

In vivo Funktion von CAP1

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

vorgelegt von
Henning Korte
aus Lohne

Köln 2004

Berichtersteller: Frau Prof. Dr. A. A. Noegel
Frau Prof. Dr. S. Korsching

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2001 bis März 2004 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel am Biochemischen Institut I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.

Abkürzungsverzeichnis

³² P	radioaktives Phosphor Isoptop
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rindersrumalbumin
C	Cytosin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA (revers von RNA transkribierte DNA)
Crn3	Coronin-3
Crn7	Coronin-7
kDa	Kilodalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	verbessertes Grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H-E	Hämalaun-Erythrosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
ko-Vektor	Knockout-Vektor
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minuten
MOPS	Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NP-40	Ethylphenylpolyethylenglycol
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper

PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SH3	
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
T	Thymin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
TTP	Thymintriphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>

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

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	4
1.1 Das Zytoskelett.....	4
1.2 Dynamik des Aktinzytoskeletts <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	5
1.3 Aktinbindende Proteine.....	5
1.4 Das G-Aktin bindende Protein CAP.....	6
1.5 CAP Homologe.....	7
1.6 Domänen der CAP Proteine und ihre Funktion.....	7
1.7 Die Funktion von CAP <i>in vivo</i>	10
1.7.1 Die Funktion von CAP bei der Organisation der Zelle.....	10
1.7.2 Die Funktion von CAP während Entwicklung und Differenzierung.....	11
1.8 Expression von CAP in Säugern.....	12
1.9 CAP und Profilin.....	13
1.10 Intra- und intermolekulare Bindungen – Multimerisierung.....	13
1.11 Subzelluläre Lokalisierung.....	14
1.12 Die Beteiligung von CAP an der Endozytose.....	14
1.13 Das Ziel der Arbeit.....	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Material.....	16
2.1.1 Labormaterialien.....	16
2.1.2 Geräte.....	17
2.1.3 Kits.....	18
2.1.4 Chemisch kompetente Zellen.....	18
2.1.5 Enzyme für die Molekularbiologie.....	18
2.1.6 Primäre Antikörper.....	19
2.1.7 Sekundäre Antikörper.....	19
2.1.8 Inhibitoren und Antibiotika.....	19
2.1.9 Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.10 Radiochemikalien.....	22
2.1.11 Vektoren.....	22
2.1.12 Oligonukleotide.....	23
2.2.1 Puffer und Lösungen.....	24
2.2.2 Kulturmedien.....	24
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	25
2.3.1 Boiling-Methode zur Plasmid-DNA Präparation im Mikromaßstab.....	25
2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel.....	25
2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im Makro –und Megamaßstab gemäß Macherey und Nagel.....	26
2.3.4 Isolierung von BAC-Klon-DNA aus <i>E. coli</i> im Makro –und Megamaßstab gemäß Macherey und Nagel.....	26
2.3.5 Isolierung von Endonuclease freier Plasmid DNA.....	26
2.3.6 Extraktion genomischer DNA aus ES-Zellen.....	26
2.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	27
2.3.8 Ethanol fällung.....	27
2.3.9 Phenol-Chloroform Extraktion.....	27
2.3.10 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im TAE-Agarosegel.....	28
2.3.11 Southernblot.....	28

2.3.12 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit dem Stratagene Prime It II ® Kit	29
2.3.13 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden mit DNA- und RNA-Blots	29
2.3.13.1 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden mit Southernblot- und Northernblot-Membranen.....	29
2.3.13.2 Kolonie-Blot.....	31
2.3.13.3 Durchmusterung einer genomischen Bank der Maus	31
2.3.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.3.15 Auftrennung von DNA Fragmenten im Saccharosegradienten.....	32
2.3.16 <i>In vitro</i> Rekombination von DNA.....	33
2.3.16.1 Restriktion von DNA	33
2.3.16.2 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen.....	33
2.3.16.3 Erzeugen stumpfer Enden	33
2.3.16.4 Entfernen einer Restriktionsschnittstelle aus einem Vektor	33
2.3.16.5 Addition von Adenosin an die 3'Enden	34
2.3.16.6 Ligation mit T4-DNA-Ligase.....	34
2.3.16.7 Klonierung mit dem Topoisomerase-System.....	35
2.3.17 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	35
2.3.17.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation.....	35
2.3.17.2 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	36
2.3.17.3 <i>E. coli</i> -Dauerkulturen	36
2.3.18 Polymerase-Kettenreaktion	36
2.4. Proteinchemische und immunologische Methoden.....	37
2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	37
2.4.2 Westernblot-Analyse	38
2.4.3 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Membranen	39
2.4.4 Proteinfärbung	39
2.4.4.1 Coomassie-Blau-Färbung.....	39
2.4.4.2 Ponceau-Färbung von Proteinen auf Membranen.....	40
2.4.5 Expression von rekombinantem CAP1 in <i>E. coli</i>	40
2.4.6 Gelextraktion von CAP1	41
2.4.7 Herstellung polyklonaler Antikörper	41
2.4.8 Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper aus Serum.....	41
2.4.9 Fixieren und Permeabilisieren von Säugerzellen und indirekte Immunfluoreszenz.....	42
2.4.10 Indirekte Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten.....	43
2.4.10.1 Paraffinschnitte.....	43
2.4.10.2 Vorbereiten von Paraffinschnitten für die indirekte Immunfluoreszenz.....	43
2.4.10.3 Antikörperdetektion in Geweben und H-E Färbung	43
2.4.11 Fluoreszenzmikroskopie.....	44
2.4.12 Immunpräzipitationen aus eGFP-CAP1 exprimierenden HEK Zelllysaten mit anti-GFP Antikörper.....	44
2.4.13 Subzelluläre Fraktionierung	45
2.4.14 Auftriebs-Saccharose-Dichtegradient	46
2.4.15 Nachweis von Proteinen aus Geweben und Zellen	46
2.5 Zellbiologische Methoden.....	47
2.5.1 Zelllinien und Medien	47
2.5.2 Kultur von Säugerzellen.....	48
2.5.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	48
2.5.4 Transfektion von A431 und Neuro-2a Zellen mit Lipofectamine Plus® Reagenz..	48
2.5.5 Selektion transfizierter A431 und Neuro-2a Zellen	49
2.5.6 Differenzierung von Neuro-2a Zellen	49

2.5.7 Wundheilungsexperimente.....	49
2.5.8 Kultur embryonaler Stammzellen	49
2.5.9 Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen	50
3. ERGEBNIS	52
3.1. Generierung einer CAP1 defizienten Mauslinie.....	52
3.1.1 Hybridisierung von α - ³² P markierter CAP1 cDNA an genomische DNA-Fragmente der Maus.....	52
3.1.2. Charakterisierung der BAC-Klone.....	53
3.1.3 Isolierung der CAP1-positiven <i>Apa</i> I und <i>Kpn</i> I Fragmente der BAC-Klone Nr. 4 und 5.....	54
3.1.4 Klonierung.....	56
3.1.5 Kartierung und Sequenzierung.....	56
3.1.6 Eigenschaften des CAP1 Locus	61
3.1.7 Erstellung eines Vektors zur Inaktivierung des CAP1 Gens mittels PCR.....	62
3.1.8. Transfektion, Selektion und „Screen“ der ES-Zellen.....	66
3.2 Charakterisierung der Funktion von CAP1.....	67
3.2.1 Expression von CAP1 in <i>E. coli</i>	67
3.2.2 Charakterisierung des Antikörpers.....	68
3.2.3 Expression von CAP1 in den Organen der Maus.....	70
3.2.4 Expression von CAP1 im Gehirn der Maus	72
3.2.5 Expression von CAP1 während der Embryonalentwicklung.....	76
3.2.6 Lokalisation von eGFP-CAP1 und endogendem CAP1 in Keratinozyten.....	82
3.2.7 Lokalisation von eGFP-CAP1 in differenzierten und undifferenzierten Neuro-2a Zellen.....	86
3.2.8 Lokalisation von CAP1 in C3H10T1/2 Fibroblasten.....	88
3.2.9 Wundheilungsexperiment.....	90
3.2.10 Subzelluläre Fraktionierung	92
3.2.11 Auftriebs-Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	94
3.2.12 Immunpräzipitation des eGFP-CAP1 Fusionsproteins	96
4. DISKUSSION	97
4.1 Generierung einer CAP1 defizienten Maus.....	97
4.2 Mögliche Phänotypen einer CAP1 defizienten Maus.....	98
4.3 Ein Pseudogen von CAP1.....	99
4.4 Der CAP1 Proteinspiegel in den Organen der Maus.....	100
4.5 Die CAP1 Expression während der Entwicklung.....	100
4.6 Expression von CAP1 in den Gehirnbereichen der Maus.....	101
4.7 Subzelluläre Lokalisation von CAP1.....	102
4.8 Welche Faktoren bestimmen die subzelluläre Lokalisation von CAP1.....	103
4.9 CAP1- ein Oligomer.....	104
4.10 Eine mögliche Rolle von CAP1 bei der Wundheilung.....	105
5. ZUSAMMENFASSUNG	106
6. SUMMARY	108
7. LITERATUR	110

1. Einleitung

1.1 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett ist eine hochdynamische Struktur, die Zellen Stabilität, die Fähigkeit zur Migration und zum intrazellulären Transport verleiht. Es wird von drei Filamentsystemen gebildet, von denen jedes bestimmte Aufgaben erfüllt. Die mit 5 bis 6 nm dünnsten Filamente werden als Mikrofilamente bezeichnet. Filamente mit einem Durchmesser von 7 bis 10 nm werden den Intermediärfilamenten zugeteilt, während Mikrotubuli Filamente mit 25 nm Durchmesser ausbilden.

Die Mikrofilamente entstehen durch die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Ausbildung eines Trimers; dieser Schritt wird Nukleation genannt. Aktinfilamente sind polar und haben ein langsam wachsendes „minus“- und schnellwachsendes „plus“-Ende. Die Aktinfilamente werden für die Zellform, Zellwachstum, Zellteilung und Bewegung benötigt [Bershadsky und Vasiliev, 1988]. Zusammengefaßt zu langen Bündeln durchziehen sie in vielen Zelltypen den ganzen Zellkörper, während sie unter der Zellmembran Netzwerke aus kürzeren Filamenten, den Kortex, bilden. Unter der Bezeichnung Intermediärfilamente wird eine Gruppe von Filamenten zusammengefasst die aus unterschiedlichen Monomeren aufgebaut sind.

Die Proteine des Intermediärfilamentsystems lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Zytokeratine, Lamine, Vimentin und vimentinähnliche Proteine. Aus ihnen entstehen zunächst Protofilamente, von denen sich dann mehrere zu Intermediärfilamenten zusammenlagern. Diese Filamente verleihen der Zelle Stabilität gegen mechanische Beanspruchung [Franke, 1993].

Die Mikrotubuli sind aus den heterodimeren Untereinheiten des α - und β -Tubulin aufgebaut, die zu röhrenförmigen Strukturen polymerisieren. Ihren Ursprung haben die Mikrotubuli an den Mikrotubuli Organisationszentren. Von hier durchziehen sie sternförmig die gesamte Zelle. Sie sind unerlässlich für die Zellpolarität, den Motorprotein gestützten Vesikeltransport, und sie bilden bei der Zellteilung den Spindelapparat aus. Außerdem sind sie ein wichtiger Bestandteil der Flagellen [Mandelkow und Mandelkow, 1995].

1.2 Dynamik des Aktinzytoskeletts *in vitro* und *in vivo*

Bei Überschreitung einer bestimmten Konzentration, kritische Konzentration genannt, kommt es in Anwesenheit von divalenten Kationen zur spontanen Zusammenlagerung von Aktinmonomeren zu Aktinfilamenten.

Prinzipiell können sich an beiden Enden des Aktinfilaments Aktinmonomere anlagern und das Filament verlängern. Die Konzentration an G-Aktin, die dabei benötigt wird ist jedoch für das schnell wachsende „plus“- und das langsam wachsende „minus“-Ende des Filaments verschieden. Für das schnell wachsende Ende beträgt sie 0,1 μM und für das langsam wachsende Ende 0,8 μM [Gaertner *et al.*, 1989; Wegner und Isenberg, 1983].

Die Aktin Konzentration von 50 bis 200 μM [Hubbertstey und Motillo, 2002] in Zellen würde bei den dort herrschenden Konzentrationen von divalenten Kationen zu einer vollständigen Polymerisation von Aktin führen. Dies ist jedoch nicht der Fall. In der Tat liegt nur etwa 50 % des Aktins als F-Aktin vor. Der größte Teil des G-Aktin liegt in der Zelle nicht in freier Form sondern gebunden an andere Proteine vor [Carlier und Pantaloni, 1997]. Zusätzlich zu diesen G-Aktin bindenden Proteinen gibt es eine Vielzahl von aktinbindenden Proteinen, über die die Polymerisation und Depolymerisation des Aktinzytoskeletts gesteuert wird [Stossel *et al.*, 1985; Pollard und Cooper, 1986].

1.3 Aktinbindende Proteine

Aktinbindende Proteine lassen sich in verschiedene Klassen einteilen. Die Klasse der F-Aktin fragmentierenden und F-Aktin verkappenden Proteine, die Klasse der G-Aktin bindenden Proteine, die Klasse der verzweigenden Proteine, die Klasse der F-Aktin vernetzenden Proteine, die Klasse der Membrananker-Proteine und die Klasse der Motorproteine.

Die F-Aktin fragmentierenden Proteine zerlegen Bestandteile bestehender F-Aktin Netzwerke und erlauben eine schnelle Neuorganisation des Netzwerks. Nach der Fragmentierung binden sie an die schnell wachsenden Enden der neu entstandenen Filamentabschnitte und verhindern so eine erneute Verlängerung. Zu dieser Gruppe gehören Gelsolin aus Säugerzellen [Yin und Stossel, 1979] und Severin aus *D. discoideum* [Eichinger und Schleicher, 1992; Eichinger *et al.*, 1999].

Um die Verlängerung wachsender Aktinfilamente zu stoppen, binden die F-Aktin verkappenden Proteine an die schnell wachsenden Enden. Zu diesen Proteinen gehören CAP Z aus Muskelzellen [Casella *et al.*, 1986] und Cap 32/34 aus *D. discoideum* [Hartmann *et al.*, 1990].

G-Aktin bindende Proteine wie CAP [Gottwald *et al.*, 1996], Profilin [Haugwitz *et al.*, 1991] und Cofilin [Toshima *et al.*, 2001] regulieren die Verfügbarkeit von G-Aktin für die Polymerisation.

Die Proteine des Arp2/3 Komplexes sind in der Lage durch Nukleation die Filamentbildung einzuleiten und Verzweigungen in Filamente einzufügen [Higgs und Pollard, 2001]

Neben diesen Proteinen gibt es Aktin vernetzende Proteine wie Spektrin [Brenner und Korn, 1979] oder α -Aktinin [Noegel *et al.*, 1987] und Aktin bündelnde Proteine wie Fimbrin [de Arruda *et al.*, 1990]. Sie stellen Verbindungen zwischen den Filamenten her, so daß aus einzelnen Filamenten ein Aktinnetzwerk entsteht.

Bei vielen Prozessen wird das Aktinzytoskelett mit Membranen verbunden. Diese Aufgabe übernimmt die Gruppe der Membranankerproteine zu denen z.B. Comitin [Weiner *et al.*, 1993], das eine Verbindung zwischen Aktinzytoskelett und den Membranen des Golgi-Apparates herstellt, und Talin [Kreitmeier *et al.*, 1995; Martel *et al.*, 2001], das über Integrine eine Verbindung zur Plasmamembran herstellt, gehören.

Die Motorproteine schließlich erlauben unter ATP-Verbrauch eine Bewegung entlang der Aktinfilamente [Kreis und eds., 1993].

1.4 Das G-Aktin bindende Protein CAP

CAP wurde zuerst als 70 kDa Protein in *S. cerevisiae* [Fedor-Chaikin *et al.*, 1990] entdeckt, später konnte es aber in einer Vielzahl von Pflanzen, Tieren und Pilzen identifiziert werden [Hubberstey und Mottillo, 2002; Stevenson und Theurkauf, 2000].

Zu Beginn wurde CAP, auch SRV2 genannt, in *Saccharomyces cerevisiae* als Suppressor von aktiviertem RAS2 isoliert [Fedor-Chaikin *et al.*, 1990]. Zur gleichen Zeit konnte CAP auch als Komponente des Adenylatzyklase Komplexes isoliert werden, was diesem Protein seinen Namen, Cyclase Associated Protein, verlieh [Field *et al.*, 1990].

Die mögliche Funktion von CAP wurde daraus abgeleitet, dass die Eliminierung von CAP den Effekt eines aktivierten RAS Proteins, welches die Adenylatzyklase stimuliert, aufheben konnte. So wurde postuliert, dass CAP eine Verbindung zwischen den Signalwegen zur Antwort auf Nahrungsreize und Veränderungen des Zytoskelts darstellt [Hubberstey und Mottillo, 2002].

1.5 CAP Homologe

Nachdem CAP in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt worden war [Fedor-Chaiken *et al.*, 1990; Field *et al.*, 1990], konnte es auch in Säugetieren als 52 kDa Protein nachgewiesen werden. Dabei wurde es zuerst als G-Aktin Bindeaktivität (ASP-56) aus den Blutplättchen des Hausschweins [Gieselmann und Mann, 1992] aufgereinigt und schließlich durch Polymerasekettenreaktion mit degenerierten Oligonukleotiden für den Menschen [Matviw *et al.*, 1992], die Ratte [Zelicof *et al.*, 1993] und die Maus [Vojtek und Cooper, 1993] nachgewiesen.

Nach der Identifikation von CAP in der Ratte wurde später ein weiteres Homolog zu CAP aus *S. cerevisiae* im Menschen und später auch in der Ratte nachgewiesen [Yu *et al.*, 1994; Swiston *et al.*, 1995]. Diese CAP2 genannten Proteine konnten bisher nur in Säugern identifiziert werden.

Ein Vergleich der Proteinsequenzen von CAP1 und CAP2 aus verschiedenen Säugern zeigte, dass die CAP1 Proteine untereinander eine höhere Homologie aufweisen als zu den jeweiligen CAP2 Proteinen. CAP1 und CAP2 Proteine bilden somit jeweils eine eigenständige Unterfamilie innerhalb der CAP Proteinfamilie [Leichter, 2002].

CAP Homologe konnten außerdem in *Chlorohydra viridissima* [Fenger *et al.*, 1994], in *Dictyostelium discoideum* [Gottwald *et al.*, 1996], in *Drosophila melanogaster* [Benlali *et al.*, 2000], in *Arabidopsis thaliana* [Barrero *et al.*, 2002] und in *Xenopus laevis* [KhosrowShahian *et al.*, 2002] identifiziert werden.

1.6 Domänen der CAP Proteine und ihre Funktion

Die CAP Proteine sind multifunktionelle Proteine mit mehreren Domänen. Die Zuordnung spezieller Funktion zu einer einzelnen Domäne ist nicht für alle Spezies durchgeführt worden. Für *S. cerevisiae* CAP steht eine Röntgenstruktur der C-

terminalen Domäne zur Verfügung [Fedorov *et al.*, 2002], für die N-terminale Domäne eine Kristallstruktur des *D. discoideum* Proteins [Ksiazek *et al.*, 2003]. CAP besteht aus 4 Hauptdomänen, denen Funktionen bei der Adenylatzyklasebindung, einer Assoziation mit SH3-Proteinen und einer Aktinbindung zugeordnet werden können.

Im N-Terminus liegt die Adenylatzyklase Bindedomäne. Sie ist in allen CAP Proteinen enthalten. Für die Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* [Field *et al.*, 1990; Kawamukai *et al.*, 1992] sowie den humanpathogenen Pilz *Candida albicans* [Bahn und Sundstrom, 2001] ist eine Bindung dieser Domäne an die Adenylatzyklase gezeigt worden. Für die Bindung von *S. cerevisiae* CAP an die Adenylatzyklase sind die N-terminalen 36 Aminosäurereste verantwortlich. Hier konnte ein „heptad repeat“ ($\alpha XX\alpha XXX$; α steht für einen hydrophoben Aminosäurerest) identifiziert werden. Dieses Motiv ist in der Lage α -Helices zu bilden, die die Ausbildung einer „coiled-coil“ Struktur ermöglichen können und ist in der N-terminalen Domäne aller CAPs enthalten.

Da bisher keine Interaktion von Säugetier CAP mit der Adenylatzyklase nachgewiesen werden konnte, könnte sich hier eine andere Spezifität entwickelt haben und die Säugetier CAPs über eine „coiled-coil“ Struktur an andere Signalmoleküle binden [Hubberstey und Mottillo, 2002]. Für die humanen CAPs konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus in Anwesenheit von Cofilin an Aktin binden kann. Die verantwortliche Region wurde aber nicht näher eingegrenzt [Moriyama und Yahara, 2002]

Eine weitere wesentliche Domäne von CAP liegt im C-Terminus und ist die am stärksten konservierte Domäne. Ihre Aufgabe ist die Bindung von G-Aktin. Dies konnte für alle untersuchten CAPs nachgewiesen werden [Hubberstey und Mottillo, 2002]. Der Grad der Konservierung ist so hoch, dass die Expression dieser Domäne einer Spezies die Deletion dieser Domäne in einer anderen Spezies ausgleichen kann [Matviw *et al.*, 1992; Vojtek und Cooper, 1993; Zelicof *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1994].

In Deletionsanalysen verloren humanes CAP und CAP aus *S. cerevisiae* durch die Entfernung der 37 carboxyterminalen Aminosäuren die Fähigkeit Aktin zu binden [Amberg *et al.*, 1995; Zelicof *et al.*, 1996]. Innerhalb dieser 37 liegt das sieben Aminosäuren lange Motiv E(X)₃PEQ. Die Reste E, P, E und Q sind in allen CAP Proteinen konserviert mit Ausnahme von zwei Pflanzenproteinen [Hubberstey und

Mottillo, 2002]. Es bleibt aber noch zu klären, ob dieser kurze konservierte Abschnitt wirklich für die Aktinbindung verantwortlich ist.

Die dritte Domäne, die in allen CAP Homologen vorkommt, besteht aus einem zentral gelegenen prolinreichen Abschnitt mit der Konsensussequenz (PXXPPPXP) für die Bindung von SH3 Domänen. In Hefe besteht diese Domäne aus zwei prolinreichen Abschnitten bezeichnet als P1 und P2. Während der P1 Abschnitt stark konserviert ist, ist die P2 Region nur schwach konserviert [Hubberstey und Mottillo, 2002]. In *S. cerevisiae* wird die P2 Stelle benötigt um CAP an das kortikale Aktinnetzwerk zu dirigieren. Übernommen wird diese Aufgabe von Abp1.

Im Menschen bindet nicht Abp1 sondern die SH3 Domäne von c-Abl an CAP. Nicht nur der Bindepartner sondern auch die Bindestelle ist verschieden zu Hefe. cAbl bindet an die P1 und nicht an die P2 Stelle.

Es scheint, als würde die Eigenschaft der CAP Homologe SH3 Domänen zu binden in den verschiedenen Arten von unterschiedlichen Bindestellen übernommen [Freeman *et al.*, 1996].

In der Hefe wird die Bindung an die SH3 Domäne von Abp1 von einem weiteren Abschnitt beeinflusst. Dieser Abschnitt liegt im N-Terminus und überlappt mit der Adenylatzyklase Bindestelle. Mutationen in diesem Bereich konnten die Fähigkeit von CAP, Abp1 zu binden und so an das kortikale Aktinnetzwerk zu translozieren, reduzieren. Die Fähigkeit an die Adenylatzyklase zu binden wurde davon aber nicht beeinträchtigt [Yu *et al.*, 1999]. Beeinträchtigt wurde allerdings die Fähigkeit zur Dimerisierung. Dies hat zu der Annahme geführt, dass monomeres CAP G-Aktin und die Adenylatzyklase binden kann, der prolinreiche Bereich dann aber für SH3 Domänen Proteine wie Abp1 nicht zugänglich ist. Nach der Dimerisierung von CAP könnte dieser Abschnitt frei werden und CAP über Abp1 an das kortikale Aktinnetzwerk gebunden werden [Yu *et al.*, 1999].

In allen CAP Homologen konnte eine weitere konservierte Region identifiziert werden. Bei *S. cerevisiae* ist sie zwischen den beiden Prolin-reichen Abschnitten lokalisiert. Es handelt sich um eine Verprolin bzw. WH2 Homologie Domäne. WH2 Domänen binden an G-Aktin, die Funktionalität der WH2 Domäne in CAP ist jedoch nicht geklärt [Paunola *et al.*, 2002].

1.7 Die Funktion von CAP *in vivo*

1.7.1 Die Funktion von CAP bei der Organisation der Zelle

Eine direkte Interaktion der N-terminalen Domäne von CAP mit der Adenylatzyklase konnte für *S. cerevisiae* [Field *et al.*, 1988] und *S. pombe* [Kawamukai *et al.*, 1992] gezeigt werden. Diese Interaktion ist wichtig für die korrekte Antwort der Adenylatzyklase auf das vom RAS2 Protein übermittelte Signal. Abgeleitet wurde dies aus der Tatsache, dass bei einer Deletion des N-Terminus von CAP1 der Hitzeschock-Phänotyp eines Hefestamms mit permanent aktivem RAS2 Protein wieder aufgehoben wurde [Field *et al.*, 1990, Gerst *et al.*, 1991]. Außerdem konnte die Expression eines N-terminalen Segmentes von CAP den Hitzeschock-Phänotyp wieder herstellen [Gerst *et al.*, 1991].

Der C-Terminus von CAP bindet an G-Aktin im Verhältnis 1:1 [Freeman *et al.*, 1995]. *In vivo* wird diese Funktion für die Organisation des Zytoskelts verwendet. Wurde der C-Terminus in Hefe deletiert, kam es zu einer abnormalen Aktinverteilung, einer veränderten Zellmorphologie in Verbindung mit verlangsamtem Wachstum und irregulärer Knospung. Dazu kamen eine Temperatursensitivität und Veränderungen der Sensitivität im Bezug auf Nährstoffe [Gerst *et al.*, 1991; Vojtek *et al.*, 1991]. Die Expression des C-terminalen Teilstücks von CAP in der Null Mutante konnte die beschriebenen Defekte wieder aufheben [Gerst *et al.*, 1991].

Ähnliche Effekte wie in der Hefe konnten auch für *D. discoideum* beobachtet werden. Hier führte eine starke Reduzierung der CAP Expression zu einer veränderten Zellmorphologie, zu verzögertem Wachstum in Flüssigkultur, zu einem Pinocytose- und einem Cytokinese Defekt. Alle beobachteten Defekte lassen sich mit Veränderungen in der Organisation des Aktinzytoskelts erklären. Zusätzlich übernimmt CAP in *D. discoideum* noch eine Funktion in der Chemotaxis und der Entwicklung der Zelle [Noegel *et al.*, 1999].

Auch für die physiologische Funktion von CAP aus Säugetieren konnte eine Bedeutung für das Aktinzytoskelett nachgewiesen werden. Die Mikroinjektion von anti-CAP Antikörpern und die Mikroinjektion von CAP aus Blutplättchen hatten gegenteilige Effekte zur Folge. Nach der Injektion der Antikörper nahm die Menge der Streßfasern ab, während nach der Injektion von CAP mehr Aktinfilamente gebildet wurden [Freeman und Field, 2000].

In *in vitro* Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass CAP stärker an Ionen oder Nukleotid-freies nicht nativ gefaltetes Aktin bindet als an nativ gefaltetes Aktin. Dabei ändert Aktin nach der Bindung an CAP seine Struktur. Diese Daten führten zu dem Schluß, dass CAP als Aktin Chaperon arbeiten könnte [McCormack *et al.*, 2001].

Ein Einfluß auf das Aktinnetzwerk wurde auch in *Arabidopsis thaliana* beobachtet. In in Suspension kultivierten Tabakpflanzenzellen führte die Überexpression von CAP zu einer massiven Reduktion von F-Aktin und einem Mitosedefekt. Wurde CAP in der Pflanze überexprimiert, resultierte dies in reduzierter Blattgröße und in einer geringeren Zahl von Epidermis- und Mesophyllzellen, die zusätzlich noch verkleinert waren [Barrero *et al.*, 2002].

1.7.2 Die Funktion von CAP während Entwicklung und Differenzierung

In *Chlorohydra viridissima* spielt CAP eine wichtige Rolle bei der Stimulierung der Adenylatzyklase durch den HA-Rezeptor. In *C. viridissima* sorgt das HA-Peptid über seinen Rezeptor für die Stimulation der Adenylatzyklase. Der resultierende Anstieg von cAMP dient als „second messenger“ bei der Determination und Differenzierung von Nervenzellen. Der Effekt des HA-Peptids konnte durch cAMP Agonisten nachgeahmt und durch cAMP Antagonisten inhibiert werden. Für CAP wurde postuliert, dass es im Signalübertragungsweg zwischen dem HA-Rezeptor und der Adenylatzyklase liegt, nachdem mit antisense Oligonukleotiden gegen CAP die Wirkung des HA-Peptids aufgehoben wurde, während die Wirkung der cAMP Agonisten unberührt blieb [Fenger *et al.*, 1994].

Auch in *D. melanogaster* spielt CAP eine wichtige Rolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletts. Es ist z. B. in der Lage, die Verteilung von F-Aktin in der Oocyte zu beeinflussen. Konkret unterbindet CAP die Bildung von F-Aktin an spezifischen Orten und verhindert so die unkontrollierte Ausbildung von Aktinfasern. Außerdem konnte eine Verbindung zwischen der korrekten Lokalisation von mRNAs innerhalb der Gradienten, die die Zellpolarität der Oocyte festlegen, und der Fixierung der mRNAs im Aktinkortex und CAP festgestellt werden [Baum *et al.*, 2000]. Ähnliches wie in der Oocyte konnte auch in der Entwicklung des Auges beobachtet werden. *D. melanogaster* Zellen, denen CAP fehlte, zeigten deutlich erhöhte Mengen von F-Aktin während der Entwicklung des Auges. Gleichzeitig waren Defekte bei der

Bildung der morphogenetischen Furche des Auges zu beobachten [Benlali *et al.*, 2000].

In der Baumwollpflanze verlängern sich einzelne epidermale Zellen bis sie mehr als das 1000-fache ihrer Breite erreichen, um Baumwollfasern zu bilden. Diese Differenzierung findet in Anwesenheit der Zytoskelettproteine Aktin, Tubulin, der Intermediärfilamentproteine usw. Statt, und die dynamische Regulation des Zytoskeletts ist unerlässlich für die Elongation der Zellen. Die Expression von CAP ist in diesen sich differenzierenden Zellen deutlich höher als in Vergleichsgewebe [Kawai *et al.*, 1998].

Auch in der Entwicklung von *Xenopus laevis* könnte die Expression von CAP eine Rolle spielen. Mit RT-PCR Analysen konnte gezeigt werden, dass CAP zunächst nur in sehr geringen Mengen als maternales Transkript exprimiert wird. Später in der Blastula und in den folgenden Phasen kommt es jedoch zu einer starken Zunahme der Expression. Mit *in situ* Hybridisierungen in den späteren Phasen konnte CAP am Animalpol detektiert werden. Auch in den folgenden Schritten der Entwicklung bleibt die Expression von CAP auf definierte Bereiche beschränkt [KhosrowShahian *et al.*, 2002].

Es könnte sein, dass eine der konservierten Funktionen von CAP während der Entwicklung darin besteht, durch Veränderungen am Aktinzytoskelett Prozesse wie die Elongation der Zellen, Migration und Polarität zu beeinflussen [Hubbersty und Mottillo, 2002].

1.8 Expression von CAP in Säugern

Die Expressionsraten von CAP1 und CAP2 wurden in den Geweben der Ratte untersucht. RT-PCR Analysen zeigten, dass CAP1, wenn auch auf unterschiedlichem Niveau, in allen untersuchten Geweben exprimiert wurde. Ähnliches konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden. CAP2 wurde dagegen nur in wenigen der untersuchten Gewebe exprimiert. Auch hier gab es Unterschiede in den Expressionsniveaus [Swiston *et al.* 1995].

Eine ubiquitäre Expression der CAP1 mRNA in den untersuchten Geweben wurde auch für die Maus gezeigt. Die CAP2 Expression war wie bei der Ratte auf einige Gewebe beschränkt [Leichter, 2002]

1.9 CAP und Profilin

Die Defekte, die mit dem Verlust der carboxyterminalen Domäne von CAP verbunden sind, können in der Hefe durch die Überexpression von Profilin ausgeglichen werden [Vojtek *et al.*, 1991]. Profilin ist ein Aktinmonomer bindendes Protein [Carlsson *et al.*, 1977; Haarer *et al.*, 1990] mit mehreren biologisch wichtigen Funktionen. Es bindet die Aktinmonomere und liefert sie an das schnellwachsende Ende der Filamente. Gleichzeitig erhöht es die ADP/ATP Austauschrate [Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1991; Pollard und Cooper 1984; Pring *et al.*, 1992]. Damit sorgt es für Aktinpolymerisation bei Werten die sogar unter der kritischen G-Aktin Konzentration liegen [Pantaloni und Carlier, 1993]. Neben Aktin kann Profilin auch Phospholipide binden [Lassing und Lindberg, 1985]. Es scheint, dass Profilin an PIP₂ bindet, um die CAP Mutation zu komplementieren [Goldschmidt-Clermont und Janmey, 1991; Vojtek *et al.*, 1991].

1.10 Intra- und intermolekulare Bindungen – Multimerisierung

In Hefe ist CAP mit der Adenylatzyklase assoziiert [Field *et al.*, 1988]. Das Molekulargewicht des Adenylatzyklasekomplexes ist in CAP-defizienten Stämmen um ca. 250 kDa verringert [Wang *et al.*, 1992]. Dieser Wert entspricht einem Heterotetramer aus monomerem Aktin und CAP. Auf die Multimerisierung von CAP wurde auch schon an anderer Stelle hingewiesen [Zelicof *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1999; Hubberstey *et al.*, 1996]. Bisher konnte jedoch kein eindeutiges Dimerisierungsmotiv identifiziert werden, obwohl eine Region im N-Terminus von CAP für die Bildung von Dimeren als wichtig erscheint [Yu *et al.*, 1999].

Außerdem konnte in „Yeast Two Hybrid“ Versuchen mit humanem CAP gezeigt werden, dass die aminoternale Domäne mit sich selbst und mit der C-terminalen Domäne interagiert. Umgekehrt konnte das Gleiche für die C-terminale Domäne gezeigt werden [Hubberstey *et al.*, 1996]. Für die Dimerisierung sind damit verschiedene Bindungskombinationen denkbar.

1.11 Subzelluläre Lokalisierung

In der Hefe ist CAP mit Hilfe seines prolinreichen Bereichs an den kortikalen Aktinstrukturen lokalisiert [Freeman *et al.*, 1996].

In höheren Eukaryonten wird die Lokalisation von anderen Domänen übernommen. Für *D. discoideum* konnte der N-Terminus als Vermittler der subzellulären Lokalisierung ausgemacht werden. CAP ist hier nahe der Plasmamembran lokalisiert und wird während Zellbewegungen relokalisiert. Außerdem kommt es zu Anreicherungen von CAP in den leading edges von chemotaktisch stimulierten Zellen und an den phagocytic cups [Noegel *et al.*, 1999; Gottwald *et al.*, 1996; Noegel *et al.*, unpublizierte Ergebnisse].

In Säugierzellen ist CAP diffus über das Zytoplasma verteilt, kann aber an der Plasmamembran oder den Lamellipodien konzentriert sein [Vojtek und Cooper, 1993; Zelicof *et al.*, 1996]. In Swiss 3T3 Zellen konnte sogar eine Lokalisation von CAP mit Streßfasern nachgewiesen werden [Freeman und Field, 2000].

Zur Rolle einer CAP Domäne in der Lokalisierung gibt es Hinweise aus einer Studie mit humanen CAPs. Hier konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von CAP an einen Komplex aus Cofilin und Aktin bindet. Dies könnte die Ursache für die Lokalisation von CAP in den dynamischen Regionen der Zellperipherie sein, die reich an Aktin und Cofilin sind [Moriyama und Yahara, 2002].

1.12 Die Beteiligung von CAP an der Endozytose

In CAP defizienten Hefestämmen konnten durch die Expression von SNC1, das starke Homologien zu Vesikelproteinen von Säugern zeigt, teilweise Defekte einer CAP Mutante aufgehoben werden. Dies war der erste Hinweis, dass CAP an Endozytosevorgängen beteiligt sein könnte [Gerst *et al.*, 1992].

Die Anreicherung von CAP am „phagocytic cup“ [Noegel, unveröffentlichte Ergebnisse] von *D. discoideum* und die Isolierung von CAP als Komponente aufgereinigter Phagosomen der murinen J774 Makrophagenzelllinie [Garin *et al.*, 2001] gibt Anlaß zur Spekulation, dass CAP auch hier an Endozytosevorgängen beteiligt sein könnte.

1.13 Das Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die *in vivo* Funktion von CAP1 untersucht werden. Dazu sollte ein ko-Vektor konstruiert werden um mit diesem eine CAP1 defiziente Mauslinie zu etablieren. Desweiteren sollte rekombinant exprimiertes CAP1 für die Produktion polyklonaler Antikörper erzeugt werden. Mit Hilfe dieser Antikörper und mit Hilfe von Northernblots sollte die CAP1 Expression in den Organen der adulten Maus und während der Embryonalentwicklung untersucht werden. Weiterhin sollten Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und zu Bindungspartnern von CAP1 an Zellen und an Zellhomogenaten durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Labormaterialien

Einfrierröhrchen, 1,8 ml und 2,2 ml	Nunc
Einweg-Pipetten, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner
Einweg-Pipettenspitzen	Greiner
Elektroportationsküvette	BioRad
Paraffin-Formschälchen	Roth
Fotofilm, Typ 100-6	Kodak
Gewebekulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ²	Nunc
Gewebekulturplatten, 24 Loch, Ø 16 mm	Nunc
Hybridisierungsröhren	Hybaid
3MM Filterpapier	Whatman
Mikrotiterplatten, 96 Loch, U96 Maxisorb	Nunc
Nitrocellulose, Typ BA85	Schleicher und Schüll
Nitrocellulose-Rundfilter, BA85 Ø 82mm	Schleicher und Schüll
Nylonmembran, Biodyne	Gelman Science
Sterilfilter, 0,2 µm	Gelman Science
Petrischalen, Ø 60 mm x 15 mm	Merck
Petrischalen, Ø 94 mm x 16 mm	Greiner
Petrischalen, Ø 100 mm x 20 mm	Nunc
Petrischalen, Ø 140 mm x 20 mm	Nunc
Plastikküvette	Greiner
Quarzküvette Infracil	Hellma
15 ml Röhrchen, Typ 2095	Falcon
50 ml Röhrchen, Typ 2070	Falcon
Reaktionsgefäße, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,2 ml	Greiner, Sarstedt
Röntgenfilm X-omat AR-5, 18 x 24 mm	Kodak
Röntgenfilm X-omat AR-5, 535 x 43 mm	Kodak

2.1.2 Geräte

Blotkammer Trans-Blot SD	BioRad
Einbettautomat Citadel 1000	Shandon
Crosslinker UVC 500	Hoefer
Elektroporationsgerät, Typ Gene-Pulser	BioRad
Elektro-Eluter 422	Bio-Rad
Heizblöcke:	
Typ DIGI-Block JR	neoLab
Typ Dri-Block DB x 20	Techne
Thermomixer	Eppendorf
Hybridisierungsöfen	Hybaid
Inkubationsöfen Lab-Therm	Kühner, Heraeus
Magnetrührer, Typ MR 3001 K	Heidolph
Mikroskope:	
Lichtmikroskop	Olympus
Laser Scan Mikroskop	Leica
Fluoreszenzmikroskop DMR	Leica
Multipipette, Multipette plus	Eppendorf
Paraffin Einbettssystem TB S88	Medite
PCR-Maschine	MWG-Biotech
pH-Meter 766	Knick
Plattengießmaschine	Technomat
Rotationsmikrotom	Leica
Rotoren:	
Typ JA-10	Beckman
Typ JA-25.50	Beckman
SLA-1500	Sorvall
SLA-3000	Sorvall
SS-34	Sorvall
SW41	Beckmann
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
UV-Auflichtmonitor TFS-35 M	Faust
UV-Transilluminator	MWG-Biotech
Vortex REAX top	Heidolph
Wasserbäder	GFL

Zentrifugen:

Beckman Avanti J25	Beckman
Beckmann Optima L-70K	Beckmann
Sorvall RC 5C plus	Sorvall

2.1.3 Kits

EndoFree Plasmid Kit	Quiagen
Nucleobond AX 100 und 500	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel
pGem-Teasy-Vector System I	Promega
Stratagene Prime [®] It II	Stratagene
Zero Blunt PCR Cloning Kit	Invitrogen

2.1.4 Chemisch kompetente Zellen

One Shot [®] chemisch Kompetenten Zellen	Invitrogen
---	------------

2.1.5 Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase	Roche
Lysozym	Sigma
Klenow-Fragment	Life Technologies
Proteinase K	Sigma

Restriktionsendonukleasen	Roche,Amersham, GibcoBRL, New England Biolabs
RNase A (Ribonuklease)	Sigma
<i>PfuTurbo</i> [®] -DNA-Polymerase	
T ₄ -DNA-Ligase	Gibco-BRL
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Roche

2.1.6 Primäre Antikörper

anti-β-Aktin Antikörper, mAk AC-74	Sigma
anti-β-COP Antikörper, mAk E5-A3	Pepperkok <i>et al.</i> , 1993
anti-GFP Antikörper, mAk K3-184-2	nicht veröffentlicht
anti-CAP1 Antikörper, pAK	Pineda nicht veröffentlicht
anti-Coronin-3 Antikörper, mAk K6-444-4	nicht veröffentlicht
anti-Coronin-7 Antikörper, mAk K 37 142-1	nicht veröffentlicht

2.1.7 Sekundäre Antikörper

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

2.1.8 Inhibitoren und Antibiotika

Inhibitoren

Complete [®] Inhibitoren Cocktail	Roche
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma

Antibiotika

Ampicillin	Grünenthal
Geneticin (G-418)	Gibco-BRL

Kanamycin

Sigma

2.1.9 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)

Nat. Diagnostics

Agar-Agar (BRC-RG)

Biomatic

Agarose (Elektrophoresis Grade)

Gibco

3-Aminophthalhydrazid

Fluka

Bacto-Agar

Difco

Bacto-Pepton

Difco

Bacto-Trypton

Difco

5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -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

DAPI

Sigma

Dimethylformamid (DMF)

Riedel-de Haen

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Merck

1,4-Dithiothreitol (DTT)

Gerbu

DMEM knockout

Gibco

Dulbeccos's Modified Eagle's Medium,DMEM

Sigma

Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)

Merck

N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)

Sigma

Essigsäure 98-100 %

Riedel-de Haen

Ethanol

Riedel-de Haen

Ethidiumbromid

Sigma

Ethylphenylpolyethylenglycol (NP-40)

Fluka

FCS, FBS (Fötales Kälberserum)

Biochrom, Gibco

Fischgelatine

Sigma

Formaldehyd

Sigma

Formamid	Merck
Gelatine	Sigma
Glucose	Merck
Glycerin	Riedel-de Haen
Glycin	Degussa
Harnstoff	Gerbu
Heringssperma	Roche
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES)	Biomol
Hefeextrakt	Oxoid
Imidazol	Merck
Lipofectamin	Invitrogen
Imidazol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Loewe Biochemica
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Kaliumhydrogenphosphat-Triphosphat	Merck
Lipofectamin PLUS [®] Reagenz	Gibco
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel-de Haen
Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Gerbu
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Riedel-de Haen
Natriumlaurylsarcosinat	Sigma
Natriumothovanadat	Sigma

Nukleotide	Sigma, Roche
Paraformaldehyd	Sigma
Phenol	Roth
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Sigma
Plus Reagenz	Invitrogen
Ponceau S Konzentrat	Sigma
Saccharose	Fluka
Salzsäure 32 %ig	Fluka
Sephadex G50	Pharmacia
N,N,N',N' -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Triton X-100 (Octylphenylpoly(ethylenglykolether))	Merck
Trypsin/EDTA	Sigma
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid (30 %ige Lösung)	Merck
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Roth

2.1.10 Radiochemikalien

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

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

2.1.11 Vektoren

pBluescript SK (-)	[Short et al., 1988]
pEGFP-C1,	Clontech
pGEM [®] -T Easy	Promega
pT7-7	[Tabor, 1990]
Topo [®] Vektor	Invitrogen

pGEM-CAP1:

Das Plasmid enthält die komplette kodierende Region der CAP1 cDNA (EMBL Datenbank-Zugangsnummer L12367). cDNA aus C3H10T1/3 Fibroblasten wurde für eine Standard PCR mit 30 Zyklen verwendet. Mit Hilfe der Oligonukleotide BH1CAP3

und BH1CAP5 wurde die komplette kodierende Region der CAP1 cDNA amplifiziert. Das Amplifikationsprodukt wurde in pGEM-Teasy ligiert und anschließend sequenziert.

pBS-CAP1:

Dieses Plasmid enthält die komplette kodierende Region der CAP1 cDNA.

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

pT7-7-CAP1:

Dieses Plasmid kodiert für das CAP1 Vollängenprotein.

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

pEGFP-CAP1:

Dieses Plasmid kodiert für das CAP1 Vollängenprotein fusioniert an EGFP (EGFP-CAP1). pGEM-CAP1 wurde mit BamHI gespalten und das Fragment isoliert. pEGFP-C1 wurde mit BamHI gespalten und gereinigt. Fragment und der linearisierte Vektor wurden ligiert.

2.1.12 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Generierung der 5'-CAP1 Sonde:

CAP1 F: GCG GCC GCA TGG CTG ACA TGC AAA ATC

CAP1 R: TTA ATT AAT GAA ACT CTT TGA TGT AAG CCT

Oligonukleotide zur Generierung des 5' Arms des ko-Vektors:

1.F: TGT CCC TGT ACA TCT GTG CAG AAG CAT GGA

1.R: AGC TGC AGA CAG AGA GGC ATG GAG TTT CAG

2.F: CTT TCA GGT CTG TGG TTT CCT TGG CTG CAT

2.R: GCG GCC GCA CTG CTC CTG GGG AAG GCA AAC AC

Oligonukleotide zur Generierung des 3' Arms des ko-Vektors:

1.F: GCG GCC GCA AAC ACG TAA GGA CAC GGG GGC CCT

1.R: GAA GGC AGT CCC AGT ATC AAA GGC TTA GGA

Oligonukleotide zur Generierung der externen ko-Sonde

1.F: ATG ATG AGG ATG GCT TGC TGA AAT TGG TT

1.R: AGG AGC TAA AAC TAT GGT GGT TTT AGT

2.2.1 Puffer und Lösungen

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

Blot Saline (pH 7,0):	10mM Tris-HCl 0,15 M NaCl
PBS (pH 7,2/ pH 8,0):	30 mM KH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl 70 mM Na ₂ HPO ₄ (zur pH Einstellung)
PBG:	0,5 % BSA 0,1 % Fischgelatine in PBS
1 M Phosphatpuffer (pH 7,4):	2/3 Volumen 1M Na ₂ HPO ₄ 1/3 Volumen 1 M NaH ₂ PO ₄
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
TE-Puffer (pH 8,0):	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA (pH 8)
50 x TAE-Puffer (pH 8,0):	2 M Tris 16,6 M Eisessig 50 mM EDTA

2.2.2 Kulturmedien

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.

LB-Medium:	SOC-Medium:
10 g Bacto-Trypton	20 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt	5 g Hefeextrakt
5 g (85,5 mmol) NaCl	20 mM Glucose
pro 1 l Wasser	0,5 g (8,5 mmol) NaCl
	pro 1 l Wasser

Die pH-Werte wurden mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden den Medien 0,9 % (w/v) Agar und bei Bedarf 100 mg/l Ampicillin oder 50 mg/l

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 XGal-Lösung (200 mg/10 ml Dimethylformamid) bestrichen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Bei nicht anders lautenden Angaben wurden Reaktionen bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.1 Boiling-Methode zur Plasmid-DNA Präparation im Mikromaßstab

1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden in einer Tischzentrifuge bei 5000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 350 µl STET Puffer resuspendiert. Für die Lyse der Zellen wurden 25 µl einer Lysozym Lösung (10 mg/ml) hinzugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 1 Minute auf 100°C erhitzt. Nach Zentrifugation bei 16.000 x g für 10 Minuten wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol für 5 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert. Die Plasmid-DNA wurde dann durch Zentrifugation bei 16000 x g für 10 Minuten pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde danach in 50 µl Wasser resuspendiert. RNA wurde mit 0,1 mg/ml RNase bei 37°C für 30 Minuten verdaut.

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

2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel

1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden 1 Minute bei ca 5000 x g in einer Tischzentrifuge pelletiert. Nach Angaben des Herstellers (Macherey und Nagel) erfolgte anschließend die Plasmidisolierung mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid-Kits. Die DNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert.

2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Makro –und Megamaßstab gemäß Macherey und Nagel

50 ml bzw. 500 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation bei 4000 bis 5000 x g für 5 Minuten pelletiert. Nach Angaben des Herstellers (Macherey und Nagel) erfolgte anschließend die Plasmidisolierung mit Hilfe des Nucleobond AX 100 oder des AX 500-Kits. Die DNA wurde in 100 µl bzw. 500 µl Wasser resuspendiert.

2.3.4 Isolierung von BAC-Klon-DNA aus *E. coli* im Makro –und Megamaßstab gemäß Macherey und Nagel

BAC-Klone enthalten ein Plasmid, das nur in geringer Kopienzahl in der *E. coli* Zelle vorliegt. Zur Isolation der BAC-Klon-DNA wurden die Modifikationen des Herstellerprotokolls (Macherey und Nagel) für diesen Plasmidtyp befolgt.

2.3.5 Isolierung von Endonuclease freier Plasmid DNA

50 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation bei 4000 bis 5000 x g für 5 Minuten pelletiert. Nach Angaben des Herstellers (Quiagen) wurde Endonuclease freie Plasmid DNA isoliert. Die DNA wurde in 80 µl Wasser resuspendiert.

2.3.6 Extraktion genomischer DNA aus ES-Zellen

Zellen in einer 24-Loch-Platte wurden mit PBS gewaschen und das PBS mit einer 1 ml Eppendorf Pipette entfernt. Innerhalb von 2 bis 3 Minuten lösten sich die Zellen bei 37°C mit 200 µl Lysepuffer von der Kulturplatte und wurden in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellyse wurde für mindestens 6 Stunden oder über nacht bei 55°C durchgeführt. Die DNA wurde im Anschluss bei Raumtemperatur mit 400 µl Ethanol unter Schwenken gefällt. Die Pelletierung erfolgte durch Zentrifugation. Nach Ethanolwaschung mit 70 % Ethanol wurde die DNA kurz getrocknet und dann mit 100 µl Wasser resuspendiert.

Lysepuffer: 10 mM Tris pH 7,5
10 mM EDTA
10 mM NaCl
0,5 % Sarcosyl
2 mg/ ml Proteinase K (frisch dazugeben)

2.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Wasser als Referenz bestimmt. Der vom Photometer gemessene OD-Wert wurde mit der Formel:

$$\frac{\text{OD} \times \text{Verdünnung} \times 50}{1000} = \text{DNA Konzentration in ng/}\mu\text{l}$$

in die Nukleinsäurekonzentration umgerechnet. Mit dem Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ ließ sich eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure machen. Betrug der Wert des Quotienten 1,8 oder mehr, wurde die Lösung als ausreichend rein angesehen.

2.3.8 Ethanolfällung

DNA-Lösungen wurde mit dem dreifachen Volumen Ethanol und einem zehntel Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) vermischt, 15 Minuten bei –80°C inkubiert und bei 4°C mit 16.000 x g für 25 bis 30 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und die DNA im gewünschten Volumen Wasser oder Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert

2.3.9 Phenol-Chloroform Extraktion

Proteinhaltige DNA-Lösungen wurde mit einem Volumen Phenol so vermischt, dass sich eine Emulsion bildete. Anschließend wurde ein halbes Volumen Chloroform hinzugefügt und erneut gut gemischt. Durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 16.000 x g trennte sich die wässrige Oberphase ab. Diese wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform gut vermischt. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert (2.2.8).

2.3.10 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im TAE-Agarosegel

Die Auftrennung von DNA unterschiedlicher Molekulargewichte erfolgte in horizontalen Ethidiumbromid-haltigen (0,1 µg/ml) Agarosegelen mit Tris-Acetat-Puffer als Laufpuffer. Die Dichte der Gele lag zwischen 0,5 % und 2 %. Die angelegte Spannung lag zwischen 5 und 10 V/cm. Vor dem Auftragen wurde die DNA mit Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter von Gibco verwendet. Zur späteren Visualisierung der aufgetrennten DNA Fragmente diente UV-Licht ($\lambda=302\text{nm}$). Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren der mit UV-Licht bestrahlten Gele mit einem Videodokumentationssystem.

DNA-Probenpuffer:

40 % Saccharose
0,5 % SDS
0,25 % Bromphenolblau (Na-Salz)
in TE-Puffer

DNA-Größenstandards:

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

2.3.11 Southernblot

Der DNA Transfer nach Southern wurde für Plasmid-DNA und genomische DNA durchgeführt. Genomische DNA wurde zunächst mit HCl depuriniert. Dazu wurde das 1 bis 0,5 %ige Agarosegel nach Trennung der DNA zweimal für 15 Minuten in 0,25 M HCl Lösung inkubiert. Die folgenden Schritte wurden auch für den Transfer von Plasmid-DNA vorgenommen: 20 Minuten Inkubation in Denaturierungspuffer und 20 Minuten Neutralisierung in Neutralisierungspuffer. Auf einen Stapel aus saugfähigem Papier wurden zunächst 3 Lagen mit 20 x SSC angefeuchtetem 3MM Whatman Papier, darüber eine zuerst mit Wasser und dann mit 20 x SSC angefeuchtete Nylonmembran und darauf das Agarosegel geschichtet. Auf das Agarosegel wurden erneut 3 Lagen 3MM Whatman Papier gebettet. Die oberste Lage bildete eine Brücke aus 2 Schichten 3MM Whatman Papier, die den Stapel mit einem 20 x SSC Reservoir verband. Der Transfervorgang wurde über Nacht durchgeführt. Nachdem die DNA durch kapillaren Sog auf die Nylonmembran übertragen war, wurde diese mit 2 x SSC gewaschen und im Falle von Plasmid-DNA zweimal mit einem UV-

Quervernetzer bestrahlt. Im Falle von genomischer DNA wurden die Nylonmembranen für 2 Stunden bei 80°C getrocknet. Anschließend wurde wieder mit 2 x SSC gewaschen.

Denaturierungspuffer:
0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisierungspuffer:
0,5 M Tris-HCl, pH 8,0
1,5 M NaCl

2.3.12 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit dem Stratagene Prime It II

® Kit

Für die Markierung von DNA-Sonden mit α -³²P wurden ca. 25 ng DNA mit Wasser auf ein Volumen von 25 μ l aufgefüllt, mit 10 μ l „Random-Oligonucleotid-Primer“ versetzt und bei 100°C für 10 Minuten inkubiert. Nach der Trennung der DNA Doppelstränge wurde die Lösung bei Raumtemperatur langsam abgekühlt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 10 μ l 5x Prime it Puffer, 5 μ l α -³²P-dATP (50 μ Ci) und 2 U Klenow-Enzym hinzugefügt. Dieser Reaktionsansatz wurde 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden nicht eingebaute Nukleotide durch eine zwei-minütige Zentrifugation bei 3.000 x g über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-Puffer abgetrennt. Inkubation bei 100°C für 5-10 Minuten trennte die beiden Stränge der gereinigten DNA-Sonde.

2.3.13 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden mit DNA- und RNA-Blots

Die hier durchgeführten Experimente wurden in Hybridisierungsöfen durchgeführt, die mit Wippen und Rotoren ausgestattet waren. Soweit die Maße der Membranen dies zuließen wurde die Hybridisierung in Röhren durchgeführt, die an den Rotoren befestigt waren. Großformatige Blots wurden in Beuteln hybridisiert. Diese wurden während der Inkubation auf der Wippe gelagert.

2.3.13.1 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden mit Southernblot- und Northernblot-Membranen

Die Hybridisierung von α -³²P markierten DNA-Sonden mit Plasmid-DNA und mit RNA wurde auf die gleiche Weise durchgeführt. Für die Hybridisierung wurden die

Southernblot- und Northernblot-Membranen mindestens 30 Minuten mit 2 x SSC gewaschen und danach für mindestens 1 Stunde bei 42°C mit Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Anschließend wurde dieser Puffer verworfen und 10 ml frischer Hybridisierungspuffer mit der einzelsträngigen DNA-Sonde (s. 2.2.13) versetzt. Die Hybridisierung wurde über Nacht durchgeführt. Im Anschluß daran wurde die Hybridisierungslösung verworfen und bei 42°C zweimal für mindestens 30 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die Membranen wurden dann für die Exponierung des Röntgenfilms in einer Filmkassette mit Kleenex getrocknet und in Folie eingeschlagen.

Die Vorgehensweise für die Hybridisierung von DNA-Sonden mit genomischen Southernblots verlief ähnlich. Abweichend waren die Hybridisierungs- und Waschpuffer (s.u.). Daraus ergab sich eine veränderte Temperatur für Prähybridisierung und Hybridisierung, die hier bei 64°C lag sowie eine Waschttemperatur von 42°C. Die Waschdauer lag für jeden der zwei Schritte bei 15 bis 20 Minuten. Anschließend wurde mit einem Flächenzähler die Aktivität auf der Membran gemessen. In Abhängigkeit davon wurde ein weiterer Waschschrift durchgeführt oder die Membran wie oben beschrieben für die Exponierung mit dem Röntgenfilm vorbereitet.

Puffer für Hybridisierung mit Plasmid-DNA

Hybridisierungspuffer (pH 7,15):

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

Waschpuffer (pH 7,15):

Hybridisierungspuffer
ohne 4x Denhardts Reagenz

Puffer für die Hybridisierung mit genomischer DNA

Hybridisierungspuffer (pH 7,2)

7 % SDS 10 mM
0,25 M NaHPO₄
1 mM EDTA
1 % BSA

Waschpuffer (pH 7,2)

0,01 M NaHPO₄
0,5 % SDS
1 mM EDTA

2.3.13.2 Kolonie-Blot

Die simultane Durchmusterung zahlreicher *E. coli*-Kolonien nach Transformanten wurde mit Hilfe des Kolonie-Blots durchgeführt. Dazu wurden mit Membranen aus Nitrozellulose Abdrücke von Kolonien gemacht, die über Nacht auf LB-Agar-Platten herangewachsen waren. Auf einer geraden Fläche wurden 2 ml einer 0,5 M KOH Lösung und 2 mal 2 ml einer 1 M Tris-HCl (pH 8,0) Lösung aufgetropft. Die Membranen wurden nacheinander für je 3 Minuten mit der DNA Seite nach oben auf jede der 3 Lösungen gelegt. Anschließend wurden die Membranen in eine Wanne mit 2 x SSC überführt. Danach wurden die *E. coli*-Zellreste mit behandschuhten Fingern abgerieben und gründlich in 2 x SSC gewaschen. Mit der DNA Seite nach oben wurden die Membranen auf 3MM Whatman Papier getrocknet. Zur Fixierung der DNA wurden die Filter für 2 Stunden bei 60°C gebacken.

Für die Hybridisierung der Filter mit der denaturierten α -³²P markierten Sonde (s. 2.2.12), wurden diese zuerst mit 2 x SSC angefeuchtet und dann wie die Southernblot-Membranen (s.o.) hybridisiert. Als Zusatz wurden hier Prähybridisierung und Hybridisierung 100 µg/ml Heringssperma DNA beigelegt.

2.3.13.3 Durchmusterung einer genomischen Bank der Maus

Die genomische Bank der SV129 Maus war in Form von BAC-Klonen auf Membranen aufgetragen. Diese wurden mit Hybridisierungspuffer in einen Beutel eingeschweißt und bei 65°C für 1 Stunde prähybridisiert. Die denaturierte α -³²P markierte Sonde (s. 2.2.12) wurde durch einen Einschnitt im Beutel eingefüllt, der Beutel anschließend wieder verschweißt und die Membranen über Nacht bei 65°C auf der Wippe inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen in eine Schale überführt, zweimal kurz mit Waschpuffer abgespült und dann zweimal für 30 Minuten bei 65°C gewaschen. Die Filter wurden anschließend wie oben beschrieben für die Exponierung des Röntgenfilm vorbereitet.

Hybridisierungspuffer:

1 M NaPO₄ (pH7,2)
7 % SDS0,5
1 mM EDTA

Waschpuffer:

40 mM NaPO₄ (pH7,2)
0,1 % SDS

2.3.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde das gewünschte Fragment unter UV Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Gelstück wurde gewogen und nach Herstellerprotokoll (Machery und Nagel) mit der entsprechenden Menge Gel-Lysepuffer versetzt. Nach einer Inkubation bei 50°C für 5 bis 10 Minuten war das Gelstück gelöst und wurde auf eine Säule geladen. Die DNA wurde nach Protokoll gereinigt und mit 25 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert.

2.3.15 Auftrennung von DNA Fragmenten im Saccharosegradienten

Es wurden ca. 60 µg DNA in einem Volumen von 400 µl unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die DNA wurde mit Phenol-Chloroform Extraktion (s. 2.2.9) gereinigt und mit Ethanol fällung (s. 2.2.8) präzipitiert. Das Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer resuspendiert. 12,5 ml 2 x Saccharosepuffer und 3,75 g Saccharose wurden mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt. 11 ml der 15 %igen (w/v) Saccharoselösung wurden in einem Ultrazentrifugen Röhrchen für 3 Stunden bei -80°C eingefroren und bei Raumtemperatur langsam wieder aufgetaut. Die resuspendierte DNA wurde mit einer 1 ml Eppendorfpipette über die Saccharoselösung geschichtet. Bei 15°C wurde bei 100.000 x g für 22 Stunden in einem Ausschwenkrotor zentrifugiert (SW 41). Das Röhrchen wurde im Anschluß von unten angestochen und der Gradient in 12 Fraktionen von je 1 ml aufgeteilt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit 1 ml Isopropanol und 100 µl 8 M NaOAc inkubiert und durch Zentrifugation bei 16.000 x g, 4°C und 15 Minuten pelletiert. Nach Waschung mit 70 %igem Ethanol wurde die Pellets in 50 µl Wasser resuspendiert.

2 x Saccharosepuffer:

100 mM Tris-HCl (pH 7,4)
100 mM NaCl
10 mM EDTA

2.3.16 *In vitro* Rekombination von DNA

2.3.16.1 Restriktion von DNA

Für die Restriktionsreaktionen wurden die vom Hersteller angegebenen Bedingungen von Puffern und Temperatur befolgt. Je nach Reinheitsgrad der DNA wurden zwischen 2 und 15 U je μg DNA eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden in der Regel für 1 bis 3 Stunden, und manchmal über Nacht unter den vorgegebenen Bedingungen inkubiert. Die Vollständigkeit der Restriktionen wurde mit Gelelektrophorese überprüft und die DNA durch Extraktion aus dem Gel gereinigt.

2.3.16.2 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen

Nach der Linearisierung eines Plasmids wurden dessen 5'-Phosphatgruppen entfernt, um einen erneuten Ringschluß des Plasmids ohne den Einbau des gewünschten DNA Fragments zu verhindern. Dazu wurden 50 μl einer Restriktionsreaktion mit 40 μl Wasser, 10 μl 10 x CIP Puffer und 1 U alkalischer Phosphatase versetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Durch eine Inkubation bei 65°C wurde die alkalische Phosphatase inaktiviert. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz durch Gelextraktion von Salzen, Enzymen und ungeschnittenen Vektormolekülen gereinigt.

2.3.16.3 Erzeugen stumpfer Enden

Für Ligationsreaktionen, die glatter DNA Enden bedurften, wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I überhängende 5' und 3' Enden, die durch Restriktionsreaktionen gebildet worden waren, in glatte Enden überführt. Dazu wurden 50 μl Restriktionsansatz mit 4 mM dNTP und 1 U Klenow-Enzym versetzt. Der Reaktionsansatz wurde dreißig Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die DNA Fragmente durch Gelextraktion gereinigt.

2.3.16.4 Entfernen einer Restriktionsschnittstelle aus einem Vektor

Für die Entfernung einer Restriktionsschnittstelle mit überhängenden Enden wurde der Vektor mit dem Enzym der entsprechenden Schnittstelle linearisiert.

Anschließend wurden die Überhänge mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I entfernt (s. 2.2.16.3). Durch Gelextraktion wurde der Vektor gereinigt und anschließend religiert (s. 2.2.16.6).

2.3.16.5 Addition von Adenosin an die 3' Enden

PCR Produkte, die von der *Pfu* DNA-Polymerase synthetisiert wurden, wurden vor der Ligation in einen T-Vektor mit einem Adenosinrest am 3'-Ende versehen. 3 U *Taq*-Polymerase und 1 µl dNTP (10 mM) wurden dem PCR Produkt beigemischt. In der PCR-Maschine wurde der Reaktionsansatz dann für 2 Minuten auf 92°C erwärmt und anschließend 10 Minuten bei 72°C inkubiert. Die DNA wurde dann nach dem Protokoll von Machery und Nagel für Aufreinigung von PCR Produkten gereinigt.

2.3.16.6 Ligation mit T4-DNA-Ligase

Vor dem Start der Ligrationsreaktionen wurden PCR Produkte und Fragmente der Restriktionsreaktionen mit dem PCR-Aufreinigungsprotokoll (s. Machery und Nagel Protokoll) bzw. durch Gelextraktion gereinigt.

Gereinigte *Taq*-DNA-Polymerase Produkte wurden mit dem pGEM-T Easy Kit ligiert.

Dazu wurden

- 5 µl 2 x „Rapid Ligation“ Puffer
- 1 µl pGEM-T Easy Vektor (50 ng/µl)
- 1 µl T4 DNA-Ligase (3 U/µl)
- 3 µl *Taq*-DNA-Polymerase Produkte (30-100 ng/µl)

vermischt und über Nacht bei 15°C inkubiert.

Für Ligrationsreaktionen von gereinigten Restriktionsfragmenten wurde ein Verhältnis von 1:3 bis 1:5 von Vektor und DNA Fragment gewählt. Alle Vektoren wurden vor der Ligation dephosphoryliert (s. 2.2.16.2) und anschließend über Gelextraktion gereinigt. Die Reaktion wurde mit 1 U T4 DNA-Ligase in einem Volumen von 10 µl und bei ca. 15°C über Nacht durchgeführt.

2.3.16.7 Klonierung mit dem Topoisomerase-System

Produkte der *Pfu*-DNA-Polymerase verfügen nicht über Adenosin Überhänge an den Enden. PCR Produkte dieses Enzyms wurden nach Addition von Adenosin (s. 2.2.16.5) in einen T-Vektor ligiert oder mit Hilfe des Zero Blunt PCR Klonierungs-Kits kloniert. Dazu wurden

4 µl *Pfu*-Polymerase Produkt
1 µl Salzlösung (im Kit enthalten)
1 µl Topo[®] Vektor (Vektor mit Topoisomerase gekoppelt)

vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µl der Reaktion wurden mit One Shot[®] chemisch kompetenten Zellen vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die äquilibrierte Suspension wurde für 30 Sekunden auf 42°C erwärmt und dann sofort auf Eis abgekühlt. Mit 250 µl SOC Medium versetzt, wurde das Reaktionsgefäß horizontal auf einem Schüttel-Inkubator bei 200 upm und 37°C für eine Stunde inkubiert. 50 µl der Suspension wurden dann auf einer LB-Agar Platte mit 50 µg/ml Kanamycin ausgestrichen.

2.3.17 Transformation von *E. coli*-Zellen

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

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellen eine OD₅₅₀ von 0,4 bis 0,5 erreicht hatten wurden sie auf 2 x 50 ml Reaktionsgefäße verteilt und auf Eis für 30 Minuten abgekühlt. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 4°C und 4000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 15 ml eiskaltem TFB I Puffer resuspendiert und 15-30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension nochmals 5 Minuten bei 4°C und 4000 x g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 2 ml eiskalter TFB II Lösung aufgenommen, 15-30 Minuten auf Eis inkubiert und zu je 200 µl in Reaktionsgefäße pipettiert. Diese wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei –80°C gelagert.

2.3.17.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 200 µl kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit einem vollständigen Ligationsansatz oder ca. 0,5 µg Plasmid-DNA vermischt und für ungefähr 5 Minuten auf Eis äquilibriert. Danach wurden die Zellen in einem Heizblock für 1 Minute auf 42°C erwärmt und anschließend in Eis abgekühlt. Nach 5 bis 10 Minuten Inkubation im Eis wurde dem Reaktionsgefäß 1 ml SOC beigemischt und dieses horizontal in einem Schüttel-Inkubator befestigt und bei 30°C und 250 upm für 1,5 Stunden inkubiert. Für die Transformation einer Ligationsreaktion wurde anschließend das gesamte Volumen auf einer LB-Agar-Platte mit Selektionsmedium ausgestrichen. Dazu wurde die *E. coli*-Suspension bei 300 x g für 1 Minute zentrifugiert, der Großteil des Überstands verworfen und das Pellet in dem verbleibenden Überstand resuspendiert und ausgestrichen. Bei Transformationen eines Plasmids wurden nur etwa 50 µl der Suspension ohne vorhergehende Konzentrierung ausgestrichen.

2.3.17.3 *E. coli*-Dauerkulturen

Wichtige Transformanten werden als Dauerkultur konserviert. Dazu wurden diese als Übernachtkultur in LB-Selektions-Medium angezogen und mit 15 % Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

2.3.18 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde hier mit genomischer DNA und mit Plasmid DNA als Template durchgeführt. Für genomische DNA wurden Primer mit ca. 30 Basen und mindestens 60°C Schmelztemperatur ausgewählt. Für Plasmid DNA wurden Primer mit ca. 25 Basen ausgewählt. Generell betrug der GC-Gehalt zwischen 40 % und 60 %. Dieser Wert sowie die Schmelztemperatur wurden mit dem Programm Oligonucleotide Properties Calculator ermittelt. Es steht auf der Internetseite: <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html> zur Verfügung. Für die PCR-Reaktion wurde ein Gemisch aller 4 dNTPs verwendet, wobei jede Einzelkomponente dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration von 10 mM vorlag.

Der PCR-Standard-Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

1-10 ng DNA
 1,5 µl F-Starter-Oligonucleotide (10 µM)
 1,5 µl R-Starter-Oligonucleotide (10 µM)
 1 µl dNTP mix (10 mM)
 5 µl 10x Polymerase Puffer
 1,5 µl DNA-Polymerase (4,5 U *Taq*, 3,7 U *PfuTurbo*)
 mit Wasser auf 50 µl auffüllen

Die initiale Denaturierung wurde bei 92 bis 94°C für 2 Minuten durchgeführt.

Die darauf folgenden Schritte waren:

92°C	30 s	Denaturierung	} 20-35 Zyklen
50-68°C	30 s	Primer-Hybridisierung	
68-72°C	1-10 min	DNA Syntheseschritt	
68°C-72°C	10 min	Abschluß der laufenden Syntheseschritte	

Die Reaktionsparameter (Temperaturen, Zeiten) wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst. Die Hybridisierungstemperatur wurde zunächst auf mindestens 1-2°C unter der geschätzten Schmelztemperatur der Primer angesetzt, wobei ein Wert von etwa 60°C nicht überschritten wurde. Kam es dabei zur Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte, wurde die Hybridisierungstemperatur schrittweise erhöht.

10 x *Taq*-PCR-Puffer:
 100 mM Tris/HCl (pH 8,3)
 500 mM KCl
 15 mM MgCl₂
 0,1 % (w/v) Gelatine

10 x *Pfu*-PCR-Puffer:
 200 mM Tris-HCl (pH 8,8)
 100 mM KCl
 20 mM MgSO₄
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 1 % Triton-X-100
 1 mg/ml Nuclease-freies BSA

2.4. Proteinchemische und immunologische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Für die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese wurden 12 %ige Trenngelle in einer Größe von 7,5 cm x 10 cm x 0,8 mm mit 5 %igem Sammelgel (Tabelle1) verwendet. Zu den aufzutrennenden Proteinlösungen wurden je nach Bedarf unterschiedliche Mengen 5 x SDS-Probenpuffer gegeben und die Mischung 5 bis 10 Minuten auf 96°C erwärmt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Laufpuffer bei einer Spannung zwischen 100 und 160 V. Als Standard diente ein Gemisch von

Proteinen definierter Molekülmassen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder elektrophoretisch auf Nitrocellulose übertragen.

Tab.1 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

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

Mengenangaben für 12 Minigele; 2) Acrylamid : Bisacrylamid

5 x SDS-Probenpuffer:

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

10 x SDS-Laufpuffer:

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

Molekülmassenstandards:

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

2.4.2 Westernblot-Analyse

Proteine wurden mit Hilfe des Semi-Dry-Transfer-Verfahrens auf Membranen übertragen. Dazu wurden 3MM Whatmanpapiere mit Transfer-Puffer getränkt. Die Nitrozellulosemembran wurde zuerst mit Wasser befeuchtet und dann mit Transfer-Puffer getränkt. Drei Lagen 3MM Whatmannpapier wurden auf die Anode gelagert. Darüber wurde zuerst die Membran, dann das SDS- Polyacrylamidgel und zu oberst drei Lagen 3 MM Whatmann Papier gelagert. Der Transfer erfolgte über 45 min bei 10 V.

Western-Transfer-Puffer:

25 mM Tris/HCl (pH 8,5)
190 mM Glycin
20 % Methanol oder Ethanol
0,01 % SDS

2.4.3 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Membranen

Westernblot-Membranen wurden nach dem Protein-Transfer für mindestens 1,5 Stunden oder über Nacht bei 4°C mit 3 % BSA in Blot-Saline abgesättigt. Die Antikörper wurden in Blot-Saline mit 3 % BSA verdünnt oder als Hybridoma Überstände unverdünnt eingesetzt. Die Bindung des Antikörpers verlief für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur, oder bei 4°C über Nacht. Die Membran wurde anschließend sechsmal für 5 Minuten mit TBS + 0,3 % NP40 gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper verwendet. Dieser wurde 1:10.000 in TBS verdünnt und für 45 bis 60 Minuten mit der Membran inkubiert. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen, wurde sechsmal mal für 5 Minuten mit TBS gewaschen. 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 1,5 bis 2 Minuten in der Luminollösung inkubiert und ein Röntgenfilm für 20 Sekunden bis 30 Minuten exponiert.

Luminol: 1 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,0

100 µl (250 mM in DMSO) 3-Aminonaphthylhydrazid
40 µl (80 mM in DMSO) p-Cumarsäure
9 ml Wasser
3,1 µl 30 %ige H₂O₂-Lösung

2.4.4 Proteinfärbung**2.4.4.1 Coomassie-Blau-Färbung**

Minigele (7,5cm x 10cm x 0,8 mm) wurden mindestens 30 Minuten in Färbelösung geschüttelt, anschließend kurz mit Wasser abgespült. Nicht gebundener Farbstoff wurde anschließend durch Schütteln in einer Entfärbelösung aus dem Gel herausgewaschen.

Färbelösung:

0,1 % Coomassie-Brilliant-Blau R 250
50 % Methanol
10 % Essigsäure

Entfärber:

10 % Ethanol
7 % Essigsäure

2.4.4.2 Ponceau-Färbung von Proteinen auf Membranen

Die Nitrocellulose-Membranen wurden nach beendetem Protein-Transfer einige Minuten in der Färbelösung inkubiert und anschließend unter fließendem Wasser gespült bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Entfärbung erfolgte durch Waschen mit Wasser.

Färbelösung:

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

2.4.5 Expression von rekombinantem CAP1 in *E. coli*

Mit pT7-7-CAP1 transformierte *E. coli* BL21-DE3 Zellen wurden in 3L LB-Medium, das 50 µg/ml Ampizillin enthielt, angeimpft und bei 37°C bis zu einer Dichte von $OD_{600}=0,6$ kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt (T_0) wurde 1 ml Kultur entnommen. Mit 0,5 mM IPTG wurde die Expression von CAP1 induziert und über Nacht bei Raumtemperatur weitergeführt. Vor Beendigung der Expression (T_1) wurde wieder 1 ml Probe entnommen. Die Proben von T_0 und T_1 wurden im SDS-Polyacrylamidgel verglichen. Die *E. coli* Übernachtskultur wurde bei ca. 8600 x g für 20 Minuten sedimentiert, eingefroren und anschließend in 50 ml TE-Lysepuffer resuspendiert. Mit einem Potter wurde die Suspension homogenisiert und nach 20-minütiger Inkubation auf Eis mit Ultraschall sonifiziert. Anschließend wurde bei 16.000 x g sedimentiert. Das Pellet wurde in 50 ml 4 M Harnstoffpuffer resuspendiert, erneut mit dem Potter homogenisiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Homogenisat wurde danach bei 16.000 x g pelletiert. Diese Schritte wurden mit 5 M, 6 M, 7 M und 8 M Harnstoffpuffer wiederholt. Alle Überstände wurden gesammelt und die Pelletbestandteile der Extraktion mit 8 M Harnstoff in TE-Lysepuffer ohne Lysozym resuspendiert.

TE-Lysepuffer:

1 mM DTT
1 mM PMSF
1 mM Benzamidin
10 µg/ml Lysozym
in 1 M TE Puffer, pH 8

Harnstoffpuffer (pH 6,5):

20 mM MOPS
5 mM DTT
4-8 M Harnstoff

2.4.6 Gelextraktion von CAP1

Das maximal mögliche Volumen der TE-Pellet-Suspension (s. 2.3.6) wurde auf ein großes Laemmli-Gel (14 x 16 x 0,02 cm) geladen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit 0,3 M CuCl₂ Lösung gefärbt und die CAP1 Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Der zerkleinerte Gelstreifen wurde in den Elektro-Eluter 422 gefüllt und CAP1 bei 8-10 mA in 3 bis 5 Stunden aus den Gelstücken extrahiert. Die Elektroelution wurde in SDS-PAGE Laufpuffer vorgenommen.

2.4.7 Herstellung polyklonaler Antikörper

Die Firma Pineda immunisierte 2 Kaninchen mit je 300 µg gelextrahiertem CAP1. Alle 30 Tage wurden Serumproben der Tiere getestet. Nach 175 Tagen war der Titer ausreichend hoch und das gesamte Serum der Tiere wurde entnommen.

2.4.8 Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper aus Serum

12 %ige SDS-Polyacrylamidminigele (7,5 cm x 10 cm x 0,8 mm) wurden mit dem maximal möglichen Volumen an CAP1 Proteinlösung der TE-Pellet-Suspension (s. 2.3.6) beladen. Nach Gelelektrophorese wurde das Protein mit dem Semi-Dry-Transfer-Verfahren (s. 2.3.2) auf Nitrozellulose-Membranen übertragen und mit Ponceaulösung (s. 2.3.5.2) angefärbt. Die CAP1 Bande wurde mit einer Schere ausgeschnitten. 6 auf diese Weise gewonnene Streifen wurden in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit Puffer 1 für zwei Stunden bei 4°C in einem Rollrad inkubiert. Das anti-CAP1-Serum wurde in TBS 1:4 verdünnt. In 8 ml dieser Lösung wurden die Streifen für zwei Stunden bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert. Anschließend wurden die Streifen viermal für 5 Minuten mit TBS gewaschen. Mit 1 ml Puffer 2 wurden die gebundenen Antikörper 1,5 Minuten lang bei 4°C unter Schütteln von den Streifen

gelöst. Die Lösung wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl 1 M Tris-HCl, pH 7, neutralisiert. Die Elution wurde einmal wiederholt. Die beiden eluierten Antikörper-Fractionen wurden zur Stabilisierung der Antikörper mit 0,5 M BSA vermischt und bei -20°C gelagert. Die Streifen wurden für eine weitere Affinitätsreinigung verwendet und anschließend verworfen.

Puffer 1: 1 % BSA in TBS

Puffer 2: 0,1 M Glycin
0,5 M NaCl
0,05% Tween
pH 2,6

2.4.9 Fixieren und Permeabilisieren von Säugerzellen und indirekte

Immunfluoreszenz

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend 15 bis 20 Minuten mit 3 % Paraformaldehyd fixiert. Nach Absaugen des Paraformaldehyds wurden die Zellen für 5 Minuten mit 0,5 % Triton permeabilisiert und anschließend dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindung des Antikörpers wurden die Zellen 1,5 bis 3 Stunden mit 10 % FBS in PBG inkubiert. Der erste Antikörper wurde in PBG mit 1 % FBS verdünnt und auf die Zellen pipettiert. Bei Mehrfachfärbungen wurde hier ein weiterer primärer Antikörper eingesetzt. Unspezifische Bindungen des Antikörpers wurden nach ca. einer Stunde durch Waschen mit PBS (fünfmal je 5 Minuten) entfernt. Der sekundäre fluoreszenzmarkierte Antikörper wurde ebenfalls in PBG mit 1 % FBS verdünnt. Bei Mehrfachfärbungen wurde diesem Schritt ein weiterer sekundärer Antikörper, DAPI (1:20.000) und/oder ein Phalloidinkonjugat mit FITC oder TRITC (1:2000) hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation wurden auch hier unspezifische Bindungen durch Waschen mit PBS (fünfmal je 5 Minuten) entfernt. Anschließend wurden die Zellen in Gelvatol eingebettet.

3 % Paraformaldehyd :
3 % Paraformaldehyd in Wasser,
zum Lösen wurde tropfenweise
NaOH zugegeben

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

TRITC / FITC-Konjugat von Phalloidin 0,1 mg/ ml in Methanol

DAPI 10 mg/ ml in PBS

2.4.10 Indirekte Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten

2.4.10.1 Paraffinschnitte

Nach der Fixierung in Paraformaldehyd wurden die Organe im Einbettautomat Citadel 1000 (Shandon) behandelt. Zur Entwässerung durchliefen die Proben zuerst Alkoholbäder (3 Stunden 70 % EtOH; 1 Stunde 80 % EtOH; 1 Stunde 90 % EtOH; 1 Stunde 96 % EtOH; 2 Stunden abs. Alkohol; 2 Stunden abs. Alkohol) gefolgt von drei Xylobädern für jeweils 1,5 Stunden. Zum Abschluß wurden die Gewebestücke noch zweimal im Paraplast Plus-Bad bei 60°C für 2 bzw. 3 Stunden gelagert um für eine gute Infiltration des Paraffins in das Gewebe zu sorgen. Für die Mäuseembryonen wurden die Inkubationszeiten der Größe des Präparates entsprechend angepaßt. Es folgte die Einbettung der Organe mit Paraffin in Formschälchen mit Hilfe des Paraffin Einbettsystems TB S88. Die Blöcke wurden bei 4° C gelagert und bei Bedarf mit einem Rotationsmikrotom (Leica) auf eine Dicke von ca. 6 µm geschnitten und bei 37°C vor der weiteren Verarbeitung getrocknet. Nicht benötigte Schnitte wurden danach bei 4°C gelagert werden

2.4.10.2 Vorbereiten von Paraffinschnitten für die indirekte Immunfluoreszenz

Die Paraffinschnitte wurden mit Xylol entparaffiniert. Dazu wurden die Gewebeschnitte dreimal für 5 Minuten in Xylol inkubiert. Anschließend wurde mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Präparate wurden jeweils 2 Minuten in 90 %, 80 %, 70 %, 50 %, 30 % Ethanol inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Zwei fünfminütige Waschschrte mit PBS schlossen sich daran an.

2.4.10.3 Antikörperdetektion in Geweben und H-E Färbung

Die Antikörperdetektion wurde wie bei fixierten Zellen durchgeführt.(s. 2.4.9).

Für die H-E Färbung erfolgte nach der Entparaffinierung der Schnitte zuerst die Inkubation in Hämalau (nach Mayers) für 4 bis 10 Minuten. Danach schloss sich das

Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min an. Nach kurzem Eintauchen in Aqua dest. wurden die Schnitte dann in Erythrosin (0,5%ig) für 2-5 min gefärbt. Zum Abschluß folgten Bäder in aufsteigender Alkoholreihe (70, 96 % EtOH, Isopropanol) und in Xylol für ca. 2 min bevor die Schnitte in Permount (Eukitt) eingebettet wurden.

Hämalaun nach Mayers

1g Hämatoxylin
0,2 g Natriumjodat
50 g Kaliumalaun
50 g Chloralhydrat
1g krist. Zitronensäure
ad 1 l Aqua dest.

Erythrosin

1% ige Stocklösung ansetzen
aus Erythrosin
auf 0,5% ige Lösung mit Aqua dest.
verdünnen

2.4.11 Fluoreszenzmikroskopie

Für die konfokale Lasermikroskopie immungefärbter Zellen wurde das CLSM-SP-Mikroskop der Fa. Leica benutzt, das optische Schnitte durch die Präparate erlaubt. Das Gerät ist mit einem Kryptonlaser, einem Argonlaser und einem 2-Photonenlaser ausgestattet und ermöglicht elektronische Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen. Der Emissionsbereich des zu empfangenden Signals kann durch die Software eingegrenzt werden, sodass Kreuzanregungen durch die beiden Laser verhindert werden. Die Daten wurden mit dem Bildverarbeitungssystem der Fa. Leica bzw Adobe Photoshop weiterverarbeitet. Für die fluorimetrische Untersuchung von Immundetektionen in Gewebeschnitten wurde das Fluoreszenzmikroskop DMR der Firma Leica verwendet. Für die Bildverarbeitung wurde Adobe Photoshop eingesetzt.

2.4.12 Immunpräzipitationen aus eGFP-CAP1 exprimierenden HEK Zelllysaten mit anti-GFP Antikörper

eGFP-CAP1 exprimierende HEK 293 Zellen von drei konfluent bewachsenen Kulturschalen wurden mit PBS gewaschen und unter PBS mit 1 mM DTT abgeschabt. Nach Zentrifugation bei 200 x g wurden die Zellen in 1 ml Zellysepuffer resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 10.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit 1 ml anti-GFP Antikörperlösung (Hybridoma Überstand von K3-182-2) versetzt. Die Lösung wurde bei 4°C auf einem Rollrad für 4 Stunden durchmischt, anschließend mit 100 µl Protein A-Sepharose-Suspension versetzt und wieder bei 4°C für 2 Stunden auf

einem Rollrad durchmischt. Danach wurde die Protein A-Sepharose bei 300 x g pelletiert, viermal mit Waschpuffer und einmal mit PBS gewaschen. Das Protein A-Sepharose Pellet wurde in 100 µl 1 x SDS Probenpuffer aufgenommen und 10 Minuten auf 100°C erhitzt. Um die Protein A-Sepharose zu präzipitieren wurde 1 Minuten bei niedriger Drehzahl (300 x g) zentrifugiert. 20 µl des Überstands wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Zellysepuffer:	0,1% Triton X-100	Waschpuffer:	0,1% Triton X-100
	150 mM Tris-HCl, pH 7,4		150 mM Tris-HCl pH 7,4
	150 mM NaCl		150 mM NaCl
	10 mM Na ₄ P ₂ O ₇		0,02 % NaN ₃
	2 mM Na ₃ VO ₄		
	100 mM NaF		
	+ Proteaseinhibitor Tablette (Boehringer)		
	+ 1 mM PMSF		

2.4.13 Subzelluläre Fraktionierung

200 ml dicht gewachsener Jurkat Zellen und 2 Schalen (140 mm) konfluent gewachsener A431 Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit PBS + 1 mM DTT von den Platten gelöst bzw. resuspendiert. Die Suspensionen wurden bei 200 x g zentrifugiert und in 1 ml Zellysepuffer aufgenommen. Mit einem Potter wurden die Zellen homogenisiert. Zentrifugation bei 500 x g trennte die Zellkerne und verbliebene intakte Zellen vom Homogenat. Mit einer 1 ml Spritze mit einer 21er Kanüle wurden Schichten aus Saccharosepuffer übereinander geladen. Begonnen wurde mit 1 ml 80 %igem Saccharosepuffer, gefolgt von 1 ml 60 %igem Saccharosepuffer. In den folgenden Schichten verringerte sich der Saccharosegehalt immer um 5 %. Die letzte Schicht wurde von 1 ml 15 %igem Saccharosepuffer gebildet. Auf diese wurde 1 ml des Zellhomogenats geladen. Der Gradient wurde in einem Ausschwenk-Rotor (SW41) für 18 Stunden bei 4°C und 100.000 x g zentrifugiert. Mit einer 1 ml Eppendorfpipette wurden aus dem Gradienten 500 µl Proben von oben beginnend genommen. Jede Probe wurde mit 100 µl 5 x SDS Probenpuffer vermischt und bei 100°C für 5 Minuten inkubiert. 20 µl jeder Probe wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Zellysepuffer: 10 mM Hepes, pH7,4
+ Proteaseinhibitor Tablette (Boehringer)

Saccharosepuffer: 10 mM Hepes, pH7,4
+ Proteaseinhibitor Tablette (Boehringer)
+ 15-80 % Saccharose

2.4.14 Auftriebs-Saccharose-Dichtegradient

Zwei Kulturschalen (140 mm) konfluent gewachsener A431 Zellen wurden mit PBS gewaschen und unter PBS+ 1 mM DTT von der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden bei 200 x g pelletiert und in 1 ml 65 %igem Saccharosepuffer aufgenommen. Die Suspension wurde mit einem Potter homogenisiert und intakte Zellen sowie Kerne wurden durch Zentrifugation bei 500 x g sedimentiert. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen geladen. Darüber wurden mit einer 1 ml Spritze mit 21er Kanüle Schichten aus Saccharosepuffer geladen. Die erste Schicht bestand aus 1 ml 50 %igem Saccharosepuffer, die folgenden Schichten aus jeweils 10 % geringer konzentriertem Saccharosepuffer bis hin zu 10 %igem Saccharosepuffer. Darüber wurde eine Schicht aus 1 ml 5 %igem Saccharosepuffer gelagert. Um einen Kollaps des Zentrifugenröhrchens zu vermeiden, wurde dieses mit Basispuffer aufgefüllt. In einem Ausschwenk-Rotor wurde der Gradient für 18 Stunden bei 4°C und 100.000 x g zentrifugiert. Mit einer 1 ml Eppendorfpipette wurden aus dem Gradienten von oben beginnend Proben genommen. Zunächst viermal mit einem Volumen von 1 ml, um den Basispuffer zu entfernen, dann mit einem Volumen von 500 µl. Jede 500 µl Probe wurde mit 100 µl 5 x SDS Probenpuffer vermischt und bei 100°C für 10 Minuten inkubiert. 20 µl jeder Probe wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Basispuffer: 10 mM Hepes, pH 7,4
1 mM DTT
1 mM Benzamidin

Saccharosepuffer: 10 mM Hepes, pH7,4
1 mM DTT
1 mM Benzamidin
5 - 65 % Saccharose

2.4.15 Nachweis von Proteinen aus Geweben und Zellen

Mit einem chirurgischen Besteck wurden getöteten Mäusen Organe entnommen und kurz in PBS gewaschen. Das Herz wurde zusätzlich mit einem saugfähigen Papier ausgepresst. Anschließend wurden die Organe in 2 ml Reaktionsgefäße überführt

und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die gefrorenen Organe wurden aus den Reaktionsgefäßen in einen vorgekühlten Mörser überführt, mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit einem Pistil zu feinem Pulver zerkleinert. Das Pulver wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 1,5 ml 1 x SDS Probenpuffer vermischt.

Zellen wurden trypsinisiert mit PBS gewaschen und mit 1 x SDS Probenpuffer vermischt. Mit einer Spritze und einer Kanüle wurden alle Proben so lange gemischt, bis die Proben ihre Viskosität verloren hatten. Anschließend wurde bei 100°C für 10 Minuten inkubiert. Bevor die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen wurden, wurde für eine Minute bei $16.000 \times g$ zentrifugiert.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Zelllinien und Medien

HEK 293, A431 Zellen DMEM (high glucose)
10 % FBS
100 U/ ml Penizillin/Streptomycin

C3H10T1/2 Zellen: DMEM (low glucose)
10 % FBS
100 U/ ml Penizillin/Streptomycin
2 mM Glutamin

Neuro-2a Zellen:

Wachstumsmedium: DMEM (low glucose)
10 % FBS
100 U/ ml Penizillin/Streptomycin
2 mM Glutamin
1 x nicht essentielle Aminosäuren

Differenzierungsmedium: DMEM (low glucose)
0,2 % FBS
100 U/ ml Penizillin/Streptomycin
2 mM Glutamin
1 x nicht essentielle Aminosäuren

Pam212 Zellen: DMEM (high glucose)
10 % FBS
100 U/ ml Penizillin/Streptomycin
2 mM Glutamin

Jurkat Zellen: RPMI-Medium ohne Hepes
10 % FBS
100 U/ ml Penizillin/Streptomycin
2 mM Glutamin

2.5.2 Kultur von Säugerzellen

Säugerzellen wurden in Zellkulturschalen (60 bis 140 mm) bei Wasser gesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 37°C mit modifiziertem DMEM-Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 0,05 % Trypsin/EDTA abgelöst (ca. 3 bis 10 Minuten bei 37°C). Die abgelösten Zellen wurden mit modifiziertem DMEM verdünnt und ausplattiert

2.5.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

10⁷ Zellen wurden in Einfriermedium aufgenommen. Das Einfrieren von Zellen in Kryo-Röhrchen erfolgte bei -70°C. Aufgetaut wurden die Zellen zügig bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen sofort in DMEM Medium resuspendiert.

Einfriermedium

DMEM
20 % FCS
10 % DMSO

2.5.4 Transfektion von A431 und Neuro-2a Zellen mit Lipofectamine Plus®

Reagenz

Die Zellen wurden mit Trypsin von der Platte abgelöst, mit modifiziertem DMEM Medium verdünnt und so in eine 24 Lochplatte ausgesät, dass die Zellen am folgenden Tag

70 % konfluent waren. 0,4 µg Plasmid DNA (s. 2.2.2) wurden mit 24 µl DMEM Medium und 4 µl Lipofectamine Plus Reagenz verdünnt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 1 µl Lipofectamine in 25 µl DMEM Medium verdünnt. Beide Lösungen wurden vereint und für 15 Minuten bei Raumtemperatur äquilibriert. Die Zellen wurden mit 200 µl frischem DMEM Medium und der Lipofectamine-DNA

Lösung für 3 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert. Im Anschluß daran wurde das Medium gegen frisches modifiziertes DMEM-Medium ausgetauscht.

2.5.5 Selektion transfizierter A431 und Neuro-2a Zellen

Die transfizierten Zellen wurden am Tag nach der Transfektion mit 1 mg/ml G418 und entsprechend modifiziertem DMEM Medium selektioniert. Das Medium wurde zu Beginn alle drei Tage ausgetauscht und täglich, nachdem das Absterben von Zellen eingesetzt hatte. Die Selektion wurde über vier Wochen aufrecht erhalten.

2.5.6 Differenzierung von Neuro-2a Zellen

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin von der Kulturschale gelöst und so in Wachstumsmedium verdünnt, dass die Zellen am folgenden Tag 20 bis 50 % konfluent waren. Nach Entfernen des Wachstumsmediums und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen ein bis drei Tage in Differenzierungsmedium kultiviert.

2.5.7 Wundheilungsexperimente

Pam212 Keratinozyten und CH310T1/2 Fibroblasten wurden bis zum Erreichen der Konfluenz auf Deckgläschen in 24-Lochplatten kultiviert. Mit einer Kanüle wurden mehrere Schnitte in die Zellschicht gemacht. Anschließend wurde sofort mit PBS gewaschen und die Zellen mit frischem vorgewärmten Medium versorgt. Nach einer Inkubation von gewünschter Dauer wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Deckgläschen in eine 24-Lochplatte mit 3 %igem Paraformaldehyd überführt. Die Fixierung und Permeabilisierung wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

2.5.8 Kultur embryonaler Stammzellen

Für die Präparation genomischer DNA wurden IB-10 Zellen, Subklon von SV129 Zellen, auf gelatinisierten Kulturschalen mit LIF-freiem Medium in wassergesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 37°C mit modifiziertem DMEM-Medium kultiviert. Zellen die für die Transfektion vorgesehen waren, wurden auf neomycinresistenten, mitoseinaktivierten embryonalen Fibroblasten (4 x 10⁶/ 100mm Kulturschale) und mit

modifiziertem DMEM-Medium kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert, bevor es zu Differenzierungsvorgängen in den Kolonien kommen konnte. Dazu wurden die ES-Zellen 3 x mit PBS gewaschen und dann mit 5 ml/ 100 mm Schale 0,05 %igem Trypsin abgelöst (ca. 5 Minuten bei 37°C), durch Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteurpipette vereinzelt, gesplittet und schließlich in frischem Medium ausplattiert (ca. 10^6 Zellen/ 90 mm Kulturschale). Auf diese Weise wurden drei Passagen durchgeführt. Ein Teil der Zellen wurde für die Transfektion auf eine 100 mm Kulturschale ausplattiert, der Großteil der Zellen für spätere Transfektionen mit DMSO eingefroren.

2.5.9 Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen

Die Transfektion der embryonalen Stammzellen wurden zwei Tage nach der letzten Passage durchgeführt. Am Tag der Transfektion wurden die ES Zellen mit PBS gewaschen und das Medium erneuert. Nach einigen Stunden wurde erneut mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin von der Kulturschale gelöst. Die Suspension wurde mit modifiziertem Medium versetzt und die Zellen bei 200 x g pelletiert. Das Pellet wurde mit modifiziertem Medium gewaschen und die Zellen in 500 µl modifiziertem Medium resuspendiert. Die Suspension wurde mit 40 bis 50 µg linearisiertem ko-Konstrukt (1 µg/ µl) vermischt und in die Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 0,4 cm, Bio-Rad) überführt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis, wurde mit 230 V und 500 µF elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen wieder fünf Minuten auf Eis inkubiert und dann auf drei 90 mm Schalen mit MEF Zellen verteilt. 24 Stunden nach der Elektroporation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das modifizierte Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht. Die Selektion der Zellen wurde drei Tage lang durchgeführt. Jeden Tag wurden die Zellen gewaschen und das Selektionsmedium erneuert. An den drei folgenden Tagen wurden Klone gepickt und in 24 Lochplatten mit modifiziertem Medium auf MEF Zellen kultiviert. Das Medium wurde täglich erneuert und die Konfluenz der Klone kontrolliert. Nach drei bis vier Tagen wurden die Zellen trypsiniert, der größte Teil mit DMSO eingefroren und der Rest in gelatinierte 24 Lochplatten ausgesät. Diese Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurden sie für die Isolation genomischer DNA verwendet.

Kulturmedium für ES-Zellen :DMEM knockout
10 % Serum Replacement Medium
1 mM β -Mercaptoethanol
1 % 100 x MEM (non essential aminoacids; Biochrom)
1 mM Na-Pyruvat
2 mM Glutamin
2000 U/ ml LIF
100 U/ ml Penicillin/Streptomycin

3. Ergebnis

3.1. Generierung einer CAP1 defizienten Mauslinie

Ziel dieser Arbeit war es, einen Knockout-Vektor herzustellen, mit dem das CAP1 Gen vollständig inaktiviert werden kann. Dies sollte durch die Rekombination des Vektors, bei dem eines der ersten Exons durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt worden ist, mit einem im 5'-Bereich des CAP1 Gens gelegenen chromosomalen Abschnitt erreicht werden. Gelingt diese in vivo Mutation in ES-Zellen, so kann sie in die Keimbahn eingeführt werden und sich dauerhaft manifestieren. Generell bestehen diese Vektoren aus einem 5'- und einem 3'-Arm, die zur chromosomalen Zielsequenz homolog sind. Dabei sollte einer der beiden Arme ca. 5 kb und der andere ca. 2 kb lang sein. Die Selektion der ES-Zell-Klone wird durch eine Neomycin-Resistenz ermöglicht. Das verantwortliche Gen wird durch eine Neomycin-Resistenzgenkassette eingeführt.

Für die Generierung des CAP1 knockout-Konstruktes mussten genomische DNA-Fragmente isoliert werden, die die 5'- und 3'-Bereiche der genomischen Sequenz des CAP1 Gens tragen. Dies sollte mit Hilfe einer BAC-DNA-Bank geschehen, die das gesamte Genom des Stamms SV129 repräsentiert. Als Probe stand eine CAP1 cDNA zur Verfügung. Die ersten 600 Basen (*Bam*HI-*Pst*I Fragment) dieser cDNA, die für die Aminosäuren 1-192 des Proteins kodieren, wurden als Hybridisierungssonde verwendet.

3.1.1 Hybridisierung von α -³²P markierter CAP1 cDNA an genomische DNA-Fragmente der Maus

Das Genom einer SV129 Maus liegt kloniert in Form von BAC-Klonen (Bacterial Artificial Chromosome) vor. Diese genomische Bank wurde am Roswell Park Cancer Insitut hergestellt (Osoegawa *et al.*, 2000) Die Länge der genomischen Fragmente liegt zwischen 100 und 500 kb je BAC-Klon. Die DNA der Klone ist im Duplikat auf Nylonmembranen aufgebracht worden, die zur Verfügung gestellt worden waren. Ein positives Signal nach Hybridisierung mit einer markierten Sonde erscheint daher als 2 dicht benachbarte Punkte. Anhand des Punktmusters und seiner Position im

Koordinatensystem der Membran konnte die Seriennummer des entsprechenden BAC-Klons ermittelt werden.

Die Hybridisierung mit der α - ^{32}P markierten *Bam*HI-*Pst*II Sonde lieferte Signale an mehreren Stellen des Filters (Abb. 1). Nach Ermittlung der Seriennummern wurden 2 Klone für die nähere Charakterisierung verwendet.

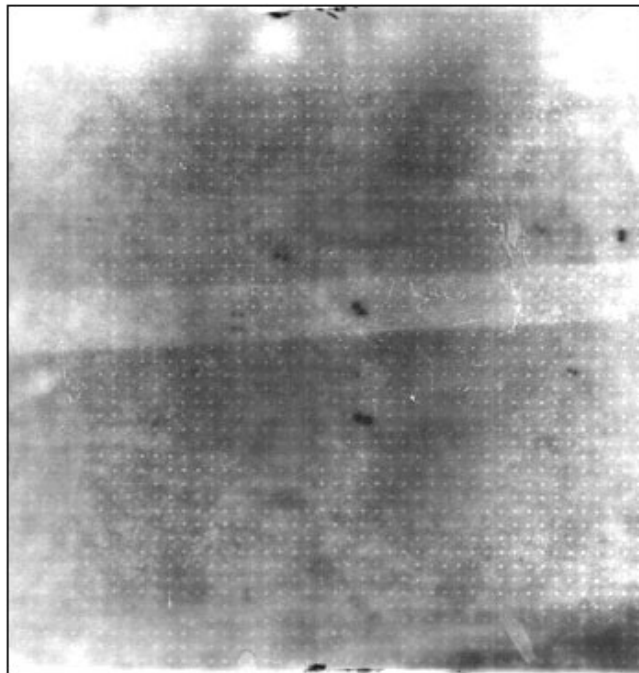


Abb.1 Hybridisierung des α - ^{32}P markierten *Bam*HI-*Pst*II Fragments (Nukleotide 1-600 der cDNA) der CAP1 cDNA an die genomische DNA-Bibliothek der Maus.

3.1.2. Charakterisierung der BAC-Klone

Um ein Fragment zu isolieren, das 5' Sequenzen des CAP1 Gens enthielt, wurden die ausgewählten BAC-Klone mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut. BAC-Klon 4 wurde mit *Spe*I, *Apa*I, *Eco*RV, *Hind*III, *Xho*I, *Xba*I und *Kpn*I verdaut, BAC-Klon 5 mit *Apa*I, *Hind*III, *Bgl*II, *Kpn*I, *Spe*I, *Xba*I, *Bam*HI und *Xho*I.

Jeder Verdau erzeugte ein spezifisches Bandenmuster im Agarosegel (1 % Agarose).

Um zu ermitteln, welches der Restriktionsfragmente das 5'-CAP1 Teilstück enthielt, wurde für die Hybridisierung die α - ^{32}P markierte 5'-CAP1 Sonde verwendet. Diese Sonde wurde im Gegensatz zu der unter 3.1.1 verwendeten Sonde mit Hilfe einer PCR aus den ersten 640 Basen der cDNA amplifiziert und entsprach den Aminosäuren 1-190.

Die Sonde erkannte in der Regel ein Fragment. Die Grössen der Fragmente lagen zwischen 10 kb (*KpnI*) und 23 kb (*XhoI*) bei BAC-Klon Nr. 4 und zwischen 1,5 kb (*BglII*) und 20 kb (*XhoI*) bei BAC-Klon Nr. 5 (Abb. 2 a und b). Die Sonde hybridisierte nicht mit Banden im *HindIII* und *XbaI* Verdau des Bac- Klon Nr. 4, obwohl die hier eingesetzte DNA-Menge gleich war mit der der anderen Restriktionsreaktionen. Möglicherweise waren die DNA-Fragmente zu gross. Fragmente des *Apal* (ca.12 kb BAC-Klon Nr. 4, ca.7 kb BAC-Klon Nr. 5) und *KpnI* Restriktionsverdau (10 kb BAC-Klon Nr. 4, ca. 20 kb BAC-Klon Nr. 5), die mit der Probe hybridisierten, wurden für die Isolierung des 5' gelegenen CAP1 Abschnitts kloniert. Zur Vereinfachung werden diese Fragmente als "CAP1-positiv" bezeichnet.

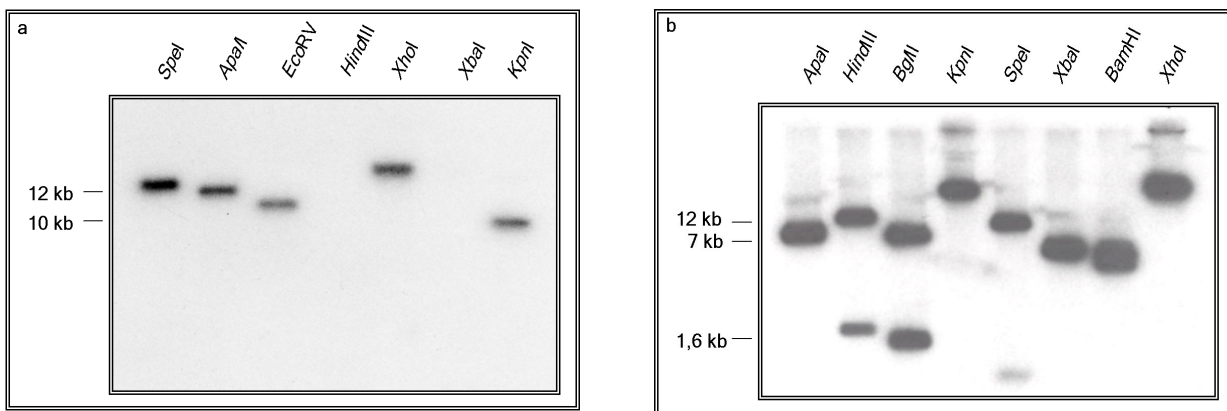


Abb. 2 Southern-Blot Analysen der Restriktionsreaktionen der genomischen DNA aus Bac-Klonen. a) DNA aus Bac-Klon Nr.4. b) DNA aus Bac-Klon Nr. 5. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Restriktionsenzyme sind angegeben. Die Hybridisierung wurde mit der α - ^{32}P markierten 5'-CAP1 Sonde (Nukleotide 1-640 der cDNA) durchgeführt. Die Sonde hybridisierte nicht mit dem *HindIII* und *XbaI* Verdau von Bac-Klon Nr.4

3.1.3 Isolierung der CAP1-positiven *Apal* und *KpnI* Fragmente der BAC-Klone Nr. 4 und 5

Von beiden Klonen wurde eine grössere Menge DNA für die Restriktionsreaktionen mit *Apal* und *KpnI* eingesetzt. Die geschnittene DNA wurde anschließend auf kontinuierliche Saccharosegradienten geschichtet und bei 100.000 x g aufgetrennt. Danach wurde jeder Gradient der Dichte nach in 10 Fraktionen geteilt.

Für den BAC-Klon Nr. 4 sind alle 10 Fraktionen des *Apal* und *KpnI* Gradienten dargestellt (Abb. 3 a und b). Die TAE-Agarosegele zeigen deutlich die Trennung der verschiedenen Fragmente nach ihrer Grösse. Die Hybridisierung mit der α - ^{32}P markierten 5'-CAP1 Sonde (Abb. 3 c und d) zeigt die Verteilung der CAP1-positiven

Fragmente in den Gradienten. Die größten Mengen finden sich in den Fraktionen 1 bis 3 des *KpnI* und in der Fraktion 1 des *Apal* Gradienten.

Die gesuchten CAP1-positiven Fragmente des Bac-Klon 5 hatten eine Länge von 7 kb und 20 kb. Anhand der Abb. 3 a und b wird deutlich, dass Fragmente dieser Größe in den hier verwendeten Gradienten in den Fraktionen Nr.1-3 zu finden waren. Daher wurden für die *Apal* und *KpnI* Gradienten des Bac-Klon Nr.5 nur diese Fraktionsnummern analysiert (Abb. 4 a). Die Hybridisierung mit der α - ^{32}P markierten 5'-CAP1 Sonde (Abb. 4 b) zeigte, dass sich die größten Mengen der CAP1-positiven Fragmente in Fraktion 2 des *Apal* und Fraktion 1 des *KpnI* Gradienten befanden.

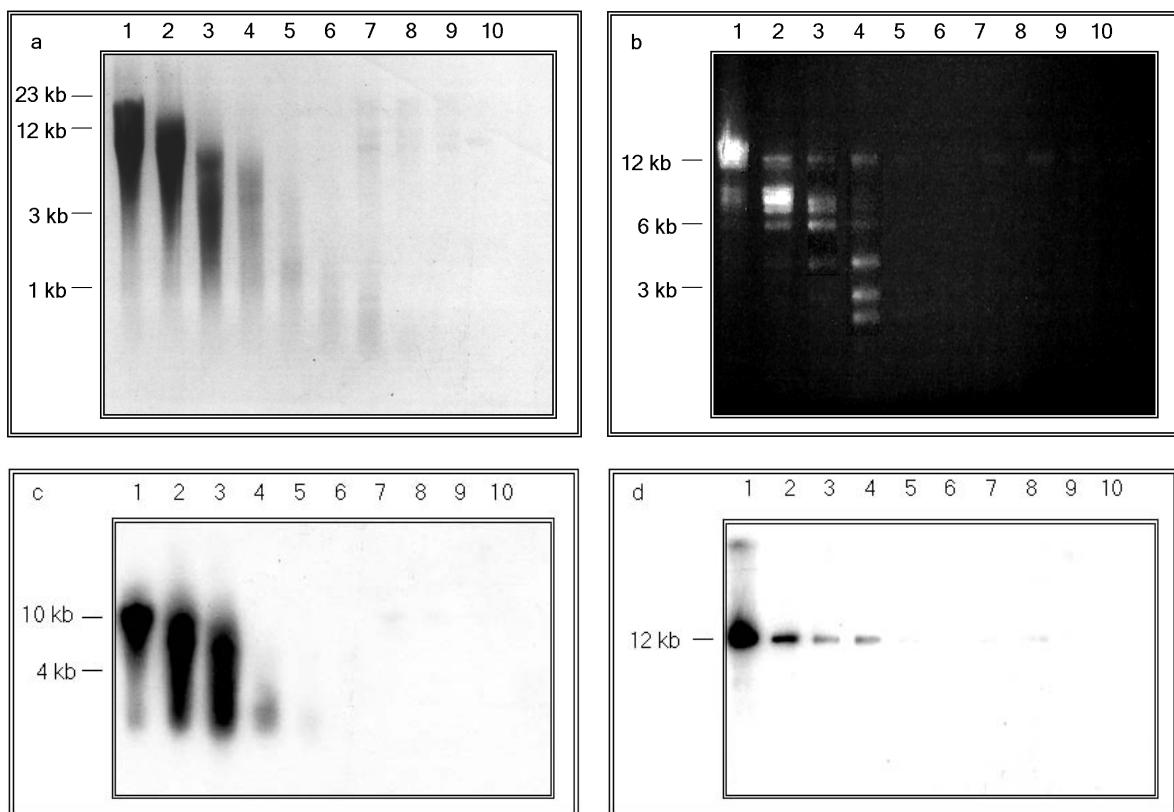


Abb. 3 Analyse der *KpnI* und *Apal* Saccharosegradienten von BAC-Klon Nr. 4. a,b): TAE-Agarosegele. (1 % Agarose) im UV Licht (320 nm) nach Anfärbung mit Ethidiumbromid. a) *KpnI* Saccharosegradient, b) *Apal* Saccharosegradient; Spur 1 entspricht der Fraktion höchster Dichte; Spur 10 entspricht der Fraktion geringster Dichte. c,d) Southernblot Analysen der TAE-Agarosegele mit der α - ^{32}P markierten 5'-CAP1 Sonde (Nukleotide 1-640 der cDNA), c) *KpnI* Saccharosegradient, d) *Apal* Saccharosegradient.

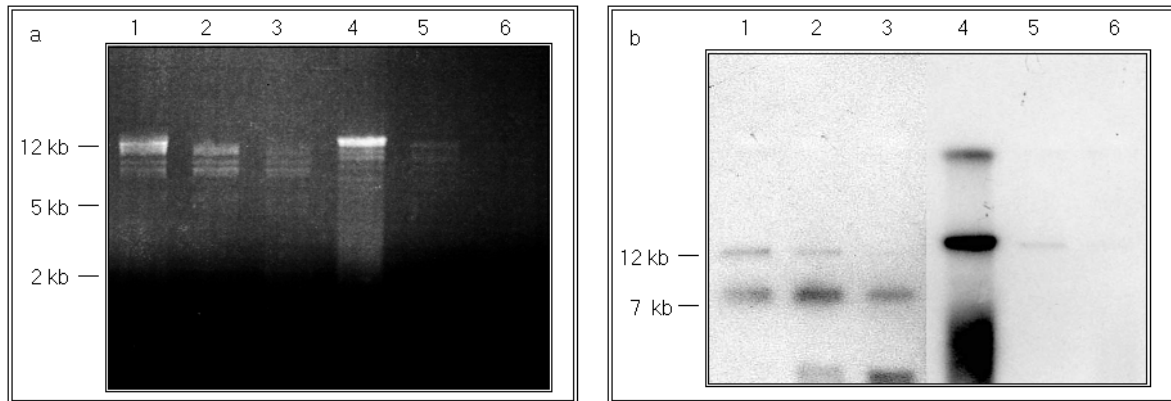


Abb. 4 Analyse des *Apal* (Spur 1-3) und *KpnI* (Spur 4-6) Saccharose Gradienten von Bac-Klon Nr.5. a) TAE-Agarosegel (1 % Agarose) im UV Licht nach Anfärbung mit Ethidiumbromid. Spur 1 und 4 entsprechen Fraktionen höchster Dichte, Dichte nach rechts abnehmend. b) Hybridisierung der $\alpha^{32}\text{-P}$ markierten 5'-CAP1 Sonde (Nukleotide 1-640 der cDNA) mit dem Southernblot des Agarosegels.

3.1.4 Klonierung

Für die Klonierung der entsprechenden Fragmente wurden die Fraktionen, die CAP1-positive Signale zeigten, in einen entsprechend verdauten pBS-Vektor ligiert. Positive Kolonien wurden durch einen Kolonie-Blot identifiziert. So konnten ein 13 kb grosses *Apal*-Fragment und ein 9 kb grosses *KpnI*-Fragment aus Bac-Klon Nr.4 isoliert werden. Aus Bac-Klon Nr.5 wurden ein 7 kb grosses *Apal*-Fragment bzw. 14 kb grosses *KpnI*-Fragment isoliert.

3.1.5 Kartierung und Sequenzierung

Nach der erfolgreichen Isolierung der CAP1-positiven Fragmente musste geklärt werden, welcher Abschnitt des CAP1 Gens im jeweiligen Restriktionsfragment enthalten war und wo er sich befand. Dazu sollte zunächst eine Karte der rekombinanten Plasmide mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen erarbeitet werden. Durch eine Hybridisierung der Fragmente mit der markierten 5'-CAP1 Sonde sollte dann die Lage des CAP1 Abschnitts auf dem Plasmid ermittelt werden. Mit nachfolgender DNA-Sequenzierung sollte schließlich bestimmt werden, welcher Teil des CAP1 Gens isoliert worden war.

Die Restriktionsreaktionen und die Hybridisierungen sind in den Abb. 5 bis 9 dargestellt.

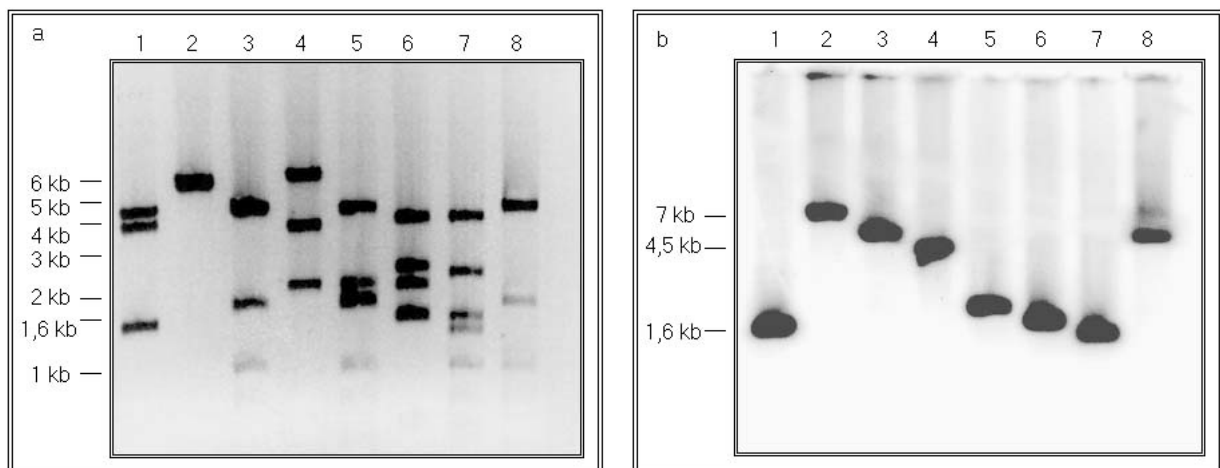


Abb. 5 Restriktionskartierung des *KpnI*-Fragments von Bac-Klon Nr.4. a) TAE-Agarosegel (1 % Agarose) im UV-Licht nach Anfärbung mit Ethidiumbromid. Spur 1-8 Restriktionsreaktionen mit *HindIII* (1), *BamHI* (2), *EcoRI* (3), *SacI* (4), *SacI-EcoRI* (5), *HindIII-BamHI* (6), *HindIII-EcoRI* (7), *EcoRI-BamHI* (8). b) Hybridisierung der α - ^{32}P markierten 5'-CAP1 Sonde (Nukleotide 1-640 der cDNA) mit dem Southernblot des Agarosegels.

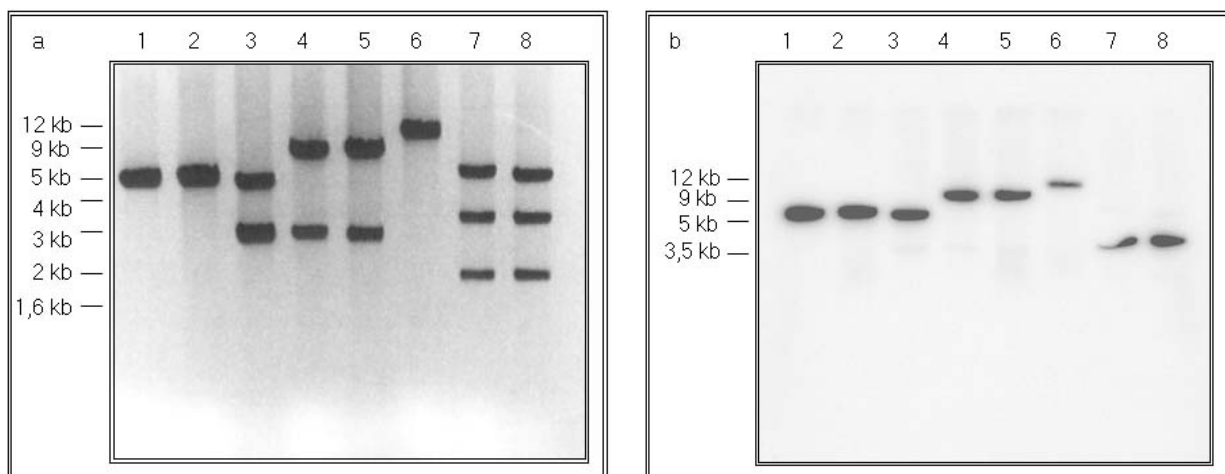


Abb. 6 Restriktionskartierung des *KpnI*-Fragments von Bac-Klon Nr.4. a) TAE-Agarosegel (1 % Agarose) im UV-Licht nach Anfärbung mit Ethidiumbromid. Spur 1-8 Restriktionsreaktionen mit *BamHI* (1), *BamHI-NotI* (2), *KpnI-BamHI* (3), *KpnI* (4), *KpnI-NotI* (5), *NotI* (6), *SacI* (7), *SacI-BamHI* (8). b) Hybridisierung der α - ^{32}P markierten 5'-CAP1 Sonde (Nukleotide 1-640 der cDNA) mit dem Southernblot des Agarosegels.

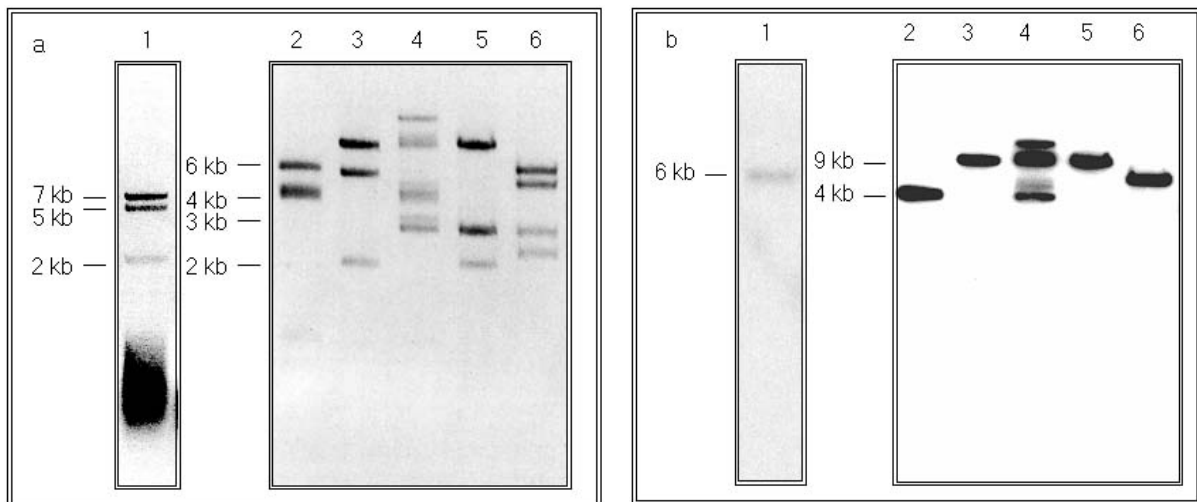


Abb. 7 Restriktionskartierung des *Apal*-Fragments des BAC-Klons Nr.4. a) TAE-Agarosegel (1 % Agarose) im UV-Licht nach Anfärbung mit Ethidiumbromid. Spur 1-6, Restriktionsreaktionen mit *Bam*HI (1), *Eco*RI (2), *Kpn*I (3), *Apal-Eco*RI (4), *Apal-Kpn*I (5), *Apal-Bam*HI (6). b) Hybridisierung der α - 32 P markierten 5'-CAP1 Sonde (Nukleotide 1-500 der cDNA) mit dem Southernblot des Agarosegels.

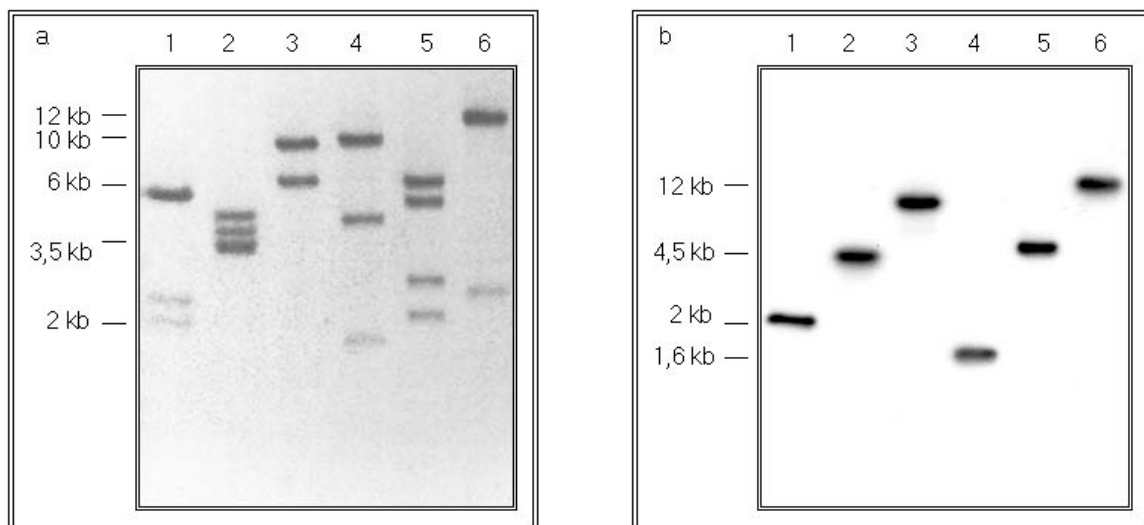


Abb. 8 Restriktionskartierung des *Apal*-Fragments von Bac-Klon Nr.4. a) TAE-Agarosegel (1 % Agarose) im UV-Licht nach Anfärbung mit Ethidiumbromid. Spur 1-6 Restriktionsreaktionen mit *Bgl*II (1), *Ac*CI (2), *Eco*RV (3), *Xba*I (4), *Spe*I (5), *Sma*I (6). b) Hybridisierung der α - 32 P markierten 5'-CAP1 Sonde (Nukleotide 1-640 der cDNA) mit dem Southernblot des Agarosegels.

Zur Klärung der Orientierung des CAP1 Genabschnitts wurde für das *Apal* Fragment von BAC-Klon 4 eine weitere Sonde verwendet (Abb. 9 c). Sie wurde durch eine Restriktionsreaktion mit *Pst*I und *Hind*III aus der CAP1 cDNA gewonnen. Dieser Abschnitt entspricht dem Mittelteil der cDNA (Nukleotide 640-1200 der cDNA) und liegt 3' von der bisher verwendeten 5'-CAP1 Sonde.

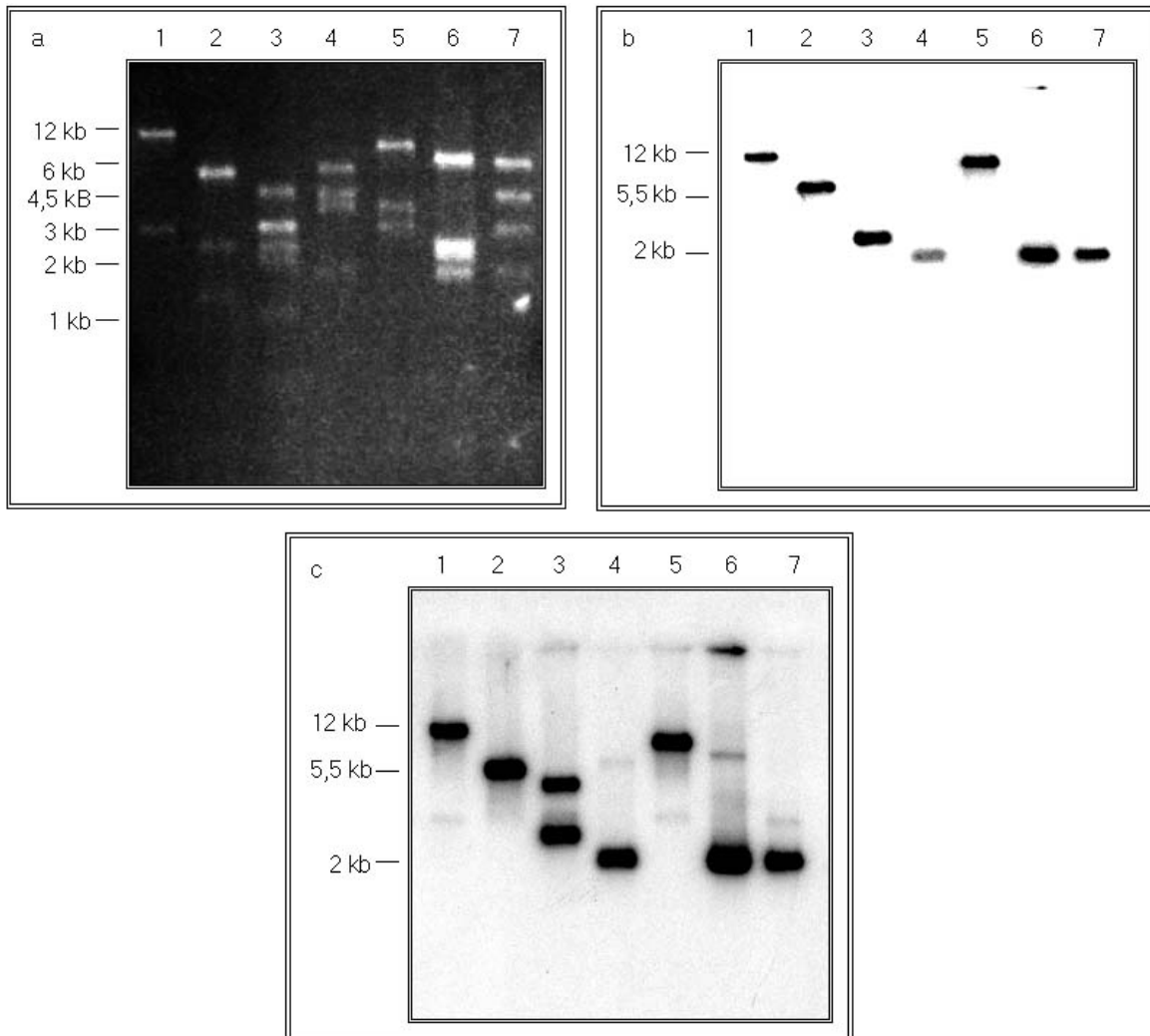


Abb. 9 Restriktionskartierung des *Apal*-Fragments von BAC-Klon 4. a) TAE-Agarosegel (1 % Agarose) im UV-Licht nach Anfärbung mit Ethidiumbromid. Spur 1-6 Restriktionsreaktionen mit *Apal* (1), *Bam*HI-*Eco*RV (2), *Bgl*II-*Eco*RV (3), *Xba*I-*Eco*RV (4), *Eco*RV-*Apal* (5), *Bam*HI-*Xba*I (6), *Xba*I-*Apal* (7). b) Hybridisierung der α -³²P markierten 5'-CAP1 Sonde (Nukleotide 1-640 der cDNA) mit dem Southernblot des Agarosegels. c) Hybridisierung des α -³²P markierten *Pst*I-*Hind*III Fragments (Nukleotide 640-1200 der cDNA) mit dem Southernblot des Agarosegels.

Die anhand der Restriktionsdaten erstellten Karten der *Kpn*I- und *Apal*-Fragmente sind in Abb. 10 und 11 dargestellt. Die Fragmentlängen, die von den hier eingetragenen Restriktionsenzymen erzeugt wurden, sind in Tab. 2 und 3 abgebildet. Die Signale der Southern-Hybridisierungen wurden den Abschnitten der Karten zugeordnet.

Die 5'-CAP1 Sonde hybridisierte mit dem randständigen *HindIII* Fragment des *KpnI* Subklons (s. Abb. 10, rote Markierung). Die gleiche Sonde hybridisierte mit dem zentralen *XbaI* Fragment des *Apal*-Subklons (s. Abb. 11, rote Markierung).

Nachdem auch das markierte *PstI-HindIII* Fragment der CAP1 cDNA mit diesem Abschnitt hybridisierte, wurde dieser Teil des *Apal*-Fragmentes sequenziert. Dieser nur 1,6 kb lange chromosomale Abschnitt entsprach fast der gesamten Sequenz der cDNA von CAP1. Allerdings konnten in allen Leserastern Stopkodons identifiziert werden. Dies und die Tatsache, dass der Abschnitt keine Introns enthielt, ließ den Schluß zu, daß es sich bei dem isolierten Fragment um ein Pseudogen von CAP1 handelte.

Bevor die Kartierung der klonierten Fragmente des Bac-Klon Nr.5 abgeschlossen werden konnten, wurde ein chromosomaler Abschnitt aus dem Genom der Maus veröffentlicht, auf dem das gesamte Gen für CAP1 enthalten war.

Tab.2 Restriktionsfragmente der *KpnI* Kartierung von Bac-Klon Nr.4

Enzym	Größen der Restriktionsfragmente in kb				
<i>HindIII</i>	4,2	3,8	1,6	1,6	
<i>BamHI</i>	6	6			
<i>KpnI</i>	7	3,5	2		
<i>HindIII- BamHI</i>	3,8	2,2	2	1,6	1,6
<i>KpnI-BamHI</i>	6	3	3		

Tab.3 Restriktionsfragmente der *Apal* Kartierung von Bac Klon Nr.4

Enzym	Größen der Restriktionsfragmente in kb				
<i>Apal</i>	13	3			
<i>BamHI</i>	8	6	2,3		
<i>KpnI</i>	8	6	2		
<i>EcoRV</i>	9	7			
<i>XbaI</i>	10	4	3		
<i>EcoRV-Apal</i>	9	4	3		
<i>XbaI-Apal</i>	7	4,5	3	1,6	
<i>XbaI-EcoRV</i>	6,5	4,5	3,5	1,6	
<i>XbaI-BamHI</i>	8	2,5	2,3	1,8	1,8
<i>Apal-BamHI</i>	6	5	3	2,3	

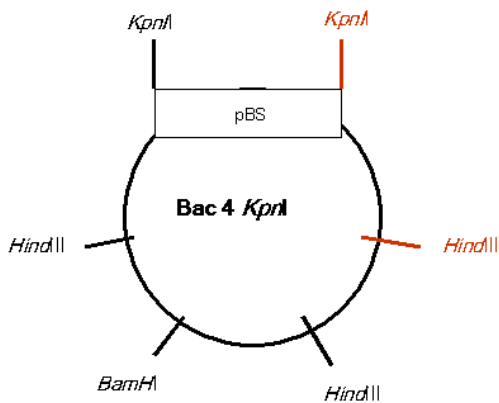


Abb. 10 Restriktionskarte des 9 kb CAPI-positivem *KpnI*-Fragments aus BAC-Klon Nr.4. Rot markierte *HindIII* und *KpnI* Schnittstellen kennzeichnen den Bereich, mit dem die 5'-CAP1 Sonde (Nukleotide 1-640 der cDNA) hybridisiert.

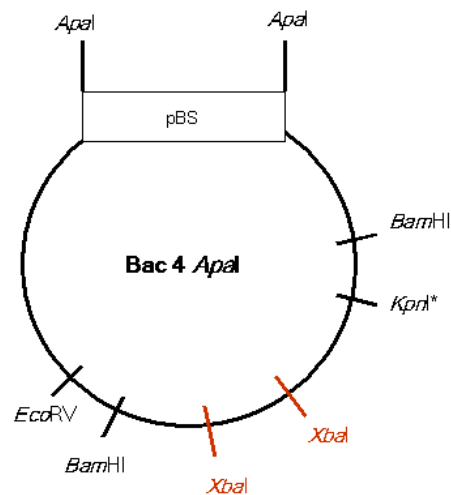


Abb. 11 Restriktionskarte des 13 kb CAPI-positiven *ApaI*-Fragments aus BAC-Klon Nr.4. Rot markierte *XbaI* Schnittstellen kennzeichnen den Bereich, mit dem die 5'-CAP1 Sonde (Nukleotide 1-640 der cDNA) und die *PstI-HindIII* Sonde (Nukleotide 640-1200 der cDNA) hybridisieren. *KpnI** einzige aufgeführte Schnittstelle für *KpnI*, Restriktionsreaktion nicht im TAE-Agarosegel dargestellt.

3.1.6 Eigenschaften des CAP1 Locus

Die Veröffentlichung eines chromosomalen Genabschnitts (AL606906) ermöglichte durch Sequenzvergleiche mit der CAP1 cDNA die Charakterisierung des CAP1 Gens.

Das Gen liegt auf Chromosom 4 und erstreckt sich über ca. 28 kb. Ein Vergleich des genomischen Abschnitts mit der cDNA von CAP1 zeigt, dass das Gen 13 Exons (Abb. 12) enthält. Die Größe der Exons liegt zwischen 80 und 240 Basen, während die Länge der Introns deutlich stärker variiert. Das kürzeste Intron mit einer Länge von 82 Basen liegt zwischen Exon 5 und 6. Auch die Exons 9 bis 12 sind dicht benachbart. Die Introns haben hier eine Länge von ca. 130 bis 330 Basen. Daneben gibt es Introns mit einer Länge von ca. 2000 Basen. Das größte Intron erstreckt sich über 13 kb und liegt zwischen Exon 1 und 2. Das Startkodon liegt im zweiten Exon, während das Stoppkodon im letzten Exon liegt.

Die ersten 1000 Basen, die stromaufwärts vom ersten Exon liegen, wurden mit Programmen analysiert, die Promotorvorhersagen durchführen (<http://123genomics.homestead.com/files/analysis.html>). Dabei wurden drei mögliche TATA-Box-Elemente entdeckt. Vergleiche dieser Region mit der entsprechenden

Sequenz des Menschen zeigten in drei Abschnitten, von denen einer ein vorhergesagtes TATA-Box-Element einschloss, eine Homologie von 78 % bis 85 %. Es könnte sich damit also um einen Promotorabschnitt des CAP1 Gens handeln.

Der Sequenzvergleich wurde danach auf das gesamte CAP1 Gen ausgedehnt. Dabei wurden Homologien von 81 % bis 91 % für die Exons ermittelt. Derartig hochkonservierte Bereiche konnten auch in einigen der Introns identifiziert werden. Besonders auffallend waren dabei zwei Regionen im ersten Intron. Die erste davon umfasst ca. 800 Basen mit drei konservierten Abschnitten (120 bis 180 Basen, 77 % bis 90 % Homologie). Etwa 2000 Basen davon entfernt befindet sich eine ähnliche Region mit ca. 600 Basen und zwei konservierten Abschnitten (220 und 110 Basen von 78 % und 80 % Homologie). Aber auch im 3' Bereich des CAP1 Gens wurden konservierte Sequenzen gefunden. Die ersten 180 Basen Intronsequenz, die auf Exon 11 folgen, wurden bei dem Sequenzvergleich zusammen mit Exon 11 einem einzigen Homologieabschnitt (85 % Homologie) zugeordnet. Die konservierten Bereiche, die hier in den Introns gefunden wurden, könnten regulatorische Funktionen ausüben.

3.1.7 Erstellung eines Vektors zur Inaktivierung des CAP1 Gens mittels PCR

Anhand der unter 3.1.6 vorgestellten Daten wurde eine Strategie zur Inaktivierung des CAP1 Gens entwickelt. Die Inaktivierung sollte durch eine Leserasterverschiebung in Exon 3 erzielt werden. Dieses Exon wurde gewählt, weil selbst durch alternatives Spleißen innerhalb des Gens das Leseraster nicht wieder hergestellt werden kann. Würde das Exon 3 durch Spleißen aus der mRNA entfernt, so würde das Exon 2 mit einem der folgenden Exons verbunden werden. Das Leseraster in Exon 2 endet aber mit der ersten Base eines Codons. Um das Leseraster zu erhalten, müsste das nächste Exon mit den 2 letzten Basen eines Codons beginnen. Das ist erst in Exon 9 der Fall. Exon 4, 5, 6 und 8 beginnen mit vollständigen Codons, und Exon 7 beginnt mit der letzten Base eines Codons. Eine Verschiebung des Leserasters in Exon 3 führt so entweder zur vollständigen Inaktivierung von CAP1 oder durch alternatives Spleißen von Exon 2 an Exon 9 zu einer stark verkürzten Version des Proteins, bei der die gesamte Information von Exon 3 bis 8 fehlen würde. Das entspricht ca. 870 Basen und somit der Hälfte des Proteins. Mit dieser Hälfte würden die N-terminale Domäne und Teile des

1. EXON
 CTT TTCCAAACGC TCCTAAGCCA GATTCTCTCT CCGGTGGCGG GGAATGAGGG CGGAGTCACG
 AGCGGAGCGG CCAAACCTTCT TCCTCTCCCC CGGGCTAGCG TTACAGCCAG TGGTTCATTT
 CCGGTGGGGG TGCCGCGCCC AGTGAGGGCC CGGAAGTGGG TCGCGGAAG ACCGCTGGGC
 GGTTCTTGCC GGAAGTGGAG AGCGGCTGAT CGCAGTCCGG AGGTGAGGCG GAACTCTTAAG

2. EXON
 CA GGTGGAACAT **TATGG**CTGAC ATGCAAATC TTGTAGAAAAG ATTGGAGAGG GCAGTGGGCC
 GCCTGGAGGC AGTGTACAT ACTTCAGACA TGCACTGTGG ATATGGAGAC AGCCCTTCAA **AAG**

3. EXON
GAG CAGTTCCATA TGTGCAAGCA TTTGACTCGC TGCTTGCCAA TCCCGTGGCA GAGTACTTGA
 AGATGAGTAA GGAGATCGGG GGAGATGTGC AGAAAC**CAC**

4. EXON
GCGGAGA TGGTCCACAC AGGCCTGAAG TTGGAGCGAG CTCTCCTGGC TACAGCTTCT CAGTGCCAGC
 AGCCAGCT**GG T**

5. EXON
AA TAAACTTTCT GATTTGTTGG CACCTATCTC GGAGCAGATC CAAGAAGTTA TAACCTTCCG
 GGAGAAGAAC CGAGGCAGCA AGTTTTTTAA TCATCTATCT GCTGTCAAGT AAAGCATCCA
 GGCCTTGGGC TGGGTGGCT**C TG**

6. EXON
GCTGCG AAACCTGGCC CCTTTGTGAA AGAGATGAAT GACGCGGCCA TGTTTTACAC AAATCGTGTC
 CTCAAGGAGT ACAGAGAT**GT**

7. EXON
G GATAAGAAGC ATGTGGACTG GGTCAAGACT TACTTGAGTA TATGGACGGA GCTGCAGGCT
 TACATCAAGG AGTTTCATAC TACTGGCCTG GCCTGGAGCA AG**ACG**GTTAG

8. EXON
GGGC CTGTGGCAA AGAACTGAGT GGATTGCCAT CTGGACCCTC TGTGGGATCA GGCCACCTC
 CTCCCCACC GGGCCCGCT CCTCCCCAA TCTCTACCAG TTCTGGTTCT GACGACTCTG
 CATCAGCTC AGCACTGTTT GCACAGATTA ATCAGGGGGA AAGCATCACA CAT**G**

9. EXON
C CTGAAACAT GTATCTGATG ACATGAAGAC TCACAAGAAC CCTGCCCTGA AAGCTCAGAG
 TGGTCCAGTT CGGAGTGGCC CCAAACCAT CTCTGCACCT AAACCCCAA CTAGCCCCTC
 CCCCAAACA GCCACAAAGA AGGAACCAGC TCTGCTGGAA CTGGAAGGCA AGAAATGGAG **AGT**

10. EXON
GA AAACCAGGAG AATGTTTCCA ACCTGGTGAT CGATGACACT GAGCTGAAGC AGGTGGCTTA
 CATCTACAAG TGTGTCAACA CAACATTGCA AATCAAGGC AAAATTAAC CCATTACAGT **AG**

11. EXON
ATA ACTGTAAGAA GCTTGGCCTG GTGTTTGATG ACGTGGTGGG CATTGTGGAG ATAATCAATA
 GTAGGGATGT CAAAGTT**CAG**

EXON 12
GTG ATGGGAAAAG TGCCAACCAT TTCCATTAAC AAAACAGATG GCTGCCATGC TTACCTGAGC
 AAGAACTCCC TGGACTGTGA GATAGTCAGT GCCAAATCTT CTGAGATGAA TGTCTCATT
 CCTACCGAAG GCGGTGAT**TT T**

13. EXON
AAC GAGTTCCAG TCCCCGAGCA GTTCAAGACC CTGTGGAACG GACAGAAGTT GGTCAACACA
 GTGACAGAAA TCGCTGGATA **AG**CAAATACA TGGTCTCTGT GCCCTCTCCC TTCACACCAT
 GGGATACATC TGTATGGAGA CGTTCTTTT CTAGA

Abb. 12 Auflistung der Exonsequenzen von CAP1. In rot: Stopkodon, gelb: Startkodon und Kodons an den Exongrenzen.

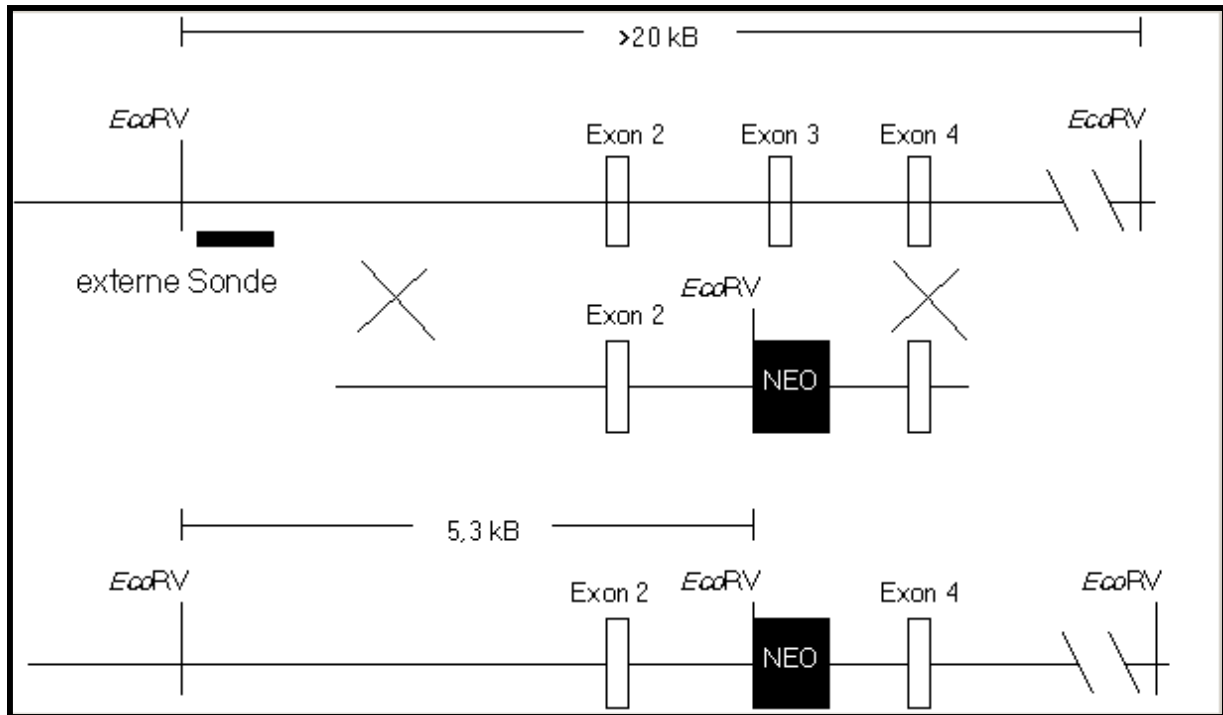


Abb. 13 Rekombinationsschema des ko-Vektors mit dem cap1 Locus.

prolinreichen Abschnitts verloren gehen. Eine Durchmusterung von EST Datenbanken ergab zudem keine Hinweise auf eine Spleißvariante, die die Exons 3 bis 8 ausklammert und zu einem Protein führt, das nur den C-terminalen Teil von CAP1 enthält. Die Leserastermutation in Exon 3 erschien so als ein effizientes Mittel, CAP1 vollständig zu inaktivieren.

Der Vektor, der diese Mutation ermöglichen sollte, ist in Abb. 13 dargestellt. Er besteht aus einem 5'-Arm mit einer Länge von 5 kb, der das 2. Exon enthält. Der 3'-Arm hat eine Länge von 2 kb und enthält das Exon 4. Beide Arme flankieren die Neomycin-Resistenz-Kassette. Durch die Homologie der Vektorarme zur chromosomalen Zielsequenz wird die Doppel-Rekombination ermöglicht, die durch die beiden Kreuze angedeutet ist. Diese sollte zum Austausch des Exon 3 gegen die Neomycin-Resistenz-Kassette führen, und nur wenige Basen am 5'- und 3'-Ende des dritten Exons sollten dabei erhalten bleiben. Zusammen mit der Neomycin-Resistenz-Kassette würde eine *EcoRV* Restriktionsschnittstelle eingefügt werden. Auf diese Weise entsteht beim Verdau der genomischen DNA mit diesem Enzym ein neues 5,3 kb langes Fragment, das mit Hilfe der in Abb. 14 eingezeichneten Sonde detektiert werden kann.

Die Arme des Vektors wurden mit PCR aus genomischer ES-Zell DNA amplifiziert, kloniert und anschließend mit der Neomycin-Kassette in den pBS-Vektor ligiert. Die Neomycin-Kassette in pBS lag bereits vor.

5'-Arm:

Der 5'-Arm wurde in zwei Abschnitte unterteilt (Abb. 14), die getrennt synthetisiert wurden. Der 3'-Primer des 5.1 und der 5'-Primer des 5.2 Abschnitts wurden so gewählt, dass ein überlappender Bereich entstand. Dieser enthielt eine *Pst*I Schnittstelle.

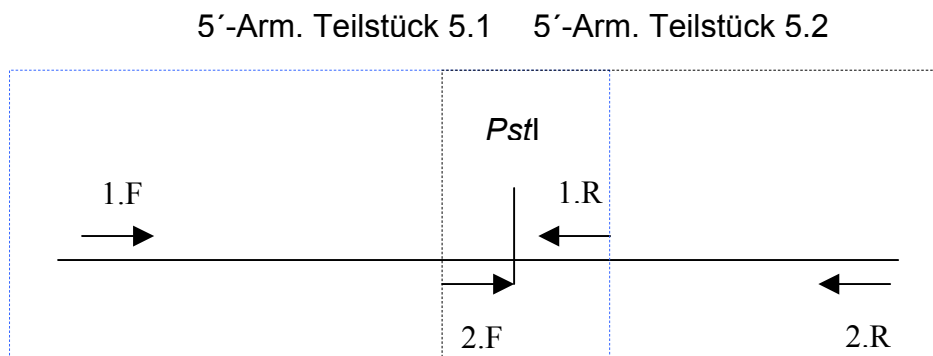


Abb. 14 Schema für die Amplifikation des 5'-Arms mit PCR.

Der Primer 2.R enthielt eine *Not*I Schnittstelle für die Ligation mit der Neomycin-Kassette. Für die PCR wurde genomische DNA aus IB 10 Zellen (Subklon von SV129 ES-Zellen) isoliert und mit *Nco*I geschnitten. *Nco*I schneidet außerhalb des zu amplifizierenden Bereichs. Diese Maßnahme sollte die Amplifikation erleichtern. Das Aufschmelzen der DNA und der DNA-Syntheseschritt wurden für beide Teilstücke bei 92°C und bei 68°C durchgeführt. Diese Schritte liefen für 30 Sekunden und 8 Minuten. Die Anlagerung der Primer wurde bei 64°C für 5.1 und bei 67°C für 5.2 durchgeführt. Das Reaktionsvolumen für 5.1 betrug 15 µl. Mit 50 µl Volumen konnte kein PCR Produkt amplifiziert werden. Mit den verringerten Volumina wurden 6 Reaktionen simultan durchgeführt. Für 5.2 betrug das Reaktionsvolumen 50 µl. Für beide Teilstücke wurden 35 Zyklen durchlaufen. Die Produkt der PCR Reaktionen wurden über ein 0,7 %iges TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Agarosegel extrahiert.

Das 5.1 Teilstück hat eine Länge von 3,5 kb und wurde direkt für die Ligrationsreaktion des Topoisomerase-Systems verwendet. Das Teilstück 5.2 hat

eine Länge von 1,8 kb. Es wurde nach der Addition von Adenosin an die 3'-Enden in den pGem-T Easy Vektor ligiert. Nach den Klonierungen wurde die gemeinsame *PstI* Schnittstelle von 5.1 und 5.2 verwendet um die beiden Teilstücke im Topo-Vektor zum vollständigen 5-Arm zusammenzufügen.

3'-Arm

Im Gegensatz zum 5'-Arm konnte der 3'-Arm mit einer Länge von 3 kb vollständig in nur einer PCR Reaktion amplifiziert werden. Als Template wurde ungeschnittene genomische DNA aus IB10 ES-Zellen verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl, die DNA wurde bei 92°C aufgeschmolzen und die Primer wurden bei 67°C angelagert. Der 5'-Primer enthielt eine *NotI*-Schnittstelle. Der DNA-Syntheseschritt wurde bei 68°C für 5 min durchgeführt. Das PCR Produkt wurde nach 35 Zyklen in einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert. Die gereinigte DNA wurde für die Klonierung mit dem Topoisomerase System eingesetzt.

ko-Vektor

Für die Fertigstellung des Konstrukts wurde der 3'-Arm aus dem Topo-Vektor geschnitten und in einen pBS-Vektor ligiert, aus dessen multiplen Klonierungsbereich zuvor die *KpnI* Schnittstelle entfernt worden war. Anschließend wurde der Vektor wieder linearisiert, um den 5'Arm hinzuzufügen. Beide Arme wurden über die *NotI*-Schnittstellen, die in den 2R Primer des 5'Arms und den 5'Primer des 3'Arms integriert worden waren, verbunden. Danach wurde der Vektor an dieser Stelle wieder linearisiert, um über diese *NotI*-Schnittstelle die Ligation der Neomycin-Kassette in den ko-Vektor zu ermöglichen.

3.1.8. Transfektion, Selektion und „Screen“ der ES-Zellen

Nach der Vervollständigung des Vektors wurde Endonuclease freie DNA aus *E. coli* isoliert. 40 µg des Konstrukts wurden linearisiert und für die Elektroporation der ES-Zellen verwendet. Nach dreitägiger Selektion mit G418 wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen 450 ES-Zell Klone gepickt. Nach der Vermehrung der Zellen wurde ein Teil als DMSO-Stock eingefroren. Die verbleibenden Zellen wurden vermehrt und für die Isolierung genomischer DNA verwendet. Die genomische DNA wurde mit *EcoRV* verdaut, in 0,5 %igen Agarosegelelelektrophoretisch aufgetrennt

und für Southernblots auf Membranen transferiert. Die Membranen wurden dann mit der in Abbildung 14 abgebildeten externen Sonde hybridisiert. Bis zur Beendigung dieser Arbeit konnten keine positiven Klone identifiziert werden.

3.2 Analyse der Funktion von CAP1

3.2.1 Expression von CAP1 in *E. coli*

Die vollständige CAP1 cDNA wurde in den Expressionsvektor pT7-7 kloniert und zur Erzeugung von rekombinantem CAP1 in den *E. coli* Stamm BL21-DE3 transformiert (Leichter, 2002). Die Induktion erfolgte mit IPTG. Dies führte zur Expression des CAP1 Proteins. Das exprimierte Protein war nicht löslich und konnte nur mit Harnstoffpuffer extrahiert werden. Dieser Umstand konnte jedoch genutzt werden, um CAP1 von *E. coli* Proteinen zu trennen. Dazu wurde das Bakterien-Pellet schrittweise mit Puffern ansteigender Harnstoffkonzentration extrahiert. Begonnen wurde mit TE Puffer gefolgt von 4 M Harnstoff bis zu 8 M Harnstoff. Das Pellet der 8 M Harnstoffextraktion wurde in TE Puffer resuspendiert. Der Vergleich der verschiedenen Fraktionen zeigt die Abnahme der bakteriellen Proteine im Verhältnis zu CAP1 (Abb. 15).

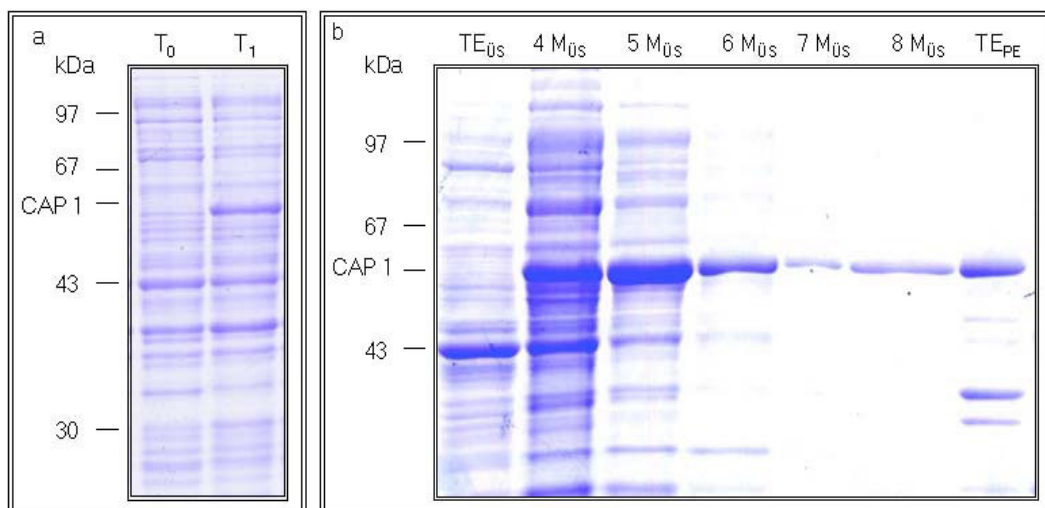


Abb 15. Expression und Harnstoffextraktion von CAP1. Die Proben wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (12 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. a) T₀, *E. coli* Lysat vor der Induktion mit IPTG. T₁, *E. coli* Lysat, induziert, nach ÜN Inkubation. b) Überstände schrittweiser Extraktion des Zellpellets nach Induktion beginnend mit TE Puffer, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M, 8 M Harnstoff. Die letzte Spur, TE_{PE}, zeigt das Endpellet der Extraktion.

Auch nach der Extraktion mit 8 M Harnstoff verblieb ein großer Teil von CAP1 im Pellet und konnte nicht gelöst werden. Die Pellet-Suspension enthielt neben CAP1

nur wenige andere Proteine, die sich zusätzlich noch deutlich von CAP1 in der Größe unterschieden. So konnte diese Fraktion genutzt werden, um mit Hilfe der Gelextraktion aus SDS-Polyacrylamidgelen (12 % Acrylamid) CAP1 aufzureinigen. Die Identität des eluierten Proteins (Abb. 16) wurde mit massenspektrometrischen Methoden nach Trypsinverdau bestätigt. Das CAP1 Protein (Abb. 16) wurde zur Produktion polyklonaler Antikörper in Kaninchen an die Firma Pineda weitergegeben. Die Seren wurden alle 30 Tage auf ihre Reaktivität getestet. Am 175. Tag war eine gewünschte Immunogenität erreicht.

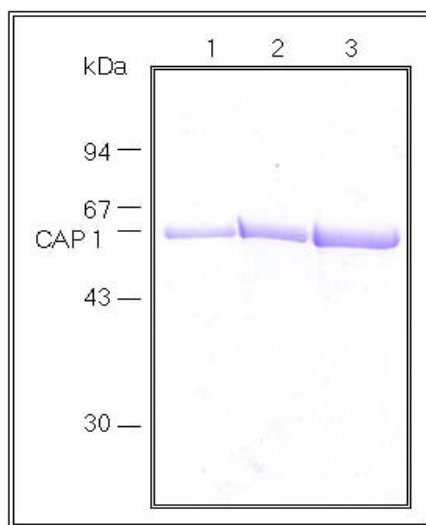


Abb. 16 Darstellung des geextrahierten CAP1, das für die Produktion von polyklonalen Antikörpern verwendet wurde. Das Eluat wurde im SDS-Polyacrylamidgel (12 % Polyacrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Spur 1-3; 5, 10, 15 μ l.

3.2.2 Charakterisierung des Antikörpers

Die Spezifität der polyklonalen Antikörper wurde an *E. coli* Lysaten getestet. Dazu wurden die Zellysate der induzierten und nicht induzierten BL21-DE3 Zellen aus Abb. 15 a in einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert.

In der Westernblot Analyse (Abb. 17) detektierten die polyklonalen Antikörper spezifisch CAP1 (Pfeil). Zusätzlich zu dem Signal bei 54 kDa sind noch weitere Signale zu erkennen. Hier handelt es sich um die Detektionen von Degradationsprodukten von CAP1

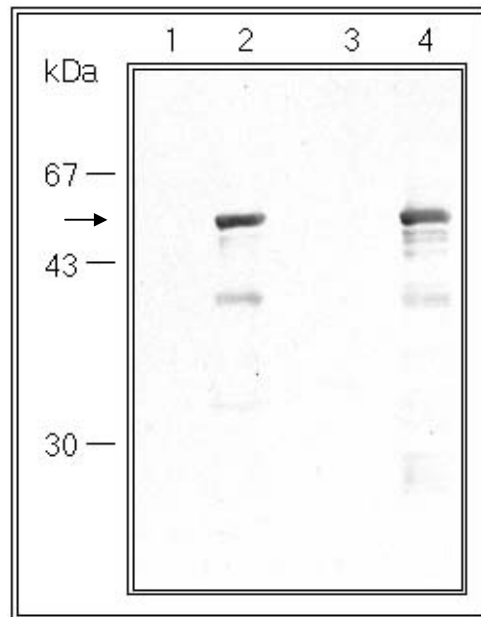


Abb. 17 Westernblot Analyse zur Bestimmung der Spezifität der polyklonalen anti-CAP1 Antikörper von Tier 1 (Spur 1 und 2) und Tier 2 (Spur 3 und 4). Zellhomogenate von nicht induzierten (1, 3) und mit IPTG induzierten (2, 4) pT7-7-CAP1 transformierten *E. coli* Zellen wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der gebundene polyklonale anti-CAP1 Antikörper wurde mit einem Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper und Chemolumineszenzreaktion mit Luminol sichtbar gemacht. Der Pfeil weist auf rekombinant exprimiertes CAP1.

Die CAP1-Spezifität des polyklonalen anti-CAP1 Antikörpers im Vergleich zu CAP2 wurde an HEK 293 Zellhomogenaten untersucht. Dazu wurden Homogenate von Zellen, die GFP-CAP2 oder CAP2-Myc überexprimieren, mit Homogenaten untransfizierter Zellen verglichen.

Beide polyklonale Antikörper erkannten das endogene 54 kDa CAP1 (Abb 18 a und b), nicht aber die überexprimierten CAP2-Fusionsproteine, die durch den anti-CAP2 Antikörper (Abb. 18 c) detektiert wurden (GFP-CAP2 ca. 80 kDa, CAP2-Myc 52 kDa) Zusätzlich zu CAP1 wurde ein weiteres Protein unterhalb des 43 kDa Markers detektiert. Dieses Signal entspricht sehr wahrscheinlich dem Signal unterhalb des 43 kDa Markers in Abb. 17 und ist damit auf die Detektion von CAP1 Degradationsprodukten zurückzuführen.

Für die Immundetektion von CAP1 in Zellen und Geweben wurde das Immuns Serum an rekombinantem Protein affinitäts gereinigt

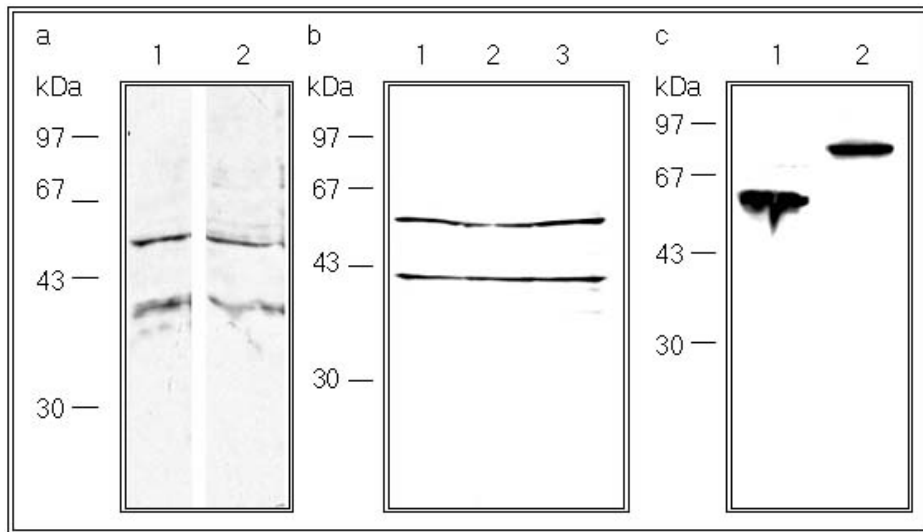


Abb. 18 Westernblot Analyse zur Bestimmung der Kreuzreaktivität der polyclonalen anti-CAP1 Antikörper mit CAP2. Zellhomogenate wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der gebundene primäre Antikörper wurde mit einem Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper und Chemolumineszenzreaktion mit Luminol sichtbar gemacht. a) Reaktion des polyclonalen anti-CAP1 Antikörpers aus Tier 1 mit Homogenat von GFP-CAP2 exprimierenden HEK 293 Zellen (Spur 1) und HEK 293 Zellen (Spur 2). b) Reaktion des polyclonalen CAP1 Antikörpers aus Tier 2 mit Homogenaten von GFP-CAP2 (Spur 1) und CAP2-Myc (Spur 2) exprimierenden HEK 293 Zellen und HEK 293 Zellen (Spur 3). c) Reaktion des affinitätsgereinigten anti-CAP2 Antikörpers mit dem Homogenat von CAP2-Myc (Spur 1) exprimierenden HEK 293 Zellen und GFP-CAP2 exprimierenden HEK 293 Zellen (Spur 2).

3.2.3 Expression von CAP1 in den Organen der Maus

Für die Untersuchung der CAP1 Expression in den Geweben der Maus wurden zwei Mäusen Gewebeproben entnommen. Milz, Hoden, Lunge, Gehirn, Haut und Niere stammen von einem Männchen. Die übrigen Gewebeproben stammen von einem drei Wochen alten SV129 Weibchen. Nach der Entnahme wurden die Gewebe homogenisiert und mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in einem 12 %igen Gel analysiert (Abb. 19).

Auffallend sind im Coomassie Blau gefärbten Kontrollgel die Aktin- und Myosinbanden bei 42 und 220 kDa in Herz (Spur 6), Magen (Spur 7) und Skelettmuskel (Spur 8, Abb. 19a). Im entsprechenden Westernblot dieser Gewebeproben zeigte der polyclonalem anti-CAP1 Antikörper, dass das Protein auf unterschiedlichem Niveau in allen Geweben exprimiert wird (Abb. 19 b).

Beim Vergleich des Coomassie-Blau gefärbten Gels mit dem Westernblot zeigt sich, dass die CAP1 Expression in Thymus, Milz und Lunge am stärksten ist, gefolgt von

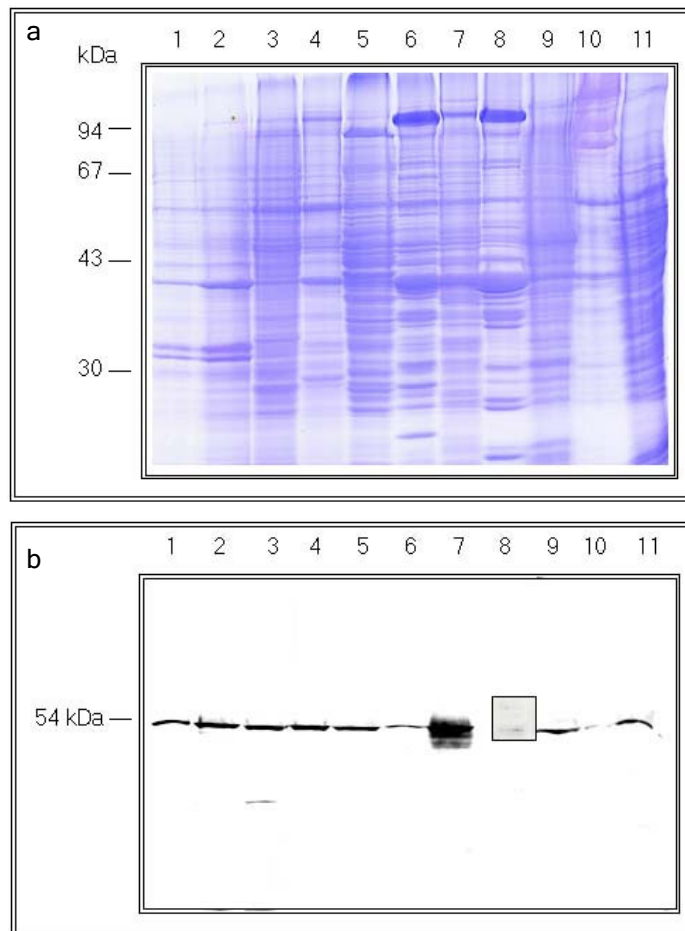


Abb 19. Expression von CAP1 in den Organen der Maus. a) Gesamthomogenate nach Auftrennung und Coomassie Färbung im SDS-Polyacrylamid-Gel (12 % Polyacrylamid). Spuren 1-11 enthalten Homogenate von Thymus (1), Milz (2), Hoden (3), Lunge (4), Leber (5), Herz (6), Magen (7), Skelettmuskel (8), Gehirn (9), Haut (10) und Niere (11) der Maus. b) Vorkommen von CAP1 in den verschiedenen Geweben. Der primäre Antikörper wurde mit einem sekundären Meerrettich Peroxidase gekoppelten Antikörper und nachfolgender Chemolumineszenzreaktion mit Luminol sichtbar gemacht.

Hoden, Leber und Magen. Am geringsten ist die CAP1 Expression in Herz, Skelettmuskel, Gehirn, Haut und Niere. Das CAP1 Signal in der Skelettmuskelspur war so schwach, dass eine längere Expositionsdauer des Röntgenfilms nötig war um das Signal zu detektieren. Dieses Signal ist in einem gesonderten Feld dargestellt.

3.2.4 Expression von CAP1 im Gehirn der Maus

Um die Expression von CAP1 im Gehirn genauer zu untersuchen, wurden Gewebeproben einzelner Gehirnteile einer neugeborenen Maus und einer adulten Maus verwendet (zur Verfügung gestellt von Dr. A. Hasse). Dabei zeigte sich eine deutlich ungleiche Expression von CAP1 in verschiedenen Bereichen des Gehirns der neugeborenen Maus und eine gleichmäßigere Expression in der adulten Maus (Abb. 20). Zur Kontrolle wurde der Westernblot mit monoklonalen anti- β -Aktin und K 37 142-1 Antikörpern gegen Coronin-7 (Crn7) markiert. Von beiden Proteinen war bekannt, dass sie in den untersuchten Proben gleichmäßig verteilt sind.

Der CAP1-Gehalt war im *Cortex cerebri* (1) und *Bulbus olfactorius* (3) der neugeborenen Maus am höchsten, gefolgt von Thalamus/Striatum (5) und dem Hirnstamm (4). Die niedrigsten Mengen wurden im *Cerebellum* (2) beobachtet. Für die Gehirnareale der adulten Maus konnte im Hirnstamm (4), im Thalamus (5) und in der *Medulla oblongata* (7) eine etwas stärkere Expression gezeigt werden.

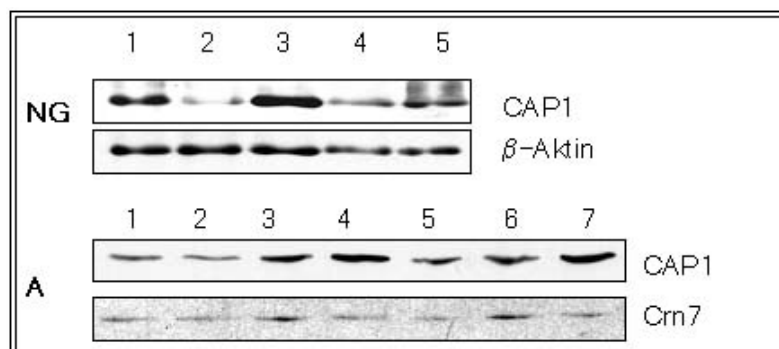


Abb. 20 Expression von CAP1 im Gehirn der Maus. Homogenate aus verschiedenen Teilbereichen des Gehirns von neugeborenen (NG) und adulten Mäusen (A). Immunreaktion mit monoklonalem anti- β -Aktin Antikörper (NG) und monoklonalem Antikörper K 37 142-1 gegen Crn7 (A). Die Immundetektionen der primären Antikörper wurden mit sekundären Meerrettich Peroxidase gekoppelten Antikörpern und folgender Chemolumineszenzreaktion mit Luminol sichtbar gemacht. NG: Spur 1-5: *Cortex* (1), *Cerebellum* (2), *Bulbus olfactorius* (3), Hirnstamm (4), Thalamus und Striatum (5). A Spur 1-7: *Cortex cerebri* (1), *Cerebellum* (2), *Bulbus olfactorius* (3), Hirnstamm (4), Thalamus (5), Striatum (6), *Medulla oblongata*(7).

Die CAP1-Verteilung wurde auch in Paraffinschnitten der Gehirne von 20 und 30 Tage alten Mäusen analysiert. Zur Übersicht über die Anatomie des Gehirns ist in Abb. 21 eine H-E Färbung eines sagittalen Gehirnschnittes dargestellt. Abb. 22 und 23 zeigen eine Zusammenstellung der Regionen, in denen CAP1 detektiert werden konnte.

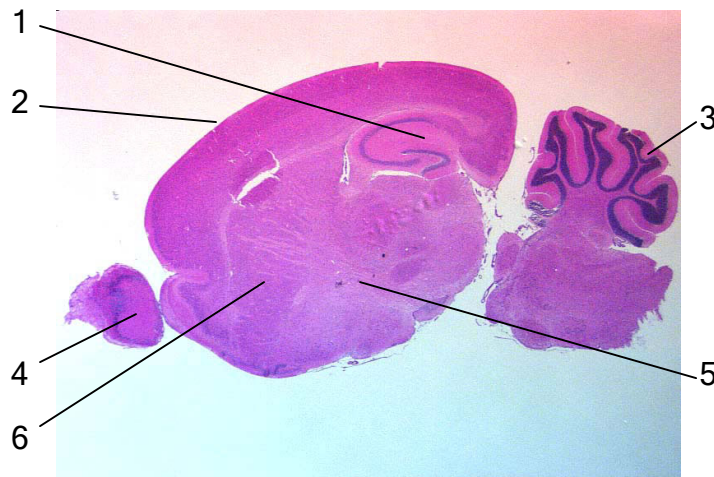


Abb. 21 H-E Färbung eines sagittalen Gehirnschnittes einer 20 Tage alten Maus.

- 1) Hippocampusformation,
- 2) *Cortex cerebri*,
- 3) *Cerebellum*,
- 4) *Bulbus olfactorius*,
- 5) *Capsula interna*,
- 6) Striatum.

In Abb. 22 a-f ist der caudale und craniale Bereich der Hippocampusformation dargestellt. CAP1 konnte hier in den Pyramidenzellen des CA3 Abschnitts des Hippocampus und in der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* detektiert werden. Beide Zelltypen sind neuronale Zellen. In Abb. 22 g-h ist die Detektion von CAP1 im Striatum gezeigt. Das Striatum trägt seinen Namen wegen der streifenförmigen Struktur. Dieses Areal besteht aus Interneuronen und Projektionsneuronen. Die Streifenstruktur wird durch Axonbündel gebildet. Stärker noch als in den Bündeln wurde CAP1 in den Zellkörpern detektiert. In Abb. 22 i-l ist die *Capsula interna* dargestellt. Hier wird CAP1 im Gegensatz zum Striatum stärker in den Fasern als in den Zellkörpern detektiert. In Abb. 23. a bis c ist das *Cerebellum* dargestellt. Auffällig ist hier die deutliche Beschränkung von CAP1 auf das *Stratum moleculare*, die äußerste Schicht des *Cerebellums*, die aus 3 unterschiedlichen Neuronentypen besteht. Die DAPI-Färbung zeigt nur wenige Kerne in diesem Areal. Unter dem *Stratum moleculare* liegt das *Stratum granulosum* mit einer sehr hohen Kerndichte. Zwischen beiden Schichten liegen die Purkinjezellen, in denen kein CAP1 detektiert wurde. Dieser Schluß kann aus der Überlagerung des CAP1 und des DAPI Signals gezogen werden, hier scheint eine dünne Schicht zwischen DAPI und CAP1 Signal nicht durch den CAP1 Antikörper detektiert worden zu sein. Die CAP1 Detektion im *Cortex cerebri* ist in Abb. 23 d dargestellt. Der *Cortex cerebri* besteht in der Hauptsache aus Pyramidenzellen. Sichtbar wird die CAP1 Detektion in diesem Areal auch in Abb. 23 g. Außerdem wird hier die Detektion von CAP1 im *Bulbus olfactorius* deutlich. Hier wird CAP1 in den Glomeruli detektiert. Umgeben werden diese von starken Anfärbungen der Kerne.

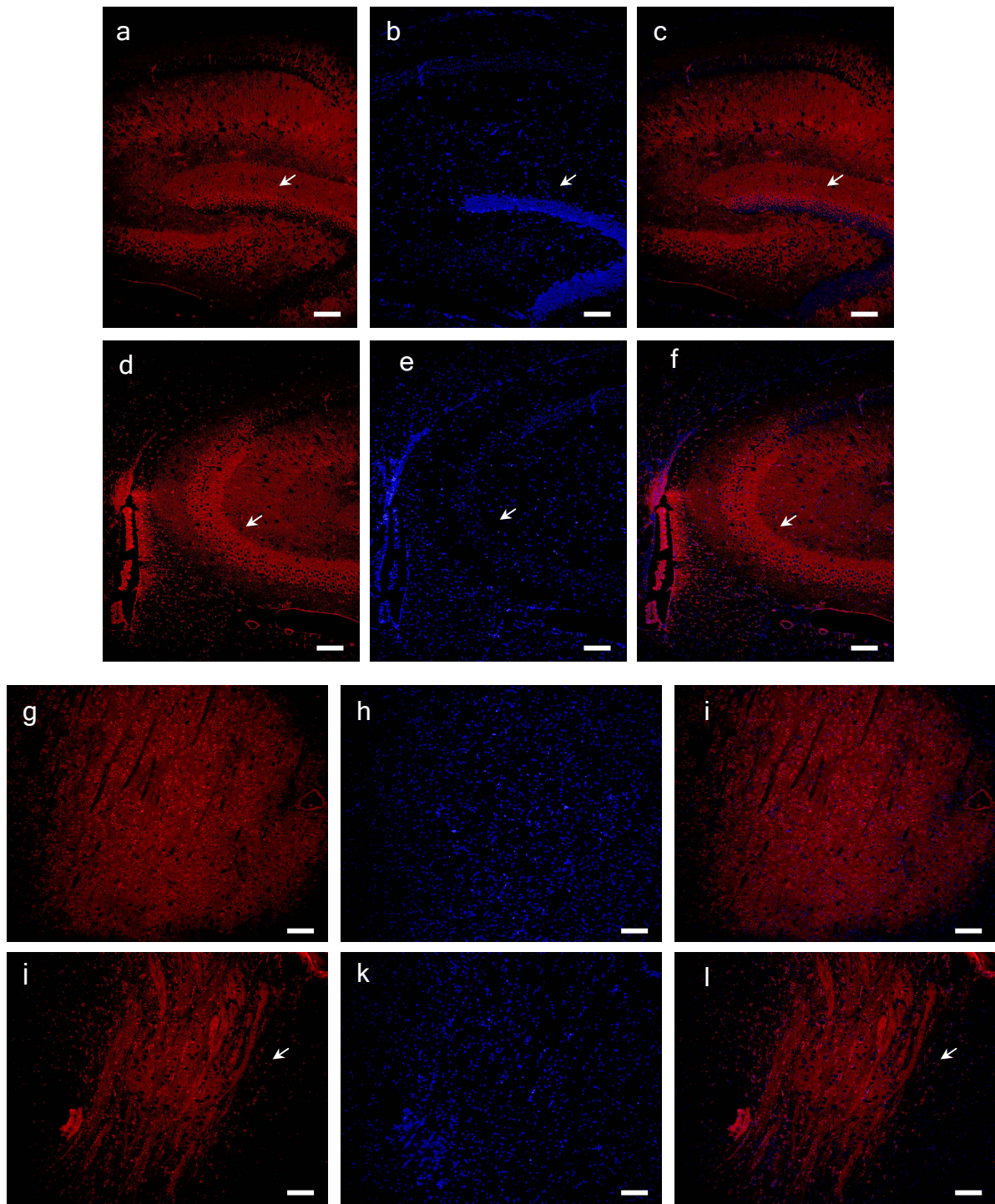


Abb. 22 Untersuchung der CAP1 Expression an sagittalen Paraffinschnitten muriner Gehirne, Tag 20 und 30. Als primärer Antikörper wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale anti-CAP 1 Antikörper, als sekundärer Antikörper der anti-Maus IgG Alexa 568 verwendet. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. In der linken Spalte ist die indirekte Immunfluoreszenzdetektion von CAP1 abgebildet, in der mittleren Spalte ist die DAPI Färbung dargestellt. Die rechte Spalte gibt die Überlagerung dieser Signale wieder. a-c) Craniale Hippocampusformation mit Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* (weißer Pfeil). d-f) Caudale Hippocampusformation mit Pyramidenzellen im CA3 Abschnitt (weißer Pfeil). g-i) Striatum, j-l) *Capsula interna* mit Fasertrakten (weißer Pfeil). Maßstab 100µm.

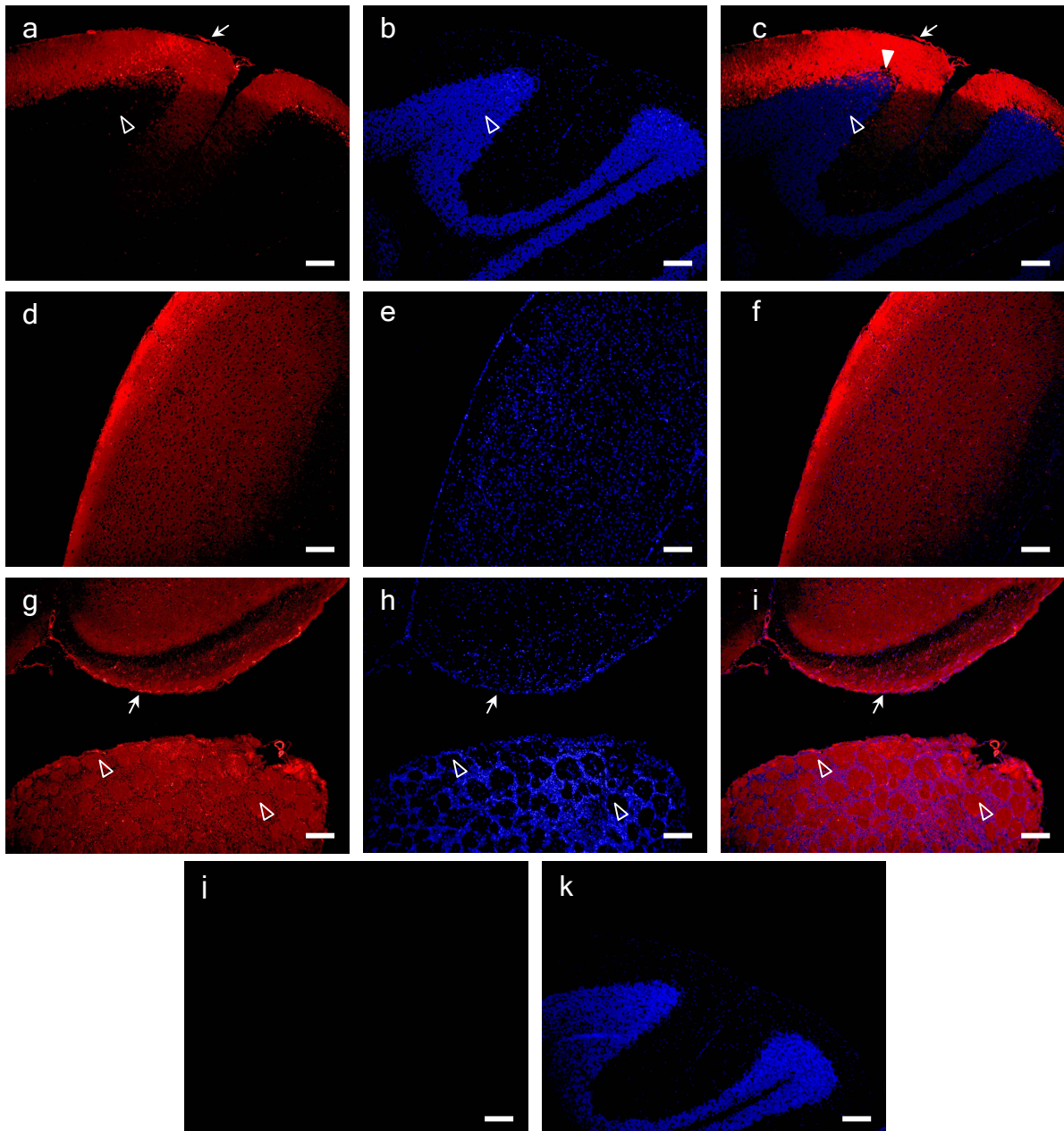


Abb. 23 Untersuchung der CAP1 Expression an Paraffinschnitten muriner Gehirne, Tag 20 und 30. Als primärer Antikörper wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale anti-CAP 1 Antikörper, als sekundärer Antikörper wurde ein Alexa 568 gekoppelter verwendet. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. In der linken Spalte ist die indirekte Immunfluoreszenzdetektion von CAP1 abgebildet, in der mittleren Spalte ist die DAPI Färbung dargestellt. Die rechte Spalte stellt die Überlagerung dieser Signale dar. a-c) *Cerebellum* mit *Stratum moleculare* (weißer Pfeil), *Stratum granulosum* (Pfeilkopf) und Purkinjzellschicht (ausgefüllter Pfeilkopf). d-f) *Cortex cerebri*, g-h) *Bulbus olfactorius* mit Glomeruli (Pfeilköpfe) und *Cortex cerebri* (weißer Pfeil). Zur Kontrolle der Signalspezifität wurde die Immunfluoreszenz alleine mit dem sekundären Antikörper und DAPI durchgeführt. Ein Beispiel ist hier dargestellt. i) *Cerebellum*, Kontrolle der Immunfluoreszenz, k) DAPI Färbung der Kerne des *Cerebellum*. Maßstab 100µm.

3.2.5 Expression von CAP1 während der Embryonalentwicklung

Die Expression von CAP1 während der Embryonalentwicklung wurde auf 2 verschiedenen Ebenen untersucht. Zunächst wurde auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene geklärt, in welchen Stadien CAP1 exprimiert wird.

Dazu wurde ein kommerziell erhältlicher Northernblot aus den embryonalen Stadien Tag 7, 11, 15, 17 mit der α - ^{32}P markierten 5'-CAP1 Sonde hybridisiert (Abb. 24 a). Die CAP1 mRNA ist in allen 4 Entwicklungsstadien vorhanden. Zur Kontrolle wurde der gleiche Blot mit einer β -Aktin-Sonde hybridisiert (Abb. 24 b).

Für die Detektion von CAP1 im Westernblot wurden Embryonen von Tag 18 und Tag 19 homogenisiert und die Homogenate auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 25). CAP1 war in beiden Proben nachweisbar.

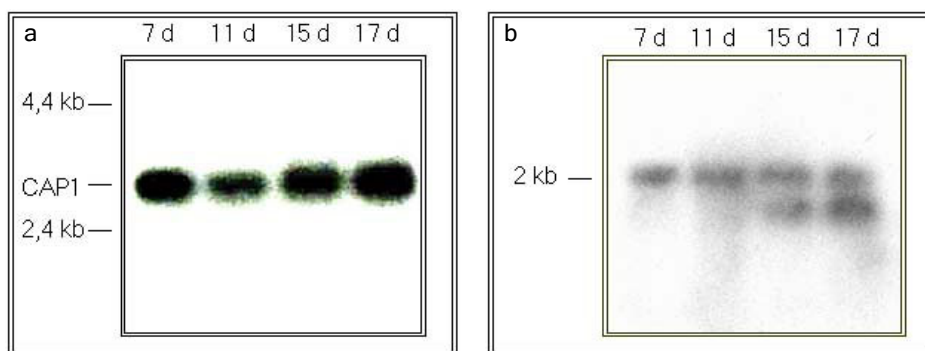


Abb. 24 Nachweis des CAP1-Transkripts während der Embryonalentwicklung. a) Hybridisierung der α - ^{32}P markierten 5'-CAP1 Sonde (Nukleotide 1-640 der cDNA), mit dem Northernblot der 4 Embryonalstadien Tag 7, 11, 15, 17. b) Hybridisierung des Northernblots mit einer β -Aktin Sonde.

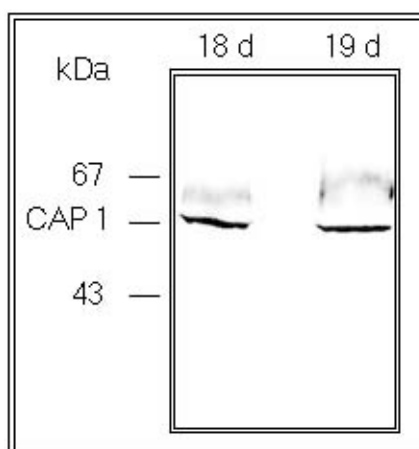


Abb. 25. Westernblot Analyse von . Gesamthomogenaten von Embryonen der Tage 18 und 19. Die Immundetektion wurde mit dem polyklonalen anti-CAP1 Antikörper durchgeführt. Der primäre Antikörper wurde mit einem sekundären, Peroxidase gekoppelten Antikörper und Chemolumineszenzreaktion mit Luminol nachgewiesen.

Nach der Bestimmung der CAP1 Expression während der Embryonalentwicklung auf der Ebene des Northern- und Westernblots wurde die CAP1 Expression mit indirekter Immunfluoreszenz in Paraffinschnitten von 10, 14 und 16 Tage alten Embryonen untersucht. Zur Übersicht sind in Abb. 26 H-E Färbungen von Embryonen der Entwicklungsstage 16 und 14 abgebildet. Für die Stadien 14d und 16d wurden keine Unterschiede in der Expression von CAP1 beobachtet. Sie werden hier parallel dargestellt.

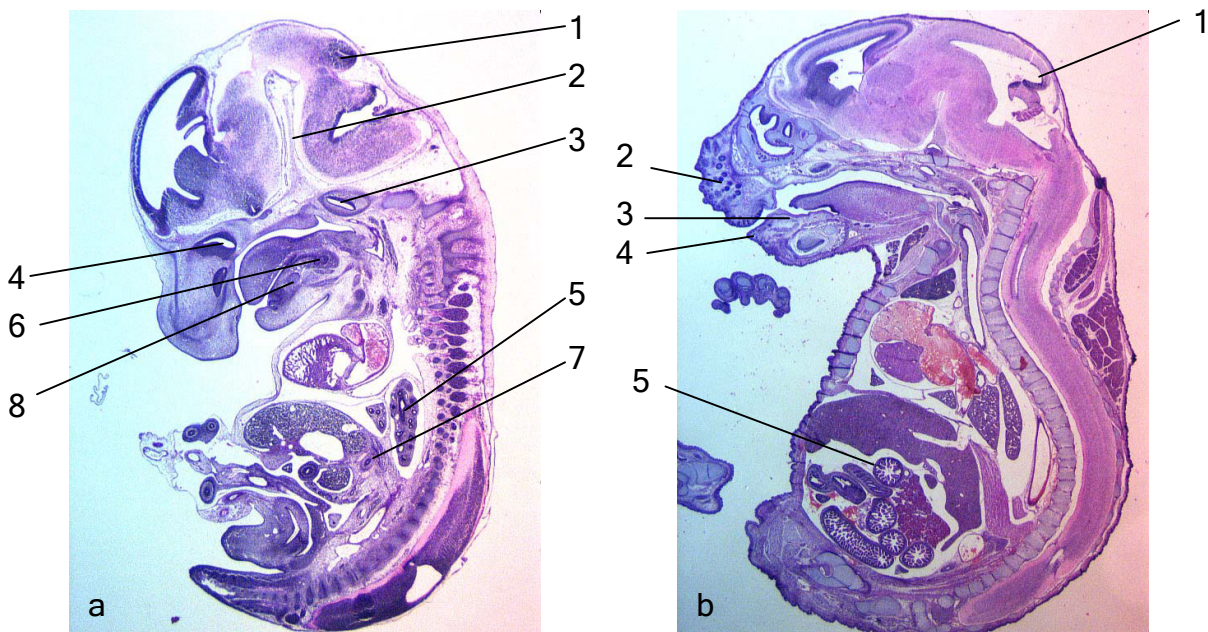


Abb. 26 H-E Färbung von sagittalen Paraffinschnitten 14 und 16 Tage alter Embryonen. a) 1. Mittelhirn, 2. *Corpus callosum*, 3. Cochlea, 4. Nasenhöhle, 5. Lunge, 6. Unterkieferdrüse, 7. Darm, 8. Meckelknorpel. b) 1. Mittelhirn, 2. und 4. Vorläufer der Schnurrhaar Follikel, 3. Meckelknorpel, 5. Dünndarm.

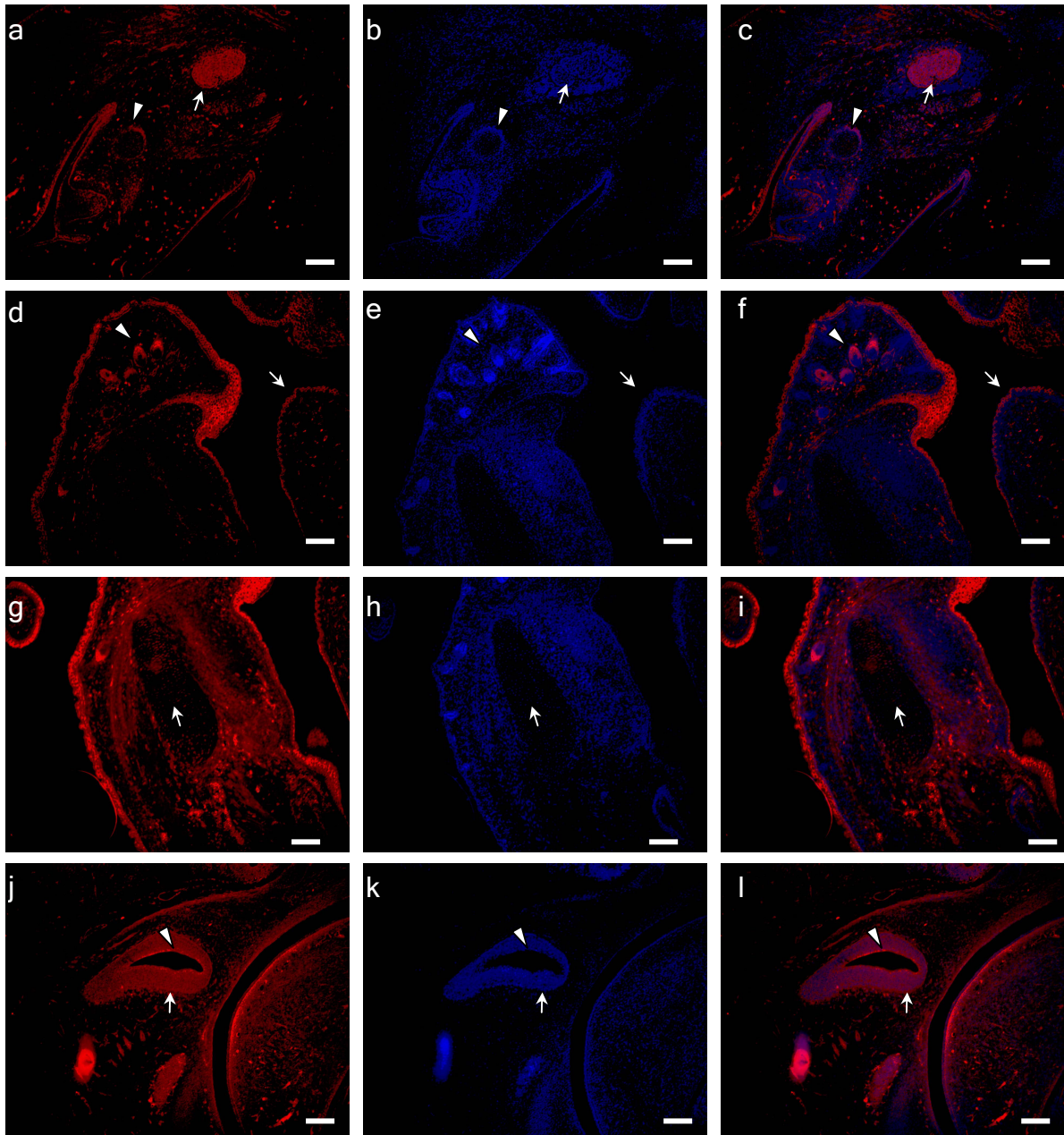


Abb. 27 Detektion von CAP1 in Paraffinschnitten muriner Embryonalgewebe von Tag 14 und 16. Als primärer Antikörper wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale anti-CAP1 Antikörper, als sekundärer ein Alexa 568 gekoppelter Antikörper verwendet. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt. Links: indirekte Immunfluoreszenz mit anti-CAP1 Antikörper (rot). Mitte: DAPI Färbung (blau). Rechts: Überlagerung von CAP1 und DAPI Signal. a-c) Tag 14, Meckelknorpel (Pfeilkopf), von Bindegewebe umgebene Unterkieferdrüse (weißer Pfeil). d-f) Tag 16, d, Ursprünge der Schnurrhaar Follikel (Pfeilkopf), Zungenspitze (weißer Pfeil). g-i) Tag 16 Meckelknorpel (weißer Pfeil). j-l) Tag 14 Nasenhöhle mit mehrreihigem Epithel (weißer Pfeil), Nasenhöhle (Pfeilkopf). Maßstab 100 μ m.

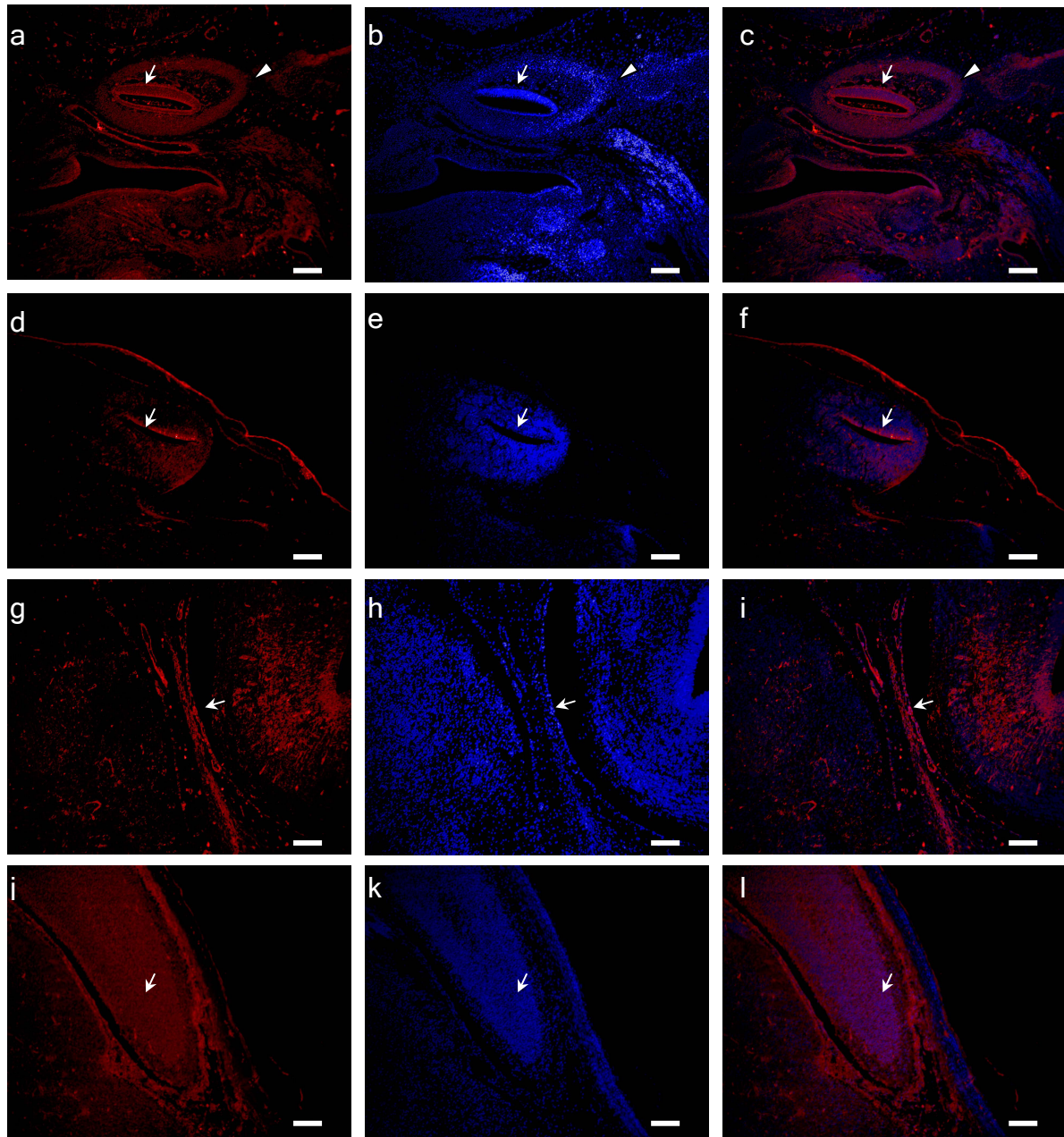


Abb. 28 Detektion von CAP1 in Paraffinschnitten muriner Embryonalgewebe von Tag 14 und 16. Als primärer Antikörper wurde der affinitätsgereinigte polyklonale anti-CAP1 Antikörper, als sekundärer ein Alexa 568 gekoppelter Antikörper verwendet. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt. Links, indirekte Immunfluoreszenz mit anti-CAP1 Antikörper (rot) . Mitte, DAPI Färbung (blau). Rechts, Überlagerung von CAP1 und DAPI Signal. a-c) Tag 14, Cochlea (weißer Pfeil), Knorpelvorläufer (Pfeilkopf). d-f) Tag 14, kaudaler Teil des Mittelhirndachs (weißer Pfeil). g-i) Tag 14, *Corpus callosum* (weißer Pfeil). j-l) Tag 16, laterale Mittelhirnwand (weißer Pfeil). Maßstab 100 μ m.

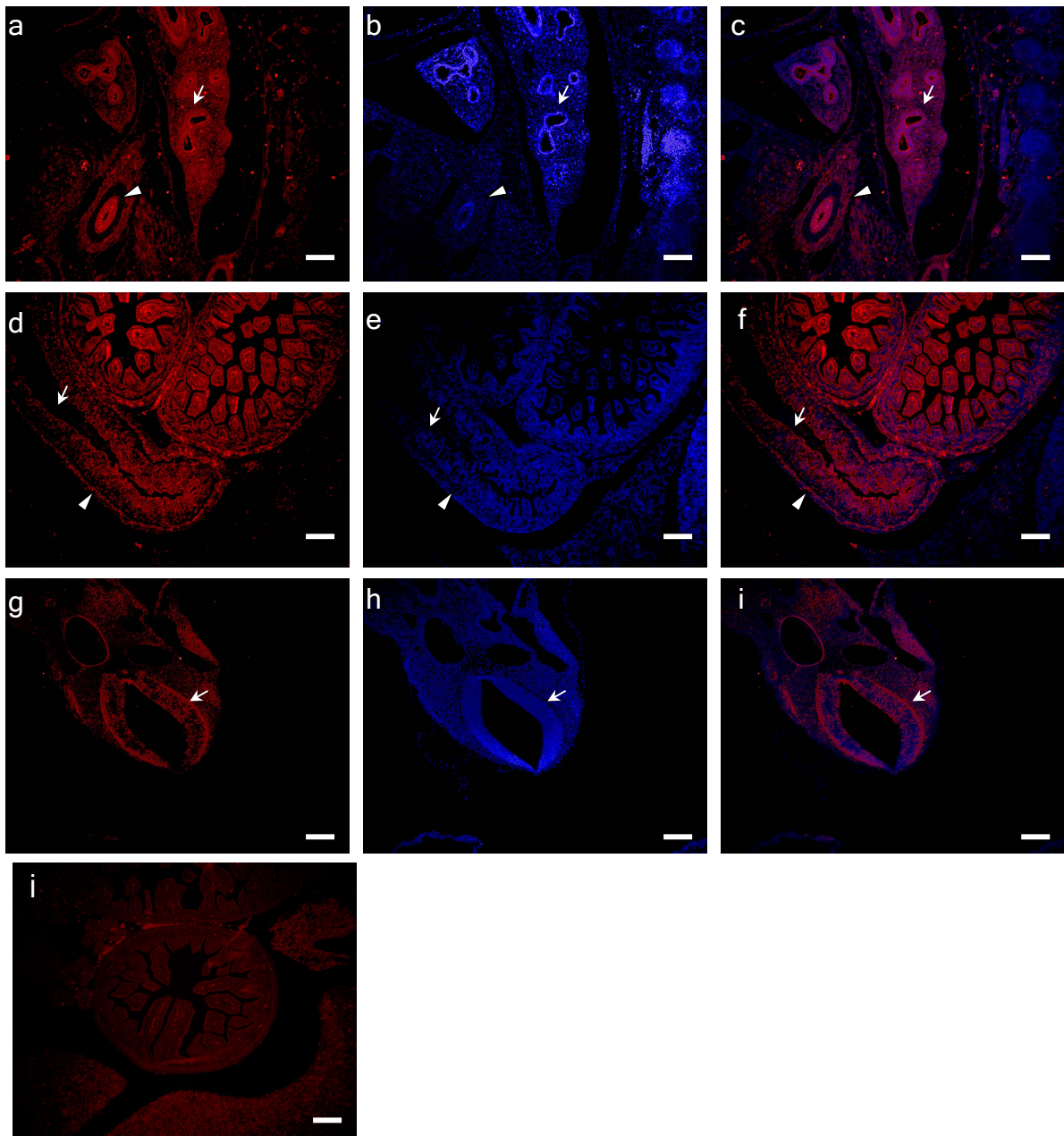


Abb. 29 Detektion von CAP1 in Paraffinschnitten muriner Embryonalgewebe Tag 10, 14 und 16. Als primärer Antikörper wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale anti-CAP1 Antikörper, als sekundärer ein Alexa 568 gekoppelter Antikörper verwendet. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt. Links: Immunfluoreszenz mit anti-CAP1 Antikörper (rot). Mitte: DAPI Färbung (blau). Rechts: Überlagerung von CAP1 und DAPI Signal. a-c) Tag 14, Bronchussegment in Lungenflügel (weißer Pfeil), Darmschlinge (Pfeilkopf). d-f) Tag 16, inneres Darmepithel (weißer Pfeil) und umgebendes Bindegewebe (Pfeilkopf). g-i) Tag 10, Marginale Schicht des Neuralrohrs (weißer Pfeil). j) Zur Kontrolle der Signalspezifität wurde die indirekte Immunfluoreszenz mit dem sekundären Antikörper alleine durchgeführt. Ein Beispiel ist hier dargestellt. j) Darm, Kontrolle der Immunfluoreszenz. Maßstab 100µm.

In Abb. 27 a-c ist der Unterkieferbereich eines 14 Tage alten Embryos abgebildet. Die Kernfärbung zeigt den Meckelknorpel und die von starkem Bindegewebe umgebene Unterkieferdrüse. CAP1 wurde spezifisch in der Drüse, nicht aber im umgebenden Bindegewebe lokalisiert. Außerdem ist CAP1 im Meckelknorpel exprimiert. Diese Struktur bildet später Teile des Unterkiefers sowie Hammer und Ambos. In Abb. 27 g-i ist die CAP1 Detektion im Meckelknorpel am Tag 16 der Entwicklung zu sehen. Die Struktur ist deutlich größer als am Entwicklungstag 14 und CAP1 wurde hier auch im Inneren des Knorpels detektiert. Neben diesen im Unterkiefer gelegenen Strukturen konnte CAP1 auch in den Anlagen der Schnurrhaarfollikel (Abb. 27 d-i) und dem mehrreihigen Epithel der Nasenhöhle (Abb. 27 j-l) detektiert werden. Bei diesem Epitheltyp haben alle Zellen Kontakt zur Basalmembran. Die Zelldichte ist damit an dieser Stelle besonders hoch, was erklären könnte, warum das CAP1 Signal am äußeren Rand des Epithels am stärksten ist.

Neben diesen Geweben konnte CAP1 in der Cochlea und dem diese Struktur umgebenden Knorpelvorläufer detektiert werden (Abb. 28 a-c). Der Knorpelvorläufer bildet in späteren Stadien Teile des Schädelknochens. An der Cochlea fällt auf, dass das Signal für CAP1 an der Innen- und Außenseite intensiver ist als in der dazwischen gelegenen Schicht.

CAP1 konnte während der Embryonalentwicklung auch im Gehirn detektiert werden. Es wird in den Entwicklungsstadien Tag 14 und 16 in Teilen des Mittelhirns so wie im *Corpus callosum* exprimiert (Abb. 28. d-l). Im Entwicklungsstadium Tag 10 wurde CAP1 in der äußeren Schicht des Neuralrohrs detektiert (Abb. 29 g-i). Diese marginale Zellschicht bildet später myelinisierte Fasern und die weiße Gehirnmasse. Auch im Darm und in den Bronchien konnte CAP1 detektiert werden (Abb. 29 a-f). Die Bronchien sind an der Innenseite mit Epithel ausgekleidet und von Knorpel umgeben. Die Überlagerung des CAP1 und des DAPI Signals zeigen, dass CAP1 vermehrt im Epithel der Bronchien exprimiert wird. In Schichten ist auch der Darm aufgebaut. Hier sind es jedoch drei. Ein inneres Epithel ist umgeben von Muskel, welcher von einer äußeren Schicht aus Bindegewebe umgeben ist. CAP1 konnte hier in der Epithel- und der Bindegewebsschicht nachgewiesen werden.

Die Gewebe in denen CAP1 detektiert werden konnte, entstammen allen drei Keimblättern. Damit ist CAP1 nicht auf eine bestimmte Gewebeklasse beschränkt.

3.2.6 Lokalisation von eGFP-CAP1 und endogendem CAP1 in Keratinozyten

Zur Untersuchung der Lokalisation von CAP1 in Keratinozyten wurden A431 (Mensch) und Pam212 (Maus) Zellen verwendet. Für beide Zellen konnte eine CAP1 Expression im Westernblot nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von CAP1 mittels indirekter Immunfluoreszenz in Paraformaldehyd-fixierten Zellen konnten aber keine zuverlässigen Daten für A431 Zellen gewonnen werden, weil die Signale schwach und diffus waren. Die Lokalisierung von CAP1 wurde in diesen Zellen daher mit Hilfe der Expression von eGFP-CAP1 untersucht.

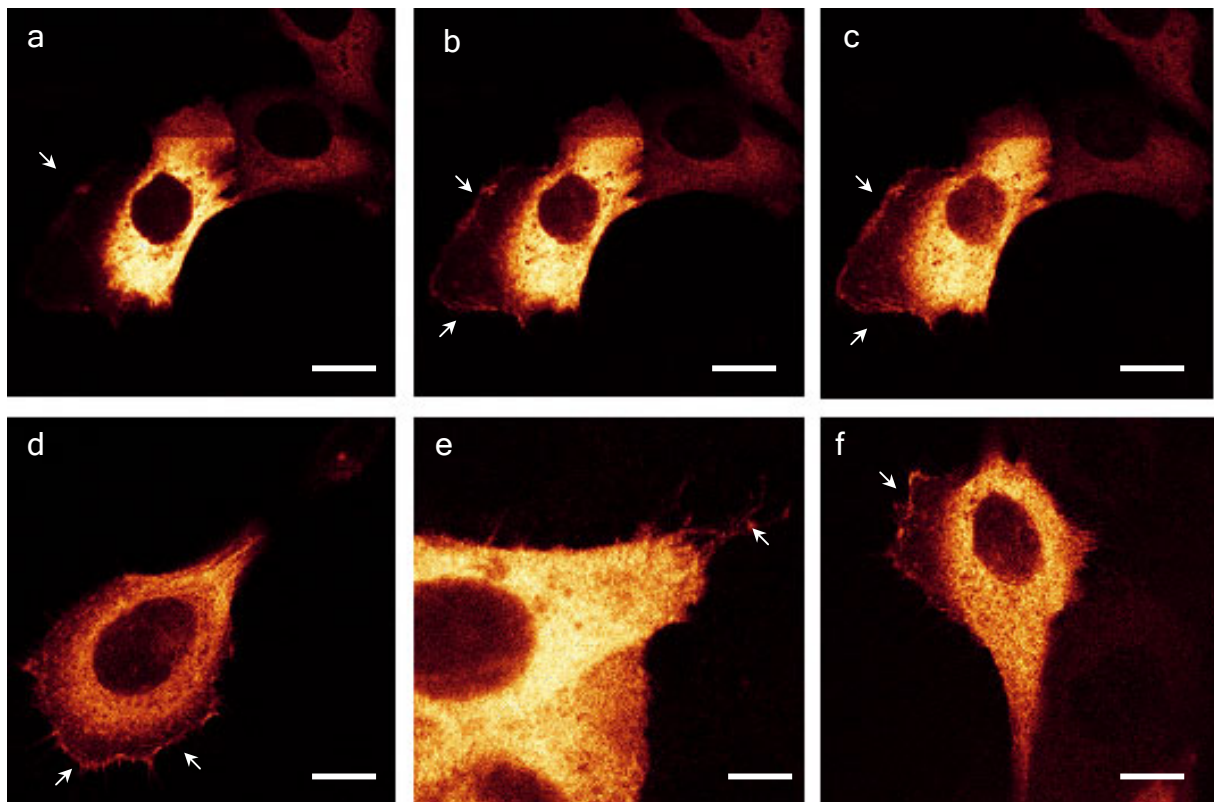


Abb. 30 Lokalisation von eGFP-CAP1 in Paraformaldehyd-fixierten A431 Keratinozyten. Weiße Pfeile weisen auf CAP1 an den Zellfortsätzen. a-c) Darstellung von 3 Ebenen in eGFP-CAP1 exprimierenden A431 Zellen. Von links nach rechts nimmt die Ebenenhöhe ab; Maßstab 20 μ m. d) Einzelzelle bei der Migration; Maßstab 13 μ m. e) Zelle im Zellverband mit Zellfortsätzen; Maßstab 6,5 μ m. f) Zelle im Zellverband am Beginn der Migration; Maßstab 13 μ m.

In Abb. 30 sind mit Paraformaldehyd fixierte A431 Zellen dargestellt, die eGFP-CAP1 exprimieren. eGFP-CAP1 ist vor allem zytoplasmatisch lokalisiert und ist im gesamten Zellkörper mit Ausnahme des Zellkerns sichtbar. In Abb. 30 a-c sind im rechten oberen Bildrand zwei Zellen sichtbar, deren eGFP-CAP1-Expressionsniveau niedrig ist. Diese Zellen geben der Migration der benachbarten Zelle eine Richtung vor. Dazu bildet die Zelle Lamellipodien aus, wobei deutlich wird, dass eGFP-CAP1

nicht nur im Zellkörper, sondern auch am Leitsaum lokalisiert ist. Ähnliches ist in Abb. 30 f zu beobachten. In Abb. 30 d ist eine Zelle bei der Migration dargestellt. Sie besitzt keine Kontakte zu Zellen in der Umgebung. Die Lamellipodien sind ausgeprägt und auch hier befindet sich eGFP-CAP1 neben seiner Lokalisation im Zellkörper, an der Front der Lamellipodien. Abb. 30 e zeigt eine Gruppe von Zellen. Eine der Zellen bildet dünne Fortsätze aus, in denen das GFP Fusionsprotein lokalisiert ist. In Abb. 31 und 32 wurden die Zellen nach der Fixierung permeabilisiert und das Aktinzytoskelett mit TRITC-Phalloidin gefärbt. Die dünnen Zellfortsätze, in denen das CAP1 Fusionsprotein lokalisiert ist, werden auch von TRITC-Phalloidin gefärbt. Die Überlagerungen des eGFP und des TRITC Kanals in Abb. 32 i zeigt zusätzlich auch die Kolokalsiation von eGFP-CAP1 und Aktin für den Leitsaum (Pfeilkopf).

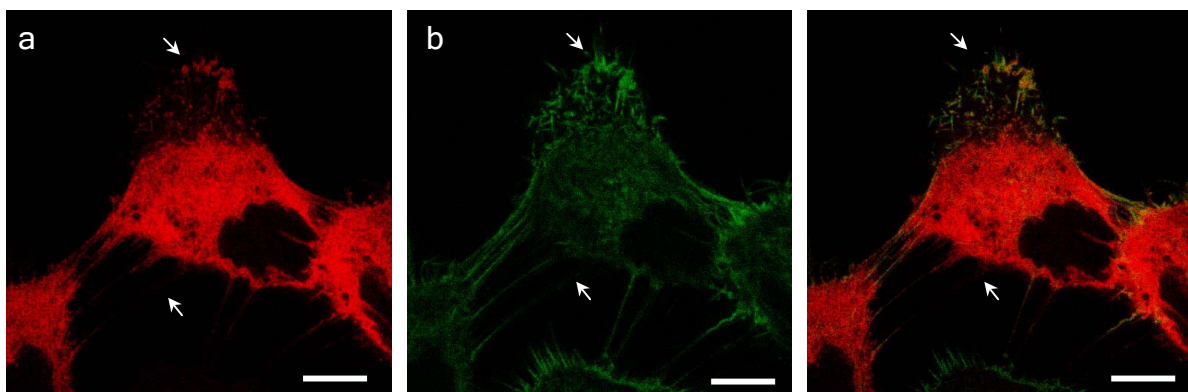


Abb. 31 Lokalisation von eGFP-CAP1 (rot-orange) und Aktinzytoskelett (grün). Nach Paraformaldehydfixierung und 0,5% Triton X-100 Permeabilisierung. Das Aktinzytoskelett wurde mit TRITC-Phalloidin angefärbt. a) eGFP-CAP1 Fluoreszenz, b) Aktinzytoskelett, c) Überlagerung der Kanäle aus a und b. Die Pfeile weisen auf die Zellfortsätze, die sowohl in der eGFP Fluoreszenz als auch in der TRITC-Phalloidin Fluoreszenz zu sehen sind; Maßstab 9 μm .

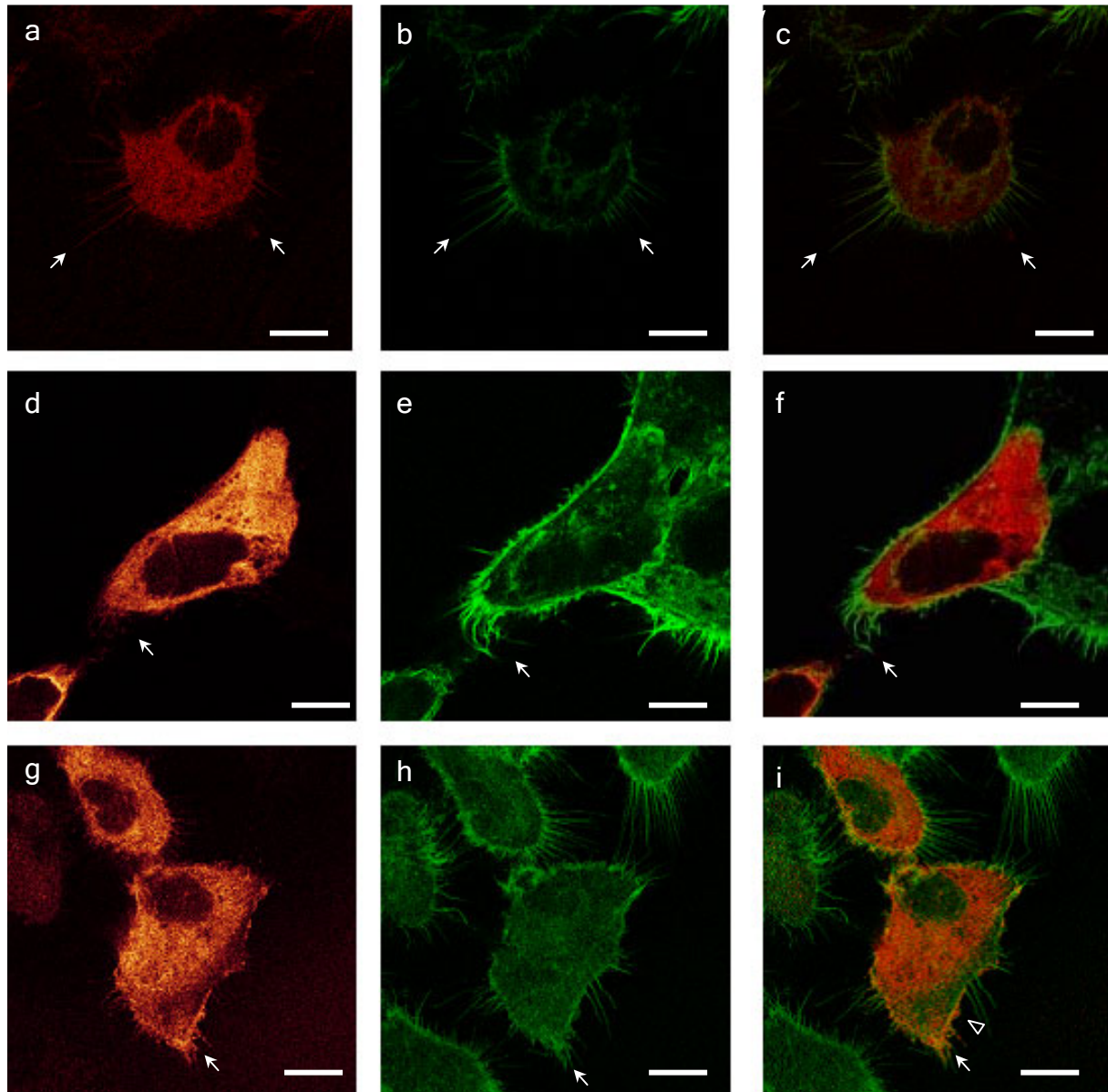


Abb. 32 Lokalisation von eGFP-CAP1 (rot-orange) und Aktinzytoskelett (grün) nach Paraformaldehydfixierung und 0,5 % Triton X-100 Permeabilisierung. Das Aktinzytoskelett wurde mit TRITC-Phalloidin angefärbt. a, d, g) eGFP-CAP1 Fluoreszenz, b, e, h) Aktinzytoskelett, c, f, i) Überlagerung der Kanäle aus a, d, g und b, e, h. Die Pfeile weisen auf die Zellfortsätze (Filopodien), die sowohl CAP1 Fluoreszenz als auch F-Aktin enthalten. Der Pfeilkopf weist auf Bereiche in den Filopodien, in denen eine Kolokalisation beobachtet wurde. Maßstab: a-f 10 μm , g-i 12 μm .

Nachdem die Lokalisation des eGFP-CAP1 Fusionsproteins in humanen Keratinozyten untersucht worden war, wurde mit Hilfe des affinitätsgereinigten

polyklonalen anti-CAP1 Antikörpers die Lokalisation von endogenem CAP1 in fixierten Pam212 Keratinozyten untersucht.

In Abb. 33 a-c sind das F-Aktinzytoskelett und die CAP1-Verteilung einer Pam212 Zelle dargestellt. Die Verteilung von endogenem CAP1 ist vergleichbar der des CAP1 Fusionsproteins in A431 Zellen. CAP1 ist im Zellkörper und an der Membran der Lamellipodien lokalisiert (Abb. 33 a). Abb. 33 c zeigt deutlich die Kolokalisation von CAP1 und F-Aktin Zytoskelett an den Lamellopodien während für den Zellkörper keine Kolokalisierung ausgemacht werden konnte. Abb. 33 d-f zeigt eine Übersicht über 3 Ebenen einer Pam212 Zellgruppe. Sehr deutlich wird hier die Lokalisation von CAP1 am Leitsaum der Zelle

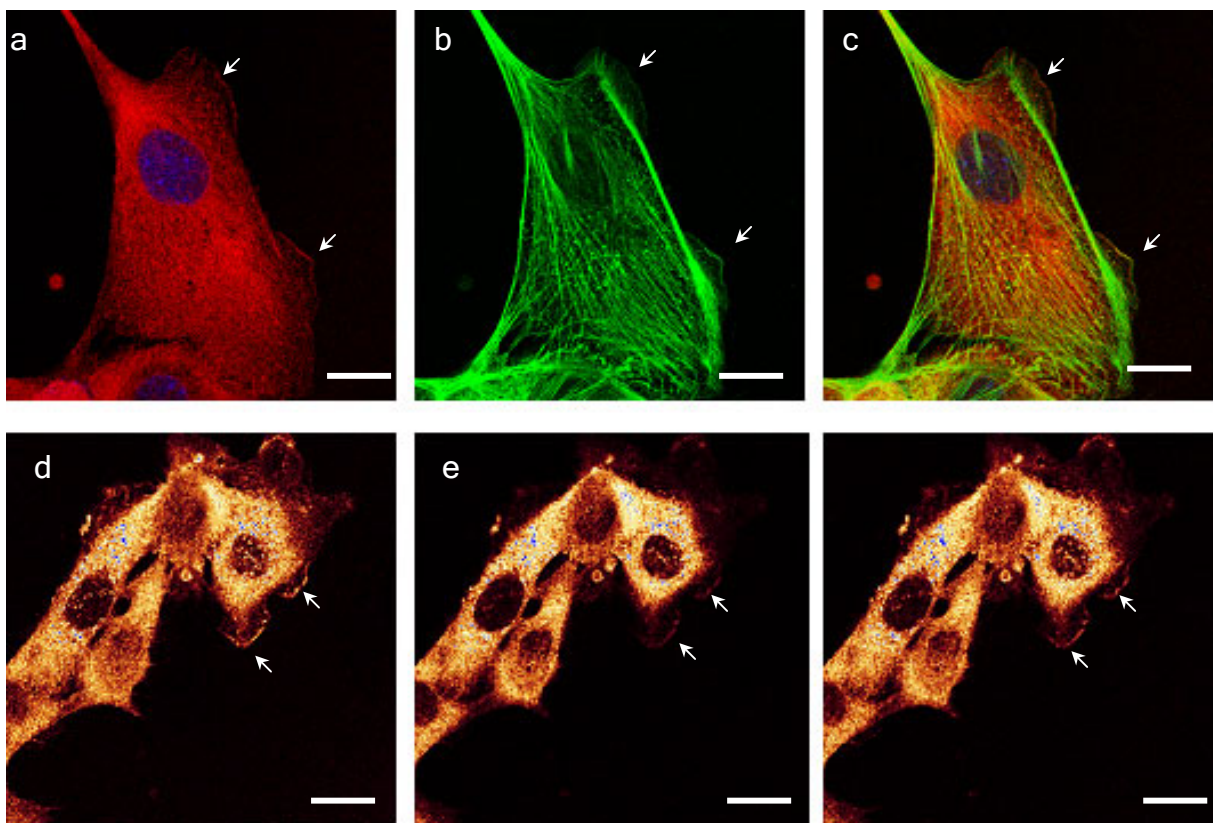


Abb. 33 Lokalisierung von CAP1 in Pam212 Zellen. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. CAP1 wurde mit affinitätsgereinigtem, polyklonalem anti-CAP1 Antikörper detektiert und durch einen sekundären Alexa 568 gekoppelten Antikörper sichtbar gemacht. a-c) Das Aktinzytoskelett wurde mit FITC-Phalloidin gefärbt, die Kerne wurde mit DAPI gefärbt. Die weißen Pfeile weisen auf die Lamellipodien an denen CAP1 und Aktin lokalisiert sind; a) CAP1 (rot) und DAPI (blau), b) Aktinzytoskelett (grün), c) Überlagerung der Fluoreszenzsignale. Maßstab 20 μm . d-f) Drei Ebenen einer Zellgruppe. Die weißen Pfeile weisen auf CAP1, das am Leitsaum der Zelle lokalisiert ist; Maßstab 18,5 μm .

3.2.7 Lokalisation von eGFP-CAP1 in differenzierten und undifferenzierten Neuro-2a Zellen

Neuro-2a Zellen stammen von Neuroblastom Zellen ab. Mit dem polyklonalen anti-CAP1 Antikörper konnte die Expression von CAP1 in diesem Zelltyp in Westernblots nachgewiesen werden. Dabei waren aber manchmal zusätzliche unspezifische Banden zu erkennen. Auch der Einsatz des affinitätsgereinigten, polyklonalen anti-CAP1 Antikörpers brachte keine Verbesserung. Daher wurde für die Untersuchung der CAP1 Lokalisation in Neuro-2a Zellen nicht die indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern, sondern die Expression von eGFP-CAP1 angewendet. Die Lokalisierung von eGFP-CAP1 wurde hier sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten Paraformaldehyd-fixierten Neuro-2a Zellen untersucht.

In Abb. 34 sind 4 Ebenen einer eGFP-CAP1 exprimierenden differenzierten Neuro-2a Zelle dargestellt. Die Zelle ist umgeben von schwach exprimierenden Zellen und bei einer dieser Zellen gibt es Kontakte über das Axon bzw. den Wachstumskegel. In der Ebene 4 (Abb. 34 d) wird die Lokalisation des CAP1 Fusionsproteins im Wachstumskegel besonders deutlich. Hier übertrifft das eGFP-CAP1 Signal die Intensität des Signals im Zellkörper. Im Zellkörper selbst scheint die Verteilung von eGFP-CAP1 gleichmäßig zu sein, während in der undifferenzierten N2A Zelle in Abb. 35 a das eGFP Signal in den äußeren Bereichen der Zelle verstärkt ist im Vergleich mit dem Zellinneren. Die Zellen in Abb. 35 b, c, d zeigen ein auswachsendes Axon mit einem Wachstumskegel an der Zellfront. Wie bei der differenzierten Zelle in Abb. 34 ist eine gleichmäßige Verteilung des CAP1 Fusionsproteins über den Zellkörper zu erkennen. Gleichzeitig wird die vermehrte Lokalisation von eGFP-CAP1 im Wachstumskegel deutlich (Abb. 35 c). Abb. 35 d zeigt zwei Zellen, die über Fortsätze Kontakt zueinander aufgenommen haben. An den Kontaktstellen ist eGFP-CAP1 konzentriert.

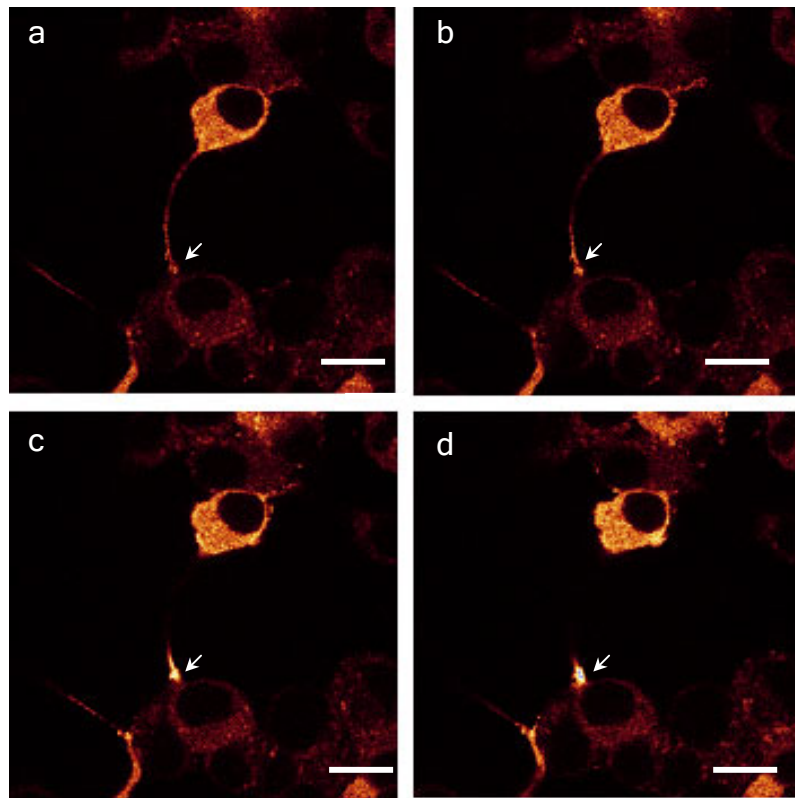


Abb. 34 Lokalisation von eGFP-CAP1 in differenzierten Neuro-2a Zellen. Die Zellen wurden 2 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert und dann mit Paraformaldehyd fixiert. a-d) 4 verschiedene Ebenen einer differenzierten Zelle; Maßstab 13 μm .

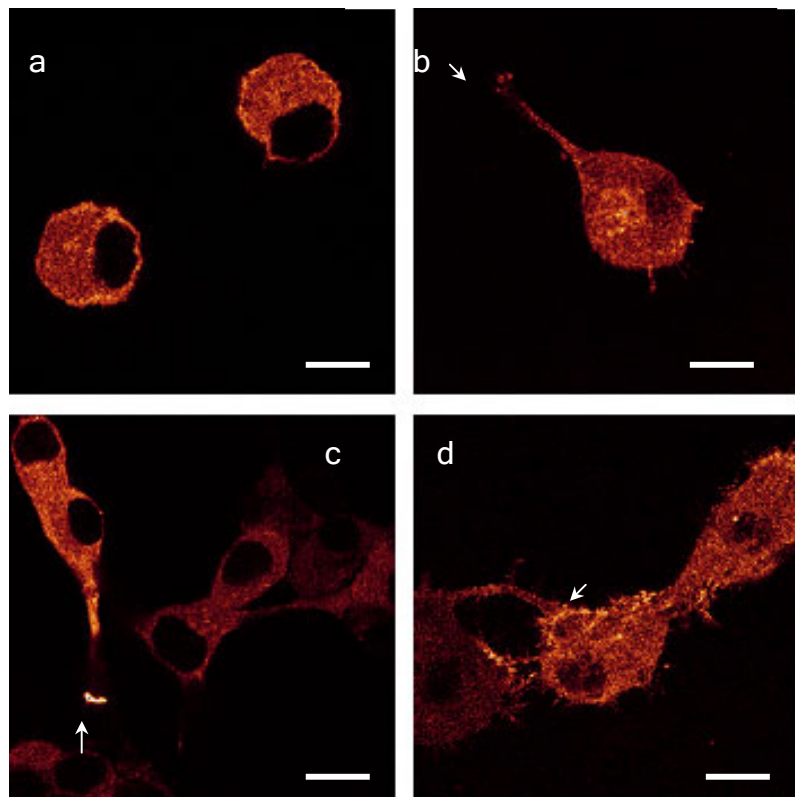


Abb. 35 Lokalisation von eGFP-CAP1 in undifferenzierten und differenzierten Neuro-2a Zellen. Differenzierte Zellen wurden vor der Paraformaldehydfixierung 2 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert. a) 2 undifferenzierte Zellen. b und c) differenzierte Zellen haben ein Axone gebildet. Der weiße Pfeil weist auf das eGFP-CAP1 Signal am Wachstumskegel. d) Ausdifferenzierte Zellen bilden Kontakte über Zellfortsätze. An den Kontaktstellen ist das Signal stärker (weißer Pfeil). Maßstab 12 μm .

3.2.8 Lokalisation von CAP1 in C3H10T1/2 Fibroblasten

Zur Untersuchung der Lokalisation von endogenem CAP1 in migrierenden Fibroblasten wurden CH310T1/2 Fibroblasten verwendet. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und CAP1 wurde mit affinitätsgereinigtem anti-Cap1 Antikörper detektiert.

Abb. 36 a zeigt eine migrierende Zelle. CAP1 ist an der Front des Lamellipodiums konzentriert und im Zellkörper in der Nähe des Zellkerns angereichert. Die höchste Konzentration wird hier jedoch im Uropod der Zelle beobachtet. Zellen, die sich in der Initialphase der Wanderung befinden (Abb. 36 b, d), zeigen ebenfalls eine erhöhte CAP1-Anreicherung an den Fronten (Pfeile). In Abb. 36 d-f wird die Verteilung von CAP1 und F-Aktin verglichen. Auch hier ist keine ausgeprägte Kolo-kalisation von CAP1 an den Stressfasern zu beobachten dagegen findet sich am Lamellipodienrand eine Überlagerung der Färbung (Pfeil).

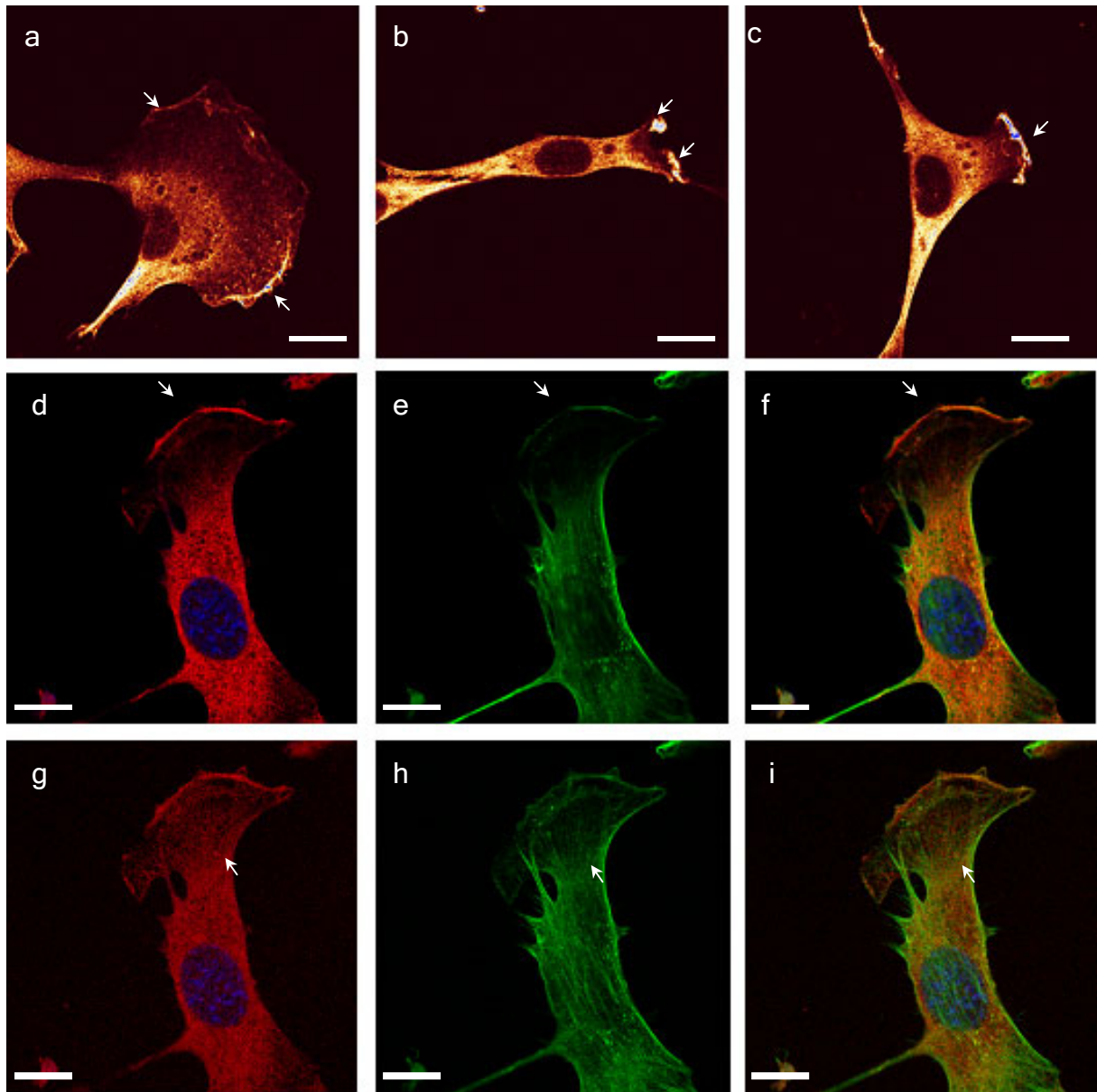


Abb. 36 Lokalisation von CAP1 in migrierenden Fibroblasten. CH310T1/2 Fibroblasten wurden mit Paraformaldehyd fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde mit affinitätsgereinigtem polyklonalem anti-CAP1 Antikörper und sekundärem Alexa 568 gekoppelten Antikörper durchgeführt. In d-i wurde das Aktinzytoskelett mit FITC-Phalloidin sichtbar gemacht und die Kerne mit DAPI markiert. a-c) Migrierende Zellen mit CAP1 Signal an den Lamellipodiengrenzen (weißer Pfeil). d, g) Detailansicht der CAP1 Lokalisation (rot), e, h) Detailansicht des Aktinzytoskeletts (grün), f, i) Überlagerung der Kanäle. d-f) Pfeile weisen auf CAP1 und F-Actin an der Spitze. g-i) Pfeile weisen auf F-Aktin Stressfasern. Es gibt keine Kolokalisation mit CAP1 Maßstab: a) 16mm, b) 15µm, c) 19µm, d-i) 20µm.

3.2.9 Wundheilungsexperiment

Im Wundheilungsexperiment wird die Situation am Wundrand einer Verletzung simuliert. Um eine Wunde wieder zu verschließen, proliferieren die Zellen am Wundrand und wandern von dort in die Wunde ein. In der Kulturschale wird diese Situation durch einen „Schnitt“ in einer konfluenten Zellschicht simuliert. Die hier verwendeten Fibroblasten und Keratinocyten migrieren von den „Wundrändern“ in das Zentrum des „Schnittes“. Nach der Fixierung der Zellen zu verschiedenen Phasen des Wundheilungsprozesses wurde die Lokalisation von CAP1 untersucht (Abb. 37, 38).

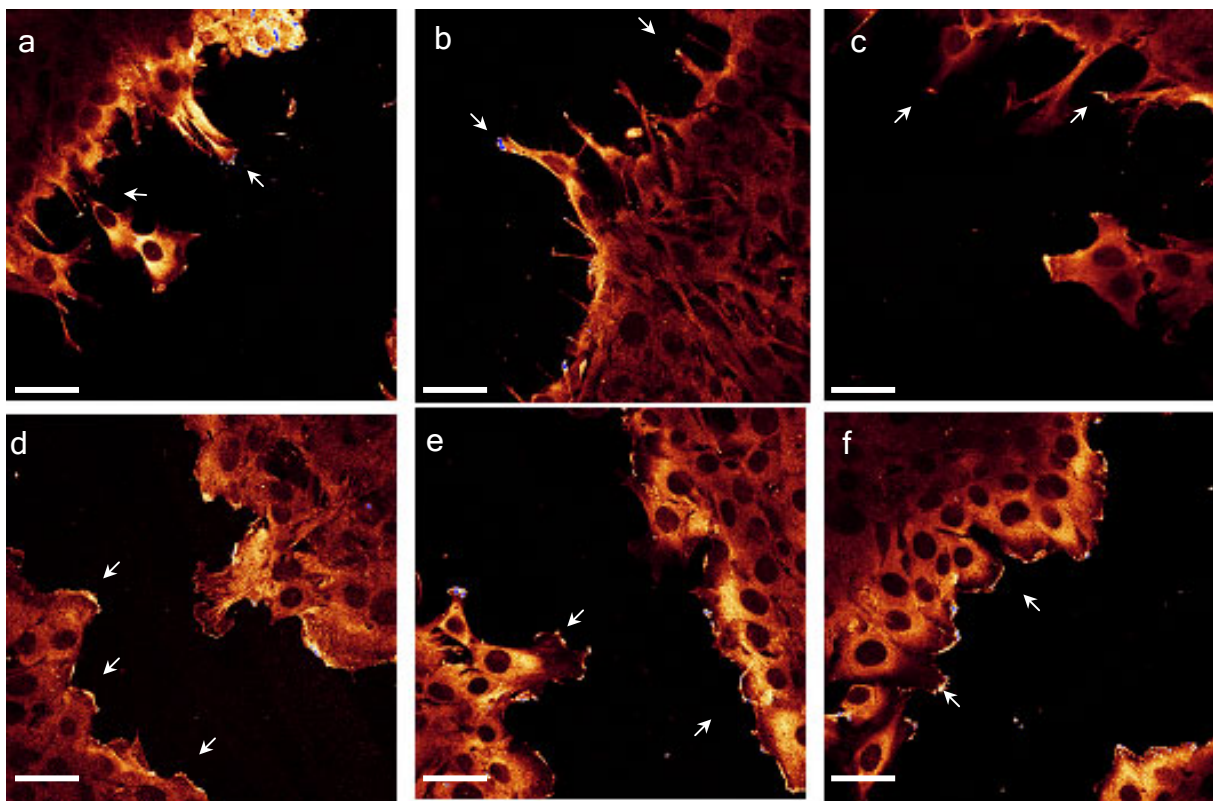


Abb. 37 Wundheilungsexperiment mit CH310 T1/2 Fibroblasten. Übersicht: Mit einer Kanüle wurde in eine konfluente Zellschicht ein Schnitt eingefügt. Die Zellen wurden nach einigen Minuten (a-c) und nach 3h (d-f) mit Paraformaldehyd fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde mit dem polyklonalen anti-Cap1 Antikörper und einem sekundären Alexa 568 gekoppelten Antikörper durchgeführt. Die weißen Pfeile deuten auf das CAP1 Signal in den zum Schnitt hin gerichteten Zellfortsätzen. Maßstäbe: a, b) 47 μm , c) 41 μm , d-f) 47 μm .

Innerhalb der ersten Minuten bilden die Fibroblasten am „Wundrand“ lange schmale Fortsätze aus (Abb. 37 und 38 a-c). CAP1 ist an den Spitzen der Fortsätze lokalisiert. Aktin-Fasern strahlen aus dem hinteren Bereich der Zelle in die Fortsätze (Abb. 38 a-c). An der Spitze geht die Faserstruktur in eine mehr punktartige Verteilung über.

F-Aktin und CAP1 kolokalisieren nur im Bereich der Spitzen der langen Fortsätze und in den Lamellipodien. Aber auch hier ist die Kolokalisation nur begrenzt. Dies trifft besonders für die lamellipodiale Färbung in Abb. 38 a-c zu. Drei Stunden nach Einfügen des Schnitts hat sich die Form der Fibroblasten verändert. Die schmalen Zellfortsätze haben sich in breite Lamellipodien umgewandelt. Die „Wundränder“ sind glatter. Deutlicher als nach den ersten Minuten ist CAP1 an den Lamellipodienrändern lokalisiert (Abb. 37 d-f). In der Detailansicht (Abb 38 d-f) ist die Kolokalisation von CAP1 mit F-Aktin in diesen Bereichen ersichtlich.

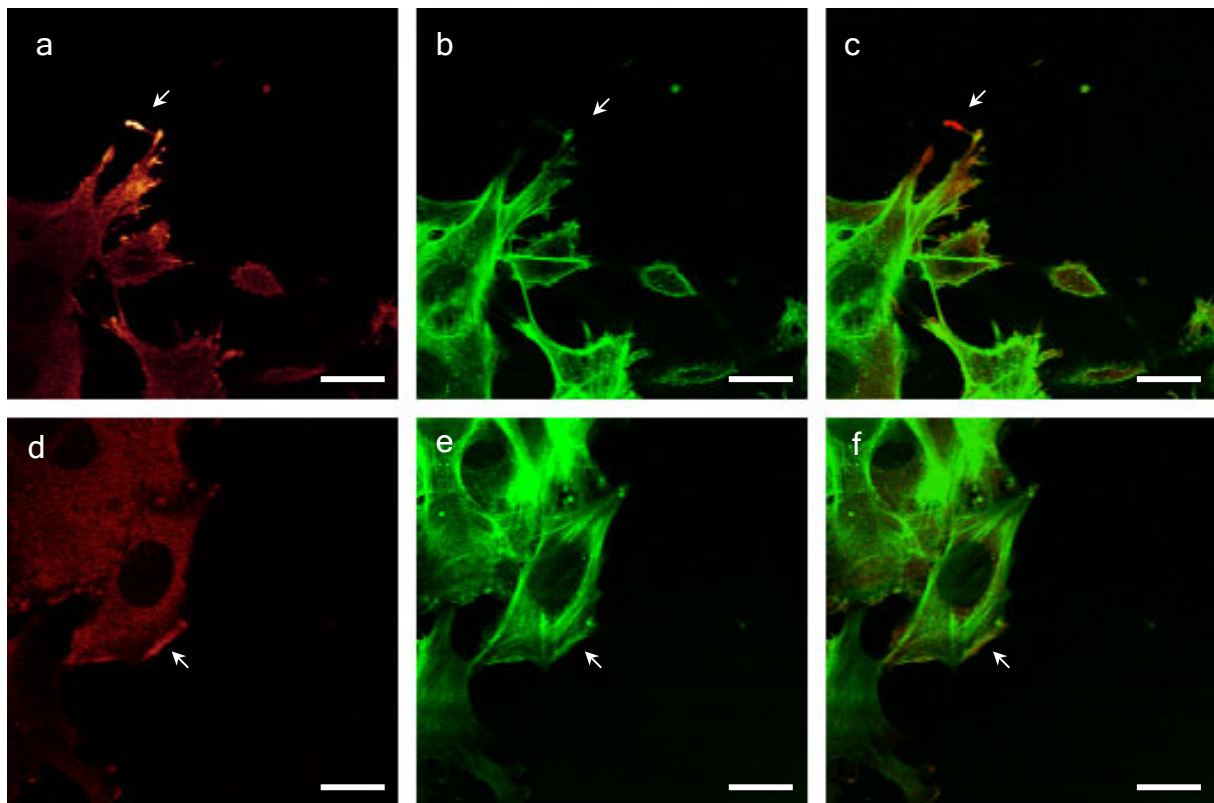


Abb. 38 Wundheilungsexperiment mit CH310T $\frac{1}{2}$ Fibroblasten- Detailansicht: Mit einer Kanüle wurde in eine konfluente Zellschicht ein Schnitt eingefügt. Die Zellen wurden nach einigen Minuten (a-c) und nach 3h (d-f) mit Paraformaldehyd fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die indirekte Immunfluoreszenz (a, d) wurde mit dem polyklonalen anti-Cap1 Antikörper und einem sekundären Alexa 568 gekoppelten Antikörper durchgeführt (rot). Das Aktinzytoskelett (b, e) wurde mit FITC Phalloidin (grün) markiert. In c und f sind die Überlagerungen der Signale abgebildet. Die weißen Pfeile deuten auf das CAP1 bzw. das Aktin Signal in den zum Schnitt hin gerichteten Zellfortsätzen- und bereichen. Maßstab 19 μ m.

Im Wundheilungsexperiment mit Keratinozyten wurde im Gegensatz zu CH310T1/2 Fibroblasten kein Unterschied zwischen Kurzzeit -und Langzeitreaktion bei der Wundheilung festgestellt. Deshalb ist nur ein Zeitpunkt gezeigt.

In Abb. 39 sind die Vorderseiten von drei Pam212 Keratinozyten abgebildet. Vorderseite (Front) bedeutet in diesem Fall die zum Schnitt gewandte Seite. Der hintere Bereich der Zellen wird überlagert von weiteren Keratinozyten. Die Zelle oben links im Bild hat Lamellipodien ausgebildet. F-Aktin Fasern strahlen vom Aktinkortex am Rand des Zellkörpers in die Lamellipodien und bilden unter der Membran wieder einen Kortex aus. Auch CAP1 ist hier lokalisiert. Seine Verteilung überlappt hier mit F-Aktin.

Damit ist CAP1 sowohl in Fibroblasten als auch in Keratinozyten in der Front der Zellen lokalisiert, wenn sie in einen „Wundbereich“ einwandern. Unklar ist dabei noch, ob sich der dünne Aktinkortex am Leitsaum bilden kann, weil CAP1 dort lokalisiert ist, oder ob CAP1 dort lokalisiert ist, weil sich ein Aktinkortex ausbildet.

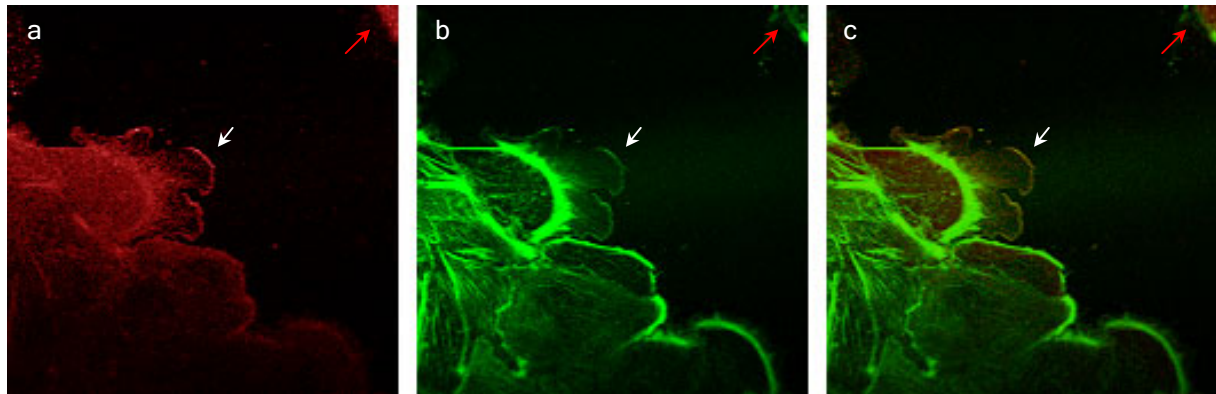


Abb. 39 Wundheilungsexperiment mit Pam212 Keratinozyten. Detailansicht: Die Zellen wurden nach 1 Stunde mit Paraformaldehyd fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. CAP1 wurde mit dem affinitätsgereinigten, polyklonalen anti-Cap1 Antikörper und einem sekundären Alexa 568 gekoppelten Antikörper detektiert (rot). Das Aktinzytoskelett wurde mit FITC Phalloidin (grün) markiert. a) Lokalisation von CAP1, b) Aktinzytoskelett, c) Überlagerung der Kanäle. Die weißen Pfeile deuten auf das CAP1 bzw. das Actin Signal an den Grenzen der Lamellipodien, die sich zur „Wunde“ hin ausgebildet haben. Der rote Pfeil weist auf die Zellen auf der gegenüberliegenden Schnittseite. Maßstab 19 μm .

3.2.10 Subzelluläre Fraktionierung

Nachdem CAP1 in den Immunfluoreszenzstudien sowohl im Zytosol der Zellen als auch an Lamellipodien von Fibroblasten und Keratinocyten nachgewiesen werden konnte, sollte mit biochemischen Verfahren die subzelluläre Lokalisation von CAP1 untersucht werden. Dazu wurden zuerst die 500 x g, 10.000 x g und 100.000 x g Pellets sowie der 100.000 x g Überstand von Zellhomogenaten im Westernblot mit

dem anti-CAP1 Antikörper untersucht. Dabei wurde CAP1 in allen Fraktionen nachgewiesen.

Um zu klären, ob CAP1 neben seiner zytosolischen Lokalisation auch membranassoziiert vorliegt oder ob CAP1 als Multimer vorkommt und deshalb sedimentiert, wurde eine subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe eines Dichtegradienten durchgeführt. Dazu wurden A431 und Jurkat Zellen homogenisiert und Zellkerne sowie intakte Zellen durch Zentrifugation bei 500 x g abgetrennt. Der zell- und zellkernfreie Überstand wurde auf einen Stufengradienten aus 9 Schichten mit 15 % bis 60 % Saccharose geschichtet. Der Gradient lagerte auf einem Kissen aus 80 %iger Saccharoselösung. Zusammen mit dem Homogenat ergab dies insgesamt 11 Schichten unterschiedlicher Dichte. Nach Zentrifugation bei 100.000 x g wurden von jeder Schicht 2 Fraktionen genommen. Auch das Pellet der Zentrifugation wurde resuspendiert und bildete die 23. Fraktion. Die Fraktionen wurden in einem Immunoblot mit anti-CAP1 Antikörper, mit anti- β -Aktin Antikörpern und mit anti- β -COP Antikörpern untersucht (Abb. 40 Saccharosegradient für A431, Abb. 41 Saccharosegradient für Jurkat Zellen).

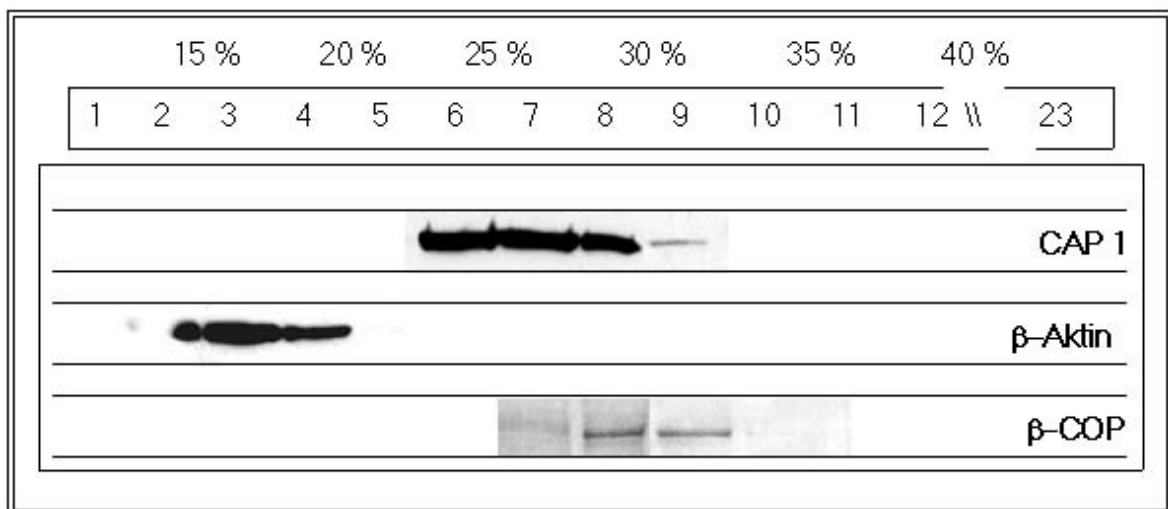


Abb. 40 Westernblot der subzellulären Fraktionierung von A431 Zellhomogenat. Die Immundetektionen wurden mit polyklonalem anti-CAP1 Antikörper, monoklonalem anti- β -Aktin Antikörper und monoklonalem E5-A3 Antikörper gegen β -COP durchgeführt und mit den entsprechenden Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpern und anschließender Chemolumineszenzreaktion mit Luminol sichtbar gemacht. Spur 1, Fraktion geringster Dichte (0 % Saccharose). Spur 21, Fraktion höchster Dichte (80 % Saccharose).

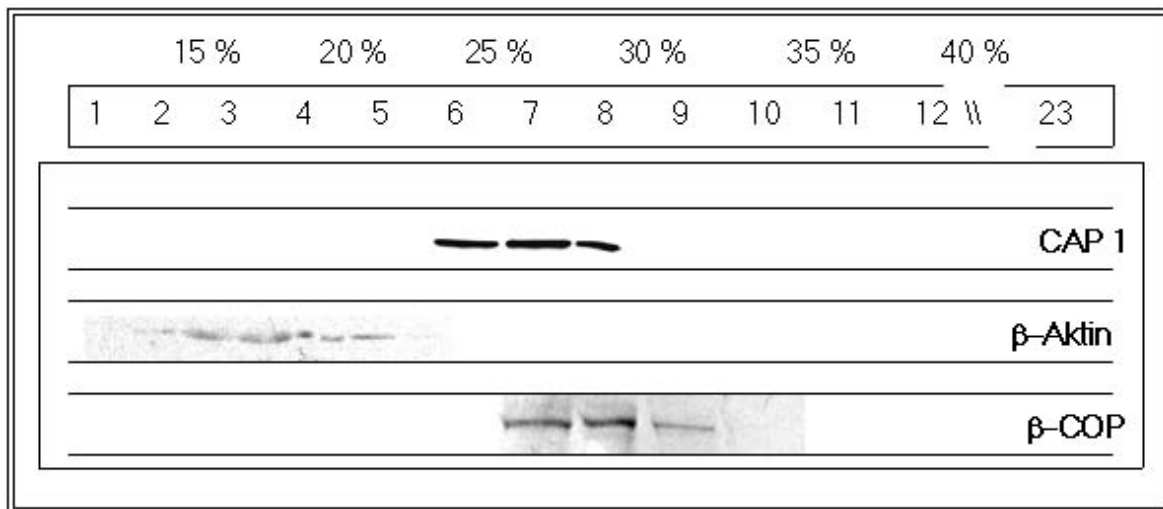


Abb. 41 Westernblot der subzellulären Fraktionierung von Jurkat-Zellhomogenat. Immundetektion und Beschreibung entspricht der oberen Abbildung.

β -Aktin gilt als Marker für die Position von zytosolischen Proteinen im Dichtegradienten, während β -COP einen Marker für die Position von Golgimembranproteinen und somit membranassoziierten Komponenten darstellt. Die Position des CAP1 Signals weicht in beiden Fällen (A431 und Jurkat Zellen) deutlich von der des zytosolischen Markers ab. CAP1 nimmt, indem es der Position des β -COP Signals nahe kommt, eher die Position eines Membran- oder membranassoziierten Proteins als eines zytosolischen Proteins ein.

3.2.11 Auftriebs-Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Eine reine Membranassoziation von CAP1, die das Verhalten des Proteins in der Dichtegradientenzentrifugation erklären könnte, steht im Widerspruch zu den Daten der Immunfluoreszenzanalysen, die mit verschiedenen Zelltypen durchgeführt wurden (s. 3.2.6-8). Die Position von CAP1 im Saccharosegradienten kann auch durch die Bildung eines Multimers erklärt werden.

Um dies zu prüfen, wurde eine Auftriebs-Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurde A431 Zellysat in 65 %iger Saccharoselösung hergestellt und als unterste Schicht in den Gradienten geladen. Darüber lagerten in 10 %igen Schritten die Dichteschichten von 50 % bis 10 % Saccharose, die von einer saccharosefreien Schicht abgeschlossen wurden. Während der Zentrifugation ordnen

sich die Membranen ihrer Dichte entsprechend im Gradienten an und membranassoziierte Proteine flottieren mit den Membranen aus der ca. 60 %igen Zellsatzschicht zu Schichten geringerer Dichte. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient fraktioniert und 15 Fraktionen wurden erhalten. Das Pellet bildete die Fraktion Nr. 16. Alle Fraktionen wurden in einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. In der Westernblot Analyse wurde die Verteilung von CAP1 und Coronin-3 (Crn 3) getestet (Abb. 42). Für Coronin-3 war bereits eine Membranlokalisierung beschrieben und das Protein konnte so als Marker für ein aufwärts flottierendes Protein gelten [Spoerl *et al.*, 2002].

Wie erwartet war das Coronin-3 Signal nicht nur in den untersten Fraktionen des Gradienten zu finden, sondern auch in Fraktionen geringerer Dichte. Das CAP1 Signal ist dagegen nur in der 60 % Fraktion und der unteren Hälfte der 50 % Fraktion nachweisbar. Sein Vorkommen im Gradienten (Abb. 40) ist deshalb auf die Ausbildung von hochmolekularen Komplexen zurückzuführen.

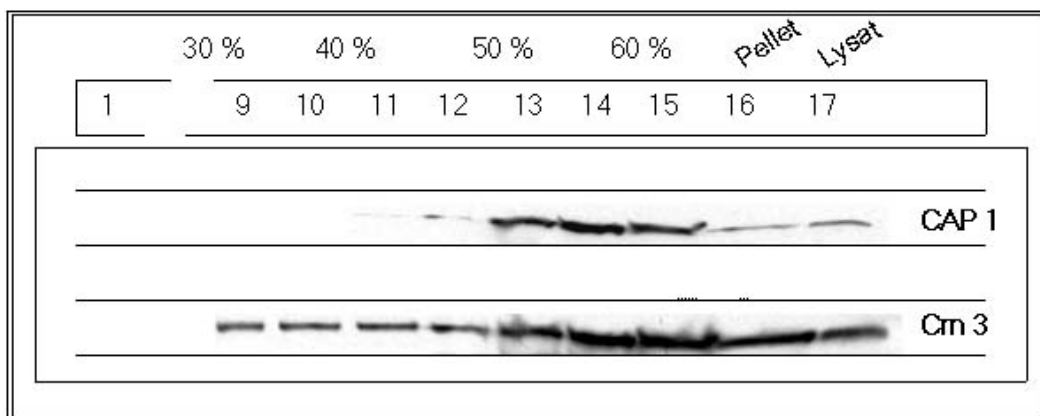


Abb. 42 Westernblot Analyse des Auftriebs-Saccharosegradienten. Die Immundetektionen wurden mit dem polyklonalen anti-CAP1 Antikörper und dem monoklonalen K6-444-4 Antikörper gegen Crn 3 durchgeführt und mit den entsprechenden sekundären Peroxidase gekoppelten Antikörpern die Bindung in der nachfolgenden Chemolumineszenzreaktion mit Luminol sichtbar gemacht. Spur 1, Fraktion geringster Dichte (0% Saccharose). Spur 15, Fraktion höchster Dichte (60% Saccharose). In den Spuren 16 und 17 sind die Immunreaktionen mit dem Pellet des Gradienten und dem A431 Gesamthomogenat abgebildet.

3.2.12 Immunpräzipitation des eGFP-CAP1 Fusionsproteins

Um Interaktionspartner von CAP1 zu identifizieren, wurde eine Immunpräzipitation (IP) von eGFP-CAP1 durchgeführt. Hierzu wurden eGFP-CAP1 exprimierende HEK293 Zellen homogenisiert und mit monoklonalen K12-481-3 Antikörper gegen eGFP inkubiert. Die Antikörper-Komplexe wurden anschließend mit Protein A Sepharose präzipitiert. Zur Kontrolle unspezifischer Bindung von Zellkomponenten an Protein A Sepharose, wurde eine Präzipitation mit Zellysat und Protein A Sepharose ohne Zugabe des anti-eGFP Antikörpers durchgeführt. Die Auftrennung der präzipitierten Proteine der IP im Coomassie Blau gefärbten 12 %igen SDS-Polyacrylamid Gel zeigte die leichte und schwere Kette des anti-GFP Antikörpers und 4 weitere Banden. In der Kontrolle konnten nur sehr geringe Mengen an Protein detektiert werden. Die präzipitierten Proteine wichen in der Größe deutlich von denen der IP ab.

Die 4 unbekanntenen Proteinbanden der IP wurden ausgeschnitten und mit Hilfe der Massenspektrometrie nach vorangegangenem Trypsinverdau identifiziert. Die identifizierten Proteine waren mit eGFP-CAP1 identisch.

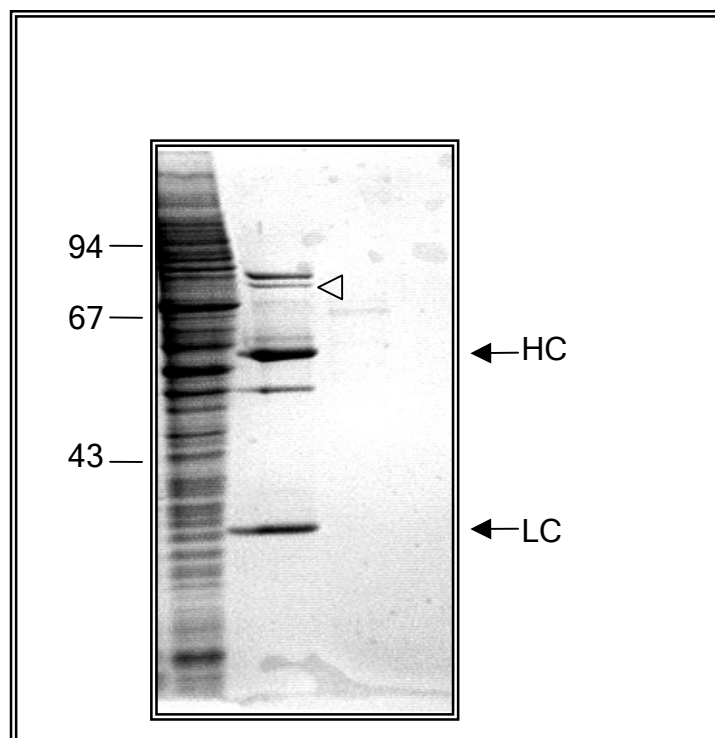


Abb. 46 Immunpräzipitation von eGFP-CAP1 mit GFP spezifischem mAK K12-184-2 aus eGFP-CAP1 exprimierenden HEK 293 Zellen. SDS-Polyacrylamid-Gel mit Totallysat von eGFP-CAP1 überexprimierenden HEK 293 Zellen. (Spur 1), Produkte der Immunpräzipitation (Spur 2), Kontrollreaktion der Immunpräzipitation (Spur 3). Der Pfeil weist auf präzipitiertes eGFP-CAP1. Den übrigen Banden konnten keine Proteine zugeordnet werden.

4. Diskussion

4.1 Generierung einer CAP1 defizienten Maus

Bisher konnte eine Bedeutung von CAP1 bei vielen Vorgängen in der Zelle gezeigt werden. Die detailliertesten Einsichten konnten dabei für Hefe und *Dictyostelium discoideum* gewonnen werden. In *Saccharomyces cerevisiae* führt der Verlust von CAP zu morphologischen Defekten wie der Vergrößerung der Zellen, ungeordneter Knospung und einer veränderten Struktur des Aktinzytoskletts [Field *et al.* 1990; Vojtek *et al.*, 1991]. In *D. discoideum* führte eine starke Reduzierung der CAP Expression zu einer veränderten Zellmorphologie, zu verzögertem Wachstum in Flüssigkultur, zu einem Pinocytose- und einem Cytokinese-Defekt. Alle beobachteten Defekte lassen sich mit Veränderungen in der Organisation des Aktinzytoskletts erklären [Noegel *et al.*, 1999].

Für die in vivo Funktion von CAP in einem Säugerorganismus gab es bis zu dieser Arbeit keine Untersuchungen oder Hinweise. Daher sollte ein für CAP1 defizienter Mäusestamm generiert werden. Dazu wurde ein ko-Vektor konstruiert, mit dem durch homologe Rekombination in ES-Zellen das 3. Exon zum größten Teil durch eine Neomycinresistenzkassette ersetzt werden sollte. Diese in vivo Mutation sollte eine Verschiebung des Leserasters des CAP1 Gens hervorrufen. Die Verschiebung des Leserasters könnte nur durch das Spleißen von Exon 2 an Exon 9 wieder ausgeglichen werden. Damit käme es entweder zu einem vollständigen Verlust von CAP1 oder zur Synthese eines stark verkürzten Proteins, dem die N-terminale Domäne fehlt. Hier liegen aber Funktionen, die wichtig sind für die Dimerisierung und die Lokalisierung von CAP1 [Hubberstey *et al.*, 1996; Moriyama und Yahara, 2002].

Um für die homologe Rekombination des ko-Vektors mit seiner Zielsequenz gute Vorbedingungen zu schaffen, wurden die Arme des ko-Vektors mit Hilfe von PCR Reaktionen aus genomischer ES-Zell (IB 10) DNA amplifiziert. Der gleiche ES-Stamm wurde später für die Transfektion mit dem ko-Vektor verwendet. So konnte eine möglichst große Sequenzübereinstimmung zwischen den Armen des ko-Vektors und der Zielsequenz erreicht werden. Um Fehler bei der Amplifikation zu vermeiden, wurde eine DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion, *PfuTurbo*[®], verwendet. Dieses Enzym kann zur Amplifikation von komplexen genomischen Sequenzen bis

zu 10 kb verwendet werden. *PfuTurbo*[®]-DNA-Polymerase erreicht dabei eine größere Effizienz und Genauigkeit als *Taq*-DNA-Polymerasen oder andere Enzyme mit Korrekturlesefunktion [Hogrefe *et al.*, 1997, Cline *et al.*, 1996].

Die Durchmusterung von 450 ES-Zellklonen nach homologer Rekombination erbrachte keine positiven Ergebnisse. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass aufgrund der oftmals geringen Qualität der Southernblot Analysen positive Klone, obwohl vorhanden, nicht detektiert werden konnten. Bei einer nachträglichen Suche nach hochrepetitiven Elementen konnten einige dieser Elemente im Bereich der Arme des ko-Vektors identifiziert werden. Es könnte sein, dass dadurch die Rekombinationswahrscheinlichkeit verkleinert ist. Es kann aber auch sein, dass die wenigen positiven Klone wegen der geringen Qualität der Southernblots nicht detektiert wurden.

4.2 Mögliche Phänotypen einer CAP1 defizienten Maus

Anhand der bisher gesammelten Daten über CAP1 kann über die Folgen eines Cap1 Wegfalls spekuliert werden. Auf subzellulärer Ebene würde es vermutlich zu Veränderungen des Aktinzytoskeletts kommen wie es für *D. melanogaster* und für *D. discoideum* beschrieben wurde [Baum *et al.*, 2000; Noegel *et al.*, 1999; Noegel *et al.*, 2004]. Diese Veränderungen könnten wie in diesen beiden Organismen die Zellpolarität beeinflussen, oder einen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen haben. Letztere Vermutung leitet sich von der starken Konzentration von CAP1 am Leitsaum von Fibroblasten und Keratinozyten sowie der Lokalisation im Wachstumskegel von neuronalen Zellen ab. Für *D. melanogaster* konnte außerdem bereits ein Einfluss von CAP1 bei der Ausbildung von Lamellipodien am Leitsaum gezeigt werden [Rogers *et al.*, 2003].

Wie stark die Auswirkungen auf den sich entwickelnden Mäuseembryo wären, hinge zum einen davon ab wie stark die Defizienz von CAP1 durch andere Proteine wie CAP2 ausgeglichen werden könnte. Möglicherweise wäre CAP2 aber nicht in der Lage den CAP1 Phänotyp zu komplementieren, da es nur in wenigen Geweben exprimiert wird. Außerdem weisen die Sequenzunterschiede [Yu *et al.*, 1994] und Unterschiede in möglichen Phosphorylierungsstellen [Leichter, 2002] darauf hin, dass CAP2 möglicherweise nicht die Funktion von CAP1 ausüben kann. Ein weiterer, Faktor der die Auswirkung eines CAP1 Wegfalls beeinflusst, ist der Zeitpunkt an dem

die CAP1 Expression während der Entwicklung beginnt. Dazu sind Daten von *X. laevis* verfügbar. Hier ist CAP1 bereits in sehr geringen Mengen als maternales Transkript detektierbar. Die CAP1 Expression steigt dann während des Blastulastadiums stark an [KhosrowShahian *et al.*, 2002]. Falls CAP1 auch in der Maus in so frühen Stadien exprimiert wird, könnte es eine Rolle bei den Zellmigrationen spielen, die bei der Bildung des Embryos stattfinden [Ridley *et al.*, 2003]. Eine Störung der Zellmigration während der Entwicklung könnte Fehlbildungen zur Folge haben oder sogar letal sein.

Falls die CAP1 Defizienz während der Entwicklung von anderen Proteinen komplementiert werden kann, so könnte die Beeinträchtigung der Zellmigration oder der Zellpolarität im adulten Organismus zu zahlreichen Phänotypen führen. Dazu könnten beeinträchtigte Wundheilung oder neuronale Störungen durch Defekte bei der axonalen Wegfindung gehören. Denkbar wären auch Störungen des Immunsystems wegen der reduzierten Migrationsfähigkeit der amöboiden Zellen des Immunsystems [Manes *et al.*, 2003].

4.3 Ein Pseudogen von CAP1

Ein Teil des Säuger-genoms besteht aus Retroposons und prozessierten Genen. Beim Menschen machen diese Sequenzen einen Anteil von mehr als 30 % aus. Die Retroposons sind dabei häufiger als prozessierte Gene. Die meisten davon gehören zu einer der zwei Gruppen, die als SINEs und LINEs bezeichnet werden. Beide verfügen über einen internen Promotor, der die Transkription dieser Elemente erlaubt. Lines verfügen zusätzlich über einen für reverse Transkription kodierenden Abschnitt. Das Transkript eines Line Elements kann so über die Bildung einer cDNA wieder in das Genom integriert werden, und das neu integrierte Element kann wieder abgelesen werden, weil der Promotor innerhalb der transkribierten Sequenz liegt. Das Transkript der Sines, so wird angenommen, wird von der reversen Transkriptase eines LINE Elements abgelesen und so die Reintegration ins Genom ermöglicht. Wird statt einer SINE mRNA die mRNA eines beliebigen Gens von der reversen Transkriptase eines LINEs abgelesen und die resultierende cDNA in das Genom reintegriert, entsteht ein prozessiertes Gen. Diese Sequenz kann nicht mehr transkribiert werden, weil ihr ein Promotor fehlt [Weiner, 2000].

Das hier gefundene Pseudogen von CAP1 ist vermutlich ein prozessiertes Gen und wurde durch reverse Transkription der CAP1 mRNA gebildet. Der Sequenzabschnitt mit dem mutmaßlichen Pseudogen hybridisierte mit den aus der CAP1 cDNA generierten Sonden und hatte ungefähr die Länge der cDNA. Die Stopkodons, die bei den Sequenzierungen ermittelt wurden, sprechen dafür, dass es sich hier nicht um ein funktionierendes Element, sondern um eine inaktive Kopie von CAP1 handelt.

4.4 Der CAP1 Proteinspiegel in den Organen der Maus

Die Expression von CAP1 in den Geweben adulter Mäuse wurde hier mit Westernblot Analysen untersucht. CAP1 wurde in allen untersuchten Geweben detektiert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen der mRNA- und Protein Spiegel von CAP1 in den Geweben der Ratte und den Northernblot Analysen für CAP1 an der Maus. [Swiston *et al.*, 1995; Leichter, 2002]. Wie für die Ratte [Swiston *et al.*, 1995] konnte auch für die Maus nur ein sehr niedriger CAP1 Spiegel im Muskel nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt dies an der Stabilität des Aktinzytoskeletts im Muskel. Interessant wäre es im Hinblick darauf die CAP1 Expression von undifferenzierten und differenzierten Muskelzellen zu untersuchen.

4.5 Die CAP1 Expression während der Entwicklung

Für verschiedenste Organismen, Pflanzen wie Tiere, konnte eine Bedeutung von CAP bei Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen gezeigt werden [Fenger *et al.*, 1994; Baum *et al.*, 2000; Kawai *et al.*, 1998; KhosrowShahian *et al.*, 2002].

Hier wurde die CAP1 Transkription in der Maus auf Ebene der mRNA und des Proteins untersucht. Vom Entwicklungstag 7 bis 17 konnte keine Veränderung des Expressionsniveaus festgestellt werden. Sollte es zu einem Anstieg der CAP1 Expression während der Entwicklung kommen, so liegt dieser vermutlich deutlich vor dem siebten Entwicklungstag. Bei *X. laevis* konnte dieser Anstieg bereits ab dem Blastulastadium beobachtet werden [KhosrowShahian *et al.*, 2002].

In den hier verwendeten embryonalen Schnitten (Entwicklungsstage 14 und 16) konnte CAP1 im Meckelknorpel, der Unterkieferdrüse, dem Darm, der Lunge, dem Epithel der Nasenhöhle, den Schnurrhaarfollikeln, in der Cochlea und dem umgebenen Knorpelvorläufer, in Teilen des Mittelhirns und dem *Corpus callosum*

detektiert werden. Außerdem konnte CAP1 in einem früheren Entwicklungsstadium (Tag 10) in der äußeren Schicht des Neuralrohrs detektiert werden. Es scheint, als wäre CAP1 sowohl im adulten wie im sich entwickelnden Organismus in vielen aber nicht allen Organen exprimiert. Die embryonalen Gewebe stammten dabei aus allen drei Keimblättern, wodurch sich keine Verbindung von CAP1 Expression und gemeinsamem Ursprung der Gewebe ableiten lässt. Ein möglicher Grund für die CAP1 Expression einiger Organe während der Entwicklung könnte eine erhöhte Zytoskelett-Dynamik in diesen Organen sein. Um eine detailliertere Aussage über die Expression von CAP1 während der Entwicklung zu machen, müssen weitere Stadien und Schnittebenen auf die Expression von CAP1 untersucht werden.

4.6 Expression von CAP1 in den Gehirnbereichen der Maus

Die Expression von CAP1 im Gehirn konnte hier sowohl in Westernblot Analysen wie in indirekten Immunfluoreszenzen gezeigt werden. Ob CAP1 ausschließlich in Neuronen oder auch in Gliazellen detektiert wurde, lässt sich ohne einen Marker für diese Zellen nicht sagen.

Der Nachweis von CAP1 mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte im Thalamus, der *Medulla oblongata* und dem Hirnstamm nicht erbracht werden. Dies lag vermutlich an der Schnittebene. Im Gehirn wird CAP1 eher in Arealen mit geringer Zelldichte und großer Axon- oder Dendritendichte exprimiert. Besonders deutlich wird dies am *Cortex cerebri*, dem Kleinhirn und dem *Bulbus olfactorius*. Eine Ausnahme macht dabei das Striatum und die Hippocampusformation. Hier werden deutlich die Zellkörper markiert. Diese Gemeinsamkeit lässt sich aber nicht auf eine ähnliche Struktur oder Funktion beider Areale, die sehr verschieden sind, zurückführen.

Die Detektion von CAP1 war im CA3 Gebiet der Hippocampusformation, nicht aber in den angrenzenden CA1 oder CA2 Gebieten möglich. Obwohl direkt in der Hippocampusformation benachbart unterscheiden sich diese Gebiete nicht nur in der Expression von CAP1 sondern auch in ihrer Zytoarchitektur. Das äußert sich z. B. darin, dass die Pyramidenzellschicht der CA1 Region dünner ist als die der CA2 und CA3 Region. Die Pyramidenzellen der CA3 Region verfügen im Gegensatz zu den anderen über besonders dicke dendritische „Spines“ [Keuker *et al.*, 2003; Jaffe *et al.*, 1997].

Diese „Spines“ sind kleine Fortsätze der Dendriten und dienen als postsynaptische Kompartimente. „Spines“ unterliegen Veränderungen ihrer Form in Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität. Dabei ist die Form in der Hauptsache vom Aktinzytoskelett abhängig [Hering und Sheng, 2003]. Da die Pyramidenzellen der CA3 Region über besonders große „Spines“ verfügen, wäre es denkbar, dass hier eine stärkere Aktindynamik herrscht. Dies könnte die Detektion von CAP1 in den Neuronen der CA3 Region erklären.

Die deutlich stärkere Expression von CAP1 im *Cortex cerebri* und dem *Bulbus olfactorius*, die in der Westernblot Analyse für die neugeborene Maus gezeigt werden konnte, könnte mit Differenzierungsvorgängen erklärt werden, bei denen es zu Migration und dem Auswachsen von Axonen oder einer starken Neubildung von Synapsen kommt. Für den Neokortex der Ratte ist beispielsweise eine starke Ausbildung von „Spines“ innerhalb der ersten Wochen bekannt [Yuste und Bonhoeffer, 2004].

4.7 Subzelluläre Lokalisation von CAP1

In den untersuchten Fibroblasten, Keratinozyten und Neuroblastomzellen konnte CAP1 im gesamten Zytosol und an den Spitzen der Zellfortsätze detektiert werden. Dies steht in Einklang mit bisher gemachten Untersuchungen [Vojtek und Cooper, 1993; Zelicof *et al.*, 1996]. Eine Kolokalisation mit F-Aktin an Streißfasern wie sie in Swiss 3T3 Fibroblasten gezeigt wurde [Freeman und Field, 2000], konnte in unseren Arbeiten aber nicht bestätigt werden.

Für humanes CAP wurde gezeigt, dass der N-Terminus von CAP an einen Komplex aus Cofilin und Aktin bindet. Dies wurde als die Ursache für die Lokalisation von CAP in den dynamischen Regionen der Zellperipherie, die reich an Aktin und Cofilin sind, vorgeschlagen [Moriyama und Yahara 2002]. Diese Lokalisation konnten wir in Doppelfluoreszenzen für F-Aktin und CAP1 beobachten. Sowohl in Keratinozyten wie auch in Fibroblasten gibt es in den zentralen Bereichen der Zelle keine Kolokalisation von CAP1 und F-Aktin, sondern an der Peripherie, an der das Aktinzytoskelett einer großen Dynamik unterliegt. Dabei wurde CAP1 aber nicht an der gesamten Plasmamembran detektiert, sondern nur wie bei *Dictyostelium discoideum* an den „leading edges“ [Noegel *et al.*, 1999].

In undifferenzierten Neuro-2a Zellen war GFP-CAP1 über die gesamte Zelle verteilt. Nach dem Auswachsen des Axons war aber eine starke Konzentration von CAP1 im Wachstumskegel und an den Kontaktstellen zu anderen Zellen zu beobachten. Beim Wachstumskegel handelt es sich um eine dynamische und bewegliche Struktur am Ende des Axons. An seinem Vorderende liegen Lamellipodien und Filopodien, deren F-Aktin Strukturen als Antwort auf Wegfindungsmoleküle permanent umstrukturiert werden [Lin und Greenberg, 2000]. Die Konzentration von CAP1 im Wachstumskegel steht im Einklang mit der beobachteten Konzentration von CAP1 in den dynamischen Bereichen der Zellperipherie in Fibroblasten und Keratinozyten. Bei den Kontakten, die zwischen Neuro-2a Zellen gebildet wurden, könnte es sich um synapsenartige Strukturen handeln. Aktindynamik ist bei der Ausbildung neuer Synapsen unerlässlich [Zhang und Benson, 2001] und F-Aktin ist sowohl auf der prä- wie auf der postsynaptischen Seite hoch konzentriert [Luo *et al.*, 2002]. Beides könnte eine Erklärung für die Anreicherung von CAP1 an den Kontaktstellen zwischen den Neuro-2a Zellen bilden.

Aus den Daten der Fluoreszenzmikroskopie könnte eine mögliche Aktin-abhängige Membranlokalisation abgeleitet werden. Einen weiteren Hinweis darauf ergab die Sedimentation von CAP1 im Saccharosegradienten. Da eine Aktin-abhängige Lokalisation an der Plasmamembran auch schon für ein anderes zytosolisches Protein, für Coronin-3, gezeigt werden konnte [Spoerl *et al.*, 2002], wurde dies als Marker im Auftriebs-Saccharose-Dichtegradienten eingesetzt. Eine Aktin-abhängige Membranassoziation konnte aber für CAP1 nicht gezeigt werden. Ein Grund dafür mag sein, dass CAP1, für das eine Rolle bei der G-Aktin Bereitstellung vorgeschlagen wurde [Freeman und Field, 2000], vielleicht nur indirekt über F-Aktin mit der Plasmamembran verbunden ist oder nur während der Übertragung eines Aktinmonomers auf das „plus“-Ende kurzzeitig mit dem Aktinzytoskelett in Kontakt tritt.

4.8 Welche Faktoren bestimmen die subzelluläre Lokalisation von CAP1

In der Hefe ist die Lokalisation von CAP von der Bindung an Abp1 abhängig. Für diese Bindung sind der P2 Abschnitt des prolinreichen Bereichs und ein Abschnitt in der N-terminalen Domäne von CAP verantwortlich. Dieser N-terminale Abschnitt übernimmt aber nur eine indirekte Rolle. Er ist verantwortlich für die Dimerisierung

von CAP, die vermutlich die SH3 Domäne für Abp1 zugänglich macht [Yu *et al.*, 1999]. Sequenzvergleiche verschiedener CAPs zeigten keine starke Konservierung des P2 Motivs. Daher ist anzunehmen, dass dieses in höheren Eukaryoten keine wichtige Rolle spielt [Hubberstey und Mottillo, 2002]. Für humanes CAP1 konnte zwar gezeigt werden, dass das aktinbindende Protein c-Abl an den P1 Abschnitt der SH3 Domäne von CAP1 bindet [Freeman *et al.*, 1996], aber für eine Bedeutung der SH3 Domäne bei der Lokalisation der CAP Homologe aus Säugetieren gibt es bisher keine Hinweise.

Wie schon unter 4.7 erwähnt, erscheint vielmehr der N-Terminus der CAP Homologe für die subzelluläre Lokalisation ausschlaggebend zu sein [Noegel *et al.*, 1999; Freeman und Field, 2000; Leichter Doktorarbeit, 2002; Moriyama und Yahara, 2002]. CAP1 und CAP2 aus der Maus verfügen über mögliche Phosphorylierungsstellen [Hubberstey und Mottillo, 2002; Leichter, 2002]. Damit wäre eine Regulation der Lokalisierung der CAP Proteine durch Phosphorylierung möglich. Diese Phosphorylierung könnte durch Signaltransduktionswege als Antwort auf extrazelluläre Reize ausgelöst werden.

4.9 CAP1- ein Oligomer

Die Fähigkeit von CAP1 mit sich selbst zu interagieren wurde bereits in „Yeast Two-Hybrid“ Versuchen und in Immunpräzipitationen gezeigt [Hubberstey *et al.*, 1996; Zelicof *et al.*, 1996]. Die Bildung eines CAP1 Oligomers von nicht näher bestimmter Größe konnte indirekt auch hier durch die Lokalisation des CAP1 in Saccharosegradienten gezeigt werden. Die Immunpräzipitation lieferte im Gegensatz dazu keine verwertbaren Daten. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass der anti-GFP Antikörper GFP-CAP1 präzipitieren konnte. Endogenes CAP1 konnte aber nicht kopräzipitiert werden. In den vorangegangenen erfolgreichen Studien wurden Fusionsproteine von CAP1 mit dem HA- und Myc-Epitop für die Immunpräzipitationen verwendet. Möglicherweise beeinflusste die Fusion mit GFP die Oligomerisierung von CAP1, auch wenn *in vivo* kein verändertes Verhalten des GFP Fusionsproteins im Vergleich mit endogenem CAP1 beobachtet werden konnte. „Yeast Two-Hybrid“ Untersuchungen lieferten Hinweise auf eine Interaktion von CAP1 und Endophilin [J. Mentrup, unveröffentlichte Ergebnisse]. Diese Interaktion konnte hier mit Hilfe der durchgeführten Immunpräzipitation nicht bestätigt werden.

4.10 Eine mögliche Rolle von CAP1 bei der Wundheilung

Bei der Wundheilung spielen Fibroblasten und Keratinozyten eine wichtige Rolle. Mit anderen proliferativen Zellen wandern sie in die Wunde ein und beginnen sich zu teilen. Dies spielt sich am Wundrand ab, weil nur hier die Zellen wie z.B. Epithelzellen ihre apikal-basale Polarität verlieren und ihre Zell-Zell Kontakte auflösen. Der fehlende Kontakt zur Nachbarzelle stellt vermutlich das Signal für Proliferation und Migration dar, die mit dem Ausstrecken der Zellfortsätze beginnt, [Scheithauer und Riechelmann, 2003].

Das beschriebene Wundscenario wurde in vereinfachter Form in dieser Arbeit mit Keratinozyten und Fibroblasten in einem Wundheilungsexperiment *in vitro* simuliert. Wie an einer echten Wunde konnte hier an den „Wundrändern“ die Ausbildung von Zellfortsätzen und eine Migration der Zellen in Richtung der „Wunde“ beobachtet werden. Dabei war CAP1 am Leitsaum der Zelle, dem Bereich größter Aktindynamik, mit F-Aktin kolokalisiert. Da die Ausbildung von Zellfortsätzen von der Bildung von F-Aktin abhängt [Heath und Holifield, 1993] und CAP1 ein wichtiger Organisator des Zytoskeletts ist [Freeman und Field, 2000], könnten veränderte CAP1 Spiegel die Wundheilung negativ beeinflussen. Interessant wäre in diesem Fall CAP1 mit Hilfe von RNAi herunterzuregulieren und den Effekt auf die „Wundheilung“ zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

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

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

6. Summary

The CAP family of proteins belongs to the actin binding proteins and is found in all analysed eukaryotic species. The first member of the family was discovered as a component of the adenylate cyclase in *S. cerevisiae*. The later CAP homologues were identified in a wide variety of animals, plants and fungi. Mammals express two homologues, CAP1 and CAP2.

This work included the construction of a knockout vector for mouse CAP1. In addition, the expression pattern of CAP1 in different organs and the subcellular localization of CAP1 in different cell lines was tested.

Genomic ES-cell DNA as a template and the proofreading enzyme *PfuTurbo*[®]-DNA-Polymerase were used to amplify the arms of the ko vector by PCR. Together with the neomycin resistance cassette these arms were cloned into a pBS vector. The homologous recombination of the knockout vector with the chromosomal target sequence will result in a frameshift mutation. This will lead to disruption of the function of one CAP1 allele. Putative alternative splice sites could have produced a truncated protein missing the N-terminal domain. After the transfection of the ES-cells with the ko vector, 450 clones were isolated and screened by Southernblot analysis. So far no positive clone was detected.

In a Westernblot analyses of homogenized tissues the biggest amounts of CAP1 were detected in thymus, spleen and lung followed by testis, liver and stomach. The lowest expression levels were revealed in heart, skeletal muscle, brain, skin and kidney. The expression of CAP1 was more precisely tested in the brain. In newborn mice the expression level of CAP1 was higher in the cortex and the olfactory bulb than in the homogenates of thalamus/ striatum, brainstem and *Cerebellum*. In adult mice the thalamus and striatum were tested separately and in addition to the brain areas tested in the newborn mice, *Medulla oblongata* was tested. For most brain areas a similar expression level of CAP1 was detected. Just in the thalamus and the *Medulla oblongata* a slightly elevated CAP1 level were observed. In addition to the westernblot analysis, CAP1 could be detected in the olfactory bulb, cortex, hippocampal formation, striatum, *Cerebellum* and the *Capsula interna* by indirect immunofluorescence.

Northernblot analysis showed an equal expression of CAP1 from embryonic day 7 to day 17. At the same time indirect immunofluorescence studies revealed a restricted expression of CAP1 to several organs.

The subcellular localization of CAP1 was examined by indirect immunofluorescence and by expression of GFP-CAP1 fusion protein in cells. Additionally cell homogenates were checked by subcellular fractionation.

In fibroblasts and keratinocytes the cytosolic protein CAP1 localized with F-actin at the leading edges of the cells. In differentiated neuroblastoma cells GFP-CAP1 was concentrated in the growth cone. In wound healing experiments CAP1 is found to be enriched at the leading edge of fibroblasts and keratinocytes too. Taken together CAP1 was enriched in all cases at sites with highest actin dynamics.

In the subcellular fractionation CAP1 couldn't be shown as associated to the membrane via actin. Instead of this it was shown that CAP1 is forming multimers.

7. Literatur

- Amberg DC, Basart E, Botstein D (1995): Defining protein interactions with yeast actin in vivo. *Nat Struct Biol* 2:28-35.
- Bahn YS, Sundstrom P (2001): CAP1, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 183:3211-23.
- Barrero RA, Umeda M, Yamamura S, Uchimiya H (2002): Arabidopsis CAP Regulates the Actin Cytoskeleton Necessary for Plant Cell Elongation and Division. *Plant Cell* 14:149-63.
- Baum B, Li W, Perrimon N (2000): A cyclase-associated protein regulates actin and cell polarity during *Drosophila* oogenesis and in yeast. *Curr Biol* 10:964-73.
- Benlali A, Draskovic I, Hazelett DJ, Treisman JE (2000): act up controls actin polymerization to alter cell shape and restrict Hedgehog signaling in the *Drosophila* eye disc. *Cell* 101:271-81.
- Bershadsky AD, Vasiliev JM (1988): "Cytoskeleton." New York, London: Plenum Press. New York, London.
- Brenner SL, Korn ED (1979): Spectrin-actin interaction. Phosphorylated and dephosphorylated spectrin tetramer cross-link F-actin. *J Biol Chem* 254:8620-7
- Carlier MF, Pantaloni D (1997): Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* 269:459-67.
- Casella JF, Maack DJ, Lin S (1986): Purification and initial characterization of a protein from skeletal muscle that caps the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem* 261:10915-21.
- Carlsson L, Nystrom LE, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U (1977): Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol* 115:465-83.
- Cline J, Braman JC, Hogrefe HH (1996): PCR fidelity of *pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 24:3546-51

- de Arruda MV, Watson S, Lin CS, Leavitt J, 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* 111:1069-79.
- Eichinger L, Lee SS, Schleicher M (1999): Dictyostelium as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech* 47:124-34.
- Eichinger L, Schleicher M (1992): Characterization of actin- and lipid-binding domains in severin, a Ca(2+)-dependent F-actin fragmenting protein. *Biochemistry* 31:4779-87.
- Fedorov AA, Dodatko T, Roswarski DA, Almo SC (2002): C-terminal domain of cyclase associated protein with Pro 505 replaced by Ser (P505s) MMDB Id#[18593](#).
- Fedor-Chaikin M, Deschenes RJ, Broach JR (1990): SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast. *Cell* 61:329-40.
- Fenger U, Hofmann M, Galliot B, Schaller HC (1994): The role of the cAMP pathway in mediating the effect of head activator on nerve-cell determination and differentiation in hydra. *Mech Dev* 47:115-25.
- Field J, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, Lerner RA, Wigler M (1988): Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol*. 8:2159-65.
- Field J, Vojtek A, Ballester R, Bolger G, Colicelli J, Ferguson K, Gerst J, Kataoka T, Michaeli T, Powers S, (1990): Cloning and characterization of CAP, the *S. cerevisiae* gene encoding the 70 kd adenylyl cyclase-associated protein. *Cell* 61:319-27.
- Franke WW (1993): The intermediate filaments. In Kreis T, Vale R (eds): "Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins." Oxford:, pp 137-144.
- Freeman NL, Chen Z, Horenstein J, Weber A, Field J (1995): An actin monomer binding activity localizes to the carboxyl-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein. *J Biol Chem* 270:5680-5.
- Freeman NL, Lila T, Mintzer KA, Chen Z, Pahk AJ, Ren R, Drubin DG, Field J (1996): A conserved proline-rich region of the *Saccharomyces cerevisiae*

cyclase- associated protein binds SH3 domains and modulates cytoskeletal localization. *Mol Cell Biol* 16:548-56.

- Freeman NL, Field J (2000): Mammalian homolog of the yeast cyclase associated protein, CAP/Srv2p, regulates actin filament assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* 45:106-20.
- Gaertner A, Ruhnau K, Schroer E, Selve N, Wanger M, Wegner A (1989): Probing nucleation, cutting and capping of actin filaments. *J Muscle Res Cell Motil* 10:1-9.
- Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C, Desjardins M (2001): The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152:165-80.
- Gerst JE, Ferguson K, Vojtek A, Wigler M, Field J (1991): CAP is a bifunctional component of the *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase complex. *Mol Cell Biol* 11:1248-57.
- Gerst JE, Rodgers L, Riggs M, Wigler M (1992): SNC1, a yeast homolog of the synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin gene family: genetic interactions with the RAS and CAP genes *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4338-42.
- Gieselmann R, Mann K (1992): ASP-56, a new actin sequestering protein from pig platelets with homology to CAP, an adenylate cyclase-associated protein from yeast. *FEBS Lett* 298:149-53.
- Goldschmidt-Clermont PJ, Janmey PA (1991): Profilin, a weak CAP for actin and RAS. *Cell* 66:419-21.
- Gottwald U, Brokamp R, Karakesisoglou I, Schleicher M, Noegel AA (1996): Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in *Dictyostelium discoideum* and characterization of its interaction with actin. *Mol Biol Cell* 7:261-72.
- Haarer BK, Lillie SH, Adams AE, Magdolen V, Bandlow W, Brown SS (1990): Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J Cell Biol* 110(1):105-14.
- Haarer BK, Brown SS (1990): Structure and function of profilin. *Cell Motil Cytoskeleton* 17:71-4.

- Haugwitz M, Noegel AA, Rieger D, Lottspeich F, Schleicher M (1991): *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J Cell Sci* 100:481-9.
- Hartmann H, Schleicher M, Noegel AA. (1990): Heterodimeric capping proteins constitute a highly conserved group of actin-binding proteins. *Dev Genet* 11:369-76.
- Heath JP, Holifield BF (1993): On the mechanisms of cortical actin flow and its role in cytoskeletal organisation of fibroblasts. *Symp Soc Exp Biol* 47:35-56.
- Hering H., Sheng M. (2003): Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci* 23:11759-69.
- Higgs HN, Pollard TD (2001): Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* 70:649-76.
- Hogrefe HH, Scott B, Nielson K, Hedden V, Hansen C. (1997): Strategies 10:93-96.
- Hubberstey A, Yu G, Loewith R, Lakusta C, Young D (1996): Mammalian CAP interacts with CAP, CAP2, and actin. *J Cell Biochem* 61:459-66.
- Hubberstey AV, Mottillo EP (2002): Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. *Faseb J* 16:487-99.
- Jaffe DB, Brown TH (1997): Calcium dynamics in thorny excrescences of CA3 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 78:10-8.
- Kawai M, Aotsuka S, Uchimiya H (1998): Isolation of a cotton CAP gene: a homologue of adenylyl cyclase-associated protein highly expressed during fiber elongation. *Plant Cell Physiol* 39:1380-3.
- Kawamukai M, Gerst J, Field J, Riggs M, Rodgers L, Wigler M, Young D (1992): Genetic and biochemical analysis of the adenylyl cyclase-associated protein, cap, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 3:167-80.
- Keuker JI, Rochford CD, Witter MP, Fuchs E (2003): A cytoarchitectonic study of the hippocampal formation of the tree shrew (*Tupaia belangeri*). *J Chem Neuroanat* 26:1-15.
- KhosrowShahian F, Hubberstey AV, Crawford MJ (2002): CAP1 expression is developmentally regulated in *Xenopus* *Mech Dev* 113:211-4.
- Kreis, eds. (1993): "Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins." Oxford:

- Kreitmeier M, Gerisch G, Heizer C, Muller-Taubenberger A (1995): A talin homologue of Dictyostelium rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *J Cell Biol* 129:179-88.
- Ksiazek D, Brandstetter H, Israel L, Bourenkov GP, Katchalova G, Janssen KP, Bartunik HD, Noegel AA, Schleicher M, Holak TA (2003): Structure of the N-terminal domain of the adenylyl cyclase-associated protein (CAP) from *Dictyostelium discoideum*. *Structure (Camb)* 11:1171-8.
- Lassing I, Lindberg U (1985): Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 314:472-4.
- Leichter M (2002): Analyse der CAP Homologe in der Maus. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Lin MZ, Greenberg ME. (2000): Orchestral maneuvers in the axon: trio and the control of axon guidance. *Cell* 101:239-42.
- Luo L (2002): Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:601-35.
- Mandelkow E, Mandelkow EM (1995): Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 7:72-81.
- Manes S, Ana Lacalle R, Gomez-Mouton C, Martinez-A C. (2003): From rafts to crafts: membrane asymmetry in moving cells. *Trends Immunol* 24:320-6.
- Martel V, Racaud-Sultan C, Dupe S, Marie C, Paulhe F, Galmiche A, Block MR, Albiges-Rizo C (2001): Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem* 276:21217-27.
- Matviw H, Yu G, Young D (1992): Identification of a human cDNA encoding a protein that is structurally and functionally related to the yeast adenylyl cyclase-associated CAP proteins. *Mol Cell Biol* 12:5033-40.
- McCormack EA, Rohman MJ, Willison KR (2001): Mutational screen identifies critical amino acid residues of beta-actin mediating interaction between its folding intermediates and eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *J Struct Biol* 135:185-97.
- Moriyama K, Yahara I. (2002): Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover. *J Cell Sci* 115:1591-601.

- Noegel AA, Witke W, Schleicher M (1987): Calcium-sensitive non-muscle alpha-actinin contains EF-hand structures and highly conserved regions. FEBS Lett 221:391-6
- Noegel AA, Rivero F, Albrecht R, Janssen KP, Kohler J, Parent CA, Schleicher M (1999): Assessing the role of the ASP56/CAP homologue of *Dictyostelium discoideum* and the requirements for subcellular localization. J Cell Sci 112:3195-203.
- Noegel AA, Blau-Wasser R, Sultana H, Muller R, Israel L, Schleicher M, Patel H, Weijer CJ (2004): The cyclase-associated protein CAP as regulator of cell polarity and cAMP signaling in *Dictyostelium*. Mol Biol Cell 15:934-45.
- Osoegawa K, Tateno M, Woon PY, Frengen E, Mammoser AG, Catanese JJ, Hayashizaki Y, de Jong PJ (2000): Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. Genome Res 10:116-28.
- Pantaloni D, Carlier MF (1993): How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. Cell 75:1007-14.
- Paunola E, Mattila PK, Lappalainen P (2002): WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. FEBS Lett 513:92-7.
- Pepperkok R, Scheel J, Horstmann H, Hauri HP, Griffiths G, Kreis TE (1993): Beta-COP is essential for biosynthetic membrane transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex in vivo. Cell 1993 74:71-82.
- Pollard TD, Cooper JA (1984): Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. Biochemistry 23:6631-41.
- Pollard TD, Cooper JA (1986): Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. Annu Rev Biochem 55:987-1035.
- Pring M, Weber A, Bubb MR (1992): Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. Biochemistry 31:1827-36.
- Rogers SL, Wiedemann U, Stuurman N, Vale RD (2003): Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. J Cell Biol. 162: 1079-88.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003): Cell migration: integrating signals from front to back. Science 302:1704-9.

- Scheithauer M, Riechelmann H (2003): Review part I: basic mechanisms of cutaneous woundhealing. *Laryngorhinootologie* 82:31-5.
- Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD (1988): Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* 16:7583-600.
- Spoerl Z, Stumpf M, Noegel AA, Hasse A (2002): Oligomerization, F-actin interaction, and membrane association of the ubiquitous mammalian coronin 3 are mediated by its carboxyl terminus. *J Biol Chem* 277:48858-67
- Stevenson VA, Theurkauf WE (2000): Actin cytoskeleton: putting a CAP on actin polymerization. *Curr Biol* 10:R695-7.
- Stossel TP, Chaponnier C, Ezzell RM, Hartwig JH, Janmey PA, Kwiatkowski DJ, Lind SE, Smith DB, Southwick FS, Yin HL (1985): Nonmuscle actin-binding proteins. *Annu Rev Cell Biol* 1:353-402.
- Swiston J, Hubberstey A, Yu G, Young D (1995): Differential expression of CAP and CAP2 in adult rat tissues. *Gene* 165:273-7.
- Tabor S (1990): Expression using the T7 RNA polymerase system. In Wang YL, Taylor DL (eds): "Methods in Cell Biology." New York.: Academic Press Inc., pp 137-151.
- Toshima J, Toshima JY, Takeuchi K, Mori R, Mizuno K (2001): Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J Biol Chem* 276:31449-58.
- Vojtek A, Haarer B, Field J, Gerst J, Pollard TD, Brown S, Wigler M (1991): Evidence for a functional link between profilin and CAP in the yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 66:497-505.
- Vojtek AB, Cooper JA (1993): Identification and characterization of a cDNA encoding mouse CAP: a homolog of the yeast adenylyl cyclase associated protein. *J Cell Sci* 105:777-85.
- Wang J, Suzuki N, Kataoka T (1992): The 70-kilodalton adenylyl cyclase-associated protein is not essential for interaction of *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase with RAS proteins. *Mol Cell Biol* 12:4937-45.
- Wegner A, Isenberg G (1983): 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:4922-5.

- Weiner OH, Murphy J, Griffiths G, Schleicher M, Noegel AA (1993): The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 123:23-34.
- Weiner AM (2000): Do all SINEs lead to LINEs? *Nat Genet* 24:332-3.
- Yin HL, Stossel TP (1979): Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281:583-6
- Yu G, Swiston J, Young D (1994): Comparison of human CAP and CAP2, homologs of the yeast adenylyl cyclase-associated proteins. *J Cell Sci* 107:1671-8.
- Yu J, Wang C, Palmieri SJ, Haarer BK, Field J (1999): A cytoskeletal localizing domain in the cyclase-associated protein, CAP/Srv2p, regulates access to a distant SH3-binding site. *J Biol Chem* 274:19985-91.
- Yuste R, Bonhoeffer T (2004): Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* 5:24-34.
- Zhang W, Benson DL (2001) Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J Neurosci* 21:5169-81.
- Zelicof A, Gatica J, Gerst JE (1993): Molecular cloning and characterization of a rat homolog of CAP, the adenylyl cyclase-associated protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268:13448-53.
- Zelicof A, Protopopov V, David D, Lin XY, Lustgarten V, Gerst JE (1996): Two separate functions are encoded by the carboxyl-terminal domains of the yeast cyclase-associated protein and its mammalian homologs. Dimerization and actin binding. *J Biol Chem* 271:18243-52.

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 – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht ist, sowie, dass ich eine Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

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

Köln den 09.03.2004

Henning Korte

Poster-Abstract:

Korte H, Shekar S, Leichter M and Noegel AA

Expression of CAP1 and CAP2 in developing and adult mouse tissues.

European Journal of Cell Biology (2004), 83 (54): 36

Danksagung

Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel möchte ich für die Betreuung, fachliche Anregungen und ihre ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Frau Prof. Dr. Korsching danke ich für die freundliche Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Für die freundliche Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen meinen Kollegen bedanken. Besonders möchte ich mich bei Frau Rosi Blau-Wasser, Frau Maria Stumpf, Herrn Dr. Andreas Hasse und Herrn Rolf Müller für die vielfältigen Tips und Vorschläge bedanken.

Herrn Dr. Neil Smyth danke ich für hilfreiche Anregungen im Zusammenhang mit der Erstellung des Knockout-Vektors und der Kultivierung der ES-Zellen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben, meinem Bruder und allen meinen Freunden.

Danken möchte ich auch meiner Freundin Soraya.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Korte, Henning
Anschrift: Kierberger Str. 21
50969 Köln

Geburtsdatum: 15.01.1975
Geburtsort: Lohne
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Josef Korte, Doris Korte (geborene Böckmann)

Schulbildung

1981 - 1985 Albert-Schweizer Grundschule Wunstorf
1985 - 1987 Orientierungsstufe Dinklage
1987 - 1994 Allgemeines Gymnasium Lohne
1994 Abitur

Zivildienst

August 1994 - Oktober 1995 Zivildienst

Hochschulausbildung

Oktober 1995 Beginn des Biologiestudiums an der Universität zu Osnabrück
September 1997 Diplom-Biologie-Vorprüfung
Dezember 1999 Diplom-Biologie-Hauptprüfung
Januar 2000 - Januar 2001 Diplomarbeit bei Prof. Dr. S.Korsching
am Institut für Genetik der Mat. Nat. Fakultät der Universität zu
Köln.
Titel: Identifizierung differentiell exprimierter Gene im *Bulbus
olfactorius* von *Danio rerio*

März 2001 – Mai 2004 Dissertation bei Frau Prof. Dr. A. A. Noegel am Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Ziel der Promotion an der Math. Nat. Fakultät der Universität zu Köln

Köln den, 09.03.2004

Henning Korte