

# **Identifizierung und Charakterisierung von FIP, einem neuen Filamin-bindenden Protein**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Monika Knuth**

aus Leverkusen

2001

Berichterstatter:

Frau Prof. Dr. A. A. Noegel

Herr Prof. Dr. R. Krämer

Tag der mündlichen Prüfung:

21. Mai 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1997 bis November 2000 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel am Biochemischen Institut I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.

**Meinen Eltern in Dankbarkeit**

**Für Frank**

## Abkürzungsverzeichnis

<sup>32</sup> P	radioaktives Phosphoratom
A	Adenin
AA	Acrylamid
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure(n)
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
bp	Basenpaar(e)
Bq	Becquerel
BSA	Rindersrumalbumin
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA (revers von RNA transkribierte DNA)
cfu	engl.: colony forming unit
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FIP	Filamin-interagierendes Protein
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Hs	Homo sapiens
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kB	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
<i>K. aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
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
Pfu	engl.: plaque forming units
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T	Thymidin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
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- $\beta$ -D-galactopyranosid

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

## Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.	Das Zytoskelett.....	1
2.	Aktin und Aktin-bindende Proteine .....	2
3.	Die Filamine und ihre Bindungspartner.....	4
4.	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus .....	9
5.	Zielsetzung der Arbeit .....	10
<b>B</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>11</b>
1.	Identifizierung von Bindungspartnern des <i>Dictyostelium discoideum</i> Filamins mit dem Hefe „Two-Hybrid“ System.....	11
1.1.	Grundlagen des Hefe „Two-Hybrid“ Systems.....	11
1.2.	„Two-Hybrid“ cDNA-Bank Durchmusterung.....	13
1.3.	Expression des GAL4-DNA-Bindedomäne-Rod 1-6 Fusionsproteins .....	13
1.4.	Die „Two-Hybrid“ cDNA-Bibliotheken.....	14
1.5.	„Two-Hybrid“ cDNA-Bank Durchmusterung mit Filamin Rod 1-6 als Köderprotein .....	15
1.6.	Nachweis der Dimerisierung des Filamins über das „Two-Hybrid“ System .....	17
1.7.	Filamin interagiert mit einer unbekanntem Sequenz (Klon 2.618).....	18
2.	Charakterisierung des Filamin-interagierenden Proteins, FIP .....	19
2.1.	Analyse des FIP-Gens .....	19
2.2.	Nachweis FIP-spezifischer mRNA während der Entwicklung von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	21
2.3.	Charakterisierung von FIP .....	22
2.4.	Rekombinante Expression und Aufreinigung eines Teilstücks des FIP-Proteins .....	24
2.5.	Darstellung monoklonaler Antikörper gegen den exprimierten Teilbereich des Filamin-Interagierenden-Proteins .....	26
2.6.	Nachweis der Expression des FIP-Proteins während der Entwicklung von <i>D. discoideum</i> .....	28
2.7.	Intrazelluläre Lokalisation des Filamin-Interagierenden Proteins .....	30
3.	Untersuchung der Interaktion zwischen Filamin und FIP.....	32
3.1.	Eingrenzung der Bindungsdomänen zwischen Filamin und FIP durch das „Two-Hybrid“ System .....	32
3.2.	Verifizierung der Interaktion durch <i>in vitro</i> Untersuchungen .....	34
3.2.1.	Expression und Aufreinigung rekombinanter Teilstücke des Filamin-Proteins .....	35
3.2.2.	Nachweis der Interaktion zwischen Filamin und FIP durch Enzymimmunoassays .....	35
3.2.2.1.	Rekombinante FIP- und Filamin-Polypeptide binden in Enzymimmunoassays aneinander.....	36
3.2.2.2.	Filamin aus <i>Dictyostelium discoideum</i> Extrakten bindet an rekombinantes FIP-Polypeptid in Enzymimmunoassays .....	38
3.2.3.	Verifikation der Filamin-FIP-Interaktion durch „Blot-overlay“ Untersuchungen.....	39
3.2.3.1.	„Blot-overlay“ Studien mit rekombinanten FIP- und Filamin-Polypeptiden .....	39
3.2.3.2.	FIP-Polypeptid bindet an Filamin aus <i>Dictyostelium discoideum</i> Extrakten in „Blot-overlay“ Untersuchungen.....	40
3.2.4.	Verifikation der Interaktion zwischen Filamin und FIP durch Koimmunpräzipitationen mit rekombinanten Polypeptiden .....	42

4.	Untersuchungen einer GFP-cFIP-Fusionsprotein exprimierenden Zelllinie von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	43
4.1	Expression eines GFP-cFIP- Fusionsprotein in <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	43
4.2	Indirekte Immunfluoreszenzstudien von GFP-cFIP exprimierenden Zellen.....	46
4.3	Lokalisation des GFP-cFIP-Fusionsproteins bei chemischer Veränderung des Aktin-Zytoskeletts .....	48
4.3.1	Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin A .....	48
4.3.2	Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch 2,4-Dinitrophenol.....	50
4.4	Lokalisation des GFP-cFIP-Fusionsproteins bei Phagozytose und Exozytose fluoreszierender Hefen.....	52
4.5	GFP-cFIP exprimierende <i>Dictyostelium discoideum</i> Zellen zeigen Veränderungen im Entwicklungszyklus .....	53
<b>C</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
1.	Welche Funktionen besitzt Filamin in der Zelle? .....	57
2.	Funktionsanalysen durch Untersuchung der Bindepartner des Filamins .....	58
3.	Suche nach Bindungspartnern des <i>D. discoideum</i> Filamins .....	60
4.	Das Filamin-interagierende Protein, FIP .....	62
5.	Charakterisierung der Interaktion zwischen Filamin und FIP .....	65
<b>D</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>E</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>70</b>
1.	Material .....	70
1.1	Labormaterialien.....	70
1.2	Geräte .....	70
1.3	Kits.....	72
1.4	Enzyme, Antikörper und Inhibitoren.....	72
1.5	Chemikalien und Reagenzien.....	73
1.6	Vektoren.....	75
1.7	Oligonucleotide .....	75
1.8	Puffer und andere Lösungen.....	77
1.9	Medien .....	78
1.9.1	Medien für die <i>E. coli</i> -Kulturen [Sambroock <i>et al.</i> , 1989] .....	78
1.9.2	Medien für die <i>Dictyostelium discoideum</i> Kulturen.....	79
1.9.3	Medien für die Hefekulturen.....	79
1.10	Bakterien-, <i>D. discoideum</i> - und Hefestämme .....	81
2	Kultur von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	81
2.1	Anzucht in Flüssigmedium .....	81
2.2	Anzucht auf Agarplatten.....	82
2.3	Sporengewinnung und Konservierung.....	82
2.4	Einfrieren von <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	82
2.5	Entwicklung von <i>D. discoideum</i> in Suspensionskultur .....	83
2.6	Entwicklung von <i>D. discoideum</i> auf Phosphatagarplatten .....	83
3	Proteinchemische und immunologische Methoden.....	83
3.1	Expression und Reinigung der bakteriell exprimierten elongierten Domänen des Filamins .....	83
3.2	Expression und Reinigung eines bakteriell exprimierten Teilstücks des Filamin-Interagierenden-Proteins (FIP) .....	85
3.3	Herstellung monoklonaler Antikörper .....	85
3.3.1	Immunisierung von Mäusen.....	85
3.3.2	Fusion.....	86
3.3.3	Test der Überstände .....	88
3.3.4	Klonierung.....	88

3.3.5	Konservierung der Hybridomaklone .....	89
3.4	Aufreinigung monoklonaler Antikörper .....	89
3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) .....	90
3.6	„Western-Blot“ Analyse .....	91
3.7	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Membranen.....	91
3.8	Proteinfärbung.....	92
3.9	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	92
3.10	Enzymimmunoassays zum Nachweis der Interaktion zwischen Filamin und FIP.....	93
3.11	„Blot-Overlay“ Analyse .....	94
3.12	Koimmunpräzipitation rekombinanter Polypeptide.....	94
3.13	Aufschluß von <i>D. discoideum</i> -Zellen und Fraktionierung .....	95
3.14	Immunpräzipitation von Filamin und FIP aus <i>D. discoideum</i> Extrakten.....	96
4.	Zellbiologische Methoden.....	96
4.1	Indirekte Immunfluoreszenz von <i>D. discoideum</i> Zellen.....	96
4.2	Fluoreszenzuntersuchungen lebender GFP-cFIP exprimierender <i>D.</i> <i>discoideum</i> Zellen.....	98
4.3	Cytochalasin A Behandlung von <i>D. discoideum</i> Zellen.....	98
4.4	Behandlung von <i>D. discoideum</i> Zellen mit 2,4-Dinitrophenol.....	98
4.5	Phagozytose von fluoreszenzmarkierten Hefen.....	99
4.6	Fluoreszenzmikroskopie .....	99
5.	Molekularbiologische Methoden.....	100
5.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im Mikromaßstab .....	100
5.1.1	Boiling-Methode.....	100
5.1.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey- Nagel.....	100
5.2	Präparation chromosomaler DNA aus <i>D. discoideum</i> .....	101
5.3	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	102
5.4	Southern-Blot-Analyse.....	102
5.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>D. discoideum</i> .....	103
5.6	RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	104
5.7	Northern-Blot-Analyse.....	104
5.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	105
5.9	Radioaktive Markierung von DNA-Proben mit dem Stratagene Prime <sup>®</sup> It II- Kit.....	105
5.10	Nachweis mit radioaktiv markierten Sonden.....	106
5.11	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	106
5.12	<i>In vitro</i> -Rekombination von DNA .....	107
5.12.1	Verdau mit Restriktionsenzymen.....	107
5.12.2	Phosphatase-Behandlung.....	107
5.12.3	Überführung überstehender Enden in glatte Enden.....	107
5.12.4	Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten.....	108
5.13	Polymerase-Kettenreaktion.....	108
5.14	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	109
5.14.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation.....	109
5.14.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroporation.....	110
5.14.3	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen.....	110
5.15	Transformation von <i>D. discoideum</i> .....	110
5.16	Durchmusterung einer <i>D. discoideum</i> $\lambda$ ZAP Phagenbibliothek .....	111
5.16.1	Herstellung von XL1blue-Maltosezellen .....	111
5.16.2	Durchmusterung der Phagenbibliothek .....	111



---

5.17	Konstruktion von Vektoren.....	114
5.17.1	Konstruktion der Hefe-Expressionsvektoren pACT2/ FIP I-VII .....	114
5.17.2	Konstruktion der Hefe-Expressionsvektoren pAS2/Rod 1-6, /Rod 1+2, /Rod 1-3, /Rod 3-6, /Rod 3, /Rod 4 und Rod 5+6 .....	114
5.17.3	Konstruktion des Expressionsvektors pT7-7/FIP .....	115
6.	Methoden zum „Two-Hybrid“-System.....	116
6.1	Konvertieren der $\lambda$ -ACT Phagenbibliotheken in cDNA-Banken.....	116
6.1.1	Titerbestimmung der <i>D. discoideum</i> -Phagenbibliotheken.....	116
6.1.2	Amplifikation der <i>D. discoideum</i> -Phagenbibliotheken.....	116
6.1.3	<i>cre-lox</i> vermittelte Konvertierung der $\lambda$ -Bibliotheken in cDNA-Banken und Isolation der Plasmid-DNA .....	117
6.2	Transformation von Hefezellen .....	117
6.2.1	Modifizierte Lithiumacetat-Methode .....	117
6.2.2	Simultane Transformation zur Durchmusterung der cDNA-Banken.....	118
6.3	His <sup>+</sup> -Selektion der transformierten Hefezellen.....	119
6.4	$\beta$ -Glaktosidasetest der His <sup>+</sup> -Hefekolonien.....	119
6.5	Cycloheximid-Selektion.....	120
6.6	Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen.....	121
6.7	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA aus Hefezellen .....	121
6.8	Hefe-Dauerkulturen .....	122
6.9	Proteinextraktion aus Hefen.....	122
6.10	Sequenzanalyse der „Two-Hybrid“-Klone .....	123
<b>F</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>124</b>
<b>G</b>	<b>Summary</b> .....	<b>135</b>

# A Einleitung

---

## 1. Das Zytoskelett

Eukaryotische Zellen werden von filamentären Strukturen durchzogen, die an vielen elementaren Prozessen wie z.B. der Formgebung und der Bewegung von Zellen beteiligt sind. Die Gesamtheit der Filamente bildet das Zytoskelett. Die einzelnen Filamenttypen werden nach ihrem Durchmesser in Mikrofilamente, intermediäre Filamente und Mikrotubuli eingeteilt [Bershadsky und Vasiliev, 1988]. Obgleich die verschiedenen Filamente aus unterschiedlichen Proteinen aufgebaut sind, liegt ihnen ein gemeinsames Bauprinzip zugrunde, nämlich die Bildung durch die Polymerisation monomerer Proteine. Die Filamente werden in Abhängigkeit von extra- bzw. intrazellulären Signalen nach Bedarf auf- oder abgebaut. Dabei spielen akzessorische Proteine, die in das Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation der Monomere eingreifen, eine wichtige Rolle [Amos und Amos, 1991].

Die röhrenförmigen Mikrotubuli haben einen Durchmesser von ca. 25 nm. Sie bestehen aus 13 Protofilamenten, die aus  $\alpha/\beta$ -Tubulindimeren aufgebaut sind. Die Polymerisation ist GTP-abhängig und erzeugt gerichtete Filamente, die vom Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) ausgehend die gesamte Zelle durchziehen. Dabei weist das schnell wachsende Ende der Filamente zur Zellperipherie. Der Spindelapparat, der während der Mitose die Chromosomen an der Äquatorialplatte anordnet und auf die Tochterzellen verteilt, wird durch Mikrotubuli aufgebaut [Mandelkow und Mandelkow, 1995]. Darüber hinaus dienen die Mikrotubuli als Schienensystem für den intrazellulären Transport von Vesikeln und Organellen durch die Motorproteine Dynein und Kinesin.

Im Gegensatz zu der homogenen Familie der globulären Tubuline wird das Intermediärfilamentsystem durch eine sehr heterogene Gruppe elongierter Proteine aufgebaut. Sie lassen sich in drei Familien unterteilen: Zytokeratine, Vimentin und Vimentin-ähnliche Proteine sowie Lamine. Die Mitglieder dieser Familien enthalten alle eine zentrale  $\alpha$ -helikale Domäne. Durch die Ausbildung von Doppelwendeln erfolgt die Verknüpfung der Monomere zu Protofilamenten. Mehrere Protofilamente ergeben das 10 nm dicke, äußerst unlösliche Intermediärfilament. Als Funktion wurde für die Intermediärfilamente eine Beteiligung an der mechanischen Stabilisierung der Zellen beschrieben [Franke, 1993].

## 2. Aktin und Aktin-bindende Proteine

Der Grundbaustein der Mikrofilamente ist Aktin, ein 43.000 Da Protein [Pollard, 1990]. Die Mikrofilamente haben einen Durchmesser von 5-7 nm. In Muskelzellen bilden Aktin- und Myosinfilamente die hochspezialisierte Einheit der Krafterzeugung, das Sarkomer. Unter Energieverbrauch können die beiden Filamentsysteme 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 Aktinkabeln oder „stress fibers“, durchzogen. Unter der Plasmamembran der Zellen befindet sich ein feines Netzwerk kürzerer Aktinfilamente, der sogenannte Cortex.

*In vitro* erfolgt die ATP-abhängige Polymerisation des Aktins in Anwesenheit mono- und divalenter Kationen wie z.B.  $K^+$  und  $Mg^{2+}$  ab einer Konzentration von 0,1  $\mu M$ . Die Bindung der Ionen an Aktinmonomere (G-Aktin) führt zu einer Konformationsänderung, die die Bildung der Filamente (F-Aktin) ermöglicht. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Polymerisation ist die Erzeugung von Aktintrimeren, die sog. Nukleation. Die Verlängerung des Nukleus erfolgt an beiden Enden des entstehenden Filaments mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Die kritische G-Aktinkonzentration, d.h. die Konzentration, bei der Polymerisation und Depolymerisation mit gleicher Geschwindigkeit ablaufen, beträgt für das schnellwachsende (+)-Ende des Filaments etwa 0,1  $\mu M$  und für das langsamwachsende (-)-Ende 0,8  $\mu M$  [Gärtner *et al.*, 1989; Wegner und Isenberg, 1983]. Die Konzentration von Aktin in Nichtmuskelzellen beträgt 100  $\mu M$ . Davon liegen nur etwa 50% in polymerer Form vor, obwohl die ionischen Bedingungen der Zellen eine vollständige Polymerisation des Aktins fördern sollten [Zigmond, 1989]. Die Regulation des F-Aktingehalts unterliegt in Zellen einer großen Anzahl Aktin-bindender Proteine [Pollard und Cooper, 1986; Stossel *et al.*, 1985].

Aktin-bindende Proteine lassen sich nach ihrer Funktion in Gruppen einteilen (Abbildung 1) [Noegel und Luna, 1995]. Profilin [Haugwitz *et al.*, 1991] und CAP [Gottwald *et al.*, 1996] aus *Dictyostelium discoideum* binden G-Aktin in einem 1:1 Komplex. Dadurch wird monomeres Aktin dem Gleichgewicht entzogen und die Polymerisation verlangsamt. Eine andere Gruppe Aktin-bindender Proteine interagiert mit dem (+)-Ende der Filamente, so dass zur Anlagerung von Monomeren nur das (-)-Ende zur Verfügung steht. Diese Funktion haben z. B. Cap Z aus den Z-Linien der Muskelzellen [Casella *et al.*, 1986] und Cap 32/34 aus

*D. discoideum* [Eddy *et al.*, 1996; Haus *et al.*, 1993]. Die Depolymerisation von Aktinfilamenten ist für die ständige Umorganisation 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 eine erneute Anlagerung von Monomeren. Eine weitere Gruppe stellen die membranassoziierten Aktin-bindenden Proteine dar. Ponticulin [Hitt *et al.*, 1994; Shutt *et al.*, 1995], Talin [Kreitmeier *et al.*, 1995] und Hisactophilin [Scheel *et al.*, 1989; Hanakam *et al.*, 1996] verbinden den Aktin-Cortex mit der Plasmamembran, während Comitin [Weiner *et al.*, 1993] und Interaptin [Rivero *et al.*, 1998] Aktin-Filamente an intrazellulären Membranen verankern.

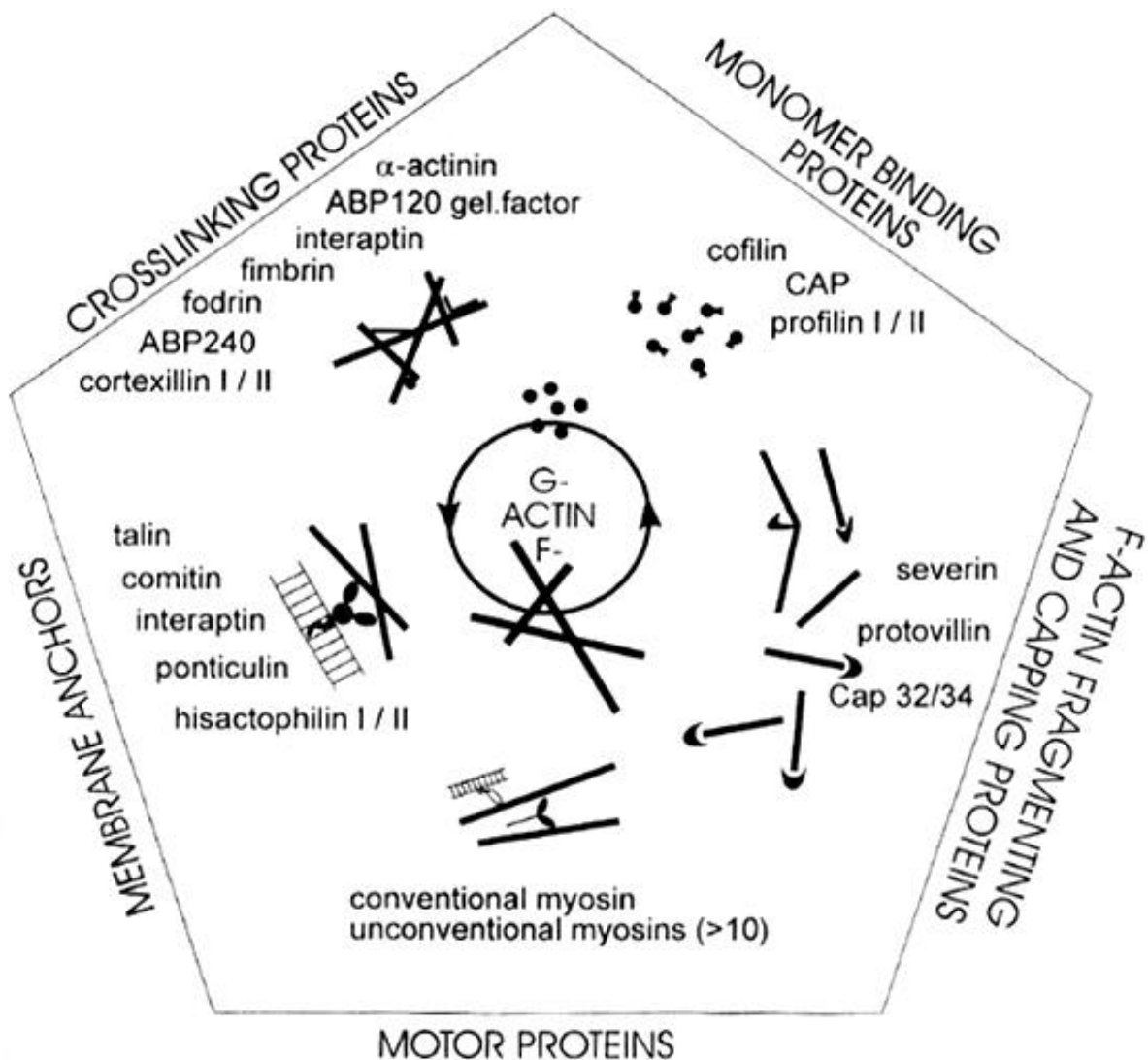


Abbildung 1: Aktin-bindende Proteine in *Dictyostelium discoideum* [aus: Eichinger *et al.*, 1999].

Die mechanische Stabilität der Aktinfasern wird durch Aktin-quervernetzende Proteine erhöht. Diese Proteine verbinden die Aktinfilamente entweder zu parallelen Bündeln, wie z.B. Fimbrin [De Arruda *et al.*, 1990], oder zu orthogonalen Netzwerken. Zu dieser zweiten Gruppe gehören Spektrin [Brenner und Korn, 1979],  $\alpha$ -Aktinin [Noegel *et al.*, 1987] und die Filamine [Hartwig und Stossel, 1975; Condeelis *et al.*, 1981]. Zur Ausübung ihrer Funktion müssen die quervernetzenden Proteine zwei Aktin-Bindedomänen enthalten, die entweder beide auf einer Polypeptidkette lokalisiert sind oder durch die Dimerisierung von zwei Polypeptidketten mit je einer Bindedomäne erzeugt werden [Eichinger *et al.*, 1999]. Der strukturelle Aufbau vieler Aktin-quervernetzender Proteine ist hoch konserviert [Hartwig und Kwiatkowski, 1991; Vanderkerkhove und Vancompernelle, 1992]. So besteht die Gruppe der  $\alpha$ -Aktinin-/Spektrin-ähnlichen Proteine aus einer sehr homologen N-terminalen Aktin-Bindedomäne aus etwa 250 Aminosäuren und einem elongierten Rest aus Wiederholungseinheiten. Diese Untereinheiten werden entweder durch einen hohen Anteil  $\alpha$ -helikaler ( $\alpha$ -Aktinin und Dystrophin [Parry *et al.*, 1992]) oder  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (Filamin [Fucini *et al.*, 1997]) gekennzeichnet.

### 3. Die Filamine und ihre Bindungspartner

Filamin gehört in vielen Zellen zu den häufigsten Aktin-quervernetzenden Proteinen. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie unterscheiden sich von den anderen Aktin-quervernetzenden Proteinen durch ihre aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufgebauten elongierten Wiederholungseinheiten (Tabelle 1). Die Dimerisierung der Filamine erfolgt über die Wechselwirkungen der beiden C-terminalen Wiederholungseinheiten der Moleküle [Hartwig, 1994]. Die elongierte Domäne der drei humanen Filamine besteht aus 24 Einheiten mit je ungefähr 96 Aminosäuren. Die C-terminale Einheit ist durch eine kurze Gelenk-Sequenz vom Rest des Moleküls abgesetzt. Filamin B ( $\beta$ -Filamin) und Filamin C ( $\gamma$ -Filamin) werden in zwei Isoformen exprimiert, die sich durch das Vorhandensein einer zweiten Gelenk-Region zwischen Untereinheit 15 und 16 unterscheiden. In Filamin A (ABP280,  $\alpha$ -Filamin) ist dieses Scharnier immer vorhanden. Diese Gelenke bewirken die zur Quervernetzung der Filamente nötige Flexibilität der Filamine. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen humane Filamine eine V- oder Y-förmige Gestalt [Hartwig und Stossel, 1981]. Das spezifisch in Muskelzellen vorkommende Filamin C trägt eine Insertion von 78 Aminosäuren in der zwanzigsten Untereinheit [Maestrini *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1998; van der Ven *et al.*, 2000a],

die zur korrekten Lokalisation an der Z-Scheibe des Sarkomers beiträgt [van der Ven *et al.*, 2000b]. Die Ähnlichkeit der humanen Filaminen ist mit 60-80% homologer Aminosäuren sehr hoch.

*Drosophila melanogaster* besitzt zwei Filamin Gene, die für Proteine mit jeweils 20 Wiederholungseinheiten kodieren. Ihr Aufbau ähnelt den humanen Filaminen. Aus dem Filamin 1 Gen entsteht durch alternatives Spleißen zusätzlich ein aus neun Untereinheiten aufgebautes Filamin (dmFLN1-9), das keine Aktin-Bindedomäne enthält. Es ist wie auch dmFLN1-20 ein Bestandteil von Follikelmembranen und Ringkanälen der Ovarien [Li *et al.*, 1999; Sokol und Cooley, 1999].

*Dictyostelium discoideum* Filamin (ddFLN, ABP120, Gelationsfaktor) besteht dagegen aus einer konservierten Aktin-Bindedomäne und einer elongierten Domäne, die aus nur sechs Wiederholungseinheiten à 100 Aminosäuren zusammengesetzt ist. Die einzelnen Einheiten bestehen strukturell aus sieben  $\beta$ -Strängen, die ein „Sandwich“ aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen bilden. Dadurch entsteht eine Immunglobulin-ähnliche Struktur [Fucini *et al.*, 1997]. DdFLN dimerisiert wie alle anderen Mitglieder der Filamin-Familie durch Interaktion der beiden C-terminalen Untereinheiten [Fucini *et al.*, 1999]. Die Bindung wird durch die Ausbildung intermolekularer  $\beta$ -Faltblattstrukturen zwischen diesen Einheiten vermittelt. Dabei sind die beiden Polypeptidketten im Gegensatz zu den anderen Filaminen antiparallel angeordnet [McCoy *et al.*, 1999]. *D. discoideum* Filamin ist *in vivo* im Zellcortex, in Lamellipodien und Filopodien lokalisiert [Condeelis *et al.*, 1981]. Durch Mutagenese und „gene disruption“ wurden mehrere Filamin-defiziente Mutanten mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund in *D. discoideum* isoliert und charakterisiert [Brink *et al.*, 1990; Wallraff und Wallraff, 1997; Cox *et al.*, 1992, 1995, 1996; Eichinger *et al.*, 1996]. Die Analyse dieser Mutanten ergab Defekte in der Zytoskelettstruktur und Quervernetzung der Aktinfilamente, die sich auf die Anzahl und Größe der gebildeten Pseudopodien und dadurch auf die Zellbewegung, Chemotaxis und Phagozytosefähigkeit der Mutanten auswirkt [Cox *et al.*, 1992, 1995, 1996]. Bei mehreren Mutanten ist die Fähigkeit zur gerichteten Phototaxis und Thermotaxis im „Slug“-Stadium der Amöben beeinträchtigt [Fisher *et al.*, 1997; Wallraff und Wallraff, 1997].

**Tabelle 1: Einteilung der Mitglieder der Filamin-Proteinfamilie [Stossel *et al.*, 2001].**

Name	andere Namen	Anzahl der Einheiten	Gelenk 1
Hs FLN A	ABP, ABP280, FLN1, nonmuscle Filamin, $\alpha$ FLN	24	+
Hs FLN B	$\beta$ FLN, FH1, FLN3	24	+/-
Hs FLN C	$\gamma$ FLN, ABP-L, FLN2	24	+/-
Gg FLN B	FLN	24	-
Dd FLN	ABP120, Gelationsfaktor	6	-
Dm FLN1-20	Filamin-240, Filamin 1	20	+
Dm FLN1-9	Filamin-90	9	-
Dm FLN2		20	+

Bislang wurden über 20 Bindungspartner der Filamine identifiziert, deren Interaktionen durch die elongierte Domäne des Filamins vermittelt werden (Tabelle 2). Durch einige dieser Partner wird das Aktin-Zytoskelett mit Membranen und Membranrezeptoren in Kontakt gebracht. Diese Interaktionen tragen einerseits zur mechanischen Stabilität und zur Aufrechterhaltung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen bei, andererseits kann durch den Kontakt des Filamins mit Membranrezeptoren die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts in Abhängigkeit von extrazellulären Signalen vermittelt werden. Filamin A und B binden über Untereinheit 15 an Glycoprotein I $\beta$ , einen Bestandteil des von-Willebrand-Faktor-Rezeptor-Komplexes [Andrews und Fox, 1992; Cunningham *et al.*, 1996; Takafuta *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 1999]. Dieser Komplex ist durch die Bindung des subendothelialen von-Willebrand-Faktors an der Adhäsion von Blutplättchen bei der Blutgerinnung beteiligt. Filamin bindet auch an den zytoplasmatischen Teil von  $\beta$ 1A,  $\beta$ 1D,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 und  $\beta$ 7 Integrin [Pfaff *et al.*, 1998; Loo *et al.*, 1998]. Integrine sind eine Familie von Membranrezeptoren, die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln. Weitere mit Filamin interagierende Plasmamembran-Rezeptoren sind Tissue Factor [Ott *et al.*, 1998], ein Aktivator des Faktors VII der Blutgerinnungskaskade, und Fc $\gamma$  Rezeptor TypI (CD64), ein Transmembranprotein, dessen Funktion in Phagozytose und Antigenprozessierung in Myelomazellen liegt [Otha *et al.*, 1991]. Die Protease Furin ist an der C-terminalen Prozessierung vieler Transmembranproteine beteiligt. Zu ihren Substraten zählen Rezeptoren, virale Hüllenproteine sowie Toxine und Plasmaproteine. Die Verteilung des Furins zwischen Plasmamembran, Endosomen und *trans*-Golgi-Apparat wird durch seine Bindung an die Filamin-Untereinheit 11 gesteuert [Liu *et al.*, 1997]. Ein weiterer Bindepartner des Filamins ist Caveolin I [Stahlhut und van Deurs, 2000], das häufigste Protein der Caveolen. Caveolen sind Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Membranvesikel, die in den zellulären Transport und in die Signaltransduktion involviert

sind. Der Dopamin D<sub>2</sub> Rezeptor, ein Rezeptor der heterotrimeren G-Protein Kaskade, bindet über eine intrazelluläre Schleife an Filamin [Li *et al.*, 2000]. Etwa die Hälfte der Fälle familiärer Alzheimerscher Erkrankung („early onset Alzheimer’s disease“) sind auf Mutationen im Gen des Presenilin-Proteins zurückzuführen. Preseniline sind Transmembranproteine mit sieben oder acht Transmembrandomänen und einer zytosolischen Schleife, die eine weite Verbreitung in fast allen Geweben aufweisen. Sie sind vor allem in den Membranen des Golgi-Apparates, des Endoplasmatischen Retikulums und in Membranen von Transportvesikeln nachweisbar. Eine Subpopulation des Presenilins ist an der Plasmamembran von Lamellipodien lokalisiert [Schwarzman *et al.*, 1999]. Eine Interaktion der zytosolischen Schleife des Presenilins wurde sowohl für humanes Filamin A und B als auch für *Drosophila* Filamin 1-20 nachgewiesen [Zhang *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2000]. Filamin C, die muskelspezifische Isoform des Filamins, bindet an Membranproteine, die bei Patienten mit Muskeldystrophien („limb girdle muscular dystrophy“) verändert sind.  $\delta$ -Sarcoglycan [Thompson *et al.*, 2000], FATZ [Faulkner *et al.*, 2000] und Myotilin [van der Ven *et al.*, 2000b] sind an der Z-Scheibe der Muskelzellen lokalisiert. Bei einer Mutation in diesen Proteinen, wie sie bei Muskeldystrophien auftritt, könnte ihre Interaktion mit Filamin gestört und so die mechanische Stabilität der Membranen herabgesetzt sein.

Eine Funktion des Filamins bei zellulären Signaltransduktionskaskaden wird durch seine Interaktion mit Komponenten des NF $\kappa$ B Signalweges deutlich. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B resultiert in der Expression von Genen, deren Produkte an der Kontrolle des Zellwachstums und der Immunantwort beteiligt sind. Primärer Stimulus der NF $\kappa$ B Aktivierung ist die Interaktion von Interleukin 1 (IL-1) und Tumornekrose-Faktor (TNF) mit ihren Rezeptoren. *Drosophila* Filamin bindet an Toll, ein Protein, das Homologien zu den humanen Rezeptoren für Interleukin 1 und Tumornekrose-Faktor aufweist [Edwards *et al.*, 1997]. Weiterhin interagiert humanes Filamin mit TRAF2, dem Tumornekrose-Faktor-assoziierten Faktor 2 [Leonardi *et al.*, 2000]. TRAF2 ist ein zellulärer Überträger der IL-1/TNF-Rezeptor Aktivierung auf stressaktivierte Proteinkinase (SAPK). Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung des Filamins an diesem Signaltransduktionsweg ist seine Bindung an SEK1, eine Proteinkinase, welche stressaktivierte Proteinkinase durch Phosphorylierung aktiviert [Marti *et al.*, 1997]. Auch der Androgen Rezeptor ist ein Bindungspartner des Filamins. Dieser zytosolische Rezeptor wird nach Aktivierung durch androgene Steroide in den Zellkern transportiert. In Filamin defizienten Zellen findet diese Translokation des Rezeptors nicht statt [Ozanne *et al.*, 2000]. Eine weitere Klasse von Filamin-interagierenden Proteinen sind die kleinen G-Proteine. Filamin bindet die GTPasen RhoA, Rac1, Cdc42 und



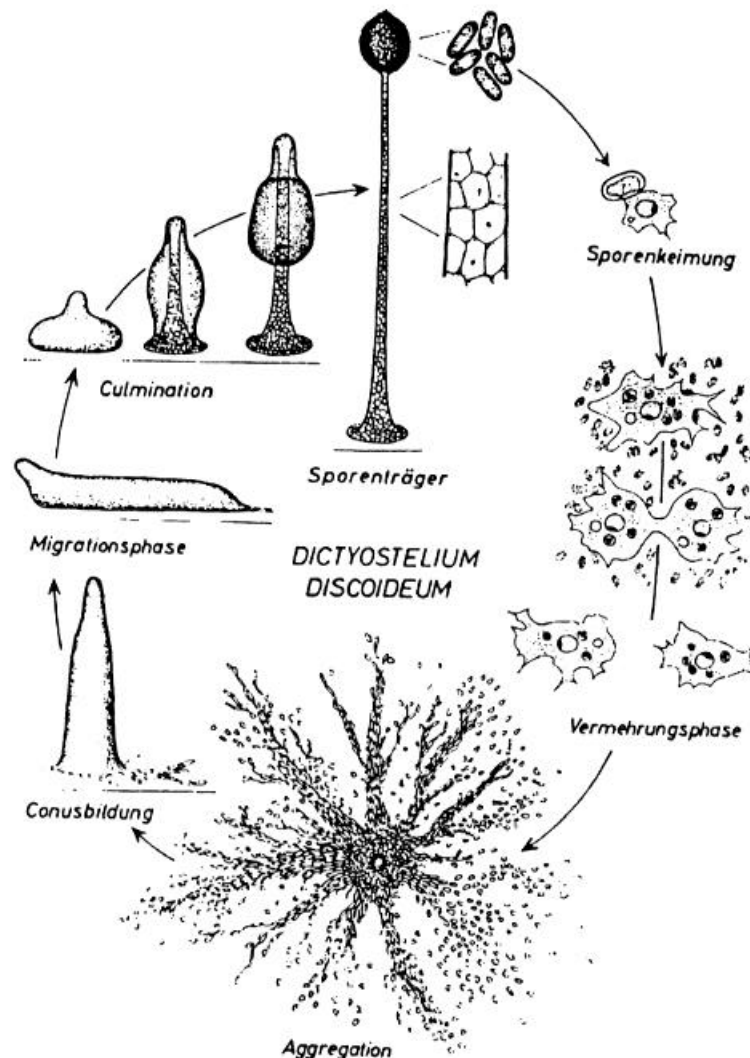
RalA, wobei die Bindung an RalA GTP-abhängig ist [Otha *et al.*, 1999]. Außerdem interagiert Filamin mit Trio, einem Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) für RhoA und RhoG [Bellanger *et al.*, 2000]. Filamin vermittelt demnach die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts nach Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden.

**Tabelle 2: Die Bindungspartner der Filamine.**

Bindungspartner	Interaktionsdomäne der Filaminsequenz	Interaktionsdomäne der Partnersequenz	Funktion der Interaktion
Glycoprotein Ib $\alpha$	UE 15	$\alpha$ -UE	Zellausbreitung
Integrine ( $\beta$ 1A, $\beta$ 1D, $\beta$ 2, $\beta$ 3, $\beta$ 7)	C-terminale Hälfte	Zytoplasmatische Domäne	Mechanische Stabilisierung
Tissue Factor	UE 23-24		Assoziation <i>in vivo</i>
FcRI (CD64)			Liganden-sensitive Dissoziation
Furin	UE 13-14		Kompartimentalisierung des Furins
$\delta$ -Sarcoglycan	UE 23-24 (Hs FLN C)		Mögliche Rolle bei Muskeldystrophien
Myotilin	UE 19-21 (Hs FLN C)	Ig-Domäne	Mögliche Rolle bei Muskeldystrophien
FATZ	(Hs FLN C)		Z-Scheiben-Lokalisation
Caveolin-1	C-terminale Hälfte		Kolokalisation in Caveolen
Presenilin	C-terminale Hälfte (Hs FLN A und B, Dm FLN1)	Zytoplasmatische Schleife	Kolokalisation, FLN1 Überexpression inhibiert den Phänotyp der Presenilin Überexpression in <i>Drosophila</i>
Dopamin D <sub>2</sub> Rezeptor	UE 16-19	Dritte zytoplasmatische Schleife	Abgeschwächte Antwort auf Dopamin in FLN-defizienten Zellen
Granzym B	UE 24		Hydrolyse von FLN
Toll	UE 16-20 (DmFLN1)		Bindet auch <i>Tube</i>
TRAF2	UE 21-24		FLN A Überexpression verhindert NF $\kappa$ B und SAPK Aktivierung
SEK-1	UE 21-24		FLN-SEK-1 Komplex aktiviert SAPK
Androgen Rezeptor	C-terminale Hälfte		Keine Translokation des Rezeptors bei FLN-Defizienz
Rho, Rac, Cdc42	UE 21-24		Nicht GTP-abhängig
RalA	UE 24		GTP-abhängig
Trio	UE 23-24	GEF-Domäne 1	Zellform
cvHSP	UE 21-24		
Hepatitis B Virus Protein	C-terminale Hälfte		

#### 4. *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

*Dictyostelium discoideum*, eine Amöbe aus der Klasse der Myxomyceten, eignet sich als Modellorganismus vor allem zur Untersuchung des Zytoskeletts und zytoskelett-assoziiierter Proteine. *D. discoideum* ist einfach in axenischem Medium zu kultivieren, zeigt Differenzierungsvorgänge von überschaubarer Komplexität und ist vielen Methoden der Molekularbiologie zugänglich. Darüber hinaus weist dieser Organismus in Bezug auf Chemotaxis, Pseudopodienbildung, Phagozytose sowie zellulären Transport Gemeinsamkeiten mit Zellen höherer Organismen wie z.B. den Granulozyten, den motilen Zellen des Immunsystems, auf.



**Abbildung 2: Entwicklungszyklus von *D. discoideum*** [aus: Gerisch, 1965]. Aus den Sporen schlüpfen unter günstigen Bedingungen Amöben, die sich von Bakterien ernähren und vegetativ vermehren. Bei Nahrungsmangel aggregieren die Zellen und bilden ein Pseudoplasmodium, das eine Wanderungsphase durchlaufen kann. Nach ca. 18 Stunden beginnt die Kulmination, bei der die Sporen vom wachsenden Stiel nach oben getragen werden. Die Sporen werden durch Berührung des Sporenkopfes freigesetzt, keimen aus und beginnen einen neuen Zyklus.

Die natürlich im Waldboden lebenden Amöben ernähren sich von Bakterien. Bei Entzug der Nahrungsquelle durchläuft *D. discoideum* einen asexuellen Entwicklungszyklus, in dessen Verlauf die Zellen in zwei Zelltypen differenzieren und einen vielzelligen Fruchtkörper ausbilden. Durch den Nahrungsmangel schütten die Zellen das Chemoattraktans cAMP aus [Gerisch *et al.*, 1975], wodurch jeweils etwa 100.000 Zellen aggregieren und ein Pseudoplasmodium bilden. Das Aggregat bildet eine Spitze und streckt sich zu einem auf dem Untergrund aufliegenden wurmartigen Gebilde, dem „Slug“. In diesem lassen sich zwei Zelltypen unterscheiden, die Prä-Stiel- und die Prä-Sporenzellen. Nach 18 Stunden beginnt die Kulminationsphase, bei der sich der „Slug“ aufrichtet und der größte Teil der Zellmasse vom wachsenden Stiel nach oben getragen wird. Der durch Invagination von Stielzellen verlängerte Stiel trägt zum Abschluss der Entwicklung den Sporenkopf. Stielzellen und Sporenkopf bilden eine Zellwand, die durch Zelluloseeinlagerung verstärkt wird. Bei Berührung platzt der Sporenkopf auf. Unter günstigen Bedingungen keimen die Sporen aus und können einen neuen Entwicklungszyklus durchlaufen.

## 5. Zielsetzung der Arbeit

Bislang wurde neben Aktin kein weiterer Bindungspartner des *D. discoideum* Filamins beschrieben. Die Involvierung von Filamin in die Photo- und Thermotaxis von *Dictyostelium*, die sich bei der Analyse der Filamin-defizienten Mutante GHR gezeigt hat, lässt allerdings auf eine Funktion des Filamins bei der Vermittlung extrazellulärer Signale schließen. Diese Funktion könnte durch die Interaktion mit weiteren Proteinen vermittelt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung weiterer Bindungspartner des *D. discoideum* Filamins. Dazu wurde eine „Two-Hybrid“ cDNA-Bank Durchmusterung mit Filamin als „Köderprotein“ durchgeführt und das Filamin-interagierende Protein, FIP, als unbekannter Bindungspartner identifiziert. Die Interaktion zwischen Filamin und FIP wurde durch unabhängige Untersuchungen bestätigt und FIP in *D. discoideum* charakterisiert.

## **B Ergebnisse**

---

### **1. Identifizierung von Bindungspartnern des *Dictyostelium discoideum* Filamins mit dem Hefe „Two-Hybrid“ System**

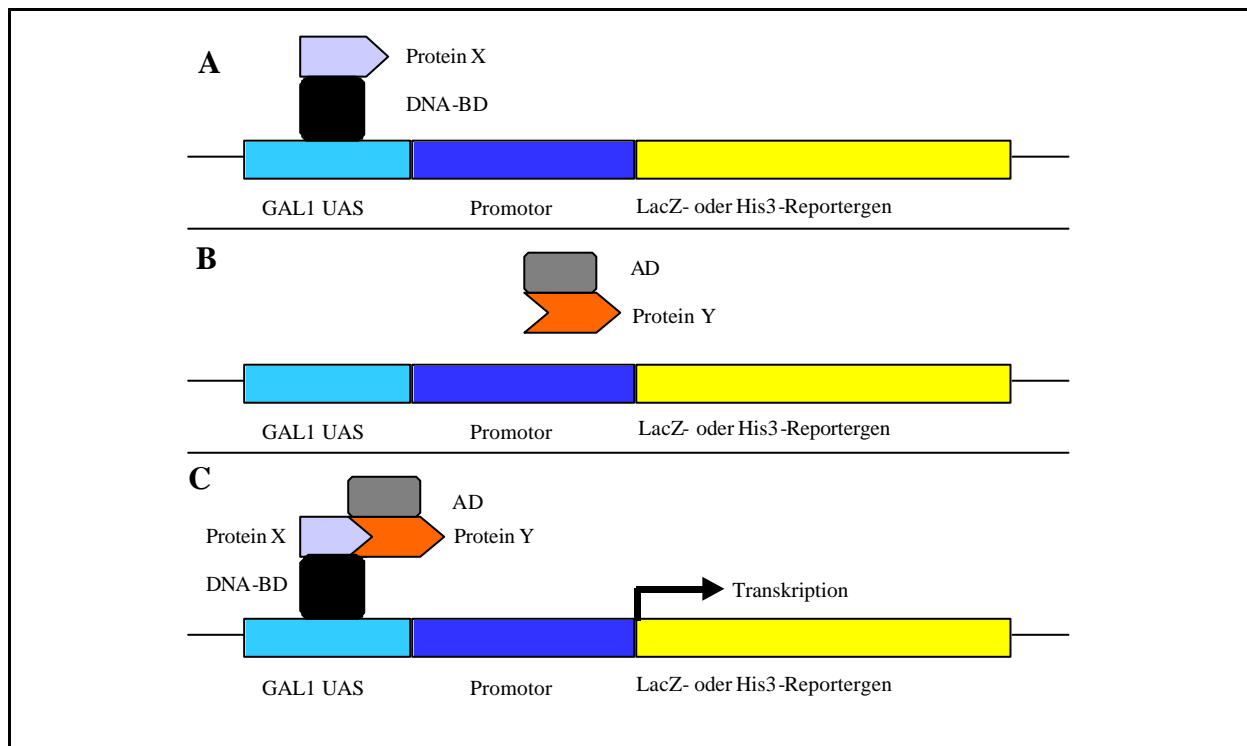
#### **1.1. Grundlagen des Hefe „Two-Hybrid“ Systems**

Das Hefe „Two-Hybrid“ System ist eine *in vivo* Methode zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen und zur Isolierung von Genen, deren Produkte miteinander interagieren [Bartel *et al.*, 1993a, 1993b; Chien *et al.*, 1991; Fields, 1993; Fields und Sternglanz, 1994; Luban und Goff, 1995; Fritz und Green, 1992; Guarente, 1993]. Es wurde erstmals 1989 von **S. Fields** und **O. Song** [Fields und Song, 1989] vorgestellt.

Das „Two-Hybrid“ System beruht auf den Eigenschaften des *Saccharomyces cerevisiae* Transkriptionsfaktor GAL4. Dieses Protein ist ein Transkriptionsaktivator, der für die Expression von Genen, die für Enzyme des Galaktosestoffwechsels kodieren, erforderlich ist. Es besteht aus zwei funktional essentiellen Domänen, der DNA bindenden Domäne (DNA-BD) und der Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD). Die DNA bindende Domäne erkennt eine spezifische Sequenz („upstream activating sequence = UAS“) stromaufwärts von GAL4 kontrollierten Genen und bindet an diese. Die Aktivierungsdomäne interagiert mit Komponenten des RNA-PolymeraseII-Komplexes und initiiert dadurch die Transkription dieser Gene. Die Transkriptionsaktivierung funktioniert auch, wenn die beiden Domänen auf zwei verschiedenen Fusionsproteinen lokalisiert sind, solange sie durch die Interaktion der Fusionsteile in nahen räumlichen Kontakt gebracht werden. Die physikalisch getrennten GAL4-Domänen alleine sind nicht in der Lage, die Transkription von Genen einzuleiten [Ma und Ptashne, 1988; Brent und Ptashne, 1985].

In dem hier verwendeten „Two-Hybrid“ System werden nun mit Hilfe von zwei kompatiblen Vektorsystemen zwei verschiedene Hybridgene in Hefezellen des Stammes Y190 eingeschleusst. Dieser Hefestamm besitzt kein endogenes GAL4-Protein. Die entsprechenden Fusionsproteine werden exprimiert und in den Zellkern importiert. Das „Köderprotein“ („bait“), das ein Fusionsprotein aus den ersten 147 Aminosäuren der GAL4 DNA-bindenden Domäne mit dem zu untersuchenden Protein X darstellt, wird durch den Vektor pAS2 kodiert [Harper *et al.*, 1993]. Das pACT2-Plasmid [Durfee *et al.*, 1993] kodiert für die Aminosäuren 768 bis 881 der GAL4-Aktivierungsdomäne [Keegan *et al.*, 1986; Hope und Struhl, 1986; Ma

und Ptashne, 1987] und wird mit der cDNA eines potentiellen Bindungspartners Y verknüpft. Dies führt zur Expression des „Beuteproteins“ („prey“). Können die beiden Proteine X und Y spezifisch miteinander interagieren, werden DNA-bindende und Aktivierungsdomäne des GAL4-Proteins durch die Wechselwirkung in Kontakt gebracht und die Transkriptionsaktivierung eines oder mehrerer Reportergene mit stromaufwärts liegenden GAL4 Bindesequenzen (GAL1 UAS<sub>G</sub>) kann erfolgen (Abbildung 3) [Silver *et al.*, 1984; Chien *et al.*, 1991]. Die Aktivierung dieser Reportergene macht die Protein-Protein-Interaktion phänotypisch auswertbar. Das Genprodukt des HIS3-Reportergens ermöglicht das Wachstum der Hefezellen auf Histidin-freiem Selektionsmedium. Das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, Genprodukt des LacZ-Reportergens, hydrolysiert eine Vielzahl von  $\beta$ -Galaktosiden einschließlich chromogener<sup>1</sup> Substrate wie das 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- $\beta$ -D-Galaktosepyranosid (X-Gal). Die Transkriptionsaktivierung des LacZ-Reportergens lässt sich somit anhand der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nachweisen.



**Abbildung 3: Modell der Transkriptionsaktivierung durch Wiederherstellung der GAL4-Aktivität.** (A) Das Hybrid aus GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) und Protein X bindet an die GAL1-Aktivierungssequenz (GAL1 UAS). Die Transkription kann aber nicht ohne die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) beginnen. (B) Das Hybrid aus der GAL4-Aktivierungsdomäne und Protein Y ist nicht an der Gal1-Aktivierungssequenz lokalisiert. Die Transkription der Reportergene kann nicht beginnen. (C) Die *in vivo* Interaktion der beiden Proteine X und Y bringt die beiden GAL4-Domänen in unmittelbare Nachbarschaft zueinander. Daraus resultiert die Transkriptionsaktivierung der Reportergene.

<sup>1</sup> Chromogene Substanz : farblose Substanz, die bei der Reaktion zu einem farbigen Produkt umgesetzt wird

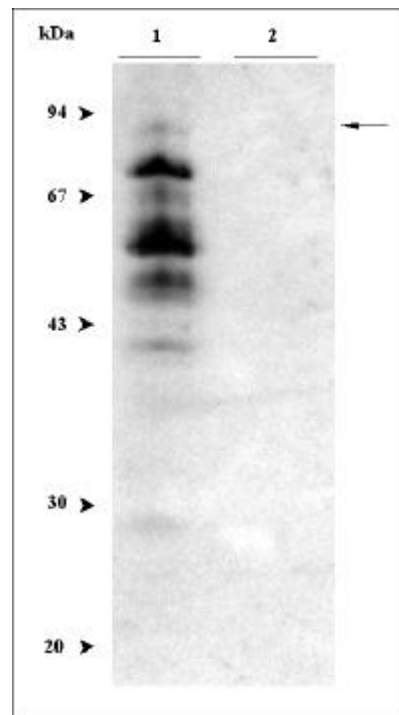
## 1.2 „Two-Hybrid“ cDNA-Bank Durchmusterung

Mit Hilfe des „Two-Hybrid“ Systems lassen sich aber nicht nur Interaktionen zwischen bekannten Proteinen testen. Sein Potential beruht vielmehr darauf, dass mit seiner Hilfe auch cDNA-Banken nach unbekanntem Proteinen oder Proteindomänen, die mit dem Köderprotein interagieren, durchmustert werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe des „Two-Hybrid“ Systems neue Interaktionspartner des *Dictyostelium discoideum* Filamins gefunden werden. Dafür wurde die Durchmusterung von drei *Dictyostelium discoideum* cDNA-Banken durchgeführt. Als „Köderprotein“ dienten dabei die sechs elongierten Domänen des Filamins (Rod 1-6) in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne des GAL4-Proteins. Gegen eine Verwendung der gesamten Filaminsequenz (Aktin-Bindedomäne + Rod 1-6) als „Köderprotein“ spricht in den cDNA-Banken abundant vorkommendes Aktin, das durch die Interaktion mit der Aktinbindedomäne des Filamins zu einer wesentlichen Erhöhung der Anzahl positiver Hefeklonen führen würde. Außerdem werden alle bisher untersuchten Interaktionen der verschiedenen Filamine mit ihren Bindungspartnern über eine Interaktion mit der elongierten Domäne vermittelt.

## 1.3 Expression des GAL4-DNA-Bindedomäne-Rod 1-6 Fusionsproteins

Durch Transformation kompetenter Hefen mit dem Plasmid pAS2/Rod 1-6 erhält man Zellen, die das Fusionsprotein aus GAL4-DNA-BD und den Filamin-domänen Rod 1-6 exprimieren. Die Expression dieses Hybridproteins wird in einem Western-Blot von Zellextrakten aus mit pAS2/Rod 1-6 transformierten und untransformierten Y190-Hefen überprüft (Abbildung 4). Zur Detektion dient hierbei der monoklonale anti-Filamin Antikörper 82-382-8 [Brink *et al.*, 1990]. Dieser Antikörper erkennt ein Protein von ca. 85 kDa im Extrakt von Hefezellen, die pAS2/Rod 1-6 enthalten. Die zusätzlichen Banden mit kleineren Molekulargewichten sind sehr wahrscheinlich Degradationsprodukte, da Filamin generell an den Übergängen zwischen den sechs IgG-ähnlichen Domänen empfindlich für Proteolyse ist. Im Kontrollhomogenat untransformierter Hefezellen ist die Antikörperreaktion negativ.



**Abbildung 4: Nachweis der Expression des GAL4-DNA-BD-Filamin-Rod 1-6 Fusionsproteins.** Zell-homogenate mit pAS2/Rod 1-6 transformierter (Spur 1) und untransformierter (Spur 2) Hefezellen wurden in einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte durch den monoklonalen anti-Filamin-Antikörper 82-382-8. Die Bindung wurde durch einen an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper und anschließende ECL-Reaktion detektiert.

Zunächst wurden Y190 Zellen mit GAL4-DNA-BD-Rod 1-6 auf die autokatalytische Aktivierung des LacZ-Reportergens getestet. Hefen, bei denen das LacZ-Reportergen bereits durch die alleinige Anwesenheit des Köderproteins aktiviert wird, färben sich in einem  $\beta$ -Galaktosidasetest durch Spaltung des chromogenen Substrates X-Gal blau. Die GAL4-DNA-BD-Rod 1-6 Protein enthaltenden Hefezellen zeigen jedoch keine Blaufärbung auf, so dass sie für eine „Two-Hybrid“ cDNA-Bank Durchmusterung verwendet werden konnten.

#### 1.4 Die „Two-Hybrid“ cDNA-Bibliotheken

Die für die „Two-Hybrid“-Durchmusterung verwendeten *Dictyostelium discoideum* cDNA-Banken wurden aus  $\lambda$ ACT-Phagenbibliotheken abgeleitet, die von A. Kuspa zur Verfügung gestellt wurden. Es handelt sich bei diesen Bibliotheken um zwei Banken aus dem vegetativen Stadium von *D. discoideum*, die sich in ihrer Fragmentgröße unterscheiden, und um eine entwicklungspezifische Phagenbibliothek (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Eigenschaften der verwendeten l-ACT-Phagenbibliotheken.**

Phagenbibliothek	Fragmentgröße	Anzahl Klone
1. vegetative	1,0 – 1,6 kB	$2,8 \times 10^7$
2. vegetative	1,6 – 5,0 kB	$8,0 \times 10^6$
entwicklungsspezifische	1,3 – 5,0 kB	$1,1 \times 10^7$

Zur Konvertierung der Phagenbibliotheken wurden *E. coli* BNN132 (= JM107/ $\lambda$ KC) Zellen mit Phagen der drei Bibliotheken infiziert. Dabei führte die Aktivität der cre-Rekombinase dieses *E. coli* Stammes zur Zirkularisierung der Plasmide an den beiden lox-Stellen [Elledge *et al.*, 1991]. Die Infektion resultierte in Ampicillin resistenten *E. coli* Kolonien, die pACT2 Plasmide enthielten. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA.

### 1.5 „Two-Hybrid“ cDNA-Bank Durchmusterung mit Filamin Rod 1-6 als Köderprotein

Zur Durchmusterung der drei *D. discoideum* „Two-Hybrid“ cDNA-Banken wurden kompetente Zellen des Hefestammes Y190 hergestellt und simultan mit Plasmid-DNA des pAS2/ Rod 1-6 Vektors und DNA der entsprechenden cDNA-Bank transformiert. Nach Wachstum unter His<sup>+</sup>-Selektion wurden insgesamt 2948 Klone, bei denen das His-Reporter gen aktiviert war, einem  $\beta$ -Galaktosidasetest unterzogen. Aus allen drei cDNA-Banken ergaben sich nach dieser Analyse insgesamt 503 unabhängige Kolonien, die eine Transkriptionsaktivierung beider Reporter gene aufwiesen (Tabelle 4).

Als nächster Schritt bei der Analyse der einzelnen Klone wurde eine Cycloheximid-Selektion durchgeführt. Hefen des Stammes Y190 tragen ein Cycloheximid-Resistenzgen (*cyh*<sup>r2</sup>) und sind somit gegen Cycloheximid unempfindlich. Es handelt sich dabei um einen rezessiven Phänotyp, der durch das auf dem pAS2-Plasmid liegende Wildtypgen für Cycloheximid-Sensitivität (*cyh*<sup>s2</sup>) aufgehoben wird. Ein Ausbringen der „Two-Hybrid“-Klone, die sowohl den pAS2- als auch den pACT2-Vektor enthalten, auf Medium mit Cycloheximid resultiert demnach in einem Verlust des pAS2-Plasmids. Dadurch wird die Resistenz der Hefezellen gegen Cycloheximid wiederhergestellt. Ein  $\beta$ -Galaktosidasetest dieser Kolonien dient der Auffindung solcher falscher Positiver, bei denen die alleinige Anwesenheit des Beuteproteins zur Aktivierung der Reporter gene ausreicht. Insgesamt wurden 15 autoaktivierende Klone von der weiteren Analyse ausgeschlossen.



Aus 113 Cycloheximid-resistenten Kolonien wurden die pACT2-Plasmide isoliert und in den *E. coli* Stamm XL1blue transformiert. Die restlichen 390 Klone wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Plasmide wurden durch eine Verdauung mit der Restriktionsendonuklease BglIII charakterisiert. Dadurch wurden 27 dieser Klone als leerer pACT2-Vektor identifiziert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die pACT2-Vektoren, die cDNA-Stücke enthielten, wurden zusammen mit pAS2/Rod 1-6 in Y190 Hefezellen rücktransformiert. Gleichzeitig wurden Kontrolltransformationen der pACT2-Plasmide gemeinsam mit einer nicht relevanten „Köder-DNA“ durchgeführt, um falsch positive Klone zu identifizieren, deren pACT2-Derivate einen beliebigen Fusionsteil an der GAL4-DNA-bindenden Domäne brauchen, um die Transkription der Reportergene auch ohne eine spezifische Interaktion mit dem „Köderprotein“ einzuleiten. Als Kontrollprotein wurde das *D. discoideum* Protein Comitín gewählt. Comitín ist ein vesikelassoziertes Aktin-bindendes Protein, für das es keine Hinweise auf eine Interaktion mit Filamin gibt [Weiner *et al.*, 1993]. Durch diese Rücktransformationsversuche wurde bei zwei voneinander unabhängigen Klonen eine spezifisch durch das Filamin-„Köderprotein“ hervorgerufene Aktivierung der Reportergene beobachtet (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Durchmusterung der „Two-Hybrid“ cDNA-Banken.**








cDNA-Bank	Anzahl durchmusterter Klone	His <sup>+</sup> -Klone	His <sup>+</sup> -/ LacZ <sup>+</sup> -Klone	richtig positive Klone	nicht weiter analysierte Klone
1. vegetative	1,5 x 10 <sup>5</sup>	258	33	0	0
2. vegetative	2 x 10 <sup>6</sup>	1168	151	2	113
entwicklungsspezifische	1,2 x 10 <sup>6</sup>	1522	319	0	277

## 1.6 Nachweis der Dimerisierung des Filamins über das „Two-Hybrid“ System

Einer der Klone, Nr. 2.565, war identisch mit Filamin (Aminosäurereste 281-857). Dem entsprechenden Polypeptid fehlen die Aktinbindesequenz und ein Teil der ersten IgG-ähnlichen Domäne des Filamins. Der C-Terminus ist in dem „Beuteprotein“ vollständig vorhanden. Somit konnte die bereits bekannte Dimerisierung des Dd Filamins [Noegel *et al.*, 1989] auch über das „Two-Hybrid“ System bestätigt werden.

Das „Two-Hybrid“ System erlaubt eine eingehende Charakterisierung der Dimerisierungsdomänen des Filamins. Bisherige biochemische und röntgenkristallographische Untersuchungen rekombinanter Polypeptide der IgG-ähnlichen Domänen des Filamins grenzen den Dimerisierungsbereich auf die C-terminale Domäne (Rod 6) ein, wobei der benachbarten Domäne 5 eine stabilisierende Rolle zugesprochen wird [Fucini *et al.*, 1999; McCoy *et al.*, 1999]. Die beiden Polypeptidketten liegen dabei in einer antiparallelen Anordnung vor, so dass sich die beiden Aktinbindedomänen des Filamin-Dimers an den entgegengesetzten Enden des Moleküls befinden. Um die Dimerisierungsfähigkeit der einzelnen Domänen des Filaminmoleküls im „Two-Hybrid“ System zu testen, wurden verschiedene Bereiche der Filamin-cDNA in den pAS2-Vektor kloniert.

Die dargestellten pAS2-Derivate zeigten mit Ausnahme von Rod 4 keine autokatalytische Aktivierung des LacZ-Reportergens. Die Deletionsmutanten Rod 1+2, Rod 1-3, Rod 3, Rod 3-6 und Rod 5+6 wurden im „Two-Hybrid“ Experiment gegen den Klon 2.565 (pACT2/Rod 1-6) getestet. In Kombination mit dem GAL4-AD-Rod 1-6 Fusionsprotein zeichneten sich Rod 1-6, Rod 3-6 und Rod 5+6 durch eine starke Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität aus. Somit konnte im „Two-Hybrid“ System die Dimerisierungsfähigkeit des Filamins auf die Domänen 5 und 6 eingegrenzt werden. Leider gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, die C-terminale Domäne 6 alleine auf ihre Fähigkeit zur Dimerisierung zu testen. Bei den Fragmenten Rod 1+2, Rod 1-3 und Rod 3 hingegen fand keine Aktivierung des LacZ-Reportergens statt (Abbildung 5). An der Dimerisierung ist also ausschließlich der C-Terminus beteiligt.

<u>Fragment</u>		<u>Aminosäuren</u>	<u>b-Galaktosidaseaktivität</u>
Rod 1-6		247 - 857	+++
Rod 1+2		243 - 454	-
Rod 1-3		243 - 587	-
Rod 3		473 - 587	-
Rod 4		543 - 653	autoaktivierend
Rod 3-6		441 - 857	+++
Rod 5+6		645 - 857	+++

**Abbildung 5 : Bestimmung der Dimerisierungsdomäne des Filamins.** +++ bezeichnet eine positive Interaktion im „Two-Hybrid“ Versuch mit pACT2/ Rod 1-6, - bezeichnet das Fehlen einer Interaktion.

### 1.7 Filamin interagiert mit einer unbekanntem Sequenz (Klon 2.618)

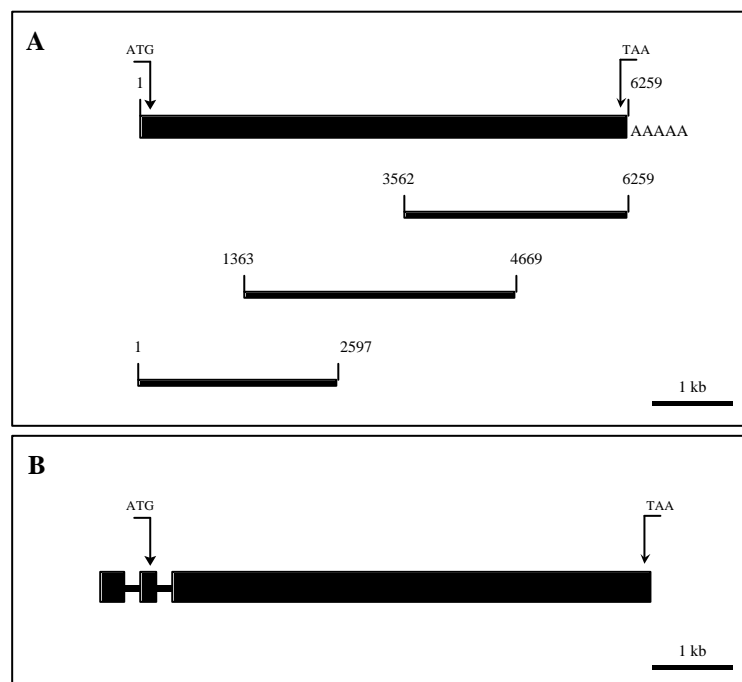
Das zweite bei der Durchmusterung der „Two-Hybrid“-Banken gefundene Beuteplasmid enthält eine cDNA mit einer Länge von 2688 Basenpaaren. Die Sequenz enthält einen offenen Leserahmen, der für ein Protein mit 876 Aminosäuren codiert. Der C-Terminus dieses Proteins ist in dem GAL4-AD-Fusionsprotein vollständig vorhanden, der N-Terminus hingegen fehlt. Computer unterstützte DNA- und Proteindatenbank-Durchmusterungen mit dem Programm „BLAST“ [Altschul *et al.*, 1997] ließen keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinen oder DNA-Sequenzen aus *D. discoideum* oder anderen Organismen erkennen. Es handelt sich also um ein bislang nicht beschriebenes Protein, das „Filamin-interagierendes-Protein“, FIP, genannt wurde.

## 2. Charakterisierung des Filamin-interagierenden Proteins, FIP

### 2.1 Analyse des FIP-Gens

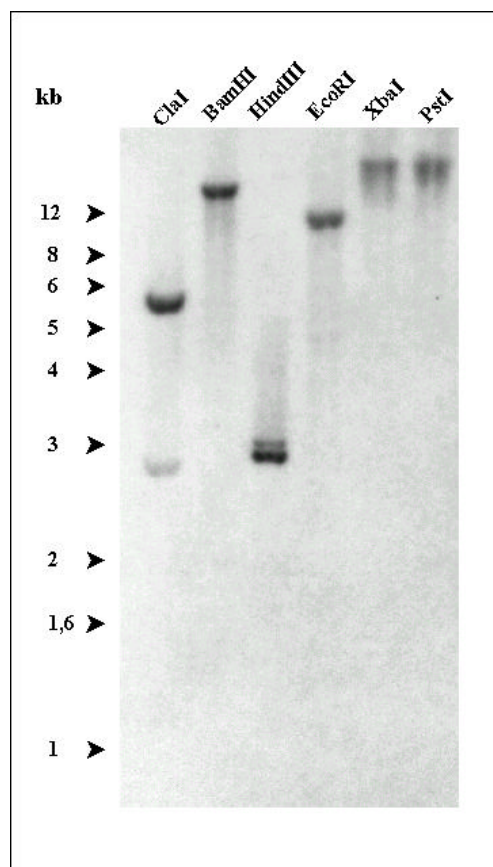
Zur Analyse des neuen Filamin-interagierenden Proteins wurde zunächst seine cDNA-Sequenz vervollständigt. Dazu wurde eine *D. discoideum*  $\lambda$ ZAP cDNA-Bank mittels Filterhybridisierung durchmustert. Aus insgesamt drei überlappenden Klonen konnte eine cDNA-Sequenz von 6234 Basenpaaren zusammengesetzt werden, die einen offenen Leserahmen von 6126 Basen enthält (Abbildung 6A). In der 5'-nichtkodierenden Region liegt vor dem mutmaßlichen Startkodon ein Stoppkodon im gleichen Leserahmen und die 3'-nichtkodierende Sequenz enthält ein Polyadenylierungssignal und eine Poly-A Sequenz.

Ein Sequenzvergleich mit der Datenbank des *D. discoideum* Genomprojektes zeigt das Vorhandensein von zwei Introns in der genomischen FIP-Sequenz auf. Die Position des ersten Introns mit einer Länge von 89 Basenpaaren befindet sich noch vor dem Startmethionin. Das zweite Intron von 85 bp Länge beginnt hinter der Position 116 der cDNA-Sequenz (Abbildung 6B). Das FIP-Gen ist auf dem Chromosom 2 lokalisiert.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der FIP-DNA.** (A) Zusammensetzen der FIP-cDNA aus drei einzelnen Sequenzen. Die Zahlen bezeichnen jeweils das erste und letzte Basenpaar einer Sequenz. (B) Schematische Darstellung der genomischen Struktur der FIP-DNA. Die dünner gezeichneten Bereiche geben die Intronsequenzen wieder.

Die Southern-Blot-Analyse (Abbildung 7) genomischer Ax2-DNA bestätigt das Vorhandensein eines einzelnen FIP-Gens im *D. discoideum* Genom. Zur Hybridisierung der Membran wurde ein 2,7 kb großes Fragment vom 3'-Ende des Gens verwendet. Innerhalb dieses DNA-Bereiches liegen je eine Schnittstelle der Restriktionsendonukleasen ClaI und HindIII, so dass bei diesen Verdauungen jeweils zwei Signale entstehen. Die BamHI-Schnittstelle im FIP-Gen liegt außerhalb des als Probe verwendeten DNA-Fragmentes und die Enzyme EcoRI, XbaI und PstI besitzen keine Konsensussequenzen im Gen. Das erklärt das Auftreten von jeweils nur einem Signal in diesen Spuren.

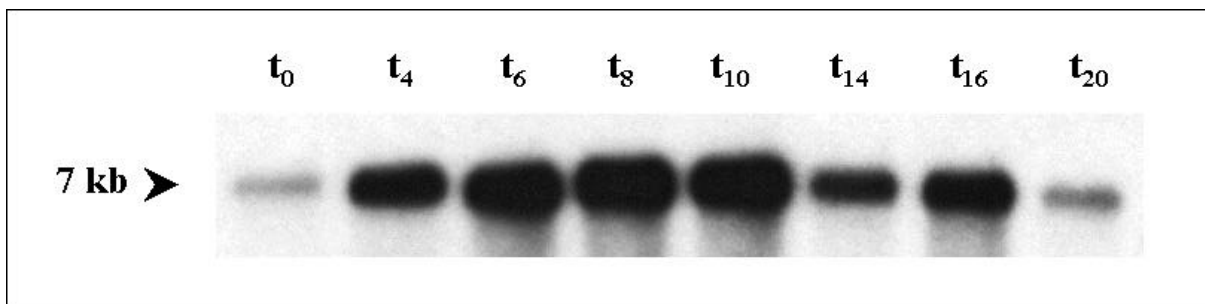


**Abbildung 7: Charakterisierung des FIP-Gens durch Southern-Blot-Analyse.** *D. discoideum* Ax2-DNA wurde mit den über der jeweiligen Spur angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Zur Hybridisierung diente das 2,7 kb große 3'-Ende der FIP-cDNA.

## 2.2 Nachweis FIP-spezifischer mRNA während der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*

Nahrungsentzug startet in *D. discoideum* Amöben ein Entwicklungsprogramm, das innerhalb von 24 Stunden zur Ausbildung eines multizellulären Organismus führt. Durch die Aggregation von Zellen bildet sich ein Pseudoplasmodium und die Zellen differenzieren zu prä-Stiel- und prä-Sporen-Zellen. In der anschließenden Kulminationsphase bildet sich der Fruchtkörper, der die Sporen trägt.

Isolierte Gesamt-RNA von Ax2-Zellen aus der Wachstumsphase ( $t_0$ ) und verschiedener Entwicklungsstadien ( $t_4$ - $t_{20}$ ) wurde nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nylonmembran übertragen, immobilisiert und mit dem 2,7 kb großen 5'-Ende der FIP-cDNA hybridisiert (Abbildung 8). Im vegetativen Zustand von *D. discoideum* ist nur eine geringe Menge RNA vorhanden. Die Expression steigt jedoch in der frühen Entwicklungsphase, in der die Zellen aggregieren ( $t_4$ ), stark an und bleibt bis zur Differenzierung in prä-Stiel- und prä-Sporen-Zellen ( $t_{16}$ ) auf diesem Niveau. Zum Abschluß der Entwicklung der Fruchtkörper sinkt die Transkriptmenge wieder auf ein niedriges Niveau. Das schwächere Signal bei  $t_{14}$  ist auf eine geringere Menge geladener RNA zurückzuführen, die durch eine Kontrollhybridisierung mit Myosin-DNA bestätigt wurde. Dieses Ergebnis deutet auf eine Funktion des FIP sowohl während der Aggregation als auch bei der Slug- und Fruchtkörperbildung hin.



**Abbildung 8: Expression der FIP-mRNA während des Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum*.** Ax2-Zellen wurden auf Phosphatagarplatten entwickelt, die Zellen zu den angegebenen Zeiten geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Je 30  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Biodyne-Membran transferiert, markiert und autoradiographiert. Zur Hybridisierung diente das 2,7 kb große 5'-Ende der cDNA.

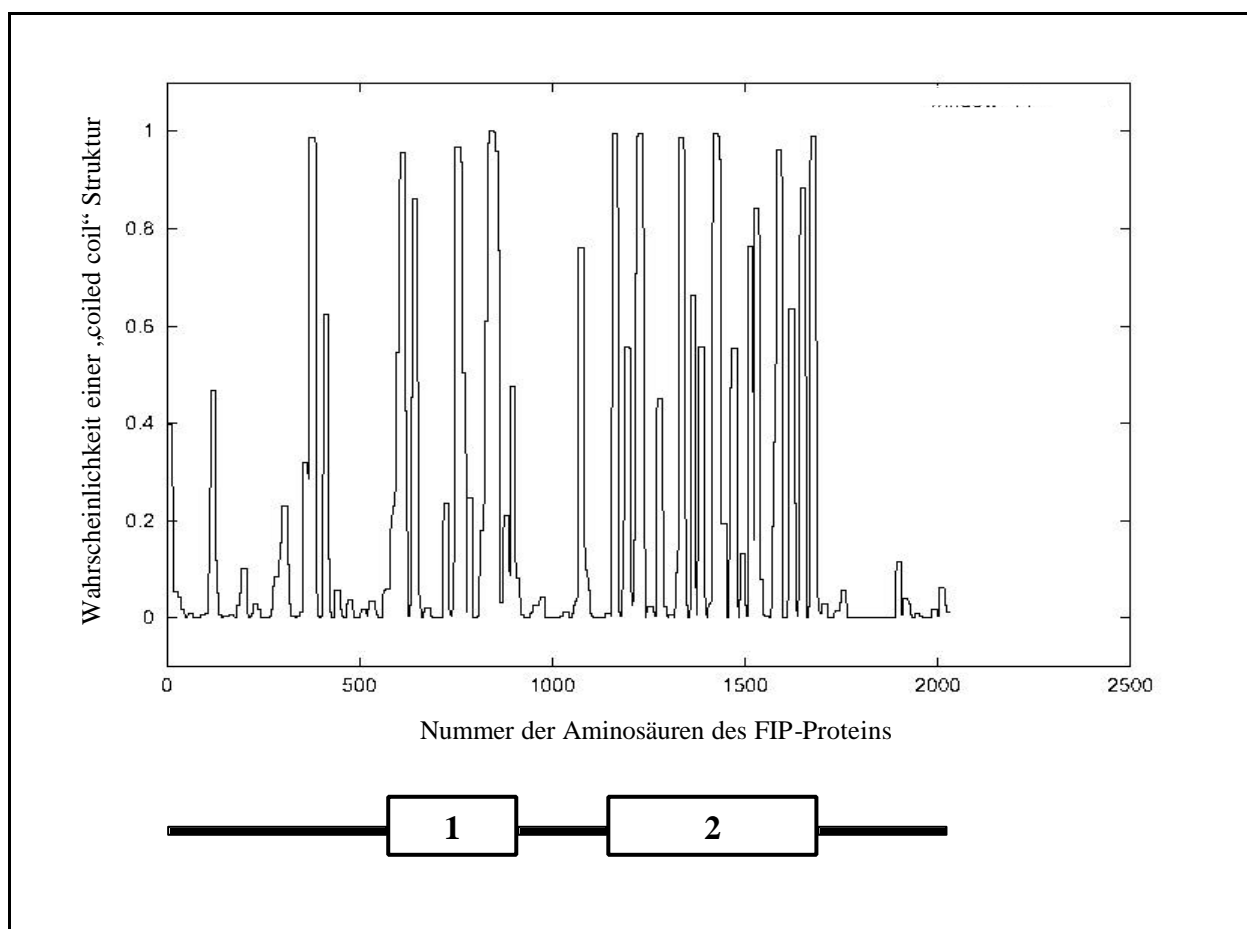
## 2.3 Charakterisierung von FIP

Die Translation der FIP-cDNA führt zu einem aus 2038 Aminosäuren bestehenden Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 229.799,3 Da und einem theoretischen isoelektrischen Punkt von 5,46 (Abbildung 9).

MLEQLSENVS QLILTVLELK DKNANL	PVVE VTAIANAASS ISDIAIKLAD AEYSNYPSIY NEIINTTNTM STIKKTTIDC	80
IANFQTTTNK QLSWSNLIQS CKNIANETYK ILKVIYDADI KRLKHLIETC KNQFKNNENS FGMIDREEFN GFGELVNQTI		160
SNLIEYSSCL EVKAKENQLS SPLQNQFIDD DDDDIKLSQ QLVEDANRLI DIVNDIFSDL DDPSQKQKFI NHQNSLLNQL		240
NHTFNLIQTN SPTLSLPEFT NVNNYIQSPI PSQYSTSNIK TIYNDNNSN NNNNNNSIEI NNEINNNNI DKNENNNLLN		320
DLIRGISKSC IEELRAACRG DPMATETISN SIQQLIPILN DTLNQHKN NNINKNEKEI LEKSINKLKN DLIQKYIQSA		400
TLVTRSSGNQ NVKNDEINKM IEGLESIQDC LNSIDGIVST KEDQFLNAIK AKEDVLTILS DHSIANNTQA IVGTLKHLAK		480
NQHQIEALIT STSTTPDDN NNNNNSSINP EINEAVSKLS ELLPLQIQAA KLYLKDSTNL ENRKQFTDIS NSMKLPLSKI		560
QSLMEPSTIS DSNELLSKQE NSSNQVLLNN INNNSNNNNN NNIEENSKLI DKLLKDLEND NANLVGLIES ELVLSNDTLL		640
KEFVKKTIDQ LLKEVQNRD IGMNFKSKSP FDKDVKQEFK KSNQLISDLS KSLIDCLKSF EVVPLLKLQL LNCHPQSVTP		720
NSPKLQSTQK DINNRINSII YNYKDQMLDQ PLIENQIKQL ESYQNQLNQE LSKDLNGSKD NLSYILDNII NNISNLSNLP		800
SSSTNDGGG GRQVPIPIEN LNDEIIDGIN EEINKEIIE NKENEIKRDN ERLEELKQLE NLSNDQKLLK LFNLDLIQYLK		880
NNEANKSVVT LKQLIGEODK LIQIGNEIKQ NSNSQDFKDQ IDSSINLFKN SSSSIALAG KTAKINDDPQ LTKACKTVKK		960
SIIELTRLK LNPLIEELSS YQALLKPH PINENIKGF KEHQINSRY YIETAYQVGD DLISQSIEKI VYQSELLKL		1040
ASNHLTSKEV SETLDPNIQL LLANSLETVK KSIVDQVEAA LSFLESEKSD DQIEKLLTIL DTVSEVDNC SKSIFPATGK		1120
GKQQQDLSP TISQNTIKQS INSIPTLTL QATQLQSNPN DKELEKHHQ LLDQIIQPLE QLILNPNIQ IIDKENIENN		1200
NNNNNDNNN NNDDDDDEE DKKIKKLIND EKKELDKLES NALDSDSKGV VESSRSLVKL HQEILSLADS LTSSTAVLID		1280
ANQNNADFER NLIKECSKE LSTLIPLQL TIKSMLQSKD IPTEASYQK VGFINNQIKR NLNEIEKQSS NNSNRYKLIS		1360
KTPYSDQFK KLSNKIDNNG MLIKDENQFK VNLKRLEKLA GKCIDSSNFD LSRQOSYLDK ERQQRIRDAI NKLENKLNK		1440
NNDSTDDLSN KINQYLKQPL NPISREQFEK VRSQFQOTLD NLINEQLSTP LQLLNHSNL IQKLSRSTQ QPINNNNNAN		1520
NNVKIQETK KILENYSKLL QQLINNDIKL NESKKLIIGK SLKEIETLTP QLIVASNNCL NDNNDQKKR ELLENLQTKI		1600
ESPIYEILNQ LDSIDPIFOF KNAIKQYQAT LKLNDSIDV STVTNDSKQ IDEYISKLSN LQSNHLIPLL KQQGLNEKEL		1680
KEFESQLKSK LSDVNSISKD YLKNLQSKL TDTIKAEK	DM SSSLCNLI SIQSINQPKI EDNRIKLSQS SQSKSDIKQ	1760
LVDSIKSNL LPIVESPNKI ERYVSIQTNS TKPIFSSSSS NNGKIISTAQ VNYKPRSSSQ PQKPII	INTN NITITKPIRP	1840
IETRVPIKLT TQPQSTNPKT VPPTTTTTTE ATTTATKPIP NKTPQPIPTF KPSDKGASLE DSCINAANQM SNISGNEQLG		1920
TIGKELEYA NAIKIGDKKQ ILLCGRNISI LLNKYSTEVN NNIKSTPTSN KMLQTRCSHG IGVLTQLSCQ FKILSSVAAA		2000
SDEKSDSDS QLTSMVNQLT STLLDLNTST STLNKFKK		2038

**Abbildung 9: Aminosäuresequenz des Filamin-Interagierenden Proteins.** Die cDNA-Sequenz des FIP sagt ein Protein mit 2038 Aminosäuren voraus. Die beiden möglichen Leucin-Reißverschluss-Motive sind einfach eingerahmt und die Filamin-Bindesequenz doppelt eingerahmt dargestellt. Die vermutlichen superspiralisierten Domänen sind unterstrichen.

Computerunterstützte Analysen der Sekundärstruktur [Geourjon und Deléage, 1995] sagen einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Helix (56%) und ungeordneter Struktur (30%) voraus. Der vorhergesagte Anteil von 10%  $\beta$ -Faltblatt und 4%  $\beta$ -Schleifen an der Sekundärstruktur des FIP ist dagegen gering. Strukturvorhersagen mit dem COILS Algorithmus [Lupas *et al.*, 1991] definieren für den Bereich der Aminosäurepositionen 603 bis 904 bzw. 1217 bis 1733 jeweils eine superspiralisierte Domäne. Diese Domänen bestehen aus helikalen Bereichen (20-100 AS), die immer wieder von kurzen Bereichen ungeordneter Sekundärstruktur (5-25 AS) unterbrochen werden (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Graphische Darstellung der Wahrscheinlichkeit einer superspiralisierten Struktur des FIP.** Die Matrix MTIDK des COILS Algorithmus, Version 2.1, [Lupas *et al.*, 1991] wurde mit einer Fenstergröße von 14 angewendet. Hohe Wahrscheinlichkeitswerte werden vor allem in den Bereichen zwischen Aminosäure 603 und 904 bzw. 1217 und 1733 erreicht und definieren je eine „coiled coil“ Region. Die postulierte Domänenstruktur des FIP ist graphisch dargestellt.

Am Anfang und am Ende der FIP-Proteinsequenz befindet sich jeweils ein als Leucin-Reißverschluss bezeichnetes Motiv von je 21 Aminosäuren Länge. Bei Leucin-Reißverschlüssen handelt es sich um amphipathische Helices mit der Aminosäure Leucin an jeder

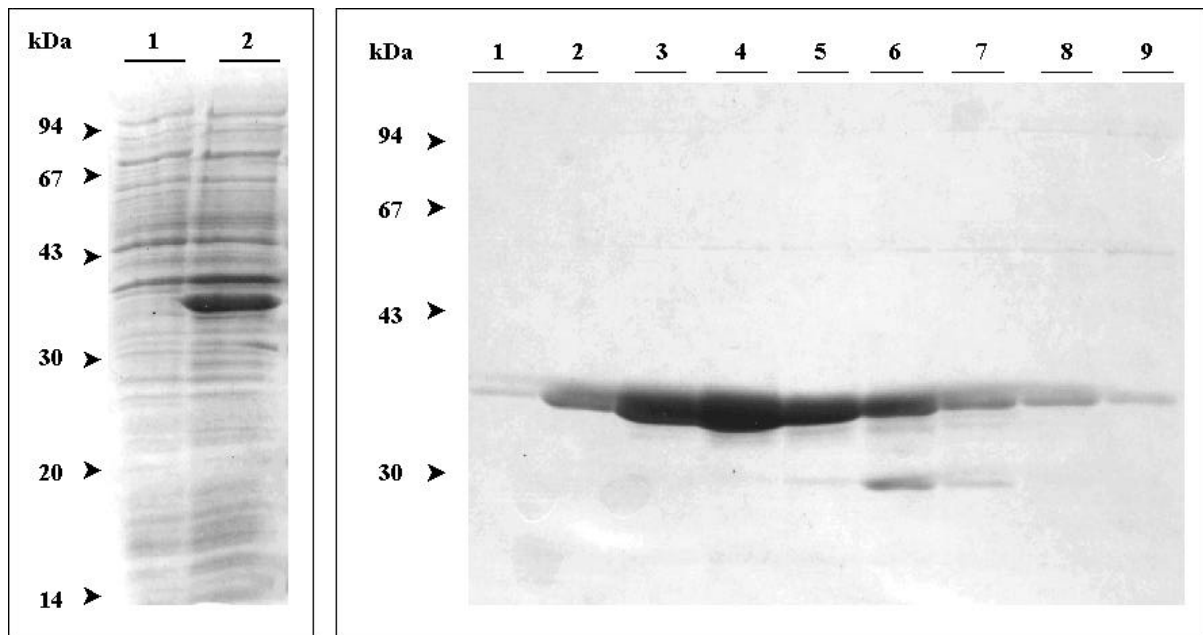


siebten Position. Durch diese regelmäßige Anordnung weisen die Seitenketten der Leucine alle in eine Richtung. Dadurch können diese Seitenketten zweier Reißverschluss-Motive durch hydrophobe Wechselwirkungen in Kontakt treten und die Dimerisierung von Proteinen vermitteln. Da für FIP je am Anfang und am Ende der Sequenz ein solches Motiv vorhergesagt wird, könnte das Protein zur Bildung von Homo- oder Heterodimeren befähigt sein. Als zweite Möglichkeit könnten die Leucin-Reißverschlüsse aber auch intramolekular miteinander wechselwirken und so zur Stabilisierung der Tertiärstruktur des FIP beitragen.

Computer unterstützte Protein-Datenbank-Durchsuchungen mit dem „BLAST“-Programm [Altschul *et al.*, 1997] zeigen nur niedrige Homologien der superspiralisierten Domänen des FIP zu bekannten Proteinen auf. Die größte Ähnlichkeit besteht zur superspiralisierten Rod-Domäne des Interaptin, eines Aktin-bindenden Proteins aus *Dictyostelium discoideum* [Rivero *et al.*, 1998]. Sie ist jedoch mit einem Anteil von 22% identischen und 42% ähnlichen Aminosäuren innerhalb der homologen  $\alpha$ -helikalen Bereiche eher gering. Auch alle anderen als homolog eingestuften Proteine haben selber eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur. Die geringen Ähnlichkeiten der Primärstrukturen sind somit auf dieses gemeinsame Sekundärstrukturelement zurückzuführen. Für die anderen Bereiche der FIP-Sequenz wurden keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen festgestellt. Es handelt sich bei FIP also um ein bislang nicht beschriebenes Protein.

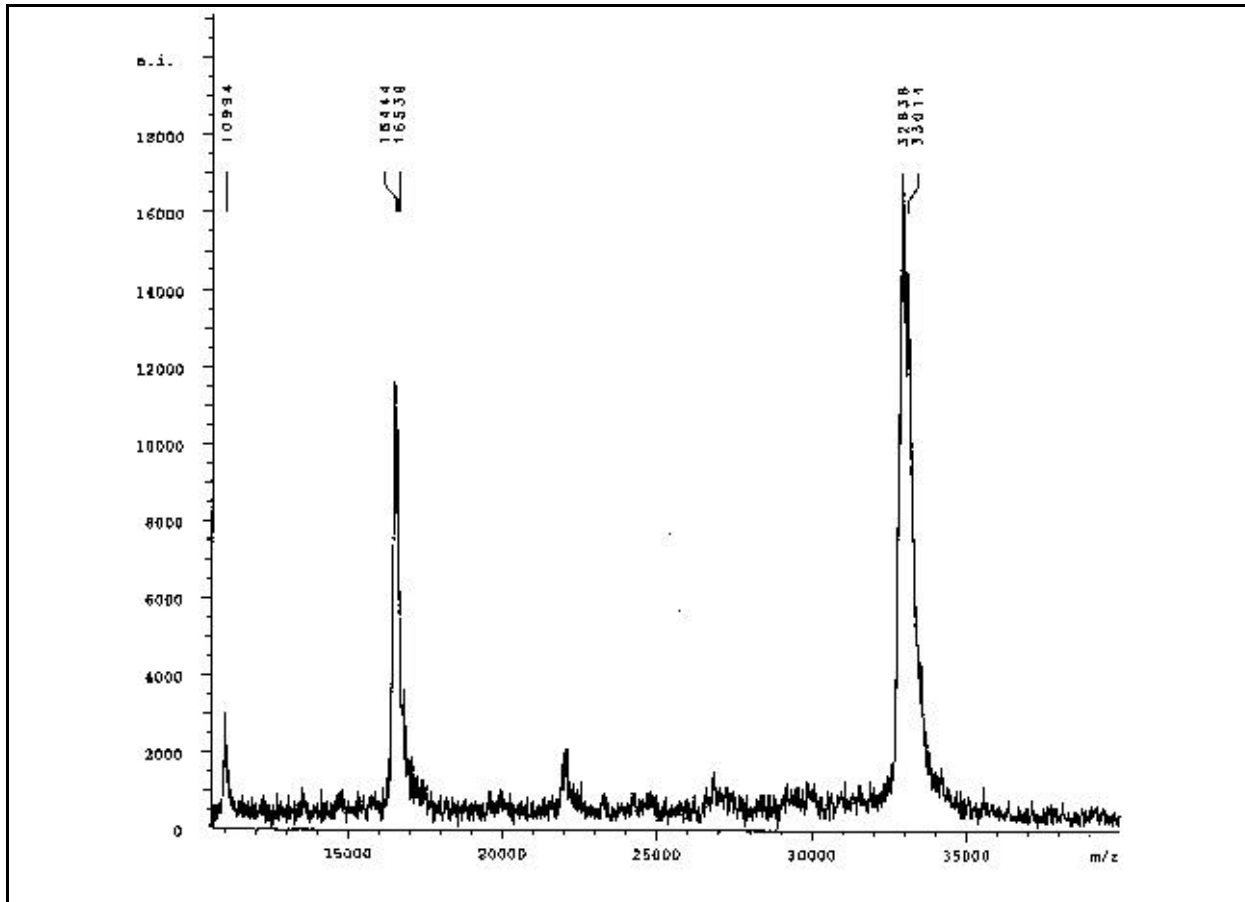
## 2.4 Rekombinante Expression und Aufreinigung eines Teilstücks des FIP-Proteins

Als Grundlage für weitergehende *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen wurde ein Teilstück des FIP im Vektor pT7-7/FIP in *E. coli* exprimiert (Abbildung 11, links). Das Polypeptid umfasst die Aminosäuren 1612 bis 1907 des Proteins. Es enthält mit Ausnahme des Startmethionins keine zusätzlichen Vektorsequenzen. Der theoretische isoelektrische Punkt des Polypeptids liegt auch unter Einbezug sämtlicher Cysteine bei einem pH-Wert von 9,92 im basischen Bereich. Das rekombinante Protein ist löslich. Zur Reinigung wurde eine Kationenaustauscher-Chromatographie bei einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt. *E. coli* selbst besitzt unter diesen Bedingungen nur wenige positiv geladene Proteine, so dass mit diesem einzigen Reinigungsschritt eine für biochemische Analysen ausreichende Reinheit des exprimierten FIP-Teilstücks erreicht werden konnte (Abbildung 11, rechte Seite).



**Abbildung 11: Expression und Reinigung des exprimierten FIP-Polypeptids.** (*links*) Gesamtzellprotein nicht induzierter (Spur 1) und mit IPTG induzierter (Spur 2) *E. coli* BL21-Zellen wurde in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. (*rechts*) Elutionsprofil einer BioRad Uno™ S Kationenaustauschersäule. Die Fraktionen wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Fraktionen 2 bis 5 wurden für die weiterführenden biochemischen Experimente eingesetzt.

Die Identität des exprimierten und gereinigten Polypeptids wurde durch eine Edman-Sequenzierung überprüft. Die sequenzierten zehn Aminosäuren (MDSIDPIFQF) entsprachen dem erwarteten N-Terminus des rekombinanten Proteins. Zusätzlich wurde eine massenspektrometrische Analyse des gereinigten Polypeptids durchgeführt. Das theoretisch berechnete Molekulargewicht des FIP-Teilstückes liegt bei 32.940 Da. Im MALDI-Massenspektrum der Substanz (Abbildung 12) erkennt man in diesem Massenbereich bei 32.838 Da und 33.014 Da zwei Signale. Da bei der Sequenzierung der N-Terminus der Substanz intakt vorgefunden wurde, deutet die Heterogenität bei der massenspektrometrischen Analyse evtl. auf einen Unterschied im Bereich des C-Terminus hin. Eine Analyse der Faltung des Polypeptids durch eindimensionale  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ergab nur einen Anteil von 15 – 20% in definierter Struktur vorliegende Substanz. 80 – 85% bestanden aus einer ungeordneten Konformation.



**Abbildung 12: MALDI-Massenspektrum des gereinigten FIP-Polypeptids.** Matrix: Sinapinsäure, Messbedingungen: Beschleunigungsspannung 20 kV, Detektorspannung 0,85 kV, Suppression bis 2000 (max), PIE 16,5 kV, Vakuum 1,8E-8 mbar, Kalibrierung: Carbonic Anhydrase (extern).

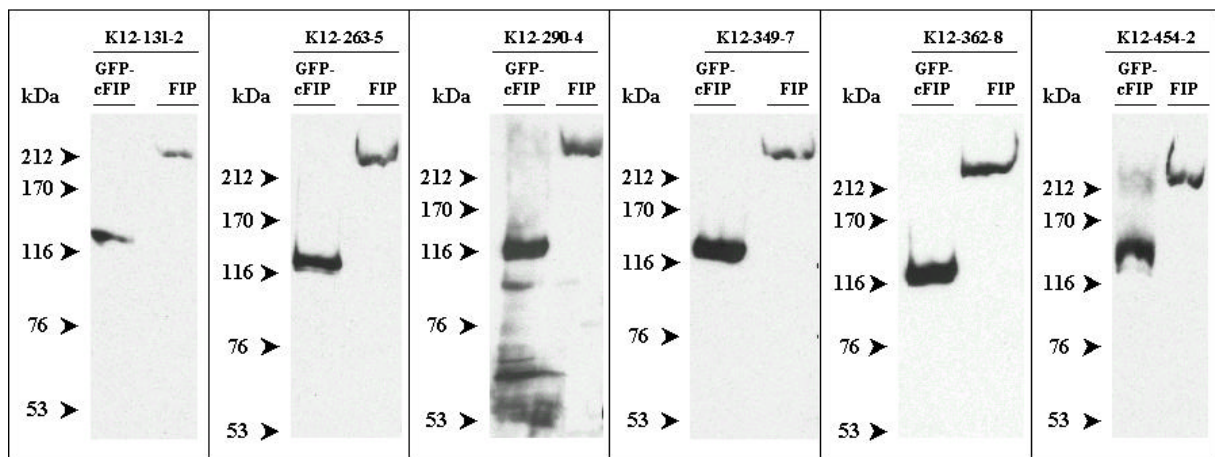
## 2.5 Darstellung monoklonaler Antikörper gegen den exprimierten Teilbereich des Filamin-Interagierenden-Proteins

Das rekombinante Protein (AS 1612-1907) wurde für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet. Die verschiedenen Hybridomaüberstände wurden zuerst im Enzymimmunoassay<sup>2</sup> gegen gereinigtes rekombinantes FIP-Polypeptid und danach im Immunoblot gegen Gesamtzellprotein FIP exprimierender *E. coli* Zellen getestet. Hybridomazellen, deren Überstände zu einem Signal führten, wurden kloniert. Die Überstände der klonierten Zellen wurden nochmals im Immunoblot getestet, wobei insgesamt sechs Zelllinien isoliert und konserviert wurden, die mit rekombinantem FIP-Polypeptid reagierten (K12-131-2, K12-263-5, K12-290-4, K12-349-7, K12-362-6 und K12-454-2).

Reaktion und Spezifität der sechs Antikörper wurde im Immunoblot mit *D. discoideum* Zellextrakten getestet. Dafür wurden sowohl Extrakte von für 15 Stunden auf

<sup>2</sup> engl. ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

Phosphatagarplatten entwickelten Ax2-Zellen als auch Extrakte GFP-cFIP Fusionsprotein exprimierender Zellen (siehe Kapitel B.4) elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit den Hybridomaüberständen inkubiert. Endogenes FIP und GFP-cFIP wurden von allen sechs Antikörpern erkannt (Abbildung 13). Die Reaktion des K12-131-2 ist allerdings schwächer als die der anderen Antikörper und K12-290-4 zeigt Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen. Zur weiteren Charakterisierung (Tabelle 5) wurden die über Protein A Sepharose gereinigten Antikörper K12-263-5 und K12-454-2 auf ihre Fähigkeit untersucht, endogenes FIP aus Proteinextrakten zu präzipitieren. Beide Antikörper sind dazu in der Lage. In indirekten Immunfluoreszenzuntersuchungen wird das GFP-cFIP Fusionsprotein von allen sechs Antikörpern (siehe Abbildung 28, Seite 46), endogenes FIP jedoch nur von gereinigtem K12-454-2 markiert (Abbildung 16, Seite 30).



**Abbildung 13: Reaktion der FIP-Antikörper im Immunoblot von *D. discoideum* Ax2- und GFP-cFIP-Extrakten.** Gesamtprotein von je  $1 \times 10^6$  GFP-cFIP exprimierender Zellen (jeweils links) oder 15 Stunden auf Phosphatagar entwickelter Ax2-Zellen (jeweils rechts) wurde in einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit den angegebenen FIP-Antikörpern inkubiert. Die Bindung wurde über einen an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper und anschließende ECL-Reaktion nachgewiesen.

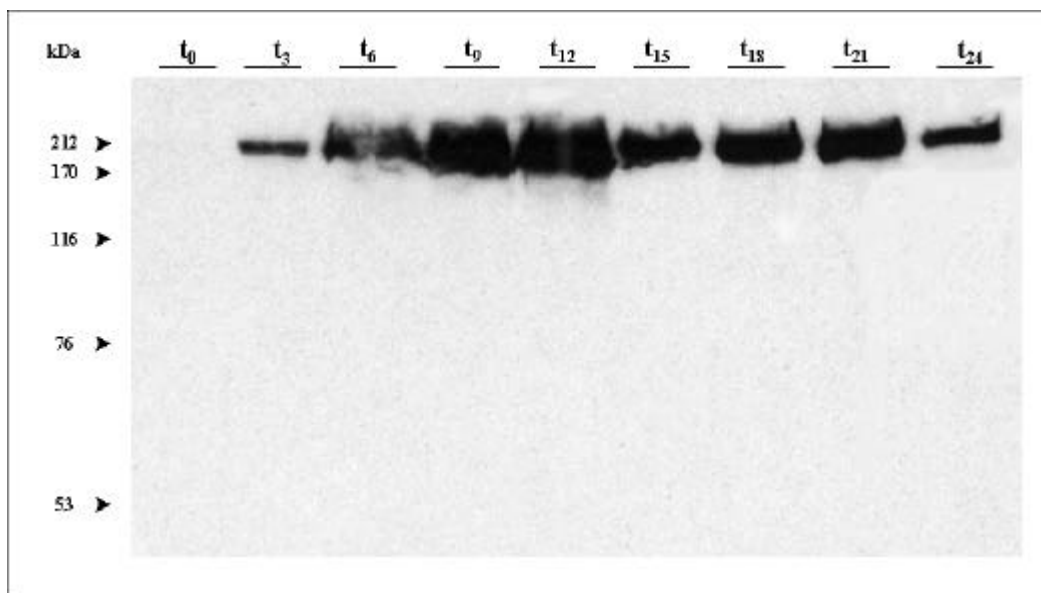
**Tabelle 5: Charakterisierung der FIP-Antikörper.**

Reaktion	K12-131-2	K12-263-5	K12-290-4	K12-349-7	K12-362-6	K12-454-2
WB rek. Protein	+++	+++	+++	+++	+++	+++
WB GFP-cFIP	+	+++	+ <sup>KR</sup>	+++	+++	+++
WB endogenes FIP	+	+++	+ <sup>KR</sup>	+++	+++	+++
Immunpräzipitation	ng	+++ <sup>g</sup>	ng	ng	ng	+++ <sup>g</sup>
Immunfluoreszenz GFP-cFIP	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Immunfluoreszenz endogenes FIP	-	- <sup>g</sup>	-	-	-	+ <sup>g</sup>

Legende: WB – Westernblot, KR – Kreuzreaktionen, ng – nicht getestet, g – über Protein A Sepharose gereinigter Antikörper, +++ bezeichnet eine stark positive Reaktion, + bezeichnet eine schwach positive Reaktion, - bezeichnet eine nicht detektierte Reaktion des Antikörpers.

## 2.6 Nachweis der Expression des FIP-Proteins während der Entwicklung von *D. discoideum*

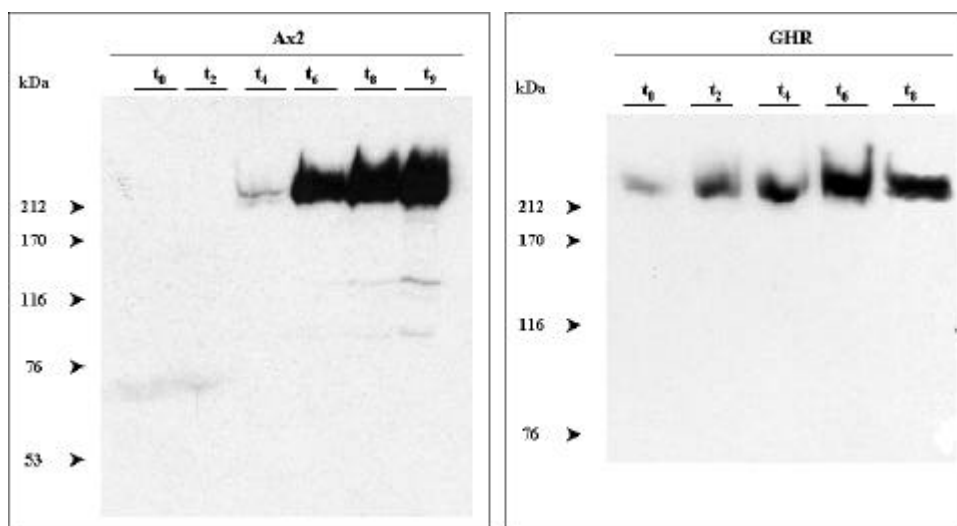
Die anti-FIP Antikörper (Kapitel B.2.5) ermöglichen eine Analyse des endogenen Filamin-interagierenden Proteins in *D. discoideum* Proteinextrakten. Da bei der Analyse der FIP-mRNA (Kapitel B.2.2) eine Entwicklungsregulation der RNA festgestellt wurde, wurde auch die Proteinexpression zu verschiedenen Zeiten des Entwicklungszyklus betrachtet. Der Antikörper K12-454-2 erkennt bei der Immunmarkierung von Gesamtzellprotein spezifisch ein Protein, dessen molekulare Masse von ca. 230.000 mit der aus der Sequenz des FIP abgeleiteten theoretischen Masse übereinstimmt. Im vegetativen Stadium von *D. discoideum* ( $t_0$ ) sind nur sehr geringe Mengen FIP-Protein vorhanden. Schon nach drei Stunden Entwicklung auf Phosphatagar erkennt man einen Anstieg der Proteinmenge. Die maximale Expression wird zum Abschluss der Aggregation nach ca. neun Stunden Entwicklung erreicht. Während der Migrations- und Kulminationsphase ( $t_{12}$ - $t_{21}$ ) die bleibt Proteinmenge auf einem konstant hohen Niveau. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Expression der mRNA und bekräftigt eine Funktion des FIP bei der Aggregation und Ausbildung der Fruchtkörper der *D. discoideum* Zellen.



**Abbildung 14: FIP-Expression während der Entwicklung von *D. discoideum* auf Phosphatagar.** Ax2-Zellen wurden auf Phosphatagarplatten entwickelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Gesamtzellproteine von je  $1 \times 10^6$  Zellen pro Zeitpunkt wurden elektrophoretisch in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis des FIP erfolgte mit dem Antikörper K12-454-2 und die Bindung wurde über die ECL-Reaktion des als sekundären Antikörper eingesetzten an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörpers detektiert.

Der Entzug der Nahrungsquelle induziert auch bei in Schüttelkultur gehaltenen *D. discoideum* Zellen den Eintritt in den Entwicklungszyklus. Dabei werden die Entwicklungsstadien im Vergleich zur Entwicklung auf festem Untergrund mit zwei- bis dreifacher Geschwindigkeit durchlaufen. In Phosphatpuffer entwickelte Zellen bilden Aggregate, sind aber nicht in der Lage Fruchtkörper zu formen. Die Expression des FIP wurde bei in Schüttelkultur entwickelten Ax2-Zellen in einem Zeitraum von null bis neun Stunden untersucht (Abbildung 15). Im vegetativen Stadium ist kaum Protein vorhanden. Die Proteinmenge steigt nach vier Stunden leicht an und erreicht nach sechs bis acht Stunden ein Maximum.

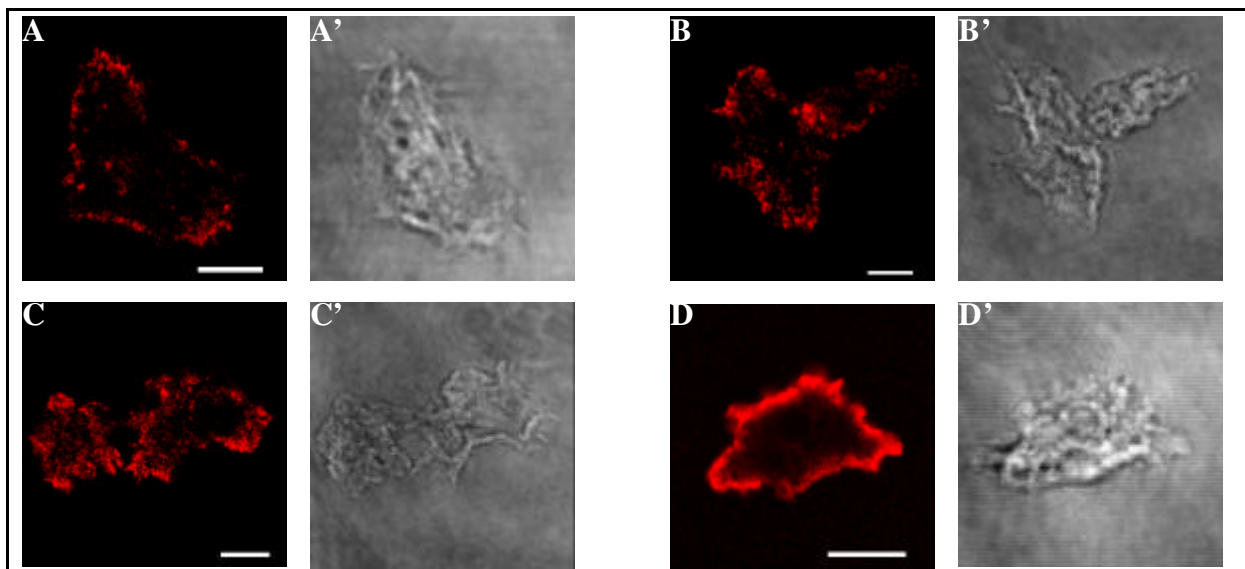
Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression des FIP und Filamin untersucht. Filamin wird in Ax2-Zellen konstitutiv in allen Entwicklungsstadien exprimiert. Für diese Untersuchung wurden Zellen der Filamin-defizienten Mutante GHR [Eichinger *et al.*, 1996] in Phosphatpuffer entwickelt und die Expression des FIP untersucht (Abbildung 15). Die Entwicklung von GHR-Zellen ist durch die Zerstörung des Filamin-Gens nicht beeinträchtigt. Im vegetativen Zustand dieser Zellen ist FIP stärker exprimiert als in Ax2-Zellen und der Anstieg der Proteinmenge bei der Entwicklung beginnt schon nach zwei Stunden. Weiterhin wird FIP in für acht Stunden in Schüttelkultur entwickelten GHR-Zellen nicht so stark exprimiert, wie in vergleichbaren Ax2-Zellen. Ob die beobachtete Veränderung des FIP-Gehaltes der GHR-Zellen gegenüber dem Wildtyp auf die Abwesenheit des Filamin zurückzuführen ist, bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.



**Abbildung 15: FIP-Proteinexpression während der Entwicklung von *D. discoideum* Ax2 (links) und GHR Zellen (rechts) in Schüttelkultur.** Die Zellen wurden auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in Phosphatpuffer eingestellt und für die angegebenen Zeiten bei 160 UpM geschüttelt. Zellen wurden geerntet und Gesamtzellprotein von je  $1 \times 10^6$  Zellen pro Zeitpunkt in einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran erfolgte der Nachweis mit dem FIP-Antikörper K12-454-2. Die Bindung wurde durch ECL-Reaktion des an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpers detektiert.

## 2.7 Intrazelluläre Lokalisation des Filamin-Interagierenden Proteins

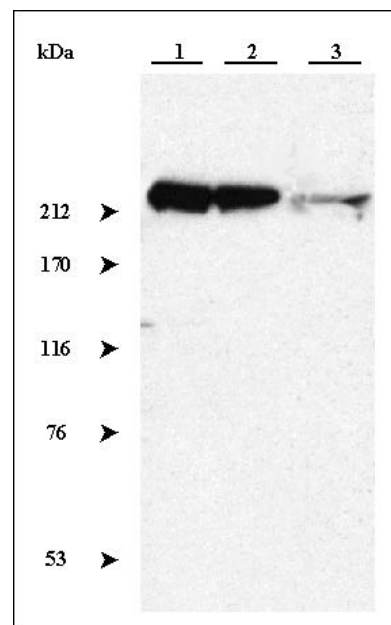
Die intrazelluläre Lokalisation des FIP wurde durch indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen mit anti-FIP Antikörpern bestimmt (Abbildung 16, A-C). Dabei wurden *D. discoideum* Zellen verwendet, die acht Stunden einem Nahrungsentzug auf Phosphatagarplatten ausgesetzt waren. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt wird das Protein vermehrt exprimiert. Die Ax2-Zellen wurden geerntet, die Aggregate in Einzelzellen resuspendiert und fixiert. Zur Fixierung wurde sowohl Methanol als auch ein Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Gemisch verwendet. Die Zellen wurden mit den Hybridomaüberständen der sechs FIP-Antikörper sowie den über Protein A-Sepharose gereinigten FIP-Antikörpern K12-263-5 und K12-454-2 inkubiert. Eine spezifische Bindung an zelluläre Strukturen war jedoch nur mit dem gereinigten Antikörper K12-454-2 in mit Paraformaldehyd /Pikrinsäure fixierten Zellen erkennbar. Der Antikörper K12-454-2 zeigt eine Lokalisation des FIP im Außenbereich der Zellen. Allerdings ist die Plasmamembran nicht durchgehend gefärbt. Man erkennt stark gefärbte Bereiche, die von nicht markierten Abschnitten unterbrochen sind. In den markierten Abschnitten der Plasmamembran zeigt der Antikörper eine punktierte Färbung, als sei FIP auch dort nur an sehr distinkten Bereichen der Membran lokalisiert. Eine andere Erklärung für diese Strukturen ist eine Assoziation des FIP mit vesikulären Strukturen, die zum größten Teil direkt an der Plasmamembran lokalisiert sind. Eine punktierte Färbung ist auch im Zytoplasma der abgebildeten Zellen zu erkennen.



**Abbildung 16: Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen zur Lokalisation des FIP-Proteins in Ax2-Zellen.** Acht Stunden auf Phosphatagar entwickelte Ax2-Zellen wurden geerntet, Aggregate resuspendiert und mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixiert. (A,B,C) Immunfärbung des anti-FIP-Antikörpers K12-454-2. (D) Immunfärbung des Filamin-Antikörpers 82-382-8. Zur Detektion diente ein an Cy3 gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper. (A',B',C',D') Phasenkontrastaufnahmen der Zellen. Maßstab; 5µm.

Da FIP nur an Filamin binden kann, wenn die beiden Proteine in den gleichen Kompartimenten der Zelle vorkommen, wurden auch mit dem anti-Filamin Antikörper 82-382-8 Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt (Abbildung 16, D). Filamin ist als ein Bestandteil des Aktin-Cortex direkt unter der Plasmamembran der Zellen lokalisiert. Eine Subpopulation des Filamins ist im Zytoplasma der Zellen verteilt [Cox *et al.*, 1995; Jungbluth *et al.*, 1994]. Die Lokalisation des Filamins ändert sich während der Entwicklung von *D. discoideum* nicht.

Die intrazelluläre Lokalisation legt eine Assoziation des FIP mit der Plasmamembran und vesikulären Membranen nahe. Deshalb wurde die Verteilung von FIP in Zellfraktionierungsexperimenten untersucht. Entwickelte Ax2-Zellen wurden durch dreimalige Passage eines Nuclepore-Filter geöffnet und das Zytoplasma durch Zentrifugation von der Membranfraktion getrennt. Die Membranfraktion wurde in einem Volumen aufgenommen, das dem des löslichen Anteils entsprach. Die Anwesenheit von FIP wurde im Immunoblot mit dem anti-FIP Antikörper K12-454-2 nachgewiesen (Abbildung 17). In Spur 1 ist FIP im Gesamtzellhomogenat nach dem Aufschluß zu sehen. Spur 2 enthält den zytosolischen Extrakt und Spur 3 die Membranfraktion.



**Abbildung 17: Verteilung von FIP bei Zellfraktionierungsexperimenten entwickelter *D. discoideum* Zellen.** Acht Stunden auf Phosphatagar entwickelte Ax2-Zellen wurden geerntet und durch dreimalige Passage eines Nuclepore-Filter geöffnet. Zytoplasma und Membranfraktion wurden durch Zentrifugation (100.000 x g, 1h, 4°C) getrennt. Nach der Zentrifugation wurde das Volumen des Überstandes bestimmt und die Membranfraktion im gleichen Volumen resuspendiert. Spur 1 zeigt FIP im Gesamtzellhomogenat vor der Trennung der Fraktionen. Spur 2 enthält die zytoplasmatische Fraktion und Spur 3 die Membranfraktion. Zur Detektion wurde der FIP-Antikörper K12-454-2 eingesetzt.



FIP befindet sich zum überwiegenden Anteil in der zytosolischen Fraktion und ist nur zu einem geringen Teil fest mit Membranen assoziiert. Die in der Immunfluoreszenz beobachtete Lokalisation des FIP an vesikulären Membranen oder direkt an der Plasmamembran kann damit nicht durch eine feste Assoziation mit diesen Membranen vermittelt werden. Vielmehr muss es sich um Wechselwirkungen handeln, die bei den Bedingungen des Aufschlusses zum größten Teil zerstört werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Analyse der Proteinsequenz des FIP. Es wurden aufgrund der FIP-Sequenz keine möglichen membranassoziierten oder Transmembrandomänen postuliert. Somit könnte die in der Immunfluoreszenz nachgewiesene Assoziation des FIP an die Plasmamembran über Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt werden, die den Bedingungen des Zellaufschlusses größtenteils nicht standhalten. Möglicherweise wird FIP über die Bindung an Filamin an die Plasmamembran rekrutiert.














### **3. Untersuchung der Interaktion zwischen Filamin und FIP**

#### **3.1 Eingrenzung der Bindungsdomänen zwischen Filamin und FIP durch das „Two-Hybrid“ System**

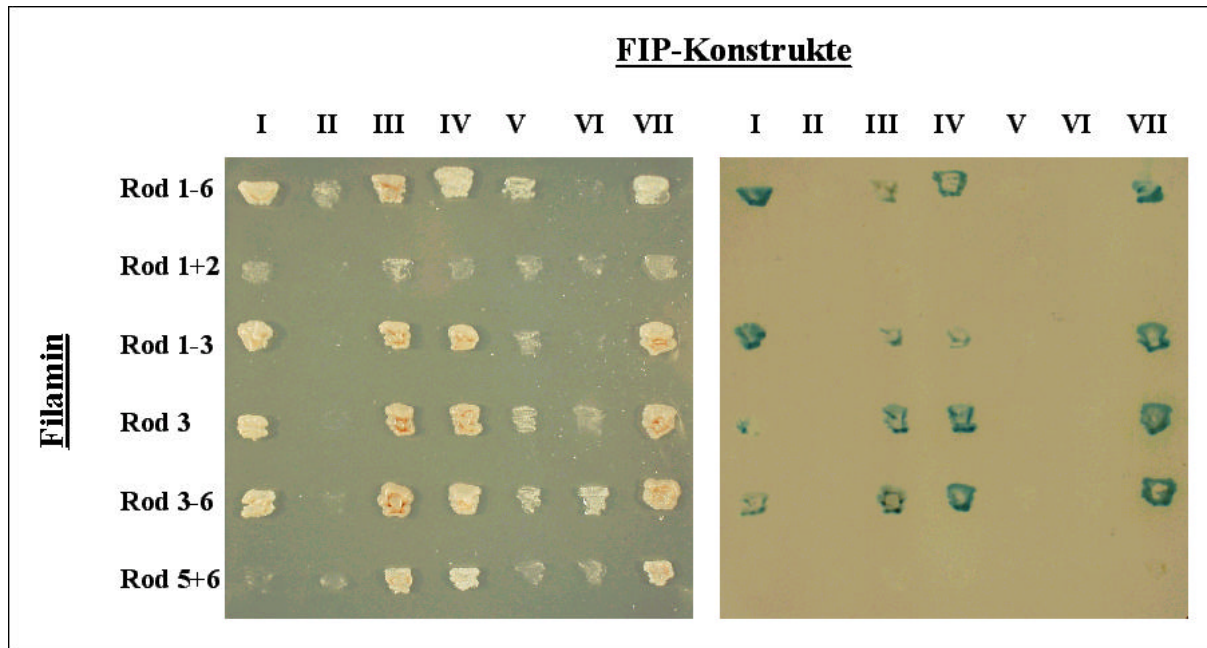
Das „Two-Hybrid“ System bietet die Möglichkeit, die Bindungsdomänen zweier miteinander interagierender Proteine einzuengen. Dabei wird die Aktivierung der Reportergene durch Fusionsproteine, die nur Teilbereiche oder einzelne Domänen der interagierenden Proteine enthalten, getestet [Fields und Sternglanz, 1994]. Zur Eingrenzung desjenigen Bereichs des Filamins, der an FIP bindet, wurden die bereits zum Nachweis der Dimerisierungsdomäne des Filamins verwendeten Fusionen der verschiedenen IgG-ähnlichen Domänen mit der GAL4-DNA-bindenden Domäne eingesetzt (siehe Kapitel B.1.6). Zur Eingrenzung des Filaminbindebereichs in FIP wurden verschiedene FIP-Deletionsmutanten in Fusion mit der GAL4-Aktivierungsdomäne hergestellt. Dabei wurde die Länge der Deletionsmutanten schrittweise aufgrund der „Two-Hybrid“ Ergebnisse verringert.

Nachdem zunächst die Autoaktivierung der Reportergene ausgeschlossen worden war, wurde jedes der sieben FIP-Fusionsproteine gegen die sechs vorhandenen Filamin-Konstrukte im „Two-Hybrid“ Experiment getestet. Dabei wurde die Filamin-domäne Rod 3 als Bindungsstelle für FIP identifiziert und der Filamin-Bindebereich des FIP auf die Aminosäuren 1719 bis 1826 eingegrenzt (Abbildung 18 und Abbildung 19). Dieser Bereich von FIP beinhaltet den Übergang der postulierten zweiten superspiralisierten Domäne zur

C-terminalen Domäne. Auffällig an diesem Teil der FIP-Sequenz ist ein hoher Anteil der Aminosäure Serin. Der Serin-Anteil an der gesamten Primärsequenz beträgt ca. 10%. In den 107 Aminosäuren der Filamin-Bindedomäne ist der Serin-Anteil mit 22% mehr als doppelt so hoch. Besonders auffallend ist ein Motiv, das neben fünf Serinen die Aminosäuren Lysin und Glutamin enthält (KLSQSSQSKSK; AS 1746-1757) und eine Abfolge von fünf Serinen hintereinander (AS 1796-1801). Die Filamin-Bindedomäne der FIP-Sequenz hat eine basische Aminosäurezusammensetzung (theoretischer pI= 9,81), Rod 3 weist dagegen einen pI-Wert im sauren Bereich auf (pI=4,50). Die Interaktion der beiden Bindungspartner könnte somit durch Säure-Base-Wechselwirkungen vermittelt werden. Da aber die Wiederholungseinheiten 1 bis 5 alle einen pI-Wert zwischen 4,0 und 4,8 besitzen, lässt sich die spezifische Interaktion zwischen FIP und Rod 3 allein durch die pI-Werte nicht erklären. Bei Oberflächenanalysen aufgrund der bekannten Sekundärstruktur der Filamin-Domänen fällt Rod 3 gegenüber den anderen Einheiten durch eine deutlichere Trennung der positiven und negativen Ladungen auf der Oberfläche auf [Fucini, 1997]. Möglicherweise interagiert der basische Bereich des FIP mit diesem negativ geladenen Oberflächenbereich des Rod 3.

<u>Filamin-domänen</u>	<u>Ergebnis</u>	<u>FIP-Konstrukte</u>	<u>Ergebnis</u>
Rod 1-6 	+++	I 	+++
Rod 1+2 	-	II 	-
Rod 1-3 	+++	III 	+++
Rod 3 	+++	IV 	+++
Rod 3-6 	+++	V 	-
Rod 5+6 	-	VI 	-
		VII 	+++

**Abbildung 18: Bestimmung der Bindungsbereiche zwischen Filamin und FIP.** Die Zahlen an den schematischen Darstellungen der FIP-Konstrukte bezeichnen die erste und letzte Aminosäure bezogen auf den im „Two-Hybrid“ Experiment gefundenen Klon (Konstrukt I). +++ bezeichnet eine positive Interaktion im „Two-Hybrid“ Experiment mit pAS2/Rod 1-6 für die FIP-Konstrukte und pACT2/FIP-Konstrukt I für die Filamin-domänen. – steht für das Fehlen einer Interaktion.



**Abbildung 19: Wachstumsselektion (links) und b-Galaktosidasetest (rechts) der verschiedene Filamin- und FIP-Fusionsproteine exprimierenden Hefen.** Die Hefezellen enthalten das an der jeweiligen Zeile genannte GAL4-BD-Filamin-Fusionsprotein und das über der jeweiligen Spalte beschriebene GAL4-AD-FIP-Teilstück. Die Tests wurden mit jeweils fünf unabhängigen Transformanten durchgeführt.

### 3.2 Verifizierung der Interaktion durch *in vitro* Untersuchungen

Obwohl das „Two-Hybrid“ System eine sehr erfolgreiche Methode zum Nachweis neuer Protein-Protein-Interaktionen darstellt, ist eine alleinige „Two-Hybrid“ Untersuchung noch kein hinreichender Beweis für eine Bindung zweier Proteine unter *in vivo* Bedingungen. Als Grund dafür ist z. B. eine unterschiedliche Kompartimentierung der beiden möglichen Bindungspartner, die eine Interaktion rein räumlich unmöglich macht, zu nennen. Ebenso können im „Two-Hybrid“ Experiment im Zellkern der Hefezellen evtl. Proteine anders gefaltet vorliegen, so dass die Bindungsdomänen unter *in vivo* Bedingungen gar nicht zugänglich sind, sondern im Inneren des Moleküls liegen. Aufgrund dessen muss die im „Two-Hybrid“ Experiment entdeckte Bindung von *D. discoideum* Filamin an das neue Filamin-interagierende-Protein durch unabhängige Untersuchungen bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden Enzymimmunoassays, „Blot-Overlay“ Untersuchungen und Koimmunpräzipitationen mit rekombinanten Polypeptiden und *D. discoideum* Zellextrakten durchgeführt.

### 3.2.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Teilstücke des Filamin-Proteins

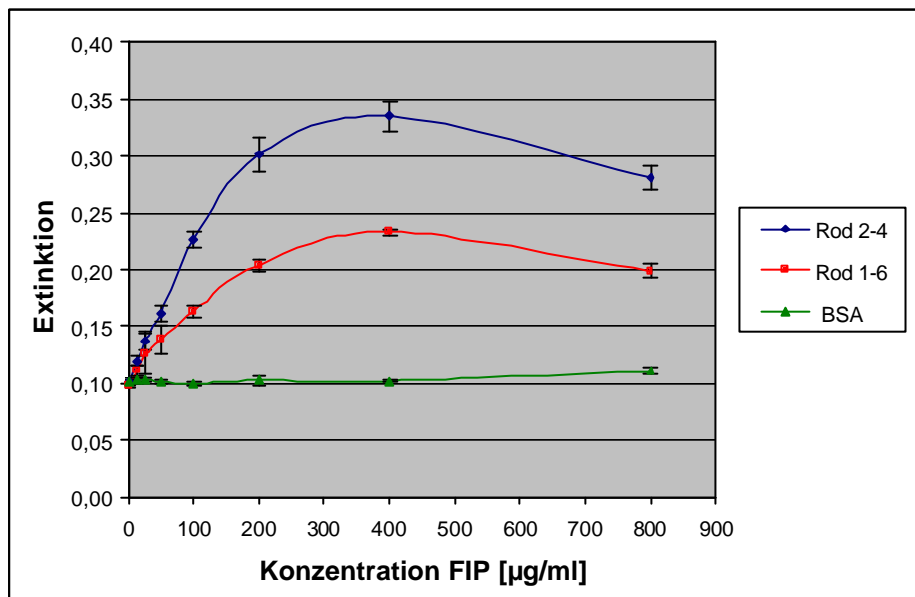
Für die *in vitro* Untersuchungen der Bindung zwischen Filamin und FIP wurden zwei verschieden große Bereiche der elongierten Domäne von Filamin in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Der Expressionsvektor pROD1-6, der die Sequenzinformation für die 601 C-terminalen Aminosäuren des Filaminproteins trägt, wurde bereits von **B. Köppel** beschrieben [B. Köppel, 1994]. Das Polypeptid Rod 1-6 repräsentiert die gesamte elongierte Untereinheit des Filamins mit Ausnahme der ersten neun Aminosäuren der ersten IgG-ähnlichen Domäne. Das Polypeptid Rod 2-4 enthält die Einheiten zwei bis vier des Filaminmoleküls. Am N-Terminus dieses Polypeptids sind zusätzlich neun durch den Expressionsvektor kodierte Aminosäuren und die letzten zehn Aminosäuren der ersten IgG-Domäne von Filamin vorhanden. Der C-Terminus des Polypeptids besteht aus den ersten zehn Aminosäuren der Untereinheit fünf.

### 3.2.2 Nachweis der Interaktion zwischen Filamin und FIP durch Enzymimmunoassays

Festphasen-Enzymimmunoassays stellen neben ihrer Anwendung zum direkten Antigen-Antikörper Nachweis eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen dar [Loo *et al.*, 1998; Takafuta *et al.*, 1998]. Dabei wird der erste Bindungspartner in gereinigter Form durch direkte Adsorption an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgt die Inkubation dieser Oberfläche mit dem zweiten Bindungspartner. Dabei kann es sich entweder um ein gereinigtes Protein oder um einen Proteinrohextrakt entsprechender Zellen handeln. Zum Nachweis des zweiten Bindungspartners dient ein Antikörper gegen das Protein. Dieser Antikörper wird wiederum von einem geeigneten enzymgekoppelten sekundären Antikörper erkannt. Die Reaktion des an den Antikörper gekoppelten Enzyms mit seinem Substrat führt zu einem Produkt, dessen Konzentration photometrisch bestimmbar ist. Als Kontrolle der Bindungsspezifität der beiden Partner sollten anstelle des ersten Bindungspartners andere Proteine an die feste Phase adsorbiert und äquivalent behandelt werden. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Enzymimmunoassays wurde stets Rinderserumalbumin als Kontrollprotein verwendet.

### 3.2.2.1 Rekombinante FIP- und Filamin-Polypeptide binden in Enzymimmunoassays aneinander

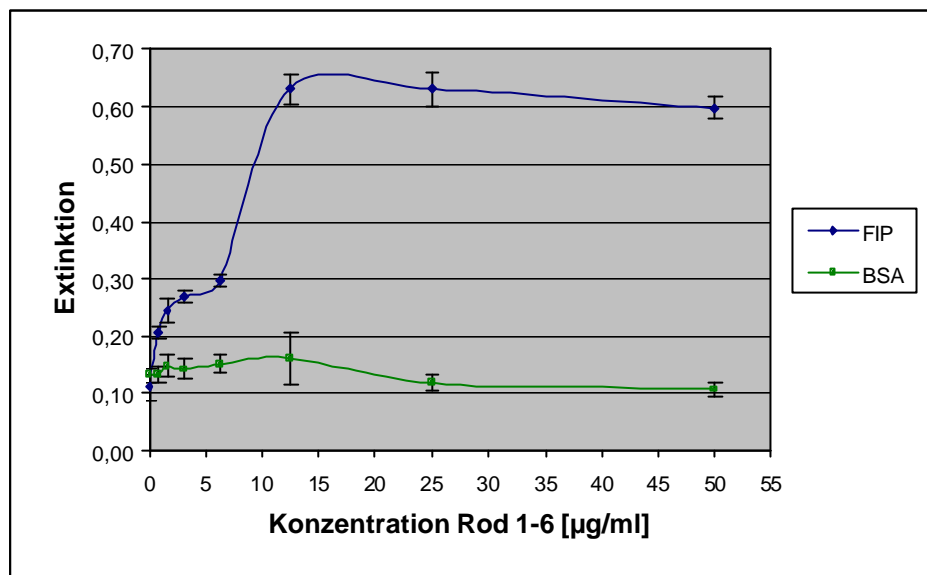
Enzymimmunoassays zum Nachweis der Interaktion rekombinanter Filamin- und FIP-Polypeptide wurden in verschiedenen Kombinationen durchgeführt. Sowohl Rod 1-6 als auch Rod 2-4 wurden in einer Konzentration von 50 µg/ml an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden und mit Konzentrationen von 0 bis 800 µg/ml des rekombinanten FIP-Polypeptids (siehe Kapitel B.2.4) inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte über den monoklonalen anti-FIP Antikörper K12-362-6 (Abbildung 20). Als Kontrolle einer unspezifischen Bindung des rekombinanten FIP-Polypeptids wurden Löcher einer Mikrotiterplatte mit BSA beschichtet und analog behandelt.



**Abbildung 20: Enzymimmunoassay zum Nachweis der Bindung zwischen Filamin und FIP.** Rekombinantes Rod 1-6, Rod 2-4 oder BSA wurden mit einer Konzentration von 50 µg/ml an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert und mit 0-800 µg/ml FIP-Polypeptid inkubiert. Der Bindungsnachweis erfolgte über den monoklonalen FIP Antikörper K12-362-6 und anschließende Farbreaktion des an alkalische Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörpers. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von sechs unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus den Standardabweichungen der Messwerte.

Man erkennt eine spezifische Bindung des FIP-Polypeptids an beide verwendeten Filamin-Teilbereiche. In beiden Fällen ist die Bindung durch den Zusatz von 1% BSA bei der Inkubation des FIP-Peptides nicht zu behindern. Beide Wechselwirkungen sind konzentrationsabhängig und streben gegen eine Sättigungskonzentration von ca. 300-400 µg FIP-Polypeptid pro Milliliter.

Alternativ wurde das rekombinante FIP-Teilstück mit einer Konzentration von 10 µg/ml an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert, mit aufsteigenden Mengen (0-50 µg/ml) von Rod 1-6 inkubiert und über den monoklonalen Filamin Antikörper 82-382-8 nachgewiesen. Da keiner der vorhandenen Filamin Antikörper ein Epitop im Bereich des Polypeptids Rod 2-4 erkennt, konnte Rod 2-4 bei dieser Versuchsanordnung nicht eingesetzt werden. Als Kontrolle einer unspezifischen Bindung wurde wiederum BSA verwendet (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Enzymimmunoassay mit adsorbiertem FIP-Polypeptid zum Nachweis der Bindung zwischen Filamin und FIP.** Rekombinantes FIP-Polypeptid wurde mit einer Konzentration von 10 µg/ml an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden und mit 0-50 µg/ml gereinigtem Rod 1-6 inkubiert. Der Nachweis erfolgte über den monoklonalen anti-Filamin Antikörper 82-382-8. Die Bindung wurde über die Farbreaktion des an alkalische Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörpers nachgewiesen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von sechs unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus den jeweiligen Standardabweichungen der Messwerte.

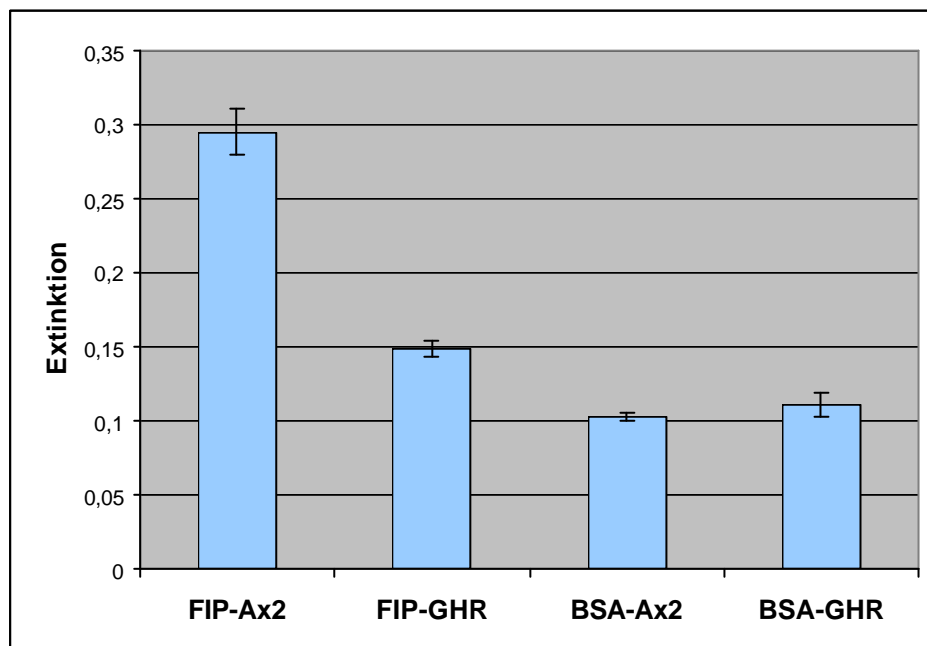
Die Bindung der rekombinanten FIP- und Filamin-Polypeptide ist auch bei dieser Versuchsanordnung spezifisch und konzentrationsabhängig. Sie ist durch den Zusatz von 1% BSA nicht zu blockieren und strebt gegen eine Sättigungskonzentration von ca. 10-15 µg Rod 1-6 pro Milliliter. Die unterschiedlichen Konzentrationen bei der Kopplung der FIP- oder Filamin-Polypeptide sowie die unterschiedlich hohen Extinktionswerte resultieren wahrscheinlich aus einer unterschiedlichen Affinität der FIP- und Filamin Antikörper zu ihrem jeweiligen Antigen.

Durch diese Enzymimmunoassays konnte die spezifische Bindung des im „Two-Hybrid“ System eingegrenzten Bindungsbereichs des FIP-Proteins an *D. discoideum* Filamin auf der Ebene rekombinanter Polypeptide bestätigt werden.

### 3.2.2.2 Filamin aus *Dictyostelium discoideum* Extrakten bindet an rekombinantes FIP-Polypeptid in Enzymimmunoassays

Zum Nachweis der Bindung von endogenem Filamin aus *D. discoideum* Zellen an das rekombinante FIP-Polypeptid im Enzymimmunoassay wurden Proteinextrakte dieser Zellen hergestellt. Dafür wurden  $2 \times 10^8$  Ax2-Zellen durch Passage durch einen Nuclepore-Filter aufgeschlossen und die zytoplasmatische Fraktion durch Zentrifugation von unlöslichen Bestandteilen getrennt. Filamin befand sich bei dieser Zentrifugation im Überstand. Zur Kontrolle der spezifischen Bindung des Filamins an das FIP-Polypeptid diente ein Aufschluß von Zellen der *D. discoideum* Mutante GHR [Eichinger *et al.*, 1996], die kein endogenes Filamin exprimieren.

Im Festphasenimmunoassay wurden FIP-Polypeptid oder BSA mit einer Konzentration von 10 µg/ml an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert. Beide Proteine wurden sowohl mit dem Zytosol von Ax2- als auch von GHR-Zellen inkubiert. Der Bindungsnachweis erfolgte über den monoklonalen anti-Filamin Antikörper 82-382-8 (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Interaktion von Filamin aus *D. discoideum* Extrakten mit rekombinantes FIP-Polypeptid im Enzymimmunoassay.** Rekombinantes FIP-Polypeptid bzw. BSA wurde mit einer Konzentration von 10 µg/ml an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden und mit Proteinextrakt aus *D. discoideum* Ax2- oder GHR-Zellen inkubiert. Der Nachweis erfolgte über den monoklonalen anti-Filamin Antikörper 82-382-8 und Farbreaktion des an alkalische Phosphatase gekoppelten zweiten Antikörpers. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus den jeweiligen Standardabweichungen der Messwerte.

Die Kontrolle mit BSA zeigt bei beiden Zellextrakten eine etwa gleich hohe Extinktion. Bei adsorbiertem FIP-Peptid steigt die Extinktion bei GHR-Zellextrakt nur leicht gegenüber dem BSA-Wert an. Wurde jedoch Ax2-Extrakt auf adsorbiertes FIP-Polypeptid aufgebracht, resultierte eine zweifach erhöhte Extinktion. Endogenes Filamin aus *D. discoideum* Extrakten bindet demnach im Enzymimmunoassay an rekombinantes FIP-Polypeptid.

### **3.2.3 Verifikation der Filamin-FIP-Interaktion durch „Blot-overlay“ Untersuchungen**

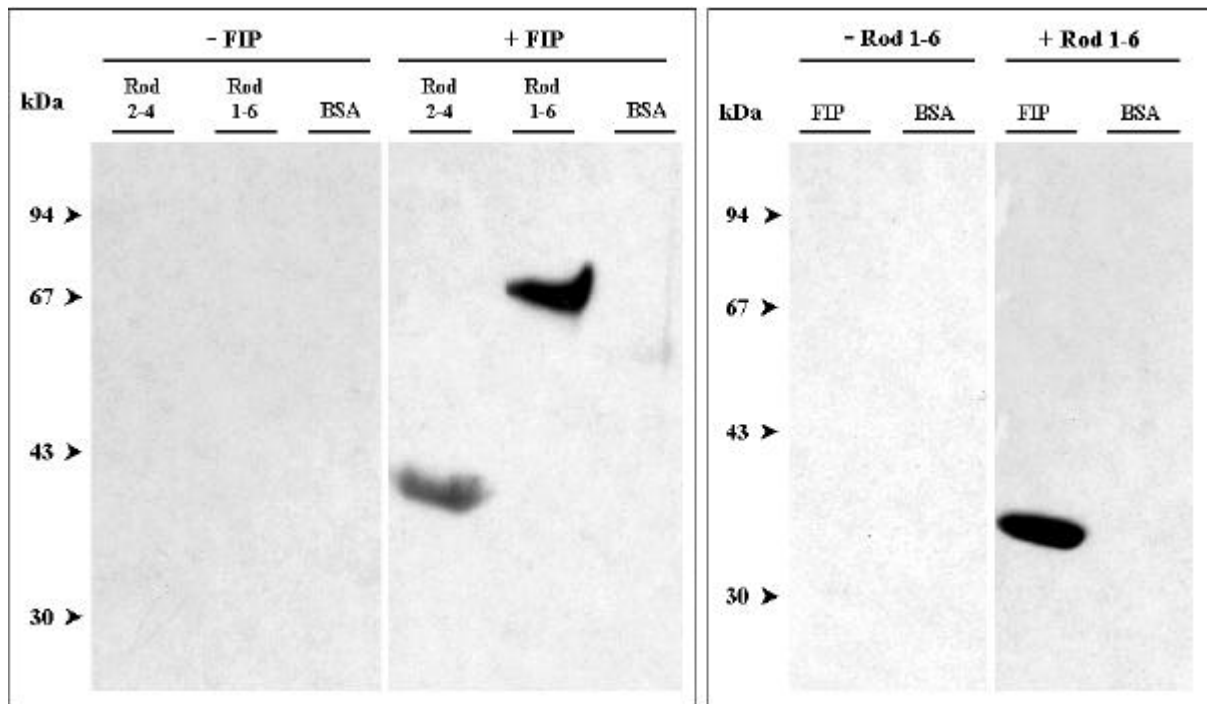
Bei „Blot-overlay“ Untersuchungen werden gereinigte Proteine oder Proteinextrakte aus Zellen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Membranen transferiert. Diese Membranen werden mit einer Proteinlösung inkubiert. Dabei binden Proteinmoleküle aus der Lösung an ihre auf der Membranoberfläche immobilisierten Bindungspartner und lassen sich durch Immunmarkierung mit geeigneten Antikörpern nachweisen [Faulkner *et al.*, 2000]. Als Kontrollprotein wurde Rinderserumalbumin verwendet.

#### **3.2.3.1 „Blot-overlay“ Studien mit rekombinanten FIP- und Filamin-Polypeptiden**

Sowohl Rod 1-6 als auch Rod 2-4 wurden auf Nitrozellulosemembran immobilisiert und mit gereinigtem rekombinatem FIP-Polypeptid inkubiert. Der FIP Antikörper K12-454-2 zeigt eine spezifische Bindung des FIP an die beiden rekombinanten Filamin-Proteine (Abbildung 23, links). BSA als Kontrollprotein wird vom FIP-Polypeptid nicht gebunden und es ist keine Kreuzreaktion des FIP-Antikörpers mit den immobilisierten Filamin-Polypeptiden nachweisbar.

Alternativ wurde rekombinantes FIP-Polypeptid auf der Membran immobilisiert und mit einer Rod 1-6 Lösung behandelt. Auch in dieser Versuchsanordnung ließ sich eine spezifische Interaktion des Rod 1-6 mit dem FIP-Peptid bestätigen. In Kontrollexperimenten mit BSA wurde die Spezifität der Reaktion bestätigt.



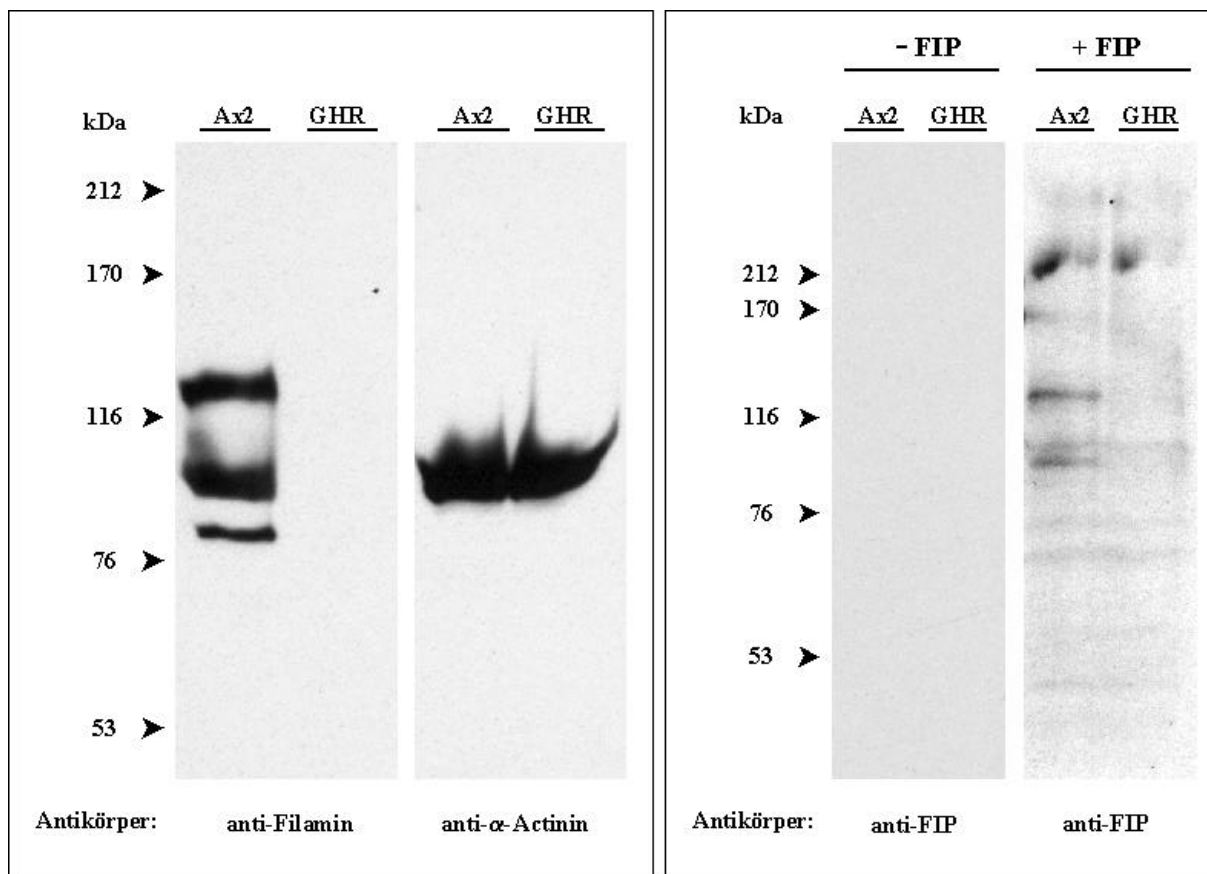


**Abbildung 23:** „Blot-overlay“ Assay mit rekombinanten FIP- und Filamin-Polypeptiden. Die Polypeptide wurden in 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. (links) FIP bindet spezifisch an die immobilisierten Filamin-Domänen Rod 1-6 und Rod 2-4. Der FIP-Nachweis erfolgte mit dem Antikörper K12-454-2 gegen FIP. (rechts) Rod 1-6 interagiert mit immobilisiertem FIP-Polypeptid. Zur Detektion von Rod 1-6 wurde der anti-Filamin Antikörper 82-382-8 eingesetzt. Als Bindungsnachweis diente die ECL-Reaktion des zweiten, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers.

### 3.2.3.2 FIP-Polypeptid bindet an Filamin aus *Dictyostelium discoideum* Extrakten in „Blot-overlay“ Untersuchungen

In diesem Test wurden Gesamtproteinextrakte von *D. discoideum* Ax2- und GHR-Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einer FIP-Polypeptidlösung inkubiert (Abbildung 24). Zunächst wurde Filamin im Immunoblot nachgewiesen. Endogenes Filamin aus Ax2-Extrakten ist sehr empfindlich für proteolytischen Abbau. Der anti-Filamin Antikörper erkennt daher in diesem Extrakt neben dem Filamin-Signal bei 120 kDa noch zwei weitere Signale bei niedrigeren molekularen Massen (ca. 100 und 80 kDa) (Abbildung 24, links). Der GHR-Extrakt ist Filamin-frei. Der Kontrolle der geladenen Proteinmengen diente eine Immunmarkierung mit dem anti- $\alpha$ -Actinin Antikörper 47-60-8. Im „Blot-overlay“ Versuch (Abbildung 24, rechts) erkennt der anti-FIP Antikörper im Ax2-Extrakt an Filamin gebundenes FIP-Polypeptid (120 kDa). Weiterhin interagiert das FIP-Peptid mit dem Filamin-Abbauprodukt bei ca. 100 kDa. In dem Filamin-freien GHR-Extrakt sind diese Signale nicht zu beobachten. Diese Kontrolle bestätigt die Interaktion des FIP-Polypeptids mit endogenem Filamin aus *D. discoideum* Ax2-Zellen. Zusätzlich wurde

eine Kontrolle der Spezifität des anti-FIP Antikörpers durchgeführt (-FIP). Der Antikörper erkennt ohne vorherige Inkubation der Membran mit dem FIP-Polypeptid keine Signale. Da es sich bei den Extrakten um Zellen aus dem vegetativen Stadium von *D. discoideum* handelt, sind nur geringe Mengen endogenes FIP vorhanden, die nicht detektiert werden. In der „Blot-Overlay“ Untersuchung erkennt man jedoch ein zusätzliches Signal bei ca. 230 kDa in beiden Proteinextrakten. Möglicherweise bindet das rekombinante FIP-Polypeptid an endogenes FIP und verstärkt so die Reaktion des Antikörpers. Dies wäre ein erster experimenteller Hinweis auf eine in Kapitel B.2.3 aufgrund von Strukturvorhersagen diskutierte Dimerisierung des FIP. Es könnte sich aber ebenfalls um einen weiteren Bindungspartner des FIP-Polypeptids handeln.



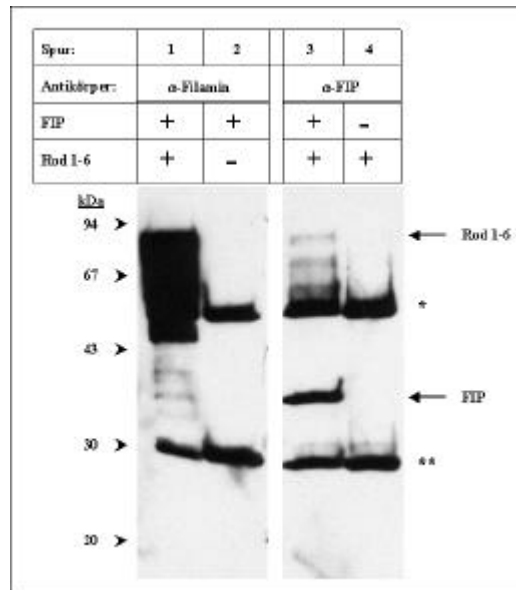
**Abbildung 24:** „Blot-overlay“ Untersuchung mit rekombinantem FIP-Polypeptid auf Gesamtzellprotein-homogenaten. Gesamtzellprotein von je  $1 \times 10^6$  Ax2- oder GHR-Zellen pro Spur wurde in einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. (*links*) Der anti-Filamin Antikörper 82-382-8 erkennt Filamin (120 kDa) und Abbauprodukte im Ax2-Extrakt. GHR-Extrakt enthält kein Filamin. Der anti- $\alpha$ -Actinin Antikörper bestätigt, dass gleiche Mengen Protein ( $1 \times 10^6$  Zellen/Spur) geladen wurden. (*rechts*) „Blot-overlay“ Assay mit FIP-Polypeptid auf Zellextrakten von Ax2- und GHR-Zellen. FIP bindet spezifisch an Filamin (120 kDa) und ein Filamin-Abbauprodukt (ca. 100 kDa) im Zellextrakt von Ax2-Zellen. Zur Detektion wurde der anti-FIP Antikörper K12-454-2 eingesetzt. Die Bindungen der Antikörper wurden durch ECL-Reaktion des zweiten, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers nachgewiesen.

### 3.2.4 Verifikation der Interaktion zwischen Filamin und FIP durch Koimmunpräzipitationen mit rekombinanten Polypeptiden

Die Technik der Koimmunpräzipitation ist eine weitere Methode zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen. Gibt man einen Antikörper in eine Lösung, die das Antigen und ein mit dem Antigen interagierendes Protein enthält, so wird ein Interaktionskomplex dieser drei Komponenten gebildet. Dieser Komplex lässt sich durch die Affinität des Antikörpers zu Protein A gekoppelter Sepharose präzipitieren. Die Komponenten des Komplexes können dann durch Immunmarkierungsexperimente nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der Interaktion zwischen Filamin und FIP in Lösung wurden Koimmunpräzipitationsstudien der rekombinanten Polypeptide Rod 1-6 und FIP durchgeführt (Abbildung 25). Dabei wurden sowohl der anti-FIP Antikörper als auch der anti-Filamin Antikörper verwendet. Aus Gemischen der Polypeptide konnte mit beiden Antikörpern neben dem Antigen auch der jeweilige Bindungspartner präzipitiert werden (Spur 1 und 3). Allerdings lag dieser jeweils im Komplex in wesentlich geringerer Menge als das Antigen vor. Möglicherweise wird die Bindung der beiden Polypeptide durch das im Immunpräzipitationspuffer enthaltene Natriumchlorid (150 mM) labilisiert, so dass nur ein Teil des Bindungspartners präzipitiert wird. Das Natriumchlorid im Puffer dient der Blockierung einer unspezifischen Bindung der Polypeptide an die Sepharosematrix. Diese Kontrollen sind in den Spuren 2 und 4 gezeigt. Zur Detektion der Polypeptide wurde die Membran mit einem Gemisch der Antikörper K12-454-2 gegen FIP und 82-382-8 gegen Filamin inkubiert. In allen Spuren erkennt man die durch direkte Bindung des zweiten Antikörpers markierte leichte und schwere Kette der zur Präzipitation eingesetzten IgG-Moleküle.

Es wurden auch Koimmunpräzipitationsversuche der endogenen Proteine in *D. discoideum* Proteinextrakten durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen konnte allerdings nur die Immunpräzipitation der endogenen Proteine mit dem jeweiligen Antikörper, nicht jedoch die Kopräzipitation des Interaktionspartners dokumentiert werden.



**Abbildung 25: Koimmunpräzitationsversuche mit rekombinanten Filamin- und FIP-Polypeptiden.** Zu Lösungen der über der jeweiligen Spur bezeichneten Polypeptide wurde der angegebene Antikörper gegeben und 1 Std. bei 4°C inkubiert. Die Antikörper-Antigen-Komplexe wurden an Protein A-Sepharose gebunden, gewaschen, die Proteine in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte durch Immunmarkierung mit einer Mischung der Antikörper 82-382-8 gegen Filamin und K12-454-2 gegen FIP. Die Bindung wurde durch einen sekundären, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper und anschließende ECL-Reaktion detektiert. In allen Spuren erkennt man die durch direkte Bindung des zweiten Antikörpers markierte schwere (\*) und leichte (\*\*) Kette der zur Präzipitation eingesetzten IgG-Moleküle.

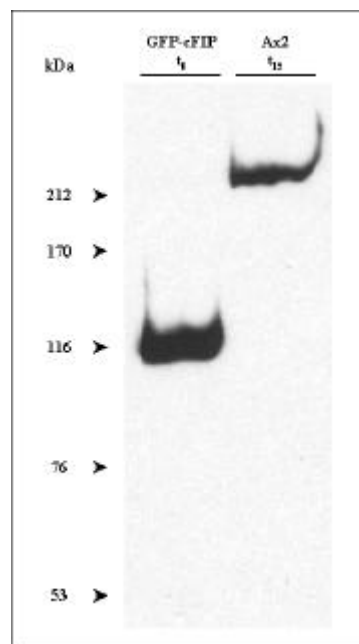
## 4. Untersuchungen einer GFP-cFIP-Fusionsprotein exprimierenden Zelllinie von *Dictyostelium discoideum*

### 4.1 Expression eines GFP-cFIP- Fusionsprotein in *Dictyostelium discoideum*

Das „green fluorescent protein“ (GFP) aus *Aequorea victoria* hat ein Molekulargewicht von 27 kDa. Die Seitenketten der drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin der Positionen 65-67 sind zu einem Fluorophor<sup>3</sup> zyklisiert. Durch Absorption von Strahlung des blauen Wellenlängenbereiches (Absorptionsmaximum bei 395 nm) wird diese Gruppe zum Leuchten angeregt. Das Protein emittiert dann Licht mit einem Emissionsmaximum von 508 nm. Diese Wellenlänge liegt im grünen Spektralbereich. Die cDNA des GFP wurde 1992 kloniert [Prasher *et al.*, 1992]. Seitdem wird GFP in Fusion mit anderen Proteinen genutzt, um die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine in lebenden Zellen zu beobachten.

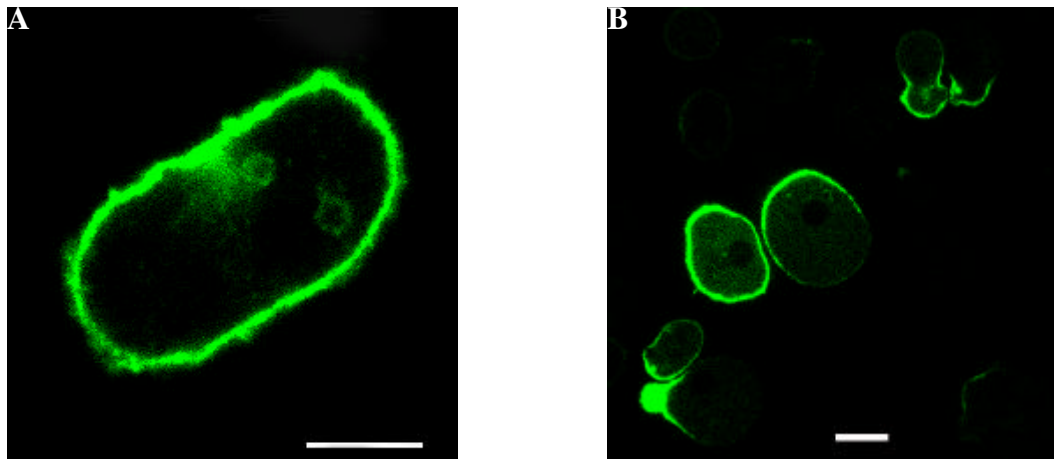
<sup>3</sup> Fluorophor = organische Gruppe, die in fluoreszierenden Stoffen als Träger der Fluoreszenz angesehen wird. Fluoreszenz = Eigenschaft bestimmter Stoffe, bei Bestrahlung selber zu leuchten.

Für die Untersuchung von FIP in lebenden *D. discoideum* Zellen wurde der GFP-Expressionsvektor pDEX-GFP [Westphal *et al.*, 1997] verwendet. In diesen Vektor wurde stromabwärts vom GFP-Gen das 2,7 kb große 3'-Ende des FIP kloniert. Das resultierende Fusionsprotein wird konstitutiv unter der Kontrolle des Aktin-15-Promotors exprimiert. Es setzt sich aus GFP, einem Acht-Aminosäuren Verbindungsstück (KLELIRHE) und den Aminosäuren 1163 bis 2038 von FIP zusammen. Dies entspricht dem im „Two-Hybrid“ System gefundenen Bereich des FIP. Das verwendete GFP hat einen Austausch der Aminosäure Serin gegen Threonin in Position 65. Dadurch ist das Emissionsmaximum des Fluorophors zu einer Wellenlänge von 511 nm verschoben. Die Expression des GFP-cFIP-Fusionsproteins in transformierten *D. discoideum* Zellen wurde im Immunoblot (Abbildung 26) mit dem FIP spezifischen Antikörper K12-454-2 überprüft. Ein Vergleich der Expressionsmengen des GFP-cFIP-Fusionsproteins (Molekulargewicht ca. 130 kDa) mit endogenem FIP zum Zeitpunkt seiner stärksten Expression in der Entwicklung der *D. discoideum* Zellen dokumentiert über die Zellpopulation gemittelt eine Überexpression des GFP-Proteins. Das Fusionsprotein ist unabhängig vom Entwicklungsstadium der Zellen nachweisbar.



**Abbildung 26: Vergleich der Proteinmengen des GFP-cFIP-Fusionsproteins mit endogenem FIP.** Gesamtzellprotein von je  $1 \times 10^6$  Zellen vegetativer GFP-cFIP exprimierender Zellen (links) und für 15 Stunden entwickelter Ax2-Zellen (rechts) wurde in einem 8%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem FIP Antikörper K12-362-6 inkubiert. Die Bindung des Antikörpers wurde durch einen an Meerrettich Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper und anschließende ECL-Reaktion dokumentiert.

Die Lokalisation des GFP-cFIP-Fusionsproteins in lebenden *D. discoideum* Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Protein ist in Plasmamembrannähe lokalisiert und bildet dort einen stark fluoreszierenden Ring. (Abbildung 27). Außerdem erkennt man eine schwache Färbung im Zytosol und vereinzelt eine Färbung von Membranen größerer intrazellulärer Vesikel.

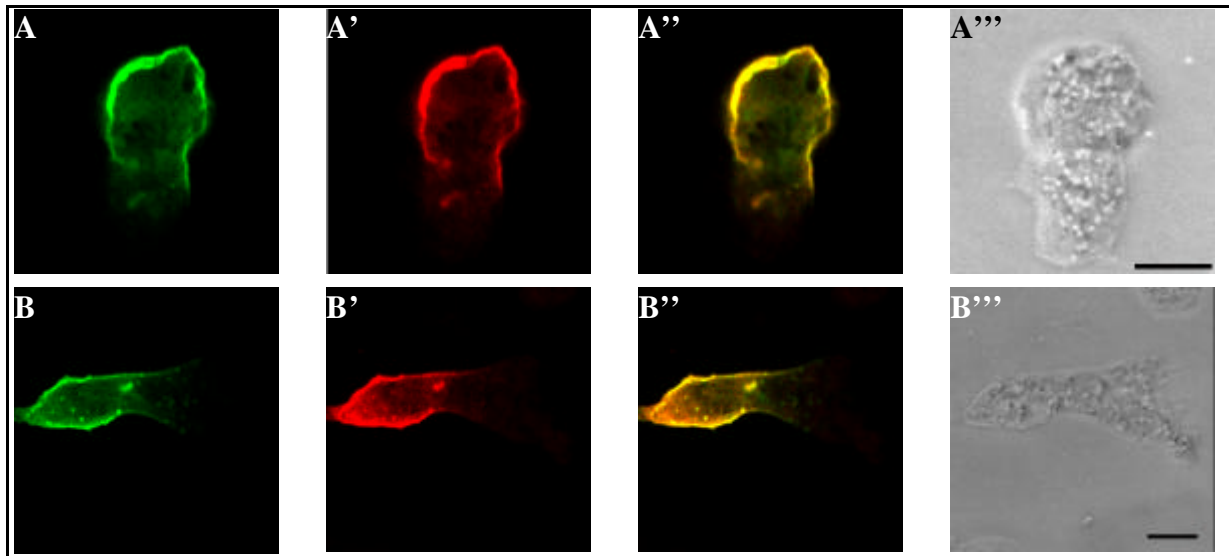


**Abbildung 27:** Lokalisation des GFP-cFIP-Fusionsproteins in lebenden Ax2-Zellen. Maßstab; 5  $\mu\text{m}$ .

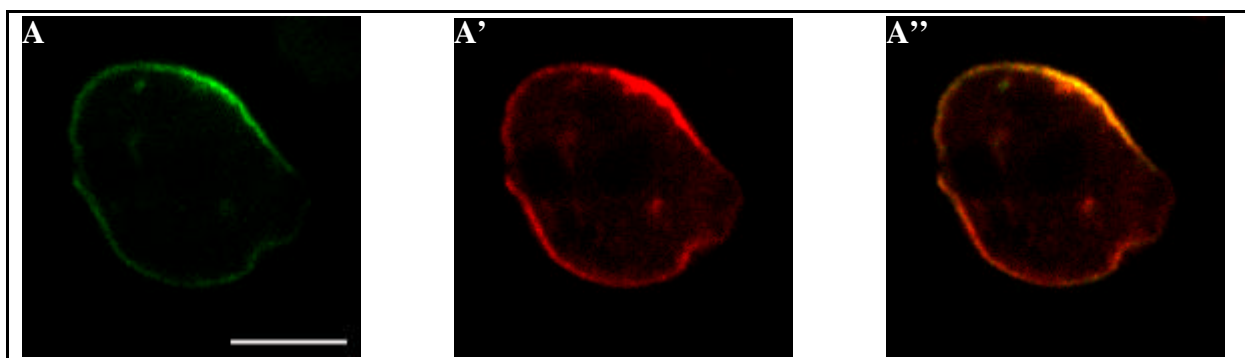
Die Lokalisation des GFP-Fusionsproteins in vegetativen *D. discoideum* Zellen unterscheidet sich von der durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmten Lokalisation des endogenen FIP-Proteins in entwickelten Zellen (Kapitel B.2.7). Zwar befinden sich beide Proteine im Außenbereich der Zellen, endogenes FIP lokalisiert jedoch im Vergleich zum GFP-Protein nicht kontinuierlich an der Plasmamembran. Es färbt vielmehr den Membranbereich punktiert an. Eine Erklärung für diese unterschiedliche Lokalisation könnte die Expression des GFP-Proteins in nicht entwickelten Zellen sein, während endogenes FIP in der Wachstumsphase der Zellen nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Gegen eine entwicklungsabhängige Lokalisation von FIP spricht allerdings, dass sich die Verteilung von GFP-cFIP im Entwicklungszyklus von *D. discoideum* nicht verändert. Außerdem ist nur der ca. 100 kDa große C-Terminus des FIP mit GFP fusioniert worden, die übrige Sequenz des Proteins fehlt. Eine eventuell durch den N-Terminus bedingte Lokalisation des endogenen FIP kann daher mit diesem Fusionsprotein nicht untersucht werden.

## 4.2 Indirekte Immunfluoreszenzstudien von GFP-cFIP exprimierenden Zellen

Die Identität des GFP-cFIP-Fusionsproteins wurde auch durch indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen mit den anti-FIP Antikörpern bestätigt. Das GFP-Fusionsprotein wird von allen vorhandenen FIP Antikörpern erkannt (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Identifizierung des GFP-cFIP-Fusionsproteins durch indirekte Immunfluoreszenzstudien mit anti-FIP Antikörpern.** (A,B) GFP-Fluoreszenz; (A',B') Färbung der FIP Antikörper K12-454-2 (A') und K12-362-6 (B'); (A'',B'') Überlagerung der Bilder A und A' bzw. B und B'; (A''',B''') Phasenkontrastaufnahmen; Maßstab; 5  $\mu$ m.

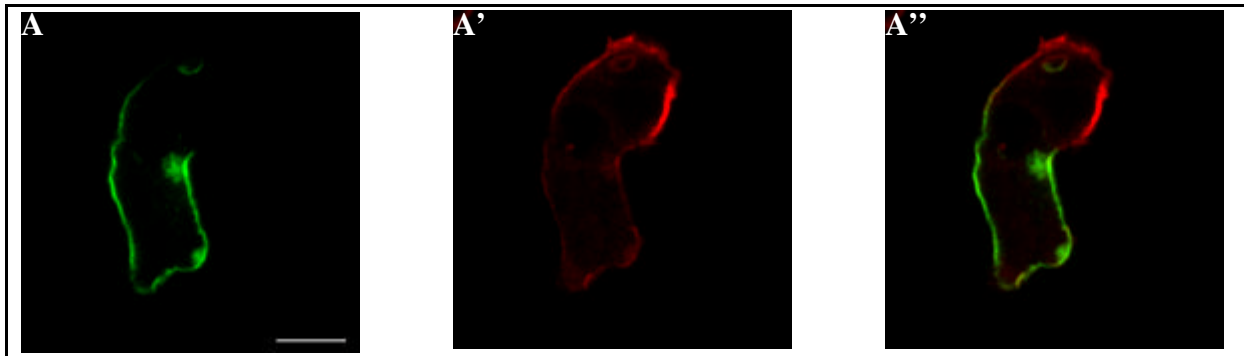


**Abbildung 29: Kolokalisationsstudien des GFP-cFIP-Fusionsproteins mit Filamin.** GFP-cFIP exprimierende Zellen wurden mit kaltem Methanol fixiert und mit dem anti-Filamin Antikörper 82-454-12 inkubiert. Zum Nachweis diente ein Cy3-gekoppelter Ziege-Anti-Maus Antikörper. (A) GFP-cFIP-Fluoreszenz; (A') Filamin-Cy3-Fluoreszenz; (A'') Überlagerung der Bilder A und A'; Maßstab; 5  $\mu$ m.

FIP wurde aufgrund seiner Assoziation mit Filamin entdeckt. In indirekten Immunfluoreszenzuntersuchungen mit anti-Filamin Antikörpern (Abbildung 29) zeigt sich eine

Kolokalisation des GFP-Proteins mit Filamin. Beide Proteine befinden sich direkt an der Plasmamembran der Zellen. Außerdem erkennt man sowohl in der GFP- als auch in der Antikörperfluoreszenz eine schwache Färbung des Zytoplasms und vesikulärer Strukturen.

Zusätzlich wurde in Immunfluoreszenzstudien eine Kolokalisation des GFP-Fusionsproteins mit Aktin untersucht. Aktin bildet unter der Plasmamembran der Zellen ein dreidimensionales Netzwerk, das der Stabilisierung der Zellform dient. Dieses Netzwerk wird unter anderem durch die Quervernetzung der Aktinfasern durch Filamin aufgebaut. In ruhenden, unpolarierten Zellen ist Aktin ebenso wie GFP-cFIP homogen unter der gesamten Plasmamembran der Zelle zu finden. In polarisierten, sich bewegenden Zellen ist Aktin vor allem im vorderen Bereich der Zelle angereichert (Abbildung 30, Mitte), die GFP-Fluoreszenz zeigt dagegen eine Akkumulation des GFP-cFIP-Fusionsproteins im entgegengesetzten Bereich der Zelle (Abbildung 30, links). Eine ähnliche Verteilung wird für Myosin II beobachtet, das eine Rolle beim Nachziehen des hinteren Zellbereichs bei der Bewegung spielt [Chu und Fukui, 1996; Jay *et al.*, 1995]. In aktiven, polarisierten *D. discoideum* Zellen ist somit keine Kolokalisation der beiden Proteine zu beobachten, obwohl sich sowohl Aktin als auch GFP-cFIP direkt unter der Plasmamembran in der Peripherie der Zelle befinden.



**Abbildung 30: Kolokalisationsstudien des GFP-cFIP-Fusionsproteins mit Aktin.** (A) GFP-Fluoreszenz; (B) Lokalisation des Aktin, zur Detektion wurde der monoklonale Antikörper Act-1-7 verwendet; (C) Überlagerung der Bilder A und A'; Maßstab; 5µm.



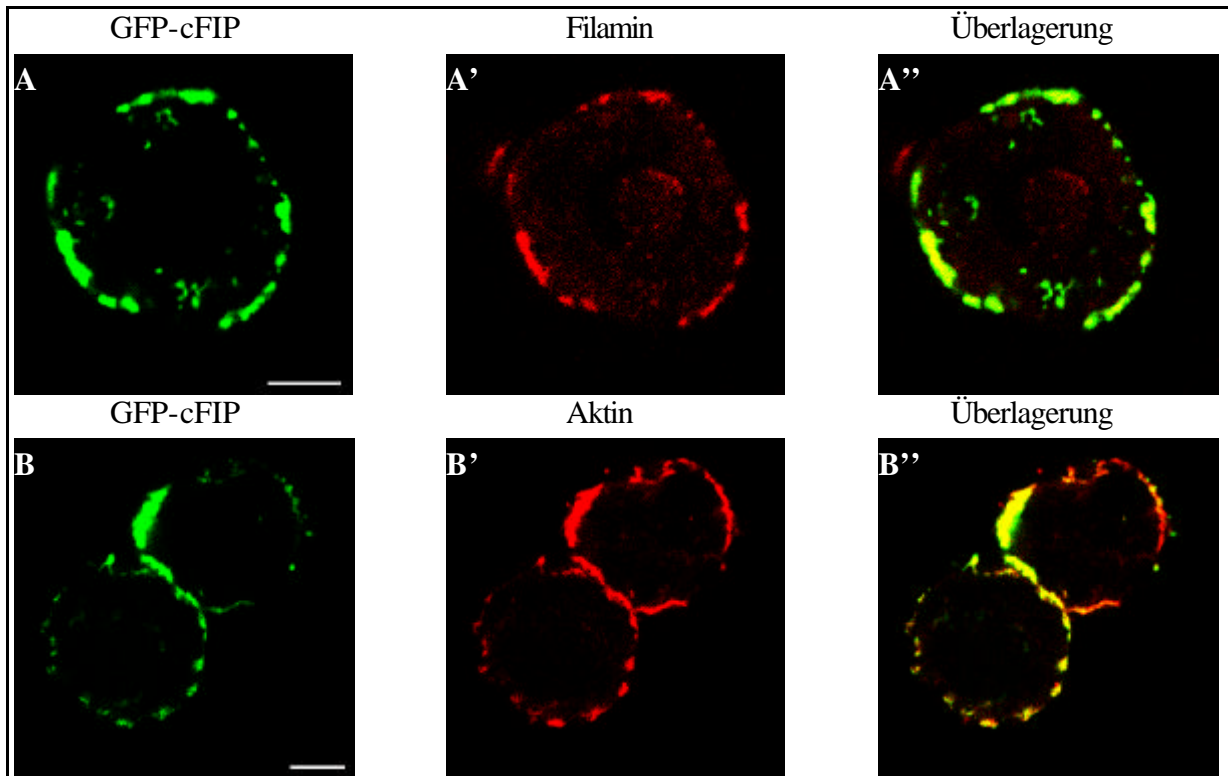
### 4.3 Lokalisation des GFP-cFIP-Fusionsproteins bei chemischer Veränderung des Aktin-Zytoskeletts

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass FIP durch seine Bindung an Filamin mit dem Aktin-Zytoskelett der Zellen interagiert. Zur näheren Charakterisierung dieser Assoziation bieten sich *in vivo* Untersuchungen der GFP-cFIP exprimierenden Zellen an, bei denen das Aktin-Zytoskelett durch äußere Einflüsse verändert wird.

#### 4.3.1 Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin A

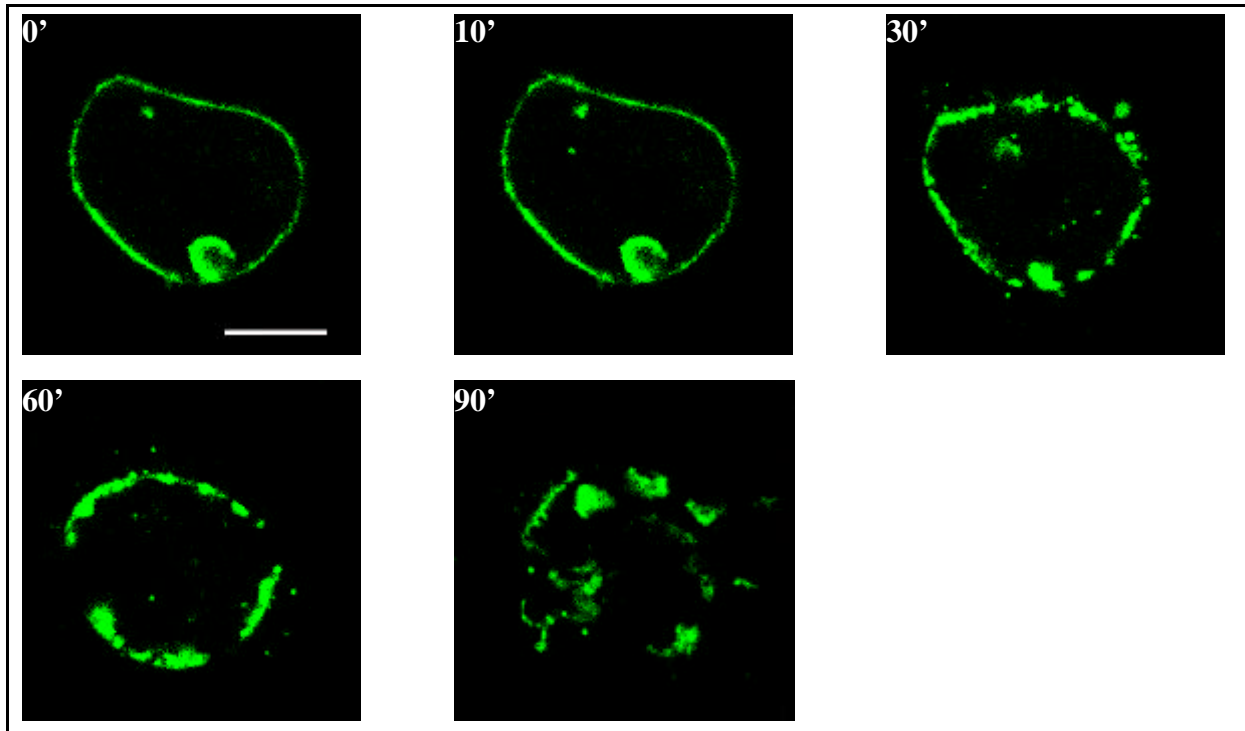
Cytochalasine sind eine Familie von Pilzalkaloiden [Pühler; 1999]. Sie inhibieren verschiedene Formen der Zellbewegung, indem sie an Aktinfilamente binden und dadurch die Anlagerung neuer Monomere unterbinden [Brown und Spudich, 1979]. Der Effekt ist reversibel und die Substanz nicht toxisch. In *D. discoideum* findet das lipophile Cytochalasin A Anwendung, da es als einziges Mitglied der Cytochalasin-Familie von den Zellen aus dem Medium aufgenommen wird. Die ebenfalls in *D. discoideum* Zellen verwendbaren Cytochalasine B und D wirken erst nach Permeabilisierung der Zellen, z. B. durch Elektroporation [McRobbie und Newell, 1985; Chu und Fukui, 1996; Lee *et al.*, 1998].

Zur Untersuchung des Effekts von Cytochalasin A auf das Aktin-Zytoskelett und die Verteilung des GFP-cFIP-Fusionsproteins wurden *D. discoideum* Zellen eine Stunde in einer Lösung mit 20  $\mu$ M Cytochalasin A inkubiert und anschließend fixiert. Bei Cytochalasin A Behandlung runden sich die Zellen ab und werden unbeweglich. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen eine Kolokalisation des GFP-cFIP mit Filamin (Abbildung 31, obere Reihe), Aktin und GFP-cFIP kolokalisieren ebenfalls (Abbildung 31, unten). Jedoch ist bei allen drei Proteinen die homogene Färbung am Rand des Zellkörpers gestört und man sieht eine fleckenartige Färbung im Außenbereich der Zellen. Da Filamin sich auch in kappenartigen Strukturen in der Zellperipherie befindet, liegt eine direkte Assoziation desselben mit dem verbleibenden Aktin nahe. Die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin A wirkt sich somit auf die Lokalisation des Filamin und dadurch auf die Lokalisation des GFP-cFIP-Fusionsproteins aus. Die Interaktionen dieser Proteine bleiben bei der Behandlung der Zellen mit Cytochalasin A erhalten.



**Abbildung 31: Kolokalisationsstudien des GFP-cFIP bei Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin A.** Die Zellen wurden 1 Stunde mit 20  $\mu\text{M}$  Cytochalasin A in Soerensen-Phosphatpuffer inkubiert und anschließend mit kaltem Methanol fixiert. (A,B) GFP-Fluoreszenz. (A',B') Färbung der anti-Filamin (A') und anti-Aktin (B') Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper verwendet. (A'',B'') Überlagerung der jeweiligen GFP- und Cy3-Fluoreszenzen. Maßstab; 5  $\mu\text{m}$ .

Die Betrachtung lebender GFP-cFIP exprimierender Zellen unter Cytochalasin A Einfluss (Abbildung 32) gibt Aufschluss über den zeitlichen Verlauf der Umorganisation des Zytoskeletts in *D. discoideum*. Die Umverteilung des GFP-cFIP Proteins setzt zwischen 10 und 30 min Inkubationsdauer mit Cytochalasin A ein. Nach 60 min ist GFP-cFIP in großen, kappenartigen Strukturen an der Plasmamembran lokalisiert. Nach 90 min Behandlung mit Cytochalasin A erkennt man große GFP-cFIP enthaltende Klumpen auch innerhalb der Zelle. Die Plasmamembran ist anhand der GFP-Fluoreszenz kaum noch zu erkennen. Ob auch in diesem fortgeschrittenen Stadium der Umstrukturierung eine Kolokalisation des GFP-Signals mit Filamin oder Aktin besteht, wurde nicht untersucht. Eine Bildung von Aktin-Clustern wurde allerdings bei Studien mit Cytochalasin D in *D. discoideum* [Chu und Fukui, 1996] bzw. Cytochalasin A in *Aspergillus nidulans* [Suelmann und Fischer, 2000; Torralba *et al.*, 1998] nicht nachgewiesen. Vielmehr konnte in diesen Zellen keine F-Aktin Fluoreszenz mehr nachgewiesen werden, was auf eine vollständige Depolymerisation des Aktins hinweist.

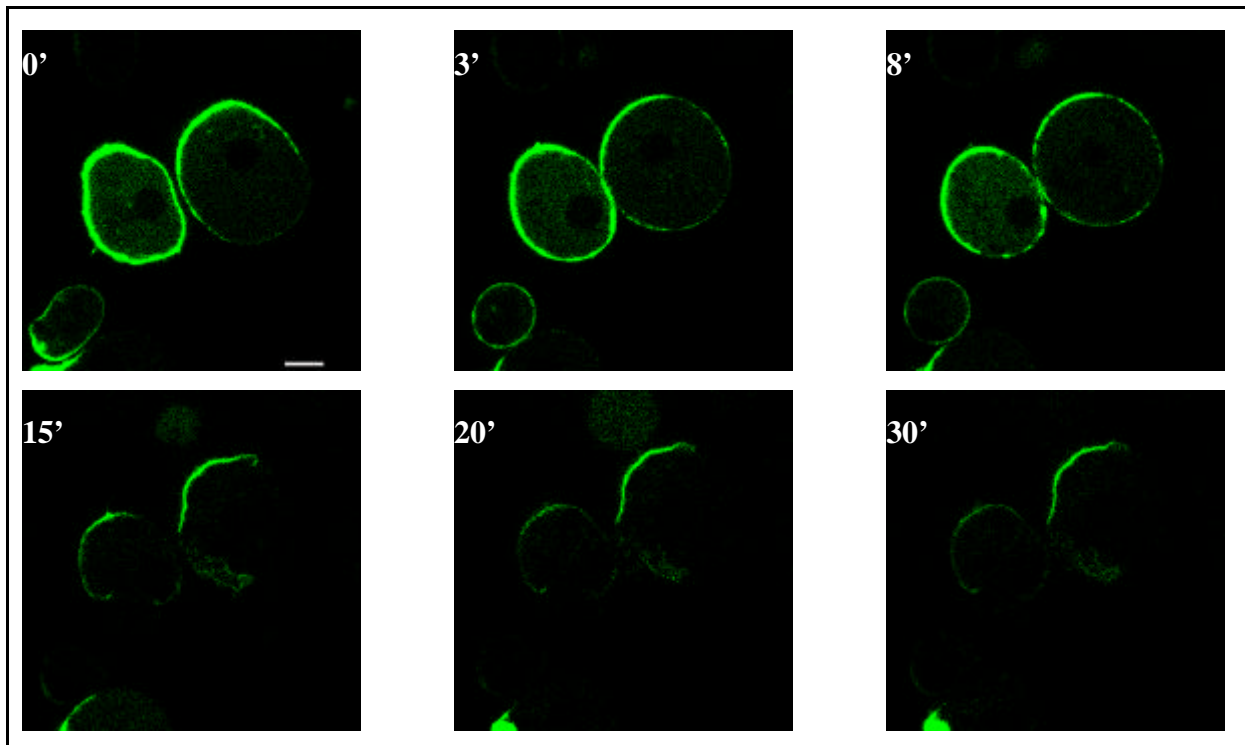


**Abbildung 32: Fluoreszenzaufnahmen bei Cytochalasin A Behandlung lebender GFP-cFIP exprimierender *D. discoideum* Zellen.** Gezeigt ist die zeitliche Veränderung (0-90 min) der GFP-Fluoreszenz lebender GFP-cFIP exprimierender Zellen. Maßstab; 5 µm.

#### 4.3.2 Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch 2,4-Dinitrophenol

2,4-Dinitrophenol wirkt in *Dictyostelium discoideum* als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung [Jungbluth *et al.*, 1994]. In Zellen, die der Einwirkung von  $5 \times 10^{-5}$  M 2,4-Dinitrophenol ausgesetzt sind, kann die durch Elektronenübertragung in der Atmungskette gelieferte Energie nicht zur ATP-Synthese verwendet werden. Dadurch sinkt ihr ATP-Gehalt auf etwa 10% des normalen Wertes. Die Entkopplung hat auch Auswirkungen auf das Aktin-Zytoskelett der Zellen. Die Phosphorylierungsrate von Tyrosinen im Aktin steigt und es erfolgt eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Die Zellen verändern ihre Gestalt und die Zellbewegung ist eingeschränkt. Das normalerweise vor allem an sich verändernden Stellen der Plasmamembran lokalisierte Aktin ist nach zehn Minuten Inkubation mit 2,4-Dinitrophenol in den abgerundeten, unbeweglichen Zellen homogen in der Zellperipherie verteilt. Nach 30 Minuten Dinitrophenol-Inkubation hat sich das Aktin zum Teil von der Zellperipherie ins Zytoplasma verlagert. Dort bildet es große, amorphe Zusammenlagerungen. Der Effekt des 2,4-Dinitrophenols ist reversibel. Schon fünf Minuten nach Entfernung der Substanz liegt Aktin wieder in seiner normalen Lokalisation an der Plasmamembran der beweglichen Zellen vor.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Entkopplersubstanz 2,4-Dinitrophenol auf die Expression und Verteilung des GFP-cFIP-Fusionsproteins untersucht. Aufgrund der über Filamin vermittelten Assoziation an das Aktin-Zytoskelett liegt eine Umorganisation des GFP-cFIP durch die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung nahe. GFP-cFIP verhält sich jedoch anders als Aktin (Abbildung 33). Die homogene Verteilung unter der Plasmamembran ist gestört. Nach acht Minuten Dinitrophenol-Einwirkung ist der fluoreszierende Rand der Zellen von nicht fluoreszierenden Bereichen unterbrochen. Fünfzehn Minuten nach Beginn der Entkopplung sind nur noch kappenartige Strukturen an der Plasmamembran zu erkennen. GFP-cFIP akkumuliert jedoch im Gegensatz zu Aktin nicht in Clustern im Zytosol. Die Reversibilität des Dinitrophenoleinflusses auf GFP-cFIP wurde nicht getestet.



**Abbildung 33: Verhalten des GFP-cFIP-Fusionsproteins bei Entkopplung des oxidativen Phosphorylierung durch 2,4-Dinitrophenol.** Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz lebender GFP-cFIP exprimierender *D. discoideum* Zellen nach den angegebenen Minuten Behandlung mit  $5 \times 10^{-5}$  M 2,4-Dinitrophenol in Phosphatpuffer. Maßstab; 5µm.

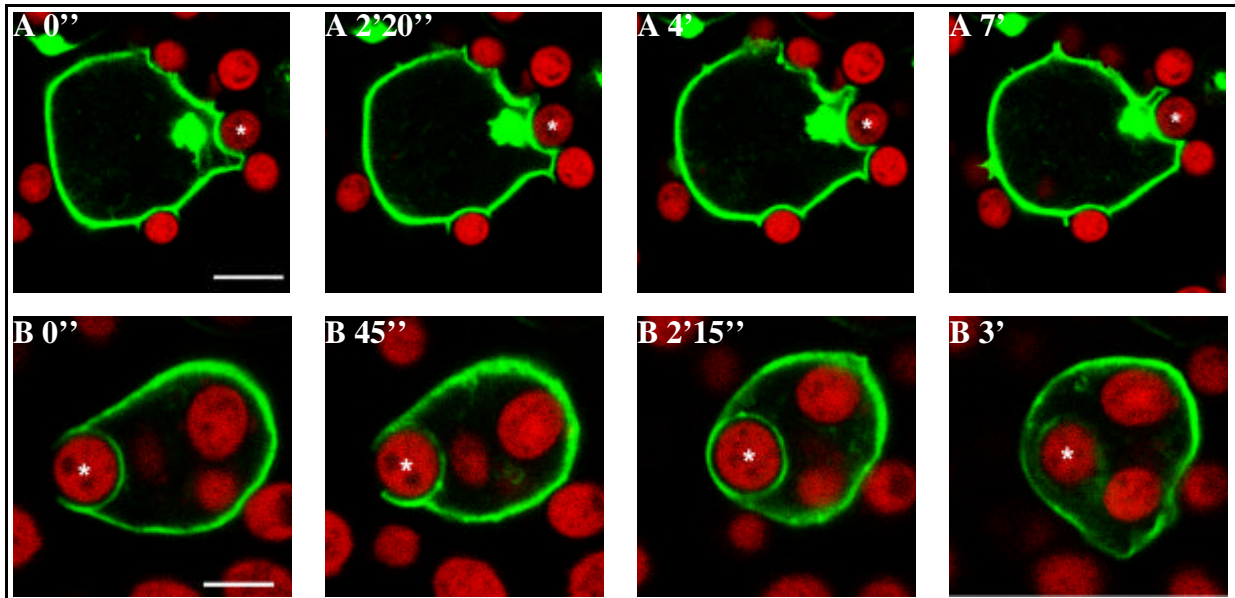
#### 4.4 Lokalisation des GFP-cFIP-Fusionsproteins bei Phagozytose und Exozytose fluoreszierender Hefen

Phagozytose, d.h. die Aufnahme von Feststoffen in die Zelle, ist bei freilebenden *D. discoideum* Amöben die einzige Möglichkeit der Nahrungsaufnahme. Ihr Wachstum und ihre Vermehrung sind von der Aufnahme von Bakterien oder Hefen abhängig. In *D. discoideum* Laborstämmen, die auch in flüssigem Medium überleben können, kommt die Pinozytose, d.h. die Aufnahme von Flüssigkeiten, als Möglichkeit der Nahrungsaufnahme hinzu. An beiden Prozessen ist das Aktin-Zytoskelett beteiligt. Bei der phagozytotischen Aufnahme von Bakterien werden zunächst Pseudopodien gebildet, die das Bakterium umschließen. Nach dem Verschmelzen der Pseudopodien schnürt sich das Phagosom ab. Dieses Phagosom wird einem Abbauweg zugeführt, der mit der Verschmelzung von Phagosom und Lysosom endet. Die Phagozytose wird hauptsächlich durch F-Aktin reguliert [Maniak *et al.*, 1995]. Diese Regulation findet unter Beteiligung Aktin-bindender Proteine wie z.B. Talin und Coronin statt [Niewöhner *et al.*, 1997; Maniak *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 1997]. Außerdem wurde die Beteiligung von Motorproteinen - Myosin-I-Isoformen [Jung und Hammer, 1990] und Myosin K [Schwarz *et al.*, 2000] – und den kleinen G-Proteinen RacC [Seastone *et al.*, 1998], RacF [Rivero *et al.*, 1999], RapI [Seastone *et al.*, 1999] und RasS [Chubb *et al.*, 2000] nachgewiesen.

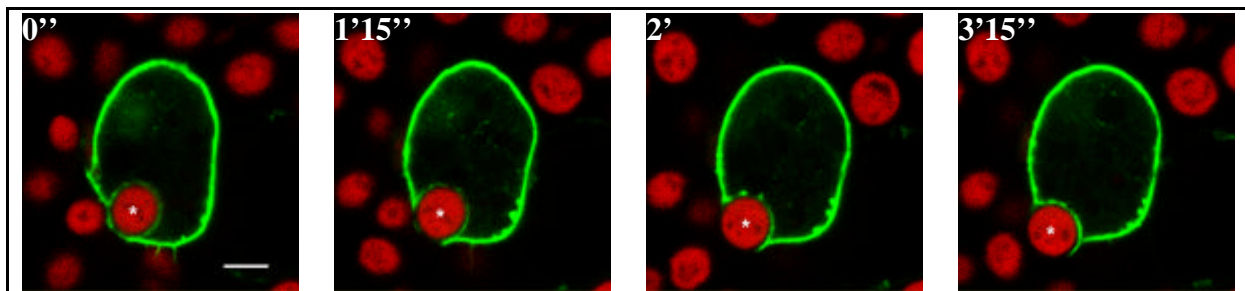
Sowohl bei der Ausbildung der Pseudopodien während der Phagozytose (Abbildung 34, obere Reihe) als auch bei der Invagination des Phagosoms (untere Reihe) ist GFP-cFIP an der Plasmamembran vorhanden. Nach Abschnürung des Phagosoms von der Plasmamembran der Zelle nimmt die Fluoreszenz in der Phagosomenmembran ab. Auch bei der Exozytose bereits aufgenommener Hefen ist GFP-cFIP als Bestandteil der exozytotischen Membran nachzuweisen (Abbildung 35).

Das für GFP-cFIP beobachtete Verhalten bei der Phago- und Exozytose ähnelt dem Verhalten von Aktin bei diesen Abläufen [Peracino *et al.*, 1998]. Da es keine Hinweise auf eine Aktin-Interaktion von GFP-cFIP gibt, liegt die Vermutung nahe, dass GFP-cFIP über seine Interaktion mit Filamin am Endo- und Exozytoseprozess teilnimmt. Eine Beteiligung von Filamin an endo- bzw. exozytotischen Prozessen wurde von **D. Cox** gezeigt [Cox *et al.*, 1997]. Sie dienen hauptsächlich der Nahrungsaufnahme vegetativer *D. discoideum* Amöben, finden aber auch noch nach Beginn der Entwicklung statt, so dass endogenes FIP in diesen Stadien daran beteiligt sein könnte. Für einen Nachweis des endogenen FIP bei endo- bzw.

exozytotischen Prozessen während der Entwicklungsphase der *D. discoideum* Zellen sind allerdings weitere Untersuchungen nötig.



**Abbildung 34: Lokalisation des GFP-cFIP bei der Phagozytose fluoreszierender Hefen.** Die obere Reihe (Bilder A) zeigt die Lokalisation des GFP-cFIP bei der Ausbildung der Pseudopodien um die Hefezelle in Zeitraum von 0 bis 7 Minuten. Der fluoreszierende Fleck innerhalb der Zelle kommt durch eine Akkumulation des GFP-cFIP zustande, die in vielen GFP-cFIP exprimierenden Zellen beobachtet wurde. Die untere Reihe (Bilder B) zeigt die Invagination und Abschnürung des Phagosoms (0-3 min). Die GFP-Fluoreszenz nimmt nach der Abschnürung des Phagosoms von der Plasmamembran ab. Maßstab; 5 $\mu$ m.



**Abbildung 35: Lokalisation des GFP-cFIP bei der Exozytose fluoreszierender Hefen.** Maßstab; 5 $\mu$ m.

#### 4.5 GFP-cFIP exprimierende *Dictyostelium discoideum* Zellen zeigen Veränderungen im Entwicklungszyklus

Nahrungsentzug startet in *D. discoideum* Amöben ein Entwicklungsprogramm, das zur Ausbildung eines multizellulären Organismus führt. Die Amöben aggregieren und wandern chemotaktisch auf einen zentralen Punkt zu. Als Chemoattraktans ist cAMP identifiziert worden. Während der Aggregation nimmt die Zell-Zell-Adhäsion zu. Eines der dafür

verantwortlichen Proteine ist das „contact site A“-Glycoprotein, das sechs bis neun Stunden nach Beginn des Hungerns gebildet wird [Beug *et al.*, 1973; Müller und Gerisch, 1978]. Als „tight aggregate“ wird das Stadium nach 14-16 Stunden bezeichnet. Unter günstigen Bedingungen kann sich das Pseudoplasmodium („Slug“-Stadium) phototaktisch bewegen. Wenn die Bewegung aufhört, rundet sich der „Slug“ ab und schiebt die Prä-Sporezellen nach oben. Dieser Prozess wird als Kulmination bezeichnet. Der Stiel wird an seiner Spitze durch Invagination von Stielzellen verlängert. Diese morphologischen Veränderungen beginnen nach 18 Stunden und sind nach etwa 24 Stunden mit der Bildung des Fruchtkörpers, der aus Stiel und Sporenkopf besteht, beendet (Abbildung 36).

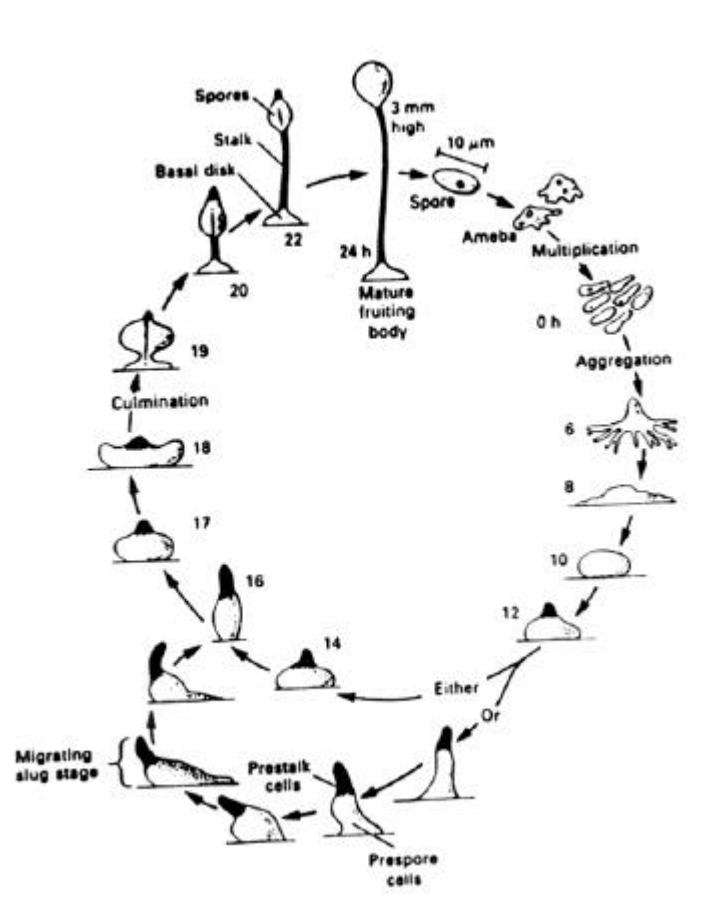
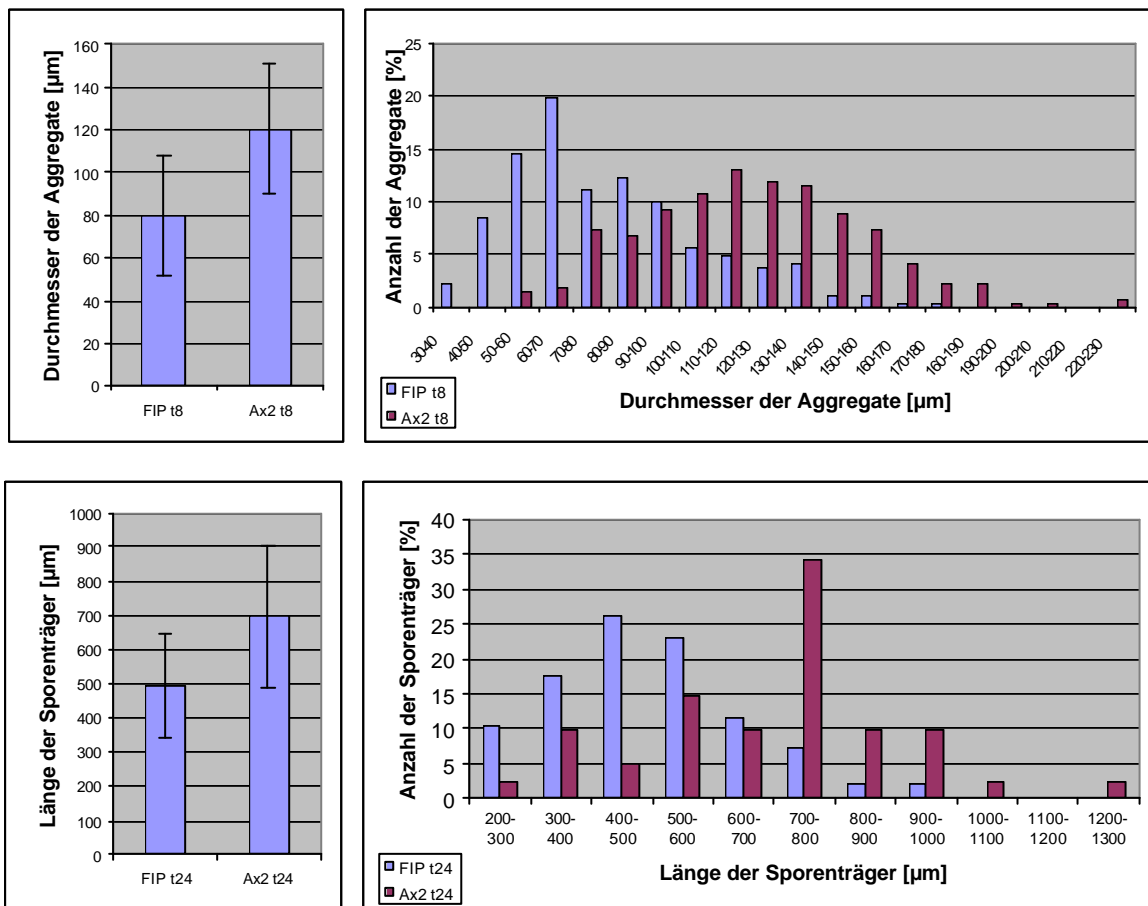


Abbildung 36: Morphologische Stadien der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* [aus: Witke, 1991].

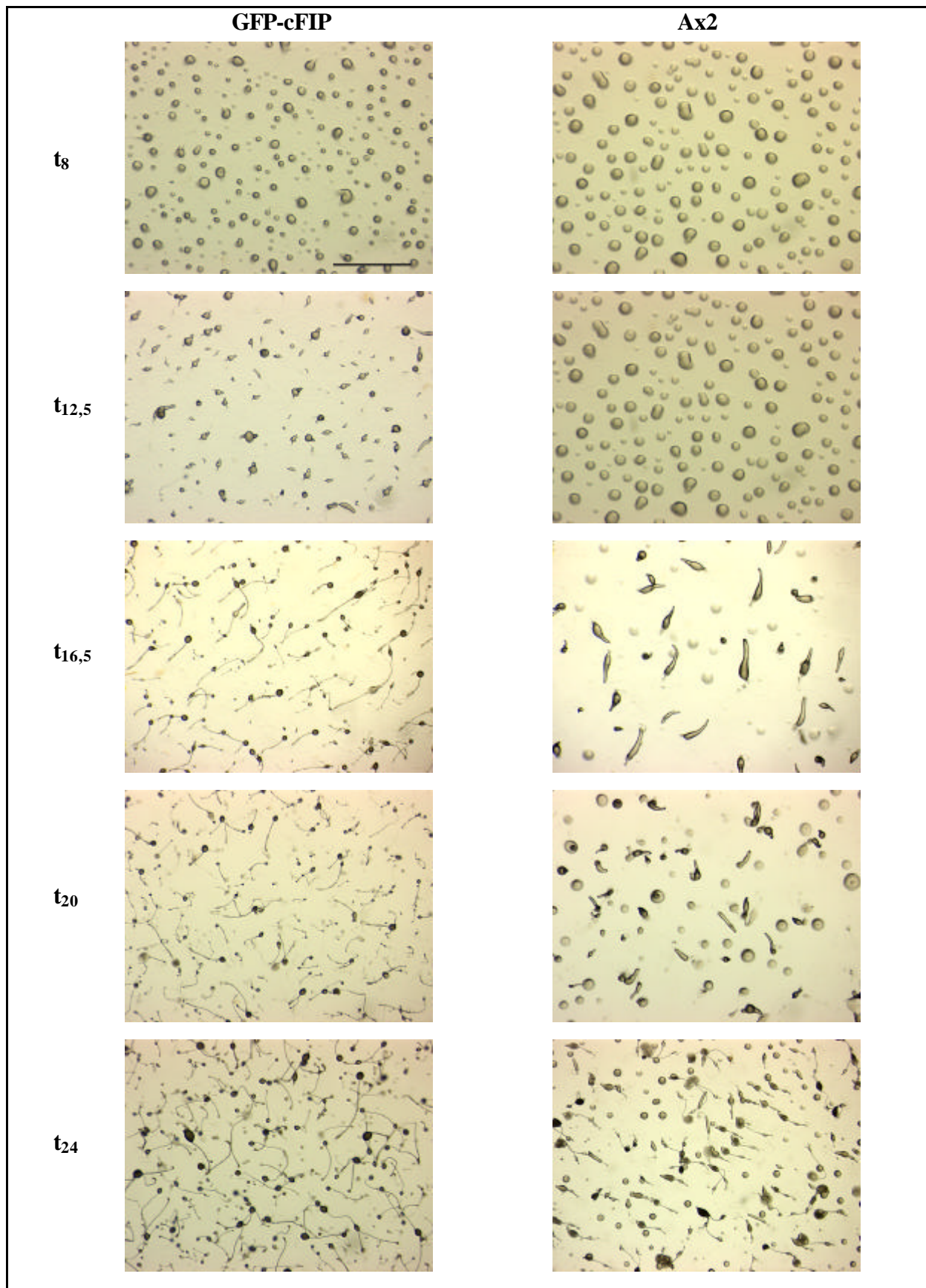
Bei der Analyse der Entwicklung von GFP-cFIP-Fusionsprotein exprimierenden Zellen wurde im Vergleich zu Ax2-Zellen eine Beschleunigung festgestellt (Abbildung 38). Der GFP-cFIP Zellstamm beendet seine Entwicklung auf Phosphatagarplatten schon nach etwa 16 Stunden Nahrungsentzug. Ax2-Zellen benötigen dafür ca. 24 Stunden und liegen nach 16 Stunden Entwicklung noch im „Slug-Stadium“ vor. Ein weiterer Unterschied besteht in der Größe der gebildeten Aggregate bzw. der Länge der ausgebildeten Sporenträger. Aggregate von GFP-

cFIP Zellen sind im Mittel um etwa 34% kleiner als Ax2-Zellen des vergleichbaren Entwicklungsstadiums (Abbildung 37, oben). Die Größenverteilungskurve ist deutlich zu kleineren Werten hin verschoben. Während der mittlere Durchmesser von Ax2-Aggregaten bei ca. 120  $\mu\text{m}$  liegt, sind Aggregate von GFP-cFIP exprimierenden Zellen nur 80  $\mu\text{m}$  groß. Dieses Verhältnis zeigt sich auch bei einer Vermessung der Länge der gebildeten Sporenträger (Abbildung 37, unten). Im Endstadium der Entwicklung sind die Sporenträger der GFP-cFIP Zellen um 30% kürzer als die des Wildtyps. Ihre mittlere Länge liegt bei 500  $\mu\text{m}$ , während Ax2-Fruchtkörper im Durchschnitt eine Länge von ca. 700  $\mu\text{m}$  erreichen. Da gleiche Zellzahlen zur Entwicklung ausgebracht wurden, müssen die GFP-cFIP Aggregate aus weniger Zellen gebildet werden als die entsprechenden Ax2-Aggregate. Man erkennt daher auch bei GFP-cFIP Zellen eine größere Anzahl Aggregate bzw. Sporenträger pro Platte.



**Abbildung 37: Größenunterschiede der Aggregate (oben) und Sporenträger (unten) GFP-cFIP exprimierender Zellen gegenüber Ax2-Zellen.** In den linken Diagrammen sind jeweils die gemittelten Durchmesser der Aggregate ( $t_8$ ) bzw. die gemittelten Längen der Sporenträger ( $t_{24}$ ) dargestellt. Die Fehlerbalken ergeben sich aus den Standardabweichungen. Die Diagramme rechts zeigen jeweils die Größenverteilung in Prozent. Zur Vermessung wurden je  $1 \times 10^8$  Zellen auf einer Phosphatagarplatte für 8 oder 24 Stunden entwickelt, mikroskopisch dokumentiert und die Durchmesser bzw. Längen ausgemessen. Der Versuch wurde jeweils dreimal ausgeführt und die Werte gemittelt. Anzahl der ausgemessenen Aggregate: Ax2 (270) und GFP-cFIP (268). Anzahl der ausgemessenen Sporenträger: Ax2 (41) und GFP-cFIP (96).





**Abbildung 38: Entwicklungsstadien der GFP-cFIP Zellen verglichen mit Ax2-Zellen.** Je  $1 \times 10^8$  Zellen wurden auf einer Phosphatagarplatte ausgebracht und bei  $21^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Aufnahmen wurden nach den angegebenen Stunden der Entwicklung gemacht und zeigen jeweils einen gleich großen Bildausschnitt. Maßstab; 1 mm.

## C Diskussion

---

### 1. Welche Funktionen besitzt Filamin in der Zelle?

Neben der Mikroinjektion von Proteinen oder Antikörpern ist die Isolierung von Mutanten in Prokaryoten und Eukaryoten eine weit verbreitete Möglichkeit der Funktionsanalyse einzelner Proteine. Die Rolle der Aktin-bindenden Proteine wurde bislang hauptsächlich in *Saccharomyces cerevisiae* [Novick und Botstein, 1985] und in *D. discoideum* [Schleicher *et al.*, 1995; Noegel und Schleicher, 2000] untersucht. In diesen Organismen können Gene gezielt durch „gene disruption“, „antisense“-RNA Techniken oder chemische Mutagenese verändert werden. In Hefe ist die Inaktivierung des einzigen Aktin-Gens letal. Ausfälle in Aktin-bindenden Proteinen, wie Profilin [Haarer *et al.*, 1990] oder ein zu Cap32 analoges Protein [Amatruda *et al.*, 1989], führen in den Zellen zu verlangsamtem Wachstum und einer veränderten Aktin-Verteilung. Aktin liegt in diesen Mutanten nicht in Form von Aktinkabeln, sondern in einer fleckenförmigen Verteilung vor. Generell besitzt die von einer Zellwand umgebene Hefe nur eine begrenzte Anzahl Zytoskelett-assoziiierter Funktionen. So können Bewegung, Pseudopodienbildung und Phagozytose von Hefezellen nicht ausgeführt werden. Dieses geringe Repertoire zellulärer Funktionen spiegelt sich in einer begrenzten Anzahl der Zytoskelettproteine wieder. Hefe enthält z. B. nur ein einziges Aktin-Gen und ein Mitglied der Filamin-Familie ist nicht identifiziert worden.

Die Funktion des *D. discoideum* Filamins hingegen wurde in mehreren unabhängigen Mutanten untersucht, die durch chemische Mutagenese [Brink *et al.*, 1990; Wallraff und Wallraff, 1997] oder „gene-disruption“ [Cox *et al.*, 1996; Eichinger *et al.*, 1996] isoliert wurden. Im vegetativen Stadium von *D. discoideum* zeigen diese Mutanten eine veränderte Quervernetzung der Aktin-Filamente im Zellcortex und eine Veränderung der Zytoskelettstruktur. Die Zellen bilden weniger und kleinere Pseudopodien aus. Dadurch ist ihre Motilität ebenso wie ihre Fähigkeit zu Chemotaxis und Phagozytose verringert. Im multizellulären Stadium der Amöben ist die Orientierung der Aggregate bei Phototaxis- und Thermotaxis-Experimenten gestört [Fisher *et al.*, 1997]. Aus der Analyse dieser Mutanten lässt sich eine Funktion von Filamin bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse, für die eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts notwendig ist, ableiten. Auf welchem Wege die zellulären Signale, die

diese Umorganisation vermitteln, auf Filamin übertragen werden, konnte durch die Charakterisierung der Mutanten jedoch nicht geklärt werden.

In *Drosophila melanogaster* führt eine Mutation im Filamin-Gen zu Infertilität der Weibchen [Sokol und Cooley, 1999; Li *et al.*, 1999]. Durch die Analyse dieser *cheerio* Mutante wurde eine Funktion von Filamin bei der Ausbildung des Aktin-Cortex in den Ringkanälen der Ovarien nachgewiesen. Ohne die stabilisierenden Aktinfilamente unter der Plasmamembran werden die Ringkanäle nicht vollständig ausgebildet. Dadurch wird der Fluß des Zytoplasmas von den Ammenzellen zur Oozyte unterbunden.

Mutationen im humanen Filamin A-Gen verursachen die periventrikuläre Heterotopie, eine dominante Erbkrankheit des X-Chromosoms. Sie ist durch fehlende Migrationsfähigkeit von Neuronen in den sich entwickelnden cerebralen Cortex gekennzeichnet [Poussaint, *et al.*, 2000; Fox, *et al.*, 1998], die zur Bildung von Knoten unter dem Cortex der Hirnkammer führt. Die meisten der an periventrikulärer Heterotopie erkrankten Patienten sind weiblich. Bei diesen Patientinnen ist bei einer Schwangerschaft die Wahrscheinlichkeit einer Fehlgeburt eines männlichen Föten sehr hoch. Dies lässt auf eine wichtige Funktion des Filamin A in der Embryogenese schließen.

## **2. Funktionsanalysen durch Untersuchung der Bindepartner des Filamins**

Außer durch Analyse von Mutationen und den damit verbundenen Krankheiten lassen sich Informationen über die Funktion von Proteinen durch die Analyse ihrer Bindungspartner ermitteln. Die Mitglieder der Filamin-Familie interagieren zusätzlich zu F-Aktin mit vielen verschiedenen Proteinen. Die Anzahl der bekannten Bindungspartner liegt zur Zeit bei 20 und die Identifizierung weiterer ist zu erwarten. Diese große Zahl der Bindungspartner unterstreicht die wichtigen Funktionen von Filamin in der Zelle. Einige dieser Interaktionen verbinden das Aktin-Zytoskelett mit Membranrezeptoren der Plasmamembran und intrazellulärer Membranen und tragen so zur mechanischen Stabilisierung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten bei. Über die Verankerung von Aktinfilamenten an Membranrezeptoren kann Filamin die Aktivierung lokaler zellulärer Prozesse vermitteln. Durch die Analyse von Bindungspartnern konnte weiterhin eine Beteiligung an Signaltransduktionskaskaden, die unter Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts ablaufen, festgestellt werden.

Die Interaktionen zwischen den Filamin-bindenden Proteinen und Filamin wurden größtenteils durch „Two-Hybrid“ cDNA-Bank Durchmusterungen in Hefe entdeckt und durch *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bestätigt. Auffällig dabei ist, dass bei diesen „Two-Hybrid“ Untersuchungen immer der jeweilige Bindepartner als „Köderprotein“ zur Durchmusterung eingesetzt und Filamin als „Beuteprotein“ identifiziert wurde. Die Interaktionspartner des Filamins sind demnach nie gezielt erforscht worden, sondern wurden bei der Aufklärung anderer Themen entdeckt.

Ein gutes Beispiel dafür ist die Interaktion von Filamin mit den humanen Presenilinen [Zhang *et al.*, 1998]. Die Gene der Preseniline 1 und 2 wurden ursprünglich bei der Erforschung der Alzheimerschen Krankheit, einer neurodegenerativen Erkrankung, identifiziert. Etwa die Hälfte der Fälle familiärer Alzheimerscher Erkrankung („early onset familial Alzheimer’s disease“) lassen sich auf Mutationen in den Presenilin-Genen zurückführen, die in einer veränderten Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) resultieren [Schenk, 2000; Annaert und de Strooper, 1999]. Das so entstehende A $\beta$ <sub>1-42</sub> Peptid - der Hauptbestandteil der toxischen „Plaques“ im Gehirn von Alzheimer Patienten - neigt mehr zur Aggregation als normalerweise gebildetes A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Presenilin ist außerdem an der Prozessierung des Notch-Rezeptors beteiligt, eines Transmembranproteins der Plasmamembran. Durch Proteolyse des Notch wird eine Signalkaskade ausgelöst, die über die Translokation der löslichen intrazellulären Domäne in den Zellkern zur Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene führt. Die Produkte dieser Gene sind für die Zelldifferenzierung während der Entwicklung multizellulärer Organismen verantwortlich. Eine Beteiligung des Filamins an diesen Mechanismen erscheint zunächst nicht sinnvoll. Möglicherweise dient Filamin jedoch der richtigen Positionierung des Presenilins. APP- und Notch-Proteolyse finden in der Plasmamembran bzw. in der Membran endosomaler Vesikel statt, Presenilin ist aber in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums, des intermediären Kompartiments und des *cis*-Golgi Netzwerks lokalisiert. Einige Studien [Schwarzman *et al.*, 1999; Ray *et al.*, 1999] berichten von einer an Filamin gebundenen Subpopulation des Presenilins in der Plasmamembran, die an der Notch-Prozessierung beteiligt ist. Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung des Filamins an diesen Vorgängen ist seine Interaktion mit Furin, einer Protease, deren Substrat unter anderem auch Notch ist. Filamin ist an der intrazellulären Kompartimentierung des Furins beteiligt [Liu *et al.*, 1997].

### 3. Suche nach Bindungspartnern des *D. discoideum* Filamins

Nach bisherigen Erkenntnissen ist *D. discoideum* Filamin ein Aktin-quervernetzendes Protein, das an vielen Vorgängen in der Zelle beteiligt ist. Anhand des festgestellten Phototaxis-Defektes der Filamin-defizienten Mutante GHR [Fisher *et al.*, 1997] wurde eine Beteiligung an Signaltransduktionswegen im multizellulären, migrationsfähigen Stadium der *D. discoideum* Amöben diskutiert. Aufschluß über eine solche Vermittlerfunktion zwischen zellulären Signalen und dem Aktin-Zytoskelett könnte die Analyse von Bindungspartnern geben. In der vorliegenden Arbeit wurde daher gezielt nach Bindungspartnern des Filamins gesucht. Ein biochemischer Ansatz der Affinitätschromatographie mit gereinigten Filamin-Polypeptiden war nicht erfolgreich. Deshalb wurde mit dem „Two-Hybrid“ System ein genetischer Ansatz zur Erforschung unbekannter Bindungspartner gewählt.

Das „Two-Hybrid“ System ist auch bei *D. discoideum* Proteinen schon zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen verwendet worden. Unter anderem wurde die Assoziation des CBP1, eines entwicklungsregulierten Kalzium-bindenden Proteins mit vier EF-Hand-Strukturen, mit den Zytoskelettproteinen Protovillin und EF-1 $\alpha$  durch eine „Two-Hybrid“ cDNA-Bank Durchmusterung aufgezeigt [Dharamsi *et al.*, 2000]. Gleichzeitig wurde eine Interaktion des CBP1 mit einem unbekanntem Kalzium-bindenden Protein CBP4a gefunden [Dorywalska *et al.*, 2000]. Die Assoziation des CBP1 mit dem Aktin-Zytoskelett wurde durch indirekte Immunfluoreszenzstudien bestätigt und die partielle Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Bindungen durch *in vitro* Bindungsstudien dokumentiert. Diese Interaktionen könnten auf eine Regulation der Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts während der Zellaggregation der Amöben hinweisen. Weiterhin konnte die Interaktion der kleinen GTPase Ras mit ihrem GTPase-aktivierenden Protein Ras GAP in einer „Two-Hybrid“ Untersuchung nachgewiesen werden [Lee *et al.*, 1997].

Alle bisher bekannten Interaktionspartner der Filamine binden innerhalb der elongierten Domäne, so dass Rod 1-6 des Dd Filamins als „Köderprotein“ für die hier vorgestellte Durchmusterung der „Two-Hybrid“ Bibliotheken gewählt wurde. Da Filamin in allen Entwicklungsstadien von *D. discoideum* vorhanden ist, haben wir die „Two-Hybrid“ Bibliotheken aus dem vegetativen Stadium und von entwickelten Zellen zur Durchmusterung eingesetzt. Bei einem nicht konstitutiv exprimierten Protein müsste man die zum Entwicklungszeitpunkt passende „Two-Hybrid“ Bibliothek einsetzen, da sonst potentielle Bindungspartner identifiziert würden, die aufgrund unterschiedlicher Expressionsmuster *in*

*in vivo* nicht miteinander interagieren können. Eine allgemeine Beschränkung des „Two-Hybrid“ Systems bei der Suche nach unbekanntem Bindungspartner ist durch die notwendige Translokation der Hybridproteine in den Zellkern gegeben. Proteine mit Transmembrandomänen sind somit von einer Bindungsanalyse im „Two-Hybrid“ System ausgeschlossen. Gerade wegen der bekannten Interaktion der humanen Filamine mit verschiedenen Membranrezeptoren und Transmembranproteinen muss diese Einschränkung der gewählten Methode berücksichtigt werden. Die Bindung dieser Proteine an Filamin wurde zwar durch „Two-Hybrid“ Methoden entdeckt, jedoch wurden stets definierte zytoplasmatische Domänen dieser Proteine als „Köderprotein“ verwendet und Bereiche des Filamins als „Beuteprotein“ entdeckt. In dem in dieser Arbeit gewählten entgegengesetzten Ansatz könnte eine Interaktion von Filamin mit einem Transmembranprotein nur dann entdeckt werden, wenn die Bibliothek zufällig cDNA-Stücke enthält, die ausschließlich für zytoplasmatische Bereiche solcher Proteine kodieren. Auch Proteine, deren Interaktion über ihren N-Terminus vermittelt wird, können evtl. nicht erkannt werden, da im „Beuteprotein“ die transkriptionsaktivierende Domäne des GAL4-Proteins N-terminal fusioniert vorliegt und die Interaktionsdomäne dadurch blockiert werden könnte. Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung oder Acetylierung sind ebenfalls oft für eine Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen notwendig. Solche Bindungspartner können im „Two-Hybrid“ ebenfalls nicht gefunden werden, da posttranslationale Modifikationen der „Beuteproteine“ im Zytoplasma der Hefe nicht vollzogen werden [Fields und Sternglanz, 1994; Allen *et al.*, 1995; Phizicky und Fields, 1995].

Die durchgeführte „Two-Hybrid“ cDNA-Bank Durchmusterung führte zu zwei als richtig positiv bewerteten Hefeklonen. Die Analyse von 390 weiteren unabhängigen Hefekolonien wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Einer der positiven „Two-Hybrid“ Klone trug die Sequenzinformation der elongierten Domänen des Filamins selber. Filamin liegt *in vivo* als sehr stabiles Dimer vor [Fucini *et al.*, 1999; McCoy *et al.*, 1999]. Diese Dimerisierung konnte durch die „Two-Hybrid“ Untersuchung nochmals bestätigt werden. Auf diesem Wege wurde aber auch die Funktionsfähigkeit des Filamin-„Köderproteins“ bei der Untersuchung verifiziert. Die zweite gefundene cDNA kodiert für den C-Terminus eines unbekanntem Proteins, das wir Filamin-interagierendes Protein, FIP, genannt haben.

## 4. Das Filamin-interagierende Protein, FIP

Die durch die Durchmusterung einer *D. discoideum* Phagenbibliothek vervollständigte cDNA hat eine Länge von ca. 6,3 kb. Die Southern-Blot Analyse genomischer DNA lässt zusammen mit dem Vergleich der cDNA-Sequenz mit den Daten des *Dictyostelium discoideum* Genomprojektes auf die Existenz eines einzelnen, auf Chromosom 2 lokalisierten FIP-Genes schließen. Die genomische Sequenz enthält zwei nichtkodierende, intervenierende Sequenzbereiche (Introns). Introns sind im Genom von *D. discoideum* im Vergleich zu höheren eukaryotischen Organismen selten [Kessin, 2001], was die geringe Anzahl Introns im FIP-Gen erklärt. Bei der Untersuchung der Transkriptmenge zeigt sich eine Entwicklungsregulation der mRNA. Im vegetativen Stadium der Zellen sind nur sehr geringe Mengen des Transkripts vorhanden. Bereits im frühen Entwicklungsstadium der Amöben wird die Expression der FIP-mRNA hochreguliert und nimmt erst zum Abschluss der Entwicklung wieder ab. Dies deutet auf eine Funktion des FIP in der Entwicklung der Zellen hin. Da die mRNA-Menge bereits in der frühen Phase der Entwicklung zunimmt, könnte FIP sowohl bei der Aggregation als auch bei der Differenzierung und Fruchtkörperbildung eine Funktion übernehmen.

Durch Translation der FIP-cDNA resultiert ein aus 2038 Aminosäuren bestehendes Protein, das nur sehr geringe Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen aufweist. Diese Ähnlichkeiten wurden vor allem zu elongierten Proteinen wie z. B. der schweren Kette des Myosin II oder Interaptin beobachtet. Sie sind vermutlich strukturell bedingt, da sie innerhalb der vorausgesagten  $\alpha$ -helikalen Domäne des FIP liegen und die homologen Proteine alle eine  $\alpha$ -helikale Struktur besitzen. Die Strukturvoraussage wurde allerdings nur aufgrund der Primärsequenz des FIP getroffen und ist nicht durch experimentelle Daten unterstützt. In den  $\alpha$ -helikalen Bereichen wird durch den COILS Algorithmus [Lupas *et al.*, 1991] eine superspiralisierte „coiled coil“ Region vorhergesagt. Durch diese Superspiralisierung von  $\alpha$ -helikalen Bereichen können Dimere und Multimere gebildet werden. Unter anderem dimerisieren die Zytoskelettproteine  $\alpha$ -Keratin und Vimentin durch superspiralisierte Domänen ebenso wie die Motorproteine Myosin, Kinesin und Dynein [Burkhard *et al.*, 2001]. Auch der bei der Fusion von Membranen gebildete SNARE-Komplex besteht aus  $\alpha$ -helikalen Proteinen. Die Wechselwirkungen, die bei der Ausbildung des SNARE-Komplexes aus Synaptobrevin in der Vesikelmembran und Syntaxin und einem anderen Protein in der Zielmembran stattfinden, werden durch die Interaktion von vier  $\alpha$ -helikalen Domänen

vermittelt, die eine superspiralisierte Struktur ausbilden können. Bei FIP schwankt die durch das Computerprogramm bestimmte Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer „coiled coil“ Struktur im  $\alpha$ -helikalen Bereich des Proteins. Auch findet man in der Sequenz des FIP die für superspiralisierte Bereiche typischen Wiederholungen von sieben Aminosäuren nicht. Diese Strukturvorhersagen sind demnach nur ein erster Anhaltspunkt für eine weitere experimentelle Aufklärung der Struktur.

Zur eingehenderen Charakterisierung des FIP wurden sechs monoklonale Antikörper gegen ein rekombinantes FIP-Polypeptid hergestellt. Alle Antikörper detektieren das rekombinante Polypeptid, ein in *D. discoideum* exprimiertes GFP-cFIP-Fusionsprotein sowie endogenes FIP aus *D. discoideum* Zellextrakten im Immunoblot. Durch die Antikörper konnte die Regulation der FIP-Expression im Entwicklungszyklus auf der Proteinebene bestätigt werden. FIP ist im vegetativen Stadium der Zellen durch die Antikörper nicht nachzuweisen. Seine Expression steigt aber schon nach drei Stunden Entwicklung an und erreicht nach ca. neun Stunden ihren höchsten Wert. Die hohe Expressionsrate wird bis zur Fruchtkörperbildung beibehalten. Eine Untersuchung der FIP-Expression in Zellen der Filamin-defizienten Mutante GHR weist auf eine veränderte Regulation in diesen Zellen hin. Erste Studien zeigen eine erhöhte Expression des FIP im vegetativen Stadium, andererseits aber einen nicht so starken Anstieg während der Entwicklung dieser Zellen. Dieses Ergebnis deutet auf eine Beeinflussung der Regulation der FIP-Expression durch Filamin hin. Weitere Anhaltspunkte könnte hier eine RNA-Analyse des FIP in GHR-Zellen bringen. Die intrazelluläre Lokalisation des FIP wurde durch indirekte Immunfluoreszenzstudien mit dem FIP-Antikörper K12-454-2 geklärt. Durch den Antikörper wird in Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixierten Zellen die Plasmamembran markiert. Allerdings wird keine kontinuierliche Markierung beobachtet, sondern nur ein Anfärben von bestimmten Bereichen. Im Inneren der Zelle erkennt man vesikuläre Strukturen. Die Immunfluoreszenzanalysen mit den FIP spezifischen Antikörpern waren nicht eindeutig. Alle Antikörper erkennen das in *D. discoideum* Zellen exprimierte GFP-cFIP Fusionsprotein, das auch im Western-Blot erkannt wird. In Ax2-Zellen konnte jedoch mit den Hybridoma-überständen sowohl bei Methanol- als auch bei Paraformaldehyd/Pikrinsäure-Fixierung keine spezifische Markierung festgestellt werden. Die oben beschriebene Färbung war nur mit dem über Protein A-Sepharose gereinigten Antikörper K12-454-2 in Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixierten Zellen zu erkennen. Die Probleme bei der Immunfluoreszenz mit diesen Antikörpern könnten in der relativ niedrigen Expression des FIP begründet sein. Eine andere Ursache könnte aber auch die Lage der von den Antikörpern erkannten Epitope im Protein sein. Alle sechs Antikörper sind gegen Sequenzen in einem 32 kDa großen Polypeptid aus dem C-



terminalen Bereich des FIP gerichtet. Bei der Immunfluoreszenzanalyse liegen die untersuchten Proteine durch die Fixierung ohne reduzierende Substanzen in nahezu nativer Form vor. Sollten die von den Antikörpern erkannten Sequenzen dabei im Inneren des Moleküls liegen, so wäre die Bindung der Antikörper behindert. Diese Hypothese ließe sich evtl. durch Immunfluoreszenzanalysen unter denaturierenden Bedingungen klären. Die Epitope könnten durch die Denaturierung des Proteins möglicherweise besser für ihre Antikörper zugänglich gemacht werden. Eine Verbesserung von Immunfluoreszenzstudien durch den Einsatz reduzierender Reagenzien wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol wurde für Bestandteile von Membranen des Golgi-Apparates gezeigt [Blum et al., 1999].

Die intrazelluläre Lokalisation und Funktion wurde für den C-Terminus von FIP durch Expression eines GFP-cFIP Fusionsproteins in *D. discoideum* analysiert. GFP-cFIP befindet sich an der Plasmamembran der Zellen, bildet dort aber eine homogenere Struktur aus als bei den Immunfluoreszenzuntersuchungen mit dem FIP-Antikörper für endogenes FIP beobachtet wurde. Außerdem ist GFP-cFIP an den Membranen größerer intrazellulärer Vesikel zu finden. In Immunfluoreszenzaufnahmen erkennt man eine Kolokalisation des Fusionsproteins mit endogenem Filamin. Es könnte sein, dass die Lokalisation des GFP-cFIP durch seine Interaktion mit Filamin bedingt ist. FIP enthält in seiner Primärsequenz keine größeren hydrophoben Bereiche, die eine direkte Membranassoziation des Proteins erklären würden. Die unterschiedliche Lokalisation könnte auch durch die stärkere Expression des GFP-Fusionsproteins im Vergleich zum endogenen Protein bedingt sein. Zur Beantwortung dieser Fragestellung würde eine durch den endogenen FIP-Promoter regulierte Expression eines vollständigen FIP-GFP Fusionsproteins beitragen. Ein Vektor, der durch homologe Rekombination mit dem FIP-Gen zu der Expression dieses GFP-FIP Fusionsproteins führen soll („knock-in“ Vektor), wurde bereits konstruiert. Bislang konnten jedoch keine fluoreszierenden Transformanten erhalten werden. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass eine Beeinflussung der intrazellulären Lokalisation durch den N-Terminus des FIP durch das GFP-Fusionsprotein nicht erfasst wird. Die Verteilung des endogenen FIP könnte demnach auch durch seinen N-Terminus bedingt sein.

GFP-cFIP nimmt an zellulären Vorgängen teil, bei denen das Aktin-Zytoskelett beteiligt ist. So konnte seine Lokalisation an der Phagosomenmembran bei der Phagozytose und Exozytose von Hefen nachgewiesen werden. Filamin ist an diesen Prozessen ebenfalls beteiligt [Cox et al., 1996]. Die Assoziation des GFP-cFIP mit Filamin bleibt auch bei einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts der Zellen durch Cytochalasin A bestehen. Zusammen-

gefasst deuten diese Daten auf eine funktionelle Interaktion zwischen Filamin und FIP in *D. discoideum* Zellen hin.

GFP-cFIP exprimierende Zellen zeigen eine Veränderung der Aggregation und Fruchtkörperbildung. Sie bilden bei der Entwicklung auf Phosphatagarplatten ca. 30% kleinere Aggregate, aus denen kürzere Sporenträger (ca. 30% Reduktion der Länge) hervorgehen. Außerdem ist der Entwicklungszyklus dieser Zellen gegenüber Ax2-Zellen beschleunigt. Die Ausbildung der Sporenträger ist bei GFP-cFIP Zellen bereits nach 16 Stunden abgeschlossen, während Ax2-Zellen 24 Stunden zur Fruchtkörperbildung benötigen. Die molekulare Ursache für dieses Verhalten ist unklar. Jedoch liegt die Vermutung nahe, dass die konstitutive Expression des GFP-cFIP Fusionsproteins Einfluss auf die Entwicklung nimmt. Falls GFP-cFIP die Funktion des endogenen FIP bei der Entwicklung der Zellen ausüben kann, ist es schon im vegetativen Stadium der Zellen vorhanden. Endogenes FIP wird erst nach ca. drei Stunden Entwicklung exprimiert. Dieser Zeitvorteil könnte die Beschleunigung des Entwicklungsprozesses erklären. Außerdem wird GFP-cFIP auch im Vergleich mit der höchsten Expressionsrate des endogenen Proteins in größeren Mengen gebildet. Die Verkleinerung der Aggregate und der daraus resultierenden Fruchtkörper könnte durch diese Überexpression begründet sein. Eventuell führt eine größere Menge des Proteins zu einem schnelleren Abschluss der einzelnen Entwicklungsstadien, so dass die Zeit für die Rekrutierung einer größeren Zellzahl zu den einzelnen Aggregaten nicht ausreicht und die gesamte Entwicklung beschleunigt wird. Diese Ergebnisse weisen auf eine Funktion des FIP bei der Aggregation und Ausbildung der Sporenträger der *D. discoideum* Zellen hin.

## 5. Charakterisierung der Interaktion zwischen Filamin und FIP

Zur näheren Charakterisierung der Interaktion zwischen Filamin und FIP wurden die Bindungsdomänen beider Proteine durch „Two-Hybrid“ Experimente mit verkürzten Fusionsproteinen eingegrenzt. Ein Teilbereich des FIP, der die Aminosäuren 1719 bis 1826 enthält, bindet an die Untereinheit Rod 3 der Filamin-Sequenz. Durch welche Aminosäuren die Bindung der beiden Proteine vermittelt wird konnte noch nicht geklärt werden. Dazu würden sich Mutationsstudien der beiden Bindesequenzen anbieten, wie sie z. B. bei der Aufklärung der Interaktion des humanen Filamin B mit  $\beta_1$ -Integrin [Loo *et al.*, 1998] durchgeführt wurden. Der Filamin-Bindebereich des FIP hat eine basische (pI=9,81), Filamin Rod 3 eine saure Aminosäurezusammensetzung (pI=4,5). Die Bindung könnte demnach durch Säure-

Base-Wechselwirkungen vermittelt werden. Da aber die Wiederholungseinheiten Rod 1 bis 5 alle isoelektrische Punkte zwischen 4,1 und 4,8 aufweisen, lässt sich die spezifische Bindung an Rod 3 nur aus Betrachtungen der isoelektrischen Punkte nicht erklären. Bei aufgrund der Sekundärstruktur berechneten Oberflächenladungsanalysen fällt jedoch Rod 3 durch eine deutlichere Trennung der positiven und negativen Ladungen auf der Oberfläche auf [Fucini, 1997]. Das basische FIP könnte demnach an diesen rein negativ geladenen Oberflächenbereich des Rod 3 binden, während die Säure-Base-Wechselwirkungen mit den anderen Domänen durch eine Vermischung der positiven und negativen Ladungen auf der Oberfläche gestört ist. Bei einem Vergleich der Homologien zwischen Rod 3 und den humanen Filaminen erhält man die größte Übereinstimmung mit der Wiederholungseinheit 17 dieser Proteine. Beide Untereinheiten weisen 34% identische und 14% ähnliche Aminosäuren auf. Die Übereinstimmung zwischen den humanen Filaminen selber ist allerdings wesentlich größer. Über diesen Bereich des humanen Filamins findet z. B. die Interaktion mit dem Glykoprotein I $\beta$  statt. FIP hat jedoch keinerlei Ähnlichkeit mit einem in diesem Bereich bindenden bereits bekannten Bindungspartner der Filamine. Vielmehr weist FIP bei Datenbankrecherchen keine signifikanten Homologien zu Proteinen anderer Organismen auf. Die Daten der verschiedenen Genomprojekte, wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* oder *C. elegans* lassen auf bis zu 30% Organismus-spezifische Proteine schließen, die eine spezialisierte Funktion innerhalb dieses Organismus erfüllen. Diese Proteine haben keine Homologen in anderen Organismen. Nach den bisherigen Daten des *D. discoideum* Genomprojektes kann man auch für *D. discoideum* mit einem zu 30-40% Organismus-spezifischen Proteom rechnen. Das Fehlen von zu FIP ähnlichen Proteinen legt eine *D. discoideum*-spezifische Funktion dieses Proteins nahe.

Die über das „Two-Hybrid“ System entdeckte Bindung zwischen Filamin und FIP wurde durch *in vitro* Analysen mit rekombinanten FIP- und Filamin-Polypeptiden sowie mit Zellextrakten von *D. discoideum* Zellen bestätigt. FIP und Filamin binden sowohl in ELISA-Assays als auch in „Blot-Overlay“ Untersuchungen aneinander. Diese Nachweismethoden wurden auch bei der Verifikation der Bindungen zwischen humanen Filaminen und Bindungspartnern angewendet. So wurde die Interaktion des Filamin B mit  $\beta_1$ -Integrin durch einen ELISA-Assay mit synthetischen Integrin-Peptiden bewiesen [Loo *et al.*, 1998]. „Blot-Overlay“ Untersuchungen hingegen wurden bei der Interaktion des FATZ-Proteins mit der muskelspezifischen Isoform des Filamins als Nachweis benutzt [Faulkner *et al.*, 2000]. Die eleganteste Methode des Bindungsnachweises, die Koimmunpräzipitation der beiden Proteine

aus Zellextrakten, gelang jedoch nicht. Allerdings konnte die Koimmunpräzipitation mit rekombinanten Polypeptiden erfolgreich durchgeführt werden.

Alle diese Untersuchungen lassen auf eine spezifische Interaktion des *D. discoideum* Filamins mit seinem neu entdeckten Bindungspartner FIP schließen. Erste Ergebnisse zur Aufklärung der in vivo Funktion der Interaktion zwischen Filamin und FIP deuten auf eine Funktion des FIP bei der Entwicklung der *D. discoideum* Zellen zum multizellulären Zellverband hin. FIP und Filamin könnten dabei gemeinsam die erforderlichen Umorganisationen des Aktin-Zytoskeletts vermitteln. Die anderen Mitglieder der Filamin-Familie tragen über ihre Interaktionen mit Membranrezeptoren wie z. B.  $\beta$ -Integrinen oder dem von-Willebrand-Faktor-Rezeptor-Komplex zur mechanischen Stabilisierung von Zellen und von Zell-Zell-Interaktionen bei [Pfaff *et al.*, 1998; Loo *et al.*, 1998; ; Takafuta *et al.*, 1998]. Weiterhin übernehmen Filamine durch ihre Bindung an Bestandteile von Signaltransduktionswegen die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts nach Aktivierung der Signalkaskaden. Aufgrund des Defektes bei der Phototaxis der Filamin-defizienten *D. discoideum* Zelllinie GHR wird auch eine Teilnahme des Dd Filamins bei der zellulären Signalübermittlung im multizellulären Stadium der Amöben diskutiert [Fisher *et al.*, 1997]. Da FIP ebenfalls in diesem Stadium der Zellen exprimiert wird, könnte eine Filamin-FIP Interaktion z. B. bei der Weiterleitung des Phototaxissignals zum Aktin-Zytoskelett eine Rolle spielen. Diese Hypothese lässt sich nur durch weiterführende Studien der Filamin-FIP Interaktion klären. Dabei könnten vor allem Studien des FIP in Filamin-defizienten Zellen sowie die Darstellung und Charakterisierung einer FIP-defizienten *D. discoideum* Zelllinie von Nutzen sein.

## D Zusammenfassung

---

*D. discoideum* Filamin (Dd Filamin) gehört zur Filamin-Familie der Aktin-quervernetzenden Proteine, die Aktin-Filamente zu dreidimensionalen Netzwerken verknüpfen. Für Mitglieder der Filamine-Familie wurden mehr als 20 Proteine als Bindepartner beschrieben, über die eine Beteiligung des Filamins an Signaltransduktionswegen und bei der Erhaltung der mechanischen Stabilität von Zellen vermittelt wird. Außer Aktin ist für Dd Filamin bislang kein weiterer Bindungspartner beschrieben worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine „Two-Hybrid“ cDNA-Bank Durchmusterung ein neuer Bindungspartner des *D. discoideum* Filamins identifiziert. Die aus einer Phagenbibliothek vervollständigte cDNA-Sequenz kodiert für ein aus 2038 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 229.799 Da, das Filamin-interagierendes Protein (FIP) genannt wurde. Das FIP-Gen ist auf dem Chromosom 2 lokalisiert. RNA-Transkript und Protein sind in *D. discoideum* Zellen entwicklungspezifisch reguliert. Im vegetativen Stadium der Amöben sind nur sehr geringe Mengen FIP vorhanden, die Expression steigt jedoch während der Aggregation der Zellen an, erreicht nach neun Stunden ihr Maximum und bleibt bis zum Ende der Entwicklung konstant. Bei Zellfraktionierungsexperimenten ist FIP zum größten Teil im Zytosol zu finden, eine Subpopulation interagiert jedoch mit Membranen. Die intrazelluläre Lokalisation wurde in indirekten Immunfluoreszenzstudien untersucht. In entwickelten *D. discoideum* Zellen liegt FIP in einer punktierten, vesikulären Verteilung unter der Plasmamembran und im Zytoplasma vor.

Es wurden monoklonale Antikörper gegen ein rekombinantes FIP-Polypeptid hergestellt. Die sechs Antikörper reagieren im Immunoblot mit rekombinanten Antigenen, endogenem FIP und einem GFP-cFIP Fusionsprotein. In Immunfluoreszenzuntersuchungen erkennen alle Antikörper das GFP-cFIP Fusionsprotein, jedoch nur ein Antikörper das endogene Protein.

Die für die Bindung zwischen Filamin und FIP verantwortlichen Bereiche konnten durch „Two-Hybrid“ Untersuchungen von Deletionsmutanten auf die Wiederholungseinheit Rod 3 des Filamins und auf eine Aminosäuresequenz aus 107 Aminosäuren (AS 1719-1826) vom C-Terminus des FIP eingegrenzt werden.

Die Interaktion zwischen Filamin und FIP wurde durch *in vitro* Untersuchungen mit rekombinanten FIP- und Filamin-Polypeptiden sowie mit *D. discoideum* Zellextrakten

bestätigt. Filamin und FIP binden in ELISA-Assays, in „Blot-Overlay“ Untersuchungen und bei Koimmunpräzipitationen rekombinanter Polypeptide aneinander.

Die Lokalisation des C-Terminus von FIP in lebenden Zellen wurde mit Hilfe eines GFP-Fusionsproteins untersucht. GFP-cFIP färbt die Plasmamembran und kolokalisiert mit Filamin. In polarisierten Zellen ist es in der rückwärtigen Region zu finden, während Aktin sich im vorderen Bereich der Zelle befindet. Bei der Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin A bildet GFP-cFIP fleckenartige Strukturen im Außenbereich der Zellen, in denen es mit Filamin und Aktin kolokalisiert. Unter Einfluß von 2,4-Dinitrophenol wird die oxidative Phosphorylierung entkoppelt, wobei die GFP-cFIP Fluoreszenz an der Plasmamembran abnimmt. Weiterhin konnte GFP-cFIP bei der Phago- und Exozytose von Hefen als Bestandteil der Pseudopodien und des Phagosoms nachgewiesen werden.

Die GFP-cFIP exprimierenden Zellen zeigen Unterschiede bei der Entwicklung zum multizellulären Organismus. GFP-cFIP Zellen bilden kleinere Aggregate und kürzere Sporenträger aus. Außerdem ist ihre Entwicklung zum Fruchtkörper gegenüber Ax2-Zellen um acht Stunden beschleunigt.

Alle diese Ergebnisse weisen auf eine funktionelle Interaktion zwischen Filamin und FIP bei der Entwicklung der *D. discoideum* Zellen zum multizellulären Fruchtkörper hin.

## E Material und Methoden

---

### 1. Material

#### 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 <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> und 175 cm <sup>2</sup>	Nunc
Gewebekulturplatten, 24 Loch, Ø 16 mm	Nunc
Hybridisierungsröhren	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, Biodyne	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

#### 1.2 Geräte

Blotkammer Trans-Blot SD	BioRad
Chromatographiesäulen:	
Mono S <sup>®</sup> Kationenaustauscher	Pharmacia Biotech
Uno <sup>™</sup> S Kationenaustauscher	BioRad
Leersäulen	BioRad
Chromatographiesysteme:	
BioLogic Workstation	BioRad
Smart <sup>®</sup> Mikrochromatographiesystem	Pharmacia Biotech
Crosslinker UVC 500	Hoefler

Elektroporationsgerät, Typ Gene-Pulser	BioRad
Elisa Reader, Multiscan RC	Labsystems
Fraktionssammler, Modell 2128	BioRad
Fraktionssammler, 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
Lichtmikroskop, Typ DMIL	Leica
Laser Scan Mikroskop	Leica
Multipipette, Multipette plus	Eppendorf
PCR-Maschine	MWG-Biotech
Peristaltikpumpe P1	Pharmacia Biotech
Plattengießmaschine	Technomat
Rotoren:	
Typ JA-10	Beckman
Typ JA-25.50	Beckman
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
Sigma	B. Braun Biotech 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



### 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 <sup>®</sup> It II	Stratagene
Original TA Cloning <sup>®</sup>	Invitrogen

### 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, Gibco-BRL, New England Biolabs
RNase A (Ribonuklease)	Sigma
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase	Gibco-BRL
Taq-DNA-Polymerase	Roche

#### Primäre Antikörper

anti-Aktin-Antikörper mAk Act 1-7	Simpson <i>et al.</i> , 1984
anti- $\alpha$ -Actinin-Antikörper mAk 47-60-8	Schleicher <i>et al.</i> , 1984
anti-GFP-Antikörper mAk K3-184-2	unveröffentlicht
anti-Filamin-Antikörper mAk 82-382-8	Brink <i>et al.</i> , 1990
anti-Filamin-Antikörper mAk 82-454-12	Brink <i>et al.</i> , 1990
anti-FIP230-Antikörper mAk K12-131-2	vorliegende Arbeit
anti-FIP230-Antikörper mAk K12-263-5	vorliegende Arbeit
anti-FIP230-Antikörper mAk K12-290-4	vorliegende Arbeit
anti-FIP230-Antikörper mAk K12-349-7	vorliegende Arbeit
anti-FIP230-Antikörper mAk K12-362-6	vorliegende Arbeit
anti-FIP230-Antikörper mAk K12-454-2	vorliegende Arbeit

#### Sekundäre Antikörper

Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma

Inhibitoren

Aprotinin	Sigma
Benzamidin	Sigma
Complete <sup>®</sup> Inhibitoren Cocktail	Roche
Cytochalasin A	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
2,4-Dinitrophenol (DNP)	Sigma
E 64 (trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan)	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma

Antibiotika

Ampicillin	Grünenthal
Blasticidin S	ICN
Dihydrostreptomycinsulfat	Sigma
Geneticin (G-418)	Gibco-BRL
Kanamycin	Sigma
Tetracyclin	Sigma

**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
Aminosäuren	Sigma
3-Amino-1,2,4-triazol	Sigma
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Pepton	Difco
Bacto-Trypton	Difco
BCIP/NBT Farbwentwicklungssubstrat	Promega
Borsäure	Merck
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth
Bromphenolblau (Na-Salz)	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Chloroform	Riedel-de Haen
Coomassie-Brilliant-Blau G 250	Roche
Coomassie-Brilliant-Blau R 250	Serva
p-Cumarsäure	Fluka
Cycloheximid	Sigma
DE-52 (Diethylaminoethyl-Cellulose)	Whatman
Dimethylformamid (DMF)	Riedel-de Haen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
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 (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
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Kaliumhydrogenphosphat-Triphosphat	Merck
Imidazol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Loewe Biochemica
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Maltose	Merck
$\beta$ -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
Nukleotide	Sigma, Roche
Paraformaldehyd	Sigma
Pepton	Oxoid
Phenol	Roth
Phosphorsäure	Merck
Pikrinsäure	Sigma
Polyethylenglycol 4000	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' -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Trichloressigsäure	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Fluka, Riedel-de Haen
Triton X-100 (Octylphenylpoly(ethylenglykolether))	Merck
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- <sup>32</sup> P-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (10 mCi/ml)	Amersham
--	----------

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

## 1.6 Vektoren

pACT2	Durfee <i>et al.</i> , 1993
pAS2	Harper <i>et al.</i> , 1993
pBluescript SK (-)	Short <i>et al.</i> , 1988
pCR-2.1	Kit: Invitrogen
pDex-GFP	Westphal <i>et al.</i> , 1997
pGemTeasy	Kit: Promega
pT7-7	Tabor, 1990

## 1.7 Oligonucleotide

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

### Oligonucleotide für den pACT2-Vektor des „Two-Hybrid“ Systems

Gal4AD	5' -TACCACTACAATGGATG- 3'
Rev4AD	5' -GAGATGGTGCACGATGCACAG- 3'

### Oligonucleotide für den pAS2-Vektor des „Two-Hybrid“ Systems

PpAS2-1	5' -TCATCGGAAGAGAGTAG- 3'
---------	---------------------------

Oligonucleotide für FIP230

FIP156v	5' -GCAATTA AATTAGCAGATGC- 3'
FIP676v	5' -CAGATTTAGACGATCCATCA- 3'
FIP1119r	5' -GTTGATTTAAAGTATCATTTAAAAT- 3'
FIP1312v	5' -GGCACGAGTTTAAATTCAATCGATGGT- 3'
FIP1444r	5' -GTACCAACTATTGCTTGAGTAT- 3'
FIP1582v	5' -CAGAATTATTACCATTACAAAT- 3'
FIP1716r	5' -CCATTAATGATTGAATCTTTGATAATG- 3'
FIP2161v	5' -GCCATCCACAATCGGTTACACCA- 3'
FIP3262r	5' -GCAGCTTCAACTTGATCAACGAT- 3'
FIP3395v	5' -ACAAGATTTATCACCAACTACAATCT- 3'
FIP3510vBamHI	5' -GGGATCCGAGAATTAGAGAAAAACATCAAC- 3'
FIP3723v	5' -GAATTAGATAAATTAGAATCAAATGCA- 3'
FIP3832r	5' -AGTTCCTTATAATAGTAATCGTCTAAG- 3'
FIP3967v	5' -TGTTACAATCAAAGATATAC- 3'
FIP4278r	5' -CTAAATAAGATTGTTGTCTTGATAAATCG- 3'
FIP4540v	5' -GACAATCAACTCAACAACCAA- 3'
FIP4857vEcoRI	5' -GAATTCGATTCAATTGATCCTATATTCCAATT- 3'
FIP4857vNdeI	5' -CATATGGATTCAATTGATCCTATATTC- 3'
FIP4858vBamHI	5' -GGGATCCGAGATTCAATTGATCCTATATTCC- 3'
FIP4880rSacI	5' -CGAGCTCTTAAGGATCAATTGAATCTAATTGA- 3'
FIP5075v	5' -ATCACAATTGAAATCTAAATTATCTGAT- 3'
FIP5155vBamHI	5' -GGGATCCCAGACACAATTAAAGCTGAGA- 3'
FIP5173vBamHI	5' -GGGATCCAGGATATGTCAATCTCTTCACT- 3'
FIP5179rSacI	5' -CGAGCTCTCCTTCTCAGCTTTAATTGTGTC- 3'
FIP5456r	5' -TACTTGAGCTGTTGAAATGAT- 3'
FIP5482vBamHI	5' -GGGATCCAACCTCAAAAACCAATTTTAAAC- 3'
FIP5503rSacI	5' -CGAGCTCGTTAAAATTGGTTTTTGGAGTT- 3'
FIP5744rSalI	5' -GTCGACTTATGCTGCATTAATACATGAATCTT- 3'
FIP5744rXhoI	5' -CTCGAGTTATGCTGCATTAATACATGAATCTTCT- 3'
FIP5796v	5' -GAATTGGAAGCTTATGCAAATGC- 3'
FIP5969r	5' -ACCAATACCAGACTACATCTTG- 3'
FIP6007v	5' -CAAGTGTTAAAGCTGCTTCTG- 3'
FIP6137rPstI	5' -CTGCAGCTTTTTTAAATTTGTTTTAAAGTACTTGTAC- 3'
FIP6140rSacI	5' -CGAGCTCTTACTTTTTTAAATTTGTTTTAAAGT- 3'
FIP6140SalI	5' -GTCGACTTACTTTTTTAAATTTGTTTTAAAGT- 3'

Oligonukleotide für Filamin

FIL728vNcoI	5' -CGCCCATGGAACGTCGTGAAACTTCAG- 3'
FIL740vNcoI	5' -CGCCCATGGCTTCAGATGCCAGCAAGG- 3'
FIL1322vNcoI	5' -CGCCCATGGCAACCGAAGTTAAGATCCTC- 3'
FIL1364rBamHI	5' -GGATCCTTAACTGTTTTGAGAGTCAGAG- 3'
FIL1628vNcoI	5' -CCCATGGTTCATATTAACCAGCTGCT- 3'
FIL1761rBamHI	5' -CTACGCAGGATCCTCAAGCGTATGATTTCTCTGG- 3'
FIL1959rBamHI	5' -GGATCCTTAGTGTTTCAGCGGATGGGG- 3'
FIL2574rSalI	5' -CGCGTTCGACTTAATTGGCAGTACGAGTA- 3'

## 1.8 Puffer und andere Lösungen

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

<u>Hepes-Phenol:</u>	1 kg (10,6 mol) Phenol wird bei 60 °C im Wasserbad geschmolzen und mit gleichem Volumen 1 M Hepes pH 7,5 äquilibriert. Die Lösung wird in Portionen bei -20 °C eingefroren.
<u>10 x MOPS (pH 7,0/ pH 8,0):</u>	41,9 g (0,2 mol) MOPS 16,7 ml 3 M Natriumacetatlösung 20 ml 0,5 M EDTA-Lösung mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.
<u>10 x NCP-Puffer (pH 8,0):</u>	12,1 g (0,1 mol) Tris/HCl 87,0 g (1,5 mol) NaCl 5,0 ml Tween 20 mit Wasser auf 1 l auffüllen.
<u>PBG (pH 7,4):</u>	0,5% Rinderserumalbumin 0,1% Gelatine in 1 x PBS
<u>PBS (pH 7,2/ pH 8,0):</u>	Eine Lösung aus 30 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ und 150 mM NaCl wird mit 70 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ auf einen pH-Wert von 7,2 oder 8,0 eingestellt. Die Lösung wird anschließend autoklaviert.
<u>1,2 M Phosphatpuffer (pH 6,8):</u>	1,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung wird mit 1,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung in einem Verhältnis von 2:1 gemischt.
<u>20 x SSC:</u>	3 M NaCl 0,3 M Natriumzitat
<u>TE-Puffer (pH 8,0):</u>	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA, pH 8,0
<u>Tris-Phenol:</u>	1 kg (10,6 mol) Phenol wird im Wasserbad bei einer Temperatur von ungefähr 60 °C geschmolzen und mit dem gleichen Volumen 1 M Tris/HCl pH 8,0 äquilibriert.

10 x Tris/Phosphatpuffer (pH 8,0): 43 g (0,36 mol) Tris  
41,4 g ( 0,25 mol) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 1 H<sub>2</sub>O  
3,7 g (10 mmol) EDTA  
auf 1 l mit Wasser auffüllen. Der pH-Wert wird mit Phosphorsäure eingestellt. Die Lösung wird anschließend autoklaviert.

10 x Tris/Boratpuffer (pH 8,3): 108 g (0,9 mol) Tris  
55 g (0,9 mol) Borsäure  
7,4 g (20 mmol) EDTA  
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

50 x Tris/Acetatpuffer (pH 8,0): 242 g (2 mol) Tris  
57,1 ml 16,6 M Eisessig  
100 ml 0,5 M EDTA-Lösung  
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

## 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.

### 1.9.1 Medien für die *E. coli*-Kulturen [Sambroock *et al.*, 1989]

#### LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g (85,5 mmol) NaCl  
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

#### SOC-Medium:

20 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
0,5 g (8,5 mmol) NaCl  
20 mM Glucose  
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

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

### 1.9.2 Medien für die *Dictyostelium discoideum* Kulturen

#### Kulturmedium (pH 6,7):

[Watts und Ashworth, 1970]

14,3 g Pepton  
18 g (0,1 mol) Maltose  
0,616 g (3,5 mmol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
0,486 g (3,6 mmol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

#### Salzlösung:

[Bonner, 1947]

10 mM NaCl  
10 mM KCl  
2,7 mM  $\text{CaCl}_2$

#### Phosphatagarplatten (pH 6,0):

15 g Agar agar  
mit Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 6,0) auf 1 l auffüllen.

#### SM-Agarplatten (pH 6,5):

10 g Agar agar  
10 g Pepton  
10 g (55 mmol) Glucose  
1 g Hefeextrakt  
1 g (4,1 mmol)  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
2,2 g (16,2 mmol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
1 g (5,7 mmol)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

#### Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 6,0):

[Malchow *et al.*, 1972]

2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

### 1.9.3 Medien für die Hefekulturen

#### YEPD-Medium:

20 g/l Difco Pepton  
10 g/l Hefeextrakt

#### YEPD-Agarplatten:

20 g/l Difco Pepton  
10 g/l Hefeextrakt  
18 g/l Agar agar

#### 100 x Adeninlösung:

200 mg (1,1 mmol) Adenin in 100 ml  
Wasser mit etwas HCl lösen und steril  
filtrieren.

#### 100 x Tyrosinlösung:

300 mg (1,7 mmol) Tyrosin in 100 ml  
Wasser mit etwas NaOH lösen und steril  
filtrieren.

#### 100 x Histidinlösung:

200 mg (1 mmol) Histidin in 100 ml  
Wasser lösen und steril filtrieren.

#### 100 x Leucinlösung:

1000 mg (7,6 mmol) Leucin in 100 ml  
Wasser lösen und steril filtrieren.

#### 100 x Tryptophanlösung:

200 mg (1 mmol) Tryptophan in 100 ml  
Wasser lösen und steril filtrieren.

#### 100 x Uracillösung:

200 mg (1,8 mmol) Uracil in 100 ml  
Wasser unter Erwärmen lösen und  
steril filtrieren.



1 M 3-Amino-1,2,4-triazollösung:

8,4 g 3-Amino-1,2,4-triazol in 100 ml Wasser lösen, einmal filtrieren und Filtrat steril filtrieren.

100 x Cycloheximidlösung:

1 mg/ml Cycloheximid in Wasser lösen und steril filtrieren.

10 x Aminosäurelösung:

300 mg (2,3 mmol) Isoleucin  
1500 mg (1,1 mmol) Valin  
200 mg (0,9 mmol) Arginin  
300 mg (1,6 mmol) Lysin  
200 mg (1,34 mmol) Methionin  
500 mg (3 mmol) Phenylalanin  
2000 mg (16,8 mmol) Threonin  
mit Wasser auf 1 l auffüllen  
und steril filtrieren

Die Zusammensetzung der Selektionsmedien und Agarplatten wird in Tabelle 6 angegeben. Nach der Zugabe von „Yeast Nitrogen Base“, Agar agar und Wasser wurde die Mischung zunächst autoklaviert. Die Zugabe der restlichen Stocklösungen erfolgte nach Abkühlung auf 55°C.

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Selektionsagarplatten für das „Two-Hybrid“-System<sup>1) 2)</sup>**

Reagenzien	Selektionsplatten				
	SD/-Leu	SD/-Leu+Cyh	SD/-Leu/-Trp	SD/-Trp	SD/-Leu/-His/-Trp/+3-AT
Yeast Nitrogen Base [g]	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
Agar agar [g]	20	20	20	20	20
Wasser [ml]	750	750	770	750	745
20%ige Glucoselösung <sup>3)</sup> [ml]	100	100	100	100	100
10 x Aminosäurelösung [ml]	100	100	100	100	100
100 x Adenin [ml]	10	10	10	10	10
100 x Tyrosin [ml]	10	10	10	10	10
100 x Uracil [ml]	10	10	10	10	10
100 x Histidin [ml]	10	10	10	10	#
100 x Leucin [ml]	#	#	#	10	#
100 x Tryptophan [ml]	10	10	#	#	#
Cycloheximidlösung [ml]	#	10	#	#	#
3-AT-Lösung [ml]	#	#	#	#	25

1) Angaben für 1 l Agarplatten. 2) Die Zusammensetzung der Selektionsmedien entspricht der Zusammensetzung der jeweiligen Agarplatten ohne Agar agar. 3) Glucoselösung vor Gebrauch steril filtrieren.

## 1.10 Bakterien-, *D. discoideum*- und Hefestämme

### Bakterienstämme

<i>E. coli</i> JM 38	Vieira und Messing, 1982
<i>E. coli</i> K 38	Tabor und Richardson, 1985
<i>E. coli</i> XL1 blue	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> BL21 (DE)	Studier und Moffat, 1986
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> BNN 132	Elledge <i>et al.</i> , 1991
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Williams und Newell, 1976

### *D. discoideum*-Stämme

AX2-214	Axenisch und auf Bakterien wachsender Abkömmling von NC4 [Raper, 1935].
GHR	Filamin-defiziente Mutante von AX2 [Eichinger <i>et al.</i> , 1996]
GFP-cFIP	Fusionsprotein zwischen GFP und dem C-Terminus von FIP exprimierender Abkömmling von AX2 [diese Arbeit]

### Hefestämme

Y190	Harper <i>et al.</i> , 1993
Y187	Flick und Johnston, 1990 Harper <i>et al.</i> , 1993

## 2 Kultur von *Dictyostelium discoideum*

### 2.1 Anzucht in Flüssigmedium

AX2 und Transformanten wurden aus Vorkulturen, Sporen oder von SM-Agarplatten in AX2-Medium angeimpft. Um die Kulturen von *Klebsiella aerogenes* zu befreien, wurden die *D. discoideum* Zellen in Dihydrostreptomycinsulfat (40  $\mu\text{g/ml}$ ) enthaltendes Medium überführt. Die Generationszeit in Schüttelkultur betrug in 300 ml Kulturen bei 21 °C und 160 upm zwischen 8 und 9 Stunden. Bei allen zellbiologischen Untersuchungen wurden die Zellen bis zu einer Dichte von maximal  $5 \times 10^6$  Zellen/ml angezogen. Ab  $5 \times 10^6$  Zellen/ml beginnt die Wachstumskurve in die stationäre Phase überzugehen.

## 2.2 Anzucht auf Agarplatten

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

## 2.3 Sporengewinnung und Konservierung

Axenisch gewachsene Zellen wurden zweimal mit kaltem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen, mit einer Dichte von  $2 \times 10^8$  Zellen/ml resuspendiert und je 500 µl auf Phosphatagarplatten gebracht. Die Zellen entwickelten sich innerhalb von zwei Tagen und bildeten Fruchtkörper. Die Sporen wurden im Deckel einer Petrischale gesammelt, in 10 ml kaltem Soerensen-Puffer aufgenommen, in 1 ml Aliquots auf Einfrierröhrchen (Nunc, 2,2 ml) verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Sporen wurden bei -80 °C gelagert. Zum Animpfen wurde ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut und in 30 ml AX2-Medium gegeben. Nach drei Tagen bei 21 °C und 160 upm hatte diese Vorkultur eine Zelldichte von etwa  $5 \times 10^6$  Zellen/ml.

## 2.4 Einfrieren von *D. discoideum*-Zellen

Zur Konservierung von *D. discoideum*-Zellen wurden axenisch gewachsene Zellen geerntet und mit einer Dichte von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots auf Einfrierröhrchen (Nunc, 2,2 ml) verteilt, die zwei Stunden auf Eis gehalten wurden. Nach weiteren zwei Stunden bei -20 °C wurden die Ampullen bei -80 °C gelagert. Um eingefrorene Zellen wieder anzuziehen, wurde ein Aliquot aufgetaut, die Zellen mit kaltem AX2-Medium gewaschen und der Inhalt in eine Kulturschale mit 10 ml AX2-Medium überführt. Bei Transformanten wurde nach 24 Stunden das Medium gewechselt und Geniticin in einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben. Nach sichtbarem Anwachsen der Zellen wurde die Konzentration auf 20 µg/ml erhöht.

---

<u>EinfriermEDIUM:</u>	9 ml AX2-Medium
	1 ml DMSO
	1 ml Pferdeserum (Oxoid)

## 2.5 Entwicklung von *D. discoideum* in Suspensionskultur

Nahrungsentzug in Schüttelkultur induziert Entwicklungsprozesse, die zur Expression entwicklungsregulierter Proteine führen. Unter diesen Bedingungen erreichen die Zellen Aggregationskompetenz, d. h. sie bilden stabile Zell-Zell-Kontakte aus und formen „tight aggregates“. Diese sind jedoch an einer morphologischen Weiterentwicklung gehindert. Die Expression entwicklungsregulierter Gene ist in Schüttelkultur gegenüber der Entwicklung auf Agarplatten um einen Faktor 1,5 bis 2 beschleunigt. Die mediumfrei gewaschenen Zellen wurden auf eine Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in Soerensen-Puffer pH 6,0 eingestellt und bei 21 °C und 160 upm geschüttelt. Dieser Zeitpunkt gilt als Beginn der Entwicklung ( $t_0$ ).

## 2.6 Entwicklung von *D. discoideum* auf Phosphatagarplatten

In Phosphatpuffer gewaschene *D. discoideum* Zellen wurden auf eine Dichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Je 5 ml dieser Suspension wurden auf Phosphatagarplatten ausgebracht, die Zellen 15 min absitzen gelassen und der überschüssige Puffer abgesaugt. Die Platten wurden im sterilen Luftstrom getrocknet und bei 21 °C inkubiert. Zu den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten wurden die Zellen durch Abspülen mit Soerensen-Puffer geerntet.

# 3 Proteinchemische und immunologische Methoden

## 3.1 Expression und Reinigung der bakteriell exprimierten elongierten Domänen des Filamins

Zur Expression der elongierten Domänen des Filamins wurde das Plasmid pT7-7/Rod 1-6 [Köppel, 1994] in *E. coli* K38 [Russel & Model, 1984] transformiert. Dieser Stamm enthält das Plasmid pGP1-2 [Tabor & Richardson, 1985], welches für die hitzeinduzierbare T7 RNA-Polymerase kodiert, die für die Transkription klonierter DNA im Vektor pT7-7 zuständig ist. Zellen, die sowohl pGP1-2 als auch pT7-7/Rod 1-6 enthielten, wurden in LB-Medium plus Ampicillin (50 µg/ml) plus Kanamycin (50 µg/ml) bei 30 °C über Nacht angezogen. Nach einer 1:20 Verdünnung wurden die Zellen bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen.

Nach Inkubation bei 42 °C für 30 min wurde Rifampicin zugegeben (Endkonzentration 200 µg/ml) und die Zellen weitere 10 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und dann geerntet (3000 x g, 10 min, 4°C).

Für die Expression des Polypeptids Rod 2-4 wurde pT7-7/Rod 2-4 in *E. coli* BL21 (DE) [Studier & Moffat, 1986] transformiert und die Zellen in LB plus Ampicillin (50 µg/ml) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach einer 1:20 Verdünnung wurden die Zellen bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen. IPTG wurde in einer Endkonzentration von 0,2 mM zugegeben und die Zellen weitere 4 Stunden inkubiert, bevor sie geerntet wurden.

Zur Aufreinigung der exprimierten Polypeptide wurden die Zellsedimente in TEDAB/P-Puffer gewaschen und in 15 ml TEDAB/P-Puffer pro Liter Ausgangssuspension aufgenommen. Nach Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff und Auftauen wurde Lysozym in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugegeben und die Suspension 45 min auf Eis inkubiert. Nach fünfmaliger Ultraschallbehandlung für jeweils 10 sec wurde das Lysat bei 35.000 x g für 20 min abzentrifugiert. Beide Polypeptide waren löslich. Der Überstand wurde auf eine DEAE-Säule geladen und mit einem 0-350mM NaCl-Gradienten in TEDAB/P-Puffer eluiert. Die Fraktionen, die die rekombinanten Proteine enthielten, wurden vereinigt. Im Falle des Rod 1-6 wurde das Protein mittels einer Gelfiltrationssäule (Sephacryl S300) in IEDANB/P-Puffer weiter aufgereinigt. Das Polypeptid Rod 2-4 wurde auf 1,7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, umgepuffert und auf eine Phenylsepharosesäule geladen. Die Elution erfolgte im linearen 1,7-0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gradienten in 100 mM Natriumphosphat-puffer, pH 7,0. Die gereinigten Proteine wurden bei 4 °C oder bei -70 °C gelagert.

TEDAB/P-Puffer (pH 8,0):

10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
1 mM EGTA  
1 mM DTT  
1 mM Benzamidin  
1 mM PMSF

IEDANB/P-Puffer (pH 7,6):

10 mM Imidazol  
1 mM EGTA  
1 mM DTT  
200 mM NaCl  
1 mM Benzamidin  
1 mM PMSF

### 3.2 Expression und Reinigung eines bakteriell exprimierten Teilstücks des Filamin-Interagierenden-Proteins (FIP)

Zur Expression eines C-terminalen Teiles des FIP-Proteins wurde pT7-7/C-FIP in *E. coli* BL21 (DE) [Studier & Moffat, 1986] transformiert und die Zellen in LB plus Ampicillin (50 µg/ml) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach einer 1:20 Verdünnung wurden die Zellen bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen. IPTG wurde in einer Endkonzentration von 0,2 mM zugegeben und die Zellen weitere 4 Stunden inkubiert, bevor sie geerntet wurden.

Zur Aufreinigung des exprimierten Polypeptids wurden die Zellsedimente in TEDA-Puffer, pH 7,0, der 1 mM PMSF enthielt, gewaschen und in 15 ml TEDA-Puffer pro Liter Ausgangssuspension aufgenommen. Nach Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff und Auftauen wurde Lysozym in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugegeben und die Suspension 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Inkubation mit 0,025% Natriumdesoxycholat. Dann wurde DNase I zugegeben und die Mischung 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaliger Ultraschallbehandlung für jeweils 10 sec wurde das Lysat bei 35.000 x g für 20 min abzentrifugiert. Das C-FIP-Polypeptid war löslich.

Zur Aufreinigung wurde der Überstand je nach Menge auf eine Mono S<sup>®</sup> Kationenaustauschersäule (Pharmacia Biotech) oder eine Uno<sup>™</sup> S Kationenaustauschersäule (BioRad) geladen. Die Elution erfolgte im linearen 0-1000 mM NaCl-Gradienten in TEDA-Puffer. Gereinigtes C-FIP wurde stets bei -70 °C gelagert.

TEDA-Puffer (pH 7,0):  
50 mM Tris/HCl, pH 7,0  
5 mM EDTA  
5 mM DTT  
5 mM Benzamidin  
1 mM PMSF

### 3.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

#### 3.3.1 Immunisierung von Mäusen

Zur Immunisierung wurden zwei Balb/C Mäuse verwendet. Beide Mäuse wurden mit gereinigtem FIP-Polypeptid immunisiert. Bei Maus 1 wurde Freund's Adjuvans benutzt. Die Maus wurde dreimal im Abstand von jeweils drei Wochen mit ca. 100 µg 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 10 µg Polypeptid. Bei beiden Mäusen fand die letzte Injektion vier Tage vor der Fusion der Milzzellen statt.

### 3.3.2 Fusion

Durch die Fusion von Milzzellen (B-Lymphozyten) mit Myelomazellen erhält man sogenannte Hybridomazellen [Köhler 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 Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (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 5 ml 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, 1500 UpM, 5 min, 4 °C), anschließend in je 5 ml 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 PAIB<sub>3</sub>ag81) fusioniert wurden. Für jede Fusion wurden die Zellen einer halben Milz (ca.  $5 \times 10^7$  Zellen) in 5 ml RPMIoH-Medium und  $2,5 \times 10^7$  Myelomazellen in 5 ml RPMIoH-Medium zusammengegeben. Dieser Ansatz wurde zentrifugiert (Beckman, 1500 UpM, 5 min, 4 °C) und das Pellet möglichst gut trocken gesaugt. Das Pellet wurde mit der Spitze einer zugeschmolzenen Pateurpipette ausgebreitet, 0,5 ml 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 10 ml RPMIoH-Medium unter leichtem Schütteln des Röhrchens im

Wasserbad tropfenweise zupipettiert. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die fusionierten Zellen abzentrifugiert, das Sediment in 125 ml Normalmedium aufgenommen und auf 10 Costarplatten verteilt (0,5 ml pro Loch). In jedes dieser Löcher waren am Vortag 0,5 ml einer Makrophagensuspension pipettiert worden. Die Platten wurden bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. 24 Stunden nach der Fusion wurden in jedes Loch 0,5 ml 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.

<u>Normalmedium:</u>	500 ml RPMI 1640 mit Hepes und Glutamin 55 ml fötales Kälberserum 5,5 ml 200 mM L-Glutamin 5,5 ml Kanamycinlösung (Gibco) 5,5 ml einer frischen 10 <sup>-3</sup> M β-Mercaptoethanollösung
<u>3 x HAT-Medium:</u>	571,5 ml Normalmedium 16,5 ml HAT-Stocklösung 16,5 ml Aminopterinstocklösung
<u>1 x HAT-Medium:</u>	571,5 ml Normalmedium 5,5 ml HAT-Stocklösung 5,5 ml Aminopterinstocklösung
<u>1 x HAT-Medium:</u>	571,5 ml Normalmedium 5,5 ml HAT-Stocklösung
<u>HAT-Stocklösung:</u>	1,0 x 10 <sup>-2</sup> M Hypoxanthin 1,6 x 10 <sup>-3</sup> M Thymidin
<u>Aminopterin-Stocklösung:</u>	4 x 10 <sup>-5</sup> M Aminopterin

Alle zugesetzten Lösungen wurden steril filtriert.

#### Makrophagenlösung:

Zur Isolierung von Makrophagen wurden ca. 10 ml 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, 1000 UpM ohne Bremse, 5 min, 4 °C) und zweimal mit Normalmedium gewaschen. Die Makrophagen wurden in 125 ml Normalmedium aufgenommen, dabei wurden für eine Fusion mit PAIB<sub>3</sub>ag81-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.

### 3.3.3 Test der Überstände

Die Überstände der einzelnen Vertiefungen wurden getestet, sobald Klone sichtbar wurden und sich das Medium gelblich verfärbte. Die Gelbfärbung (Farbumschlag des zugesetzten Indikators) ist durch die Ansäuerung des Mediums durch Stoffwechselprodukte bedingt. Die Antikörpermenge im Überstand ist dann hoch genug, um detektiert zu werden. Als erster Test wurde ein Enzymimmunoassay der einzelnen Überstände durchgeführt. Dazu wurden 100 µl der Überstände eine Stunde in mit je 1 µg gereinigtem Antigen beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper eingesetzt. Als Substrat diente p-Nitrophenylphosphat (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 405 nm 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 FIP-Polypeptid exprimierenden *E. coli* Zellen aufgetrennt worden war, mit je 0,5 ml der Überstände überschichtet. Die Teststreifen wurden über Nacht mit den Überständen inkubiert, 3 x 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 5 min in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer, pH 10,2, inkubiert, um das für die Enzymreaktion erforderliche alkalische Milieu herzustellen. Danach wurden die Filter 10 min in einer Lösung des Substrats BCIP (BCIP/NBT Farentwickler-substrat, Promega) geschwenkt und die Reaktion durch Überführen in Wasser gestoppt. Zellen von Überständen, die in diesem Test eine Bande bei ca 32 kDa aufwiesen, wurden kloniert.

### 3.3.4 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. 10 Tage 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 5 ml, dann 15 ml und 50 ml Kulturen angezogen. Die 50 ml Kulturen wurden zum Sammeln der Hybridomaüberstände verwendet (3 x wöchentlich). Die Zellen wurden hierbei durch Zentrifugation abgetrennt (Beckman, 1000 UpM, 5 min, 4 °C) und die Überstände bei 4 °C oder -20 °C aufbewahrt.

### 3.3.5 Konservierung der Hybridomaklone

Zur Konservierung der einzelnen Klone wurden die Zellen einer dichtgewachsenen 50 ml Kultur geerntet und in 5 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf sechs Einfrierröhrchen (2,2 ml, 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 10 ml Normalmedium überführt. Nach Zentrifugation (1000 UpM, 5 min, 4 °C) wurde das Medium abgegossen, die Zellen in 1 ml Normalmedium aufgenommen und in einer Vertiefung einer Costarplatte im Brutschrank inkubiert.

Einfriermedium:  
70 ml RPMI mit Hapes und L-Glutamin  
20 ml fötales Kälberserum  
12 ml DMSO  
1 ml 10<sup>-3</sup> M β-Mercaptoethanol (frisch angesetzt)

### 3.4 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Erster Schritt bei der Aufreinigung monoklonaler Antikörper war die Präzipitation der im Kulturüberstand vorhandenen Proteine. Dazu wurden 45 Teile Hybridomaüberstand langsam und unter ständigem Rühren mit 55 Teilen kalter, gesättigter Ammoniumsulfatlösung gemischt und über Nacht bei 4 °C gerührt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (8000 x g, 20 min, 4 °C), der Niederschlag in 50-100 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8,9, gelöst und über

Nacht gegen 100 mM Tris/HCl, pH 8,9, dialysiert. Das Dialysat wurde nochmals zentrifugiert (8000 x g, 20 min, 4 °C) und der Überstand mit Festsubstanz auf 3 M NaCl gebracht. Diese Lösung wurde auf eine mit Waschpuffer äquilibrierte Protein A-Sepharosesäule (1 ml Protein A-Sepharose CL4B, Pharmacia) geladen. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Zitronensäure, pH 3,0, wobei in jedem Röhrchen des Fraktionssammlers 50 µl 2 M Tris/HCl, pH 9,0, zur direkten Neutralisation vorgelegt wurden. Die Antikörper enthaltenden Fraktionen wurden über Nacht gegen PBS dialysiert und bei 4 °C gelagert.

Die Protein A Säule wurde mit 0,1 M Zitronensäure (pH 3,0) regeneriert und mit Wasch-Puffer äquilibriert. Eine Säule konnte mehrmals für denselben Antikörper verwendet werden und wurde in Wasch-Puffer mit 0,1 % Natriumazid bei 4 °C aufbewahrt.

Waschpuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,9  
3 M NaCl

### 3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Für die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese [Lämmli, 1970] wurden 8 bis 15%ige Trenngelle in einer Größe von 7,5 cm x 10 cm x 0,05 cm mit 5%igem Sammelgel (Tabelle 7) verwendet. Zu den aufzutrennenden Proteinlösungen wurden je nach Bedarf unterschiedliche Mengen 5 x SDS-Probenpuffer gegeben und die Mischung fünf Minuten gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei einer Spannung zwischen 100 und 190 V. Als Standard diente ein Gemisch von Proteinen definierter Molekülmassen. Nach der Elektrophorese werden die Proteine entweder mit Coomassie-Blau (s. Abschnitt E.3.8) gefärbt oder durch „Western“-Transfer (s. Abschnitt E.3.6.) auf Nitrocellulose übertragen.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele<sup>1)</sup>**

	Trenngel				Sammelgel
	8%	10%	12%	15%	5%
Acrylamid 30:0,8 <sup>2)</sup> [ml]:	15,8	19,7	23,6	30	3,4
H <sub>2</sub> 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 [µl]:	590	590	590	590	200
TEMED [µl]:	23	23	23	23	8
10% APS [µl]:	165	165	165	165	80

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

5 x SDS-Probenpuffer:

2,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,5  
4,0 ml 10% Natriumdodecylsulfat  
2,0 ml Glycerin  
1,0 ml 14,3 M  $\beta$ -Mercaptoethanol  
200  $\mu$ l 10% Bromphenolblau-Lösung

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer:

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

Molekülmassenstandards:

LMW-Marker (Pharmacia) [Da]: 94.000; 67.000; 43.000; 30.000; 20.100; 14.400  
HMW-Marker (Pharmacia) [Da]: 212.000; 170.000; 116.000; 76.000; 53.000

### 3.6 „Western-Blot“ Analyse

Proteine mit einem Molekulargewicht unter 100 kDa wurden mit Hilfe des Semi-Dry-Transfer-Verfahrens auf Membranen übertragen. Diese Methode zeichnet sich durch eine kurze Transferdauer, hohe Transfereffizienz und einen geringen Pufferverbrauch aus. Der Transfer erfolgte für 30-45 Minuten bei 10 V.

Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 100 kDa wurden im Naß-Transfer-Verfahren auf die Membran übertragen. Hierbei erfolgte der Transfer über Nacht bei 20 V und 4 °C.

Western-Transfer-Puffer:

25 mM Tris/HCl (pH 8,5)  
190 mM Glycin  
10% Methanol oder Ethanol  
0,02% Natriumdodecylsulfat

### 3.7 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Membranen

Nitrocellulose-Membranen wurden nach dem Protein-Transfer für mindestens zwei Stunden mit 4% Magermilchpulver in NCP-Puffer abgesättigt. Danach wurden sie mit Hybridoma-überständen für 1-16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünfmal je 10 min 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 430 nm führt. Dies verursacht die Schwärzung eines

Röntgenfilms. Die Membran wurde 2-3 min in der Luminollösung inkubiert und ein Röntgenfilm für fünf Sekunden bis dreißig Minuten exponiert.

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

### 3.8 Proteinfärbung

#### Coomassie-Blau-Färbung:

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

#### Färbelösung:

0,1 % Coomassie-Brilliant-Blau R 250  
50 % Methanol  
10 % Essigsäure  
vor Gebrauch filtrieren.

#### Entfärber:

10 % Ethanol  
7 % Essigsäure

#### 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:

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

### 3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmungen wurden nach der von **M. M. Bradford** (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Bindung von Coomassie „Brilliant Blue“ G 250 an Proteine. Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm verschoben. Zur Erstellung einer Eichkurve wird BSA als Standard verwendet.

Sowohl für die Probe als auch für den Standard wurden für jeden Ansatz 33 µl Proteinlösung mit 33 µl Wasser versetzt. Anschließend wurde 1 ml Bradford-Reagenz (Sigma) hinzugegeben und nach fünf Minuten die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen.

### **3.10 Enzymimmunoassays zum Nachweis der Interaktion zwischen Filamin und FIP**

#### Enzymimmunoassays mit gekoppelten Filamin-Polypeptiden:

Die Adsorption der Proteine an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte (U96 Maxisorb, Nunc) erfolgte stets über Nacht bei 4 °C. Dazu wurden Rod 1-6 und Rod 2-4 und BSA auf eine Konzentration von 50 µg/ml in Vollers-Puffer, pH 9,6, eingestellt und pro Loch 100 µl der Lösungen verwendet. Am nächsten Tag wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend unspezifische Bindungsstellen für zwei Stunden mit je 150 µl Blockpuffer abgesättigt. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation mit je 100 µl serieller Verdünnungen des C-FIP-Polypeptids (0-800 µg/ml). Anschließend wurde zunächst zwei Stunden mit Hybridomaüberstand des mAk K12-362-6 und dann mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente ein an alkalische Phosphatase gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper (Sigma; Verdünnung 1:10.000 in Blockpuffer). Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend wurde jeweils dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Der Bindungsnachweis erfolgte durch eine 60 minütige Inkubation mit einer p-Nitrophenylphosphat-Lösung (Sigma Fast™ p-Nitrophenylphosphat-Tabletten, Sigma) und Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm im „Elisa Reader“ (Multiscan RC, Labsystems).

Vollers-Puffer: 1,59 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
2,93 g/l NaHCO<sub>3</sub>

Waschpuffer: PBS, pH 7,4, mit 0,05% Triton X-100

Blockpuffer: Waschpuffer mit 1% BSA

#### Enzymimmunoassays mit gekoppeltem C-FIP-Polypeptid:

Enzymimmunoassays mit gekoppeltem C-FIP-Polypeptid erfolgten analog zu den Immunoassays mit Filamin-Polypeptiden. Jedoch wurde zur Adsorption eine Konzentration von

10 µg/ml C-FIP in Vollers-Puffer eingesetzt. Als zweiter Bindungspartner dienten entweder serielle Verdünnungen des gereinigten Rod 1-6 Polypeptids (0-50 µg/ml) oder eine 1:100 Verdünnung eines *D. discoideum* Zellextraktes (siehe Kapitel E.3.13). Als erster Antikörper wurde ein Protein A-Sepharose gereinigter anti-Filamin Antikörper 82-382-8 (Verdünnung 1:5.000 in Blockpuffer) benutzt.

### 3.11 „Blot-Overlay“ Analyse

Für „Blot-Overlay“ Untersuchungen wurden entweder gereinigte Proteine (Rod 1-6, Rod 2-4, C-FIP und BSA) oder Gesamtzellproteinmischungen von *D. discoideum* Zellen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel E.3.5) aufgetrennt und durch „Western“-Transfer (Kapitel E.3.6) auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden zwei Stunden mit 4% Magermilchpulver in NCP-Puffer abgesättigt und anschließend für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 10 ml einer Proteinlösung (ca. 0,5 mg/ml in 4% Magermilchpulver in NCP-Puffer) inkubiert. Membranen, die Filamin-Polypeptide oder Gesamtzellprotein von Ax2- und GHR-Zellen gebunden hatten, wurden mit einer C-FIP-Lösung inkubiert, Membranen mit C-FIP mit einer Rod 1-6-Lösung. Während dieser Inkubationszeit sollen die Proteine jeweils an ihre auf der Membran immobilisierten Bindungspartner binden. Anschließend wurde dreimal je 10 min mit NCP-Puffer gewaschen. Membranen, die Filamin-Polypeptide oder Gesamtzellprotein von Ax2- und GHR-Zellen gebunden hatten, wurden danach eine Stunde mit dem anti-FIP Antikörper K12-454-2 inkubiert. Membranen mit immobilisiertem C-FIP wurden in dem anti-Filamin Antikörper 82-382-8 geschüttelt. Zur Kontrolle der Antikörperspezifität diene jeweils eine äquivalente Membran, die zuvor nicht mit der Lösung des jeweiligen Bindungspartners, gegen den der Antikörper gerichtet ist, in Berührung gekommen war. Es wurde erneut dreimal je 10 min mit NCP-Puffer gewaschen und die Membranen danach mit einem Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper inkubiert. Die Analyse erfolgte wie bei der Immunmarkierung (Kapitel E.3.7) beschrieben durch Oxidation von Luminol, wobei die Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm (1-60 min) dokumentiert wurde.

### 3.12 Koimmunpräzipitation rekombinanter Polypeptide

Es wurden Lösungen von je 100 µg Rod 1-6, rekombinantem FIP-Polypeptid und zwei Mischungen beider Polypeptide in je 500 µl IP-Puffer hergestellt und 15 min auf Eis

inkubiert. Eine der Mischungen wurde mit gereinigten anti-FIP Antikörper K12-454-2, die andere mit gereinigtem anti-Filamin Antikörper 82-382-8 versetzt. Als Negativkontrollen wurde die Rod 1-6 Lösung mit K12-454-2 und die FIP-Lösung mit 82-382-8 versetzt. Es wurden je 10 µg Antikörper pro Ansatz verwendet und die Lösungen eine Stunde bei 4 °C über Kopf geschüttelt. Sodann wurde jeder Lösung 40 µl einer Protein A-Sepharose Suspension (gequollene Protein A-Sepharose, 1:1 (v:v) mit IP-Puffer verdünnt) zugesetzt und die Mischungen 30 min über Kopf geschüttelt (4 °C). Die Protein A-Sepharose wurde durch Zentrifugieren sedimentiert (13.000 x g, 2 min, 4 °C), das Sediment zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgekocht.

IP-Puffer:

20 mM Tris/HCl, pH 7,0  
150 mM NaCl  
1% Triton X-100  
1% BSA

Waschpuffer:

20 mM Tris/HCl, pH 7,0  
150 mM NaCl  
1% Triton X-100

### 3.13 Aufschluß von *D. discoideum*-Zellen und Fraktionierung

1-2 x 10<sup>8</sup> *D. discoideum* Zellen der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet, zweimal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und in 1 ml Homogenisationspuffer, pH 7,4, aufgenommen. Die Zellen wurden durch dreimalige Passage eines Nuclepore-Filters (Durchmesser der Poren 5 µm) geöffnet. Dabei erfolgt die Zerstörung der Zellen durch Scherkräfte.

Die Fraktionierung in Zytosol und Membranfraktion erfolgte durch Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellsuspension bei 100.000 x g und 4 °C für eine Stunde. Danach befinden sich die Membranbestandteile im Sediment, während die zytosolischen Proteine im Überstand bleiben. Der Überstand wurde abgenommen und sein Volumen vermessen. Die im Sediment enthaltenen Membranen wurden zweimal mit 1 ml Homogenisationspuffer gewaschen und jeweils zentrifugiert (100.000 x g, 15 min, 4 °C). Danach wurde das Sediment in Homogenisationspuffer resuspendiert (gleiches Volumen wie der Überstand).

Homogenisationspuffer, pH 7,4:

50 mM Tris/HCl, pH 7,4  
5 mM DTT  
5 mM EDTA  
5 mM Benzamidin  
5 mM PMSF  
5 µM E64 Protease Inhibitor (Sigma)  
1 Tablette complete<sup>®</sup> mini Protease Inhibitor Mix (Roche) pro 10 ml Puffer



### 3.14 Immunpräzipitation von Filamin und FIP aus *D. discoideum* Extrakten

Zur Immunpräzipitation von Filamin bzw. FIP aus *D. discoideum* Zellhomogenat wurden acht Stunden auf Phosphatagarplatten entwickelte Zellen wie in Kapitel E.3.13 beschrieben aufgeschlossen und die zytosolischen Bestandteile von den Membranen getrennt. Filamin und FIP befinden sich beide zum größten Teil im Zytosol.

Zur Immunpräzipitation des Filamins wurden je 200 µl der Proteinlösung mit je 20 µg gereinigtem anti-Filamin Antikörper 82-382-8 oder 82-454-12 versetzt. Zur Präzipitation des FIP wurden die Antikörper K12-263-5 und K12-454-2 eingesetzt. Die Mischungen wurden eine Stunde bei 4 °C über Kopf geschüttelt und anschließend je 50 µl einer Protein A-Sepharose Suspension (gequollene Protein A-Sepharose, 1:1 (v:v) mit Homogenisationspuffer verdünnt) zugegeben. Als Kontrolle einer unspezifischen Bindung der Proteine an die Sepharosematrix dienten 200 µl Proteinlösung, die nur mit Protein A-Sepharose versetzt wurden. Die Mischungen wurden 1 Stunde inkubiert (4 °C, über Kopf schütteln) und die Protein A-Sepharose durch Zentrifugation (13.000 x g, 1 min, 4 °C) sedimentiert. Die Sepharose wurde zweimal mit je 1 ml Homogenisationspuffer gewaschen und mit 50 µl SDS-Probenpuffer gekocht.

## 4. Zellbiologische Methoden

### 4.1 Indirekte Immunfluoreszenz von *D. discoideum* Zellen

Zum Nachweis der intrazellulären Verteilung von Proteinen wurden Zellen fixiert und mit monoklonalen Antikörpern markiert. Anschließend wurde die Verteilung des ersten Antikörpers mit einem fluoreszierenden zweiten Ziege-anti-Maus-Antikörper sichtbar gemacht. Zellkerne wurden durch 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) markiert.

Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden vegetative oder für acht Stunden auf Phosphatagarplatten entwickelte Zellen verwendet. Zellen der Wachstumsphase wurden bis zu einer Zelldichte von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml angezogen, abzentrifugiert (4 min, 780 x g, 4 °C), in Phosphatpuffer gewaschen und auf eine Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Entwickelte Zellen wurden von der Phosphatagarplatte geerntet, zentrifugiert und ebenfalls auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. 200 µl dieser Zellsuspension wurden auf ein Deckgläschen (Durchmesser 18 mm) pipettiert und die Zellen 15 min absitzen lassen.

Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Zellen entweder mit kaltem Methanol oder mit einer Paraformaldehyd / Pikrinsäure Lösung fixiert. Für die Methanol-fixierung wurden die Deckgläser für 10 min in  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltes Methanol gegeben. Bei Fixierung mit Paraformaldehyd / Pikrinsäure wurden die Deckgläser mit je  $300\text{ }\mu\text{l}$  einer Paraformaldehyd / Pikrinsäure Lösung überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Fixierungsmittel abgezogen und die Deckgläser 5 min mit  $10\text{mM}$  PIPES, pH 6,0, gewaschen. Die nachfolgende Behandlung erfolgte bei beiden Fixierungsmethoden gleich.

Die Deckgläser wurden  $3 \times 5$  min mit PBS/Glycin und  $2 \times 15$  min mit PBG gewaschen und für 1-16 Stunden mit dem Antikörper enthaltenden Hybridomaüberstand inkubiert. Eine 1-3 stündige Inkubation erfolgte stets bei Raumtemperatur, längere Inkubationen bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Der erste Antikörper wurde entfernt, die Präparate  $6 \times 5$  min mit PBG gewaschen und für 1 Stunde mit einem Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1000 Verdünnung in PBG) und DAPI (1:1000 Verdünnung in PBG) inkubiert. Nach  $2 \times 5$  min Waschen mit PBG und  $3 \times 5$  min Waschen mit PBS wurden die Präparate kurz in Wasser getaucht, anschließend in Gelvatol eingebettet und zum Aushärten über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

PBS/Glycin:

50 mM Glycin in 1 x PBS

Paraformaldehyd / Pikrinsäure:

0,4 g Paraformaldehyd in 7 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $40^{\circ}\text{C}$  mit 2-3 Tropfen NaOH (2 M) lösen und 10 ml PIPES (20 mM, pH 6,0) und 3 ml gesättigte Pikrinsäure zugeben.

Gelvatol:

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

## 4.2 Fluoreszenzuntersuchungen lebender GFP-cFIP exprimierender *D. discoideum* Zellen

Für Fluoreszenzuntersuchungen wurden GFP-cFIP exprimierende Zellen einer Dichte von  $2\text{-}5 \times 10^6$  Zellen/ml geerntet, einmal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in Phosphatpuffer eingestellt. 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden auf ein mit einem Rahmen versehenes Deckglas pipettiert und den Zellen für 15 min erlaubt abzusetzen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

## 4.3 Cytochalasin A Behandlung von *D. discoideum* Zellen

Cytochalasine gehören zu den Pilzalkaloiden. Sie inhibieren verschiedene Formen der Zellbewegung, indem sie an Aktinfilamente binden, wodurch die Anlagerung neuer Monomere verhindert wird [Brown und Spudich, 1979]. In *D. discoideum* Zellen findet das lipophile Cytochalasin A Anwendung.

*D. discoideum* Zellen wurden bis zu einer Dichte von  $2\text{-}5 \times 10^6$  Zellen/ml angezogen, geerntet (780 x g, 4 min, 4 °C) und einmal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Die Zellen wurden mit einer frisch hergestellten Lösung von 20  $\mu\text{M}$  Cytochalasin A (Stocklösung: 100 mM Cytochalasin A in DMSO) in Soerensen-Phosphatpuffer auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Je 200  $\mu\text{l}$  dieser Suspension wurden auf Deckgläser (Durchmesser 18 mm) pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit Methanol fixiert und weiter behandelt (s. Kapitel E.4.1).

Für die Dokumentation des Effektes von Cytochalasin A bei lebenden GFP-cFIP exprimierenden Zellen wurden 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension auf ein mit einem Rahmen versehenes Deckglas gegeben und zu verschiedenen Zeitpunkten im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

## 4.4 Behandlung von *D. discoideum* Zellen mit 2,4-Dinitrophenol

2,4-Dinitrophenol ist ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung [Jungbluth *et al.*, 1994]. Sein Effekt auf lebende GFP-cFIP exprimierende *D. discoideum* Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dafür wurden GFP-cFIP Zellen einer Dichte von  $2\text{-}5 \times 10^6$  Zellen/ml geerntet und einmal mit Phosphatpuffer gewaschen (780 x g, 4 min, 4 °C). Die Zellen wurden mit einer frisch bereiteten Lösung von  $5 \times 10^{-5}$  M 2,4-Dinitrophenol

(Stocklösung: 1 mM in H<sub>2</sub>O) in Soerensen-Phosphatpuffer auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. 200  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden auf ein mit einem Rahmen versehenes Deckglas pipettiert und die zeitlichen Veränderungen der GFP-Fluoreszenz dokumentiert.

#### 4.5 Phagozytose von fluoreszenzmarkierten Hefen

Fluoreszenz-markierte YSC-Hefen (Sigma) sind entsprechend der Vorschrift aus dem EMBO Course, Juli 3-15, 1994 hergestellt worden. Dazu werden 5 g Hefen in 50 ml PBS suspendiert und dreißig Minuten unter Rühren erhitzt. Anschließend werden die Zellen fünfmal mit PBS und danach zweimal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Es wird eine Zelldichte von  $1 \times 10^9$  Zellen/ml eingestellt. Aliquots lassen sich bei einer Temperatur von  $-20$  °C aufbewahren.

Zur Fluoreszenzmarkierung werden  $2 \times 10^{10}$  dieser vorbereiteten Zellen in 20 ml 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung, pH 9,2, die 2 mg TRITC enthält, resuspendiert und dreißig Minuten bei 37°C rotiert. Die Hefezellen werden zweimal mit Natriumhydrogenphosphat-Puffer und anschließend viermal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Aliquots von  $1 \times 10^9$  Zellen/ml werden in Soerensen-Phosphat-Puffer bei einer Temperatur von  $-20$  °C aufbewahrt. Diese Vorschrift lässt sich auch für die Hefemarkierung mit FITC anwenden.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung der Phagozytose TRITC-markierter Hefen durch GFP-cFIP exprimierende *D. discoideum* Zellen werden lebende Zellen wie in Kapitel E.4.2 beschrieben vorbereitet, mit 10-50  $\mu$ l einer  $1 \times 10^8$  Zellen/ml enthaltenden Hefelösung versetzt und im Mikroskop betrachtet.

#### 4.6 Fluoreszenzmikroskopie

Für die konfokale Lasermikroskopie wurde ein von der Fa. Leica entwickeltes CLSM-SP-Mikroskop benutzt, das optische Schnitte durch die Präparate erlaubt. Die Präparate konnten bei 63-facher Vergrößerung (Pl APO 63x/1,32-0,6/ Öl) betrachtet werden. Das Gerät ist mit einem Krypton- 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.

## 5. Molekularbiologische Methoden

### 5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Mikromaßstab

#### 5.1.1 Boiling-Methode

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.

1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden in einem Eppendorfgefäß bei 16.000 x g für drei Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl STET-Puffer suspendiert. Zur Bakterienlyse wurden ca. 70 µg 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 16.000 x g wurde das Pellet entfernt und der Überstand zur Fällung der Plasmid-DNA mit 20 µl 3 M Natriumacetat, pH 7,0, und 500 µl 96%igem Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgte für dreißig Minuten bei -80 °C. Die gefällte Plasmid-DNA wurde zehn Minuten bei 16.000 x g sedimentiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, danach ungefähr zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30 µl Wasser gelöst.

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

#### 5.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel

Um bis zu 40 µg saubere Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen zu gewinnen, wurde das von der Firma Macherey-Nagel angebotene „NucleoSpin Plus“-Kit benutzt. Hierzu wurden 5 bis 10 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthält, abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 250 µl Lösung A1, die RNase enthält, versetzt. Danach wurden 250 µl Lösung A2 zugegeben, drei- bis fünfmal geschüttelt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Infolge der SDS- und Alkalibehandlung werden bei diesem Reaktionsschritt die Zellmembranen zerstört und durch die RNase die RNA verdaut. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl eiskalter Lösung A3 zur Reaktionsmischung,

die dann gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert wurde. Dadurch werden Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile gefällt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C wurde der Überstand auf eine NucleoSpin-Säule gegeben. Es wurde eine Minute bei 18.000 x g zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial bindet. Anschließend wurde die Säule zuerst mit 500 µl Puffer AW und dann mit 700 µl Puffer A4 gewaschen. Danach wurde noch einmal ohne vorherige Pufferzugabe zentrifugiert, um Ethanolreste zu entfernen. Zur Elution wurden schließlich 50 µl Lösung AE auf die Säule gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann eine Minute bei 18.000 x g zentrifugiert.

## 5.2 Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

*D. discoideum* besitzt einen hohen Gehalt an RNA und Kohlenhydraten, die bei Reinigung chromosomaler DNA diese verunreinigen können. Deshalb wird die DNA aus angereicherten Zellkernen isoliert [Noegel *et al.*, 1985].

*D. discoideum* Zellen wurden mit 10 ml kaltem Wasser von einer dicht bewachsenen SM-Agarplatte geerntet und bei 720 x g zwei Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit kaltem Wasser gewaschen, um *D. discoideum* Zellen von *K. aerogenes* zu befreien. Anschließend wurden die *D. discoideum* Zellen in 5 ml kaltem NLB-Puffer, der die Zellen lysiert aber die Kernmembran nicht angreift, resuspendiert und erneut bei 2.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Kerne wurden in 1 ml TE-Puffer aufgenommen und mit 50 µl 10%iger SDS-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 10 µl einer Proteinase K-Lösung [100 µg/ml] wurde die Reaktionsmischung zwei bis vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Restliche Proteine und RNA wurden durch zweifache Extraktion mit Wasser gesättigtem Phenol entfernt. Zum Überstand wurden zur DNA-Präzipitation das zweifache Volumen 96%iger Ethanol und ein zehntel des Volumens 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,2, pipettiert. Die gefällte DNA wurde mit einem Glashäkchen aus der Lösung gefischt und mit reinem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen an der Luft wurde die chromosomale DNA in TE-Puffer gelöst und bis zu ihrer Verwendung bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt.

---

<u>NLB-Puffer:</u>	10 mM Magnesiumacetat
	10 mM NaCl
	30 mM Hepes, pH 7,5
	10% Saccharose
	2% Nonidet P 40

### 5.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegelmatrix [Sambrook *et al.*, 1989]. Je nach Auftrennungsziel und Verwendung des Gels werden 0,6 bis 2%ige Gele in Tris-Borat-Puffer oder in Tris-Acetat-Puffer als Gel- und Laufpuffer eingesetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte horizontal in Flachbett-Gelapparaturen verschiedener Größen (7,5 cm x 8 cm; 11,5 cm x 14 cm; 13 cm x 19 cm) in der Regel bei einer Spannung von 10 V/cm. Den DNA-Proben wurde vor dem Auftragen ein zehntel des Volumens DNA-Probenpuffer zugesetzt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht ( $\lambda=302$  nm) enthielten die Agarose-Lösungen 0,1  $\mu\text{g/ml}$  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.

<u>DNA-Probenpuffer:</u>	40% Saccharose
	0,5% Natriumdodecylsulfat
	0,25% Bromphenolblau (Na-Salz)
	in TE-Puffer

#### DNA-Größenstandards:

100 Bp DNA Leiter (Gibco BRL):	von 100 - 1500 Bp in 100 Bp-Schritten; 2072 Bp
1 kB 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; 75 Bp

### 5.4 Southern-Blot-Analyse

Das als Southern-Blot bezeichnete Verfahren dient dazu, die nach Größe aufgetrennte DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen zu transferieren [Southern, 1975]. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Probe können spezifische Fragmente

identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sind ausschließlich genomische Southern-Blots angefertigt worden.

Dafür wurde genomische DNA in einem Volumen von 300 µl mindestens fünfzehn Stunden mit Restriktionsenzymen verdaut. Anschließend wurde die DNA mit dem zweifachen Volumen 96%igen Ethanols und dem 1/10-fachen Volumen 3 M Natriumacetat, pH 7,0, für zwei Stunden bei -20 °C gefällt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 4 °C wird der Überstand verworfen und die gefällte DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde nach dem Trocknen in 20 µl Wasser aufgenommen, mit 4 µl Ladungspuffer versetzt und in einem 0,6 bis 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt, wobei zusätzlich ein DNA-Größenmarker mitlief. Um eine gute Auftrennung der DNA-Fragmente zu erreichen, wurde der Gellauf ungefähr siebzehn Stunden bei 35 V durchgeführt. Das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel wurde gemeinsam mit einem angelegten Lineal bei einer Wellenlänge von 302 nm photographiert, um eine spätere Größenbestimmung der Signale zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gel zunächst zwanzig Minuten in einem Denaturierungspuffer und danach zwanzig Minuten in einem Neutralisierungspuffer inkubiert. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgte in 20 x SSC-Lösung über einen Zeitraum von achtzehn Stunden aufgrund von Kapillarkräften. Dabei lag das Agarosegel auf zwei in 20 x SSC-Lösung getränkten Whatman 3 MM Papieren mit Kontakt zu einem 20 x SSC-Lösungsreservoir. Das Gel wurde mit der zunächst in Wasser, dann in 20 x SSC-Lösung befeuchteten Nylonmembran, mit zwei feuchten Whatman 3 MM Papieren und mit einem ca. 7 cm dicken Stapel Saugpapier überschichtet und mit einem Gewicht beschwert. Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 2 x SSC-Lösung inkubiert und dann zweimal im UV-Quervernetzer unter UV-Licht bestrahlt. Die Nylonmembran wurde bis zu ihrer Verwendung im Dunkeln aufbewahrt.

Denaturierungspuffer:

1,5 M NaCl  
0,5 M NaOH

Neutralisierungspuffer:

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

## **5.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus *D. discoideum***

Zum Schutz vor RNasen wurden während der Arbeit stets Handschuhe getragen. Außerdem wurden nur sterile Plastikgefäße und Pipetten, sowie autoklavierte Lösungen verwendet.



Für einen „RNA-timecourse“ wurden je  $1 \times 10^8$  Zellen auf Phosphatagarplatten ausgebracht. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 15 ml eiskaltem Wasser geerntet und mit 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5, gewaschen. Die *D. discoideum*-Zellen wurden sodann in 5 ml 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5, resuspendiert und durch Zugabe von 1 ml 10%iger SDS-Lösung und 100  $\mu$ l DEPC unter heftigem Schütteln lysiert. Diese Suspension wurde unverzüglich mit dem zweifachen Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Hierzu wurden gleiche Volumen an Phenol, das mit 1 M Hepes, pH 7,5, gesättigt war, mit Chloroform gemischt. Zur Phasentrennung wurde die Suspension bei  $5.000 \times g$  zehn Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die Extraktion wurde sofort wiederholt, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 10 M LiCl-Lösung und zwei Volumen Ethanol wurde die RNA zwei Stunden bei  $-20^\circ\text{C}$  gefällt, danach dreißig Minuten bei  $5.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, die RNA mit 70%igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in Wasser aufgenommen. Die RNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei  $-78^\circ\text{C}$  gelagert.

## 5.6 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden Agarosegele mit einer Endkonzentration von 1,2% Agarose verwendet [Lehrach *et al.*, 1977]. Dazu wurden 2,4 g Agarose mit 20 ml 10 x MOPS-Puffer, pH 8,0, und 148 ml Wasser versetzt und zum Sieden erhitzt. Nachdem die Mischung auf eine Temperatur unter  $65^\circ\text{C}$  abgekühlt war, wurden 32 ml 36%iger Formaldehydlösung hinzugegeben. Die Auftrennung erfolgte in einer Flachbett-Gelapparatur (12,5 cm x 21 cm). Die zu trennende RNA wurde mit 1/3 Volumen RNA-Puffer versetzt und fünf Minuten bei  $68^\circ\text{C}$  denaturiert und nach Zugabe von 5  $\mu$ l RNA-Farbmarker aufgetragen. Die Trennung erfolgte mit einer Spannung von 35 V.

### RNA-Puffer:

50  $\mu$ l 10 x MOPS, pH 8,0  
83  $\mu$ l Formaldehyd  
250  $\mu$ l Formamid

### RNA-Farbmarker:

50 % Saccharose  
Bromphenolblau  
in Wasser

## 5.7 Northern-Blot-Analyse

Nach der Elektrophorese wurden die RNA-Gele zunächst zehn Minuten in Wasser und anschließend zehn Minuten in 20 x SSC-Lösung gewaschen. Der Transfer auf die Nylonmembran erfolgte über einen Zeitraum von ungefähr 18 Stunden in 20 x SSC Lösung

analog zum Southern-Blot (Kapitel E.5.5). Die Membranen wurden nach dem Transfer in 2 x SSC-Lösung gewaschen, kurz getrocknet und im UV-Quervernetzer bestrahlt.

## 5.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die mit Restriktionsenzymen verdaute DNA (s. Kapitel E.5.3) 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 0,5 ml Reaktionsgefäß wurde in ein 1,5 ml Auffanggefäß gegeben und es wurde zweimal je 30 sec bei 3.000 x g zentrifugiert. Dabei wird die DNA mit der Flüssigkeit aus dem Gel gespült und gelangt in das 1,5 ml Gefäß. Die DNA wurde sodann mit 2,5-fachem Volumen 96%igem Ethanol und 1/10-fachem Volumen 3 M Natriumacetatlösung, pH 5,2, gefällt, sedimentiert (13.000 x g, 4 °C, 10 min), mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 10-20 µl Wasser aufgenommen.

## 5.9 Radioaktive Markierung von DNA-Proben mit dem Stratagene Prime<sup>â</sup> It II-Kit

Die zur Markierung verwendete DNA wurde mit Restriktionsenzymen aus Plasmiden geschnitten oder durch PCR-Reaktion gewonnen. Es wurden ungefähr 25 ng DNA mit Wasser auf ein Endvolumen von 24 µl aufgefüllt und mit 10 µl „random-oligonucleotide-primer“ versetzt. Die Probe wurde 5 min auf 92 °C erhitzt, 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 10 µl 5 x Primer-Puffer, 5 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP (50 µCi) und 2 U Klenow-Enzym versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch Zentrifugation (3.000 UpM, 2 min) über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-Puffer abgetrennt. Die radioaktiv markierte Probe wurde vor ihrem Einsatz im Southern- oder Northern-Blot bei 100 °C für 10 min denaturiert und danach 5 min auf Eis abgekühlt.

## 5.10 Nachweis mit radioaktiv markierten Sonden

Die hier angeführten Hybridisierungsbedingungen sind eine Abwandlung der von **M. C. Mehdy** (1983) veröffentlichten Technik. Die mit 2 x SSC-Lösung angefeuchtete Nylon membran wurde in eine Glashybridisierungsröhre überführt und mit 10 ml Hybridisierungspuffer eine halbe Stunde bei 37 °C in einem Röhrenofen zur Vorhybridisierung inkubiert. Zur Vermeidung späterer unspezifischer Bindungen der radioaktiven Sonde an die Membran wurde während der Vorhybridisierung 1 ml denaturiertes Heringssperma (200 µg/ml) zur Lösung gegeben. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Probe zur Vorhybridisierungslösung wurde die Membran über Nacht in einem Rotationsofen bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die radioaktive Probe abgossen und die Membran zweimal kurz mit Waschpuffer behandelt. Anschließend wurde zweimal eine halbe Stunde mit dem Waschpuffer bei 37 °C unter Schütteln gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Membran in Polyethylen-Folie verpackt und ein Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -70 °C exponiert.

### Hybridisierungspuffer:

50% Formamid  
1% Natriumlaurylsarcosinat  
2 mM EDTA, pH 7,2  
0,12 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8  
in 2 x SSC  
4 x Denhardt' s Reagenz

### Waschpuffer:

50% Formamid  
1% Natriumlaurylsarcosinat  
0,2% Natriumdodecylsulfat  
2 mM EDTA, pH 7,2  
0,12 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8  
in 2 x SSC

## 5.11 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

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

## 5.12 *In vitro*-Rekombination von DNA

### 5.12.1 Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA mit einem Restriktionsenzym erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Temperaturbedingungen. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden 2-10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Plasmid-DNA wurde 1-3 Stunden, chromosomale DNA über Nacht verdaut. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde in einem Agarosegel kontrolliert.

### 5.12.2 Phosphatase-Behandlung

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden endständige 5'-Phosphat-Gruppen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) entfernt. Linearisierte Vektor-DNA (5-10  $\mu\text{g}$ ) wurde in einem 50  $\mu\text{l}$  Ansatz mit 3 U alkalischer Phosphatase in CIAP-Puffer bei 37 °C für 30 min dephosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70 °C (10 min) gestoppt und die DNA mit Ethanol gefällt.

<u>10 x CIAP-Puffer (pH 9,0):</u>	0,5 M Tris/HCl
	10 mM $\text{MgCl}_2$
	1 mM $\text{ZnCl}_2$
	10 mM Spermidin

### 5.12.3 Überführung überstehender Enden in glatte Enden

Viele Restriktionsenzyme erzeugen kohäsive Enden mit einem 5'- oder 3'-überstehenden Ende. 5'-DNA-Überhänge können mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt werden. Der den 3'-Überhang tragende DNA-Strang kann von der  $T_4$ -Polymerase abgebaut und nach Zugabe von Nukleotiden wieder zu einem glatten Ende aufgefüllt werden.

a) <u>Reaktionsansatz für das Klenow-Enzym:</u>	1 $\mu\text{g}$ DNA
	2 $\mu\text{l}$ 10 x NT-Puffer
	2 $\mu\text{l}$ d(ATP/GTP/TTP/CTP), je 1 mM
	1 U Klenow-Enzym
	mit Wasser auf 20 $\mu\text{l}$ auffüllen

Der Reaktionsansatz wurde dreißig Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch zehnmütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Die DNA wurde nach Zugabe des DNA-Probenpuffers in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel isoliert (s. Abschnitt E.5.8).

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

Nach Zugabe der T<sub>4</sub>-Polymerase wurde zwei Minuten bei 37 °C, nach Zugabe der Nukleotide weitere fünfzehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit dem zweifachen Volumen Ethanol gefällt.

#### 5.12.4 Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten

Die T<sub>4</sub>-DNA-Ligase katalysiert die Ligation von DNA-Fragmenten und entsprechend linearisierter Vektor-DNA.

Zur Verbindung glatter Enden wurde 24 h bei 21 °C, zur Verbindung überhängender Enden 12-16 Stunden bei 8 °C im vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer inkubiert. Für die Ligation kleiner Fragmente (< 1000 Bp) wurde ein etwa 10fach molarer Überschuß des Fragments eingesetzt, große Fragmente (> 3000 Bp) wurden mit der halben Menge Vektor ligiert. Die verwendeten Vektoren waren in der Regel dephosphoryliert.

#### 5.13 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 180 s 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. Die DNA konnte aus Agarosegelen isoliert werden (s. Abschnitt E.5.8).

Reaktionsansatz:

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

10 x *Taq*-Polymerase-Puffer:

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

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

- |                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| I. Initiale Denaturierung:           | 94 °C, 3 min  |
| II. Temperaturzyklus (20-35 Zyklen): | Denaturierung (94 °C, 1 min)<br>Primer-Hybridisierung (58-64 °C, 1 min)<br>Primer-Extension (72 °C, 30-120 sec) |
| III. Terminale Verlängerung:         | 72 °C, 10 min   |
| IV. Kühlung auf 4 °C                 |   |

## 5.14 Transformation von *E. coli*-Zellen

### 5.14.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation

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

gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 50 ml 15%igem autoklavierten Glycerin resuspendiert und bei 3.000 x g und 4 °C pelletiert. Nach erneutem Resuspendieren in 1 bis 2 ml 15%igem Glycerin wurden 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 5.14.2 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation

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

#### 5.14.3 *E. coli*-Dauerkulturen

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

#### 5.15 Transformation von *D. discoideum*

Das Einführen von DNA wurde nach dem Elektroporationsverfahren von **P. K. Howard** vorgenommen [Howard *et al.* 1988].

*D. discoideum*-Zellen wurden bis zu einer Dichte von 2 bis 3 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml kultiviert, durch Zentrifugation bei 720 x g geerntet und einmal mit kaltem Soerensen-Phosphat-Puffer, pH 6,0, sowie ein weiteres Mal mit kaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einer Dichte von 1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml in eiskaltem Elektroporationspuffer suspendiert. 500 µl dieser Zellsuspension wurden zusammen mit 15 bis 30 µg des zu transformierenden Vektors in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation wurde in einer Elektroporationsapparatur bei einer Kondensatorkapazität von 3 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 0,9 kV durchgeführt. Danach wurden die Zellen in eine Petrischale überführt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$  zu einer Endkonzentration von 1 mM tropfenweise als Lösung hinzugegeben. Nach fünfzehn Minuten leichtem Schütteln (50 UpM) bei einer Temperatur von 21 °C werden 10 ml AX2-Medium zu den Zellen pipettiert. Es schließt sich eine 24-stündige Inkubation bei 21 °C an, bevor Selektionsdruck mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgeübt wird.

Elektroporationspuffer: 50 mM Saccharose  
10 mM Kaliumphosphat, pH 6,1

## 5.16 Durchmusterung einer *D. discoideum* l ZAP Phagenbibliothek

### 5.16.1 Herstellung von XL1blue-Maltosezellen

Es wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* XL1blue-Zellen in 50 ml LB-Medium mit 0,2 % Maltose und 10 mM Magnesiumsulfat hergestellt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3000 x g, 10 min, RT) und in 10 ml steriler Magnesiumsulfatlösung (10 mM) resuspendiert. Die Zellen waren 2-3 Tage bei 4 °C haltbar [Sambrook, 1989].

Stocklösungen: 20% Maltose, sterilfiltriert  
1 M  $\text{MgSO}_4$   
10 mM  $\text{MgSO}_4$

### 5.16.2 Durchmusterung der Phagenbibliothek

#### a) Ausbringen der Phagen:

Zur Vorbereitung wurden 20 große (12x12 cm) LB-Agarplatten auf eine Temperatur von 42 °C vorgewärmt und 20 Reagenzgläser mit je 9 ml Top-Agarose bei 49 °C äquilibriert. Außerdem wurden zwanzig 1,5 ml Reagiergefäße mit je 200 µl XL1blue-Maltosezellen vorbereitet. 0,5 ml der Phagenbibliothek wurde mit 200 µl SM-Puffer verdünnt, je 10 µl dieser Verdünnung zu den Maltosezellen gegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Phagen injizieren dabei ihre DNA in die Zellen. Die Mischungen wurden in die Top-Agarose pipettiert, auf den LB-Agarplatten gleichmäßig verteilt, bei Raumtemperatur ausgehärtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten, auf denen fast alle Zellen lysiert waren, mindestens 2 Stunden bei 4 °C abgekühlt.



SM-Puffer:

5,8 g NaCl  
2 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
50 ml 1M Tris/HCl, pH 7,5  
0,01% Gelatine  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen,  
autoklavieren

b) Filterabzüge herstellen:

Auf jede Agarplatte wurde für 1 min ein Nitrozellulosefilter aufgelegt (Platte und Orientierung des Filters markieren). Die Filter wurden vorsichtig vom Agar gelöst und in einer Schale nacheinander 1 min denaturiert, 5 min neutralisiert und weitere 5 min in 2 x SSC gewaschen. Dadurch lösen sich anhaftende Zellreste von den Filtern, so dass nur die übertragene Phagen-DNA zurückbleibt. Die Filter wurden getrocknet und 1 Stunde bei 80 °C inkubiert. Dabei verbindet sich die anhaftende DNA fest mit der Nitrozellulose. Die Filter wurden mit einer für das gesuchte Gen spezifischen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (Kapitel E.5.10) und ein Röntgenfilm exponiert.

Denaturierungspuffer:

1,5 M NaCl  
0,5 M NaOH

Neutralisierungspuffer:

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

c) Vereinzeln der markierten Phagenplaques:

Die durch die radioaktive Sonde markierten Stellen der Filter wurden den entsprechenden Stellen auf den Phagenplatten zugeordnet. An diesen Stellen wurden die Phagen mitsamt des Agars in 1 ml SM-Puffer überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dabei gehen die Phagen in den Puffer über. Je 0,5 ml dieser Phagenlösungen wurden mit je 100 µl XL1blue-Maltosezellen vermischt und wie unter a) beschrieben auf LB-Platten ausgebracht. Dabei wurden kleine (Durchmesser 9 cm) Agarplatten und je 4 ml Top-Agarose verwendet. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von diesen Platten, die ineinander übergehende Phagenplaques zeigten, wurden wiederum Filterabzüge angefertigt und hybridisiert. Die erhaltenen Signale wurden den entsprechenden Stellen auf den Phagenplatten zugeordnet und die Phagen an diesen Stellen grob mitsamt des Agars in 1 ml SM-Puffer überführt und bei 4 °C aus dem Agar gelöst.

Am nächsten Tag wurde je eine 1/1000 Verdünnung der Phagenlösungen wie beschrieben ausplattiert. Dabei soll die Konzentration der Phagen so gewählt werden, dass auf den Platten ein Bakterienrasen mit einzelnen Phagenplaques entsteht. Jeder dieser Plaques ist auf die Infektion einer Bakterienzelle mit einem einzelnen Phagen zurückzuführen. Es wurden Filterabzüge der Platten angefertigt, hybridisiert und die durch die Sonde markierten einzelnen Phagenplaques mit der Spitze einer Pasteurpipette aus dem Agar gestochen und in je 500 µl SM-Puffer überführt.

d) Konvertierung der Phagen-DNA in Plasmide

Die vereinzelt Phagenklone wurden sodann konvertiert, wobei ihre DNA zyklisiert und in das Genom des *E. coli* Wirtes integriert wird. Die DNA der λZAP II Phagen enthält die Sequenzen des pBlueskript SK(-) Phagemids flankiert von der Initiationsstelle und der Terminationsstelle der DNA-Synthese. Bei gleichzeitiger Infektion von *E. coli* Zellen mit λZAP II Phagen und dem f1 Helferphagen wird durch f1 Phagen kodierte Proteine ein einzelsträngiger DNA-Abschnitt der λ-DNA zwischen Initiations- und Terminationsstelle synthetisiert und zyklisiert. Diese DNA enthält die pBlueskript-Vektorsequenz zusammen mit der enthaltenden *D. discoideum* cDNA.

Dazu wurden je 200 µl XL1blue-Maltosezellen ( $OD_{600}=1.0$ ) mit 25 µl Phagenlösung und 1 µl R408 Helferphage ( $10^{11}$  pfu/ml) 15 min bei 37°C und 250 UpM inkubiert. Dann wurden je 5 ml LB-Medium zugegeben und weitere drei Stunden bei 37°C geschüttelt. Daran schloss sich eine 20 minütige Inkubation bei 70 °C und eine Zentrifugation bei 3000 x g (10 min) an. Der resultierende Phagemidstock wurde in ein neues Gefäß überführt.

Bei der zweiten Infektion wurden je 200 µl XL1blue-Maltosezellen ( $OD_{600}=1,0$ ) mit 10 µl Phagemidstock 15 mit bei 37 °C geschüttelt (250 UpM) und ca. 100 µl auf LB-Agarplatten, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, ausgebracht und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

## 5.17 Konstruktion von Vektoren

### 5.17.1 Konstruktion der Hefe-Expressionsvektoren pACT2/ FIP I-VII

Zur Eingrenzung der Filamin-Bindedomäne von FIP wurden verschiedene Bereiche der FIP-cDNA (Tabelle 8) in den Hefe-Expressionsvektor pACT2 [Durfee *et al.*, 1993] kloniert. Die DNA-Fragmente wurden jeweils durch Polymerase-Kettenreaktion (Kapitel E.5.13) erhalten und in den Vektor pGemTeasy (Promega) ligiert. Aus diesem Vektor wurden sie mit den in Tabelle 8 angegebenen Restriktionsendonukleasen geschnitten und in den entsprechend verdauten pACT2 Vektor ligiert.

**Tabelle 8: Klonierungsstrategien der FIP-Teilsequenzen in den pACT2-Vektor.**

Konstrukt	Nucleotide	Aminosäuren	Restriktionsstellen für		Oligonucleotide
			pACT2	PCR	
I	1 - 2688	1 - 876	EcoRI/XhoI	#	#
II	1 - 1362	1 - 454	BamHI/SacI	BamHI/SacI	FIP3510vBamHI/FIP4871rSacI
III	1348 - 2631	449 - 876	BamHI/SacI	BamHI/SacI	FIP4858vBamHI/FIP6140rSacI
IV	1348 - 1994	449 - 664	BamHI/SacI	BamHI/SacI	FIP4858vBamHI/FIP5503rSacI
V	1973 - 2631	658 - 876	BamHI/SacI	BamHI/SacI	FIP5482vBamHI/FIP6140rSacI
VI	1348 - 1670	449 - 556	BamHI/SacI	BamHI/SacI	FIP4858vBamHI/FIP5179rSacI
VII	1664 - 1994	554 - 664	BamHI/SacI	BamHI/SacI	/FIP5173vBamHIFIP5503rSacI

Legende: Nucleotide – Nucleotide des FIP ausgehend vom ersten Nucleotid des „Two-Hybrid“-Klons, Aminosäuren – entsprechende Aminosäuren des FIP ausgehend von der ersten Aminosäure des „Two-Hybrid“-Klons, Restriktionsstellen für pACT2 – verwendete Schnittstellen im pACT2-Vektor, Restriktionsstellen für PCR – über PCR erzeugte Schnittstellen, Oligonucleotide – bei der PCR eingesetzte Oligonucleotide.

### 5.17.2 Konstruktion der Hefe-Expressionsvektoren pAS2/Rod 1-6, /Rod 1+2, /Rod 1-3, /Rod 3-6, /Rod 3, /Rod 4 und Rod 5+6

Zur Eingrenzung der FIP-Bindungsdomäne des Filamins durch „Two-Hybrid“-Untersuchungen wurden die für verschiedene Bereiche der elongierten Domäne des Filamins kodierenden cDNA-Fragmente in den Vektor pAS2 [Harper *et al.*, 1993] kloniert (Tabelle 9). Einige cDNA-Fragmente wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (Kapitel E.5.13) erhalten und in den Vektor pGemTeasy (Promega) ligiert. Aus diesem Vektor wurden sie mit den in Tabelle 9 angegebenen Restriktionsendonukleasen geschnitten und in den entsprechend verdauten pAS2 Vektor ligiert. Andere cDNA-Bereiche wurden bereits vorhandenen Konstrukten im Vektor pT7-7 [Tabor, 1990] entnommen und in den pAS2-Vektor ligiert.

**Tabelle 9: Klonierungsstrategien der einzelnen Filamin-Untereinheiten in den pAS2-Vektor.**

Fragment	Nukleotide	Aminosäuren	Restriktionsstellen für			Oligonukleotide
			pT7-7	pAS2	PCR	
Rod 1-6	740 – 2574	247 - 857	#	NcoI/SalI	NcoI/SalI	Fil740vNcoI / Fil2574rSalI
Rod 1+2	728 – 1364	243 - 454	#	NcoI/BamHI	NcoI/BamHI	Fil728vNcoI / Fil1364rBamHI
Rod 1-3	728 – 1761	243 - 587	#	NcoI/BamHI	NcoI/BamHI	Fil728vNcoI / Fil1761rBamHI
Rod 3	1417 – 1761	473 - 587	NdeI/BamHI	NdeI/BamHI	#	#
Rod 4	1628 – 1959	543 - 653	#	NcoI/BamHI	NcoI/BamHI	Fil1628vNcoI / Fil1959rBamHI
Rod 3-6	1322 – 2574	441 - 857	#	NcoI/SalI	NcoI/SalI	Fil1322vNcoI / Fil2574rSalI
Rod 5+6	1933 - 2574	645 - 857	NdeI/BamHI	NdeI/BamHI	#	#

Legende: Fragment – Untereinheit des Filamins, Nukleotide – Nukleotide des Filamins ausgehend vom ersten Nukleotid des Startkodons, Aminosäuren – entsprechende Aminosäuren des Filamins ausgehend vom Startmethionin, Restriktionsstellen für pT7-7 – verwendete Schnittstellen im pT7-7-Vektor, Restriktionsstellen für pAS2 – verwendete Schnittstellen im pAS2-Vektor, Restriktionsstellen für PCR – über PCR erzeugte Schnittstellen, Oligonukleotide – bei der PCR eingesetzte Oligonukleotide.

### 5.17.3 Konstruktion des Expressionsvektors pT7-7/FIP

Für die bakterielle Expression eines Teiles des FIP, welches die Filamin-Bindedomäne enthält, wurde der Vektor pT7-7/FIP konstruiert. Aus der cDNA des FIP-Konstruktes I im pACT2-Vektor wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion ein DNA-Fragment amplifiziert, das für die Aminosäuren 1612 bis 1907 des FIP kodiert. Dafür wurden die Oligonukleotide FIP4857vNdeI und FIP5744rSalI eingesetzt und eine Standard-PCR mit 20 Zyklen durchgeführt. Die Hybridisierung der Oligonukleotide an die DNA erfolgte bei 50 °C. Das PCR-Produkt wurde in den pGemTeasy-Vektor (Promega), in den PCR-Produkte direkt eingesetzt werden können, ligiert. Der resultierende Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und SalI verdaut und das erhaltene FIP-DNA-Fragment mittels Elektroelution aus einem Agarosegel (Kapitel E.5.8) gereinigt. Das Fragment wurde in den pT7-7-Vektor [Tabor, 1990] über die NdeI und SalI Schnittstelle gerichtet kloniert. Der resultierende Expressionsvektor wurde pT7-7/FIP genannt. Das resultierende FIP-Polypeptid enthält mit Ausnahme des Startmethionins keine durch den Vektor kodierten Aminosäuren.

## 6. Methoden zum „Two-Hybrid“-System

### 6.1 Konvertieren der *l*-ACT Phagenbibliotheken in cDNA-Banken

#### 6.1.1 Titerbestimmung der *D. discoideum*-Phagenbibliotheken

Zur Titerbestimmung wurden serielle Verdünnungsreihen ( $1:10^2$ ,  $1:10^4$ ,  $1:10^6$  und  $1:10^8$ ) der Phagenstocks in sterilem SM-Puffer erstellt. Je 100  $\mu$ l Phagenverdünnung wird mit 100  $\mu$ l XL1blue-Maltosezellen versetzt (s. Kapitel E.5.15.1). Die Proben werden zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so dass die Phagen in die *E. coli*-Zellen eindringen können. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation der Proben bei 37 °C für zehn Minuten, bei der die Phagen ihre DNA in die Wirtszelle injizieren. Die Mischungen wurden dann zu je 4 ml vorgewärmter (49 °C) Top-Agarose gegeben, vorsichtig gemischt und auf vorgewärmte LB-Agarplatten (42 °C) ausgebracht. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Titer lässt sich aus der Anzahl der Plaques auf der LB-Agarplatte unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnung berechnen.

#### 6.1.2 Amplifikation der *D. discoideum*-Phagenbibliotheken

$2 \times 10^6$  Phagen wurden zu 2 ml XL1blue-Maltosezellen (s. Abschnitt E.5.16.1) gegeben und fünfzehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 100  $\mu$ l der *E. coli*-Phagenmischung zu 8 ml 47 °C warmer Top-Agarose pipettiert und dann auf frische 37 °C vorgewärmte LB-Agarplatten gegeben. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C für sechs Stunden wurde jede Agarplatte mit 8 ml SM-Puffer überschichtet. Die Agarplatten wurden nun sechzehn Stunden bei 4 °C leicht geschüttelt. Danach wurde der SM-Puffer mit einer Pasteurpipette abgenommen. Die Überstände wurden vereinigt, mit 1 ml Chloroform versetzt und fünf Minuten bei  $4.000 \times g$  zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde zu je 2 ml aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Zur Stabilisierung der Phagenbibliothek wurde jedem Aliquot 2 Tropfen Chloroform zugesetzt. Zur Aufbewahrung bei -80 °C wurden 930  $\mu$ l Aliquots der Phagenbibliothek, die kein Chloroform enthielt, mit 70  $\mu$ l DMSO versetzt.

### 6.1.3 *cre-lox* vermittelte Konvertierung der $\lambda$ -Bibliotheken in cDNA-Banken und Isolation der Plasmid-DNA

Eine 1:10 verdünnte *E. coli* BNN 132 Übernachtskultur wurde bei 30 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 inkubiert. Nach Zugabe desselben Volumens 10 mM  $MgCl_2$ -Lösung wurden 10 ml der Bakteriensuspension mit  $1 \times 10^8$  Phagen versetzt. Die Kultur wurde dreißig Minuten bei 30 °C ohne Schütteln inkubiert und anschließend 2,5 ml LB-Medium hinzugefügt. Nach einer Stunde Wachstum bei 30 °C unter Schütteln (150 UpM) wurden je 1 ml der Kultur auf 12 x 12 cm Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Bakterienrasen auf den Agarplatten wurde vorsichtig mit TB-Medium geerntet. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in insgesamt 6 l TB-Medium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (250 Upm) inkubiert. Die Plasmid-DNA wird entsprechend des Maxi-Präparationsprotokolls der Fa. Macherey-Nagel isoliert.

TB-Medium:            12 g Bacto Trypton  
                              24 g Bacto Hefeextrakt  
                              4 ml Glycerin  
                              900 ml Wasser  
                              autoklavieren und anschließend mit 100 ml steriler Lösung, bestehend  
                              aus 0,17 M  $KH_2PO_4$ - und 0,72 M  $K_2HPO_4$ -Lösung, versetzen.

## 6.2 Transformation von Hefezellen

### 6.2.1 Modifizierte Lithiumacetat-Methode

Diese Methode eignet sich für die Transformation geringer DNA-Mengen [Elble, 1992]. Es lassen sich viele unterschiedliche Transformationen parallel behandeln.

Y190-Hefezellen wurden über Nacht in YEPD-Medium bei 30 °C bis zur Sättigung kultiviert. Für jeden Transformationsansatz wurde 1 ml dieser Hefekultur in einer Mikrozentrifuge fünf Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Sediment in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 2  $\mu$ l einer 10 mg/ml Heringssperma-DNA enthaltenden Lösung und jeweils ungefähr 1  $\mu$ g der Plasmid-DNA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde geschüttelt und dann mit 500  $\mu$ l Plate-Mischung versetzt. Nach erneutem Schütteln wurden 50  $\mu$ l einer 1 M DTT-Lösung hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Dann erfolgte ein Hitzeschock der Zellen bei 42 °C für zehn Minuten. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand

abgegossen und die Zellen in 100 µl Wasser resuspendiert. Die Hefesuspensionen wurden auf die entsprechenden SD-Agarplatten (Tabelle 10) ausgebracht und 3-8 Tage bei 30 °C inkubiert.

**Tabelle 10: Verwendete SD-Agarplatten für Hefetransformationen.**

Plasmid	SD-Agarplatte	SD-Kontrollagarplatte
pAS2	SD/-Trp	*
pACT2	SD/-Leu	*
pAS2 und pACT2	SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT	SD/-Leu/-Trp

Plate-Mischung:  
 90 ml 50%ige PEG-4000-Lösung  
 10 ml 1 M Lithiumacetatlösung  
 1 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5  
 0,2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

## 6.2.2 Simultane Transformation zur Durchmusterung der cDNA-Banken

### a) Herstellung kompetenter Hefezellen:

1 l YEPD-Medium wurde mit einer Y190-Übernachtkultur auf eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,2-0,3 angeimpft und 3 Stunden bei 230 UpM und 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1.000 x g, 5 min, RT), das Sediment in 500 ml Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die kompetenten Zellen wurden in 8 ml 1 x TE/LiAc-Puffer aufgenommen.

<u>10 x LiAc-Puffer:</u> 1 M Lithiumacetat, pH 7,5	<u>10 x TE-Puffer:</u> 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 10 mM EDTA
---	--

### b) Transformation der kompetenten Zellen:

Der Transformationsansatz bestand jeweils aus 8 ml kompetenter Y190-Hefezellen mit 0,5 mg pAS2/Rod 1-6, 0,5 mg der cDNA-Bank und 20 mg Heringsperma-DNA. Nach Zugabe von 60 ml frisch hergestellter, steriler PEG/LiAc-Lösung wurde der Reaktionsansatz kurz gemischt und dreißig Minuten bei 30 °C unter Schütteln (200 Upm) inkubiert. Anschließend wurden 7 ml DMSO hinzugegeben und die Zellen 15 Minuten in einem Wasserbad auf 42 °C erhitzt. Nachdem die Zellen kurz auf Eis abgekühlt wurden, wurde die Suspension für fünf Minuten bei 1.000 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Hefepellet wurde in 1 l YEPD-Medium aufgenommen und eine Stunde bei 30 °C und 230 UpM inkubiert. Nach dieser Erholungsphase wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (1.000 x g, 5 min, RT), in 8

ml YEPD-Medium resuspendiert und jeweils 170 µl der Suspension auf SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT-Agarplatten mit einer Oberfläche von 12 x 12 cm ausplattiert. Die Platten wurden 5-10 Tage bei 30 °C inkubiert.

PEG/LiAc-Lösung:  
8 ml 50% PEG 4000-Lösung  
1 ml 10 x TE-Puffer  
1 ml 10 x LiAc-Lösung

c) Ermittlung der Transformationseffizienz:

100 µl einer Suspension transformierter Hefezellen wurden in einer Verdünnung von 1:10, 1:100 und 1:1000 auf SD/-Trp-, SD/-Leu- und SD/-Leu/-Trp-Selektionsagarplatten mit einem Durchmesser von 100 mm ausgebracht. Die Platten wurden bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar sind.

Zur Ermittlung der Transformationseffizienz wird zuerst die Zahl der Kolonien im Verhältnis zur eingesetzten DNA ermittelt:

$$\text{cfu}/\mu\text{g DNA} = \frac{\text{cfu} \times \text{Gesamtvolumen} [\mu\text{l}]}{\text{ausplatt. Volumen} [\mu\text{l}] \times \text{Verdünnung} \times \text{DNA-Menge} [\mu\text{g}]}$$

Bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten Plasmid-DNA ergibt sich als Gesamtzahl der Klone:

$$\text{Zahl der analysierten Klone} = (\text{cfu}/\mu\text{g DNA}) \times \text{DNA Menge} [\mu\text{g}]$$

### 6.3 His<sup>+</sup>-Selektion der transformierten Hefezellen

Nach ca. zehn Tagen wurden die Hefeklone, die nach der Transformation der cDNA-Banken gewachsen sind, mit sterilen Zahnstochern auf eine neue SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT-Agarplatte überführt. Diese Platten werden erneut ungefähr fünf Tage bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert. Diese Selektion erfolgte zweimal hintereinander.

### 6.4 b-Glaktosidasetest der His<sup>+</sup>-Hefekolonien

Von den Agarplatten mit His<sup>+</sup>-Hefeklonen wurden Filterabzüge mit Nitrozellulosefiltern gemacht [Schneider *et al.*, 1996]. Die Position des Filters auf der Platte wurde markiert und der Filter für zehn Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Dadurch wird die Zellmembran



der Hefen permeabilisiert, so dass sie Flüssigkeiten aufnehmen. Anschließend wurde der Filter bei Raumtemperatur aufgetaut und mit der Koloniseite nach oben auf einen mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung angefeuchtetes Filterpapier gelegt. Die Filter wurden bei 30 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen auf blau gefärbte Hefekolonien kontrolliert.

Z-Puffer (pH 7,0):

10,69 g (0,04 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$   
5,5 g (0,04 mol)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   
0,75 g (0,01 mol) KCl  
0,246 g (0,01 mol)  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$   
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Z-Puffer/X-gal-Lösung:

100 ml Z-Puffer, pH 7,0  
0,27 ml 14,4 M  $\beta$ -Mercaptoethanol  
1,67 ml X-gal-Lösung (20 mg/ml DMF)

## 6.5 Cycloheximid-Selektion

Durch die Cycloheximidselektion sollen Hefeklone erhalten werden, die nur noch das pACT2-Plasmid enthalten. Hefen des Stammes Y190 tragen ein Cycloheximid-Resistenzgen ( $\text{cyh}^r$ ) und sind somit gegen Cycloheximid unempfindlich. Es handelt sich dabei um einen rezessiven Phänotyp, der durch das auf dem pAS2-Plasmid liegende Wildtypgen für Cycloheximid-Sensitivität ( $\text{cyh}^s$ ) aufgehoben wird. Ein Ausbringen der „Two-Hybrid“-Klone, die sowohl den pAS2- als auch den pACT2-Vektor enthalten, auf Medium mit Cycloheximid, resultiert demnach in einem Verlust des pAS2-Plasmids. Dadurch wird die Resistenz der Hefezellen gegen Cycloheximid wiederhergestellt.

Jeweils eine Kolonie der  $\text{His}^+$ - und  $\text{LacZ}^+$ -Hefeklone wurde in 200  $\mu\text{l}$  sterilem Wasser aufgenommen und vollständig durch heftiges Schütteln suspendiert. 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurde auf SD/-Leu/+Cycloheximid-Agarplatten ausgebracht. Danach erfolgte eine 10- bis 14-tägige Inkubation der Platten bei 30°C. Anschließend wurden von jeder Platte mehrere Kolonien auf SD/-Trp- und SD/-Leu-Selektionsagarplatten ausgestrichen. Dadurch wurde der Verlust des pAS2-Plasmids kontrolliert. Nach Inkubation bei 30 °C für einige Tage werden nur diejenigen Klone im weiteren Verlauf berücksichtigt, die nicht auf den SD/-Trp-Agarplatten gewachsen sind. Die Hefeklone auf den SD/-Leu-Selektionsplatten wurden einem erneuten  $\beta$ -Galaktosidase-Test (s. Kapitel E.6.4) unterzogen, um Klone auszuschließen, deren pACT2-Plasmid autokatalytisch wirkt. Die so erhaltenen  $\text{Leu}^+$ -,  $\text{Trp}^-$ - und  $\text{cyh}^R$ -Klone wurden zur Isolierung der pACT2-DNA eingesetzt.

## 6.6 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen ist nur in sehr geringen Ausbeuten und mit Verunreinigung genomischer DNA möglich. Deshalb liefert diese Methode Plasmid-DNA, die in einem weiteren Schritt in Bakterien amplifiziert werden muss [Hoffman *et al.*, 1987].

Eine Einzelkolonie der transformierten Hefezellen wurde in 5 ml des entsprechenden Selektionsmediums (bei  $\text{Leu}^+$ -Transformanten: SD/-Leu-Medium) aufgenommen und vollständig suspendiert. Nach mindestens 20 Stunden Inkubation bei 30 °C unter Schütteln (250 UpM) wurde die Kultur fünf Minuten bei 1.000 x g und 21 °C zentrifugiert. Das Sediment wird in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Hefe-Lysis-Puffer, 200 µl Phenol/Chloroform-Mischung (Mischungsverhältnis 1:1) und 0,4 g säuregewaschenen Glaskügelchen (Sigma) wird die Suspension zwei Minuten heftig geschüttelt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur in einer Sigma-Tischzentrifuge bei 13.000 UpM wird die wäßrige Phase in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wird durch Zugabe eines zehntel Volumens 3 M Natriumacetatlösung, pH 7,0, und des zweifachen Volumens Ethanol bei -78 °C für dreißig Minuten gefällt und anschließend zentrifugiert (13.000 x g, 10 min 4 °C). Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

Hefe-Lysis-Puffer:

- 2% Triton X-100
- 1% Natriumdodecylsulfat
- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 1 mM EDTA

## 6.7 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA aus Hefezellen

Die Transformation der aus Hefezellen isolierten Plasmid-DNA erfolgte nach der in Kapitel E.5.13.2 beschriebenen Elektroporationsmethode in XL1 blue- oder DH5 $\alpha$ -*E. coli*-Zellen. Dabei wurden jeweils 5-10 µl der aus Hefen isolierten DNA eingesetzt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mehrerer Kolonien nach der Boiling-Methode (s. Abschnitt E.5.1.1) isoliert und durch Restriktionsverdauung mit dem Enzym BglIII kontrolliert. Von den Kolonien mit eindeutigen Klonen wurde die Plasmid-DNA durch Minipräparationsmethode (s. Kapitel E.5.1.2) isoliert. Zusätzlich wurde von diesen Klonen jeweils eine *E. coli*-Dauerkultur (s. Abschnitt E.5.13.3) angelegt.

## 6.8 Hefe-Dauerkulturen

Von einer 5 ml Übernachtkultur eines Hefeklons im entsprechenden Selektionsmedium wurden 910 µl in ein 1,5 ml Minipräparationsgefäß pipettiert und mit 90 µl DMSO versetzt. Die Dauerkultur wurde bei  $-78\text{ °C}$  aufgehoben.

## 6.9 Proteinextraktion aus Hefen

Die Proteinextraktion aus Hefen erfolgte durch die Harnstoff/SDS-Methode. Für jeden zu untersuchenden Hefestamm wurden 50 ml YEPD-Medium mit 5 ml einer gesättigten Übernachtkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,4-0,6 inkubiert ( $30\text{ °C}$ , 230 UpM). Die genaue optische Dichte wurde bestimmt und die Gesamt-OD-Einheiten ( $OD_{600} \times \text{ml der Kultur}$ ) berechnet. Die Kulturen wurden in einen zur Hälfte mit Eis gefüllten Zentrifugenbecher überführt und fünf Minuten bei  $1.000 \times g$  und  $4\text{ °C}$  zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit 50 ml eiskaltem Wasser gewaschen und danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei  $-70\text{ °C}$  aufbewahrt.

Zur Proteinextraktion wurden die Zellen kurz aufgetaut und mit auf  $60\text{ °C}$  vorgewärmtem Lysispuffer versetzt. Dabei wurden pro 7,5 OD-Einheiten 100 µl Lysispuffer verwendet. Die Mischung wurde in ein 1,5 ml Reagiergefäß mit 80 µl säuregewaschenen Glaskügelchen überführt, 10 Minuten auf  $70\text{ °C}$  erhitzt und anschließend eine Minute kräftig geschüttelt ( $10.000\text{ UpM}$ ). Sodann wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Membranbestandteile bei  $13.000 \times g$  und  $4\text{ °C}$  fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Sediment wurde 3-5 Minuten auf  $100\text{ °C}$  erhitzt, erneut eine Minute geschüttelt ( $10.000\text{ UpM}$ ) und zentrifugiert ( $13.000 \times g$ , 5 min,  $4\text{ °C}$ ). Der Überstand dieser Zentrifugation wurde mit dem ersten Überstand vereinigt und direkt zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt.

### Lysis-Puffer-Stocklösung:

48 g Harnstoff  
5 g SDS  
4 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8  
20 µl 0,5 M EDTA  
40 mg Bromphenolblau  
mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

### Proteaseinhibitor-Lösung:

0,1 mg/ml Pepstatin A (Sigma)  
0,03 mM Leupeptin (Sigma)  
145 mM Benzamidin (Sigma)  
0,37 mg/ml Aprotinin (Sigma)

Lysis-Puffer:

1 ml Lysis-Puffer-Stocklösung  
10 µl β-Mercaptoethanol  
70 µl Proteaseinhibitor-Lösung  
50 µl 0,1 M PMSF

**6.10 Sequenzanalyse der „Two-Hybrid“-Klone**

Die sequenzierten „Two-Hybrid“-Klone wurden sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Proteinebene durch Datenbankvergleiche untersucht. Zur Suche auf Nukleinsäureebene wurden mit den Programmen BLASTN und TBLASTN die Datenbanken Genbank, EST Division, EMBL, DDBJ und PDB durchsucht [Altschul *et al.*, 1990]. Während BLASTN sehr ähnliche Sequenzen mit hoher Homologie erkennt, werden mit dem Programm TBLASTN ähnliche Sequenzen mit größeren Lücken ermittelt. Peptidsequenzvergleiche der „Two-Hybrid“-Klone wurden mit den Computerprogrammen BLASTP und TBLASTP gegen die Datenbanken Genbank, PDB, SwissProt und PIR durchgeführt [Altschul *et al.*, 1990]. Der isoelektrische Punkt und das Molekulargewicht wurden mit dem Programm „ProtParam tool“ berechnet. Die Sekundärstruktur der Proteine wurde mit dem Programm „Pôle Bio-informatique Lyonnais“ [Geourjon und Deléage, 1995] ermittelt. Mit Hilfe der Programme MOTIFSearch und MotifFinder [Bairoch, 1992] werden bekannte Motive in Peptidsequenzen ermittelt. Strukturvorhersagen zur Wahrscheinlichkeit der Bildung einer superspiralisierten Helix wurden mit dem COILS Algorithmus [Lupas *et al.*, 1991] gemacht. Verweise auf die genannten Programme sind im Internet unter der World Wide Web-Adresse „ExpASY“ (<http://www.expasy.ch>) zu finden.

## F Literatur

---

- Allen, J. B., Walberg, M. W., Edwards, M. C. und Elledge, S. J. (1995). Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 511-516.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Amatruda, J. F., Cannon, J. F., Tatchell, K., Hug, C. und Cooper, J. A. (1989). Disruption of the single capping protein beta gene in yeast. *J. Cell Biol.* **109**, 274a (Supplement).
- Amos, L. A. und Amos, W. B. (1991). Molecules of the cytoskeleton. Macmillan Education, London.
- Annaert, W. und de Strooper, B. (1999). Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci.* **22**, 439-443.
- Andrews, R. K. und Fox, J. E. B. (1992). Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex that binds to purified actin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 18605-18611.
- Bairoch, A. (1992). PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res.* **11**, 2013-2018.
- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R. und Fields, S. (1993a). Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, ed. Hartley, D.A. (Oxford University Press, Oxford) pp 153-179.
- Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. und Fields, S. (1993b). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques* **14**, 920-924.
- Bellanger, J.-M., Astier, C., Sardet, C., Otha, Y., Stossel, T. P. und Debant, A. (2000). The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nature Cell Biol.* **2**, 888-892.
- Bershadsky, A. D. und Vasiliev, J. M. (1988). Cytoskeleton. Plenum Press, New York, London.
- Beug, H., Katz, F. E. und Gerisch, G. (1973). Dynamics of antigenic membrane sites relating to cell aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **56**, 647-658.
- Blum, R., Pfeiffer, F., Feick, P., Nastainczyk, W., Kohler, B., Schäfer, K.-H. und Schulz, I. (1999). Intracellular localization and *in vivo* trafficking of p24A and p23. *J. Cell Sci.* **112**, 537-548.
- Bonner, J. T. (1947). Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Exp. Zool.* **106**, 1-26.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brenner, S. L. und Korn, E. D. (1979). Spectrin-actin interaction. Phosphorylated and dephosphorylated spectrin tetramer crosslink F-actin. *J. Biol. Chem.* **254**, 8620-8627.

- Brent, R. und Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**, 729-736.
- Brink, M., Gerisch, G., Isenberg, G., Noegel, A. A., Segall, J. E., Wallraff, E. und Schleicher, M. (1990). A *Dictyostelium* mutant lacking an F-actin cross-linking protein, the 120-kD gelation factor. *J. Cell Biol.* **97**, 178-185.
- Brown, S. S. und Spudich, J. A. (1979). Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments. *J. Cell Biol.* **83**, 657-662.
- Bullock, W. O. (1987). *BioTechniques* **5**, 376-378.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. und Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* **11**, 82-88.
- Casella, J. F., Maack, D. J. und Lin, S. (1986). Purification and initial characterisation of a protein from skeletal muscle that caps the barbed ends of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **261**, 10915-10921.
- Chien, A., Edgar, D. B. und Trela, J. M. (1976). Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550-1557.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. und Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**, 9578-9582.
- Chu, Q. und Fukui, Y. (1996). *In vivo* dynamics of myosin II in *Dictyostelium* by fluorescent analogue cytochemistry. *Cell Motil. Cytoskeleton* **35**, 254-268.
- Chubb, J. R., Wilkins, A., Thomas, G. M. und Insall, R. H. (2000). The *Dictyostelium* RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J. Cell Sci.* **113**, 709-719.
- Condeelis, J., Salisbury, J. und Fujiwara, K. (1981). A new protein that gels F-actin in the cell cortex of *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **292**, 161-163.
- Cox, D., Condeelis, J., Wessels, D., Soll, D., Kern, H. und Knecht, D. A. (1992). Targeted disruption of the ABP-120 gene leads to cells with altered motility. *J. Cell Biol.* **116**, 943-955.
- Cox, D., Rinsdale, J. A., Condeelis, J. und Hartwig, J. (1995). Genetic deletion of ABP-120 alters the three-dimensional organization of actin filaments in *Dictyostelium* pseudopods. *J. Cell Biol.* **128**, 819-835.
- Cox, D., Wessels, D., Soll, D. R., Hartwig, J. und Condeelis, J. (1996). Re-expression of ABP-120 rescues cytoskeletal, motility and phagocytosis defects of ABP-120<sup>-</sup> *Dictyostelium* mutants. *Mol. Biol. Cell* **7**, 803-823.
- Cunningham, J. G., Meyer, S. C. und Fox, J. E. (1996). The cytoplasmic domain of the alpha-subunit of glycoprotein (GP) Ib mediates attachment of the entire GP Ib-IX complex to the cytoskeleton and regulates von Willebrand factor-induced changes in cell morphology. *J. Biol. Chem.* **271**, 11581-11587.
- Dharamsi, A., Tessarolo, D., Coukell, B. und Pun, J. (2000). CBP1 associates with the *Dictyostelium* cytoskeleton and is important for normal cell aggregation under certain developmental conditions. *Exp. Cell Res.* **258**, 298-309.
- De Arruda, M. V., Watson, S., Lin, C.-S., Leavitt, J. und Matsudaira, P. (1990). Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J. Cell Biol.* **111**, 1069-1079.

- Dorywalska, M., Coukell, B. und Dharamsi, A. (2000). Characterization and heterologous expression of cDNAs encoding two novel closely related Ca(2+)-binding proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1496**, 356-361.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. und Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* **7**, 555-569.
- Eddy, R. J., Han, J. H., Sauterer, R. A. und Condeelis, J. S. (1996). A major antagonist-regulated capping activity in *Dictyostelium* is due to the capping protein, cap 32/34. *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 247-259.
- Edwards, D., Towb, P. und Wasserman, S. (1997). An activity-dependent network of interactions links the rel protein dorsal with its cytoplasmic regulators. *Development* **124**, 3855-3864.
- Eichinger, L. und Schleicher, M. (1992). Characterization of actin-binding and lipid-binding domains in severin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent F-actin fragmenting protein. *Biochemistry* **31**, 4779-4787.
- Eichinger, L., Köppel, B., Noegel, A. A., Schleicher, M., Schliwa, M., Weijer, K., Witke, W. und Janmey, P. A. (1996). Mechanical perturbation elicits a phenotypic difference between *Dictyostelium* wild-type cells and cytoskeletal mutants. *Biophys. J.* **70**, 1054-1060.
- Eichinger, L., Bähler, M., Dietz, M., Eckerskorn, C. und Schleicher, M. (1998). Characterization and cloning of a *Dictyostelium* Ste20-like protein kinase that phosphorylates the actin-binding protein severin. *J. Biol. Chem.* **273**, 12952-12959.
- Eichinger, L., Lee, S. S. und Schleicher, M. (1999). *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc. Res. Tech.* **47**, 124-134.
- Elble, M. (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *BioTechniques* **13**, 18-20.
- Elledge, S. J., Mulligan, J. T., Ramer, S. W., Spottswood, M. und Davis, R. W. (1991).  $\lambda$ -YES: A multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and *Escherichia coli* mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1731-1735.
- Faulkner, G., Pallavicini, A., Salamon, M., Bortoletto, G., Ievoletta, C., Trevisan, S., Kojic, S., Veccia, F. D., Lavender, P., Valle, G. und Lanfranchi, G. (2000). FATZ: a filamin, actinin and theletonin binding protein of the Zdisk of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **275**, 41234-41242.
- Fields, S. (1993). The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *METHODS: A Companion to Meth. Enzymol.* **5**, 116-124.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-247.
- Fields, S. und Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* **10**, 286-292.
- Fisher, P. R., Noegel, A. A., Fechheimer, M., Rivero, F., Prassler, J. und Gerisch, G. (1997). Photosensory and thermosensory responses in *Dictyostelium* slugs are specifically impaired by absence of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120). *Curr. Biol.* **7**, 889-892.
- Flick, J. S. und Johnson, M. (1990). Two systems of glucose repression of the *Gall* promotor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **10**, 4757-4769.

- Fox, J. W., Lamperti, E. D., Eksioglu, Y. Z., Hong, S. E., Feng, Y. und Graham, D. A. (1998). Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* **21**, 1315-1325.
- Franke, W. W. (1993). The intermediate filaments. In *Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins* (Kreis, T. und Vale, R., eds.), Oxford University Press, Oxford, 137-144.
- Fritz, C. C. und Green, M. R. (1992). Fishing for partners. *Curr. Biol.* **2**, 403-405.
- Fucini, P., Renner, C., Herberhold, C., Noegel, A. A. und Holak, T. (1997). The repeating segments of the F-actin crosslinking gelation factor (ABP-120) have an immunoglobulin-like fold. *Nature Struct. Biol.* **4**, 223-230.
- Fucini, P., Köppel, B., Schleicher, M., Lustig, A., Holak, T., Müller, R., Stewart, M. und Noegel, A. A. (1999). Molecular architecture of the rod domain of the *Dictyostelium* gelation factor (ABP120). *J. Mol. Biol.* **291**, 1017-1023.
- Gärtner, A., Ruhnau, K., Schöer, E., Selve, N., Wanger, M. und Wegner, A. (1989). Probing nucleation, cutting and capping of actin filaments. *J. Muscle Res. Cell Mot.* **10**, 1-9.
- Geourjon, C. und Deleage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.*, **11**, 681-684.
- Gerisch, G. (1965). Spezifische Zellkontakte als Mechanismen der tierischen Entwicklung. *Umschau* **13**, 392-395.
- Gerisch, G., Malchow, D., Huesgen, A., Nanjundiah, V., Roos, W., Wick, U. und Hülser, D. (1975). Cyclic-AMP reception and cell recognition in *Dictyostelium discoideum*. In: ICN-UCLA Symposia on molecular and cellular biology. Vol. 2, Developmental Biology, 76-88, (McMahon, D. und Fox, C. F., Eds.) W. A. Benjamin Inc.
- Gottwald, U., Brokamp, R., Karakesisoglou, I., Schleicher, M. und Noegel, A. A. (1996). Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in *Dictyostelium discoideum* and characterization of its interaction with actin. *Mol. Biol. Cell* **7**, 261-272.
- Gu, M., Xi, X., Englund, G. D., Berndt, M. C. und Du, X. (1999). Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  using a reconstituted mammalian cell expression model. *J. Cell Biol.* **147**, 1085-1096.
- Guarente, L. (1993). Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1639-1641.
- Guo, Y., Zhang, S. X., Sokol, N., Cooley, L. und Boulianne, G. L. (2000). Physical and genetic interaction of filamin with presenilin in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **113**, 3499-3508.
- Haarer, B. K., Lillie, S. H., Adams, A. E. M., Magdolen, V., Bandlow, W. und Brown, S. S. (1990). Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J. Cell Biol.* **110**, 105-114.
- Hacker, U., Albrecht, R. und Maniak, M. (1997). Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **110**, 105-112.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.



- Hanakam, F., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Müller-Taubenberger, A., Schäfer, W. und Gerisch, G. (1995). The pH-sensitive actin-binding protein hisactophilin of *Dictyostelium* exists in two isoforms which both are myristoylated and distributed between plasma membrane and cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **270**, 596-602.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G 1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Hartwig, J. H. und Stossel, T. P. (1975). Isolation and properties of actin, myosin, and a new actin-binding protein in rabbit alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* **250**, 5696-5704.
- Hartwig, J. H. und Stossel, T. P. (1981). Actin-binding protein promotes the bipolar and perpendicular branching of actin filaments. *J. Cell Biol.* **87**, 841-848.
- Hartwig, J. H. und Kwiatkowski, D. J. (1991). Actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 87-97.
- Hartwig, J. H. (1994) in *Protein Profile* (eds. Shelterline, P.), 711-778. Academic press, London.
- Haugwitz, M., Noegel A. A., Rieger, D., Lottspeich, F. und Schleicher, M. (1991). *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J. Cell. Sci.* **100**, 481-489.
- Haus, U., Trommler, P., Fisher, P. R., Hartmann, H., Lottspeich, F., Noegel, A. A. und Schleicher, M. (1993). The heat shock cognate protein from *Dictyostelium* affects actin polymerisation through interaction with the actin-binding protein cap32/34. *EMBO J.* **12**, 3763-3771.
- Hitt, A. L., Lu, T. H. und Luna, E. J. (1994). Ponticulin is an atypical membrane protein. *J. Cell Biol.* **126**, 1421-1431.
- Hoffmann, C. S. und Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- Hope, I. A. und Struhl, K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional protein, GNN4 of yeast. *Cell* **46**, 885-894.
- Howard, P. K., Ahern, K. G. und Firtel, R. A. (1988). Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 2613-2618.
- Huxley, H. E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science* **164**, 1356-1366.
- Jay, P. Y., Pham, P. A., Wong, S. A. und Elson, E. L. (1995). A mechanical function of myosin II in cell motility. *J. Cell Sci.* **108**, 387-397.
- Jung, G. und Hammer, J. A. (1990). Generation and characterization of *Dictyostelium* cells deficient in a myosin I heavy chain isoform. *J. Cell Biol.* **110**, 1955-1964.
- Jungbluth, A., von Armin, V., Biegelmann, B., Humbel, B., Schweiger, A. und Gerisch, G. (1994). Strong increase in the tyrosine phosphorylation of actin upon inhibition of oxidative phosphorylation: correlation with reversible rearrangements in the actin skeleton of *Dictyostelium* cells. *J. Cell Sci.* **107**, 117-125.
- Keegan, L., Gill, G. und Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from transcription-activating function of an eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**, 699-704.

- Kessin, R. H. (2001). *Dictyostelium*: Evolution, cell biology and the development of multicellularity. Developmental and cell biology series, Cambridge University Press, Cambridge.
- Köhler, G. und Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* **6**, 511-519.
- Köppel, B. (1994). Dissertation, Universität Bayreuth.
- Kreitmeier, M., Gerisch, G., Heizer, C. und Müller-Taubenberger, A. (1995). A talin homologue of *Dictyostelium* rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *J. Cell Biol.* **129**, 179-188.
- Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 722-725.
- Lee, S., Escalante, R. und Firtel, R. (1997). A Ras GAP is essential for cytokinesis and spatial patterning in *Dictyostelium*. *Development* **124**, 983-996.
- Lee, E., Shelden, E. A. und Knecht, D. A. (1998). Formation of F-actin aggregates in cells treated with actin stabilizing drugs. *Cell Motil. Cytoskel.* **39**, 122-133.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. und Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751.
- Leonardi, A., Ellinger-Ziegelbauer, H., Franzoso, G., Brown, K. und Siebenlist, U. (2000). Physical and functional interaction of filamin (actin-binding protein-280) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J. Biol. Chem.* **275**, 271-278.
- Li, M., Serr, M., Edwards, K., Ludmann, S., Yamamoto, D., Tilney, L. G., Field, C. M. und Hays, T. S. (1999). Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Biol.* **146**, 1061-1073.
- Li, M., Bermac, C., Wang, Z. W. Und Zhou, Q. Y. (2000). Modulation of dopamine D<sub>2</sub> receptor signalling by actin-binding protein (ABP-280). *Mol. Pharmacol.* **57**, 446-452.
- Liu, G., Thomas, L., Warren, R. A., Enns, C. A., Cunningham, C. C., Hartwig, J. H. und Thomas, G. (1997). Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J. Cell. Biol.* **139**, 1719-1733.
- Loo, D. T., Kanner, S. B. und Aruffo, A. (1998). Filamin binds to the cytoplasmic domain of the  $\beta_1$ -integrin. *J. Biol. Chem.* **273**, 23304-23312.
- Luban, J. und Goff, S. P. (1995). The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 59-64.
- Lupas, A., Van Dyke, M. und Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Sciences* **252**, 1162-1164.
- Ma, J. und Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**, 113-119.
- Ma, J. und Ptashne, M. (1988). Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* **55**, 443-446.
- Maestrine, E., Patrosso, C., Mancini, M., Rivella, S., Rocchi, M., Repetto, M., Villa, A., Frattini, A., Zoppé, M., Vezzoni, P. und Tonolio, D. (1993). Mapping of two genes encoding isoforms of the actin-binding protein ABP-280, a dystrophin like protein, to Xq28 and to chromosome 7. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 761-766.

- Malchow, D. B., Nägele, B., Schwarz, H. und Gerisch, G. (1972). Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **28**, 136-142.
- Mandelkow, E. und Mandelkow, E.-M. (1995). Microtubules and microtubule associated proteins. *Curr. Opin Cell Biol.* **7**, 72-81.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J. und Gerisch, G. (1995). Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag. *Cell* **83**, 915-924.
- Marti, A., Luo, Z., Cunningham, C., Otha, Y., Hartwig, J., Stossel, T. P. Kyriakis, J. M. und Avruch, J. (1997). Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation SAPK in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 2620-2628.
- McCoy, A. J., Fucini, P., Noegel, A. A. und Stewart, M. (1999). Structural basis for dimerisation of the *Dictyostelium* gelation factor (ABP120) rod. *Nature Struct. Biol.* **6**, 836-841.
- McRobbie, S. J. und Newell, P. C. (1985). Effects of cytochalasin B on cell movements and chemoattractant-elicited actin changes of *Dictyostelium*. *Exp. Cell Res.* **160**, 275-286.
- Mehdy, M. C., Ratner, D. und Firtel, R. A. (1983). Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Cell* **32**, 763-771.
- Müller, K. und Gerisch, G. (1978). A specific glycoprotein as the target site of adhesion blocking Fab in aggregating *Dictyostelium* cells. *Nature* **273**, 445-449.
- Niewöhner, J., Weber, I., Maniak, M., Müller-Taubenberger, A. und Gerisch, G. (1997). Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J. Cell Biol.* **28**, 349-361.
- Noegel, A. A., Welker, D. L., Metz, B. A. und Williams, K. L. (1985). Presence of nuclear associated plasmids in the lower eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* **185**, 447-450.
- Noegel, A. A., Witke, W. und Schleicher, M. (1987). Calcium-sensitive non-muscle  $\alpha$ -actinin contains EF-hand structures and highly conserved regions. *FEBS Lett.* **221**, 391-396.
- Noegel, A. A., Rapp, S., Lottspeich, F., Schleicher, M. und Stewart, M. (1989). The *Dictyostelium* gelation factor shares a putative actin binding site with  $\alpha$ -actinins and dystrophin and also has a rod domain containing six 100-residue motifs that appear to have a cross-beta conformation. *J. Cell Biol.* **109**, 607-618.
- Noegel, A. A. und Luna, J. E. (1995). The *Dictyostelium* cytoskeleton. *Experientia* **51**, 1135-1143.
- Noegel, A. A. und Schleicher, M. (2000). The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *J. Cell Sci.* **113**, 759-766.
- Otha, Y., Stossel, T. und Hartwig, J. (1991). Ligand-sensitive binding of actin-binding protein (ABP) to immunoglobulin G Fc receptor I (Fc $\gamma$ RI, CD64). *Cell* **67**, 275-282.
- Otha, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J. und Stossel, T. P. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2122-2128.
- Ott, I., Fischer, E., Miyagi, Y., Mueller, B. und Ruf, W. (1998). A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J. Cell Biol.* **140**, 1241-1253.

- Ozanne, D. M., Brady, M. E., Cook, S., Gaughan, L., Neal, D. E. und Robson, C. N. (2000). Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the F-actin cross-linking protein filamin. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1618-1626.
- Parry, D. A. D., Dixon, T. W. und Cohen, C. (1992). Analysis of the three- $\alpha$ -helix motif in the spectrin superfamily of proteins. *Biophys. J.* **61**, 858-867.
- Peracino, B., Borleis, J., Jin, T., Westphal, M., Schwartz, J.-M., Wu, L., Bracco, E., Gerisch, G., Devreotes, P. und Bozzaro, S. (1998). G protein  $\beta$  subunit null-mutants are impaired in phagocytosis and chemotaxis due to inappropriate regulation of the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **141**, 1529-1537.
- Pfaff, M., Liu, S., Erle, D. J. und Ginsberg, M. H. (1998). Integrin  $\beta$  cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 6104-6109.
- Phizicky, E. M. und Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* **59**, 94-123.
- Pollard, T. D. und Cooper, J. A. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 987-1035.
- Pollard, T. D. (1990). Actin. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 33-40.
- Poussaint, T. Y., Fox, J. W., Dobyns, W. B., Radtke, R., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., Barnes, P. D., Huttenlocher, P. R. und Walsh, C. A. (2000). Periventricular nodular heterotopia in patients with filamin-1 gene mutations: neuroimaging findings. *Pediatr. Radiol.* **30**, 748-755.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. und Cornier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.
- Pühler, A. (Hrsg.). Römpp kompakt, Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie, Thieme Verlag; Stuttgart, New York, 1999.
- Raper, K. B. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**, 135-147.
- Ray, W. J., Yao, M., Mumm, J., Schroeter, E. H., de Strooper, B., Saftig, P., Wolfe, M., Selkoe, D. J., Kpoan, R. und Goate, A. M. (1999). Cell surface presenilin-1 participates in the  $\gamma$ -secretase-like proteolysis of Notch. *J. Biol. Chem.* **274**, 36801-36807.
- Rivero, F., Kuspa, A., Brokamp, R., Matzner, M. und Noegel, A. A. (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**, 735-750.
- Rivero F., Furukawa R., Fechheimer M. und Noegel A. A. (1999). Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein,  $\alpha$ -actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **112**, 2737-2751.
- Rivero, F., Albrecht, R., Dislich, H., Bracco, E., Graciotti, L., Bozzaro, S., Noegel, A. A. (1999). RacF1, a novel member of the Rho protein family in *Dictyostelium discoideum*, associates transiently with cell contact areas, macropinosomes, and phagosomes. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1205-1219.
- Russel, M. und Model, P. (1984). Replacement of the *fip* gene of *Escherichia coli* by an inactive gene cloned on a plasmid. *J. Bacteriol.* **159**, 1034-1039.

- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Scheel, J., Ziegelbauer, K., Kupke, T., Humbel, B., Noegel, A. A., Gerisch, G. und Schleicher, M. (1989). Hisactophilin, a histidin-rich actin-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **264**, 2832-2839.
- Schenk, D. (2000). A partner for presenilin. *Nature* **407**, 34-35.
- Schleicher, M., Gerisch, G. und Isenberg, G. (1984). New actin binding proteins from *Dictyostelium discoideum*. *EMBO J.* **3**, 2095-2100.
- Schleicher, M., André, B., Andréoli, C., Eichinger, L., Haugwitz, M., Hofmann, A., Karakesisoglou, J., Stöckelhuber, M. und Noegel, A. A. (1995). Structure/funktion studies on cytoskeletal proteins in *Dictyostelium amoebae* as a paradigm. *FEBS Letters* **369**, 38-42.
- Schneider, S., Buchert, M. und Hovens, C. M. (1996). An *in vitro* assay of  $\beta$ -galactosidase from yeast. *BioTechniques* **20**, 960-962.
- Schwarz, E. C., Neuhaus, E. M., Kistler, C., Henkel, A. W. und Soldati, T. (2000). *Dictyostelium myosin IK* is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis. *J. Cell Sci.* **113**, 621-633.
- Schwarzman, A. L., Singh, N., Tsiper, M., Gregory, L., Dranovsky, A., Vitek, M. P., Glabe, C. G., George-Hyslop, P. H. St. und Goldgaber, D. (1999). Endogenous presenilin 1 redistributes to the surface of lamellipodia upon adhesion of Jurkat cells to a collagen matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7932-7937.
- Seastone, D. J., Lee, E., Bush, J., Knecht, D. und Cardelli, J. (1998). Overexpression of a novel rho family GTPase, RacC, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2891-2904.
- Seastone, D. J., Zhang, L., Buczynski, G., Rebstein, P., Weeks, G., Spiegelman, G. und Cardelli, J. (1999). The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **10**, 393-406.
- Short, J. M., *et al.* (1988). *Nucleic Acids Res.* **16**, 7583-7600.
- Shutt, D. C., Wessels, D., Wagenknecht, K., Chandrasekhar, A., Hitt, A. L., Luna, J. E. und Soll, D. R. (1995). Ponticullin plays a role in the positional stabilization of pseudopods. *J. Cell Biol.* **131**, 1495-1506.
- Silver, P. A., Keegan, L. P. und Ptashne, M. (1984). Amino terminus of the yeast Gal4 gene product is sufficient for nuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5951-5955.
- Simpson, P. A., Spudich, J. A. und Parham, P. (1984). Monoclonal antibodies prepared against *Dictyostelium* actin: Characterisation and interactions with actin. *J. Cell Biol.* **99**, 287-295.
- Sokol, N. und Cooley, L. (1999). *Drosophila* filamin is encoded by the *cheerio* locus is a component of ovarian ring canals. *Curr. Biol.* **9**, 1221-1230.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.

- Stahlhut, M. und van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **11**, 325-337.
- Stossel, T. P., Chaponnier, C., Ezzell, R. M., Hartwig, J. H., Janmey, P. A., Kwiatkowski, D. J., Lind, S. E., Southwick, F. S., Yin, H. L. und Zaner, K. S. (1985). Nonmuscle actin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 353-402.
- Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J. H., Noegel, A., Schleicher, M. und Shapiro, S. S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature Reviews* **2**, 138-145.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Suelmann, R. und Fischer, R. (2000). Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil. Cytoskel.* **45**, 42-50.
- Suggs, S. V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E. H., Johnson, M. J., Itakura, K. und Wallace, R. B. (1981). Use of synthetic oligodesoxy-ribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences using purified genes. In: *Developmental Biology* (Brown, D. D. & Fox, C. F., eds.), Academic Press NY, 683-693.
- Tabor, S. (1990). Expression using the T7 RNA polymerase system. In: *Methods in Cell Biology*. **Vol. 29**, (eds. Wang, Y. L. und D. L. Taylor), 137-151. Academic Press Inc. New York.
- Tabor, S. und Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1074-1078.
- Takafuta, T., Wu, G., Murphy, G. F und Shapiro, S. S. (1998). Human  $\beta$ -filamin is a new protein that interacts with the cytoplasmic tail of glycoprotein Iba $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **273**, 17531-17538.
- Thompson, T. G., Chan, Y.-M., Hack, A. A., Brosius, M., Rajala, M., Lidov, H. G. W., McNally, E. M., Watkins, S. und Kunkel, L. M. (2000). Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J. Cell Biol.* **148**, 115-126.
- Torralba, S., Raudaskoski, M., Pedregosa, A. M. und Laborda, F. (1998). Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol.* **144**, 45-53.
- Vanderkerkhove, J. und Vankompernelle, K. (1992). Structural relationships of actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 36-42.
- Van der Ven, P. F. M., Obermann, W. M. J., Lemke, B., Gautel, M., Weber, K. und Fürst, D. O. (2000a). The characterization of muscle filamin isoforms suggests a possible role of ABP-L/ $\gamma$ -filamin in sarcomeric Z-disk formation. *Cell Motil. Cytoskelet.* **45**, 149-162.
- Van der Ven, P. F. M., Wiesner, S., Salmikangas, P., Auerbach, D., Himmel, M., Kempa, S., Hayes, K., Pacholsky, D., Taivainen, A., Schröder, R., Carpén, O. und Fürst, D. O. (2000b). Indications for a novel muscular dystrophy pathway:  $\gamma$ -filamin, the muscle specific filamin isoform, interacts with myotilin. *J. Cell Biol.* **151**, 235-247.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982). The pUC plasmid, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.

- Wallraff, E. und Wallraff, H. G. (1997). Migration and bidirectional phototaxis in *Dictyostelium discoideum* slugs lacking the actin cross-linking 120 kDa gelation factor. *J. Exp. Biol.* **200**, 3213-3220.
- Watts, D. J. und Ashworth, J. M. (1970). Growth of myxamoebae of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 171-174.
- Wegner, A. und Isenberg, G. (1983). 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4922-4925.
- Weiner, O. H., Murphy, J., Griffiths, G., Schleicher M. und Noegel, A. A. (1993). The actin-binding protein Comitin (p24) is a component of the Golgi Apparatus. *J. Cell Biol.* **123**, 23-34.
- Westphal, M., Jungbluth, A., Heidecker, M., Mühlbauer, B., Heizer, C., Schwarz, J.-M., Marriot, G. und Gerisch, G. (1997). Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion. *Curr. Biol.* **7**, 176-183.
- Williams, C. und Newell, G. (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* **82**, 287-307.
- Witke, W. Dissertation Universität München 1991
- Xie, Z., Xia, W., Davie, E. W. und Chung, D. W. (1998). Molecular cloning of human ABPL, an actin-binding protein homologue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 914-919.
- Yin, H. L. und Stossel, T. P. (1979). Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependant regulatory protein. *Nature* **281**, 583-586.
- Zhang, W., Han, S. W., McKeel, D. W., Goate, A. und Wu, J. W. (1998). Interaction of presenilins with the filamin family of actin-binding proteins. *J. Neurosci.* **18**, 914-922.
- Zigmond, S. H. (1989). Cell locomotion and chemotaxis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**, 80-86.

## G Summary

---

The filamins are a family of highly homologous actin-crosslinking proteins. Recent studies give evidence that this protein family not only stabilises cortical cellular actin but links actin networks to membrane proteins and directs intracellular signalling reactions to the actin scaffold. These functions are mediated by the interaction with over 20 proteins.

The aim of this work was to find new binding partners for the *D. discoideum* filamin paralogue. The C-terminal part of FIP, a new filamin-interacting protein, was found in a two-hybrid screen with the Dd filamin rod-domain as bait. The FIP-gene is located on chromosome 2 and the cDNA encodes a protein of 2038 aminoacids and 229.8 kDa molecular mass. FIP RNA as well as protein expression are developmentally regulated. A very low amount is present in growth phase cells, however it accumulates during aggregation and formation of spores. In immunofluorescence studies with newly developed monoclonal antibodies, FIP localises to the plasma membrane in a patchy, vesicular pattern.

Using two-hybrid assays with filamin and FIP truncations, the minimal requirement for binding of the two proteins was narrowed down to the filamin rod domain 3 and to a 107 aminoacid sequence (aminoacids 1719-1826) in the C-terminal part of FIP. To substantiate the two-hybrid interactions, we verified the binding of filamin to FIP in *in vitro* binding assays using recombinant FIP- and filamin-polypeptides as well as *D. discoideum* cell extracts. Filamin and FIP bind to each other in ELISA, blot-overlay assays and coimmunoprecipitation experiments.

By use of a GFP-cFIP fusionprotein we investigated the localisation of the C-terminal part of FIP in living cells. GFP-cFIP stains the plasmamembrane and colocalises with filamin. In polarised cells it is found in the rear, whereas actin is localised to the leading edge of the cell. Upon cytoskeletal rearrangement induced by Cytochalasin A GFP-cFIP forms large clusters underneath the plasmamembrane, where it colocalises with filamin as well as actin. During phago- and exocytosis GFP-cFIP is found in newly formed pseudopods and in the phagosomal membrane. GFP-cFIP expressing cells show an accelerated development. The formation of spores is speeded up by eight ours compared to wild-type cells. Furthermore, GFP-cFIP cells form smaller aggregates and shorter fruiting bodies than Ax2 cells.

These data suggest a functional interaction between filamin and FIP in the development of *D. discoideum* cells.



**Erklärung:**

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

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

---

## Danksagungen

Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel möchte ich für die interessante und aktuelle Themenstellung, die fachliche Betreuung der Arbeit, die zahlreichen Vorschläge und Anregungen sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft herzlich danken. Besonders möchte ich mich für die Möglichkeit, meine Arbeit auf einem internationalen Kongress vorzustellen, bedanken.

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

Herrn Dr. M. Macht danke ich für die Aufnahme des MALDI-Massenspektrums sowie der Edman-Sequenzierung des FIP-Polypeptids.

Bei Herrn Dr. Alfred Lautwein möchte ich mich herzlich für seine fachlichen Ratschläge und die Diskussionsbereitschaft bei den proteinchemischen Fragestellungen dieser Arbeit bedanken.

Für die freundliche Arbeitsatmosphäre in Labor 14 und ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft möchte ich Frau Rosi Blau-Wasser, Frau Dipl. Biol. Tina Mohrs, Herrn cand. med. Christoph Clemen, Herrn Dipl. Biol. Michael Leichter, Herrn Dr. Thomas Schreiner und Herrn Dr. Alfred Lautwein ganz herzlich danken.

Den „guten Geistern“ des Arbeitskreises, Frau Bärbel Bock, Frau Sonja Winninger und Herrn Roberto Campanella danke ich für die Bereitstellung der Hektoliter verschiedener Medien und Agarplatten, die die Durchführung dieser Arbeit verschlungen hat.

Bedanken möchte ich mich auch ausdrücklich bei Frau Maria Stumpf, Frau Dr. Claudia Herr, Frau Dipl. Chem. Claudia Pikzack, Herrn Berthold Gassen, Frau Heidrun Dislich, Herrn Stephan Braune, Herrn Rolf Müller und Herrn Dr. Francisco Rivero-Crespo für die vielen Anregungen und praktischen Ratschläge zu vielen verschiedenen Aspekten der Laborarbeit.

Allen nicht namentlich erwähnten Kollegen des Arbeitskreises gebührt mein Dank für die kooperative und gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben, und Frank. Sie standen mir in kritischen Zeiten immer hilfreich zur Seite.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name, Vorname: Knuth, Monika  
Geburtsdatum: 08. August 1971  
Geburtsort: Leverkusen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Eltern: Georg Robert Arnold Knuth  
Margarethe Christine Knuth, geb. Klünsch

### Schulbildung

1978-1982 Gemeinschaftsgrundschule Brühl West  
1982-1991 Max-Ernst Gymnasium, Brühl  
1991 Abitur

### Hochschulausbildung

Oktober 1991 Beginn des Chemiestudiums an der Universität zu Köln  
Juli 1994 Diplom-Chemiker-Vorprüfung  
Oktober 1996 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung  
November 1996 – August 1997 Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. F.-J. Marner am Institut für Biochemie der Mat.-Nat. Fakultät der Universität zu Köln  
Thema: Versuche zur stereospezifischen Synthese des Polygodan-Ringsystems  
November 1997 – Mai 2001 Dissertation bei Frau Prof. Dr. A. A. Noegel am Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln