

Analyse der CAP Homologe in der Maus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Michael Leichter
aus Leverkusen

Köln 2002

Abkürzungsverzeichnis

³² P	radioaktives Phosphor Isoptop
A	Adenin
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure(n)
<i>A thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rindersrumalbumin
C	Cytosin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA (revers von RNA transkribierte DNA)
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA,DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	verbessertes Grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minuten
MOPS	Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NP-40	Ethylphenylpolyethylenglycol
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
T	Thymidin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Tyhmidintriphosphat
UAS	engl.: upstream activating sequence
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:

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Zytoskelett.....	1
1.2	Organisation des Aktinzytoskeletts.....	1
1.3	Aktin und Aktin bindende Proteine.....	2
1.4	Domänenstruktur und Funktion von CAP, Stand der Forschung.....	4
1.5	Interaktion von CAP mit der Adenylatzyklase	4
1.6	Wirkung von CAP auf das Aktin Zytoskelett	5
1.7	Konservierung der Funktion der carboxyterminalen Domäne.....	7
1.8	Der Prolin-reiche Bereich.....	8
1.9	Komplexbildung und Dimerisierung.....	8
1.10	Subzelluläre Lokalisation von CAP	9
1.11	Endozytose	9
1.12	Funktion von CAP in Differenzierungsvorgängen	10
1.13	Zielsetzung der Arbeit.....	10
2	Ergebnisse.....	11
2.1	Klonierung der CAP1 und CAP2 cDNA aus Maus	11
2.2	Sequenzergleich von Maus CAP 1 und 2 untereinander und mit CAP –Homologen aus anderen Organismen.....	12
2.3	Analyse der CAP1 und CAP2 Expression auf der Transkriptebene	14
2.4	Expression von CAP1 in <i>E. coli</i>	17
2.5	Expression eines aminoterminalen Teilstücks von CAP2 in <i>E. coli</i>	18
2.6	Isolierung monoklonaler Antikörper gegen CAP1 und CAP2.....	19
2.6.1	Darstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen rekombinant exprimiertes CAP1 Protein	19
2.6.2	Generierung von CAP2-spezifischen monoklonalen Antikörpern.....	21
2.7	Analyse der subzellulären Lokalisation von GFP CAP Fusionsproteinen.....	22
2.7.1	Expression der EGFP-Fusionsproteine	23
2.7.2	Die Bedeutung der CAP1-Domänen für die subzelluläre Lokalisation	26
2.7.3	Die Bedeutung der CAP2-Domänen für die subzelluläre Lokalisation	29
2.8	Interaktion von EGFP-CAP-Fusionsproteinen mit dem Triton X-100 unlöslichen Zytoskelett	31
2.9	Fraktionierung von HEK Zellen, die EGFP-CAP1 oder EGFP-CAP2 stabil exprimieren.....	33
2.10	Aktin-Bindung der EGFP-CAP Fusionsproteine in HEK und COS7 Zellen.....	33
2.11	Einfluss der Expression von CAP-Fusionsproteinen auf den F-Aktin Gehalt von HEK-Zellen.....	35
2.12	Komplexe von CAP-Fusionsproteinen in Säugerzellen.....	36
2.12.1	CAP-Fusionsproteine sind Teil von hochmolekularen Komplexen.....	37
2.12.2	Aktin ist Teil der hochmolekularen Komplexe von CAP1	39
2.12.3	Beeinflussung der Komplexgröße von CAP Proteinen durch PI3-Kinase.....	40
2.13	Aktin-Bindung der EGFP-CAP1-Fusionsproteine in HEK Zellen nach Inhibition der PI3-Kinase	42
3	Diskussion	43
3.1	Sequenzvergleich von CAP1 und CAP2.....	43
3.2	Differentielle Expression von CAP1 und CAP2 in der Maus.....	43

3.3	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von CAP1 und CAP2, Lokalisation von EGFP-CAP1 und -CAP2 Fusionsproteinen	44
3.4	EGFP-CAP Fusionsproteine befinden sich in der Triton X-100 löslichen Fraktion von HEK Zellen	46
3.5	EGFP-CAP-Fusionsproteine befinden sich im zytosolischen 100.000 x g Überstand von HEK Zellen	46
3.6	Die Überexpression der EGFP-CAP-Fusionsproteine hat keinen Einfluss auf den Gehalt an zellulärem F-Aktin	47
3.7	Die Bindung von CAP1 und CAP2 Fusionproteinen an Aktin in HEK und COS7 Zellen.....	47
3.8	Komplexe von CAP	48
3.9	Beeinflussung der Komplexgröße von CAP Proteinen durch PI3-Kinase.....	48
4	Zusammenfassung	51
5	Summary	53
6	Material und Methoden	55
6.1	Material	55
6.1.1	Labormaterialien	55
6.1.2	Geräte	55
6.1.3	Kits	56
6.1.4	Enzyme, Antikörper und Inhibitoren	56
6.1.5	Chemikalien und Reagenzien.....	57
6.1.6	Vektoren.....	59
6.1.7	Oligonukleotide.....	59
6.1.8	Puffer und andere Lösungen	60
6.1.9	Medien.....	61
6.1.10	Bakterienstämme	61
6.2	Molekularbiologische Methoden.....	62
6.2.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel	62
6.2.3	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> im Makromaßstab gemäß Macherey und Nagel	63
6.2.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	63
6.2.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus Maus-Geweben.....	64
6.2.6	RNA-Agarosegelelektrophorese [Lehrach et al., 1977].....	64
6.2.7	Northern-Blot-Analyse.....	64
6.2.8	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit dem Stratagene Prime It II ® Kit	65
6.2.9	Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden für Nylonmembranen nach Northern-Blot	65
6.2.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	66
6.2.11	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	66
6.2.12	<i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	66
6.2.13	Polymerase-Kettenreaktion	68
6.2.14	Reverse Transkriptase-Reaktion	69
6.2.15	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	69
6.3	Zellbiologische Methoden.....	70
6.3.1	Zelllinien und Medien	70
6.3.2	Kultur von Säugerzellen.....	70
6.3.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	70

6.3.4	Transfektion von HEK und COS7 Zellen durch Elektroporation	71
6.3.5	Transfektion von C3H10T1/2 Zellen mit Lipofectamine Plus ® Reagenz.....	71
6.3.6	Fixieren und permeabilisieren von Säugerzellen	71
6.3.7	Indirekte Immunfluoreszenz,	71
6.3.8	Fluoreszenzmikroskopie.....	72
6.4	Proteinchemische und immunologische Methoden.....	72
6.4.1	Reinigung von rekombinant exprimiertem CAP1	72
6.4.2	Expression und Reinigung eines aminoterminalen Teilstücks von CAP2 in <i>E. coli</i>	73
6.4.3	Herstellung monoklonaler Antikörper	74
6.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	78
6.4.5	Western-Blot-Analyse	79
6.4.6	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Membranen	79
6.4.7	Proteinfärbung.....	79
6.4.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	80
6.4.9	Bestimmung der Proteinkonzentration mit der BCA Methode [Smith et al., 1985]	80
6.4.10	Bestimmung des relativen F-Aktin gehaltes von Zellen [Hall et al., 1988].....	81
6.4.11	Gelfiltrationsexperimente [Didichenko et al., 2000].....	82
6.4.12	Immunpräzipitationen aus HEK Zelllysaten mit anti-GFP Antikörper	82
6.4.13	Fraktionierung von HEK Zellen in Triton X-100 lösliche und unlösliche Fraktion, verändert nach Ko et al. [Ko et al., 2001]	83
6.4.14	Fraktionierung von HEK Zellen in Membran-, Kern- und Zytosol- Fraktion [Jugloff und Jongstra-Bilen, 1997]	83
6.5	Konstruktion von Vektoren.....	84
6.5.1	Klonierung der CAP1 und CAP2 cDNA.....	84
6.5.2	Herstellung von CAP1 und CAP2 Expressionsplasmiden für die Expression in <i>E. coli</i>	85
6.5.3	Herstellung von CAP1 und CAP2 Expressionskonstrukten auf Basis der pEGFP Vektoren	85
7	Literatur	89

1 Einleitung

1.1 Das Zytoskelett

Ein Hauptmerkmal eukaryotischer Zellen ist der Besitz eines Zytoskeletts. Das Zytoskelet ist ein dynamisches Netzwerk von filamentösen Strukturen, das den Zellen neben mechanischer Stabilität und Form die Fähigkeit zu vielen bewegungsabhängigen Prozessen verleiht. Es werden drei verschiedene miteinander vernetzte Filamentsysteme unterschieden, die anhand ihrer Komponenten und Größe kategorisiert werden. Aktin oder Mikrofilamente werden aus Aktin (43kDa) aufgebaut und haben einen Durchmesser von etwa 5-6nm, Mikrotubuli einen von 25nm und Intermediärfilamente einen von 7-10nm. Das Aktinzytoskelett ist wichtig kritisch für Zellform, Zellwachstum, Zellteilung und Bewegung [Übersicht in: [Bershadsky und Vasiliev, 1988]. Die röhrenförmigen Mikrotubuli durchziehen vom sogenannten Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) ausgehend die gesamte Zelle. Mikrotubuli bilden den mitotischen Spindelapparat, sind maßgeblicher Bestandteil von Flagellen, sind im Verbund mit Motorproteinen am Vesikeltransport beteiligt und sind essentiell für die Etablierung der Zellpolarität. Für die Intermediärfilamente wurde eine Beteiligung an der mechanischen Stabilisierung der Zellen beschrieben [Franke, 1993].

1.2 Organisation des Aktinzytoskeletts

In Muskelzellen bilden Aktin- und Myosinfilamente die spezialisierte Einheit der Krafterzeugung, das Sarkomer. Unter Energieverbrauch können Aktinfilamente und Myosinfilamente aneinander vorbeigleiten, was zur Kontraktion des Muskels führt [Huxley, 1969]. In Nichtmuskelzellen bilden die Aktinfilamente keine permanente Struktur, sie unterliegen vielmehr einem dynamischen Auf- und Abbau. Viele Zelltypen werden von langen Bündeln aneinandergelagerter Aktinfilamente, den Stressfasern, durchzogen. Unter der Plasmamembran der Zellen befindet sich ein feines Netzwerk kürzerer Aktinfilamente, der sogenannte Kortex.

In vitro werden Mikrofilamente (F-Aktin) unter ATP Verbrauch, in Anwesenheit von mono- oder divalenten Kationen wie Kalium- oder Magnesiumionen, aus monomerem Aktin gebildet. Die Bindung der Ionen an Aktinmonomere führt zu einer Konformationsänderung, die die Bildung der Filamente ermöglicht. Bildung und Dynamik eines Aktinfilaments wird durch die Prozesse der Nukleation und Polymerisation bzw. Depolymerisation bestimmt. In einer Nukleationsphase lagern sich mehrere Aktinmonomere zu einem Trimer zusammen. Die Nukleationsphase ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Polymerisation. Aktinfilamente sind gerichtet, es existiert jeweils ein schnell wachsendes (+) und ein langsam

wachsendes Ende (-). Aktinanlagerung kann an beiden Enden, allerdings in unterschiedlichen Raten stattfinden. Bei der sogenannten kritischen G-Aktin Konzentration laufen Polymerisation und Depolymerisation mit gleicher Geschwindigkeit ab.

Die kritische G-Aktinkonzentration beträgt für das schnellwachsende Ende etwa $0,1\mu\text{M}$ und für das langsamwachsende (-)Ende $0,8\mu\text{M}$ [Gaertner et al., 1989; Wegner und Isenberg, 1983]. Die Konzentration von Aktin in Nichtmuskelzellen beträgt etwa $100\mu\text{M}$, ein Wert der weit über der kritischen Konzentration für die Aktinpolymerisation liegt. Diese Konzentration und das Ionenmilieu der Zelle sollten für eine vollständige Vorlage des Aktins als F-Aktin sorgen [Zigmond, 1989]. Dies ist jedoch nicht der Fall und nur ungefähr die Hälfte davon liegt in polymerer Form vor. Deshalb wurde vorgeschlagen, dass das meiste G-Aktin in der Zelle an Protein gebunden vorliegt, um die kritische Konzentration beizubehalten [Carlier und Pantaloni, 1997]. Die Aktinpolymerisation in der Zelle unterliegt somit einer weiteren Regulation. Diese Regulation wird, zum Teil stimulusabhängig, von einer großen Anzahl von G- und F-Aktin bindenden Proteinen bewerkstelligt [zur Übersicht siehe [Pollard und Cooper, 1986; Stossel et al., 1985; Zigmond, 1996]]. Dabei spielen Proteine, die in das Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation der Aktin-Monomere eingreifen, eine wichtige Rolle [zu Übersicht siehe [Amos, 1991]].

1.3 Aktin und Aktin bindende Proteine

Aktin bindende Proteine lassen sich nach ihrer Funktion in Gruppen einteilen. Proteine wie α -Actinin und Fascin, besorgen eine Vernetzung von Aktinfilamenten zu Strukturen höherer Ordnung. Motorproteine wie Myosine gleiten unter Energieverbrauch an Aktinfilamente entlang [zur Übersicht siehe [Kreis und eds., 1993]]. Proteine wie Interaptin [Rivero et al., 1998] und Comitin [Weiner et al., 1993] sorgen für eine Verbindung von Aktinfilamenten mit zellulären Membranen [zur Übersicht siehe [Eichinger et al., 1999]]. Neben diesen Proteinen gibt es Proteine die die Aktinpolymerisation regulieren. Die Proteine des Arp2/3 Komplexes sorgen für die Nukleation von monomerem Aktin und für die Verzweigung von Aktinfilamenten. Die Aktivität des Arp2/3 Komplexes selbst ist wiederum einer starken Regulation unterworfen [zur Übersicht siehe [Higgs und Pollard, 2001]].

Eine weitere Gruppe Aktin bindender Proteine assoziiert mit dem schnell wachsenden Ende der Filamente und verhindert so die Anlagerung von Monomeren, so dass für eine Filamentverlängerung nur das langsam wachsende Ende zur Verfügung steht. Diese Funktion haben z. B. Cap Z aus den Z-Banden der Muskelzellen [Casella et al., 1986] und Cap32/34

aus *D. discoideum* [Eddy et al., 1996]. Proteine wie Tropomodulin [Weber et al., 1994] dagegen binden an das langsam wachsende Ende des Filaments.

Die Depolymerisation von Aktinfilamenten ist durch die ständig notwendige Reorganisation des Zytoskeletts unerlässlich. Die Filamente werden dazu zunächst in kleinere Stücke fragmentiert. Diese Funktion wird von Proteinen wie Gelsolin aus Säugerzellen [Yin und Stossel, 1979] und Severin aus *D. discoideum* [Eichinger et al., 1998; Eichinger und Schleicher, 1992] übernommen. Nach der Fragmentierung der Filamente binden sie an das (+)-Ende der Filamente und verhindern so deren Verlängerung.

Eine weitere Klasse von Proteinen bindet G-Aktin. Beispiele hierfür sind Profilin, Thymosin und Proteine der WASP Familie (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein Familie). Profilin wird durch Phosphoinositide reguliert und bindet G-Aktin in einem Verhältnis von 1:1. Dadurch wird monomeres Aktin dem Gleichgewicht entzogen und die Polymerisation verlangsamt. [zur Übersicht siehe [Sohn und Goldschmidt-Clermont, 1994]]. Durch zelluläre Stimuli aktiviertes WASP bindet ebenfalls G-Aktin und sorgt seinerseits für eine Aktivierung des Arp2/3 Komplexes [zur Übersicht siehe [Zigmond, 2000]]

Weitere Proteine aus der Klasse der G-Aktin bindenden Proteine stellen die Proteine der CAP-Familie dar [zur Übersicht siehe auch [Hubberstey und Mottillo, 2002; Stevenson und Theurkauf, 2000]. CAP wurde zuerst in *Saccharomyces cerevesiae* (hier auch als SRV2 bezeichnet) als Suppressor von aktiviertem RAS2 identifiziert [Fedor-Chaiken et al., 1990]. Weiterhin wurde CAP als 70kDa Untereinheit des Adenylat Zykase Komplexes identifiziert (CAP für Cyclase Associated Protein) [Field et al., 1990].

Die Inaktivierung des CAP Gens in Hefe führte zur Unfähigkeit der Hefen auf Vollmedium zu wachsen, zur Temperatursensitivität beim Wachstum auf Minimalmedium und zu einer Sensitivität gegen Stickstoffentzug. Die Zellen zeigten eine Zunahme der Größe und hatten eine veränderte Zellform, was auf Störungen des Aktinzytoskeletts zurückzuführen sein könnte. Die Wachstumsdefekte lassen sich mit einer Störung des RAS2-Adenylatzyklase Signalwegs erklären.

In allen bisher untersuchten Spezies wurden zu CAP homologe Proteine gefunden, was auf eine konservierte Funktion von CAP in der Evolution hinweist. Die bisher identifizierten CAP Proteine haben molare Massen zwischen 70kDa für das Hefeprotein und etwa 52kDa für Maus CAP Säuger besitzen zwei CAP Homologe [Swiston et al., 1995], die untereinander eine Identität von etwa 64% aufweisen.

1.4 Domänenstruktur und Funktion von CAP, Stand der Forschung

CAP aus allen Organismen weisen eine konservierte Domänenstruktur auf. Eine aminoterminal Domäne wird durch einen Prolin-reichen Bereich von einer carboxyterminalen Domäne getrennt (Abb. 1). Computergestützte Homologieuntersuchungen haben zusätzlich eine in allen CAP Proteinen konservierte WH2 Domäne (WH2=WASP Homologie 2) identifiziert. WH2 Domänen binden an G-Aktin, die Funktionalität der WH2 Domäne im CAP ist jedoch nicht geklärt [Paunola et al., 2002].

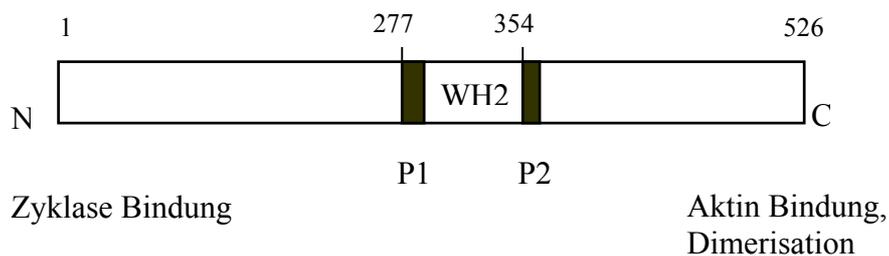


Abb.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von CAP aus *S.cerevisiae* (verändert nach [Zelicof et al. 1996]). Die beiden Prolin-reichen Bereiche sind gekennzeichnet (P1, P2). Die funktionalen Bereiche sind markiert genauso wie der Bereich der WH2 Domäne.

In *S. cerevisiae* interagiert der Aminoterminal von CAP mit dem Carboxyterminus der Adenylatzyklase und vermittelt die zellulären Funktionen von aktiviertem RAS2 Protein. Der Carboxyterminus ist notwendig um eine normale Zellmorphologie zu erhalten.

1.5 Interaktion von CAP mit der Adenylatzyklase

CAP spielt eine Rolle in der RAS-Adenylatzyklase Interaktion [Wang et al., 1993]. Untersuchungen der Domänenstruktur von CAP zeigten, dass die Expression des aminoterminalen Drittels von CAP Defekte des Adenylatzyklase und RAS Signalweges in der CAP Null Mutante aufheben konnte [Gerst et al., 1991]. Für die Interaktion von CAP, RAS2 und Adenylatzyklase ist der Aminoterminal von CAP verantwortlich, die ersten 36 Aminosäurereste von CAP interagieren mit der Adenylatzyklase. Die aminoterminalen 36 Aminosäurereste von CAP sind in sogenannten „heptad-repeats“ axxxxx angeordnet (a steht für eine hydrophoben Aminosäurerest und x für einen beliebigen Aminosäurerest). Eine Interaktion mit der Adenylatzyklase durch Bildung eines sogenannten „coiled-coils“ wurde durch Computeranalyse vorhergesagt. Mutationen in den hydrophoben Aminosäureresten des

„heptad-repeats“ zerstörten die Bindung an die Adenylatzyklase. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Expression dieser 36 Aminosäurereste ausreichend ist, um die Funktion von CAP im RAS-Signaltransduktionsweg zu komplementieren [Nishida et al., 1998].

Die Bindestelle für CAP an der Zykase wurde an deren Carboxyterminus lokalisiert. Die Interaktion mit CAP findet durch die carboxyterminalen 150 Aminosäurereste der Adenylatzyklase statt [Mintzer und Field, 1994; Nishida et al., 1998; Wang et al., 1993].

Neben dem *S. cerevesiae* CAP wurde eine direkte Interaktion von CAP mit einer Adenylatzyklase auch in *S. pombe* nachgewiesen, wo es ebenfalls an deren Aktivierung beteiligt ist. Teilweise können die Defekte, die mit der Inaktivierung von CAP in *S. pombe* verbunden sind durch Expression von CAP aus *S. cerevesiae* aufgehoben werden [Kawamukai et al., 1992]. Auch in der Hefe *Candida albicans* scheint die Kopplung von CAP an Adenylatzyklase konserviert zu sein. In *C. albicans* führt die Inaktivierung des CAP Gens, wie in *S. cerevesiae* zu einem verringerten cAMP Spiegel in den Zellen [Bahn und Sundstrom, 2001].

In *Chlorohydra viridissima* ist das CAP Homolog in die Signaltransduktion des Signalpeptides HA (head aktivator) involviert. HA ist in Hydra ein Signal zur Differenzierung und Neurogenese. Die Gabe von cAMP Agonisten kann die Wirkung von HA imitieren, wohingegen die Gabe von cAMP Antagonisten die Wirkung von HA inhibiert. Inaktiviert man CAP durch Gabe von „antisense“ Oligonukleotiden, ist die Wirkung von HA aufgehoben, nicht jedoch die der cAMP Agonisten. Diese Experimente ordnen Hydra CAP in einen Signaltransduktionsweg zwischen dem membranständigen HA Rezeptor und der Adenylatzyklase ein [Fenger et al., 1994]. Für eine Interaktion von weiteren CAP Homologen mit Adenylatzyklasen gibt es bisher keine Hinweise.

1.6 Wirkung von CAP auf das Aktin Zytoskelett

Die Expression des carboxyterminalen Drittels von CAP unterdrückte in der CAP Null Mutante in *S. cerevesiae* Defekte wie veränderte Zellmorphologie, veränderte Knospungsstellen und Veränderungen im Aktinkortex [Gerst et al., 1991]. Für die carboxyterminale Domäne konnte eine G-Aktin Bindungs-Funktion nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass CAP an G-Aktin im Verhältnis 1: 1 bindet [Freeman et al., 1995]. Eine Deletion der letzten 27 Aminosäuren unterbindet die Aktin Bindung [Zelicof et al., 1996].

Dictyostelium besitzt ebenfalls ein CAP Homolog. Es weist etwa 40% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit Hefe CAP auf. CAP defiziente *Dictyostelium* Stämme weisen eine veränderte Zellgröße auf und haben einen Zytokinese- Pinozytosedefekt. Diese Veränderungen sind gut mit einer Rolle von CAP in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts zu vereinbaren [Noegel et al., 1999]. *Dictyostelium* CAP bindet G-Aktin mit einer 1:1 Stöchiometrie. Die Aktin bindende Domäne ist auch hier im Carboxyterminus lokalisiert. Die Aktinbindungsaktivität des rekombinanten Vollängenproteins wurde *in vitro* durch PIP₂ dosisabhängig inhibiert (molares Verhältnis CAP: PIP₂ = 1 : 40). Überraschenderweise konnte die Bindung von Aktin an den rekombinant exprimierten Carboxyterminus nicht durch PIP₂ inhibiert werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Aminoterminus für die Regulation durch PIP₂ verantwortlich ist [Gottwald et al., 1996].

Aus Blutplättchen des Hausschweins konnte eine Aktin Monomer Bindungsaktivität aufgereinigt werden, ASP-56 (Actin Sequestering Protein, 56kDa). ASP-56 bindet Aktin im Verhältnis 1:1 und inhibiert *in vitro* die Aktinpolymerisation. Die Sequenzierung von 20 tryptischen Peptiden von Asp-56 ergab die Identifikation des ersten CAP Homologen in einem Säuger [Gieselmann und Mann, 1992].

Durch die Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden in Polymerasekettenreaktion an cDNA konnten weitere Homologe aus Säugern isoliert werden, zunächst eine humane cDNA, welche für ein 475 Aminosäurereste großes Protein kodiert [Matviw et al., 1992]. Die Identifikation von Homologen in Maus [Vojtek und Cooper, 1993] und Ratte MCH1 [Zelicof et al., 1993] folgten. Später wurde noch ein zweites Homolog zu CAP in Mensch [Yu et al., 1994] und Ratte nachgewiesen [Swiston et al., 1995]. Diese als CAP2 bezeichneten Proteine konnten bisher nur in Säugern nachgewiesen werden.

Die Bindung von verschiedenen CAP Proteinen aus Säugern an Aktin konnte durch Immunpräzipitationsexperimente nachgewiesen werden. Eine nähere Untersuchung von humanem CAP und CAP aus Ratte (MCH1) identifizierte wie in Hefe den C-Terminus als Aktin bindende Domäne [Hubberstey et al., 1996; Zelicof et al., 1996]. Die Mikroinjektion von anti-CAP Antikörpern in Swiss3T3 Maus Fibroblasten verringerte die Stressfaser Bildung und die Mikroinjektion von gereinigtem CAP aus Blutplättchen induzierte die Bildung von Aktinfilamenten [Freeman und Field, 2000].

CAP aus *Arabidopsis thaliana*, ein Protein mit 476 Aminosäureresten, bindet ebenfalls mit dem Carboxyterminus an Aktin. Die Überexpression von *Arabidopsis* CAP in transgenen Pflanzen führte zu einer reduzierten Blattgröße und zu kleineren und weniger Epidermis- und

Mesophyllzellen in den Blättern. Weiterhin verursachte die induzierbare Überexpression von *Arabidopsis* CAP in in Suspension kultivierten Tabakzellen zu einem Mitosedefekt und einem Defekt in der Ausbildung von Aktinfilamenten [Barrero et al., 2002].

Kürzlich wurde CAP aus Maus Testes im Komplex mit Aktin aufgereinigt. Konkurrenzexperimente mit mutiertem β -Aktin legten den Schluss nahe, dass Maus-CAP eine höhere Affinität zu nicht nativ gefaltetem Aktin als zu nativ gefaltetem Aktin hat. An CAP gebundenes Aktin hat im Vergleich zu freiem Aktin eine höhere Sensitivität gegenüber einer Verdauung mit Trypsin. Dies deutet ebenfalls auf eine andere Faltung von an CAP gebundenem Aktin hin. Zusammenfassend wurde der Schluss gezogen, dass CAP eine hohe Affinität zu Ionen oder Nukleotid freiem Aktin besitzt. Dieses deutet wiederum auf eine mögliche Aktivität von CAP als Aktin Chaperon hin [McCormack et al., 2001].

1.7 Konservierung der Funktion der carboxyterminalen Domäne

Die Expression von CAP aus *S. pombe* [Kawamukai et al., 1992], verschiedenen Säugern [Matviw et al., 1992; Vojtek und Cooper, 1993] [Yu et al., 1994; Zelicof et al., 1993] aus dem Pilz *L. edodes* [Zhou et al., 1998] und aus *A. thaliana* [Barrero et al., 2002] konnte die Zytoskelett-assoziierten Defekte in CAP defizienten *S. cerevisiae* komplementieren. Dieses Ergebnis lässt auf eine hohe evolutive Konservierung der Funktion des Carboxyterminus schließen.

Weiterhin konnte die Überexpression von Profilinen die Zytoskelett-assoziierten Defekte in CAP defizienten Hefen aufheben. Profiline binden Aktin in einem 1:1 Verhältnis. Weiterhin fungiert Profilin als ADP/ATP Austauschfaktor für Aktin und bindet PIP₂ [Theriot und Mitchison, 1993; Carlier und Pantaloni, 1994]. Die Zytoskelett assoziierten Defekte konnten durch Profilin aus Hefe und durch die Profilin II Isoform aus *Acanthamoeba* aufgehoben werden, nicht jedoch durch die Isoform I. Die Isoform II zeichnet sich gegenüber der Isoform I durch eine verstärkte PIP₂ Bindung aus [Vojtek et al., 1991]. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Komplementation des durch die CAP Inaktivierung verursachten Phänotyps in Hefe durch die Bindung von Profilin an PIP₂ verursacht wird [Goldschmidt-Clermont und Janmey, 1991]. Weiterhin wurde vorgeschlagen, dass CAP und Profilin eine Verbindung zwischen Wachstumssignalen und der Reorganisation des Zytoskeletts darstellen [Vojtek et al., 1991].

1.8 Der Prolin-reiche Bereich

Der aminoternale und der carboxyterminale Bereich werden von einem zentralen Prolin-reichen Bereich voneinander getrennt sind. Der Prolin-reiche Bereich von CAP aus Hefe gliedert sich in zwei Teile, P1 und P2. Für P2 konnte *in vitro* eine Bindung an die SH3 Domänen von Abp1 und verschiedenen anderen Proteinen gezeigt werden. Des weiteren wurde gezeigt, dass der Prolin-reiche Bereich im Falle von *S. cerevesiae* für die Lokalisation von CAP im Aktin Kortex verantwortlich ist [Freeman et al., 1996]. CAP aus Säugern und aus *Dictyostelium* besitzen nur einen Prolin-reichen Bereich. Im Falle von *Dictyostelium* CAP enthält der Prolin-reiche Bereich nur etwa zu 20% Prolinreste [Gottwald et al., 1996].

Im Gegensatz zu Hefe konnte dem Prolin-reichen Bereich in anderen Organismen bisher keine Funktion nachgewiesen werden. In „blot-overlay-assays“ mit MCH1, dem Homologen Protein aus Ratte, wurde eine Bindung der SH3 Domäne der nicht Rezeptor Tyrosin Kinase cAbl nachgewiesen. Die funktionelle Relevanz hiervon ist jedoch unbekannt [Freeman et al., 1996].

1.9 Komplexbildung und Dimerisierung

In Hefe liegt CAP im Komplex mit der Adenylatzyklase vor. Die Größe des Adenylatzyklase Komplexes ist in CAP defizienten Hefen um etwa 250kDa gegenüber dem der Wildtyp Hefen verringert (von 890 auf 610kDa). 250kDa entsprechen einem Heterotetramer aus G-Aktin und CAP [Wang et al., 1992]. Im Carboxyterminus von CAP aus *S. cerevesiae* konnte eine Dimerisierungs- bzw. Oligomerisierungsfunktion lokalisiert werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass CAP mit dem homologen Protein aus Ratte interagieren kann. In Hefe exprimiertes MCH1 bildet Komplexe von 200kDa oder größer [Zelicof et al., 1996]. Später wurde gezeigt, daß bestimmte Mutationen im N-Terminus zu einer veränderten subzellulären Lokalisation, einem verändertem Multimerisierungsverhalten und einer verringerten Bindung an SH3 Domänen von CAP führten [Yu et al., 1999].

Das Bild wurde komplexer als für das Homolog aus Ratte in Immunpräzipitationsexperimenten gezeigt wurde, dass der Carboxyterminus nicht nur mit dem Carboxyterminus sondern auch mit dem Aminoternus interagieren kann. Weiterhin wurde eine Interaktion der aminoternalen Domänen miteinander nachgewiesen [Hubberstey et al., 1996].

1.10 Subzelluläre Lokalisation von CAP

Im Gegensatz zu *S. cerevesiae* CAP, welches durch den Prolin reichen Bereich in den Aktinkortex, also den Bereich mit hohem „Aktin Umsatzes“ dirigiert wird, scheinen für die Lokalisation anderer CAP Proteine andere Domänen verantwortlich zu sein. Die Analyse der subzellulären Lokalisation zeigte, dass CAP in polaren Regionen von *Dictyostelium* Zellen und in den „leading edges“ von chemotaktisch stimulierten Zellen angereichert ist und dort mit F-Aktin kolokalisiert [Gottwald et al., 1996]. Eine Untersuchung der Domänenstruktur mit Hilfe von GFP-CAP Fusionsproteinen identifizierte den Aminoterminus von *Dictyostelium* CAP als verantwortlich für die subzelluläre Lokalisation, der Carboxyterminus zeigte dagegen keine Umlagerung an die „leading edge“ [Noegel et al., 1999].

In Säugerzellen wurde die Subzelluläre Lokalisation von CAP mit Hilfe monoklonaler Antikörper [Vojtek und Cooper, 1993] oder mit rekombinant exprimierten Fusionsproteinen [Zelicof et al., 1996] untersucht. In den zitierten Fällen stellte sich die Lokalisation als zytosolisch mit teilweisen Konzentrationen an Zellmembran und Lamellipodien dar, eine Kolokalisation mit Stressfasern konnte nicht gezeigt werden. In einer weiteren Publikation wurde gezeigt, dass monoklonale Antikörper gegen humanes CAP zusätzlich zur Lokalisation an Lamellipodien CAP an Stressfasern in Swiss3T3 Fibroblasten nachwies. Für die subzelluläre Lokalisation an Lamellipodien und Stressfasern wurde hier ebenfalls der Aminoterminus von CAP verantwortlich gemacht [Freeman und Field, 2000].

1.11 Endozytose

Der erste Hinweis auf eine Beteiligung von CAP an Endozytosevorgängen ergab sich daraus, dass Defekte in CAP defizienten Hefen teilweise durch Expression von SNC1 komplementiert werden konnten. SNC1 ist ein Protein mit starker Homologie zu synaptischen Vesikelproteinen aus Säugern [Gerst et al., 1992]. Später wurde ein rezessiv negatives Allel, SRV2, des CAP Gens aus *S. cerevesiae* identifiziert, welches einen Endozytosedefekt verursacht [Wesp et al., 1997]. Weiterhin wurde CAP als Komponente von aufgereinigten Phagosomen aus der murinen J774 Makrophagenzelllinie mittels 2D Gelelektrophorese und folgender MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert [Garin et al., 2001].

In *D. discoideum* ist CAP an der sogenannten „phagocytic cup“ angereichert [A.Noegel unpublizierte Ergebnisse]. Eine Rolle von CAP hierbei könnte darin bestehen, Rearrangements im Aktinzytoskelett zu organisieren, die bei Endozytosevorgängen notwendig sind.

1.12 Funktion von CAP in Differenzierungsvorgängen

In Baumwollpflanzen wird die CAP mRNA am stärksten in sich entwickelnden Faserzellen exprimiert, die mit Hilfe des Zytoskeletts eine starke Elongation erfahren [Kawai et al., 1998]. In Säugern wurde CAP1 in vielen verschiedenen Geweben identifiziert, wohingegen CAP2 nur in wenigen Geweben stark exprimiert wird [Swiston et al., 1995]. Aber auch CAP1 scheint nicht vollständig ubiquitär exprimiert zu werden. Eine kürzlich publizierte Studie zeigt eine differenzielle Expression von CAP1 nur in eine Untergruppe von Zellen der Geschmacksknospen [Ishimaru et al., 2001]. In *Drosophila* wurde ein CAP Gen (*acu*, *capulet*) auf der Suche nach Mutanten, die die Augenentwicklung inhibieren, identifiziert. Die Inaktivierung des *acu* Gens führte zur vermehrten Polymerisation von Aktin während der Augenentwicklung und zu Defekten bei der Bildung der morphogenetischen Furche der Augenscheibenanlage [Benlali et al., 2000].

Weiterhin wurde eine *Drosophila* CAP Mutante identifiziert, die einen Defekt in der Etablierung der Polarität der Oocyte aufweisen [Baum et al., 2000]. *Drosophila* Stämme mit mutiertem Proteinkinase A (PKA) Gen sind *Drosophila* CAP-Mutanten sehr ähnlich. Der Phänotyp von CAP, PKA Doppelmutanten ist noch weit stärker ausgeprägt, was auf eine Interaktion von CAP und PKA im selben Signaltransduktionsweg hinweist [Baum und Perrimon, 2001].

1.13 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten Differenzielle Expression und die Funktion der CAP Homologe der Maus untersucht werden.

An rekombinant in *E. coli* hergestelltem CAP1 und CAP2 Protein sollten Aktinbindung und eine mögliche Regulation durch PIP₂ untersucht werden. Als vielseitig nutzbares Reagenz sollten gegen beide CAP Proteine monoklonale Antikörper erzeugt werden.

Die Expression in verschiedenen Geweben sollte auf RNA Ebene mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen und auf Proteinebene mit Hilfe monoklonaler Antikörper untersucht werden. Es sollte die subzelluläre Lokalisation von CAP1 und CAP2 untersucht und verglichen werden. Weiterhin sollten die Bereiche der CAP Proteine identifiziert werden, die für eine korrekte Lokalisation der Proteine in der Zelle sorgen.

Zusätzlich hierzu sollte das Verhalten der CAP Proteine im zellulären Kontext in Bezug auf Aktinbindung, und Komplexbildung untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Klonierung der CAP1 und CAP2 cDNA aus Maus

Eine cDNA Sequenz für CAP1 aus Maus wurde von Voitek et al. [Voitek und Cooper, 1993] publiziert. Für CAP2 lag eine Sequenz aus Ratte vor [Swiston et al., 1995]. Um einen cDNA-Klon für Maus CAP1 zu erhalten, wurden anhand der publizierten cDNA Sequenz von Maus CAP (Acc# L12367) Primer entworfen. Mit diesen Primern wurde eine PCR an cDNA aus C3H10T1/2 Maus Fibroblasten durchgeführt, das Amplifikationsprodukt wurde in pGEM-Teasy™ kloniert und sequenziert (siehe Material & Methoden 6.5.1). Für CAP2 wurde eine Homologie-Suche der Maus EST Datenbanken (EMBL) mit der Sequenz von CAP2 aus Ratte (Acc# U31935) durchgeführt. Verschiedene EST Klone für den Anfang und das Ende des kodierenden Bereichs von Maus CAP2 wurden identifiziert. Von diesen wurden Sequenzen aus den Bereichen des Amino- und Carboxyterminus ausgewählt, Primer abgeleitet und eine PCR an cDNA aus Maus Herzgewebe (Stamm: Balb/c) durchgeführt. Das Amplifikationsprodukt wurde kloniert und die Sequenz bestätigt (Abb.2), aus cDNA von C3H10T1/2 Zellen und Leber wurde kein Amplifikationsprodukt erhalten. Zur Verifikation der Sequenz wurden Amplifikationsprodukte aus zwei verschiedenen PCR Reaktion miteinander verglichen. Eine Analyse der Maus CAP2 cDNA zeigt, dass die Translation im Vergleich zu CAP2 aus Mensch und Ratte wahrscheinlich erst am zweiten Methionin beginnt, da erst das zweite vorhandene Methionin-Kodon in eine Translations-Initiations-Konsensussequenz [Kozak, 1987] eingebettet ist. Die CAP2 cDNA kodiert für ein Protein von 476 Aminosäureresten

```

1      ATGACAGACA TGGCGGGACT GATGGAGAGG CTGGAACGTG CAGTCATCCG GCTGGAGCAG CTGTCTGCAG
71     GGTTAGACGG ACCTCCCAGA GGTCGCGGGG AAGTGAATGG TGTC AATGGA GGTGTGGCAC CGTCCGTGGA
141    AGCTTTTGAC AAAGTATAA ACAGTATGGT GGCCGAGTTC TTAAAGAACA GCCGAGTCC TGTGTTGAGC
211    GTAGAGACTC ACGCAGAAAT GGTGCACGGT GCTTTC AAG CCCAGCGTGC TTTTCTTCTC ATGGTCTCGC
281    AGTACCAACA ACCCCAGGAG AATGAAGTTG CTGTCCCTTCT GAAGCCCATA TCGGAGAAGA TTCAAGAAAT
351    ACAGACTTTC CGAGAGAGAA ACCGGGGAAG CAACATGTTT AACCACCTCT CGGCAGTCAG TGAAAAGCATC
421    GCCGCCCTGG GCTGGATAGC CGTGTCCCCC AAACCTGGTC CTTATGTCAA GGAGATGAAC GACGCTGCCA
491    CCTTTTACAC AAACAGGGTC CTGAAAGACT ACAAGCACAG CGATCTGCGC CACGTGGATT GGGTGAGGTC
561    CTACCTCAAC ATCTGGAGCG AGCTGCAAGC CTACATCAGG GAACACCACA CCACAGGCCCT CACTTGGAGC
631    AAAACAGGTC CTGTGGCATC CACAGCGTCA GCGTTTTCCA TCCTCTCCTC TGGCCTGGT CTCCCGCCAC
701    CACCTCCACC ACCACCTCCT CCTGGGCCAC CTCACCCCTT TGAGAATGAG GATAAAAAGG AGGAGCCCTC
771    CCCTTCTCGC TCAGCTTTAT TTGCCAGCT CAATCAAGGA GAAGCCATCA CTAAAGGGCT CCGGCATGTC
841    ACAGATGACA AGAAGACATA CAAGAATCCC AGCCTGAGGG CTCAAGGACA GATTTCGCTCT CCAACCAAAA
911    CTCACACGCC GAGCCCACA TCTCCAAAAT CGAATTCCTC TCAGAAACAT ACTCCAGTGT TGGAGCTGGA
981    AGGGAAGAAG TGGAGAGTGG AATACCAAGA GGACAGGAAT GACCTTGTC TCTCCGAGAC CGAGCTGAAA
1051   CAAGTGGCTT ACATTTTCAA ATGTGACAAA TCCACTCTTC AGATAAAGGG AAAAGTGAAC TCCATCACTG
1121   TCGATAACTG CAAGAAGTTT GGCCTGGTGT TTGATCATGT GGTGGGCATT GTGGAAGTGA TCAACTCCAA
1191   GGACATTCAG ATCCAGGTAA TGGGAGAGT ACCAACAATC TCCATTAATA AGACAGAAGG ATGCCACCTG
1261   TACCTCAGTG AAGATGCACT AGACTGTGAG ATCGTGAGCG CGAAGTCGTC CGAGATGAAT GTCTTGGTCC
1331   CTCAGGATGA CGATTATAGA GAATTCCTCA TTCGCCAGCA GTTCAAGACA ATATGGGATG GCTCCAAGCT
1401   GGTACCCGAA CCTGCAGAGA TCATGGCC TG A

```

Abb.2: Sequenz der kodierenden Region der CAP2 cDNA aus Maus. Die Zahlen geben die Positionen der Nukleotide an. Die Kozak Konsensus Sequenz ist gelb unterlegt. Das erste funktionelle Methionin Startkodon ist Fett unterlegt und unterstrichen, das Stoppkodon ist rot hervorgehoben.

2.2 Sequenzvergleich von Maus CAP 1 und 2 untereinander und mit CAP –Homologen aus anderen Organismen

Der Vergleich der CAP1 und der CAP2 Proteinsequenzen mit CAP aus *S. cerevesiae* zeigt, dass in CAP1 und CAP2 viele Merkmale mit CAP aus *S. cerevesiae* gemeinsam haben. CAP, CAP1 und CAP2 weisen eine ähnliche Domänenstruktur auf, wobei eine aminoterminal Domäne und eine carboxyterminale Domäne durch einen Prolin-reichen Bereich voneinander getrennt sind. Ein Sequenzvergleich der Proteinsequenzen von CAP1 und CAP2 aus verschiedenen Säugern zeigt, dass die CAP1 Proteine untereinander eine höhere Homologie aufweisen als zu den jeweiligen CAP2 Proteinen (s.Abb.2 A und B). CAP1 aus Maus weist zu CAP2 aus Maus 62% Identität und 76% Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz auf. CAP1 und CAP2 Proteine aus den verschiedenen Organismen zeigen zu CAP aus *S. cerevesiae* 33-34% Identität und 52-53% Ähnlichkeit auf. Die CAP2 Proteine weisen mit 88-93% Identität und 93-96% Ähnlichkeit zueinander eine etwas geringere Homologie als die CAP1 Proteine zueinander auf, die zu 95-99% identisch und 97-99% ähnlich sind. Ein weiterer Vergleich der Aminosäuresequenzen von CAP Proteinen aus verschiedenen Organismen zeigt, dass CAP1 und CAP2 Proteine zu anderen CAP Proteinen eine gleiche große Ähnlichkeit aufweisen. Die Verwandtschaft der CAP Proteine untereinander ist im Dendrogramm in Abb.3 B dargestellt. CAP1 und CAP2 Proteine bilden somit jeweils eine eigenständige Unterfamilie innerhalb der CAP Protein Familie.

A

```

RN1 : MAD---MQN---LVERLERAVGRLEAVS-----HTSDMHCG-YGDSPSK--G-AVPYVQ-----AFDSLILANP : 53
MM1 : MAD---MQN---LVERLERAVGRLEAVS-----HTSDMHCG-YGDSPSK--G-AVPYVQ-----AFDSLILANP : 53
HS1 : MAD---MQN---LVERLERAVGRLEAVS-----HTSDMHRG-YADSPSK--AGAAPYVQ-----AFDSLILAGP : 54
RN2 : MAD---MLG---LMORLEFAMSRLERLSS-----GLHEPPGGCG-EVNSLSR--GIVAPSV-----AFDKLINSM : 57
MM2 : MTD---MAG---LMEERLAVIRLEQLSA-----GLDGPGRGCG-EVNGVN---GGVAPSV-----AFDKLINSM : 56
HS2 : MAN---MQG---LVERLERAVSRLESLSA-----ESHRPPGNGC-EVNGVI---AGVAPSV-----AFDKLMDMS : 56
SC : MPDSKYTMQGYNLVKLLKRLLEAFARLEEDVTIYQEGYIQNKLEASKNNKPSDSGADANTTNEPSAENAPEVEQDPKCITAFQSYIGEN : 88

RN1 : VAEYLMKMSKEIGGDVQKHAEMVHTGLKLERALLVTASQCQOP--AGNKLSDLLAPISEQIQEVIITFREKNRGSKFFNHLSAVSESIQA : 139
MM1 : VAEYLMKMSKEIGGDVQKHAEMVHTGLKLERALLVTASQCQOP--AGNKLSDLLAPISEQIQEVIITFREKNRGSKFFNHLSAVSESIQA : 139
HS1 : VAEYLMKMSKEIGGDVQKHAEMVHTGLKLERALLVTASQCQOP--AENKLSDLLAPISEQIQEVIITFREKNRGSKFFNHLSAVSESIQA : 140
RN2 : VAEFLKNSRVLAGDVETHAEMVHGAFQAQRAFLIMVSOHQOP--QENNEVAVLLKPISEKIQEIQEITFRERNRGSDMFNHLSAVSESIQA : 143
MM2 : VAEFLKNSRVLAGDVETHAEMVHGAFQAQRAFLIMVSOHQOP--QENNEVAVLLKPISEKIQEIQEITFRERNRGSDMFNHLSAVSESIQA : 142
HS2 : VAEFLKNSRVLAGDVETHAEMVHGAFQAQRAFLIMVSOHQOP--HENDVAALLKPISEKIQEIQEITFRERNRGSDMFNHLSAVSESIQA : 142
SC : IDPLVELSGKIDTVVLDALQLKGGFQSQLTFLRAAVRSRKPFDYSSQTFADSLRPINENITKLGQLKESNRQSKYFAYLSALSAGAPL : 176

RN1 : LGWVALAAKPGPFVKEMNDAAMFYTNRVLRKYRDVDRKHHVDWVRAYLSTWTELOAYIKEHHTGLAWSKTC-PVAKELSG-----P : 220
MM1 : LGWVALAAKPGPFVKEMNDAAMFYTNRVLRKYRDVDRKHHVDWVRAYLSTWTELOAYIKEHHTGLAWSKTC-PVAKELSG-----P : 220
HS1 : LGWVAMAKPGPFVKEMNDAAMFYTNRVLRKYRDVDRKHHVDWVRAYLSTWTELOAYIKEHHTGLAWSKTC-PVAKELSG-----P : 221
RN2 : LGWIAVSPKPGPFVKEMNDAAMFYTNRVLRDVKRHSDLRHVDWVRSYLNINWSELQAYIKEHHTGLAWSKTC-PVASTASAFSII---S : 227
MM2 : LGWIAVSPKPGPFVKEMNDAAMFYTNRVLRDVKRHSDLRHVDWVRSYLNINWSELQAYIREHHTGLAWSKTC-PVASTASAFSII---S : 226
HS2 : LGWIAVSPKPGPFVKEMNDAAMFYTNRVLRDVKRHSDLRHVDWVRSYLNINWSELQAYIKEHHTGLAWSKTC-PVASTASAFSII---S : 226
SC : FSNVAVDT-IVSMVTFDKDAACFWTNRILKEYRESDPNVAEWWKFLASDNLKAYIKEHHTGVSNKKGDMDFADAMAQSTKNTGAT : 263

RN1 : SGFS-----VSGGPPP-PPPGPPPPVPTSSGSDD--SASRS-----ALFAQINQGESITHALKHVSDDMKTHKNPALKQAQSGPVRSGP : 296
MM1 : SGFS-----VSGGPPP-PPPGPPPIPTSSGSDD--SASRS-----ALFAQINQGESITHALKHVSDDMKTHKNPALKQAQSGPVRSGP : 296
HS1 : SGFS-----AGSGPPP-PPPGPPPPVSTSSGSDE--SASRS-----ALFAQINQGESITHALKHVSDDMKTHKNPALKQAQSGPVRSGP : 297
RN2 : SGGF-----LPPPPPPP-PPPGPPP--FENEGGKEEPSPSRS-----ALFAQLNQGEAITKGLRVTDDKITYKNPSLRAQG-QIRSP : 303
MM2 : SGGF-----LPPPPPPP-PPPGPPP--FENEDKKEEPSPSRS-----ALFAQLNQGEAITKGLRVTDDKITYKNPSLRAQG-QIRSP : 302
HS2 : SGGF-----LPPPPPPP-PPPGPPP--FENEGGKEEPSPSRS-----ALFAQLNQGEAITKGLRVTDDKITYKNPSLRAQGGQTSPT : 303
SC : SSSPASPATAAAPPP-PPAPASVFEIISNDTPATSDANKGGIGAVFAELNQGENITKGLRVDKSOQLHKNPELRSSTVSTVSTGS : 350

```

```

RN1 : KPFSAPKPKPTSPSPKPAIKKEPALLELEGGKWRVENQENVSNIIVDDTELKQVAYIKCVNTTLQIKGKINSITVDNCKKLGLVFDDV : 384
MM1 : KPFSAPKPKPTSPSPKPAIKKEPALLELEGGKWRVENQENVSNIIVDDTELKQVAYIKCVNTTLQIKGKINSITVDNCKKLGLVFDDV : 384
HS1 : KPFSAPKPKPTSPSPKPAIKKEPALLELEGGKWRVENQENVSNIIVDDTELKQVAYIKCVNTTLQIKGKINSITVDNCKKLGLVFDDV : 385
RN2 : KTR-TPSP-TSPKSNPQKHAP-VLELEGGKWRVEYQEDRNDLVISETELKQVAYIKKDKSTLQIKGKINSITVDNCKKLGLVFDHV : 388
MM2 : KTH-TPSP-TSPKSNPQKHAP-VLELEGGKWRVEYQEDRNDLVISETELKQVAYIKKDKSTLQIKGKINSITVDNCKKLGLVFDHV : 387
HS2 : KSH-TPSP-TSPKSYPSQKHAP-VLELEGGKWRVEYQEDRNDLVISETELKQVAYIKKDKSTLQIKGKINSITVDNCKKLGLVFDNV : 388
SC : KSGPPRP-KKSTLK-TKRPP-RKELVGNKWTENYENETESLVIDANKDESIFIGKCSQVLVQIKGKVNALISLSETESCSVVLDS : 435

```

```

RN1 : VGICEIINSRDVQVQVGRVPTISINKTDGCHAYLSKNSLDCEIVSAKSSEMNVLIPT-EGGDFNEFPVPEQFR-TLWNGOKLVTITVT : 470
MM1 : VGIVEIINSRDVQVQVGRVPTISINKTDGCHAYLSKNSLDCEIVSAKSSEMNVLIPT-EGGDFNEFPVPEQFR-TLWNGOKLVTITVT : 470
HS1 : VGIVEIINSRDVQVQVGRVPTISINKTDGCHAYLSKNSLDCEIVSAKSSEMNVLIPT-EGGDFNEFPVPEQFR-TLWNGOKLVTITVT : 471
RN2 : VGIVEVINSKDIQIQVGRVPTISINKTEGCHLYLSKDALDCEIVSAKSSEMNVLP--QDDYREFPIPEQFR-TLWDGSKLITEPA : 473
MM2 : VGIVEVINSKDIQIQVGRVPTISINKTEGCHLYLSKDALDCEIVSAKSSEMNVLP--QDDYREFPIPEQFR-TLWDGSKLITEPA : 472
HS2 : VGIVEVINSQDIQIQVGRVPTISINKTEGCHLYLSKDALDCEIVSAKSSEMNVLIPT--QDDYREFPIPEQFR-TLWDGSKLITEPA : 473
SC : ISGMDVIRKNKFGIQVNSLEPCSIDKSGGNTYLSRESLNTETELYSCSTAINVNLEIGEDDYVEFPPIPEQFRHSFADG-KFKSAVF : 522

```

```

RN1 : ELAG : 474
MM1 : ELAG : 474
HS1 : ELAG : 475
RN2 : EMA : 477
MM2 : EMA : 476
HS2 : EMA : 477
SC : EHAG : 526

```

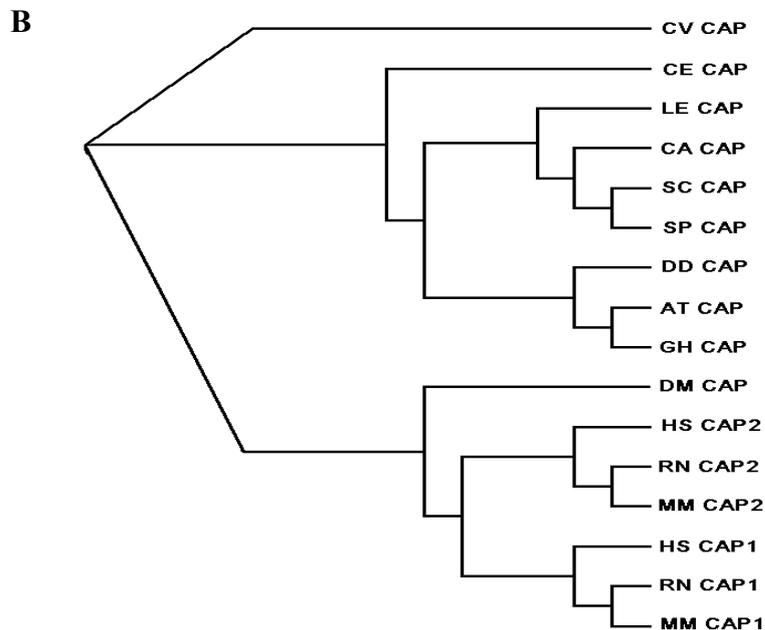


Abb.3: Sequenzvergleich der verschiedenen CAP Proteine. (diese Seite und Seite 13)

A, Sequenzvergleich der CAP Proteine aus Säugern mit CAP aus *S.cerevesiae* mit Hilfe des ClustalW Computer Programms [Higgins, 1988 #129]. Die dunkel unterlegten Bereiche stellen die Bereiche mit höchster Homologie dar. B, Sequenzvergleich der CAP Proteine aus verschiedenen Organismen mit Hilfe von Clustal W, die Daten sind als Dendrogramm dargestellt. die Abkürzungen sind wie folgt verwendet, nachstehend werden die Zugangsnummer der EMBL Datenbank angegeben: CV, *Chlorohydra viridissima* S47091, *Caenorhabditis elegans* AAK68198, LE *Lentinula edodes* BAA26003, *Candida albicans* AAD42978, SC *Saccharomyces cerevesiae* CAA86887, SP *Schizosaccharomyces pombe* CAB 41657, DD *Dictyostelium discoideum*, AT, *Arabidopsis thaliana* CAB80166, GH *Gossypim hirsutum* BAA36585, DM *Drosophila melanogaster* AAD27865, HS CAP1 *Homo sapiens* Q01518, HS *Homo sapiens* CAP2 P40123, MM1 CAP1 *Mus musculus* MM CAP2 *Mus musculus*, RN CAP1 *Rattus norvegicus* A46584, RN CAP2 *Rattus norvegicus* JC4386

2.3 Analyse der CAP1 und CAP2 Expression auf der Transkriptebene

In einer früheren Studie wurde die Expression von CAP1 und CAP2 aus Ratte mit Hilfe von RT-PCR untersucht und miteinander verglichen. CAP1 zeigte sich als mehr ubiquitär exprimiertes Gen, während die CAP2 Expression auf einige Gewebe beschränkt war [Swiston et al., 1995]. Um die Expression von CAP1 und CAP2 in Maus Geweben und Zelllinien zu vergleichen, wurden Northern-Blot-Analysen von Gesamt-RNA aus Geweben und RT-PCR Analysen von Zelllinien durchgeführt.

RNA wurde aus Geweben von 8 Wochen alten Mäuse (Balb/c) präpariert und mit radioaktiv markierten CAP1- und CAP2- spezifischen DNA-Sonden im Northern-Blot analysiert (Abb.5).

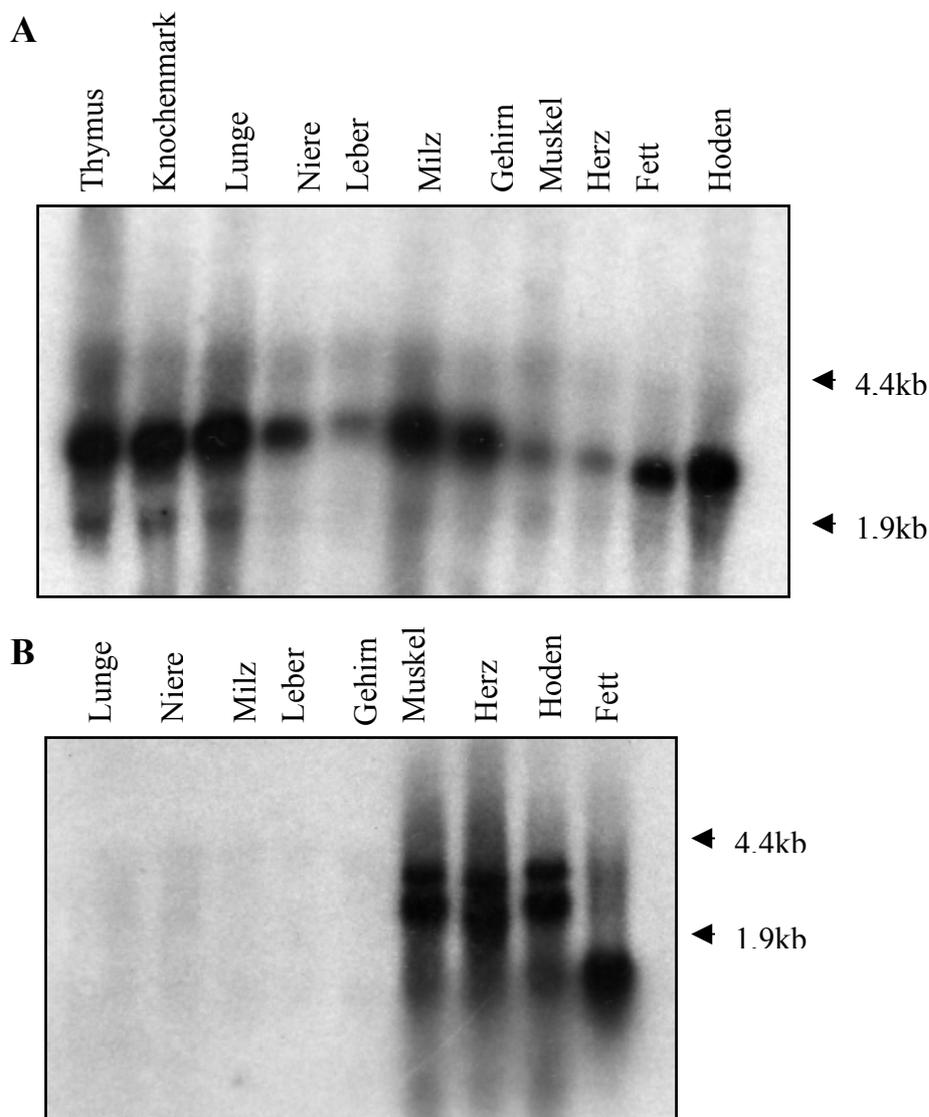


Abb.5: Northern-Blot-Analyse von Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben. 20 μ g RNA aus den jeweiligen Geweben wurden im 1% igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. In (A) erfolgte die Hybridisierung mit einer der CAP1 spezifischen Sonde aus dem N-terminalen Bereich (Position 1-587) in (B) erfolgte die Hybridisierung mit einer CAP2 spezifischen Sonde (Position 1-634). Die Pfeile zeigen die Position der großen (4.4kb) und kleinen (1.9kb) ribosomalen RNA an.

Die CAP1 Sonde, die die ersten 587bp des kodierenden Bereichs der CAP1 cDNA umfasst, erkannte in RNA aus allen hier untersuchten Organen ein 3kb Transkript (Abb.5 A).

Die Transkriptmenge war in RNA aus Thymus, Knochenmark, Lunge, Milz, Gehirn und Hoden am höchsten, in Niere und Fettgewebe geringer und in Leber-, Muskel- und Herzgewebe amgeringsten. Im Unterschied zu CAP1 zeigt CAP2 eine höhere Gewebespezifität der Transkription und die entsprechende mRNA war in Muskel, Herz und Hoden nachweisbar (Abb.5 B). Die CAP2- Sonde, die die ersten 634bp des kodierenden Bereichs der CAP2 cDNA umfasst, erkannte zwei Transkripte von etwa 3kb und 3,5kb. In Fettgewebe wurde eine kleinere RNA detektiert. Sie ist möglicherweise ein Abbauprodukt. In den anderen untersuchten Organen konnten keine Transkripte nachgewiesen werden.

Zusätzlich zur Northern-Blot-Analyse von RNA aus Gewebeextrakten wurde eine Analyse der CAP1 und CAP2 Transkription in verschiedenen Maus Zelllinien mittels RT-PCR vorgenommen. Es wurden CAP1 und CAP2 spezifische Primer verwendet. Zur Kontrolle wurde eine PCR mit Primern, die für Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase-cDNA (GAPDH) spezifisch sind, vorgenommen (Abb.6).

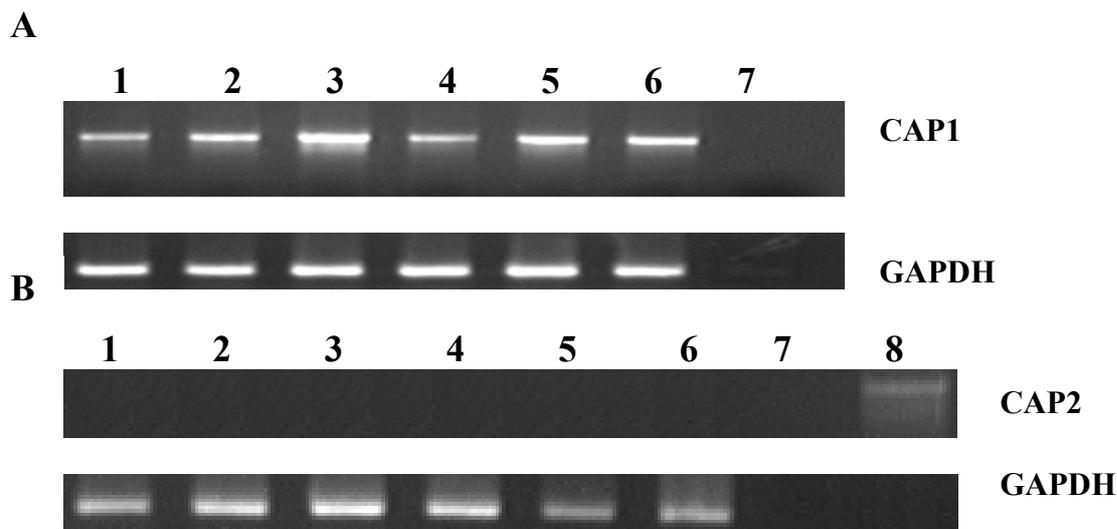


Abb.6: RT-PCR-Analyse verschiedener Maus Zelllinien. Gesamt RNA aus verschiedenen Zelllinien wurde präpariert und revers transkribiert. Eine PCR Reaktion mit CAP1 spezifischen Primern (A) und CAP2 spezifischen Primern (B) wurde durchgeführt. Zur Kontrolle wurde jeweils eine PCR Reaktion mit Primern für die GAPDH cDNA durchgeführt. Die PCR Produkte wurden in Gegenwart von Ethidiumbromid in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV Licht detektiert. Ladung der Spuren: (1) N2A, Neuroblastozelllinie, (2) C3H10T1/2, Fibroblasten, (3) J774, Makrophagen, (4) Pai, Myelomzelllinie, (5) C2-7, Myoblastozelllinie, (6) A20, B-Zelllinie, (7) Wasserkontrolle, (8) pGEM-CAP2 Plasmid DNA.

Die CAP1 mRNA wurde in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen, CAP2 mRNA wurde dagegen in keiner der untersuchten Zelllinien gefunden. CAP1 wird somit, im Gegensatz zu CAP2 in Zelllinien von so verschiedener Herkunft wie Neuroblastomzellen, Myoblastomzellen, Fibroblastenzellen, Myelomzellen, B-Zelllymphom und einer Makrophagenzelllinie exprimiert.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass CAP1 nahezu ubiquitär exprimiert wird, während CAP2 in der Maus auf bestimmte Gewebe beschränkt ist. Zusätzlich hierzu existieren für CAP2 zwei verschieden große Transkripte. In einer früheren Untersuchung zur Expression von CAP1 in Ratte wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt und mit einer CAP1 spezifischen Sonde ebenfalls ein Transkript von etwa 3kb in allen untersuchten Geweben identifiziert [Zelicof et al., 1993]. Weiterhin stimmen diese Ergebnisse größtenteils mit den Ergebnissen einer RT-PCR basierten Untersuchung aus Ratte überein. Hier wurden Transkripte von CAP1 ebenfalls in fast allen untersuchten Geweben vorgefunden, wohingegen CAP2-Transkripte nur in bestimmten Geweben nachweisbar waren. Die höchste Transkriptmenge wurde ebenfalls in Testes und Herzmuskel gefunden, in weit geringeren Mengen wurde CAP2 mRNA auch in anderen Geweben, mit Ausnahme von Leber nachgewiesen [Swiston et al., 1995].

2.4 Expression von CAP1 in *E. coli*

Als Grundlage für die Herstellung monoklonaler Antikörper und für weitergehende biochemische Untersuchungen wurde das Maus CAP1 Volllängenprotein mit Hilfe des Plasmids pT7-CAP1 in *E. coli* exprimiert. Das Polypeptid umfasst neben allen Aminosäureresten von CAP1 aminoterminal noch zusätzlich 9 Aminosäurereste, die durch den Vektor kodiert werden. Der theoretisch berechnete isoelektrische Punkt des Polypeptids liegt bei 8,23. Das Protein wurde nach Aufschluss der Zellen sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion gefunden. Das in der löslichen Fraktion vorhandene Protein präzipitierte aber mit der Zeit. Zur Reinigung des Polypeptids wurde eine Kationenaustauscher-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen in Harnstoff (8M) vorgenommen (Abb.7). Das Protein war dann zu mehr als 90% sauber. Versuche, das Protein durch Dialyse gegen Puffer mit absteigenden Harnstoffkonzentrationen wieder in Lösung zu bringen, führten erneut zur Präzipitation des Proteins. Die Analyse im MALDI-Massenspektrometer ergab eine Masse von 53kDa. Dieser Wert stimmt gut mit der theoretisch errechneten Masse von 52,5kDa überein. Bei einer weiteren massenspektrometrische Analyse des Proteins nach Trypsinverdauung konnte etwa 75% der erwarteten Fragmente identifiziert und die Identität des Polypeptids bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Wegen der Unlöslichkeit des Proteins konnten keine weitergehenden biochemischen Untersuchungen vorgenommen werden.

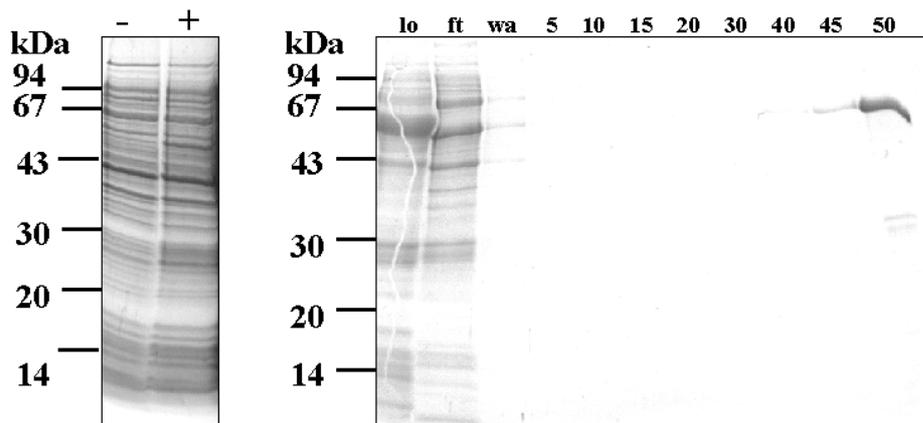


Abb.7: Reinigung von rekombinantem CAP1-Polypeptid. Linkes Bild: Gesamtzellprotein nicht induzierter (-) und mit IPTG induzierter (+) *E. coli* BL21-DE3 Zellen wurde im SDS-Polyacrylamidgel (12% Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Rechtes Bild: Elutionsprofil der CM-52 Zellulose Kationenaustauschersäule. Spur 1 zeigt den Säulenauftrag (lo), Spur 2 den Durchfluss, Spur 3 den letzten Waschschritt. Die Bezeichnungen über den nächsten Spuren geben die Konzentration Kochsalz (in mM) an, die zur Elution eingesetzt wurde. Das mit 50mM Kochsalz eluierte Protein wurde weiter untersucht.

2.5 Expression eines aminoterminalen Teilstücks von CAP2 in *E. coli*

Als Grundlage für die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen CAP2 wurde ein Teilstück von CAP2 im His-Tag-Vektor pQE-CAP2-2 in *E. coli* exprimiert. Das Polypeptid enthält neben den Aminosäureresten von CAP2 aminoterminal 6 Histidinreste und C- und N-terminal noch insgesamt zusätzlich 10 Aminosäurereste, die ebenfalls durch den Vektor kodiert werden. Das 24kDa Protein wurde nach Aufschluss der Zellen in der unlöslichen Fraktion vorgefunden (Abb.8). Das Polypeptid wurde unter denaturierenden Bedingungen in Harnstoff (8M) über eine Nickel-Agarose-Säule gereinigt. Das Protein war zu mehr als 90% rein. Versuche, das Protein durch Dialyse gegen Puffer mit absteigenden Harnstoffkonzentrationen wieder in Lösung zu bringen, führten erneut zur Präzipitation des Proteins.

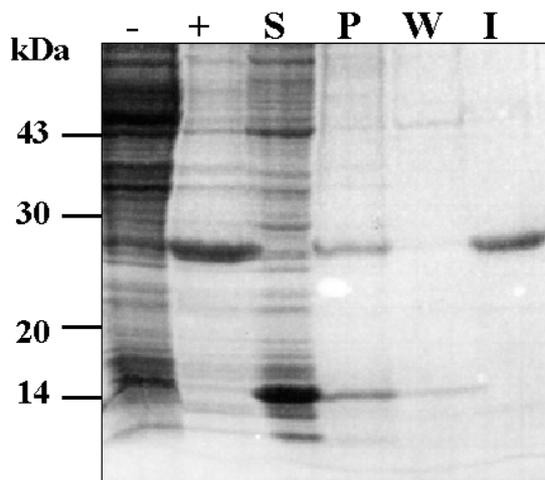


Abb.8: Expression und Reinigung von rekombinantem CAP2-2-Polypeptid. Die Abbildung zeigt die Analyse von Gesamtzellprotein nicht induzierter (-) und mit IPTG induzierter (+) *E. coli* M15-Zellen, Aliquots der löslichen (S) und unlöslichen Fraktion (P) sowie der Waschfraktion (W) und des Eluats einer Nickel-Agarose-Säule wurden im SDS-Polyacrylamidgel (15% Acrylamid) aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Blau angefärbt.

2.6 Isolierung monoklonaler Antikörper gegen CAP1 und CAP2

Um Reagenzien für weitergehende Untersuchungen zu haben, wurden monoklonale Antikörper gegen rekombinantes CAP1 und CAP2 hergestellt.

2.6.1 Darstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen rekombinant exprimiertes CAP1 Protein

Für die Erzeugung monoklonaler Antikörper wurde rekombinant exprimiertes CAP1 verwendet. Die verschiedenen Hybridomaüberstände wurden zunächst im Immunoblot gegen Gesamtzellprotein von *E. coli* Zellen getestet, die Vollängen-CAP1 exprimierten. Hybridomazellen, deren Überstände rekombinantes CAP1 erkannten, wurden kloniert.

Es wurden insgesamt zwei Hybridomazelllinien isoliert und konserviert, deren Überstände im Western-Blot eine Immunreaktion mit rekombinant exprimierten CAP1 zeigten (K11-308-F4, K11-321-E9) (Abb.9 A). Zur weiteren Charakterisierung der monoklonalen Antikörper wurden sie im Immunoblot mit Gesamtzellextrakten von murinen Swiss3T3 und humanen HEK Zellen getestet (Abb.9 B). Weiterhin wurden Gesamtzellextrakte von HEK Zellen getestet, die stabil verschiedene EGFP-CAP1 Fusionsproteine exprimieren (Abb.10). Die EGFP-CAP Fusionsproteine sind in Abschnitt 2.7.1 beschrieben. Zusätzlich wurden die Antikörper für indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen eingesetzt. mAK K11-308-F4 erkennt in C3H10T1/2 und Swiss3T3 Zellhomogenaten ein Protein mit einer molaren Masse von etwa 70kDa, mAK K11-321-E9 erkennt ebenfalls ein 70 kDa Protein und zusätzlich ein weiteres Protein von etwa 90kDa (Abb.9 B). In Gesamtzellextrakten von C3H10T1/2 und Swiss3T3 erkennen beide Antikörper somit Proteine, deren molare Massen über der errechneten Masse von CAP1 mit 52kDa liegen. In Homogenaten von HEK Zellen, die EGFP-CAP1 Fusionsproteine exprimieren, erkannte nur K11-308-F4 ein Fusionsprotein und zwar ein aminoterminales Fusionsprotein (Abb.10). Mit einem GFP-spezifischen Antikörper konnten dagegen alle Fusionsproteine nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass das Epitop des Antikörpers in der aminoterminalen Hälfte des Proteins liegt, zum anderen ist die Affinität nur ausreichend, um das im Vergleich zum Vollängenfusionsprotein erheblich stärker exprimierte aminoterminaler GFP-Fusionsprotein nachzuweisen. In allen Spuren wurde dagegen ein Protein von ca. 70kDa detektiert, das dem endogenen CAP entspricht. K11-321-E9 erkannte keines der EGFP-Fusionsproteine.

In der indirekten Immunfluoreszenz färbte K11-321-E9 sowohl das Zytoplasma als auch teilweise die Stressfasen an (Abb.11). K11-308-F4 ergab in der indirekten Immunfluoreszenz kein spezifisches Signal. Die zytosolische Lokalisation und die Kolo-kalisation des K11-321-E9 Antigens mit Stressfasern stimmt mit den Beobachtungen von Freeman und Field überein

[Freeman und Field, 2000]. Diese Beobachtungen stehen jedoch im Gegensatz zu älteren Beobachtungen von Vojtek et al [Vojtek und Cooper, 1993; Zelicof et al., 1996], die gezeigt hatten, dass CAP1 nicht an Stressfasern lokalisiert. In drei unabhängigen Studien wurden monoklonale Antikörper gegen humanes CAP1 [Freeman und Field, 2000], CAP1 aus Maus [Vojtek und Cooper, 1993] bzw. polyklonale Antikörper gegen CAP1 aus Ratte [Swiston et al., 1995] hergestellt. In allen Fällen wurden Proteine mit einem Molekulargewicht von etwas mehr als 50kDa (52-55kDa) erkannt. Dies entspricht dem theoretisch berechneten Molekulargewicht von CAP1. Die hier vorgestellten monoklonalen Antikörper erkennen dagegen ein Protein von mehr als 70kDa. Die Diskrepanz konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, die Ergebnisse haben uns aber veranlasst, die Antikörper nicht weiter zu verwenden.

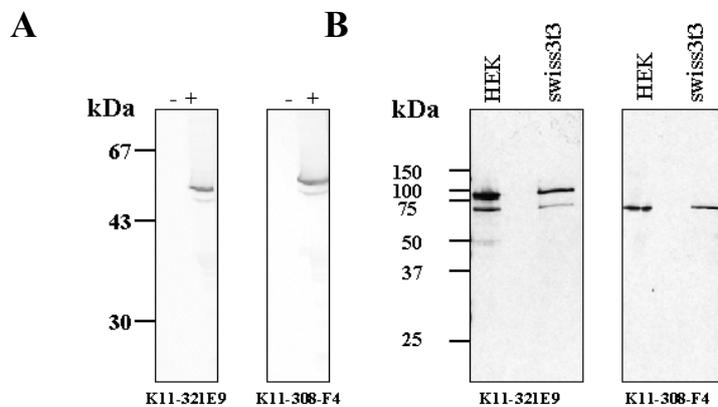


Abb.9: Western-Blot-Analyse der Überstände von K11-321-E9 und K11-308-F4. (A) zeigt die Western-Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten von *E. coli* Zellen, die CAP1 exprimieren (+) oder Kontrolllysate von nicht induzierten *E. coli* Zellen (-). Zur Erkennung der primären Antikörper wurde ein sekundärer, an alkalische Phosphatase gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper verwendet. (B) zeigt die Western-Blot-Analyse von Gesamtzellhomogenaten von HEK (humanen embryonalen Nierenzellen) und Swiss3T3 Maus Fibroblasten. Die Bindung der primären Antikörper wurde durch ECL-Reaktion des zweiten, an Merrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers nachgewiesen.

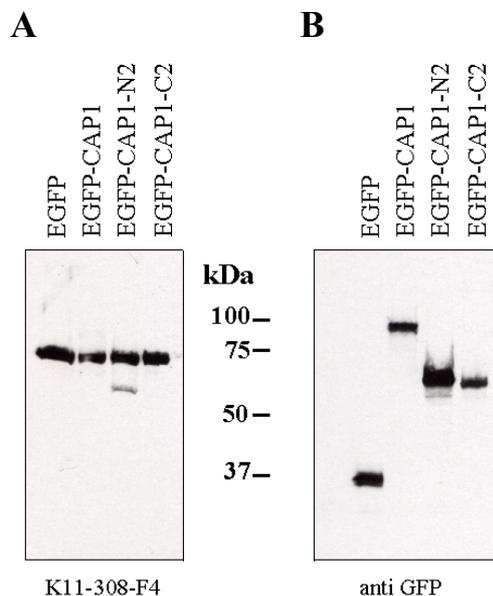


Abb.10: Spezifität von mAb K11-308-F4 im Western-Blot gegen CAP1-EGFP-Fusionsproteine. Gesamtzellextrakte von HEK Zellen, die verschiedene CAP1 EGFP Fusionsproteine exprimieren, wurden mit K11-308-F4 (A) bzw. die Kontrolle mit monoklonalem anti-GFP Antikörper K3-184-2 inkubiert (B). In beiden Fällen wurde die Bindung der primären Antikörper durch ECL-Reaktion des zweiten, an Merrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers nachgewiesen.

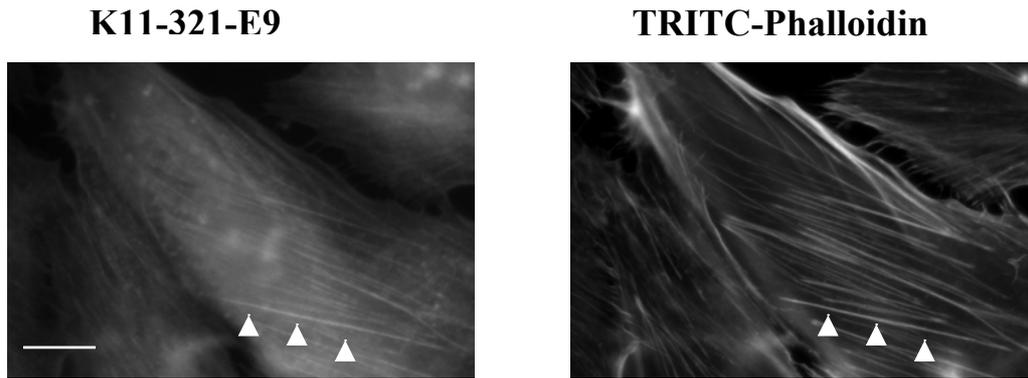


Abb.11: Immunfluoreszenz Untersuchungen mit mAk K11-321-E9. Swiss3T3 Fibroblasten wurden mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit K11-321-E9 und TRITC-Phalloidin inkubiert. Zur Detektion von K11-321-E9 diente ein an Alexa488 gekoppelter anti-Maus Antikörper. Die Abbildung links zeigt die Färbung mit K11-321-E9, rechts ist die F-Aktin-Färbung durch TRITC-Phalloidin wiedergegeben. Die Pfeile weisen auf mit TRITC-Phalloidin und K11-321-E9 erkannte Stressfasern hin. Maßstab: 20µm

2.6.2 Generierung von CAP2-spezifischen monoklonalen Antikörpern

Für die Herstellung von CAP2-spezifischen Antikörpern wurde ein rekombinant exprimiertes aminoterminales CAP2 Polypeptid (Aminosäuren 1-206) verwendet. Die monoklonalen Antikörper K18-78-C10, K19-934-F10, K18-396-H1, K19-485B-A11, K19-906-E9, K19-803-1, K19-389-2) erkannten das rekombinante Protein im Western-Blot (Abb.12.A). In Testes-Extrakten von Maus, einem Gewebe, in dem hohe Mengen an mRNA nachweisbar waren, reagierten alle Antikörper mit Proteinen von ca. 70, 90 und 100kDa (Abb.12 B). Die Molekulargewichte weichen auch hier von dem erwarteten Wert ab. Swiston et al. [Swiston et al., 1995] berichteten für humanes CAP2 ein Molekulargewicht von 55kDa im SDS Polyacrylamidgel. Ein in HEK Zellen exprimiertes EGFP-CAP2 Fusionsprotein (siehe 2.7.1) wurde nicht erkannt (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die hier generierten Antikörper nicht weiter verwendet.

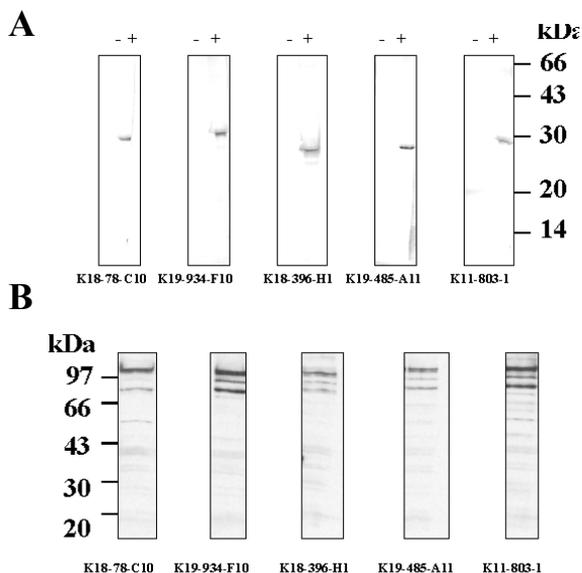


Abb.12: Western-Blot-Analyse der Überstände von K18-78-C10, K19-934-F10, K18-396-H1, K19-485B-A11, K19-906-E9, K19-803-1, und K19-389-2 (A) zeigt die Western-Blot-Analyse von Gesamtzell-extrakten von *E. coli* Zellen, die ein aminoterminales Polypeptid von CAP2 exprimieren (+) oder Kontrolllysate von nicht induzierten *E. coli* Zellen (-). Zur Erkennung der primären Antikörper wurde ein sekundärer an alkalische Phosphatase gekoppelter Ziege anti-Maus Antikörper verwendet. (B) zeigt die Western-Blot-Analyse von Gesamthomogenaten von HEK (humanen embryonalen Nierenzellen) und Swiss3T3 Maus Fibroblasten. Die Bindung der primären Antikörper wurde durch ECL-Reaktion des zweiten, an Merettich-peroxidase gekoppelten Antikörpers nachgewiesen.

2.7 Analyse der subzellulären Lokalisation von GFP CAP Fusionsproteinen

In früheren Untersuchungen wurde die subzelluläre Lokalisation von CAP1 in Säugerzellen mit Hilfe monoklonaler Antikörper [Vojtek und Cooper, 1993] oder mit rekombinant exprimierten Fusionsproteinen [Zelicof et al., 1996] untersucht. In diesen Arbeiten wurde eine zytosolische Lokalisation gefunden und eine Konzentration des Proteins an der Zellmembran und in Lamellipodien. In einer neueren Publikation wurde mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen humanes CAP1 zusätzlich eine Lokalisation an Stressfasern in Swiss3T3 Fibroblasten nachgewiesen. Für diese Lokalisation wurde der Aminoterminus verantwortlich gemacht, da entsprechende CAP-GFP-Fusionsproteine eine ähnliche Verteilung zeigten [Freeman und Field, 2000].

In dieser Arbeit wurde eine vergleichende Analyse der Lokalisation von CAP1 und CAP2-GFP-Fusionsproteinen durchgeführt. GFP, das 27kDa große „green-fluorescent-protein“ aus *Aequorea victoria* (GFP) [Prasher et al., 1992], ist ein häufig genutztes Werkzeug der Zellbiologie (Zur Übersicht siehe [Ludin und Matus, 1998]). Es wird in Fusion mit anderen Proteinen als Reporterprotein zur Analyse der subzellulären Lokalisation dieser Proteine genutzt. GFP kann durch Absorption von Strahlung des blauen Wellenlängenbereichs (Absorptionsmaximum 395nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Dabei emittiert das Protein Licht mit einem Emissionsmaximum von 508nm im grünen Spektralbereich.

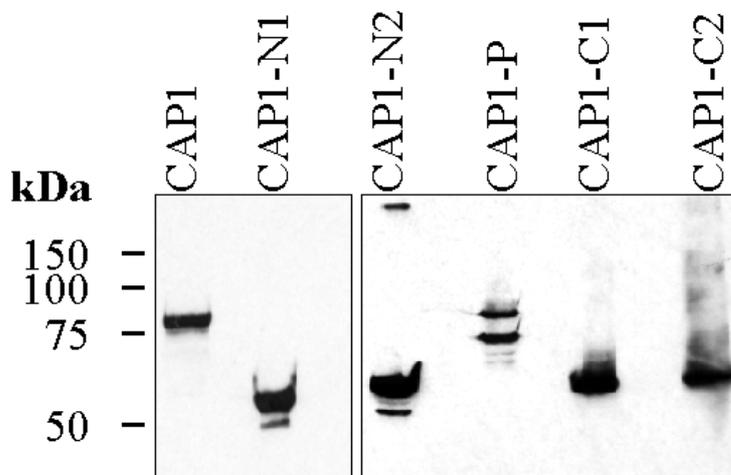
Mit GFP-Fusionsproteinen wurde auch die Bedeutung der CAP1 und CAP2 Domänen für die subzelluläre Lokalisation untersucht. Weiterhin konnten die Effekte der Expression von CAP1 und CAP2 auf das Aktinzytoskelett beobachtet werden. Dieses ist von besonderem Interesse, da Freeman und Field zeigten, dass die Mikroinjektion von anti-CAP1 Antikörpern in Swiss3T3 Maus Fibroblasten die Stressfaser-Bildung verringerte und die Mikroinjektion von gereinigtem CAP1 aus Blutplättchen die Bildung von Aktinfilamenten induzierte [Freeman und Field, 2000]. Weiterhin gibt es Daten, dass die Überexpression von CAP aus *Arabidopsis* in in Suspension kultivierten Tabakzellen zu einem Defekt in der Ausbildung von Aktinfilamenten führte [Barrero et al., 2002].

2.7.1 Expression der EGFP-Fusionsproteine

Plasmide, die die Sequenzen für die Expression der GFP-Fusionsproteine tragen, wurden in HEK/293 Zellen transfiziert [HEK für humane embryonale Nierenzellen] und die Expression im Western-Blot mit einem monoklonalen GFP-spezifischen Antikörper analysiert (Abb.13). In dieser Arbeit wurde zur Expression von CAP GFP Fusionsproteinen eine Variante des GFP, das sogenannte „enhanced-green-fluorescent-protein“ (EGFP, Clontech) verwendet. Die pEGFP Expressions-Plasmide kodierten sowohl für Volllängen-CAP1 und -CAP2 (EGFP-CAP1, EGFP-CAP2, siehe Abb.13 und Abb.14), EGFP-CAP1-N1 enthält die Sequenz für Aminosäure 1-228 und endet vor dem Prolin-reichen Bereich, EGFP-CAP1-N2 kodiert für den aminoterminalen Bereich einschließlich des Prolin-reichen Bereichs (AS 1-240), EGFP-CAP1-C1 kodiert für den carboxyterminalen Bereich von CAP1 ohne, und EGFP-CAP1-C2 den carboxyterminalen Bereich von CAP1 mit dem Prolin-reichen Bereich (AS 241-474 und AS 229-474). In EGFP-CAP1-P ist der Prolin-reiche Bereich (AS229-240) deletiert (Abb.13). Alle Fusionsproteine konnten in Zellhomogenaten mit dem GFP-spezifischen Antikörper K3-184-2 nachgewiesen werden. Die molaren Massen stimmten mit den theoretisch berechneten Werten überein.

Für CAP wurden ähnliche Fusionsproteine geschaffen. EGFP-CAP2-1 umfasst die ersten 48 Aminosäurereste, EGFP-CAP2-2 die ersten 206 Aminosäuren unter Ausschluss des Prolin-reichen Bereichs und EGFP-CAP2-3 umfasst die ersten 316 Aminosäurereste von CAP2 fusioniert an EGFP. Diese Proteine konnten ebenfalls in Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Auch hier stimmten die molaren Massen mit den theoretisch berechneten Werten überein (s.Abb14 A und B) .

A



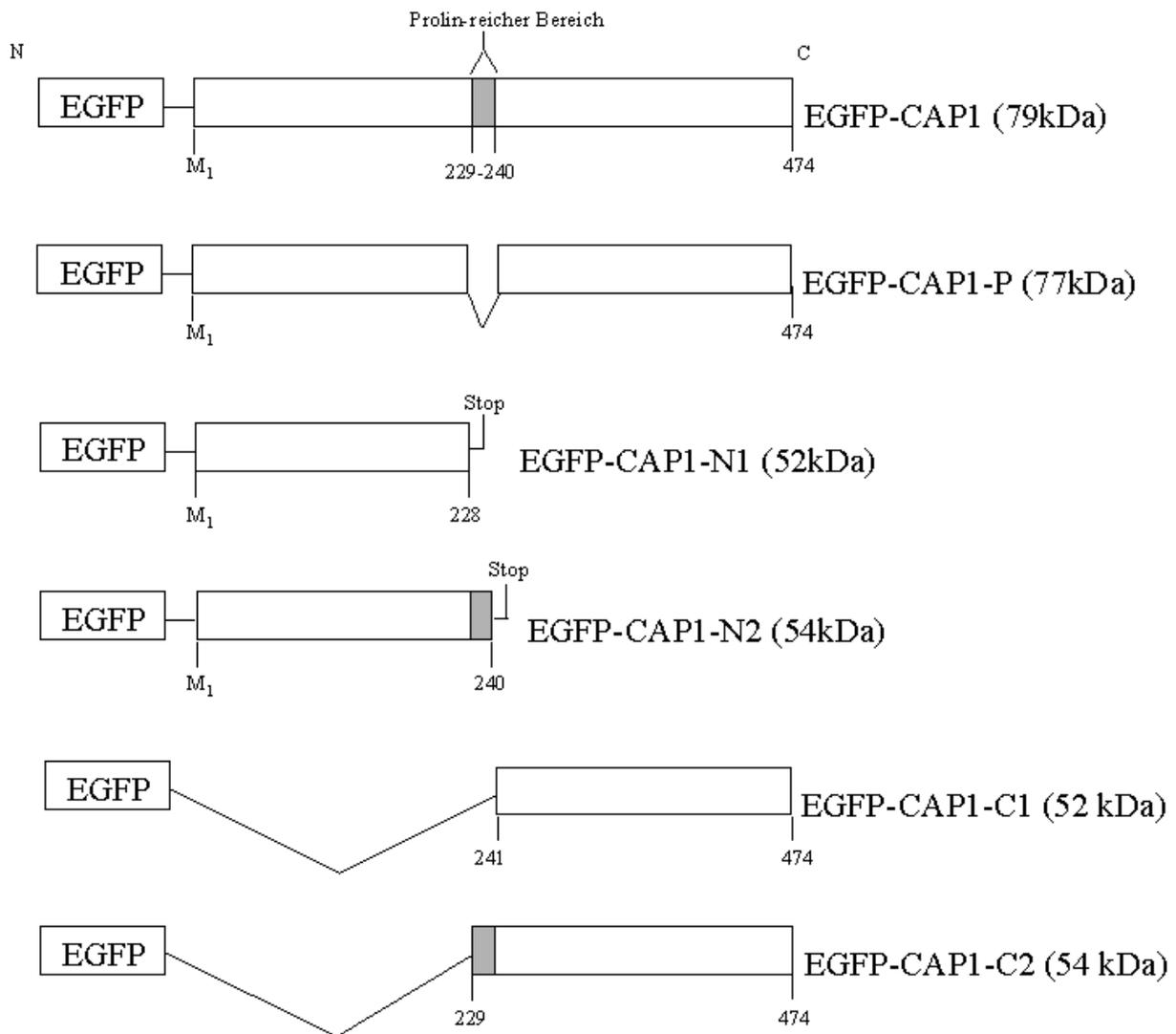
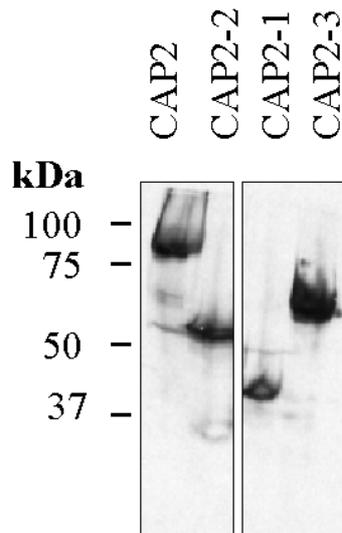
B

Abb.13: Expression von EGFP-CAP1-Fusionsproteinen in Säugerzellen. (diese und vorhergehende Seite) (A), die in (B) gezeigten EGFP-Fusionsproteine wurden in HEK/293 Zellen exprimiert. Zellhomogenate aus den entsprechenden Transfektanten wurden im SDS-Polyacrylamidgel (10% Acrylamid) aufgetrennt und im Western-Blot die Fusionsproteine mit mAK K3-184-2 nachgewiesen. Die Bindung von mAK K3-184-2 wurde durch ECL-Reaktion des zweiten, an Merettich-peroxidase gekoppelten Antikörpers nachgewiesen (B), Domänenstruktur der EGFP-CAP1 Fusionsproteine. Der Prolin-reiche Bereich ist dunkel unterlegt. Die erste CAP1 spezifische Aminosäure (M1) und das Stopp Kodon (Stop) sind gekennzeichnet. Weiterhin sind die theoretisch berechneten Molekulargewichte angegeben.

A



B

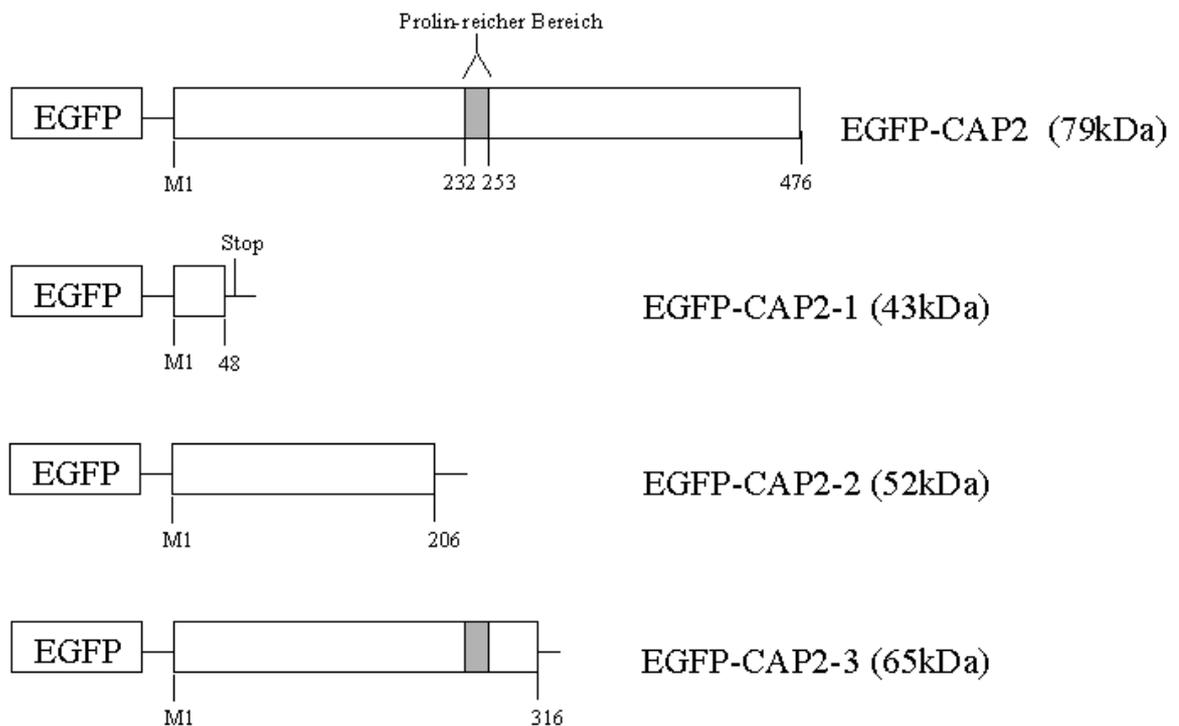


Abb.14: Expression von EGFP-CAP2-Fusionsproteinen in Säugerzellen. (A) Die in (B) gezeigten EGFP-Fusionsproteine wurden in HEK/293 Zellen exprimiert. Zellhomogenate aus den entsprechenden Transfektanten wurden im SDS-Polyacrylamidgel (10 % Acrylamid) aufgetrennt und im Western-Blot die Fusionsproteine mit mAK 184-2 nachgewiesen. Die Bindung von mAK K3-184-2 wurde durch ECL-Reaktion des zweiten, an Merettich-peroxidase gekoppelten Antikörpers nachgewiesen. (B), Domänenstruktur der EGFP-CAP2 Fusionsproteine. Der Prolin-reiche Bereich ist dunkel unterlegt. Die erste CAP2 spezifische Aminosäure (M1) und Stopp Kodons (Stop) sind gekennzeichnet. Weiterhin sind die theoretisch berechneten Molekulargewichte angegeben.

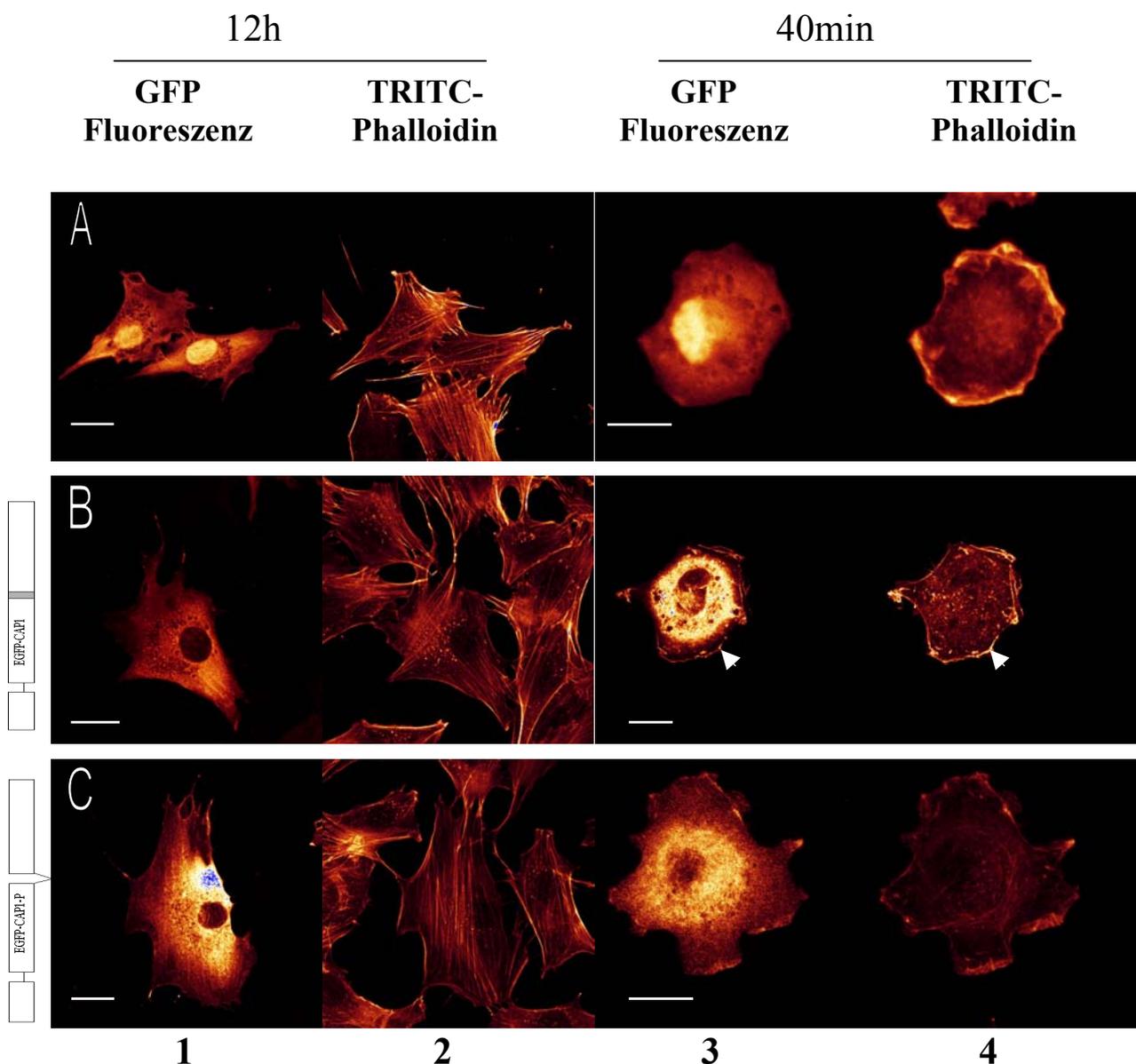
2.7.2 Die Bedeutung der CAP1-Domänen für die subzelluläre Lokalisation

Die unter 6.5.3 und 2.7.1 vorgestellten Expressionsplasmide für EGFP-CAP1-Fusionsproteine wurden in C3H10T1/2 Maus Fibroblasten transfiziert. Diese Zellen sind im Gegensatz zu anderen gängigen Zelllinien wie Swiss3T3 oder NIH3T3 Fibroblasten mit einer hohen Effizienz zu transfizieren. Die C3H10T1/2 zeigen zudem alle F-Aktin abhängigen Strukturen die auch von Swiss3T3 Zellen beobachtet werden. Die Zellen wurden einmal 24h nach Transfektion auf Deckgläschen ausgesät und nach weiteren 12h mit Paraformaldehyd fixiert. Im zweiten Fall wurden die Zellen 24h nach Transfektion ausgesät und nach etwa 40min mit Paraformaldehyd fixiert. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,5% Triton X-100. Um die Lokalisation der EGFP Fusionsproteine mit der von F-Aktin vergleichen zu können, wurden die Zellen mit TRITC markiertem Phalloidin gefärbt. Phalloidin erkennt spezifisch F-Aktin und lagert sich in das Filament ein [Wulf et al., 1979]. Die Analysen wurden am konfokalen Laserscanmikroskop durchgeführt.

Das EGFP-CAP1 Volllängenprotein war in Zellen, die 12h Zeit hatten sich auf der Oberfläche auszubreiten, vorwiegend zytosolisch lokalisiert (Abb.15 B1). Eine Kolo-kalisation mit F-Aktin war nicht zu erkennen (Abb.15 B2). Frisch ausgesäte Zellen bilden beim Anheftungsprozess Lamellipodien aus. In diesen Zellen ist EGFP-CAP1 auch in den Lamellipodien angereichert und kolo-kalisiert dort mit F-Aktin (vergleiche hierzu Abb.15 B3 und 4). Deletionsmutanten von CAP1 zeigten eine vergleichbare Verteilung. In Zellen, die 12h Zeit hatten sich auf der Oberfläche auszubreiten, waren alle EGFP-Fusionsproteine vorwiegend im Zytosol lokalisiert (Abb.15 Reihe 1). Eine Verteilung in F-Aktin-reichen Strukturen wurde nicht beobachtet (Abb.15 Reihe 2). Wenn man Zellen betrachtet, die 40 min Zeit hatten sich anzuheften (Abb.15 Reihe 3), ist dagegen ein erheblicher Teil aller EGFP-Fusionsproteine nun in Lamellipodien lokalisiert und zeigt dort eine Kolo-kalisation mit F-Aktin (Abb.15 Reihe 4). Aus der Deletionsanalyse geht hervor, dass sowohl der Aminoterminus (Abb.15 D3 und E3) als auch der Carboxyterminus von CAP1 (Abb.15 F3 und G3) sich in die Lamellipodien verlagern. Die Deletion des Prolin-reichen Bereichs erlaubte ebenfalls weiterhin die Lokalisation in Lamellipodien (Abb.15 C3). Die Spezifität dieser Lokalisation wird durch einen Vergleich mit der Lokalisation von EGFP gezeigt. Das EGFP alleine zeigte dagegen keine Anreicherung in Lamellipodien und war ausschließlich homogen im Zytosol verteilt sowohl in frisch ausgesäten Zellen als auch in Zellen 12 Stunden nach der Aussaat. EGFP war stets auch im Zellkern nachweisbar (Abb.15 A1).

Ein Vergleich der F-Aktinverteilung in transfizierten und untransfizierten Zellen ergab, dass die Expression der CAP1-Fusionsproteine keine Auswirkungen auf die Ausbildung von

Stressfasern hatte (Abb.15 Reihe2). CAP1 ist somit ein zytosolisches Protein, das sich bei der Bildung von Lamellipodien umverteilt und sich in diesen F-Aktin-reichen Strukturen anreichert. Ähnliche Beobachtungen wurden von Freeman und Field, Vojtek et al. und Zelicof et al. gemacht [Freeman und Field, 2000; Vojtek und Cooper, 1993; Zelicof et al., 1996]. Im Gegensatz zu Freeman und Field wurde in dieser Arbeit jedoch keine spezifische Lokalisation von CAP1 an Stressfasern vorgefunden [Freeman und Field, 2000]. Weiterhin konnte keiner der Domänen von CAP eine eindeutige Rolle für die Bestimmung der subzellulären Lokalisation zugewiesen werden. Freeman und Field haben dagegen nur für ein aminoterminales Fusionsprotein eine zum Volllängenprotein vergleichbare Lokalisation nachgewiesen.



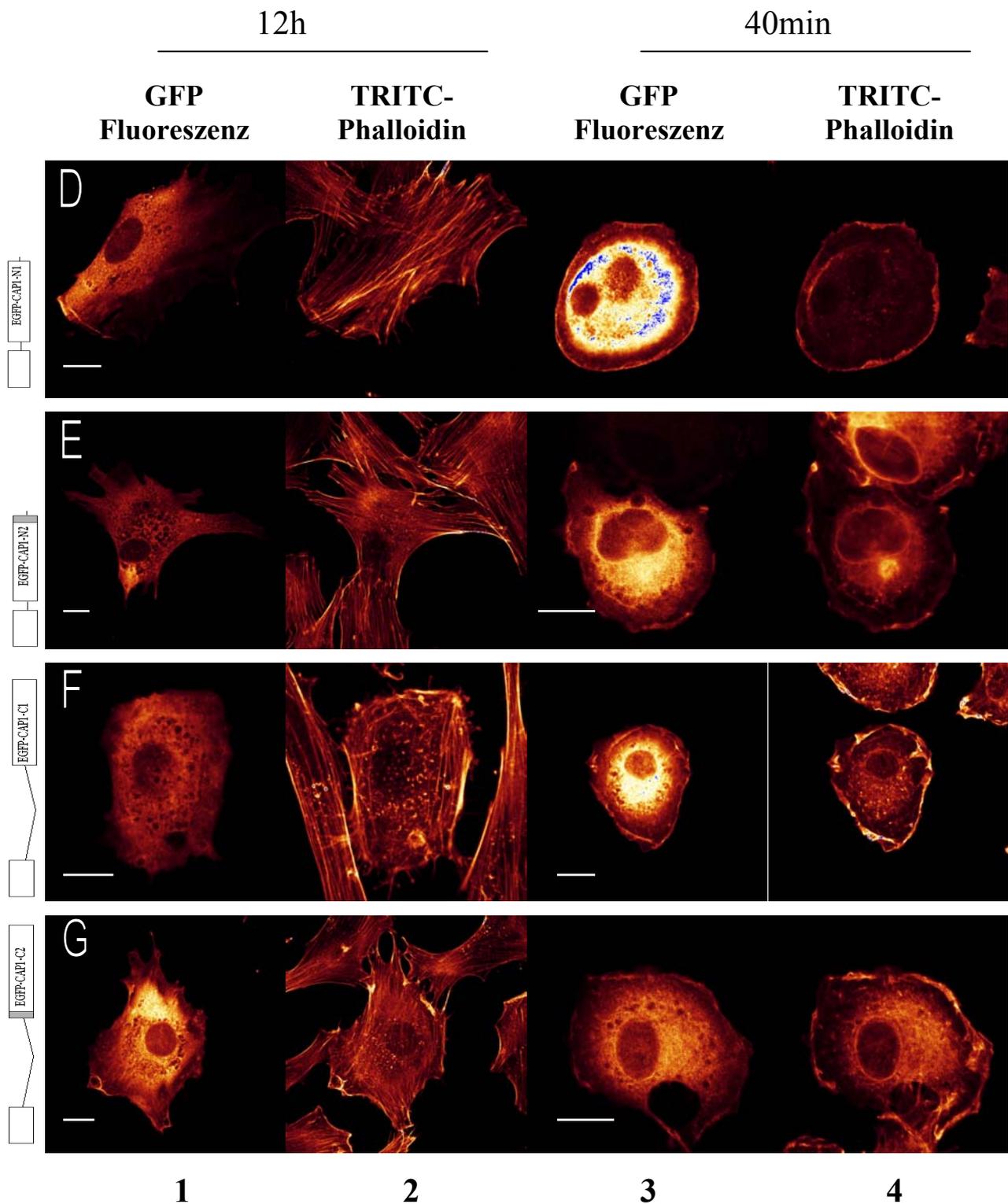


Abb.15: Analyse der subzellulären Lokalisation von EGFP-CAP1 Fusionsproteinen. (Diese Seite und Seite 27) Die in Abb.13 gezeigten EGFP-CAP Fusionsproteine wurden in C3H10T1/2 Maus Fibroblasten exprimiert. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und F-Aktin mit Hilfe von TRITC-Phalloidin markiert. Die Abbildung zeigt die GFP-Fluoreszenz. In den Spalten zwei, drei und vier ist die Färbung von F-Aktin durch TRITC-Phalloidin gezeigt. Die Spalten 1 und 2 zeigen die Analyse von voll angehefteten Zellen. Die Spalten 3 und 4 zeigen die Analyse von Zellen, die 40 min Zeit hatten sich anzuheften. Die in den verschiedenen Reihen verwendeten Buchstaben entsprechen wie folgt den EGFP Fusionsproteinen: A, EGFP; B, EGFP-CAP1; C, EGFP-CAP1-P, D, EGFP-CAP1-N1; E, EGFP-CAP1-N2; F, EGFP-CAP1-C1; G, EGFP-CAP1-C2. Für EGFP-CAP1 und F-Aktin wurde die Kolokalisation hervorgehoben (Pfeil). Maßstab: 20µm

2.7.3 Die Bedeutung der CAP2-Domänen für die subzelluläre Lokalisation

C3H10T1/2 Maus Fibroblasten wurden mit Expressionskonstrukten für die in 2.7.1 beschriebenen EGFP-CAP2 Fusionsproteine transfiziert und wie unter 2.7.2 weiter behandelt und untersucht. Das EGFP-CAP2 Volllängenprotein weist in Zellen, die 12h Zeit hatten sich auf der Oberfläche auszubreiten, eine vorwiegend zytosolische Lokalisation auf (Abb.16 A1). Eine Kolokalisation mit F-Aktin-reichen Strukturen wurde nicht beobachtet (Abb.16 A2). Eine Kolokalisation mit F-Aktin-reichen Strukturen wurde nicht beobachtet (Abb.16 A2).

In frisch ausgesäten Zellen, die Lamellipodien bilden, ist EGFP-CAP2 in den Lamellipodien angereichert und kolokalisiert dort mit F-Aktin (Abb.16 A3 und 4). Die Deletionsmutanten von CAP2 (Abb.14) zeigten eine ähnliche Verteilung. In Zellen, die 12h Zeit hatten sich auf der Oberfläche auszubreiten, wiesen die GFP-Fusionsproteine EGFP-CAP2-1, EGFP-CAP2-2 und EGFP-CAP2-3 eine vorwiegend zytosolische Lokalisation auf und eine Färbung der Stressfasern wurde nicht beobachtet (Abb.16 Reihe 1). In Zellen kurz nach dem Ausplattieren waren dagegen die EGFP-Fusionsproteine in die Lamellipodien umverteilt und kolokalisierten mit F-Aktin (Abb.16 Reihe 4). Wie im Falle von CAP1 war keines der CAP2 Fusionsproteine an den Stressfasern nachweisbar.

EGFP-CAP2 ist somit wie EGFP-CAP1 ein zytosolisches Protein. In migrierenden Zellen lagert es sich in Lamellipodien um. Die Deletionsmutanten zeigten, dass schon die aminoterminalen 48 Aminosäuren von CAP2 ausreichen, um CAP2 in Lamellipodien zu lokalisieren.

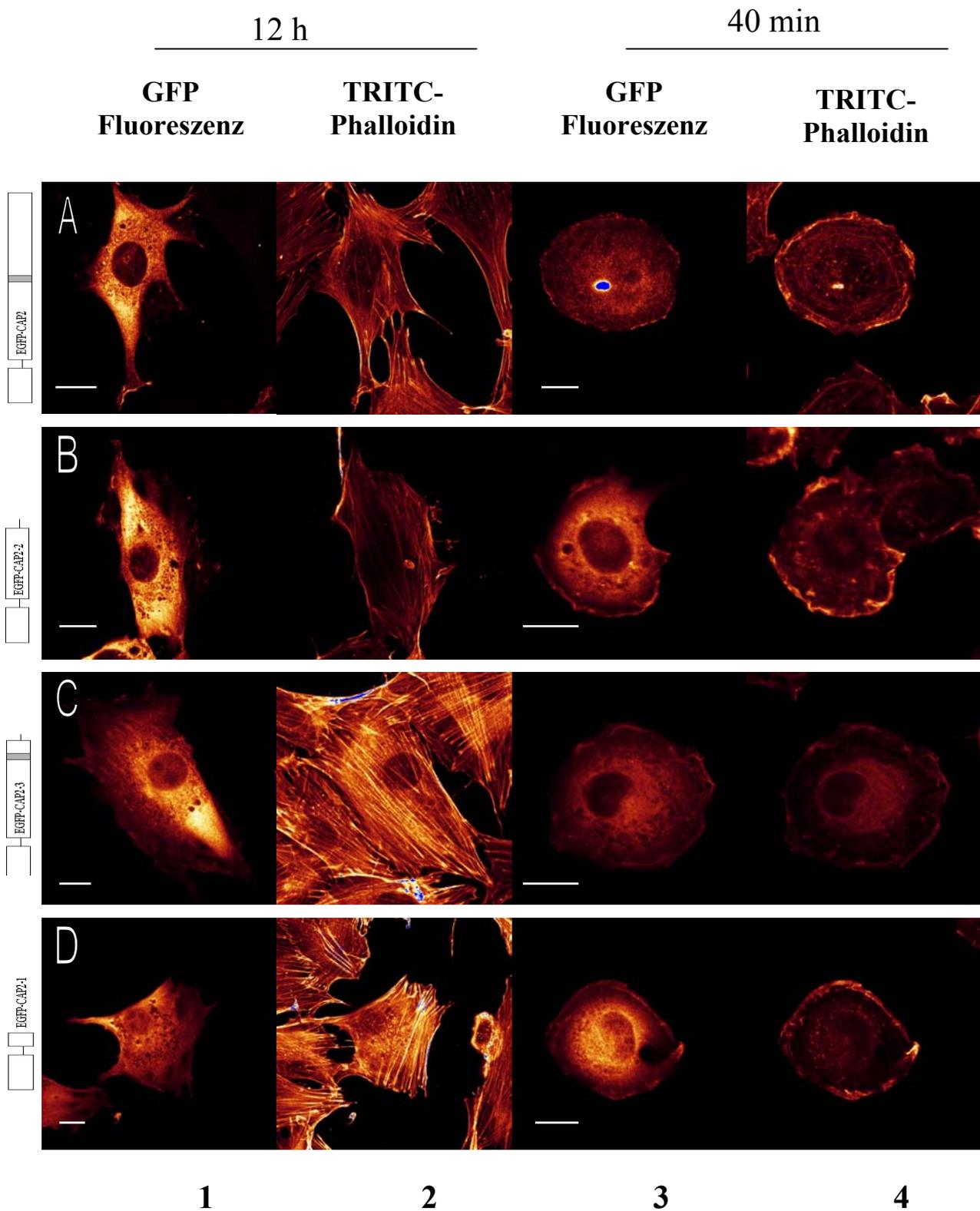


Abb.16: Analyse der subzellulären Lokalisation von EGFP-CAP2-Fusionsproteinen. Die in Abb.14 gezeigten EGFP-CAP-Fusionsproteine wurden in C3H10T1/2 Maus Fibroblasten exprimiert. Analyse und Beschriftung erfolgten wie in Abb.15 dargestellt. Die in den verschiedenen Reihen verwendeten Buchstaben entsprechen wie folgt den EGFP-Fusionsproteinen: A, EGFP-CAP2; B, EGFP-CAP2-3; C, EGFP-CAP2-2, D, EGFP-CAP2-1. Maßstab: 20µm

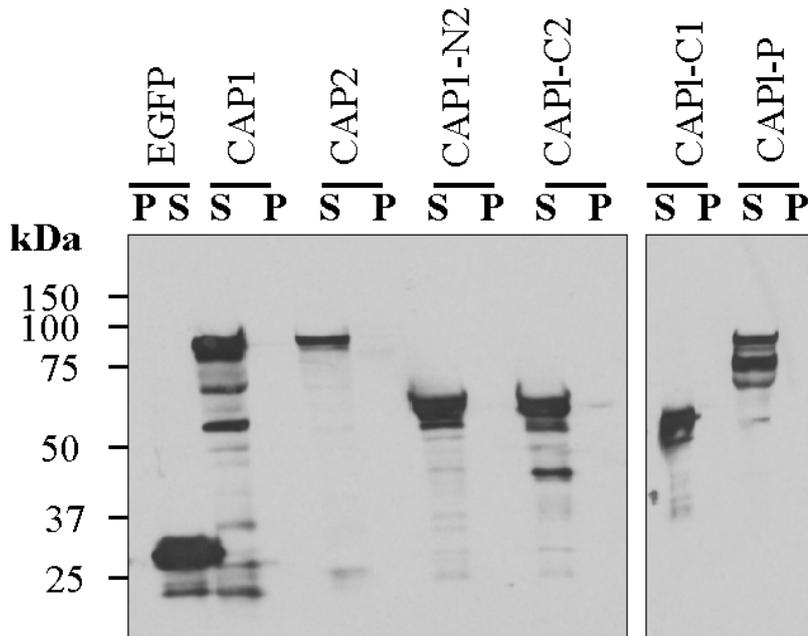
2.8 Interaktion von EGFP-CAP-Fusionsproteinen mit dem Triton X-100 unlöslichen Zytoskelett

Die Ergebnisse aus 2.7.2 und 2.7.3 zeigen eine spezifische Kolo-kalisation von EGFP-CAP-Fusionsproteinen mit F-Aktin in Lamellipodien,. Für den Nachweis einer direkten Interaktion mit F-Aktin-Strukturen wurden Zellfraktionierungsexperimente durchgeführt [Ko et al., 2001]. Schließt man Zellen mit geringen Konzentrationen des nicht ionischen Detergenz Triton X-100 auf, so bleiben viele Strukturen des Aktin-Zytoskeletts erhalten. Konfluent ausgesäte voll ausgebreitete Zellen wurden mit Puffer, der 0,5% Triton X-100 enthielt, aufgeschlossen. Anschließend wurden durch Zentrifugation Triton X-100 lösliche und unlösliche Bestandteile von einander getrennt (siehe 6.4.13) und die Verteilung der EGFP-Fusionsproteine in den einzelnen Fraktionen im Western-Blot mit monoklonalem anti-GFP Antikörper immunchemisch analysiert (Abb.17 A).

Die Western-Blot Analyse zeigt, dass EGFP-CAP1 und alle EGFP-CAP1 Derivate sowie EGFP-CAP2 sich wie die EGFP Kontrolle exklusiv in der Triton X-100 löslichen Fraktion befinden (Abb.17 A). Eine Assoziation der EGFP-CAP Fusionsproteine mit Strukturen des F-Aktin konnte in voll ausgebreiteten Zellen nicht nachgewiesen werden.

Um eine verstärkte Lamellipodienbildung zu induzieren und den Anteil der EGFP-CAP Fusionsproteine zu erhöhen, die mit F-Aktin kolo-kalisieren, wurde das Experiment modifiziert. Hierzu wurden Zellen verwendet, die sich erst für eine kurze Zeit angeheftet haben und sich über das Substrat ausbreiten. Nach 60min Anheftungszeit zeigen mehr als 90% der Zellen eine besonders starke Lamellipodienbildung. Die Zellen wurden 60min nach Aussaat, wie beschrieben geerntet und in eine Triton X-100 lösliche und unlösliche Fraktion aufgetrennt mit nachfolgender Western-Blot-Analyse. Die Triton X-100 unlösliche Fraktion war im Verhältnis zur löslichen Fraktion in diesem Experiment bezogen auf die Zellzahl zehnfach konzentriert. Die Verteilung der EGFP-Fusionsproteine in den einzelnen Fraktionen wurde wiederum mit anti-GFP Antikörper immunchemisch nachgewiesen. Die Western-Blot-Analyse zeigt, dass sich EGFP-CAP1 und alle EGFP-CAP1 Fusionsproteine sowie EGFP-CAP2, wie die EGFP Kontrolle, auch unter diesen Bedingungen exklusiv in der Triton X-100 löslichen Fraktion befinden (Abb.17 B).

A



B

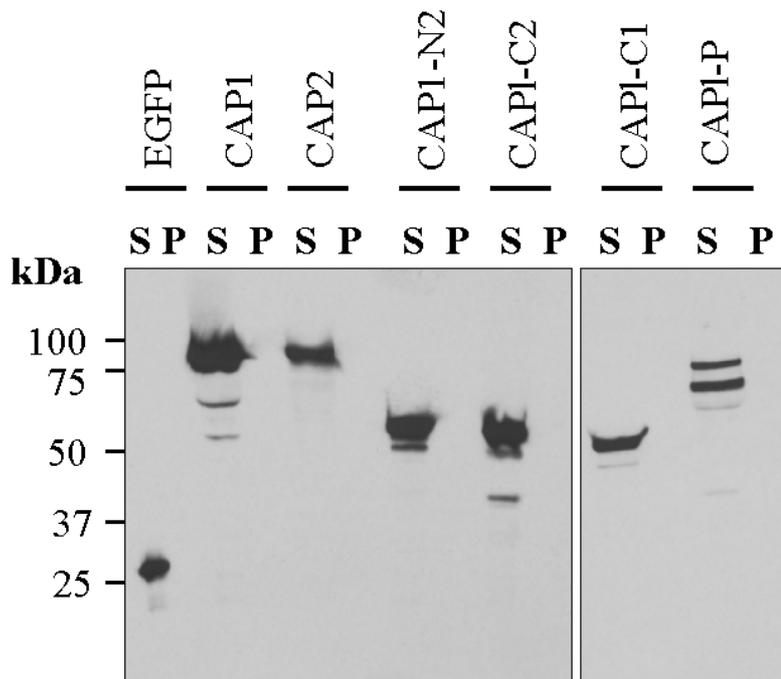


Abb.17: Verteilung der EGFP-CAP-Fusionsproteine in die Triton X-100 lösliche bzw. unlösliche Fraktion von stabil transfizierten HEK Zellen. Die Abbildung zeigt die Western-Blot-Analyse der Zellfraktionierung mit monoklonalem anti-GFP Antikörper K3-184-2. **A**, zeigt die Analyse von komplett ausgebreiteten Zellen. **B**, zeigt die Analyse von HEK Zellen, die 60min Zeit hatten sich anzuheften. In (B) war die Triton X-100 unlösliche Fraktion im Verhältnis zur löslichen Fraktion bezogen auf die Zellzahl zehnfach konzentriert. Die Zellextrakte wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte durch einen zweiten, an Merettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers mittel ECL-Reaktion.

2.9 Fraktionierung von HEK Zellen, die EGFP-CAP1 oder EGFP-CAP2 stabil exprimieren

EGFP-CAP1 bzw. EGFP-CAP2 Fusionsproteine verlagern sich in sich ausbreitenden Zellen in Lamellipodien (Abschnitt 2.7.2 und 2.7.3). Hier kolokalisieren die Proteine zwar mit F-Aktin, verteilen sich aber nicht in das Triton-unlösliche Zytoskelett. Um eine etwaige Interaktion mit der Zytoplasmamembran oder anderen Membransystemen nachzuweisen, wurden Zellfraktionierungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden Gesamthomogenate von HEK-Zellen, die EGFP-CAP1 bzw. EGFP-CAP2 Fusionsproteine exprimieren, in Kern-, Zytoplasma- und Membranfraktion aufgetrennt (siehe 6.4.14). Sowohl das CAP1- als auch das CAP2-EGFP-Fusionsprotein sind exklusiv in der zytoplasmatischen Fraktion vorhanden (Abb.18). Eine direkte und stabile Assoziation von CAP an Membranen scheint somit nicht vorhanden zu sein.

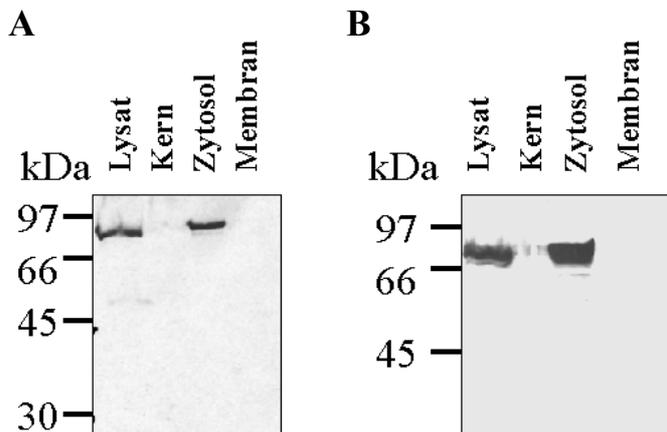


Abb.18: Verteilung von EGFP-CAP1 und EGFP-CAP2 in Kern-, Membran- und Zytosol- Fraktionen. HEK Zellen, die stabil EGFP-CAP1 bzw. EGFP-CAP2 exprimierten, wurden in Kern-, Membran- und Zytosol-Fraktion aufgetrennt. Kern- und Membranfraktion wurden von jeweils 10^7 Zellen und Zytosol-Fraktion entsprechend 10^6 Zellen auf einem SDS-Gel (10% Acrylamid) aufgetrennt im Western-Blot mit mAK12-184-2 analysiert. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte durch einen zweiten, an Merettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper mittels ECL-Reaktion. (A), zeigt die Verteilung für EGFP-CAP1 und (B) die Verteilung für EGFP-CAP2.

2.10 Aktin-Bindung der EGFP-CAP Fusionsproteine in HEK und COS7 Zellen

CAP wurde als G-Aktin bindendes Protein beschrieben. Da keine nativ gefalteten Proteine für eine direkte Analyse der Aktin-Bindung von CAP1 und CAP2 zu testen zur Verfügung standen, wurden Immunpräzipitations-Experimente mit in Zelllinien exprimierten EGFP-CAP1 und EGFP-CAP2 Volllängenproteinen durchgeführt.

Mit Zelllysaten von HEK/293 Zellen, die stabil EGFP-CAP1, EGFP-CAP2 oder EGFP exprimieren, wurden Immunpräzipitationen mit anti-GFP Antikörper durchgeführt und das Präzipitat in der SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde die Anwesenheit von Aktin im Western-Blot mit einem monoklonalem anti- β -Aktin Antikörper immunchemisch nachgewiesen (Abb.19 A). In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass Aktin mit EGFP-CAP1 kopräzipitiert, während für EGFP alleine und EGFP-CAP2 keine Kopräzipitation von Aktin nachgewiesen werden konnte (Abb.19 A). Der Gehalt an EGFP-Fusionsprotein wurde mit dem GFP-spezifischen Antikörper überprüft (Abb.19 B). Die Intensitäten der Banden für EGFP-CAP1, EGFP-CAP2 und für EGFP zeigen, dass vergleichbare Mengen an EGFP-Fusionsprotein präzipitiert wurden. Die Intensitäten der Banden für die schwere und die leichte Ketten der Immunglobuline zeigen, dass mit vergleichbaren Mengen an Antikörper präzipitiert wurde.

Um die Aktinbindung von EGFP-CAP2 in anderen Zellen zu testen, wurden COS7 Zellen mit pEGFP-CAP2 transfiziert, geerntet und Zelllysate hergestellt. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit anti-GFP Antikörper durchgeführt und das Präzipitat in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Anwesenheit von Aktin wurde im Western-Blot mit einem monoklonalem anti- β -Aktin Antikörper immunchemisch nachgewiesen (Abb.19 C).

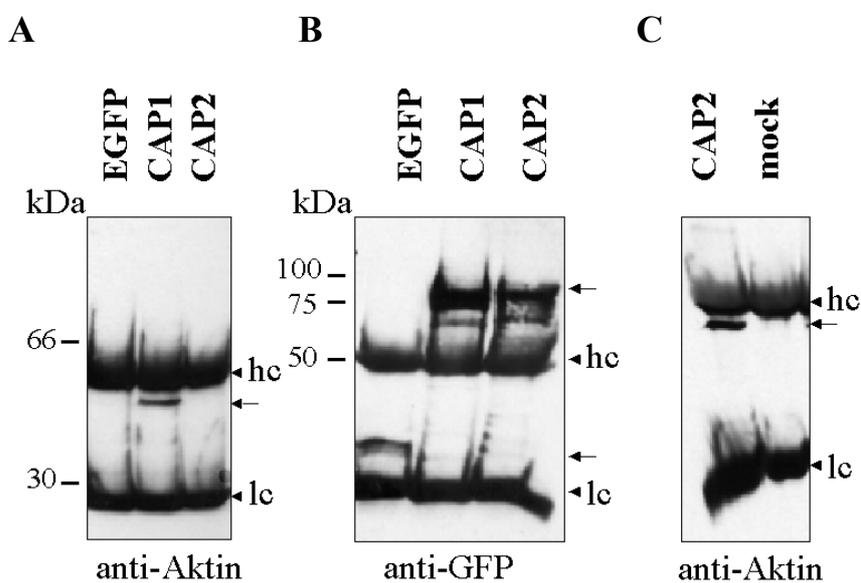


Abb.19. Analyse der Aktinbindung von EGFP-CAP-Fusionsproteinen. Lysate von HEK/293 Zellen bzw. COS7 wurden hergestellt und mit mAK12-184-3 eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Auftrennung der Immunpräzipitate erfolgte im SDS-Polyacrylamidgel (12% Acrylamid). Die Detektion der primären monoklonalen anti- β -Aktin Antikörper erfolgte durch einen zweiten, an Merrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers mittel ECL-Reaktion. Die durch den sekundären anti-Maus Antikörper detektierten schweren und leichten Ketten des Antikörpers sind mit „hc“ und „lc“ markiert. **A**, Aktin wurde im Western-Blot mit monoklonalem anti- β -Aktin Antikörper nachgewiesen (Pfeil). **B**, EGFP-Fusionsproteine wurden im Western-Blot mit monoklonalem anti-GFP Antikörper nachgewiesen. Die Pfeile weisen auf die detektierten EGFP-Proteine hin. **C**, Aktin wurde im Western-Blot mit monoklonalem anti- β -Aktin Antikörper nachgewiesen (Pfeil).

Die Western-Blot-Analyse ergab, dass durch die Präzipitation von EGFP-CAP2 aus COS7 Zelllysaten Aktin kopräzipitiert wurde (Abb.19 C). In Kontrollexperimenten an untransfizierten Zellen (mock) wurde dagegen kein Aktin mit anti-GFP Antikörper kopräzipitiert. Somit bindet Aktin in HEK Zellen an EGFP-CAP1, aber nicht an EGFP-CAP2. In COS7 Zellen hingegen bindet EGFP-CAP2 an Aktin.

2.11 Einfluss der Expression von CAP-Fusionsproteinen auf den F-Aktingehalt von HEK-Zellen

Die Mikroinjektion von Affinitätsgereinigtem gereinigtem CAP Protein aus Blutplättchen induzierte in Swiss3T3 Zellen lokal eine F-Aktin Polymerisation [Freeman und Field, 2000]. Die Überexpression von CAP aus *Arabidopsis* in in-Suspension-kultivierten Tabakzellen führte zu einer Inhibition der Ausbildung von Aktinfasern [Barrero et al., 2002]. Weiterhin gibt es Daten aus *Drosophila*, wo die Inaktivierung von CAP in bestimmten Zelltypen zu einer Akkumulation von F-Aktinfasern führte [Baum et al., 2000; Baum und Perrimon, 2001]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass CAP an der Kontrolle des zellulären F-Aktingehaltes beteiligt ist. Aus diesem Grund sollte der Effekt einer Überexpression von CAP in Säugerzellen auf den F-Aktingehalt zu überprüft werden.

Dazu wurde der F-Aktingehalt von HEK Zellen, die stabil EGFP-CAP-Fusionsproteine exprimieren, gemessen. Die Zellen wurden ausgesät und der F-Aktingehalt nach 24 Stunden bestimmt (verändert nach Hall et al. [Hall et al., 1988] s. Abschnitt 6.4.10) und zum Gesamtproteingehalt in Bezug gesetzt (normalisiert). Die Analyse der Daten zeigt, dass der relative F-Aktingehalt in den verschiedenen Zellen trotz Überexpression der CAP-Fusionsproteine um weniger als 20% voneinander abweicht und somit nicht signifikant verschieden ist. Weiterhin zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu HEK-Zellen die EGFP exprimieren oder zu untransfizierten HEK-Zellen (Abb.20). Die relativen Mengen der einzelnen CAP-EGFP-Fusionsproteine sind untereinander vergleichbar, nur EGFP-CAP2 wird in geringerer Menge exprimiert (siehe Abschnitt 2.8; Abb.17).

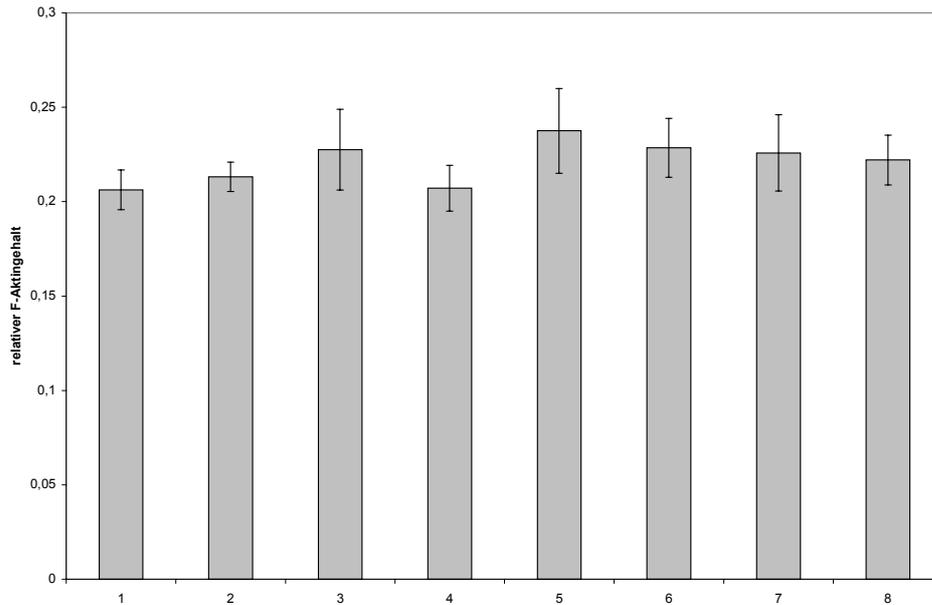


Abb.20: Effekt der Überexpression von CAP-Fusionsproteinen auf den relativen F-Aktin Gehalt von HEK/293 Zellen. HEK Zellen, die stabil verschiedene CAP-EGFP-Fusionsproteine exprimierten, wurden ausgesät und nach 24h geerntet. Der F-Aktin Gehalt wurde nach Hall et al. [Hall et al., 1988] und der Proteingehalt nach der BCA Reagenz Methode bestimmt. Der relative F-Aktin Gehalt wurde durch Standardisierung des F-Aktin Gehaltes auf den Proteingehalt ermittelt. Die einzelnen Balken geben den relativen F-Aktin Gehalt und die Standardabweichung (N=6) wieder. (1) untransfizierte HEK Zellen, (2) EGFP, (3) EGFP-CAP1, (4) EGFP-CAP2, (5) EGFP-CAP1-N2, (6) EGFP-CAP1-C1, (7) EGFP-CAP1-C2.

2.12 Komplexe von CAP-Fusionsproteinen in Säugerzellen

In Hefe liegt CAP im Komplex mit der Adenylatzyklase vor. Die Größe des Adenylatzyklase Komplexes ist in CAP defizienten Hefen um etwa 250kDa gegenüber dem der Wildtyp Hefen verringert (von 890 auf 610 kDa). 250kDa entsprechen einem Heterotetramer aus G-Aktin und CAP [Wang et al., 1992]. Im Carboxyterminus von CAP aus *S. cerevesiae* konnte eine Dimerisierungs- bzw. Oligomerisierungsfunktion lokalisiert werden. In Hefe exprimiertes MCH1 bildet Komplexe von 200kDa oder größer [Zelicof et al., 1996]. Später wurde gezeigt, dass bestimmte Mutationen im N-Terminus unter anderem zu einem verändertem Multimerisierungsverhalten führten [Yu et al., 1999].

In dieser Arbeit wurden die Komplexe untersucht, die CAP-Fusionsproteine in Säugerzellen bilden. Es wurden die Komplexgrößen durch Gelfiltration bestimmt und weiterhin wurde untersucht ob Aktin in diesen Komplexen vorhanden ist.

2.12.1 CAP-Fusionsproteine sind Teil von hochmolekularen Komplexen

Es wurden zytosolische Fraktionen von HEK-Zellen, die EGFP-CAP1 bzw. EGFP-CAP2 Fusionsproteine exprimieren, entsprechend der Größe mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie aufgetrennt und fraktioniert. Die verwendeten EGFP-CAP Fusionsproteine sind unter 2.7.1 beschrieben. Die Säulenfraktionen wurden auf das Vorhandensein von CAP-Fusionsproteinen hin untersucht. Zum einen wurde photometrisch die Absorption bei 466nm (A_{466}) gemessen. Die A_{466} wurde als Indikator für das Vorhandensein von EGFP-Fusionsprotein benutzt. Weiterhin wurden die Fraktionen mit Hilfe von monoklonalem anti-GFP Antikörper im Western-Blot analysiert. Das Trennungsverhalten der Säule wurde mit Standardproteinen festgehalten und die Größe der Proteinkomplexe, die CAP Fusionsproteine enthalten abgeschätzt. Hierzu wurden die molaren Massen der Standardproteine logarithmisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen und mit den Elutionsvolumina der EGFP-CAP Fusionsproteine verglichen (nicht gezeigt). Das EGFP-CAP1-Volllängenprotein hat eine theoretisch berechnete molare Masse von 79kDa, eluiert aber in einer Fraktion, die Proteine mit Massen von 400 bis 700kDa enthält. CAP1 ist am stärksten angereichert in Fraktionen, in denen Proteine von 650kDa eluieren (Abb.21 A). Das EGFP-CAP2-Volllängenprotein eluiert ebenfalls zwischen 400 und 700kDa mit einem Maximum bei etwa 650kDa (Abb.21 B). Beide Proteine liegen folglich in der Zelle in hochmolekularen Komplexen vor. EGFP-CAP1-N2, das den Aminoterminus mit Prolinreichem Bereich und EGFP-CAP2-N1 das den Aminoterminus ohne Prolinreichen Bereich umfasst, eluieren in Fraktionen, die Proteine/Proteinkomplexe mit einer molaren Masse von etwa 200 bis 300kDa enthalten (Abb.21 D und E). Daraus geht hervor, dass der Prolinreiche Bereich keinen messbaren Einfluss auf die Komplexbildung von CAP1 in HEK Zellen hat.

EGFP-CAP1-N2 scheint verschieden große Komplexe zu bilden, zum einen einen hochmolekularen Komplex von mehr als 600 bis 700kDa und zum anderen Komplexe von etwa 350 bis 400 kDa. Weiterhin eluiert das Protein bei einem Volumen entsprechend einer molaren Masse von 60 bis 100kDa was sehr nahe bei dem theoretisch berechneten Wert von 54kDa für das Monomer liegt. EGFP eluiert als monomeres Protein von der Säule. Die Komplexbildung von CAP ist also nicht auf die Anwesenheit des GFP zurückzuführen (Abb.21 F)

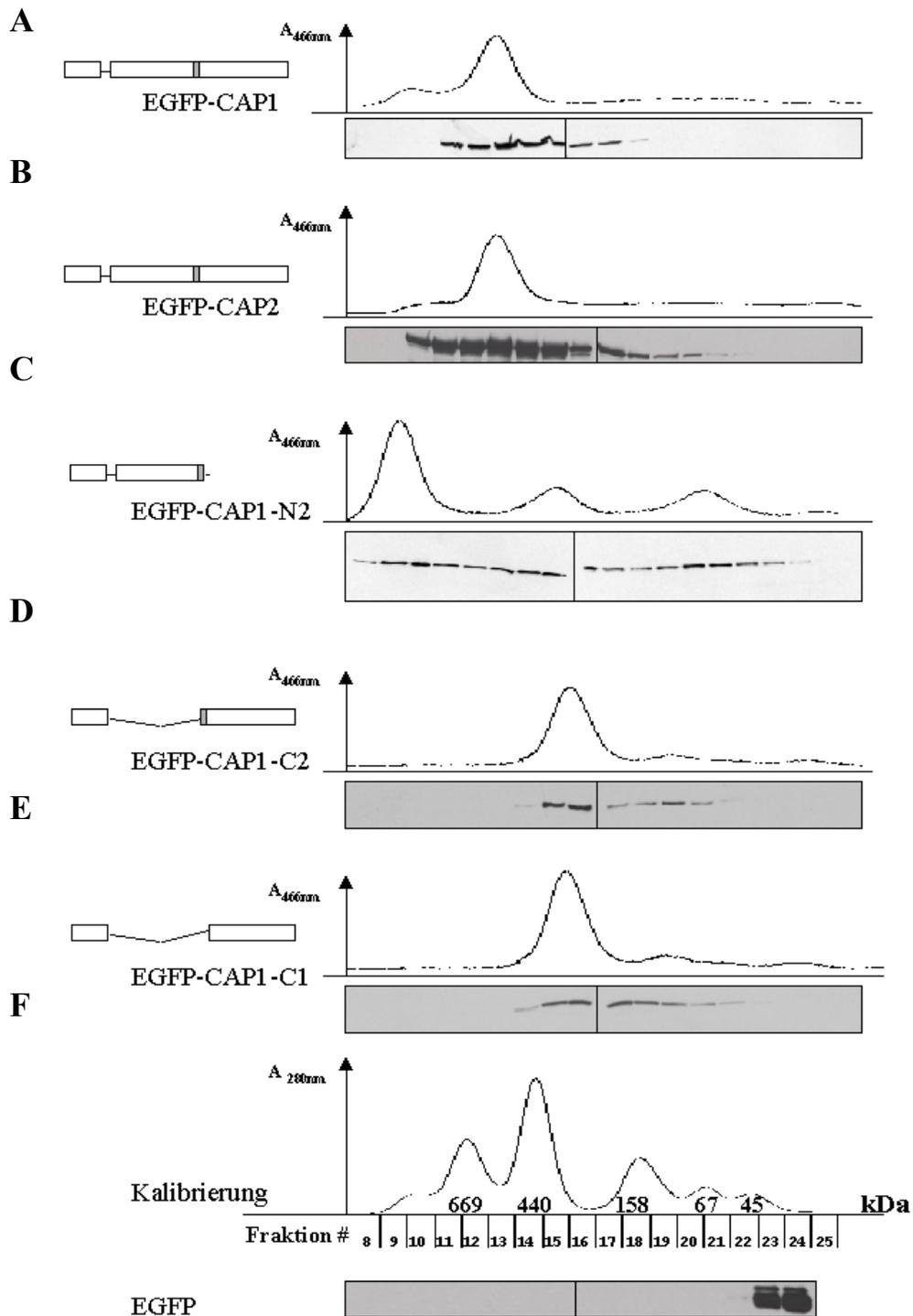


Abb.21: Komplexbildung von EGFP-CAP-Fusionsproteinen. Die Abbildung zeigt die Elutionsprofile der zytosolischen HEK-Zellextrakte von der Superdex-G-200 Gelfiltrationsäule. Oben ist jeweils das Profil der Absorption bei 466 nm und unten die Western-Blot-Analyse der Fraktionen mit monoklonalem anti-GFP Antikörper K3-184-2 gezeigt (A-E). In (F) oben ist das Elutionsprofil der Kalibrierung mit Standardproteinen bei 280nm gezeigt. In (F) ist die Western-Blot-Analyse der Fraktionen der Elution von EGFP aus zytosolischen HEL-zellextrakten gezeigt. Die Bindung von mAK K3-184-2 wurde in allen Fällen durch ECL-Reaktion des zweiten, an Merettich-peroxidase gekoppelten Antikörpers nachgewiesen.

2.12.2 Aktin ist Teil der hochmolekularen Komplexe von CAP1

Wie in 2.12.1 gezeigt, liegen CAP Fusionsproteine in Säugerzellen in hochmolekularen Komplexen vor. Da G-Aktin an CAP gebunden ist, wurde getestet, ob Aktin in diesen Komplexen enthalten ist. Hierzu wurde die zytosolische Fraktion von HEK Zellen, die stabil EGFP-CAP1 exprimieren, durch Gelfiltration aufgetrennt und fraktioniert. Die Fraktionen mehrerer Experimente wurden im Western-Blot mit monoklonalem anti- β -Aktin Antikörper auf die Anwesenheit von EGFP-Fusionsproteinen hin analysiert. Weiterhin wurden die Fraktionen, in denen das EGFP-CAP1 Fusionsprotein vorhanden war (Fraktion 11 bis 15), vereinigt, und es wurde eine Immunpräzipitation mit monoklonalem anti-GFP Antikörper durchgeführt und Aktin im Western-Blot mit monoklonalem anti- β -Aktin Antikörper nachgewiesen. Aktin war vorwiegend in niedermolekularen Fraktionen ab 67 kDa vorhanden. In diesen Fraktionen wurden keine CAP1-Fusionsprotein detektiert. Ein kleinerer Anteil des Aktins findet sich jedoch auch in höhermolekularen Fraktionen um 500 bis 700kDa, die auch die EGFP-CAP-Komplexe enthalten. In Abb.22 B ist gezeigt, dass aus hochmolekularen Fraktionen Aktin mit EGFP-CAP1 kopräzipitiert werden konnte. Aktin scheint also auch in den hochmolekularen Komplexen mit EGFP-CAP1 in Verbindung vorzuliegen.

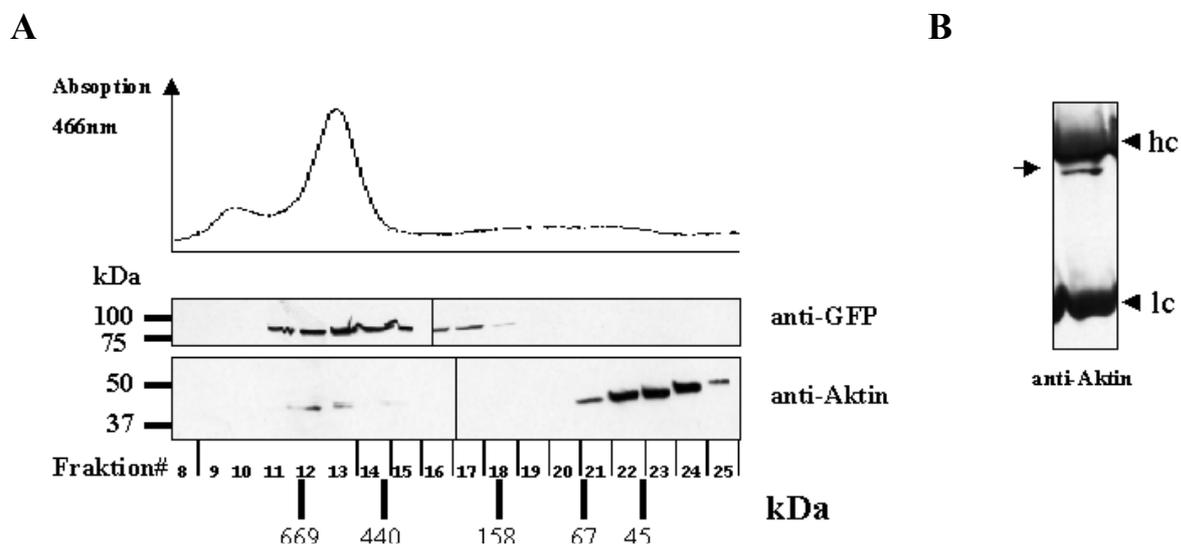


Abb.22. Die zytosolischen Komplexe von EGFP-CAP1 enthalten Aktin. (A) Die Abbildung zeigt die Elutionsprofile der zytosolischen HEK-Zellextrakte von der Superdex-G-200 Gelfiltrationsäule. Oben ist das Profil der Absorption bei 466 nm und unten die Western-Blot-Analyse der Fraktionen mit dem monoklonalen anti-GFP Antikörper K3-184-2 und dem monoklonalen anti- β -Aktin Antikörper gezeigt (B) Mit mAK3-184-2 wurde eine Immunpräzipitation mit den vereinigten Fraktion 11-15 durchgeführt. Die durch den sekundären anti-Maus Antikörper detektierten schweren und leichten Ketten des Antikörpers sind mit „hc“ und „lc“ markiert. Aktin wurde im Western-Blot mit monoklonalem anti- β -Aktin Antikörper nachgewiesen (Pfeil). Die Bindung der Antikörper im Western-Blot wurde in allen Fällen durch ECL-Reaktion des zweiten an Merettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers nachgewiesen.

2.12.3 Beeinflussung der Komplexgröße von CAP Proteinen durch PI3-Kinase

Kürzlich wurde für Coronin, ein Aktin bindendes Protein, gezeigt, dass es in bestimmten Zelltypen in hochmolekularen Komplexen von 200 und 400-600kDa vorliegt [Didichenko et al., 2000]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Inhibition von PI3-Kinase den größeren der Komplexe stabilisiert, während die Expression einer konstitutiv aktiven PI3-Kinase zur Zerstörung des Komplexes führte. Da für *Dictyostelium* CAP eine Regulation der Aktinbindefunktion durch PIP₂, einem Substrat von PI3-Kinasen berichtet wurde [Gottwald et al., 1996], wurde der Effekt von PI3-Kinase Inhibitoren auf die Komplexgröße der EGFP-CAP-Fusionsproteine in HEK Zellen untersucht.

HEK Zellen, die stabil EGFP-CAP-Fusionsproteine exprimieren, wurden eine Stunde mit 50µM LY294002, einem spezifischen Inhibitor von PI3-Kinasen [Vlahos et al., 1994], inkubiert. Anschließend wurden zytosolische Fraktionen präpariert, und die Proteine in der Gelfiltration aufgetrennt. EGFP-Fusionsproteine wurden im Western-Blot mit monoklonalem anti-GFP Antikörper nachgewiesen. Weiterhin wurden das Elutionsprofil bei einer Absorption von 466nm aufgenommen (Abb.23).

EGFP-CAP1-N2 aus Zellen, die mit 50 µM LY294002 behandelt waren, eluiert überwiegend in niedermolekularen Fraktionen mit einem Maximum entsprechend einer molaren Masse von 60 bis 100kDa. Ein zweites, kleineres Maximum der Elution liegt bei etwa 350 bis 400kDa. In unbehandelten Zellen liegt EGFP-CAP1-N2 vor allem in hochmolekularen Komplexen größer 700kDa vor. Zwei weitere, kleinere Maxima der Elution liegen bei etwa 350 bis 400kDa und 60 bis 100kDa (Abb.23 C). Die Verteilung des EGFP-CAP1 (Abb.23 A) sowie von EGFP-CAP1-C2 (Abb.23 B) wurde dagegen nicht messbar durch LY294002 beeinflusst. Die Inhibition von PI3-Kinasen beeinflusst also die von EGFP-CAP1-N2 gebildeten hochmolekularen Komplexe, andere EGFP-CAP1-Fusionsproteine werden dagegen in ihrem Komplexbildungsverhalten nicht ersichtlich beeinflusst.

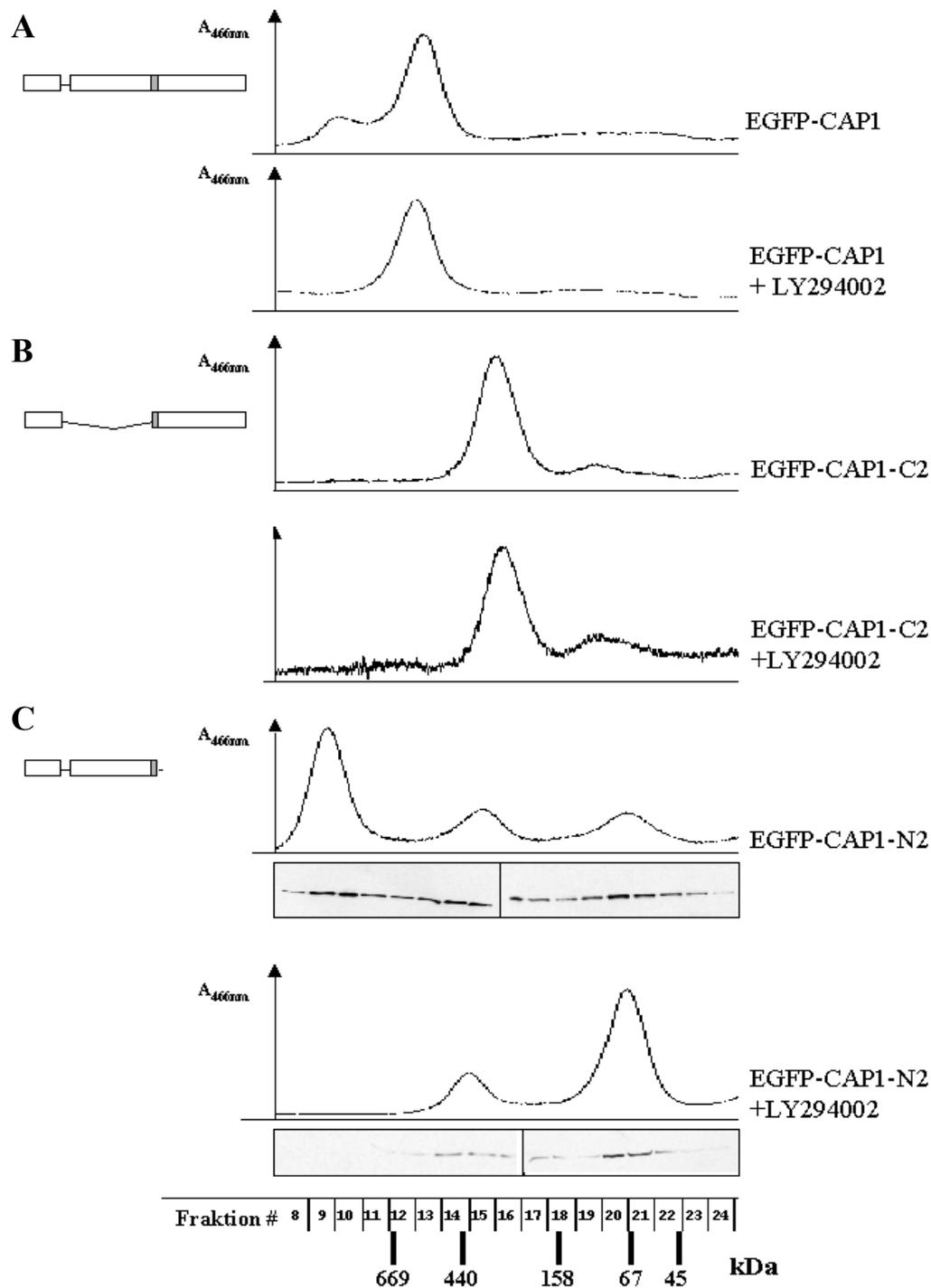


Abb.23: Der Einfluss der Hemmung von PI3-Kinase auf die Komplexbildung von EGFP-CAP-Fusionsproteinen. Die Abbildung zeigt die Elutionsprofile der zytosolischen HEK-Zellextrakte von der Superdex-G-200 Gelfiltrationsäule. (A,B,C) zeigen die Absorptionsprofile bei 466nm von Zellen, die entweder eine Stunde mit 50 μ M LY294002 inkubiert wurden (oben) bzw. unbehandelt waren (unten). In (C) ist die entsprechende Western-Blot-Analyse gezeigt. Als Antikörper wurde mAK K3-184-2 verwendet, der die GFP-Fusionsproteine erkennt. Die Bindung von mAK K3-184-2 wurde durch ECL-Reaktion des zweiten, an Merettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers nachgewiesen.

2.13 Aktin-Bindung der EGFP-CAP1-Fusionsproteine in HEK Zellen nach Inhibition der PI3-Kinase

Wie in Abschnitt 12.3 gezeigt, konnte die Inhibition der PI3 Kinase durch LY294002 die Komplexgröße des EGFP-CAP1-N2 Fusionsproteins verändern. Der Einsatz von LY294002, eines spezifischen Inhibitors von PI3 Kinasen [Vlahos et al., 1994], sollte zur Erhöhung des PIP₂ Spiegels in den behandelten Zellen führen [zur Übersicht siehe [Cantrell, 2001] [Takenawa und Itoh, 2001]]. Die Bindung von *Dictyostelium* CAP an Aktin konnte *in vitro* durch Gabe von PIP₂ inhibiert werden [Gottwald et al., 1996]. Um einen Hinweis auf die Involvierung von PIP₂ in die CAP-Funktion auch in Säugerzellen zu erhalten, haben wir versucht, die PIP₂-Konzentration durch Inhibition der PI3-Kinase-Aktivität in den Zellen zu beeinflussen. Im nachfolgenden Experiment wurde die Fähigkeit von EGFP-CAP1 Aktin zu binden in Lysaten aus LY294002 behandelten und unbehandelten HEK Zellen getestet.

An Lysaten von HEK Zellen, die stabil EGFP-CAP1 Volllängenprotein exprimieren, wurde nach einstündiger Inkubation mit 50µM LY294002 eine Immunpräzipitation mit anti-GFP Antikörper durchgeführt. In diesem Präzipitat konnte Aktin im Western-Blot in behandelten und in Kontrollzellen mit monoklonalem anti-β-Aktin Antikörper immunchemisch nachgewiesen werden (Abb. 24). Die Inhibition von PI3-Kinase durch LY294002 hat somit keinen erkennbaren Einfluss auf die Aktinbindung von EGFP-CAP1.

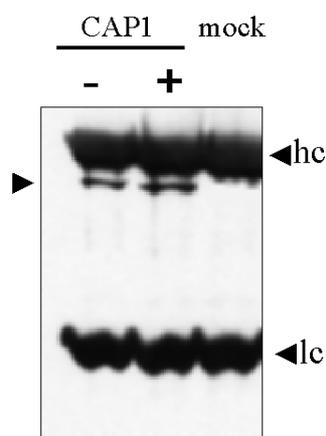


Abb.24: Einfluß der Inhibition von PI3Kinase auf die Aktinbindung von EGFP-CAP1. Lysate von HEK-Zellen wurden hergestellt und mit anti-GFP Antikörper eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im 12%igen Acryamidgel. Die Detektion der primären monoklonalen anti-β-Aktin Antikörper erfolgte durch einen zweiten, an Merettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper mittel ECL-Reaktion.. Die durch den sekundären anti-Maus Antikörper detektierten schweren und leichten Ketten des in der Präzipitation verwendeten Antikörpers sind mit „hc“ und „lc“ markiert. Aktin wurde im Western-Blot mit einem monoklonalem anti-β-Aktin Antikörper nachgewiesen (Pfeil) Gezeigt sind das Präzipitat aus mit LY294002 behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen. Mock zeigt die Kontrollpräzipitation aus untransfizierten HEK Zellen.

3 Diskussion

CAP wurde zuerst in Hefe als Teil des Adenylatzyklase Komplexes identifiziert. In Hefe fungiert CAP in der Signaltransduktion von RAS2 zur Adenylatzyklase. Weiterhin wurde CAP eine Rolle in der Organisation des Aktinzytoskeletts und in der Endozytose zugeordnet. CAP bindet G-Aktin und inhibiert *in vitro* die Aktinpolymerisation.

Im Laufe der Zeit wurden homologe Proteine in allen untersuchten eukaryotischen Organismen gefunden. In Säugern existieren zwei zu CAP homologe Proteine, CAP1 und CAP2. In dieser Arbeit wurden die Maus Homologe von CAP aus Hefe untersucht.

3.1 Sequenzvergleich von CAP1 und CAP2

Ein Vergleich der CAP1 und CAP2 Proteinsequenzen aus verschiedenen Organismen zeigte, dass CAP1 und CAP2 Proteine je eine eigenständige Unterfamilie innerhalb der CAP Protein Familie bilden. CAP1 und CAP2 wurden bisher nur in Säugern identifiziert. Der Vergleich der CAP1 und der CAP2 Proteinsequenz mit CAP aus *S. cerevisiae* zeigt, dass CAP1 und CAP2 viele Merkmale mit CAP aus *S.cerevisiae* gemeinsam haben. CAP, CAP1 und CAP2 weisen eine ähnliche Domänenstruktur auf, wobei eine aminoternale Domäne und eine carboxyterminale Domäne durch einen Prolin-reichen Bereich voneinander getrennt sind. Auch in der Feinstruktur haben sich in CAP1 und in CAP2 verschiedene Merkmale erhalten. Das aminoternale RLE Motiv [Vojtek und Cooper, 1993], das in Hefe CAP für die Bindung an die Adenylatzyklase zuständig ist, ist in CAP1 und in CAP2 vorhanden (siehe hierzu 2.2.). Aufgrund von Computermodellen wurde vorhergesagt, dass das RLE Motiv zusammen mit einem Bindepartner eine sogenannte „coiled-coil“ Struktur ausbilden kann. Die Bindepartner für diese Region in CAP1 und CAP2 sind (außer CAP1 bzw. CAP2), nicht bekannt.

Ein Vergleich der Röntgenstruktur der carboxyterminalen Domäne von CAP aus *S. cerevisiae* [A.A.Fedorov et al., 2002] mit im Computer erzeugten Modellen der CAP1 und CAP2 Sekundärstruktur legt nahe, dass die Carboxytermini von CAP1 und CAP2 eine fast identische Struktur mit dem Carboxyterminus von *S. cerevisiae* CAP haben.

3.2 Differentielle Expression von CAP1 und CAP2 in der Maus

In dieser Arbeit wurde die Expression von CAP1 und CAP2 in der Maus mit Hilfe von Northern-Blots analysiert. Zudem wurde die Expression von CAP1 und CAP2 mit Hilfe von RT-PCR in verschiedenen Zelllinien analysiert. Diese Untersuchungen konnten ein 3kb

Transkript von CAP1 nachweisen, welches, wenn auch in unterschiedlichen Raten, in allen untersuchten Geweben exprimiert wird. Im Gegensatz hierzu wurde CAP2 nur in wenigen Geweben nachgewiesen (Testes, Muskel, Skelettmuskel und Fettgewebe). Weiterhin existieren von CAP2 zwei Transkripte von etwa 3 und 3,5 kb Länge

Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Vojtek und Zelicof überein. CAP1 wurde in Ratte und Maus als ubiquitär exprimiertes Gen charakterisiert [Vojtek und Cooper, 1993; Zelicof et al., 1993]. Weiterhin stimmen die Ergebnisse mit den Daten von Swiston et al. überein, die in einer auf RT-PCR basierenden Untersuchung hohe Expressionsraten von CAP2 ebenfalls nur in wenigen Geweben (Herz, Testes) nachweisen konnten. In Leber wurde keine CAP2 mRNA nachgewiesen [Swiston et al., 1995]. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass CAP1 und CAP2 unterschiedliche Funktionen in den verschiedenen Geweben erfüllen.

3.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von CAP1 und CAP2, Lokalisation von EGFP-CAP1 und -CAP2 Fusionsproteinen

CAP1 und CAP2 EGFP-Volllängenfusionsproteine zeigen in C3H10T1/2 Fibroblasten eine vorwiegend zytosolische Lokalisation. In Zellen, die sich über ihr Substrat ausbreiten, war ein erheblicher Teil von CAP1 und CAP2 in Lamellipodien lokalisiert. In den Lamellipodien zeigten beide CAP Proteine eine Kolo-kalisation mit F-Aktin (siehe 2.7.2 und 2.7.3).

Ähnliche Beobachtungen an CAP1 wurden von Freeman und Field, Vojtek et al. und Zelicof et al. gemacht [Freeman und Field, 2000; Vojtek und Cooper, 1993; Zelicof et al., 1996]. Zusätzlich zu der hier beschriebenen Lokalisation haben Freeman und Field jedoch eine Lokalisation von CAP1 an Stressfasern beschrieben [Freeman und Field, 2000]. Die unterschiedliche Lokalisation der verwendeten EGFP-CAP Fusionsproteine im Vergleich zu Freeman und Field lässt sich eventuell durch konstruktbedingte Unterschiede erklären. In der vorliegenden Arbeit war CAP1 mit dem Aminoterminal an EGFP fusioniert, wohingegen Freeman und Field eine carboxyterminale Fusionen verwendeten. Sterische Effekte könnten eine Kolo-kalisation des CAP1 Fusionsproteins mit Stressfasern verhindert haben. Das EGFP-CAP2 Fusionsprotein zeigte in C3H10T1/2 Fibroblasten eine zum EGFP-CAP1 Fusionsprotein vergleichbare Lokalisation. CAP2 konnte bei einer Untersuchung der mRNA Expression jedoch weder in C3H10T1/2 Fibroblasten noch in einer anderen Zelllinie nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation von CAP2 in C3H10T1/2 Zellen lassen aber darauf schließen, dass CAP2 das Potenzial hat in Lamellipodien zu lokalisieren.

Die Analyse von CAP1 Deletionsmutanten (siehe Abschnitt 2.7.2) zeigte, dass sowohl der Aminoterminus als auch der Carboxyterminus von CAP1 die Fähigkeit haben, das Protein in Lamellipodien zu lokalisieren. Der Prolin-reiche Bereich ist hierfür nicht notwendig.

Die Analyse von Hefe CAP ergab im Gegensatz hierzu, dass der Prolin-reiche Bereich P2 für die Lokalisation von CAP in Regionen des kortikalen Aktins zuständig ist [Freeman et al., 1996]. Yu et al. [Yu et al., 1999] konnten jedoch zeigen, dass Mutationen in den ersten 36 Aminosäurereste das Multimerisierungsverhalten beeinflussten und die Bindung von SH3 Domänen an die P2 Region inhibierten. Sie entwickelten daraufhin ein Modell wonach der Aminoterminus den Zugang zur P2 Region reguliert.

Eine Untersuchung von CAP in *D. discoideum* mit Hilfe von GFP Fusionsproteinen ergab, dass der Aminoterminus hinreichend und notwendig ist, um CAP korrekt in der Zellperipherie zu lokalisieren [Noegel et al., 1999].

In der Arbeit von Freeman und Field wurde nur dem Aminoterminus eine Rolle für die subzelluläre Lokalisation von CAP1 in Swiss3T3 Fibroblasten zugeschrieben [Freeman und Field, 2000]. Wiederum können konstrukt bedingte Unterschiede zur Erklärung herangezogen werden. In den in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteinen war EGFP an den Aminoterminus von CAP1 fusioniert, Freeman und Field hingegen verwendeten eine Fusion von EGFP an den Carboxyterminus der von ihnen generierten CAP Deletionsmutanten.

Die Beobachtungen, die in dieser Arbeit gemacht wurden, lassen sich durch die Anwesenheit von endogenem CAP erklären. Hubberstey et al. [Hubberstey et al., 1996] konnten in Immunpräzipitationen eine Interaktion des aminoterminalen Bereichs von CAP1 mit dem carboxyterminalen Bereich von CAP1 nachweisen. Weiterhin wurde eine Bindung des Carboxyterminus an den Carboxyterminus und eine Bindung des Aminoterminus an den Aminoterminus gezeigt.

CAP1 wird in C3H10T1/2 Fibroblasten exprimiert (siehe Abschnitt 2.3) und so könnte die Anwesenheit von endogenem CAP zu einer Lokalisation der aminoterminalen und carboxyterminalen Deletionsmutanten von CAP1 in Lamellipodien führen. Eine Erklärung der Diskrepanzen zur den Ergebnissen von Freeman und Field ergibt sich hieraus allerdings nicht, da CAP1 in Swiss3T3 Zellen vorhanden ist (siehe Abschnitt 2.3). Der Carboxyterminus von *Dictyostelium* CAP hingegen zeigt unabhängig von der Anwesenheit von endogenem CAP keine spezifische Lokalisation; somit ist hier nur der Aminoterminus für die korrekte Lokalisation in der Zelle verantwortlich [Noegel et al., 1999]. Eine definitive Antwort

darüber, welcher Teil von CAP1 für die subzelluläre Lokalisation verantwortlich ist, lässt sich demnach nur in Zellen, die kein CAP exprimieren erhalten.

Die Deletionsanalyse von CAP2 (siehe 2.7.3) ergab, dass die aminoterminalen 48 Aminosäurereste von CAP2 ausreichen, um eine dem Vollängenprotein vergleichbare Lokalisation zu erreichen. In den aminoterminalen 48 Aminosäureresten sind die unter 2.2. beschriebenen Sequenzwiederholungen (RLE Motiv) enthalten. Die hierzu homologen Aminosäurereste sind in Hefe CAP für die Protein-Protein Interaktion mit der Adenylatzyklase ausreichend und notwendig [Mintzer und Field, 1994; Yu et al., 1999]. Die Aminosäurereste 3 bis 63 von CAP1 erwiesen sich zudem im Hefe „Two-Hybrid“ System als ausreichend, um eine Interaktion mit dem Carboxyterminus von CAP1 herzustellen [Hubberstey et al., 1996]. Es scheint plausibel zu sein, dass das vergleichbare Motiv in CAP2 ebenfalls für Protein-Protein Interaktionen zuständig ist. Diese Protein-Protein Interaktionen könnten dann für eine korrekte Lokalisation von CAP2 in der Zelle sorgen.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von CAP1 und CAP2 Fusionsproteinen zeigen, dass diese in Lamellipodien eine Anreicherung erfahren und dort eine starke Koloakalisation mit F-Aktin zeigen. Diese Daten legen eine direkte oder indirekte Interaktion mit F-Aktin nahe. Weiterhin wurde von Freeman und Field eine Lokalisation vom CAP1 an Stressfasern nachgewiesen. Aus diesem Grund wurden Zellfraktionierungsexperimente durchgeführt.

3.4 EGFP-CAP Fusionsproteine befinden sich in der Triton X-100 löslichen Fraktion von HEK Zellen

Die Fraktionierung von HEK Zellen, die EGFP-CAP-Fusionsproteine exprimieren, in eine Triton X-100 lösliche und eine unlösliche Fraktion ergab, dass sich alle EGFP-CAP-Fusionsproteine in der Triton X-100 löslichen Fraktion befanden (2.8). Der Verbleib in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion wäre ein Hinweis auf eine stabile Assoziation mit dem F-Aktinzytoskelett gewesen. Eine direkte oder indirekte Interaktion mit dem F-Aktinzytoskelett und ein Einfluss auf seine Stabilität ist dadurch aber nicht ausgeschlossen..

3.5 EGFP-CAP-Fusionsproteine befinden sich im zytosolischen 100.000x g Überstand von HEK Zellen

Die fluoreszenzmikroskopischen Daten dieser Arbeit zeigen die EGFP-CAP-Fusionsproteine in Lamellipodien in der Nähe der Zytoplasmamembran angereichert. Um eine Binding an die Zytoplasmamembran zu überprüfen, wurden Zellfraktionierungsexperimente durchgeführt (siehe Abschnitt 2.9). Diese Experimente zeigten, dass die EGFP-CAP-Fusionsproteine sich im zytosolischen 100.000x g Überstand von HEK Zellen befinden. In der Membranfraktion

wurden sie nicht nachgewiesen. Aus den Daten geht somit hervor, dass CAP1 und CAP2 EGFP-Fusionsproteine exklusiv zytosolische Proteine sind.

3.6 Die Überexpression der EGFP-CAP-Fusionsproteine hat keinen Einfluss auf den Gehalt an zellulärem F-Aktin

Die Überexpression von EGFP-CAP-Fusionsproteinen in HEK Zellen hatte keinen messbaren Einfluss auf den Gehalt an zellulärem F-Aktin. Das Ergebnis befindet sich zum Teil im Kontrast zu den Ergebnissen von Freeman und Field, die zeigen konnten, dass die Injektion von gereinigtem CAP1 in Swiss3T3 Fibroblasten zur lokalen Bildung von F-Aktin führte [Freeman und Field, 2000]. Das Ergebnis befindet sich aber im Einklang mit den hier vorgestellten immunfluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen (siehe Abschnitt 2.7.2 und 2.7.3), in denen kein Effekt der CAP-Expression auf F-Aktin beobachtet wurde.

Ein Ansatz zur Erklärung für die beobachteten Unterschiede liegt in möglichen Adaptionsprozessen der Zellen. Transfizierte Zellen könnten sich an eine erhöhte Expression von CAP entweder durch eine direkte Modulation der Funktion von CAP oder andere die CAP Funktion ausgleichende Prozesse anpassen. Im Gegensatz dazu führt die Injektion von CAP zu einem sofortigen Anstieg in der Zelle, Adaptionsprozesse sind hier nicht möglich.

3.7 Die Bindung von CAP1 und CAP2 Fusionsproteinen an Aktin in HEK und COS7 Zellen

In dieser Arbeit wurde in Immunpräzipitationsexperimenten das Aktinbindeverhalten von CAP1 und CAP2 in HEK und COS7 Zellen untersucht. In HEK Zellen konnte die Bindung eines EGFP-CAP1 Volllängenfusionsproteins an Aktin nachgewiesen werden, nicht jedoch die eines EGFP-CAP2-Volllängenfusionsproteins. Diese Experimente wurden mehrmals in unabhängigen Ansätzen bestätigt. In COS7 Zellen konnte dagegen eine Aktinbindung von EGFP-CAP2 nachgewiesen werden. Die Aktinbindung der CAP1 und CAP2 Fusionsproteine unterstützt die Befunde der anderen Experimente, indem sie zeigt, dass die EGFP-Fusionsproteine zumindest im Sinne der Aktinbindung funktional sind. Die Unterschiede in den Befunden aus HEK und COS7 Zellen können verschiedene Ursachen haben: CAP2 könnte im Vergleich zu CAP1 unterschiedlich reguliert sein und diese Regulation ist in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich ausgeprägt. Weiterhin ist eine höhere Affinität von CAP1 zu Aktin im Vergleich zu CAP2 denkbar. Der Unterschied zwischen HEK und COS7 Zellen könnte auch in den unterschiedlichen Expressionsraten der Fusionsproteine liegen. Im Falle der HEK Zellen wurden stabile Zelllinien verwendet, im Falle der COS7 Zellen transient transfizierte Zellen. In transient transfizierten COS7 Zellen werden die hier verwendeten Expressionsplasmide auf Grund des auf ihnen vorhandenen SV40 Virus

Replikationsursprungs amplifiziert, was zu einer starken Überexpression führt. Um dies eindeutig zu klären, muss man CAP1 und CAP2 aufreinigen und ihre Affinität zu Aktin messen. Im Rahmen dieser Arbeit war dies nicht möglich, da die rekombinant exprimierten CAP Proteine unlöslich waren.

3.8 Komplexe von CAP

CAP1 und CAP2 Fusionsprotein bilden hochmolekulare Komplexe von mehr als 500kDa aus (siehe Abschnitt 2.12.1). Von CAP aus *S. cerevisiae* ist seit langem bekannt, dass es hochmolekulare Komplexe mit der Adenylatzyklase bildet. Vermutlich ist Aktin ebenfalls Bestandteil dieser Komplexe [Wang et al., 1992].

In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass die Komplexe von EGFP-CAP1 Aktin enthalten (siehe 2.12.2). Weiterhin ist anzunehmen das CAP als Dimer oder Oligomer in diesen Komplexen vorliegt.

Während die Volllängenfusionsproteine von CAP1 und CAP2 und die Fusion des Carboxyterminus an EGFP einen Komplex von etwa 300kDa ausbilden, können für EGFP-CAP1-N2 mindestens drei Komplexe identifiziert werden, ein hochmolekularer Komplex von 650 bis 700kDa, ein Komplex um 350kDa und ein Komplex um 80kDa, der das monomere Protein darstellen könnte.

Der größte von EGFP-CAP1-N2 ausgebildete Komplex ist somit größer als die von den CAP1 und CAP2 Volllängenfusionsproteinen ausgebildete Komplex. Eine Erklärung hierfür könnte in "unkontrollierter" Oligomerisierung des Aminoterminus liegen. Im Volllängenprotein könnte das Vorhandensein des Carboxyterminus eine solche Oligomerisierung verhindern. Diese Kontrolle könnte durch Bindung des Carboxyterminus an den Aminoterminus erfolgen. Dass der Carboxyterminus von CAP an den Aminoterminus binden kann, wurde bereits gezeigt [Hubberstey et al., 1996].

3.9 Beeinflussung der Komplexgröße von CAP Proteinen durch PI3-Kinase

Verschiedene Proteine, die mit dem Aktinzytoskelett interagieren, liegen als hochmolekulare Komplexe in der Zelle vor. Ein Beispiel hierfür ist Coronin welches in bestimmten Zelltypen in hochmolekularen Komplexen von 200kDa und 400-600kDa vorliegt [Didichenko et al., 2000]. Diese Komplexe unterliegen einer Regulation durch PI3-Kinase, die eine wichtige Regulatorfunktion für viele Vorgänge im Aktinzytoskelett hat (zur Übersicht siehe [Cantrell, 2001; Takenawa und Itoh, 2001]). Die Inhibition der PI3-Kinase stabilisiert den größeren der beiden Komplexe, während die Expression einer konstitutiv aktiven PI3-Kinase zur Zerstörung des größeren Komplexes führte [Didichenko et al., 2000]. Da für *Dictyostelium*

CAP eine Regulation der Aktinbindefunktion durch PIP_2 , einem Substrat von PI3-Kinasen berichtet wurde [Gottwald et al., 1996], wurde der Effekt von PI3-Kinase Inhibitoren auf die Komplexgröße der EGFP-CAP-Fusionsproteine in HEK Zellen untersucht und dabei beobachtet, dass die Inhibition der PI3-Kinase durch den Inhibitor LY294002 [Vlahos et al., 1994] eine Zerstörung der hochmolekularen Komplexe von EGFP-CAP1-N2 verursachte, nicht jedoch der Komplexe der anderen untersuchten CAP1 Fusionsproteine. Die Aktinbindefunktion des CAP1 Volllängenfusionsproteins wurde jedoch nicht durch Inkubation der Zellen mit LY294002 beeinflusst.

Die Veränderung der Komplexgröße ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Inhibition der PI3-Kinase den PIP_2 Spiegel in der Zelle erhöht und die Bindung von PIP_2 an den Aminoterminus von CAP die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den aminoterminalen Domänen verschiedener CAP Proteine unterbindet. Die Größe der Komplexe der Volllängenfusionsproteine könnte dagegen durch die carboxyterminale Dimerisierungs- bzw. Oligomerisierungsfunktion aufrecht erhalten werden. Über einen Einfluss von PIP_2 auf die C-terminale Domäne ist nichts bekannt. Diese Interpretation befindet sich im Einklang mit dem von Hubberstey und Mottillo vorgeschlagenem Modell, wonach Carboxy- und Aminoterminus der CAP Proteine in einem Oligomer flexibel miteinander interagieren können (Abb.25 [Hubberstey und Mottillo, 2002]).

Diese Hypothese kann durch Immunpräzipitationsexperimente mit unterschiedlich getaggtten Fusionsproteinen des Aminoterminus überprüft werden. Diese Fusionsproteine müssen dazu in einer Zelle koexprimiert werden. Es wäre dann zu testen, ob die Inkubation von Zellen mit LY294002 eine Koimmunpräzipitation der Fusionsproteine unterbindet.

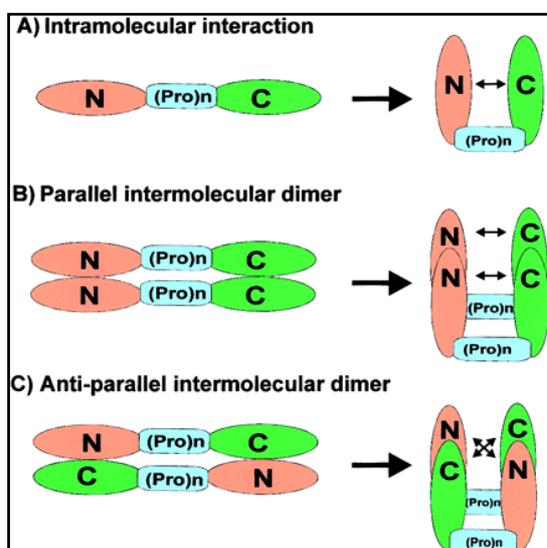


Abb.25: Modell der Multimerisierung von CAP (aus Hubberstey und Mottillo [Hubberstey und Mottillo, 2002]). A, zeigt die intramolekulare Interaktion zwischen Carboxy- und Aminoterminus. B, und C, zeigen die Möglichkeiten von parallel und antiparallel angeordneten Dimeren von CAP

Worin besteht der funktionale Unterschied von CAP1 und CAP2 ?

Bisher ist nicht klar, worin der Unterschied in der Funktion von CAP1 und CAP2 besteht. CAP1 und CAP2 werden unterschiedlich in verschiedenen Geweben exprimiert. Es könnte wie in 2.10. dargelegt eine unterschiedliche Regulation der Aktinbindungsfunktion in verschiedenen Zelltypen vorliegen.

Die Grundlage einer solchen Regulation ist bisher nicht bekannt. Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass CAP1 durch Phosphorylierung reguliert werden könnte. In Computeranalysen mit dem Programm NetPhos2.0 [Blom et al., 1999] wurde in allen untersuchten Spezies eine konservierte mögliche Phosphorylierungsstelle (in allen Säuger CAP1 Proteinen identisch: VSAKSSEMN) in der Aktinbindedomäne identifiziert [Hubberstey und Mottillo, 2002].

Ein Vergleich mit der Sequenz von CAP2 zeigt, dass diese Serinphosphorylierungsstelle ebenfalls in CAP2 aus Maus, Ratten und Mensch vorhanden ist. Weiterhin geht aus diesem Vergleich hervor, dass in CAP2 zwei verschiedene konservierte mögliche Tyrosinphosphorylierungsstellen vorhanden sind, in CAP1 Proteinen jedoch keine einzige. Eine dieser Phosphorylierungsstellen (QDGDYREFP) befindet sich ebenfalls in der Aktinbindedomäne. Ein Vergleich mit Hefe ergibt wiederum, dass an vergleichbarer Stelle ebenfalls eine mögliche Tyrosinphosphorylierungsstelle liegt, was auf eine evolutive Konservierung dieser möglichen Phosphorylierungsstelle schließen lässt.

Der Unterschied von CAP1 und CAP2 könnte in einer Regulation durch unterschiedliche Signaltransduktionswege liegen. Diese würde es den CAP Proteinen je nach zellulärem Kontext ermöglichen, unabhängig voneinander reguliert zu werden und somit in unterschiedlichen Prozessen zu agieren. Aus *Dictyostelium* ist bekannt, dass CAP auf externe Signale hin seine Lokalisation in der Zelle schnell verändern kann und sich an Stellen anreichert, in denen das Aktinzytoskelett umgebaut wird. Dies erlaubt der Zelle eine Reaktion auf den Reiz hin. Viele dieser Signale lösen Signalkaskaden aus, in die Kinasen involviert sind. Eine Modulierung der CAP-Aktivität durch eine Phosphorylierung ist in diesem Zusammenhang sehr sinnvoll.

4 Zusammenfassung

Die Proteine der CAP Familie sind G-Aktin bindende Proteine, die in allen bisher untersuchten eukaryotischen Organismen vorkommen. Der erste Vertreter der Familie wurde als Adenylatzyklase assoziiertes Protein in *S. cerevesiae* identifiziert und charakterisiert. In Säugern wurden zwei zu Hefe-CAP homologe Proteine identifiziert, CAP1 und CAP2. In dieser Arbeit wurden CAP1 und CAP2 aus der Maus untersucht.

Auf der Transkriptebene ist eine 3kb große CAP1-spezifische mRNA in allen untersuchten Geweben nachzuweisen, für CAP2 gibt es zwei Transkripte von 3kb und 3,5kb, die gewebespezifisch exprimiert werden.

Die subzelluläre Lokalisation von CAP1 und CAP2 wurde mit Hilfe von EGFP-Fusionsproteinen in C3H10T1/2 Fibroblasten untersucht. CAP1 und CAP2 sind zytosolische Proteine, die in Lamellipodien umverteilt werden können. In Lamellipodien sind EGFP-CAP1 und EGFP-CAP2 Fusionsproteine in der Nähe der Zytoplasmamembran angereichert und zeigen dort eine Kolokalisation mit F-Aktin. In Zellfraktionierungen dagegen sind die EGFP-CAP Fusionsproteine jedoch exklusiv im zytosolischen 100.000x g Überstand zu finden und eine direkte Assoziation von CAP mit zellulären Membranen scheint nicht vorhanden zu sein. Weiterhin konnte eine Interaktion mit dem F-Aktinzytoskelett durch die Fraktionierung von Zellen in eine Triton X-100 lösliche und unlösliche Fraktion nicht nachgewiesen werden. Die EGFP-CAP Fusionsproteine fanden sich exklusiv in der Triton X-100 löslichen Fraktion.

Eine Deletionsanalyse von CAP1 mit Hilfe von EGFP-Fusionsproteinen zeigte, dass sowohl der Carboxyterminus als auch der Aminoternus von CAP1 für eine spezifische Lokalisation in Lamellipodien hinreichend sind. Die Deletion des Prolin-reichen Bereichs des Moleküls führte zu keiner vom Volllängenfusionsprotein abweichenden Lokalisation. Die Deletionsanalyse von CAP2 mit Hilfe von EGFP-Fusionsproteinen ergab, dass die aminoterminalen 48 Aminosäurereste von CAP2 ausreichend sind, um eine dem Volllängenfusionsprotein vergleichbare Lokalisation zu erreichen.

Um die Aktinbindung von CAP1 und CAP2 zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. In Extrakten von HEK/293 Zellen konnte eine Aktinbindung nur für das CAP1-, nicht jedoch für das CAP2-Volllängenfusionsproteinen gezeigt werden. In COS7 Zellen hingegen wurde eine Bindung von CAP2 an Aktin nachgewiesen. Die Überexpression von CAP1 und CAP2 Fusionsproteinen hatte keinen Einfluss auf den F-Aktin Gehalt von HEK/293 Zellen.

In Gelfiltrationsexperimenten mit zytosolischen Überständen von Säugerzellen, die stabil CAP1- und CAP2-EGFP-Fusionsproteine exprimieren, wurden die CAP1 und CAP2 Vollängenproteine in hochmolekularen Komplexen von etwa 500-650kDa gefunden. In Immunpräzipitationsexperimenten wurde gezeigt, dass diese Komplexe Aktin enthalten.

Eine Untersuchung der zytosolischen Komplexe von verschiedenen an EGFP fusionierten CAP1-Deletionsmutanten ergab, dass der Carboxyterminus von CAP1 in Komplexen von 280 kDa organisiert ist. Weiter ergab sich, dass der Aminoterminus dagegen mehrere Komplexe mit Größen von 60 bis 100kDa, 350 bis 400kDa und höher als 600kDa bildet.

Die Inhibition von PI-3 Kinase zerstörte die hochmolekularen Komplexe, die vom CAP1-Aminoterminus gebildet werden, nicht jedoch die Komplexe des Vollängen-EGFP-CAP1 Fusionsproteins. Die Komplexe des Carboxyterminus wurden ebenfalls nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis deutet auf eine Rolle von PI-3 Kinase bei der Regulation von CAP durch die aminoternale Domäne hin.

5 Summary

The adenylyl cyclase associated protein CAP was first identified and characterised in *S. cerevisiae*. The members of the CAP family are G-actin binding proteins which exist in all eukaryotic organisms so far examined. In mammals two proteins homologous to yeast CAP were identified. In this work CAP1 and CAP2 from mouse were studied.

A 3kb CAP1 transcript was identified in all tissues examined, whereas two transcripts of CAP2 with sizes of 3kb and 3,5kb were identified. CAP1 was found to be ubiquitously expressed, although the amounts differed. In contrast, CAP2 was found to be expressed in a tissue specific manner. Subcellular localization studies of CAP1 and CAP2 were performed using EGFP fusion proteins in C3H10T1/2 fibroblasts, since the monoclonal antibodies generated did not recognize the endogenous proteins. According to this study CAP1 and CAP2 are cytosolic proteins which are redistributed to lamellipodia in adhering cells. In the lamellipodia the CAP1 and CAP EGFP fusion proteins localize in close proximity to the plasma membrane where they colocalize with F-actin. However, in cell fractionation experiments the EGFP CAP fusion proteins were found exclusively in the cytosolic 100.000 x g supernatant and thus no direct interaction with cellular membranes could be detected. Fractionation of cells in Triton X-100 soluble and insoluble material did not demonstrate an interaction with the F-actin cytoskeleton and the EGFP CAP fusion proteins were present in the Triton X-100 soluble fraction only.

Deletion analyses using EGFP fusions revealed that the amino- and carboxyterminal part of CAP1 protein are sufficient for directing the protein to lamellipodia. Deletion of the proline-rich region of the molecule did not lead to alterations in the subcellular localization of the protein. Deletion analyses of CAP2 identified the first 48 amino acid residues to be sufficient to direct CAP2 to lamellipodia.

In order to investigate actin binding of CAP1 and CAP2 immunoprecipitation experiments were performed. In extracts from HEK/293 cells actin binding of CAP1 full length fusion protein but not of full length CAP2 EGFP fusion could be demonstrated. Overexpression of CAP1 and CAP2 fused to EGFP had no influence on the F-actin content of HEK/293 cells.

In gel filtration experiments of cytosolic extracts from cells which stably expressed CAP1 and CAP2 EGFP full length fusions the proteins were found in high molecular weight complexes of 500-650kDa. In immunoprecipitation experiments actin was identified in these complexes. Investigation of cytosolic complexes from various CAP1 deletion mutants showed the CAP carboxyterminus fused to EGFP is part of complexes of about 280kDa.

By contrast, the aminotermminus of CAP1 fused to EGFP formed complexes of about 60-100 kDa, 350-400kDa and more than 600kDa, respectively. Inhibition of PI-3 kinase destroyed the high molecular weight complexes formed by the aminotermminus of CAP1. Complexes formed by the full length EGFP fusion or the carboxy terminus fused to EGFP were not affected in size. This result implies a role of PI-3 kinase in the regulation of CAP via the aminoterminal moiety of CAP.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Labormaterialien

Einfrierröhrchen, 1,8 ml und 2,2 ml	Nunc
Einweg-Pipetten, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner
Einweg-Pipettenspitzen	Greiner
Elektroporationsküvette	BioRad
Fotofilm, Typ 100-6	Kodak
Gewebekulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ²	Nunc
Gewebekulturplatten, 24 Loch, Ø 16 mm	Nunc
Hybridisierungsröhrchen	Hybaid
3MM Filterpapier	Whatman
Mikrotiterplatten, 96 Loch, flacher Boden	Nunc
Mikrotiterplatten, 96 Loch, U96 Maxisorb	Nunc
Nitrocellulose, Typ BA85	Schleicher und Schüll
Nitrocellulose-Rundfilter, BA85 Ø 82mm	Schleicher und Schüll
Nuclepore-Filter	Nuclepore
Nylonmembran, Biotyne	Gelman Science
Sterilfilter, 0,2 µm und 0,45 µm	Gelman Science
Sterilfilter, 150 ml, Porengröße 0,22 µm	Falcon
Petrischalen, Typ 3003	Falcon
Petrischalen, Ø 90 mm x 17 mm	Greiner
Petrischalen, 120 x 120 x 17 mm	Greiner
Plastikküvette	Greiner
Quarzküvette Infrasil	Hellma
15 ml Röhrchen, Typ 2095	Falcon
50 ml Röhrchen, Typ 2070	Falcon
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,2 ml	Sarstedt
Röntgenfilm X-omat AR-5, 18 x 24 mm	Kodak
Röntgenfilm X-omat AR-5, 535 x 43 mm	Kodak

6.1.2 Geräte

Blotkammer Trans-Blot SD	BioRad
Superdex 200 PC 3.2/30	
Chromatographiesäule	Pharmacia Biotech
Smart [®] Mikrochromatographiesystem	Pharmacia Biotech
Crosslinker UVC 500	Hoefer
Elektroporationsgerät, Typ Gene-Pulser	BioRad
Elisa Reader, Multiscan RC	Labsystems
Fraktionsensammler, RediFrac	Pharmacia Biotech
pH-Meter 766	Knick
Heizblöcke:	
Typ DIGI-Block JR	neoLab
Typ Dri-Block DB x 20	Techne

Hybridisierungsöfen	Hybaid
Inkubationsöfen Lab-Therm	Kühner
Magnetrührer, Typ MR 3001 K	Heidolph
Mikroskope:	
Lichtmikroskop	Olympus
Laser Scan Mikroskop	Leica
Multipipette, Multipette plus	Eppendorf
PCR-Maschine	MWG-Biotech
Peristaltikpumpe P1	Pharmacia Biotech
Plattengießmaschine	Technomat
Rotoren:	Beckman
Typ JA-10	Beckman
Typ JA-25.50	Sorvall
SLA-1500	Sorvall
SLA-3000	Sorvall
SS-34	Sorvall
TLA 45	Beckman
Rüttler 3015	GFL
Rüttler Lab-Shaker	Kühner
Spannungsverstärker Power Pac 200 und 300	Bio-Rad
Spektralphotometer, Typ Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Tischzentrifugen:	
Centrifuge 5414	Eppendorf
Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Kühlzentrifuge Biotech fresco	Heraeus Instruments
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman
UV-Auflichtmonitor TFS-35 M	Faust
UV-Transilluminator	MWG-Biotech
Vortex REAX top	Heidolph
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen:	
Beckman Avanti J25	Beckman
Sorvall RC 5C plus	Sorvall

6.1.3 Kits

Nucleobond AX 100 und 500	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plus	Macherey-Nagel
pGem-Teasy-Vector System I	Promega
Stratagene Prime® It II	Stratagene

6.1.4 Enzyme, Antikörper und Inhibitoren

Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase	Roche
DNase I (Desoxyribonuklease)	Sigma
Lysozym	Sigma
Klenow-Fragment	Life Technologies
Proteinase K	Sigma
Restriktionsendonukleasen	Roche, Amersham, GibcoBRL, New England Biolabs

RNase A (Ribonuklease)	Sigma
T ₄ -DNA-Ligase	Gibco-BRL
Taq-DNA-Polymerase	Roche

Primäre Antikörper

anti β -Aktin-Antikörper, mAk AC-74	Sigma
anti-GFP-Antikörper, mAk K3-184-2	nicht veröffentlicht

Sekundäre Antikörper

Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa 488-Konjugat	Molecular Probes

Inhibitoren

Complete [®] Inhibitoren Cocktail	Roche
Cytochalasin A	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
LY294002	Sigma

Antibiotika

Ampicillin	Grünenthal
Geneticin (G-418)	Gibco-BRL
Kanamycin	Sigma

6.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)	Nat. Diagnostics
Agar-Agar (BRC-RG)	Biomatic
Agarose (Elektrophoresis Grade)	Gibco
3-Aminophthalhydrazid	Fluka
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Pepton	Difco
Bacto-Trypton	Difco
BCA Reagenz	Pierce
BCIP/NBT Farbentwicklungssubstrat	Promega
Borsäure	Merck
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth
Bromphenolblau (Na-Salz)	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
CM-52 (Carboxymethylzellulose)	Whatman
Chloroform	Riedel-de Haen
Coomassie-Brilliant-Blau G 250	Roche
Coomassie-Brilliant-Blau R 250	Serva
p-Cumarsäure	Fluka
Cycloheximid	Sigma

Dimethylformamid (DMF)	Riedel-de Haen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Dulbeccos's Modified Eagle's Medium,DMEM	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylenglycolbis[2-aminoethylether]- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Essigsäure 98-100%	Riedel-de Haen
Ethanol	Riedel-de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylphenylpolyethylenglycol (NP-40)	Fluka
FCS, FBS (Fötales Kälberserum)	Biochrom, Gibco
Fischgelatine	Sigma
Formaldehyd	Sigma
Formamid	Merck
Gelatine	Sigma
Glucose	Merck
Glycerin	Riedel-de Haen
Glycin	Degussa
Harnstoff	Gerbu
Heringssperma	Roche
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES)	Biomol
Hefeextrakt	Oxoid
Imidazol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Loewe Biochemica
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Kaliumhydrogenphosphat-Triphosphat	Merck
Lipofectamin PLUS [®] Reagenz	Gibco
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Maltose	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel-de Haen
[Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Gerbu
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Riedel-de Haen
Natriumlaurylsarcosinat	Sigma
Natriumothovanadat	Sigma
Ni-NTA-Agarose	Quiagen
Nukleotide	Sigma, Roche
Paraformaldehyd	Sigma

Pepton	Oxoid
Phenol	Roth
Phosphorsäure	Merck
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Sigma
Polyvinylglykol MW 10000	Sigma
Ponceau S Konzentrat	Sigma
Saccharose	Fluka
Salzsäure 32%ig	Fluka
Sephacryl S300	Pharmacia
Sephadex G50	Pharmacia
Sigma Fast™ p-Nitrophenylphosphat-Tabletten	Sigma
Sorbitol	Fluka
N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Trichloressigsäure	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Fluka, Riedel-de Haen
Triton X-100 (Octylphenylpoly(ethylenglykolether))	Merck
Trypsin/EDTA	Sigma
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid (30%ige Lösung)	Merck
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	Roth
Yeast Nitrogen Base	Difco
Xylencyanolblau	Fluka

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.

6.1.6 Vektoren

pBluescript SK (-)	[Short et al., 1988]
pEGFP-C1,-N3	Clontech
pGemTeasy	Promega
pT7-7	[Tabor, 1990]
pQE30	Quiagen

6.1.7 Oligonukleotide

Die für Sequenzierungen oder Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) eingesetzten Oligonukleotide sind von der Firma MWG Biotech in Ebersberg bezogen worden.

Oligonukleotide für CAP1:

BH1CAP3	5' AAT GGA TCC TTA TCC AGC GAT TTC TGT C
BH1CAP5	5' AAT GGA TCC ATG GCT GAC ATG CAA AAT
HHII749MCAP5 :	5' TCT CAA GCT TCG CCA CCT CCT CCC CCA
HHII785MCAP5	5' TCT CAA GCT TCG ATC CCT ACC AGT TCT G
788MCAP3	5' GGA TTG GGG GAG GAG GCG G
748MCAP3	5' GCC TGA TCC CAC AGA GGG TC

MutI5	5' AGT ATA TGG ACG GAG C
OvMutI3	5' CAG AAC TGG TAG GGA TGC CTG ATC CCA CAG AG
MuII3b	5' ACC ACG TCA TCA AAC A
OvMutII5	5' CTC TGT GGG ATC AGG CAT CCC TAC CAG TTC TG

Oligonukleotide für CAP2:

BglMCAPII3	5' GTT AGA TCT ATC TCT TGG ATG TCA GGC
BglMCAPII5	5' TAT AGA TCT ATG ACA GAC ATG GCG GGA

Oligonukleotide für GAPDH:

5' GAPDH	5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG
3' GAPDH	5' GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC T

6.1.8 Puffer und andere Lösungen

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

Denhardt's Reagenz:

2% Ficoll 400
2% Polyvinylpyrrolidon
2% BSA

Hepes-Phenol:

1kg (10,6mol) Phenol wird bei 60°C im Wasserbad geschmolzen und mit gleichem Volumen 1M Hepes pH 7,5 äquilibriert. Die Lösung wird in Portionen bei -20°C eingefroren.

10x MOPS (pH 7,0/ pH 8,0):

41,9g (0,2mol) MOPS
16,7ml 3M Natriumacetatlösung
20ml 0,5MEDTA-Lösung
mit destilliertem Wasser auf 1l auffüllen.

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

12,1g (0,1mol) Tris/HCl
87,0g (1,5mol) NaCl
5,0ml Tween 20
mit Wasser auf 1l auffüllen.

PBG (pH 7,4):

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

PBS (pH 7,2/ pH 8,0):

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

<u>20 x SSC:</u>	3M NaCl 0,3M Natriumzitat
<u>TE-Puffer (pH 8,0):</u>	10mM Tris/HCl 1mM EDTA
<u>Tris-Phenol:</u>	1kg (10,6mol) Phenol wird im Wasserbad bei einer Temperatur von ungefähr 60°C geschmolzen und mit dem gleichen Volumen 1M Tris/HCl pH 8,0 äquilibriert.
<u>50 x Tris/Acetatpuffer (pH 8,0):</u>	2M Tris 1M Acetat 50mM EDTA auf 1l mit Wasser auffüllen.

6.1.9 Medien

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

6.1.9.1 Medien für die *E. coli* Kulturen [Sambrock et al., 1989]

<u>LB-Medium:</u>	<u>SOC-Medium:</u>
1% (w/v) Bacto-Trypton	2%(w/v) Bacto-Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt	0,5% (w/v) Hefeextrakt
0,5%(w/v) NaCl	0,5%(w/v) NaCl
inWasser.	20mM Glucose
	inWasser

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Für Agarplatten wurden den Medien 0,9%(w/v) Agar und bei Bedarf 50mg/l Ampizillin oder Kanamycin zugesetzt. Für Farbindikatorplatten zur Blau/Weiß-Selektion von *E. coli*-Transformanten wurden die fertigen Platten jeweils mit 50µl 0,1M IPTG-Lösung und 90µl X-gal-Lösung (200mg/10ml Dimethylformamid) bestrichen.

6.1.10 Bakterienstämme

Bakterienstämme

M15	Quiagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE)	[Studier und Moffatt, 1986]
<i>E. coli</i> DH5α	[Hanahan, 1983]

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1 Boiling-Methode zur Plasmid-DNA Präparation im Mikromaßstab

Dieses Verfahren ist geeignet, eine große Anzahl von Versuchsansätzen parallel zu bearbeiten [Holmes und Quigley, 1981]. Die Methode 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. 1,5ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden in einem Eppendorfgefäß bei 16.000x g für drei Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200µl STET-Puffer suspendiert. Zur Bakterienlyse wurden ca. 70µg Lysozym hinzugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde anschließend für neunzig Sekunden auf 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 16.000x g wurde das Pellet entfernt und der Überstand zur Fällung der Plasmid-DNA mit 20 µl 3M Natriumacetat, pH 7,0, und 500µl 96%igem Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgte für dreißig Minuten bei -80°C. Die gefällte Plasmid-DNA wurde zehn Minuten bei 16.000x g sedimentiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, danach ungefähr zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30µl Wasser gelöst.

STET-Puffer: 0,1M NaCl
 10mM Tris, pH 9,0
 1mM EDTA, pH 8,0
 5% Triton X-100

6.2.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel

Um bis zu 40µg hochreine Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen zu gewinnen, wurde das von der Firma Macherey-Nagel angebotene „NucleoSpin Plus“-Kit benutzt. Hierzu wurden 10ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, mit entsprechendem Antibiotikum, abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 250µl Lösung AI, die RNase enthält, versetzt. Danach wurden 250µl Lösung A2 zugegeben, drei- bis fünfmal geschüttelt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300µl eiskalter Lösung A3 zur Reaktionsmischung, die dann gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert wurde. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 16.000x g und 4°C wurde der Überstand auf eine NucleoSpin-Säule gegeben. Es wurde eine Minute bei 18.000x g zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial bindet. Anschließend wurde die Säule zuerst mit 500µl Puffer AW und dann mit 700µl Puffer A4 gewaschen. Danach wurde noch einmal ohne

vorherige Pufferzugabe zentrifugiert, um Ethanolreste zu entfernen. Zur Elution wurden schließlich 50µl Lösung AE auf die Säule gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann eine Minute bei 18.000x g zentrifugiert

6.2.3 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* im Makromaßstab gemäß Macherey und Nagel

Die Zellen einer 50ml Bakterienübernachtskultur wurden durch Zentrifugation (5 Minuten; 4.000x g) pelletiert. Nach Angaben des Herstellers (Macherey und Nagel) erfolgte anschließend die Plasmidisolierung mit Hilfe des „Nucleobond AX 100“-Kits. Die DNA wurde mit 200µl Wasser von der Säule eluiert.

6.2.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegelmatrix [Sambrock et al., 1989]. Es wurden 0,7 bis 2%ige Gele in Tris-Acetat-Puffer als Gel- und Laufpuffer eingesetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte horizontal in Flachbett-Gelapparaturen. bei einer Spannung von 10V/cm. Den DNA-Proben wurde vor dem Auftragen ein sechstel des Volumens DNA-Probenpuffer zugesetzt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht ($\lambda=302\text{nm}$) enthielten die Agarose-Lösungen 0,1µg/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 (Na-Salz)
in TE-Puffer

DNA-Größenstandards:

1kB DNA Leiter (Gibco BRL): 12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090;
4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506,17; 396; 344; 298;
220; 201; 154; 134; 75bp

6.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Maus-Geweben

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 0,2M Natriumacetat (pH 3,2) und Phenol/Chloroform extrahiert. Danach wurde die RNA mit Isopropanol gefällt, mit 75%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser aufgenommen. Aliquots wurden bei -80°C aufbewahrt oder direkt weiter verwendet.

Extraktionslösung:

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

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

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

RNA-Puffer:

50 %Formamid
6 %Formaldehyd
in MOPS-Puffer (pH 7,0)

RNA-Farbmarker:

50 % Saccharose
0,25 %Bromphenolblau
in Wasser

6.2.7 Northern-Blot-Analyse

Nach der Elektrophorese wurden die RNA-Gele zunächst fünf Minuten in Wasser und anschließend fünf Minuten in 20x SSC-Lösung gewaschen. Der Transfer auf die

Nylonmembran erfolgte über Nacht in 20x SSC Lösung. Die Membranen wurden nach dem Transfer in 2x SSC-Lösung gewaschen, kurz getrocknet und im UV-Crosslinker bestrahlt.

6.2.8 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit dem Stratagene Prime It II ® Kit

Die zur Markierung verwendete DNA wurde mit Restriktionsenzymen aus Plasmiden geschnitten oder durch PCR-Reaktion gewonnen. Es wurden ungefähr 25ng DNA mit Wasser zu einem Endvolumen von 24µl aufgefüllt und mit 10µl „random oligo nucleotide primer“ versetzt. Die Sonde wurde fünf Minuten auf 92°C erhitzt, zwei Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend mit 10µl 5x Primer-Puffer, 5µl α -³²P-dATP (50µCi) und 2U Klenow-Enzym versetzt. Der Reaktionsansatz wurde zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Zentrifugation bei 3.000x g für zwei Minuten über eine 1ml 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 25ml Hybridisierungspuffer gemischt.

6.2.9 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden für Nylonmembranen nach Northern-Blot

Die mit 2x 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 100µl denaturierte Heringssperma DNS (10mg/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 abgegossen 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

Waschpuffer (pH 7,15):

Hybridisierungspuffer
ohne 4x Denhardts Reagenz

0,12 M Phosphatpuffer (pH 6,8)
in 2 x SSC
4 x Denhardt's Reagenz

6.2.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die mit Restriktionsenzymen verdaute DNA in 0,6-2,0%igen Agarosegelen in Tris-Acetat-Puffer aufgetrennt. Das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel wurde im UV-Licht betrachtet und das die zu isolierende Bande enthaltende Agarosestück mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. In das Reaktionsgefäß war zuvor mit einer Kanüle am Boden eine Öffnung gestochen worden, die mit silanisierter Glaswolle verschlossen wurde. Dadurch kann Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß austreten ohne dass Gelstückchen mitgerissen werden. Das so vorbereitete 0,5ml Reaktionsgefäß wurde in ein 1,5ml Auffanggefäß gegeben und es wurde zweimal je 30sec bei 3.000x g zentrifugiert. Dabei wird die DNA mit der Flüssigkeit aus dem Gel gespült und gelangt in das 1,5ml Gefäß. Die DNA wurde sodann mit 2,5-fachem Volumen 96%igem Ethanol und 1/10-fachem Volumen 3M Natriumacetatlösung, pH 5,2, gefällt, sedimentiert (13.000x g, 4°C, 10min), mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 10-20µl Wasser aufgenommen.

6.2.11 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde spektralfotometrisch mit TE-Puffer oder Wasser als Referenz bestimmt. Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ entspricht eine OD von 1,0 einer Konzentration von 50µg/ml dsDNA bzw. 40µg/ml RNA [Sambrock et al., 1989]. Über den Grad der Verunreinigung mit Proteinen und Phenolen lässt sich mit Hilfe des Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ eine Aussage machen. Beträgt der Wert des Quotienten 1,8 oder mehr, kann die DNA- oder RNA-haltige Lösung als rein angesehen werden.

6.2.12 *In vitro*-Rekombination von DNA

6.2.12.1 Verdauung mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit einem Restriktionsenzym erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Temperaturbedingungen. Pro µg DNA wurden 2-10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Plasmid-DNA wurde 1-3 Stunden verdaut. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde in einem Agarosegel kontrolliert.

6.2.12.2 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden endständige 5'-Phosphat-Gruppen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) entfernt. Linearisierte Vektor-DNA (0,5-3µg) wurde in einem 50µl Ansatz mit 3U alkalischer Phosphatase in CIAP-Puffer bei 37°C für 30min dephosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70 °C (10min) und Zugabe von 2mM EDTA gestoppt. Die DNA wurde nach Zugabe des DNA-Probenpuffers in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel isoliert.

<u>10x CIAP-Puffer (pH 9,0):</u>	0,5M Tris/HCl
	10mM MgCl ₂
	1mM ZnCl ₂
	10mM Spermidin

6.2.12.3 Auffüllen überhängender Enden

Viele Restriktionsenzyme erzeugen kohäsive Enden mit einem 5'- oder 3'-überstehenden Ende. 5'-DNA-Überhänge können mit Hilfe des Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt werden und desoxy Ribonukleotiden

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

Der Reaktionsansatz wurde 12Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch zwanzigminütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Die DNA wurde nach Zugabe des DNA-Probenpuffers in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel isoliert .

6.2.12.4 Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Ligation von DNA-Fragmenten und entsprechend linearisierter Vektor-DNA.

Ligationen wurden 8-12h bei 16°C im vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer durchgeführt. Für die Ligation wurden 50 bis 150ng Vektor DNA mit 1-4 fachem molarem Überschuss des Fragments eingesetzt. Die verwendeten Vektoren waren in der Regel dephosphoryliert.

6.2.13 Polymerase-Kettenreaktion

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 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 180s gewählt. Für den letzten Zyklus wurde eine Polymerisationsdauer von 300 s 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“ wurden die Zyklen automatisch gesteuert.

Reaktionsansatz:

0,5µg Plasmid-DNA
 2µl Oligonukleotid A (10 pmol/ml)
 2µl Oligonukleotid B (10 pmol/ml)
 5µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
 5µl 10x *Taq*-Polymerase Puffer
 1µl *Taq*-Polymerase (3-4 U)
 mit Wasser auf 50µl auffüllen.

10x *Taq*-Polymerase-Puffer:

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

Die Reaktionsparameter (Temperaturen, Zeiten) wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst. Die Hybridisierungstemperatur wurde so gewählt, dass sie etwa 1-2 °C unter der geschätzten Schmelztemperatur der Primer lag. Das Standard-PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

- | | |
|--------------------------------------|---|
| I. Initiale Denaturierung: | 94°C, 5min |
| II. Temperaturzyklus (20-35 Zyklen): | Denaturierung (94°C, 1min)
Primer-Hybridisierung (48-64°C, 1min)
DNA-Synthese (72 °C, 1min) |
| III. Terminale Verlängerung: | 72 °C, 10min |
| IV. Kühlung auf 4 °C | |

6.2.14 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 Transkription 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 400ng Gesamt-RNA eingesetzt und nach dem folgenden Protokoll in cDNA umgeschrieben:

0,5µl 10 mM dNTP-Mix
1µl 50µM p(dN)₆
0,5µl M-MLV-Transkriptase (Promega)
2µl 5x RT-Puffer
0,5µl RNAsin (40U/µl; Promega)
400ng Gesamt-RNA
Wasser auf 10µl

1h Inkubation bei 37 °C

6.2.15 Transformation von *E. coli*-Zellen

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

1l LB-Medium wurde mit 5ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C mit 250UpM kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und dann abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit insgesamt 1l autoklaviertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 50ml 15%igem autoklaviertem Glycerin resuspendiert und bei 3.000x g und 4°C pelletiert. Nach erneutem Resuspendieren in 1 bis 2ml 15%igem Glycerin wurden 50µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

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

Zur Transformation wurden die Zellen (50µl) auf Eis aufgetaut und 1µg Plasmid-DNA oder die Hälfte des Ligationsansatzes zupipettiert. Nach 10min wurde das Zell-Plasmid-Gemisch in eine eiskalte Elektroporationsküvette gefüllt und die Zellen bei 200Ω, 2,5kV und 25µF transformiert. Anschließend wurden die Zellen in 1ml SOC-Medium [Sambrook et al., 1989] aufgenommen, 45min bei 37°C inkubiert und 50 und 300µl Aliquots auf entsprechende Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2.15.3 *E. coli*-Dauerkulturen

Wichtige Transformanten werden als Dauerkultur konserviert. Dazu wurden diese als Übernachtkultur in LB-Selektions-Medium angezogen und mit 10% DMSO bei -80 °C aufbewahrt.

6.3 Zellbiologische Methoden

6.3.1 Zelllinien und Medien

Zelllinien:

HEK₂₉₃ Zellen

Ein Derivat menschlicher embryonaler Nierenzellen [Pear et al., 1993]

C3H10T1/2 Zellen

Ein Derivat muriner embryonaler Fibroblasten

COS7 Zellen

Mit dem Großen T-Antigen des SV40 Virus stabil transfizierte Zellen zur Überexpression von Proteinen [Jasin et al., 1985]

Medien:

DMEM/FBS:

DMEM (high glucose)

10% FBS

100U/ml Penizillin/Streptomycin

6.3.2 Kultur von Säugerzellen

Säugerzellen wurden in Zellkulturschalen im Brutschrank bei Wasser gesättigter Atmosphäre und 5%CO₂ bei 37°C mit modifiziertem DMEM-Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und dann mit 1ml/100 mm Schale 0,05% Trypsin/EDTA abgelöst (ca. 3min bei 37°C). Die Zellen wurden 1:10 in DMEM/FBS verdünnt und ausplattiert (ca. 10⁶ Zellen/90 mm Kulturschale).

6.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

10⁷Zellen wurden in Einfriermedium aufgenommen. Das Einfrieren von Zellen in Kryoröhrchen erfolgte in bei -70°C oder in flüssigem Stickstoff. Aufgetaut wurden die Zellen zügig bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen sofort in DMEM Medium gegeben.

Einfriermedium

DMEM

20 % FCS

10 % DMSO

6.3.4 Transfektion von HEK und COS7 Zellen durch Elektroporation

10^8 Zellen wurden in 200 μ l DMEM/FBS aufgenommen und 20 μ g hochreine Plasmid DNA hinzugegeben. Die Zellen wurden 10min auf Eis inkubiert und dann bei 500 Ω , 975 μ F und 180V elektroporiert. Die Zellen wurden dann 10min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellen in 20ml DMEM/FBS aufgenommen, in eine 10cm Zellkulturschale gegeben und im Brutschrank inkubiert.

6.3.5 Transfektion von C3H10T1/2 Zellen mit Lipofectamine Plus [®] Reagenz

Eine 60mm Kulturschale Zellen wurde 12h vor Transfektion mit Zelle so ausgesät, dass die Schale bei Beginn der Transfektion zu 70% konfluent war. 1 μ g hoch reine Plasmid DNA wurde mit 100 μ l DMEM (ohne Serum) verdünnt, es wurden 6 μ l PLUS Reagenz[®] hinzugefügt. Dann wurden 4 μ l Lipofectamin Reagenz in weiteren 100 μ l DMEM (ohne Serum) aufgenommen, die in DMEM verdünnte DNA wurde hinzugegeben, es folgte ein Inkubation von 15min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und 1ml DMEM ohne Serum hinzugefügt. Die Verdünnte mit Lipofectamin versetzte DNA wurde zu den Zellen gegeben und 3h im Brutschrank inkubiert. anschließend wurden 3ml DMEM/FBS hinzugefügt und 18-36h inkubiert.

6.3.6 Fixieren und permeabilisieren von Säugerzellen

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 200 μ l 3% Paraformaldehyd für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden danach zweimal für 5min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10min mit 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen und 30min mit 5% FBS in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal für 5min mit PBS gewaschen.

6.3.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit primärem Antikörper für 50min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend viermal für 5min mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit sekundärem Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend viermal für 5min mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in Gelvatol eingebettet und zum Aushärten über Nacht bei 4°C stehen gelassen.

3% Paraformaldehyd :

3% Paraformaldehyd in Wasser,
zum Lösen wurde Tropfenweise
NaOH zugegeben

Gelvatol:

20g Gelvatol 20-30 (Polyvinylglykol, MW10.000)
in PBS 16h rühren
40ml Glycerin zugeben, 16h rühren
15min bei 12.000x g zentrifugieren
25ng/ml DABCO zum Überstand geben
Lagerung aliquotiert bei -20 °C

6.3.8 Fluoreszenzmikroskopie

Für die konfokale Lasermikroskopie wurde das CLSM-SP-Mikroskop der Fa. Leica benutzt, das optische Schnitte durch die Präparate erlaubt. Das Gerät ist mit einem Krypton- und einem Argonlaser ausgestattet und ermöglicht elektronische Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen. Der Emissionsbereich des zu empfangenden Signals kann durch die Software eingegrenzt werden, so dass Kreuzanregungen durch die beiden Laser verhindert werden. Die Daten wurden mit dem Bildverarbeitungssystem der Fa. Leica weiterverarbeitet

6.4 Proteinchemische und immunologische Methoden**6.4.1 Reinigung von rekombinant exprimiertem CAP1**

Mit pT7-CAP1 transformierte *E. coli* BL21- DE3 wurden in LB-Medium, versetzt mit 50µg/ml Ampizillin, angeimpft und bis zu einer Dichte von $OD_{600}=0,6$ angezogen. Die Expression von CAP1 wurde dann mit 1mM IPTG für 5 Stunden bei Raumtemperatur induziert. Die Expression eines Protein von etwa 55kDa wurde induziert. Aliquots aller Reinigungsschritte wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert. 2,7l induzierter Kultur wurden bei 3.000x g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde bei -20°C eingefroren. Das Pellet wurde in 60ml Aufschlusspuffer aufgenommen, $MgCl_2$ wurde zu einer finalen Konzentration von 25mM hinzugegeben und je 0,3g Lysozym und DNase I wurden hinzugefügt. Es wurde 15min auf Eis inkubiert und anschließend EDTA zu einer finalen Konzentration von 60mM hinzugefügt. Die Probe wurde dann bei 3.000x g zentrifugiert. In der Pellet-Fraktion befand sich ein großer Teil des zu reinigenden Proteins, der sich in Lösung befindliche Teil präzipitierte ebenfalls nach und nach. Das Pellet wurde mit 30ml Aufschlusspuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 30ml Harnstoff Puffer für 30min bei Raumtemperatur extrahiert, im Anschluss daran wurde wiederum zentrifugiert. Der Überstand wurde über Nacht gegen Aufschlusspuffer dialysiert. Ein Teil des zu reinigenden Proteins und ein kontaminierendes Protein mit geringerer molarer Masse präzipitierten. Das kontaminierende Protein präzipitierte wesentlich stärker als das zu reinigende Protein und konnte durch Zentrifugation bei 10.000x g und 4°C fast vollständig abgetrennt werden. Da das zu reinigende Protein ebenfalls mit der Zeit ausflockte wurde der

Überstand wieder gegen Harnstoffpuffer dialysiert. Der Überstand wurde dann auf eine mit Harnstoffpuffer äquilibrierte CM-52-Zellulose-Kationenaustauscher-Säule gegeben (20ml Gelbettvolumen). Die Säule wurde mit 20ml Harnstoffpuffer gewaschen und schrittweise mit 10ml 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM NaCl in Harnstoffpuffer eluiert und fraktioniert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Das Protein eluierte bei 50mM NaCl von der Säule. Beim der Schritt-Weisen Dialyse gegen Puffer mit absteigenden Harnstoffkonzentrationen fiel das Protein wieder aus. Das Protein wurde nach tryptischem Verdau im MALDI-Massenspektrum anhand seiner Fragmente als rekombinant exprimiertes CAP1 identifiziert.

Aufschlusspuffer(pH 6,5):

20mM MOPS
100mM NaCl
0,1% Triton X-100
5mM DTT
1mM PMSF

Harnstoffpuffer (pH6,5):

20mM MOPS
5mM DTT
8M Harnstoff

6.4.2 Expression und Reinigung eines aminoterminalen Teilstücks von CAP2 in *E. coli*

Mit pQE-CAP2-2 transformierte *E. coli* wurden in LB-Medium, versetzt mit 50µg/ml Ampizillin, angeimpft und bis zu einer Dichte von $OD_{600}=0,6$ angezogen. Die Expression des Proteins wurde dann mit 0,4mM IPTG für 2 Stunden bei 37°C induziert. Die Expression eines Protein von etwa 26kDa wurde induziert. Aliquots aller Reinigungsschritte wurden in Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert. 1l induzierter Kultur wurden bei 3.000x g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde bei -20°C eingefroren.

Das Pellet wurde in 4ml Aufschlusspuffer/g Feuchtwicht Bakterien aufgenommen, je eine Spatelspitze Lysozym und DNase I wurden hinzugefügt und 15 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde dann 20min bei 3.000x g und 4°C zentrifugiert. Das zu reinigenden Protein befand sich im Pellet. Das Pellet wurde in 10ml Solubilisierungspuffer aufgenommen und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 20min bei 10.000x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit Solubilisierungspuffer äquilibrierte Ni-NTA-Agarose Säule gegeben (3ml Gelbettvolumen). Die Säule wurde mit 100ml Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 5ml Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde fraktioniert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Das Protein war zu mehr als 90% rein. Versuche, das Protein durch Dialyse gegen Puffer mit absteigenden Harnstoffkonzentrationen in Lösung zu bringen, führten zur Präzipitation des Proteins.

Aufschlusspuffer (pH 8):

50mM NaH₂PO₄
300mM NaCl
10mM Imidazol
1mM DTT

Solubilisierungspuffer (pH 8):

50mM NaH₂PO₄
300mM NaCl
10mM Imidazol
8M Harnstoff

Wasch-Puffer (pH 8):

50mM NaH₂PO₄
300mM NaCl
20mM Imidazol
8M Harnstoff

Elutionspuffer (pH 8):

50mM NaH₂PO₄
300mM NaCl
250mM Imidazol
8M Harnstoff

6.4.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

6.4.3.1 Immunisierung von Mäusen

Zur Immunisierung wurden 2 Balb/C Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden mit gereinigtem CAP1 bzw. CAP2-Polypeptid immunisiert. Bei Maus 1 wurde Freund's Adjuvans benutzt. Die Maus wurde dreimal im Abstand von jeweils drei Wochen mit ca. 100µg Antigen immunisiert. Bei Maus 2 wurde das Immun Easy Mouse Adjuvant der Firma Quiagen angewendet. Die Immunisierung erfolgte dabei zweimal im Abstand von drei Wochen mit jeweils 10µg Polypeptid. Bei beiden Mäusen fand die letzte Injektion vier Tage vor der Fusion der Milzzellen statt.

6.4.3.2 Fusion

Durch die Fusion von Milzzellen (B-Lymphozyten) mit Myelomazellen erhält man sogenannte Hybridomazellen [Kohler und Milstein, 1976]. Diese vereinigen die Eigenschaften der Ausgangszellen in sich, nämlich Antikörperproduktion (B-Lymphozyten) und Teilungsfähigkeit (Myelomazellen). Um auf diese Hybridomazellen selektionieren zu können, werden Myelomazelllinien zur Fusion verwendet, die keine Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase (HPRT) besitzen. Diese Zellen sterben in einem Medium ab, das mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin supplementiert ist. Da auch Milzzellen nicht in der Lage sind, in Kultur zu überleben, werden in diesem Medium nur die Fusionsprodukte beider Zellarten wachsen können. Die Milzzelle steuert das Enzym HPRT bei, so dass die Purinsynthese über Hypoxanthin ablaufen kann. Die *de novo* Synthese ist durch Aminopterin

blockiert. Die Myelomazelle ihrerseits bringt die Teilungsfähigkeit in die Fusion ein. Die Hybridomazelle kann sich somit vermehren.

Die Milzen der beiden immunisierten Mäuse wurden unter sterilen Bedingungen herauspräpariert und in jeweils 5ml kaltem RPMI 1640-Medium (Gibco) aufgenommen. Die Milzen wurden mit Skalpell und Pinzette zerkleinert, vom Fettgewebe befreit und mit einem Glashomogenisator vorsichtig in Einzelzellen zerlegt. Diese Zellsuspensionen wurden anschließend durch je eine mit Kunstfaserwolle gestopfte Spritze filtriert, um gröbere Bestandteile abzutrennen. Die Zellen wurden zweimal in kaltem, serumfreien RPMI-Medium gewaschen (Beckman, 1500UpM, 5min, 4°C), anschließend in je 5ml RPMIoH (RPMI-Medium ohne Hepes-Puffer) aufgenommen und auf Eis gestellt. In allen Fällen wurde die Milz der Mäuse in zwei Hälften aufgeteilt, die dann mit zwei unterschiedlichen Myelomastämmen (Stamm x63-Ag8.6538 und Stamm PAIB₃ag81) fusioniert wurden. Für jede Fusion wurden die Zellen einer halben Milz (ca. 5×10^7 Zellen) in 5ml RPMIoH-Medium und $2,5 \times 10^7$ Myelomazellen in 5 ml RPMIoH-Medium zusammengegeben. Dieser Ansatz wurde zentrifugiert (Beckman, 1500UpM, 5min, 4°C) und das Pellet möglichst gut trocken gesaugt. Das Pellet wurde mit der Spitze einer zugeschmolzenen Pateurpipette ausgebreitet, 0,5ml PEG 4000 (PEG solution ready to use, Sigma) zugegeben und genau eine Minute im 37°C Wasserbad inkubiert. Nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10ml RPMIoH-Medium unter leichtem Schütteln des Röhrchens im Wasserbad tropfenweise zupipettiert. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis wurden die fusionierten Zellen abzentrifugiert, das Sediment in 125ml Normalmedium aufgenommen und auf 10 Costarplatten verteilt (0,5ml pro Loch). In jedes dieser Löcher waren am Vortag 0,5ml einer Makrophagensuspension pipettiert worden. Die Platten wurden bei 37°C, 5%CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. 24 Stunden nach der Fusion wurden in jedes Loch 0,5ml eines dreifach konzentrierten HAT-Selektionsmediums zugegeben. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt, wobei nach 14 Tagen HAT-Medium durch HT-Medium ersetzt und nach weiteren zwei Wochen die Selektion beendet wurde.

Normalmedium:

500ml RPMI 1640 mit Hepes und Glutamin
55ml fötales Kälberserum
5,5ml 200 mM L-Glutamin
5,5ml Kanamycinlösung (Gibco)
5,5ml einer frischen 10^{-3} M β -Mercaptoethanollösung

3x HAT-Medium:

571,5ml Normalmedium
16,5ml HAT-Stocklösung
16,5 ml Aminopterinstocklösung

<u>1x HAT-Medium:</u>	571,5ml Normalmedium 5,5ml HAT-Stocklösung 5,5ml Aminopterinstocklösung
<u>1x HAT-Medium:</u>	571.5ml Normalmedium 5,5ml HAT-Stocklösung
<u>HAT-Stocklösung:</u>	1,0 x 10 ⁻² M Hypoxanthin 1,6 x 10 ⁻³ M Thymidin
<u>Aminopterin-Stocklösung:</u>	4 x 10 ⁻⁵ M Aminopterin

Alle zugesetzten Lösungen wurden steril filtriert.

Makrophagensuspension:

Zur Isolierung von Makrophagen wurden ca. 10ml Normalmedium unter sterilen Bedingungen in die Bauchhöhle einer durch Genickdislokation getöteten Maus injiziert. Die 10 ml Medium wurden wieder entnommen und der Vorgang noch zweimal wiederholt. Die Makrophagen wurden anschließend abzentrifugiert (Beckman, 1000UpM ohne Bremse, 5min, 4°C) und zweimal mit Normalmedium gewaschen. Die Makrophagen wurden in 125 ml Normalmedium aufgenommen, dabei wurden für eine Fusion mit PAIB₃ag81-Zellen Makrophagen von sechs Mäusen und für eine Fusion mit x63-Ag8.6538-Zellen Makrophagen von 10 Mäusen verwendet. Zum Klonieren wurden Makrophagen von einer Maus in 10 ml Normalmedium aufgenommen.

6.4.3.3 Test der Überstände

Die Überstände der einzelnen Vertiefungen wurden getestet, sobald Klone im Mikroskop sichtbar wurden und sich das Medium gelblich verfärbte. Die Antikörpermenge im Überstand ist dann hoch genug, um detektiert zu werden. Als erster Test wurde ein Enzymimmunoassay der einzelnen Überstände durchgeführt. Dazu wurden 100µl der Überstände eine Stunde in mit je 1µg gereinigtem Antigen beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper eingesetzt. Als Substrat diente p-Nitrophenyl-phosphat (Sigma Fast™ Tabletten, Sigma). Diese farblose Substanz wird durch die Phosphatasereaktion in gelbes p-Nitrophenol umgewandelt. Nach einer halben Stunde Reaktionsdauer wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Überstände, die zu einer Extinktion größer als 0,15 führten, wurden im Immunoblot getestet. Dafür wurden Nitrozellulosestreifen, auf die im SDS-Gel aufgetrenntes Gesamtproteinextrakt von CAP1- oder CAP2-Polypeptid exprimierenden *E. coli* Zellen aufgetrennt worden war, mit je 0,5ml der Überstände

überschichtet. Die Teststreifen wurden über Nacht mit den Überständen inkubiert, 3x 10 Minuten mit NCP-Puffer gewaschen und mit an alkalische Phosphatase gekoppeltem Ziege-anti-Maus Antikörper eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Streifen wieder in NCP-Puffer gewaschen und dann 5min in 0,1M Natriumcarbonatpuffer, pH 10,2, inkubiert, um das für die Enzymreaktion erforderliche alkalische Milieu herzustellen. Danach wurden die Filter 10min in einer Lösung des Substrats BCIP (BCIP/NBT Farbwentwicklersubstrat, Promega) geschwenkt und die Reaktion durch Überführen in Wasser gestoppt. Zellen von Überständen, die in diesem Test eine Bande korrekter Größe aufwiesen, wurden kloniert.

6.4.3.4 Klonierung

Zur Klonierung wurden die Zellen aufgewirbelt und mit Normalmedium verdünnt. Aus dieser Suspension wurden dann mit einer ausgezogenen Pasteurpipette kleine Tropfen in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Unter dem Mikroskop wurde festgestellt, welches der Löcher nur eine Zelle enthielt. Diese Vertiefungen wurden dann mit einer Makrophagensuspension in Normalmedium aufgefüllt und im Brutschrank ca. 10Tage inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Test der Einzelklone im Immunoblot. Klone, die ein positives Signal zeigten, wurden zunächst auf Costarplatten überimpft und anschließend in Gewebekulturflaschen überführt. Hierzu wurden zunächst 5ml, dann 15ml und 50ml Kulturen angezogen. Die 50ml Kulturen wurden zum Sammeln der Hybridomaüberstände verwendet (3 x wöchentlich). Die Zellen wurden hierbei durch Zentrifugation abgetrennt (Beckman, 1000UpM, 5min, 4°C) und die Überstände bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

6.4.3.5 Konservierung der Hybridomaklone

Zur Konservierung der einzelnen Klone wurden die Zellen einer dichtgewachsenen 50ml Kultur geerntet und in 5ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf sechs Einfrierröhrchen (2,2ml, Nunc) verteilt, die auf Eis gehalten wurden. Die Ampullen wurden dann in ein isolierendes Styroporbehältnis gestellt und für mindestens 24 Stunden in einer -80°C Gefriertruhe aufbewahrt. Das Styroporgefäß sorgt dabei für ein genügend langsames Absinken der Temperatur in der Zellsuspension. Nach mindestens einem Tag konnten die Zellen in ein Aufbewahrungsgefäß im Stickstofftank überführt werden.

Für die erneute Kultivierung eines eingefrorenen Hybridomaklons wurde eine Ampulle zügig im 37°C Wasserbad aufgetaut und der Inhalt in 10ml Normalmedium überführt. Nach Zentrifugation (1000UpM, 5min, 4°C) wurde das Medium abgegossen, die Zellen in 1ml Normalmedium aufgenommen und in einer Vertiefung einer Costarplatte im Brutschrank inkubiert.

Einfriermedium:
 70ml RPMI mit Hepes und L-Glutamin
 20ml fötales Kälberserum
 12ml DMSO
 1ml 10^{-3} M β -Mercaptoethanol (frisch angesetzt)

6.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Für die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese [Laemmli, 1970] wurden 8 bis 15%ige Trenngel in einer Größe von 7,5cm x 10cm x 0,05cm mit 5%igem Sammelgel (Tabelle1) verwendet. Zu den aufzutrennenden Proteinlösungen wurden je nach Bedarf unterschiedliche Mengen 5x SDS-Probenpuffer gegeben und die Mischung fünf Minuten gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei einer Spannung zwischen 100 und 190V. Als Standard diente ein Gemisch von Proteinen definierter Molekülmassen. Nach der Elektrophorese werden die Proteine entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder durch Western-Blot auf Nitrocellulose übertragen.

Tabelle1: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele¹⁾

	Trenngel				Sammelgel
	8%	10%	12%	15%	5%
Acrylamid 30:0,8 ²⁾ [ml]:	15,8	19,7	23,6	30	3,4
H ₂ O [ml]:	27,4	23,5	19,6	13,2	14,3
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 [ml]:	16	16	16	16	2
10% SDS [μ l]:	590	590	590	590	200
TEMED [μ l]:	23	23	23	23	8
10% APS [μ l]:	165	165	165	165	80

1) Mengenangaben für 12 Minigele; 2) Acrylamid : Bisacrylamid

5x SDS-Probenpuffer:
 2,5ml 1M Tris/HCl, pH 6,5
 4,0ml 10% SDS
 2,0ml Glycerin
 1,0ml 14,3M β -Mercaptoethanol
 200 μ l 10% Bromphenolblau-Lösung

10x SDS-PAGE-Laufpuffer:
 0,25M Tris
 1,9M Glycin
 1% SDS

Molekülmassenstandards:

LMW-Marker (Pharmacia) [Da]: 94.000; 67.000; 43.000; 30.000; 20.100; 14.400

6.4.5 Western-Blot-Analyse

Proteine mit einem Molekulargewicht wurden mit Hilfe des Semi-Dry-Transfer-Verfahrens auf Membranen übertragen. Der Transfer erfolgte für 60min bei 10V.

Western-Transfer-Puffer: 25mM Tris/HCl (pH 8,5)
 190mM Glycin
 10% Methanol oder Ethanol
 0,02% SDS

6.4.6 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Membranen

Nitrocellulose-Membranen wurden nach dem Protein-Transfer für mindestens zwei Stunden mit 10% Magermilchpulver in NCP-Puffer abgesättigt. Danach wurden sie mit Antikörperlösungen für 1-16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünfmal je 10min mit NCP-Puffer gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation der Nitrocellulose-Filter mit dem sekundären Antikörper (1:10.000 in NCP-Puffer verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Rahmen dieser Arbeit handelte es sich stets um einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper. Nicht gebundene Antikörper werden anschließend 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 430nm führt. Dies verursacht die Schwärzung eines Röntgenfilms. Die Membran wurde 2-3min in der Luminollösung inkubiert und ein Röntgenfilm für fünf Sekunden bis dreißig Minuten exponiert.

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

6.4.7 Proteinfärbung

Coomassie-Blau-Färbung:

Minigele (7,5cm x 10cm x 0,5cm) wurden mindestens 15 Minuten in Färbelösung geschüttelt. Nicht gebundener Farbstoff wurde anschließend durch Schütteln in einer Entfärberlösung ausgewaschen.

<u>Färbelösung:</u>	<u>Entfärber:</u>
0,1 % Coomassie-Brilliant-Blau R 250	10 % Ethanol
50 % Methanol	7 % Essigsäure
10 % Essigsäure	
vor Gebrauch filtrieren.	

Ponceau-Färbung von Proteinen auf Membranen:

Die Nitrocellulose-Filter wurden nach beendetem Protein-Transfer für eine Minute in der Färbelösung inkubiert und anschließend kurz in Wasser geschüttelt, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Die Entfärbung erfolgte durch kurzes Waschen mit Wasser, gefolgt von Inkubation mit NCP-Puffer.

Färbelösung:

2g Ponceau S-Farbstoff gelöst in
100ml 3%iger Trichloressigsäure

6.4.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

6.4.8.1 Proteinbestimmung nach Bradford [Bradford, 1976]

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

6.4.9 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der BCA Methode [Smith et al., 1985]

Diese Methode erlaubt es Proteinbestimmungen in Gegenwart von Detergenzien durchzuführen. 10µl Probenlösung wurden mit 1ml BCA Reagenz versetzt und 30min, bei 60°C inkubiert. Die Extinktion von 562nm wurde anschließend photometrisch bestimmt. Zur Erstellung einer Eichkurve wird BSA als Standard verwendet.

BCA Reagenz (Pierce):

Lösung A und Lösung B

Zum Gebrauch wurden 1 Teil Lösung B und 50 Teile Lösung A gemischt.

6.4.10 Bestimmung des relativen F-Aktingehaltes von Zellen [Hall et al., 1988]

Die Methode beruht auf der spezifischen Bindung von Phalloidin an F-Aktin. Je 10^5 Zellen wurden 12h vor Versuchsbeginn, pro Vertiefung in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät. Alle Puffer wurden vor Gebrauch auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 250 μ l Lysis Puffer, für 10min, bei 4°C lysiert. Das Lysat wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß mit 750 μ l vorgelegter Stopp-Lösung überführt. Die Vertiefung wurde zweimal mit 250 μ l Lysis Puffer ausgewaschen, die Lösung wurde zum Lysat hinzugefügt. Anschließend wurde 1h bei 4°C inkubiert und danach 5min bei 13.000x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1ml Stopp-Lösung, ohne TRITC-Phalloidin gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1ml Methanol aufgenommen und 20h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde nochmals zentrifugiert und die Fluoreszenz des Überstandes im Spektrofluorimeter bei 540/575nm gemessen.

Parallel hierzu wurde die Proteinkonzentration von Zelllysaten bestimmt. Hierzu wurden die Zellen einer Vertiefung zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1ml 1% SDS lysiert. Die Vertiefung wurde noch einmal mit 1ml 1%SDS ausgewaschen, die Lösung wurde mit dem Lysat vereinigt. Die Proteinkonzentration wurde anschließend nach der BCA Methode bestimmt. Um den relativen F-Aktingehalt zu errechnen wurde die Fluoreszenz auf den Proteingehalt normalisiert.

Lysis Puffer:

0,1% Triton X-100

20mM KPO₄

10mM PIPES

5mM EGTA

2mM MgCl₂

1mM PMSF

Der pH wurde auf 6,8 eingestellt.

Das PMSF wurde kurz vor Gebrauch zugefügt.

Stopp Puffer:

0,1% Triton X-100

20mM KPO₄

10mM PIPES

5mM EGTA

2mM MgCl₂

1mM PMSF

Der pH wurde auf 6,8 eingestellt

Es wurden Formaldehyd ad 7,4 % und TRITC-Phalloidin ad 50 μ M zugefügt

Das PMSF wurde kurz vor Gebrauch Zugefügt.

6.4.11 Gelfiltrationsexperimente [Didichenko et al., 2000]

Eine Zellkulturschale ($\varnothing=10\text{cm}$) konfluent wachsender HEK/293 Zellen wurde zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurde anschließend in 0,2ml eiskaltem Relaxationspuffer aufgenommen und 5min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 5 mal mit bei 50% Amplitudenstärke auf Eis sonifiziert. Das Lysat wurde 10min bei 10.000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und anschließend für 15min bei 100.000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Die Gelfiltration erfolgte in Relaxationspuffer mit der Superdex200PC3.2/30 Chromatographiesäule am SMART® Chromatographie-System. Hierzu wurden die zytosolischen Extrakte nochmals für 5min bei 100.000xg zentrifugiert. Die Säule wurde mit 50 μl Überstand beladen. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit folgenden Markerproteinen: Thyroglobulin (669kDa), Ferritin 440 kDa, humanem IgG (158kDa), BSA (67kDa), Ovalbumin (45kDa) und RibonukleaseA (13kDa).

Relaxationspuffer:

100mM KCl
3mM NaCl
3,5mM MgCl₂
10mM PIPES
1mM DTT
1mM PMSF

Der pH wurde mit KOH auf 7,3 eingestellt.

Kurz vor Gebrauch wurde noch 1 Tablette Complete® Inhibitoren Cocktail pro 10ml Puffer hinzugegeben.

6.4.12 Immunpräzipitationen aus HEK Zellysaten mit anti-GFP Antikörper

Zur Kopplung wurden 3ml anti-GFP Antikörper Lösung (Hybridoma Überstand von K3-182-2) mit 100 μl in PBS äquilibrierten Protein A Sepharose Kügelchen versetzt und für 1h bei 4°C leicht bewegt. Die Kügelchen wurden anschließend viermal mit 10ml RIPA Puffer gewaschen und in 100 μl RIPA Puffer aufgenommen. Eine Zellkulturschale ($\varnothing=10\text{cm}$) konfluent wachsender HEK/293 Zellen wurde zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1ml kaltem PBS abgeschabt und bei 720x g und 4°C für 30sek. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml eiskaltem RIPA Puffer aufgenommen und 5' auf Eis lysiert. Das Lysat wurde anschließend bei 10.000x g und 4°C für 5min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 100.000x g und 4°C für 10min. zentrifugiert. Der

Überstand wurde mit 100µl in RIPA Puffer äquilibrierten Protein A Sepharose Kügelchen versetzt und für 1h bei 4°C leicht bewegt.

Anschließend wurde bei 10.000x g und 4°C für 5min. zentrifugiert, das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde mit 30µl an Protein A Sepharose Kügelchen gekoppeltem monoklonalem anti-GFP Antikörper versetzt und für 1h bei 4°C leicht bewegt.

Anschließend wurde 30sek. zentrifugiert und das Pellet mit 1ml RIPA Puffer für 5min bei 4°C und leichter Bewegung gewaschen. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt. Danach wurde zentrifugiert und das Pellet in 30µl SDS Probenpuffer aufgenommen und 5min gekocht. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

RIPA Puffer:

150mM	NaCl
1%	NP40
0,5%	Natrium-Deoxycholat
0,1%	SDS
50mM	TRIS/Cl, pH 8

Kurz vor Gebrauch wurde noch 1 Tablette Complete® Inhibitoren Cocktail pro 10ml Puffer hinzugegeben. Weiterhin wurden PMSF zu 1mM und Natriumorthovanadat zu 50µM Endkonzentration hinzugegeben.

6.4.13 Fraktionierung von HEK Zellen in Triton X-100 lösliche und unlösliche Fraktion, verändert nach Ko et al. [Ko et al., 2001]

Zu je einer 10cm Zellkulturschale mit HEK Zellen wurde 1ml eiskaltes Triton /PBS hinzugegeben, und die Zellen abgeschabt. Die Zellen wurden 10min auf Eis lysiert, anschließend wurde 10min bei 10.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit SDS Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde zweimal mit Triton/PBS gewaschen und nach einer abschließenden Zentrifugation in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Triton/PBS:

0,5% Triton X-100
5mM EDTA
1mM PMSF
in PBS

6.4.14 Fraktionierung von HEK Zellen in Membran-, Kern- und Zytosol-Fraktion [Jugloff und Jongstra-Bilen, 1997]

10⁷ HEK Zellen in eine 10cm Kulturschale ausgesät. Die Zellen wurde abgeschabt und in Homogenisations Puffer aufgenommen, anschließend wurden sie mit Hilfe eines „Dounce

Homogenisators“ (10 Stöße) aufgeschlossen. Das Homogenat wurde bei 13.000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit Homogenisationspuffer gewaschen und als Kernfraktion in Probenpuffer aufgenommen. Der Überstand wurde abgenommen und bei 100.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde als zytoplasmatische Fraktion in Probenpuffer aufgenommen. Das Pellet wurde einmal mit Homogenisationspuffer gewaschen und als Membranfraktion in Probenpuffer aufgenommen.

Homogenisationspuffer:

137mM NaCl

1mM MgCl₂

10% Glyzerin

20mM Tris

Der pH wurde mit HCl auf 8 eingestellt

Kurz vor Gebrauch wurde PMSF zu einer Endkonzentration von 1mM hinzugegeben.

6.5 Konstruktion von Vektoren

6.5.1 Klonierung der CAP1 und CAP2 cDNA

pGEM-CAP1:

Das Plasmid enthält die komplette kodierende Region der CAP1 cDNA (EMBL Datenbank-Zugangsnummer L12367).

cDNA aus C3H10T1/3 Fibroblasten wurde für eine Standard PCR mit 30 Zyklen verwendet. Mit Hilfe der Oligonukleotide BH1CAP3 und BH1CAP5 wurde die komplette kodierende Region der CAP1 cDNA amplifiziert. Das Amplifikationsprodukt wurde in pGEM-Teasy ligiert und anschließend sequenziert.

pGEM-CAP2:

cDNA aus Maus Herzgewebe wurde für eine Standard PCR mit 35 Zyklen verwendet. Mit Hilfe der Oligonukleotide BgIMCAPII3 und BgIMCAPII5 wurde die komplette kodierende Region der CAP2 cDNA amplifiziert. Das Amplifikationsprodukt wurde in pGEM-Teasy ligiert und anschließend sequenziert. Zur Feststellung der Sequenzintegrität wurden zwei unabhängig von einander hergestellte Klone miteinander verglichen.

pBS-CAP1

Dieses Plasmid enthält die Komplette kodierende Region der CAP1 cDNA.

pGEM-CAP1 wurde mit BamHI gespalten und das Fragment isoliert. Das Fragment wurde in mit BamHI gespaltenen pBluescrip KS II ligiert.

6.5.2 Herstellung von CAP1 und CAP2 Expressionsplasmiden für die Expression in *E. coli*

Zur Expression in *E. coli* wurden Expressionsplasmide für CAP1 und CAP2 hergestellt

pT7-CAP1:

Dieses Plasmid kodiert für das CAP1 Volllängenprotein.

pGEM-CAP1 wurde mit BamHI gespalten und das Fragment isoliert. Das Fragment wurde in mit BamHI gespaltenen pT7-7 [Tabor, 1990] ligiert.

pQE-CAP2-2:

Dieses Plasmid kodiert für die ersten 206 Aminosäurereste von CAP2, fusioniert an einen Amioterminal gelegenen „6xHis-Tag“

pGEM-CAP2 wurde mit BglII und StuI gespalten und das Fragment isoliert. pQE30 wurde mit BamHI und SmaI geschnitten und aufgereinigt. Fragment und gereinigter Vektor wurden ligiert.

6.5.3 Herstellung von CAP1 und CAP2 Expressionskonstrukten auf Basis der pEGFP Vektoren

CAP1

Zur Studie der Subzellulären Lokalisation von CAP1 in Säugerzellen wurden verschiedenen Bereiche des kodierenden Bereichs der CAP1 cDNA in den pEGFP-C1 Expressions-Vektor (Clontech) kloniert. Alle Vektoren wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen und Sequenzierungsreaktionen getestet. Alle Angaben von Nukleotidnummern beziehen sich auf die Sequenz der EMBL Zugangsnummer L12367.

pEGFP-CAP1:

Dieses Plasmid kodiert für das CAP1 Volllängenprotein, fusioniert an EGFP (EGFP-CAP1).

pGEM-CAP1 wurde mit BamHI gespalten und das Fragment isoliert. pEGFP-C1 wurde mit BamHI gespalten und gereinigt. Fragment und der gespaltene Vektor wurden ligiert.

pEGFP-CAP1-P:

Dieses Plasmid kodiert für das CAP1 Volllängenprotein ohne den Prolin-reichen Bereich (AS 229-240) EGFP-CAP1-P.

pGEM-CAP1 wurde in zwei Standard PCRs mit 20 Zyklen verwendet. Ein Amplifikationsprodukt wurde mit Hilfe der Oligonukleotide MutI5 und OvMutI3, ein zweites Amplifikationsprodukt mit Hilfe der Oligonukleotide MuII5 und MutII3b generiert. Diese Produkte wurden in einer dritten Standard PCR mit den Oligonukleotiden MutI5 und MutII3b zu einem DNA Strang verbunden. Das Amplifikationsprodukt wurde in pGEMTeasy subkloniert. Die mutierte cDNA wurde mit HindIII und PstI ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurde pBS-CAP1 mit HindIII und PstI gespalten, der Vektor gereinigt, die mutierte cDNA wurde in den gespaltenen, aufgereinigten Vektor ligiert und ergab pBS-CAP1-P. pBS-CAP1-P wurde mit BamHI gespalten und das Fragment in mit BamHI gespaltenen pEGFP-C1 Vektor ligiert.

pEGFP-CAP1-N1:

Kodiert für die Aminoterminalen 228 Aminosäuren von CAP1 fusioniert an EGFP (EGFP-CAP1-N1).

pGEM-CAP1 wurde in einer Standard PCR mit 20 Zyklen verwendet. Mit Hilfe der Oligonukleotide BHICAP5 und 748MCAP3 wurden die Nukleotide 1-748 amplifiziert. Das Amplifikationsprodukt wurde in pGEMTeasy subkloniert. Aus pGEMTeasy wurde der cDNA Teil mit Hilfe von BamHI und PstI isoliert in, mit BamHI und Pst I gespaltenen pEGFP-C1 kloniert.

pEGFP-CAP1-N2

Kodiert für die Aminoterminalen 240 Aminosäuren von CAP1 fusioniert an EGFP (EGFP-CAP1-N2) pGEM-CAP1 wurde in einer Standard PCR mit 20 Zyklen verwendet. Mit Hilfe der Oligonukleotide BHICAP5 und 788MCAP3 wurden die Nukleotide 1-788 der kodierenden Region amplifiziert. Die überhängenden Enden des Amplifikationsprodukts wurden aufgefüllt, anschließend wurde das Amplifikationsprodukt mit BamHI gespalten und aufgereinigt. pEGFP-C1 wurde mit XbaI gespalten und die Überhängenden Ende aufgefüllt. Anschließend wurde mit BamHI gespalten. Der Vektor wurde gereinigt und mit dem gereinigten Amplifikationsprodukt ligiert.

pEGFP-CAP1-C1:

Kodiert für den Carboxyterminus von CAP1 ohne Prolin-reichen Bereich (AS 241-474)

pGEM-CAP1 wurde in einer Standard PCR mit 20 Zyklen verwendet. Mit Hilfe der Oligonukleotide BHICAP3 und HIII785MCAP5 wurden die Nukleotide 788-1487 amplifiziert. Das Amplifikationsprodukt wurde in pGEMTeasy subkloniert. pEGFP-CAP1 wurde mit HindIII gespalten und der Vektor aufgereinigt. Aus pGemTeasy wurde der cDNA Teil mit Hilfe von HindIII isoliert. Das Fragment wurde mit gereinigtem, mit HindIII gespaltenem pEGFP-CAP1 Vektor ligiert.

pEGFP-CAP1-C1:

Kodiert für den Carboxyterminus von CAP1 mit Prolin-reichem Bereich (AS 229-474)

pGEM-CAP1 wurde in einer Standard PCR mit 20 Zyklen verwendet. Mit Hilfe der Oligonukleotide BHICAP3 und HIII749MCAP5 wurden die Nukleotide 749-1487 amplifiziert. Das Amplifikationsprodukt wurde in pGEMTeasy subkloniert. pEGFP-CAP1 wurde mit HindIII gespalten und der Vektor aufgereinigt. Aus pGemTeasy wurde der cDNA Teil mit Hilfe von HindIII isoliert. Das Fragment wurde mit gereinigtem, mit HindIII gespaltenem pEGFP-CAP1 Vektor ligiert.

CAP2

Zur Studie der Subzellulären Lokalisation von CAP2 in Säugerzellen wurden verschiedene Bereiche des kodierenden Bereichs der CAP1 cDNA in den pEGFP-C1, bzw. pEGFP-N3 Expressions-Vektor (Clontech) kloniert. Alle Vektoren wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen und Sequenzierungsreaktionen getestet.

pEGFP-CAP2:

Dieses Plasmid kodiert für das CAP2 Volllängenprotein, fusioniert an EGFP (EGFP-CAP2).

pGEM-CAP2 wurde mit BglII gespalten und das Fragment isoliert. pEGFP-C1 wurde mit BglII gespalten und gereinigt. Fragment und der gespaltene Vektor wurden ligiert.

pEGFP-CAP2-1:

Dieses Plasmid kodiert für die ersten 48 Aminosäurereste von CAP2, fusioniert an EGFP (EGFP-CAP2-1).

pGEM-CAP2 wurde mit BglII und HindIII gespalten und ein ca. 150bp großes Fragment isoliert. pEGFP-C1 wurde mit BglII und HindIII gespalten und aufgereinigt. Fragment und gereinigter Vektor wurden ligiert.

pEGFP-CAP2-2:

Dieses Plasmid kodiert für die ersten 206 Aminosäurereste von CAP2, fusioniert an EGFP (EGFP-CAP2-2).

pGEM-CAP2 wurde mit BglII und StuI gespalten und ein ca. 600bp großes Fragment isoliert. pEGFP-N3 wurde mit BglII und SmaI gespalten und aufgereinigt. Fragment und gereinigter Vektor wurden ligiert.

pEGFP-CAP2-3:

Dieses Plasmid kodiert für die ersten 316 Aminosäurereste von CAP2, fusioniert an EGFP (EGFP-CAP2-3).

pGEM-CAP2 wurde mit BglII und EcoRI gespalten und ein ca. 800bp großes Fragment isoliert. pEGFP-C1 wurde mit BglII und EcoRI gespalten und aufgereinigt. Fragment und gereinigter Vektor wurden ligiert.

7 Literatur

- A.A.Fedorov, T.Dodatko, D.A.Roswarski, S.C.Almo (2002): C-Terminal Domain Of Cyclase Associated Protein With Pro 505 Replaced By Ser (P505s) MMDB Id#[18593](#).
- Amos LAuA, W. B. (1991): "Molecules of the cytoskeleton." London.: Macmillan Education.
- Bahn YS, Sundstrom P (2001): CAP1, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 183:3211-23.
- Barrero RA, Umeda M, Yamamura S, Uchimiya H (2002): Arabidopsis CAP Regulates the Actin Cytoskeleton Necessary for Plant Cell Elongation and Division. *Plant Cell* 14:149-63.
- Baum B, Li W, Perrimon N (2000): A cyclase-associated protein regulates actin and cell polarity during *Drosophila* oogenesis and in yeast. *Curr Biol* 10:964-73.
- Baum B, Perrimon N (2001): Spatial control of the actin cytoskeleton in *Drosophila* epithelial cells. *Nat Cell Biol* 3:883-90.
- Benlali A, Draskovic I, Hazelett DJ, Treisman JE (2000): act up controls actin polymerization to alter cell shape and restrict Hedgehog signaling in the *Drosophila* eye disc. *Cell* 101:271-81.
- Bershadsky AD, Vasiliev JM (1988): "Cytoskeleton." New York, London: Plenum Press. New York, London.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999): Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294:1351-62.
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Cantrell DA (2001): Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 114:1439-45.
- Carlier MF, Pantaloni D (1994): Actin assembly in response to extracellular signals: role of capping proteins, thymosin beta 4 and profilin. *Semin Cell Biol* 5:183-91.
- Carlier MF, Pantaloni D (1997): Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* 269:459-67.

- Casella JF, Maack DJ, Lin S (1986): Purification and initial characterization of a protein from skeletal muscle that caps the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem* 261:10915-21.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9.
- Didichenko SA, Segal AW, Thelen M (2000): Evidence for a pool of coronin in mammalian cells that is sensitive to PI 3-kinase. *FEBS Lett* 485:147-52.
- Eddy RJ, Han J, Sauterer RA, Condeelis JS (1996): A major agonist-regulated capping activity in Dictyostelium is due to the capping protein, cap32/34. *Biochim Biophys Acta* 1314:247-59.
- Eichinger L, Lee SS, Schleicher M (1999): Dictyostelium as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech* 47:124-34.
- Fedor-Chaikin M, Deschenes RJ, Broach JR (1990): SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast. *Cell* 61:329-40.
- Fenger U, Hofmann M, Galliot B, Schaller HC (1994): The role of the cAMP pathway in mediating the effect of head activator on nerve-cell determination and differentiation in hydra. *Mech Dev* 47:115-25.
- Field J, Vojtek A, Ballester R, Bolger G, Colicelli J, Ferguson K, Gerst J, Kataoka T, Michaeli T, Powers S, et al. (1990): Cloning and characterization of CAP, the *S. cerevisiae* gene encoding the 70 kd adenylate cyclase-associated protein. *Cell* 61:319-27.
- Franke (1993): The intermediate filaments. In Kreis T, Vale R (eds): "*Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins*." Oxford:, pp 137-144.
- Freeman NL, Chen Z, Horenstein J, Weber A, Field J (1995): An actin monomer binding activity localizes to the carboxyl-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein. *J Biol Chem* 270:5680-5.
- Freeman NL, Field J (2000): Mammalian homolog of the yeast cyclase associated protein, CAP/Srv2p, regulates actin filament assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* 45:106-20.
- Freeman NL, Lila T, Mintzer KA, Chen Z, Pahk AJ, Ren R, Drubin DG, Field J (1996): A conserved proline-rich region of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein binds SH3 domains and modulates cytoskeletal localization. *Mol Cell Biol* 16:548-56.

- Gaertner A, Ruhnau K, Schroer E, Selve N, Wanger M, Wegner A (1989): Probing nucleation, cutting and capping of actin filaments. *J Muscle Res Cell Motil* 10:1-9.
- Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C, Desjardins M (2001): The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152:165-80.
- Gerst JE, Ferguson K, Vojtek A, Wigler M, Field J (1991): CAP is a bifunctional component of the *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase complex. *Mol Cell Biol* 11:1248-57.
- Gerst JE, Rodgers L, Riggs M, Wigler M (1992): SNC1, a yeast homolog of the synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin gene family: genetic interactions with the RAS and CAP genes [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Aug 1;89(15):7287]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4338-42.
- Gieselmann R, Mann K (1992): ASP-56, a new actin sequestering protein from pig platelets with homology to CAP, an adenylyl cyclase-associated protein from yeast. *FEBS Lett* 298:149-53.
- Goldschmidt-Clermont PJ, Janmey PA (1991): Profilin, a weak CAP for actin and RAS. *Cell* 66:419-21.
- Gottwald U, Brokamp R, Karakesisoglou I, Schleicher M, Noegel AA (1996): Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in *Dictyostelium discoideum* and characterization of its interaction with actin. *Mol Biol Cell* 7:261-72.
- Hall AL, Schlein A, Condeelis J (1988): Relationship of pseudopod extension to chemotactic hormone-induced actin polymerization in amoeboid cells. *J Cell Biochem* 37:285-99.
- Hanahan D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-80.
- Higgs HN, Pollard TD (2001): Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* 70:649-76.
- Hubberstey A, Yu G, Loewith R, Lakusta C, Young D (1996): Mammalian CAP interacts with CAP, CAP2, and actin. *J Cell Biochem* 61:459-66.
- Hubberstey AV, Mottillo EP (2002): Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. *Faseb J* 16:487-99.
- Huxley HE (1969): The mechanism of muscular contraction. *Science* 164:1356-65.

- Ishimaru Y, Yasuoka A, Asano-Miyoshi M, Abe K, Emori Y (2001): An actin-binding protein, CAP, is expressed in a subset of rat taste bud cells. *Neuroreport* 12:233-5.
- Jasin M, de Villiers J, Weber F, Schaffner W (1985): High frequency of homologous recombination in mammalian cells between endogenous and introduced SV40 genomes. *Cell* 43:695-703.
- Jugloff LS, Jongstra-Bilen J (1997): Cross-linking of the IgM receptor induces rapid translocation of IgM-associated Ig alpha, Lyn, and Syk tyrosine kinases to the membrane skeleton. *J Immunol* 159:1096-106.
- Kawai M, Aotsuka S, Uchimiya H (1998): Isolation of a cotton CAP gene: a homologue of adenylyl cyclase-associated protein highly expressed during fiber elongation. *Plant Cell Physiol* 39:1380-3.
- Kawamukai M, Gerst J, Field J, Riggs M, Rodgers L, Wigler M, Young D (1992): Genetic and biochemical analysis of the adenylyl cyclase-associated protein, cap, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 3:167-80.
- Ko KS, Arora PD, Bhide V, Chen A, McCulloch CA (2001): Cell-cell adhesion in human fibroblasts requires calcium signaling. *J Cell Sci* 114:1155-67.
- Kohler G, Milstein C (1976): Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 6:511-9.
- Kozak M (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15:8125-48.
- Kreis, eds. (1993): "*Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins.*" Oxford:
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H (1977): RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16:4743-51.
- Ludin B, Matus A (1998): GFP illuminates the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 8:72-7.
- Matviw H, Yu G, Young D (1992): Identification of a human cDNA encoding a protein that is structurally and functionally related to the yeast adenylyl cyclase-associated CAP proteins. *Mol Cell Biol* 12:5033-40.
- McCormack EA, Rohman MJ, Willison KR (2001): Mutational screen identifies critical amino acid residues of beta-actin mediating interaction between its folding intermediates and eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *J Struct Biol* 135:185-97.

- Mintzer KA, Field J (1994): Interactions between adenylyl cyclase, CAP and RAS from *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Signal* 6:681-94.
- Nishida Y, Shima F, Sen H, Tanaka Y, Yanagihara C, Yamawaki-Kataoka Y, Kariya K, Kataoka T (1998): Coiled-coil interaction of N-terminal 36 residues of cyclase-associated protein with adenylyl cyclase is sufficient for its function in *Saccharomyces cerevisiae* ras pathway. *J Biol Chem* 273:28019-24.
- Noegel AA, Rivero F, Albrecht R, Janssen KP, Kohler J, Parent CA, Schleicher M (1999): Assessing the role of the ASP56/CAP homologue of *Dictyostelium discoideum* and the requirements for subcellular localization. *J Cell Sci* 112:3195-203.
- Paunola E, Mattila PK, Lappalainen P (2002): WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett* 513:92-7.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8392-6.
- Pollard TD, Cooper JA (1986): Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem* 55:987-1035.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-33.
- Rivero F, Kuspa A, Brokamp R, Matzner M, Noegel AA (1998): Interaptin, an actin-binding protein of the alpha-actinin superfamily in *Dictyostelium discoideum*, is developmentally and cAMP-regulated and associates with intracellular membrane compartments. *J Cell Biol* 142:735-50.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): "Molecular Cloning. A laboratory Manual." New York: Cold Spring Harbour Press.
- Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD (1988): Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* 16:7583-600.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Sohn RH, Goldschmidt-Clermont PJ (1994): Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays* 16:465-72.
- Stevenson VA, Theurkauf WE (2000): Actin cytoskeleton: putting a CAP on actin polymerization. *Curr Biol* 10:R695-7.

- Stossel TP, Chaponnier C, Ezzell RM, Hartwig JH, Janmey PA, Kwiatkowski DJ, Lind SE, Smith DB, Southwick FS, Yin HL, et al. (1985): Nonmuscle actin-binding proteins. *Annu Rev Cell Biol* 1:353-402.
- Studier FW, Moffatt BA (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-30.
- Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K (1981): Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:6613-7.
- Swiston J, Hubberstey A, Yu G, Young D (1995): Differential expression of CAP and CAP2 in adult rat tissues. *Gene* 165:273-7.
- Tabor S (1990): Expression using the T7 RNA polymerase system. In Wang YL, Taylor DL (eds): "Methods in Cell Biology." New York.: Academic Press Inc., pp 137-151.
- Takenawa T, Itoh T (2001): Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1533:190-206.
- Theriot JA, Mitchison TJ (1993): The three faces of profilin. *Cell* 75:835-8.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994): A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4- morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-8.
- Vojtek A, Haarer B, Field J, Gerst J, Pollard TD, Brown S, Wigler M (1991): Evidence for a functional link between profilin and CAP in the yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 66:497-505.
- Vojtek AB, Cooper JA (1993): Identification and characterization of a cDNA encoding mouse CAP: a homolog of the yeast adenylyl cyclase associated protein. *J Cell Sci* 105:777-85.
- Wang J, Suzuki N, Kataoka T (1992): The 70-kilodalton adenylyl cyclase-associated protein is not essential for interaction of *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase with RAS proteins. *Mol Cell Biol* 12:4937-45.
- Wang J, Suzuki N, Nishida Y, Kataoka T (1993): Analysis of the function of the 70-kilodalton cyclase-associated protein (CAP) by using mutants of yeast adenylyl cyclase defective in CAP binding. *Mol Cell Biol* 13:4087-97.
- Weber A, Pennise CR, Babcock GG, Fowler VM (1994): Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments. *J Cell Biol* 127:1627-35.

- Wegner A, 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 U S A* 80:4922-5.
- Weiner OH, Murphy J, Griffiths G, Schleicher M, Noegel AA (1993): The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 123:23-34.
- Wesp A, Hicke L, Palecek J, Lombardi R, Aust T, Munn AL, Riezman H (1997): End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 8:2291-306.
- Wulf E, Deboben A, Bautz FA, Faulstich H, Wieland T (1979): Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4498-502.
- Yu G, Swiston J, Young D (1994): Comparison of human CAP and CAP2, homologs of the yeast adenylyl cyclase-associated proteins. *J Cell Sci* 107:1671-8.
- Yu J, Wang C, Palmieri SJ, Haarer BK, Field J (1999): A cytoskeletal localizing domain in the cyclase-associated protein, CAP/Srv2p, regulates access to a distant SH3-binding site. *J Biol Chem* 274:19985-91.
- Zelicof A, Gatica J, Gerst JE (1993): Molecular cloning and characterization of a rat homolog of CAP, the adenylyl cyclase-associated protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268:13448-53.
- Zelicof A, Protopopov V, David D, Lin XY, Lustgarten V, Gerst JE (1996): Two separate functions are encoded by the carboxyl-terminal domains of the yeast cyclase-associated protein and its mammalian homologs. Dimerization and actin binding. *J Biol Chem* 271:18243-52.
- Zhou GL, Miyazaki Y, Nakagawa T, Tanaka K, Shishido K, Matsuda H, Kawamukai M (1998): Identification of a CAP (adenylyl-cyclase-associated protein) homologous gene in *Lentinus edodes* and its functional complementation of yeast CAP mutants. *Microbiology* 144:1085-93.
- Zigmond SH (1989): Cell locomotion and chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol* 1:80-6.
- Zigmond SH (1996): Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol* 8:66-73.
- Zigmond SH (2000): How WASP regulates actin polymerization. *J Cell Biol* 150:117-20.

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.

Köln den

Michael Leichter

Danksagungen

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

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

Für die freundliche Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen Mitarbeitern, besonders von Labor 14 bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben, allen meinen Freunden und allen die ein offenes Ohr für mich hatten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Leichter, Michael
Anschrift: Eythstr.4
51103 Köln

Geburtsdatum: 24.11.1971
Geburtsort: Opladen, jetzt Leverkusen
Staatsangehörigkeit: Deutscher
Familienstand: ledig
Eltern: Rudolf Leichter, Hildegard Leichter (geb. Kleba)

Schulbildung

1978-1982 Gemeinschaftsgrundschule Bergisch Neukirchen
1982-1983 Theodor Heuss Realschule, Opladen
1983-1991 Marienschule zu Opladen
1991 Abitur

Zivildienst

August 1991-Oktob 1992 Zivildienst

Hochschulbildung

Oktober 1992 Beginn des Biologiestudiums an der Universität zu Köln
September 1994 Diplom-Biologie-Vorprüfung
Oktober 1996 Diplom-Biologie-Hauptprüfung
Dezember 1997 Diplomarbeit bei Priv. Doz Dr. Gerald Thiel
am Institut für Genetik der Mat. Nat. Fakultät der Universität zu Köln
„Untersuchungen zur Funktionsweise von REST,
einem Repressor neuronaler Gene

Juni 1999 –
Mai 2002 Dissertation bei Frau Prof. Dr. A. A. Noegel am Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Ziel der
Promotion an der Math. Nat. Fakultät der Universität zu Köln

Köln den, Michael Leichter