bei den Doppelmutanten B1 und B3. Ihre Verdopplungszeiten sind in Bakteriensuspension geringer, die maximale Zelldichte doppelt so hoch wie in axenischem Medium, mit $1,9 \times 10^7$ Zellen/ml im Falle der Mutante B1 wird sogar die maximale Zelldichte von AX2 deutlich überschritten. Im Gegensatz zum Wildtyp, welcher bereits innerhalb von 10 Stunden nach Ansetzen der Kultur in die logarithmische Wachstumsphase übergeht, ist dies bei der Mutante B3 erst nach 30 Stunden der Fall. Die Fimbrin defiziente Mutante FG2 weist in Bakteriensuspension eine um fünf Stunden verkürzte Verdopplungszeit auf, tritt aber bei einer ähnlichen Zelldichte in die stationäre Phase wie AX2 (s. Abb. B 3.4 und Tab. B 3.1).

Für die Stämme AX2, FG2, B1 und B3 wurde auch *E. coli* B/r (lebend) als Nahrungsquelle in Schüttelkultur eingesetzt. Unter diesen Bedingungen sind die maximal erreichten Zelldichten gegenüber axenischem Wachstum nicht so stark erhöht wie bei der Verwendung von *K. aerogenes*, wenn auch B1 und B3 etwa die doppelte Dichte erreichen. Die Verdopplungszeiten sind mit 5 Stunden für AX2 und FG2 bzw. 4 Stunden für B1 und B3 deutlich kürzer als in axenischem Medium und auch in Suspension mit *K. aerogenes*.

Das Wachstum der 34⁻ Mutante in axenischem Medium und Bakteriensuspension wurde bereits von **Rivero et al.** (1996) untersucht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zu AX2 festgestellt.

Stamm	Maximale Zelldichte [$\times 10^7$ Zellen/ml]			Verdopplungszeit [h]		
	axenisch	<i>K. aerogenes</i>	<i>E. coli</i> B/r	axenisch	<i>K. aerogenes</i>	<i>E. coli</i> B/r
AX2	1,3	1,4	1,4	10	10	5
B1	0,9	1,9	1,5	13	12	4
B3	0,8	1,5	1,6	15	12	4
FG2	1,1	1,5	1,4	13	8	5
RF	1,1	-	-	13	-	-
DEF	1,2	1,8	-	10	12	-
S®A	1,2	1,2	-	10	10	-

Tab B 3.1: Maximal erreichte Zelldichten und Verdopplungszeiten von Fimbrin-Mutanten von *D. discoideum* bei axenischem Wachstum und Wachstum in Suspension mit *E. coli* oder abgetöteten *K. aerogenes*

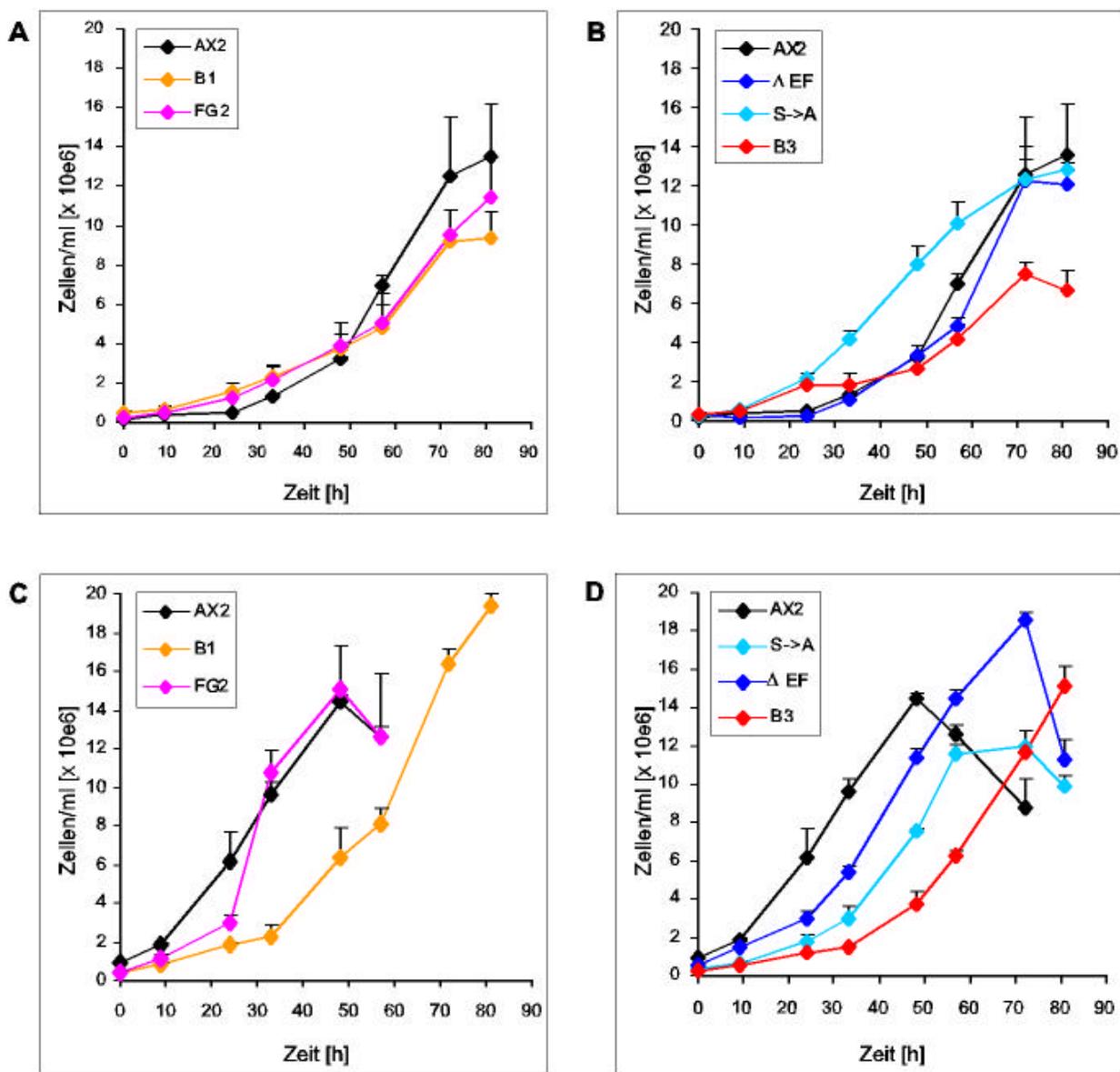


Abb. B 3.4: Wachstum verschiedener Mutanten von *D. discoideum* in axenischem Medium und in Bakterien-suspension. **A** und **B**: axenisches Wachstum; **C** und **D**: Wachstum in Suspension mit abgetöteten *K. aerogenes*. Das Wachstum der einzelnen Stämme wurde drei- bis fünfmal in Doppelbestimmungen getestet. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

3.3.2 Bestimmung der Zellgröße

Genauso wie das Wachstum wird auch die Größe einer Zelle von Komponenten des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst. Die Ausschaltung von ABP 34 in *D. discoideum* führt beispielsweise zu Zellen, welche mit einem Durchmesser von 10,5 μm im Vergleich zum Wildtyp (11,3 μm) leicht verkleinert sind [Rivero *et al.*, 1996]. Eine Bestimmung der Zellgröße der verschiedenen Mutanten ist daher von Interesse. Diese wurde mikroskopisch durchgeführt, nachdem durch Inkubation in Soerensen-Phosphat-Puffer mit 20 mM EDTA gewährleistet war, dass die Zellen abgerundet und keine Zellklumpen mehr vorhanden waren (s. Abschnitt E 5.8).

Alle Stämme, die ausschließlich Mutanten des Fimbrins darstellen, FG2, ΔEF und S \rightarrow A weisen die gleiche durchschnittliche Zellgröße von 12-14 μm im Durchmesser auf, wie der Wildtyp AX2. Im Falle der Mutanten B1 und B3 ist jedoch eine geringere Zellgröße feststellbar. Die mittlere Größe von B3 ist mit 10-12 μm nur geringfügig kleiner als AX2, B1 mit 6-8 μm im Durchmesser ist jedoch deutlich kleiner, kleiner auch als 34⁻-Zellen. (s. Abb. B 3.5).

3.3.3 Endozytose

Das Wachstum der Amöben in axenischem Medium basiert auf dem Mechanismus der Endozytose. Da bekannt ist, dass das zu Fimbrin homologe Protein sac6p in *S. cerevisiae* an endozytotischen Prozessen beteiligt ist [Kübler und Riezman, 1993], und sich die Mutanten B1 und B3 wie in Abschnitt B 3.3.1 beschrieben in ihrem Wachstum von Wildtyp-Zellen unterscheiden, ist es von Interesse, die Endozytose quantitativ zu bestimmen. Hierzu wurde das Kulturmedium der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt, der für die Zellen nicht verwertbar ist. Der von den Zellen aufgenommene Farbstoff wurde fluorimetrisch bestimmt.

Deutliche Unterschiede in der Endozytose sind bei den Mutanten B1 und B3 zu erkennen, diese erreichen lediglich 70 beziehungsweise 75 % der relativen Fluoreszenz von AX2.

Während die B1- und B3-Zellen nach 120 Minuten in die Sättigungsphase übergehen, nimmt der Wildtyp weiterhin zusätzlichen Farbstoff auf, ebenso wie die Mutante mit Deletion von ABP 34 und die Stämme mit Mutationen des Fimbrins (s. Abb. B 3.6). Dies stimmt mit den Wachstumsraten der jeweiligen Mutanten in axenischem Medium überein.

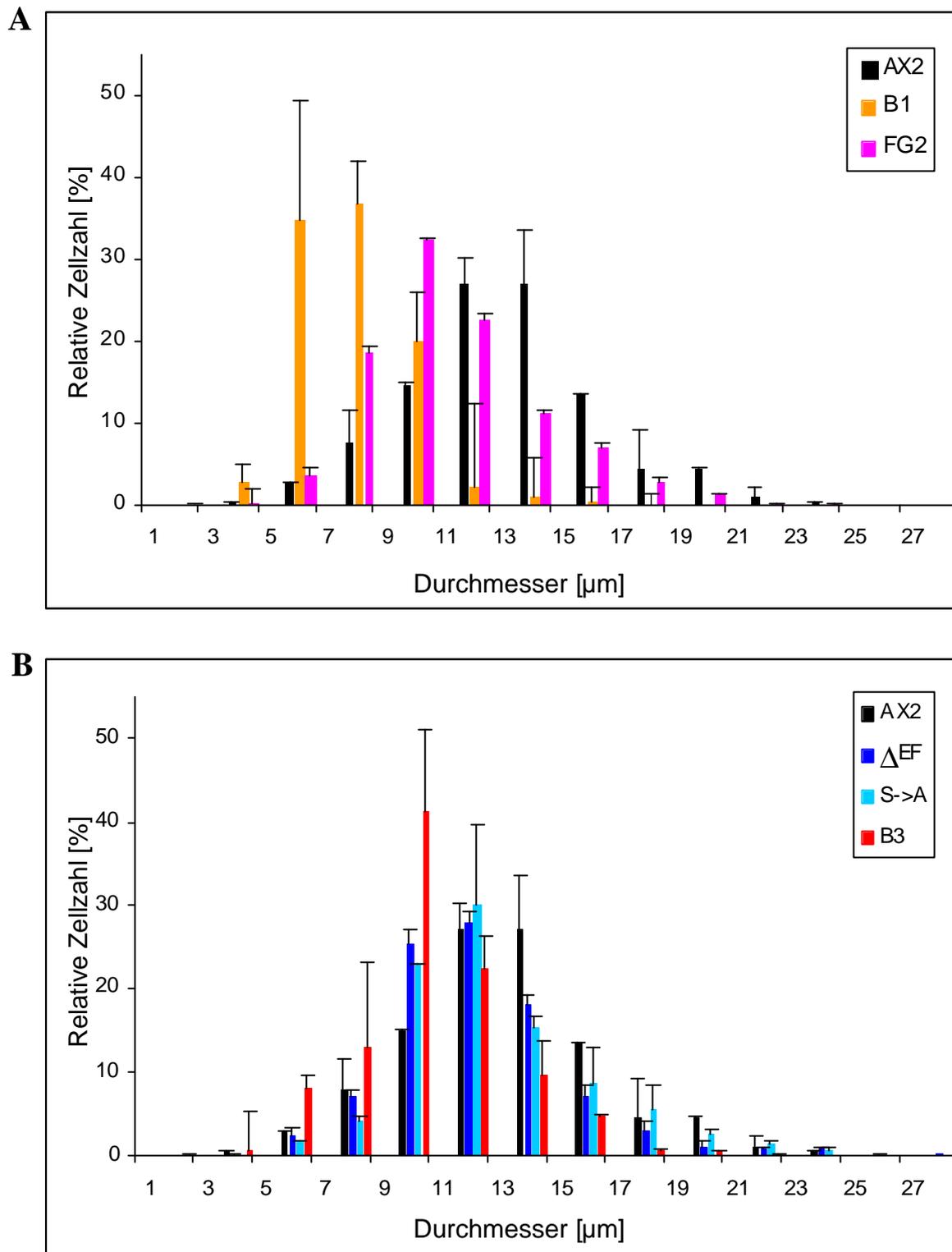


Abb. B 3.5: Bestimmung der Zellgröße von **A)** Mutanten, die kein Fimbrin und **B)** Mutanten, die nur Teilbereich oder mutierte Varianten von Fimbrin exprimieren im Vergleich zu AX2. In drei von einander unabhängigen Versuchen wurden je 150-250 Zellen vermessen. Die Mittelwerte der verschiedenen Messungen sind in der Grafik mit der Standardabweichung dargestellt.

3.3.4 Exozytose

Endozytotisch aufgenommenes FITC-Dextran wird von den Amöben in saure lysosomale Vesikel transferiert und anschließend in Postlysosomen transportiert bevor es durch Exozytose aus der Zelle herausgebracht wird [Aubry *et al.*, 1993]. Hierzu ist wie bei der Endozytose eine Reorganisation des Zytoskeletts erforderlich. Folglich kann auch auf die Exozytose die Mutation eines oder mehrerer Proteine des Aktin-Zytoskeletts eine Auswirkung haben, wie es bei dem zu den Rho-Proteinen gehörenden RacC der Fall ist. Überexpression dieses Proteins führt zu einer deutlichen Verlangsamung der Exozytose von FITC-Dextran [Seastone *et al.*, 1998].

Im Versuchsablauf stellt die Exozytose eine Fortsetzung des Versuchs zu Endozytose dar. Nachdem die Amöben über 120 Minuten einen Fluoreszenzfarbstoff aufgenommen haben, werden die Zellen gewaschen und in farbstofffreiem Medium weiter kultiviert, so dass der durch Exozytose abnehmende Farbstoffgehalt der Zellen fluorimetrisch bestimmbar ist.

Während die Mutanten mit vollständiger Deletion von Fimbrin (B1, FG2) und auch 34⁻ in der Exozytose keinerlei Unterschied zum Wildtyp aufweisen, ist die Farbstoffabgabe der Mutante B3 leicht verlangsamt, der Gehalt in der Zelle ist nach 120 Minuten gegenüber AX2 um 10 % höher. Die Stämme mit Deletion bzw. Mutationen im Bereich des N-Terminus, Δ EF und S \rightarrow A exozytieren den Farbstoff etwas schneller als AX2, sie haben nach 60 Minuten 10-15 % mehr Farbstoff ausgeschieden als der Wildtyp (s. Abb. B 3.7).

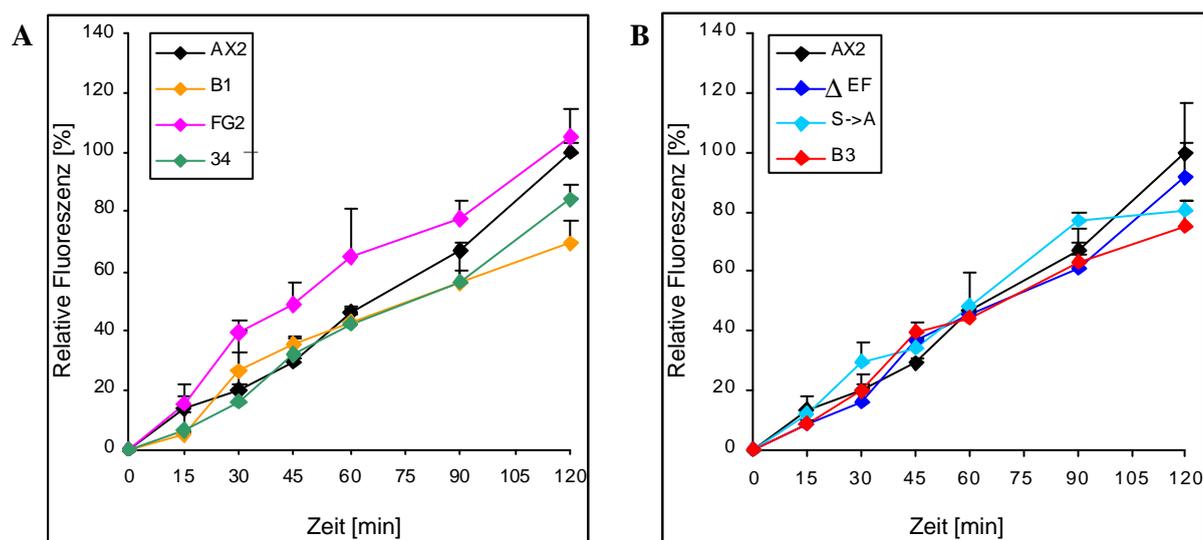


Abb. B 3.6: Endozytose von FITC-Dextran. von A) Mutanten, die kein Fimbrin und B) Mutanten, welche nur einen Teilbereich oder mutierte Varianten von Fimbrin exprimieren im Vergleich zu AX2. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung.

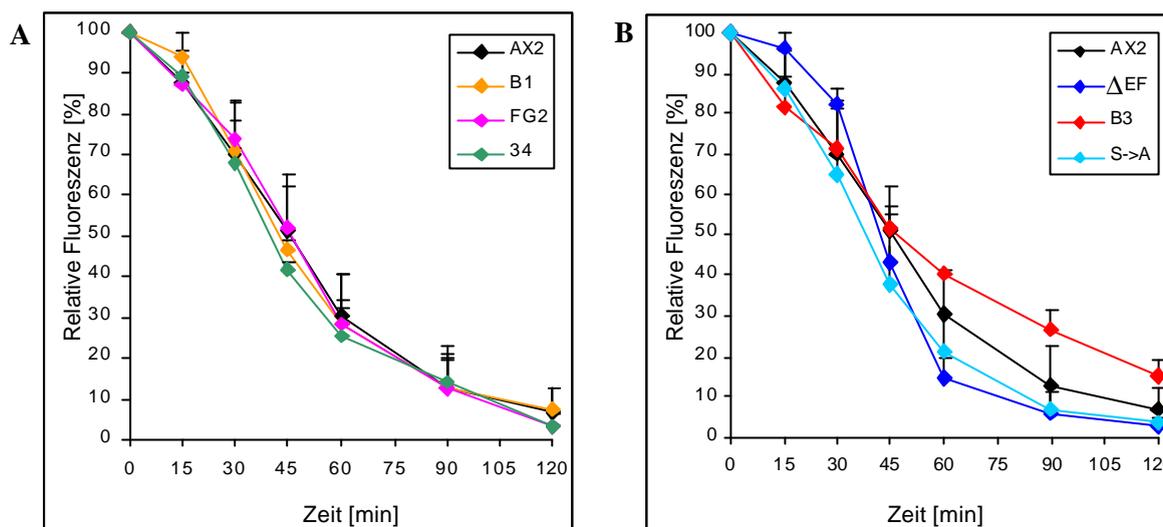


Abb. B 3.7: Exozytose von FITC-Dextran. von **A)** Mutanten, die kein Fimbrin und **B)** Mutanten, welche nur einen Teilbereich oder mutierte Varianten von Fimbrin exprimieren im Vergleich zu AX2. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung.

3.3.5 Phagozytose

Da Immunfluoreszenzstudien eine Anreicherung von L-Plastin in Phagosomen zeigen [Rosales *et al.*, 1994] und rezeptorvermittelte Phagozytose zur Phosphorylierung dieses zu Fimbrin homologen Proteins führt [Jones und Brown, 1996] ist zu vermuten, dass dieses Protein auch an der Phagozytose beteiligt ist. Mutationen von Fimbrin oder die Ausschaltung der Expression des Proteins könnte also zu einer Beeinträchtigung des Phagozytoseverhaltens führen. Dies konnte bereits für andere Proteine des Aktin-Zytoskeletts aus *D. discoideum* gezeigt werden. Die Unterbindung der Expression von Coronin, einem Protein, welches ebenfalls in Phagosomen lokalisiert ist, führt zu einer um 70 % verminderten Phagozytoserate von abgetöteten Hefen gegenüber dem Wildtyp [Maniak *et al.*, 1995]. Eine Talin-defiziente Mutante weist sogar eine um 90 % geringere Phagozytoserate auf als AX2 [Niewöhner *et al.*, 1997]. Eine Quantifizierung der Phagozytose unter Verwendung von abgetöteter, fluoreszenzmarkierter Hefe soll weitere Informationen liefern.

Es zeigt sich, dass die ABP 34 defizienten Mutanten 34⁻, B1 und B3 eine deutlich erhöhte Phagozytoserate aufweisen, nach 120 Minuten wurden von diesen Stämmen bis zu 80 % mehr Hefen aufgenommen als vom Wildtyp. Die alleinige Ausschaltung von Fimbrin bzw. die Deletion der calciumbindenden Domänen hat hingegen keinen Einfluss. Letzteres wurde an der Mutante 34R (Rescue von 34⁻ mit ABP 34) bestätigt. Bemerkenswert ist die gegenüber AX2 um 40 % gesenkte Phagozytoserate der Mutante S→A, bei welcher die potentiellen Phosphorylierungsstellen am N-Terminus punktmuiert wurden.

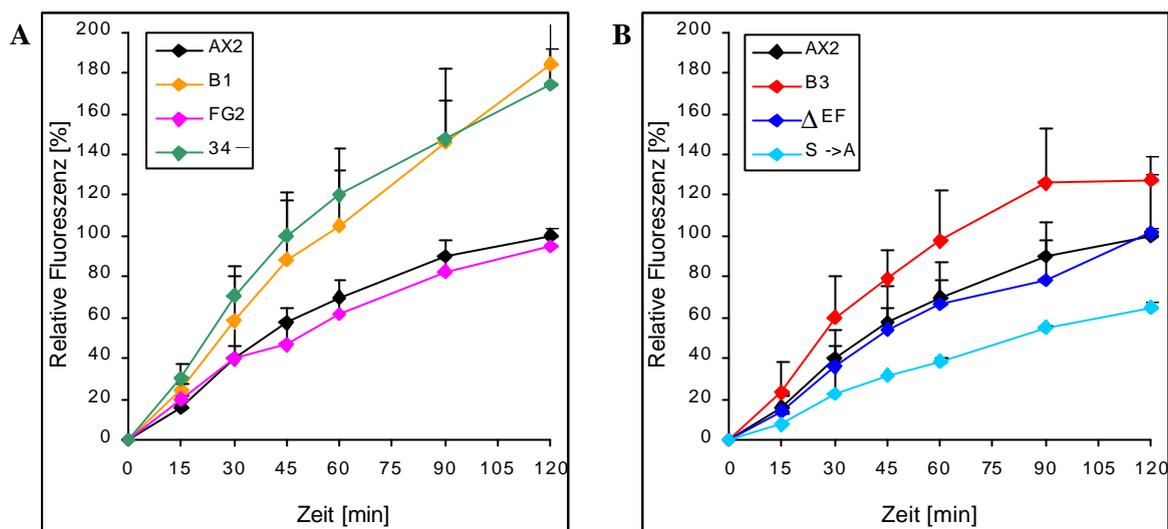


Abb. B 3.8: Phagozytose fluoreszenzmarkierter Hefen A) Mutanten, die kein Fimbrin und/oder 34 kDa aktinbindendes Protein und B) Mutanten, die nur Teilbereich oder mutierte Varianten von Fimbrin exprimieren im Vergleich zu AX2. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung.

3.4 Lokalisation von Fimbrin und Aktin in fixierten *D. discoideum*-Zellen

3.4.1 Vergleich der verschiedenen Fimbrin-Mutanten bei Verwendung unterschiedlicher Fixierungsmethoden

Die Lokalisation von Fimbrin wurde bereits in Immunfluoreszenzstudien mit dem anti-Fimbrin-Antikörper 210-183-1 an mit Methanol oder Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixierten *D. discoideum*-Zellen des Wildtyps AX2 untersucht [Prassler *et al.*, 1997]. Ein Vorteil der Fixierung mit Methanol ist, dass Proteine kaum denaturiert werden, die Form der Zelle und intrazelluläre Strukturen werden allerdings stark beeinträchtigt. Paraformaldehyd/Pikrinsäure stellt ein sehr starkes Fixativ dar und gilt als gut geeignet für die Fixierung von *D. discoideum* [Brink *et al.*, 1990]. Die Unterschiede der verschiedenen Fixierungsmethoden zeigen sich deutlich in der Lokalisation von Fimbrin. Bei der Fixierung mit Methanol ist Fimbrin entlang der Zellmembran lokalisiert, Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixierung zeigt ein diffuses Netzwerk im Zytosol. Welche Fixierungsmethode die tatsächliche Verteilung *in vivo* am ehesten wiedergibt, ist jedoch nicht klar.

Des Weiteren soll überprüft werden, ob die vorgenommenen Mutationen eine Veränderung der Lokalisation bewirken. Dazu wurden die Mutanten mit beiden Methoden fixiert und dem anti-Fimbrin-Antikörper 120-183-1 markiert.

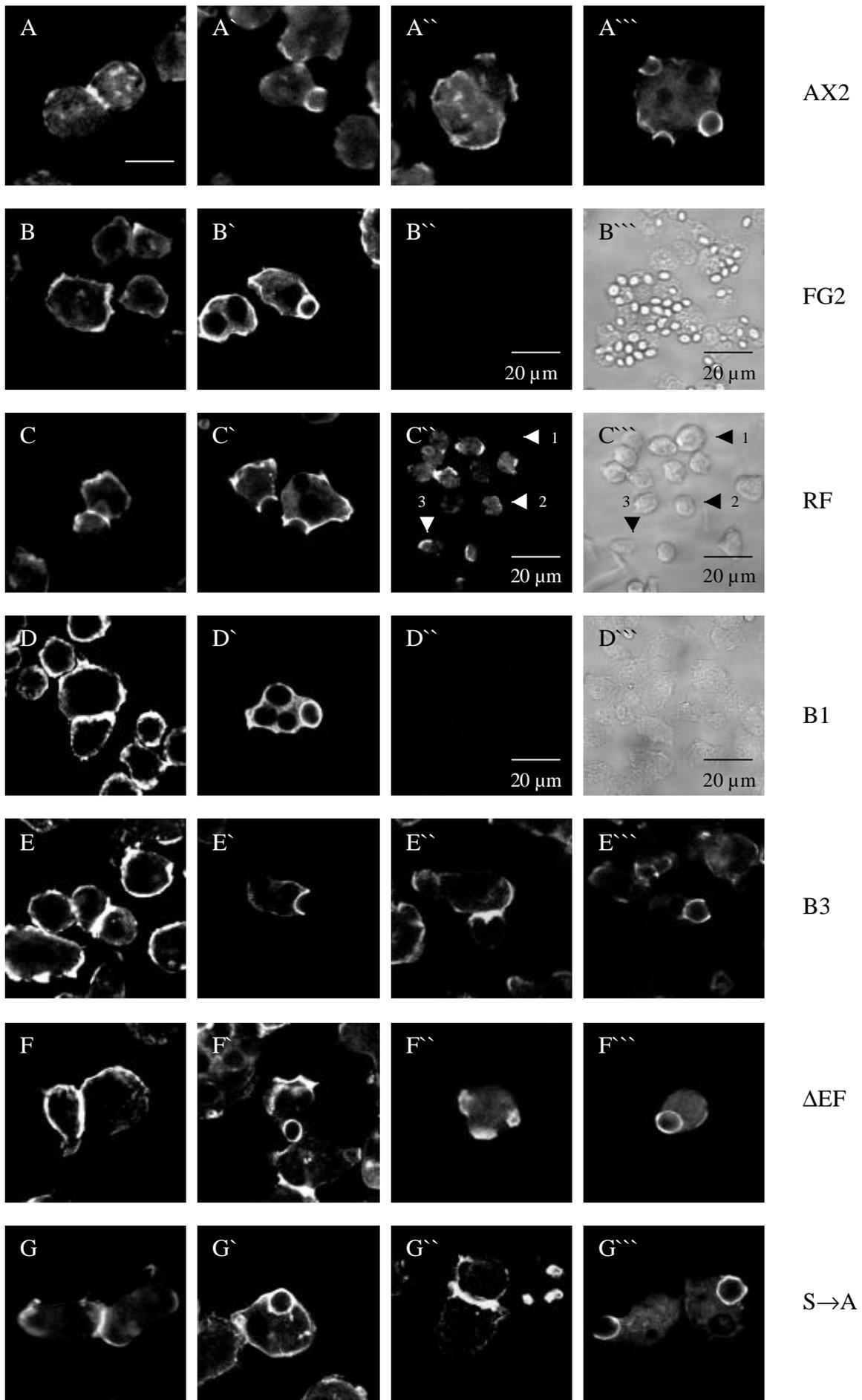


Abb. B 3.9 (vorhergehende Seite): Lokalisation von Aktin und Fimbrin in methanolfixierten Fimbrin-Mutanten von *D. discoideum*. A-G: Immunfärbung mit anti-Aktin-Ak Act 1-7. A'-G': Wie A-G, die Zellen wurden vor der Fixierung mit einer Suspension abgetöteter Hefen inkubiert. A''-G'': Immunfärbung mit anti-Fimbrin-Ak 120-183-1. A''', E'''-G''': Wie A'-G' unter Verwendung des anti-Fimbrin-Ak. B'''-D''': Phasenkontrast von B''-D''. Maßstab, wenn nicht anders gekennzeichnet: 10 µm.

Zusätzlich wurden Methanol-fixierte Zellen separat mit dem anti-Aktin-Antikörper Act 1-7 markiert und Paraformaldehyd/Pikrinsäure-fixierte Zellen mit TRIC-Phalloidin behandelt, um Aktin sichtbar zu machen. So kann überprüft werden, ob Aktin und Fimbrin in denselben Bereichen der Zelle lokalisieren und Mutationen von Fimbrin zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts führen.

Methanolfixierte Zellen aller Mutanten zeigen die gleiche Lokalisation von Aktin (s. Abb. 3.9, A-G): Es ist entlang der Zellmembran angereichert, aber auch im Bereich von Zell-Zell-Kontakten oder Endosomen. Fimbrin ist prinzipiell genauso lokalisiert (s. Abb. B 3.9, A''-G''). Die Fimbrin-defizienten Mutanten B1 und FG2 werden von dem anti-Fimbrin-Antikörper nicht erkannt. Im Falle der Mutante RF, ein vollängen-Fimbrin-„Rescue“ der Mutante FG2 ist erkennbar, dass nicht von allen Zellen im gleichen Maße Fimbrin exprimiert wird. Einige Zellen weisen deutlich weniger Fimbrin auf als andere (s. Abb. B 3.9, C'' und C''', Pfeile 1-3).

Bei einigen Präparaten wurden die Zellen vor der Fixierung für 20 Minuten mit einer Suspension abgetöteter Hefen inkubiert. Sowohl Aktin als auch Fimbrin lokalisieren an den Phagosomen und Phagozytose-„Cups“, unbeeinflusst von den verschiedenen vorgenommenen Mutationen (s. Abb. B 3.9, A'-G', A''', E'''-G''').

Der Vergleich von Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixierung zur Fixierung mit Methanol zeigt bei allen Stämmen Unterschiede bezüglich der Lokalisation von Fimbrin (s. Abb. B 3.10, am Beispiel der Mutante B3). Während Aktin entsprechend der Methanol-Fixierung auch mit der Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixierung eine definierte Lokalisation im Bereich der Zellmembran aufweist (Vergleich s. Abb. B 3.10 A' und C''), erscheint die Lokalisation von Fimbrin nach Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixierung diffuser über die Zelle verteilt (Vergleich s. Abb. B 3.10 A und C).

Wurden die Zellen vor der Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixierung mit Hefe-Suspension inkubiert (s. Abb. B 3.10 B-B''') so ist wiederum bei allen Stämmen die Lokalisation von Aktin (rot) und Fimbrin (grün) an den Phagosomen erkennbar, was eine Überlagerung der beiden Bilder (gelb) verdeutlicht. Fimbrin ist allerdings wiederum zusätzlich diffus über die ganze Zelle verteilt.

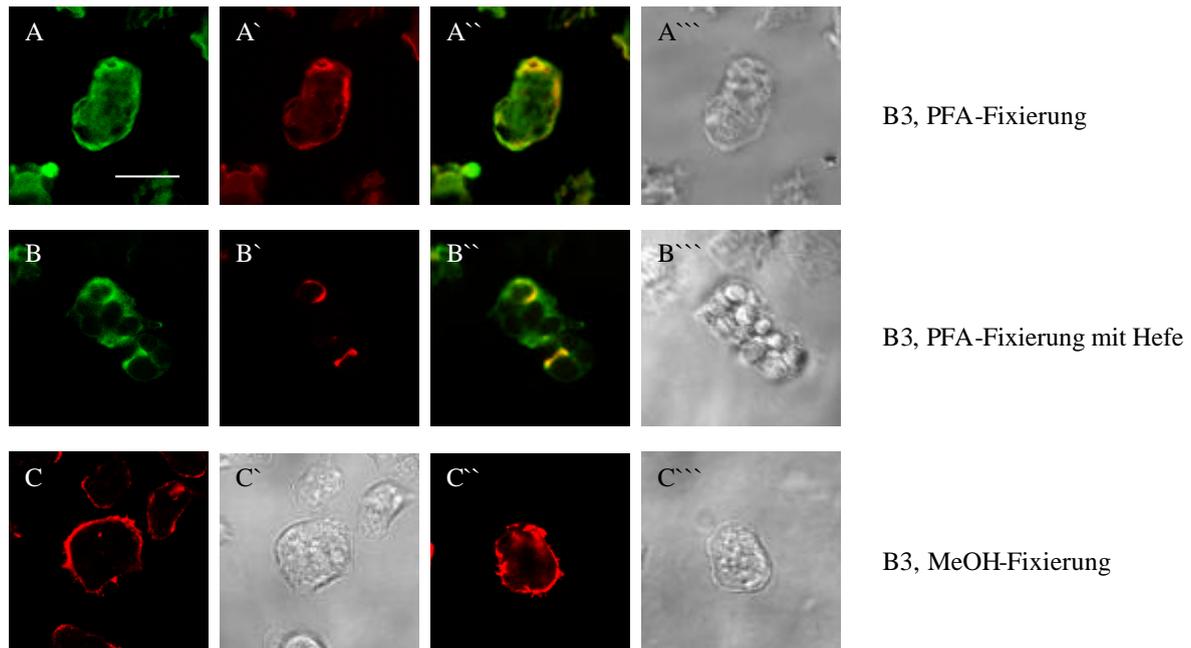


Abb. B 3.10: Paraformaldehyd/Pikrinsäure (PFA)-Fixierung und Methanol (MeOH)-Fixierung im Vergleich am Beispiel der Mutante B3. A-A''': PFA-Fixierung mit anti-Fimbrin AK (A), Aktin-Färbung mit TRIC-Phalloidin (A'), Überlagerung von A und A'' und Phasenkontrast (A'''). B-B''': Wie A-A'''' nach Inkubation mit Hefen. C-C''': MeOH-Fixierung mit anti-Fimbrin Ak (C), mit Phasenkontrast (C') und anti-Aktin-Ak (C'') mit Phasenkontrast (C'''). Maßstab: 10 μ m

3.4.2 Lokalisation von Fimbrin in Aktin-GFP-Zellen

Eine gleichzeitige Immunfärbung mit zwei aus Maus-Hybridomazellen gewonnenen Antikörpern ist nicht ohne weiteres möglich, da Aktin in Methanol-fixierten Zellen nicht mit Phalloidin angefärbt werden kann und die primären Antikörper beide von einem anti-Maus IgG-Antikörper erkannt würden. Deshalb wurde für weitere Immunfluoreszenzen ein *D. discoideum*-Stamm verwendet, der an „green fluorescent protein“ (GFP) gekoppeltes Aktin exprimiert [Westphal *et al.*, 1997]. Bei GFP handelt es sich um ein 27 kDa schweres Protein. Nach Anregung mit kurzwelligem Licht (Absorptionsmaximum bei 490 nm) emittiert das Protein im grünen Spektralbereich mit einem Emissionsmaximum bei 508 nm.

Werden diese Zellen mit Methanol fixiert und mit anti-Fimbrin-Antikörper markiert, so kann die Lokalisation von Aktin und Fimbrin gleichzeitig in einer Zelle beobachtet werden (s. Abb. B 3.11). Die Verteilung von Fimbrin in Aktin-GFP-Zellen ist identisch mit der in AX2 und in den verschiedenen Mutanten. Methanol-fixierte Zellen zeigen eine Kollokalisierung von Aktin-GFP und Fimbrin an Phagozytose-„Cups“ und entlang der Zellmembran (s. Abb. B 3.11 A A''). Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixierung resultiert in einer diffusen zytosolischen Verteilung von Fimbrin, Aktin-GFP lokalisiert ähnlich wie in den Methanol-fixierten Zellen

(s. Abb. B 3.11 B-B''). Die Lokalisation von GFP-gekoppeltem Aktin stimmt mit der von endogenem Aktin überein.

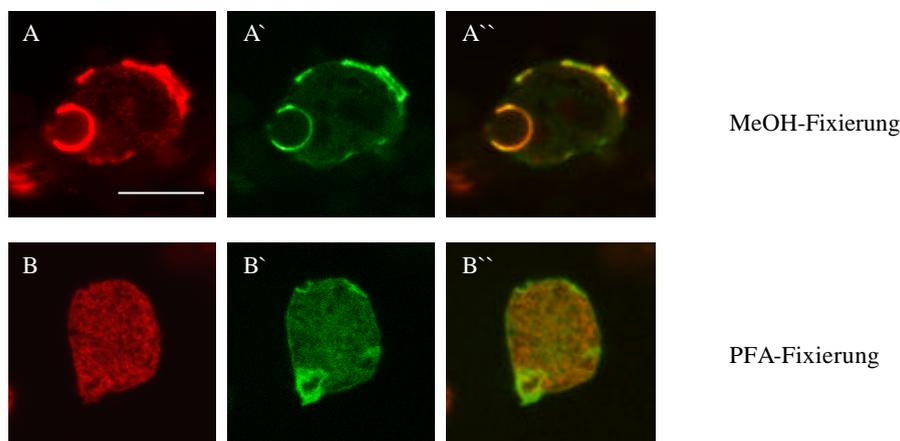


Abb. B 3.11: Lokalisation von Fimbrin und GFP-gekoppeltem Aktin in Aktin-GFP-Zellen. A-A'': methanolfixierte Zellen nach Inkubation mit Hefen mit A) anti-Fimbrin-Ak und A') Aktin-GFP-Färbung, A'') ist die Überlagerung von A und A'. B-B'': Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixierung mit B) anti-Fimbrin-Ak und B') Aktin-GFP-Färbung, B'') ist die Überlagerung von B und B'. An der unteren Spitze dieser Zelle ist ein Makropinosom erkennbar. Maßstab: 10 μ m

3.4.3 Expression von murinem L-Plastin in *D. discoideum*

Um nähere Informationen über die Lokalisierung und Phosphorylierung von L-Plastin zu erhalten, wurde versucht, Vollängen-L-Plastin und eine Variante mit Punktmutationen der Phosphorylierungsstellen von Serin nach Alanin an GFP gekoppelt in verschiedenen Säuger-Zelllinien zu exprimieren. Da dies nicht erfolgreich war, wurde L-Plastin so in den Vektor pDEX-GFP [Westphal *et al.*, 1997] kloniert, dass GFP an den N-Terminus von L-Plastin gekoppelt ist und in *D. discoideum*-Zellen des Wildtyps transfiziert. Nach Selektion mit G418 wurde der Klon GFP-LP 1 isoliert.

Immunfluoreszenzstudien dieses Klons zeigen nach Methanol-Fixierung, dass GFP-L-Plastin ähnlich wie endogenes Fimbrin entlang der Plasmamembran, an Makropinosomen, Phagosomen und Phagozytose-„Cups“ lokalisiert ist, wie auch Aktin (s. Abb. B 3.12 A-D und A'-D'). Nach Fixierung mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure erscheint die Grünfärbung durch GFP-L-Plastin in der ganzen Zelle verteilt, wie es auch bei endogenem Fimbrin der Fall ist (s. Abb. B 3.12, E-F und E'-F'). Nur gelegentlich ist eine Anreicherung an Phagosomen erkennbar. In lebenden Zellen ist GFP-L-Plastin jedoch entlang der Plasmamembran und an Makropinosomen lokalisiert, entsprechend methanolfixierten Zellen. Folglich kann vermutet werden, dass auch für Fimbrin die Fixierung mit Methanol eher die tatsächliche Lokalisation in lebenden Zellen wiedergibt als die Fixierung mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure.

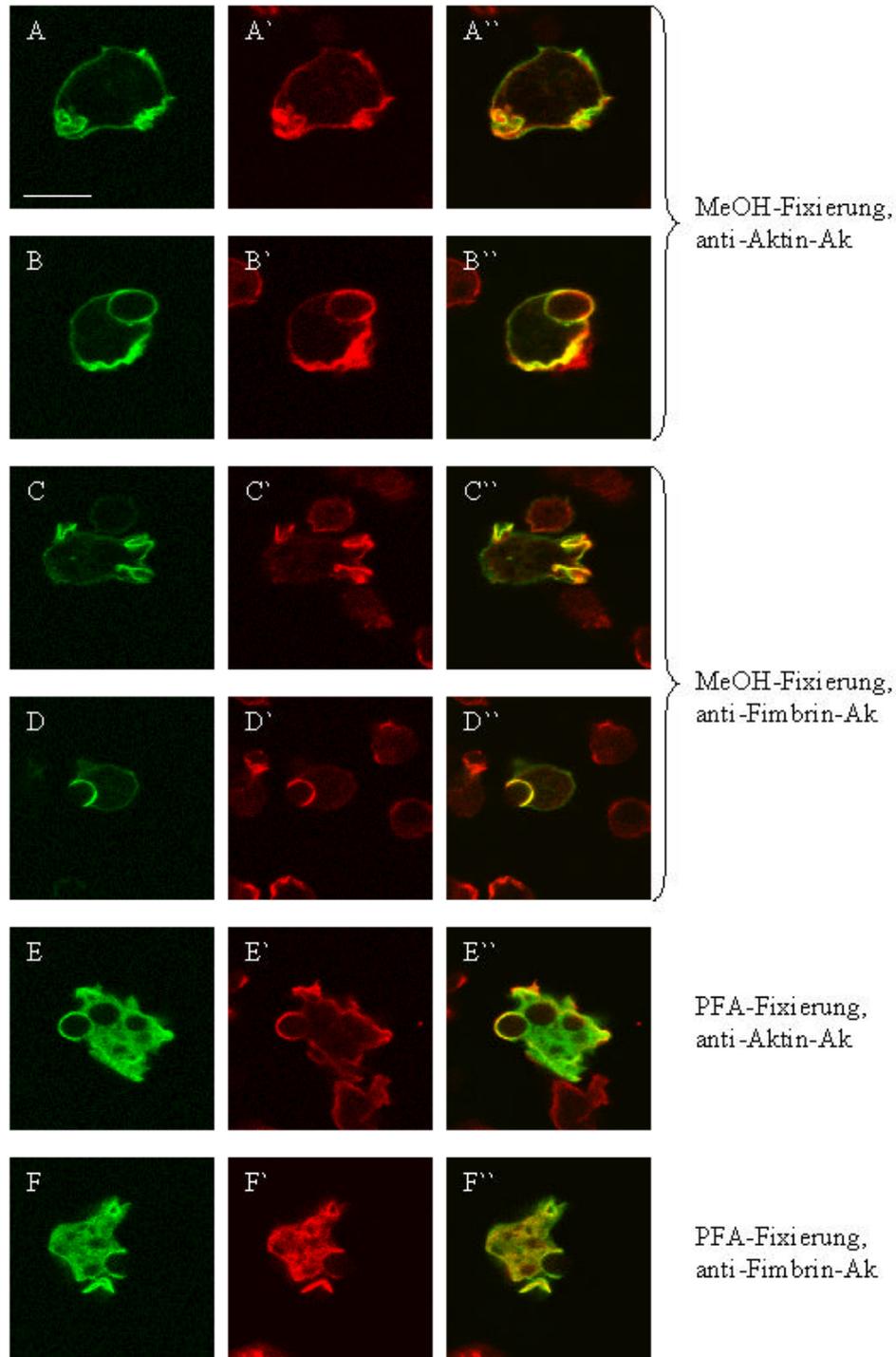


Abb. B 3.12: Immunfluoreszenzen von GFP-L-Plastin exprimierenden Amöben. A-D: L-Plastin-GFP in Methanol-fixierten Zellen, B und D nach Inkubation mit abgetöteten Hefen. A' und B': anti-Aktin-Antikörper, C' und D': anti-Fimbrin-Antikörper. E und F: L-Plastin-GFP in nach Inkubation mit abgetöteten Hefen mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixierten Zellen. E': anti-Aktin-Antikörper, F': anti-Fimbrin-Antikörper. A''-F'': Überlagerung der jeweiligen vorhergegangenen Bilder. Maßstab: 10 μ m

3.5 Verhalten von Fimbrin-Mutanten unter osmotischem Stress

Hyperosmotischer Stress führt in eukaryontischen Zellen zu einer Vielzahl von Reaktionen, von denen auch das Aktin-Zytoskelett betroffen ist. In Neutrophilen aus menschlichem Blut wurde sowohl eine Verdopplung des vorhandenen F-Aktins beobachtet als auch die Inhibierung von Migration, Phagozytose und Exozytose [Rizoli *et al.*, 2000]. *Dictyostelium discoideum*-Zellen reduzieren unter hyperosmotischen Bedingungen das Zellvolumen um 50 %, erscheinen abgerundet und eine Phosphorylierung von Aktin und Myosin II findet statt [Zischka *et al.*, 1999]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das aktinmodulierende Protein Cofilin in Amöben eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegenüber osmotischen Stress einnimmt [Aizawa *et al.*, 1999].

Ob die Deletion von Fimbrin und/oder ABP 34 einen Einfluss auf die Verteilung intrazellulärer Membran-Kompartimente wie beispielsweise dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum hat, ist nicht bekannt. Gleiches gilt für die Beteiligung dieser Proteine an Reaktionen der Zelle auf osmotischen Stress. Daher wurden die Mutanten FG2, B1 und 34⁻ durch einstündige Inkubation in Soerensen-Phosphat-Puffer mit 400 mM Sorbitol oder in Wasser hyper- bzw. hypoosmotischem Stress ausgesetzt, bevor sie mit Methanol fixiert wurden. Unter Verwendung verschiedener Antikörper, die intrazelluläre Kompartimente erkennen, wurden Immunfluoreszenzen aufgenommen. Als Kontrolle wurden axenisch gewachsene unbehandelte Zellen mit den gleichen Antikörpern fixiert. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und den Mutanten auftreten, sind nur AX2 und B1 abgebildet (s. Abb. B 3.13)

Im Falle aller Mutanten und des Wildtyps sind die Zellen nach Behandlung mit Sorbitol stark abgeflacht, rund und verkleinert. Der anti-Aktin-Antikörper Act 1-7 zeigt das gewohnte Bild einer ringförmigen Struktur entlang der Plasmamembran. Es sind keine deutlichen Veränderungen bei hypoosmotischen Bedingungen erkennbar, bei hyperosmotischem Stress sammelt sich Aktin punktuell unterhalb der Plasmamembran (s. Abb. B 3.13 B und C). Neben dem anti-Aktin-Antikörper wurden noch monoklonale Antikörper gegen die Protein-Disulfid-Isomerase, V/H⁺-ATPase Untereinheit A, Vakuolin, Kohlenhydrat-Epitope lysosomaler Enzyme und Comitine verwendet.

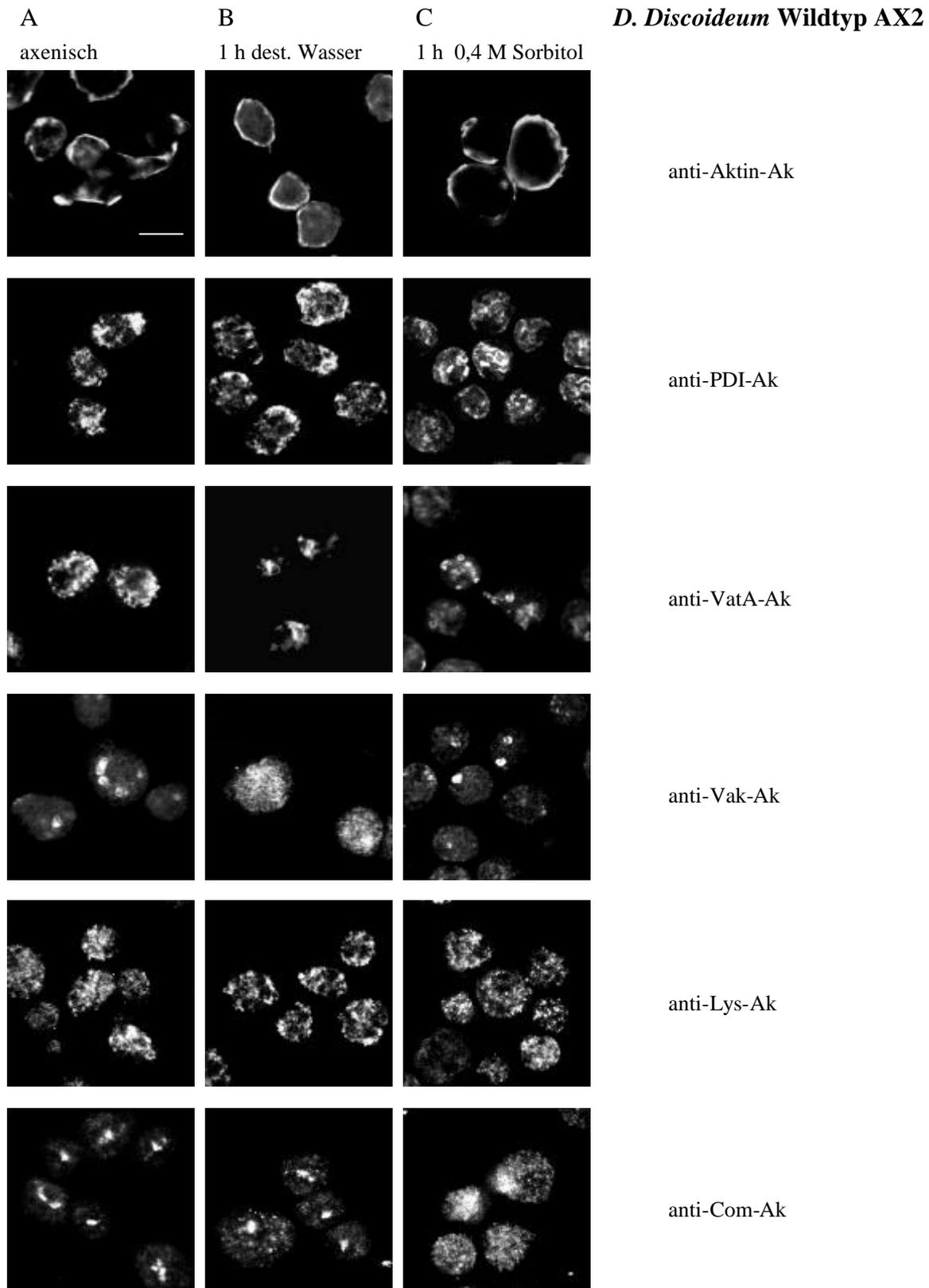
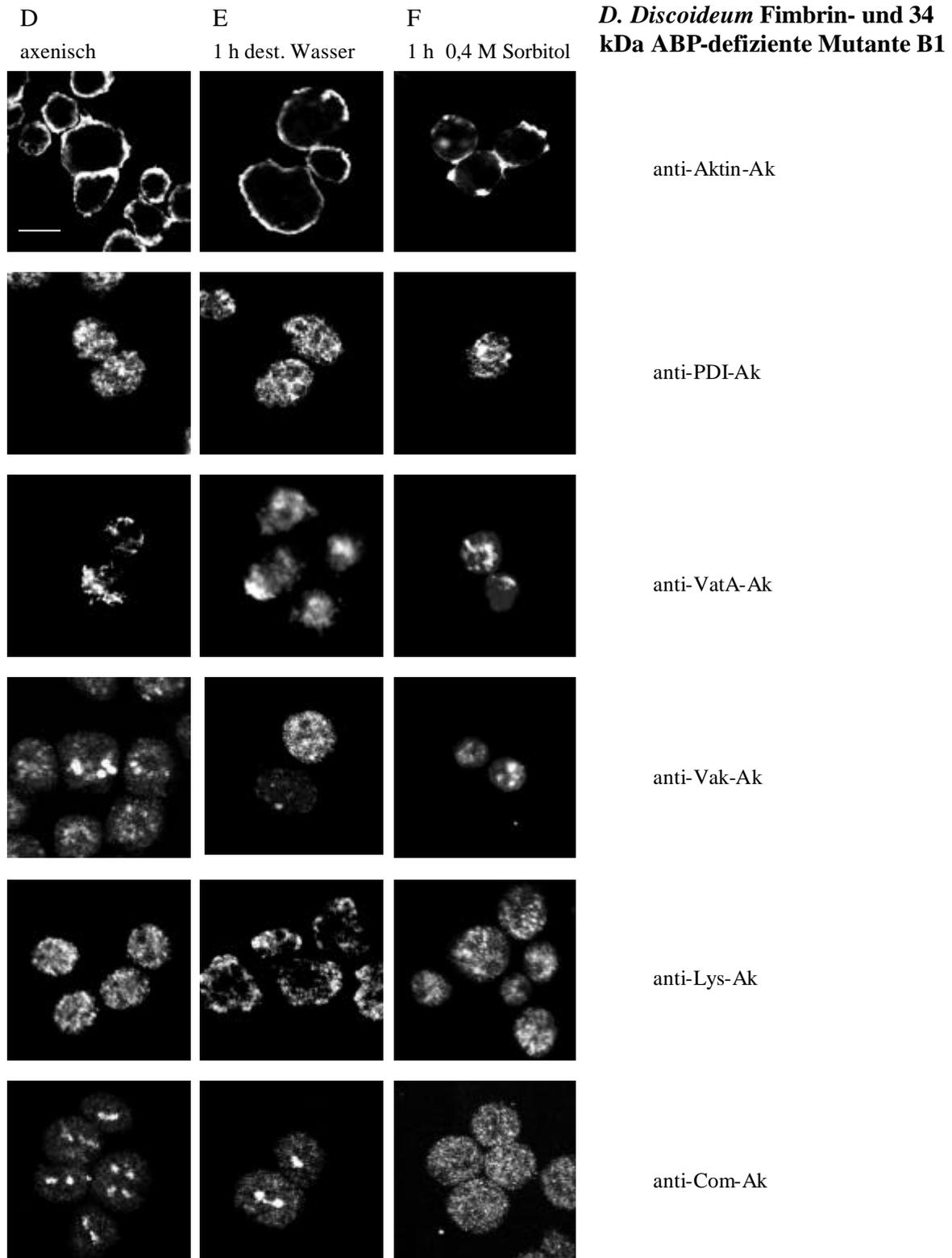


Abb. B 3.13 (diese und nachfolgende Seite): Immunfluoreszenzstudien mit Methanol fixierter Amöben nach osmotischem Schock. A-C: AX2-Zellen A) axenisch gewachsen B) nach hypoosmotischem Schock mit Wasser (1h) und C) nach hyperosmotischem Schock mit 0,4M Sorbitol (1h). D-F: wie A-C mit der Mutante B1. Anti-Aktin-Ak, anti-PDI-Ak, anti-VatA-Ak, anti-Vak-Ak, anti-Lys-Ak und anti-Com-Ak: Verwendete Antikörper wie in Abschnitt E 1.5 beschrieben.



Bei der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) handelt es sich um ein Protein des endoplasmatischen Retikulums (ER). Das ER erscheint netzartig über die Zelle verteilt, unter keiner der gewählten Bedingungen sind Veränderungen im Vergleich zu AX2 erkennbar.

Nach Pinozytose entstehen aus den Endosomen Vesikel mit saurem pH-Wert. Ein für diese Vesikel charakteristisches Protein ist die V/H^+ -ATPase, welches auch an der Membran der kontraktilen Vakuole vorkommt. Dort reguliert das Enzym Wasser- pH- und Calcium-homöostase. Antikörper gegen eine Untereinheit des Enzyms (VatA) zeigen in der Immunfluoreszenz vesikuläre Strukturen, die über die ganze Zelle verteilt sind und sich unter hypoosmotischem Stress an einer Seite der Zelle sammeln. Bei Behandlung mit Sorbitol lokalisieren die Vakuolen hingegen in der Zellmitte.

Lysosomen enthalten spezifische Enzyme gegen deren Kohlenhydrat-Epitope generierte Antikörper (Lys) verwendet wurden. Lysosomen erscheinen immer als sehr zahlreiche kleine Punkte. Wiederum sind keine Unterschiede unter den verschiedenen Bedingungen festzustellen.

Kompartimente mit unverdaulichen Rückständen, die exozytiert werden, enthalten das für sie typische Protein Vakuolin. Der gegen dieses Protein gerichtete Antikörper (Vak) erkennt runde, vesikuläre Strukturen. Hypoosmotischer Stress führt zu einer Auflösung dieser Strukturen.

Ein Marker-Protein für den Golgi-Apparat ist Comitín. Hyperosmotischer Stress führt zu Fragmentierung des Golgi-Apparats, so dass der anti-Comitín-Antikörper (Com) nur noch punktierte über die ganze Zelle verteilte Strukturen erkennt [Schreiner, 2000].

Die Defizienz von Fimbrin und/oder ABP 34 führt unter den verschiedenen osmotischen Bedingungen bei keinem der untersuchten Kompartimente zu einer Veränderung der Lokalisation oder Struktur.

Prinzipiell ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Mutanten und Zellen des Wildtyps festzustellen, (s. Abb. B 3.13, der Übersichtlichkeit halber sind nur AX2 und B1 dargestellt). Die verschiedenen Kompartimente erscheinen in den Mutanten sowohl bei axenischen Zellen wie auch nach osmotischem Stress identisch zu denen des Wildtyps unter den jeweiligen Bedingungen.

4. Suche nach zu Fimbrin homologen Proteinen in *D. discoideum* und Vergleich zu anderen Proteinen der Plastin-Familie

4.1 Suche nach fimbrinähnlichen Proteinen

Da die Ausschaltung von Fimbrin in *D. discoideum* zu keinen deutlichen Änderungen des Phänotyps führt, ist es denkbar, dass es zu Fimbrin ähnliche Proteine gibt, die dessen Funktion übernehmen können. Um solche Proteine zu finden, wurde mit der Protein-Sequenz von *D. discoideum*-Fimbrin mit TBLASTN in der Datenbank des *Dictyostelium*-Genom-Projekts gesucht. So konnten drei vermutlich vollständige und ein unvollständiges zu Fimbrin homologes Gen gefunden werden.

Das von einem 96 Basenpaaren langen Intron unterbrochene Gen **F01706** wurde auf Contig 5295 von Chromosom 6 gefunden und kodiert für ein 1116 Aminosäuren langes Protein. Gen **F02091** ist auf Contig C-JC2d85a06.r1 von Chromosom 2 lokalisiert, es kodiert für 1683 Aminosäuren. Beide Gene sind vollständig. Vermutlich vollständig ist auch die Sequenz von Gen **R09493**. Es ist in Contig C-JC2e33h03.s1 enthalten und ebenfalls auf Chromosom 2 lokalisiert. Die genaue Lage von Start- und Stopcodon ist nicht eindeutig, wie die genaue Lage und Länge eines Introns. Die Sequenz von Gen **R10109** ist unvollständig, das zugehörige Startcodon konnte bislang nicht gefunden werden. Die vorhandene genomische Sequenz wurde aus verschiedenen Klonen zusammengesetzt und befindet sich vermutlich auf Chromosom 1. Die bislang ermittelte Proteinsequenz beläuft sich auf 1248 Aminosäuren (s. Tab B 4.1).

Gen-Nr.	Kodierte Aminosäuren	Chromosom	Introns	Contig
F01706	1116	6	1	5295
F02091	1683	2	-	C-JC2d85a06.r1
R09493	~1943	2	1(?)	C-JC2e33h03.s1
R10109	>1248	1(?)	?	12996, JC1c85h04.s1, Iiafp1d34926, JC1a290b10, Iiafp2d29042, JC1b64b12, JC1a98g12r1

Tab B 4.1: Übersicht Fimbrin-ähnlicher Proteine aus *D. discoideum*.

4.2 Struktur der fimbrinähnlichen Protein

Ob die fimbrinähnlichen Proteine möglicherweise Funktionen von Fimbrin übernehmen können, hängt von deren Struktur ab. Fimbrin besteht prinzipiell aus zwei calciumbindenden Domänen („EF-Hands“) im Bereich des N-Terminus gefolgt von zwei aktinbindenden Domänen, die sich jeweils aus zwei Calponin-Homologie-Domänen (CH₁ + CH₂ und CH₃ + CH₄) zusammensetzen. Die verschiedenen Domänen der neuen Proteine wurden mit verschiedenen Computer-Programmen ermittelt (s. Abschnitt E 1.3). Keines der fimbrinähnlichen Proteine beinhaltet „EF-hands“, jedoch eine (F01706) oder zwei aktinbindende Domänen und Bereiche mit „Coiled coil“-Struktur. Bei letzteren handelt es sich um Zusammenlagerungen von zwei oder vier α -Helices die je nach exakter Struktur eine Vielzahl von Funktionen übernehmen können [Burkhard *et al.*, 2001].

Im Falle von F01706 sind die CH-Domänen am N-Terminus lokalisiert gefolgt von einer langen „Coiled coil“-Domäne. Bei den übrigen fimbrinähnlichen Proteinen ist es umgekehrt, die CH-Domänen befinden sich am C-Terminus des Proteins. F02091 enthält zusätzlich einen etwa 139 Aminosäuren langen zu Talin ähnlichen Bereich am N-Terminus, gefolgt von einer Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) (s. Abb. B 4.1).

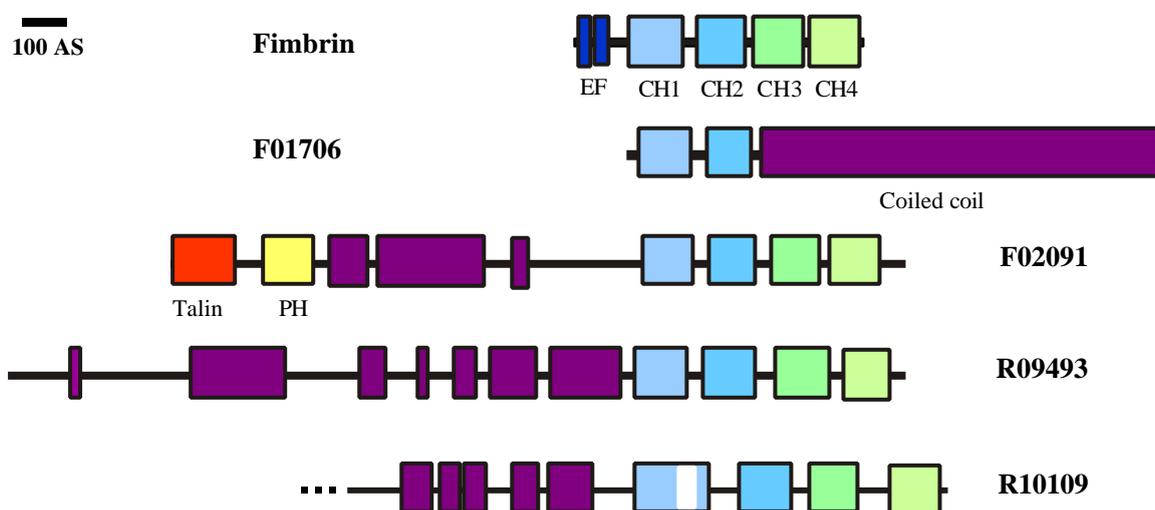


Abb. B 4.1: Übersicht über die Struktur von Fimbrin und fimbrinähnlichen Proteinen aus *D. discoideum*. Die neuen Proteine wurden bei einer Durchsuchung der Datenbank des *Dictyostelium*-Genomprojekts gefunden, die Strukturvorhersage erfolgte mit verschiedenen Software-Programmen. „EF-Hands“ (EF) sind dunkelblau dargestellt, CH-Domänen der ersten aktinbindenden Domäne (CH₁ + CH₂) sind hellblau, die der zweiten (CH₃ + CH₄) hellgrün. „Coiled coil“ Bereiche mit einer Wahrscheinlichkeit über 50 % sind violett dargestellt. Der Talin-ähnliche Bereich und die PH-Domäne in F02091 sind rot bzw. gelb dargestellt. Ein weißer Block in der ersten CH-Domäne von R10109 kennzeichnet einen asparaginreichen Abschnitt, der keine Homologie zu den anderen CH-Domänen aufweist.

4.3 Homologie der fimbrinähnlichen Proteine aus *D. discoideum* zu anderen Fimbrinen und Plastinen

4.3.1 Sequenzvergleich

Um einen Überblick zu erhalten, wie hoch die Homologie der CH-Domänen der fimbrinähnlichen Proteine zu anderen Fimbrinen bzw. Plastinen ist, wurde ein Sequenzvergleich erstellt (s. Abb. B 4.2). Im Falle der Plastine der Vertebraten erstreckt sich die Homologie über die ganze Länge des Proteins. Innerhalb einer Isoform sind die Proteine der verglichenen Organismen *H. sapiens* und *M. musculus* zu 96 % identisch, bei unterschiedlichen Isoformen beträgt die Homologie 70-80 %. Der Vergleich der Proteine der Vertebraten zu denen der übrigen aufgeführten Organismen zeigt eine Homologie von 52 % bei *Drosophila melanogaster*, 46 % bei *D. discoideum*, 40 % bei *Saccharomyces cerevisiae*, 35-40 % bei *Arabidopsis thaliana* und 25-35 % bei den neu ermittelten fimbrinähnlichen Proteinen im Bereich der CH-Domänen. Die Homologie der aktinbindenden Domänen der fimbrinähnlichen Proteine zu anderen Fimbrinen/Plastinen bewegt sich zwischen 23 % und 44 %. Die größte Ähnlichkeit zu *D. discoideum*-Fimbrin zeigt mit 61 % F01706 (s. Tab. B 4.2).

Fimbrin oder Plastin	F01706		F02091		R09493		R10109	
	Identität [%]	Ähnlichkeit [%]						
Fimbrin Dd	44	61	28	47	31	52	25	43
Fimbrin1 At	38	60	28	49	33	54	26	44
I-Plastin Hs	41	58	27	45	31	51	23	40
L-Plastin Hs	38	58	27	45	31	51	23	41
T-Plastin Hs	38	58	27	47	32	52	24	41
Fimbrin Dm	37	59	27	48	33	53	25	42
Fimbrin Sc	35	58	30	48	31	54	26	43

Tab. B 4.2: Homologie der aktinbindenden Domänen der fimbrinähnlichen Proteine zu Fimbrinen/Plastinen. Mit Ausnahme von F01706 wurden jeweils beide aktinbindenden Domänen der fimbrinähnlichen Proteine mit beiden aktinbindenden Domänen der Fimbrine/Plastine verglichen. Im Falle von F01706 wurde jeweils mit der ersten aktinbindenden Domäne verglichen.

L-Plas.	Mm	-----MARGSVSDEEMMELRFAFAKVIIDGNGYISCNELNDLFLKAACLPLPGYKVR-----EITENIMATGDLDDQ--KISFDEYIKVPHGL-----	82
T-Plas.	Mm	----MDEMATTQISKDELDELKFAFAKVLNLSNGFTCDYELHELFEKPEANMPLPGYKVR-----EITIQKIMVDGDRNKD--KISFNEFYVIFQEVK-----	85
I-Plas.	Mm	----MENSTTTISREELLEELQAFNFKIIDNSGYVSDYELQDLFKFEASLPLPGYKVR-----EIVEKILVVDANNKDD--KISFEFVSLMQELK-----	84
L-Plas.	Hs	----MARGSVSDEEMMELRFAFAKVIIDGNGYISFNELNDLFLKAACLPLPGYKVR-----EITENIMATGDLDDQ--KISFDEYIKVPHGL-----	82
T-Plas.	Hs	----MDEMATTQISKDELDELKFAFAKVLNLSNGFTCDYELHELFEKPEANMPLPGYKVR-----EITIQKIMVDGDRNKD--KISFNEFYVIFQEVK-----	85
I-Plas.	Hs	----MENSTTTISREELLEELQAFNFKIIDNSGYVSDYELQDLFKFEASLPLPGYKVR-----EIVEKILVVDANNKDD--KISFEFVSLMQELK-----	84
Fimbrin	Dd	-----MTNFSESEISEFKASFNQFVENGDDQISALDELQKLLTKCGEKVITGVEVR-----DMIKKEVDTDG---N--SIDKEFLQVMQKARQ-----	77
F01706	Dd	-----	1
F02091	Dd	-----	1
R09493	Dd	-----	1
R10109	Dd	-----	1
Fimbrin	Sc	MNIVKLRQKFPFLTQEDLFSTIKFRAIILDDKGVWEKQQALEAVSKDGDATY-----DEARETLKHVGDAS--RVELDDYVGLVAKLRRESKTGAAPQ	94
Fimbrin	Dm	--MATLNKFKTSLIDEKAEIKKFIELDANKDGFIDLHELKDALNQVGFKLAGYQVR-----EMIDEYKQKQLTAFQ--KLNLEEFALCLDLK-----	87
Fim.3	At	----MSSYVGVVSDPWLQSQFTQVELRTLKFKFVSNKQQLGRFTVGDILPVFELKLFKAF-NGTIDEDEIKSVLDKSYNADD--EVDVFEFLRAFLSVQ-----	92
Fim.1	At	----MSGYVGVVSDPWLQSQFTQVELRTLKSKHYVSNKQNGKVTIEDLPLFAKALKSALTFKEDL--KGMGELGSDTST--DVSEFELK-----	86
Fim.2	At	----MSGFVGVVSDPWLQSQFTQVELRSLKSHFTSMKRESGLKTVSDLSARMGKSKVVGQNLNSNERATLIIQNPHNLND--EVDVFEFLRYLNLQ-----	93
Fim.4	At	----MSGFVGVVSDPWLQSQFTQVELRSLNKKFVALKNQSGKVTLEDLSVLYKVKSL-SSSFKEKEIKELGGLSDYESDDDDFESFLKVVNLNR-----	94

CH-Domäne 1

L-Plas.	Mm	-----TTEVAKTFRKAINKKEGICAIIGGTSIQSSVGTQHSYSEEEKYAFVNWINKALENDPDCRH-VIPIMNNTD-DLNAVGDGIVLCKMINLSVPTIDERTIN	182
T-Plas.	Mm	-----SSDIAKTFRKAINKKEGICALGCTSELSSEGTHSSEEEKYAFVNWINKALENDPDCRH-VIPIMNNTD-DLNAVGDGIVLCKMINLSVPTIDERTIN	185
I-Plas.	Mm	-----SKDISKTFRKAINKKEGITAIGGTSISSESEGTHSSEEEKYAFVNWINKALENDPDCRH-VIPIMNNTD-DLNAVGDGIVLCKMINLSVPTIDERTIN	184
L-Plas.	Hs	-----STDVAKTFRKAINKKEGICAIIGGTSIQSSVGTQHSYSEEEKYAFVNWINKALENDPDCRH-VIPIMNNTD-DLNAVGDGIVLCKMINLSVPTIDERTIN	182
T-Plas.	Hs	-----SSDIAKTFRKAINKKEGICALGCTSELSSEGTHSSEEEKYAFVNWINKALENDPDCRH-VIPIMNNTD-DLNAVGDGIVLCKMINLSVPTIDERTIN	185
I-Plas.	Hs	-----SKDISKTFRKAINKKEGITAIGGTSISSESEGTHSSEEEKYAFVNWINKALENDPDCRH-VIPIMNNTD-DLNAVGDGIVLCKMINLSVPTIDERTIN	184
Fimbrin	Dd	-----HSANASPAFASAVKVGAVNTIGCYGSGTASGVQHSYSEEEKYAFVINDINNCNAKLVLDLKS-RLEIPEDGD-KFFAACNDGLLCKLINDAVPTIDERTIN	178
F01706	Dd	-----HTVHDEEKQSLVEHVNFLKKEKLLKS-RIPIDKSD-LINDSIKQDVLCKLINSKIKTINNTTLK	66
F02091	Dd	-----HTQVVSKRSPATKYIQLLNSNCVSAAGLNITATSP---EELPTMSTRVLCGLINKVYRGTIDERTIN	64
R09493	Dd	-----KDYIIEEPEPLINYVN-TIEQLLVDKH-VFEIDS-TK-HLHSPFDGVLCKLVINFAVDGTIDERTIN	64
R10109	Dd	-----EKVIHKCEIINDNGLILKLVYVK---LLGKEIKSGRECTLSLPSDGLFELINKFTESIDSGL-	65
Fimbrin	Sc	TTFNVPAPNSTPIVSTAATGLQHKKGTQAKIIVAGQTGTHTINEEERRETKHINSVLAGQDIDG-LLFPPTDF-QLDECRGLVSKLINDSVPTIDERTIN	202
Fimbrin	Dm	-----SKDVASTFKTVVSKKENLETIGGMSSISEGTHSVRLLEQLAFSDWINSNLGHKDLQH-LLPIDSEKGRVYLSIKDGILLCKLINHCPDIDERTIN	187
Fim.3	At	-----AGVVEKSGGS-KGASSFLKTSITTVHAINSEKASVYSHVNNYLRDPPFLKS-YLIDIAIN-AFDLKDGVLLCKLINAVAGTIDERTIN	184
Fim.1	At	-----NSSSFLKACTTTLHTIYQSEKGFVQHTNRYLGDPPFLKQ-FLPDLHSHN-QLVELKDGVLCKLINAVAGTIDERTIN	167
Fim.2	At	-----AHVNAIIGSGVKNSSAPLKAATHTLLHTISDSKSSYVAHTNNYLSGFEFLNK-CLPINDSSN-DLFEVAKDGLLCKLINAVAGTIDERTIN	186
Fim.4	At	-----DKAADKAGGGLKHSFLKAGTTT-LHTINQSEKGSFVHLNRYLGDPPFLKQ-FLPDLHSHN-DLVELKDGVLCKLINAVAGTIDERTIN	186

CH-Domäne 2

L-Plas.	Mm	KKK---LTPFTIQENLNALNSASAIGCHVVN---TGAEDLKEGKPYLVGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GESLEDLMKLSPEEL	271
T-Plas.	Mm	KKK---LTPFTIQENLNALNSASAIGCHVVN---TGAEDLRAKPHLVGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GETLEELMKLSPEEL	274
I-Plas.	Mm	KKK---LTPFTVSENLALNSASAIGGTVVN---MGAQDLKEGKPHLVGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GETLEELMKLSPEEL	273
L-Plas.	Hs	KKK---LTPFTIQENLNALNSASAIGCHVVN---TGAEDLKEGKPYLVGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GESLEDLMKLSPEEL	271
T-Plas.	Hs	KKK---LTPFTIQENLNALNSASAIGCHVVN---TGAEDLRAKPHLVGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GETLEELMKLSPEEL	274
I-Plas.	Hs	KKK---LTPFTVSENLALNSASAIGGTVVN---TGAEDLKEGKPHLVGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GETLEELMKLSPEEL	273
Fimbrin	Dd	KKK---LNAIRINENQVLCINSAKAIGQVVVN---TGAEDLVEGRAHLMSLWQVIKIGLFDARLNINNHETVRLHE-----GETLEDLKLVEPEI	267
F01706	Dd	LNSD--KLNIEKKNVNEENC-KGAKKIGIQLTM---TGAEDIQGKRHLISILWQVLRIDLMNKVSKLAYRVKAEMLD-----GET-ETLEELVADIEI	156
F02091	Dd	KIQ---QKCKNMLAYNGAKALGATSPDIVFLSDKDTISSTVLEHNTSTSTVETCLQSDAPTKNRH-FHLR-----AATRTSFMKLEKIKI	152
R09493	Dd	IETP---TSNIEDQNLNLVFNLSAKAIGGVIPS---TISPTLTKSDKEMVNLVELVQVITSSNINITYTILVVKET-----HDMKHFVQSTNKL	153
R10109	Dd	---FKVCKSKQDRIDNINVSLSIKVLCFGTISSTTTSISFSSGIMNMYSELISFLEFFIGNLNKVNLSHPPELVYLWKNHPHSISHSKRESWDSFIAEESCH	172
Fimbrin	Sc	WPKKGKEINNQAASENANIVINSAKAIGQVVVN---VHSEDIIEGRELILGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GETLEELMKLSPEEL	295
Fimbrin	Dm	KKK---LTVYREFENTLALVNSQAIGQIVVN---TDAHDLAKGPHLVGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GETLEELMKLSPEEL	276
Fim.3	At	TKK---TLNFWERNENTLGLNSAKAIGGTVVN---TGTODIABGRPYLVGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GETLEELMKLSPEEL	274
Fim.1	At	TKR---VNLFWERNENHTCLNSAKAVGGSVVN---TGTODIABGRPHLVGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GETLEELMKLSPEEL	257
Fim.2	At	TKS---MNLFWERNENHTCLNSAKAIGGTVVN---TGTODIIEGRRHLVGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GETLEELMKLSPEEL	276
Fim.4	At	TKR---VNLFWERNENHTCLNSAKAVGGSVVN---TGTODIABGRPHLVGLLWQVIKIGLFDADIELSRNEALIALRE-----GETLEELMKLSPEEL	276

CH-Domäne 2

L-Plas.	Mm	LLRWANYHLENAGCT-KLTFNFSHTIKDSKAYYHLEQVAPKGDDEEGIPAVVIDMGRKSKDDIQRAHCLMQQAERLGCROFVTAIDVVRGNPK-----LNLAFAN	371
T-Plas.	Mm	LLRWANFHLENSGWQ-KLNPNFSADIKDSKAYFHLLNQIAPKGGQKEGEPRIIDNMGFGNITDLDLKRASMLQQAADKLGCRQFVTAIDVVRGNPK-----LNLAFVA	374
I-Plas.	Mm	LLRWVNYHLENAGCT-KLTFNFSQDIKDSKAYFHLLNQIAPKGRDRDDGPAVAIDL-SGFNRKNDLKRAGFMLOQEAADKLGCRQFVTAIDVVRGNPK-----LNLAFVA	373
L-Plas.	Hs	LLRWANYHLENAGCN-KLGNFSTDIKDSKAYYHLEQVAPKGDDEEGVPAVVIDMGRKSKDDIQRAHCLMQQAERLGCROFVTAIDVVRGNPK-----LNLAFIA	371
T-Plas.	Hs	LLRWANFHLENSGWQ-KLNPNFSADIKDSKAYFHLLNQIAPKGGQKEGEPRIIDNMGFGNITDLDLKRASMLQQAADKLGCRQFVTAIDVVRGNPK-----LNLAFVA	374
I-Plas.	Hs	LLRWVNYHLENAGCT-KLTFNFSQDIKDSKAYFHLLNQIAPKGG-EDGPAIADLGGINITNDLKRAGFMLOQEAADKLGCRQFVTAIDVVRGNPK-----LNLAFVA	372
Fimbrin	Dd	LLRWVNYHLEAAGSQRVKNFSGDIKDSQYTIHROITAPKDGAG-----VETALNINSLNDQRAVVENADKLGCRKGLKROIITVDFQ-----LNLAFVA	361
F01706	Dd	LLRWVNYHLEAAGIDRRISNPSDDIKDCVVYIQLFHLSISIC-----GLLELNEKLELNERAKRFIDTIRLIDKKTIRQOITDNGN-----LNLAFVA	248
F02091	Dd	MLRWVNYHLRKGSSR-SLNNTDLELDCENYAFVLSIHAQHS-----LKSILKLNWFKRAMVLSMAKIGGMSLSSRIETENS-----QNLQFVA	245
R09493	Dd	LLRWVNYHLEALDKTKLSLDQLASSPNLILKLFISLKDLAANG--GTALLQQSSVDQSSNESDEFKWIIEPSKQTFNIFQWNLNLESIQNRNCL-----LNYLHLS	252
R10109	Dd	LLRWVNYHLEALDKQLSLLDLSGFSITFKRAILILKTIKIKVYKILNENNNDNIEEITLNNISNNNNNNNSDNDEEIEKLFKPFIDSKILPNEMIVFKDPLGGDQOKIIL	281
Fimbrin	Sc	LLRWVNYHLEAAGIDRRISNPSDDIKDCVVYIQLFHLSISIC-----SKAPLQTTDLMERAHQVLCNAEKLDCRYLTFESSLVANPK-----LNLAFVA	387
Fimbrin	Dm	LLRWVNYHLEAAGISRRCTINQSDIVDSSEINSLKLIAGN--D--ADVNLDAIRLSLQSRABIEMLOQAALNCRSELTPQVAVNVA-----LNLAFVA	370
Fim.3	At	LLKWMNPHLKKAGYKQVTFNPSDDLKDGAYAYLLNALAPEHS-----THVALETKQDTERAKKVEQAEKLDGRYLSRQIWDGSSAN-----LNLAFVA	366
Fim.1	At	LLKWMNPHLKKAGYKQVTFNPSDDLKDAQAYAYLLNVLAPEHC-----DPATLDAKDPFLERALELVLSHARMNCKRYLTAEEIEGSSAT-----LNLAFVA	349
Fim.2	At	LLKWMNPHLKKAGYKQVTFNPSDDLKDAQAYAYLLNVLAPEHC-----NPVHLAVKSSFERAKLVLEHDKMGKRYLTAEEIEGSSAN-----LNLAFVA	368
Fim.4	At	LLKWMNPHLKKAGYKQVTFNPSDDLKDAQAYAYLLNVLAPEHC-----DPATLNAEDELERANMVLEHARMNCKRYLTAEEIEGSSY-----LNLAFVA	368

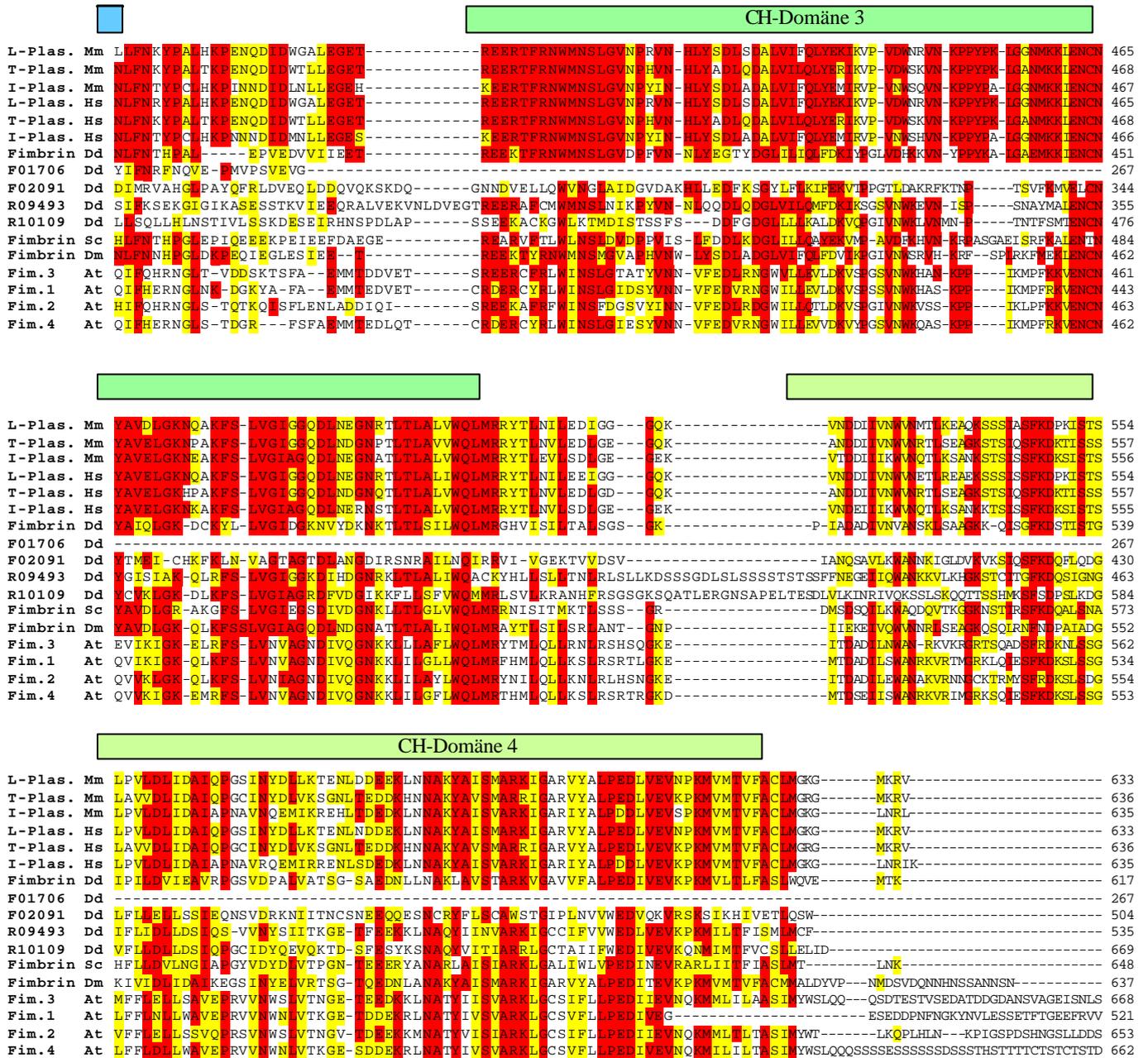


Abb. B 4.2 (diese und vorhergehende Seite): Sequenzvergleich verschiedener Plastine/Fimbrine und fimbrinähnlicher Proteine. Verglichen wurden I T- und LPlastin von Maus (Mm) und Mensch (Hs), Fimbrin und die CH-Domänen Fimbrin-ähnlicher Proteine aus *D. discoideum* (Dd) sowie Fimbrine aus *D. melanogaster* (Dm), *S. cerevisiae* (Sc) und *A. thaliana* (At). Identische Aminosäuren sind rot gekennzeichnet, ähnliche gelb. Gekennzeichnete Calponin-Homologie-Domänen (CH) sind je nach Zugehörigkeit zu einer aktinbinde-Domäne blau oder grün unterlegt. Zum Erhalt der Übersichtlichkeit wurden einzelne Proteinabschnitte, die keinerlei Homologie zu einem der anderen Proteine aufweisen, nicht in den Vergleich einbezogen: asparaginreicher Abschnitt in CH-Domäne 1 von R10109 (37 Aminosäuren), wie auch 36 Aminosäuren zwischen CH-Domäne 3 und 4 und C-Terminus desselben Proteins (35 Aminosäuren) Ähnliches gilt für die C-Termini der *A. thaliana*-Fimbrine: Fimbrin 1, 25 Aminosäuren; Fimbrin 2, 17 Aminosäuren; Fimbrin 3, 45 Aminosäuren und Fimbrin 4, 68 Aminosäuren.

4.3.2 Phylogenetischer Stammbaum

Die große Ähnlichkeit vieler Fimbrine/Plastine lässt auf eine hohe Konservierung im Laufe der Evolution schließen. Ein phylogenetischer Stammbaum, welcher die aktinbindenden Domänen umfasst, soll Auskunft über die Divergenz auch in Hinblick auf die neuen fimbrinähnlichen Proteine geben (s. Abschnitt E 1.3).

Es zeigt sich, dass die Proteine aus Tier-, Pflanzen- und Pilzreich jeweils gemeinsame klar abgegrenzte Wurzeln haben. Bei den Tieren weist der Wurm *Schistosoma mansoni* die höchste Divergenz auf, die Plastin-Isoformen der Säugetiere liegen alle sehr dicht beieinander. Bei Pflanzen und Pilzen sind die Proteine gleichmäßig weit von einander entfernt, bei den Pilzen ist die Divergenz jedoch etwas höher als bei den Pflanzen. Fimbrin des Ciliaten *Tetrahymena thermophila* und von *D. discoideum* bilden eigene Zweige außerhalb der drei Reiche. Die neuen fimbrinähnlichen Proteine weisen die höchste Divergenz im Vergleich zu allen anderen dargestellten Proteinen auf, wobei zu berücksichtigen ist, dass Dd F01706 nur eine aktinbindende Domäne aufweist im Gegensatz zu aktinbindende Domänen bei allen übrigen Proteinen (s. Abb. B 4.3).

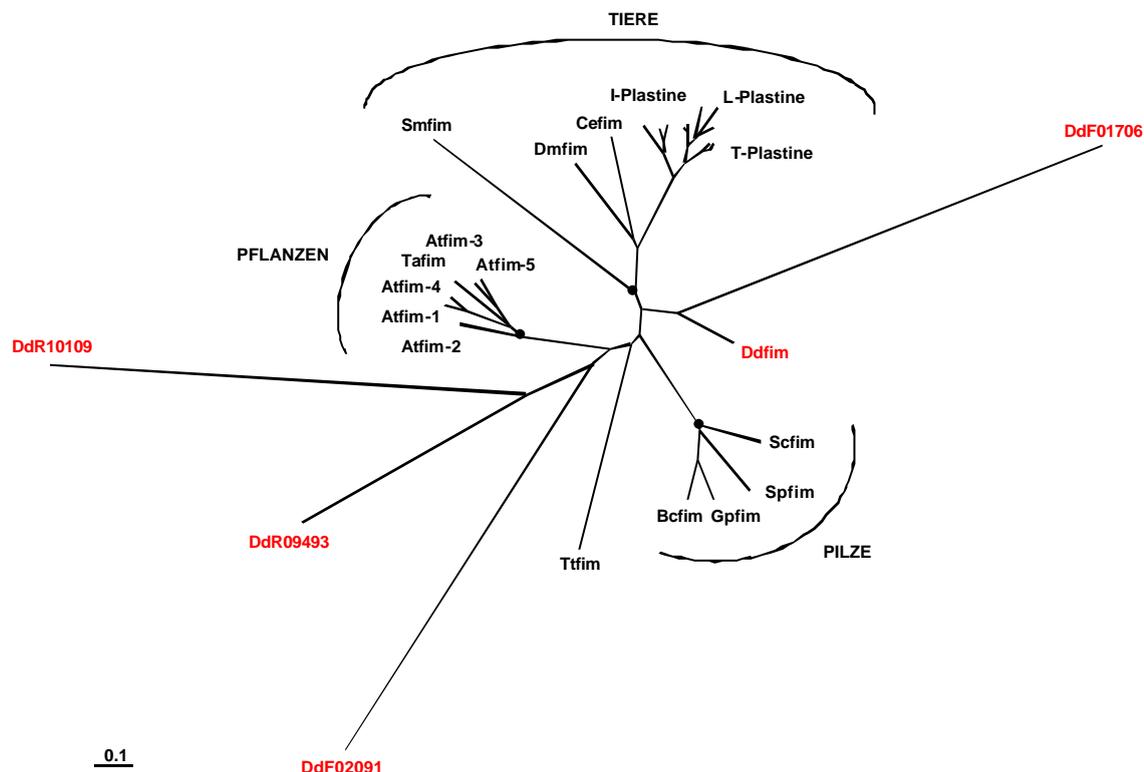


Abb. B 4.3: Phylogenetischer Stammbaum der aktinbindenden Domänen von Plastinen/Fimbrinen und Fimbrin-ähnlichen Proteinen. Verwendet wurden neben den fünf Sequenzen aus *D. discoideum* (Dd, rot) auch fünf aus *A. thaliana* (At). Jeweils 3 Proteine aus *M. musculus*, *H. Sapiens* und *G. gallus* und je eines aus *R. norvegicus*, *C. griseus*, *D. rerio*, *X. laevis* und *I. punctatus* sind aus Gründen der Übersichtlichkeit als I- T- und L-Plastine aufgeführt. Des Weiteren wurde eine Sequenz aus *T. aestivum* (Ta), *S. cerevisiae* (Sc), *S. pombe* (Sp), *B. cinerea* (Bc), *G. pulicaris* (Gp), *D. melanogaster* (Dm), *C. elegans* (Ce), *S. mansoni* (Sm) und *T. thermophila* (Tt) eingesetzt. Die innersten Verzweigungspunkte der Äste von Tier- Pflanzen- und Pilzreich sind mit einem schwarzen Punkt gekennzeichnet, hier kommen >50 % „Bootstraps“ zum Tragen. Maßstab: 0,1% Divergenz.

Um die Unterschiede der einzelnen aktinbindenden Domänen auch innerhalb eines Proteins beurteilen zu können und Vergleiche zu anderen Proteinen der α -Aktinin-Familie, welche nur eine aktinbindende Domäne besitzen zu ermöglichen, wurden in einem separaten Stammbaum die aktinbindenden Domänen verschiedenster Proteine berücksichtigt (s. Abb. B 4.4). Die erste und zweite aktinbindende Domäne der Plastine/Fimbrine bilden separate Zweige getrennt von weiteren aktinbindenden Proteinen der α -Aktinin-Familie. Die Zugehörigkeit der aktinbindenden Domänen der fimbrinähnlichen Proteine zu den jeweiligen aktinbindenden Domänen der Fimbrine/Plastine ist eindeutig. Sie weisen allerdings die größte Divergenz innerhalb der Gruppe auf. Eine Ausnahme stellt dabei das zweite Tandem der CH-Domänen von R09493 dar. Hier ist die Divergenz vergleichbar mit der von Fimbrin aus *S. cerevisiae*, *A. thaliana* und auch *D. discoideum*. F01706 besitzt nur eine aktinbindende Domäne, welche der ersten aktinbindenden Domäne der Fimbrine/Plastine mit 58-61 % am ähnlichsten ist.

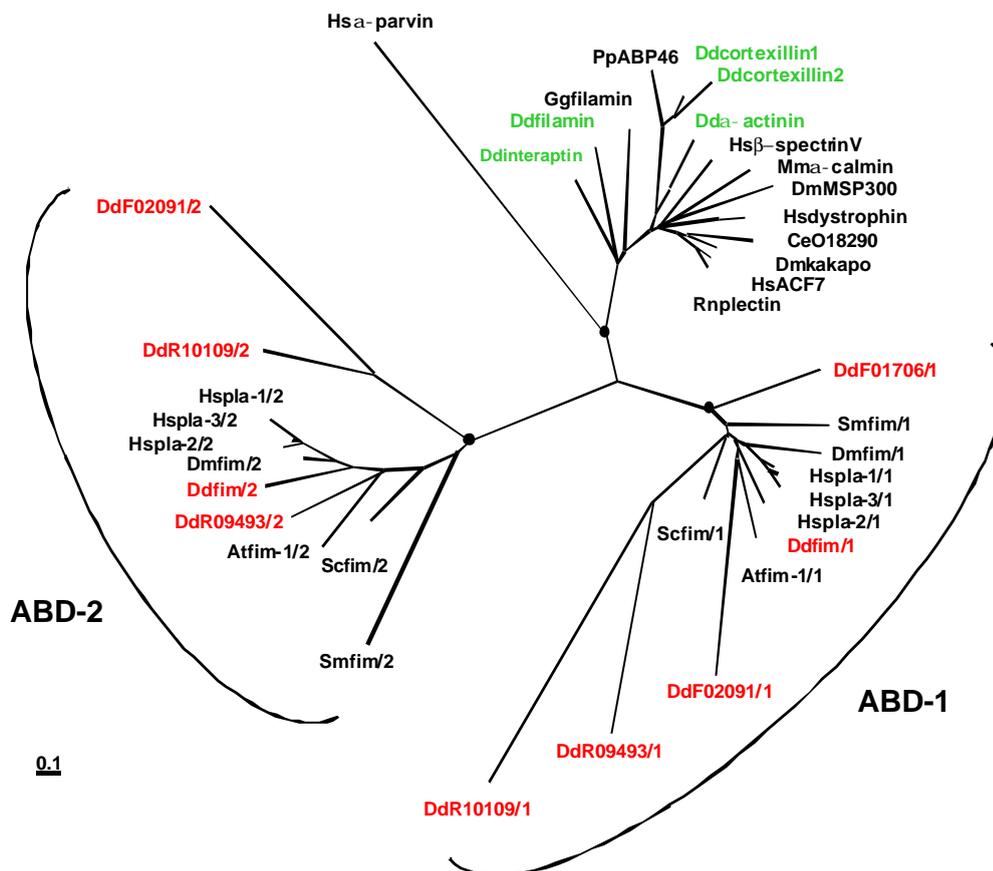


Abb. B 4.4: Phylogenetischer Stammbaum von aktinbindenden Domänen (ABD) verschiedener Proteine der α -Aktinin-Familie. Die erste und zweite ABD von Plastinen/Fimbrinen erscheinen jeweils in eigenen Zweigen gegenüber einem dritten Zweig mit ABDs anderer Proteine der α -Aktinin-Familie. Die innersten Verzweigungspunkte der drei Hauptäste sind mit einem schwarzen Punkt gekennzeichnet, hier kommen >50 % „Bootstraps“ zum Tragen. Es wurden aus Plastinen/Fimbrinen und fimbrinähnlichen Proteinen sechs aktinbindende Domänen von *H. sapiens* (Hs), neun von *D. discoideum* (Dd, rot) und je zwei von *S. cerevisiae* (Sc), *S. mansoni* (Sm) und *D. melanogaster* (Dm) eingesetzt. Des Weiteren wurden aktinbindende Domänen aus allen bekannten Proteinen der α -Aktinin-Familie von *D. discoideum* (grün), vier aus *H. sapiens*, zwei aus *D. melanogaster*, und je eines aus *M. musculus* (Mm), *R. norvegicus* (Rn), *G. gallus* (Gg) und *P. pallidum* (Pp) verwendet. Maßstab: 0,1% Divergenz.

4.4 Analyse des fimbrinähnlichen Proteins F02091

Das Protein F02091 unterscheidet sich von den übrigen fimbrinähnlichen Proteinen aus *D. discoideum* durch das Vorhandensein eines talinähnlichen Bereichs und einer PH-Domäne (s. Abb. B 4.1). Beide befinden sich am N-Terminus des Proteins: Der talinähnliche Bereich umfasst die ersten 139 Aminosäuren und die PH-Domäne die Aminosäuren 192-298. Es schließt sich drei kurz aufeinander folgende „Coiled coil“-Bereiche an, welche die Aminosäuren 325-737 ausfüllen. Die Wahrscheinlichkeit, dass „Coiled coil“-Strukturen vorliegen, liegt bei 80 bis 100%. Am C-Terminus sind die beiden zu Fimbrin homologen aktinbindenden Domänen lokalisiert.

4.4.1 Der zu Talin ähnliche Sequenzbereich

Bei Talin handelt es sich um ein aktinbindendes Protein, welches an der Verknüpfung des Aktin-Zytoskeletts mit Orten der Zell-Substrat-Adhäsion beteiligt ist [Niewöhner *et al.*, 1997]. Eine Funktion ist für die Talin-Proteine in dem talinähnlichen Bereich von F02091 nicht bekannt. Unmittelbar im Anschluss folgt jedoch eine ERM-Domäne, die für die Bindung von Talin an die Plasmamembran sorgt.

Es wurde ein Sequenzvergleich des talinähnlichen Bereichs von F02091 mit den entsprechenden Sequenzabschnitten von Talin A und B aus *D. discoideum*, *M. musculus* und *D. melanogaster* erstellt (s. Abschnitt E 1.3). 28 % des verglichenen Bereichs von F02091 sind identisch zu den anderen Proteinen, 58 % sind ähnlich. Eingeschlossen ist dabei eine Insertion von 16 Aminosäuren, welche in Talin-Proteinen nicht auftritt (s. Abb. B 4.5 A).

4.4.2 Die Pleckstrin-Homologie-Domäne

Pleckstrin-Homologie-Domänen tauchen in einer Vielzahl von Proteinen auf, welche mitunter eine Rolle in der Signaltransduktion oder Organisation des Zytoskeletts spielen. Hierzu gehören beispielsweise das GTPase aktivierende RasGAP oder das aktinquervernetzende Spektrin. PH-Domänen sorgen für die Bindung des Proteins an Phospholipide der Plasmamembran. Sie umfassen zumeist 100 Aminosäuren, wobei die Sequenz nicht sehr hoch konserviert ist, allerdings tritt eine charakteristische Faltung des Proteins auf [Lemmon *et al.*, 1996].

Die Sequenz der PH-Domäne von F02091 wurde sowohl mit den entsprechenden Domänen von β -Spektrin und Vav (zur Rho-Familie gehörender Guanin-Nucleotid-Austausch-Faktor)

aus *H. sapiens* verglichen als auch mit RasGAP aus *D. melanogaster* und Phospholipase G_7 aus *B. taurus*. Es sind nur 13% der F02091-PH-Domäne mit den Vergleichsproteinen identisch, die Ähnlichkeit beträgt 40% (s. Abb. B 4.5).

A Talin-ähnliche Domäne

F02091	Dd	MSDDK IHLKVRLLV DKKV FKKFS FYPKKT VKEARLF IAAELEVD --- FDQYGLFLPPKDD	56
Talin A	Dd	---MSISLKNIVGANTVKT LRFAPDMCIQECCTH IFEKTNE ---GGP-DHGLYQAHIEG	53
Talin B	Dd	---MSLT LKIQIVRDKQVKAMKFSPTQTVAEVCAQVREKINETS-G--DDHGLFQPGIDA	54
Talin	Mm	---MVALSLK ILSIGNVVKTMQFEPSTMVYDACRMIRERIRIPEALAGPPNDFGLFLSDDDP	56
Talin	Dm	--MSTLSLR IQLLEGGRVTKTIQFQPNITVFDACKV I RDKFAEAVQGPSEYGLFISDEQN	58
F02091	Dd	QN-GVWFRD DYPLDFYGL EGENEKEALLFTSKDS AQMEFV EFKRYRPIKV GKGLNQFRI	115
Talin A	Dd	KQSARWLAMEKTLQFYDINS DQO-----LDYKKKHRPQKFKLLDGTIKT	97
Talin B	Dd	KRPSRWLKM DKT LQFYDLKINDE-----LDYKKKHRPLKVRLMDET VKT	98
Talin	Mm	KK-GIWLEAGKALDY YMLRNGLT-----MEYRKKQRPLKIRMLDGT VKT	99
Talin	Dm	QQ-GVWLEPGR TLGYIILHNQDT-----LEYRRKTRTLRVRMLDGA VKT	101
F02091	Dd	LMVDDT MNVSDIVKYVSTQVPISS	139
Talin A	Dd	QLVDESQNVSEIVNS ICKKMG IKN	121
Talin B	Dd	MLVDDSLTAGE ILEIIGKRIG IKN	122
Talin	Mm	IMVDDSKT VTDMLM TICARIGITN	123
Talin	Dm	ILVDDSQPVS QLMVVIC T KIGITN	125

B PH-Domäne

F02091	Dd	YFEGFIMRKRGGG---LIKGLKNWKRWYS I RKNKLLYFKSKS-----D	232
bSpektrin	Hs	QMEGFLNRKHEWEAHNKKASSR SWHNVCV INNQEMGFYKDAKTAASGIP	2249
RasGAP	Dm	EGECLMTKYPTSR---KRFGRQFKQRHFRITTHSLSYAKSKG-----	803
Vav	Hs	KIDGELKITSV-----ERRSKMDRYAFLLDKALLICKRRGD-----S	441
PLCg	Bt	VMTLEYYSKKS-----QRPERKTFQVK IETRQITWSRGA-----	67
F02091	Dd	STEMGC ILMKTVQTVRPCTEVA IIP-----SKYSKMCFEIIVTPAR--	272
bSpektrin	Hs	YHSEVPVSLKEAV-CEVALDYK-----KKKKEVFKLRLNDG--	2283
RasGAP	Dm	KQPICDIPLQEI IASVEQLKDKSF-----KMQNCFKIVHNR--	839
Vav	Hs	YDLKDFVNLHSF--QVRDSSG I RD-----NKKWSHMELLI EDQGA-	480
PLCg	Bt	DKIEGAD I DRIEIK EIRPGKTSR I FDRYQEDPAFRPDQSHCEVILLYGMEFR	107
F02091	Dd	--TFVMLANNVSDMKK WVEI IESSRRMF	298
bSpektrin	Hs	-NEYLFQAKDDEEMNTW IQAISSAISSD	2310
RasGAP	Dm	--SLIVGTTNCVBEREFDL I HKICLMN	865
Vav	Hs	-QGYELFFKTRELK KKWMEQFEMAI SNI	507
PLCg	Bt	LKTLSSLQATSEDEVNM I RGLTWLMEDT	145

Abb. B 4.5: Sequenzvergleich des talinähnlichen Bereichs und der PH-Domäne aus F02091. **A)** Der talinähnliche Bereich wurde mit den entsprechenden Proteinabschnitten aus *D. discoideum* (Dd) Talin A und B sowie Talin aus *M. musculus* (Mm) und *D. melanogaster* (Dm) verglichen. **B)** Die PH-Domäne wurde mit jenen von β -Spektrin und Vav aus *H. sapiens* (Hs), RasGAP aus *D. melanogaster* (Dm) und PLC $_7$ aus *B. taurus* (Bt) verglichen. Identische Aminosäuren sind rot unterlegt, ähnliche gelb. Die Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm BioEdit erstellt (s. Abschnitt E 1.3)

C Diskussion

Um die Funktion eines Proteins in Organismen zu untersuchen, werden häufig deren Gene durch „Gene-Targeting“ mutiert oder ausgeschaltet. Die dadurch eventuell auftretenden Defekte können Rückschlüsse auf die biologische Bedeutung des Proteins ermöglichen. Diese Methode wird bei verschiedensten Organismen wie *S. cerevisiae*, *D. discoideum*, der Pflanze *A. thaliana* oder der Maus angewendet. Insbesondere „Knockout“-Mäuse haben sich in den letzten Jahren als probates Mittel erwiesen, um die Beteiligung von Proteinen an verschiedensten Vorgängen des Organismus zeigen zu können [Eckhart und Koch, 2001]. *D. discoideum* wird häufig genutzt, um das Aktin-Zytoskelett an Mutanten zu untersuchen. Mutationen können bei diesem Organismus einfach durch verschiedene gentechnische Ansätze wie die Geninaktivierung durch homologe Rekombination oder „Gene Replacement“ erhalten werden [Noegel und Schleicher, 2000].

1. Generierung einer L-Plastin defizienten ES-Zelllinie

Das zur α -Aktinin-Familie gehörende aktinbindenden Protein L-Plastin wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen und nichthämatopoetischen Tumorgewebe exprimiert. Bislang wurde seine Funktion nur in verschiedenen primären Zelllinien, Kulturzellen oder Tumorgewebe untersucht [Park *et al.*, 1994; Arpin *et al.*, 1995; Zu *et al.*, 1990]. Die Bedeutung für den Gesamtorganismus ist jedoch nicht bekannt, daher wäre eine „Knockout“-Maus von Interesse. Um die Voraussetzung dafür zu schaffen, sollen im Rahmen dieser Arbeit embryonale Stammzellen mit der entsprechenden Mutation generiert werden. Ein „Knockout-Targeting“-Vektor wurde erstellt, durch welchen Exon 2 und Teile des nachfolgenden Introns des L-Plastin-Gens durch das Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Neo-Gen) ersetzt werden. Das Neo-Gen wird flankiert von 3,5, bzw. 3 kb genomischer Sequenz aus Intron 1 und Intron 2 bis 4. Da in Exon 2 das Startcodon für die Translation kodiert ist und dieses durch die homologe Rekombination mit dem „Knockout-Targeting“-Konstrukt entfernt wäre, sollte die Expression des Gens vollständig unterbunden werden [Hasty *et al.*, 1992].

Der Nachweis des homologen Rekombinationsereignisses hat sich dabei als problematisch erwiesen. Das Neo-Gen enthält eine EcoRV-Restriktionsschnittstelle. Bei einer homologen Rekombination sollte es daher zu einer Verkleinerung eines EcoRV-Restriktionsfragments

kommen, welches Intron 1 bis Intron 7 überspannt. Dieses Fragment wird von ursprünglich 9,8 kb durch die Einführung des Neo-Gens um 1,2 kb auf 8,6 kb verkleinert. Diese Größenverschiebung sollte gut mit Southern-Blot-Analyse nachweisbar sein. Die Verwendung von cDNA als Sonde hat sich dabei allerdings als kritisch erwiesen, da die Homologie zu den beiden anderen Isoformen des Plastins so hoch ist, dass es zu Kreuzreaktionen kommen kann, die zusätzliche Signale in der Southern-Blot-Analyse liefern. Eine Unterscheidung der relevanten Banden wird dadurch erschwert. Es wurde nach alternativen Restriktionsschnittstellen gesucht, um den Restriktionslängenpolymorphismus nachzuweisen. Eine alternative Möglichkeit wäre danach ein Verdau mit BamHI. Eine BamHI Schnittstelle in Exon 2 würde bei homologer Rekombination verloren gehen und das ursprünglich 5 kb großes DNA Fragment wäre danach etwa doppelt so groß. Dieses Enzym ist jedoch bei der Verwendung an genomischer Maus-DNA problematisch, es kommt vermutlich wegen Verunreinigungen der DNA zu nicht reproduzierbarem Partialverdau [persönliche Mitteilung, N. Smyth]. In Zukunft könnten noch weitere Sequenzen als Sonde getestet werden, welche den Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus bei Verdau mit EcoRV nachweisen.

2 Zellbiologische Untersuchungen der Fimbrin-Mutanten aus *D. discoideum*

Fimbrin aus *D. discoideum* wurde wie L-Plastin als calciumreguliertes aktinbindendes Protein der α -Aktinin-Familie beschrieben, welches mit Aktin im Bereich der Zellmembran und zu geringerem Anteil zytosolisch lokalisiert [Prassler *et al.*, 1997]. Um genauere Information über die biologische Funktion von Fimbrin und seiner Domänen zu erhalten, wurden verschiedene Mutanten untersucht. In drei Mutanten ist Fimbrin entweder ausgeschaltet (FG2), der N-Terminus mit den calciumbindenden Domänen des Proteins wird nicht mehr exprimiert (Δ EF) oder zwei potentielle Phosphorylierungsstellen sind punktmutiert (S? A). In zwei weiteren Mutanten ist neben einer vollständigen (B1) oder partiellen Deletion von Fimbrin (B3) zusätzlich das 34 kDa aktinbindende Protein (ABP 34) ausgeschaltet.

Bisher wurden nur in *S. cerevisiae* und *S. pombe* Deletionsmutanten des Fimbrins generiert. In *S. cerevisiae* zeigte sich, dass der Mangel von Fimbrin zu einer deutlichen Abnahme an Aktin-Bündeln führt und die Endozytose beeinträchtigt wird [Adams *et al.*, 1991; Kübler und Riezman, 1993]. In *S. pombe* bleibt die alleinige Deletion von Fimbrin ohne Veränderungen

des Phänotyps. Die Doppeldeletion zusammen mit einem α -aktininähnlichen Protein führt zu einem Zytokinese-Defekt, der die Zellteilung verhindert [Wu *et al.*, 2001]. Schwerpunkte bei den zellbiologischen Untersuchungen wurden daher auch aufgrund der bekannten Lokalisation von Fimbrin auf aktinassozierte Prozesse wie Wachstum, Endozytose und Phagozytose konzentriert.

2.1 Die Mutanten DEF und S[?]A

In hämatopoietischen Zellen konnte gezeigt werden, dass L-Plastin als Antwort auf rezeptorvermittelte Phagozytose an zwei N-terminalen Serin-Resten phosphoryliert wird [Jones und Brown, 1996]. Zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung von Zellhomogenat aus *D. discoideum* lässt auch die Phosphorylierung von Fimbrin vermuten. [Prassler *et al.*, 1997]. Da Leukozyten und Amöben bezüglich ihrer Motilität, Chemotaxis und Phagozytose große Ähnlichkeiten aufweisen [Parent und Devreotes, 1999; Van Es und Devreotes, 1999], ist es denkbar, dass sich die Proteine der verschiedenen Organismen auch in diesem Falle ähnlich verhalten.

Die Mutante S[?]A weist eine um 40 % geringere Phagozytoserate als AX2 auf. Es ist also denkbar, dass Fimbrin tatsächlich an einer dieser Positionen oder an beiden phosphoryliert wird und die Phosphorylierung in Zusammenhang mit der Phagozytose steht. Man kann sich vorstellen, dass die Bindung eines Nahrungspartikels an einen Rezeptor die Phosphorylierung von Fimbrin hervorruft, welche dann möglicherweise die Bindung an Aktinfilamente schwächt oder anderweitig verändert, so dass die für die Phagozytose notwendige Umorganisation der Aktinfilamente von statten gehen kann. Die fimbrindefiziente Mutante FG2 weist eine mit dem Wildtyp identische Phagozytoserate auf. Dies steht in Einklang mit dem zuvor entworfenen Model: es ist denkbar, dass andere Proteine teilweise die Funktion von Fimbrin übernehmen können, so dass keine Beeinträchtigung für die Zelle beim Ausfall des Proteins entsteht. Solche Fälle partieller Redundanz wurden für *D. discoideum* schon früher in der Literatur diskutiert [Rivero *et al.*, 1999]. Bei einer Deletion des N-Terminus von Fimbrin, welche sowohl die potentiellen Phosphorylierungsstellen und auch die calciumbindenden Domänen umfasst, könnte man den gleichen Effekt erwarten wie bei der Mutante S[?]A. Die Mutante Δ EF zeigt jedoch normales Phagozytoseverhalten. Möglicherweise beeinflussen sich Phosphorylierung und die Bindung von Calcium gegenseitig. Eine Entfernung beider regulatorischer Einheiten könnte zu einem weitgehenden Funktionsverlust des Proteins führen. Immunfluoreszenzen zeigen, dass das mutierte Protein wie Fimbrin mit

Aktin kolokalisiert, vielleicht ist dies aber nur auf eine Bindung an Aktin aber nicht mehr auf dessen Bündelung zurückzuführen.

Um den Sachverhalt erschöpfend zu klären, sind weitere Experimente erforderlich. Vorrangig ist zu klären, ob Fimbrin tatsächlich phosphoryliert wird. Versuche, dies mit 2D-Gelelektrophorese zu klären, waren erfolglos. Eine weitere Möglichkeit ist es, das Protein mit einer geeigneten Kinase (entsprechend L-Plastin vermutlich PKC [Lin *et al.*, 1998]) und mit oder ohne radioaktivem Phosphor (ATP) zu inkubieren. Eine ausreichende Menge gereinigten Fimbrins ist dafür erforderlich. Es wurde daher versucht, rekombinantes Protein in *E. coli* herzustellen. Alle Expressionsversuche waren allerdings bislang erfolglos. Alternativ könnte das Protein aus den Amöben aufgereinigt werden. Des Weiteren sollte der Einfluss von Calcium genauer untersucht werden. Dies ist bislang für *D. discoideum* nur in vitro erfolgt [Prassler *et al.*, 1997], nicht aber in vivo. Die Verwendung der Mutante S? A könnte dabei unter Umständen Hinweise geben, ob sich Calciumbindung und Phosphorylierung beeinflussen.

2.2 Die Mutanten B1 und B3 und FG2

Fimbrindefiziente Zellen (FG2) zeigen bezüglich Zellgröße, Wachstum, Phago-, Endo- und Exozytose wie auch bei der Reaktion auf osmotischen Stress keinerlei Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. Dies könnte auf partielle Redundanz zurückzuführen sein, wie sie auch für ABP 34 beschrieben wurde. Der Phänotyp von Amöben, in denen dieses Protein ausgeschaltet ist, unterscheidet sich kaum vom Wildtyp. Die Zellen sind geringfügig kleiner, zeigen eine veränderte Morphologie der Filopodien und eine verstärkte Motilität bei der Chemotaxis. Wachstum, Zelldifferenzierung und Endozytose zeigen keine Unterschiede zum Wildtyp. Bislang ist nicht klar, ob und wenn welche Proteine Funktionen des ABP 34 übernehmen können oder mit diesem Protein zusammenwirken [Rivero *et al.*, 1996; Rivero *et al.*, 1999]. ABP 34 ist wie Fimbrin calciumreguliert und bündelt ebenfalls Aktin, daher könnte es auch ähnliche Funktionen wie Fimbrin übernehmen. Um ein Zusammenwirken beider Proteine zu überprüfen, wurde im Hintergrund einer ABP 34-defizienten Mutante Fimbrin vollständig ausgeschaltet (B1) oder ab der zweiten aktinbindenden Domäne deletiert (B3).

Bei Wachstum in axenischem Medium weisen die Mutanten gegenüber den normal wachsenden 34⁻- und FG2-Zellen Unterschiede auf. Sie erreichen geringere Zelldichten und haben erhöhte Verdopplungszeiten. Hier scheint es der Fall zu sein, dass sich beide Proteine bezüglich der Aufnahme flüssiger Nahrung in ihrer Funktion überschneiden oder zumindest

ergänzen. Möglicherweise ist die für die endozytotische Nahrungsaufnahme erforderliche Reorganisation des Zytoskeletts beeinträchtigt.

Quantitative Untersuchungen der Phagozytose mit fluoreszenzmarkierten Hefen wurden bislang nicht an 34⁻-Zellen durchgeführt. Es zeigt sich, dass die Phagozytoserate dieser Zellen gegenüber AX2 um etwa 80 % erhöht ist. Ähnliches gilt für die Mutanten B1 und B3. Offenbar hat das 34 kDa aktinbindende Protein Einfluss auf die Phagozytose. Vielleicht ermöglicht das Fehlen dieses Proteins eine schnellere Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts an den Phagozytose-„Cups“ und führt so zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme.

In *D. discoideum* stehen diverse Rezeptoren für die phagozytotische Aufnahme von Feststoffen zur Verfügung [Vogel *et al.*, 1980; Cornillon *et al.*, 2000; Cardelli, 2001]. Unterschiedliche Oberflächeneigenschaften der potentiellen Nahrung könnten verschiedene Rezeptoren ansprechen und daher Auswirkungen auf die Phagozytoserate haben. Dies zeigt sich auch bei den unterschiedlichen Verdopplungszeiten aller getesteten Zelllinien, welche sich bei der Verwendung von *E. coli* B/r oder abgetöteten *K. aerogenes* als Nahrung ergeben. *E. coli* B/r weist kürzere Kohlenhydrat-Ketten auf seiner Oberfläche auf als viele andere Stämme [Malchow *et al.*, 1967], folglich sind die adhäsiven Eigenschaften und die Erkennung durch Rezeptoren verschieden. So kann auch erklärt werden, warum Hefen von den Mutanten mit ABP 34-Deletion mit einer deutlich höheren Rate phagozytiert werden als von AX2, sich das Wachstum dieser Mutanten in Bakteriensuspension aber nicht von AX2 unterscheidet. Das ABP 34 könnte von bestimmten Rezeptoren abhängig sein, so dass das Fehlen dieses Proteins auch nur in Zusammenhang mit diesen Rezeptoren einen Phänotyp zeigt, bzw. die Proteine, welche die Defizienz ausgleichen, hängen von eben diesen Rezeptoren ab.

Es wurde in *D. discoideum* für einige weitere Proteine eine Beteiligung an Endo- und Phagozytose festgestellt. Dazu gehört beispielsweise ABP-120, ein aktinquervernetzendes Protein dessen Ausschaltung mitunter zu einer Beeinträchtigung der Phagozytose führt [Cox *et al.*, 1996], oder der Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor rasGEF, welcher rasS aktiviert und somit an der Regulation der Endozytose beteiligt ist [Wilkins *et al.*, 2000]. Ein Zusammenwirken von Fimbrin mit diesen Proteinen könnte durch Doppeldeletionsmutanten geklärt werden.

Auch an der Verteilung intrazellulärer Membransysteme ist das Aktin-Zytoskelett beteiligt. So werden beispielsweise Aktinbündel zur Verfügung gestellt, um Vesikel an Mikrotubuli zu binden und zu transportieren [Koonce, 2000; Noegel *et al.*, 1997]. Es wurden einige Proteine beschrieben, welche Membran-Kompartimente am Aktin-Zytoskelett verankern wie beispielsweise Comitín [Weiner *et al.*, 1993], Interaptin [Rivero *et al.*, 1998], verschiedene

Spektrin-Isoformen [Beck *et al.*, 1994] oder Filamin [Liu *et al.*, 1997].

Um zu untersuchen, ob die Defizienz von Fimbrin und/oder ABP 34 die Verteilung von Membransystemen wie endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat, Lysosomen, Vesikeln oder der kontraktile Vakuole beeinflusst, wurden Immunfluoreszenzstudien der Mutanten 34⁻, FG2 und B1 durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die obengenannten Mutationen zumindest auf dieser Ebene keinerlei Einfluss auf die Struktur und Verteilung dieser Kompartimente haben. Auch hyper- oder hypoosmotischer Stress führt nur zu den Veränderungen, die auch AX2-Zellen aufweisen. Eine Funktion von Fimbrin und ABP 34 im Bereich der untersuchten Kompartimente ist daher sehr unwahrscheinlich. Die Fimbrin-Mutanten zeigten normale Osmosensitivität, die Zellen haben den osmotischen Schock überlebt.

Exakte Aussagen über die biologische Funktion von Fimbrin oder dem 34 kDa aktinbindenden Protein lassen sich anhand dieser Ergebnisse nicht treffen. Die Hinweise für ein Zusammenwirken beider Proteine sind eher gering. Es wäre zu überprüfen, ob die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration in den verschiedenen Mutanten der beiden Ca²⁺-bindenden Proteine zu einer Veränderung beispielsweise des Zytoskeletts führt, welche die Wildtyp-Zellen nicht aufweisen.

3. Lokalisation von Fimbrin in der Zelle

Die Lokalisation von L-Plastin erscheint in Osteoklasten als punktierte Struktur an der Zellperipherie [Babb *et al.*, 1997], Fimbrin der Hefe kolokalisiert mit zytoplasmatischen Aktin-Bündeln und mit Aktin des Cortex [Drubin *et al.*, 1988]. Die Lokalisation von Fimbrin in *D. discoideum* wurde schon früher mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen das Protein untersucht [Prassler, 1995; Prassler *et al.*, 1997]. Dabei zeigte sich je nach den gewählten Bedingungen eine andere Verteilung des Proteins. Nach Methanol-Fixierung scheint Fimbrin wie Aktin entlang der Zellmembran zu lokalisieren, während die Fixierung mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure ein diffuses Netzwerk in der Zelle zeigt. Es wurde argumentiert, dass bei der Fixierung mit kaltem Methanol lösliche Proteine wie Fimbrin teilweise aus der Zelle ausgewaschen werden und andererseits ein starkes Fixierungsmittel wie Formaldehyd/Pikrinsäure die Bindung von Antigen und Antikörper verhindert. Folglich seien nur starke Immunfärbungen, die bei beiden Methoden identisch nachweisbar sind, als zuverlässig zu betrachten.

Da die in diesen Publikationen abgebildeten Immunfluoreszenzen so große Unterschiede aufweisen, dass eine Aussage über eine gemeinsame Lokalisation von Fimbrin nach beiden Fixierungsmethoden nicht möglich ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welche Lokalisation letztendlich der *in vivo*-Situation am nächsten kommt.

Die Fixierung von AX2 mit Methanol oder Paraformaldehyd/Pikrinsäure liefert die gleiche Lokalisation wie bereits veröffentlicht. Die Lokalisation von Aktin ist von der Wahl der Fixierungsmethode unabhängig, es erscheint immer unterhalb der Plasmamembran, Makropinosomen oder Phagozytose-„Cups“. Bei der Fixierung mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure ist eine für ein aktinbindendes Protein zu erwartende Kolokalisation von Fimbrin mit Aktin entlang der Membran neben der starken zytosolischen Färbung nur in der Überlagerung beider Bilder zu erkennen. Um eine Kolokalisation von Aktin und Fimbrin in methanolfixierten Zellen nachweisen zu können, wurden Zellen verwendet, die an GFP-gekoppeltes Aktin exprimieren. Aktin-GFP lokalisiert in diesen Zellen wie endogenes Aktin [Westphal *et al.*, 1997]. Überlagerungen mit Fimbrinfärbungen zeigen für Aktin-GFP und Fimbrin die zu erwartende Kolokalisation. Dies spricht eher dafür, dass die Methanolfixierung die Lokalisierung *in vivo* besser wiedergibt. Dies wird bestätigt durch Studien an Zellen, welche GFP-L-Plastin exprimieren. Die Lokalisation von GFP-L-Plastin in fixierten Zellen stimmt in beiden Fixierungsmethoden mit der von Fimbrin überein. Gleiches gilt für die Überlagerung mit Aktin. Die Betrachtung der Lokalisation von GFP-L-Plastin *in vivo* zeigt deutlich eine Verteilung entlang der Plasmamembran und nicht ein zytosolisches, diffuses Netzwerk wie nach der Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixierung. Aufgrund der hohen Homologie von L-Plastin zu Fimbrin aus *D. discoideum* und der zu Fimbrin ähnlichen Lokalisation von L-Plastin-GFP bei Methanol-Fixierung kann davon ausgegangen werden, dass diese Methode eher die *in vivo*-Lokalisation von Fimbrin wiedergibt als die Fixierung mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure. Die Expression von Fimbrin-GFP in *D. discoideum* ist in Planung, um dies zu bestätigen.

Da auch Fimbrin aus *D. discoideum* möglicherweise an der Phagozytose beteiligt ist, wurden die verschiedenen Fimbrin-Mutanten sowie Wildtyp-Zellen vor ihrer Fixierung mit abgetöteten Hefen inkubiert. Wenn die Amöben die Hefen phagozytieren, umhüllen sie mit ihrer Zellmembran sukzessiv die Hefezellen; es bilden sich sogenannte Phagozytose-„Cups“. Zur vollständigen Internalisierung wird die hefeumschließende Membran von der Zellmembran abgeschnürt, ein Phagosom ist entstanden. Es zeigt sich eine Anreicherung von Aktin an Phagozytose-„Cups“ und an Phagosomen. Dies ist offensichtlich unabhängig von den an Fimbrin vorgenommenen Mutationen oder seiner vollständigen Ausschaltung, die

Lokalisation von Aktin ist unverändert. Fimbrin selber lokalisiert ebenfalls an Phagosomen und Phagozytose-„Cups“. Es zeigte sich am Beispiel der Mutante B3, dass eine aktinbindende Domäne ausreichend für die Kolokalisation von Fimbrin und Aktin ist. Dies wurde auch schon im Falle anderer Proteine beschrieben [Pang *et al.*, 1998].

4. Neue fimbrinähnliche Proteine aus *D. discoideum*

Da die Ausschaltung von Fimbrin in *D. discoideum* zu keine drastischen Veränderungen des Phänotyps führte und es daher möglich ist, dass andere Proteine die Funktion von Fimbrin übernehmen, wurde die Datenbank des *Dictyostelium discoideum*-Genomprojektes nach Genen, die zu Fimbrin ähnliche Proteinen exprimieren, durchsucht. Die Sequenzierung des kompletten Genoms eines Organismus ermöglicht bequem die gezielte Suche nach Genen und Proteinen. Im Rahmen des *Dictyostelium discoideum* Genomprojekts sind bislang 1.219.956.887 Nukleotide (Stand November 2001) der auf sechs Chromosomen verteilten Gene sequenziert worden. Die Abdeckung ist teilweise sechs- bis siebenfach [L. Eichinger, persönliche Mitteilung].

Es wurden vier solcher Gene gefunden, von einem ist die Sequenz allerdings noch unvollständig (R10109). Strukturvorhersagen ergeben, dass diese Proteine alle eine (F01706) oder zwei (F02091, R09493, R10109) aktinbindende Domänen besitzen. Die phylogenetische Analyse dieser Domänen zeigt, dass sie zu den aktinbindenden Domänen der Fimbrine eine deutlich höhere Homologie besitzen als zu denen anderer Proteine. Die neuen Proteine unterscheiden sich alle von Fimbrin durch Abschnitte mit „Coiled coil“-Struktur und das Fehlen der calciumbindenden Domänen. „Coiled coil“-Strukturen wurden bereits in anderen Proteinen der α -Aktinin-Familie beschrieben. Dazu zählen Cortexilline [Faix *et al.*, 1996] und Interaptin [Rivero *et al.*, 1998] in *D. discoideum* sowie Plectin [Liu *et al.*, 1996] und Dystrophin [Brown *et al.*, 1995] in Mammalia.

Besonders außergewöhnlich ist die Struktur von F02091. Am N-Terminus besitzt dieses Protein einen 139 Aminosäuren langen Bereich mit Homologie zum Talin-N-Terminus. Es handelt sich dabei aber nicht um eine Domäne, welcher eine spezielle Funktion wie beispielsweise die Bindung von Calcium zugeschrieben wird. Noch in keinem anderen Protein (außer in Talin) wurde dieser talinähnliche Abschnitt berichtet. Die Funktion dieser Sequenz in Talin sollte daher untersucht werden. An diesen talinähnlichen Bereich schließt sich eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) an. PH-Domänen können vermutlich eine

Reorganisation des Zytoskeletts bewirken. Dabei binden sie an Phosphoinositide, welche einen Teil einer Signaltransduktionskette bilden, während ein anderer Teil des Proteins über eine aktinbindende Domäne mit einem Aktinfilament verbunden ist. Signale von außerhalb der Zelle bewirken so letztendlich über die PH-Domäne eine Verschiebung eines Aktinfilaments in Richtung Zellcortex, so dass beispielsweise Lamellipodien entstehen [Ma und Abrams, 1999]. Dies könnte auch bei dem neuen fimbrinähnlichen Protein der Fall sein. In der Mitte dieses Proteins liegen 3 Abschnitte die mit zu über 50 %iger Wahrscheinlichkeit „Coiled coil“-Struktur haben. Diese Zusammenlagerungen von zwei oder vier α -Helices können verschiedene Funktionen erfüllen [Burkhard *et al.*, 2001]. In diesem Bereich könnte beispielsweise eine über die PH-Domäne vermittelte Konformationsänderung stattfinden, die letztendlich die Verschiebung der Aktinfilamente bewirkt. Am C-Terminus des Proteins befindet sich ein Tandem der zu Fimbrin ähnlichen aktinbindenden Domänen, die vermutlich der Bündelung von Aktin dienen.

Protein F01706 beinhaltet eine aktinbindende Domäne am N-Terminus gefolgt von einer „Coiled coil“-Domäne, die drei Viertel des Proteins umfasst. Cortexillin I und II aus *D. discoideum* gehören wie Fimbrin zur α -Aktinin-Familie und besitzen die gleiche Struktur wie F01706. Die Homologie der aktinbindenden Domäne von F01706 zeigt allerdings eine deutlich höhere Homologie zu Fimbrin als zu Cortexillin. Dennoch ist es denkbar, dass beide Proteine ähnliche biologische Funktionen übernehmen. Cortexillin bildet Dimere und verbindet Aktin Filamente in antiparallele Bündel, die ein Netzwerk bilden. Es ist so beteiligt an der Formgebung und Größe der Zelle wie auch an der Cytokinese [Faix *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1999]. Es ist ebenfalls denkbar, dass F01706 über die „Coiled coil“-Domänen dimerisiert und so in der Lage ist, Aktinfilamente zu bündeln.

Über eine mögliche Funktion von R09493 und R10109 kann nicht viel gesagt werden, zumal die Sequenz von R10109 unvollständig ist. Beide Proteine besitzen zwei aktinbindende Domänen am C-Terminus und „Coiled coil“-Strukturen in der Mitte des Proteins und N-terminal. Es ist anzunehmen, dass diese Proteine Aktin bündeln. Die „Coiled coil“-Domänen könnten an einer Vielzahl von Interaktionen mit anderen Proteinen beteiligt sein.

Genauere Informationen über die tatsächliche Funktion der Proteine können natürlich nur Untersuchungen am Protein selbst *in vitro* oder in der Zelle *in vivo* ergeben.

D Zusammenfassung

Fimbrine bzw. Plastine gehören zu der α -Aktinin Familie aktinbindender Proteine und bündeln calciumabhängig Aktinfilamente. Sie kommen in einer Vielzahl eukaryontischer Organismen vor. Vertebraten besitzen drei gewebespezifische Isoformen, I-Plastin in intestinalen Epithelien, L-Plastin in hämatopoietischen Zellen und T-Plastin in allen übrigen Geweben. L-Plastin wird als Antwort auf Hormone, Wachstumsfaktoren aber auch bei rezeptorvermittelter Phagozytose phosphoryliert. Über die genaue biologische Funktion der Proteine ist bisher nicht viel bekannt. In dieser Arbeit wurden daher Studien an L-Plastin aus *M. musculus* und Fimbrin aus *D. discoideum* vorgenommen.

Im der vorliegenden Arbeit wurden Teile des Gens von murinem L-Plastin sequenziert kartiert. Ein „Knockout-Targeting“-Konstrukt wurde hergestellt und für die Transfektion embryonaler Stammzellen verwendet.

Verschiedene *Dictyostelium discoideum*-Mutanten des Fimbrins wurden analysiert. Die Ausschaltung von Fimbrin wie auch die Deletion des N-Terminus und der zwei calciumbindenden Domänen beinhaltet, beeinflusste nicht die Zellgröße, das Wachstum in axenischem Medium und in Suspension mit Bakterien sowie die Phagozytose, Endozytose und Exozytose. Auch die Kolokalisation von Aktin und Fimbrin entlang der Plasmamembran, an Makropinosomen und Phagozytose-„Cups“ war unabhängig von den verschiedenen Mutationen. Die Verteilung verschiedener intrazellulärer Membransysteme wie Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum, Lysosomen und der kontraktilen Vakuole wurde ebenfalls nicht verändert, auch unter hyper- und hypo-osmotischem Stress sind keine Unterschiede zu Wildtypzellen zu erkennen.

Die Punktmutation von potentiellen Phosphorylierungsstellen am N-Terminus von Fimbrin führte zu einer deutlich verminderten Phagozytoserate. Dies stellt ein Hinweis darauf dar, dass Fimbrin tatsächlich an diesen Positionen phosphoryliert wird und an der Phagozytose beteiligt ist.

Die vollständige oder teilweise Deletion von Fimbrin im Hintergrund einer Mutante mit Defizienz des 34 kDa aktinbindenden Proteins wurde ebenfalls untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung des 34 kDa aktinbindenden Proteins zu einer Erhöhung der Phagozytoserate führt, welche auch die Doppelmutanten zeigen. Eine Beteiligung des 34 kDa aktinbindenden Proteins an der Phagozytose ist daher wahrscheinlich.

Die subzelluläre Lokalisation von Fimbrin in *D. discoideum* wurde an mit Methanol oder Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixierten Zellen, welche Aktin-GFP oder GFP-L-Plastin

exprimieren, untersucht. Prinzipiell konnte gezeigt werden, dass eine Fixierung mit Methanol eher die *in vivo*-Verteilung von Fimbrin in *D. discoideum* darstellt als eine Fixierung mit Paraformaldehyd/ Pikrinsäure.

Es wurden *in silico* vier fimbrinähnliche Proteine aus *D. discoideum* gefunden, F01706, F02091, R09493 und R10109. Alle weisen eine oder zwei aktinbindende Domänen auf, die zu aktinbindenden Domänen aus anderen Plastinen/Fimbrinen höchste Homologie zeigen. Diese sind am C-Terminus lokalisiert, mit Ausnahme von F01706, dessen aktinbindende Domäne am N-Terminus ist. Im Gegensatz zu Fimbrin besitzen sie keine calciumbindende Domänen aber „Coiled coil“-Domänen. Eines der Proteine (F01706) zeichnet sich durch große strukturelle Ähnlichkeit zu dem aktinbindenden Protein Cortexillin aus. F02091 besitzt eine Pleckstrin-Homologie-Domäne und einen Sequenzabschnitt homolog zum N-Terminus von Talin.

E Material und Methoden

1. Material

1.1 Labormaterialien

Chromatographiesäulen, Polyprep	Bio-Rad
Einfrieröhrchen, 1 ml und 1,8 ml	Nunc
Einweg-Pipetten, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner
Einweg-Pipettenspitzen	Greiner
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad
Gewebekulturplatten, 6 Loch, 24 Loch, 96 Loch	Nunc
Gewebekulturplatten, 48 Loch	Greiner
Hybridisierungsröhrchen	Hybaid
3MM Filterpapier	Whatman
Nitrozellulosemembran, Typ BA85	Schleicher und Schuell
Nylonmembran, Hybond N+	Amersham
Nitrozellulose-Rundfilter, BA85 Ø 82 mm	Schleicher und Schuell
Pipetten 1-10 µl, 10-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl	Gilson
Multipette, Multipette plus	Eppendorf
Sterilfilter, 0,2 µm und 0,45 µm	Gelman Science
Petrischalen Typ 3003	Falcon
Petrischalen Ø 90 mm, Ø 150 mm	Greiner
Plastikküvetten	Greiner
Quarzküvette Infrasil	Hellma
Quarzküvette, Luminescence Spectroscopy Cell	Perkin Elmer
15 ml Röhrchen, Typ 2095	Falcon
50 ml Röhrchen, Typ 2070	Falcon
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt
Röntgenfilm X-omat AR-5, 18x24, AR-5, 35x43	Kodak

1.2 Geräte

Blotkammer	Trans-Blot SD	BioRad
Chromatographiesäulen, leer		BioRad
Crosslinker	UVC 500	Hoefer
Elektroporationsgerät	Typ Gene-Pulser	BioRad
Fluorimeter		Photon Technology International
Fraktionssammler	RediFrac	Pharmacia Biotech
Heizblöcke:	Typ DIGI-Block JR	neoLab
	Typ Thermomixer	Eppendorf
Hybridisierungsöfen		Hybaid
Inkubationsofen Lab-Therm		Kühner
Magnetrührer	Typ MR 3001 K	Heidolph

Mikroskope:	Lichtmikroskop, Typ CH30	Olympus
	Lichtmikroskop, Typ IX70	Olympus
	Lichtmikroskop, Typ DMIL	Leica
	Laser Scan Mikroskop, Typ DMIL	Leica
PCR-Maschine		MWG-Biotech
Peristaltikpumpe P1		Pharmacia Biotech
pH-Meter 766		Knick
Rotoren:	Typ JA-10	Beckman
	Typ JA-25.50	Beckman
	SLA-1500	Sorvall
	SLA-3000	Sorvall
	SS-34	Sorvall
	TLA 45	Beckmann
	SW 41	Beckmann
Rüttler 3015		GFL
Rüttler Lab-Shaker		Kühner
Spannungsverstärker	Power Pac 200 und 300	BioRad
Spektralphotometer	Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Tischzentrifugen:	Kühlzentrifuge Biotech fresco	Heraeus Instruments
	eppendorf centrifuge 5415 D	Eppendorf
Ultrazentrifugen:	Optima TLX	Beckmann
	Optima L70K	Beckmann
UV-Auflichtmonitor	TFS-35 M	Faust
UV-Transilluminator		MWG-Biotech
Vortex REAX top		Heidolph
Wasserbad		GFL
Zentrifugen:	Beckman Avanti J25	Beckman
	Sorvall RC 5C plus	Sorvall

1.3 Software

Sequenzierte DNA-Abschnitte wurden mit der Wisconsin Sequence Package-Software 9.0 der Genetics Computer Group [Devereux *et al.*, 1984] zusammengesetzt und analysiert. Die Suche nach zu Platin homologen Proteinen erfolgte mit BLASTN und BLASTP [Altschul *et al.*, 1990] in der Datenbank des *Dictyostelium discoideum* Genom-Projekts ([http://www. Uni-koeln.de/dictyostelium](http://www.Uni-koeln.de/dictyostelium)).

Um die Homologie der verschiedenen Proteine zu vergleichen, wurde das Programm BioEdit [Hall, 1999] verwendet. Die Analyse der Protein-Domänen erfolgte unter Verwendung von SMART (<http://www.smart.embl-heidelberg.de>). „Coiled coil“-Strukturen wurden mit der Software Coils 2.1 [Lupas *et al.*, 1991] berechnet.

Phylogenetische Stammbäume wurden mit dem „neighbour-joining“-Algorithmus [Saitou und Nei, 1987] des Programms ClustalX [Thompson *et al.*, 1997] erstellt. Die Darstellung erfolgte mit TreeView [Page, 1996].

1.4 Für phylogenetische Analysen verwendete Sequenzen

Zulassungsnummern von Sequenzen, die zur phylogenetischen Analyse oder Homologievergleichen genutzt wurden: *Homo sapiens*: L-Plastin, L36202; T-Plastin, M222991; I-Plastin, L20826; β -Spektrin, Q01082; Vav, P15498; α -Aktinin 1, X15804; β -Spektrin, M96803; β -Spektrin V, Q9NRC6; ACF7, AB029290; Dystrophin, Q14205; Utrophin, X69086; Parvin A, AF23771. *Mus musculus*: L-Plastin, D37837; T-Plastin: BC005459; I-Plastin, IMAGE 998K233773; Talin P26039; BPAG (Dystonin), AF396870; Calmin A, AB047978. *Drosophila melanogaster*: Fimbrin, AF053225; Talin, Q9USL8; RasGAP, P48423; Kakapo AJ011924. *Saccharomyces cerevisiae*: Fimbrin, X63867. *Arabidopsis thaliana*: Fimbrin 1, AL161565; Fimbrin 2, AF042671; Fimbrin 4, AB015479; Fimbrin 3, AY045780; Fimbrin 5, Q9SJ84. *Dictyostelium discoideum*: Fimbrin L36202; Talin A, P54633; Talin B O97054, Filamin, X15430; α -Aktinin, Y00689; Cortexillin 1, L49527; Cortexillin 2, L46371; Interaptin, AF057019. *Bos taurus*: P08487. *Gallus gallus*: I-Plastin, P19179; Filamin, Q9574. *Coenorhabditis elegans*: α -Aktinin O18290; Lamin O61841; Fimbrin, AC024742, AC024743. *Rattus norvegicus*: T-Plastin, Q63598; Plectin, X59601. *Polysphondylium pallidum*: ABP64, L08068. *Tetrahymena thermophila*: Fimbrin. JC7170. *Schistosoma mansoni*: Fimbrin, AAA29882. *Cricetulus griseus*: T-Plastin, BAA32974. *Triticum aestivum*: Fimbrin, U67717. *Schizosaccharomyces pombe*: Fimbrin, P32599. *Giberella pulicaris*: Fimbrin, CAA10667.

1.5 Kits

Nucleobond AX 100 und 500
 NucleoSpin Extract 2 in 1
 NucleoSpin Plus
 EndoFree Plasmid Maxi Kit
 Stratagene Prime[®] It II
 Original TA Cloning[®]
 pGEM-Teasy-Vector System I

Macherey-Nagel
 Macherey-Nagel
 Macherey-Nagel
 Qiagen
 Stratagene
 Invitrogen
 Promega

1.6 Enzyme, Inhibitoren, Antikörper und Antibiotika

Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase	Roche
DNA-Polymerase I	Sigma
DNase I (Desoxyribonuklease)	Sigma
Klenow-Fragment	Life Technologies
Proteinase K	Sigma
Restriktionsendonukleasen	Life Technologies, Amersham, Roche, Gibco-BRL, New England Biolabs
Ribonuklease A	Sigma
T ₄ -DNA-Ligase	Life Technologies
Taq-DNA-Polymerase	Roche

Primäre Antikörper

anti-Aktin-Antikörper mAk Act 1-7	Simpson <i>et al.</i> , 1984
anti-Comitin-Antikörper mAk 190-340-2	Weiner <i>et al.</i> , 1993
anti-Fimbrin-Antikörper mAk 210-183-1	Prassler, 1995
anti-PDI-Antikörper mAk 221-135-1	Monnat <i>et al.</i> , 1997
anti-V/H ⁺ -ATPase Untereinheit A- Antikörper mAk 221-35-2	Jenne <i>et al.</i> , 1998
anti-Vakuolin-Antikörper mAk 221-1-1	Jenne <i>et al.</i> , 1998
anti-Kohlenhydrat-Epitop-lysosomaler Enzyme mAk 221-342-5	Neuhaus <i>et al.</i> , 1998
anti-34 kDa ABP mAk 159-291-1	Rivero <i>et al.</i> , 1996

Sekundäre Antikörper

Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3-Konjugat	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG Alexa 488-Konjugat	Molecular Probes
Ziege-anti-Kaninchen-IgG Alexa 568-Konjugat	Molecular Probes

Inhibitoren

DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Complete [®] Inhibitoren-Cocktail	Roche

Antibiotika

Ampicillin	Grünenthal
Blasticidin S	ICN

Chloramphenicol	Sigma
Dihydrostreptomycinsulfat	Sigma
Geneticin (G418)	Life Technologies
Kanamycin	Sigma
Mitomycin C	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Tetracyclin	Sigma

1.7 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)	National Diagnostics
Agar-Agar (BRC-RG)	Biomatic
Agarose (electrophorese grade)	Life Technologies
Ammoniumsulfat	Riedel-de-Haen
Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton	Difco
Borsäure	Merck
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth
Bromphenolblau (Na-Salz)	Serva
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Chloroform p.a.	Riedel-de-Haen
CNBr-aktivierte Sepharose 4Fast Flow	Pharmacia Biotech
Coomassie-Brilliant-Blau R 250	Serva
p-Cumarsäure	Fluka
Dimethylformamid (DMF)	Riedel-de-Haen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM	Sigma
Essigsäure	Riedel-de-Haen
Ethanol	Riedel-de-Haen
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendinitrotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylenglycolbis[2-aminoethylether]- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
FCS (Fötale Kälberserum)	Biochrom, Life Technologies
FITC-Dextran 70S	Sigma
Fischgelatine	Sigma
Formamid	Merck
Gelatine	Sigma
Glucose	Merck
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Riedel-de-Haen
Glycin	Degussa
Harnstoff (ultrapure)	Pharmacia Biotech
Hefeextrakt	Oxoid
Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Kaliumhydrogenphosphat-Triphosphat	Merck
Keyhole Limpet Hemocyanine	Sigma

LIF ESGRO [®] (leukaemia inhibitory factor)	Chemicon
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Maltose	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol p.a.	Riedel-de-Haen
MOPS ([Morpholino]propansulfonsäure)	Gerbu
Natriumacetat	Merck
Natriumcitrat	Fluka
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Riedel-de-Haen
Ni-NTA-Sepharose	Pharmacia
Nukleotide	Roche
NP-40 (Ethylphenylpolyethylenglycol)	Fluka
Paraformaldehyd	Sigma
Pepton	Roth
Phenol	Roth
Pikrinsäure	Sigma
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Sigma
Polyethylenglycol 4000	Merck
Polyvinylglycol MW 10000	Sigma
Ponceau S Konzentrat	Sigma
Protein-A-Sepharose CL-4B	Pharmacia Biotech
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
Saccharose	Fluka
Salzsäure 32%ig	Fluka
Sorbitol	Fluka
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Triethylamin	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (ultrapure)	Sigma
TRITC-Phalloidin	Sigma
Triton-X-100	Merck
Trypan Blau	Merck
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid (30%ige Lösung)	Merck
Zitronensäure	Merck

Radiochemikalien:

α- ³² P-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (10 mCi/ml)	Amersham
--	----------

Alle übrigen nicht aufgeführten Chemikalien in p.a. Qualität wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva, Sigma und Riedel-de-Haen bezogen.

1.8 Vektoren

pCR-2.1	Kit: Invitrogen
pDEX-GFP	Westphal <i>et al.</i> , 1997
pDEX-RH	Faix <i>et al.</i> , 1992
pGEM-Teasy	Kit: Promega
pGEX-2T	Smith, 1993
pPNT	Tybulwicz <i>et al.</i> , 1991
pUC19	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pQE 30	Bujard <i>et al.</i> , 1987
pQE 40	Bujard <i>et al.</i> , 1987

1.9 Oligonukleotide

Die für Sequenzierungen oder die Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) eingesetzten Oligonukleotide wurden der Firma MWG-Biotech AG in Ebersberg oder von Roth bezogen.

Oligonukleotide für L-Plastin:

LP U1:	5'-ACGAATTCATATGGCCAGAGGATCCGTTGCTG-3'
LP R1:	5'-ACGAATTCTTACACCCTCTTCATCCCTTTC-3'
LP UGFP	5'-GAATTCATGCTGGATGGTGACAGGAATAAAG-3'
LP RGFP	5'-GAATTCCTTACCAGTCAATGTCCTGGTTC-3'
LP U1/B:	5'-ACAGATCTATGGCCAGAGGATCCGTTGCTG-3'
LP R1/B:	5'-ACAGATATTACACCCTCTTCATCCCTTTC-3'
LP U2:	5'-ACAAGAAGGAAGGGAGCTGTG-3'
LP R2:	5'-ACAAGCTTACATGCCGGCAGTCGGGGTTCATTC-3'
LP R3:	5'-TGAGTAAGAGTGCTGGGTACCA-3'
LP U4:	5'-GTCCTCCATGGCTTAAAAACGA-3'
LP R4:	5'-ACTCGAAAAAGAACAAGCAAGAG-3'
LP U5:	5'-AGGAAGAAAAGTATGCCTTCGTC-3'
LP U5':	5'-GTATGCCTTCGTCAACTGGATAAACA-3'
LP R5:	5'-CAAAGAAGTATGCCATCGCCTAC-3'
LP U6:	5'-TAAATGATCAACCCTGFTCTGTGCAA-3'
LP U6':	5'-AACCTGTCTGTGCCAGACACGATTG-3'
LP R6:	5'-CTGAATGGTGAATGGGTTGAGCTT-3'
LP R6':	5'-TCTTGTTGATCGTTCTCTCGTCAATCG-3'
LP R7:	5'-AGAGTTCAGAGCCAAGTTCA-3'
LP R7':	5'-GAGGCAGAGTTCAGAGCCAAGTTCAA-3'
LP U8:	5'-CCTAGAGGATTTGATGAA-3'
LP R8:	5'-TAGTTAGCCCACCGCAGCA-3'
LP E7:	5'-GAAAAGTGGCTCTGA-3'
LP E7:	5'-AAAGTCAAGGVAGGGGTTAA-3'
LP5'R:	5'-GTCAGACACGGATCCTCTGGCCAT-3'
LP 5'R2:	5'-GCCATCATGATTATCTTTAA-3'
LP 5'R3:	5'-TGAGAAAGCTCAGACTACTCC-3'
LP 5'R4:	5'-TACAGTAAGCACCATATTTTACT-3'
LP 5'R6:	5'-ATCTTGAATACCTTATTAGCTAGT-3'
LP 5'R7:	5'-AACACCTGTAAGTCCAAGTTCCA-3'

LP Bam U: 5'-CGTGTGAAAGTGCATCATGAAT-3'
LP Bam R: 5'-TGCCTGTGTAGCCTGCTGATT-3'
LP F2R3: 5'-GCCTGACGACCGGAGTTGGAT-3'
F2 I2: 5'-CAACTGGCCAGTGAGCCCCAG-3'
LP I4son.-rev: 5'-GAATGTAAATGTCTTACACACAGG
F2 In2-2: 5'-AACACCTAAGATTTCTAGATG-3'
F2 U1: 5'-CCTAAGGCAAGCTGGAGGCAGAC-3'
F2 R1: 5'-GTGGGTGTTAGAAATCTAAACC-3'
F2 R2: 5'-GCCTGCGTCACCACACCGGGA-3'
F2 LPU3: 5'-CGATGGCAATGGATAACATCAG-3'
F2 LPR3: 5'-CCAGATCACCTGTGGCCATC-3'
F2 R3-2: 5'-GCCTTGAGTAGGTGTGGTC-3'
F2 EV 1: 5'-ACAATGATTTGTGTAAGTCTGGGCCCT-3'
F2 EV R3: 5'-ACCTTTAAAGAGAATATT-3'
Klon2-1 U1: 5'-CCTTCTGAGTAGCTAAGATATG-3'
Klon U2 I4: 5'-CATGATTATTCTTAACGGTT-3'
Klon U2 I41: 5'-CCAGTTCAGGCACAGGACCCA-3'
Klon U2 I42: 5'-CCTGCTGATTTAGATGCTG-3'
Klon U2 I43: 5'-ATTCAATGTCAAGATAAGT-3'
KlonF7 U2: 5'-ATTTGGGGCTGCTCTTCCGCT-3'
KlonF7 R2: 5'-TCACCGTCATCACGAAA-3'
Klon15 U1: 5'-AGATAGTGAATG-3'
Klon15 R1: 5'-CATAGGGTTGGCACA-3'
Klon15 U2: 5'-ACATCCATATGATCAAGGA-3'
Klon15 R2: 5'-AGGACTATCCGCCTACATGC-3'
Klon15 R2': 5'-CAGGACTATCCGCCTACATGCCTG-3'
Klon15 U3: 5'-ATACTACACATAGAGGAGA-3'
Klon15 U3': 5'-GCTCATACTACACATAGAGGAGA-3'
Klon16 U1: 5'-TAGTTGAGAGGGTTT-3'
Klon16 R1: 5'-GCCACTCGGTGACGC-3'
Klon16 U2: 5'-ACTTCAACCAGGTCTTCT-3'
Klon16 R2: 5'-AGCAGTGTCTCAGCACCA-3'
Klon16 U3: 5'-CACACTGATGCCTGGTGATTC-3'
Klon16 R3: 5'-GCATCTATTATGACCCAGCTA-3'
Klon16 U4: 5'-CATTCTTAGCTCTTGTTGAC-3'
Klon16 R4: 5'-GGTGTGGTCCAGTAGCAGCTT-3'
Klon19 U1: 5'-TCGCCAGCAGCTGCT-3'
Klon19 U1': 5'-GCAGCTGCTTCTTGGCACACATTG-3'
Klon19 R1: 5'-CATGGACAACCTGCCA-3'
Klon19 R2: 5'-ATGTAAGTGCCTAAGAGCCCTA-3'
Klon19 R3: 5'-AGTCACATGTCTGCATTCCTA-3'
Klon19 U8': 5'-CCTAGAGGATTTGATGAAGTT-3'
Klon19R8-2: 5'-AACAAATGCAATCACATT-3'
Klon19 R8-2': 5'-CTCAACAATGCAATCAACATTCC-3'
LP U S? A: 5'-AGATCTATGGCCAGAGGAGCCGTGGCTGACGAAGAAATG-3'
LP R no stop: 5'-AGATCTCACCCCTCTTCATCCCTTTCCCC-3'
Lpep U: 5'-AGATCTATGGCCAGAGGATCCGTGTCTGACGAAGAAATGATG-3'
Lpep R: 5'-AAGCTTCTAAAAAGCCTCTCTGAGCTCCATCATTCTTC-3'

Oligonukleotide für T-Plastin:

Tpep U: 5'-AGATCTATGGCAACCACTCAGATTTCCAAAGATGAGCTTGAT-3'
 Tpep R: 5'-AAGCTTCTAAAAGGCCTCTTTGAGTTCATCAAGCTCATCTTT-3'

Oligonukleotide für I-Plastin:

Ipep U: 5'-AAGCTTCTAACTATTGTCAATATCTATTTTATTAATGCCTCTTGT
 AGTTCTTCAAG-3'
 Ipep R: 5'-AGATCTATGGAAAACAGTACTACTACCATTTCTCGGGAGGAGCTT
 GAAGAACTA-3'

Oligonukleotide für die Neomycin-Resistenzkassette:

Neo-uni: 5'-AGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTG-3'
 Neo-rev: 5'-AAGAAGCTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCG-3'
 Neo-5'rev: 5'-CCTGCGTGCAATCCATTCTTGTTTC-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung verschiedener Plasmide:

Universal (5'--3'): 5'-ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG-3'
 M13 revers : 5'-TTCACACAGGAAACAGCTATGACC-3'
 pQE 30: 5'-CGGATAACAATTCACACAG-3'

1.10 Puffer und andere Lösungen

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

10x NCP-Puffer (pH 8,0):

12,1 g (0,1 mol) Tris/HCl
 87,0 g (1,5 mol) NaCl
 5 ml Tween 20
 2,0 g (37 mmol) Natriumazid
 mit destilliertem Wasser auf 1l auffüllen

PBG (pH 7,4):

0,5 % Rinderserumalbumin
 0,1 % Fischgelatine
 in 1 x PBS

PBS (pH 7,2/ pH8,0):

Eine Lösung aus 30 mM KH₂PO₄ und 150 mM NaCl wird mit 70mM Na₂HPO₄ auf einen pH-Wert von 7,2 oder 8,0 eingestellt. Die Lösung wird anschließend autoklaviert.

<u>1,2 M Phosphatpuffer (pH 6,8):</u>	1,2 M Na ₂ HPO ₄ wird mit 1,2 M NaH ₂ PO ₄ in einem Verhältnis von 2:1 gemischt
<u>20x SSC:</u>	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
<u>TE-Puffer (pH 8,0):</u>	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
<u>10 x Tris/Boratpuffer (pH 8,3):</u>	43 g (0,36 mol) Tris 55 g (0,9 mol) Borsäure 7,4 g (20 mmol) EDTA mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen
<u>50 x Tris/Acetatpuffer (pH 8,0):</u>	242 g (2 mol) Tris 57,1 ml 16,6 M Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

1.11 Medien

Die verwendeten Medien wurden mit deionisiertem Wasser, welches über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) gefiltert wurde, angesetzt und bei 120 °C autoklaviert. Antibiotika wurden nach Abkühlen des Mediums auf etwa 50 °C zugegeben. Das Gießen der Platten erfolgte mit einer halbautomatischen Plattengießmaschine.

1.11.1 Medien für *E. coli*-Kulturen [Sambroock *et al.*, 1989]

<u>LB Medium:</u>	<u>SOC Medium:</u>
10 g Bacto-Trypton	20 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt	5g Hefeextrakt
5 g (85,5 mmol) NaCl	0,5 g (8,5 mmol) NaCl
auf 1 l mit Wasser auffüllen	20 mM Glucose
	auf 1 l mit Wasser auffüllen

Der pH-Wert von 7,4 wurde mit NaOH eingestellt. Für Agarplatten wurden den Medien 0,9 % (w/v) Agar und bei Bedarf 100 mg/l Ampicillin oder Kanamycin zugesetzt. Für Farbindikatorplatten zur Blau/Weiß-Selektion von *E. coli*-Transformanten wurden die fertigen Platten jeweils mit 50 µl 0,1 M IPTG-Lösung und 90 µl X-gal-Lösung (20 mg/ml Dimethylformamid) bestrichen.

1.11.2 Medien für *D. discoideum*-KulturenSörensen-Phosphat-Puffer (pH 6,0):

[Malchow *et al.*, 1972]
 2 mM Na₂HPO₄
 15 mM KH₂PO₄

Salzlösung:

10 mM NaCl
 10 mM KCl
 2,7 mM CaCl₂

axenisches Kulturmedium (pH 6,7):

[Watts und Ashworth, 1970]
 14,3 g Pepton
 18 g (0,1 mol) Maltose
 0,616 g (3,5 mmol) Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 0,486 g (3,6 mmol) KH₂PO₄
 mit Wasser auf 1 l auffüllen

SM-Agarplatten (pH 6,5):

10 g Agar agar
 10 g Pepton
 10 g (55 mmol) Glucose
 1 g Hefeextrakt
 1 g (4,1 mmol) MgSO₄ x 7H₂O
 2,2 g (16,2 mmol) KH₂PO₄
 1 g (5,7 mmol) K₂HPO₄
 mit Wasser auf 1 l auffüllen

1.12 **Bakterien- und *D. discoideum*-Stämme, Kulturzellen**Bakterienstämme:

<i>E. coli</i> BL21 (DE)	Studier und Moffat, 1986
<i>E. coli</i> B/r	Zhou <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> DH5 α	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> JM 109	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> XL1 blue	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> MC1061	Wertmann <i>et al.</i> , 1986
<i>E. coli</i> M15	Ruther 1982
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Williams und Newell, 1976

D. discoideum-Stämme:

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Beschreibung</u>
AX2-214		Axenisch und auf Bakterien wachsender Abkömmling von NC4 [Raper, 1935]
34 ⁻	<i>abpB</i> / <i>hyg</i> ^R	Aktinbindendes Protein 34 defiziente Mutante von AX2 [Rivero <i>et al.</i> , 1996]
34 ^R	<i>abpB</i> ^{+/+} / <i>hyg</i> ^R / <i>G418</i> ^R	Aktinbindendes Protein 34 exprimierende Mutante von 34 ⁻ [Rivero <i>et al.</i> , 1996]
B1	<i>abpB</i> / <i>fim</i> ⁻ / <i>hyg</i> ^R / <i>bsr</i> ^R	Aktinbindendes Protein 34 und Fimbrin defiziente Mutante von AX2
B3	<i>abpB</i> / <i>fim</i> ^{-/+AS1-400} / <i>hyg</i> ^R / <i>bsr</i> ^R	Den N-Terminus (AS 1- 400) von Fimbrin exprimierende Mutante von B1
FG2	<i>fim</i> ⁻ / <i>G418</i> ^R	Fimbrin defiziente Mutante von AX2 [Prassler, 1995]
Δ EF	<i>fim</i> ^{-/+AS80-610} / <i>G418</i> ^R / <i>bsr</i> ^R	Den C-Terminus (AS 80-610) von Fimbrin exprimierende Mutante von FG2

S→A	$fim^{-/+S(5,7)A}/G418^R/bsr^R$	An den Aminosäuren 5 und 7 (Serin) zu Alanin punktmutiertes Fimbrin exprimierende Mutante von FG2
RF	$fim^{-/+}/G418^R/bsr^R$	Fimbrin exprimierende Mutante von FG2

Für die Reintegration von Fimbrin (RF, ΔEF, S? A) in die Mutante FG2 wurde der Vektor pDEX-RH mit Blasticidin-Resistenz-Gen (bsr^R) eingesetzt. Die Fimbrin-Deletion bzw. Teildeletion der Mutanten B1 und B3 wurde mit einem auf pUC 19 basierenden Vektor durchgeführt, der neben dem Blasticidin-Resistenz-Gen den *Aktin15*-Promotor und eine Terminationsequenz aus *D. discoideum* enthält [Witke *et al.*, 1987].

Kulturzellen:

NIH/3T3	Maus-Fibroblasten, [Westermann und Leboulch, 1993]
Jurkat	Humane leukämische T-Zell-Lymphoblasten, [Schneider <i>et al.</i> , 1997]
IB10	Embryonale Stammzellen der Maus, hervorgegangen aus ES-E14 TG2a (<i>M. musculus</i> -Stamm 129 OLA) [Doetschmann <i>et al.</i> , 1987]

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* [Holmes und Quigley, 1981]

Diese Methode ist geeignet, eine große Anzahl von Versuchsansätzen parallel zu bearbeiten. Sie beruht darauf, dass Proteine, Zellwandmaterial und chromosomale DNA beim Erhitzen auf knapp 100 °C koagulieren und abzentrifugiert werden können, während RNA und Plasmid-DNA löslich sind und im Überstand bleiben.

1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden in einem Eppendorfgefäß bei 18.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl STET-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde das Lysat eine Minute auf 95 °C erhitzt und bei 18.000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und der Überstand mit 1 ml Isopropanol gemischt. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde zehn Minuten bei 13.000 x g pelletiert. Die DNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl Wasser aufgenommen.

<u>STET-Puffer:</u>	8 % Saccharose
	50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	50 mM EDTA
	0,5 % Triton X-100

2.2 **Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel**

Um bis zu 40 µg saubere Plasmid-DNA aus *E. coli* Kulturen zu gewinnen, wurde das von der Firma Macherey-Nagel angebotene „NucleoSpin Plus“-Kit benutzt. Hierzu wurden 2 bis 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthält, abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 250 µl Lösung A1, die RNase enthält, versetzt. Danach wurden 250 µl Lösung A2 zugegeben, drei bis fünfmal geschüttelt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Infolge der SDS- und Alkalibehandlung werden bei diesem Reaktionsschritt die Zellmembranen zerstört und durch die RNase die RNA verdaut. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl eiskalter Lösung A3 zur Reaktionsmischung, die dann gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert wurde. Dadurch werden Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile gefällt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C wurde der Überstand auf eine NucleoSpin-Säule gegeben. Es wurde eine Minute bei 18.000 x g zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial bindet. Anschließend wurde die Säule zuerst mit 500 µl Puffer AW und dann mit 700 µl Puffer A4 gewaschen. Danach wurde noch einmal ohne vorherige Pufferzugabe zentrifugiert, um Ethanolreste zu entfernen. Zur Elution wurden schließlich 50 µl Lösung AE auf die Säule gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann eine Minute bei 18.000 x g zentrifugiert. Für größere Mengen sauberer Plasmid-DNA wurde das NucleoBond AX 100- oder 500-Kit benutzt. Dieses Kit arbeitet nach dem gleichen Prinzip, ermöglicht aber die Aufreinigung von bis zu 100 beziehungsweise 500 µg Plasmid-DNA.

2.3 **Aufreinigung von Plasmid-DNA für die Transfektion von ES-Zellen gemäß Qiagen**

Um bei der Transfektion von embryonalen Stammzellen eine möglichst hohe Ausbeute transfizierter Klone zu erhalten ist die Verwendung hochreiner DNA erforderlich. Mit dem „EndoFree Plasmid Maxi“-Kit können bis zu 500 µg endotoxinfreie Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen gewonnen werden. Es wurden 200 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthält, bei 6000 x g und 4 °C für fünfzehn

2.5 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien [Hogan *et al.*, 1994]

0,5-1 cm Schwanzspitze wurden in 500 µl Lysis-Puffer und 30 µl Protease K (10 mg/ml) bei 55 °C über Nacht im Schüttler bei 850 UpM lysiert. Danach wurde die DNA mit Phenol (TE-gesättigt) und Chloroform extrahiert, außerdem wurden so restliche Proteine und RNA entfernt. Der erhaltene Überstand wurde zur Präzipitation der DNA mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die DNA wurde mit einem Glashaken gefischt, mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 60 µl TE-Puffer (pH 8,0) über Nacht bei 4 °C gelöst.

Lysis-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 100 mM EDTA (pH 8,0)
 100 mM NaCl
 1 % SDS
 100 µg/ml Proteinase K

2.6 DNA-Agarosegelelektrophorese [Sambrook *et al.*, 1989]

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegelmatrix. Je nach Auftrennungsziel und Verwendung des Gels wurden 0,5 bis 2 %ige Gele in Tris-Borat-Puffer oder Tris-Acetat-Puffer als Gel- und Laufpuffer eingesetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte horizontal in Flachbett-Gelapparaturen verschiedener Größen (7,5 cm x 8 cm; 11,5 cm x 14 cm; 13 cm x 19 cm) in der Regel bei einer Spannung von 10 V/cm. Die Auftrennung von restringierter, genomischer DNA erfolgte in 0,5 %iger Agarose bei 5 V/cm für 8 h. Den DNA-Proben wurde vor dem Auftragen ein Zehntel des Volumens DNA-Probenpuffer zugesetzt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht ($\lambda=302$ nm) enthielten die Agarose-Lösungen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein geeigneter Größenstandard zusätzlich aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren der mit UV-Licht bestrahlten Gele mit einem Videodokumentationssystem.

DNA-Probenpuffer: 40 % Saccharose
 0,5 % SDS
 0,25 % Bromphenolblau
 in TE-Puffer

DNA-Größenstandard:

1 kb DNA Leiter (Life Technologies): 12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126;
6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018;
506; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp

2.7 Southern-Blot-Analyse [Southern, 1975]

Dieses Verfahren dient dazu, die nach Größe aufgetrennte DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen zu Blotieren. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde können spezifische Fragmente identifiziert werden. Das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel wurde gemeinsam mit einem angelegten Lineal bei einer Wellenlänge von 302 nm fotografiert, um eine spätere Größenbestimmung der Signale zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gel zunächst fünfzehn Minuten in einem Denaturierungspuffer und danach fünfzehn Minuten in einem Neutralisationspuffer inkubiert. Der Blot der DNA auf die Nylonmembran erfolgte in 20 x SSC-Lösung über einen Zeitraum von achtzehn Stunden aufgrund von Kapillarkräften. Dabei lag das Agarosegel auf drei in 20 x SSC-Lösung getränkten Whatman 3 MM Papieren mit Kontakt zu einem 20 x SSC-Lösungsreservoir. Das Gel wurde mit der in Wasser befeuchteten Nylonmembran, mit drei feuchten Whatman 3 MM Papieren und mit einem ca. 7 cm dicken Stapel Saugpapier überschichtet und mit einem Gewicht beschwert. Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 2 x SSC-Lösung inkubiert und dann zweimal im UV-Quervernetzer unter UV-Licht fixiert. Die Nylonmembran wurde bis zu ihrer Verwendung im Dunkeln aufbewahrt.

Denaturierungspuffer:

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisationspuffer:

1,5 M NaCl
0,5 M Tris/HCl (pH 7,5)

2.8 Isolierung von Gesamt-RNA aus Maus-Gewebe

Zum Schutz vor RNAsen wurden während des Arbeitens stets Handschuhe getragen. Außerdem wurden nur sterile Plastikgefäße und Pipetten sowie autoklavierte Lösungen verwendet. Gesamt-RNA wurde nach der Guanidinium-Isothiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktionsmethode gewonnen [Chomczynski und Sacchi, 1987]. Dazu wurden die Organe in Extraktionslösung homogenisiert, und die RNA anschließend mit 0,2 M Natriumacetat (pH 3,2) und Phenol/Chloroform extrahiert. Danach wurde die RNA mit Isopropanol gefällt, mit 75%igem EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser aufgenommen. Aliquots

wurden bei -80 °C aufbewahrt oder direkt weiter verwendet.

Extraktionslösung: 4 M Guanidinium-Isothiocyanat
 25 mM NaCitrat (pH 7,0)
 0,5 % Sarcosyl
 0,1 M 2-Mercaptoethanol

2.9 RNA-Agarosegelelektrophorese [Lehrach et al., 1977]

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden Agarosegele mit einer Endkonzentration von 1% Agarose verwendet, und wie folgt hergestellt: 1,5 g Agarose wurde mit 15 ml 10 x MOPS-Puffer (pH 8,0) und 121 ml Wasser aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt. Dann wurden 24 ml 36%ige Formaldehydlösung hinzugegeben, die Mischung in eine Flachbett-Gelapparatur (12,5 cm x 20 cm) gegossen und das Gel nach Erhärten mit MOPS-Puffer (pH 7,0) überschichtet. Die RNA wurde mit 1/3 Volumen RNA-Puffer versetzt, fünf Minuten bei 68 °C denaturiert und nach Zugabe von 2 µl RNA-Farbmarker sofort auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei einer Spannung von 2 V/cm.

<u>RNA-Puffer:</u>	<u>RNA-Farbmarker:</u>	<u>10x MOPS (pH 7/pH 8):</u>
50 % Formamid	50 % Saccharose	20 mM MOPS
6 % Formaldehyd	0,25 % Bromphenolblau	50 mM Natriumacetat
in MOPS-Puffer (pH 7,0)	in Wasser	1 mM EDTA
		in Wasser

2.10 Northern-Blot-Analyse

Nach der Elektrophorese wurden die RNA-Gele zunächst fünf Minuten in Wasser und anschließend fünf Minuten in 20 x SSC-Lösung gewaschen. Der Transfer auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht in 20 x SSC Lösung analog zur Southern-Blot-Analyse (s. Abschnitt E2.7). Die Membranen wurden nach dem Transfer in 2 x SSC-Lösung gewaschen, kurz getrocknet und im UV-Crosslinker bestrahlt.

2.11 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit dem Stratagene Prime^â It II-Kit

Die zur Markierung verwendete DNA wurde mit Restriktionsenzymen aus Plasmiden geschnitten oder durch PCR-Reaktion (s. Abschnitt E 2.14) gewonnen. Es wurden ungefähr 25 ng DNA mit Wasser zu einem Endvolumen von 24 µl aufgefüllt und mit 10 µl „random-oligonucleotide-primer“ versetzt. Die Sonde wurde fünf Minuten auf 92 °C erhitzt, zwei Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend mit 10 µl 5 x Primer-Puffer, 5 µl α-³²P-dATP (50 µCi) und 2 U Klenow-Enzym versetzt. Der Reaktionsansatz wurde zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Zentrifugation bei 3.000 x g für zwei Minuten über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-Puffer abgetrennt. Die radioaktiv markierte Probe wurde vor ihrem Einsatz im Southern- oder Northern-Blot-Analyse bei 100 °C für zehn Minuten denaturiert fünf Minuten auf Eis abgekühlt und danach mit 15 bis 25 ml Hybridisierungspuffer gemischt.

2.12 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden

Die hier angeführten Hybridisierungsbedingungen sind eine Abwandlung der von **M. C. Mehdy** (1983) veröffentlichten Technik. Die mit 2 x SSC-Lösung angefeuchtete Nylonmembran wurde in einer Glashybridisierungsröhre für dreißig Minuten mit 10 ml Hybridisierungspuffer bei 37 °C in einem Röhrenofen vorhybridisiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der radioaktiven Sonde an die Membran wurde während der Vorhybridisierung 100 µl denaturiertes Heringssperma (10 mg/ml; Sigma) zur Lösung gegeben. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Probe zur Vorhybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung für achtzehn Stunden bei 37 °C. Danach wurde die radioaktive Probe abgossen und die Membran zweimal kurz mit Waschpuffer behandelt. Anschließend wurde zweimal eine halbe Stunde bei 37 °C mit Waschpuffer gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Membran in Polyethylen-Folie verpackt und ein Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -70 °C exponiert.

Hybridisierungspuffer (pH 7,15):

50 % Formamid
1 % Natriumlaurylsarcosinat
2 mM EDTA (pH 7,2)
0,2 % SDS
0,12 M Phosphatpuffer (pH 6,8)
in 2 x SSC
4 x Denhardt´s Reagenz

Waschpuffer (pH 7,15):

Hybridisierungspuffer
ohne 4x Denhardts Reagenz

Bei der Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA wurden bei sonst gleicher Vorgehensweise andere Hybridisierungsbedingungen gewählt. Die Hybridisierung erfolgte in Church-Puffer bei 65°C, gewaschen wurde zweimal für etwa 20 Minuten bei 40-50°C mit Church-Waschpuffer.

Church-Puffer:

0,5 M NaPO₄ (pH 7,15)
7 % SDS
1 mM EDTA

Church-Waschpuffer:

40 mM NaPO₄ (pH 7,15)
1 % SDS
1 mM EDTA

2.13 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „NucleoSpin Extract 2 in 1“-Kit der Firma Macherey-Nagel. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Restriktionsfragmente wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel im UV-Licht betrachtet und die Bande des gewünschten DNA-Fragments mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Das Gelstück wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Zu je 100 mg Agarosegel wurden jeweils 300 µl Puffer NT 1 pipettiert. Die Probe wurde zehn Minuten auf 50 °C erwärmt, zwischendurch geschüttelt und anschließend auf eine NucleoSpin-Säule geladen. Nach Zentrifugation bei 6.000 x g für eine Minute wird der Durchfluss verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit je 700 µl Puffer NT3 und Zentrifugation bei 10.000 x g für eine Minute. Nach erneuter Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit ohne Zugabe des Puffers NT3 wurde die Säule in ein sauberes 1,5 ml Gefäß überführt. Anschließend wurde mit 50 µl Puffer NE eluiert.

2.15.3 Überführung überstehender Enden in glatte Enden

Viele Restriktionsenzyme erzeugen kohäsive Enden mit einem 5'- oder 3'-überstehenden Ende. 5'-DNA-Überhänge können mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt werden. Der den 3'-Überhang tragende DNA-Strang kann von der T₄-Polymerase abgebaut und nach Zugabe von Nukleotiden wieder zu einem glatten Ende aufgefüllt werden.

- a) Reaktionsansatz für das Klenow-Enzym:
- | |
|---------------------------------|
| 1 µg DNA |
| 2 µl 10 x NT-Puffer |
| 2 µl d(ATP/GTP/TTP/CTP), je 1mM |
| 1 U Klenow-Enzym |
| mit Wasser auf 20 µl auffüllen |

Der Reaktionsansatz wurde dreißig Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch zehnminütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Die DNA wurde nach Zugabe des DNA-Probenpuffers in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel isoliert (s. Abschnitt E 2.13).

- b) Reaktionsansatz für die T₄-Polymerase:
- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1 µg DNA | 10 x T ₄ -Pol.-Puffer (pH 7,9): |
| 2 µl 10 x T ₄ -Pol.-Puffer | 330 mM Tris-Acetat |
| 1-2 U T ₄ -Polymerase | 660 mM Kaliumacetat |
| mit Wasser auf 18 µl auffüllen | 100 mM Magnesiumacetat |
| | 5 mM DTT |
| | 2 µl d(ATP/GTP/TTPCTP), je 5 mM |
| | 1 mg/ml Rinderserumalbumin |

Nach Zugabe der T₄-Polymerase wurde zwei Minuten bei 37 °C, nach Zugabe der Nukleotide weitere fünfzehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit dem zweifachen Volumen Ethanol gefällt.

2.15.4 Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten

Die T₄-DNA-Ligase katalysiert die Ligation von DNA-Fragmenten und entsprechend hydrolysiertes Vektor-DNA. Zur Verbindung glatter Enden wurde vierundzwanzig Stunden bei 21 °C, zur Verbindung überhängender Enden zwölf bis sechzehn Stunden bei 8 °C im vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer inkubiert. Für die Ligation kleiner Fragmente (< 1000 Bp) wurde ein etwa zehnfach molarer Überschuss des Fragments eingesetzt, große Fragmente (> 3000 Bp) wurden mit der halben Menge Vektor ligiert. Die verwendeten Vektoren waren in der Regel dephosphoryliert.

Reaktionsansatz:

linearisierte Vektor-DNA (200-400 ng)
DNA Fragment
2 µl Ligationspuffer
1 µl 10 mM ATP
2 µl T₄-Ligase
mit Wasser auf 20 µl auffüllen

Ligationspuffer:

660 mM Tris/HCl, pH 7,6
100 mM MgCl₂
10 mM Spermidin

2.16 Saccharosegradient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe [Sambrook *et al.*, 1989]

Diese Methode wird genutzt, um mit einem Restriktionsenzym verdaute genomische DNA nach der Größe der entstandenen Fragmente zu fraktionieren. DNA-Fractionen, die die gewünschten Fragmente enthalten, können für Ligationen eingesetzt werden. 600 µg DNA wurden mit einem Restriktionsenzym über Nacht verdaut (s. Abschnitt E 2.15.1) und am nächsten Tag auf eine vorbereitete Saccharose-Lösung in einem für Ultrazentrifugation geeignetem PE-Röhrchen gegeben. Die Saccharose-Lösung wurde zuvor über Nacht bei -80 °C gefroren und unter Vermeidung von Erschütterungen wieder aufgetaut, damit bei der Überschichtung der Saccharose-Lösung mit dem Restriktionsansatz keine Vermischung der beiden Lösungen auftritt. Im Anschluss wurde mindestens sechzehn Stunden bei 30.000 UpM und 15 °C unter Verwendung des Rotors SW 41 und bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Bei der Zentrifugation bildet sich in dem Röhrchen ein Saccharose-Dichtegradient, dementsprechend verteilen sich die DNA-Fragmente nach ihrer Größe.

Das Röhrchen wurden vorsichtig unter Vermeidung von Erschütterungen in eine Halterung gespannt, mit der in den Boden des Röhrchens ein Loch gebohrt wurde. Durch einen Schlauch wurden 1 ml-Fractionen entnommen. Diese Fractionen wurden mit je 1 ml Isopropanol gefällt und fünfzehn Minuten bei 13.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde mit 100 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst. 10-20 µl jeder Fraction wurden auf ein 0,7 %iges Agarosegel aufgetragen, welches zum Southern-Blot (s. Abschnitt E 2.7) genutzt wurde. Der Blot wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (s. Abschnitte E 2.11 und E 2.12) um die Fractionen mit der genomischen DNA von Interesse auswählen zu können.

<u>2 x Saccharose-Puffer:</u>	100 mM Tris/HCl pH (7,4)
	100 mM NaCl
	10 mM EDTA
	12,5 ml 2 x Sucrose-Puffer werden nach Zugabe von
	3,75 g Sucrose mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt

2.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann bei Wahl geeigneter Oligonukleotide zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Abschnitten verwendet werden [Saiki *et al.*, 1985]. Dazu werden eine doppelsträngige DNA-Vorlage und zwei begrenzende Oligonukleotide (Primer) einer kontinuierlich aufeinanderfolgenden Reihe von Denaturierungen, Primer-Hybridisierungen und DNA-Polymerisierungen in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und hitzeresistenter *Taq*-DNA-Polymerase [Chien *et al.*, 1976] ausgesetzt. Die Oligonukleotide können an den Enden einen Überhang von nicht hybridisierenden Nukleotiden haben, mit deren Hilfe andere Sequenzen, wie z. B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, eingeführt werden können. Um die DNA-Vorlage zu Beginn der Reaktion vollständig zu denaturieren, wurde für den ersten Zyklus eine Denaturierungsdauer von vier Minuten bei 94 °C gewählt. Für den letzten Zyklus wurde eine Polymerisationsdauer von zehn Minuten benutzt, um vollständig polymerisierte Endprodukte zu erhalten. Die Hybridisierungstemperatur (T_H) eines bestimmten Oligonukleotids wurde anhand seiner Basenzusammensetzung folgendermaßen abgeschätzt [Suggs *et al.*, 1981]:

$$T_H = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 2$$

Mit einem programmierbaren „Thermocycler“ werden die Zyklen automatisch gesteuert. Die DNA kann aus Agarosegelen isoliert werden (s. Abschnitt E 2.13).

<u>Reaktionsansatz:</u>	<u>10 x <i>Taq</i>-Polymerase-Puffer:</u>
0,5 µg Plasmid-DNA	100 mM Tris/HCl (pH 8,3)
2 µl Oligonukleotid A (10 pmol/ml)	500 mM KCl
2 µl Oligonukleotid B (10 pmol/ml)	0,1 % (w/v) Gelatine
5 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	
5 µl 10 x <i>Taq</i> -Polymerase Puffer	
1 µl <i>Taq</i> -Polymerase (3-4 U)	
mit Wasser auf 50 µl auffüllen	

Die Reaktionsparameter (Temperaturen, Zeiten) wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst. Die Hybridisierungstemperatur wurde so gewählt, dass sie etwa 2 °C unter der

geschätzten Schmelztemperatur der Primer lag. Das Standard-PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

- I. Initiale Denaturierung: 94 °C, 4 min
- II. Temperaturzyklus (25-35 Zyklen):
 - Denaturierung (94 °C, 1 min)
 - Hybridisierung (58-64 °C, 1 min)
 - Verlängerung (72 °C, 30-120 sek)
- III. Terminale Verlängerung: 72 °C, 10 min
- IV. Kühlung auf 4 °C

2.18 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, das RNA in DNA umschreiben kann. In dieser Arbeit wurde für die RT-Reaktion Gesamt-RNA verwendet. Für die Retranskription in cDNA wurden Hexanukleotide ($p(dN)_6$) gewählt, die während der Reaktion an beliebigen Stellen der RNA binden und so die Synthese vieler cDNA-Stränge ermöglichen.

Für die RT-Reaktion wurden 400 ng Gesamt-RNA eingesetzt und nach dem folgenden Protokoll in cDNA umgeschrieben:

- 0,5 µl 10 mM dNTP-Mix
- 1 µl 50 µM $p(dN)_6$
- 0,5 µl M-MLV-Transkriptase (Promega)
- 2 µl 5 x RT-Puffer
- 0,5 µl RNAsin (40 U/µl; Promega)
- 400 ng Gesamt-RNA
- Wasser auf 10 µl
- 1 h Inkubation bei 37 °C

Die Ansätze wurden anschließend zur PCR eingesetzt.

Die PCR-Produkte wurden in Agarosegelen gelelektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel eluiert. Die Amplifikate wurden in den Vektor pGemTeasy nach Angaben des Herstellers (Promega) ligiert.

2.19 Transformation von *E. coli*-Zellen

2.19.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation

1 l LB-Medium wurde mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C mit 250 UpM kultiviert, bis eine OD_{600} von 0,5 erreicht war. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und dann

bei 3000 x g und 4 °C zehn Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit insgesamt 1 l autoklaviertem, eiskaltem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 50 ml 15 %igem autoklaviertem, eiskaltem Glycerin resuspendiert und bei 3.000 x g und 4 °C pelletiert. Nach erneutem Resuspendieren in 1 bis 2 ml 15 %igem Glycerin wurden 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.19.2 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation

Zur Transformation wurden die Zellen (50 µl) auf Eis aufgetaut und 1 µg Plasmid-DNA oder die Hälfte eines Ligationsansatzes zupipettiert. Nach zehn Minuten wurde das Zell-Plasmid-Gemisch in eine eiskalte Elektroporationsküvette gefüllt und die Zellen bei 200 Ω, 2,5 kV und 25 µF transformiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SOC Medium [Sambrook *et al.*, 1989] aufgenommen, 45 Minuten bei 37 °C inkubiert und 50 und 250 µl Aliquots auf die entsprechenden Selektionsagarplatten ausplattiert.

2.19.3 *E. coli*-Dauerkulturen

Wichtige Transformanten werden als Dauerkultur konserviert. Dazu wurden diese als Übernachtskultur in LB-Selektions-Medium angezogen, pelletiert und mit 15 %igem Glycerin resuspendiert und bei -80 °C eingefroren.

3. **Proteinchemische und immunologische Methoden**

3.1 **Induktion und Extraktion rekombinanter Proteine**

Für die Expression rekombinanter Proteine unter der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren $\phi T7p$ -Promotors wurden die *E. coli* Stämme BL21(DE3), XL1 blue und M15 verwendet. Übernachtskulturen der entsprechenden Transformanten wurden 1:100 in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt, und bis zu einer OD_{600} von 0,7 unter Schütteln (250 UpM) inkubiert. Die Expression rekombinanter Proteine wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Endkonzentration) induziert, die Zellen wurden anschließend weitere 4 h bei 37 °C geschüttelt und nach der Ernte durch Zentrifugation (10.000 x g, 10 min) in Lysis-Puffer resuspendiert. Hier ist zu unterscheiden, ob das pQE- oder pGEX-2T- Expressionssystem verwendet wurde. Das Produkt der Expression mit dem pQE-System ist das in den Vektor klonierte Protein in Fusion mit einem „6His-Tag“. Dieser ermöglicht die affinitätschromatographische Reinigung des Proteins mit „Ni-NTA-Sepharose“. Bei

Verwendung des Vektors pGEX-2T ist das exprimierte Protein mit Glutathion-S-Blotase fusioniert, um die Reinigung mit Glutathion-Sepharose zu erleichtern.

3.1.1 Reinigung rekombinanter Proteine nach Qiagen (pQE-System)

Das Pellet wurde in 4 ml Lysis-Puffer/g Feuchtgewicht Bakterien resuspendiert und mit 1 mg/ml Lysozym 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach sechsmaliger Ultraschallbehandlung für jeweils zehn Sekunden wurde das Lysat für 30 Minuten bei 10.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Zu 4 ml des Überstands wurde 1 ml einer mit Lysis-Puffer äquilibrierten 50 %igen Ni-NTA-Sepharose gegeben und eine Stunde bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde eine Minute bei 1000 x g und 4 °C abzentrifugiert und die Sepharose fünfmal mit dem doppelten Volumen Wasch-Puffer gewaschen. Danach wurde fünfmal mit einfachem Volumen Elutions-Puffer eluiert, wobei nach jeder Pufferzugabe fünf Minuten inkubiert wurde. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Abschnitt E 3.4) analysiert.

Lysis-Puffer:

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
mit NaOH pH 8 einstellen
einstellen

Wasch-Puffer:

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
20 mM Imidazol
mit NaOH pH 8 einstellen

Elutions-Puffer:

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
mit NaOH pH 8

3.1.2 Reinigung rekombinanter Proteine mit pGEX-2T-Expressionssystem

[Smith, 1993]

Das Zellpellet von 20 ml Bakterienkultur wurde in 10 ml Puffer A resuspendiert und mit 10 µl 1M DTT und 1mg Lysozym versetzt. Nach fünfzehnminütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat dreimal für jeweils 20 Sekunden mit Ultraschall behandelt und eine Stunde bei 18.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 100 µl mit Puffer B äquilibrierter Glutathion-Agarose-Matrix gegeben, die Mischung wurde mit 1 % Triton X100 versetzt und 30 Minuten bei 4 °C geschüttelt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 700 UpM wurde einmal mit Puffer B und 1 % Triton X100 und danach zweimal nur mit Puffer B gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution. Hierzu wurden dreimal 6-8 mg Glutathion in Reaktionsgefäßen abgewogen und unmittelbar vor der Verwendung in 2 ml Puffer C gelöst. Diese Lösung wurde mit der Matrix vermischt, zwei Minuten inkubiert und abzentrifugiert (700

UpM, 1 min). Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und die proteinhaltigen Überstände mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s Abschnitt E 3.4) analysiert.

Puffer A:

25 mM Tris/HCl (pH 7,5)
0,5 mM EDTA
1mM DTT
10 % Sucrose

Puffer B:

25 mM Tris/HCl (pH 7,5)
0,5 mM EDTA
1 mM DTT

Puffer C:

1 M Tris/HCl (pH 8,0)
100 mM NaCl

3.2 Herstellung von Proteinhomogenaten aus Organen der Maus

Die Organe wurden durch zervikale Dislokation getöteten Tieren entnommen und entweder sofort weiterverarbeitet oder zur Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. 100 mg Organewebe wurde mit 6 Volumen kaltem TEDABP-Puffer versetzt, mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Homogenat zentrifugiert (30.000 x g, 20 min) und Überstand und Pellet analysiert bzw. bei -80 °C gelagert. Um mehrmaliges Auftauen zu vermeiden, wurde das Homogenat aliquotiert.

TEDABP-Puffer:

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM DTT
1 mM EGTA
0,02 % Natriumazid
1 mM Benzamidin
0,5 mM PMSF

3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmungen wurden nach der von **M. M. Bradford** (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Bindung von Coomassie „Brilliant Blue“ G 250 an Proteine. Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm verschoben. Zur Erstellung der Eichkurve wird Rinderserumalbumin als Standard verwendet. Sowohl für die Probe als auch für den Standard wurden für jeden Ansatz 33 µl Proteinlösung mit 33 µl Wasser versetzt. Anschließend wurde 1 ml Bradford-Reagenz (Sigma) hinzugegeben und nach fünf Minuten die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen.

3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970]

Für die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese wurden 10 bis 15 %ige Trenngele in einer Größe von 7,5 cm x 10 cm x 0,05 cm mit 5 %igem Sammelgel verwendet (siehe Tabelle E 1). Zu den aufzutrennenden Proteinlösungen wurden je nach Bedarf unterschiedliche Mengen an 5 x SDS-Probenpuffer gegeben und die Mischung fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei einer Spannung zwischen 100 und 180 V in 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer. Als Standard diente ein Gemisch von Proteinen definierter Molekülmassen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie-Blau (s. Abschnitt E 3.6) gefärbt oder durch Western-Blot (s. Abschnitt E 3.5) auf Nitrocellulose übertragen.

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12 %	15 %	5 %
Acrylamid ²⁾ 30:0,8 [ml]	19,7	23,6	30	3,4
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 [ml]	16	16	16	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 [ml]				2
10 % SDS [µl]	590	590	590	200
TEMED [µl]	23	23	23	8
10 % APS [µl]	165	165	165	80
Wasser [ml]	23,5	19,6	13,2	14,3

Tab. E 3.1: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele ¹⁾ Mengenangaben für 12 Minigele;

²⁾ Acrylamid : Bisacrylamid

5 x SDS-Probenpuffer:

2,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,5
 4,0 ml 10 % Natriumdodecylsulfat
 2,0 ml Glycerin
 1,0 ml 14,3 M β -Mercaptoethanol
 200 µl 10 % Bromphenolblau

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer:

0,25 M Tris
 1,9 M Glycin
 1 % Natriumdodecylsulfat

Molekülmassenstandard:

LMW-Marker (Pharmacia) (kDa): 94; 67; 43; 30; 24; 20,1; 14,4

3.7 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrozellulose

Nitrozellulosemembranen wurden nach dem Protein-Transfer über Nacht mit 1 % Magermilchpulver in NCP-Puffer abgesättigt. Danach wurden sie mit Hybridomaüberständen oder polyklonalen Antisera für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran sechsmal für fünf Minuten mit NCP-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit einem sekundären Antikörper (1:10.000 in NCP-Puffer verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Rahmen dieser Arbeit handelte es sich um einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus- oder Ziege-anti-Kaninchen IgG-Antikörper. Nicht gebundene Antikörper wurden durch sechsfaches Waschen mit NCP-Puffer für je fünf Minuten entfernt. Die Immunmarkierung wurde mit Hilfe von Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dabei oxidiert die am sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase Luminol, was zu einer Lichtreaktion bei 430 nm führt. Diese verursacht eine Schwärzung des Röntgenfilms. Die Membran wurde kurz in der Luminollösung inkubiert und ein Röntgenfilm für fünf Sekunden bis 30 Minuten exponiert.

Luminol: 2 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,0)
 200 µl (0,25 M in DMSO) 3-Aminonaphthylhydrazid
 89 µl (0,1 M in DMSO) p-Cumarsäure
 18 ml Wasser
 6,1 µl 30 %ige H₂O₂-Lösung

3.8 Produktion und Reinigung polyklonaler anti-Peptid-Antikörper [Walter *et al.*, 1980]

3.8.1 Kopplung von Peptiden an KLH

Die zuvor auf ihre Hydrophilie überprüften [Kyte und Doolittle, 1982] käuflich erworbenen Peptide (ZMMK-Service-Labor) wurden zunächst an „Keyhole Limpet Hemocyanine“ (Haemocyanin der Schnecke *Megathura crenulata*, KLH), gekoppelt. KLH dient als Trägerprotein, um überhaupt eine Immunantwort hervorzurufen. Es wurde mit Glutaraldehyd gekoppelt, welches Peptid und Trägerprotein über Aminogruppen verknüpft. In einem 15 ml-Glasröhrchen wurden 10 mg KLH in 2 ml Borat-Puffer (pH 10,0) unter Schütteln gelöst. Anschließend wurden 10 µg Peptid zugegeben und langsam unter Rühren mit 1 ml einer 0,3 %igen Glutaraldehyd-Lösung versetzt. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden 250 µl 1 M Glycin zugegeben und eine halbe Stunde weiter gerührt um über-

schüssiges Glutaraldehyd abzufangen. Die Reaktionslösung wurde anschließend über Nacht bei 4 °C gegen 3 l Phosphatpuffer (pH 8,0) dialysiert. Am nächsten Morgen wurde der Dialysepuffer gewechselt und für weitere vier Stunden dialysiert. Das Protein-Peptid-Konjugat wurde bis zur Immunisierung bei 4 °C gelagert.

Borat-Puffer (pH 10,0) 0,1 M: 0,618 g Borsäure
95 ml Wasser zugeben und mit 10 M NaOH pH 10,0
einstellen, anschließend mit Wasser auf 100 ml auffüllen

Phosphat-Puffer (pH 8,0) 20 mM: 18,64 ml 1 M Na_2HPO_4
1,36 ml 1 M NaH_2PO_4
mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

Glutaraldehyd-Lösung: 120 μl 25 % Glutaraldehyd
9,88 ml Borat-Puffer (pH 10,0)
unmittelbar vor Gebrauch ansetzen

3.8.2 Immunisierung

Die Immunisierung wurde von der Firma Eurogentech in Belgien durchgeführt. Immunisiert wurden zwei Kaninchen je Peptid. Zunächst wurden etwa 5 ml Präimmunserum pro Tier entnommen. Anschließend wurde jedes Tier mit 200 μg Peptid-Protein-Konjugat dreimal im Abstand von zwei Wochen immunisiert. Fünf Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgte die Entnahme von etwa 5 ml Serum und nach acht Wochen eine weitere Immunisierung. Nach weiteren 10 Tagen wurden etwa 20 ml Serum entnommen. Alle Seren wurden mit Western-Blot (s. Abschnitt E 3.5) analysiert. Solange keine genügende Immunreaktion nachgewiesen werden konnte, wurde die Immunisierung in monatlichen Abständen wiederholt. Wenn ausreichend Antikörper im Serum nachweisbar war, wurden die Tiere getötet, um das Antiserum vollständig (50-70 ml) zu entnehmen.

3.8.3 Reinigung

Die Reinigung erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurde das Antiserum zur Entfernung von nicht-Protein-Anteilen mit Ammoniumsulfat gefällt. Nach einer Aufreinigung aller Immunglobuline mit Protein-A-Sepharose wurde dann der Antikörper mit Affinitätschromatographie gereinigt.

Ammoniumsulfatfällung:

20 ml gefrorenes Antiserum wurden über Nacht bei 4 °C aufgetaut und unter ständigem Rühren innerhalb einer halben Stunde mit 22 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Anschließend wurde vierundzwanzig Stunden bei 4 °C gerührt und das Präzipitat zwanzig Minuten bei 8000 UpM und 4 °C abzentrifugiert.

Gesättigte Ammoniumsulfatlösung:

541,77 g Ammoniumsulfat
Unter Rühren in dest. Wasser (25 °C) geben, bis
sich nichts mehr löst

Protein-A-Sepharose-Säule:

Das Pellet der Ammoniumsulfat-Fällung wurde in 40 ml Dialysepuffer, pH 8,9 gelöst und über Nacht bei 4 °C gegen 2 l Dialysepuffer dialysiert. Der Puffer wurde zweimal vollständig gewechselt. Das Dialysat wurde zwanzig Minuten bei 10.000 UpM und 4 °C zentrifugiert und der Niederschlag verworfen. Der Überstand wurde mit festem NaCl versetzt, bis eine Konzentration von 3 M erreicht war. Diese Lösung wurde bei 4 °C auf eine Protein-A-Sepharose-Säule aufgetragen und auf dieser mit einer Peristaltikpumpe mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 ml/h über Nacht zirkuliert. Danach wurde die Säule mit 100 ml Waschpuffer gewaschen und die Immunoglobuline mit 0,1 M Zitronensäure pH 3,5 in 25 Fraktionen von 1 ml eluiert. Für die Elution war die Peristaltikpumpe auf einen Durchfluss von 5 ml/h eingestellt, die Fraktionen wurden durch Vorlage von 100 µl 2 M Tris pH 9,0 neutralisiert. Die Säule wurde zur Regeneration mit 0,1 M Zitronensäure pH 3 gewaschen, bis der Durchfluss einen pH Wert von 8,9 aufwies.

Die OD der gesammelten Fraktionen wurde bei 280 nm gegen Elutionspuffer gemessen. Fraktionen mit einer OD₂₈₀ größer 1,5 wurden weiter verwendet, die übrigen verworfen. Die Antikörperlösungen wurden gegen 1 l PBS über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die Reinigung wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. Abschnitt E 3.4) überprüft und die Proteinkonzentration bestimmt (s. Abschnitt E 3.3).

Dialysepuffer:

100 mM Tris (pH 8,9)

Waschpuffer:

100 mM Tris (pH 8,9)
3M NaCl

Säulenmaterial :

1,5 g Protein-A-Sepharose 4 CL B
20 min. bei Raumtemperatur in dest. Wasser quellen
blasenfrei in Säule gießen, bei 4 °C mit Waschpuffer äquilibrieren

Affinitätsreinigung:

600 µl CNBr-4B-Sepharose wurden mit 100 ml 1 mM HCl aktiviert und 1 mg rekombinantes Antigen in Kupplungspuffer wurden über Nacht bei 4 °C an diese Matrix gekoppelt. Anschließend wurde bei 1000 x g abzentrifugiert und zur Absättigung freier Bindungsstellen zwei Stunden mit 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 bei Raumtemperatur inkubiert. Die Matrix wurde in eine Chromatographiesäule gegossen und nacheinander mit dem zehnfachen Säulenvolumen der folgenden Puffern gewaschen:

0,1 M Natriumacetat (pH 4,0), 5 M NaCl

0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 5 M NaCl

10 mM Tris/HCl (pH 7,5)

100 mM Glycin (pH 2,5)

10 mM Tris/HCl (pH 8,8)

100 mM Triethylamin (pH 11,5)

10 mM Tris/HCl (pH 7,5)

1 ml der Antikörperlösung wurde 1,5 Stunden bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der klare Überstand mit 9 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 verdünnt. Diese Lösung wurde bei 4 °C auf die Affinitätssäule aufgetragen und auf dieser mit einer Peristaltikpumpe mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 ml/h über Nacht zirkuliert. Anschließend wurde mit dem zehnfachen Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl gewaschen. Die Antikörper wurden mit 100 mM Glycin pH 2,5 in 25 Fraktionen von 200 µl eluiert. Für die Elution war die Peristaltikpumpe auf einen Durchfluss von 5 ml/h eingestellt, die Fraktionen wurden durch Vorlage von 200 µl 1 M Tris/HCl pH 8,8 neutralisiert. Analog wurde nachfolgend mit 100 mM Triethylamin pH 11,5 eluiert. Die OD der gesammelten Fraktionen wurde bei 280 nm gegen Elutionspuffer gemessen um die antikörperhaltigen Fraktionen auswählen zu können.

4. Kultur von *Dictyostelium discoideum*

4.1 Anzucht in Flüssigmedium

AX2 und Transformanten wurden von SM-Agarplatten in AX2- Medium angeimpft. Um die Kulturen von *Klebsiella aerogenes* zu befreien, wurden die *D. discoideum* Zellen in Dihydrostreptomycinsulfat (40 µg/ml) enthaltendes Medium überführt. Die Generationszeit von AX2-Zellen in Schüttelkultur betrug in 300 ml Kulturen bei 21 °C und 160 UpM etwa neun bis zehn Stunden. Bei allen zellbiologischen Untersuchungen wurden die Zellen bis zu einer Dichte von maximal 5×10^6 Zellen/ml angezogen. Ab dieser Zelldichte beginnt das Wachstum in die stationäre Phase überzugehen.

4.2 Anzucht auf Agarplatten

Zum Klonieren von Transformanten wurden SM-Agarplatten verwendet. Hierzu wurden je 0,1 ml einer dichten *K. aerogenes* Suspension in Salzlösung auf vorgetrockneten SM-Platten ausgestrichen, die *D. discoideum*-Zellen ausgebracht und die Platten bei 21 °C ca. 3 Tage inkubiert. Die Generationszeit betrug hierbei 3 bis 4 Stunden. *D. discoideum* Kolonien zeigten sich als klare Fresshöfe auf dem Bakterienrasen. Die Klone konnten auch mit Hilfe eines Animpfstäbchens auf SM-Platten übergeimpft werden, die zuvor mit *K. aerogenes* bestrichen worden waren.

4.3 Anzucht in Bakteriensuspension

Zunächst wurde eine Suspension von 10^{11} Bakterien/ml in Sörensen-Phosphat-Puffer angesetzt. Hierzu wurden entweder *Klebsiella aerogenes* angezogen und vor der Verwendung autoklaviert oder lebende *E. coli* B/r [Rivero *et al.*, 1996] verwendet. 5 ml dieser Suspensionen wurden mit 5×10^4 Zellen/ml der verschiedenen *D. discoideum*-Stämme angeimpft.

4.4 Einfrieren von *D. discoideum*-Zellen

Zur Konservierung von *D. discoideum*-Zellen wurden axenisch gewachsene Zellen geerntet und mit einer Dichte von 5×10^7 Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots auf Einfrier Röhrchen (Nunc, 1,8 ml) verteilt, die zwei Stunden auf Eis gehalten wurden. Nach weiteren zwei Stunden bei -20 °C wurden die Ampullen bei -80 °C gelagert. Um eingefrorene Zellen wieder anzuziehen, wurde ein Aliquot

reszenzmarkierung wurden vegetative Zellen verwendet. Zellen der Wachstumsphase wurden bis zu einer Zelldichte von $2-5 \times 10^6$ Zellen/ml angezogen, abzentrifugiert (4 min, $780 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), in Phosphatpuffer gewaschen und auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. 200 μl dieser Zellsuspension wurden auf ein Deckgläschen (Durchmesser 18 mm) pipettiert und die Zellen fünfzehn Minuten absitzen gelassen. Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Zellen entweder mit kaltem Methanol oder mit einer Paraformaldehyd/Pikrinsäure Lösung fixiert. Für die Methanolfixierung wurden die Deckgläser für zehn Minuten in $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ kaltes Methanol gegeben. Bei Fixierung mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure wurden die Deckgläser mit je 300 μl einer Paraformaldehyd/Pikrinsäure Lösung überschichtet und dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Fixierungsmittel abgezogen und die Deckgläser fünf Minuten mit 10 mM PIPES, pH 6,0 gewaschen. Die nachfolgende Behandlung erfolgte bei beiden Fixierungsmethoden gleich. Die Deckgläser wurden 3 x 5 Minuten mit PBS/Glycin und 2 x 15 min mit PBG gewaschen und für 1-3 Stunden mit dem Antikörper enthaltenden Hybridomaüberstand inkubiert. Der erste Antikörper wurde entfernt, die Präparate 6 x 5 Minuten mit PBG gewaschen und für eine Stunde mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten anti-Maus-Antikörper und DAPI (1:1000 Verdünnung in PBG) inkubiert. Nach 2 x 5 Minuten Waschen mit PBG und 3 x 5 Minuten Waschen mit PBS wurden die Präparate kurz in Wasser getaucht, anschließend in Gelvatol eingebettet und zum Aushärten über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

PBS/Glycin:

50 mM Glycin in 1 x PBS

Paraformaldehyd / Pikrinsäure:

0,4 g Paraformaldehyd in 7 ml H_2O bei 40°C mit 2-3 Tropfen NaOH (2 M) lösen und 10 ml PIPES (20 mM, pH 6,0) und 3 ml gesättigte Pikrinsäure zugeben.

Gelvatol:

20 g Gelvatol 20-30 (Polyvinylglykol, MW 10.000) in PBS 16 h rühren 40 ml Glycerin zugeben, 16 h rühren
5 min bei $12.000 \times g$ zentrifugieren
25 ng/ml DABCO [Langanger *et al.*, 1983] zum Überstand geben
Lagerung aliquotiert bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$

5.2 Indirekte Immunfluoreszenz von *D. discoideum*-Zellen mit phagozytierten Hefen

D. discoideum-Zellen wurden wie bereits beschrieben (s. Abschnitt E 5.1) auf Deckgläschen gebracht und absitzen gelassen. Nach fünfzehn Minuten wurde die Flüssigkeit entfernt. Unmarkierte Hefen mit einer Zelldichte von 1×10^9 Zellen/ml wurden 1:10 in Soerensen-Phosphat-Puffer verdünnt. 300 μ l der Hefesuspension wurden auf die Deckgläschen pipettiert, anschließend wurde dreißig Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Methanol oder Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixiert (s. Abschnitt E 5.1)

5.3 Hyper- und Hypoosmotischer Schock

D. discoideum-Zellen des Wildtyps AX2 sowie der Mutanten 34⁻, B1 und FG2 wurden wie bei den Experimenten zur indirekten Immunfluoreszenz (s. Abschnitt E 5.1) auf Deckgläschen gebracht und absitzen gelassen. Für den hyperosmotischen Schock wurden 300 μ l einer 0,4 M Sorbitollösung auf die Deckgläschen pipettiert, für den hypoosmotischen Schock wurden stattdessen 300 μ l deionisiertes Wasser verwendet. Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle dienten in AX2-Medium inkubierte Zellen. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit monoklonalen Hybridomaüberständen von anti-Aktin-Antikörper mAK Act 1-7, anti-Comitin-Antikörper mAK 190-340-2, anti-PDI-Antikörper mAk 221-135-1, anti-V/H⁺-ATPase-Antikörper mAK 221-35-2, anti-Vakuolin-Antikörper mAk 221-1-1 und anti-Kohlenhydrat-Epitop-lysosomaler Enzyme mAk 221-342-5 markiert.

5.4 Fluoreszenzmikroskopie

Für die konfokale Lasermikroskopie wurde ein von der Fa. Leica entwickeltes CLSM-SP-Mikroskop benutzt, das optische Schnitte durch die Präparate erlaubt. Die Präparate konnten bei 63-facher Vergrößerung (PL APO 63x/1,32-0,6/ Öl) betrachtet werden. Das Gerät ist mit einem Krypton- (565 nm) und einem Argonlaser (488) ausgestattet und ermöglicht elektronische Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen. Der Emissionsbereich des zu empfangenden Signals kann durch ein softwaregesteuertes Spektralphotometer eingegrenzt werden, so dass Kreuzanregungen durch die beiden Laser verhindert werden können. Die Daten wurden mit dem Bildverarbeitungssystem der Fa. Leica weiterverarbeitet.

5.5 Phagozytose von fluoreszenzmarkierten Hefen [Maniak *et al.*, 1995]

Zur Herstellung fluoreszenzmarkierter YSC-Hefen (Sigma) wurden 5 g Hefen in 50 ml PBS suspendiert und dreißig Minuten unter Rühren erhitzt. Anschließend wurden die Zellen fünfmal mit PBS und danach zweimal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Es wurde eine Zelldichte von 10^9 Zellen/ml eingestellt. Aliquots lassen sich bei einer Temperatur von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahren. Zur Fluoreszenzmarkierung wurden 2×10^{10} dieser vorbereiteten Zellen in 20 ml 50 mM Na_2HPO_4 -Lösung, pH 9,2, die 2 mg TRITC enthält, resuspendiert und dreißig Minuten bei 37°C rotiert. Die Hefezellen wurden zweimal mit Natriumhydrogenphosphat-Puffer und anschließend viermal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Aliquots von 10^9 Zellen/ml wurden in Soerensen-Phosphat-Puffer bei einer Temperatur von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Um die Fluoreszenz nicht phagozytierter Hefen zu quenchen, wird eine Trypan Blau-Lösung verwendet. Dazu wird Trypan Blau in einer Endkonzentration von 20 mg/ml in 20 mM Natriumcitratlösung, die zusätzlich 150 mM NaCl enthält, gelöst. Der pH-Wert wird auf 4,5 eingestellt. Die Lösung wird dreißig Minuten bei Raumtemperatur gerührt, dann filtriert und anschließend durch einen Filter mit einer Porenweite von $0,45\text{ }\mu\text{m}$ gepresst. *D. discoideum*-Zellen wurden mehr als fünf Generationen in axenischem Medium bis zu einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml kultiviert. Nach Zentrifugation bei $720 \times g$ für zwei Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen einmal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in demselben Puffer zu einer OD_{600} von 0,5 resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation bei $21\text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Schüttler bei 160 UpM wurden 20 ml Zellsuspension mit $200\text{ }\mu\text{l}$ fluoreszenzmarkierter Hefe versetzt. Nach 0, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten wurde jeweils ein 1 ml Aliquot entnommen und mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Trypan Blau-Lösung versetzt. Die Mischung wurde drei Minuten geschüttelt und anschließend fünfzehn Sekunden bei $1.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig und vollständig abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Soerensen-Phosphat-Puffer resuspendiert. Die Emission wurde bei 574 nm bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm gemessen.

5.6 Endozytose von FITC-Dextran [Thilo und Vogel, 1980]

D. discoideum-Zellen wurden mehr als fünf Generationen in axenischem Medium bis zu einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml angezogen. Die Zellen wurden bei $720 \times g$ für zwei Minuten zentrifugiert und in frischem AX2-Medium zu einer OD_{600} von 1 resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation bei $21\text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Schüttler bei 160 UpM wurde eine wässrige

FITC-Dextran-Lösung zu einer Endkonzentration von 2 mg/ml zugegeben. Nach 0, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten wurde jeweils ein 500 µl Aliquot entnommen. Die Proben wurden sofort in 1 ml eiskalten Soerensen-Phosphat-Puffer gegeben und eine Minute bei 1000 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden noch ein weiteres mal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und anschließend mit 1 ml Lysis-Puffer versetzt. Die Emission wurde entweder sofort bei 515 nm bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm gemessen, oder die Proben wurden bis zur Vermessung bei -20 °C gelagert.

Lysis-Puffer: 50 mM Na₂HPO₄ (pH 9,3)
0,2% Triton X-100

5.7 Exozytose von FITC-Dextran [Thilo und Vogel, 1980]

Die quantitative Bestimmung der Exozytose von FITC stellt die Fortsetzung der Bestimmung der Endozytose dar. Nach zweistündiger Kultur in FITC-Dextran-haltigem Medium (s. Abschnitt E 5.6) wurden *D. discoideum*-Zellen bei 720 x g für zwei Minuten abzentrifugiert und zweimal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen, um überschüssiges FITC-Dextran zu entfernen. Die Zellen wurden in dem gleichen Volumen frischen axenischen Mediums resuspendiert, welches sie vor den Waschsritten hatten. Wieder wurden nach 0, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten 500 µl Aliquots entnommen. Diese wurden genauso behandelt wie die Proben der Endocytose und auch entsprechend gemessen.

5.8 Bestimmung der Zellgröße

D. discoideum-Zellen wurden bis zu einer Dichte von 6×10^5 Zellen/ml kultiviert und in Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in dem selben Puffer resuspendiert und mit 20 mM EDTA versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 21 °C und 160 UpM wurde ein Tropfen der abgerundeten Zellen auf ein Deckgläschen gebracht und die Zellgröße mikroskopisch bestimmt. Hierzu wurde ein Mikroskop der Firma Leica (Typ DMIL) mit aufgesetzter Kamera und das Programm DISKUS (Vers. 4.20.34) der Firma Hilger-Software verwendet. Etwa 200 Zellen wurden fotografiert und der Durchmesser der einzelnen Zellen mit der Software bestimmt.

6. Methoden zum „Gene-Targeting“

6.1 Präparation embryonaler Fibroblasten

Embryonen eines Neomycin-resistenten Mausstammes wurden zwischen Tag 13 und Tag 15 p.c. aus dem Uterus entnommen. Nach Entfernung von Kopf, Leber und Intestinaltrakt wurden die Embryos zur Entfernung roter Blutzellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Embryos in einer Petrischale mit einer Rasierklinge zerhackt. Der Zellbrei wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und zehn Minuten bei Raumtemperatur in 20 ml 1 x Trypsin geschüttelt. Es wurde kurz absitzen gelassen, der Überstand abgenommen und weiter geschüttelt, das Pellet wurde erneut mit Trypsin versetzt und weitere zehn Minuten geschüttelt. Diese Vorgehensweise wurde so lange wiederholt, bis alle viskosen Zellklumpen gelöst waren. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von serumhaltigen Medium gestoppt und die Zellen bei Raumtemperatur fünf Minuten bei 1000 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 50 ml serumfreien Medium resuspendiert und mit 500 µl DNase I (10 mg/ml) zum Abbau von aus toten Zellen ausgetretener DNA zehn Minuten geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und die DNase-Behandlung in serumhaltigen Medium wiederholt. Danach wurden die Zellen so ausplattiert, dass eine Suspension, die etwa zwei Embryonen entspricht, auf eine 150 mm Kulturschale gegeben wurde. Die Schalen wurden vierundzwanzig Stunden in wassergesättigter Atmosphäre und 5% CO₂ bei 37 °C inkubiert, in dieser Zeit sollten die Petrischalen nicht bewegt werden um die Anheftung der Zellen zu gewährleisten. Danach wurde bis zum Erreichen der Konfluenz täglich das Medium gewechselt. Von jeder Platte wurden vier Röhrchen je 1 ml in Einfriermedium bei -70 °C eingefroren [Chan und Evans, 1991]. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Verwendung wurden die Fibroblasten wieder aufgetaut (bei 37 °C im Wasserbad), 1-2mal passagiert, bis die notwendige Zellzahl erreicht war. Durch Zugabe von Mitomycin C (100 µg/150 mm Kulturschale/ 20 ml EF-Medium) und Inkubation für 2,5 Stunden bei 37 °C erfolgte die Mitose-Inaktivierung der Zellen. Die Zellen wurden anschließend 3 x mit PBS gewaschen und in einer Konzentration von 4 x 10⁶ Zellen/90 mm Schale ausplattiert. Die so behandelten Zellen wurden spätestens am nächsten Tag weiter benutzt.

Medium für embryonale Fibroblasten:

DMEM (high glucose)
10 % FCS
2 mM Glutamin

Einfriermedium:

DMEM (high glucose)
20 % FCS
10 % DMSO

6.2 Kultur von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus

ES-Zellen der IB10-Linie, die Abkömmlinge der E14-Linie [Doetschmann *et al.*, 1987] sind, wurden auf neomycinresistenten, mitoseinaktivierten embryonalen Fibroblasten (4×10^6 / 90 mm Kulturschale) in wassergesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 37 °C mit modifiziertem DMEM-Medium kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden die ES-Zellen 3 x mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml/ 90 mm Schale 0,05 % Trypsin abgelöst (ca. 5 min bei 37 °C), durch auf- und abpipettieren mit einer Pasteurpipette vereinzelt, gesplittet und schließlich in frischem Medium ausplattiert (ca. 10^6 Zellen/ 90 mm Kulturschale). Für die Präparation genomischer DNA wurden die ES-Zellen auf gelatinisierten Kulturschalen mit LIF-freiem Medium kultiviert.

ES-Zell-Kulturmedium:

DMEM (high glucose)
15 % FCS
1 mM β -Mercaptoethanol
1 % 100 x MEM (non essential aminoacids; Biochrom)
1 mM Na-Pyruvat
2 mM Glutamin
2000 U/ml LIF
100 U/ml Penicillin/Streptomycin

6.3 Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen

Die Transfektion der embryonalen Stammzellen erfolgte nach einem Protokoll von **Mansouri**. ES-Zellen wurden zwei Tage nach einer Passagierung elektroporiert. Etwa vier Stunden vor der Elektroporation wurde das Medium der ES-Zell-Kulturen und der embryonalen Fibroblasten gewechselt. Die ES-Zellen wurden trypsinisiert, fünf Minuten bei 200 x g abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und dann ausgezählt. $1-2 \times 10^7$ ES-Zellen wurden in 960 μ l kaltem PBS resuspendiert und davon 160 μ l zur Kontrolle der G418-Selektion ausplattiert. Die verbleibende ES-Zell-Suspension wurde mit 25-80 μ g linearisierter Vektor-DNA versetzt und in einer Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 0,4 cm, Bio-Rad) fünf Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Elektroporation mit 500 μ F und 250 V mit einem Gene-Pulser (Bio-Rad) durchgeführt und weitere fünf Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden in ES-Kulturmedium resuspendiert und auf fünf mit embryonalen Fibroblasten beschichteten Kulturschalen (90 mm) verteilt. 24 Stunden nach der Elektroporation wurde das ES-Medium gegen Selektionsmedium (ES-Medium mit 350 μ g/ml G418) ausgetauscht. Auch die nicht elektroporierten ES-Zellen wurden mit dem Selektionsmedium

kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt. Nach 8-10 Tagen wurden G418-resistente ES-Zellklone in PBS unter einem Mikroskop mit einer Eppendorf-Pipette isoliert, auf 96-Lochplatten fünf Minuten in 100 μ l Trypsinlösung inkubiert und nach Resuspendieren auf 48-Lochplatten in 500 μ l ES-Medium auf embryonalen Fibroblasten bei reduzierter G418-Konzentration (150 μ g/ml) kultiviert. Nach 3-4 Tagen wurde das Medium entfernt und die Zellen nach waschen mit PBS trypsiniert. Die vereinzelt Zellen wurden in 600 μ l Einfriermedium (s. Abschnitt E 6.1) aufgenommen. 500 μ l dieser Suspension wurden in Einfrieröhrchen überführt und eingefroren. Die verbliebenen 100 μ l wurden auf gelatinisierten 24-Lochplatten zur Präparation genomischer DNA bis zur Konfluenz weiter kultiviert.

F Literatur

- Adams, A. E. M., Botstein, D. und Drubin, D. G. (1991). Requirement of yeast fimbrin for actin organization and morphogenesis *in vivo*. *Nature* **354**, 404-408
- Aizawa, H., Katadae, M., Maruya, M., Sameshima, M., Murakami-Murofushi, K. und Yahara, I. (1999). Hyperosmotic stress-induced reorganization of actin bundle in *Dictyostelium* cells over-expressing cofilin. *Genes Cells* **4**, 311-324
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410
- Arpin, M., Friederich, E., Algrain, M., Vernel, F. und Louvard, D. (1994). Functional differences between L- and T-plastin isoforms. *J. Cell Biol.* **127**, 1995-2008
- Aubry, L., Klein, G., Martiel, J.-L. und Satre, M. (1993). Kinetics of endosomal pH evolution in *Dictyostelium discoideum* amoebae. *J. Cell Sci.* **105**, 861-866
- Babb, S. G., Matsudaira, P., Sato, M., Correia, I. und Lim, S.-S. (1997). Fimbrin in podosomes of monocyte-derived osteoclasts. *Cell Motil. Cytoskeleton* **307**, 308-325
- Bear, J. E., Krause, M. und Gertler, F. B. (2001). Regulating the actin assembly. *Curr. Opinion Cell Biol.* **13**, 158-166
- Beck, K. A., Buchanan, J. A., Malhotra, V., Nelson, W. J. (1994). Golgi spectrin: identification of an erythroid β -spectrin homologue associated with the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **127**, 707-723
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brenner, S. L. und Korn, E. D. (1979). Spectrin-actin interaction. Phosphorylated and dephosphorylated spectrin tetramer crosslinks F-actin. *J. Biol. Chem.* **254**, 8620-8627.
- Bretscher, A. (1981). Fimbrin is a cytoskeletal protein that crosslinks F-actin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4986-4990
- Bretscher, A. und Weber, K. (1980). Fimbrin, a new microfilament associated protein present in microvilli and other cell surface structures *J. Cell. Biol.* **86**, 335-340
- Brink, M., Gerisch, G., Isenberg, G., Noegel, A. A., Segall, J. E., Wallraff, E. und Schleicher, M. (1990). A *Dictyostelium* mutant lacking an F-actin cross-linking protein, the 120-kD gelation factor. *J. Cell Biol.* **111**, 1477-1489
- Brown, A., Bernier, G., Mathieu, M., Roosant, J. und Kothary, R. (1995). The mouse *Dystonia musculorum* gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nature Genet.* **10**, 301-306

- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M. T. und Dobberstein, B. (1987). A T5 promoter based transcription-translation system for the analysis of proteins in vivo and in vitro. *Methods Enzymol.* **155**, 416-433
- Bullock, W. O. (1987). *BioTechniques* **5**, 376-378.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. und Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* **11**, 82-88
- Campbell, N. A. (1997). *Biologie*. Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford
- Capecchi, M. R. (1994). Targeted gene replacement. *Sci. Am.* **270**, 52-59
- Cardelli, J. (2001). Phagocytosis and macropinocytosis in *Dictyostelium*: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic* **5**, 311-320
- Casella, J. F., Maack, D. J. und Lin, S. (1986). Purification and initial characterisation of a protein from skeletal muscle that caps the barbed ends of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **261**, 10915-10921
- Chan, S. Y. und Evans, M. J. (1991). In situ freezing of embryonic stem cells in multiwell plates. *Trends Genet.* **7**, 76
- Chien, A., Edgar, D. B. und Trela, J. M. (1976). Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550-1557
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159
- Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., Bruckert, F. und Cosson, P. (2000). Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in *Dictyostelium* adhesion and phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 34287-34292
- Cox, D., Wessels, D., Soll, D. R., Hartwig, J. und Condeelis, J. (1996). Reexpression of ABP-120 rescues cytoskeletal structure, motility, and phagocytosis defects of ABP-120 *Dictyostelium* mutants. *Mol. Biol. Cell* **5**, 803-823
- De Arruda, M. V., Watson, S., Lin, C.-S., Leavitt, J. und Matsudaira, P. (1990). Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J. Cell Biol.* **111**, 1069-1079
- De Lozanne, A. und Spudich, J. A. (1987). Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**, 1086-1091
- Devereux, J., Haerberli, P. und Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic. Acids. Res.* **12**, 387-395
- Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S. und Smithies, O. (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* **330**, 576-578

- Drenckhahn, D. und Dermietzel, R. (1988). Organization of actinfilament cytoskeleton in intestinal brush border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. *J. Cell. Biol.* **107**, 1037-1048
- Drubin, D. G., Miller, K. G. und Botstein, D. (1988). Yeast actin bindingproteins: evidence for a role in morphogenesis. *J. Cell Biol.* **107**, 2551-2561
- Eckhart, A. D. und Koch, W. J. (2001). Transgenic studies of cardiac adrenergic receptor regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 1-5
- Eddy, R. J., Han, J. H., Sauterer, R. A. und Condeelis, J. S. (1996). A major antagonist-regulated capping activity in *Dictyostelium* is due to the capping protein, cap 32/34. *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 247-259
- Eichinger, L., Bähler, M., Dietz, M., Eckerskorn, C. und Schleicher, M. (1998). Characterization and cloning of a *Dictyostelium* Ste20-like protein kinase that phosphorylates the actin-binding protein severin. *J. Biol. Chem.* **273**, 12952-12959
- Eichinger, L., Lee, S. S. und Schleicher, M. (1999). *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc. Res. Tech.* **47**, 124-134
- Faix, J., Noegel, A. A. und Gerisch, G. (1992). Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP regulated promotor impairs morphogenesis in *Dictyostelium*. *J. Cell. Sci.* **102**, 203-214
- Faix, J., Steinmetz, M., Boves, H., Kammerer, R. A., Lottspeich, F., Mintert, U., Murphy, J., Stock, A., Aebi, U. und Günther Gerisch. (1996). Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin bundling proteins with parallel coiled-coil tail. *Cell* **86**, 631-642
- Franke, W. W. (1993). The intermediate filaments. In Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins (Kreis, T. und Vale, R., eds.), Oxford University Press, Oxford, 137-144
- Frederick, M. J., Rodriguez, L. V., Johnston, D. A., Darnay, B. G. und Grimm, E. A. (1996). Characterization of the M_r 65,000 lymphokine-activated killer proteins phosphorylated after tumor target binding: evidence that pp65a and pp65b are phosphorylated forms of L-plastin. *Cancer Res.* **56**, 138-144
- Gärtner, A., Ruhnau, K., Schöer, E., Selve, N., Wanger, M. und Wegner, A. (1989). Probing nucleation, cutting and capping of actin filaments. *J. Muscle Res. Cell Mot.* **10**, 1-9
- Glenney, J. R., Kaulfus, P., Matsudaira, P. und Weber, K. (1981) F-actin binding and bundling properties of fimbrin, a major cytoskeletal protein of microvillus core filaments. *J. Biol. Chem.* **256**, 9283-9288
- Goldstein D., Djeu, J., Latter, G., Burbeck, S. und Leavitt, J. (1985). Abundant synthesis of the transformation induced protein of neoplastic human fibroblasts, plastin in normal lymphocytes. *Cancer Res.* **45**, 5643-5647

- Gorlin, J. B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J. und Hartwig, J. H. (1990). Human endothelial actin-binding protein (ABP-280 nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J. Cell. Biol.* **111**, 1089-1105
- Gottwald, U., Brokamp, R., Karakesisoglou, I., Schleicher, M. und Noegel, A. A. (1996). Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in *Dictyostelium discoideum* and characterization of its interaction with actin. *Mol. Biol. Cell* **7**, 261-272
- Haber, J. E. (1999). DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 271-275
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98
- Hames, B. D., Weeks, G. und Ashworth, J. M. (1972). Glycogen synthetase and the control of glycogen synthesis in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* during cell differentiation. *Biochem. J.* **126**, 627-633
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of E coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hasty, P., Rivera-Perez, J. und Bradley, A. (1992). The role and the fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2464-2474
- Haugwitz, M., Noegel A. A., Rieger, D., Lottspeich, F. und Schleicher, M. (1991). *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J. Cell. Sci.* **100**, 481-489
- Haus, U., Trommler, P., Fisher, P. R., Hartmann, H., Lottspeich, F., Noegel, A. A. und Schleicher, M. (1993). The heat shock cognate protein from *Dictyostelium* affects actin polymerisation through interaction with the actin-binding protein cap32/34. *EMBO J.* **12**, 3763-3771
- Hock, R. S., Davis, G. und Speicher, D. W. (1990). Purification of human smooth muscle filamin and characterization of structural domains and functional sites. *Biochemistry* **29**, 9441-9451
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. und Lacy, E. (1994). Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory manual. Cold spring Harbour Laboratory Press, New York
- Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197
- Howard, P. K., Ahern, K. G. und Firtel, R. A. (1988). Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 2613-2618

- Jenne, N., Rauchenberger, R., Hacker, U., Kast, T. und Maniak, M. (1998). Targeted gene disruption reveals a role of vacuolin B in the late endocytic pathway and exocytosis. *J. Cell Sci.* **111**, 61-70
- Jones, S. L. und Brown, E. J. (1996). Fc_γRII-mediated adhesion and phagocytosis induce L-plastin phosphorylation in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **271**, 14623-14630
- Khyse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209
- Knecht, D. A. und Loomis, W. F. (1987). Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **236**, 1081-1086
- Koonce, M. P. (2000). *Dictyostelium*, a model organism for microtubule-based transport. *Protist.* **151**, 17-25
- Kovar, D. R., Gibbon, B. C., McCurdy, D. W. und Staiger, C. J. (2001). Fluorescently-labeled fimbrin decorates a dynamic actin filament network in live plant cells. *Planta* **213**, 390-395
- Kreitmeyer, M., Gerisch, G., Heizer, C. und Müller-Taubenberger, A. (1995). A talin homologue of *Dictyostelium* rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *J. Cell Biol.* **129**, 179-188
- Kübler, E. und Riezman, H. (1993). Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J.* **12**, 2855-2862
- Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132
- Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 722-725
- Langanger, G., De Mey, J. und Adam, H. (1983). 1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-oktan (DABCO) verzögert das Ausbleichen von Immunfluoreszenzpräparaten. *Mikroskopie* **40**, 237-241
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. und Beodtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M. und Schlessinger, J. (1996). PH Domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* **85**, 621-624
- Lin, C.-S., Aebersold, R. H., Kent, S. B., Varma, M. und Leavitt, J. (1988). Molecular cloning and characterization of plastin, a human leukocyte protein expressed in transformed human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4659-4668

- Lin, C.-S., Chang, C.-H. und Huynh, T. (1997). The murine L-plastin gene promoter: identification and comparison with the human L-plastin gene promoter. *DNA Cell Biol.* **16**, 9-16
- Lin, C.-S., Lau, A. und Lue, T. F. (1998). Analysis and mapping of plastin phosphorylation. *DNA Cell Biol.* **17**, 1041-1046
- Lin, C.-S., Park, T., Chen, Z. P. und Leavitt, J. (1993). Human plastin genes. *J. Biol. Chem.* **268**, 2781-2792
- Lin, C.-S., Shen, W., Chen, Z. P., Tu, Y.-H. und Matsudaira, P. (1994). Identification of I-plastin, a human fimbrin isoform expressed in intestine and kidney. *Mol. Cell Biol.* **14**, 2457-2467
- Liu, C.-G., Maercker, C., Castañón, M. J., Hauptman, R. und Wiche, G. (1996). Human plectin: organization of the gene, sequence analysis, and chromosome localization (8q24). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4278-4283
- Liu, G., Thomas, L., Warren, R. A., Enns, C. A., Cunningham, C., Hartwig, J. H. und Thomas, G. (1997). Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J. Cell Biol.* **139**, 1719-1733
- Lupas, A., Van Dyke, M. und Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1164
- Ma, A. D. und Abrams, C. S. (1999). Pleckstrin homology domains and phospholipid-induced cytoskeletal reorganization. *Thromb Haemost.* **82**, 399-406
- Malchow, D. B., Nägele, B., Schwarz, H. und Gerisch, G. (1972). Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **28**, 136-142
- Malchow, D., Lüderitz, O., Westphal, O., Gerisch, G. und Riedel, V. (1967). Polysaccharide in vegetativen und aggregationsreifen Amöben von *Dictyostelium discoideum*. I. In vivo Degradierung von Bakterien-Lipopolysaccharid. *Eur. J. Biochem.* **2**, 469-479
- Mandelkow, E. und Mandelkow, E.-M. (1995). Microtubules and microtubule associated proteins. *Curr. Opin Cell Biol.* **7**, 72-81
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J. und Gerisch, G. (1995). Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag. *Cell* **83**, 915-924
- Mansour, S. L., Thomas, K. R. und Capecchi, M.R. (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**, 348-352

- Mansouri, A. A homologous recombination in embryonic stem cells. MPI für biophysikalische Chemie, Abteilung Molekulare Zellbiologie, Göttingen, Germany
- Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M. R. und Albiges-Rizo, C. (2001). Conformation, localization and integrin-binding of talin depend on its interaction with inositides. *J. Biol. Chem.* **276**, 21217-21227
- Mehdy, M. C., Ratner, D. und Firtel, R. A. (1983). Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Cell* **32**, 763-771.
- Monnat, J., Hacker, U., Geissler, H., Rauchenberger, R., Neuhaus, E. M., Maniak, M. und Soldati, T. (1997). *Dictyostelium discoideum* disulfid isomerase, an endoplasmic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal. *FEBS Lett.* **418**, 357-362
- Neuhaus, E. M., Horstmann, H., Almers, W., Maniak, M. und Soldati, T. (1998). Ethane-freezing/methanol-fixation of cell monolayers: a procedure for improved preservation of structure and antigenicity for light and electron microscopies. *J. Struct. Biol.* **121**, 326-342
- Niewöhner, J., Weber, I., Maniak, M., Müller-Taubenberger, A. und Gerisch, G. (1997). Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J. Cell Biol.* **138**, 349-361
- Noegel, A. A. und Schleicher, M. (2000). The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *J. Cell Sci.* **113**, 759-766
- Noegel, A. A., Rivero, F., Fucini, P., Bracco, E., Janssen, K. P. und Schleicher, M. (1997). *Dictyostelium*- A model system for cell and developmental biology. Universal Academy Press, Inc, 33-41
- Noegel, A. A., Witke, W. und Schleicher, M. (1987). Calcium-sensitive non-muscle α -actinin contains EF-hand structures and highly conserved regions. *FEBS Lett.* **221**, 391-396
- Page, R. D. M. (1996). TREEVIEW : an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 357-358
- Pang, K. M., Lee, F. und Knecht, D. A. (1998). Use of a fusion protein between GFP and an actin-binding domain to visualize transient filamentous-actin structures. *Curr. Biol.* **8**, 405-408
- Parent, C. A. und Devreotes, P. N. (1999) A cell's sense of direction. *Science* **284**, 765-770
- Park, T., Chen, Z. P. und Leavitt, J. (1994). Activation of the leukocyte plasmin gene occurs in most human cancer cells. *J. Cancer Res.* **54**, 1775-1781

- Pierce, J., Sternberg, N. und Sauer, B. (1992). A mouse genomic library in the bacteriophage P1 cloning system: organization and characterization. *Mammal. Genome*. **3**, 550-558
- Pollard, T. D. und Cooper, J. A. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 987-1035
- Prassler, J. (1995). Platin aus *Dictyostelium discoideum*: Isolierung, biochemische Charakterisierung und Ausschalten dieses aktinbindenden Proteins durch Geninaktivierung, Doktorarbeit, Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried bei München
- Prassler, J., Stocker, S., Marriott, G., Heidecker, M., Kellermann, J. und Gerisch, G. (1997). Interaction of a *Dictyostelium* member of the platin/fimbrin family with actin filaments and actin-myosin complexes. *Mol. Biol. Cell*. **8**, 83-95
- Rafferty, J. B., Sedelnikova, S. E., Hargreaves, D., Artymiuk, P. J., Baker, P. J., Sharples, G. J., Mahdi, A. A., Lloyd, R. G. und Rice, D. W. (1996). Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. *Science* **274**, 415-421
- Raper, K. B. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mould from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**, 135-147
- Rivero, F., Furukawa, R., Fechheimer, M. und Noegel, A. A. (1999). Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin bundling protein, α -actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of *Dictyostelium*. *J. Cell. Sci.* **112**, 2737-2751
- Rivero, F., Furukawa, R., Noegel, A. A. und Fechheimer, M. (1996). *Dictyostelium discoideum* cells lacking the 34,000-dalton actin-binding protein can grow, locomote and develop, but exhibit defects in regulation of cell structure and movement: a case of partial redundancy. *J. Cell Biol.* **135**, 965-980
- Rivero, F., Kuspa, A., Brokamp, R., Matzner, M. und Noegel, A. A. (1998). Interaptin, an actin-binding protein of the α -actinin superfamily in *D. discoideum*, is developmentally and cAMP regulated and associates with intracellular membrane compartments. *J. Cell Biol.* **142**, 735-750
- Rizoli, S. B., Rotstein, O. D., Pardo, J., Phillips, M. J. und Kapus, A. (2000). Hypertonic inhibition of exocytosis in neutrophils: central role for osmotic actin skeleton remodelling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, 619-633
- Rosales, C., Jones, S. L., McCourt, D. und Brown, E. J. (1994). Bromphenacyl bromide binding to the actin-bundling protein I-Plasin inhibits inositol trisphosphate-independent increase in Ca^{2+} in human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3534-3538
- Ruther, U. (1982). pUR250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts. *Nucleic Acids Res.* **10**, 5765-5772

- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354
- Saitou, N. und Nei, M. (1987). The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Schneider, U., Schwenke, H. U. und Bornkaum, G. (1977). Charakterization of EBV-genome negative „null“ and „T“ cell lines and leukaemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* **19**, 621-626
- Seastone, D. J., Lee, E., Bush, J., Knecht, D. und Cardelli, J. (1998). Overexpression of a novel rho family GTPase, racC, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2891-2904
- Shinomiya, H., Hagi, A., Fukuzumi, M., Mizobuchi, M., Hirata, H. und Utsumi, S. (1995). Complete primary structure and phosphorylation site of the 65-kDa macrophage protein phosphorylated by stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **154**, 3471-3478
- Simpson, P. A., Spudich, J. A. und Parham, P. (1984). Monoclonal antibodies prepared against *Dictyostelium* actin: Characterisation and interactions with actin. *J. Cell Biol.* **99**, 287-295
- Smith, D. B. (1993). Purification of glutathion-S-transferase fusion proteins. *Methods Mol. Cell Biol.* **4**, 220-229
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517
- Sternberg, N., Smoller, D. und Braden, T. (1994). Three new developments in P1 cloning. *GATA*. **11**, 171-180
- Stossel, T. P., Chaponnier, C., Ezzell, R. M., Hartwig, J. H., Janmey, P. A., Kwiatkowski, D. J., Lind, S. E., Southwick, F. S., Yin, H. L. und Zaner, K. S. (1985). Nonmuscle actin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 353-402
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130
- Suggs, S. V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E. H., Johnson, M. J., Itakura, K. und Wallace, R. B. (1981). Use of synthetic oligodesoxy-ribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences using purified genes. In: *Developmental Biology* (Brown, D. D. & Fox, C. F., eds.), Academic Press NY, 683-693

- Thilo, L. und Vogel, G. (1980). Kinetics of membrane internalisation and recycling during pinocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **77**, 1015-1019
- Thomas, K. R. und Capecchi, M. R. (1986). Targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 2, 1101-1113
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. J. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality and analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4876-4882
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S. und Mizuno, K. (2001). Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1131-1145
- Tybulewicz, V. L., Crawford, C. E., Jackson, P. K., Bronson, R. T. und Mulligan, R. C. (1991). Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-ase proto-oncogene. *Cell* **65**, 1153-1163
- Van Es, S., Devreotes, P. N. (1999). Molecular basis of localized responses during chemotaxis in amoebae and leukocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 1341-1351
- Van Troys, M., Vandekerckhove, J. und Ampe, C. (1999). Structural modules in actin-binding proteins: towards a new classification. *Biochem. Biophys. Acta* **1448**, 323-348
- Vogel, G., Thilo, L., Schwarz, H. und Steinhart, R. (1980). Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *J. Cell Biol.* **86**, 456-465
- Walter, G., Scheidtmann, K.H., Carbone, A., Laudano, A. P. und Doolittle, R. F. (1980). Antibodies specific for the carboxy- and amino-terminal regions of simian virus 40 large tumorantigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **77**, 5197-5200
- Watts, D. J. und Ashworth, J. M. (1970). Growth of myxamoebae of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 171-174
- Weber, I., Gerisch, G., Heizer, C., Murphy, J., Badelt, K., Stock, A., Schwartz, J.M. und Faix J. (1999). Cytokinesis mediated through the recruitment of cortexillins into the cleavage furrow. *EMBO J.* **18**, 586-94
- Wegner, A. und Isenberg, G. (1983). 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4922-4925
- Weiner, O. H., Murphy, J., Griffiths, G., Schleicher M. und Noegel, A. A. (1993). The actin-binding protein Comitín (p24) is a component of the Golgi Apparatus. *J. Cell Biol.* **123**, 23-34

- Wertman, K. F., Wyman, A. R. und Bolstein, D. (1986). Host/vector interaction which affect the viability of recombinant phage λ clones. *Gene* **49**, 253-262
- Westermann, K. A. und Le Boulch, P. (1996). Reversible immortalization of mammalian cells mediated retroviral transfer and site-specific recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 8971-8976
- Westphal, M., Jungbluth, A., Heidecker, M., Mühlbauer, B., Heizer, C., Schwarz, J.-M., Marriot, G. und Gerisch, G. (1997). Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion. *Curr. Biol.* **7**, 176-183
- Wilkins, A., Chubb, J. R. und Insall, R. H. (2000). A novel *Dictyostelium* RasGEF is required for normal endocytosis, motility and multicellular development. *Current Biol.* **10**, 1427-1437
- Williams, C. und Newell, G. (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* **82**, 287-307
- Witke, W., Nellen, W. und Noegel, A. A. (1987). Homologous recombination in the *Dictyostelium* alpha-actinin gene leads to an altered mRNA and lack of the protein. *EMBO J.* **6**, 4143-4148
- Wu, J.-Q., Bähler, J. und Pringle, J. R. (2001). Roles of a fimbrin and an α -actinin-like protein in fission yeast cell polarization and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1061-1077
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119
- Yin, H. L. und Stossel, T. P. (1979). Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependant regulatory protein. *Nature* **281**, 583-586
- Zhou, P., Bogan, J. A., Welch, K., Pichett, S. R., Wang, H. J., Zaritsky, A. und Helmstetter, C. E. (1997). Gene transcription and chromosome replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 163-169
- Zischka, H., Oehme, F., Pintsch, T., Ott, A., Keller, H., Kellermann, J. und Schuster, S. C. (1999). Rearrangement of cortex proteins constitutes an osmoprotective mechanism in *Dictyostelium*. *EMBO J.* **18**, 4241-4249
- Zu, Y., Khono, M., Kubota, I., Nishida, E., Hanaoka, M. und Namba, Y. (1990). Characterization of interleukin 2 stimulated 65-kilodalton phosphoprotein in human T-cells. *Biochemistry* **29**, 1055-1062

G Summary

Fimbrins, also known as plastins, belong to the α -actinin-superfamily of actin-binding proteins. They are highly conserved from yeast to man. In vertebrates three tissue-specific isoforms have been described. I-plastin is expressed in epithelial cells from the small intestine and kidney, L-plastin in haematopoietic cells and T-plastin in all other tissues. Plastins/fimbrins ability to bundle actin is calcium-dependent. In addition L-plastin is phosphorylated upon stimulation by hormones, growth factors or receptor-mediated phagocytosis. Little is known about the function of these proteins.

The aim of this work was to functionally analyse both murine L-plastin and fimbrin from *D. discoideum*.

A knockout-targeting construct was generated and used for transfection of embryonic stem-cells. For this, parts of the L-plastin-gene from *Mus musculus* were sequenced and mapped. To investigate fimbrin function in *Dictyostelium* various fimbrin mutations were analysed. Fimbrin null-mutants and mutants in which the N-terminal calcium-binding domains were deleted did not display any difference from the wild-type regarding cell-size, growth under axenic conditions or in bacterial suspension, phagocytosis, endocytosis and exocytosis. The distribution of actin in these mutants was unaltered and the colocalization of fimbrin with actin along the plasma membrane, at macropinosomes and phagocytic cups was found to be independent of the different mutations made. No alterations were observed in the distribution of intracellular membrane-compartments like the Golgi-apparatus, endoplasmic reticulum, lysosomes and the contractile vacuole after hyper- or hypoosmotic stress.

Point-mutations of the potential phosphorylation sites at the N-terminus of fimbrin led to a significant reduction of the phagocytosis rate, indicating that the phosphorylation state of fimbrin might be important for its function during phagocytosis.

The knockout or partial deletion of fimbrin in the background of a mutant lacking the 34 kDa actin-binding protein (ABP 34) was also investigated. Phagocytosis in ABP 34 minus cells and in the ABP 34/fimbrin double mutant was drastically increased, pointing at a role for ABP34 during phagocytosis.

The subcellular localization of *D. discoideum* fimbrin was investigated in methanol- or paraformaldehyde/picric acid-fixed cells expressing GFP-actin or GFP-L-plastin. It could be shown that methanol-fixation reproduces the *in vivo* localization best.

A search of the *Dictyostelium* genome project database for fimbrin-like proteins yielded four

candidates. They possess one (F01706) or two (F02091, R09493 and R10109) actin-binding domains with highest homology to actin-binding domains of fimbrins/plastins. None of them have EF-hands, but all have sequence stretches with coiled coil structure. Except for F01706, the actin-binding domains localize at the C-terminus. F01706 displays certain structural homology to cortexillin, F02091 has a PH domain and a region homologous to the N-terminus of talin.

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen – die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht ist, sowie, dass ich eine Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. Noegel betreut worden.

Danksagungen

Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und fachliche Anregungen danken.

Bei Dr. Francisco Rivero bedanke ich mich für die interessante Themenstellung, die intensive Betreuung und vielfältigen Tips und Vorschläge.

Herrn Prof. Dr. H. W. Klein danke ich für die freundliche Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen.

Den Mitarbeitern des *Dictyostelium*-Genomprojekts gilt mein Dank für die Bereitstellung von Sequenzen im Internet.

Herrn Dr. Neil Smyth danke ich für sehr hilfreiche Anregungen im Zusammenhang mit der Erstellung des „Knockout-Targeting“-Konstruktes und der Kultivierung der ES-Zellen.

Bei Frau Dipl. Biol. Tina Mohrs, Frau Heidrun Dislich, Herrn Rolf Müller, Frau Ann Kathrin Meyer, Herrn Dipl. Chem. Markus Wasen, Frau Dr. Sonia Ramos, Frau Rosi Blau-Wasser, Frau Dr. Monika Knuth, Herrn Dr. Thomas Schreiner, Herrn Dipl. Biol. Michael Leichter, Frau Dipl. Biol. Marija Marko, Frau Dr. Claudia Herr, Frau Silke Müller und Herrn Dr. Andreas Hasse möchte ich mich nicht nur für anregende Diskussionen und praktischen Ratschläge sondern auch für die angenehme Atmosphäre herzlich bedanken.

Auch allen nicht namentlich erwähnten Kollegen gilt mein Dank für ihre Kooperativität und Zusammenarbeit, welche den Laboralltag so sehr vereinfachen.

Bei Herrn Dipl. Biol. Lutz Koerschgen bedanke ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Ermöglichung dieser Ausbildung und Ihr stets offenes Ohr. Außerdem bedanke ich mich bei Oliver für sein Verständnis und die moralische Unterstützung.

Lebenslauf

Name und Anschrift	Claudia Pikzack Altenbach 23 42799 Leichlingen
Geburtsdatum:	23. August 1971
Geburtsort:	Solingen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Eino Peter Pikzack Anneliese Pikzack, geb. Evertz

Schulbildung

1978-1982	Grundschule Uhlandstraße, Solingen
1982-1988	Geschwister-Scholl-Gymnasium, Solingen
1988-1991	Humboldt-Gymnasium, Solingen
1991	Abitur

Studium

Oktober 1991	Beginn des Chemiestudiums an der Bergischen Universität/Gesamthochschule Wuppertal
April 1993	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
Juni 1997	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
Juli 1997 – März 1998	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. G. Vogel am Institut für Biochemie des Fachbereichs Naturwissenschaften II der Bergischen Universität/Gesamthochschule Wuppertal Thema: Stoffwechsel hochphosphorylierter Inositolphosphate in zellulären Schleimpilzen
	Mai 1998 – Februar 2002 Dissertation bei Frau Prof. Dr. A. A. Noegel am Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit Ziel der Promotion an der Math. Nat. Fakultät der Universität zu Köln.