

# **Interaktion zweier mechanistisch unterschiedlicher Aktinnukleatoren – Spir und Cappuccino**

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Susanne Hilgert  
aus Trier**

**Würzburg 2007**

Eingereicht am: .....  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: .....  
2. Gutachter: .....  
der Dissertation

1. Prüfer: .....  
2. Prüfer: .....  
3. Prüfer: .....  
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Interaktion zweier mechanistisch unterschiedlicher Aktinnukleatoren – Spir und Cappuccino“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Susanne Hilgert

**Für Dora**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>4</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Das Aktincytoskelett</b> .....	<b>7</b>
1.1.1 Das stabile Aktincytoskelett .....	7
1.1.2 Das dynamische Aktincytoskelett .....	8
<b>1.2 Aktin Struktur und Dynamik</b> .....	<b>8</b>
1.2.1 Monomeres Aktin .....	8
1.2.2 Filamentöses Aktin .....	9
1.2.3 Aktindynamik .....	10
<b>1.3 Aktinnukleatoren</b> .....	<b>11</b>
1.3.1 Arp2/3-Komplex und WASP-Proteine .....	11
1.3.1.1 Arp2/3-Komplex .....	11
1.3.1.2 Regulation der Arp2/3 Nukleationsaktivität durch WASP/WAVE-Proteine ....	11
1.3.2 Formine .....	13
1.3.2.1 Formin-Struktur und -Polymerisationsmechanismus .....	14
1.3.2.2 Regulation .....	16
1.3.2.3 Die Cappuccino-Untergruppe der Formine .....	17
1.3.3 Spir .....	20
1.3.3.1 Spir Struktur und Nukleationsmechanismus .....	20
1.3.3.2 Spir Expression und Funktion .....	22
1.3.3.3 Spir-Regulation .....	23
<b>1.4 Aufgabenstellung</b> .....	<b>24</b>
<b>2 Material</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1 Chemikalien</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2 Enzyme</b> .....	<b>27</b>
<b>2.3 Antikörper und Reagenzien zur cytochemischen Aktinfärbung</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4 Plasmide und Oligonukleotide</b> .....	<b>28</b>
2.4.1 Plasmide .....	28
2.4.2 Oligonukleotide .....	29
<b>2.5 Standards</b> .....	<b>30</b>
<b>2.6 Organismen</b> .....	<b>30</b>
<b>2.7. Puffer und Lösungen</b> .....	<b>31</b>
<b>2.8 Geräte</b> .....	<b>32</b>

---

<b>3 Methoden</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 Kultivierung von Bakterien</b> .....	<b>33</b>
3.1.1 Flüssigkulturen.....	33
3.1.2 Plattenkulturen.....	33
3.1.3 Bakterien-Dauerkulturen .....	33
<b>3.2 Präparation von DNA</b> .....	<b>33</b>
3.2.1 Analytische Plasmid-DNA-Isolierung.....	33
3.2.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung über den „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ .....	34
<b>3.3 Herstellung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten</b> .....	<b>34</b>
3.3.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	34
3.3.2 Konzentrationsbestimmung auf Agarosegelen .....	35
3.3.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen .....	35
3.3.4 Aufreinigung von DNA über den „PCR-Purification-Kit“ .....	35
3.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten mittels „QIAEX II Gel Extraction Kit“ .....	35
3.3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion .....	36
3.3.7 Kolonie-PCR .....	36
3.3.8 Reverse-Transcriptase Polymerase-Ketten-Reaktion.....	36
<b>3.4 Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle</b> .....	<b>37</b>
3.4.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für Hitzeschock-Transformation .....	37
3.4.2 Präparation von Vektoren .....	37
3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren.....	37
3.4.4 Hitzetransformation von Bakterienzellen .....	37
<b>3.5 Gelelektrophoretische Methoden</b> .....	<b>38</b>
3.5.1 Analyse von DNA in Agarosegelen .....	38
3.5.2 Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen.....	38
<b>3.6 Proteinexpression in Prokaryoten</b> .....	<b>39</b>
3.6.1 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> Rosetta.....	39
3.6.2 Aufreinigung nativer rekombinanter GST-tag Proteine .....	39
3.6.3 Aufreinigung nativer rekombinanter Hexa-His-tag Proteine.....	39
<b>3.7 Proteinanalytische Methoden</b> .....	<b>40</b>
3.7.1 Coomassie Färbung von Proteingelen .....	40
3.7.2 Western-Blot .....	40
3.7.3 Western-Blot <i>Semi Dry</i> .....	40
3.7.4 Färbung der Membran mit Ponceau S .....	41
3.7.5 Immundetektion von immobilisierten Proteinen .....	41
3.7.6 Strippen von Nitrozellulosemembranen.....	41
3.7.7 Umpuffern von Proteinen über Nap-10 Säulen bzw. PD-10 Säulen .....	41

---

3.7.8 Dialyse von Proteinen .....	41
3.7.9 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	42
3.7.10 Analytische Gelfiltration nativer Proteine .....	42
<b>3.8 Immunpräzipitation.....</b>	<b>42</b>
3.8.1 Immunpräzipitation mit Potein A-Sepharose .....	42
3.8.2 Immunpräzipitation mit Potein G-Sepharose .....	43
<b>3.9 Bindungsstudie .....</b>	<b>43</b>
3.9.1 GST <i>pull down</i> mit NIH/3T3 oder HeLa Zell-Lysat.....	43
3.9.2 GST <i>pull down</i> mit 6x-His-Fusionsprotein .....	44
3.9.3 6x-His <i>pull down</i> mit NIH/3T3 Zellysat.....	44
3.9.4 Ko-Immunpräzipitation .....	44
<b>3.10 Zellkulturtechniken.....</b>	<b>44</b>
3.10.1 Kultivierung von NIH/3T3 Zellen.....	44
3.10.2 Herstellung und Kultivierung primärer muriner Körnerzellenlinien .....	44
3.10.3 Zellzahlbestimmung .....	45
3.10.4 Transfektion eukaryontischer Zellen.....	46
3.10.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	46
<b>3.11 Immuncytochemische Methoden.....</b>	<b>46</b>
3.11.1 Fixierung und Permeabilisierung von adhärennten NIH/3T3, HeLa und Körnerzellen.....	46
3.11.2 Immunfärbungen von NIH/3T3, HeLa und Körnerzellen .....	47
3.11.3 Direkte Kopplung von Antikörpern an Alexa Fluor Farbstoff konjugierte Fab Fragmente .....	47
3.11.4 Immunfärbungen von NIH/3T3, HeLa und Körnerzellen mittels mit Alexa Fluor Farbstoff gekoppelten Antikörpern .....	47
<b>3.12 Immunohistochemische Methoden .....</b>	<b>48</b>
3.12.1 Präparation und Fixierung von L3-Larvengehirnen von <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i> .....	48
3.12.2 Immunohistochemische Färbung der Larvengehirne.....	48
<b>3.13. Herstellung polyklonaler Antikörper .....</b>	<b>48</b>
3.13.1 Herstellung geeigneter Antigene zur Immunisierung von Kaninchen.....	48
3.13.2 Aufreinigung der Seren .....	49
3.13.3 Lagerung der Antiseren.....	49
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Kolokalisationsstudien von <i>Drosophila</i> p150-Spir/Cappuccino und murinen Spir-1/Formin-2 Proteinen .....</b>	<b>50</b>

4.1.1 Spezifische Kolokalisation von <i>Drosophila</i> p150-Spir und Cappuccino-FH1-FH2 in NIH/3T3 Zellen.....	50
4.1.2 Spezifische Kolokalisation und Translokation von Fmn2-FH2 an Spir-1-KIND in NIH/3T3 Zellen.....	52
4.1.2.1 Konstruktion von Vektoren für die Translokationsstudien .....	53
4.1.2.2 Subzelluläre Kolokalisation der KIND- und Formin-Fusionsproteine, Translokation von Fmn2-FH2 an Spir-1-KIND.....	54
<b>4.2 <i>in vitro</i> Bestimmung der Interaktionsdomänen von Proteinen der Spir- und Formin-Proteinfamilien .....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Bindungsstudien mit <i>Drosophila</i> p150-Spir und Cappuccino.....	56
4.2.1.1 Konstruktion von Vektoren für die Bindungsstudien .....	56
4.2.1.2 Interaktion von p150-Spir-KIND und Capu-FH1-FH2.....	57
4.2.2 Bindungsstudien mit Spir-1 und Fmn2 aus Säugern .....	59
4.2.2.1 Konstruktion von Vektoren für die Bindungsstudien .....	59
4.2.2.2 Interaktion von GST-Spir-1-KIND mit EGFP-Fmn2-FH2 und His-Fmn2-FH261	
4.2.2.3 Direkte Interaktion von 6x-His-Spir-1-KIND und 6x-His-Fmn2-FH2 .....	63
<b>4.3 Untersuchungen zum Expressionsmuster von endogenem <i>Drosophila</i> p150-Spir/Cappuccino und murinem Spir-1/Formin-2.....</b>	<b>66</b>
4.3.1 Das Proteinexpressionsmuster von endogenem p150-Spir und Cappuccino in <i>Drosophila melanogaster</i> .....	66
4.3.1.1 Herstellung der Antikörper gegen p150-Spir-KIND-WH2 und Capu-FH2.....	66
4.3.1.2 Myc-p150-Spir Effektorgenexpressionstudien in L3-Larvengehirnen.....	68
4.3.1.3 Biochemischer Nachweis von p150-Spir und Cappuccino in Embryonen .....	72
4.3.1.4 Untersuchung einer möglichen Interaktion von endogenem p150-Spir und Cappuccino.....	73
4.3.2 Untersuchung des Proteinexpressionsmusters von endogenem Spir-1 und Formin-2 in Körnerzellen des postnatalen Mausgehirns.....	75
4.3.2.1 Nachweis der <i>spir-1</i> und <i>Fmn2</i> RNA-Expression in cerebellären Körnerzellen .....	75
4.3.2.2 Nachweis von endogenem Formin-2 im Cerebellum adulter Mäuse.....	76
4.3.2.3 Untersuchung einer möglichen Interaktion von endogenem mSpir-1 und mFormin-2 .....	77
4.3.2.4 Immunocytochemische Spir-1 und Formin-2 Färbungen der Körnerzellen .....	79
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>82</b>
<b>5.1 Konservierte direkte Interaktion der Spir-KIND-Domäne mit der Formin-FH2-Domäne .....</b>	<b>82</b>



---

5.1.1 Interaktion der <i>Drosophila</i> p150-Spir-KIND-Domäne mit dem C-Terminus von Cappuccino.....	83
5.1.2 Interaktion der Säuger-Proteindomänen Spir-1-KIND und Fmn2-FH2.....	85
<b>5.2 Regulation der Spir-KIND/Formin-FH2 Interaktion .....</b>	<b>86</b>
<b>5.3 Überlappende Proteinexpressionsmuster von endogenem Spir und Forminen. 87</b>	
5.3.1 Expression von endogenem <i>Drosophila</i> Spir und Cappuccino .....	87
5.3.2 Expression von Maus Spir-1 und Formin-2 in cerebellären Körnerzellen .....	89
<b>5.4 Mögliche funktionale Implikationen einer Interaktion der Spir- und Formin-Proteine .....</b>	<b>92</b>
<b>6 Literatur.....</b>	<b>93</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>102</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	102
7.2 Klonierungsschema für Plasmide .....	104
7.3 Sequenzen.....	106
7.4 Danksagung.....	118
7.5 Lebenslauf.....	119
7.6 Publikationen .....	120

## Zusammenfassung

Formine und Spir-Proteine gehören zu den Regulatoren des Aktincytoskeletts. Diese konservierten Multidomänen-Proteine regulieren den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Aktin-Polymerisation, die Nukleation. Formine und Spir-Proteine nukleieren lineare Aktinfilamente. Erstere vermitteln die Nukleation mit Hilfe der „formin homology 2“- (FH2-) Domäne und bleiben während der Polymerisation mit dem Plus-Ende der Aktinfilamente assoziiert. Spir-Proteine vermitteln die Nukleation mit Hilfe der WASP-Homologie-Domäne 2- (WH2-) Clusters und verbleiben anschließend an den Minus-Enden der Aktinfilamente. Formine der Cappuccino-Unterfamilie und Spir-Proteine werden in den gleichen Geweben von *Drosophila* bis zu den Säugetierenentwicklungsspezifisch exprimiert. Dies weist auf eine funktionelle Kooperation der Proteine beider Klassen hin. In dieser Arbeit wurde eine Interaktion von Spir-Proteinen und Forminen der Cappuccino-Untergruppe in *Drosophila* und Säugern in *in vitro* Bindungsstudien und in *in vivo* Kollokalisationsstudien analysiert. Zudem wurden die endogenen Expressionsmuster der Spir-Proteine und Formine untersucht.

In *Drosophila* sind *cappuccino* und *spire* für die Etablierung der Polarität in der Oocyte und während der Embryonalentwicklung wichtig. Zur Klärung der Frage, ob die Proteine p150-Spir und Cappuccino (Capu) *in vivo* kollokalisiert sind, wurden diese als rekombinante Proteine heterolog in murinen NIH/3T3 Fibroblasten exprimiert. p150-Spir und p150-Spir-CT, welches die modifizierte FYVE-Zinkfingerstruktur und die Spir-Box umfasst, wiesen die typische Verteilung am *trans*-Golgi-Netzwerk, den post-Golgi Vesikeln und dem Recycling Endosom auf. Capu, sowie N-terminal verkürztes Capu-FH1-FH2 und C-terminal verkürztes Capu-NT waren bei ektopischer Expression diffus im Cytoplasma verteilt. In Koexpressionsstudien konnte eine nahezu vollständige Translokation von Capu an die subzellulären p150-Spir Punkte gezeigt werden. Die für diese Translokation verantwortlichen Protein-Regionen wurden durch Analysen mit verkürzten Spir- und Cappuccino Proteinen näher bestimmt. C-terminales Capu, welches die FH1- und FH2-Domänen umfasst, war im Gegensatz zu N-terminalem Capu, ausreichend für die Translokation an p150-Spir. Nicht ausreichend für eine Translokation von Capu war das N-terminal verkürzte p150-Spir-CT. In *in vitro* Bindungsstudien wurde daher eine mögliche Interaktion von Capu-FH1-FH2 und C-terminal verkürztem p150-Spir-NT analysiert. Mit einem 6x-His *pull down* aus Lysat von ektopisch Myc-Capu-FH1-FH2 exprimierenden murinen NIH/3T3 Zellen konnte gezeigt werden, daß die „Kinase Non-catalytic C-lobe Domain“- (KIND-) von p150-Spir ausreichend ist, um die FH1-FH2-Region von Cappuccino zu binden. Ein auf die Region des WH2-Cluster verkürztes p150-Spir-Protein interagiert nicht mit Myc-Capu-FH1-FH2. Eine indirekte Bindung über einen eukaryontischen Multi-Protein-Komplex konnte durch positive Ergebnisse einer Bindungsstudie mit bakteriell exprimiertem GST-Capu-FH1-FH2 und His-p150-Spir-NT ausgeschlossen werden. Dies weist auf eine direkte Interaktion von *Drosophila* p150-Spir-KIND und Capu-FH1-FH2 hin. Die konservierte KIND-Domäne befindet sich im N-

terminalen Abschnitt von KIND-Proteinen und ist ein potentielles Protein-Interaktionsmodul, dessen Funktion bisher nicht geklärt ist.

*In situ* Hybridisierungen am Maus-Zentralnervensystem zeigten ein überlappendes Expressionsmuster von *spir-1* und *formin-2*. Diese Arbeit befasste sich mit der Fragestellung, ob die Säugerproteine Spir-1 und Formin-2 analog zu den *Drosophila* Homologen *in vivo* und *in vitro* interagieren. Für *in vivo* Kollokalisationsstudien mit rekombinatem Spir-1, VKIND, N-terminal verkürztem Formin-2-FH2 (Fmn2-FH2) sowie Diaphanous1-FH2 (Dia1-FH2) wurden diese ektopisch in murinen NIH/3T3 Fibroblasten exprimiert. VKIND wurde als Kontrollprotein der KIND-Familie und Dia1 als Vertreter der autoregulatorischen Formin-Untergruppe genutzt. Spir-1 weist die für *Drosophila* p150-Spir-typische cytoplasmatische, punktförmige Lokalisation auf. Fmn2-FH2 und Dia1-FH2 waren bei transienter Expression diffus im Cytoplasma verteilt. Koexpressionsstudien deuten aufgrund eines nahezu identischen punktierten cytoplasmatischen Lokalisationsmusters auf eine Rekrutierung der Fmn2-FH2-Domäne an Spir-1 hin. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die KIND-Domäne von Spir-1 als Translokationsdomäne der Fmn2-FH2-Domäne eingegrenzt werden. Hierzu wurden die KIND-Domäne von Spir-1 und VKIND mit einem Membran-bindenden CAAX-Motif fusioniert und jeweils mit Fmn2-FH2 und Dia1-FH2 koexprimiert. Es konnte eine Translokation von Fmn2-FH2, nicht jedoch von Dia1-FH2, an Plasmamembran-gebundenes Spir-1-KIND-CAAX gezeigt werden. Weder von Fmn2-FH2 noch von Dia1-FH2 war eine Translokation an Membran-gebundenes VKIND-KIND-CAAX zu beobachten. In den folgenden *in vitro* Glutathione S-Transferase-(GST-) Bindungsstudien konnte eine spezifische Interaktion von Fmn2-FH2 mit Spir-1-KIND bestätigt werden. Transient in NIH/3T3 Zellen exprimiertes rekombinantes Fmn2-FH2 und Fmn2-FH1-FH2 wurden von GST-Spir-1-KIND und nicht von GST oder GST-VKIND-KIND gebunden. Bei analogen Untersuchungen mit Dia1-FH1-FH2 und Dia1-FH2 interagierten diese nicht mit GST, GST-VKIND-KIND und GST-Spir-1-KIND. In einem GST-Spir-1-KIND *pull down* mit bakteriell exprimiertem 6x-His-Fmn2-FH1-FH2 und einer Ko-Gelfiltration von nativem 6x-His-Spir-1-KIND mit 6x-His-Fmn2-FH2 über eine Superdex-Säule konnte gezeigt werden, daß es sich um eine direkte Interaktion von Spir-1-KIND mit Fmn2-FH2 handelt. Die Gelfiltrations-Analysen weisen auf eine Dimerisierung der Fmn2-FH2-Domäne hin. Dies würde eine Analogie zur dimeren FH2-Struktur anderer Formine darstellen.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die endogene Expression von Spir und Forminen in Maus und *Drosophila* biochemisch und immunocytochemisch untersucht. In *in situ* Hybridisierungsstudien wurde die RNA-Expression von *Drosophila capu* und *spire* in Oocyten und Embryonen nachgewiesen. Zur Untersuchung der endogenen *Drosophila* Proteine wurden Embryonenlysate der Treiberlinie 67.15 analysiert. Diese exprimieren wie der Wildtyp kein transgenes p150-Spir oder Cappuccino. Endogenes Spir wurde im Immun-Blot gegen polyklonales anti-p150-Spir-Antiserum mit einem Molekulargewicht von <150 kD nachgewiesen und entspricht der Größe von p150-Spir (1020 AS) bzw. Spir „long form“ (990 AS). Cappuccino wurde in einem analogen Immun-Blot gegen polyklonales anti-Capu-Antiserum mit einem Molekulargewicht von >150 kD und 125 kD detektiert und entspricht

den vorhergesagten Molekulargewichten der Capu-Isoformen. Bei einer Ko-Immunpräzipitationen (KoIP) mit dem anti-p150-Spir-Antiserum aus Wildtyp W1118 Embryonenlysat wurde Capu mit einem Molekulargewicht von 150 kD koimmunpräzipitiert. Zudem wurde eine Spir-Expression im *Drosophila* L3-Larvengehirn untersucht. Transgenes Myc-p150-Spir konnte mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems in Nervenzellen des Pilzkörpers und des Ventralganglions exprimiert werden. Jedoch war außerhalb der ektopischen Expression kein endogenes Spir detektierbar.

Eine schwache *spir-1* und *formin-2* Expression wurde in der Körnerzellschicht des Cerebellums von adulten Mäusen beobachtet. Zudem wurde die Protein-Expression von Spir-1 im Maus-Gehirn nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde im Immun-Blot gegen anti-Fmn2-FH2-Antiserum (IG 467) endogenes Formin-2 mit einem Molekulargewicht von >200 kD im Cerebellum, nicht jedoch in der Lunge, im Colon, in den Ovarien oder in NIH/3T3 Fibroblasten detektiert. Alle folgenden Untersuchungen zur endogenen Spir-1 und Fmn2 Expression wurden mit primären murinen cerebellären Körnerzellkulturen der postnatalen Tage P5-9 durchgeführt. Eine RNA-Expression von *spir-1* und *formin-2* konnte mittels RT-PCR während P7 und P9 nachgewiesen werden. Im Immun-Blot gegen den anti-Spir-1-Antikörper konnten zwei Proteine von ca. 95 kD und 50 kD in P5-9 Lysaten nachgewiesen werden. In einer KoIP mit dem anti-Spir-1-Antikörper und anschließend Immun-Blot gegen einen anti-Fmn2-Antikörper (von M. Dettenhofer, Boston) konnte kein Fmn2 detektiert werden. Bei einer analogen KoIP mit dem unaufgereinigten anti-Spir-1-Antiserum konnte ein kopräzipitiertes Protein von >150 kD mit dem anti-Fmn2-Antikörper detektiert werden, ebenso bei einer GST-Spir-1-KIND Bindungsstudie. Eine mit dem anti-Fmn2-Antikörper durchgeführte KoIP war negativ für Spir-1. In Körnerzellen wurde mit dem anti-Fmn2-Antikörper eine schwache Fmn2-Färbung an cytoplasmatischen Strukturen, an Nervenzellfortsätzen und Regionen starker Aktin-Färbung der Plasmamembran beobachtet. Mit Hilfe des anti-Spir-1-Antikörpers wurde endogenes Spir-1 am Trans-Golgi-Netzwerk, dem Axon und den Dendriten der Körnerzellen nachgewiesen. In immun-cytochemischen Doppel-Färbungen konnte eine punktförmige cytoplasmatische Verteilung von Spir-1 und Fmn2 gezeigt werden. Im perinukleären Raum war eine Kolokalisation von Spir-1 und Fmn2 zu beobachten. In Kern distalen Regionen, den Dendriten und dem Axon ist keine Kolokalisation mehr zu erkennen. Insgesamt weisen die Körnerzell-Untersuchungen darauf hin, daß erstens endogenes Fmn2 nur sehr schwach exprimiert wird bzw. der anti-Fmn2-Antikörper nicht sensitiv genug für eine Detektion ist und zweitens, daß Spir-1 und Fmn2 nicht vollständig kolokalisiert sind.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine direkte Interaktion von Spir-KIND mit der FH2-Domäne von nicht-autoinhibitorischen Forminen nachgewiesen, welche von *Drosophila* bis zur Maus konserviert ist. Diese Bindung könnte ein erster Hinweis für die Funktion der KIND-Domäne sein. So konnte in weiteren Untersuchungen in Kooperation mit M. Quinlan und D. Mullins (San Francisco) eine inhibitorische Wirkung der gebundenen KIND-Domäne auf die nukleierende Aktivität der Formin-FH2-Domäne gezeigt werden.

## Summary

Formin and Spir proteins belong to the regulators of the actin cytoskeleton. These conserved multi-domain proteins initiate actin nucleation, the rate limiting step of actin polymerisation. Both classes of proteins mediate the nucleation of unbranched actin filaments. Formins nucleate actin by means of the formin homology 2 (FH2) domain. During polymerisation they remain associated with the barbed-end of the actin filament as “leaky”-capping proteins. Spir-proteins mediate nucleation via a cluster of four WASP homology domains 2 (WH2) and subsequently cap the pointed-end of the actin filament. Cappuccino-subfamily formins and Spir proteins are co-expressed in a specific developmental manner in defined tissues of distinct species from *Drosophila* up to mammals. This indicates a functional cooperation of the two classes of nucleators. The work presented here focused on a potential protein interaction of Cappuccino-subfamily formins and Spir proteins both in *Drosophila* and mouse. The interaction was analyzed using *in vitro* binding assays and *in vivo* colocalization studies. Furthermore, the endogenous expression patterns of Formins and Spir proteins were examined.

*Drosophila cappuccino* and *spire* are required to establish the polarity of oocytes and for the embryonic development. In this work a potential colocalization of recombinant p150-Spir and Cappuccino proteins was assessed by heterologous expression in murine NIH/3T3 fibroblasts. As reported previously, full length p150-Spir and truncated p150-Spir-CT which contains the modified FYVE zinc finger and the Spir-box had a typical punctuated localization that corresponds to the *trans*-Golgi network, post-Golgi vesicles and the recycling endosome. Full length Capu as well as N-terminal truncated Capu-FH1-FH2 and C-terminal truncated Capu-NT were uniformly distributed throughout the cytoplasm. Co-expressed Capu was translocated to discrete, subcellular punctae that coincide exactly with the localization of p150-Spir. Truncation mutants of p150-Spir and Cappuccino were used to map the domains required for this colocalization. In contrast to N-terminal Capu, the C-terminal Capu encompassing the FH1 and FH2 domains was sufficient for a translocation to p150-Spir punctae. For the translocation of Capu N-terminal truncated p150-Spir-CT was not sufficient either. *In vitro* binding assays were carried out to further elucidate whether the observed translocation was due to an interaction of Capu-FH1-FH2 and C-terminal truncated p150-Spir-NT. A 6x-His-Spir-KIND pull down assay with lysate of ectopically Myc-Capu-FH1-FH2 expressing NIH/3T3 cells indicates an interaction of the Kinase Non-catalytic C-lobe Domain (KIND) of p150-Spir and Capu-FH1-FH2. A truncation mutant of p150-Spir which contained the region of the WH2 cluster was not sufficient to bind Myc-Capu-FH1-FH2. To exclude an indirect binding via additional eukaryotic proteins of the NIH/3T3 lysate, a GST pull down assay with exclusively bacterially expressed GST-Capu-FH1-FH2 and 6x-His-p150-Spir-NT proteins was performed. The results also revealed a positive binding. Taken together the data suggest a direct interaction of *Drosophila* p150-Spir and Cappuccino. The function of

KIND which is located at the N-terminal part of KIND-family proteins is not yet known. It has been proposed that KIND is a putative protein interaction domain.

Mammalian *spir-1* and *formin-2* have a nearly identical expression pattern in the nervous system of mice. Therefore one task of this work was to analyze a possible interaction of these mammalian homologues of *Drosophila* p150-Spir and Cappuccino *in vivo* and *in vitro*. To investigate the subcellular localization, recombinant Spir-1, VKIND, N-terminal truncated Formin-2-FH2 (Fmn2-FH2) and Diaphanous1-FH2 (Dia1-FH2) were ectopically expressed in NIH/3T3 mouse fibroblasts. VKIND was chosen as a control protein for the KIND-family proteins and Dia1 as a representative of the auto-regulatory formin-subfamily. As shown for *Drosophila* p150-Spir full length Spir-1 had a typical punctated cytoplasmic localization. Fmn2-FH2 and Dia1-FH2 were diffusely distributed throughout the cytoplasm. Transiently co-expressed mammalian hu-Spir-1 and mFmn2-FH2 were located in perinuclear punctae that coincide exactly with the localization of Spir. Co-expression studies revealed an identical punctated localization of both proteins which suggest that the FH2-domain is recruited to Myc-Spir-1. In this study the KIND domain of Spir-1 was mapped as interaction domain for Fmn2-FH2 by means of translocation studies. KIND truncation mutants of Spir-1 and VKIND were fused to a membrane-binding CAAX motif and co-expressed with Fmn2-FH2 and Dia1-FH2, respectively. Fmn2-FH2 but not Dia1-FH2 was translocated to the plasma membrane-bound Spir-1-KIND-CAAX. Neither Fmn2-FH2 nor Dia1-FH2 was translocated to the plasma membrane-bound VKIND-KIND-CAAX. In order to verify a specific interaction of Fmn2-FH2 and Spir-1-KIND an *in vitro* Glutathione S-Transferase (GST) pull down assay was performed. In NIH/3T3 cells transiently overexpressed recombinant Fmn2-FH2 and Fmn2-FH1-FH2 were pulled down by GST-Spir-1-KIND and not by GST and GST-VKIND-KIND. Dia1-FH1-FH2 and Dia1-FH2 did not bind to any of the GST proteins in an analogous pull down assay. A GST-Spir-1-KIND pull down assay with bacterially expressed 6x-His-Fmn2-FH2 as well as a co-gelfiltration on a Superdex column with native 6x-His-Spir-1-KIND and 6x-His-Fmn2-FH2 confirmed a direct interaction of the two domains. The gelfiltration analysis revealed a dimerization of the Fmn2-FH2 domain. The data suggest an analogy to the FH2 dimerization of other formins.

A main aspect of this work was to examine the patterns of endogenous Spir and Formin expression in murine cells and *Drosophila* tissues by immunostaining and immunoblotting experiments. *In situ* hybridization studies demonstrate an expression of *Drosophila capu* and *spire* RNA in oocytes and embryos. To verify an expression of the endogenous proteins embryo lysates of the *Drosophila* 67.15 driver strain were analyzed. Like wild-type strains they do not express any transgenic p150-Spir or Cappuccino. A protein of <150 kD was detected by immunoblotting against polyclonal anti-p150-Spir antibodies. The molecular weight corresponds to p150-Spir (1020 aa) and Spire long form (990 aa), respectively. Cappuccino was detected by analogous immunoblotting against polyclonal anti-Capu antibodies. The detected >150 kD and 125 kD proteins correspond to the predicted molecular weights of the Capu isoforms. A co-immunoprecipitation (CoIP) with embryo lysates of the *Drosophila* wildtype

strain W1118 against the anti-p150-Spir antibodies revealed a co-binding of a 150 kD protein, which was detected by the anti-Capu antibodies. Furthermore the brain of stage L3 *Drosophila* larvae was analyzed for p150-Spir expression. The UAS-Gal4 enhancer trap system was used to target expression of Myc-p150-Spir transgenes within neurons of the mushroom bodies and the ventral nerve cord. Apart from the ectopical expression no endogenous p150-Spir expression could be found.

*In situ* hybridizations showed a weak *spir-1* and *formin-2* expression in the granular layer of the cerebellum. Also an expression of endogenous Spir-1 protein in mouse brain was confirmed. In the present work endogenous Fmn2 was detected by immunoblotting against polyclonal anti-Fmn2-FH2 (IG 467) antibodies. The antibodies recognized a >200 kD protein in cerebellum, but not in lung, ovaries or NIH/3T3 fibroblasts. To address an endogenous expression of Spir-1 and Formin-2 in neurons of mice cerebella, the following biochemical and immunostaining experiments were carried out with primary post-natal day P5-P9 granular cells. First, RNA expression of *spir-1* und *formin-2* was confirmed by RT-PCR. Subsequently, two proteins of 95 kD and 50 kD were detected by immunoblotting against polyclonal anti-Spir-1 antibodies. A co-immunoprecipitation against the anti-Spir-1 antibodies was performed. The following immunoblotting analysis against polyclonal anti-Fmn2 antibodies (gift of M. Dettenhofer, Boston) did not show any co-immunoprecipitated Formin-2. A >150 kD protein which was detected by immunoblotting with the anti-Fmn2 antibodies was bound in a CoIP against the unpurified anti-Spir-1 antisera and a GST-Spir-1-KIND pull down, though. In analogy a co-immunoprecipitation with the anti-Fmn2 antibody was assessed. Again no co-immunoprecipitated Spir-1 could be detected. To study the subcellular localization of Formin-2 granular cells were stained with the anti-Fmn2 antibodies. A weak staining was observed for the cytoplasm, actin-stained areas of the plasma membrane and projections of the cells. Spir-1 was detected at the trans-Golgi network, axon and dendrites with the anti-Spir-1 antibodies. Double-labeling of Spir-1 and Formin-2 revealed an apparent colocalization around the nucleus but not in more distant regions of the nucleus, in axons and dendrites. Taken together the data obtained from these granular cell studies indicate that first, Fmn2 is just weakly expressed or the anti-Fmn2 antibody does not exhibit much sensitivity and second that Spir-1 and Formin-2 are not completely colocalized.

In the presented work a direct interaction between the actin nucleators of the Spir and non-autoregulatory formin classes was determined which is conserved across phyla. The binding sites were narrowed down to the KIND domain of Spir and the FH2 domain of formins. This finding implies for the first time a function for the KIND domain as a protein-protein binding module. Further studies in cooperation with M. Quinlan and D. Mullins (San Francisco) indicate an inhibitory function of the KIND domain on the nucleation activity of the FH2 domain.

# 1 Einleitung

Das Cytoskelett oder „Zellskelett“ ist ein Proteinnetzwerk im Cytoplasma eukaryontischer Zellen, welches aus drei Typen von Filamenten besteht: den Aktinfilamenten (Mikrofilamenten), Mikrotubuli sowie den Intermediärfilamenten. Diese sind aufgrund ihrer Durchmesser von 6 nm (Aktin), 10 nm (Intermediärfilamente) und 23 nm (Mikrotubuli) definiert. Die Nutzung des Begriffs „Skelett“ stammt wahrscheinlich von dem (Fluoreszenz-) mikroskopischen Erscheinungsbild der Filamente. Der Begriff ist jedoch insoweit irreführend, da es sich insbesondere im Falle der Aktinfilamente und Mikrotubuli um weitestgehend dynamische Strukturen handelt, welche kontinuierlich auf- und abgebaut werden. Beide Filamenttypen sind an verschiedenen zellulären Funktionen, wie Polarisation, Zellteilung, Motilität oder intrazellulärem Transport beteiligt und unterliegen daher einer gezielten Regulation. Zu den wichtigen Regulatoren des Aktincytoskeletts gehören die Aktinnukleatoren. Diese regulieren den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Aktinpolymerisation, die Nukleation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Interaktion der mechanistisch unterschiedlichen Aktinnukleatoren der Spir- und Formin-Familie in Säugern und *Drosophila* untersucht.

## 1.1 Das Aktincytoskelett

Das Aktincytoskelett gliedert sich in einzelne cytoskelettale Kompartimente, welche aufgrund ihrer verschiedenen Funktionen unterschiedlicher Regulation unterliegen<sup>15-17</sup>. Das Aktincytoskelett läßt sich strukturell in zwei Gruppen aufteilen, welche in stabilen Aktinfilamenten bzw. dynamischen Aktinfilamenten organisiert sind. Bei der mikroskopischen Betrachtung des Aktincytoskeletts einer Zelle fallen zwei unterschiedliche Anordnungen der Mikrofilamente auf: Erstens ein im 70°-Winkel Y-artig verzweigtes, locker verbundenes Aktinfilamentnetzwerk und zweitens parallele, unverzweigte, teilweise in Bündeln angeordnete Aktinfilamente. Beide Anordnungen können je nach Kompartiment und Funktion aus stabilen oder dynamisch organisierten Aktinfilamenten bestehen. Im folgenden wird ein kurzer Überblick über das stabile und dynamische Aktincytoskelett gegeben.

### 1.1.1 Das stabile Aktincytoskelett

Stabile Aktinfilamente sind u. a. Teil des Gleitfilamentsystems im Muskel, von Streifasern und spielen eine Rolle beim Organellentransport, wie beim Transport von Mitochondrien in sprossenden Hefen. Außerdem unterstützen das stabil quervernetzte Aktinnetzwerk die Zellmembran. Stabil quervernetzte Aktinbündel stützen die Stereocilien, auch bekannt als Stereovilli (lange Fortsätze auf der Epithelzelloberfläche), in den Sinneszellen der Schnecke des Innenohrs<sup>18</sup>.

Streifasern sind kontraktile Aktomyosinbündel, welche eine zentrale Rolle bei der Substratadhäsion über Fokalkontakte und bei der Bewegung, insbesondere beim Nachziehen (Retraktion) des hinteren Zellpols bei der Migration spielen<sup>19-23</sup>. Sie bestehen aus relativ kurzen, unverzweigten Aktinfilamenten mit alternierender Polarität<sup>24</sup>. Die Streifasern sind durch



$\alpha$ -Aktinin und wahrscheinlich weitere Aktin-bündelnde Proteine quervernetzt<sup>25,26</sup>. Wie auch bei Myofibrillen der Muskelzellen ist Myosin II periodisch entlang der Streifasern verteilt<sup>27</sup>. Die Aktinfilamente in Streifasern haben niedrige Turnover-Raten, weswegen sie auch als stabile Aktinfilamente klassifiziert werden. Allerdings ist ihre Assoziation mit  $\alpha$ -Aktinin hoch dynamisch. Die progressive Entfernung von  $\alpha$ -Aktinin während der Kontraktion ist beispielsweise für die Bewegung von Myosin entlang der quervernetzten Aktinfilamente wichtig<sup>28,29</sup>.

### 1.1.2 Das dynamische Aktincytoskelett

Die dynamische Reorganisation des Aktincytoskeletts sowie die Polarität der Aktinfilamente sind essentiell für viele gerichtete zelluläre Prozesse, wie z. B. Zellmigration, Phagozytose, Cytokinese und intrazellulärem Transport<sup>30</sup>. In höheren Lebewesen ist das Aktincytoskelett auch die treibende Kraft für morphogenetische Prozesse, wie Epithelfaltung und neuronale Wegfindung<sup>31</sup>. Ein gut erforschter Aspekt des dynamischen Aktincytoskeletts stellt die Bildung von protrusiven Strukturen migrierender Zellen dar.

Das **Lamellipodium** ist der nur 200 nm breite, flache Leitsaum der Zelle (10-100  $\mu\text{m}$ ) mit kurzen, verzweigten Aktinfilamenten, die mit ihren schnell wachsenden Plus-Enden zur Zellmembran gerichtet sind und den Zellvorschub bewirken<sup>32-35</sup>. Die Polymerisation neuer Filamente wird durch den Arp2/3-Komplex vorangetrieben, welcher Aktin an den Seiten bereits vorhandener Filamente nukleiert<sup>36,37</sup>. Die Elongation der Filamente wird dann durch die Bindung von Capping-Proteinen inhibiert, um ein Netz aus kurzen, starren Filamenten aufrechtzuerhalten und die Polymerisierung am Zellvorsprung (Protrusion) in der Nähe der Plasmamembran zu konzentrieren<sup>38,39</sup>.

**Filopodien** sind dünne Stäbchen-ähnliche Zelloberflächenfortsätze, welche lange, parallele Aktinfilamentbündel beinhalten. Ihnen werden sensorische- und Erkundungseigenschaften zugeschrieben<sup>40</sup>. Sie entstehen am dendritischen Lamellipodiennetzwerk durch Entfernen der Capping-Proteine und folgender Elongation einer ausgewählten Teilmenge der Aktinfilamente durch Formine<sup>41-44</sup>. Proteine der Ena/VASP-Familie und Formine scheinen eine zentrale Rolle beim Entfernen der Capping-Proteine und der Bündelung der unverzweigten Aktinfilamente zu spielen<sup>42,45</sup>.

## 1.2 Aktin Struktur und Dynamik

In der Zelle kommt Aktin in zwei Formen vor, als monomeres, globuläres Aktin (G-Aktin) welches reversibel zu filamentösem Aktin (F-Aktin) polymerisieren kann. Die Aktindynamik wird in der Zelle streng reguliert.

### 1.2.1 Monomeres Aktin

Monomeres Aktin (43 kD) ist ein globuläres Protein und wurde mittels hochauflösender Verfahren, wie Protein-Kristallographie oder kernmagnetischer Resonanz (NMR) bereits gut untersucht. Hochauflösende Strukturbilder von G-Aktin mit vielen Interaktionspartnern sind bekannt<sup>46</sup>. Ein Aktinmonomer umfaßt vier Domänen. Die Domänen I und II bilden mit den

Domänen III und IV einen Bindungsspalt mit ATPase Aktivität, in welchem ATP und Magnesium mit sehr hoher Affinität binden<sup>47</sup>. Je nach kokristallisiertem Interaktionspartner und verwendetem Agens zur Stabilisierung des G-Aktins ist dieser Bindungsspalt mehr oder weniger weit offen. Die beobachteten Aktinstrukturen können somit als „offen“, wie bei Profilin:ATP-Aktin<sup>48</sup> bzw. „geschlossen“, wie u. a. in einer weiteren Profilin:ATP-Aktin Struktur<sup>49</sup> sowie ADP-Aktin<sup>50</sup> klassifiziert werden. Allerdings inhibieren die Interaktionspartner/Agenzien durch ihre stabilisierende Funktion den Nukleotidaustausch, möglicherweise durch eine Verengung des Bindungsspalts, so daß alle bis auf eine der untersuchten Strukturen „geschlossen“ sind<sup>46</sup>. Die Autoren schlagen ein oszillierendes Aktin Monomer vor, welches von der geschlossenen ADP-gebundenen Form über die offene ATP-gebundene Form zu einer weiteren geschlossenen ATP-gebundenen Form den Nukleotidaustausch vollzieht. Profilin katalysiert diesen Austausch<sup>51,52</sup>.

### 1.2.2 Filamentöses Aktin

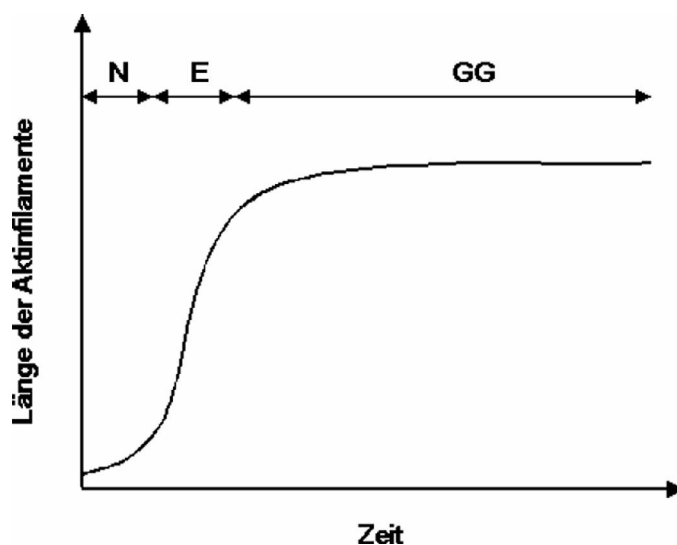
F-Aktin besteht aus zwei Strängen von Aktinpolymeren, die zu einer Doppel-Helix verdrillt sind<sup>53</sup>. Alle Monomere weisen die gleiche Kopf-zu-Schwanz Orientierung im Filament auf, welche eine strukturelle Polarität generiert. Die atomare Struktur von F-Aktin ist noch nicht aufgeklärt. Allerdings gibt es einige Modelle, von denen das Holmes-Modell bereits 1990 veröffentlicht wurde und allgemein anerkannt und weiterentwickelt worden ist. Die Polymere werden durch schwache nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten. Jedes Monomer hat mit vier weiteren Kontakt, wodurch das hohe Maß an Kooperativität bei der Polymerisation erklärt werden kann<sup>54</sup>. Wie oben beschrieben, unterscheiden sich die beiden Enden der Aktinfilamente strukturell und durch die unterschiedlichen Protein-Interaktionspartner auch funktionell<sup>30,55</sup>. Die Polarität kann durch Dekoration der Aktinfilamente mit schwerem Meromyosin (HMM), welches die globuläre Kopfstruktur des verkürzten Myosins enthält, gezeigt werden. Gibt man HMM oder nur das globuläre S1 Kopffragment des Myosins in Abwesenheit von ATP zu Aktinfilamenten, binden sie diese in einem Winkel von 45°, wodurch ein pfeilförmiges Minus- (*pointed-* oder spitzes -) Ende und ein Plus (*barbed-* oder stumpfes -) Ende in elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen sichtbar wird<sup>56,57</sup>.

Die strukturellen Unterschiede zwischen Minus- und Plus-Ende resultieren nicht nur aus der Orientierung der Monomere im Filament, sondern auch aufgrund verschiedener Zustände des gebundenen Nukleotids und der Konformation der Aktinuntereinheiten. Mindestens zwei Konformationsänderungen des Monomers sind bei der Einfügung in das Aktinfilament beschrieben worden. Die erste findet direkt bei der Inkorporation des monomeren Aktins in das Filament statt, bei welcher Profilin freigesetzt und ATP hydrolysiert wird<sup>58</sup>. Die zweite findet nach der langsameren Freisetzung des Phosphatrestes statt und ist durch die Präferenz von Filament-bindenden Proteinen für ADP.P-Aktin bzw. ADP-Aktin zu erkennen. Der Aktindepolymerisierende Faktor ADF/Cofilin bindet bevorzugt an ADP-Aktin<sup>59</sup>. Damit läßt sich die Reifung der Untereinheiten entlang des F-Aktins beobachten.

### 1.2.3 Aktindynamik

G-Aktin bindet ein Molekül ATP und kann unter ATP-Hydrolyse in einem mehrstufigen Prozeß zu langen Filamenten, dem F-Aktin polymerisieren. Man unterscheidet die Polymerisationsschritte Nukleation, Elongation und Fließgleichgewicht (Abb. 1).

Der initiale **Nukleationsschritt**, die Assoziation eines Dimers und anschließende Ausbildung eines stabilen Trimers zu einem Nukleus, ist energetisch ungünstig und läuft sehr langsam ab. Die Nukleation ist daher der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Aktinpolymerisation. In der **Elongationsphase** werden Aktinmonomere an beide Filamentenden zugefügt. Jedoch unterscheiden sich die Assoziations- ( $k_{on}$ ) und Dissoziationsraten ( $k_{off}$ ) an beiden Enden. Übersteigt die Assoziations- die Dissoziationsrate, verlängert sich das Filamentende. Die Elongationsrate hängt von der Konzentration an G-Aktin ab<sup>60</sup>. Bei der kritischen Konzentration an monomerem Aktin ( $\sim 0,1 \mu\text{M}$ ) stellt sich ein **Fließgleichgewicht** ein, bei welchem das Netto-Filamentwachstum endet. Assoziations- und Dissoziationsrate sind angeglichen, und die G-Aktin Konzentration bleibt konstant. Da die kritische Konzentration für das Minus-Ende oder *pointed end* ( $0,5\text{-}0,7 \mu\text{M}$ ) 5- bis 10fach höher ist als für das Plus-Ende oder *barbed end* ( $0,05\text{-}0,1 \mu\text{M}$ ), wächst es langsamer bzw. gibt im Fließgleichgewicht kontinuierlich Aktinmonomere ab, während das Plus-Ende im selben Maße wächst<sup>18,61</sup>. In diesem sogenannten „Tretmühlenmechanismus“ wandern inkorporierte Aktinmonomere vom Minus- zum Plus-Ende<sup>57</sup>.



**Abb. 1: Schema der Aktinpolymerisations-Kinetik.**

Die Aktinpolymerisation verläuft in drei Stufen. Die Nukleation (N) ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, welcher sich als lag-Phase in der Polymerisationskurve darstellt. Anschließend folgt die schnelle Elongation (E) bis zu zum Erreichen der kritischen Konzentration an freiem G-Aktin. Im Fließgleichgewicht (GG) bleibt die Netto-Filamentlänge aufgrund des Tretmühlenmechanismus konstant.

In der Zelle liegt die Konzentration an monomerem Aktin über der kritischen Konzentration, so daß auch eine spontane Nukleation und Polymerisation stattfinden könnte. Allerdings ist die Nukleation kinetisch ungünstig und wird in der Zelle im Normalfall durch eine Reihe von Monomer-sequestrierender (absondernder) Proteine und Aktinnukleatoren reguliert<sup>62,63</sup>.

## 1.3 Aktinnukleatoren

Das Aktincytoskelett wird durch viele Proteine reguliert. Diese binden monomeres und filamentöses Aktin und regulieren somit Struktur, Dynamik und die zeitlich-räumliche Organisation des Aktincytoskeletts. Die Aktivität dieser Proteine wird genau über verschiedene Signaltransduktionswege geregelt. Wie bereits unter 1.3.1 beschrieben, erfolgt die spontane Nukleation von Aktin sehr langsam, da sie energetisch ungünstig ist. Für die notwendige kontinuierliche Umstrukturierung des Aktincytoskeletts müssen Aktinfilamente jedoch schnell polymerisiert und depolymerisiert werden. Daher sind regulierbare Aktinnukleatoren für die Beschleunigung der geschwindigkeitsbestimmenden Nukleation essentiell. Wichtige Aktinnukleatoren sind: der „Actin Related Protein“- (Arp)2/3-Komplex, die Formin-Proteinfamilie und Spir-Proteinfamilie.

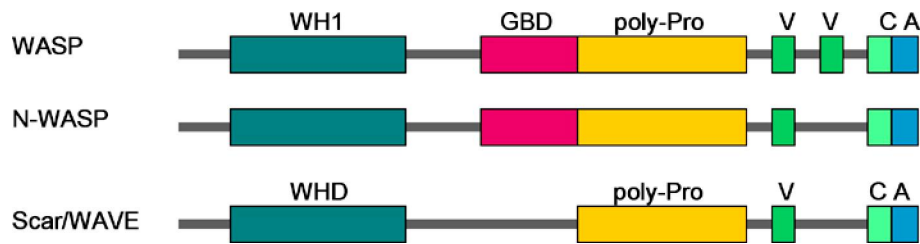
### 1.3.1 Arp2/3-Komplex und WASP-Proteine

#### 1.3.1.1 Arp2/3-Komplex

Der Arp2/3-Komplex ist, ebenso wie einige Proteine der Formin-Familie, bereits gut charakterisiert. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Protrusion von eukaryontischen Zellen. Außerdem wird er von einigen intrazellulären pathogenen Bakterien zur Fortbewegung im Cytoplasma der Wirtszelle genutzt<sup>64,65</sup>. Im derzeit favorisierten „dendritischen Nukleations-Modell“ wird vorgeschlagen, daß der aus den sieben Proteinen Arp2, Arp3 und ARPC1-5 (p16, p20, p21, p34 und p40) bestehende Komplex lokal die Bildung neuer Aktinfilamente stimuliert. Er bindet seitlich an bereits existierende Filamente und induziert eine Verzweigung<sup>30,36,37,66-68</sup>. Die atomare Struktur des Arp2/3-Komplexes wurde kristallographisch aufgeklärt. Arp2 und Arp3 weisen eine ähnliche Faltung wie Aktin auf. Sie bilden im aktivierten Zustand ein Heterodimer aus, welches dem freien Plus-Ende eines Aktinfilaments gleicht. Als „Pseudo-Nukleus“ katalysiert Arp2/3 so die Aktinpolymerisation<sup>69-71</sup>. Die Nukleationsaktivität des Arp2/3-Komplexes allein ist jedoch gering. Er muß durch „nucleation promoting factors“ (NPFs), den Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteinen (WASP) und „WASP family verprolin homology proteins“ (WAVE)-Proteinen, in Anwesenheit von F-Aktin aktiviert werden<sup>37,72-75</sup>.

#### 1.3.1.2 Regulation der Arp2/3 Nukleationsaktivität durch WASP/WAVE-Proteine

Zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes sind mindestens zwei Signaltransduktionswege bekannt, welche mit der Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen beginnen. Zusätzlich kann die Aktivität des Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteins (WASP) durch Phosphorylierung erhöht werden. Die GTP-gebundenen und damit aktivierten Rho-GTPasen Cdc42 und Rac induzieren die Aktivität der Multidomänenproteine der WASP-Familie, welche dann den Arp2/3 Komplex aktivieren<sup>73,76</sup>. Im folgenden wird ein Überblick über die Domänen-Struktur der Proteine der WASP-Familie gegeben und anschließend auf die regulatorischen Besonderheiten der zwei Untergruppen dieser Proteinfamilie eingegangen.



**Abb. 2: Schema der Domänenorganisation von Proteinen der WASP Familie**

Alle WASP/WAVE-Proteine sind durch ein konserviertes C-terminales VCA-Modul charakterisiert. Das VCA-Modul besteht aus der Verprolin Homologie- (V-) oder WASP Homologie 2- (WH2-) Domäne, gefolgt von einer Cofilin Homologie- oder „central“- (C-) Domäne und einer „acidic“- (A-) Domäne. N-terminal des VCA-Moduls befindet sich ein Poly-Proilin-Bereich. WASP und N-WASP enthalten eine zentrale „GTPase binding domain“ (GBD) und eine N-terminale „WASP homology domain 1“ (WH1). Die WAVE-Proteine enthalten dagegen eine N-terminale „WAVE homology domain“ (WHD).

Die Proteine der WASP-Familie sind ca. 65 kD groß und weisen gemeinsame biochemische Eigenschaften durch eine konservierte C-terminale Struktur auf<sup>77</sup>. Abb. 2 gibt einen schematischen Überblick über die Domänenorganisation der WASP/WAVE-Proteine. Das C-terminale **VCA-Modul** besteht aus einer V- (Verprolin Homologie-) oder WH2- (WASP Homologie 2-) Domäne, gefolgt von einer C- (Cofilin Homologie- oder „central“-) Domäne sowie einer A- („acidic“-) Domäne<sup>78</sup>. Die V- oder auch WH2-Domäne bindet G-Aktin und ist in vielen Aktin-bindenden Proteinen, wie auch den Spir-Proteinen, zu finden<sup>13,79</sup>. Die CA-Domäne bindet den Arp2/3-Komplex<sup>60,70,75</sup>. Das VCA- oder auch WA-Modul stellt die kleinstmögliche benötigte Region für die Arp2/3-Komplex Aktivierung dar<sup>60,73</sup>. N-WASP enthält im Gegensatz zu WASP- und den WAVE-Proteinen zwei anstatt nur einer V-Domäne und ist der stärkste Aktivator der Aktinpolymerisierung<sup>80</sup>. Alle WASP-Familie-Proteine weisen N-terminal von der VCA-Domäne einen **Poly-Proilin-Bereich** auf. Dieser stellt eine Interaktionsoberfläche für verschiedene Signalwege dar und beeinflusst über die Bindung von SH3- („src homology 3“-) Adaptorproteinen die Aktindynamik<sup>60,81-84</sup>. Profilin bindet an die Poly-Proilin-Domäne und treibt so die Aktinpolymerisation an<sup>85-87</sup>. Profilin ist ein von Hefe bis zu höheren Metazoen konserviertes Protein und bindet Aktinmonomere im Verhältnis 1:1. Hierbei hat Profilin eine höhere Affinität zu ATP-G-Aktin als zu ADP-G-Aktin und katalysiert den Nukleotid-Austausch von ADP zu ATP<sup>30</sup>. Darüberhinaus sequestriert Profilin G-Aktin vom Minus-Ende, stimuliert das schnelle Wachstum am Plus-Ende und senkt gleichzeitig die kritische G-Aktin Konzentration im Fließgleichgewicht<sup>88-91</sup>. Die Dissoziation von Aktin wird möglicherweise durch die sauren Phospholipide Phosphatidylinositolphosphat (PIP) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) stimuliert<sup>92,93</sup>. Profilin:ATP-Aktin bindet an die Poly-L-Proilin-Domänen weiterer Aktin-regulierender Proteine, wie "vasodilator-stimulated phosphoprotein" (VASP) und Formine und nimmt somit indirekt Einfluß auf Aktinnukleation und Aktinpolymerisation<sup>94-96</sup>.

Die Proteine der WASP-Familie werden aufgrund unterschiedlicher N-Termini in zwei Kategorien eingeteilt, in WASP-ähnliche Proteine (WASP und neuronales N-WASP) und „WASP family verprolin homology proteins“ (WAVE1-3)-Proteine<sup>78</sup>. WASP und N-WASP enthalten eine zentrale „GTPase binding domain“ (**GBD**) und eine N-terminale „WASP homology

domain 1“ (**WH1**), welche auch als „Ena-VASP homology domain 1“ (EVH1) bezeichnet wird<sup>97,98</sup>. WAVE-Proteine werden aufgrund ihrer Entdeckung in *Dictyostelium* auch als Scar („suppressor of cAMP receptor“-) Proteine bezeichnet<sup>99,100</sup>. WAVE-Proteine enthalten eine konservierte „WAVE homology domain“ (**WHD**), welche auch als „Scar homology domain“ (SHD) bezeichnet wird.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen WASP- und WAVE-Proteinen besteht in ihrer Aktivierbarkeit, insbesondere durch kleine Rho-GTPasen. WASP und N-WASP sind direkte spezifische Effektoren von Cdc12, während WAVE-Proteine aufgrund einer fehlenden GBD nur indirekt über Rac1 aktiviert werden<sup>97,101,102</sup>.

**WASP**-Proteine liegen im ruhenden Zustand in einer autoinhibierten Form vor: Durch eine intramolekulare Bindung der GBD an das VCA-Modul wird eine Aktivierung des Arp2/3-Komplex verhindert<sup>103</sup>. Dieser inaktive Zustand wird durch das „WASP interacting protein“ (WIP), ein Protein der Aktin-bindenden Verprolin-Familie, stabilisiert<sup>104-106</sup>. Die kooperative Bindung von aktivem Cdc42 an das „Cdc42/Rac-interactive-binding“- (CRIB-) Motiv der GBD und dem Phospholipid „phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate“ (PIP<sub>2</sub>) an die basische Region des VCA-Moduls demaskiert die VCA-Region und aktiviert hiermit die WASP-Proteine<sup>82,103,107</sup>. Nach teilweiser Aktivierung von WASP durch Cdc42 können Tyrosinphosphorylierungen an Y291 in der GBD sowie Serinphosphorylierungen an S483 und S484 im VCA-Modul die Affinität für den Arp2/3-Komplex verstärken und die Aktinpolymerisation somit erhöhen<sup>102,108-112</sup>. Außerdem kann die Phosphorylierung von Y291 die nukleäre Lokalisation von N-WASP mindern und so die subzelluläre Lokalisation beeinflussen<sup>112</sup>. Durch Bindung der SH2/SH3 Adaptorproteine „growth factor receptor bound 2“ (Grb2) und „non-catalytic region of tyrosine kinase“ (Nck) an WASP-Proteine werden diese subzellulär an Stellen mit hoher Aktindynamik rekrutiert. Möglicherweise können Grb2 und Nck zusätzlich die aktive Konformation von N-WASP unterstützen<sup>60,113-115</sup>.

**WAVE**-Proteine sind nicht auto-inhibitorisch und werden indirekt über Effektorproteine durch die GTPase Rac aktiviert. Sie stimulieren die Ausbildung breiter Lamellipodien und *membrane ruffles*<sup>87</sup>. Zwei Effektorproteine von Rac sind in diesem Signaltransduktionsweg bekannt. Das SH3-Adaptorprotein „insulin receptor tyrosine kinase substrate p53“ (IRSp53) bindet an WAVE2<sup>116-118</sup>. Ein anderer Signalweg aktiviert über „p53-inducible mRNA 121“ (PIR121) den pentameren WAVE1- bzw. WAVE2-Komplex. Diese bestehen aus WAVE, Abl-interactor (Abi), „Nck-associated protein“ (Nap), PIR121 and „haematopoietic stem progenitor cell 300“ (HSPC300)<sup>119-121</sup>. Unklar ist, ob der pentamere WAVE-Komplex Rac abhängig Arp2/3 aktiviert, oder ob durch Bindung von Rac der Komplex dissoziiert und dann ein WAVE/HSPC300-Dimer Arp2/3 aktiviert<sup>119,122-124</sup>.

### 1.3.2 Formine

Die Proteine der Formin-Familie sind in einer Vielzahl von Arten konserviert, von der Hefe bis zum Menschen sowie in Pflanzen. Formine nukleieren lineare Aktinfilamente, welche meist in parallelen Arrays gebündelt sind. Sie bleiben während der Polymerisation mit dem Plus-Ende

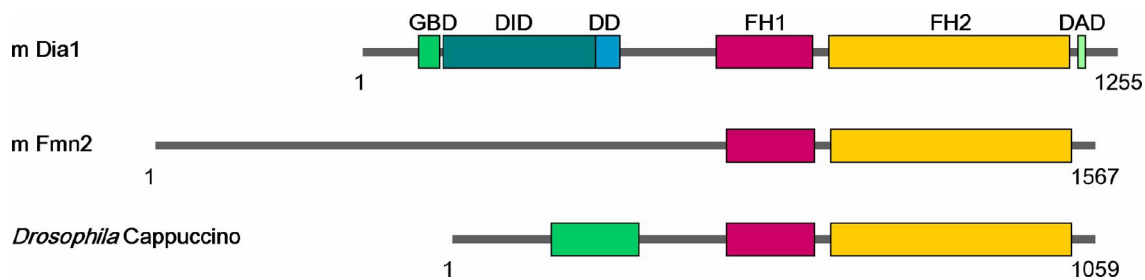
der Aktinfilamente assoziiert und verhindern so das Binden von Capping-Proteinen, wodurch lange Aktinfilamente entstehen. Hierdurch unterscheiden diese sich grundlegend von anderen Aktinnukleatoren, welche am Minus-Ende der Aktinfilamente verbleiben. Formine beeinflussen verschiedene intrazelluläre Strukturen<sup>125</sup>. So spielen Formine z. B. eine wichtige Rolle bei der Cytokinese<sup>126,127</sup>, bei der Filopodien Formation, bei der Ausbildung der Zell-Polarität und beim Organellen-Transport in Hefe<sup>128-130</sup> sowie bei der Zell-Adhäsion und Streißfaser-Ausbildung<sup>29,131-133</sup>. Auch bei der Endocytose<sup>134,135</sup>, der Transkriptionsaktivierung über den „serum response factor“ (SRF)/SRF Kofaktor MAL<sup>136-139</sup>, der Embryogenese<sup>140-142</sup> und der Mikrotubuli Stabilisierung<sup>143-145</sup> sind Formine involviert.

Die Proteine der Formin-Familie können in zwei Gruppen unterteilt werden, in auto-inhibitorische „Diaphanous-related formins“ (Drfs) und in nicht auto-regulatorisch Formine. Zu den Drfs gehören neben den gut untersuchten, namensgebenden Diaphanous- (Dia-) Proteinen auch die „dishevelled-associated activator of morphogenesis“ (DAAM) und „formin-related gene in leukocytes“- (FRL-) Proteine<sup>146</sup>. In der phylogenetischen Analyse der charakteristischen „formin homology 2“-Domäne der Metazoen-Formine können, zu den oben genannten, vier weitere Untergruppen unterschieden werden: „formin homology domain-containing protein“ (FHOD), „inverted formin“ (INF), „formin“ (FMN) und Delphilin<sup>147</sup>. In den letzten Jahren wurden mehrere Übersichtsartikel zur Formin-Forschung veröffentlicht<sup>1,94,125,147-152</sup>. Im folgenden werden Besonderheiten zweier Proteine der FMN-Gruppe, Formin-2 (Fmn2) und Cappuccino (Capu) ausführlicher besprochen.

### 1.3.2.1 Formin-Struktur und -Polymerisationsmechanismus

Formine sind sehr große, meist über 1000 Aminosäurereste lange Multidomänen-Proteine. Allen Forminen gemeinsam ist die „formin homology 2“- (FH2-) Domäne, welche im Regelfall am C-Terminus lokalisiert ist. Zusätzlich sind die meisten Formine über eine Linker-Region mit einer weiteren „formin homology 1“- (FH1-) Domäne verbunden, welche sich N-terminal zur FH2-Domäne befindet (Abb. 3).

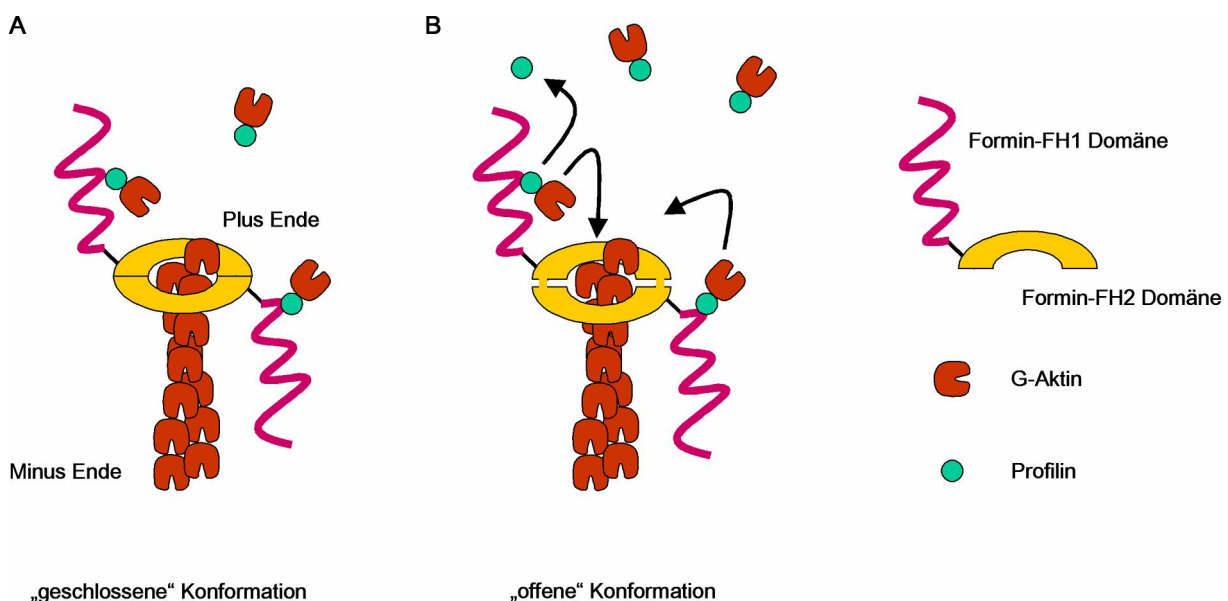
Die ca. 400 Aminosäurereste lange **FH2-Domäne**, einschließlich Linker-Region, ist notwendig und hinreichend um Aktin zu nukleieren und mit hoher Affinität während der Elongation gebunden zu halten<sup>146,153-155</sup>. Durch die Bindung der Formine an die Plus-Enden der Aktinfilamente wird die Inhibition der Polymerisation durch Capping-Proteine und Gelsolin verhindert, welche ebenfalls mit hoher Affinität an Plus-Enden von F-Aktin binden<sup>2</sup>. Verschiedene aktuelle Studien legen eine Dimerisierung der FH2-Domäne nahe<sup>10,11,156,157</sup>. Die Kristallstruktur von Bni1-FH2 zeigt eine Donut-ähnliche Gestalt, wobei sich zwei längliche Untereinheiten zu einem stabilen, aber flexiblen zirkulären Dimer mit einer großen zentralen Öffnung zusammenlagern<sup>10</sup>. Eine Kokristallisation von Bni1-FH2 mit (alleine nicht polymerisationsfähigem) „tetramethyl-rhodamine-labeled actin“ (TMR-Aktin) zeigt eine Filament-ähnliche Struktur des Aktin, bei welchem jede FH2-Untereinheit zwei Aktinuntereinheiten bindet, wobei die vorletzte Aktin-Untereinheit von beiden FH2-Untereinheiten gebunden wird<sup>158</sup>. Das könnte ein Hinweis darauf sein, daß der Nukleationsmechanismus nicht auf der Stabilisierung eines Dimers, sondern eines Trimers basiert.



**Abb. 3: Schema der Domänenorganisation von Formin-Proteinen**

Alle Formine lassen sich durch die Formin-Homologie-Domänen FH1 und FH2 charakterisieren. Murines Diaphanous 1 (m Dia1, NP\_031884.1) ist Vertreter der „Diaphanous-related formins“- (Drf-) Unterfamilie, welche zusätzlich die autoregulatorischen Strukturen „GTPase binding domain“ (GBD), „Diaphanous-inhibitory domain“ (DID), „dimerization domain“ (DD) und „Diaphanous-autoregulatory domain“ (DAD) aufweisen. Die FMN-Untergruppe, vertreten durch murines Formin-2 (m Fmn2, AAF72883) und *Drosophila* Cappuccino (AAC46925.1), ist durch ein Fehlen von autoinhibitorischen Strukturen gekennzeichnet.

Aktuell wird das folgende **Modell** der Aktin-Polymerisation durch die FH2-Domäne vorgeschlagen (Abb. 4): Das FH2-Homodimer rotiert während der Elongation entgegengesetzt zur F-Aktin-Helix und wirkt so einem Verdrehungsstress und Supercoil-Formationen entgegen<sup>155,158,159</sup>. Das FH2-Dimer oszilliert zwischen einem „offenen“ und einem „geschlossenen“ Konformations-Zustand und erlaubt oder verhindert so die Einfügung eines neuen Aktinmonomers in das Aktinfilament<sup>158,160</sup>.



**Abb. 4: vorgeschlagener Aktin-Polymerisationsmechanismus von Forminen.**

Es wird ein konservierter Mechanismus für die Aktinpolymerisation durch Formine angenommen, bei welchem die Geschwindigkeitsrate der Polymerisation je nach Formin unterschiedlich ist. Das Formin-FH2 Dimer umschließt das Plus-Ende des F-Aktins und oszilliert zwischen einem „offenen“ und einem „geschlossenen“ Zustand. (A) Profilin-Aktin bindet an die Prolin-reiche FH1-Domäne. Die Polymerisation wird jedoch durch die „geschlossene“ Konformation des Formin-Dimers verhindert. (B) Die „offene“ Konformation des Formin-Dimers ermöglicht die Polymerisation. Sie wird um ein Vielfaches durch die Rekrutierung von Profilin-Aktin über die FH1-Domäne gegenüber einer Assoziation von freiem Aktin an das Plus-Ende des Aktinfilaments beschleunigt<sup>148</sup>.

Die nur schwach konservierte **FH1-Domäne** ist sehr Prolin-reich und variiert innerhalb der Formin-Proteinfamilie in der Länge (15-229 Aminosäurereste) sowie dem Prolin-Anteil (35-100%)<sup>147</sup>. Diese Prolin-reiche Region stellt eine potentielle Bindungsstelle für eine variierende Anzahl (0-16) an Profilin bzw. Profilin:ATP-Aktin dar<sup>6,161-164</sup>. Die Dissoziationskonstante



( $K_d$ ) für Profilin ist hoch und liegt bei  $\sim 5 \mu\text{M}$ . Jedoch ist die Profilin-Konzentration der Zelle sehr hoch, so daß Profilin einen physiologisch relevanten Liganden darstellt. Pyrene-Aktin-Assays und TIRF-Mikroskopie zeigen eine teils erhebliche Beschleunigung der *in vitro* Aktin-Polymerisationsrate durch Formin-FH1-FH2-Konstrukte in Profilin-Aktin Anwesenheit im Vergleich zu Kontrollstudien ohne die Formin-FH1-Domäne auf<sup>95,165</sup>. Die Rekrutierung von ATP-G-Aktin aus Profilin-Aktinkomplexen durch die FH1-Domäne und eine anschließende Weitergabe des Aktins an die FH2-Domäne ist eine mögliche Interpretation dieser Studien (Abb. 4). Außerdem ist die FH1-Domäne durch den hohen Prolin-Anteil potentielle Interaktionsdomäne für SH3-Domänen oder WW-Motiven anderer Proteine<sup>147,151</sup>.

### 1.3.2.2 Regulation

In den meisten Organismen wurden mehrere Formin-Unterfamilien gefunden. Ein Grund für diese Diversität könnte die Notwendigkeit der strengen zeitlichen und räumlichen Kontrolle der Formine darstellen, welche über verschiedene regulatorische Mechanismen vermittelt wird.

So gehört die Formin-Unterfamilie der **Drfs** (Dia, DAAM und FRL) zu den Effektoren der Rho-GTPasen<sup>164,166,167</sup>. Ihre FH1-FH2-Domänen werden beidseitig von insgesamt mehreren regulatorischen Domänen flankiert (Abb. 2). Am C-Terminus befindet sich die „Diaphanous-autoregulatory domain“ (DAD), während die größere N-terminale regulatorische Region aus der „GTPase binding domain“ (GBD) gefolgt von der „Diaphanous-inhibitory domain“ (DID) und „dimerization domain“ (DD) besteht. Die Kristallstruktur der DID-DD-Region (auch als „formin homology 3“- (FH3-) Domäne bezeichnet) von mDia1 zeigt, daß diese ein stabiles Dimer bildet, welches mit der GBD eine helikale Einheit formt<sup>168</sup>. Die 20-30 Aminosäurereste lange DAD bindet im autoinhibierten Grundzustand des Drfs an die DID. Diese inhibitorische Konformation wird durch die dimerisierende DD verstärkt<sup>157,169</sup>. Die inhibitorische intramolekulare Interaktion zwischen DID und DAD kann durch die Bindung einer aktivierten Rho-GTPase an die GBD/DID-Region größtenteils wieder gelöst werden<sup>157,169</sup>. Obwohl Bindungen von Rho bzw. DAD an die DID sich gegenseitig ausschließen, zeigen Kristallstrukturen aus RhoC bzw. RhoA in Komplexen mit GBD/DID von mDia1, daß deren Bindung an diese Regionen nur teilweise überlappend mit der Bindungsregion der DAD mit der DID ist<sup>168,170</sup>.

Bei der Untergruppe der **FHOD-Proteine** wurde gezeigt, daß eine Interaktion der C-terminalen (DAD)-Region mit der N-terminalen FH3-Region zu einer Autoinhibition von FHOD1 führt<sup>171,172</sup>. Diese monomere FH3-Domäne hat allerdings keine ausgeprägte Homologie zu den FH3-Domänen der Drfs und liegt N-terminal benachbart zu einer Rac1 GBD. Die Bindung von nicht-GTP-gebundenem Rac1 führt zu einer Aktivierung von FHOD1 durch eine Lösung der inhibitorischen intramolekularen Interaktion<sup>137,171,172</sup>. Aktiviertes FHOD1 induziert die Bildung von Streßfasern und eine Verstärkung der „serum response element“ (SRE) Transkription<sup>172-174</sup>.

Bei Proteinen der **FMN-, INF- und Delphilin-**Untergruppe sind keine autoinhibitorischen Regionen bekannt, zu möglichen Regulationsmechanismen der FMN-Untergruppe siehe 1.3.2.3. **Delphilin** wird selektiv in Parallelfaser-Synapsen der Purkinjezellen des

Cerebellums exprimiert und bindet mit seiner N-terminale PDZ-Domäne an den glutamate receptor delta2 (GluRdelta2) Rezeptor. Diese Interaktion wird durch eine Phosphorylierung des GluRdelta2 Rezeptor durch „cAMP-dependent protein kinase“ (PKA) reduziert. Die physiologische Funktion der Delphinin-GluRdelta2 ist jedoch noch ungeklärt<sup>175-178</sup>.

### 1.3.2.3 Die Cappuccino-Untergruppe der Formine

Zu der Formin-Proteinfamilie gehört die bisher wenig untersuchte Cappuccino- oder FMN-Untergruppe, welche unter anderem die zwei Säuger-Homologe Formin-1 (FMN1) und Formin-2 (FMN2) umfaßt. Primitive Wirbeltiere wie die Seescheide *Ciona savignyi* besitzen, wie Säuger, zwei *formin* Gene, während *Drosophila melanogaster* nur ein Ortholog von *formin-2*, *cappuccino* (*capu*) exprimiert. Da sich die vorliegende Arbeit mit der funktionellen Charakterisierung und Regulation der zwei Vertreter Fmn-2 und Cappuccino dieser Gruppe befaßt, soll hier ausführlicher auf diese eingegangen werden.

#### Cappuccino

Zu Beginn der Entwicklung von *Drosophila* bilden sich innerhalb der **Oocyte** zwei Gradienten aus morphogenen Substanzen aus, die die anteroposteriore und die dorsoventrale Achse definieren (Gradiententheorie). Die maternalen Ei-Polaritäts-Gene sind für diese frühe Musterbildung wesentlich<sup>179</sup>. Nachdem beide Achsen etabliert sind, setzt in der späten Oogenese (in Stadium S10b) eine Nährzell-Strömung ein, bei welcher das Nährzell-Cytoplasma in die Oocyte einströmt und die Nährzellen anfangen zu schrumpfen. Die entstandene Gesamtströmung vermischt Nährzell-Cytoplasma und Ooplasma. Das Stadium S10b ist dadurch charakterisiert, daß in den Nährzellen eine Reorganisation des Aktincytoskeletts von der Membran zum Nukleus hin und eine Reorganisation der Mikrotubuli an den Kortex der Oocyte stattfinden<sup>180,181</sup>. Im folgenden wird der *cappuccino* Phänotyp beschrieben.

In Mutagenese-Experimenten wurden die maternalen Gene *cappuccino* und *spire* (siehe 1.3.3) identifiziert. Diese gehören neben *staufen*, *mago nashi*, *valois* und *oskar* zu der posterioren Gruppe der Maternal-Effekt Gene. In Eikammern von *cappuccino* und *spire* Mutanten werden Komponenten des posterioren Pols, wie das Vasa-Protein, die G-Protein alpha Untereinheit Gi alpha, *Staufen* und *oskar* mRNA nicht richtig lokalisiert<sup>4,14,182</sup>. Neben der posterioren Musterbildung werden *cappuccino* und *spire* auch für die dorsoventrale Musterbildung benötigt. So wird *gurken* mRNA nicht richtig in der dorsal-anterioren Region der Oocyte, sondern ringförmig am anterioren Ende der Oocyte lokalisiert<sup>183</sup>. Die Folge ist ein dorsalisierter Phänotyp von Ei und Embryo<sup>4</sup>. *capu* Transkripte wurden in den Ovarien schon im Germarium in Region 2, in Nährzellen der Eikammer in den Stadien S1-S13, in der Oocyte in den Stadien S4-S9 und schwach in den Follikelzellen der Stadien S4-S11 detektiert<sup>14</sup>. In *cappuccino* Mutanten kommt es in der Mitte der Oogenese (Stadium S8) zu einer verfrühten subkortikalen Bündelung der Mikrotubuli in der Oocyte, welche von Mikrotubuli-abhängigen ooplasmatischen Strömen und einer Fehllokalisation von *Staufen* begleitet wird<sup>14,184</sup>. Der beobachtete Phänotyp ist nahezu identisch mit dem *chickadee*- und *spire*-Mutanten Phänotyp<sup>4,184</sup>. *Chickadee* kodiert für *Drosophila* Profilin und interagiert mit Cappuccino<sup>6</sup>. Der beob-

bachtete Mutanten Phänotyp der anormalen Mikrotubuli Verteilung kann auch durch Cytochalasin D induziert werden. Das legt den Schluß nahe, daß Komponenten des Aktin-cytoskeletts diese Mikrotubuli Reorganisation vor dem Stadium S10b zumindest teilweise hemmen, und die Aktinnukleatoren Cappuccino und Spir zwischen diesen Bestandteilen des Cytoskeletts vermitteln<sup>6,14</sup>. Allerdings sind weder Geschwindigkeit noch zeitliche Regulierung von der Stärke der unterschiedlichen *capu* Mutanten Allele abhängig<sup>14</sup>.

In der Mitte der Oogenese treten bei Mutationen der starken Allele *capu*<sup>G7</sup>/*capu*<sup>G7</sup> und *capu*<sup>RK12</sup>/*capu*<sup>RK12</sup>, neben Mikrotubuli-Mißlokalisierung in der Oocyte, weitere Defekte in der Eikammer auf. So enthalten Eikammern in Stadium S10 binukleierte **Nährzellen** mit unvollständiger Zellmembran und Überresten von Aktin-enthaltenden Ring-Kanälen. Diese Defekte wurden auch bei *cut* und *chikadee* Mutanten nachgewiesen<sup>6,185</sup>. Das *cut* Gen kodiert für ein Homöo-Domänen-Protein, das einen für die Morphologie der Keimbahnzellen erforderlichen Soma-zu-Keimbahn Signalstoff-Stoffwechselweg reguliert. Es interagiert genetisch mit *cappuccino*, nicht aber mit *chikadee* und *spire*<sup>185</sup>. Zwei Möglichkeiten werden als Ursache des Phänotyps diskutiert. Zum einen können die binukleierten Nährzellen aus einer unvollständigen Cytokinese resultieren. Hierfür würde die Beteiligung der Formine und Profilin in der Cytokinese von Hefe und Maus sprechen<sup>6</sup>. Die Ring-Kanal-Überreste enthalten jedoch die Proteine Hu-li tai shao und Kelch, welche den Ring Kanälen erst nach vollendeter Cytokinese hinzugefügt werden. Daher ist es möglich, daß die Cytokinese der Keimzellentwicklung im Germarium normal verläuft und die binukleierten Nährzellen erst später durch Fusion entstehen<sup>185</sup>.

Der *Gene Expression Report* des Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) ist eine *in situ* Hybridisierungsstudie zur Bestimmung der Expressionsmustern von 5270 Genen in Embryonen. Zusätzlich wurde eine unabhängige Microarray Zeitverlaufs-Analyse der Genexpressionsmuster erstellt. Der Report für das *capu* Gen (Gen CG3399) zeigt eine Expression im Präblastoderm von Stadien 1-3 **Embryonen**. In den Stadien 4-10 konnte keine Expression visualisiert werden, obwohl die Genexpression im Zeitverlaufs-Profil durchgehend (Stadien 1-16) positiv war. Ab Stadium 11 gibt es eine erneute Expression im Bereich der Vorderdarmanlagen, Enddarmanlagen und dorsalen Epidermisanlagen. Die Expression dauert bis zum Ende der Embryonalentwicklung (Stadium16) fort. Allerdings sind die Färbungen sehr schwach. Teilweise sind Expressionen in Embryonen desselben Stadiums einmal zu sehen und ein anderes Mal nicht<sup>12</sup>. Weibliche Mutanten der posterioren Gruppe der Maternal-Effekt-Gene produzieren Embryonen ohne Polzellen (primordiale Keimzellen) und granuläre Partikel des Polplasmas. Außerdem weisen sie Defekte bei der abdominalen Segmentierung auf<sup>4</sup>.

## Formin-2

B. Leader und P. Leder beschrieben 2000 erstmals die komplette kodierende Sequenz des murinen *formin-2* (*fmn2*) Gens sowie partiell die kodierende Sequenz des humanen *FORMIN-2* (*FMN2*) Gens. Das Maus-Gen liegt auf Chromosom 1, kodiert für ein 1567-aa Protein, während das humane *FMN2* Gen auf dem Chromosomen Intervall 1q23-1q43 liegt und für

ein 1722-aa Protein kodiert. Die Aminosäuresequenz von humanem und murinem Formin-2 ist über das ganze Protein zu 74,7%, im C-Terminus sogar zu ca. 90% identisch. hFMN2 und hFMN1 sind dagegen nur zu 31,9% identisch<sup>186-189</sup>. Das Maus-Gen wird fast ausschließlich im sich entwickelnden und adulten **Zentralnervensystem** exprimiert und hat damit ein völlig anderes Expressionsmuster als *Fmn1*, welches in der Niere exprimiert wird<sup>187,190</sup>. Die Expression von muriner *formin-2* mRNA beginnt am Embryonaltag E9,5 im sich entwickelnden Rückenmark und Gehirn und dauert in den neonatalen und adulten Gehirnstrukturen des Bulbus olfactorius, Kortex, Thalamus, Hypothalamus, Hippocampus und Cerebellum fort. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde bei humanem *FMN2* beobachtet<sup>187</sup>. Zudem wird humanes *FMN2* in parathyloiden Tumoren und verschiedenen Tumoren im Gehirn (Glioblastoma, Retinoblastoma und Chondrosarcoma) exprimiert<sup>188</sup>. Interessanterweise weisen bei *in situ* Hybridisierungsstudien die murinen *formin-2* und *spir-1* Gene ein fast identisches Expressionsmuster während der Embryogenese im Telencephalon, Mesencephalon, Trigeminal-Ganglion und Neuralrohr des sich entwickelnden Zentralnervensystems sowie im adulten Gehirn auf. Im adulten Gehirn wurden starke, sich überlappende Expressionsmuster in den Purkinjezellen des Cerebellums, der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und den CA1-, CA2- und CA3-Regionen des Hippocampus nachgewiesen<sup>5</sup>.

*formin-2* ist wie *cappuccino* ein Maternal-Effekt-Gen, welches während der Oogenese exprimiert wird und in **Oocyten** für den Ablauf der Metaphase von Meiose I benötigt wird. Während der Oogenese wird in zwei meiotischen Teilungen (Meiose I und II) aus der Urkeimzellen das Ovum (die befruchtungsfähige Eizelle) gebildet. Hierbei wird die Oocyte zweimal asymmetrisch geteilt. Bei jeder Reduktionsteilung entsteht eine große, plasmahaltige Eizelle und eine deutlich kleinere Zelle, das Polkörperchen, das dann degeneriert. Für diese asymmetrische Teilung ist die korrekte Positionierung des Spindelapparats notwendig. Der Spindelapparat wird in Meiose I im Zentrum der Oocyte gebildet und wandert dann zum Zellkortex. In der kortikalen Domäne über der Spindel reichern sich Aktinfilamente an und die Mikrovilli nehmen ab. In dieser Region bildet sich nach der Anaphase die Teilungsfurche aus, worauf das Polkörperchen entsteht. *Fmn2* ist notwendig für die Mikrotubuli-unabhängige Chromatin-Positionierung während Metaphase I. In *formin-2*<sup>-/-</sup> Oocyten wird die Metaphase Spindel nicht richtig positioniert und das erste Polkörperchen nicht gebildet. Die Befruchtung von *formin-2*<sup>-/-</sup> Oocyten hat die Ausbildung polyploider Embryonen, Schwangerschaftsverluste oder Hypofertilität zur Folge. Die Kreuzung von *formin-2*<sup>-/-</sup> Männchen mit *formin-2*<sup>+/+</sup> Weibchen führt zu keinem Rückgang der Fertilität. Erstaunlicherweise weisen *formin-2*<sup>-/-</sup> Mäuse keine erkennbaren Abnormalitäten des Zentralnervensystems im Vergleich zu *formin-2*<sup>+/+</sup> Mäusen auf<sup>141,191</sup>.

Bei Frauen mit ungeklärter Unfruchtbarkeit wurde mehrfach über in der Meiose arretierte, teilweise polyploide Oocyten berichtet<sup>192-195</sup>. Bei künstlichen Befruchtungen (IVF) wurde festgestellt, daß 20-30% der entnommenen Ova bei der Entnahme nicht gereift waren, mit keinem Anzeichen von Bildung des ersten Polkörperchens<sup>196</sup>. Eine potentielle Verbindung von ungeklärter Unfruchtbarkeit und Mutationen des humanen *FMN2* Gens wurde durch Analyse

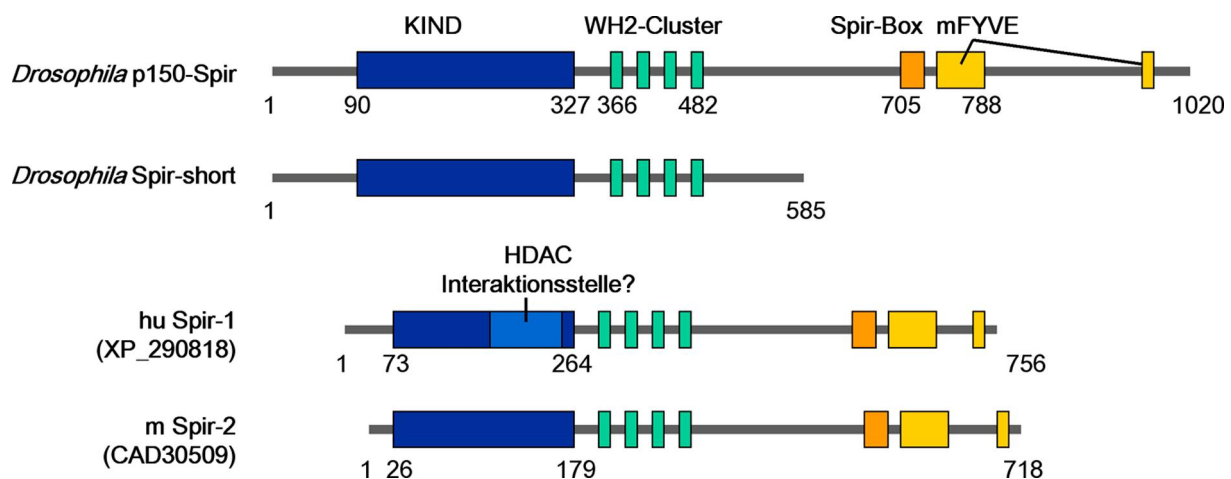
von Polymorphismen in der DNA-Sequenz von sieben IVF Frauen und 62 gesunden Frauen untersucht. Eine IVF Frau war homozygot für ein Allel der 18 *FMN2* Exons, Exon 9/10, während alle anderen Frauen heterozygot für dieses Allel waren. Ob dieses Ergebnis statistisch aussagekräftig ist bzw. ob es bereits mit Unfruchtbarkeit in Zusammenhang gebracht werden kann, ist fraglich. Exon 5, welches für die FH1-Domäne kodiert, konnte nicht untersucht werden. Weitere Untersuchungen sollen jedoch folgen<sup>189</sup>.

### 1.3.3 Spir

Die Spir-Proteine gehören zur einer dritten Klasse von Aktinnukleatoren mit einem eigenen, verschiedenartigen Nukleationsmechanismus. Sie nukleieren, wie Formine, lineare Aktinfilamente, verbleiben jedoch an deren Minus-Ende, wie der Arp2/3-Komplex<sup>3</sup>. Die Proteine der Spir-Familie wurden im Gegensatz zum Arp2/3-Komplex und zu den Forminen, welche auch in Hefe und Pflanzen vorkommen, bisher nur in Metazoen identifiziert. Vertebraten besitzen zwei *spire* Gene, *spir-1* und *spir-2*, während die Seescheide *Ciona savignyi* und *Drosophila melanogaster* jeweils eine Gen, *posterior end mark-5 (pem-5)* bzw. *spire (p150-spir)* exprimieren<sup>8,9,13</sup>. Der Locus von *Drosophila spire* liegt auf Chromosom 2L und kodiert für mindestens zwei Isoformen von Spir: p150-Spir und Spir-short.

#### 1.3.3.1 Spir Struktur und Nukleationsmechanismus

Spir-Proteine sind große Multidomänen-Proteine mit folgender Strukturmotivanordnung von N-terminal nach C-terminal: KIND, Cluster aus vier WH2-Domänen, Spir-Box, mFYVE und JNK Bindungsregion (Abb. 5).

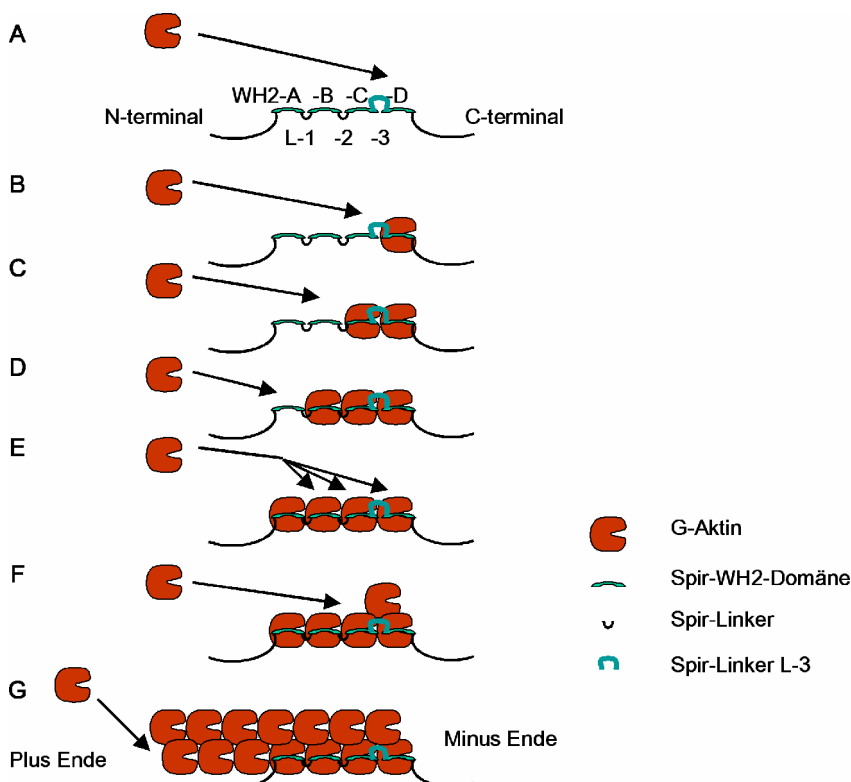


**Abb. 5: Schema der Domänenorganisation der Spir-Proteine.**

Alle Spir-Proteine weisen eine ähnliche Strukturmotivanordnung wie *Drosophila* p150-Spir (Spire-PA, NP\_724254) auf. N-terminal befinden sich die „Kinase Non-catalytic C-lobe Domain“ (KIND) und WASP-Homologie-Domäne 1- (WH2-) Domänen, C-terminal die konservierte Spir-Box und mFYVE. Die Splice-Varianten Spir-short (AAF23616) ist C-terminal verkürzt. Säuger-Spir-1 (XP\_290818.1) und Spir-2 (CAD30509.1) sind kleiner als p150-Spir, weisen aber eine ähnliche Domänenstruktur auf. Eine potentielle Histone-Deacetylase (HDAC) Interaktionsstelle in Spir-1 wurde durch Sequenzanalyse mit SMART ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)) definiert.

In der N-terminalen Hälfte enthält Spir die „Kinase Non-catalytic C-lobe Domain“ (**KIND**), ein neues Strukturmotiv, das sich möglicherweise aus der Faltung der konservierten Serin-

Threonin-Proteinkinasen entwickelte. Proteinkinasen bestehen aus zwei Domänen: Der kleinere N-terminale Lappen weist viele Kontakte zu  $Mg^{2+}$ -ATP auf und ist von dem größeren C-terminalen  $\alpha$ -helikalen Lappen durch eine Spalte getrennt. Die C-terminale Domäne trägt die wichtigsten katalytischen Reste und ist für die Substratbindung zuständig<sup>197,198</sup>. KIND ist strukturell verwandt mit der C-terminalen Domäne und stellt somit ein potentielles Protein-Interaktionsmodul dar. Da die katalytisch wirksame Schleife fehlt, ist es wahrscheinlich, daß KIND keine katalytische Eigenschaft besitzt. Das Ras-GEF Very-KIND (VKIND) gehört ebenfalls zur KIND-Proteinfamilie und enthält zwei N-terminalen KIND-Motive<sup>9</sup>. Hiernach folgt ein charakteristisches Cluster aus vier WASP-Homologie-Domäne 2- (WH2-) Motiven, welche monomeres globuläres Aktin (G-Aktin) binden und nukleieren. WH2-Domänen kommen in vielen Proteinen vor und können in zwei große Unterklassen, den WASP/WAVE ähnlichen- sowie den Thymosin- $\beta$ 4 ähnlichen WH2-Domänen eingeteilt werden. Thymosin- $\beta$ 4 sequestriert ATP-G-Aktin von F-Aktin und WASP-Proteine sind notwendig für die Aktivierung des Arp2/3-Komplex (siehe 1.3.1.2)<sup>79,199</sup>. Die Aktinnukleation durch Spir erfolgt jedoch völlig unabhängig vom Arp2/3-Komplex, und das WH2-Cluster ist notwendig und hinreichend für die Aktinnukleation<sup>3,13</sup>.



**Abb. 6: vorgeschlagener Aktin-Nukleationsmechanismus von Spir.**

Die Spir WH2-Domänen koordinieren die Assoziation von bis zu vier Aktinmonomeren entlang eines Strangs des Aktinfilaments. (A-D) WH2-D und WH2-C binden das erste Dimer, longitudinal stabilisiert durch L-3. Zwei weitere Aktinmonomere binden an WH2-B und WH2-A. (E-H) Die Addition eines weiteren Aktinmonomers an die Berührungsfläche zweier beliebiger WH2-gebundener Aktinmonomere führt zur Bildung eines stabilen Nukleus mit anschließender schneller Polymerisation<sup>3</sup>.

Die vier WH2-Domänen werden N-terminal nach C-terminal durch dem Suffix -A, -B, -C, und -D unterschieden (Abb. 6). Die Linker-Regionen zwischen ihnen werden mit L-1, L-2 und L-3

bezeichnet. Quinlan *et al.* (2005) wiesen durch Pyrene-Aktin Polymerisationsstudien und Elektronenmikroskopie mit unterschiedlichen WH2- und L-Mutanten nach, daß die Region von WH2-D, L-3 und WH2-C den funktionellen Kern für die Nukleation darstellen. Die kinetische Barriere wird wahrscheinlich durch die Assemblierung eines Aktin-Dimers überwunden, welches durch das Binden von zwei Aktinmonomeren an WH2-D und WH2-C unter Koordination der Linker-Region L-3 entsteht. Die L-3 hat selbst eine schwache Nukleationsaktivität und stellt ein neues Aktin-bindendes Motiv dar. Über Bindungen an WH2-B und WH2-A werden dann ein drittes und viertes Aktinmonomer angefügt. So entsteht ein linearer Strang entlang der Längsachse der zweisträngigen F-Aktin Helix, mit WH2-D an dessen Minus-Ende und WH2-A am Plus-Ende. Die Bindung eines weiteren Aktinmonomers an die Berührungsfläche zweier beliebiger WH2-gebundener Aktinmonomere würde in der Formation eines stabilen Nukleus und folgender Polymerisation resultieren<sup>3</sup>.

Am C-Terminus von Spir befinden sich die Spir-Box und eine modifizierte FYVE Zinkfinger-Struktur. Die **Spir-Box** ist ein in Spir-Proteinen hochkonserviertes Sequenzmotiv, das eine Strukturverwandtschaft zur  $\alpha$ -helikalen Rab-GTPase-Bindungsdomäne des Rab3A Effektors Rabphilin-3A aufweist. Rabphilin-3A ist ein FYVE-Zinkfinger-ähnliches Protein und bindet die GTP-gebundene Form der GTPase Rab3A. Rab-GTPasen sind wie FYVE-Proteine in der Regulation von zellulären Membrantransportprozessen involviert. Transient in murinen NIH/3T3 Fibroblasten überexprimiertes Spir weist eine punktförmige Lokalisation auf. Diese ist mit der kleinen GTPase Rab11 kolokalisiert und entspricht der des *trans*-Golgi Netzwerkes, der post-Golgi Vesikel und des Recycling Endosoms<sup>7,8</sup>. Rab11 ist ein Regulator der Exocyst Untereinheit Sec15 und E-Cadherin und reguliert den exocytotischen Transportweg vom Recycling Endosom zur Plasmamembran<sup>200,201</sup>. Außerdem ist Rab-11 über das Adaptorprotein „Rab11 family interacting protein 2“ (Rab11-FIP2) mit Myosin Vb assoziiert. Das Motorprotein Myosin Vb ist essentiell für den Plasmamembran Recycling Weg<sup>202,203</sup>. Eine dominant interferierend Rab11 Mutante hat denselben Effekt auf die Lokalisation des „vesicular stomatitis virus“ (VSV) G-Proteins in Vero Zellen wie der überexprimierte C-Terminus von mSpir-1 (mSpir-1-CT): Beide inhibieren den Transport von VSV G-Protein an die Zellmembran über den exocytotischen Transportweg. Das VSV G-Protein akkumuliert im Golgi-Netzwerk<sup>8,204</sup>.

Unmittelbar hinter der Spir-Box liegt die modifizierte FYVE-Zinkfinger-Struktur (**mFYVE**). Sie ist homolog zu FYVE-Zinkfinger-Motiven. FYVE-Domänen sind Membran-bindende Module und beinhalten acht Cystein-Reste, welche zwei Zink-Ionen binden. Zwischen Cystein 2 und 3 befinden sich eine basische, hydrophobe Interaktionsfläche für Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat<sup>205</sup>. Die mFYVE-Domäne besitzt nicht diese basische Region und hat eine zusätzliche Schleife zwischen Cystein 6 und 7<sup>8</sup>. Zusammen mit der Spir-Box ist sie für die subzelluläre Lokalisation von Spir von Bedeutung.

### 1.3.3.2 Spir Expression und Funktion

Die Aminosäuresequenz von murinem Spir-1 wurde noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisher wurde die C-terminale Sequenz von 643 AS beschrieben. Humanes (XP\_290818.1, 756 AS)

und murines Spir-1 (NP\_919336.1, 643 AS) sind über die bekannte m Spir-1 Sequenz zu 81 % identisch. Humanes (CAD19439, 728 AS) und murines Spir-2 (CAD30509, 718 AS) sind zu 83% identisch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). *In situ* Hybridisierungsstudien zeigen ein fast identisches Expressionsmuster der murinen *formin-2* und *spir-1* Gene während der Embryogenese im sich entwickelnden und adulten Zentralnervensystem<sup>5</sup>.

*Drosophila spire* gehört wie *cappuccino* zur posterioren Gruppe der maternalen Ei-Polaritätsgene. Mutanten dieser Gruppe weisen einen ähnlichen Phänotyp während der *Drosophila* Entwicklung auf (siehe 1.3.2.3 Cappuccino). *In situ* Hybridisierungsstudien in Ovarien zeigen eine mRNA-Expression von *spire-RA* (auch *p150-spir*) und *spire-RD* (*spire short form*) ab der Region 2 des Germariums bis Stadium 10 der Oogenese. Die *spire* Transkripte sind in den Nährzellen und Follikelzellen zu beobachten<sup>13</sup>. Der *Gene Expression Report* (Gen CG10076), zeigt eine starke *spire* Expression im gesamten Embryo in den präblastodermalen Stadien 1-3, besonders in den Polzellen. Nach abgeschlossener Zellularisierung, ab dem zellulären Blastoderm Stadium 4, ist keine Expression mehr zu beobachten. Ab Stadium 11 ist eine erneute Expression im Bereich der posterioren Mitteldarmanlagen, Enddarmanlagen und Rectum, Keimzellen sowie im Bereich der Vorderdarmanlagen, clypeolabraler Anlagen und ventralen Epidermisanlagen festzustellen. Die Expression dauert in diesen Bereichen bis zum Ende der Embryonalentwicklung (Stadium 16) an<sup>12</sup>.

### 1.3.3.3 Spir-Regulation

Untersuchungen zur Regulation von Spir wurden bisher nur für *Drosophila* Spir durchgeführt. In einem Yeast-Two-Hybrid Screen für die „Jun N-terminal kinase“ (JNK), einem Mitglied der „mitogen-activated protein kinases“ (MAP-Kinasen), wurde eine Interaktion mit dem C-Terminus von p150-Spir festgestellt. Aktiviertes JNK phosphoryliert Spir *in vivo* und *in vitro*. Bei Koexpression in NIH/3T3 Zellen kolokalisieren beide Proteine<sup>7</sup>. JNK wird u. a. durch Umwelt-Streß/Cytokine mittels Phosphorylierung über die MAP-Kinase-Kinasen MKK4 und MKK7 aktiviert<sup>206</sup>. Der JNK-Signalweg kann durch Hochregulierung von JNK-Blockern durch den Transkriptionsfaktor NF-kappaB behindert werden. NF-kappaB ist ein Gegenspieler der, durch den „tumor necrosis factor“ (TNF) alpha, induzierten Apoptose. Außerdem spielt NF-kappaB eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und bei Entzündungsreaktionen<sup>207,208</sup>. Weitere Regulationsmechanismen durch Rho-GTPasen sind wahrscheinlich. So wurden in *Yeast-Two-Hybrid-Assays* Bindungsstellen für Rho1 (ein Homolog von RhoA), Rac1 und Cdc42 am N-terminalen Ende (AS 1-100) von p150-Spir gefunden<sup>13</sup>. Rac und Cdc42 GTPasen sind Aktivatoren des JNK-Signalwegs, welcher für die dorsale Schließung des Embryos notwendig ist<sup>209-214</sup>.



## 1.4 Aufgabenstellung

Formine und Spir-Proteine sind Nukleatoren von linearen Aktinfilamenten. Die *Drosophila* Proteine Cappuccino und Spir gehören zu diesen zwei Proteinklassen und sind für die Etablierung der Polarität in der Oocyte und die Embryonalentwicklung wichtig<sup>4,6</sup>. *Drosophila spir-* (*p150-spire*) und *cappuccino*-Mutanten haben einen nahezu identischen Phänotyp<sup>4</sup>. Dies läßt eine mögliche funktionelle Kooperation dieser Proteine auf zellulärer Ebene vermuten. Die subzelluläre Lokalisation und eine mögliche Kolokalisation der *Drosophila* Proteine p150-Spir und Cappuccino sollte *in vivo* in murinen Fibroblasten der NIH/3T3 Zelllinie mittels ekto-pischer Expression analysiert werden. Eine mögliche direkte Interaktion dieser beiden Proteine sollte zudem in *in vitro* Bindungsstudien untersucht werden. Zudem sollten polyklonale Antikörper gegen beide Proteine hergestellt werden, um so das endogene Expressionsmuster in *Drosophila* zu untersuchen.

Ein überlappendes Expressionsmuster der Säugerhomologe *spir-1* und *formin-2* wurde im sich entwickelnden und im adulten Zentralnervensystems von Mäusen beobachtet. In diesen *in situ* Hybridisierungsstudien wurde u. a. eine schwache *spir-1* und *Fmn2* Expression in der Körnerzellschicht nachgewiesen<sup>5</sup>. Analog zu den Untersuchungen in *Drosophila* sollten *in vitro* Bindungsstudien Aufschluß über eine direkte Interaktion von Spir-1 und Fmn2 geben. Die subzelluläre Lokalisation und eine mögliche Kolokalisation der Säugerproteine Spir-1 und Formin-2 sollte *in vivo* in murinen Fibroblasten der NIH/3T3 Zelllinie mittels transienter Überexpression analysiert werden. Translokationsstudien sollten durch Koexpression von EGFP-Formin-Fusionsproteinen und C-terminal verkürzten KIND-Proteinen durchgeführt werden, welche mit einem als C-terminaler Membrananker dienendem CAAX-Motiv fusioniert werden. Zusätzlich sollte auch hier das endogene Expressionsmuster untersucht werden. Hierfür sollten primäre Körnerzellen des Cerebellums postnataler Mäuse biochemisch und immuncytochemisch untersucht werden, da diese einfach zu isolieren und kultivieren sind. Zunächst sollte mittels RT-PCR eine RNA-Expression bestätigt und dann durch immuncytochemische Doppel-Färbungen eine mögliche Kolokalisation analysiert werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Materialien	Hersteller, Bestellnr.	Materialien	Hersteller, Bestellnr.
3 MM-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel	D (+)-Glucose-anhydrous	Fluka, 49140
6-well-plate	Greiner, 657160	Dimethylformamid (DMF)	Sigma, München
3AT:3Amino1,2,4-triazol	Sigma, München	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, D2650
Aceton	Merck, Darmstadt	dNTPs	Peqlab, Erlangen
Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 und 37.5:1	Bio-Rad Laboratories, 1610125 und 1610120	Dithiothreitol (DTT)	Sigma, München
Adenin	Sigma, A9126	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technology, Belgien, 32430-19
Agar select	Sigma, A5054	ECL-Hyperfilm	Amersham, RPN3103K
Agarose, ultra pure	Life Technology, 15510-027	ECL Western Blot Reagenz	Amersham, Chalfont St. Giles (UK), RPN2106
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt	EDTA	Sigma, E5134
Ammoniumpersulfat	Sigma, A3678	EGTA	Sigma, München
Ampicillin	Sigma, A9518	Eisessig	Sigma, München
Antipain	Boehringer, Mannheim	Eppendorf Combitips	Eppendorf, Hamburg
Aprotinin	Boehringer, 100690	Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, RK1G
ATP	Sigma, München	Essigsäure	AppliChem, Darmstadt
ATP $\gamma$ - <sup>32</sup> P (6000 Ci/mmol)	Amersham, Chalfont St. Giles (UK)	Ethanol, abs.	AppliChem, 100458
Basal Medium Eagle (BME)	Sigma, B 1522	Ethidiumbromid	Life Technology, Belgien
Benzamidin	Sigma, München	Fettfreie Trockenmilch	Nestlé
Borsäure	Sigma, B0252	Formaldehyd	Sigma, München
Bottle Top Filter 0,22 $\mu$ m	Nalge Nunc International, Wiesbaden	Fötales Kälberserum (FKS)	HyClone, SH30071
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, A 9418	Frischhaltefolie	Alio, Renningen
Bromphenol Blau	Sigma, München	Gentamycin Sulfat	Sigma, G 1264
Calciumchlorid	Sigma, C3881	Gewebekulturflaschen	Sarstedt, 83/1813.002
Chloramphenicol	Sigma, C0378	Glutathione Sepharose® 4B	Amersham, 17075601
Chloroform	Sigma, C2432	Glycerol	Sigma, München
Coomassie-Blue G	Sigma, München	Glycin	Sigma, G7126
Cytosine $\beta$ -D-arabinofuranoside hydrochloride (AraC)	Sigma, C 6645		

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller, Bestellnr.</b>	<b>Materialien</b>	<b>Hersteller, Bestellnr.</b>
Greiner-Röhrchen	Greiner, 227261	Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, München	Natriumfluorid	Sigma, München
Hoechst Stain Solution	Sigma, H 6024	Natriumhydrogencarbonat	Sigma, München
Hybond-C extra 82 mm	Amersham, Chalfont St. Giles (UK)	Natriumhydroxid	Sigma, München
IPTG	Sigma, I9003	Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden, 30210
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt	Nonidet P40 (NP40)	Sigma, München
Kaliumchlorid	Sigma, P4504	Parafilm® M	Brand GmbH, Wertheim, PF10
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt	PBS	Life Technology, Belgien, A0965, 9010
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, 1.05033.0500	PD-10 Entsalzungs-Säulen	Amersham, 17-0851-01
Lachssperma-DNA	Sigma, München	Pepstatin	Sigma, P4265
LB-Broth Base	Sigma, München, L3022	Phenol Red	Sigma, P 5530
Leupeptin	Boehringer Mannheim, 1017101	Phenol:Chloroform: Isoamylalkohol	AppliChem, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma, G1251	Phenylalanin	Sigma, München
Lipofectamin	Invitrogen, Karlsruhe, 18324-012	Pipes	Sigma, P6757
Lithiumacetat	Sigma, München	PMSF	Sigma, P7626
Magnesiumacetat	Sigma, München	Polyethylenglykol 4000 (PEG)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, M2670	Poly-L-Lysin	Sigma, P 2636
Magnesiumsulfat	Sigma, München	Ponceau S	Sigma, München, P3504
β-Mercaptoethanol	Sigma, München	2-Propanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Rühl AG	Protein A-Agarose	Boehringer, 1 134 515
MOPS-Säure	Sigma, München, M9381	Protein G-Agarose	Boehringer, 1 243 233
Mowiol	Calbiochem, 475904	Protran Nitrozellulose Transfer-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel, 401391
Mullbinden	Apotheke, Würzburg	Quick-Hybe	Stratagene, Heidelberg
NAP-10 Entsalzungs-Säulen	Amersham, 17085401	Saccharose	Merck, Darmstadt
Natrium-Orthovanadat	Sigma, München	Salzsäure, rauchend	Merck, Darmstadt
Natrium Pyrophosphat	Sigma, München	SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma, München	Sterilfilter Millex-GS	Millipore, Schwalbach
Natriumchlorid	Sigma, S3014	TB-Broth	Sigma, München
		TEMED	Sigma, T9281
		Tris Base	Sigma, München

Materialien	Hersteller, Bestellnr.	Materialien	Hersteller, Bestellnr.
Triton X-100	Sigma, München	Tyrosin	Sigma, München
Trizma Hydrochlorid	Sigma, München	Vectashield	Vector Laboratories, H-1000
Trizol	Life Technology	Wasser	Sigma, W 3500
Trypsin	Sigma, T 9935	Whatman-Rundfilter	Whatman, Maidstone (USA)
Trypsin Inhibitor	Sigma, T 6522	Xylencyanolblau	Sigma, München
Trypsin/EDTA	Life Technology		
Tween 20	Sigma, P1379		

## 2.2 Enzyme

Materialien	Hersteller
DNase	Sigma, D 5025
Klenow Fragment	NEB, Frankfurt
Pfu-DNA-Polymerase	Promega, M 7741
T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt und MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt und MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt und MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

Alle Enzyme und Antikörper wurden mit den vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffern sowie bei den empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

## 2.3 Antikörper und Reagenzien zur cytochemischen Aktinfärbung

Primäre Antikörper	Hersteller
Maus anti-cMyc 9E10, monoklonal	Santa Cruz
Kaninchen anti-GFP (Living Colors A.v. Peptide Antibody)	Clontech (BD Biosciences)
Ziege anti-GST	Amersham
Maus anti-Penta-His	Qiagen
Maus anti-hu-Rab11a	Clontech
Kaninchen anti-m-Fmn2, polyklonal	M. Dettenhofer, Harvard, USA
Schaf-anti-hu-TGN46, polyklonal	Serotec
Kaninchen-anti- <i>Drosophila</i> -p150-KW, polyklonal	S. Hilgert
Kaninchen-anti- <i>Drosophila</i> -Capu-FH2, polyklonal	S. Hilgert
Kaninchen-anti-m-Fmn2-FH2-467, polyklonal	S. Hilgert
Sekundäre Antikörper	Hersteller
TRITC-gekoppelter Esel-anti-Maus-Antikörper	Dianova
FITC-gekoppelter Esel-anti-Kaninchen-Antikörper	Dianova
TRITC-gekoppelter Esel anti-Schaf-Antikörper	Dianova

<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen-, Ziege- und Maus-Antikörper	Amersham
Zenon Alexa Fluor® 488 rabbit IgG labeling reagent	Molecular Probes
Zenon Alexa Fluor® 555 rabbit IgG labeling reagent	Molecular Probes
<b>Reagenzien zur Aktinfärbung</b>	<b>Hersteller</b>
TRITC-gekoppeltes Phalloidin	Molecular Probes
FITC-gekoppeltes Phalloidin	Molecular Probes

## **2.4 Plasmide und Oligonukleotide**

### **2.4.1 Plasmide**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Beschreibung</b>
pCDNA3	eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV Promotor (Invitrogen, Karlsruhe)
pEGFP (N1)	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von Fusionsproteinen, die mit dem N-Terminus von EGFP fusioniert sind (Clontech, Heidelberg)
pGEX (4T-3, 6P-1)	bakterieller Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine (Amersham, Chalfont St. Giles (UK))
pQE (80L, 70)	bakterieller Expressionsvektor für Hexa-His-Fusionsproteine (Qiagen, Hilden)
EGFP-mDia1-ΔN3	S. Narumiya, Tokyo
EGFP-mDia1-F2	S. Narumiya, Tokyo
pcDNA3:VKIND-f.l.	A. Mees, MSZ, Würzburg <sup>215</sup>
pBS-KIAA1135-new	EST-Klon: Accession: AB 032961.2, XM_290818.1
pcDNA3-Myc-hu-Spir-1:	E. Kerkhoff, J. Borawski, C. Leberfinger (s. Anhang)
pcDNA3-hu-Spir2-KIND-CAAX	E. Kerkhoff, J. Borawski, C. Leberfinger (s. Anhang)
pcDNA3-Myc-p150Spir	I. Otto, MSZ, Würzburg <sup>216</sup>
pcDNA3-Myc-Capu-FH1-FH2	E. Kerkhoff, J. Borawski, C. Leberfinger (s. Anhang)
pGEX-4T-3-Capu-FH1-FH2	E. Kerkhoff, J. Borawski, C. Leberfinger (s. Anhang)
pEGFP-C1-m-Fmn2-FH2	E. Kerkhoff, J. Borawski, C. Leberfinger (s. Anhang)
pEGFP-C1-m-Fmn2-FH1-FH2	E. Kerkhoff, J. Borawski, C. Leberfinger (s. Anhang)

## 2.4.2 Oligonukleotide

Primer	Sequenz
Bam-p150-WH2-5'	5' GC GGA TCC GCG AAG CTG GGC TTC AAC GAC 3'
p150-WH2-TAG-KI3'	5' GC GGT ACC CTA TTC CCT GAG GGT CGG TGC TTC 3'
Bam-p150-Spir5'	5' GC GGA TCC ACG GAG CAC CAG GCC GAG GAG 3'
SphI-p150-WH2-5'	5' T TAA GCA TG C TG GCG AAG CTG GGC TTC AAC 3'
p150-WH2-TAG-Bam-3'	5' GC GGA TCC CTA TTC CCT GAG GGT CGG TGC TTC 3'
p150-NT-KIND-KI3'	5' GC GGT ACC GCG TGC CCA GTC GTT GAA GCC 3'
SphI-p150-308-5'	5' T TAA GCA TG C TG CCT GAG AAC CAC TAT AGA GCT 3'
Bam-p150-309-5'	5' GC GGA TCC ACC CTG CCT GAG AAC CAC TAT AGA 3'
p150-NT-TAG-KI3'	5' GC GGT ACC CTA GGC CAG GTC GTA GGA TTC CAG 3'
5' hu-Spir-1-BamHI-Myc primer	5' GC GGA TCC GCC GCC GCC ATG GAG CAG AAG CTG ATC TCC GAG GAG GAC CTG gct cag gcg gct ggc ccg gcg 3'
hSpir1-KIND-EcoRI-3'	5' CG GAA TTC TCG TGC CCA GTC AGC GTT 3'
hSpir1-WH2-EcoRI-3'	5' CG GAA TTC GCT AAG TGG CCG CAT TGC TAA 3'
BamHI-h-Spir1-5'	5' GC GGA TCC gct cag gcg gct ggc ccg gcg 3'
h-Spir1-after-KIND-Kpnl-3'	5' GC GGTACC TCA TCG TGC CCA GTC AGC GTT 3'
h-Spir1-after-WH2-Kpnl-3'	5' GC GGTACC TCA GCT AAG TGG CCG CAT TGC TAA 3'
5' m-spir1-CT	5' CG GGA TCC CAG CCA GAG AGA AGG CAG CCA 3'
3' m-spir1-CT	5' TCC CCC GGG TCA GAT CTC GTT GAT AGT CCG 3'
5'-vKIND-BamH1-Myc	5' GC GGA TCC GCC GCC GCC ATG GAG CAG AAG CTG ATC TCC GAG GAG GAC CTG cag gcc atg gac cca gcc tcc 3'
5'-fr.1-BglII	5' GA AGA TCT cag gcc atg gac cca gcc tcc 3'
3'-vKIND-K1-CAAX	5' GC GAA TTC CTG CCC AGC CTC CTG CTC GGC 3'
5'-BamHI-RasGEF	5' CG GGA TCC GAG AAG GGT CCT TAC TTC TTG 3'
3'-Ras-GEF-EcoRI	5' CG GAA TTC CTA CTG GAA TGT GGC CTT CAT 3'
Bam-m-fmn2-befFH2-5'	5' GC GGA TCC gac aga gtg gct agg aag cag 3'
3' m-fmn2-TAG-Kpnl	5' CG GGT ACC TGT TCT GGT CAC AGA TCA CGT 3'
Bam-m-fmn2-853-5'	5' GC GGA TCC cct ggc ctg ggc atg gca att 3'

## 2.5 Standards

DNA-Standard	Bandengröße in bp
1 kb Ladder, Peqlab	250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000
Protein-Standards	Bandengröße in kD
Precision Plus Protein dual color standards, Bio-Rad Laboratories	10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250
Kaleidoscope prestained standards, Bio-Rad Laboratories	7, 18, 31, 42, 71, 133, 202

## 2.6 Organismen

Bakterien	Beschreibung/Herkunft
<i>Escherichia coli</i> ; DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80d lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-avgF) U169 recA- endA- hsdR17 (rk -, mk +) phoA snp E44 $\lambda$ - thi -1 gyr A96 rel A1 (Gibco BRL)
<i>Escherichia coli</i> ; Rosetta(DE3)	lac-, recA-, endA-, lon-, ompT- (Novagen)
Zelllinien	Beschreibung/Herkunft
NIH3T3-Zellen (Jainchill <i>et al.</i> 1969)	immortalisierte, embryonale murine Fibroblasten-Zelllinie, kontaktinhibiert (ATCC [America Type Culture Collection] CRL-1711)
murine Körnerzellen	primäre cerebelläre Maus-Zellen
Fliegenstämme	Beschreibung/Herkunft
Wildtyp Berlin	Wildtyp, AG Raabe, MSZ, Würzburg
W1118	Wildtyp, AG Raabe, MSZ, Würzburg
w <sup>-</sup> ;P[UAS:Myc-p150-Spir] <sup>T13</sup> /TM3	Transgene p150-Spir-Linie, E. Kerkhoff, T. Raabe
w <sup>-</sup> ;P[UAST:Myc-p150-Spir] <sup>T13</sup> /P[UAST:Myc-p150-Spir] <sup>T13</sup>	Transgene p150-Spir-Linie, E. Kerkhoff, T. Raabe
w;P[w <sup>+</sup> ,hs-Gal4]/SM6	Gal4-Linie zur Überexpression von Transgenen, Bloomington/5248
67.15-Gal4	Gal4-Treiberlinie,
P[GAL4]OK107	Gal4-Treiberlinie, E. Jauch
w <sup>-</sup> ;P[UAST:Myc-p150-Spir] <sup>T13</sup> /P[UAST:Myc-p150-Spir] <sup>T13</sup> ;P[GAL4]ok107/+	Transgene p150-Spir-Linie E. Kerkhoff, T. Raabe
P[ap-Gal4]	Gal4-Treiberlinie, E. Jauch
w <sup>-</sup> ;P[UAS:Myc-p150-Spir] <sup>T13</sup> /P[ap-Gal4]	Transgene p150-Spir-Linie, E. Kerkhoff, T. Raabe

<b>Mäuse</b>	<b>Beschreibung/Herkunft</b>
B6D2	Hybride aus einer Kreuzung zwischen den Inzuchtstämmen C57Bl/6 und DBA/2, Harlan Winkelmann GmbH

## 2.7. Puffer und Lösungen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blocking-Puffer für Western-Blots	5 % (w/v) Trockenmilchpulver, 1x PBS, 0,1 % Tween 20
Bradford-Lösung	0,008 % Coomassie G250, 8,5 % Phosphorsäure, 5 % Ethanol
DNA-Probenpuffer	9 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,45 mM EDTA, 46 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenol-blau, 0,005 % (w/v) Xylencyanolblau
ICKA-Puffer (Immuno-Complex-Kinase-Assay-Buffer)	50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 1 % Triton X100, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, 2 g/ml Leupeptin, 2 g/l Aprotinin, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 0,2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
LB-Medium	1 % Caseinhydrolysat/Peptone 140, 0,5 % Yeast Extrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glucose
LB-Platten	1 % Caseinhydrolysat/Peptone 140, 0,5 % Yeast Extrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glucose, 1 % Agar
Mowiol	20 ml Glykol, 15 g Mowiol, 100 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,5, 3,5 g DABCO
PBS pH 7,4	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 3,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBST	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 3,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,05 % Tween 20
PBT	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 3,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,1 % Triton X-100
Ponceau S Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure
Protein-Transferpuffer 1 (Western-Transfer)	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
Protein-Transferpuffer 2 (Western <i>Semi-Dry</i> )	25 mM Tris-HCl pH 8,3, 150 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol
SDS-Laufpuffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS (w/v), pH 8,6
SDS-Probenpuffer (5x)	300 mM Tris-HCl pH 6,8, 50 % (v/v) Glycerin, 15 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
Strip-Puffer	100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
TAE-Puffer	40 mM Tris, 40 mM Eisessig, 2 mM EDTA, pH 7,8
TBST (Protein-Waschpuffer)	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM EDTA pH7,5, 0,1 % Tween 20



Bezeichnung	Zusammensetzung
TE-Puffer	1 M Tris-HCl pH 7,4, 100 mM EDTA
Zellkulturmedium	1 Vol 1x DMEM, 10 % FKS, 200 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin

## 2.8 Geräte

Artikel	Firma	Artikel	Firma
Analysenwaage	Sartorius	Sequencer	ABI PRISM 377
Autoklav	Webeco	Sterilbank	Heraeus
Blottingkammer	Hoefer	Tischzentrifuge	Eppendorf
Brutschränke	Memmert	UV-Fotoanlage	Herolab, Kaiser, Sony
Eismaschine	Scotsman	Vibrax VX2	Janke und Kinkel
Elektrophoresekammer	Institutswerkstatt, Bio-Rad	Vortex-Gerät	Scientific Industries
Exponierkassetten	Dr. Goos-Suprema	Wasserbad	GFL
Feinwaage	Mettler	Wecker	Roth
Filmentwickler	Kodak	Zählkammer	Neubauer (improved)
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr	Zentrifugen Heraeus	Beckmann
Gefrierschrank -80 °C	Nunc	Megafuge 1.0R, J2-HS	
Gewebekulturschrank	Heraeus		
Grobwaage	Sartorius		
Heizblöcke	Gebr. Liebisch		
Kühlschrank	Liebherr		
Kühlzentrifuge	Heraeus		
Luftschüttler	New Brunswick Scientific		
Magnetrührer	GLW		
Mikroskop	Leica		
Mikrowelle	Siemens		
Netzgeräte	Bio-Rad		
Orbitalschüttler	Bellco Biotechnology		
PCR Gerät	Perkin Elmer		
pH-Meter	WTW		
Photometer	Hitachi		
Pipetten	Gilson		
Trans-Blot SD Apparatur	Bio-Rad		

## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung von Bakterien

#### 3.1.1 Flüssigkulturen

Für analytische Plasmidisolierungen und Dauerkulturen wurden Bakterien des *E. coli* Stammes DH5 $\alpha$  in 5 ml LB-Flüssigmedium angezogen. Ausgehend von einer einzelnen Bakterienkolonie auf einer LB-Agar-Platte bzw. einer Glycerinkultur wurden diese 5 ml Vorkulturen angeimpft. Zur Selektion wurden dem Medium die benötigten Antibiotika zugesetzt. Die Bakterienkulturen wurden im Schüttler bei 180 Upm für 12-16 h bei 37 °C inkubiert. Zur Isolierung größerer Mengen von high bzw. low copy Plasmiden wurden 100 ml bzw. 500 ml LB Medium (supplementiert mit den benötigten Antibiotika) angeimpft und über Nacht unter denselben Bedingungen inkubiert.

#### 3.1.2 Plattenkulturen

Um einen Vereinzelausstrich zu erhalten, wurden Bakterien auf festem LB-Agar-Nährboden, der die erforderlichen Selektionssubstanzen bzw. -antibiotika enthielt, ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 3.1.3 Bakterien-Dauerkulturen

Zur Erstellung einer Bakterien-Dauerkultur wurde von einer 5 ml Übernachtskultur eine 40%ige Glycerinkultur angelegt, die bei -80 °C in sterilen Eppendorfgefäßen aufbewahrt wurde. Unter diesen Bedingungen sind die Bakterien mehrere Jahre haltbar.

### 3.2 Präparation von DNA

#### 3.2.1 Analytische Plasmid-DNA-Isolierung

1,5 ml einer 5 ml über Nacht Bakterien -Kultur wurden für 1 min bei 13000 UpM pelletiert (Biofuge 15, Heraeus) und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde mit 250  $\mu$ l Qiagen Puffer P1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 250  $\mu$ l Qiagen Puffer P2 wurde mehrmals invertiert und die Suspension für 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluß wurden die chromosomale DNA und die bakteriellen Proteine durch Zugabe von 250  $\mu$ l Qiagen Puffer P3 gefällt. Die gefällten Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 UpM (Biofuge 28RS, Heraeus) sedimentiert, 500  $\mu$ l des klaren Überstands in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 500  $\mu$ l Isopropanol für 5 min bei RT gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 UpM (Biofuge 28RS, Heraeus) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500  $\mu$ l 70%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst. Für analytische Restriktionsanalysen wurden jeweils 8  $\mu$ l der erhaltenen DNA-Lösung eingesetzt.

Qiagen Puffer P1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA
	100 $\mu$ g/ml Rnase A

Qiagen Puffer P2	200 mM NaOH 1 % SDS
Qiagen Puffer P3	3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5

### 3.2.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung über den „Qiagen Plasmid Maxi Kit“

100 ml (für high-copy Plasmide) bzw. 500 ml (für low-copy Plasmide) einer über Nacht Bakterienkultur wurden 15 min bei 6000 UpM abzentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, Rotor SS-34 bzw. GSA) und die Plasmid-DNA in Anlehnung an das Qiagen Plasmid Maxi Kit Protokoll isoliert. Diese Methode zur Reinigung von Plasmid-DNA basiert auf der optimierten alkalischen Lyse-Methode von Birnboim und Doly<sup>217</sup>. Sie erlaubt vor allem die selektive Reinigung von Plasmid-DNA in der *supercoiled*-Form und besitzt einen hohen Reinheitsgrad, so daß die gereinigte DNA zur Transfektion und Transformation, zum Sequenzieren oder Klonieren eingesetzt werden kann. Das Bakterienpellet wurde mit 10 ml Qiagen Puffer P1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Qiagen Puffer P2 wurde die Suspension vorsichtig geschüttelt und die Bakterien für 5 min bei RT lysiert. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Qiagen Puffer P3 neutralisiert und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 400 UpM (Heraeus Megafuge) entfernt. Der klare Überstand wurde auf eine bereits mit 10 ml Qiagen Puffer QBT äquilibrierte Säule (Qiagen-tip 500) gegeben. Nach der Passage des Überstandes wurde die Säule zweimal mit jeweils 30 ml Qiagen Puffer QF gewaschen. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 15 ml Qiagen Puffer QF eluiert und mit 0,7 Vol Isopropanol bei RT gefällt. Nach der Zentrifugation (30 min, 4 °C, 4000 UpM) wurde das Plasmid-DNA-Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in 100-300 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde mittels Extinktionsmessung bei 260 nm bestimmt.

Qiagen Puffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Isopropanol 0,15 % Triton X-100
Qiagen Puffer QC	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Isopropanol
Qiagen Puffer QF	1,25 M NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 15 % Isopropanol

## 3.3 Herstellung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten

### 3.3.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Ultrospec Plus 4054, Pharmacia) ermittelt. Eine OD<sub>260</sub>-

Einheit entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für RNA und einzelsträngige DNA sowie 37 µg/ml für Einzelstrangoligonukleotide<sup>218</sup>.

### 3.3.2 Konzentrationsbestimmung auf Agarosegelen

Für die Konzentrationsbestimmung kleiner DNA-Mengen wurden Aliquots der entsprechenden DNA-Lösungen zusammen mit einer Reihe von Referenzproben bekannter Konzentration auf einem Agarosegel koelektrophoretisiert. Durch einen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten definierter Banden konnte die Konzentration der DNA-Lösungen sehr genau bestimmt werden, da bei niedrigen Konzentrationen diese Intensität proportional zur DNA-Menge ist<sup>218</sup>.

### 3.3.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsspaltungen wurden in 30 µl Reaktionsvolumen und mit einer DNA Konzentration von maximal 0,1 µg/µl durchgeführt. Die Reaktionsdauer betrug 1-2 h bei 37 °C. In der Regel wurden 2 Einheiten (U) des Enzyms pro µg DNA eingesetzt. Die Reaktionspuffer und Inkubationstemperaturen wurden nach Herstellerangaben gewählt.

### 3.3.4 Aufreinigung von DNA über den „PCR-Purification-Kit“

Nach Restriktionsspaltungen wurde die DNA, wenn erforderlich, mittels „QIAquick PCR Purification Kit Protocol“ aufgereinigt. Es wurden fünf Volumen Bindungspuffer PB mit einem Volumen Restriktionsansatz gemischt und für 60 s und 13000 UpM über eine QIAquick Säule zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen (60 s, 13000 UpM). Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule ein weiteres Mal zur kompletten Entfernung des Waschpuffers PE zentrifugiert (60 s, 13000 Upm). Die Säule wurde in ein frisches Eppendorfgefäß gesetzt und die QIAquick Membran mit 30 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) für 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (60 s, 13000 UpM) von der Säule eluiert.

### 3.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten mittels „QIAEX II Gel Extraction Kit“

Die QIAEX II Methode der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen basiert auf der Auflösung der Agarose und der selektiven, quantitativen Adsorption der Nukleinsäuren an die QIAEX II Silikagel Partikel unter hohen Salzkonzentrationen sowie anschließender Elution der DNA durch niedrige Salzkonzentrationen. Zu einem Volumen nukleinsäurehaltigen Agarose-Gels wurden drei Volumen QIAEX Puffer QX1 und 10 µl QIAEX II Matrix gegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 10 min bei 50 °C unter regelmäßigem heftigem Schütteln inkubiert, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Dieser Ansatz wurde für 30 s bei 13000 UpM zentrifugiert und die Matrix einmal mit 500 µl QIAEX Puffer QX1 und zweimal mit 500 µl QIAEX Puffer PE gewaschen. Die sedimentierte Matrix wurde 15 min an der Luft getrocknet und die DNA mit 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> für 5 min bei 50 °C eluiert. Nach der Zentrifugation (30 s, 13000 UpM) wurde der Überstand mit dem DNA-Fragment isoliert und konnte für Restriktionsspaltung oder Ligationen verwendet werden.

### 3.3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Zunächst wird eine doppelsträngige DNA (Matrizen-DNA) denaturiert und anschließend an die entstehenden komplementären Einzelstränge zwei Oligonukleotid-Primer, die die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren, hybridisiert. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase werden, ausgehend von den Oligonukleotid-Primern, die jeweiligen komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Eine sich wiederholende Folge von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese führt zu einer exponentiellen Anreicherung der Ziel-DNA, deren Enden durch die 5'-Enden der Primer definiert sind. Die PCR wird in einem Reaktionsvolumen von 100 µl in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß durchgeführt. Für einen Ansatz werden ca. 200 ng Matrizen-DNA, 10 µl 10x Pfu-Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix, je 20 pmol Primer und 1 µl Pfu-Polymerase eingesetzt. Standardreaktionen wurden auf einem Thermocycler (Eppendorf, Hybaid) mit folgendem Programm durchgeführt: Die optimale Hybridisierungstemperatur  $T_M$  wurde für jedes Primerpaar ermittelt:  $T_M = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 5$

Die Reaktion wurde für 3 min bei 94 °C inkubiert und durchlief dann 30x folgende Schleife:

Denaturierung bei 94 °C, 45 s

Primer-Hybridisierung bei 48-65 °C, 45 s

Polymerasereaktion bei 72 °C, 2 min/1000 bp

Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 72 °C inkubiert und auf RT gekühlt. Der gesamte PCR Ansatz wurde auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Die Aufreinigung der PCR Produkte erfolgte mittels QIAEX II Gel Extraction Kit.

### 3.3.7 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde alternativ zur Überprüfung von Klonierungen eingesetzt und ersetzte hier die analytische Plasmidpräparation mit anschließender Restriktionsspaltung. Sie wurde analog zu 3.3.6 durchgeführt. Als DNA-Matrize diente die DNA einer Bakterienkolonie, welche durch Lyse der Bakterien zugänglich gemacht wurde. Die Lyse wurde durch einen zusätzlichen Schritt für 5 min bei 95 °C vor dem PCR-Programm (siehe 3.3.6) auf dem Thermocycler durchgeführt. Von den getesteten Bakterienkolonien wurde jeweils ein Replikat für den Fall einer Weiterverwendung auf einer neuen Agarplatte angefertigt.

### 3.3.8 Reverse-Transcriptase Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Reverse-Transcriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) ist wie die PCR eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen ausgehend von einer RNA-Matrize. Der eigentlichen PCR-Amplifikation mit der HotStarTaq DNA Polymerase geht die reverse Transkription mit Omniscript und Sensiscript Reverse Transcriptasen voran. Die RT-PCR wurde mit dem Qiagen OneStep RT-PCR Kit durchgeführt. Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Für einen Ansatz wurden ca. 200 ng Matrizen-RNA, 10 µl 5x Q-Solution, 10 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR Buffer, 1 µl dNTP-Mix (0,5 mM), je 20 pmol Primer und 2 µl Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix eingesetzt. Der Ansatz für die reverse Transkriptions-Reaktion wurde für 30 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die HotStarTaq DNA Polymerase für 15 min bei 95 °C aktiviert und die Reversen Transkriptasen inaktiviert. Die anschließende PCR-Reaktion wurde analog zu 3.3.6 durchgeführt.

## 3.4 Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle

### 3.4.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für Hitzeschock-Transformation

*E. coli* Bakterien können durch Behandlung mit einem Calciumchlorid Puffer (TB Puffer) kompetent gemacht werden, d. h. dazu gebracht werden, Plasmid-DNA aus einer umgebenden Lösung aufzunehmen. Zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurden ausschließlich autoklavierte Lösungen und Gefäße benutzt. Von einer Glycerinkultur des *E. coli* Stammes DH5 $\alpha$  bzw. Rosetta wurden ca. 50  $\mu$ l auf einer LB- bzw. LB (Camp<sup>+</sup>)- Agarplatte ausgestrichen. Nach Wachstum über Nacht bei 37 °C im Brutschrank wurde eine einzelne Kolonie gepickt und damit 500 ml SOB- bzw. SOB (Camp<sup>+</sup>)- Medium angeimpft, das über Nacht bei 18 °C geschüttelt wurde bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dies ist der Fall, wenn die Bakteriensuspension eine optische Dichte OD von 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht hat. Die Suspension wurde dann in einem Eisbad 10 min abgekühlt. Alle weiteren Schritte wurden bei 0-4 °C durchgeführt. Die Bakterien wurden zunächst 10 min bei 4 °C mit 2.000 Upm sedimentiert (Zentrifuge CR3i, Rotor T40, Jouan), in 160 ml TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie 10 min bei 2.000 Upm und 4 °C abzentrifugiert (Zentrifuge Heraeus, Rotor T40, Jouan) und das Pellet in 40 ml eiskaltem TB Puffer aufgenommen. Unter leichtem Schwenken wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % zugegeben. Diese Bakteriensuspension wurde in Aliquots von je 100  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Kompetenz der Bakterien wurde in Anzahl der transformierten Bakterien (Klone) pro eingesetzter Menge ( $\mu$ g) DNA angegeben und lag durchschnittlich bei 10<sup>8</sup> Klonen pro 1  $\mu$ g verwendeter Plasmid-DNA.

### 3.4.2 Präparation von Vektoren

Zur Herstellung linearisierter Vektor-DNA wurden 2  $\mu$ g Plasmid-DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen gespalten. Der Reaktionsansatz wurde auf einem Agarosegel auf die Vollständigkeit der Linearisierung untersucht und die DNA über den QIAEX II Gel Extraction Kit aufgereinigt.

### 3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren

Die Ligation eines linearisierten Vektors mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Dazu wurden in einem 20  $\mu$ l-Ansatz 100 ng Vektor-DNA mit einem 3- bis 9-fachen molaren Überschuss des zu ligierenden Fragments, 2  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer (*sticky ends*) und 2 Einheiten (U) T4-DNA-Ligase versetzt und bei 16 °C über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne das zu ligierende Fragment durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Reinigung zur Transformation kompetenter Bakterien-Zellen des *E. coli* Stammes DH5 $\alpha$  eingesetzt.

### 3.4.4 Hitzetransformation von Bakterienzellen

Die bei -80 °C aufbewahrte kompetente Bakterienzellen (*E. coli* Stämme DH5 $\alpha$  bzw. Rosetta) wurden für 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend 50 % des Ligationsansatzes bzw. 100 ng Plasmid-DNA zugegeben. Die Zellsuspension wurde für 30 min bei 0 °C inkubiert, anschließend für 90 s auf 42 °C erwärmt und sofort wieder für 2-3 min im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l LB-Medium ohne

Selektionsantibiotika wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C mit 120 UpM geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden 10 % bzw. 90 % der Bakterien auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Kolonien wurde im analytischen bzw. präparativen Maßstab gezüchtet und die isolierte Plasmid-DNA durch Restriktionsspaltung und anschließender Gelelektrophorese analysiert.

### **3.5 Gelelektrophoretische Methoden**

#### **3.5.1 Analyse von DNA in Agarosegelen**

Für 1%ige Agarosegele wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TBE-Puffer aufgekocht, auf 60 °C abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Als Elektrophoresepuffer wurde ebenfalls TBE-Puffer verwendet. Die in Probenpuffer aufgenommene DNA wurde bei 80-100 V (max. 300 mA) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese konnte die DNA dann unter UV-Licht analysiert, photographiert und gegebenenfalls mit einem Skalpell ausgeschnitten werden.

#### **3.5.2 Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen**

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 18 x 11 x 0,15 cm SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Sie bestanden aus einem unteren Trenngel (6-12,5%ig) und einem oberen Sammelgel (3,75%ig). Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von etwa 2 cm unterhalb des Taschenformers zwischen zwei vertikal stehende Glasplatten gegossen und zur Ausbildung einer glatten Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und ein Taschenformer eingesetzt. Anschließend wurde das Gel in die Gelelektrophoresekammer (Sigma) eingespannt und mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Die zu untersuchenden Proteinproben wurde in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte für 2 h bei 45 mA und 300 V.

Trenngel	6-12,5 % Acrylamid-Bisacrylamid (33 :0,9) 391 mM Tris-HCl, pH 9,0 0,69 % SDS 0,1 % TEMED 0,05 % APS
Sammelgel	3,75 % Acrylamid-Bisacrylamid (19:1) 116 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,09 % SDS 0,14 % TEMED 0,09 % APS

## 3.6 Proteinexpression in Prokaryoten

### 3.6.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* Rosetta

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden Expressionsvektoren für N-terminale GST-Fusionsproteine (pGEX-4T-3 bzw. pGEX-6P-1) bzw. 6x-Histidin-tag-Fusionsproteine (pQE-80-L) in den *E. coli* Stamm *Rosetta* transformiert. Die Transkriptionskontrolle der rekombinanten Proteine erfolgt über den LacZ-Promotor dieser Expressionsvektoren. Die Expression wurde durch IPTG induziert. Die Bakterien wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol über Nacht bei 37 °C und 180 Upm auf einem Plattformschüttler kultiviert. Die Übernachtskultur wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt, bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 weiterwachsen gelassen, die Expression mit 0,1 mM IPTG induziert und nochmals über Nacht bei 21 °C und 120 UpM kultiviert. Die Kultur wurde in einer Beckmann-Zentrifuge mit GSA-Rotor für 10 min bei 13000 UpM zentrifugiert und das Bakterienpellet weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verarbeitung bei –20 °C gelagert.

### 3.6.2 Aufreinigung nativer rekombinanter GST-tag Proteine

Alle Schritte zur Aufreinigung der nativen Proteine erfolgten auf Eis, um eine Degradation der Proteine zu vermeiden. Die Lyse erfolgte durch Resuspension der Bakterien-Pellets in TBST (1/20 Vol des vorherigen Kulturvolumens) und anschließender Sonifizierung (Intervalle von 6x 10 s und 2x 20 s). Das Lysat wurde durch Zentrifugation in einer Beckmann-Zentrifuge mit SS34-Rotor geklärt (30 min, 4 °C, 13000 UpM). Das klare Lysat, welches die löslichen GST-Fusionsproteine enthielt, wurde mit TBST gewaschener Glutathione-Sepharose (200 µl Matrixvolumen/10 ml klares Lysat) für 2 h bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die an der Matrix immobilisierten Proteine zweimal mit TBST gewaschen und bis zur weiteren Verwendung als 1:1 Suspension in TBST bei 4 °C gelagert.

### 3.6.3 Aufreinigung nativer rekombinanter Hexa-His-tag Proteine

Alle Schritte zur Aufreinigung der nativen Proteine erfolgten auf Eis um eine Degradation der rekombinanten Proteine zu vermeiden. Die Aufreinigung der nativen 6x-His-Fusionsproteine erfolgte nach Lyse der Bakterien in Lysispuffer (1/20 Vol des vorherigen Kulturvolumens), achtmaliger Sonifizierung für 10 s und anschließender Zentrifugation in einer Beckmann-Zentrifuge mit SS34-Rotor geklärt (30 min, 4 °C, 13000 Upm). Das klare Lysat wurde für 1 h bei 4 °C mit Ni-NTA-Agarose, die zuvor in Lysispuffer äquilibriert worden war, inkubiert. Die an den Ni-NTA Matrix immobilisierten Proteine wurden zweimal mit Qiagen-Lysispuffer, einmal mit Qiagen-Waschpuffer gewaschen. Die Proteine wurden zweimal mit 500 µl Qiagen-Elutionspuffer eluiert und anschließend über NAP-10 Säulen in *pull down*-Puffer oder PBS mit jeweils 20 % Glycerin umgepuffert und bei –20 °C gelagert. Alternativ konnten die an den Ni-NTA beads immobilisierten Proteine zweimal mit PBST-Puffer gewaschen werden und als 1:1 Suspension in PBST-Puffer bei 4 °C gelagert werden.

Der Reinheitsgrad sowie die Konzentration der rekombinanten GST- bzw. 6x-His-Proteine wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung im Vergleich zu BSA Standards oder mittels Western-Blot und Ponceau Färbung verifiziert.



Lysispuffer, pH 8,0	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 10-20 mM Imidazole
Waschpuffer, pH 8,0	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 20-50 mM Imidazole
Elutionspuffer, pH 8,0	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 150 mM Imidazole

### **3.7 Proteinanalytische Methoden**

#### **3.7.1 Coomassie Färbung von Proteingelen**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können durch Anfärbung mit Coomassie-Blau auf dem Gel sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden Gele für 30 min in Coomassie-Blau-Färbelösung gelegt und anschließend über Nacht auf dem Schüttler in Entfärbelösung gewaschen, bis der überschüssige Farbstoff entfernt und die einzelnen Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

#### **3.7.2 Western-Blot**

Der elektrophoretische Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mit einer Elektroblokkammer von Sigma. Die Nitrozellulosemembran und vier 3MM-Whatman-Filterpapierstücke wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Zwei Schaumstoffschwämme aus der Blotapparatur und das Whatman-Papier wurden mit Transferpuffer durchtränkt, die Nitrozellulosemembran für einige Minuten in destilliertes Wasser gelegt. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge im Plastikeinsatz der Blotapparatur luftblasenfrei gestapelt: Schaumstoffschwamm, zwei Lagen Whatman-Papier, Gel, Nitrozellulosemembran, zwei Lagen Whatman-Papier Schaumstoffschwamm. Der Plastikeinsatz mit Blot wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Blottingkammer so eingesetzt, daß die Nitrozellulosemembran in Richtung Anode und das Gel in Richtung Kathode zeigte. Der Transfer fand für 80 min unter konstanter Stromstärke von 450 mA statt.

#### **3.7.3 Western-Blot *Semi Dry***

Der elektrophoretische Transfer der Proteine aus breiteren (>11 cm) SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mit einer Trans-Blot SD Apparatur (Bio-Rad) mit Hilfe der Halbtrocken-Methode. Die Nitrozellulosemembran und 12 Whatman-Filterpapierstücke wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und mit Transferpuffer 2 getränkt. Auf die Anode der Transferapparatur wurden luftblasenfrei sechs Lagen des Whatman-Papiers, die Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und nochmals sechs Lagen Whatman-Papier gestapelt. Der Transfer fand für 60 min unter konstanter Stromleistung von 8 W statt.

### 3.7.4 Färbung der Membran mit Ponceau S

Um den Transfer zu kontrollieren, wurde die Nitrozellulosemembran für 2 min in Ponceau S Lösung geschwenkt und anschließend in H<sub>2</sub>O solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde die Membran mit PBST-Puffer wieder entfärbt.

### 3.7.5 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit Blocking-Puffer (5 % Magermilchpulverlösung in PBST, pH 7,4) ÜN bei 4 °C abgesättigt. Anschließend wurde der gegen das gesuchte Protein gerichtete primäre Antikörper verdünnt in Blocking-Puffer (100-300 ng/ml) zugegeben und 3 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 7 min mit PBST-Puffer gewaschen und der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte sekundäre Antikörper (50-100 ng/ml in verdünntem Blocking-Puffer (1,67 % Magermilchpulverlösung in PBST, pH 7,4), der gegen den ersten Antikörper gerichtet war, zugegeben. Wiederum wurde 45 min bei RT inkubiert und danach erneut gründlich gewaschen.

Zur Detektion wurden 800 µl ECL-Lösung I mit 800 µl ECL-Lösung II gemischt und die Nitrozellulosemembran für 1 min darin geschwenkt. Anschließend wurde sie vorsichtig getrocknet, in Frischhaltefolie verpackt und für 1 min bis 1 h auf einem Röntgenfilm exponiert. Zur Größenbestimmung diente der Prestained Protein Marker.

### 3.7.6 Strippen von Nitrozellulosemembranen

Um weitere Proteine auf der Membran detektieren zu können, mußten die daran gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierzu wurde die Membran für 30 min bei 50 °C in 10 ml Strip-Puffer geschwenkt und anschließend viermal für 10 min bei RT mit PBST-Puffer gewaschen. Die so behandelte Membran stand für eine erneute Immundetektion zur Verfügung.

Strip-Puffer                      62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7  
  2 % SDS  
  0,7 % β-Mercaptoethanol

### 3.7.7 Umpuffern von Proteinen über Nap-10 Säulen bzw. PD-10 Säulen

Zur Umpufferung von Proteinlösungen wurden Nap-10 bzw. PD-10 Säulen mit 1 ml bzw. 5 ml Sephadex G-25 Matrix (Partikelgröße: 85-260 µm) verwendet. Die Säulen wurden mit 15 ml bzw. 25 ml des gewünschten (glycerinfreien) Puffers äquilibriert, die Proteinlösung zugegeben und der Durchlauf verworfen. Die Proteine wurden mit dem gewünschten Puffer eluiert.

### 3.7.8 Dialyse von Proteinen

Zur Dialyse von größeren Volumina an Proteinlösungen wurden Dialyseschläuche (Fa. Roth, Typ 8/32) mit einer Porengröße von 2,5-5,0 nm verwendet. Die Dialyseschläuche wurden vor Gebrauch nach Anleitung des Herstellers in 2 % NaCO<sub>3</sub> und 1 mM EDTA gekocht, und für 10 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden sie für 10 min in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gekocht und in 0,1 mM EDTA gelagert. Die Proteinlösungen wurden im Dialyseschlauch unter langsamem Rühren für mindestens 4 h oder über Nacht gegen ein bis zu 1000faches Volumen Puffer dialysiert. Der Puffer wurde dabei zweimal gewechselt.

### 3.7.9 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffes Serva Blue G-250 an Proteine und die daraus resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm (rot-violett) nach 595 nm (blau) (Bradford, 1976). Zu je 950 µl Bradford-Lösung wurden 50 µl eines BSA- oder IgG-Standards bzw. die zu analysierenden wäßrigen Protein- oder Antikörper-Lösungen gegeben und für fünf Minuten bei RT inkubiert. Durch Extinktionsmessung bei OD = 595 nm konnte die Proteinkonzentration anhand der mit BSA bzw. IgG erstellten Eichgeraden berechnet werden.

$$c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{595} \times \text{Bradford-Faktor} / \text{eingesetzte Proteinmenge in } \mu\text{l}$$

### 3.7.10 Analytische Gelfiltration nativer Proteine

Für die Durchführung der Gelfiltration zur größenabhängigen Auftrennung von Proteinen wurde das HPLC-System ÄKTA*explorer*100 (Amersham) verwendet. Alle Lösungen wurden filtriert (Membranfilter 0,6 µm, Schleicher & Schuell) und mit einer Vakuum-Saugflasche bei 80 mbar (CUC-2 Vacuubrand) entgast. Die Superdex 200 HR 16/60 Säule (Amersham/Pharmacia) wurde für 2 h bei einer Flußrate von 100 µl/min mit dem Laufpuffer äquilibriert. Das System wurde mit den folgenden Proteinmarkern des HMW und LMW Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia) kalibriert: Aldolase (158 kD), Albumin (67 kD), Ovalbumin (43 kD) und Chymotrypsinogen A (25 kD) (Amersham). Der Probenauftrag von 150-400 µg Protein (500 µl) erfolgte über einen Injektionsloop. Die Auftrennung erfolgte zunächst mit einer Flußrate von 400 µl/min. Nach 15 ml Lauf wurde die Flußrate auf 600 µl/min gesetzt. Die Absorption wurde bei 280 nm gemessen und das Eluat mit einem Fraktionssammler (Model 2110 Fraction Collector, Bio-Rad) in 1 ml Fraktionen gesammelt. Je Fraktion wurden 40 µl Eluat entnommen, mit 5 µl 5x Probenpuffer für 5 min bei 95 °C inkubiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	15 % Glycerin

## 3.8 Immunpräzipitation

### 3.8.1 Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose

Immunpräzipitation ist eine weit verbreitete Methode um Zielantigene mittels eines spezifischen Antikörpers im analytischen Maßstab aus komplexen Proteinmischung, wie Zell-Lysaten, zu isolieren. In 35 mm-Kulturschalen gezüchtete NIH/3T3, HeLa oder murine Körner-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit je 1 ml eiskaltem, mit Proteaseinhibitoren komplettiertem ICKA-Lysis-Puffer für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von den Kulturschalen gelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und dreimal für 15 s heftig geschüttelt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 4 °C und 15000 UpM zentrifugiert und zu dem Überstand 3 µg des gewünschten Kaninchen Antikörpers gegeben. Die Mischung wurde mehrmals invertiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 30 µl einer Protein A-Agarosematrix, die zweimal mit ICKA-Puffer vorgewaschen war, dem Antikörper Ansatz zugegeben

und für 1,5 h bei 4 °C rotiert. Die Matrix wurde für 1 min bei 2000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Matrix dreimal mit eiskaltem ICKA-Lysis-Puffer gewaschen. Die auf der Matrix immobilisierten Proteine wurden entweder bei 4 °C gelagert oder sofort mittels SDS-PAGE analysiert. Dazu wurde die Matrix in 30 µl 1x SDS-Puffer aufgenommen und die Proteine bei für 5 min 95 °C denaturiert.

ICKA-Lysis-Puffer	50 mM Hepes, pH 7,5
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	2,5 mM EGTA
	1 % Triton X-100
	10 % Glycerin
Proteaseinhibitoren	2 µg/ml Leupeptin
	2 µg/ml Aprotinin
	1 µg/ml Pepstatin (in Methanol)
	1 mM PMSF (in Ethanol)

### 3.8.2 Immunpräzipitation mit Potein G-Sepharose

Die Immunpräzipitation mit Protein G-Agarose wurde analog zu 3.8.1 mit Maus Antikörpern durchgeführt.

## 3.9 Bindungsstudien

### 3.9.1 GST pull down mit NIH/3T3 oder HeLa Zell-Lysat

Ein 3,5 cm Kulturschale mit transient EGFP- bzw. Myc-Fusionsprotein exprimierenden NIH/3T3 oder HeLa Zellen wurde zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen in 500 µl eiskaltem, mit Proteaseinhibitoren (siehe 3.8.1) komplementiertem *pull down*-Puffer abgeschabt und in einem Eppendorfgefäß für 40 min bei 4 °C auf einem Nutator lysiert. Das Lysat wurde für 5 min bei 4 °C und 15000 UpM zentrifugiert, 43 µl Überstand (als Einsatzkontrolle) mit 5 µl 5x Probenpuffer für 5 min bei 95 °C inkubiert und 430 µl des klaren Lysats für den *pull down* eingesetzt. Jeweils 25 µl unbeladene Glutathione-Sepharose-Matrix wurden einmal mit eiskaltem *pull down*-Puffer gewaschen, 1-2 µg GST bzw. GST-Fusionsprotein an Glutathione-Sepharose-Matrix zugegeben und weitere zweimal gewaschen. Das Zell-Lysat wurde zur gewaschenen Matrix gegeben, für 2 h bei 4 °C permanent invertiert und fünfmal mit eiskaltem *pull down*-Puffer gewaschen. Die Matrix wurde mit 30 µl 1x Probenpuffer für 5 min bei 95 °C inkubiert und der Überstand sowie die Einsatzkontrolle des Zell-Lysats auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

<i>pull down</i> -Puffer	25 mM Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0,1 % NP-40
	10 % Glycerol

### 3.9.2 GST pull down mit 6x-His-Fusionsprotein

Eluiertes rekombinantes 6x-His-Protein wurde über NAP-10 Säulen in *pull down*-Puffer umgepuffert, die Proteinmenge zusammen mit einem BSA Proteinmengenstandard auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert und 2 bzw. 10 µg mit *pull down*-Puffer auf 500 µl aufgefüllt. Der *pull down* wurde analog zu dem *pull down* mit NIH/3T3 Zellen durchgeführt.

Die *pull down* Experimente mit rekombinantem 6x-His-p150-Spir-NT und 6x-His-m-Fmn-2-FH1-FH2 wurde aufgrund der schnellen Degradation bzw. der geringen Expressionsmenge der Proteine direkt mit jeweils 2,5 ml eines mit *pull down*-Puffer hergestellten klaren 6x-His-p150-Spir-NT bzw. 6x-His-m-Fmn-2-FH1-FH2 Lysat aus Rosetta-Bakterien durchgeführt.

### 3.9.3 6x-His pull down mit NIH/3T3 Zellysat

Der *pull down* assay wurde analog zu dem GST *pull down* mit NIH/3T3 Zell-Lysat mit 6x-His-Fusionsprotein beladenen Ni-NTA-beads durchgeführt.

### 3.9.4 Ko-Immunpräzipitation

Für Ko-Immunopräzipitation wurde aus NIH/3T3, HeLa Zellen oder murine Körnerzellen wie unter 3.9.1 beschrieben ein klares Lysat hergestellt und ein Aliquot als Einsatzkontrolle für die nachfolgende Analyse aufbereitet. Dem Überstand wurden 2-3 µg des gewünschten Kaninchen Antikörpers zugegeben. Die Mischung wurde mehrmals invertiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde 30 µl mit *pull down*-Puffer äquilibrierte Protein A-Agarose dem Antikörper Ansatz zugegeben und für 145 min bei 4 °C rotiert. Die Matrix wurde 1 min bei 2000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach fünf Waschgängen mit eiskaltem *pull down*-Puffer wurde die Matrix mit 30 µl 1x Probenpuffer für 5 min bei 95 °C inkubiert und die eluierten Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

## 3.10 Zellkulturtechniken

### 3.10.1 Kultivierung von NIH/3T3 Zellen

Zellen der murinen Fibroblasten Zelllinie NIH/3T3 wurden in 1x DMEM-Medium kultiviert, dem 10 % FKS, 1 % Penicillin (10 kU/ml) und 1 % Streptomycin (10 kU/ml) zugefügt worden waren. Sie wurden in einem 37 °C Brutschrank bei Wasserdampfsättigung mit einer konstanten CO<sub>2</sub>-Begasung von 5 % gezogen, wodurch sich der pH-Wert auf 7,4 einstellte. Die NIH/3T3- Zellen wurden in T75 Kulturflaschen gezüchtet und dreimal pro Woche subkultiviert. Hierfür wurden die Zellen mit 900 µl Trypsin vom Untergrund abgelöst, mit frischem Medium 1:5 verdünnt und auf neue Schalen überführt.

### 3.10.2 Herstellung und Kultivierung primärer muriner Körnerzellenlinien

Da Nervenzellen sehr empfindlich auf Temperaturschwankungen reagieren, wurden alle bei der Präparation benutzten Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Sieben Cerebella 5-7 Tage alter Mäuse wurden präpariert und in eine 35 mm-Kulturschale mit PBS überführt. Anschließend wurde die Meninges unter dem Binokular entfernt und das PBS durch einigen Tropfen von Lösung 1 ersetzt. Unter der Zellkulturbank wurde das Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert, in weiteren 10 ml Lösung 1 gewaschen und bei 1200 UpM für 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und

die Cerebella in 7 ml trypsinhaltiger Lösung 2 auf einer 100 mm-Kulturschale im Brutschrank für 13 min bei 37 °C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Die Cerebella wurden mit 7 ml Trypsin inhibitorhaltiger Lösung 4 neutralisiert, in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt und bei 1200 UpM für 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, 2 ml trypsininhibitorhaltige Lösung 3 zugegeben und durch 25maliges auf und ab Pipetieren mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Die Lösung wurden für 10 min stehen gelassen, damit größere Gewebestücke sedimentieren konnten. Dann wurde der Überstand in ein neues 15 ml Greiner Röhrchen mit 3 ml vorgelegter Lösung 5 überführt. Zum Sediment wurden weitere 2 ml Lösung 3 zugegeben und nochmals mit der Pasteurpipette resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung mit der des Überstandes in Lösung 5 vereinigt und für weitere 10 min sedimentiert. In der Zwischenzeit wurde die Poly-Lysin Lösung von den Deckgläschen abgesaugt, kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen und an der Luft getrocknet. Die obere Phase wurde in ein neues 15 ml Greiner Röhrchen überführt und bei 1200 UpM für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frisch komplementiertem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und in 35 mm-Kulturschalen mit gecoateten Deckgläschen ausgesät. Am nächsten Tag wurde 10 µM Ara-c/HCL zugegeben.

Krebs-Henseleit Puffer	Sigma, Bestellnummer K3753
modifizierter Krebs-Henseleit Puffer 1x	118 mM NaCl 4,7 mM KCl 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25 mM NaHCO <sub>3</sub> 14 mM D-Glucose 0,3 % w/v BSA Phenol Red
Lösung 1	modifizierter Krebs-Henseleit Puffer 1x 1,24 mM MgSO <sub>4</sub>
Lösung 2	Lösung 1 0,025 % w/v Trypsin
Lösung 3	modifizierter Krebs-Henseleit Puffer 1x 0,008 % w/v DNase 0,052 % w/v Trypsin Inhibitor 2,79 mM MgSO <sub>4</sub>
Lösung 4	6,25 % v/v Lösung 1 93,75 % v/v Lösung 3
Lösung 5	modifizierter Krebs-Henseleit Puffer 1x 2,48 mM MgSO <sub>4</sub> 13,1 µM CaCl <sub>2</sub>

### 3.10.3 Zellzahlbestimmung

Die kultivierten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in eine Fuchs- Rosenthal-Zählkammer gegeben. Durch Auszählen der Zellen unter einem Phasenkontrast- Mikroskop (Fluovert FS, Leitz) wurde der Zellzahl-Mittelwert von zweien der 16 Großquadrate, die jeweils 16 kleine Quadrate enthalten, ermittelt. Dabei wurde darauf geachtet, daß in einem Großquadrat eine Zellzahl

von 50 nicht unterschritten wurde, um Fehlerabweichungen so gering wie möglich zu halten. Die Zellzahl berechnete sich dann wie folgt:  $\text{Zellkonzentration} = \text{Zellzahl} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 5000$  [Zellen/ml]

### 3.10.4 Transfektion eukaryontischer Zellen

Kationische Lipid-Reagenzien bilden in wässrigen Lösungen kleine (100-400 nm große), unilaminare Vesikel (Liposomen), deren Oberfläche positiv geladen ist und somit negativgeladene DNA-Vektoren umlagern kann. Auf diese Weise wird es der zu transfizierenden Plasmid-DNA ermöglicht, mit der Zielzellmembran in Kontakt zu treten und in das Zellinnere geleitet zu werden. Wie vom Hersteller empfohlen, wurde zur Transfektion von NIH/3T3-Zellen das Lipid-Reagenz Lipofectamine (Life Technologies) verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf 35 mm-Kulturschalen mit Deckgläschen für Immunfärbungen oder ohne Deckgläschen für Zell-Lysate gleichmäßig, zu 50 % konfluent ( $2,5 \times 10^5$  Zellen/35 mm Loch einer 6-Loch-Platte) ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit 1x DMEM-Medium, dem weder FKS noch Antibiotika zugesetzt worden waren, gewaschen. Auf Streptomycin und Penicillin muß verzichtet werden, da Lipid-Reagenzien die Membranpermeabilität erhöhen und die Aufnahme von Antibiotika in die Zelle erlauben. Auch zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurde serum- und antibiotikafreies Medium verwendet. Zu Lösung 1 (0,7-1,4 µg Plasmid-DNA in 100 µl serumfreiem Medium) wurde 1 Vol Lösung 2 (6 µl Lipofectamine in 100 µl serumfreiem Medium) gegeben und für 30 min bei RT inkubiert, um die Ausbildung von DNA-Liposomen-Komplexen zu ermöglichen. Anschließend wurde der Transfektionsansatz mit Medium auf 1 ml aufgefüllt, auf die Kulturschale gegeben und für 4-6 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen für 1-2 Tage mit serum- und antibiotikahaltigem Medium inkubiert. Die Zellen konnten nun für Färbungen oder Lysate verwendet werden.

### 3.10.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Diese wurden geerntet, 2 min bei 1000 UpM abzentrifugiert (Ominfuge 2.0RS, Heraeus) und in kaltem Einfrieremedium mit einer Konzentration von  $10^7$  Zellen/ml aufgenommen. Diese Suspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und zunächst für 1 h auf -20 °C gekühlt, bevor sie über Nacht bei -70 °C eingefroren wurden. Am darauffolgenden Tag wurden sie in flüssigen N<sub>2</sub> überführt und dort gelagert. Zum erneuten Ansetzen in Zellkultur wurden die eingefrorenen Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad leicht angetaut. Die Proben wurden anschließend im halbgefrorenen Zustand in 20 ml Kulturmedium gegeben. Da das Einfrieremedium das Zellgift DMSO enthält, wurden die Zellen kurz abzentrifugiert und in frischem Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 75 ml-Zellkulturflasche überführt.

## 3.11 Immuncytochemische Methoden

### 3.11.1 Fixierung und Permeabilisierung von adhärennten NIH/3T3, HeLa und Körnerzellen

Das Medium wurde von den auf Glasplättchen adhärennten Zellen abgesaugt und die Plättchen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden 600 µl Paraformaldehyd (PFA) zugegeben und die

Zellen für 20 min bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden je 600 µl 0,2 % Triton für 3,5 min auf die Plättchen gegeben und diese wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen konnten nun gefärbt werden.

### **3.11.2 Immunfärbungen von NIH/3T3, HeLa und Körnerzellen**

Die Zellen wurden in 50 µl einer 1 % FCS/PBS Blocklösung mit 0,5-20 µg/ml erstem Antikörper für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Der zweite Antikörper, welcher an FITC oder TRITC gekoppelt war, wurde 1:250 in 50 µl 1 % FCS/PBS verdünnt. Die Zellen wurden für 1 h bei RT in Dunkelheit mit der Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen, das PBS entfernt und H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> zugegeben. Die Plättchen wurden mit 10 µl Mowiol auf Objektträger aufgeklebt und die immunocytochemische Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

### **3.11.3 Direkte Kopplung von Antikörpern an Alexa Fluor Farbstoff konjugierte Fab Fragmente**

Die direkte Kopplung von Alexa Fluor Farbstoff konjugierten Fab Fragmenten an Kaninchen Antikörper wurde mit Hilfe des „Zenon Rabbit IgG Labeling Kits“ (Molecular Probes, Bestellnummern Z-25302, Z-25305) durchgeführt. Er bietet eine schnelle Methode um kleinste (sub-mikrogramm) Mengen an Antikörper in variablen molaren Verhältnissen mit Farbstoffe zu koppeln und diese für Kofärbungen mit zwei verschiedenen Kaninchen Antikörper einzusetzen. Zur Zenon Komplex Bildung wurden Fab Fragment und Zielantikörper im molaren Verhältnis 3:1 (für Immunfärbung von Zellen) bzw. 6:1 (für nachfolgende immunohistochemische Anwendungen) eingesetzt. 1 µg Zielantikörper wurde mit 5 µl bzw. 10 µl „Zenon rabbit IgG labeling“ Reagenz für 5 min bei RT inkubiert. 5 µl bzw. 10 µl „Zenon blocking“ Reagenz werden zugegeben und die Mischung für weitere 5 min bei RT inkubiert. Der Komplex wurde nun innerhalb der nächsten 30 min für eine Immunfärbung eingesetzt.

### **3.11.4 Immunfärbungen von NIH/3T3, HeLa und Körnerzellen mittels mit Alexa Fluor Farbstoff gekoppelten Antikörpern**

Die Immunfärbung mit Alexa Fluor Farbstoff konjugierten Fab Fragment-gekoppelten Antikörpern (siehe 3.11.2) wurde mit einem modifizierten „Immunocytochemistry“ Protokoll der „Zenon Rabbit IgG Labeling Kits“ von Molecular Probes durchgeführt. Die Zellen wurden wie in 3.11.1 beschrieben fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen für 30 min mit 1 % FCS/PBS geblockt. Die gekoppelten Antikörper wurde in 50 µl einer 1 % FCS/PBS Lösung in einer Konzentration zwischen 0,5-20 µg/ml (in dreifach höherer Konzentration als im Standardprotokoll 3.11.2) verdünnt. Die Zellen wurden für 1 h bei RT in Dunkelheit in der Antikörperlösung inkubiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Da die Kaninchen-Antikörper nicht kovalent an das Zenon Fab Fragment gekoppelt sind, wurden die Zellen ein weiteres Mal, zur Verhinderung einer möglichen Kreuzfärbung der Kaninchen Antikörper, wie in 3.11.1 beschrieben, fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, das PBS entfernt und H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> zugegeben. Die Plättchen wurden mit 10 µl Mowiol auf Objektträger aufgeklebt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet.



## **3.12 Immunohistochemische Methoden**

### **3.12.1 Präparation und Fixierung von L3-Larvengehirnen von *Drosophila melanogaster***

Die L3-Larven wurden in PBS überführt und der Kopf der Larve mit einer Pinzette abgetrennt. Das Larvengehirn wurde in eine Glasschale überführt und von allen überflüssigen Loben vorsichtig gesäubert. Anschließend wurden die Gehirnloben zusammen mit dem Ventralganglion für 60 min bei 4 °C in PLP (3,6 % Paraformaldehyd, 10 mM Natriumperjodat, 75 mM Lysin, 30 mM Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,8) fixiert. Nach der Fixierung wurden diese dreimal für 30 min bei RT mit 0,3 % PBT gewaschen.

### **3.12.2 Immunohistochemische Färbung der Larvengehirne**

Die Larvengehirne wurden nach der Fixierung in eine 63-well Mikrotiterplatte überführt und für 1 h bei RT in 0,3 % PBT, 3 % NGS geblockt. Der erste Antikörper wurde in gewünschter Konzentration zugegeben und ÜN bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde entfernt und die Larvengehirne dreimal für 1 h mit 0,3 % PBT gewaschen. Der zweite Antikörper wurde in der gewünschten Konzentration in 0,3 % PBT, 3% NGS zugegeben und für 6 h bei RT (alternativ ÜN bei 4 °C) inkubiert. Die Antikörperlösung wurde anschließend entfernt und die Embryonen dreimal für 1 h mit 0,3 % PBT gewaschen. Die Larvengehirne wurden kurz in PBS gewaschen auf einem Objektträger in Vectashield eingebettet. Das Deckglas wurde mit Nagellack abgedichtet und die Fluoreszenz am Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

## **3.13. Herstellung polyklonaler Antikörper**

### **3.13.1 Herstellung geeigneter Antigene zur Immunisierung von Kaninchen**

Als Antigene wurden rekombinante, bakteriell exprimierte Hexa-His-Proteine verwendet. Rekombinante GST-Proteine wurden nicht gewählt, da GST stark immunogen wirkt und die GST-Antikörper nach der Immunisierung aufwendig aus den Seren entfernt werden müssten. Zunächst wurde cDNAs, die für verschiedene verkürzte Proteinmutanten kodieren und möglichst geringe Homologien zu anderen Proteinen derselben Spezies aufweisen, in einen pQE-80L Vektor kloniert. Bei der Auswahl des geeigneten rekombinanten Proteins wurde darauf geachtet, daß dieses sich sehr gut exprimieren ließ. Des Weiteren sollte es sich bei der Aufreinigung an Ni-NTA-Matrix ohne größere Proteinmengenverlust mit stringenten Puffern (50 mM Imidazol) waschen lassen, um unspezifisch gebundene Hintergrundproteine entfernen zu können. Da die herzustellenden Antikörper hauptsächlich für Immunfärbungsexperimente eingesetzt werden sollten, wurde das Antigen mit intakter Tertiärstruktur hergestellt. Das Protein wurde entsprechend 3.6.3 nativ aufgereinigt und über Nap-10 Säulen in TBST-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 % Tween, 20 % Glycerin) oder PBS-Puffer (PBS, 20 % Glycerin) umgepuffert und bei -20°C gelagert. Die Reinheit der Proteine wurde auf Proteingelen kontrolliert. Die fertigen Antigene wurden auf Trockeneis zur Immunisierung von Kaninchen an Eurogentec bzw. an Immunoglob geschickt.

### 3.13.2 Aufreinigung der Seren

Die polyklonalen Antikörper aus Kaninchen-Seren wurden mit Hilfe des „AminoLink<sup>®</sup> Plus Immobilization Kit“ (Pierce, Bestellnummer 44894) aufgereinigt.

#### 3.13.2.1 Kopplung des Antigens an die Aufreinigungssäule

Hierzu wurde die *Procedure for Coupling Protein Using the pH 7,2 Coupling Buffer* angewendet. Die Antigene, welche auch zur Immunisierung verwendet wurden, wurden über PD-10 Säulen in einen Phosphatpuffer (*Coupling Buffer*: 0,1 M Phosphat, 0,15 M NaCl; pH 7,2) umgepuffert. Zur kovalenten Kopplung des Antigens an die Aufreinigungssäule wurde die Säule und alle Reagenzien für 15 min auf RT äquilibriert. Anschließend wurde die Lagerungslösung aus der Säule entfernt und die Säule mit 5 ml Phosphatpuffer äquilibriert. Das untere Ende der Säule wurde wieder mit einem Stopfen verschlossen und 3,5 ml der Antigen-Phosphatpuffer-Lösung und 46 µl einer 5 M Cyanoborohydrid-, 0,01 M NaOH-Lösung unter dem Abzug zugegeben. Das obere Ende der Säule wurde verschlossen und die Säule ÜN bei 4 °C rotiert. Nach der Inkubation wurde die Antigenlösung entfernt und die Säule mit 5 ml Phosphatpuffer gewaschen. Zum Blocken der restlichen aktiven Bindungsstellen der Säulen-Gelmatrix wurde die Säule mit 4 ml *Quenching Buffer* (1 M Tris-HCl, 0,05 % NaN<sub>3</sub>; pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde die Säulen-Gelmatrix mit 2 ml *Quenching Buffer* und 40 µl der 5 M Cyanoborohydrid-, 0,01 M NaOH-Lösung für 30 min auf dem Rotator inkubiert. Nach dem Entfernen des Puffers wurde die Säule mit mindestens 17 ml Waschlösung (1 M NaCl, 0,05 % NaN<sub>3</sub>) gewaschen.

#### 3.13.2.2 Affinitätsaufreinigung der Antikörper

Die Seren wurden ÜN bei 4 °C aufgetaut und anschließend 1:1 mit dem Phosphatpuffer versetzt. Die Gelmatrix der Säule wurde mit 6 ml Phosphatpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Gelmatrix aus der Säule entnommen und im *batch*-Verfahren mit der Serum-Phosphatpuffer Mischung in einem Erlenmeyerkolben für 2,5 h bei 18 °C und 90 UpM inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gelmatrix für 2 min bei 2000 UpM (Heraeus) zentrifugiert, der Überstand größtenteils abgenommen und die Gelmatrix wieder in die Säule überführt. 0,2 ml Phosphatpuffer wurde auf die Säule gegeben und das untere Ende der Säule mit einem Stopfen verschlossen. Anschließend wurden 0,5 ml Phosphatpuffer zugegeben, das obere Ende der Säule verschlossen und die Antikörper auf der Säule nochmals ÜN bei 4°C inkubiert. Die Säule wurde mit 12 ml Phosphatpuffer gewaschen. Die Antikörper wurden mit 8 ml Elutionspuffer (0,2 M Glycin-HCl, pH 2,5) von der Säule eluiert, in 1 ml Fraktionen gesammelt und mit 50 µl Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCl, pH 9) neutralisiert. Die Säule wurde mit 16 ml Phosphatpuffer gewaschen und reaktiviert und anschließend ein weiteres Mal mit 8 ml entgastem, acidhaltigem Phosphatpuffer (0,1 M Phosphat, 0,15 M NaCl, 0,05 % NaN<sub>3</sub>; pH 7,2) reäquilibriert. Die Säule konnte nun mit 2 ml entgastem, acidhaltigem Phosphatpuffer bis zur erneuten Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

### 3.13.3 Lagerung der Antiseren

Die Antiseren wurden bei -20 °C gelagert. Die aufgereinigten Antikörper wurden gegen Phosphatpuffer (0,1 M Phosphat, 0,15 M NaCl; pH 7,2) dialysiert, mit 0,02 % NaN<sub>3</sub> versetzt und bei 4 °C gelagert. Ein Teil der Antikörper wurde in 100-200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

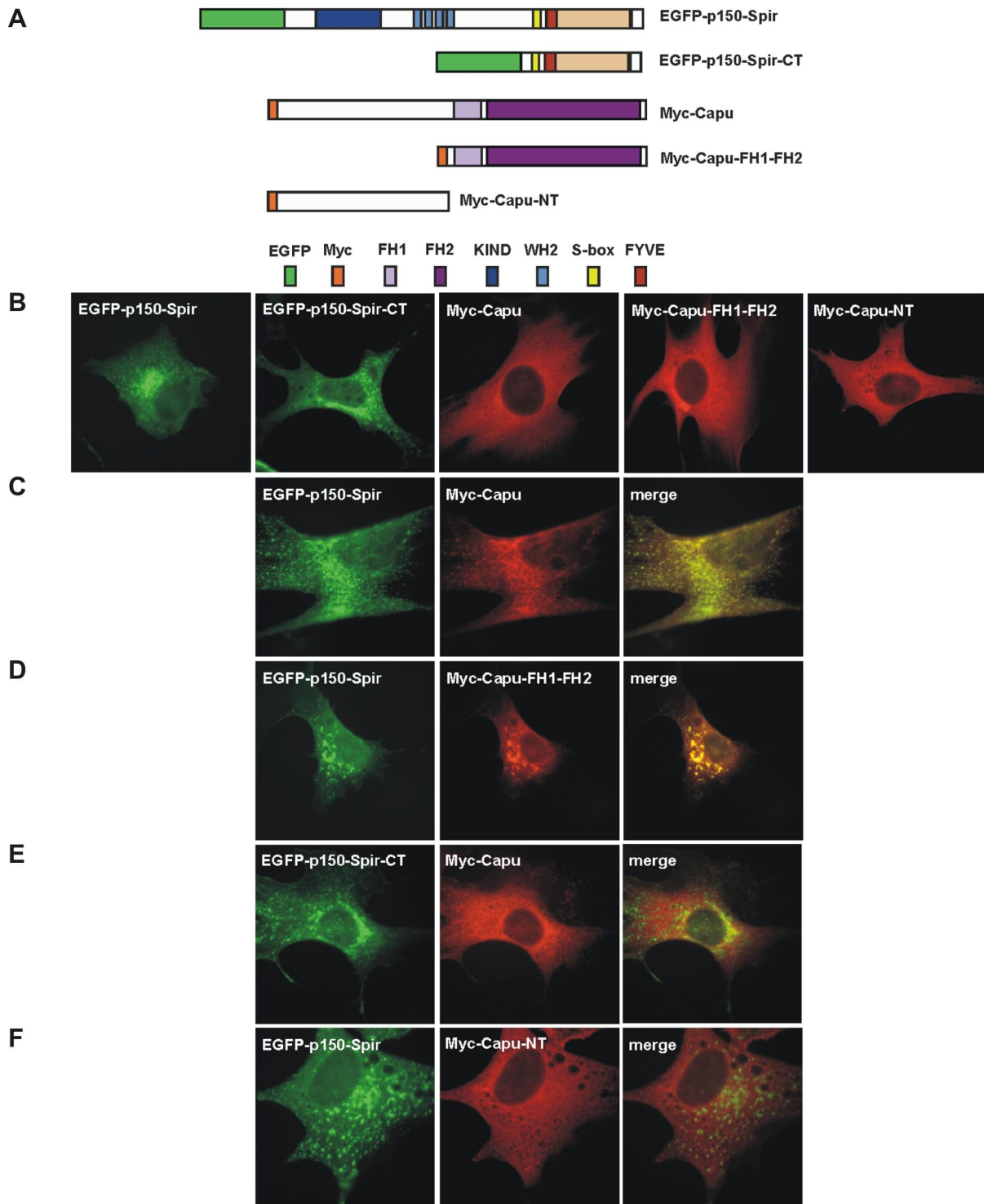
## 4 Ergebnisse

Die *Drosophila* Proteine Cappuccino und Spir gehören zu zwei unterschiedlichen Klassen von Aktinnukleationsfaktoren, die für die Etablierung der Polarität in der Oocyte und im Embryo wichtig sind<sup>3,4,6</sup>. Die Spir- und FMN-Proteinklassen kommen ausschließlich in Metazoa vor und sind konserviert. Jedoch ist ihre zelluläre Funktion und Regulation noch wenig verstanden. *Drosophila spire-* (*p150-spire*) und *cappuccino*-Mutanten haben einen nahezu identischen Phänotyp<sup>4</sup>. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche funktionelle Kooperation dieser Proteine auf zellulärer Ebene. Unterstützt wird diese Vermutung von einem überlappenden Expressionsmuster der Säugerhomologe von *Drosophila spire* und *cappuccino*, *spir-1* und *formin-2*, im sich entwickelnden Zentralnervensystems (ZNS) sowie dem adulten ZNS von Mäusen<sup>5</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Spir-Proteine und Formine interagieren. Außerdem wurden Untersuchungen zu den endogenen Proteinexpressionsmustern von Spir-Proteinen und Forminen mit Hilfe polyklonaler Antikörper durchgeführt.

### 4.1 Kolokalisationsstudien von *Drosophila p150-Spir/Cappuccino* und murinen *Spir-1/Formin-2* Proteinen

#### 4.1.1 Spezifische Kolokalisation von *Drosophila p150-Spir* und Cappuccino-FH1-FH2 in NIH/3T3 Zellen

Cappuccino und Spir sind für die cytoskelettale Reorganisation in der Oocyte und in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* wichtig<sup>4,184</sup>. *Drosophila p150-Spir* repräsentiert eine eigenständige Aktinnukleator Klasse, welche sich mechanistisch von der der Formine und des Arp2/3 Komplexes unterscheidet<sup>3</sup>. Das *Drosophila* Protein Cappuccino gehört zur Unterklasse der nicht-autoregulatorischen Formine und damit ebenso zu den Aktinnukleatoren<sup>3,14,146,147</sup>. Jedoch wurde die zelluläre Lokalisation und Funktion von Cappuccino, im Gegensatz zu p150-Spir, noch nicht aufgeklärt<sup>7,8</sup>. Daher sollte die Lokalisation von Cappuccino, sowie dessen mögliche funktionelle Korrelation mit p150-Spir *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden Cappuccino und Spir in voller Länge und als verkürzte Mutanten in murinen NIH/3T3 Fibroblasten transient exprimiert. Eine mögliche Kolokalisation beider Proteine sollte durch ektopische Koexpression in NIH/3T3 Zellen überprüft werden. Zur Unterscheidung beider Proteine wurden p150-Spir-Proteine als Fusionsprotein mit dem N-terminalen Reportergen „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) und Cappuccino mit einem N-terminalen Myc-Marker exprimiert. Folgende Vektoren wurden daher einzeln oder paarweise in murine NIH/3T3 transfiziert: pEGFP-C1-150-Spir, pEGFP-C1-150-Spir-CT, pcDNA3-Myc-Capu, pcDNA3-Myc-Capu-FH1-FH2 und pcDNA3-Myc-Capu-NT. Die Expressionsmuster wurden anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert.



**Abb. 7: Translokation der *Drosophila* Cappuccino-FH1-FH2-Region an EGFP-p150-Spir in NIH/3T3 Zellen.**

(A) gibt einen schematischen Überblick über die eingesetzten Fusionsproteine. (B) zeigt die transienten Einzelexpressionen von EGFP-p150-Spir, EGFP-p150-Spir-CT, Myc-Capu, Myc-Capu-FH1-FH2 und Myc-Capu-NT. (B-E) zeigen Koexpressionen von EGFP-p150-Spir bzw. EGFP-p150-Spir-CT (grün) mit Myc-Cappuccino Fusionsproteinen (rot). (C, D) Eine Kolokalisation und Translokation von Myc-Capu und Myc-Capu-FH1-FH2 an EGFP-p150-Spir wurde bei den jeweiligen Koexpressionen beobachtet. (E) Eine Translokation von Myc-Capu an EGFP-p150-Spir-CT konnte nicht nachgewiesen werden. (F) Das gleiche gilt für Myc-Capu-NT und EGFP-p150-Spir. Der Nachweis der Myc-Capu-Fusionsproteine erfolgte mit monoklonalen anti-cMyc-9E10 Antikörpern (rot), und der Nachweis von p150-Spir durch dessen N-terminale Fusion an EGFP (grün).

Abb. 7 A gibt einen schematischen Überblick über die eingesetzten Fusionsproteine. Die einzeln exprimierten Fusionsproteine EGFP-p150-Spir und EGFP-p150-Spir-CT wiesen eine typische perinukleäre Akkumulation und punktförmige Verteilung im Cytoplasma auf (Abb. 7 B). Diese subzelluläre Lokalisation am *trans*-Golgi-Netzwerk, den post-Golgi Vesikeln und dem Recycling Endosom wird über die C-terminale mFYVE-Domäne und Spir-Box vermittelt<sup>8</sup>. Myc-Capu, Myc-Capu-FH1-FH2 und Myc-Capu-NT waren bei ektopischer Einzeldexpression in NIH/3T3 Zellen dagegen diffus im Cytoplasma verteilt (Abb. 7 B).

Zur Untersuchung einer möglichen Kolo-kalisation wurden p150-Spir und Cappuccino in den weiteren Untersuchungen koexprimiert (Abb. 7 C-F). In diesen Untersuchungen konnte eine Translokation von Myc-Capu an die subzellulären EGFP-p150-Spir Punkte gezeigt werden. Beide Proteine waren hierbei nahezu vollständig kolo-kalisiert (Abb. 7 C). Um die für diese Translokation verantwortlichen Protein-Regionen näher bestimmen zu können, wurden verkürzte Mutanten beider Proteine mit dem jeweils anderen Protein voller Länge koexprimiert. Das C-terminale Myc-Capu-FH1-FH2 war dabei ausreichend für die Translokation an EGFP-p150-Spir (Abb. 7 D). Nicht ausreichend für eine Translokation von Myc-Capu war das N-terminal verkürzte EGFP-p150-Spir-CT, welches die Spir-Box und die modifizierte FYVE-Zinkfingerstruktur umfasst (Abb. 7 E). Ebenso wies das C-terminal um die FH1- und FH2-Domänen verkürzte Myc-Capu-NT keine Translokation an die subzellulären EGFP-p150-Spir Punkte mehr auf und war diffus im Cytoplasma verteilt (Abb. 7 F). Die Ergebnisse deuten auf eine Translokation des C-Terminus von Cappuccino an den N-Terminus von p150-Spir, welcher die KIND-Domäne und das WH2-Cluster umfasst, hin. Daher wurden die folgenden *in vitro* Bindungsstudien mit verkürzten Mutanten dieser Protein-Regionen durchgeführt.

#### **4.1.2 Spezifische Kolo-kalisation und Translokation von Fmn2-FH2 an Spir-1-KIND in NIH/3T3 Zellen**

Die Kolo-kalisationsstudien von *Drosophila* p150-Spir und Cappuccino legen eine mögliche Interaktion beider Proteine nahe, welche über die C-terminale FH1-FH2-Region von Cappuccino vermittelt werden könnte. Der C-Terminus von p150-Spir war dagegen nicht ausreichend für eine Translokation von Cappuccino. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um ein konserviertes funktionelles Merkmal von Spir und nicht-autoregulatorischen Forminen handelt, wurden analoge *in vivo* Untersuchungen mit den Säugerhomologen Spir-1 und Formin-2 durchgeführt. Von *spir-1* und *formin-2* wurde bereits eine überlappende Expression im sich entwickelnden und im adulten Zentralnervensystems von Mäusen beobachtet<sup>5</sup>.

Die subzelluläre Lokalisation und eine mögliche Kolo-kalisation der Säugerproteine Spir-1 und Formin-2 wurde durch heterologe Koexpression in murinen Fibroblasten der NIH/3T3 Zelllinie untersucht. Zudem wurden Translokationsstudien in NIH/3T3 Zellen durchgeführt. Spir-1 und Formin-2 sind Aktinnukleatoren und gehören wie die *Drosophila* Homologe zu den cytosolischen Proteinen. *Drosophila* p150-Spir ist subzellulär über die C-terminale mFYVE-Domäne und Spir-Box am *trans*-Golgi-Netzwerk, den post-Golgi Vesikeln und dem Recycling Endosom lokalisiert<sup>8</sup>. Für die oben beschriebene Translokation von Cappuccino war der

C-Terminus von p150-Spir nicht ausreichend. Für die Translokationsstudien der Säugerproteine wurden daher von Spir-1 C-terminal verkürzte Mutanten hergestellt und ein neuer, C-terminaler Membrananker angehängt. Somit können Spir-1 und Formin-2 bei einer Koexpression unterschiedliche subzelluläre Lokalisierungen aufweisen. Für Kontrollstudien wurden jeweils ein weiteres Protein der KIND-Familie mit Formin-2 bzw. der Formin-Familie mit Spir-1 koexprimiert. Die Formine wurden anschließend auf eine mögliche Translokation an die membranverankerten KIND-Proteine hin untersucht. Als Membrananker diente ein Prenylrest, welcher C-terminal über ein CAAX-Motiv mit den KIND-Proteine verknüpft wurde. Zu den Prenylresten gehören Farnesyl- ( $C_{15}$ ) und Geranylgeranylreste ( $C_{20}$ ). Diese werden *in vivo* durch Thioetherbindungen kovalent an ein C-terminales Cystein geknüpft. Die Farnesylierung erfolgt am viertletzten Aminosäurerest, dem Cystein des CAAX-Motivs. Das CAAX-Motiv besteht aus einem Cystein (C), zwei aliphatischen AS-Resten (a) und einem C-terminalen Rest (X). Die aaX-Reste werden nach der Farnesylierung proteolytisch entfernt und die Carboxylatgruppe des Cysteins methyliert, so daß ein hydrophober Membrananker entsteht<sup>219,220</sup>.

Die cDNAs wurden teilweise aus vorhandenen Vektoren umkloniert, wobei geeignete Schnittstellen flankierend eingeführt und das interne Stopcodon verändert wurde. Zur Unterscheidung beider Proteine wurden die KIND-CAAX-Proteine mit einem Myc-Marker und die Formine als Fusionsproteine mit dem Reporter gen EGFP in den NIH/3T3 Zellen exprimiert. Die Expressionsmuster wurden anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert.

#### 4.1.2.1 Konstruktion von Vektoren für die Translokationsstudien

Für Analysen der subzelluläre Lokalisation der KIND-CAAX Fusionsproteine in eukaryontischen Zellen wurden die cDNAs kodierend für die KIND-Proteine, in diesem Fall *hSpir-1* und *hVKIND*, mit einem Myc-tag fusioniert. Eine kompatible Schnittstelle sowie der Myc-tag wurden am 5' Ende der kodierenden Sequenzen über entsprechende Primer mittels PCR eingeführt. Ebenso wurde eine zweite kompatible Schnittstelle am 3' Ende der für die KIND-Domäne bzw. die WH2-Domäne kodierenden Sequenz eingeführt. Die cDNAs wurden anschließend in den Vektor pcDNA3-hu-Spir2-KIND-CAAX, nach dessen Linearisierung und Ausschneiden der *hSpir2-KIND* cDNA, inseriert. Im Falle einer korrekten Expression in eukaryontischen Zellen sollten die Fusionsproteine aufgrund des CAAX-Motivs auf der cytosolischen Seite von Membranen lokalisiert sein.

Die erfolgreichen Klonierungen wurden durch asymmetrische Restriktionsanalyse überprüft. Tabelle 1 zeigt die bei den Klonierungen verwendeten Template-DNAs, Längen der inserierten kodierenden Sequenz, die Primer und die Schnittstellen, über welche die cDNAs in den pcDNA3-CAAX Vektor inseriert wurden. Die Expression der Myc-KIND-CAAX Proteine in murinen NIH/3T3 Zellen wurde mittels SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und Immunodetektion mit dem anti-Myc9E10 Antikörper überprüft.

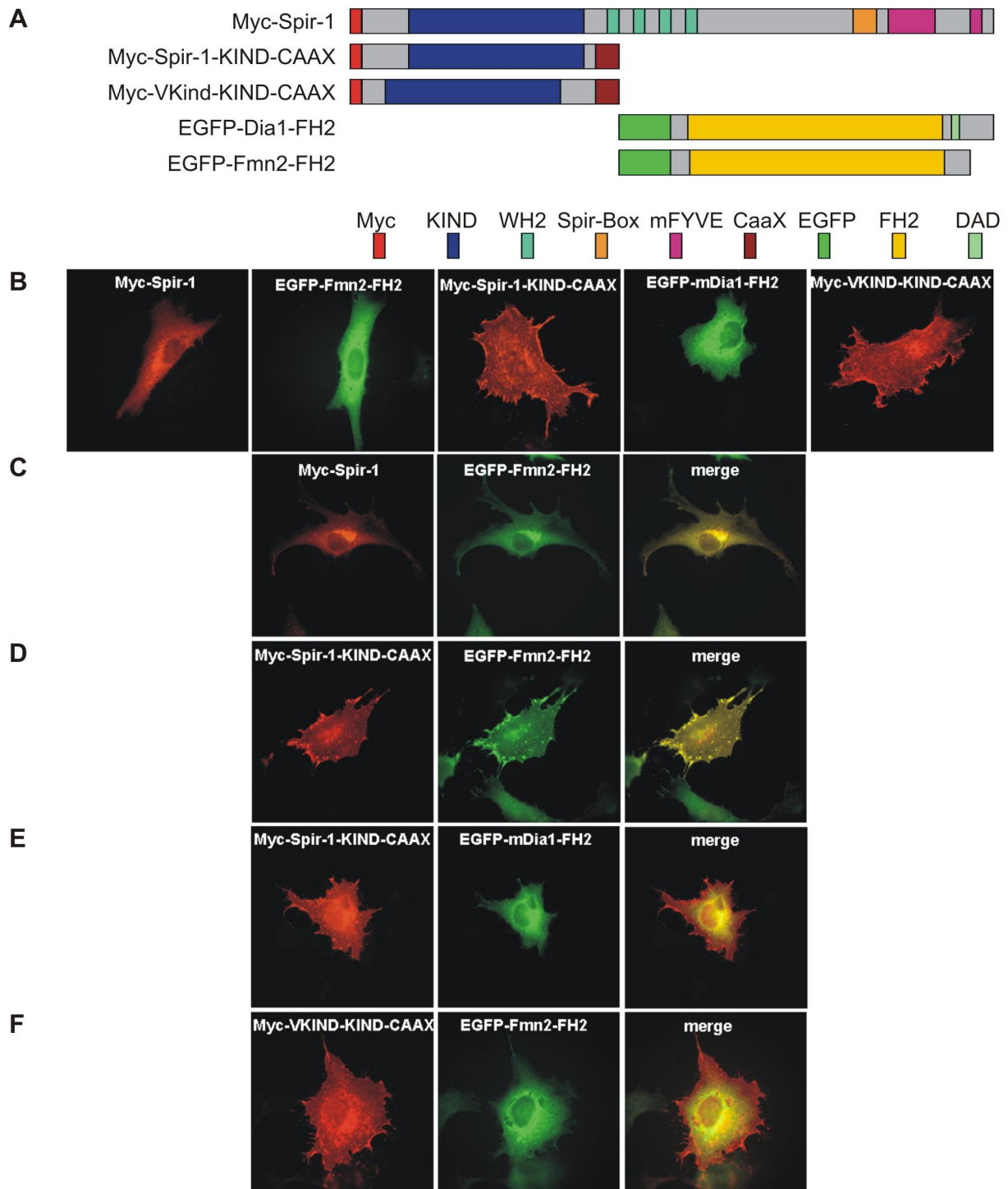
**Tabelle 1: Klonierungsschema für CAAX-pcDNA3-Plasmide**

Konstrukt	Template-DNA	kodierende Sequenz	Primer	Schnittstellen 5'/3'
pcDNA3-Myc-hu-Spir1-KIND-CAAX	pBS-KIAA1135-new	4-813 bp	5' hu-Spir1-BamHI-Myc hSpir1-KIND-EcoRI-3'	BamHI/EcoRI
pcDNA3-Myc-hu-Spir1-KIND-WH2-CAAX	pBS-KIAA1135-new	4-1206 bp	5' hu-Spir1-BamHI-Myc hSpir1-WH2-EcoRI-3'	BamHI/EcoRI
pcDNA3-Myc-VKIND-KIND-CAAX	pcDNA3:VKIND-f.l.	4-783 bp	5'-vKIND-BamHI-Myc 3'-vKIND-K1-CAAX	BamHI/EcoRI

#### 4.1.2.2 Subzelluläre Kolokalisation der KIND- und Formin-Fusionsproteine, Translokation von Fmn2-FH2 an Spir-1-KIND

In Kolokalisationsstudien wurde eine Translokation von Myc-Capu-FH1-FH2 an EGFP-p150-Spir beobachtet, für welche die C-terminale Region von p150-Spir nicht ausreichend war (Abb. 7). Um zu untersuchen, ob die Säuger-Proteine Spir-1 und Formin-2 ebenso eine Kolokalisation auf zelluläre Ebene aufweisen, wurden diese transient in eukaryontischen Zellen exprimiert. Hierzu wurden folgende Vektoren einzeln oder paarweise in murine NIH/3T3 transfiziert: pcDNA3-Myc-hu-Spir-1, pcDNA3-Myc-hu-Spir-1-KIND-CAAX, pcDNA3-Myc-VKIND-KIND-CAAX, pEGFP-C1-formin-2-FH2 und EGFP-mDia1-F2. Beide exprimierten Formine waren N-terminal mit EGFP fusioniert. Die KIND-Proteine wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen Myc-Marker exprimiert. Abb. 8 A gibt einen schematischen Überblick über die eingesetzten Fusionsproteine. In Immunfluoreszenz-Analysen wurde die Lokalisation der einzelnen, transient exprimierten KIND-Proteine und Formine analysiert und anschließend mit der Lokalisation der paarweise koexprimierten KIND-Proteine und Forminen verglichen.

In NIH/3T3 Zellen wies das Myc-hu-Spir-1 Fusionsprotein die auch für *Drosophila* p150-Spir typische perinukleäre Akkumulation und punktförmige Verteilung im Cytoplasma auf. Die beiden Formin-Fusionsproteine EGFP-Fmn2-FH2 und EGFP-mDia1-FH2 waren dagegen diffus im Cytoplasma sowie verstärkt rund um den Zellkern verteilt. Es liegt nahe, daß der C-Terminus korrekt modifizierten und prenylierten war, da die beiden KIND-Fusionsproteine Myc-hu-Spir-1-KIND-CAAX und Myc-VKIND-KIND-CAAX an der Plasmamembran und anderen intrazellulären Membranstrukturen lokalisiert waren (Abb. 8 B). Die Koexpression von Myc-hu-Spir-1 und EGFP-Fmn2-FH2 zeigte ein nahezu identisches Expressionsmuster beider Proteine im perinukleären Raum (Abb. 8 C). Wurde EGFP-Fmn2-FH2 mit Myc-hu-Spir-1-KIND-CAAX in NIH/3T3 Zellen koexprimiert, wurde EGFP-Fmn2-FH2 an das membranständige Myc-hu-Spir-1-KIND-CAAX translokiert (Abb. 8 D).



**Abb. 8: Translokation der Fmn2-FH2-Domäne an die Spir-1-KIND-CAAX-Domäne in NIH/3T3 Zellen.**

(A) gibt einen schematischen Überblick über die eingesetzten Fusionsproteine. (B) zeigt transiente Einzelexpressionen von Myc-Spir-1, EGFP-Fmn2-FH2, Myc-Spir-1-KIND-CAAX, EGFP-mDia1-FH2 und Myc-VKIND-KIND-CAAX. Die KIND-CAAX Fusionsproteine sind an der cytosolischen Seite von Membranen lokalisiert. (C-F) zeigen Koexpressionen von KIND-Proteinen (rot) mit Forminen (grün). (C,D) Kolokalisationen von EGFP-Fmn2-FH2 mit Myc-Spir-1 bzw. Myc-Spir-1-KIND-CAAX wurden bei deren Koexpression festgestellt. (E) Eine Translokation von EGFP-mDia1-FH2 an Myc-Spir-1-KIND-CAAX an die Plasmamembran konnte nicht nachgewiesen werden. (F) Das gleiche gilt für EGFP-Fmn2-FH2 und Myc-VKIND-KIND-CAAX. Der Nachweis der Myc-KIND-Fusionsproteine erfolgte mit monoklonalen anti-cMyc-9E10 Antikörpern (rot), Formine durch N-terminale Fusion an EGFP (grün).



Diese Translokation ist spezifisch, da keine Translokation von EGFP-mDia1-FH2 an koexprimiertes Myc-Spir-1-KIND-CAAX zu beobachten war (Abb. 8 E). Ebenso ist keine Translokation von EGFP-Fmn2-FH2 an Myc-VKIND-KIND-CAAX nachzuweisen (Abb. 8 F). Eine Translokation von EGFP-Fmn2-FH2 an die Plasmamembran aufgrund des EGFP-Reportergens, des Myc-tags oder des modifizierten C-Terminus ist daher auszuschließen.

## **4.2 *in vitro* Bestimmung der Interaktionsdomänen von Proteinen der Spir- und Formin-Proteinfamilien**

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß transient in NIH/3T3 Zellen exprimiertes Fmn2 und Spir-1 kolokalisieren und Fmn2 an Membran-gebundenes Spir-1-KIND translokiert. Diese Befunde legen den Schluß nahe, daß die Fmn2-FH2-Domäne mit der hu-Spir-1-KIND-Domäne interagiert. Daher sollte dies in *in vitro* Bindungsstudien weiter untersucht werden. Aufgrund der Homologien zu *Drosophila* p150-Spir und Cappuccino, sollten diese Proteinen ebenfalls auf eine mögliche Interaktion untersucht werden. Ein Hinweis auf eine Interaktion oder Kooperation der *Drosophila* Proteine stellt zudem der identische Phänotyp der *spire*- und *cappuccino*-Mutanten in der Oocyte dar.

### **4.2.1 Bindungsstudien mit *Drosophila* p150-Spir und Cappuccino**

Mit Hilfe von GST *pull down*-Studien und Bindungsstudien an 6x-His-Fusionsproteinen an Ni-NTA-beads sollte eine potentielle Interaktion von *Drosophila* p150-Spir und Cappuccino analysiert werden. Im Falle einer Interaktion sollten genauer eingegrenzt werden, welche Domänen für eine Bindung hinreichend sind. Hierfür wurden rekombinante 6x-His-p150-Spir-Fusionsproteine und GST-Cappuccino-Fusionsproteine eingesetzt.

#### **4.2.1.1 Konstruktion von Vektoren für die Bindungsstudien**

Verkürzte cDNAs, die für distinkte N-terminale Domänen des *Drosophila* Protein p150-Spir kodieren, wurden in einen bakteriellen Expressionsvektor inseriert, um rekombinante Proteine für *in vitro* Bindungsstudien zu erhalten. Dazu wurden die *E. coli*-Expressionsvektoren pQE-80L und pQE-70 (Qiagen) verwendet, welche hohe Expressionsraten gewährleisten. Diese Vektoren enthalten ein *cis-lacI<sup>q</sup>* Repressor-Gen. Eine Überexpression des *lac* Repressors unterdrückt die Expression des rekombinanten Proteins vom *lac* Promotor vor der Zugabe des Induktors Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Die cDNA des zu exprimierenden Gens wird im richtigen Leseraster hinter (pQE-80L) bzw. vor (pQE-70) die kodierende Sequenz einer Metall-Chelat-Domäne inseriert. Diese aus sechs Histidinresten bestehende Fusionsdomäne ermöglicht eine schnelle und effiziente Aufreinigung des überexprimierten Proteins durch Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Beads.

Die cDNAs kodierend für den N-Terminus, die KIND-Domäne, die Capu-Homologie-Region-(CHR)-WH2-Domänen, die WH2-Domäne und die KIND-CHR-WH2-Domäne wurden mittels PCR aus dem Vektor pcDNA3-Myc-p150Spir amplifiziert. Die fünf cDNAs wurden jeweils in den Vektor pQE-80L inseriert. Tabelle 2 zeigt die bei den verschiedenen Klonierungen

verwendeten Längen der inserierten kodierenden Sequenz, die zugehörigen Primer und die Schnittstellen, über welche die cDNAs in den pcDNA3-CAAX Vektor inseriert wurden. Erfolgreiche Klonierungen wurden durch asymmetrische Restriktionsanalyse überprüft. Die Expression der p150-Spir Proteine mit N-terminalem His-tag in Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta wurde mittels SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und Immunodetektion mit dem anti-Penta-His Antikörper überprüft. Da die Expressionsraten der kleinen WH2- und CHR-WH2-Domänen sowie deren Affinität an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Beads sehr gering waren, wurden die entsprechenden cDNAs ein weiteres Mal in den Vektor pQE-70, für die Expression dieser Domänen mit einem C-terminalem His-tag, kloniert. Die Expressionsraten für diese Fusionsproteine wurden überprüft. Jedoch waren die Expressionsraten und die aufgereinigten Proteinmengen noch geringer als die der N-terminal fusionierten 6x-His-Proteindomänen.

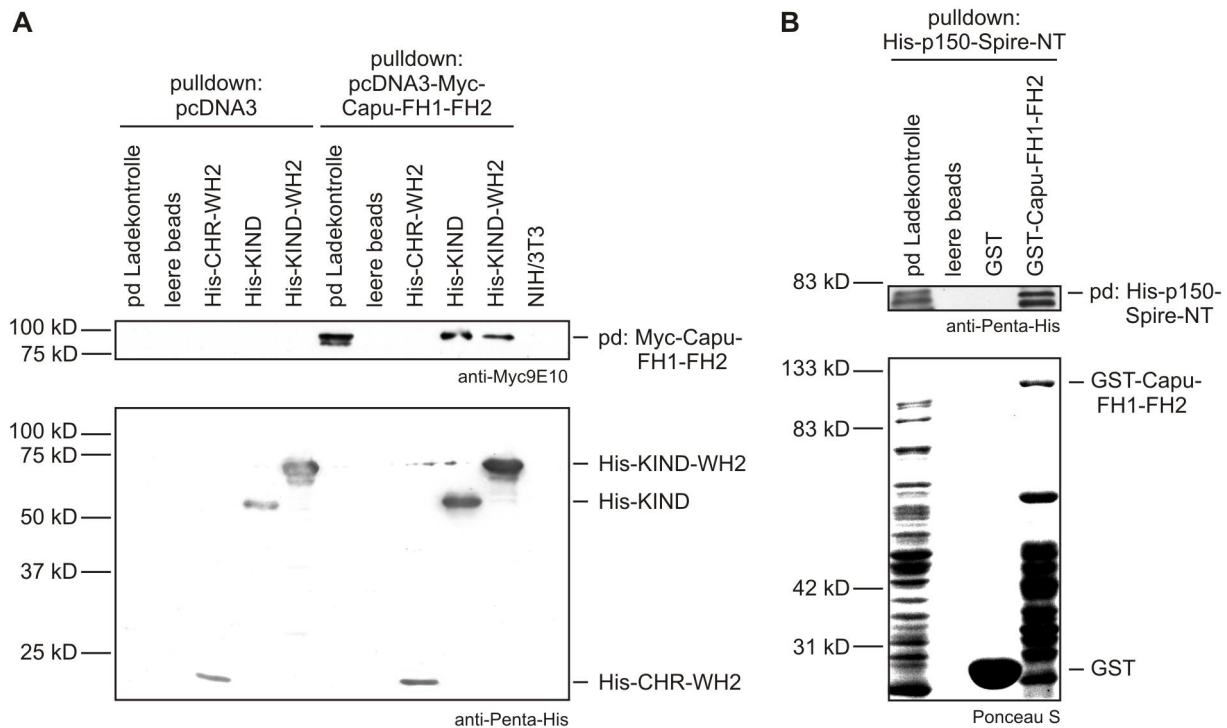
**Tabelle 2: Klonierungsschema für pQE-80L-p150-Spir-Plasmide**

Konstrukt	kodierende Sequenz	eingesetzte Primer	Schnittstellen
pQE-80L-p150Spir-WH2-new	1077-1470	Bam-p150-WH2-5' p150-WH2-TAG-KI3'	BamHI/KpnI
pQE-80L-p150Spir-KIND-WH2-TAG	4-1470	Bam-p150-Spir5' p150-WH2-TAG-KI3'	BamHI/KpnI
pQE-70-p150Spir-CHR-WH2	924-1470	SphI-p150-308-5' p150-WH2-TAG-Bam-3'	SphI/BglIII (V) SphI/BamHI (F)
pQE-80L-p150Spir-CHR-WH2	921-1470	Bam-p150-309-5' p150-WH2-TAG-KI3'	BamHI/KpnI
pQE-80L-p150Spir-NT	4-1854	Bam-p150-Spir5' p150-NT-TAG-KI3'	BamHI/KpnI
pQE-70-p150Spir-WH2-new	1074-1470	SphI-p150-WH2-5' p150-WH2-TAG-Bam-3'	SphI/BglIII (V) SphI/BamHI (F)
pQE-80L-p150Spir-NT-KIND	4-1104	Bam-p150-Spir5' p150-NT-KIND-KI3'	BamHI/KpnI

#### 4.2.1.2 Interaktion von p150-Spir-KIND und Capu-FH1-FH2

Um zu überprüfen, ob p150-Spir mit Cappuccino interagiert, wurden GST *pull down*-Studien und Bindungsstudien an 6x-His-Fusionsproteinen an Ni-NTA-beads durchgeführt. Zunächst sollte nachgewiesen werden, ob p150-Spir mit transient exprimiertem Myc-Cappuccino aus NIH/3T3 Zellysat interagiert. Hierzu wurden die verkürzten His-p150-Spir-CHR-WH2-, His-p150-Spir-KIND- und His-p150-Spir-KIND-WH2-Fusionsproteine in Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta exprimiert und durch Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Beads aufgereinigt. Die Proteinmengen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und Ponceau S Färbung überprüft und für die nachfolgenden Bindungsstudien angeglichen. Der 6x-His *pull down* wurde mit Lysat aus transient Myc-Capu-FH1-FH2 exprimierenden NIH/3T3 Zellen und als Kontrolle mit reinem NIH/3T3-Lysat durchgeführt (Abb. 9 A). Die NIH/3T3 Zellen wurden hierfür mit dem eukaryontischen Expressionsvektor

pcDNA3-Myc-Capu-FH1-FH2 und für die Kontrolle mit dem Insert-freien pcDNA3-Vektor transfiziert.



**Abb. 9: Bindungsstudien mit Capu-FH1-FH2 und His-p150-Spire-Fusionsproteinen.**

(A) Der *pull down* (pd) mit Zellysaten aus pcDNA3 und pcDNA3-Myc-Capu-FH1-FH2 transfizierten NIH/3T3 Zellen wurde an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Beads sowie an His-p150-Spir-CHR-WH2-, His-p150-Spir-KIND- und His-p150-Spir-KIND-WH2-gebundenen Beads durchgeführt. Die pd Ladekontrolle entspricht jeweils 1/10 Vol der pro pd eingesetzten Menge Zellysat. Der obere Ausschnitt zeigt den Immun-Blot des spezifischen *pull downs* von Myc-Capu-FH1-FH2 an His-p150-Spir-KIND- und His-p150-Spir-KIND-WH2-gebundenen Beads. Der untere Immun-Blot-Ausschnitt gegen Penta-His spiegelt die Einsatzmenge der His-p150-Spir-Fusionsproteine wider. (B) Der *pull down* (pd) von His-p150-Spir-NT wurde an leeren Glutathione-Sepharose-Beads sowie an GST- und GST-Capu-FH1-FH2-gebundenen Beads durchgeführt. Die pd Ladekontrolle entspricht jeweils 1/10 Vol der pro *pull down* eingesetzten Menge an klarem Lysat. Der obere Ausschnitt zeigt den Immun-Blot gegen anti-Penta-His des *pull downs* von His-p150-Spir-NT an GST-Capu-FH1-FH2-gebundenen Beads. Der untere Ausschnitt, ein Ponceau S gefärbter Western-Blot, spiegelt die Einsatzmenge der Proteine wider.

Der *pull down* erfolgte an leeren  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Beads und an unterschiedlich verkürzten, Beads gebundenen His-p150-Spir-Fusionsproteinen. Myc-Capu-FH1-FH2 bindet spezifisch an die His-p150-Spir-KIND- und His-p150-Spir-KIND-WH2-Fusionsproteine. Die p150-Spir-KIND-Domäne war ausreichend für diese Bindung, während die CHR-WH2-Region nicht ausreichend für eine Bindung war. Eine Bindung von anti-Penta-His detektierbaren Proteinen aus NIH/3T3 Zellen an verkürzte His-p150-Spir-Fusionsproteine und  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Beads konnte im Immun-Blot nicht nachgewiesen werden.

Um zu verifizieren, ob es sich bei der Bindung um eine direkte oder um eine indirekte Interaktion handelt, wurde ein Glutathione S-Transferase- (GST) *pull down* mit ausschließlich bakteriell exprimierten Proteinen durchgeführt (Abb. 9 B). Als Expressionsvektoren dienten pGEX-4T3, pGEX-4T-3-Capu-FH1-FH2 und pQE-80L-p150Spir-NT. GST- und N-terminal mit einem GST-tag fusioniertes Capu-FH1-FH2 wurden in Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta

exprimiert und an Glutathione Sepharose 4B-Beads aufgereinigt. Der *pull down* wurde mit dem His-p150-Spir-NT-enthaltenden, klaren Lysat der IPTG-induzierten, pQE-80L-p150-Spir-NT transformierter Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta durchgeführt. Als Negativ-Kontrollen dienten leere- sowie GST-gebundene Glutathione-Sepharose-Beads. His-p150-Spir-NT bindet ausschließlich an GST-Capu-FH1-FH2 und nicht an GST. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß der N-Terminus von p150-Spir direkt mit dem C-Terminus von Cappuccino interagiert. Wahrscheinlich sind für diese Interaktion die N-terminale KIND-Domäne von p150-Spir und die FH1-FH2-Region von Cappuccino ausreichend.

#### 4.2.2 Bindungsstudien mit Spir-1 und Fmn2 aus Säugern

In dieser Arbeit wurde eine spezifische Kollokalisierung und Translokation der Formin-2-FH2-Domäne an die Spir-1-KIND-Domäne in NIH/3T3 Zellen gezeigt. Zudem weisen *spir-1* und *formin-2* ein überlappendes Expressionsmuster im Zentralnervensystems von Mäusen auf<sup>5</sup>. Mit Hilfe von GST-Bindungsstudien sollte eine potentielle Interaktion der Säuger Spir-1 und Formin-2 Proteine verifiziert werden. Hierfür wurden rekombinante GST-Spir-1-Fusionsproteine und EGFP/6x-His-Formin-2-Fusionsproteine eingesetzt. Als Kontrollen wurden wiederum, wie bei den Translokationsstudien, das KIND-Protein VKIND und das Formin Dia1 eingesetzt.

##### 4.2.2.1 Konstruktion von Vektoren für die Bindungsstudien

In dieser Arbeit wurde eine spezifische Kollokalisierung und Translokation der Formin-2-FH2-Domäne an die Spir-1-KIND-Domäne in NIH/3T3 Zellen gezeigt. Zur Eingrenzung dieser potentiellen Interaktionsdomänen für die Bindungsstudien wurden daher verkürzte Spir-1 und Formin-2 Proteine hergestellt. Verkürzte cDNAs, die für N-terminalen Domänen verschiedener Proteine der KIND-Familie von Mensch kodieren, wurden in bakterielle Expressionsvektoren inseriert, um große Mengen der rekombinanten Proteine für die *in vitro* GST *pull down* Bindungsstudien zu erhalten. Dazu wurden die cDNAs, kodierend für die KIND-Domäne und die KIND-WH2-Domäne von hSpir-1, zunächst in den Vektor pQE-80L und anschließend in den *E. coli*-Expressionsvektor pGEX-4T-3 subkloniert, welcher ebenfalls hohe Expressionsraten gewährleistet. Dieser Vektor enthält, wie pQE-80L, ein *cis-lacI<sup>l</sup>* Repressor-Gen. Eine Überexpression des *lac* Repressors unterdrückt die Expression des rekombinanten Proteins vom *lac* Promotor vor der Zugabe von IPTG. Die cDNA des zu exprimierenden Gens wird im richtigen Leseraster hinter die kodierende Sequenz der Glutathione S-Transferase inseriert. Diese Fusionsdomäne ermöglicht eine schnelle und effiziente Aufreinigung des überexprimierten Proteins an Glutathione Sepharose 4B-Beads. Die cDNA kodierend für die erste KIND-Domäne (K1) von VKIND, wurde mittels PCR aus dem Vektor pcDNA3:VKIND-f.l. amplifiziert und in den Vektor pGEX-4T-3 inseriert. Tabelle 3 zeigt die bei den verschiedenen Klonierungen verwendeten Template-DNAs, die inserierte kodierende Sequenz, die Primer und die Schnittstellen, über welche die cDNAs in die pQE-

80L und pGEX-4T-3 Vektoren inseriert wurden. Die erfolgreichen Klonierungen wurden durch asymmetrische Restriktionsanalyse überprüft.

Die Expression der GST-KIND- und 6xHis-KIND-Fusionsproteine in Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta und deren Aufreinigung wurde mittels SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und Immunodetektion mit dem GST- bzw. anti-Penta-His-Antikörper überprüft.

**Tabelle 3: Klonierungsschema für KIND-Plasmide**

Konstrukt	Template-DNA	kodierende Sequenz	eingesetzte Primer	Schnittstellen
pQE-80L-h-Spir1-KIND	pBS-KIAA 1135new	4-813 bp	BamHI-h-Spir1-5' h-Spir1-after-KIND-KpnI-3'	BamHI/KpnI
pGEX-4T-3-hu-Spir1-KIND	pQE-80L-h-Spir1-KIND	4-813 bp	_____	BamHI/SalI
pQE-80L-h-Spir1-KIND-WH2	pBS-KIAA 1135new	4-1206 bp	BamHI-h-Spir1-5' h-Spir1-after-WH2-KpnI-3'	BamHI/KpnI
pGEX-4T-3-hu-Spir1-KIND-WH2	pQE-80L-h-Spir1-KIND-WH2	4-1206 bp	_____	BamHI/SalI
pGEX-4T-3-VKIND-K1	pcDNA3:VKIND-f.l.	4-783 bp	5'-fr.1-BglIII 3'-vKIND-K1-CAAX	BamHI/EcoRI (V) BglIII/EcoRI (F)

Um eine direkte Interaktion von Spir-1 und Formin-2 in *in vitro* Bindungsstudien zu überprüfen, wurden die kodierenden Sequenzen von mFmn2-FH2 und mFmn2-FH1-FH2 in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-80L kloniert. Tabelle 4 zeigt die bei den Klonierungen verwendete Template-DNA, die inserierte kodierende Sequenz, die Primer und die Schnittstellen, über welche die cDNAs in den pQE-80L Vektor inseriert wurden. Die erfolgreichen Klonierungen wurden durch asymmetrische Restriktionsanalyse überprüft.

Die Expression der 6xHis-Formin-2-Fusionsproteine in Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta und deren Aufreinigung wurde mittels SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und Immunodetektion mit dem anti-Penta-His-Antikörper überprüft. Es wurde festgestellt, daß His-Fmn2-FH1-FH2 nicht gut exprimiert und während der Aufreinigung und Umpufferung relativ schnell degradiert wurde. Daher wurden die folgende Bindungsstudie mit His-Fmn2-FH1-FH2 aus dem klaren Lysat der induzierten Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta durchgeführt.

**Tabelle 4: Klonierungsschema für pQE-80L-m-fmn2-Plasmide**

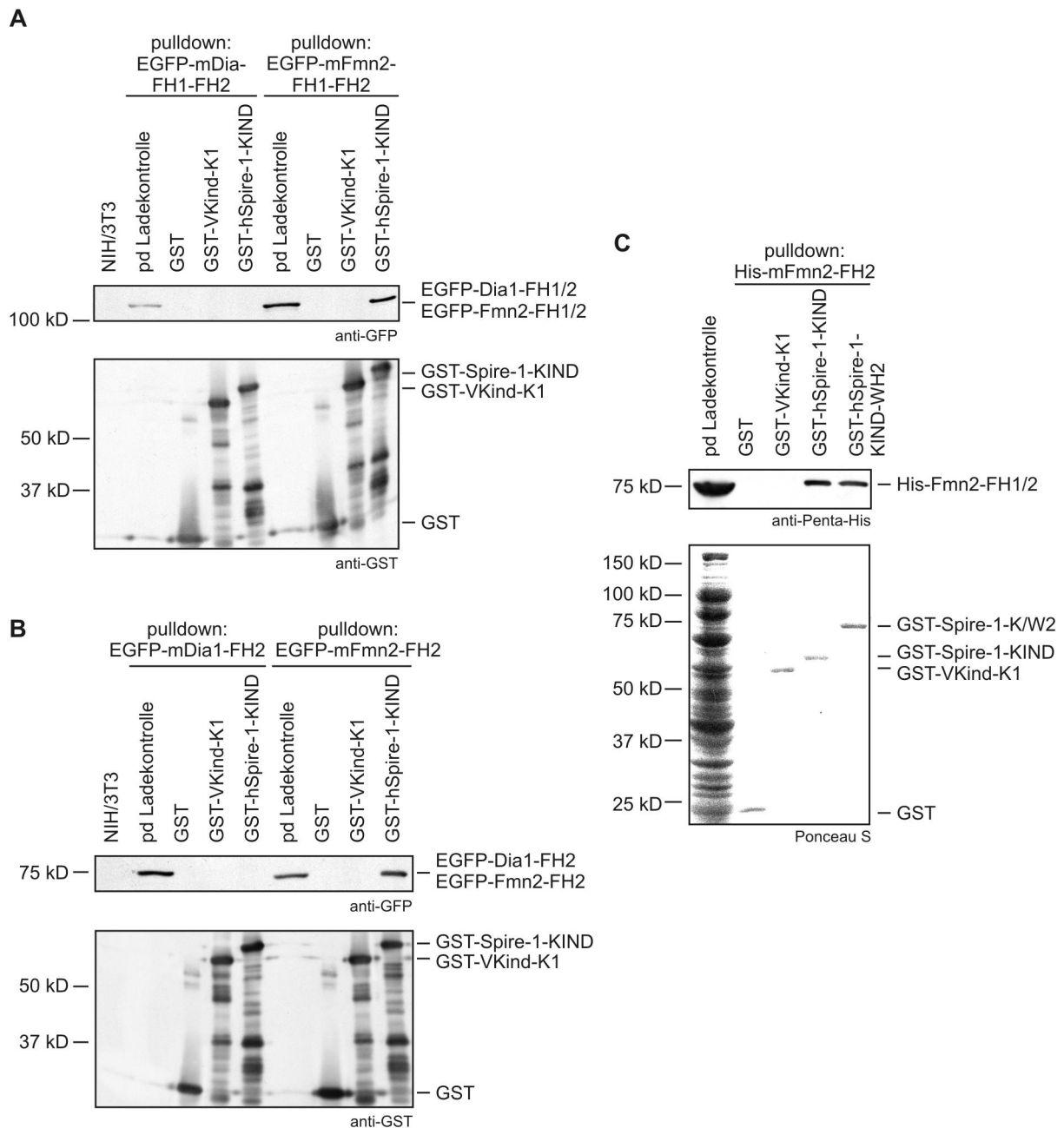
Konstrukt	Template-DNA	kodierende Sequenz (bp)	eingesetzte Primer	Schnittstellen
pQE-80L-m-fmn2-FH2	pEGFP-C1-formin-2-FH1-FH2	3372-4701	Bam-m-fmn2-befFH2-5' 3' m-fmn2-TAG-KpnI	BamHI/KpnI
pQE-80L-m-fmn2-FH1-FH2	pEGFP-C1-formin-2-FH1-FH2	2562-4701	Bam-m-fmn2-853-5' 3' m-fmn2-TAG-KpnI	BamHI/KpnI

#### 4.2.2.2 Interaktion von GST-Spir-1-KIND mit EGFP-Fmn2-FH2 und His-Fmn2-FH2

In dieser Arbeit wurde eine spezifische Kollokalisierung und Translokation der Formin-2-FH2-Domäne an die Spir-1-KIND-Domäne in NIH/3T3 Zellen gezeigt. Mit Hilfe von GST *pull down*-Studien wurde nun eine potentielle Interaktion der Säuger Spir-1 und Formin-2 Proteine untersucht. Eine potentielle Interaktionsdomäne sollte eingegrenzt werden. Als Kontrollen wurden das KIND-Protein VKIND und das Formin Dia1 eingesetzt.

Zunächst wurde überprüft, ob GST-Spir-1-KIND mit transient exprimiertem EGFP-Fmn2-FH1-FH2 aus NIH/3T3 Zellysat interagiert. Als Expressionsvektoren für GST und die GST-Fusionsproteine dienten die Plasmide pGEX-4T3, pGEX-4T-3-hu-Spir1-KIND und pGEX-4T-3-VKIND-K1. Die verkürzten GST-VKIND-K1- und GST-Spir-1-KIND-Fusionsproteine sowie GST wurden in Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta exprimiert und an Glutathione Sepharose 4B-Beads aufgereinigt. Die Proteinmengen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und Ponceau S Färbung mittels eines BSA-Mengenstandards überprüft und für die nachfolgenden Bindungsstudien angeglichen. Der GST *pull down* wurde mit Lysat aus transient EGFP-Fmn2-FH1-FH2 exprimierenden NIH/3T3 Zellen und als Kontrolle mit EGFP-Dia1-FH1-FH2 NIH/3T3-Lysat durchgeführt (Abb. 10 A). Die NIH/3T3 Zellen wurden hierfür mit dem eukaryontischen Expressionsvektoren pEGFP-C1-formin-2-FH1-FH2 und für die Kontrolle mit dem EGFP-mDia1- $\Delta$ N3-Vektor transfiziert. Der *pull down* erfolgte an den GST-(Fusionsprotein)-gebundenen Beads. EGFP-Fmn2-FH1-FH2 bindet spezifisch an das GST-Spir-1-KIND-Fusionsproteine, während das Formin-Fusionsprotein EGFP-Dia1-FH1-FH2 nicht gebunden wurde. Eine Bindung von EGFP-Fmn2-FH1-FH2 und EGFP-Dia1-FH1-FH2 an GST bzw. an die KIND-Domäne des Fusionsproteins GST-VKIND-K1 konnte nicht nachgewiesen werden.

Um nachzuweisen, ob die für eine Translokation an die Spir-1-KIND-Domäne in NIH/3T3 Zellen ausreichende FH2-Domäne von Fmn2 ebenfalls für eine *in vitro* Interaktion hinreichend ist, wurde der GST *pull down* analog mit den FH2-Domänen der Formine wiederholt (Abb. 10 B). Die NIH/3T3 Zellen wurden hierfür mit dem eukaryontischen Expressionsvektoren pEGFP-C1-formin-2-FH2 und für die Kontrolle mit dem EGFP-mDia1-F2-Vektor transfiziert. Es konnte gezeigt werden, daß EGFP-Fmn2-FH2 spezifisch an das GST-Spir-1-KIND-Fusionsproteine bindet, während das Formin-Fusionsprotein EGFP-Dia1-FH2 nicht gebunden wurde. Eine Bindung von EGFP-Fmn2-FH2 und EGFP-Dia1-FH2 an GST bzw. an die KIND-Domäne des Fusionsproteins GST-VKIND-K1 konnte nicht nachgewiesen werden. Eine indirekte Bindung von Spir-1-KIND an Fmn2-FH2 über weitere eukaryontische Proteinen sollte durch weitere Bindungsstudien ausgeschlossen werden. Um zu überprüfen, ob es sich bei der KIND-FH2-Bindung um eine direkte oder um eine indirekte Interaktion handelt, wurde ein GST *pull down* mit ausschließlich bakteriell exprimierten Proteinen durchgeführt (Abb. 10 C). Als bakterielle Expressionsvektoren für die GST-Proteine dienten pGEX-4T3, pGEX-4T-3-hu-Spir1-KIND, pGEX-4T-3-hu-Spir1-KIND-WH2 und pGEX-4T-3-VKIND-K1.



**Abb. 10: GST pull down von Formin-2/Dia1 und GST-KIND-Fusionsproteinen.**

(A,B) Der *pull down* (pd) mit Zellysaten aus EGFP-Fmn2/EGFP-mDia1 transfizierten NIH/3T3 Zellen wurde an GST-/GST-VKIND-K1-/GST-Spire-1-KIND-gebundenen Beads durchgeführt. Die pd Ladekontrolle entspricht jeweils 1/10 Vol der pro pd eingesetzten Menge Zellysat. Die unteren Immun-Blot-Ausschnitte gegen GST spiegeln die Einsatzmenge der GST-Fusionsproteine wider. Die oberen Ausschnitte zeigen die Immun-Blots der spezifischen *pull downs* von EGFP-Fmn2-FH1-FH2 (A) und EGFP-Fmn2-FH2 (B) an GST-Spire-1-KIND. (C) Der *pull down* (pd) von His-Fmn2-FH1-FH2 wurde an GST-/GST-VKIND-K1-/GST-Spire-1-KIND-/GST-Spire-1-KIND-WH2-gebundenen Beads durchgeführt. Die pd Ladekontrolle entspricht jeweils 1/10 Vol der pro pd eingesetzten Menge an klarem Lysat. Der obere Ausschnitt zeigt den Immun-Blot gegen anti-Penta-His des *pull downs* von His-Fmn2-FH1-FH2 an GST-Spire-1-KIND- und GST-Spire-1-KIND-WH2-gebundenen Beads. Der untere Ausschnitt, ein Ponceau S gefärbter Western-Blot, spiegelt die Menge an eingesetztem Protein wider.

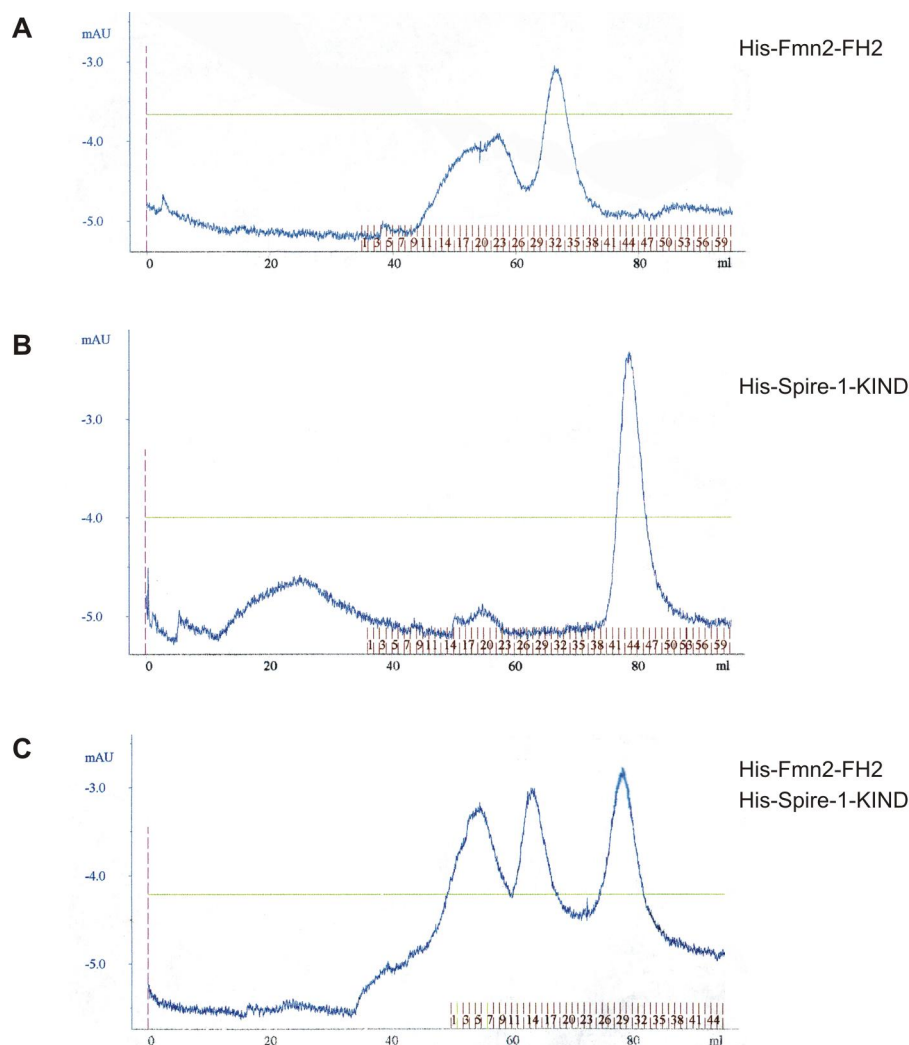
Die Expression, die Aufreinigung, der Expressionsnachweis und die Angleichung der Proteinmengen erfolgte wie oben beschrieben. Der *pull down* wurde mit dem His-Fmn2-FH1-FH2-angereicherten, klaren Lysat der IPTG-induzierten, pQE-80L-m-fmn2-FH1-FH2 transformierten Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta durchgeführt. Als Negativ-Kontrollen dienten die an Glutathione-Sepharose-Beads gebundenen Proteine GST sowie GST-VKIND-K1. His-Fmn2-FH1-FH2 bindet spezifisch an GST-Spir-1-KIND sowie GST-Spir-1-KIND-WH2 und nicht an GST sowie GST-VKIND-K1. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß der N-Terminus von Spir-1 direkt mit dem C-Terminus von Formin-2 interagiert. Für diese Interaktion waren die N-terminale KIND-Domäne von Spir-1 und die FH2-Domäne von Formin-2 hinreichend.

#### 4.2.2.3 Direkte Interaktion von 6x-His-Spir-1-KIND und 6x-His-Fmn2-FH2

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, daß GST-Spir-1-KIND mit EGFP-Fmn2-FH2 aus NIH/3T3 Lysat interagiert. Zudem konnte schon eine direkte Interaktion von ausschließlich bakteriell exprimierten His-Fmn2-FH1-FH2 und GST-Spir-1-KIND gezeigt werden. Um zu überprüfen, ob His-Spir1-KIND und His-Fmn2-FH2 ausreichend für eine direkte Interaktion sind, wurde ein Ko-Gelfiltration der bakteriell exprimierten, nativ aufgereinigten Proteine über eine Superdex 200 HR 16/60-Säule in einem FPLC-Äkta-System (Amersham) durchgeführt (Abb. 11). Durch Gelfiltration ist es möglich, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Während der Passage der Proteinlösung über die Säule diffundieren die Moleküle in die Poren der Matrix. Dabei dringen kleinere Moleküle weiter in die Matrix vor und weisen deshalb eine längere Retentionszeit auf. Größere Moleküle verlassen die Säule zuerst. Der Auftrennungsbereich der Superdex 200 HR 16/60 Gelfiltrationssäule liegt zwischen 10 und 600 kD. Eine Gelfiltration ist geeignet als finaler Reinigungsschritt einer Aufreinigung einzelner Proteine oder eines Proteinkomplexes unter nativen Bedingungen, da die Proteine nicht an das Säulenmaterial binden und in aufgetrennten Fraktionen gesammelt werden können. Durch die Auftrennung von Markerproteinen bekannter Größe unter den gleichen Laufbedingungen ist es möglich, die Größe der aufgereinigten Proteinkomplexe zu bestimmen.

Als bakterielle Expressionsvektoren für die Expression der 6x-His-Fusionsproteine in Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta dienten pQE-80L-m-fmn2-FH2 und pQE-80L-h-Spir1-KIND. Die Aufreinigung erfolgte an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Beads mit einem stringenten 50 mM Imidazole-Waschpuffer. Der quantitative und qualitative Expressionsnachweis erfolgte analog zu den *pull down*-Studien. Für die beiden 6x-His-Fusionsproteine wurden jeweils eine einzelne und eine Ko-Gelfiltration durchgeführt. Die Gelfiltration von His-Fmn2-FH2 wurden mit ca. 203 µg und von His-Spir-1-KIND mit ca. 146 µg durchgeführt, um ein vergleichbares molares Einsatzverhältnis der Proteine zu erhalten. Für die Ko-Gelfiltration von His-Fmn2-FH2 und His-Spir-1-KIND wurden die Proteine vor dem Lauf für 1 h bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Die Proteine wurden über eine 500 µl-Schleife auf die mit Laufpuffer voräquilibrierte Superdex-Säule aufgetragen und die Fraktionen ab 35 ml der His-Fmn2-FH2-Gelfiltration, ab 36 ml bei der His-Spir-1-KIND-Gelfiltration und ab 50 ml bei der Ko-Gelfiltration aufgefangen.



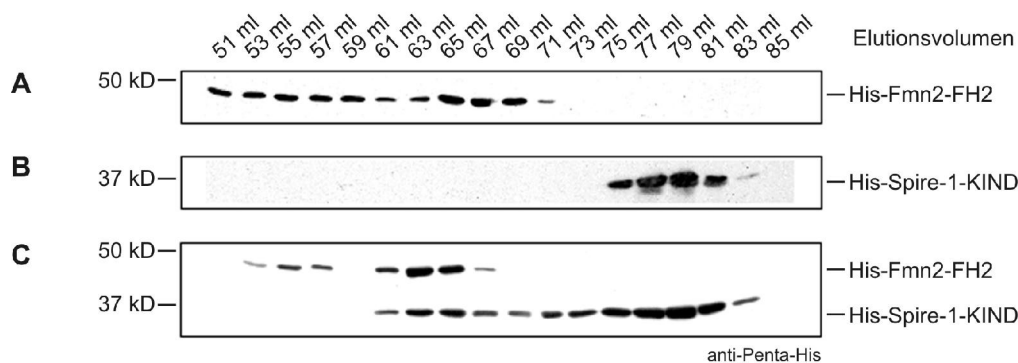


**Abb. 11: Superdex-Gelfiltration von His-Formin-2-FH2 und His-Spire-1-KIND.**

Die blauen Linien zeigen die Elutionsprofile der nativen, aufgereinigten 6x-His-Fusionsproteine im zeitlichen Verlauf bei einer Absorption von 280 nm. Die gesammelten Fraktionen sind in violett dargestellt. (A) Das Chromatogramm von His-Formin-2-FH2 weist zwei Absorptionsmaxima bei ca. 55 ml und 66 ml auf. (B) Das Chromatogramm von His-Spire-1-KIND weist ein Absorptionsmaximum bei 79 ml auf. (C) Das Chromatogramm von His-Formin-2-FH2 und His-Spire-1-KIND weist Absorptionsmaxima bei 55 ml, 63 ml und 79 ml auf.

Die Absorptionsmaxima von His-Fmn2-FH2 wurden bei einem Laufvolumen von ca. 55/57 ml sowie 66 ml (Abb. 11 A) und von His-Spir-1-KIND bei ca. 79 ml aufgezeichnet (Abb. 11 B). Das Chromatogramm der Ko-Gelfiltration von His-Fmn2-FH2 und His-Spir-1-KIND weist Absorptionsmaxima bei ca. 55 ml, 63 ml und 79 ml auf (Abb. 11 C). Als Referenz dienten die Standardproteine Aldolase (158 kD), Albumin (67 kD), Ovalbumin (43 kD) und Chymotrypsinogen A (25 kD), welche unter gleichen Laufbedingungen aufgetrennt wurden und Absorptionsmaxima bei 67 ml, 74 ml, 81 ml und 91 ml aufwiesen. Eine Eichgerade wurde erstellt und die Absorptionsmaxima graphisch ausgewertet. Die ermittelten Molmassen betragen für His-Fmn2-FH2 ca. 146 kD und 300/350 kD und für His-Spir-1-KIND ca. 56 kD. Für die Ko-Elution von His-Fmn2-FH2 und His-Spir-1-KIND können den Absorptionsmaxima der Proteine/Proteinkomplexe die Molmassen von ca. 56 kD, 188 kD und 350 kD zugeordnet werden.

Aliquots der gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Immun-Blot gegen anti-Penta-His analysiert. Im Immun-Blot der Fraktionen der His-Fmn2-FH2-Gelfiltration konnte das Protein entsprechend der Absorptionsmaxima des Chromatogramms bei einem Laufvolumen von 51-59 ml und 65-69 ml nachgewiesen werden (Abb. 12 A). His-Spir-1-KIND wurde in den Fraktionen von 75-81 ml der entsprechenden Einzel-Gelfiltration detektiert. Dies stimmte ebenfalls mit den Absorptionsmaxima des Chromatogramms überein (Abb. 12 B). In der Ko-Gelfiltration von His-Fmn2-FH2 und His-Spir-1-KIND konnte His-Fmn2-FH2 wiederum im ersten Absorptionsmaximum des Chromatogramms, den eluierten Fraktionen von 53-57 ml, nachgewiesen werden (Abb. 12 C). Die bei 61-65 ml eluierten Fraktionen entsprechen dem zweite Absorptionsmaximum des Chromatogramms. Diese Fraktionen enthalten beide rekombinanten Proteine. Das zweite Absorptionsmaximum von His-Fmn2-FH2 (Abb. 12 A) verschob sich somit von 66 ml des Laufvolumens nach 63 ml (Abb. 11C, 12 C). His-Spir-1-KIND wurde wieder bei 75-81 ml des Laufvolumen und zusätzlich bei 61-65 ml eluiert.



**Abb. 12: Analyse der His-Formin-2-FH2- und His-Spire-1-Fusionsproteinen nach der Gelfiltration über die Superdex-Säule.**

Auf den Immun-Blots gegen anti-Penta-His wurde jede zweite der gesammelten 1 ml-Fractionen des Durchlaufvolumens von 51-85 ml analysiert. (A) Die Fraktionen des Einzellaufs von His-Formin-2-FH2 zeigen eine Elutionen des Proteins bei 51-59 ml und 65-69 ml des Laufvolumens an. (B) Die Fraktionen des Einzellaufs von His-Spir-1-KIND zeigen eine Elutionen des Proteins bei 75-81 ml des Laufvolumens an. (C) Die gesammelten Fraktionen der Ko-Gelfiltration von His-Formin-2-FH2 und His-Spir-1-KIND zeigen Verschiebungen der Elution von His-Formin-2-FH2 zu 61-65 ml und eine zusätzliche Elution von His-Spir-1-KIND bei ebenfalls 61-65 ml des Laufvolumens an.

Auffällig ist, daß denaturiertes His-Fmn2-FH2 (449 AS) bei der SDS-Gelelektrophorese auf der Höhe von ca. 50 kD und denaturiertes His-Spir-1-KIND (276 AS) bei ca. 37 kD migriert. Die Abweichungen zu der ermittelten Molmasse auf Basis der Eichgerade und Chromatographie von 56 kD für His-Spir-1-KIND könnte durch eine mögliche globuläre Tertiärstruktur des nativen Proteins verursacht werden. Die starken Abweichungen von 146 kD und 300/350 kD für His-Fmn2-FH2 legen jedoch eine Dimerisierung und/oder sogar eine Tetramerisierung des Proteins nahe. Die ermittelte Molmasse von 188 kD für den Proteinkomplex des zweiten Absorptionsmaximums der Ko-Gelfiltration beider Proteine (Abb. 11 C, 12 C) legt eine Interaktion der Spir-1-KIND-Domäne mit dem putativen His-Fmn2-FH2-Dimer nahe. Die interagierenden Proteine wurden zudem in nahezu äquimolarer Menge im Immun-Blot gegen den anti-Penta-His Antikörper detektiert.

### **4.3 Untersuchungen zum Expressionsmuster von endogenem *Drosophila* p150-Spir/Cappuccino und murinem Spir-1/Formin-2**

Um zu untersuchen, ob die *in vitro* Interaktionen von p150-Spir und Cappuccino bzw. Spir-1 und Fmn2 auch eine physiologische Relevanz haben, wurden die endogenen Protein-Expressionsmuster auch auf mögliche Kollokationen der Spir- und Formin-Proteine hin überprüft. Für mSpir-1 und mFmn2 standen polyklonale Antikörper zur Verfügung. Da der polyklonale mFmn2 Antikörper uns von M. Dettenhofer (Harvard, Boston) in kleiner Menge zur Verfügung gestellt wurde, wurde für mFmn2 ein Antigen hergestellt und an Immunoglobulin zur Immunisierung von Kaninchen gesendet. Ebenso wurden für p150-Spir und Cappuccino Antigene hergestellt und an Eurogentec, Niederlande, zur Immunisierung von Kaninchen gesendet. Die Antiseren wurden biochemisch und immunocytochemisch charakterisiert. Anschließend wurden die endogene Expression in *Drosophila* Embryonen und Larvengehirnen untersucht. Für Nachweise der Spir-1- und Fmn2-Proteine in der Maus wurden Körnerzellen des Kleinhirns auf eine endogene Proteinexpression hin getestet.

#### **4.3.1 Das Proteinexpressionsmuster von endogenem p150-Spir und Cappuccino in *Drosophila melanogaster***

In *Drosophila in situ* Hybridisierungsstudien wurde die RNA-Expression von *capu* und *spire* in Oocyten und Embryonen nachgewiesen<sup>12-14</sup>. Daher sollten Embryonen auf eine Expression von p150-Spir und Cappuccino hin untersucht werden. In *in situ* Hybridisierungsstudien in der Maus wurde ein überlappendes Expressionsmuster von *spir-1* und *Fmn2* im sich entwickelnden ZNS nachgewiesen. Daher sollte auch das Larvengehirn von *Drosophila* auf eine Expression von Cappuccino und Spir hin untersucht werden.

##### **4.3.1.1 Herstellung der Antikörper gegen p150-Spir-KIND-WH2 und Capu-FH2**

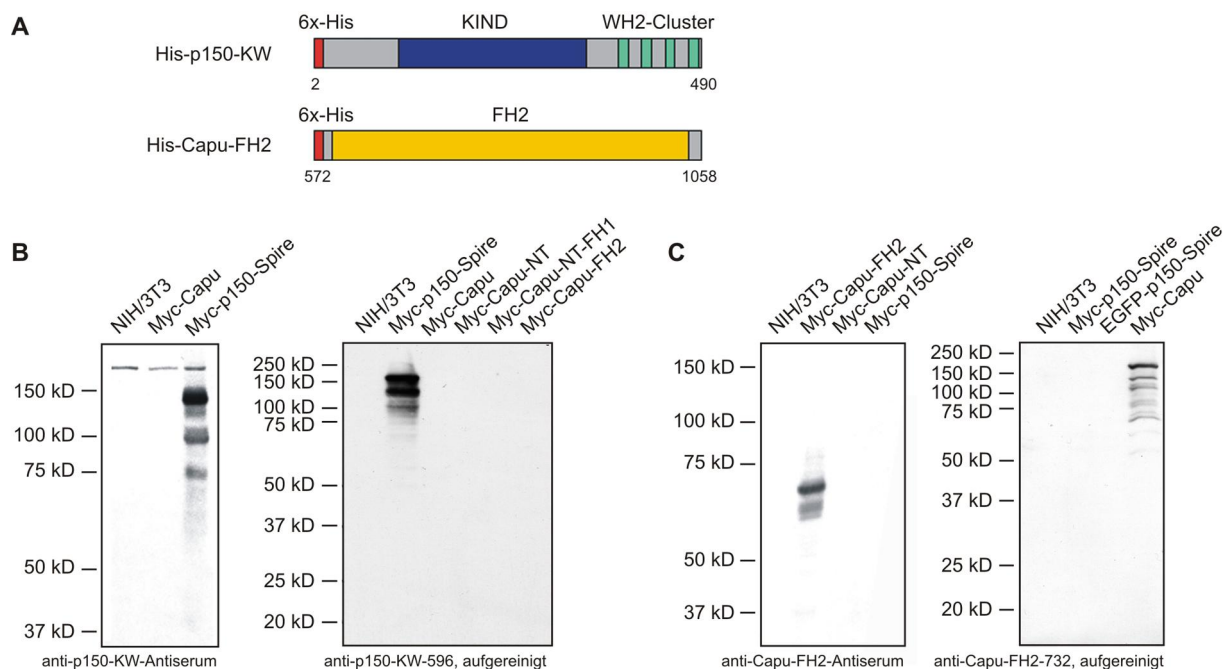
Für die Untersuchungen der endogenen p150-Spir und Cappuccino Expression in *Drosophila* mußten entsprechende Antikörper hergestellt werden. Als Antigene wurden die verkürzten 6x-His-Fusionsproteine p150-Spir-KW (AS 2-490) und Capu-FH2 (AS 572-1058) verwendet (Abb. 13 A). Die Klonierung des Expressionsvektor pQE-80L-p150Spir-KIND-WH2-TAG wurde bereits beschrieben (4.2.1.1). Die cDNA kodierend für Capu-FH2 wurde mittels PCR aus dem Vektor pBS-capu-GH14467 mit den Primern Bam-capu-FH2-5' und 3'capu-TAG-Xmal-primer amplifiziert. Die cDNA wurde anschließend über die Schnittstellen BamHI/Xmal in den Vektor pQE-80L inseriert. Die Klonierung wurde durch asymmetrische Restriktionsanalyse und die Expression von His-Capu-FH2 mittels SDS-Gelelektrophorese und Immun-Blot gegen den anti-Penta-His Antikörper überprüft.

pQE-80L-p150Spir-KIND-WH2-TAG und pQE-80L-Capu-FH2 wurden in Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta transformiert und die rekombinanten 6x-His-Proteine exprimiert. Die Proteine wurden mit stringentem Puffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol) an

Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Beads nativ aufgereinigt. Zur Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen wurden die Proteine in TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Tween, 20% Glycerin) an Eurogentec gesendet. Die Kaninchen wurden viermal, an den Tagen 0, 14, 28 und 50, mit jeweils 100 µg Antigen intradermal immunisiert. Vor der Grundimmunisierung wurde das Präimmunsrum entnommen und am Tag 65 die Kaninchen ausgeblutet.

Die Antiseren wurden immuncytochemisch auf ihre Spezifität getestet. Anschließend wurden die Antiseren über Affinitätschromatographie mit Hilfe der Antigene aufgereinigt. Zur Verhinderung von Kreuzreaktivitäten wurden die gereinigten Antikörper ein zweitesmal über eine mit dem jeweils anderen Antigen-gekoppelten Säule analog aufgereinigt.

Für die biochemische Charakterisierung wurden NIH/3T3 Zellen mit pcDNA3-Myc-p150Spir, pEGFP-C1-p150Spir, pcDNA3-Myc-Capu, pcDNA3-Myc-Capu-NT, pcDNA3-Myc-Capu-NT-FH1 und pcDNA3-Myc-Capu-FH2 transfiziert. Die Lysate der transient p150-Spir- und Capu-überexprimierenden Zellen wurden im Immun-Blot gegen die Antiseren und aufgereinigten Ak getestet (Abb. 13). Im Immun-Blot gegen das anti-p150-KW-Antiserum und den aufgereinigten anti-p150-KW-596-AK wurde Myc-p150-Spir und nicht Myc-Capu detektiert (Abb. 13 A). Jedoch ist eine unspezifische Bande in allen NIH/3T3 Lysaten zu erkennen. Nach der Aufreinigung detektierte der anti-p150-KW-596-AK weder diese Bande noch eines der verkürzten Myc-Capu-Fusionsproteine (Myc-Capu-NT, Myc-Capu-NT-FH1 und Myc-Capu-FH2).



**Abb. 13: Biochemische Charakterisierung der anti-p150-KW- und anti-Capu-FH2-Antiseren**

(A) gibt einen schematischen Überblick über die eingesetzten Antigene. (B, C) Immun-Blot gegen die anti-p150-KW- und anti-Capu-FH2-Antikörper (AK) in transient Myc-Capu und Myc-p150-Spir exprimierenden NIH/3T3 Zellen. (A) Im Immun-Blot gegen das anti-p150-KW-Antiserum und den aufgereinigten anti-p150-KW-596-AK wurde Myc-p150-Spir, nicht jedoch Myc-Capu detektiert. (B) Im Immun-Blot gegen das anti-Capu-FH2-Antiserum und den aufgereinigten anti-Capu-FH2-AK wurde Myc-Capu-FH2, nicht jedoch Myc-Capu-NT und Myc-p150-Spir detektiert.

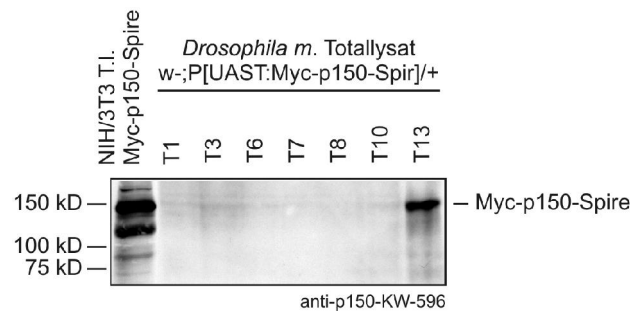
Im Immun-Blot gegen das anti-Capu-FH2-Antiserum wurde Myc-Capu-FH2 und kein Myc-Capu-NT sowie Myc-p150-Spir detektiert (Abb. 13 B). Nach der Aufreinigung detektierte der

anti-Capu-FH2-732-AK wiederum nur Myc-Capu und nicht Myc-p150-Spir oder EGFP-p150-Spir. Kreuzreaktivitäten der Antikörper gegen das jeweils andere Protein können somit biochemisch ausgeschlossen werden. Dies ist für die folgenden Versuche wichtig.

Lysate aus Wildtyp *Drosophila melanogaster* W1118 wurden im Immun-Blot gegen die anti-p150-KW- und anti-Capu-FH2-Antiseren getestet. Hierzu wurden adulte männliche von adulten weiblichen Tieren getrennt. Jeweils 10 Caput, Thorax und Abdomen wurden mit 1x Probenpuffer homogenisiert, für 10 min zentrifugiert und der Überstand analysiert. Ebenso wurde ein Lysat aus 4 Larven hergestellt und analysiert. Es konnten jedoch in keinem der Lysate endogenes Spir oder Cappuccino detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine endogene Expression in Larven und adulten Tieren kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es ist möglich, daß die Expressionsrate entweder zu niedrig für eine Immundetektion ist oder die Proteine nicht oder nicht vollständig im Überstand gelöst waren.

#### 4.3.1.2 Myc-p150-Spir Effektorgenexpressionstudien in L3-Larvengehirnen

In *in situ* Hybridisierungsstudien wurde ein überlappendes Expressionsmuster von *spir-1* und *Fmn2* im sich entwickelnden ZNS der Maus nachgewiesen<sup>5</sup>. Daher sollte auch das Larvengehirn von *Drosophila* auf eine Expression von p150-Spir hin untersucht werden. Um die Spezifität des anti-p150-Spir-KW Ak *in vivo* zu überprüfen, wurden immunhistochemische Nachweise von Myc-p150-Spir in *Drosophila* L3-Larvengehirnen unterschiedlicher Genotypen durchgeführt. Hierzu wurde das Gal4/UAS-System genutzt, welches eine zell- und entwicklungstypische Expression eines Transgens, durch Kreuzung einer *Drosophila melanogaster* Transgen-tragenden Linie mit einer Treiberlinie, in der F1-Generation gewährleistet. Das Transgen steht unter der Kontrolle der Gal4 Bindungsstelle *upstream activator sequence* (UAS), welche über den Hefe-Transkriptionsfaktor Gal4 reguliert wird. Die Expression des hefespezifischen Transkriptionsfaktors Gal4 der Treiberlinie wird durch ein benachbartes gewebe- und entwicklungsspezifisches regulatorisches Element, eine genomische Enhancer Sequenz, reguliert. Aus einer solchen Kreuzung gehen Tiere hervor, die beide Konstrukte tragen. Gal4 kann an die UAS-Sequenz binden und das Transgen wird im selben Muster wie Gal4 mit einer Zeitverzögerung exprimiert<sup>221</sup>. Für Untersuchungen an transgenen Myc-p150-Spir Fliegen wurden die Effektorlinie P[UAST:Myc-p150-Spir] mit verschiedenen Treiberlinien gekreuzt. Für die Kreuzungen wurde der Stamm T13 der P[UAST:Myc-p150-Spir] transgenen Linien ausgewählt, da die unspezifische Expression von Myc-p150-Spir über einen Hitzeschockpromotor hier am stärksten war (Abb. 14).

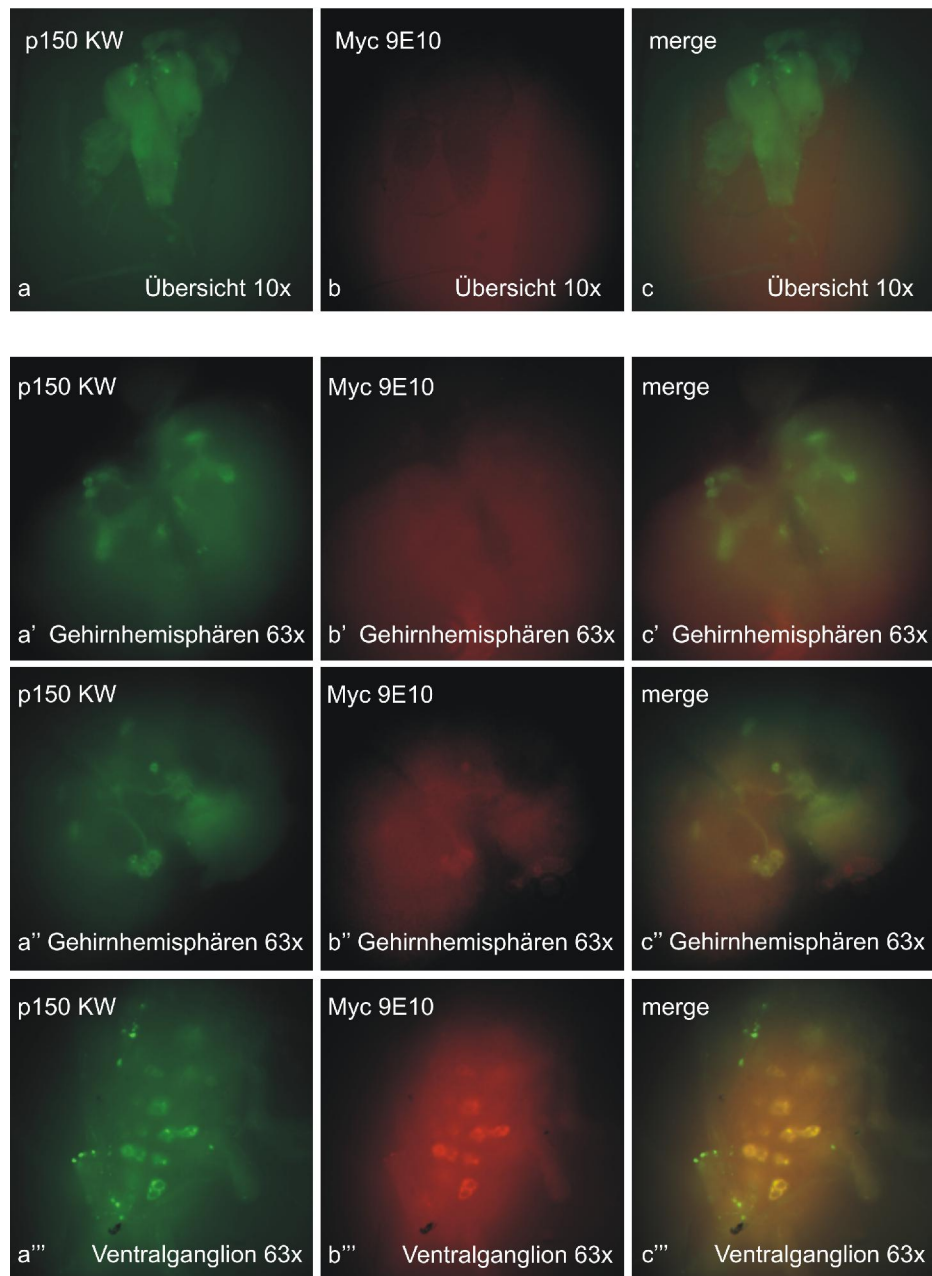


**Abb. 14: Expression von p150-Spir verschiedener transgener UAS-Myc-p150-Spire *Drosophila* Stämme**

Immun-Blot gegen anti-p150-KW-596-Antiserum (1:400) der Expressionskontrolle von Myc-p150-Spir verschiedener Stämme aus der Kreuzung der Hitzeschocklinie mit der P[UAST:Myc-p150-Spir]-Linie. Spur 1 zeigt transient überexprimiertes p150-Spir in NIH/3T3 Zellen.

Als Treiberlinien wurden P[OK107-Gal4] und P[ap-Gal4] verwendet. Diese Treiberlinien führen zu einer gezielten Expression des *spire*-Transgens in bestimmten Neuronen der beiden Gehirnhemisphären und des Ventralganglions in *Drosophila* Larven. Die L3-Larven der F1-Nachkommen aus Kreuzungen von Jungfrauen des Genotyps w-;P[UAST:Myc-p150-Spir]<sup>T13</sup>/P[UAST:Myc-p150-Spir]<sup>T13</sup> mit Männchen der Gal4-Treiberlinien P[GAL4]OK107 bzw. w-;P[UAS:Myc-p150-Spir]<sup>T13</sup>/Sm6a mit Männchen der Gal4-Treiberlinien P[ap-Gal4] wurden in immunhistochemischen Untersuchungen analysiert.

Die Treiberlinie (OK107-Gal4) bewirkt eine Expression des Zielgens in den Pilzkörper-Neuronen. Diese markante Strukturen der Gehirnloben sind wichtig für das olfaktorische Lernen und Gedächtnis<sup>222-225</sup>. Es gibt drei Klassen von Pilzkörperneuronen,  $\gamma$  Neurone,  $\alpha'$ / $\beta'$  Neurone und  $\alpha/\beta$  Neurone. Unterschieden werden diese durch ihre axonalen Projektionsmustern und ihre Entstehungszeitpunkt vor dem L3-Larvenstadium, während des L3-Larvenstadiums und nach der Verpuppung<sup>226</sup>. In Abb. 15 ist das Nervensystem einer L3-Larve aus einer Kreuzung der UAS-Myc-p150-Spir<sup>T13</sup>-Effektorlinie mit der OK107-Gal4-Treiberlinie zu sehen. Deutlich zu erkennen ist die Myc-p150-Spir-Expression in den Pilzkörpern der Gehirnloben (a, a', a''-c, c', c''). Hierbei ist festzustellen, daß das anti-p150-KW-596-Antiserum wesentlich besser für die Immunhistochemie geeignet ist, als der anti-Myc9E10-Ak. Das unaufgereinigte anti-p150-KW-596-Antiserum ist bereits sensitiver und produziert weniger Hintergrund als der anti-Myc9E10-Ak. Im Ventralganglion (VG) sind median gelegene Soma, die sich in Zweier-Paaren gruppieren, zu erkennen (a'''-c'''). Diese sind in der Übersichtsabbildung nicht zu sehen, da der Fokus des Fluoreszenzmikroskops hier auf einer anderen Ebene liegt. Axone konnten im VG nicht sichtbar gemacht werden.

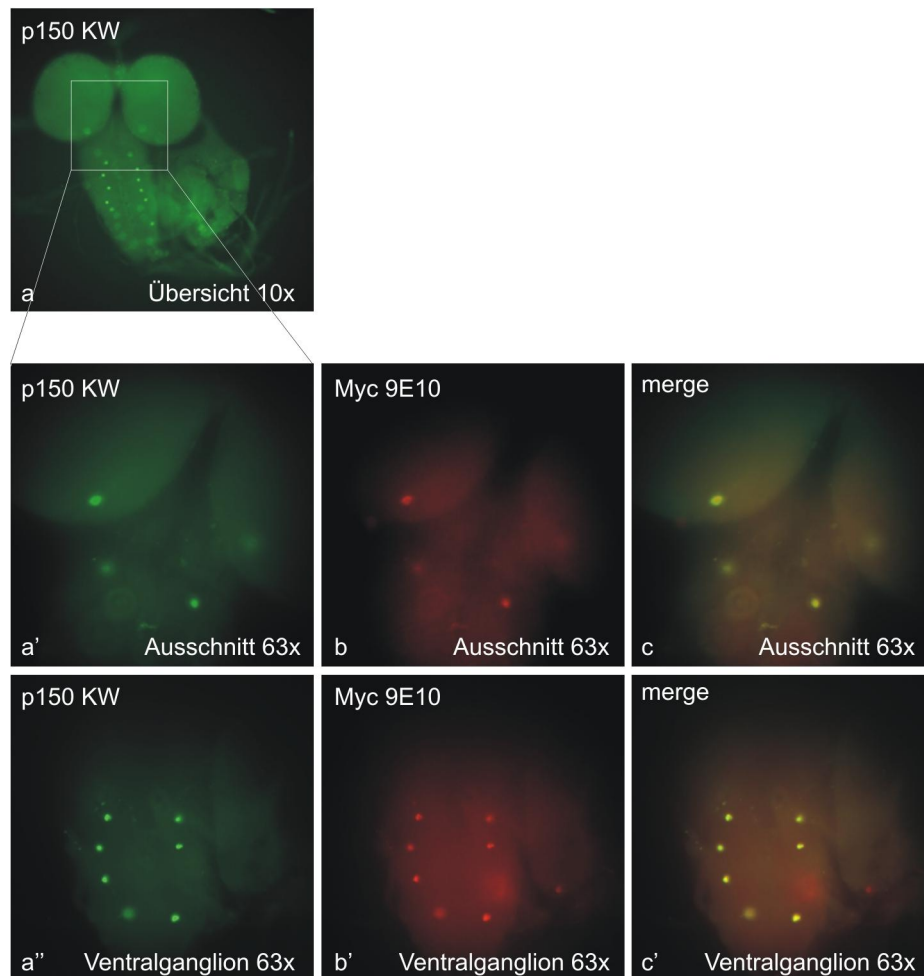


**Abb. 15: OK107-Gal4-vermittelte Effektorgenexpression im L3-Larvengehirn**

Immunohistochemischer Nachweis der Myc-p150-Spir-Expression im Nervensystem von  $w^1118$ ;P[UAS:Myc-p150-Spir]<sup>T13</sup>/P[UAS:Myc-p150-Spir]<sup>T13</sup>;P[GAL4]ok107/+ L3-Larven. Die Larvengehirne der F1-Nachkommen aus der Kreuzung der OK107-Gal4-Linie mit der UAS-Myc-p150-Spir-Linie wurden mit anti-p150-KW-596 Antiserum (1:500)/anti-rabbit-FITC (a-a''') und anti-Myc-9E10/anti-mouse-TRITC Antikörpern (b-b''') angefärbt. Überlagerung beider Antikörperfärbungen (c-c''').

Die Gal4-Treiberlinie P[ap-Gal4] bewirkt eine Expression des Zielgens in Interneuronen des Ventralganglions (VG). Das *Drosophila apterous* Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor der LIM-Homeodomäne-Proteinfamilie. Während der Gehirnentwicklung ist dieser notwendig für die axonale Wegfindung bestimmter Interneurone<sup>227</sup>. Im VG des Larvengehirns ist eine axonale Projektion zweier lateral gelegener Reihen Apterous-exprimierender Interneurone entlang aufsteigender longitudinaler Wege zu beobachten<sup>228</sup>





**Abb. 16: ap-Gal4 vermittelte Effektorgenexpression im L3-Larvengehirn**

Immunhistochemischer Nachweis der Myc-p150-Spir-Expression im Nervensystem von  $w^1;P[UAS:Myc-p150-Spir]^{T13}/P[ap-Gal4]$  L3-Larven. Die Larvengehirne der F1-Nachkommen aus der Kreuzung der ap-Gal4-Linie mit der UAS-Myc-p150-Spir-Linie wurden mit anti-p150-KW-596/anti-rabbit-FITC Serum 1:500 (a-a'') und anti-Myc-9E10/anti-mouse-TRITC Antikörpern (b-b'') angefärbt. Überlagerung beider Antikörperfärbungen (c-c'').

In Abb. 16 ist das Nervensystem einer L3-Larve aus einer Kreuzung der UAS-Myc-p150-Spir<sup>T13</sup>-Effektorlinie mit der ap-Gal4-Treiberlinie zu sehen. Deutlich sind die Soma, jedoch nicht die Axone, zweier lateral gelegener Reihen an Interneurone im VG des Larvengehirns zu beobachten. Wiederum ist festzustellen, daß das anti-p150-KW-596-Antiserum besser als der anti-Myc9E10-Ak für immunhistochemische Untersuchungen geeignet ist.

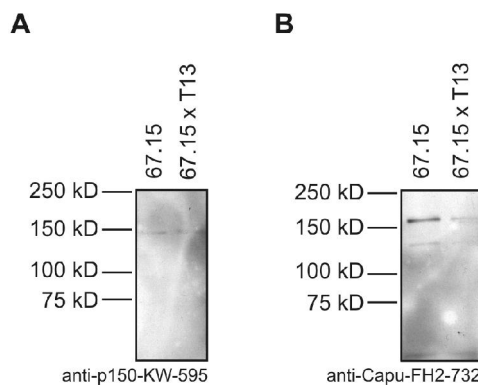
Die Frage, ob eine endogene Expression von p150-Spir im Larvengehirn stattfindet, konnte nicht geklärt werden. In beiden immunhistochemischen Nachweisen konnte kein überlappendes Expressionsmuster aufgezeigt werden. Dies könnte ein Hinweis sein, daß eine mögliche Expression zu schwach für eine immunhistochemische Detektion ist bzw. keine endogene Expression stattfindet. Daher wurde auf weitere Untersuchungen der Larvengehirne verzichtet.



### 4.3.1.3 Biochemischer Nachweis von p150-Spir und Cappuccino in Embryonen

In *Drosophila in situ* Hybridisierungsstudien wurde eine RNA-Expression von *capu* und *spire* in Oocyten und Embryonen nachgewiesen<sup>12-14</sup>. Daher sollten *Drosophila* Embryonen auf eine Expression von p150-Spir und Cappuccino hin untersucht werden. Um die Spezifität des anti-p150-Spir-KW Ak *in vivo* weiterhin zu überprüfen, wurden biochemische Nachweise von transgenem Myc-p150-Spir in *Drosophila* Embryonen durchgeführt. Hierzu wurde wiederum das Gal4/UAS-System genutzt.

Für Untersuchungen an transgenen Myc-p150-Spir Embryonen wurden die Effektorlinie P[UAS:Myc-p150-Spir] mit einer maternalen Treiberlinie gekreuzt. Als maternale Treiberlinie für eine Expression in Embryonen wurde der *Drosophila* Stamm 67.15-Gal4 verwendet. Diese Treiberlinie enthält Gal4-Inserts unter der Kontrolle eines maternalen  $\alpha$ -Tubulin Promotors im zweiten und dritten Chromosom und führt bereits in frühen *Drosophila* Embryonalstadien zu einer Expression des Transgens. Kreuzungen von Junfrauen der Gal4-Treiberlinien 67.15 mit Männchen des Genotyps  $w;P[UAS:Myc-p150-Spir]^{T13}/TM3$  wurden zunächst im Immun-Blot gegen den anti-p150-KW-596-Antikörper und anti-Capu-FH2-732-Antikörper getestet (Abb. 17). Hierzu wurden F1-Embryonen mit 1x Probenpuffer homogenisiert, für 10 min zentrifugiert und der Überstand analysiert.



**Abb. 17: Immun-Blot von Embryolysaten der Treiberlinie 67.15-Gal4 und der Kreuzung  $w;P[UAS:Myc-p150-Spir]^{T13}/TM3$  mit 67.15-Gal4.**

Immun-Blot von Embryolysaten gegen den anti-p150-KW-596-Antikörper und den anti-Capu-FH2-732-Antikörper. Die Spuren 1 und 2 beider Immun-Blots enthalten jeweils die gleiche Menge an Lysat der Treiberlinie 67.15-Gal4 bzw. der Kreuzung  $w;P[UAS:Myc-p150-Spir]^{T13}/TM3$  mit 67.15-Gal4. (A) Im Immun-Blot gegen anti-p150-KW-596 wurde in beiden Spuren eine schwache Proteinbande auf der Höhe von  $<150$  kD detektiert. (B) Im Immun-Blot gegen anti-Capu-FH2-732 wurde in beiden Spuren Proteinbanden auf der Höhe von  $>150$  kD und ca. 125 kD detektiert.

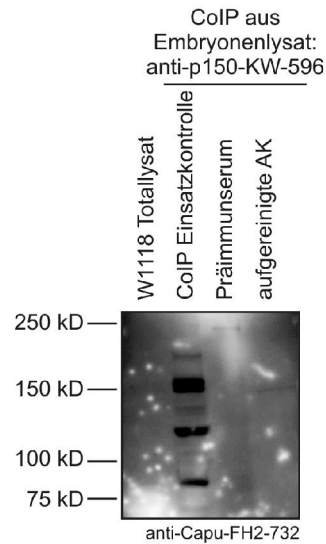
*Drosophila* Spir aus der Treiberlinie 67.15-Gal4 und aus der Kreuzung von 67.15-Gal4 mit der transgenen Myc-p150-Spir Linie migriert auf der Höhe von  $<150$  kD (Abb. 17 A). *Drosophila* Cappuccino der Treiberlinie 67.15-Gal4 und der Kreuzung von 67.15-Gal4 mit der transgenen Myc-p150-Spir Linie läuft auf der Höhe von  $>150$  kD und ca. 125 kD. Die Menge an Protein im Embryonenlysat in Spur 1 ist größer als in Spur 2 (Abb. 17 B). Das ist ein Hinweis darauf, daß das transgene Myc-p150-Spir erfolgreich in Embryonen der Kreuzung exprimiert wird, da dort in beiden Spuren äquimolare Mengen an p150-Spir detektiert wurden

(Abb. 17 A). Die Embryonalstadien 1-4 der Kreuzung wurden immunhistochemisch mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Eine diffuse Konzentration von Spir am Rand des Blastoderms war sowohl mit dem anti-Myc9E10- sowie dem anti-p150-KW-596-Antikörper zu beobachten. In Embryonen derselben Stadien des Wildtyps W1118 konnte jedoch kein Spir nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.1.4 Untersuchung einer möglichen Interaktion von endogenem p150-Spir und Cappuccino

*In situ* Hybridisierungsstudien des *Gene Expression Report* des Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) zeigen eine Expression der *capu* und *spire* Gene in Embryonen der präblastodermalen Stadien 1-3 und der Stadien 11-16<sup>12</sup>. In Abb. 17 wurde bereits endogenes Spir und Cappuccino in der Treiberlinie 67.15-Gal4 im Immun-Blot nachgewiesen. Mit Hilfe einer Ko-Immünpräzipitation (KoIP) aus Embryonenlysate sollte nun eine mögliche Interaktion von endogenem p150-Spir und Cappuccino untersucht werden.

Eine Ko-Immünpräzipitation (KoIP) aus Wildtyp *Drosophila melanogaster* W1118 Embryonenlysate wurde mit dem anti-p150-KW-596-Antikörper durchgeführt (Abb. 18). Als Negativkontrolle wurde eine KoIP mit dem Präimmenserum-596 durchgeführt. Embryonen aller Entwicklungsstadien wurden in KoIP Puffer homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand für die KoIP eingesetzt. Spur 1 zeigt den Immun-Blot gegen den anti-Capu-FH2-732-Antikörper von in 1x Probenpuffer homogenisierten adulten *Drosophila* W1118 Fliegen. Im klaren Embryonenlysate der KoIP Einsatzkontrolle (Spur 2) wurden zwei Proteinbanden auf der Höhe von ca. 85 kD, 120 kD und eine Doppelbande bei ca. 150/160 kD durch den anti-Capu-FH2-732-Antikörper detektiert. Durch das Präimmenserum wurde keines der durch den anti-Capu-FH2-732-Antikörper erkannten Proteine der Einsatzkontrolle koimmunpräzipitiert (Spur 3). In der Ko-Immünpräzipitation mit dem anti-p150-KW-596-Antikörper konnte eine sehr schwache Proteinbande auf der Höhe von ca. 150 kD durch den anti-Capu-FH2-732-Antikörper nachgewiesen werden (Spur 4). Ob es sich hierbei tatsächlich um kopräzipitiertes Cappuccino oder nur um ein Artefakt handelt, ist nicht abschließend zu bestimmen. Im Flybase Gene Report wurden vier Cappuccino Polypeptid-Isoformen vorhergesagt, mit folgenden Proteinlängen: Capu-PA (1059 AS, 114 kD), Capu-PB (1049 AS), Capu-PC (1154 AS) und Capu-PD (1207 AS). Es ist denkbar, daß die detektierten Proteinbanden auf der Höhe von 120 kD und 150/160 kD des embryonalen Lysates (Spur 2) diesen vier Capu-Isoformen entsprechen. Die Proteinbande auf der Höhe von ca. 85 kD könnte eine weitere, kürzere Capu-Isoform oder eine unspezifische Bande repräsentieren.



**Abb. 18: Ko-Immünpräzipitation (KoIP) mit dem anti-p150-KW-596-Antikörper (AK) aus *Drosophila* W1118 Embryonenlysat**

Immun-Blot gegen anti-Capu-FH2-732-Antikörper der Ko-Immünpräzipitation (KoIP) mit dem anti-p150-KW-596-Antikörper (AK). In Spur 1 werden keine Proteine aus *Drosophila* W1118 Totallysat adulter Tiere durch den anti-Capu-FH2-732-Antikörper detektiert. Die KoIP Ladekontrolle in Spur 2 entspricht 1/10 Vol der pro KoIP eingesetzten Menge an klarem Lysat des W1118-Embryonenlysat. Die Spuren 3 und 4 zeigen die KoIPs mit dem Präimmunserum als Negativkontrolle und dem aufgereinigten anti-p150-KW-596-Antikörper.

Zusammenfassend unterstützen diese Untersuchungen eine physiologische Relevanz der *in vitro* beobachteten Interaktion zwischen Spir und Cappuccino aufgrund des Vorkommens in den gleichen Entwicklungsstadien von *Drosophila*. Die subzellulären Lokalisation der endogenen Proteine sollte daher in Embryonen im Vergleich mit den entsprechenden Spir- und Cappuccino Mutanten analysiert werden.

### 4.3.2 Untersuchung des Proteinexpressionsmusters von endogenem Spir-1 und Formin-2 in Körnerzellen des postnatalen Mausgehirns

Um zu untersuchen, ob die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene *in vitro* Interaktionen von Spir-1 und Fmn2 *in vivo* eine physiologische Relevanz hat, wurden verschiedene Untersuchungen zur endogenen Spir-1 und Fmn2 Expression durchgeführt. In *in situ* Hybridisierungsstudien wurde ein überlappendes Expressionsmuster von *spir-1* und *formin-2* in embryonalen Nervenzellen sowie im adulten Gehirn der Maus nachgewiesen. Eine schwache *spir-1* und *Fmn2* Expression wurde u. a. in der Körnerzellschicht des adulten Cerebellum beobachtet. Zudem wurde endogenes Spir-1 im Immun-Blot gegen den SA2133 Antikörper in Gehirn-Lysat adulter Mäuse detektiert<sup>5</sup>. Daher sollten primäre Körnerzellen des Cerebellums postnataler Mäuse isoliert und biochemisch sowie immuncytochemisch auf eine *spir-1* und *Fmn2* Expression untersucht werden.

Das Cerebellum gliedert sich in eine Soma-haltige Schicht, den Kortex, und eine Nervenfasers-haltige Schicht, die weiße Substanz. Der Kortex ist von außen nach innen in drei Schichten aufgebaut: Die Molekularschicht, die Purkinjezellschicht und die Körnerzellschicht. Körnerzellen sind Hauptbestandteil der Körnerzellschicht und stellen neben den Golgizellen den einzigen Zelltyp dieser Schicht dar. Sie besitzen kleine runde Somata (10 µm). Das apikale Axon projiziert in die Molekularschicht, wo es sich einmal rechtwinklig in die Parallelfasern verzweigt, während die vier basalen Dendriten unverzweigt bleiben. Die Parallelfasern innervieren *en-passant* die Dendriten der Purkinjezellen. Der Vorteil der Körnerzellen liegt in ihrer einfachen Isolierung und Kultivierung, ihr Nachteil in der geringen Größe der Soma.

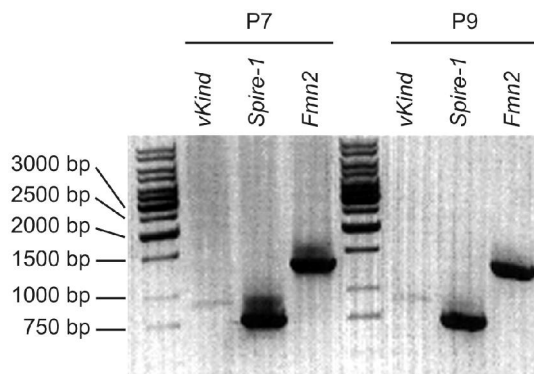
#### 4.3.2.1 Nachweis der *spir-1* und *Fmn2* RNA-Expression in cerebellären Körnerzellen

Zunächst sollte die *spir-1* und *Fmn2* RNA-Expression in isolierten murinen Körnerzellen nachgewiesen werden. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus Körnerzellen der postnatalen Tage P7 und P9 mittels RT-PCR untersucht. Als Kontrolle wurde eine RT-PCR mit VKIND Primern durchgeführt. In *in situ* Hybridisierungsstudien wurde die VKIND-Expression in Körnerzellen und Purkinjezellen des sich entwickelnden murinen Cerebellums nachgewiesen<sup>215</sup>.

**Tabelle 5: Primer für RT-PCR aus Gesamt-RNA cerebellärer Körnerzellen**

RNA	Primer
<i>spir-1</i>	5' m-spir1-CT
	3' m-spir1-CT
<i>Fmn2</i>	Bam-m-fmn2-befFH2-5'
	3'-m-fmn2-TAG-Kpnl
VKIND	5'-BamHI-RasGEF
	3'-Ras-GEF-EcoRI

In Tabelle 5 sind die für die RT-PCR benutzten Primer aufgeführt. Von der Gesamt-RNA und den Primern wurden jeweils äquimolare Mengen eingesetzt.



**Abb. 19: *spir-1*- und *Fmn2* Expression in Körnerzellen.**

Die Expression von *VKIND*, *spir-1* und *Fmn2* RNA wurde mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA der postnatalen P7 und P9 Körnerzellen untersucht.

In Abb. 19 spiegelt die starke Bande der amplifizierten *spir-1*- und *Fmn2* cDNA eine deutliche RNA-Expression in P7 Körnerzellen wider. Die Menge der amplifizierten *VKIND* cDNA ist dagegen wesentlich niedriger. In P9 Körnerzellen ist wiederum die amplifizierte cDNA-Menge an *Spir-1* und *Fmn2* größer als die Menge an *VKIND* cDNA.

Nachdem die RNA-Expression von *spir-1* und *Fmn2* in Körnerzellen beobachtet wurde, sollte auch die Protein-Expression untersucht werden.

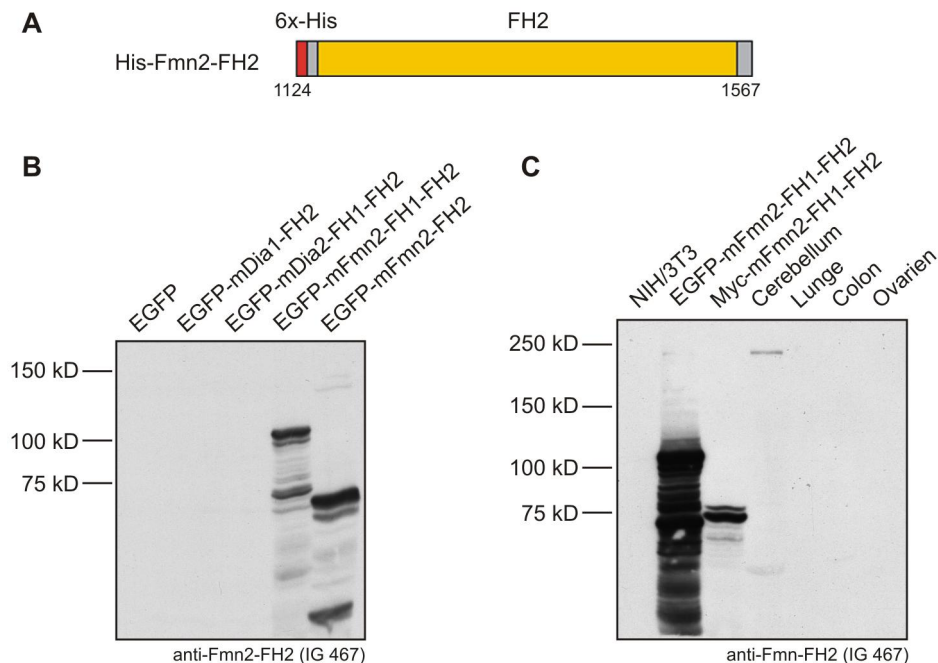
#### 4.3.2.2 Nachweis von endogenem Formin-2 im Cerebellum adulter Mäuse

Bei *in situ* Hybridisierungsstudien wurde ein fast identisches Expressionsmuster der murinen *formin-2* und *spir-1* Gene im adulten Gehirn beobachtet. Zudem wurde endogenes *Spir-1* im Immun-Blot gegen den SA2133 Antikörper im Gehirn-Lysat adulter Mäuse detektiert<sup>5</sup>. Daher sollten nun das Cerebellum adulter Mäuse biochemisch auf eine Formin-2-Expression hin untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein polyklonaler anti-mFmn2-Antikörper hergestellt und mit dessen Hilfe verschiedene Mausgewebe adulter Tiere auf eine Expression von Formin-2 hin untersucht.

Als Antigene für die AK-Herstellung wurden das verkürzte 6x-His-Fusionsprotein Fmn2-FH2 (AS 1124-1567) verwendet (Abb. 20 A). Die Klonierung des Expressionsvektor pQE-80L-m-fmn2-FH2 wurde bereits beschrieben (4.2.2.1). pQE-80L-m-fmn2-FH2 wurde in Bakterien des *E. coli* Stamms Rosetta transformiert und das 6x-His-Fmn2-FH2 Fusionsprotein exprimiert. 6x-His-Fmn2-FH2 wurde mit stringenter Puffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol) an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Beads nativ aufgereinigt. Zur Immunisierung von Kaninchen wurden das Antigen in TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Tween, 20% Glycerin) an Immunglobe gesendet. Die Kaninchen wurden dreimal, an den Tagen 0, 14 und 28, mit jeweils 100 µg Antigen intradermal immunisiert. Vor der Grundimmunisierung wurde das Präimmenserum und am Tag 60 das Antiserum entnommen.

Für die biochemische Charakterisierung des aufgereinigten Antiserums (IG 467) wurden NIH/3T3 Zellen mit pEGFP-C1, pEGFP-mDia1-ΔN3, pEGFP-C1-Formin-2-FH1-FH2, pcDNA3-Myc-mFormin-2-FH1-FH2 und pEGFP-C1-Formin-2-FH2 transfiziert. Die Lysate der EGFP-Fusionsproteine überexprimierenden Zellen wurden im Immun-Blot gegen den aufgereinigten Antikörper getestet. Im Immun-Blot gegen das aufgereinigte anti-Fmn2-FH2-

Antiserum (IG 467) wurden EGFP-mFmn2-FH2 und EGFP-mFmn2-FH1-FH2, nicht jedoch EGFP, EGFP-mDia1-FH2 und EGFP-mDia1-FH1-FH2 detektiert (Abb. 20 B). Hierdurch konnte eine Kreuzreaktion des aufgereinigten anti-Fmn2-FH2-Antiserums (IG 467) mit dem Formin mDia1 ausgeschlossen werden.



**Abb. 20: Biochemische Charakterisierung des anti-Fmn2-FH2-Antiserums: Nachweis von exogenem und endogenem Formin-2**

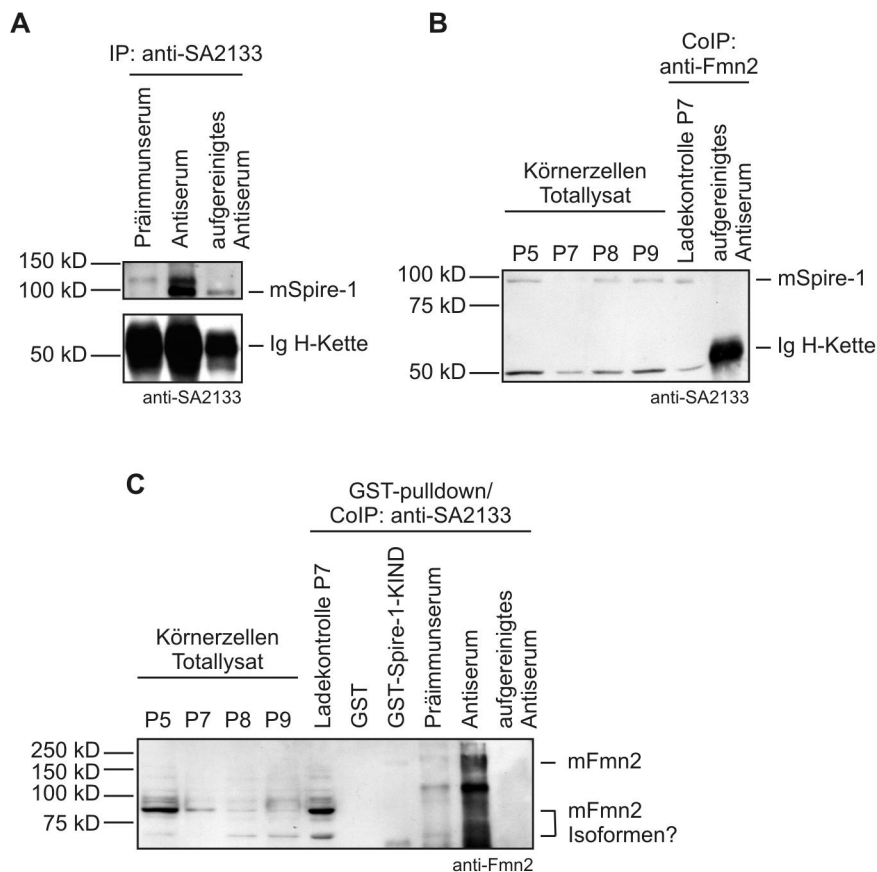
(A) gibt einen schematischen Überblick über das eingesetzte Antigen. (B, C) Immun-Blots gegen das aufgereinigte anti-Fmn2-FH2-Antiserums (IG 467). (B) Im Immun-Blot wurde ektopisch in NIH/3T3 Zellen exprimiertes EGFP-mFmn2-FH2 und EGFP-mFmn2-FH1-FH2, nicht jedoch EGFP, EGFP-mDia1-FH2 oder EGFP-mDia1-FH1-FH2 detektiert. (C) Formin-2 wurde im Cerebellum, nicht jedoch in der Lunge, im Colon oder in den Ovarien detektiert. EGFP-mFmn2-FH1-FH2 und Myc-mFmn2-FH1-FH2 aus NIH/3T3-Lysaten dienten als Positiv-Kontrollen.

Anschließend wurden eine Expression des endogenen Formin-2 in verschiedenen Geweben adulter Mäuse überprüft (Abb. 20 C). Im Immun-Blot gegen das aufgereinigte anti-Fmn2-FH2-Antiserum (IG 467) wurde Formin-2 im Cerebellum, nicht jedoch in der Lunge, im Colon oder in den Ovarien detektiert. EGFP-mFmn2-FH1-FH2 und Myc-mFmn2-FH1-FH2 aus NIH/3T3-Lysaten dienten als Positiv-Kontrollen. In NIH/3T3 Lysat wurde kein Formin-2 nachgewiesen. Die mit dem PeptideMass-Programm der ExPASy Proteomics Webseite ermittelte Molmasse für das unmodifizierte Fmn2 Protein liegt bei 166 kD (NP\_062318, 1567 AS). Das im Immun-Blot gegen das aufgereinigte anti-Fmn2-FH2-Antiserum (IG 467) detektierte Protein aus Cerebellum migriert auf der richtigen Höhe, oberhalb des 150 kD Standards, zwischen 150 kD und 250 kD.

#### 4.3.2.3 Untersuchung einer möglichen Interaktion von endogenem mSpir-1 und mFormin-2

In *in situ* Hybridisierungsstudien wurde eine schwache *spir-1* und *Fmn2* Expression in der Körnerzellschicht des adulten Cerebellum beobachtet<sup>5</sup>. Um endogenes Spir-1 und Formin-2

in Körnerzellen nachzuweisen, wurden Körnerzell-Lysate im Immun-Blot gegen den anti-Fmn2- und den anti-SA2133-Antikörper untersucht. Zur Untersuchung einer möglichen Interaktion von endogenem Spir-1 und Formin-2 wurden Ko-Immunpräzipitationen (KoIP) mit dem anti-Fmn2- und dem anti-SA2133-Antikörper durchgeführt (Abb. 21).



**Abb. 21: mSpir-1 Expression sowie anti-SA2133- und anti-Fmn2-KoIP in Körnerzellen**

Immun-Blots gegen den anti-SA2133- und anti-Fmn2-Antikörper. (A) IPs aus P7 Körnerzell-Lysat gegen den anti-SA2133-Antikörper. (B) Immun-Blot gegen anti-SA2133 aus P5-P9 Körnerzell-Lysat und KoIP durch anti-Fmn2. (C) Immun-Blot gegen anti-Fmn2 aus P5-P9 Körnerzell-Lysat sowie GST-Spir-1-KIND *pull down* und KoIP durch anti-SA2133.

Der anti-SA2133-Antikörper ist gegen ein Peptid im Spir-1-C-Terminus gerichtet und detektiert im Immun-Blot ein 95 kD Protein im Gehirn-Lysat adulter Mäuse<sup>5</sup>. Durch diesen Antikörper wurde ein Protein aus dem P7 Körnerzell-Lysat immunpräzipitiert, welches ebenfalls auf der Höhe von ca. 95 kD während der SDS-Gelelektrophorese migriert. Eine unspezifische Präzipitation, wie durch das Präimmuns serum und das unaufgereinigte Antiserum, war durch den aufgereinigten Antikörper nicht zu erkennen. Dagegen war die präzipitierte Proteinmenge durch den aufgereinigten Antikörper wesentlich niedriger als durch das unaufgereinigte Antiserum (Abb. 21 A). Im Immun-Blot gegen anti-SA2133 wurden im Körnerzell-Lysat der postnatalen Tage P5-P9 zwei Proteinbanden nachgewiesen, welche auf der Höhe von ca. 95 kD (Spir-1) und 50 kD migrieren. Beide Banden wurden bereits in Gesamt-Lysat aus Maus-Gehirn und nur die 50 kD Bande in Lysat aus der Niere beobachtet. In einer KoIP mit dem anti-Fmn2-Antikörper (von M. Dettenhofer, Boston) aus P7 Körnerzell-Lysat konnte kein Spir-1 kopräzipitiert werden (Abb. 21 B). Im Immun-Blot gegen anti-Fmn2

wurde im Körnerzell-Lysat der postnatalen Tage P5-P9 verschieden Proteinbanden detektiert (Abb.21 C). Eine klare Proteinbande ist auf der Höhe von ca. 85 kD zu sehen. Diese ist jedoch deutlich kleiner als erwartet. In einem GST-Spire-1-KIND *pull down* des P7 Körnerzell-Lysats konnte ein Protein von >150 kD in einer sehr schwachen Bande detektiert werden. Auch in einer KoIP gegen das unaufgereinigte anti-SA2133-Antiserum konnte ein schwaches Proteinsignal bei >150 kD, unterhalb der unspezifischen Proteinbande des Präimmunserums, durch den anti-Fmn2-Antikörper detektiert werden (Abb. 21 C). Dies weist darauf hin, daß der anti-Fmn2 Antikörper neben den unspezifischen Proteinbanden auch mFormin-2 detektiert. Diese KoIPs sollten daher mit dem neu hergestellten anti-Fmn2-FH2-Antikörper (IG 467) wiederholt werden.

#### 4.3.2.4 Immuncytochemische Spir-1 und Formin-2 Färbungen der Körnerzellen

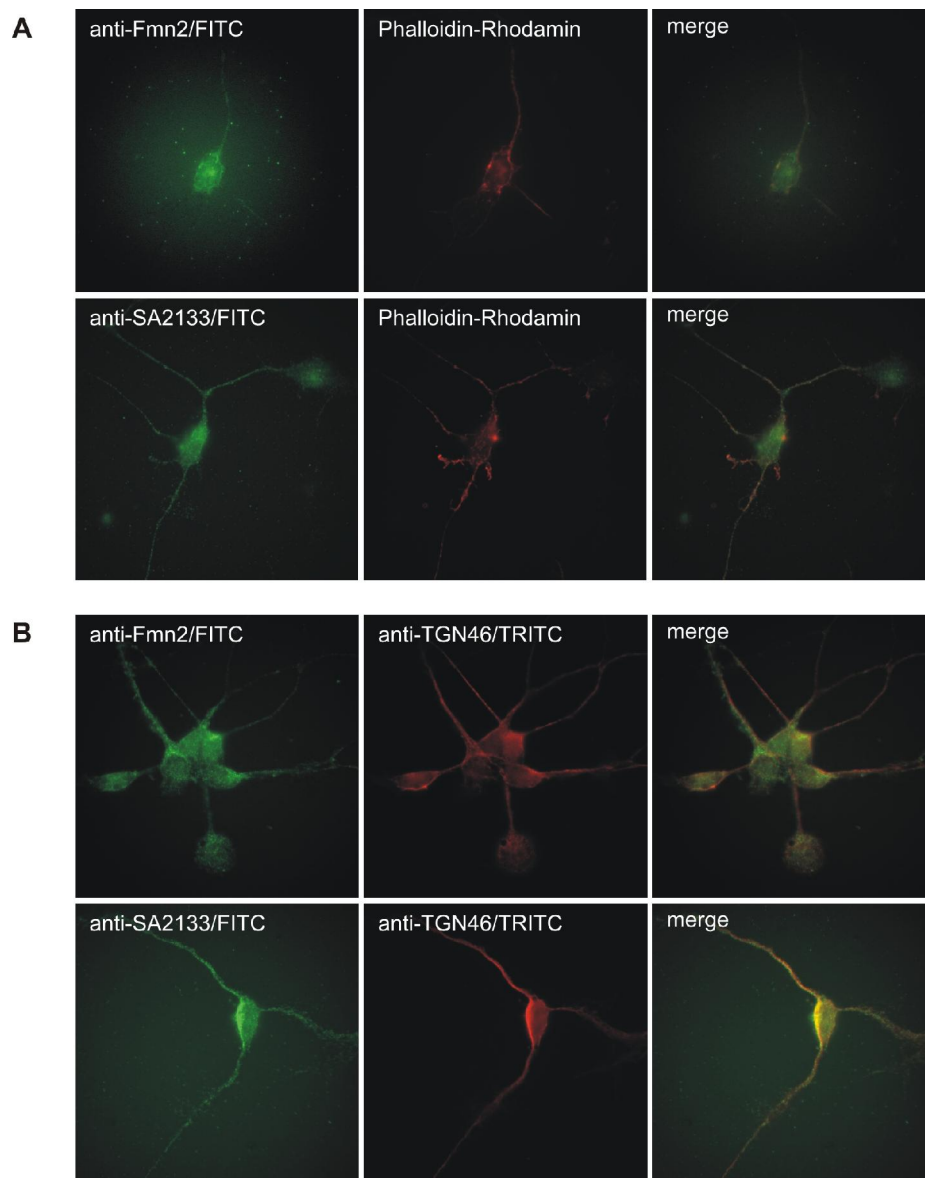
In *in situ* Hybridisierungsstudien wurde eine schwache *spir-1* und *Fmn2* Expression in der Körnerzellschicht des adulten Cerebellum beobachtet<sup>5</sup>. Um eine endogene Proteinexpression von Spir-1 und Fmn2 immuncytochemisch in murinen cerebellären Körnerzellen nachzuweisen, wurden diese mit Hilfe der anti-SA2133- und anti-Fmn2-Antikörper (von M. Dettenhofer, Boston) angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Vor den folgenden immuncytochemischen Untersuchungen wurden überprüft, ob ektopisches EGFP-Fmn2-FH1-FH2 in NIH/3T3 Zellen durch den anti-Fmn2-Antikörper/TRITC nachgewiesen werden kann. Da im immuncytochemischen Nachweis durch den anti-Fmn2-Antikörper/TRITC eine identisches subzelluläres Muster wie durch EGFP-Fmn2-FH1-FH2 beobachtet wurde, wurden weitere Kolokalisationsstudien mit Hilfe beider Antikörper durchgeführt.

Die Antikörper wurden jeweils in Kombination mit Phalloidin-Rhodamin, dem anti-Rab11a-Antikörper und dem anti-TGN46-Antikörper eingesetzt. Es konnte jedoch keine immuncytochemische Färbung durch den anti-Rab11a-Antikörper/TRITC beobachtet werden.

Zunächst wurden Ko-Färbungen mit dem anti-SA2133/FITC- bzw. anti-Fmn2/FITC-Antikörper zusammen mit Phalloidin-Rhodamin durchgeführt (Abb. 22 A). Der anti-Fmn2-Antikörper detektierte schwach cytoplasmatische Strukturen sowie Nervenzellfortsätze. Diese Färbungen sollten daher mit dem neu hergestellten anti-Fmn2-FH2-Antikörper (IG 467) wiederholt werden. Zudem war eine Fmn2 Färbung verstärkt an Orten der F-Aktin Färbung durch Phalloidin-Rhodamin, in der Nähe der Plasmamembran, zu beobachten.

Mit Hilfe des anti-SA2133-Antikörper wurden ebenfalls cytoplasmatische Strukturen, das Axon und die Dendriten angefärbt. Verstärkt war eine Färbung in der perinukleären Region bzw. am Axonhügel zu beobachten. An Orten starker F-Aktinfärbung der Dendriten-Wachstumspunkte war jedoch kaum Spir-1 nachzuweisen.





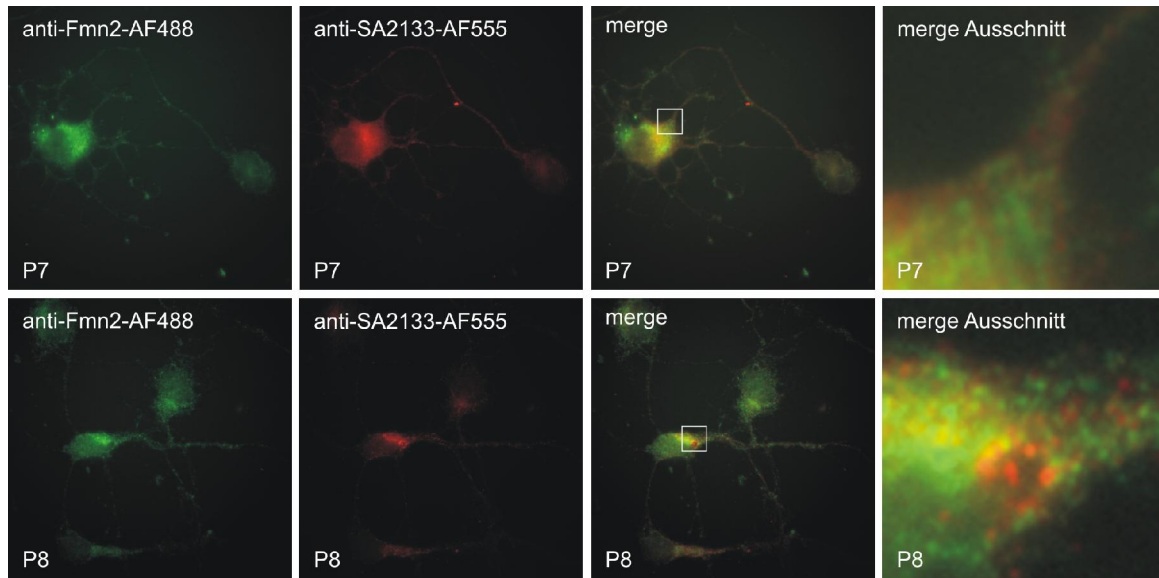
**Abb. 22: Immunocytochemische Färbung von murinen cerebellären Körnerzellen**

(A) Fmn2 (grün) ist teilweise mit F-Aktin-Clustern (rot) am Kortex der Zellen kolokalisiert und ist im gesamten Cytoplasma lokalisiert. Spir-1 (grün) ist stark im periplasmatischen Bereich und in Axon sowie Dendriten, jedoch kaum an Orten des aktuellen Dendritenwachstums (starke F-Aktin Färbung mit Phalloidin-Rhodamin) lokalisiert. (B) Fmn2 (grün) ist nur teilweise und Spir-1 (grün) fast vollständig mit dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) kolokalisiert.

Desweiteren wurden Ko-Färbungen mit dem anti-SA2133/FITC- bzw. anti-Fmn2/FITC-Antikörper zusammen mit dem anti-TGN46/TRITC-Antikörper durchgeführt, um eine subzelluläre Lokalisation in den sehr kleinen Somata näher zuordnen zu können (Abb. 22 B). Fmn2 kommt im gesamten cytoplasmatischen Raum vor und ist daher unter anderem auch mit dem TGN kolokalisiert. Allerdings ist die Färbung insgesamt sehr schwach und scheint einen starken Hintergrund zu haben. Die Spir-1 Färbung der P8 Körnerzellen war dagegen stärker und scheint vollständig mit dem TGN assoziiert zu sein.

Abschließend sollte eine Kolokalisationsstudie von Spir-1 und Fmn2 erfolgen. Hierzu sollten Doppel-Färbungen der beiden endogenen Proteine in cerebellären Körnerzellen durchgeführt werden. Da es sich bei den beiden entsprechenden Antikörper um Kaninchen-

Antikörper handelte, wurden die Fc-Fragmente der Erstantikörper wiederum mit Zenon-Alexa-Fluor-gekoppelten Fab-Fragmenten (Molecular Probes) gekoppelt. Die immunocytochemischen Färbungen erfolgten an P7 und P8 Körnerzellen aus primärer Zellkultur. In Körnerzellen des postnatalen Tages P7 waren die Zellen nur schwach gefärbt.



**Abb. 23: Immunocytochemische Ko-Färbung von Spir-1 und Fmn2 in murinen cerebellären Körnerzellen**

Die immunocytochemische Ko-Färbung gegen Fmn2 (grün) und Spir-1 (rot) zeigt nur eine schwache Färbung beider Proteine in einer P7 Körnerzelle (rechte Zelle), gegenüber einer stärkeren Färbung einer Gliazelle (linke Zelle). Die P8 Körnerzellen sind stärker ko-gefärbt. Beide Proteine kommen im cytoplasmatischen Raum vor, jedoch kann man an Orten niedrigerer Protein-Konzentration bei Vergrößerung keine Kolokalisation einzelner Punkte beobachten.

Auffallend war jedoch eine sehr viel stärkere Färbung in einem anderen Zelltyp, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um Gliazellen handelt. Dies sollte jedoch in weiteren Untersuchungen mit einem Marker für Gliazellen verifiziert werden. Gliazellen und Fibroblasten lassen sich sehr gut aus den primären Körnerzellkulturen, welche aus dem gesamten Cerebellum hergestellt werden, durch Zugabe eines Cytosinarabinsids (Ara-C) entfernen, da dieses selektiv auf sich teilende Zellen wirkt. Es inhibiert die DNA-Synthese, jedoch nicht die RNA-Synthese und wirkt damit zytotoxisch. Jedoch sollte die Konzentration nicht zu hoch gewählt sein, da dies ebenfalls Schädigungen an Körnerzellen hervorrufen könnte. Daher wird das Wachstum von Gliazellen zwar gehemmt, jedoch sind diese vereinzelt noch in Kultur vorzufinden. In den beiden Zelltypen (P7 und P8) ist jedoch eine gemeinsame Beobachtung zu machen: Die größte Konzentration von Spir-1 und Fmn2 befand sich im perinukleären Bereich, und die Proteine scheinen dort kolokalisiert zu sein. Ob es sich hierbei um eine spezifische Kolokalisation handelt, bleibt jedoch noch zu analysieren, da die Proteine in Bereichen niedrigerer Konzentration, in Richtung Axon der Körnerzelle, nur in verschiedenen Punkten vorkommen.

## 5 Diskussion

Das Aktincytoskelett ist eine wesentliche Komponente für Zell- und Entwicklungsprozesse in Eukaryonten. Es gliedert sich in einzelne cytoskelettale Kompartimente, welche kontinuierlich umstrukturiert werden und aufgrund ihrer verschiedenen Funktionen unterschiedlichen Regulationen unterliegen<sup>15-17</sup>.

Die spontane Nukleation von Aktin erfolgt sehr langsam, da diese energetisch ungünstig ist. Regulierbare Aktinnukleatoren sind daher für diesen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Polymerisation essentiell. Verschiedene Klassen von Aktinnukleatoren sind bekannt: der Arp2/3-Komplex, die Formine und die Spir-Proteine. Die zwei letztgenannten Klassen sind konserviert und nukleieren lineare Aktinfilamente. Formine verbleiben während der Polymerisation am Plus-Ende der Aktinfilamente, während Spir-Proteine an den Minus-Enden der Aktinfilamente verbleiben<sup>2,3</sup>. Die *Drosophila* Proteine Cappuccino und Spir gehören zu diesen zwei Proteinklassen und sind für die Etablierung der Polarität in der Oocyte und die Embryonalentwicklung wichtig<sup>4,6</sup>. *Drosophila* *spire-* (*p150-spire*) und *cappuccino*-Mutanten haben einen nahezu identischen Phänotyp<sup>4</sup>. Dies läßt eine mögliche funktionelle Kooperation dieser Proteine auf zellulärer Ebene vermuten. Ein überlappendes Expressionsmuster der Säugerhomologe *spir-1* und *formin-2* wurde zudem im sich entwickelnden und im adulten Zentralnervensystem (ZNS) von Mäusen beobachtet<sup>5</sup>. Desweiteren gehören Cappuccino und Formin-2 zu derselben Unterklasse der nicht-autoregulatorischen Formine<sup>146,147</sup>. Sollten Spir-1 und Formin-2 (Fmn2) sowie Cappuccino und p150-Spir interagieren, könnte dies ein Hinweis auf eine konservierte funktionelle Kooperation der beiden Proteinklassen sein. Bindungsstudien und Untersuchungen zu den endogenen Proteinexpressionmustern von Spir und Forminen in Maus und *Drosophila* sollten einen näheren Aufschluß zu dieser Frage geben.

### **5.1 Konservierte direkte Interaktion der Spir-KIND-Domäne mit der Formin-FH2-Domäne**

In der N-terminalen Hälfte enthalten Spir-Proteine eine konservierte „Kinase Non-catalytic C-lobe Domain“ (KIND), ein Strukturmotiv, das sich möglicherweise aus der Faltung der konservierten Serin-Threonin-Proteinkinasen entwickelte. Die KIND-Domäne ist strukturell verwandt mit der katalytischen, Substrat-bindenden, C-terminalen Domäne der „p21-activated kinase“ (PAK) und stellt somit ein potentiell Protein-Interaktionsmodul dar. Da die katalytisch wirksame Schleife fehlt, ist es wahrscheinlich, daß KIND keine katalytische Aktivität besitzt. Zur KIND-Proteinfamilie gehören Mitglieder von zwei weiteren Proteinklassen: Very-KIND (VKIND) ist ein „guanine nucleotide exchange factor“ der Ras-ähnlichen GTPases (Ras-GEFs) und die Protein-Tyrosine-Phosphatasen „PTP-Basophil“ (PTP-Bas) und „PTP-Basophil-like“ (PTP-BL) gehören zu der Unterfamilie der nicht-Rezeptor Protein-Tyrosine-Phosphatasen<sup>9,215,229</sup>. Bisher wurde noch keine Proteininteraktion mit KIND

nachgewiesen. Die *Drosophila* Spir-KIND-Domäne umfaßt 237 AS (AS 90-327) und humanes Spir-1 191 AS (AS 73-264). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Bindungsstudien und *in vivo* Translokationsstudien zeigten, daß Spir-KIND direkt mit der Aktin-nukleierenden FH2-Domäne von nicht-autoregulatorischen Forminen interagiert und es sich hierbei wahrscheinlich um eine von *Drosophila* bis zur Maus konservierte Protein-Bindung handelt.

### 5.1.1 Interaktion der *Drosophila* p150-Spir-KIND-Domäne mit dem C-Terminus von Cappuccino

Cappuccino und Spir sind für die cytoskelettale Reorganisation in der Oocyte und in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* wichtig<sup>4,184</sup>. Beide Proteine gehören zu unterschiedlichen Klassen an Aktinnukleatoren<sup>3,14,146,147</sup>. Otto *et al.* und Kerkhoff *et al.* beschrieben 2000 und 2001 erstmalig die zelluläre Lokalisation von p150-Spir bei ektopischer Expression in murinen NIH/3T3 Zellen. P150-Spir weist eine perinukleäre Akkumulation und punktförmige Verteilung im Cytoplasma auf. Diese subzelluläre Lokalisation am *trans*-Golgi-Netzwerk, den post-Golgi Vesikeln und dem Recycling Endosom wird über die C-terminale mFYVE-Domäne und die Spir-Box vermittelt<sup>7,8</sup>. Die zelluläre Lokalisation von Cappuccino wurde bisher noch nicht analysiert. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation von Cappuccino, sowie dessen mögliche funktionelle Korrelation mit p150-Spir *in vivo* untersucht.

Hierzu wurden Cappuccino und Spir in voller Länge und als verkürzte Mutanten in murinen NIH/3T3 Fibroblasten transient exprimiert. EGFP-Fusionsproteine von p150-Spir und N-terminal verkürztem p150-Spir, welches die mFYVE-Domäne und Spir-Box enthielt, wiesen die typische punktförmige Verteilung am *trans*-Golgi-Netzwerk, den post-Golgi Vesikeln und dem Recycling Endosom auf. Myc-markiertes Capu, sowie N-terminal und C-terminal verkürztes Cappuccino, Capu-FH1-FH2 und Capu-NT, waren bei ektopischer Expression diffus im Cytoplasma verteilt. Zur Untersuchung einer möglichen Kolokalisation wurden p150-Spir und Cappuccino in NIH/3T3 Zellen koexprimiert. In diesen Untersuchungen konnte eine nahezu vollständige Translokation von Myc-Capu an die subzellulären EGFP-p150-Spir Punkte gezeigt werden. Die für diese Translokation verantwortlichen Protein-Regionen wurden durch Analysen mit verkürzten Spir- und Cappuccino Proteinen näher bestimmt. C-terminales Myc-Capu-FH1-FH2, welches die FH1- und FH2-Domänen umfasst, war ausreichend für die Translokation an EGFP-p150-Spir. Dagegen wies C-terminal um die FH1- und FH2-Domänen verkürztes Myc-Capu-NT keine Translokation an die subzellulären EGFP-p150-Spir Punkte mehr auf und war diffus im Cytoplasma verteilt. Nicht ausreichend für eine Translokation von Myc-Capu war N-terminal verkürztes EGFP-p150-Spir-CT, welches nur die Spir-Box und die modifizierte FYVE-Zinkfingerstruktur umfasst.

Für die beschriebene Translokation war der C-Terminus von Cappuccino, nicht jedoch der C-Terminus von p150-Spir ausreichend. Dies legt eine mögliche Interaktion beider Proteine über den C-Terminus von Cappuccino und den N-Terminus von p150-Spir, welcher die

KIND-Domäne und das WH2-Cluster umfasst, nahe. Daher konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen zu einer möglichen Interaktion auf diese Protein-Regionen. Um zu überprüfen ob es sich um eine potentielle direkte Interaktion oder um eine Interaktion in einem Multi-Protein-Komplex handelt, wurden *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt.

Mit einem 6x-His *pull down* aus Lysaten von ektopisch Myc-Capu-FH1-FH2 exprimierenden NIH/3T3 Zellen konnte gezeigt werden, daß *Drosophila* Spir-KIND (AS 1-368) ausreichend ist, um die FH1-FH2 Region von Cappuccino zu binden. Ein verkürztes *Drosophila* Spir-Protein, welches eine N-terminal verlängerte Region des WH2-Cluster (AS 308-490) umfasste, war hingegen nicht ausreichend für eine Bindung von Capu-FH1-FH2. Bei der KIND/FH1-FH2 Interaktion handelte es sich wahrscheinlich um eine direkte Bindung, da ein GST-Capu-FH1-FH2 *pull down* mit bakteriell exprimiertem His-p150-Spir-NT (AS 1-618) ebenfalls positiv war.

Dieser Befund widerspricht auf den ersten Blick einer Untersuchung von Rosales-Nieves *et al.* (2006). Jedoch wurden beide Untersuchungen methodisch unterschiedlich durchgeführt, was zu dieser Diskrepanz geführt haben könnte. Diese Gruppe wies in einem GST *pull down* eine direkte Bindung des WH2-Clusters von SpirD (AS 366-491) an eine *in vitro* translatierte (IVT) FH2-Domäne von Cappuccino (AS 584-1058) nach. Jedoch war ebenfalls eine klare Bindung an eine Region vor (AS 199-365) und nach dem WH2-Cluster (AS 492-586) zu erkennen. Zudem gab es ein sehr schwaches Bindungssignal an den N-Terminus von SpirD (AS 1-198). Die *Drosophila* Spir-KIND-Domäne umfaßt 237 AS (AS 90-327)<sup>9</sup>. Jedoch wurden die GST-Bindungsstudien von Rosales-Nieves *et al.* mit zwei Hälften der KIND-Domäne, den Polypeptiden AS 1-198 und AS 199-365, durchgeführt. Durch die Teilung der Domäne ist deren inkorrekte Faltung oder Denaturierung möglich, welche zu der gezeigten verminderten Bindung von Capu-FH2 geführt haben könnte. Diese Bindungsstudie wurde mit IVT Capu-FH2 aus Kaninchen Retikulozyten-Lysat eines Promega-Kits durchgeführt<sup>142</sup>. In diesen Lysaten sind bekanntermaßen alle Zellproteine weiterhin vorhanden. Da Aktin ein ubiquitäres Protein ist, ist es wahrscheinlich Bestandteil dieses Lysates. Da es sich bei der FH2-Domäne von Cappuccino sowie dem WH2-Cluster von Spir um F-Aktin-nukleierende Domänen handelt, welche nach der Nukleation am Plus-Ende bzw. dem Minus-Ende des Aktinfilaments verbleiben, ist eine zusätzliche indirekte Interaktion dieser beiden Domänen über Aktin möglich. Dies könnte durch einen Immun-Blot des Retikulozyten-Lysats gegen einen anti-Aktin Antikörper einfach überprüft werden. Desweiteren wurde der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte GST-Bindungsassay mit Lysat aus transient Myc-Capu-FH1-FH2 überexprimierenden NIH/3T3 Zellen durchgeführt, in welchem aktiviertes Rho-GTP vorhanden sein könnte. Dieses bindet, laut Rosales-Nieves *et al.* an die Spir-WH2-Region und verhindert so deren direkte Bindung an die FH2-Domäne. Daher ist es möglich, daß so eine Bindung der N-terminal verlängerten Polypeptidsequenz des WH2-Clusters (AS 308-490) an Myc-Capu-FH1-FH2 verhindert wurde. Verbindet man beide Untersuchungen, bleibt festzustellen, daß durch die Spir-KIND-Region der AS 1-368 (diese Arbeit) sowie der AS 199-365<sup>142</sup> eine positive Interaktion mit Capu-FH1-FH2 bzw. Capu-FH2 zu beobachten

war. Eine zusätzliche Bindung von FH2 an die WH2-Region ist jedoch aufgrund obiger Erläuterung nicht auszuschließen. Zudem wurde eine funktionelle Relevanz für die beobachtete Bindung FH2-WH2, nämlich eine Blockierung der F-Aktin-bündelnden und F-Aktin-Mikrotubuli quervernetzenden Aktivität von Capu-FH2 durch die WH2-Region, beschrieben<sup>142</sup>.

Eine Inhibition der Aktin-nukleierenden Aktivität von CapuFH2 durch SpirD konnte in einem Pyrene-Aktin-Polymerisations-Assay durch Rosales-Nieves *et al.* (2006) nicht festgestellt werden. Unveröffentlichte Ergebnisse von *in vitro* Aktin-Polymerisationsstudien, die mit unseren Kooperationspartnern D. Mullins und M.Quinlan aus San Francisco durchgeführt wurden, zeigen dagegen, daß p150-Spir-KIND *in vitro* die Aktin-Nukleation von Capu-FH1-FH2 inhibiert.

Insgesamt deuten die Ergebnisse aus beiden Untersuchungen darauf hin, daß der N-Terminus von *Drosophila* Spir, welcher die KIND-Domäne und das WH2-Cluster umfaßt, insgesamt an die FH2-Domäne von Cappuccino bindet und jede der beiden Spir-Domänen eine unterschiedliche Funktion der FH2-Domäne inhibiert. Die KIND-Domäne ist jedoch für eine Bindung ausreichend.

### 5.1.2 Interaktion der Säuger-Proteindomänen Spir-1-KIND und Fmn2-FH2

Die *in vivo* und *in vitro* Studien von *Drosophila* p150-Spir und Cappuccino legen eine direkte Interaktion beider Proteine nahe, welche über die C-terminale FH1-FH2-Region von Cappuccino und die KIND von p150-Spir vermittelt wird. Die Säugerhomologe *spir-1* und *formin-2* zeigen eine überlappende Expression im sich entwickelnden und im adulten Zentralnervensystems von Mäusen<sup>5</sup>. In dieser Arbeit wurde daher untersucht und nachgewiesen, daß es sich bei der Interaktion von Spir und nicht-autoregulatorischen Forminen um ein konserviertes funktionelles Merkmal handelt.

Da die N-terminale AS-Sequenz von m-Spir-1 nicht bekannt ist, die C-terminale Sequenz (NP\_919336.1, 643 AS) jedoch zu 80% identisch zu der hu-Spir-1 Sequenz (XP\_290818.1, 756 AS) ist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>), wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls von einer hochkonservierten N-terminalen Sequenz von m-Spir-1 ausgegangen. Daher wurden die *in vitro* Bindungsstudien und *in vivo* Translokationsstudien mit der hu-Spir-1-KIND-Domäne und dem murinen Fmn2 Protein durchgeführt. Die subzelluläre Lokalisation sowie Kolokalisation der Säugerproteine Spir-1 und Formin-2 wurde *in vivo* in murinen Fibroblasten der NIH/3T3 Zelllinie mittels transienter Überexpression analysiert. In NIH/3T3 Zellen wies das Myc-hu-Spir-1 Fusionsprotein die auch für *Drosophila* p150-Spir typische perinukleäre Akkumulation und punktförmige Verteilung im Cytoplasma auf. Dies läßt vermuten, daß hu-Spir-1, so wie p150-Spir und mSpir-1-CT, am *trans*-Golgi-Netzwerk, den post-Golgi Vesikeln und dem Recycling Endosom lokalisiert ist<sup>8</sup>. EGFP-Fmn2-FH2 und EGFP-Dia1-FH2 waren dagegen diffus im Cytoplasma verteilt. Da die Formine N-terminal verkürzt waren, ist es möglich, daß diese Vollängeformen eine unterschiedliche Lokalisation aufweisen. Die Koexpression von Myc-hu-Spir-1 und EGFP-Fmn2-FH2 zeigte

ein nahezu identisches Lokalisationsmuster beider Proteine im perinukleären Raum. EGFP-Fmn2-FH2 ist somit verstärkt in dieser Region und weniger diffus im Cytoplasma lokalisiert. Dies deutet auf eine Rekrutierung der FH2-Domäne an Myc-hu-Spir-1, welches am TGN lokalisiert sein könnte, hin.

Translokationsstudien wurden mit den C-terminal verkürzten KIND-Proteinen Spir-1 und VKIND durchgeführt, welche mit einem als C-terminaler Membrananker dienendem CAAX-Motiv fusioniert wurden. Eine Translokation von EGFP-Fmn2-FH2, nicht jedoch von EGFP-Dia1-FH2, konnte an Membran-gebundenes Spir-1-KIND in NIH/3T3 Zellen beobachtet werden. Weder EGFP-Fmn2-FH2 noch EGFP-Dia1-FH2 translozierten an Membran-gebundenes VKIND-K1. Die Spezifität dieser Bindung wurde durch GST-KIND *pull down* Studien mit Lysaten aus transient EGFP-Fmn2-FH1-FH2 bzw. EGFP-Dia1-FH1-FH2 und EGFP-Fmn2-FH2 bzw. EGFP-Dia1-FH2 überexprimierenden NIH/3T3 Zellen bestätigt. Daß es sich hierbei um eine direkte Interaktion von Spir-1-KIND mit Fmn2-FH2 handelte, konnte in einem GST-Spir-1-KIND *pull down* mit bakteriell exprimiertem 6x-His-Fmn2-FH1-FH2 und einer Ko-Gelfiltration von 6x-His-Spir-1-KIND mit 6x-His-Fmn2-FH2 nachgewiesen werden. Die Gelfiltrations-Analysen weisen zudem auf eine Dimerisierung der Fmn2-FH2-Domäne hin. Dies würde auf eine Analogie zur FH2-Struktur anderer Formine, wie Bni1 aus Bäckerhefe und mDia1 aus Säugern, hindeuten. Diese dimerisieren und weisen eine Donut-ähnliche Gestalt eines flexiblen zirkulären Dimers mit einer großen zentralen Öffnung auf<sup>10,11</sup>. Die interagierenden Proteine wurden bei der Gelfiltration zudem in nahezu äquimolarer Menge im Immun-Blot gegen den anti-Penta-His Antikörper detektiert. Daher kann man von einem molaren Bindungsverhältnis von 1:1 der Spir-1-KIND- und Fmn2-FH2-Domänen ausgehen.

Unveröffentlichte Ergebnisse von Aktin-Polymerisationsstudien, die zusammen mit unseren Kooperationspartnern D. Mullins und M.Quinlan aus San Francisco durchgeführt wurden, zeigen, daß Spir-1-KIND *in vitro* die Aktin-Nukleation von Fmn2-FH2 hemmt. Dies weist auf eine evolutionär konservierte Interaktion hin, da eine ähnliche Interaktion von *Drosophila* p150-Spir-KIND und Capu-FH2 bzw. Säuger Spir-1-KIND und Fmn2-FH2 nachgewiesen wurde.

## **5.2 Regulation der Spir-KIND/Formin-FH2 Interaktion**

Bislang wurde noch kein Regulationsmechanismus für die Aktin-Nukleation der nicht auto-regulatorischen Cappuccino-Unterfamilie der Formin-Superfamilie beschrieben. Gut erforscht ist dagegen bereits die Regulation der Gruppe der auto-inhibitorischen „Diaphanous-related formins“ (Drfs). Drfs gehören zu den Effektoren der Rho-GTPasen<sup>164,166,167</sup>. Die C-terminale „Diaphanous-autoregulatory domain“ DAD bindet im autoinhibierten Grundzustand des Drfs an die N-terminale „Diaphanous-inhibitory domain“ DID. Diese inhibitorische Konformation wird durch eine „dimerization domain“ DD verstärkt<sup>157,169</sup>. Die inhibitorische intramolekulare Interaktion zwischen DID und DAD kann bei mDia1 durch die Bindung einer aktivierten Rho-

GTPase, RhoC oder RhoA, an die „GTPase binding domain“ GBD/DID-Region größtenteils wieder gelöst werden<sup>157,168-170</sup>.

Obwohl *Drosophila* Cappuccino ebenfalls mit der aktiven Form der kleinen Rho-GTPase Rho1, einem humanem RhoA-Homolog, interagiert, ist der regulatorische Effekt dieser Bindung noch unklar. Rho1 interagiert genetisch mit Capu. So zeigen Eikammern von *trans*-heterozygoten Rho1 und Capu (*Rho1 capu/+ +*) *Drosophila* Weibchen eine Störung des Aktincytoskeletts der Ring-Kanäle<sup>230</sup>. Rho1-GTP bindet außerdem an zwei Regionen des *Drosophila* Spir-Proteins, erstens an das N-terminale WH2-Cluster (AS 366-491) und zweitens an die letzten 435 AS des C-Terminus. Eine Inhibition der F-Aktin-bündelnden und F-Aktin-Mikrotubuli quervernetzenden Aktivität von Cappuccino durch SpirD konnte durch die Bindung von Rho1-GTP an das WH2-Cluster *in vitro* aufgehoben werden<sup>142</sup>. Im Gegensatz zu den beschriebenen Spir-Rho1-Bindestellen, wurde in einer früheren Veröffentlichung eine Interaktionsdomäne für die Rho-GTPasen Rho1, Rac1 und Cdc42 innerhalb der ersten 100 AS des Spir-Proteins nachgewiesen<sup>13</sup>. Zudem ist p150-Spir ein Phosphorylierungs-Ziel der „Jun N-terminal kinase“ (JNK). Bei Koexpression in NIH/3T3 Zellen kolokalisiert beide Proteine<sup>7</sup>. Eine mögliche Inhibition der Aktin-nukleierenden Funktion der Capu-FH2-Domäne durch die N-terminale *Drosophila* Spir-KIND-Domäne könnte daher über Phosphorylierungen von Spir durch JNK oder direkt durch einige upstream Aktivatoren von JNK, den Rho-GTPasen, reguliert werden<sup>209-214</sup>. Da die Interaktion der Spir-KIND- mit der FH2-Domäne der CAPPUCINO-Proteinfamilie konserviert ist, ist ein ähnlicher Regulationsmechanismus in *Drosophila* und Maus durchaus denkbar.

### **5.3 Überlappende Proteinexpressionsmuster von endogenem Spir und Forminen**

Die Frage wie es zu einer Aufhebung der Interaktion zwischen Spir-KIND und Formin-FH2 *in vivo* kommt, führt demnach zu folgenden weiteren Fragen: Was geschieht physisch mit einem reaktivierten Formin? Und wo sind die beiden Proteine in der Zelle lokalisiert, wenn diese interagieren und wo im Falle einer Aufhebung der Interaktion? Verschiedene *in situ* Hybridisierungsstudien geben einen ersten Hinweis auf die RNA-Expression von *spir-1* und *formin-2* in den gleichen Geweben und Entwicklungsstadien von Maus sowie *Drosophila*<sup>5,13,14,141</sup>. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit auch eine Koexpression auf Proteinebene mit Hilfe polyklonaler Antikörper in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden.

#### **5.3.1 Expression von endogenem *Drosophila* Spir und Cappuccino**

In *in situ* Hybridisierungsstudien wurde eine RNA-Expression von *capu* und *spire* in Oocyten und Embryonen nachgewiesen<sup>12-14</sup>. Der embryonale *Gene Expression Report* des Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP), zeigt eine *spire* (Gen CG10076) und *capu* (Gen CG3399) Expression in den präblastodermalen Stadien 1-3, von *spire* zusätzlich in den Polzellen. Zwischen dem zellulären Blastoderm-Stadium 4 und Stadium 10 ist keine



Expression der beiden Gene zu beobachten. Ab Stadium 11-16 ist eine erneute Expression von *spire* im Bereich der posterioren Mitteldarmanlagen, Enddarmanlagen und Rectum, Keimzellen sowie im Bereich der Vorderdarmanlagen, clypeo-labraler Anlagen und ventralen Epidermisanlagen festzustellen. *Capu* wurde ebenso wieder ab Stadium 11-16 im Bereich der Vorderdarmanlagen, Enddarmanlagen und dorsalen Epidermisanlagen exprimiert. Allerdings sind diese *capu* Färbungen sehr schwach und eine Expression war nicht in allen Embryonen derselben Stadien zu erkennen<sup>12</sup>.

Aufgrund des *Gene Expression Reports* wurden *Drosophila* Embryonen auf eine Expression von Spir und Cappuccino untersucht. Für Untersuchungen an transgenen Myc-p150-Spir Embryonen wurde das Gal4/UAS-System genutzt. Die maternale Treiberlinie 67.15-Gal4 enthält Gal4-Inserts unter der Kontrolle eines maternal  $\alpha$ -Tubulin Promotors und führt nach Kreuzung mit einer Effektorlinie bereits in frühen *Drosophila* Embryonalstadien zu einer Expression des Transgens. Die Treiberlinie exprimiert wie der Wildtyp kein transgenes p150-Spir oder Cappuccino und wurde daher zusätzlich zur Untersuchung der endogenen p150-Spir und Cappuccino Expression in Embryonen genutzt. Embryonenlysate der Treiberlinie und der F1-Nachkommen der Kreuzung mit der Effektorlinie P[UAST:Myc-p150-Spir] wurden im Immunblot gegen den anti-p150-KW-596-Antikörper und den anti-Capu-FH2-732-Antikörper analysiert. Spir aus beiden Embryonenlysaten migrierte auf der Höhe von <150 kD. Die detektierte Proteinmenge war jedoch gering. Die „Spir long form“ umfasst 990 AS und p150-Spir 1020 AS<sup>7,13</sup>. Da beide Protein-Isoformen annähernd die gleiche Proteinlänge aufweisen, könnte die mit dem anti-p150-KW-596-Antikörper detektierte Proteinbande von ca. 150 kD einer oder beiden Isoformen entsprechen. *Drosophila* Cappuccino der Treiberlinie 67.15-Gal4 und der Kreuzung von 67.15-Gal4 mit der transgenen Myc-p150-Spir Linie läuft auf der Höhe von >150 kD und ca. 125 kD. Im Flybase Gene Report wurden vier Cappuccino Polypeptid-Isoformen vorhergesagt, mit folgenden Proteinlängen: Capu-PA (1059 AS, 114 kD), Capu-PB (1049 AS, 114 kD), Capu-PC (1154 AS, 125 kD) und Capu-PD (1207 AS, 131 kD). Die Molmassen der unmodifizierten Proteine wurden mit dem Peptide-Mass-Programm der ExPASy Proteomics Webseite ermittelt (<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>). Die detektierten Proteinbanden auf der Höhe von 125 kD und >150 kD des embryonalen Lysats entsprechen der Größe dieser Capu-Isoformen. Da auch hier die Isoformen ähnliche Proteinlängen aufweisen, könnten die mit dem anti-Capu-FH2-732-Antikörper detektierten Proteinbanden jeder dieser Isoformen entsprechen.

In einer KoIP mit dem anti-p150-KW-596-Antikörper aus *Drosophila* W1118 Embryonenlysat wurde eine geringe Menge eines Proteins von ca. 150 kD ko-immunpräzipitiert. Dieses migrierte während der SDS-Gelelektrophorese auf gleicher Höhe wie ein Protein der Lysat-Einsatzkontrolle und war im Immun-Blot gegen anti-Capu-FH2-732 schwach, aber deutlich erkennbar. Die Spir-Expression in Embryonen ist wahrscheinlich gering (s. o.). Daher könnte die geringe Menge an ko-präzipitiertem Cappuccino an einer geringen Spir-Menge im Lysat liegen.

Da in *in situ* Hybridisierungsstudien in der Maus ein überlappendes Expressionsmuster von *spir-1* und *formin-2* im sich entwickelnden ZNS nachgewiesen wurde<sup>5</sup>, wurde auch das Larvengehirn von *Drosophila* auf eine Expression von Spir untersucht. In den immunhistochemischen Larvengehirn-Untersuchungen konnte transgenes Myc-p150-Spir mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems in bestimmten Nervenzell-Typen des L3-Larvengehirns exprimiert werden. Ektopisch exprimiertes Spir war so u.a. in den Pilzkörper-Somata und -Axonen zu beobachten. Jedoch war außerhalb dieser ektopischen Expression kein endogenes Spir detektierbar. Dies deutet darauf hin, daß eine mögliche endogene Expression zu schwach für eine immunhistochemische Detektion ist oder keine endogene Spir-Expression stattfindet. Jedoch war es durch diese Analyse möglich, die Spezifität des anti-p150-Spir-KW Antikörpers *in vivo* zu bestätigen. Die immunhistochemischen Doppel-Färbungen gegen anti-Myc 9E10 und gegen das anti-p150-Spir-KW Antiserum zeigten ein identisches Bild.

### 5.3.2 Expression von Maus Spir-1 und Formin-2 in cerebellären Körnerzellen

Die *in situ* Hybridisierungsstudien weisen die murinen *formin-2* und *spir-1* Gene während der Embryogenese ein fast identisches Expressionsmuster im Telencephalon, Mesencephalon, Trigeminale-Ganglion und Neuralrohr des sich entwickelnden ZNS sowie im adulten Gehirn auf. Im adulten Gehirn wurden starke, sich überlappende Expressionsmuster in den Purkinjezellen des Cerebellums, der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und den CA1-, CA2- und CA3-Regionen des Hippocampus nachgewiesen<sup>5</sup>. Das Maus *formin-2* Gen hat damit ein völlig anderes Expressionsmuster als das *formin-1* Gen, welches in der Niere exprimiert wird<sup>187,190</sup>. *Formin-2* ist zudem, wie *cappuccino*, ein Maternaleffekt-Gen, welches während der Oogenese exprimiert wird und in Oocyten für den Ablauf der Metaphase von Meiose I benötigt wird. Northern-Blot Analysen aus Maus-Geweben zeigen, neben einer Expression im Gehirn, eine zusätzliche *spir-1* Expression in der Milz sowie eine *spir-2* Expression im Gehirn, im Darm und in den Hoden<sup>216</sup>.

Die physiologische Relevanz der *in vitro* Interaktionen von Spir-1 und Fmn2 wurde in dieser Arbeit durch den Nachweis der Koexpression beider Proteine in cerebellären Körnerzellen unterstrichen. Hierfür wurden primäre Körnerzellen des Cerebellums postnataler Mäuse isoliert und biochemisch sowie immunocytochemisch untersucht. Die Körnerzellschicht ist die innerste von drei Schichten des cerebellären Soma-haltigen Kortex. Körnerzellen sind Hauptbestandteil dieser Zellschicht und stellen neben den Gliazellen den einzigen Zelltyp dieser Schicht dar. *In situ* Hybridisierungsstudien zeigen eine schwache *spir-1* und *formin-2* Expression in der Körnerzellschicht<sup>5</sup>. Der Vorteil der Körnerzellen liegt in deren einfachen Isolierung und Kultivierung, der Nachteil in der geringen Größe der Somata.

Die RNA-Expression von *spir-1* und *formin-2* in cerebellären Körnerzellen der postnatalen Tage (P) 7 und 9 konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Spire-1 und Formin-2 wurden zudem in cerebellären Körnerzellen bzw. im Cerebellum mittels polyklonaler Antisera detektiert. Die mit dem PeptideMass-Programm der ExPASy Proteomics Webseite ermit-

telte Molmasse für das unmodifizierte Fmn2 Protein liegt bei 166 kD (NP\_062318, 1567 AS). Im Immun-Blot gegen das aufgereinigte anti-Fmn2-FH2-Antiserum (IG 467) wurde endogenes Formin-2 mit einer Größe zwischen 150 kD und 250 kD im Cerebellum, nicht jedoch in der Lunge, im Colon, in den Ovarien oder NIH/3T3 Fibroblasten detektiert. Dies entspricht der vorhergesagten Größe des Fmn2 Proteins. In cerebellären P7 Körnerzell-Lysaten präzipitierte der polyklonale anti-Fmn2-Antikörper (von M. Dettenhofer, Boston) ein 70 kD Protein. In Totallysaten der P5-P9 Körnerzellen wurden, neben dem immunpräzipitierten Protein, weitere Proteinbanden mit diesem anti-Fmn2-Antikörper detektiert. Die einzige weitere deutliche Proteinbande ist auf der Höhe von ca. 85 kD zu beobachten. Ob es sich bei diesen kleinen Proteinen um unspezifische Präzipitationen oder um sehr viel kürzere Isoformen von Fmn2 handelt, müßte in weiteren Analysen mit dem anti-Fmn2-FH2-Antiserum (IG 467) untersucht werden. In Totallysaten der P5-P9 Körnerzellen konnten zwei Proteine von ca. 95 kD und 50 kD mit dem anti-SA2133-Antikörper nachgewiesen werden. Der anti-SA2133-Antikörper ist gegen ein Peptid im Spir-1-C-Terminus gerichtet und detektiert im Immun-Blot ein 95 kD Protein im Gehirn-Lysat adulter Mäuse<sup>5</sup>. Das 95 kD Protein konnte immunpräzipitiert werden. Ob das 50 kD Protein ebenfalls immunpräzipitiert wurde, kann nicht festgestellt werden, da die schwere Kette der Immunglobuline auf der gleichen Höhe migriert. Die volle Protein-Sequenz von m-Spir-1 wurde noch nicht beschrieben, jedoch ist schon ein C-terminales Teilstück von 643 AS (NP\_919336.1), mit einer durch das PeptideMass-Programms der ExPASy Proteomics Webseite ermittelten Molmasse von 74 kD, bekannt. Daher könnte das Protein von 95 kD dem vollen m-Spir-1 entsprechen. Ein durch den anti-SA2133-Antikörper detektiertes 50 kD Protein aus Lysat der Niere wurde als nicht-spezifisch beschrieben, da in einer Northern-Blot-Analyse keine *spir-1* mRNA in der Niere nachgewiesen werden konnte<sup>5</sup>. Von dem *Drosophila* Spir Protein sind jedoch mehrere Isoformen bekannt, unter anderem ein im Vergleich mit der längsten Isoform, p150-Spir, das N-terminal um ca. 40 % verkürztes SpirC. Daher ist es möglich, daß auch das murine 50 kD Protein aus Körnerzellen spezifisch durch den anti-SA2133-Antikörper, welcher gegen ein Polypeptid der C-terminalen Region von Spir-1 gerichtet ist, detektiert wurde. In zukünftigen Experimenten sollten die Antikörper jedoch in Knock-Out Mäusen oder in Zellkulturen, welche mit entsprechender si-RNA behandelt wurden, weiter ausgetestet werden, damit eine mögliche Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen *in vivo* ausgeschlossen werden kann.

Im weiteren wurde in dieser Arbeit eine mögliche Interaktion von endogenem Spir-1 und Formin-2 in murinen cerebellären Körnerzellen untersucht. In einer KoIP mit dem anti-SA2133-Antikörper konnte kein mit dem anti-Fmn2-Antikörper detektierbares Protein aus P7 Zellen ko-präzipitiert werden. In einer analogen KoIP mit dem unaufgereinigten anti-SA2133-Antiserum konnte eine sehr schwache Protein-Bande bei >150 kD detektiert werden, ebenso bei einem GST-Spir-1-KIND *pull down*. Bei einer KoIP gegen den anti-Fmn2-Antikörper wurde wiederum kein Spir-1 ko-präzipitiert. Daß in den KoIPs und dem GST *pull down* die Proteine nicht eindeutig ko-präzipitiert werden konnten, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen ist es wahrscheinlich, daß der anti-Fmn2-Antikörper nicht besonders gut für Immun-

präzipitationen geeignet ist, da von ihm eine Vielzahl von Proteinen im Immun-Blot detektiert wurden, unter welchen höchstens eine Protein-Bande auf der richtigen Höhe zu erahnen ist. Zum anderen sind beide Proteine wahrscheinlich mit dem Aktincyoskelett und Spir desweiteren mit dem *trans*-Golgi-Netzwerk, den post-Golgi Vesikeln und dem Recycling Endosom assoziiert und daher nicht 100 %ig im Überstand löslich. In einem dritten Punkt ist zu bedenken, daß die Interaktion beider Proteine sich wahrscheinlich in einem Gleichgewichtszustand zwischen dem Proteinkomplex und den nicht-gebundenen Proteinen befindet und die Ausbeute an ko-präzipitiertem Protein daher unter Umständen sehr klein sein kann.

In immuncytochemischen Doppel-Färbungen mit dem anti-Fmn2/FITC-Antikörper und Phalloidin-Rhodamin detektierte der anti-Fmn2-Antikörper schwach cytoplasmatische Strukturen sowie Nervenzellfortsätze und war etwas stärker an Orten starker F-Aktin Färbung, in der Nähe der Plasmamembran, zu beobachten. Fmn2 kommt im gesamten cytoplasmatischen Raum vor und ist daher unter anderem auch mit dem TGN, welches zusätzlich mit dem anti-TGN46/TRITC-Antikörper gefärbt wurde, kolokalisiert. Mit Hilfe des anti-SA2133-Antikörper wurden ebenfalls cytoplasmatische Strukturen, das Axon und die Dendriten angefärbt. Verstärkt war eine Färbung in der perinukleären Region bzw. am Axonhügel zu beobachten. Spir-1 scheint vollständig mit dem TGN assoziiert zu sein. An Dendriten-Wachstumspunkten war jedoch kaum Spir-1 nachzuweisen. In immuncytochemischen Doppel-Färbungen gegen den anti-Fmn2-Antikörper und den anti-SA2133-Antikörper weisen sowohl Spir-1 sowie Fmn2 eine punktförmige cytoplasmatische Verteilung auf. Im perinukleären Raum sind beide Proteine stärker konzentriert als in den Axonen und Dendriten. Daher scheinen die beiden Proteine im perinukleären Raum eine Kolokalisation aufzuweisen. Allerdings ist keinerlei Kolokalisation in Regionen, welche weiter vom Kern entfernt sind, den Dendriten und Axonen mehr zu erkennen. Dort wurden beide Proteine in unterschiedlichen Punkten detektiert, was auf eine Transportfunktion der beiden Proteine hindeuten könnte. Alle immuncytochemischen Färbungen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert und es wurden daher keine einzelnen Ebenen in den Bildern aufgenommen. Insgesamt lassen die Körnerzell-Färbungen wie auch die KOLPs vermuten, daß Spir-1 und Fmn2 eine nur teilweise überlappende Lokalisation haben und nicht permanent interagieren. Das könnte darauf hindeuten, daß beide Aktinnukleatoren nicht an allen subzellulären Lokalisationen interagieren. Möglicherweise inhibiert Spir-1 die Aktin-Nukleation von Fmn2 nur im perinukleären Raum, z. B. am Golgi-Apparat. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Quinlan *et al.* (2005), daß p150-Spir-NT und Capu-FH1-FH2 *in vitro* eine gleich starke maximale Aktin-Nukleations-Aktivität aufweisen. Bei niedrigen Konzentrationen ist die Nukleationsaktivität von Spir-NT jedoch höher als von Capu-FH1-FH2 und nimmt bei steigenden Konzentrationen von Spir im Vergleich zu Cappuccino ab. Spir ist damit wahrscheinlich der einzige bekannte Aktinnukleator mit biphasischer Dosis-abhängiger Aktivität<sup>3</sup>. Sollte dieses biphasische Verhalten auch für die Spir-Homolge der Säugetiere gelten, könnte das eine geringere Aktin-Nukleationsaktivität von Spir im perinukleären Raum bedeuten, dem einzigen Ort an der

beide Proteine kolokalisiert sind. Sollte dort auch die Aktin-Nukleationsaktivität der Formine gehemmt sein, könnte das einen generellen Mechanismus darstellen, bei welchem die volle Aktin-Nukleationsaktivität beider Proteine nur bei einer möglichen (Vesikel-) Transportfunktion in den Dendriten und Axonen zum Tragen kommt.

#### **5.4 Mögliche funktionale Implikationen einer Interaktion der Spir- und Formin-Proteine**

Sollte die Spir-Nukleationsaktivität nicht simultan durch einen anderen Mechanismus gehemmt werden, ist es wahrscheinlich, daß Spir während der Interaktion weiterhin als Aktinnukleator aktiv ist und damit mit dem Minus-Ende eines Aktinfilaments assoziiert ist<sup>3</sup>. Ein prozessiver Aktin-Polymerisationsmechanismus wie der von Forminen, wurde für Spir (noch) nicht nachgewiesen, daher ist es wahrscheinlich, daß Spir selbst nicht aktiv an einer Elongation des F-Aktins beteiligt ist. Wird sofort nach einer Aktin-Nukleation durch Spir die Formin-FH2-Untereinheit freigesetzt, wäre es möglich, daß diese am Plus-Ende verbleibt. So könnte ein sofortiges Capping durch andere Capping-Proteine verhindert werden, und es könnte zu einer rapiden Elongation des F-Aktins am Plus-Ende kommen. Wahrscheinlich ist Spir über seinen C-Terminus an Vesikeln des *trans*-Golgi-Netzwerks lokalisiert<sup>8</sup>. Die Vesikel könnten so analog zu einigen intrazellulären pathogenen Bakterien im Cytoplasma der Wirtszelle fortbewegt werden. Diese rekrutieren den Arp2/3-Komplex an die Bakterienoberfläche, wodurch sich lokal ein Aktinschweif ausbildet, mit dessen Hilfe sich die Bakterien durch die Zelle bewegen<sup>64,65</sup>.

Wird die Formin-FH2-Untereinheit erst einige Zeit nach der Aktin-Nukleation durch Spir freigesetzt, könnte Spir so einen „Nukleationsvorsprung“ bei einer gleichen subzellulären Lokalisation wie die Formine haben. Dies würde darauf hindeuten, daß Spir an bestimmten subzellulären Lokalisationen kurze Aktinfilamente bereitstellen könnte, welche sofort „gecappt“ werden könnten. Jedoch ist auch möglich, daß durch die enge räumliche Nähe von Spir zu der FH1-Domäne es dort zu einer lokalen Erhöhung von Profilin-Aktin kommt. Die Anwesenheit von Profilin senkt die Nukleationsaktivität von p150-Spir<sup>3</sup>. In räumlicher Nähe zu der FH1-Domäne könnte es jedoch zu einer Rekrutierung von ATP-G-Aktin aus Profilin-Aktinkomplexen und einer anschließende Weitergabe des Aktins an das WH2-Cluster von Spir kommen, analog zum Mechanismus der Formine<sup>95,165</sup>. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß Spir den sofortigen Transport von neu translatierten Forminen zu deren Bestimmungsort vermitteln könnte, ohne daß diese bereits aktiviert wären. Die Fülle der funktionalen Möglichkeiten der Inhibition der Formin-FH2-Domäne durch die Spir-KIND-Domäne ist jedenfalls sehr groß. Es wäre daher nicht verwunderlich, wenn es einen Zusammenhang zwischen dem völlig unterschiedlichen Nukleationsmechanismus von Spir im Vergleich zu den anderen zwei Aktinnukleator-Familien und der beschriebenen inhibitorischen Funktion von Spir gäbe.

## 6 Literatur

1. Zigmund, S. H. Beginning and ending an actin filament: control at the barbed end. *Curr Top Dev Biol* **63**, 145-88 (2004).
2. Zigmund, S. H. et al. Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr Biol* **13**, 1820-3 (2003).
3. Quinlan, M. E., Heuser, J. E., Kerkhoff, E. & Mullins, R. D. Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* **433**, 382-8 (2005).
4. Manseau, L. J. & Schubach, T. cappuccino and spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the Drosophila embryo. *Genes Dev* **3**, 1437-52 (1989).
5. Schumacher, N., Borawski, J. M., Leberfinger, C. B., Gessler, M. & Kerkhoff, E. Overlapping expression pattern of the actin organizers Spir-1 and formin-2 in the developing mouse nervous system and the adult brain. *Gene Expr Patterns* **4**, 249-55 (2004).
6. Manseau, L., Calley, J. & Phan, H. Profilin is required for posterior patterning of the Drosophila oocyte. *Development* **122**, 2109-16 (1996).
7. Otto, I. M. et al. The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. *Curr Biol* **10**, 345-8 (2000).
8. Kerkhoff, E. et al. The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr Biol* **11**, 1963-8 (2001).
9. Ciccarelli, F. D., Bork, P. & Kerkhoff, E. The KIND module: a putative signalling domain evolved from the C lobe of the protein kinase fold. *Trends Biochem Sci* **28**, 349-52 (2003).
10. Xu, Y. et al. Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* **116**, 711-23 (2004).
11. Shimada, A. et al. The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Mol Cell* **13**, 511-22 (2004).
12. Tomancak, P. et al. Systematic determination of patterns of gene expression during Drosophila embryogenesis. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0088 (2002).
13. Wellington, A. et al. Spire contains actin binding domains and is related to ascidian posterior end mark-5. *Development* **126**, 5267-74 (1999).
14. Emmons, S. et al. Cappuccino, a Drosophila maternal effect gene required for polarity of the egg and embryo, is related to the vertebrate limb deformity locus. *Genes Dev* **9**, 2482-94 (1995).
15. Small, J. V. The actin cytoskeleton. *Electron Microsc Rev* **1**, 155-74 (1988).
16. Small, J. V. Lamellipodia architecture: actin filament turnover and the lateral flow of actin filaments during motility. *Semin Cell Biol* **5**, 157-63 (1994).
17. Small, J. V., Rottner, K. & Kaverina, I. Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 54-60 (1999).
18. Weber, A. Actin binding proteins that change extent and rate of actin monomer-polymer distribution by different mechanisms. *Mol Cell Biochem* **190**, 67-74 (1999).
19. Anderson, K. I., Wang, Y. L. & Small, J. V. Coordination of protrusion and translocation of the keratocyte involves rolling of the cell body. *J Cell Biol* **134**, 1209-18 (1996).
20. Huxley, H. E. Muscular contraction and cell motility. *Nature* **243**, 445-9 (1973).
21. Small, J. V., Geiger, B., Kaverina, I. & Bershadsky, A. How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 957-64 (2002).
22. Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B., McQuade, K. M. & Borisy, G. G. Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol* **139**, 397-415 (1997).
23. Small, J. V. & Resch, G. P. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 517-23 (2005).
24. Cramer, L. P., Siebert, M. & Mitchison, T. J. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J Cell Biol* **136**, 1287-305 (1997).
25. Otey, C. A. & Carpen, O. Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**, 104-11 (2004).
26. Tseng, Y. et al. How actin crosslinking and bundling proteins cooperate to generate an enhanced cell mechanical response. *Biochem Biophys Res Commun* **334**, 183-92 (2005).
27. Goeckeler, Z. M. & Wysolmerski, R. B. Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol* **130**, 613-27 (1995).

28. Peterson, L. J. et al. Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo. *Mol Biol Cell* **15**, 3497-508 (2004).
29. Hotulainen, P. & Lappalainen, P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol* **173**, 383-94 (2006).
30. Pollard, T. D., Blanchoin, L. & Mullins, R. D. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 545-76 (2000).
31. Jacinto, A. & Baum, B. Actin in development. *Mech Dev* **120**, 1337-49 (2003).
32. Watanabe, N. & Mitchison, T. J. Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* **295**, 1083-6 (2002).
33. Wang, Y. L. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol* **101**, 597-602 (1985).
34. Small, J. V., Isenberg, G. & Celis, J. E. Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature* **272**, 638-9 (1978).
35. Wehner, R. & Gehring, W. *Zoologie* (Thieme Verlag, 1995).
36. Svitkina, T. M. & Borisy, G. G. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* **145**, 1009-26 (1999).
37. Mullins, R. D., Heuser, J. A. & Pollard, T. D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6181-6 (1998).
38. Nicholson-Dykstra, S., Higgs, H. N. & Harris, E. S. Actin dynamics: growth from dendritic branches. *Curr Biol* **15**, R346-57 (2005).
39. Pantaloni, D., Le Clainche, C. & Carlier, M. F. Mechanism of actin-based motility. *Science* **292**, 1502-6 (2001).
40. Faix, J. & Rottner, K. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 18-25 (2006).
41. Svitkina, T. M. et al. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* **160**, 409-21 (2003).
42. Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M. & Faix, J. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol* **7**, 619-25 (2005).
43. Peng, J., Wallar, B. J., Flanders, A., Swiatek, P. J. & Alberts, A. S. Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol* **13**, 534-45 (2003).
44. Vignjevic, D., Peloquin, J. & Borisy, G. G. In vitro assembly of filopodia-like bundles. *Methods Enzymol* **406**, 727-39 (2006).
45. Bear, J. E. et al. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* **109**, 509-21 (2002).
46. Aguda, A. H., Burtnick, L. D. & Robinson, R. C. The state of the filament. *EMBO Rep* **6**, 220-6 (2005).
47. Schuler, H. ATPase activity and conformational changes in the regulation of actin. *Biochim Biophys Acta* **1549**, 137-47 (2001).
48. Chik, J. K., Lindberg, U. & Schutt, C. E. The structure of an open state of beta-actin at 2.65 Å resolution. *J Mol Biol* **263**, 607-23 (1996).
49. Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C. & Lindberg, U. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* **365**, 810-6 (1993).
50. Otterbein, L. R., Graceffa, P. & Dominguez, R. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* **293**, 708-11 (2001).
51. Selden, L. A., Kinosian, H. J., Estes, J. E. & Gershman, L. C. Impact of profilin on actin-bound nucleotide exchange and actin polymerization dynamics. *Biochemistry* **38**, 2769-78 (1999).
52. Mockrin, S. C. & Korn, E. D. Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* **19**, 5359-62 (1980).
53. Kabsch, W. & Vandekerckhove, J. Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**, 49-76 (1992).
54. Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. & Kabsch, W. Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-9 (1990).
55. Pollard, T. D. Assembly and dynamics of the actin filament system in nonmuscle cells. *J Cell Biochem* **31**, 87-95 (1986).
56. Ishikawa, H., Bischoff, R. & Holtzer, H. Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. *J Cell Biol* **43**, 312-28 (1969).
57. Wegner, A. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* **108**, 139-50 (1976).
58. Blanchoin, L. & Pollard, T. D. Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry* **41**, 597-602 (2002).

59. Carlier, M. F. et al. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* **136**, 1307-22 (1997).
60. Fabian, A. in *Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie* 129 (Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, 2005).
61. Kuhn, J. R. & Pollard, T. D. Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys J* **88**, 1387-402 (2005).
62. Stossel, T. P. On the crawling of animal cells. *Science* **260**, 1086-94 (1993).
63. Paavilainen, V. O., Bertling, E., Falck, S. & Lappalainen, P. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol* **14**, 386-94 (2004).
64. Welch, M. D., Iwamatsu, A. & Mitchison, T. J. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**, 265-9 (1997).
65. Welch, M. D., DePace, A. H., Verma, S., Iwamatsu, A. & Mitchison, T. J. The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol* **138**, 375-84 (1997).
66. Blanchoin, L. et al. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**, 1007-11 (2000).
67. Blanchoin, L., Pollard, T. D. & Mullins, R. D. Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol* **10**, 1273-82 (2000).
68. Amann, K. J. & Pollard, T. D. Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15009-13 (2001).
69. Nolen, B. J., Littlefield, R. S. & Pollard, T. D. Crystal structures of actin-related protein 2/3 complex with bound ATP or ADP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15627-32 (2004).
70. Robinson, R. C. et al. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* **294**, 1679-84 (2001).
71. Rodal, A. A. et al. Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 26-31 (2005).
72. Rohatgi, R. et al. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221-31 (1999).
73. Takenawa, T. & Miki, H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* **114**, 1801-9 (2001).
74. Kreishman-Deitrick, M. & Rosen, M. K. Ignition of a cellular machine. *Nat Cell Biol* **4**, E31-3 (2002).
75. Machesky, L. M. et al. Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3739-44 (1999).
76. Stradal, T. E. & Scita, G. Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 4-10 (2006).
77. Stradal, T. & Wehland, J. Aktindynamik und WASP/WAVE-Proteine. *BIOspektrum* **11**, 283-286 (2005).
78. Miki, H. & Takenawa, T. Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem (Tokyo)* **134**, 309-13 (2003).
79. Paunola, E., Mattila, P. K. & Lappalainen, P. WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett* **513**, 92-7 (2002).
80. Yamaguchi, H. et al. Two tandem verprolin homology domains are necessary for a strong activation of Arp2/3 complex-induced actin polymerization and induction of microspike formation by N-WASP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12631-6 (2000).
81. Westphal, R. S., Soderling, S. H., Alto, N. M., Langeberg, L. K. & Scott, J. D. Scar/WAVE-1, a Wiskott-Aldrich syndrome protein, assembles an actin-associated multi-kinase scaffold. *Embo J* **19**, 4589-600 (2000).
82. Higgs, H. N. & Pollard, T. D. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* **70**, 649-76 (2001).
83. Takenawa, T. From N-WASP to WAVE: key molecules for regulation of cortical actin organization. *Novartis Found Symp* **269**, 3-10; discussion 10-5, 30-4 passim (2005).
84. Rodal, A. A., Manning, A. L., Goode, B. L. & Drubin, D. G. Negative regulation of yeast WASP by two SH3 domain-containing proteins. *Curr Biol* **13**, 1000-8 (2003).
85. Suetsugu, S., Miki, H. & Takenawa, T. The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *Embo J* **17**, 6516-26 (1998).
86. Yang, C. et al. Profilin enhances Cdc42-induced nucleation of actin polymerization. *J Cell Biol* **150**, 1001-12 (2000).
87. Miki, H., Suetsugu, S. & Takenawa, T. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J* **17**, 6932-41 (1998).



88. Pring, M., Weber, A. & Bubb, M. R. Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* **31**, 1827-36 (1992).
89. Pantaloni, D. & Carlier, M. F. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* **75**, 1007-14 (1993).
90. Tilney, L. G., Bonder, E. M., Coluccio, L. M. & Mooseker, M. S. Actin from Thyone sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin. *J Cell Biol* **97**, 112-24 (1983).
91. Yarmola, E. G. & Bubb, M. R. Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions. *Trends Biochem Sci* **31**, 197-205 (2006).
92. Goldschmidt-Clermont, P. J., Machesky, L. M., Baldassare, J. J. & Pollard, T. D. The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science* **247**, 1575-8 (1990).
93. Skare, P. & Karlsson, R. Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Lett* **522**, 119-24 (2002).
94. Evangelista, M., Zigmond, S. & Boone, C. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci* **116**, 2603-11 (2003).
95. Romero, S. et al. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* **119**, 419-29 (2004).
96. Reinhard, M. et al. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J* **14**, 1583-9 (1995).
97. Bompard, G. & Caron, E. Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J Cell Biol* **166**, 957-62 (2004).
98. Callebaut, I., Cossart, P. & Dehoux, P. EVH1/WH1 domains of VASP and WASP proteins belong to a large family including Ran-binding domains of the RanBP1 family. *FEBS Lett* **441**, 181-5 (1998).
99. Bear, J. E., Rawls, J. F. & Saxe, C. L., 3rd. SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J Cell Biol* **142**, 1325-35 (1998).
100. Machesky, L. M. & Insall, R. H. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* **8**, 1347-56 (1998).
101. Pollard, T. D. & Borisy, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-65 (2003).
102. Caron, E. Regulation by phosphorylation. Yet another twist in the WASP story. *Dev Cell* **4**, 772-3 (2003).
103. Prehoda, K. E., Scott, J. A., Mullins, R. D. & Lim, W. A. Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* **290**, 801-6 (2000).
104. Ramesh, N., Anton, I. M., Hartwig, J. H. & Geha, R. S. WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14671-6 (1997).
105. Anton, I. M., Lu, W., Mayer, B. J., Ramesh, N. & Geha, R. S. The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein Nck. *J Biol Chem* **273**, 20992-5 (1998).
106. Anton, I. M. & Jones, G. E. WIP: a multifunctional protein involved in actin cytoskeleton regulation. *Eur J Cell Biol* **85**, 295-304 (2006).
107. Rudolph, M. G. et al. The Cdc42/Rac interactive binding region motif of the Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) is necessary but not sufficient for tight binding to Cdc42 and structure formation. *J Biol Chem* **273**, 18067-76 (1998).
108. Cory, G. O., Garg, R., Cramer, R. & Ridley, A. J. Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *J Biol Chem* **277**, 45115-21 (2002).
109. Cory, G. O., Cramer, R., Blanchoin, L. & Ridley, A. J. Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP. *Mol Cell* **11**, 1229-39 (2003).
110. Yokoyama, N., Loughheed, J. & Miller, W. T. Phosphorylation of WASP by the Cdc42-associated kinase ACK1: dual hydroxyamino acid specificity in a tyrosine kinase. *J Biol Chem* **280**, 42219-26 (2005).
111. Torres, E. & Rosen, M. K. Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP. *Mol Cell* **11**, 1215-27 (2003).
112. Wu, X., Suetsugu, S., Cooper, L. A., Takenawa, T. & Guan, J. L. Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function. *J Biol Chem* **279**, 9565-76 (2004).
113. Scaplehorn, N. et al. Grb2 and Nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus. *Curr Biol* **12**, 740-5 (2002).

114. O'Sullivan, E., Kinnon, C. & Brickell, P. Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 383-7 (1999).
115. She, H. Y. et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is associated with the adapter protein Grb2 and the epidermal growth factor receptor in living cells. *Mol Biol Cell* **8**, 1709-21 (1997).
116. Miki, H. & Takenawa, T. WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 93-9 (2002).
117. Nakagawa, H. et al. IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J Cell Sci* **116**, 2577-83 (2003).
118. Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. & Takenawa, T. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* **408**, 732-5 (2000).
119. Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. & Kirschner, M. W. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790-3 (2002).
120. Gautreau, A. et al. Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4379-83 (2004).
121. Stradal, T. E. et al. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol* **14**, 303-11 (2004).
122. Steffen, A. et al. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *Embo J* **23**, 749-59 (2004).
123. Berken, A. & Hülkamp, M. Arp und wie er die Welt der Zellform in Pflanzen sah. *BIOspektrum* **12**, 30-32 (2006).
124. Innocenti, M. et al. Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* **6**, 319-27 (2004).
125. Faix, J. & Grosse, R. Staying in shape with formins. *Dev Cell* **10**, 693-706 (2006).
126. Balasubramanian, M. K., Bi, E. & Glotzer, M. Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol* **14**, R806-18 (2004).
127. Glotzer, M. The molecular requirements for cytokinesis. *Science* **307**, 1735-9 (2005).
128. Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y. & Bretscher, A. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 559-91 (2004).
129. Bretscher, A. Polarized growth and organelle segregation in yeast: the tracks, motors, and receptors. *J Cell Biol* **160**, 811-6 (2003).
130. Pruyne, D., Gao, L., Bi, E. & Bretscher, A. Stable and dynamic axes of polarity use distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol Biol Cell* **15**, 4971-89 (2004).
131. Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T. & Narumiya, S. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* **1**, 136-43 (1999).
132. Kobiela, A., Pasolli, H. A. & Fuchs, E. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol* **6**, 21-30 (2004).
133. Sahai, E. & Marshall, C. J. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol* **4**, 408-15 (2002).
134. Gasman, S., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol* **5**, 195-204 (2003).
135. Gachet, Y. & Hyams, J. S. Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J Cell Sci* **118**, 4231-42 (2005).
136. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I. & Treisman, R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**, 329-42 (2003).
137. Gasteier, J. E. et al. Activation of the Rac-binding partner FHOD1 induces actin stress fibers via a ROCK-dependent mechanism. *J Biol Chem* **278**, 38902-12 (2003).
138. Tominaga, T. et al. Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. *Mol Cell* **5**, 13-25 (2000).
139. Somogyi, K. & Rorth, P. Evidence for tension-based regulation of Drosophila MAL and SRF during invasive cell migration. *Dev Cell* **7**, 85-93 (2004).
140. Habas, R., Kato, Y. & He, X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* **107**, 843-54 (2001).
141. Leader, B. et al. Formin-2, polyploidy, hypofertility and positioning of the meiotic spindle in mouse oocytes. *Nat Cell Biol* **4**, 921-8 (2002).
142. Rosales-Nieves, A. E. et al. Coordination of microtubule and microfilament dynamics by Drosophila Rho1, Spire and Cappuccino. *Nat Cell Biol* **8**, 367-76 (2006).
143. Gundersen, G. G. et al. Regulation of microtubules by Rho GTPases in migrating cells. *Novartis Found Symp* **269**, 106-16; discussion 116-26, 223-30 (2005).
144. Wen, Y. et al. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol* **6**, 820-30 (2004).
145. Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S. & Gundersen, G. G. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* **3**, 723-9 (2001).

146. Higgs, H. N. & Peterson, K. J. Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol Biol Cell* **16**, 1-13 (2005).
147. Higgs, H. N. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci* **30**, 342-53 (2005).
148. Kovar, D. R. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 11-7 (2006).
149. Watanabe, N. & Higashida, C. Formins: processive cappers of growing actin filaments. *Exp Cell Res* **301**, 16-22 (2004).
150. Zigmund, S. H. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 99-105 (2004).
151. Wallar, B. J. & Alberts, A. S. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **13**, 435-46 (2003).
152. Harris, E. S. & Higgs, H. N. Actin cytoskeleton: formins lead the way. *Curr Biol* **14**, R520-2 (2004).
153. Pruyne, D. et al. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* **297**, 612-5 (2002).
154. Kovar, D. R., Kuhn, J. R., Tichy, A. L. & Pollard, T. D. The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol* **161**, 875-87 (2003).
155. Kovar, D. R. & Pollard, T. D. Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14725-30 (2004).
156. Harris, E. S., Li, F. & Higgs, H. N. The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J Biol Chem* **279**, 20076-87 (2004).
157. Li, F. & Higgs, H. N. Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDia1. *J Biol Chem* **280**, 6986-92 (2005).
158. Otomo, T. et al. Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* **433**, 488-94 (2005).
159. Shemesh, T., Otomo, T., Rosen, M. K., Bershadsky, A. D. & Kozlov, M. M. A novel mechanism of actin filament processive capping by formin: solution of the rotation paradox. *J Cell Biol* **170**, 889-93 (2005).
160. Vavylonis, D., Kovar, D. R., O'Shaughnessy, B. & Pollard, T. D. Model of formin-associated actin filament elongation. *Mol Cell* **21**, 455-66 (2006).
161. Chang, F., Drubin, D. & Nurse, P. cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol* **137**, 169-82 (1997).
162. Evangelista, M. et al. Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* **276**, 118-22 (1997).
163. Petrella, E. C., Machesky, L. M., Kaiser, D. A. & Pollard, T. D. Structural requirements and thermodynamics of the interaction of proline peptides with profilin. *Biochemistry* **35**, 16535-43 (1996).
164. Watanabe, N. et al. p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J* **16**, 3044-56 (1997).
165. Sagot, I., Rodal, A. A., Moseley, J., Goode, B. L. & Pellman, D. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol* **4**, 626-31 (2002).
166. Wasserman, S. FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol* **8**, 111-5 (1998).
167. Dong, Y., Pruyne, D. & Bretscher, A. Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol* **161**, 1081-92 (2003).
168. Rose, R. et al. Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature* **435**, 513-8 (2005).
169. Alberts, A. S. Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem* **276**, 2824-30 (2001).
170. Otomo, T., Otomo, C., Tomchick, D. R., Machius, M. & Rosen, M. K. Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1. *Mol Cell* **18**, 273-81 (2005).
171. Westendorf, J. J. The formin/diaphanous-related protein, FHOS, interacts with Rac1 and activates transcription from the serum response element. *J Biol Chem* **276**, 46453-9 (2001).
172. Schonichen, A. et al. Biochemical characterization of the diaphanous autoregulatory interaction in the formin homology protein FHOD1. *J Biol Chem* **281**, 5084-93 (2006).
173. Koka, S., Minick, G. T., Zhou, Y., Westendorf, J. J. & Boehm, M. B. Src regulates the activity of the mammalian formin protein FHOD1. *Biochem Biophys Res Commun* **336**, 1285-91 (2005).
174. Koka, S. et al. The formin-homology-domain-containing protein FHOD1 enhances cell migration. *J Cell Sci* **116**, 1745-55 (2003).

175. Sonoda, T. et al. Binding of glutamate receptor delta2 to its scaffold protein, Delphilin, is regulated by PKA. *Biochem Biophys Res Commun* **350**, 748-52 (2006).
176. Matsuda, K., Matsuda, S., Gladding, C. M. & Yuzaki, M. Characterization of the delta2 glutamate receptor-binding protein delphilin: Splicing variants with differential palmitoylation and an additional PDZ domain. *J Biol Chem* **281**, 25577-87 (2006).
177. Miyagi, Y. et al. Delphilin: a novel PDZ and formin homology domain-containing protein that synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor delta 2 subunit. *J Neurosci* **22**, 803-14 (2002).
178. Yamashita, T. et al. Identification and characterization of a novel Delphilin variant with an alternative N-terminus. *Brain Res Mol Brain Res* **141**, 83-94 (2005).
179. Nusslein-Volhard, C., Frohnhofer, H. G. & Lehmann, R. Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* **238**, 1675-81 (1987).
180. Gutzeit, H. O. The role of microfilaments in cytoplasmic streaming in *Drosophila* follicles. *J Cell Sci* **80**, 159-69 (1986).
181. Theurkauf, W. E., Smiley, S., Wong, M. L. & Alberts, B. M. Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development* **115**, 923-36 (1992).
182. Wolfgang, W. J. & Forte, M. Posterior localization of the *Drosophila* Gi alpha protein during early embryogenesis requires a subset of the posterior group genes. *Int J Dev Biol* **39**, 581-6 (1995).
183. Neuman-Silberberg, F. S. & Schupbach, T. The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell* **75**, 165-74 (1993).
184. Theurkauf, W. E. Premature microtubule-dependent cytoplasmic streaming in *cappuccino* and *spire* mutant oocytes. *Science* **265**, 2093-6 (1994).
185. Jackson, S. M. & Berg, C. A. Soma-to-germline interactions during *Drosophila* oogenesis are influenced by dose-sensitive interactions between *cut* and the genes *cappuccino*, *ovarian tumor* and *agnostic*. *Genetics* **153**, 289-303 (1999).
186. Wu, H.-H. et al. Characterization of the human FORMIN2 (FMN2) gene. *FERTILITY & STERILITY* **80**, S252-53 (2003).
187. Leader, B. & Leder, P. Formin-2, a novel formin homology protein of the *cappuccino* subfamily, is highly expressed in the developing and adult central nervous system. *Mech Dev* **93**, 221-31 (2000).
188. Katoh, M. Characterization of FMN2 gene at human chromosome 1q43. *Int J Mol Med* **14**, 469-74 (2004).
189. Ryley, D. A. et al. Characterization and mutation analysis of the human formin-2 (FMN2) gene in women with unexplained infertility. *Fertil Steril* **83**, 1363-71 (2005).
190. Mass, R. L., Zeller, R., Woychik, R. P., Vogt, T. F. & Leder, P. Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant limb deformity alleles. *Nature* **346**, 853-5 (1990).
191. Maro, B. & Verlhac, M. H. Polar body formation: new rules for asymmetric divisions. *Nat Cell Biol* **4**, E281-3 (2002).
192. Neal, M. S. et al. Cytogenetic evaluation of human oocytes that failed to complete meiotic maturation in vitro. *Fertil Steril* **77**, 844-5 (2002).
193. Eichenlaub-Ritter, U., Schmiady, H., Kentenich, H. & Soewarto, D. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod* **10**, 2343-9 (1995).
194. Levran, D., Farhi, J., Nahum, H., Glezerman, M. & Weissman, A. Maturation arrest of human oocytes as a cause of infertility: case report. *Hum Reprod* **17**, 1604-9 (2002).
195. Rudak, E. et al. Anomalies of human oocytes from infertile women undergoing treatment by in vitro fertilization. *Fertil Steril* **54**, 292-6 (1990).
196. Avrech, O. M. et al. Treatment variables in relation to oocyte maturation: lessons from a clinical micromanipulation-assisted in vitro fertilization program. *J Assist Reprod Genet* **14**, 337-42 (1997).
197. Knighton, D. R. et al. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-14 (1991).
198. Knighton, D. R. et al. Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 414-20 (1991).
199. Irobi, E. et al. Structural basis of actin sequestration by thymosin-beta4: implications for WH2 proteins. *Embo J* **23**, 3599-608 (2004).

200. Wu, S., Mehta, S. Q., Pichaud, F., Bellen, H. J. & Quiocho, F. A. Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 879-85 (2005).
201. Lock, J. G. & Stow, J. L. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell* **16**, 1744-55 (2005).
202. Hales, C. M. et al. Identification and characterization of a family of Rab11-interacting proteins. *J Biol Chem* **276**, 39067-75 (2001).
203. Hales, C. M., Vaerman, J. P. & Goldenring, J. R. Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. *J Biol Chem* **277**, 50415-21 (2002).
204. Chen, W., Feng, Y., Chen, D. & Wandinger-Ness, A. Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol Biol Cell* **9**, 3241-57 (1998).
205. Misra, S. & Hurley, J. H. Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell* **97**, 657-66 (1999).
206. Davis, R. J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* **64**, 1-12 (1999).
207. Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C. & Franzoso, G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* **117**, 5197-208 (2004).
208. Bubici, C., Papa, S., Pham, C. G., Zazzeroni, F. & Franzoso, G. The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histol Histopathol* **21**, 69-80 (2006).
209. Hou, X. S., Goldstein, E. S. & Perrimon, N. Drosophila Jun relays the Jun amino-terminal kinase signal transduction pathway to the Decapentaplegic signal transduction pathway in regulating epithelial cell sheet movement. *Genes Dev* **11**, 1728-37 (1997).
210. Williams, M. J., Wiklund, M. L., Wikman, S. & Hultmark, D. Rac1 signalling in the Drosophila larval cellular immune response. *J Cell Sci* **119**, 2015-24 (2006).
211. Noselli, S. & Agnes, F. Roles of the JNK signaling pathway in Drosophila morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 466-72 (1999).
212. Harden, N. et al. A Drosophila homolog of the Rac- and Cdc42-activated serine/threonine kinase PAK is a potential focal adhesion and focal complex protein that colocalizes with dynamic actin structures. *Mol Cell Biol* **16**, 1896-908 (1996).
213. Harden, N., Ricos, M., Ong, Y. M., Chia, W. & Lim, L. Participation of small GTPases in dorsal closure of the Drosophila embryo: distinct roles for Rho subfamily proteins in epithelial morphogenesis. *J Cell Sci* **112 ( Pt 3)**, 273-84 (1999).
214. Glise, B. & Noselli, S. Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in Drosophila morphogenesis. *Genes Dev* **11**, 1738-47 (1997).
215. Mees, A. et al. Very-KIND is a novel nervous system specific guanine nucleotide exchange factor for Ras GTPases. *Gene Expr Patterns* **6**, 79-85 (2005).
216. Otto, I. M. 112 (Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2001).
217. Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23 (1979).
218. Sambrook, J. & Russel, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001).
219. Schafer, W. R. & Rine, J. Protein prenylation: genes, enzymes, targets, and functions. *Annu Rev Genet* **26**, 209-37 (1992).
220. Clarke, S. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* **61**, 355-86 (1992).
221. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15 (1993).
222. Kurusu, M. et al. Embryonic and larval development of the Drosophila mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the role of fasciclin II. *Development* **129**, 409-19 (2002).
223. Kurusu, M. et al. Genetic control of development of the mushroom bodies, the associative learning centers in the Drosophila brain, by the eyeless, twin of eyeless, and Dachshund genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2140-4 (2000).
224. Su, H. & O'Dowd, D. K. Fast synaptic currents in Drosophila mushroom body Kenyon cells are mediated by alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors and picrotoxin-sensitive GABA receptors. *J Neurosci* **23**, 9246-53 (2003).
225. Connolly, J. B. et al. Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in Drosophila mushroom bodies. *Science* **274**, 2104-7 (1996).
226. Lee, T., Lee, A. & Luo, L. Development of the Drosophila mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* **126**, 4065-76 (1999).

- 
227. Herzig, M. C., Thor, S., Thomas, J. B., Reichert, H. & Hirth, F. Expression and function of the LIM homeodomain protein Apterous during embryonic brain development of *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **211**, 545-54 (2001).
  228. Rincon-Limas, D. E. et al. Conservation of the expression and function of apterous orthologs in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2165-70 (1999).
  229. Erdmann, K. S. The protein tyrosine phosphatase PTP-Basophil/Basophil-like. Interacting proteins and molecular functions. *Eur J Biochem* **270**, 4789-98 (2003).
  230. Magie, C. R., Meyer, M. R., Gorsuch, M. S. & Parkhurst, S. M. Mutations in the Rho1 small GTPase disrupt morphogenesis and segmentation during early *Drosophila* development. *Development* **126**, 5353-64 (1999).

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent	His	Histidin
$\alpha$	alpha	<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
$\beta$	beta	IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
$\gamma$	delta	k	Kilo
$\Delta$	Delta	kb	Kilobasenpaare
$\mu$	mikro	kD	Kilodalton
A	Adenin	l	Liter
Abb.	Abbildung	$\mu$	mikro
ADP	Adenosin-5´-Diphosphat	M	molar
Amp <sup>+</sup>	Ampicillin-haltig	m	milli
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Min	Minute
AS	Aminosäure	mm	Millimeter
ATP	Adenosintri-phosphat	<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
ATPase	Adenosin-5´-Triphosphatase	mmol	Millimol
bp	Basenpaare	M-Phase	Mitose-Phase
BSA	Rinderserumalbumin	n	nano
bzw.	beziehungsweise	NGS	Normal Goat Serum
C	Cytosin	NLS	Kernlokalisations-signal
°C	Grad Celsius	NP40	Nonidet P-40
ca.	circa	nt	Nukleotid(e)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	OD	Optische Dichte
DMEM	Dulbeccos modified Eagle`s Medium	p	piko
cm	Zentimeter	EGTA	Ethylenglykol-bis(ä-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
d. h.	das heißt	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat	RT	Raumtemperatur
DTT	Dithiothreitol	s.	siehe
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	s	Sekunde
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
FKS	Fötale Kälberserum	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
g	Gramm	<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
G	Guanin	T	Thymin
GFP	Green Fluorescent Protein	TCA	Trichloressigsäure
GST	Glutathion-S-Transferase		
h	Stunde		
HEPES	2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2'-ethansulfonsäure		

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
z. B.	zum Beispiel

---



## 7.2 Klonierungsschema für Plasmide

Konstrukt	Template für Fragment	Primer	Vektor	Schnittstellen 5'/3'
pECFP-C1-p150-Spir-NT	pcDNA3-Myc-p150-Spir	p150-Spir-NT 5' p150-Spir-NT 3'	pECFP-C1 (Clontech)	Bgl II/EcoR I
pECFP-C1-p150-Spir	pcDNA3-Myc-p150-Spir	_____	pECFP-C1-p150-Spir-NT	BstX I/Hind III
<b>pEGFP-C1-150-Spir</b>	pECFP-C1-p150-Spir	_____	pEGFP-C1 (Clontech)	Bgl II/Hind III
<b>pEGFP-C1-150-Spir-CT</b>	pcDNA3-Myc-p150-Spir	p150-Spir-CT 5' p150-Spir-CT 3'	pEGFP-C1 (Clontech)	Xba I
pBluescript-Capu-CT	EST Klon GH14467 (accession: A1238426)	_____	pBluescript SK +/- (Stratagene)	EcoR V/Xho I
pBluescript-Myc-Capu	Gesamt RNA aus ♀ <i>D. melanogaster</i> (WT Berlin)	Myc-Capu-NT 5' Capu-NT 3'	pBluescript-Capu-CT	BamH I/Nde I
<b>pcDNA3-Myc-Capu</b>	pBluescript-Myc-Capu	_____	pBluescript-Myc-Capu	BamH I/Xho I
<b>pcDNA3-Myc-Capu-FH1-FH2</b>	EST Klon GH14467 (accession: A1238426)	Myc-Capu-FH1 5' Capu-CT 3'	pBluescript SK +/- (Stratagene)	BamH I/Sma I (F) BamH I/EcoR V (V)
<b>pcDNA3-Myc-Capu-NT</b>	pcDNA3-Myc-Capu	BamHI-Myc 5' Capu-NT-aa465 3'	pcDNA3 (Invitrogen)	BamH I/Sma I (F) BamH I/EcoR V (V)
<b>pGEX-4T-3-Capu-FH1-FH2</b>	pcDNA3-Myc-Capu	pGEX-Capu-FH1 5' Capu-CT-XmaI 3'	pGEX-4T-3 (Amersham)	BamH I/Xma I (F) BamH I/Sma I (V)
<b>pEGFP-C1-m-Fmn2-FH2</b>	pEGFP-C1-m-Fmn2-FH1-FH2	Fmn2-FH2 5' Fmn2-CT 3'	pEGFP-C1 (Clontech)	KpnI/XbaI
<b>pEGFP-C1-m-Fmn2-FH1-FH2</b>	Gesamt-RNA aus Maus-Gehirn	KpnI-m-fmn2-before-FH1 5' m-fmn2-XbaI 3'	pEGFP-C1 (Clontech)	KpnI/XbaI
pBS-SK-(-)Sacl-KIAA1135old	KIAA1135 EST Klon (accession: AB032961.2)	_____	pBluescript SK - (Stratagene)	BamH I/Xho I
pBS-Myc-KIAA1135new	KIAA1135 EST Klon (accession: AB032961.2)	Myc-hu-Spir-1-NT-5' hu-Spir-1-NT-3'	pBS-SK(-)Sacl-KIAA1135(old)	BamH I/Sac I
<b>pcDNA3-Myc-hu-Spir-1</b>	pBS-Myc-KIAA1135new	_____	pcDNA3 (Invitrogen)	BamH I/Xho I

Fragment (F), Vektor (V)

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
p150-Spir-NT 5'	5' GA AGA TCT ACG GAG CAC CAG GCC GAG GAG 3'
p150-Spir-NT 3'	5' G GAA TTC AAG CTT CCT GAG GGT CGG TGC TTC TGG 3'
p150-Spir-CT 5'	5' GC TCT AGA ACT CAG TGC GAG TCG AGG AGG 3'
p150-Spir-CT 3'	5' GC TCT AGA CTA CTT CCA GAC GGG CGT CAG 3'
Myc-Capu-NT 5'	5' CG GGA TCC GCC GCC GCC ATG GAG CAG AAG CTG ATC TCC GAG GAG GAC CTG GCC TTG CAG CTA GGC AAG AAG 3'
Capu-NT 3'	5' GC TCT AGA TTG CAT CGT TGA GAT TAG CCA 3'
Myc-Capu-FH1 5'	5' CG GGA TCC GCC GCC GCC ATG GAG CAG AAG CTG ATC TCC GAG GAG GAC CTG GTG TCC GAT AAC AAA AGT GCA 3'
Capu-CT 3'	5' TCC CCC GGG CTA GTT CTT GCT ACG CCT CAT 3'
BamHI-Myc 5'	5' CG GGA TCC GCC GCC GCC ATG GAG 3'
Capu-NT-aa465 3'	5' TCC CCC GGG CTA CGT CGA GGA TTG GCC GCA CTT 3'
Fmn2-FH2 5'	5' GC GGT ACC GAC AGA GTG GCT AGG AAG CAG 3'
Fmn2-CT 3'	5' GCT CTA GAG TGT TCT GGT CAC AGA TCA CGT 3'
KpnI-m-fmn2-before-FH1 5'	5' GC GGT ACC CCT GGC CTG GGC ATG GCA ATT 3'
m-fmn2-XbaI 3'	5' GC TCT AGA G TGT TCT GGT CAC AGA TCA CGT 3'
Myc-hu-Spir-1-NT-5'	5' GC GGA TCC GCC GCC GCC ATG GAG AAG CTG ATC TCC GAG GAG GAC CTG GCT CAG GCG GCT GGC CCG GCG 3'
hu-Spir-1-NT-3'	5' CCA GAA TCG TGC CCA GTC AGC 3'
pGEX-Capu-FH1 5'	5' CG GGA TCC GTG TCC GAT AAC AAA AGT GCA 3'
Capu-CT-XmaI 3'	5' TCC CCC GGG CTA GTT CTT GCT ACG CCT CAT 3'

## 7.3 Sequenzen

### Capu-PA (U34258.1)

```

1/1                31/11                61/21                91/31
atg gcc ttg cag cta ggc aag aag ttg gcc cag gtt ttg ggc agt gga gcg ggc tca cct ttg acc ccc ggc aca atg gag cct tgt gca gcg ggt tcg ggc tca ccg ctg gca aat gga
M A L Q L G K K L A Q V L G S G A G S P L T P G T M E P C A A G S G S P L A N G
121/41            151/51            181/61            211/71
gag ctc ttc aac gtc tcc aag gcc aaa aag gta gag cta cag aac ctt tcg tct cga ttc aca gcc gcc gtc acc caa aca ccg cca ggt gtc acg tca tcc act ccc aat gaa tca gga
E L F N V S K A K K V E L Q N L S S R F T A A V T Q T P P G V T S S T P N E S G
241/81            271/91            301/101           331/111
gtc aca gga cct gca gga cct ttg ggg gct aca aca tcc tcg ccg tcg ctg gaa acg caa tca act gtt ata att tcg ttt aaa tca tct caa aca cct gtg cag tct caa acg aat tct
V T G P A G P L G A T T S S P S L E T Q S T V I I S F K S S Q T P V Q S Q T N S
361/121           391/131           421/141           451/151
gca gcc tcc gaa aat gtt gag gat gac aca gcg ccc ctg cca ctt cca ccg ccg ccc ccc ggc ttc ggt acg ccc acc acg ccc ctt ttg tca agc aat gtg ctg aag aag gtc gcc agc
A A S E N V E D D T A P L P L P P P P P G F G T P T T P L L S S N V L K K V A S
481/161           511/171           541/181           571/191
ttc acg gtc gag aag tct tcg gcg ggc aat aat agc tcg aat cct ccg aat ttg tgc ccc acc agt gac gag acc acc ctc ttg gcc aca cca tgt tct tca tcg ctg acg gtg gca acc
F T V E K S S A G N N S S N P P N L C P T S D E T T L L A T P C S S S L T V A T
601/201           631/211           661/221           691/231
ctg ccg ccc gaa atc gcc gtg ggc gca gcg gcg ggg ggc gtg gcc ggg ggt gct ggt tcg cga cgc ggc tca tct tat gta ccg gaa aag tta agc ttc gct gca tat gaa aag ttc gaa
L P P E I A V G A A A G G V A G G A G S R R G S S Y V P E K L S F A A Y E K F E
721/241           751/251           781/261           811/271
ggt caa atg cta ata aaa tgg cta atc tca acg atg caa agc aat ccg aag agt tcg tgc ggt gat gct aat cag gaa tta ttt aat aca ctg gcg ttg cag ttc tgc aat aat ctc aaa
G Q M L I K W L I S T M Q S N P K S S C G D A N Q E L F N T L A L Q F C N N L K
841/281           871/291           901/301           931/311
tat gtc ggc gtc ctt aag cag atc tcc aat gag cac ttg gat tgc gga ttt agc ccc tat gaa atg tac caa tgg acg cac acg gag cag cca acc acc tca ttg ccc ctg acc ccc ggc
Y V G V L K Q I S N E H L D C G F S P Y E M Y Q W T H T E Q P T T S L P L T P G
961/321           991/331           1021/341          1051/351
aag ctg gac aag gtg gcg gct tgg cca ttt tcc agc aca cca tcc ggc att cga gcg ctg gag tcc gca tcg ctg gcg tcc ttg gga gca ggt ggg gtg gcg ggt tct ttg gca acc att
K L D K V A A W P F S S T P S G I R A L E S A S L A S L G A G G V A G S L A T I
1081/361          1111/371          1141/381          1171/391
gcc acc gca acc aca gcc tca tcg gac aat cag aaa acc ctg cag cag atc ctc aag aag cgt cta ctc aac tgc tcg acc ttg gcc gaa gtt cat gcg gtg gta aac gag ctg ctg agc
A T A T T A S S D N Q K T L Q Q I L K K R L L N C S T L A E V H A V V N E L L S
1201/401          1231/411          1261/421          1291/431
agc gtg gat gaa cca ccg cgt cgt cca tcg aag aga tgt gtg aat ctc acg gag ctg ctg aat gcc agt gag gct acc gtt tat gaa tac aac aag act gga gcg gag ggc tgt gtg aag
S V D E P P R R P S K R C V N L T E L L N A S E A T V Y E Y N K T G A E G C V K

```

















## m-Spir-1 (hmm1733110)

```

1/1                               31/11                               61/21                               91/31
atg acg gag cac cag gcc gag gag cag gcg gac acg ccg ccc acc aag gtc aag gcc acg ccc aca ccc acc ccg agt gga aag ttc aag gac gcg aag gaa gac gcc ttc ctg tcc aca
M T E H Q A E E Q A D T P P T K V K A T P T P T P S G K F K D A K E D A F L S T
121/41                               151/51                               181/61                               211/71
tcg ccg gac agc gcc aac ggc gat gcc caa cac aag ctg cca gcg gac cag ctg gcc atg tcc tcc agt gcg cat ccc cag cag gcg ggc caa gcc cgc ccg ctc atc ctg caa gcc ttc
S P D S A N G D A Q H K L P A D Q L A M S S S A H P Q Q A G Q A R P L I L Q A F
241/81                               271/91                               301/101                               331/111
cac cgc tgc tcc tcg cca gaa cag tgc gtc acg ctg cac gac atc ctg gac tcc ttt aag gcg ccg ctc tcc gag gac cag gcc tgg gcc ctg atc cac cag ttc gcc ggg ctc tac cac
H R C S S P E Q C V T L H D I L D S F K A P L S E D Q A W A L I H Q F A G L Y H
361/121                               391/131                               421/141                               451/151
cag gtg gcc gta caa gcg cac acc tgt gcc gcg gac tac gag gcc gcc ctg ccc acc gga ttc gag ctg cac ttc cat cgc gac ggc agc gtc cac ttc tcc ggc ccg gat cag ctg acg
Q V A V Q A H T C A A D Y E A A L P T G F E L H F H R D G S V H F S G P D Q L T
481/161                               511/171                               541/181                               571/191
cct aag gag caa ctg cag cag gag cag atc ccc ctc ccc ccg cag cac gac gtg att gtg gat cag ccg gac cac agc gcc agc agc agc ggc gac agc agc gtc atc aac aga gcg ttc
P K E Q L Q Q E Q I P L P P Q H D V I V D Q P D H S A S S S G D S S V I N R A F
601/201                               631/211                               661/221                               691/231
gac aac agc aat cac cac cac cat caa cat cat cac ccg ccg ctc gtc gtc tcg cat aga aag att atc agc gaa ctg gcg gaa atc gtc tac acc gcc ttg gat tac aat ctg ccg
D N S N H H H H H Q H H H P P L V V S H R K I I S E L A E I V Y T A L D Y N L P
721/241                               751/251                               781/261                               811/271
gag gac gag gag tgc caa gtg tca cag gag ctg gag aat ctg ttc aac ttt atg acg gca gat gag aca gac gac gat tgc att gac gag ggc atc gac gag ggc gac aag cgc tgg gac
E D E E C Q V S Q E L E N L F N F M T A D E T D D D C I D E G I D E G D K R W D
841/281                               871/291                               901/301                               931/311
gac gaa tcc gag gag gag cgc aac gat acc aaa gaa cta gag cac ata atc gag acc tgc aga aat cac ata aaa acc acc ctg cct gag aac cac tat aga gct gtc tgc aga gcc ctc
D E S E E E R N D T K E L E H I I E T C R N H I K T T L P E N H Y R A V C R A L
961/321                               991/331                               1021/341                               1051/351
gtg acg gag acc ata gag ctc cga gta ttt ctg cag cag gtc ctg aac aat gaa gca ggt gcc gag aaa ctg atc aag gcg tcg gaa tca tcg gcc acc acg caa caa gaa ctg gcg aag
V T E T I E L R V F L Q Q V L N N E A G A E K L I K A S E S S A T T Q Q E L A K
1081/361                               1111/371                               1141/381                               1171/391
ctg ggc ttc aac gac tgg gca cgc ttc tgg gtg cag gtg atc gac gaa ctg cga cgg gga gtg cgg ctg aag aag agc aac cac gag cgc act ccc atc gaa tat gag ctg aca ccc tac
L G F N D W A R F W V Q V I D E L R R G V R L K K S N H E R T P I E Y E L T P Y
1201/401                               1231/411                               1261/421                               1291/431
gaa ata ctc atg ggc gac atc cga gcc aaa aag tat cag ttg cgc aag gtg atg gtc aac gga gat att ccg ccg cgc gtc aag aaa gat gcc cac gcc atg atc ttg gag ttc atc agg
E I L M G D I R A K K Y Q L R K V M V N G D I P P R V K K D A H A M I L E F I R
1321/441                               1351/451                               1381/461                               1411/471
tca cgg ccg ccg ctg aag aag gcc agc gat cgc caa ttg ggc ccg ccg cgc atg tgc gag cct tct ccg cgg gag cag ctc atg gag tcc ata cgg aag ggg aag gag ctc aag cag atc
S R P P L K K A S D R Q L G P P R M C E P S P R E Q L M E S I R K G K E L K Q I

```







## **7.4 Danksagung**

Herrn PD Dr. E. Kerkhoff möchte ich für die Vergabe des Dissertationsthemas, die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und die Betreuung meiner Arbeit am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung danken.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Professor Dr. F. Grummt für seine freundliche und hilfsbereite Art, die vielfältige Unterstützung während dieser Arbeit sowie die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. U. Fischer für die Bereitschaft, als dritter Prüfer meine Prüfungskommission zu vervollständigen.

Den Mädels aus meinem Labor möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die lustigen Mittagsstunden danken. Insbesondere Anaid, die uns immer „die Höhle heiß machen“ durfte, weil sie „so ein Brett bei uns in der Tür hatte“ ;-). Johanna und unser Guntherle alias Meister Tietsch, unsere MSZ-eigenen Stadler und Waldorf, haben auch mich mit ihren flotten Sprüchen immer auf Trab gehalten. Conny danke ich für ihre stete Freundlichkeit und Ausgeglichenheit wodurch sie zu dem nötigen Ruhepol in unserem Labor wurde. Den „Neuen“ Sabine, Agnes, Sandra, Martin und Markos möchte ich vor allem für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die netten Stunden auch außerhalb des MSZs danken.

Bei der Thomas Raabe Gruppe, insbesondere bei Thomas selbst, Felix, Nicolas, Eike, Benjamin und Heike möchte ich mich nicht nur für die „wilden Typen“ und Spir-Fliegen bedanken, sondern auch für die Freundschaft und Herzlichkeit die unsere Arbeitsgruppen verbunden haben.

Insbesondere Stephan Albert, Lupe und auch Ralf Schreck möchte ich für ihre vielen nützlichen Ratschläge und kompetente fachliche Hilfe danken, mit der sie mich jederzeit unterstützt haben. Den Neurologen Stefan Wiese, Wilfried und Katja danke ich für die gute Zusammenarbeit und Einführung in die Maus-Gehirn Histologie.

Ganz besonders danke ich auch den Leuten aus der Biochemie, die mich während meines Zusammenschreibens moralisch unterstützt haben. Der Szalay Gruppe möchte ich dabei besonders für die Einrichtung meines Schreibplatzes danken. Den Fischers, besonders meinen Freunden Simon und Lusy, danke ich für die vielen guten Gespräche und fröhlichen Stunden bei Kaffee und Kuchen, beim Grillen und während der WM. Basti danke ich außerdem für die Hilfe bei Computer-Fragen.

Allen anderen Kollegen, die nicht namentlich genannt wurden, aber an der Entstehung dieser Arbeit mitgeholfen haben, danke ich ganz herzlich.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Geschwistern Tina und Thomas, Dora sowie meinen Freunden herzlich für ihre Unterstützung und Anteilnahme an meiner Arbeit danken.

---

## 7.5 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Hilgert  
Vorname: Susanne  
Wohnort: Am Lehnstein 28, 97337 Dettelbach  
Geburtsdatum: 16. Dezember 1975  
Geburtsort: Speyer  
Familienstand: ledig

### Schulische Ausbildung

1986-1995 Auguste-Viktoria-Gymnasium Trier  
1995 Allgemeine Hochschulreife

### Akademische Laufbahn

1995-2002 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
1998/1999 Auslandssemester im Laboratori de Microbiologica, Universitat de Barcelona, Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Viñas  
2001-2002 Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Universität Würzburg:  
„Analyse von Vektorsystemen für die effiziente Expression heterologer Proteine in Säugerzellen“ unter Anleitung von Prof. Dr. F. Grummt  
2002 Diplom im Fach Biologie  
2002/2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Molekulare Genetik, Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier, Arbeitsgruppe J. Tazi  
2003-2007 Anfertigung der vorliegenden externen Dissertation am Institut für Medizinische Strahlenkunde, Universität Würzburg:  
„Interaktion zweier mechanistisch unterschiedlicher Aktinnukleatoren – Spir und Cappuccino“ unter Anleitung von PD Dr. E. Kerkhoff und Prof. Dr. F. Grummt



## 7.6 Publikationen

### Publikation von Daten aus dieser Arbeit

Quinlan, M., **Hilgert, S.**, Mees, A., Mullins, D. R., Kerkhoff, E. (2007). Regulatory Interactions Between Two Actin Nucleators - Spire and Cappuccino. *JCB*  
Im Druck

### Poster und Abstracts

Quinlan, M., Heuser, J., **Hilgert, S.**, Mullins, D. R., Kerkhoff, E. (2005). The MAP kinase substrate Spir nucleates actin polymerization by novel Arp2/3 independent mechanism. *Onkologie* 28 (suppl 2),1–21, O-42

13th International AEK/AIO Congress of the German Cancer Society,  
Würzburg, März 2005

**Hilgert, S.**, Mees, A., Borawski, J. M., Leberfinger, C. B., Kerkhoff, E. (2004). The novel KIND motif mediates the interaction of the distinct actin organizers Spir and Cappuccino. Symposium on Visualising Cytoskeletal Architecture and Dynamics by Light and Electron Microscopy, Dresden, Oktober 2004