

Biochemische und zellbiologische  
Charakterisierung von  
*VASP* aus *Dictyostelium discoideum*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biol. Antje Katrin Kiese Wetter  
geboren am 12.11.1979 in Großburgwedel

2010

Referent: PD. Dr. Jan Faix  
Korreferent: PD. Dr. Ralf Gerhard  
Tag der Promotion: 27.09.2010

# Danksagung

Besonders danke ich Herrn PD. Dr. Jan Faix für die Bereitstellung dieses interessanten Themas. Seine bemerkenswerte Motivation und Faszination für die Wissenschaft waren ein stetiger Antrieb.

Herrn PD Dr. Ralf Gerhard danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe - Dennis Breitsprecher, Annette Breskott, Jörn Linkner und Benjamin Nordholz -, sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau PD. Dr. Ute Curth - Lydia Litz, Sirine ElHoury und Nathalie Naue - danke ich für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und die große Bereitschaft für fruchtbare, fachliche Diskussionen.

Frau PD Dr. Ute Curth danke ich für die große Diskussionsbereitschaft, die Ausführung der Ultrazentrifugationsexperimente und deren Auswertung.

Dr. Gregor Witte danke ich für die Hilfe bei kristallographischen Fragestellungen und die moralische Unterstützung.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Dietmar Manstein für die Möglichkeit diese Arbeit am sehr gut ausgestatteten Institut für Biophysikalische Chemie durchführen zu können.

Des Weiteren danke ich den nicht namentlich genannten Mitgliedern des Instituts für Biophysikalische Chemie, sie haben durch ihren Einsatz am Gelingen dieser Arbeit mitgewirkt.

Meinen Geschwistern, Verwandten und Freunden gilt großer Dank für ihr Verständnis.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für die liebevolle Betreuung meines Sohnes Mathis, für die immerwährende Unterstützung und den festen Glauben an mich.

Großer Dank gilt auch meinem Sohn Mathis dessen freundliches Wesen mich sehr glücklich macht.

Last not least bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Mann Dr. Dennis Breitsprecher für seine Unterstützung und Geduld, sowie das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

*„Wer A sagt, der muss nicht B sagen. Er kann auch erkennen, dass A falsch war.“*

Bertold Brecht

# Zusammenfassung

Das Protein VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Dynamik des Aktinzytoskeletts, wobei es sowohl an fokalen Kontakten als auch in der Front von Filopodien und Lamellipodien lokalisiert. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Proteine der Ena/VASP-Familie in allen motilen eukaryotischen Zellen exprimiert werden und in Prozesse der Phagozytose, Zelladhäsion und Zellmigration involviert sind. VASP ist aus einer N-terminalen EVH1-Domäne (*Ena/VASP homology-Domain 1*), einer Prolin-reichen Domäne (PRD) und einer C-terminalen EVH2-Domäne aufgebaut. Letztere vermittelt sowohl die Tetramerisierung des Proteins als auch die Interaktion mit G- und F-Aktin über WH2-artige G- und F-Aktin Bindungsstellen (GAB und FAB).

Ziel dieser Arbeit war es, durch zellbiologische und biochemische Analysen den Einfluss von VASP auf die Aktinpolymerisation und die damit verbundenen zellulären Prozesse zu untersuchen und somit einen Beitrag zur Klärung bestehender Kontroversen bezüglich des Mechanismus von VASP zu leisten. Zur Untersuchung der Effekte von rekombinant hergestelltem humanem und *Dictyostelium* VASP (hVASP und DdVASP) auf die Aktinpolymerisation wurden spektroskopische Analysen vorgenommen. Beide VASP Proteine waren in der Lage, die Aktin-Filament-Elongation direkt zu beschleunigen, allerdings in sehr unterschiedlichem Maße. Anschließende Bindungsanalysen mit GFP-markierten GAB-Peptiden und Aktin durch analytische Ultrazentrifugation zeigten, dass die GAB des schnell elongierenden DdVASP eine deutlich höhere Affinität zu G-Aktin aufwies, als die des langsam elongierenden hVASP. Diese Befunde stützen die Annahme, dass die Elongationsrate der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation direkt mit der Aktin-Affinität der GAB korreliert. Analysen der Aktinpolymerisation mit DdVASP Deletionsmutanten ohne GAB, FAB oder Tetramerisierungsdomäne (Tet) ergaben, dass sowohl GAB als auch Tet für die volle Funktion des Proteins in diesen Assays erforderlich waren, wohingegen die Deletion des FAB-Motivs keinen signifikanten Effekt zeigte.

Die Deletion des *vasP*-Gens in *Dictyostelium* führte zum Verlust von Filopodien und einer verminderten Migrations- und Adhäsionsfähigkeit der Zellen. Rekonstitutionsexperimente mit GFP-markierten VASP-Konstrukten ergaben, dass im Gegensatz zum Wildtyp-Konstrukt die Mutante DdVASP $\Delta$ FAB nicht in der Lage war, die Filopodienbildung und Migrationsfähigkeit von VASP-null-Zellen wiederherzustellen. Die Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen zeigte, dass sowohl das Wildtyp-Protein als auch die DdVASP $\Delta$ GAB und  $\Delta$ PRD Mutanten strikt an der pseudopodialen Front als auch in Filopodienspitzen lokalisierten. DdVASP $\Delta$ FAB war hingegen diffus im Pseudopodium verteilt, was vermutlich auf eine fehlende Assoziation des Proteins mit den Plusenden der Aktinfilamente zurückgeführt werden kann. Auch die Überexpression eines konstitutiv aktiven Konstrukts des Formins dDia2 führte zur Ausbildung von Filopodien in VASP-null-Zellen. Dieser Befund stützt zum einen das *de novo* Nukleationsmodell der Filopodienbildung und zum anderen deutet er darauf hin, dass auch Formine zur Elongation filopodialer Aktinfilamente beitragen können. Darüber hinaus konnte die Filopodienbildung in VASP-null-Zellen auch durch Expression des Maus Orthologs mVASP wieder hergestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass Ena/VASP-Proteine verschiedener Spezies hochkonservierte zelluläre Funktionen ausüben.

**Schlüsselwörter:** VASP, Aktin, *Dictyostelium discoideum*, Zellmotilität, Filopodium

# Abstract

VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) is a key mediator of actin polymerization in sites of active actin assembly, e.g. in focal adhesions, on the surface of intracellular pathogens or in the tips of filopodia and lamellipodia. Proteins of the Ena/VASP family are ubiquitously expressed all motile cells, and are involved in phagocytosis, cell adhesion and cell migration. VASP is composed of an N-terminal EVH1-domain (*Ena/VASP homology-Domain 1*), a central proline-rich domain (PRD) and a C-terminal EVH2 domain. The latter mediates both, the tetramerization of the protein as well as the direct interaction with actin monomers and filaments by virtue of WH2-domain related G- and F-actin binding motifs (GAB and FAB).

The focus of this study was to analyze the effects of VASP on actin filament assembly *in vitro* as well as *in vivo*, thereby aiming to solve the long standing controversies in the field concerning the mechanism of Ena/VASP proteins. Therefore, the effects of recombinant human and *Dictyostelium* VASP (hVASP and DdVASP) on the polymerization of actin were analyzed by spectroscopic methods. They showed that both proteins accelerated the rate of filament elongation, albeit to markedly different extends. Concomitant binding analyses by analytical ultracentrifugation with fluorescently-tagged GAB peptides revealed that the GAB from the fast elongating DdVASP displayed a much higher affinity towards G-actin than the GAB from the slow elongating hVASP. These findings were in line with the hypothesis that the monomer affinity of the GAB directly determines the VASP-mediated elongation rate. Analyses of actin polymerization by DdVASP deletion mutants lacking GAB, FAB or the tetramerization domain (Tet) showed that both, GAB and Tet were necessary for full activity of the protein, while deletion of the FAB had virtually no effect on the actin polymerization in the pyrene-assays.

Deletion of the *vasP*-gene in *Dictyostelium* resulted in the loss of filopodia and a pronounced reduction in cell migration and adhesion. Reconstitution of VASP-null-cells with GFP-tagged wild-type and deletion mutants showed that solely mutant DdVASP $\Delta$ FAB was incapable to rescue the VASP-null phenotype. Live cell imaging further revealed that mutants DdVASP $\Delta$ GAB –and DdVASP $\Delta$ PRD prominently localized to the tips of pseudopodia as well as to the tips of filopodia, whereas mutant DdVASP $\Delta$ FAB displayed a rather diffuse localization within the pseudopods. This hampered localization might have resulted from an impaired interaction of VASP with the barbed ends of the actin filaments. Notably, overexpression of a constitutive-active mutant of the formin dDia2 rescued filopodia formation in VASP-null-cells, suggesting that formins also participate in actin filament elongation in filopodia, and moreover supporting the *de-novo*-nucleation model of filopodia initiation. Most strikingly, filopodia formation in VASP-null-cells could also be rescued by expression of the murine VASP orthologue mVASP. This finding, in combination with the discovered affinity-dependence of VASP-mediated actin assembly *in vitro*, strongly suggests that even Ena/VASP proteins from evolutionary distant organisms exert highly conserved functions *in vivo*.

**keywords:** VASP, actin, *Dictyostelium discoideum*, cell motility, filopodium

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Zytoskelett</b>	<b>1</b>
1.1.1	Intermediärfilamente	2
1.1.2	Mikrotubuli	2
1.1.3	Aktin	2
1.1.3.1	Das Aktin-Monomer	3
1.1.3.2	Polymerisation zu Aktinfilamenten	4
<b>1.2</b>	<b>Aktin-abhängige zelluläre Prozesse</b>	<b>7</b>
1.2.1	Endozytose	7
1.2.2	Zytokinese	8
1.2.3	Zellmotilität	9
<b>1.3</b>	<b>Aktin-bindende Proteine</b>	<b>11</b>
1.3.1	Aktin sequestrierende Proteine	11
1.3.2	Aktinfilament Nukleatoren	12
1.3.3	Aktinfilament Elongatoren	13
1.3.4	Aktinfilament-depolymerisierende Proteine	14
1.3.5	Aktinfilament-verkappende Proteine	14
<b>1.4</b>	<b>Proteine der Formin Familie</b>	<b>14</b>
1.4.1	Formine in <i>Dictyostelium</i>	17
<b>1.5</b>	<b>Ena/VASP Proteine</b>	<b>19</b>
<b>1.6</b>	<b>WH2-Motive</b>	<b>23</b>
<b>1.7</b>	<b>Modelle der Aktin-basierenden Motilität</b>	<b>26</b>
<b>1.8</b>	<b><i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus</b>	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>35</b>
3.1.1	Medien	41
3.1.1.1	Medien für die Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	41
3.1.1.2	Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen	42
3.1.2	Selektionsmarker	43
3.1.2.1	Zur Selektion von <i>E. coli</i> -Zellen	43
3.1.2.2	Zur Selektion von <i>D. discoideum</i> -Zellen	43
3.1.3	Häufig verwendete Puffer	43
3.1.4	Bakterienstämme	44

3.1.5	<i>D. discoideum</i> -Stämme .....	44
3.1.6	Plasmide .....	44
3.1.6.1	Vektoren für die Transformation von <i>E. coli</i> .....	45
3.1.6.2	Plasmide für die Transformation von <i>D. discoideum</i> .....	46
3.1.6.3	Oligodesoxynukleotide .....	47
3.1.6.3.1	Mutageneseprimer .....	47
3.1.6.3.2	Sequenzierprimer .....	48
3.1.6.4	Computerprogramme .....	48
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>49</b>
3.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	49
3.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen .....	49
3.2.1.2	Ermittlung der Zelldichte von Bakterienkulturen .....	49
3.2.1.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Mehr-Ionen-Technik) .....	50
3.2.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	51
3.2.1.5	Herstellung von <i>E. coli</i> Dauerkulturen .....	51
3.2.1.6	Isolation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> .....	51
3.2.1.7	Aufreinigung von genomischer DNA aus <i>D. discoideum</i> unter Benutzung des „High pure PCR Template Preparation Kit“ .....	52
3.2.1.8	Bestimmung der DNA Konzentration .....	52
3.2.1.9	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren .....	53
3.2.1.9.1	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	53
3.2.1.9.2	5'-Dephosphorylierung von DNA .....	53
3.2.1.9.3	Glätten von überhängenden DNA-Enden .....	53
3.2.1.9.4	Ligation von DNA-Fragmenten .....	54
3.2.1.10	Polymerase Ketten Reaktion (PCR) .....	54
3.2.1.11	Reinigung von DNA .....	56
3.2.1.12	Agarose Gelelektrophorese .....	56
3.2.1.13	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	57
3.2.1.14	Klonierungsstrategien .....	57
3.2.2	Biochemische Methoden .....	60
3.2.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	60
3.2.2.2	Konzentrieren von Proteinlösungen .....	61
3.2.2.3	Dialyse und Entfernung des GST-tags .....	61
3.2.2.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	61
3.2.2.5	Coomassie Färbung .....	63
3.2.2.6	Western Blot .....	64
3.2.2.7	Expression und Aufreinigung von Fusions-Proteinen .....	65
3.2.2.7.1	GST-Fusions-Proteine .....	65
3.2.2.7.2	MBP-Fusions-Proteine .....	67
3.2.2.8	Gelfiltration mittels Flüssigkeitschromatographie .....	68
3.2.2.9	Herstellung von Aktin aus Kaninchen-Skelettmuskel .....	68

3.2.2.9.1	Präparation des Aceton-Puders .....	68
3.2.2.9.2	Präparation von G-Aktin aus Acetonpuder .....	69
3.2.2.10	Pyren-Markierung von Aktin .....	70
3.2.2.11	Pyren-Aktin-Assay .....	71
3.2.2.12	Nachweis der Aktin-Bündelungsaktivität von VASP durch Kosedimentation.....	71
3.2.2.13	Coverslip-Assay .....	72
3.2.2.14	Bestimmung von Dissoziationskonstanten mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation .....	72
3.2.2.15	Herstellung und Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern .....	73
3.2.2.16	Bestimmung der intrazellulären Konzentration von VASP in <i>D. discoideum</i> -Zellen . .....	75
3.2.3	Zellbiologische Methoden .....	75
3.2.3.1	Kultivierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen in Flüssigmedium .....	75
3.2.3.2	Kultivierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen auf Bakterienrasen.....	75
3.2.3.3	Cryokonservierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	76
3.2.3.4	Konservierung von <i>D. discoideum</i> -Sporen .....	76
3.2.3.5	Bestimmung der Zellzahl von <i>D. discoideum</i> -Kulturen.....	76
3.2.3.6	Herstellung von Ganz-Zell-Lysaten aus <i>D. discoideum</i> -Zellen .....	77
3.2.3.7	Transformation von <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	77
3.2.3.8	Herstellung genetischer Knockouts von <i>D. discoideum</i> -Zellen .....	78
3.2.3.9	Analyse der Wachstumsrate von <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	78
3.2.3.10	Phagozytose-Assay .....	79
3.2.4	Mikroskopie.....	79
3.2.4.1	Untersuchung fixierter <i>D. discoideum</i> -Zellen .....	80
3.2.4.1.1	Fixierung und Präparation von <i>D. discoideum</i> -Zellen für die Immunfluoreszenz .. .....	80
3.2.4.2	Aufnahme lebender <i>D. discoideum</i> -Zellen .....	82
3.2.4.2.1	Motility-Assay .....	82
3.2.4.2.2	Bestimmung der Filopodienlänge .....	83
3.2.4.2.3	Mikroskopischer Phagozytose-Assay .....	83
3.2.4.2.4	Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) .....	83
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>85</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich von humanem mit <i>Dictyostelium</i> VASP durch Primär- und Sekundärstruktur Analysen .....</b>	<b>85</b>
4.1.1	Domänengröße und Organisation .....	85
4.1.2	Die EVH1-Dömäne .....	86
4.1.3	Die Prolin-reiche-Domäne .....	88
4.1.4	Die EVH2-Domäne .....	90
4.1.4.1	Die G-Aktin Bindestelle (GAB).....	90
4.1.4.2	Die F-Aktin Bindestelle (FAB).....	91

4.1.4.3	Die Tetramerisierungsdomäne (Tet).....	93
4.1.4.4	Vergleich potentieller Phosphorylierungsstellen in hVASP und DdVASP.....	94
<b>4.2</b>	<b>Biochemische Charakterisierung von VASP.....</b>	<b>95</b>
4.2.1	Herstellung von VASP Expressions-konstrukten.....	95
4.2.1.1	Deletionsmutanten von DdVASP.....	95
4.2.1.2	Konstrukte von humanen und <i>D. discoideum</i> VASP-WH2-Motiven.....	97
4.2.2	Aufreinigung und biochemische Analyse rekombinanter Proteine.....	99
4.2.2.1	Expression und Reinigung von humanem und <i>D. discoideum</i> VASP.....	99
4.2.2.2	Präparation von Aktin aus Kaninchen-Skelettmuskel.....	100
4.2.2.3	Vergleich der Einflüsse von hVASP und DdVASP auf die Aktinpolymerisation..	101
4.2.2.4	Salzabhängigkeit der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation.....	105
4.2.2.5	Effekte der DdVASP-Deletionsmutanten auf die Aktinpolymerisation.....	107
4.2.2.6	Expression und Reinigung des GAB-Peptids aus hVASP und DdVASP als MBP- bzw. GST-GFP-Fusionsprotein.....	110
4.2.2.7	Analyse der G-Aktin-GAB Interaktion.....	112
4.2.2.8	Expression und Reinigung von VASP-Fragmenten zur Herstellung polyklonaler Antikörper.....	114
4.2.2.9	Bestimmung der intrazellulären Konzentration von endogenem VASP in <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	116
<b>4.3</b>	<b>Zellbiologische Charakterisierung von VASP.....</b>	<b>117</b>
4.3.1	Herstellung einer unabhängigen VASP-null Mutante.....	117
4.3.2	Herstellung von DdVASP-Konstrukten für die Expression von GFP-Fusionsproteinen	119
4.3.3	Rekonstitution von <i>D. discoideum</i> VASP-null-Zellen mit GFP-DdVASP-Fusionsproteinen .....	120
4.3.3.1	Effekte der DdVASP-Deletionsmutanten auf die Filopodienbildung.....	120
4.3.3.2	Einflüsse der Deletionsmutanten auf die subzelluläre Lokalisation von VASP sowie die Zellmotilität.....	123
4.3.4	Rekonstitution von DdVASP-defizienten <i>D. discoideum</i> -Zellen mit murinem VASP (mVASP).....	127
4.3.5	Einfluss von VASP auf die Zell-Substrat-Adhäsion von <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	130
4.3.6	VASP-null-Mutanten zeigen eine verminderte Phagozytoserate.....	133
4.3.7	Die Eliminierung von VASP hat keinen Einfluss auf das Wachstum von <i>D. discoideum</i> - Zellen auf Bakterienrasen.....	135
4.3.8	Wiederherstellung der Filopodienbildung in VASP-defizienten Zellen durch die Expression des konstitutiv aktiven Formins dDia2.....	137
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>139</b>
<b>5.1</b>	<b>Mechanismus der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation.....</b>	<b>139</b>
<b>5.2</b>	<b>Die Rolle von VASP bei Aktin-basierenden Prozessen in <i>Dictyostelium</i>.....</b>	<b>146</b>
5.2.1	Einfluss von DdVASP auf die Zellmigration.....	146

5.2.2	Die Rolle von VASP bei der Phagozytose .....	148
5.2.3	Einfluss von DdVASP auf die Filopodien-bildung.....	149
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis.....</i></b>	<b>153</b>
<b>7</b>	<b><i>Publikationen und Präsentationen .....</i></b>	<b>167</b>
<b>8</b>	<b><i>Curriculum Vitae.....</i></b>	<b>168</b>

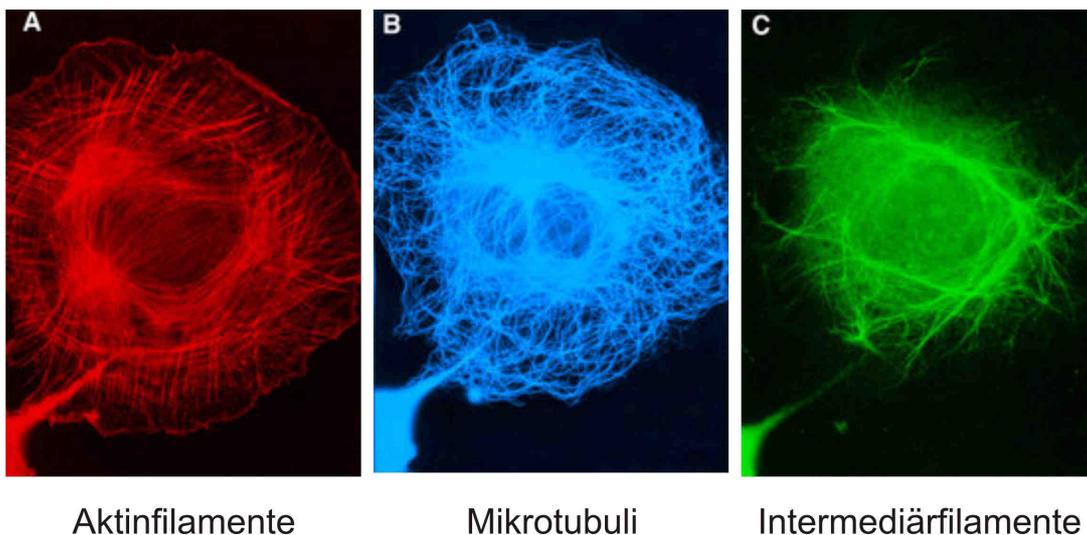
# 1 Einleitung

## 1.1 Das Zytoskelett

Eukaryotische Zellen besitzen ein dynamisches Zytoskelett, das aus einem Netzwerk von drei verschiedenen Proteinfilament-Systemen aufgebaut ist (Abbildung 1), die unterschiedliche Aufgaben übernehmen und miteinander interagieren:

- Intermediärfilamente bieten mechanische Festigkeit und Widerstand gegen Schub und Torsion.
- Mikrotubuli verankern Organellen, dirigieren den intrazellulären Verkehr, bilden während der Zellteilung den Spindelapparat aus und sind für die Ausbildung der Zellpolarität verantwortlich.
- Aktinfilamente bestimmen die Form der Zelloberfläche, vermitteln eine Vielzahl zellulärer Transportprozesse und sind für die Bewegung der Zelle zuständig.

Lange Zeit wurde angenommen, dass das Zytoskelett ein charakteristisches Merkmal eukaryotischer Zellen sei. In den letzten 15 Jahren wurde dieses Dogma jedoch mit der Entdeckung von Struktur- und Funktionshomologen aller drei Zytoskelettproteinklassen in Bakterien wiederlegt (Margolin, 2009, Pogliano, 2008).



**Abbildung 1:** Die drei Filamentsysteme des Zytoskeletts (Bilder adaptiert von <http://cellix.imba.oeaw.ac.at/cytoskeleton>).

## 1.1.1 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente (IF) sind Hetero- oder Homopolymere. Alle Intermediärfilament-Proteine (67 humane Gene sind bekannt) bilden homogene, apolare Fasern mit ca. 10 nm Durchmesser und einem Molekulargewicht von 30 bis 200 kDa. Einige IF-Proteine sind ubiquitär vorhanden, andere kommen lediglich in bestimmten Zelltypen vor. Ebenso wie die Expression, ist die Organisation der Intermediärfilamente Zelltyp-abhängig. IF erhöhen zusammen mit den Aktinfilamenten die mechanische Stabilität der Zelle (Goldman et al., 2008; Abbildung 1C).

## 1.1.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli (MT) sind aus polaren, globulären  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin Untereinheiten aufgebaut. Das Tubulin Heterodimer bindet pro  $\alpha$ - und  $\beta$ -Monomer ein GTP. Heterodimere binden aneinander und bilden Protofilamente aus 13 Untereinheiten, die sich wiederum parallel zu einem hohlzylindrischen Mikrotubulus von 25 nm Durchmesser zusammenlagern. Innerhalb der Zelle entspringen Mikrotubuli dem sogenannten *Microtubule Organizing Centre* (MTOC), das  $\gamma$ -Tubulin enthält (Abbildung 1B). Während des Wachstums der MT werden am Plusende GTP Monomere eingebaut. Anschließend findet eine Hydrolyse des gebundenen Nukleotids zu GDP statt (Kueh und Mitchison, 2009). Im Gegensatz zu Aktinfilamenten (siehe 1.1.3.2) wachsen MT nicht kontinuierlich, sondern wechseln zwischen Wachstum und schneller Depolymerisation (auch als *Catastrophe* bezeichnet) bzw. Depolymerisation und Wachstum (auch als *Rescue* bezeichnet). Diese sogenannte „dynamische Instabilität“ der MT ist für ihre Funktion in der Zelle essentiell (Brun et al., 2009). Entlang von MT erfolgt der intrazelluläre Transport von Organellen und Proteinen unter ATP-Verbrauch durch Motorproteine (Kinesine in Richtung des Plusendes und Dyneine in Richtung des Minusendes; Gennerich und Vale, 2009). Außerdem bilden sie während der Zellteilung den Spindelapparat aus und erzeugen als Zilien und Geißeln einen koordinierten Flimmerschlag (Hawkins et al., 2010).

## 1.1.3 Aktin

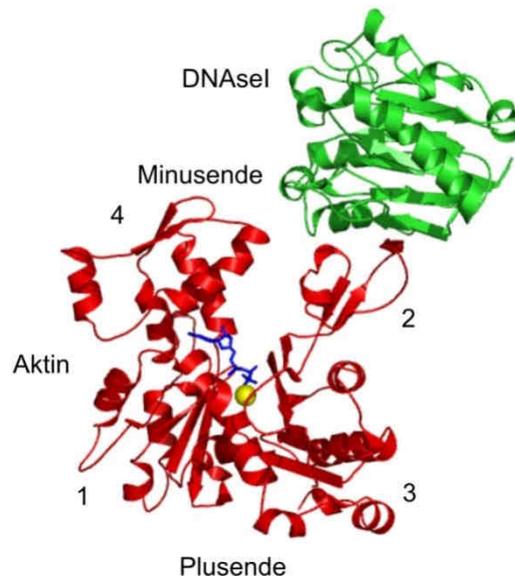
Aktin wurde erstmals 1942 als Teil des Akto-Myosin-Komplexes aus Muskelzellen isoliert (Szent-Gyorgyi, 2004). Erst zwanzig Jahre später wurden zufällig filamentöse Strukturen in nicht-Muskelzellen entdeckt, die sich im Nachhinein als Aktinfilamente herausstellten (Abbildung 1A). Nachfolgend wurde Aktin als ubiquitäres Protein in allen eukaryotischen Zellen nachgewiesen (Garrels und Gibson, 1976, Weber et al., 1975). Aktin bildet entweder

relativ stabile Filamente in Sarcomeren ausdifferenzierter Muskelzellen oder ein sich kontinuierlich umgestaltendes, filamentöses Netzwerk in Nichtmuskelzellen, dass z.B. für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellmorphologie sowie die Zellmotilität essentiell ist (Pollard und Cooper, 2009).

Aufgrund seiner wichtigen Funktion in vielen zellulären Prozessen ist die Aminosäuresequenz von Aktin evolutionär hochkonserviert (Sheterline et al., 1995). Niedere Eukaryoten wie Hefen besitzen nur ein essentielles Gen für Aktin (Gallwitz und Seidel, 1980, Ng und Abelson, 1980). *Dictyostelium discoideum* hingegen hat 34 Aktin- oder Aktinverwandte Gene, 17 davon gehören der *Act8* Gruppe an und kodieren für die gleiche Aktin-Aminosäuresequenz, die anderen 17 Gene weisen sehr große Homologien zu konventionellem Aktin auf, unterscheiden sich aber in ihrer Aminosäuresequenz (Joseph et al., 2008, Vandekerckhove und Weber, 1980). Alle höheren Eukaryoten weisen multiple Aktin-Isoformen auf, die von einer Familie von Aktin-Genen codiert werden: Säuger besitzen 35 Aktin-Gene, die für mindestens 6 Aktin-Isoformen kodieren, welche nur leicht in ihrer AS-Sequenz variieren und gewebespezifisch exprimiert werden (Vandekerckhove und Weber, 1978). Vier Isoformen kodieren für  $\alpha$ - (lokalisiert in Muskel Zellen), eine für  $\beta$ - (lokalisiert in der Front von beweglichen Zellen) und eine für  $\gamma$ -Aktin (lokalisiert in Stressfasern). Aktin ist das in eukaryotischen Zellen am häufigsten vorkommende Protein. In Muskelzellen von Vertebraten beträgt der Anteil am gesamten zellulären Protein circa 20%, in Nichtmuskelzellen 1-5% und in *Dictyostelium discoideum* 8% (Kabsch und Vandekerckhove, 1992). Aktin kommt in zwei Formen vor: G-Aktin (G für globulär) ist die monomere Form während F-Aktin (F für filamentös) das helikale Polymer darstellt (Podolski und Steck, 1990).

### 1.1.3.1 Das Aktin-Monomer

Das Aktin-Monomer hat ein Molekulargewicht von etwa 42 kDa und ist aus ca. 375 Aminosäuren aufgebaut. Die atomare Struktur von G-Aktin wurde erstmals im Jahre 1990 in Komplex mit DNase I und  $Mg^{2+}$  von Kabsch et al. und nicht komplexiert im Jahre 2001 von Otterbein et al. gelöst (Abbildung 2, Kabsch und Vandekerckhove, 1992, Otterbein et al., 2001).



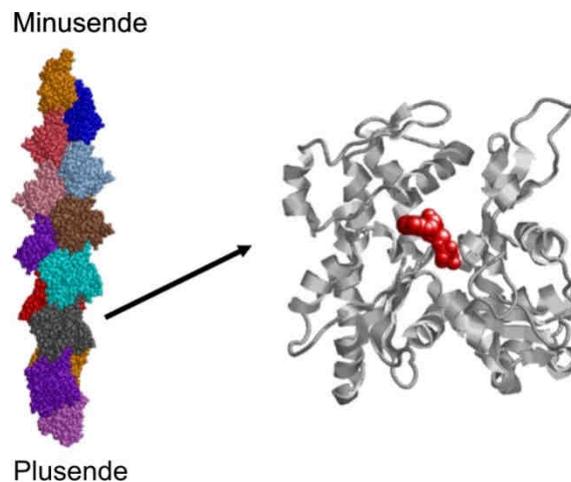
**Abbildung 2: Struktur des Aktin-Monomers.** Model eines Aktin-Monomers (rot) im Komplex mit dem Aktin-sequestrierenden Protein DNase I (grün). Das Aktin-Monomer besteht aus vier Domänen, wobei Domäne 1 und 3 das Plusende und 2 und 4 das Minusende und die Nukleotid-Bindungstasche bilden. Im Zentrum des Proteins ist ein Nukleotid (hier ATP, blau) und ein zweiwertiges Ion (hier Ca<sup>2+</sup>, gelb) gebunden.

G-Aktin bildet vier Domänen (1-4), die um einen zentralen Spalt angeordnet sind, der eine Nukleotidbindungsstelle (für ATP, ADP+Pi oder ADP) und eine Bindungsstelle für ein divalentes Kation (Ca<sup>2+</sup> oder Mg<sup>2+</sup>) aufweist (Schutt et al., 1993). In Gegenwart niedriger Ionenstärken liegt Aktin als Monomer vor, in Gegenwart millimolarer Konzentrationen monovalenter oder divalenter Ionen wie Kalium oder Magnesium sowie bei physiologischen Salzkonzentrationen überwiegen jedoch Aktinfilamente. In Zellen existieren Monomere daher nur im Komplex mit regulatorischen G-Aktin sequestrierenden Proteinen, die die Polymerisation verhindern.

### 1.1.3.2 Polymerisation zu Aktinfilamenten

Aktin-Monomere bilden durch ionische Wechselwirkungen ihrer geladenen Aminosäuren Polymere variabler Länge mit einem Durchmesser von ca. 8 nm (Kabsch und Vandekerckhove, 1992). Das Aktin-Filament ist eine zweisträngige, rechtsgängige Doppelhelix mit 13 Untereinheiten pro Windung, was einer Länge von 36 nm entspricht (Oda et al., 2009). Die Filamente sind aufgrund der Polarität des Monomers ebenfalls polar, was erstmals durch Dekoration von Aktinfilamenten mit den Aktin-Bindungsköpfen von Myosin (S1-Fragment) gezeigt werden konnte (Hayashi und Ip, 1976). In diesen elektronenmikroskopischen Untersuchungen besaßen die so behandelten Filamente eine

Struktur, die einer Aneinanderreihung von Pfeilspitzen ähnelt. Diese Struktur führte letztlich zu der Namensgebung der Filamentenden: Die Subdomänen 1 und 3 bilden das flache Plusende oder *barbed end*, wogegen Subdomänen 2 und 4 das spitze Minusende oder *pointed end* bilden. Die Struktur des Filaments wurde lange Zeit durch das sogenannte „Holmes Modell“ beschrieben, welches die Struktur des Monomers mit Daten aus Röntgenstreuungs- und EM-Analysen kombinierte (Holmes et al., 1990, Lorenz et al., 1993, Lorenz et al., 1995). Im Jahr 2009 konnte erstmals eine detailliertere Struktur des Aktinfilaments mit Hilfe von Röntgenstreuung durch Oda und Kollegen gelöst werden (Abbildung 3; Oda et al., 2009).



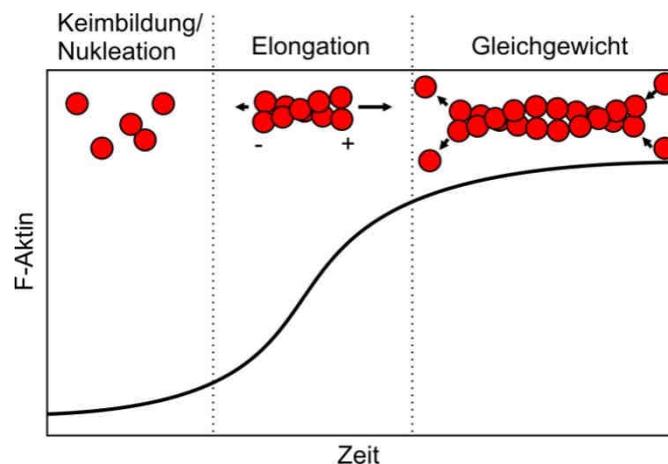
**Abbildung 3: Struktur des Aktinfilaments.** Das Aktinfilament bildet eine zweisträngige, rechtsgängige Doppelhelix mit 13 Untereinheiten pro Windung. Die Nukleotid-Bindungs tasche von Aktin ist im Filament weniger geöffnet als im Monomer (von Oda et al., 2009).

Die Polymerisation von G- zu F-Aktin kann *in vitro* durch Zugabe von milimolaren Konzentrationen monovalenter Kationen ausgelöst werden und wird in drei aufeinander folgende Phasen unterteilt (Abbildung 4):

1. Während der *lag*-Phase müssen zur Bildung von Nukleationskeimen zunächst energetisch ungünstige Dimere und Trimere gebildet werden, bevor die Polymerisation zu Filamenten erfolgen kann (Pollard, 1984). Diese Zwischenzustände sind thermodynamisch sehr instabil, weshalb die Nukleation (Trimerbildung) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Aktinpolymerisation ist (Carrier, 1991, Pollard, 1986a, Pollard, 1990).
2. Ein rasches Wachstum der Filamente kennzeichnet die Polymerisationsphase. Die spontane Elongation läuft unter physiologischen Bedingungen (KCl > 50 mM, neutraler pH Wert, mM Mg<sup>2+</sup> Konzentration) mit 10,6  $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  am Plusende und etwa 0,2  $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  am Minusende ab bis sich ein Gleichgewicht einstellt (Pollard, 1986b). Das Gleichgewicht von

Polymerisation und Depolymerisation ist abhängig von der freien Monomer-Konzentration. Die so genannte kritische Konzentration von G-Aktin beträgt  $0,1 \mu\text{M}$  für das Plus- und  $0,6 \mu\text{M}$  für das Minusende (Pollard, 1986b, Wegner und Isenberg, 1983).

3. Hat die Aktinpolymerisation den Gleichgewichtszustand erreicht, kommt es aufgrund der unterschiedlichen kritischen Konzentrationen an beiden Enden der Filamente zum so genannten *treadmilling*. Hierbei lagern sich am Plusende Monomere an, während am Minusende gleichzeitig Depolymerisation stattfindet. Die Länge der Filamente bleibt dabei konstant (Neuhaus et al., 1983, Wegner, 1982).



**Abbildung 4: Schema der Phasen der Aktinpolymerisation.** Während der Nukleationsphase von Aktin bilden sich Di- und Trimere, die nachfolgend zu Filamenten elongiert werden. Das Wachstum der gebildeten Nukleationskeime bewirkt in der Elongationsphase einen spürbaren Anstieg des F-Aktins und eine Verarmung an G-Aktin. Im Gleichgewicht findet das so genannte *treadmilling* statt, bei dem sich Aktin-Monomere in gleichem Maße am Plusende anlagern und vom Minusende ablösen.

Eine weitere Eigenschaft von Aktin ist die rasche Spaltung des gebundenen ATPs nach Einbau ins Filament zu  $\text{ADP} + \text{P}_i$  und nachfolgender Freisetzung des  $\text{P}_i$ , weshalb „ältere“ Aktinfilamente ausschließlich aus ADP-Aktin bestehen (Pollard und Borisy, 2003). *In vivo* erkennen bestimmte Depolymerisations-fördernde Proteine den Nukleotidstatus des Filaments und binden ADP-Aktin Bereiche, um diese Abzubauen. Die dynamische Umgestaltung des Aktinzytoskeletts ist für viele zelluläre Prozesse von außerordentlich großer Bedeutung und wird im Folgenden kurz vorgestellt (Pollard und Borisy, 2003):

## 1.2 Aktin-abhängige zelluläre Prozesse

### 1.2.1 Endozytose

Endozytose bezeichnet den Vorgang, bei dem eukaryotische Zellen ihre Plasmamembran einstülpen, abschnüren und dadurch Flüssigkeiten (Pinozytose, Vesikelgröße < 150 nm, oder Makropinocytose bei Amöben) oder Feststoffe (Phagozytose, Vesikelgröße > 250 nm) aus dem umgebenden Medium in ihr Zytoplasma über plasmamembran-stämmige Vesikel aufnehmen. Dabei werden Proteine und Lipide der Plasmamembran, extrazelluläre Moleküle, Flüssigkeiten, Partikel, Viren und Bakterien internalisiert. Anschließend folgen der Transit durch die Zelle und die Ausschleusung nicht-verwertbarer Komponenten in das umgebende Medium durch Exozytose (Maniak, 2003).

Die Phagozytose ist ein Aktin-abhängiger, Clathrin-unabhängiger Prozess, der zu der Aufnahme von Partikeln (wie Mikroorganismen) mit einem Durchmesser von wenigen  $\mu\text{m}$  führt. Zellen phagozytieren nicht kontinuierlich, sondern nur bei Bedarf. Während der verschiedenen Stadien der Phagozytose bindet zunächst der Partikel über Interaktion mit einem Rezeptor an die Oberfläche der Zelle, woraufhin aktivierte GTPasen verschiedene Signaltransduktionswege initiieren. Durch die nun folgende Umordnung von F-Aktin werden Pseudopodien ausgebildet, die das Partikel umschließen. Nach erfolgter Internalisierung des Partikels wird der Aktin-Mantel des Phagosoms entfernt und die Reifung zu einem Phagolysosom durch Verschmelzen mit Lysosomen folgt (Conner und Schmid, 2003). Die Phagozytose wird von wenigen spezialisierten Zellen, sogenannten professionellen Phagozyten, wie Neutrophilen, Makrophagen, dendritischen Zellen und Amöben (z.B. *D. discoideum*), ausgeführt (Aderem und Underhill, 1999).

Die Pinozytose hingegen tritt in fast allen Zelltypen auf und findet praktisch kontinuierlich statt. Pinozytose wird unterteilt in absorptive Pinozytose nach unspezifischer Bindung von gelösten Stoffen an die Membran, und rezeptorvermittelte Endozytose, die nach hochspezifischer Bindung von extrazellulären Liganden an Rezeptoren der Plasmamembran erfolgt. Durch diese Mechanismen wird eine Steigerung der Aufnahme-Effizienz erreicht. In Säugerzellen existieren mehrere rezeptorvermittelte Endozytosewege. Unterteilt wird in Macropinocytose (Aktin-abhängig, Substanz >1  $\mu\text{m}$ ), Clathrin-vermittelte Endozytose (CME; Clathrin-, Aktin-, Dynamin- und Amphyphisin-abhängig, Substanz~120 nm), Caveolae/Calveolin1-abhängige Endozytose (Aktin und Dynamin-abhängig; Substanz~60 nm) und verschiedene Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose-Typen (Substanz~90 nm) (Conner und Schmid, 2003, Doherty und McMahon, 2009).

Das Aktinzytoskelett ist zwar für die Clathrin-vermittelte Endozytose von Hefe (Ayscough, 2000), allerdings nicht für die von Säugerzellen essenziell (Fujimoto et al., 2000). Da aber viele akzessorische Proteine direkt oder indirekt sowohl mit dem Aktinzytoskelett, als auch mit der Endozytose-Maschinerie interagieren (Qualmann et al., 2000), spielt es offensichtlich eine wichtige Rolle bei diesem Prozess. Aktin könnte dabei möglicherweise entweder sogenannte Endozytose-*spots* organisieren, oder die neu entstehenden Endozytosevesikel durch das Cytoskelett drücken, welches nahe des Kortexes sehr dicht ist (Conner und Schmid, 2003).

In *D. discoideum* findet Phagozytose im Gegensatz zu Zellen multizellulärer Organismen, in denen spezialisierte Zellen hauptsächlich zur Infektabwehr endozytieren, zur Aufnahme von Nahrung statt (Chen et al., 2007, Qualmann et al., 2000). Die Zellen sind professionelle Phagozyten und in der Lage sowohl Feststoffe wie Bakterien, Hefen, Zellen der eigenen Spezies, synthetische *beads* durch Phagozytose als auch Flüssigkeiten durch Pinozytose aufzunehmen (Cardelli, 2001, Maniak, 2003, Steinert et al., 2003). Der größte Teil der Flüssigkeit wird über Makropinozytose aufgenommen (Hacker et al., 1997), allerdings existieren noch weitere Wege, wie zum Beispiel Clathrin-abhängige und unabhängige Endozytose (Neuhaus et al., 2002, O'Halloran und Anderson, 1992). *D. discoideum* wird deshalb als Modellorganismus für die Untersuchung von grundlegenden Endozytosevorgängen aber auch von Mechanismen zur Aufnahme von Pathogenen über Endozytose in die Wirtszelle verwendet (Farbrother et al., 2006, Rivero, 2008, Steinert und Heuner, 2005).

## **1.2.2 Zytokinese**

Im Anschluss an die Kernteilung (Mitose) und damit die Trennung der Chromatiden findet der letzte Schritt der Zellteilung statt: Während der sogenannten Zytokinese werden die beiden Tochterzellen voneinander getrennt.

Bei tierischen Zellen beginnt die Zytokinese gewöhnlich während der Anaphase der Mitose, kurz nach der Trennung der Tochterchromatiden. Gegliedert wird die Zytokinese in vier Abschnitte: Zuerst wird die Teilungsfurche positioniert, worauf die Ausbildung eines kontraktiven Akto-Myosin-Rings am Zell-Kortex folgt, der dann nach und nach die Zellmembran einschnürt und anschließend wieder disassembliert wird. Die Trennung der Tochterzellen stellt den letzten Schritt der Zytokinese dar.

Die Position zur Ausbildung des Akto-Myosin-Rings wird von Mikrotubuli festgelegt und von der GTPase RhoA reguliert, welche am Zell-Cortex auf Höhe der Metaphaseplatte verschiedene Effektoren aktiviert (Pollard, 2010). Diese aktivieren sowohl das Formin mDia1,

welches Aktinfilamente nukleiert und elongiert, als auch Myosin durch Phosphorylierung seiner leichten regulatorischen Kette (rMLC) (Glotzer, 2001, Kato et al., 2001). Anschließende Kontraktion der Aktinfilamente durch Myosin führt zur Zusammenschnürung des Rings.

Neben Aktin (Schroeder, 1973) und Myosin II (Mabuchi und Okuno, 1977) sind in den meisten Eukaryoten etwa 100 Proteine an der Zytokinese beteiligt, von denen etwa 20 hochkonserviert sind (Glotzer, 2005). Dazu gehören wichtige Aktin-assoziierten Proteine wie Formine (Chang et al., 1997, Evangelista et al., 1997, Feierbach und Chang, 2001, Kohno et al., 1996, Pelham und Chang, 2002, Watanabe et al., 1997), Profilin (Chang et al., 1997), ADF/Cofilin (Ono et al., 2003, Tammana et al., 2010) und Anillin (Oegema et al., 2000, Tasto et al., 2003). Reguliert werden die Prozesse von einer großen Anzahl von Proteinen des RhoA-Signaltransduktionswegs sowie entsprechende GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) und GAPs (*GTPase activating proteins*; Glotzer, 2003, Glotzer, 2005, Kato et al., 2001).

Ähnlich wie bei tierischen Zellen schnürt auch in *Dictyostelium discoideum* ein kontraktiler Ring die Tochterzellen voneinander ab. Allerdings kann hier die Zytokinese erstaunlicherweise ohne Myosin II ablaufen, wenn die Zellen mit Kontakt zu einer Oberfläche kultiviert werden (Neujahr et al., 1997). Die Myosin-Funktion scheint hier von Cortexillinen übernommen zu werden, die parallele Dimere bilden und an den Kortex von *D. discoideum* Zellen lokalisieren (Faix et al., 1996, Weber et al., 1999a). Werden die Zellen hingegen in Schüttelkultur kultiviert, ist Myosin II jedoch essenziell für die Zytokinese (De Lozanne und Spudich, 1987a).

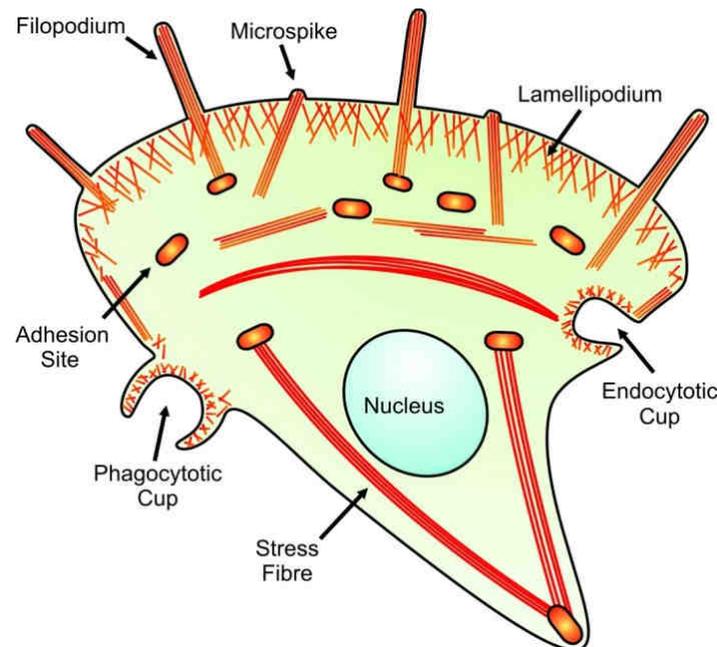
### 1.2.3 Zellmotilität

Zuletzt soll auf die Funktion des Zytoskeletts für die Motilität von Zellen eingegangen werden, die in dieser Arbeit eine wichtige Rolle spielt. Viele eukaryotische Zellen sind motil, um ihre Funktion bei der Immunabwehr, Wundheilung, oder Ergründung neuer Nahrungsquellen (z.B. Amöben) zu gewährleisten. Zellbewegung ist außerordentlich komplex und beruht hauptsächlich auf vier Prozessen (Goode et al., 2000, Weber et al., 1999b).

Der erste Schritt der gerichteten Zellbewegung ist die Polarisierung der Zelle nach extra- oder intrazellulären Stimuli. Die Plasmamembran in der Zellfront (*leading edge*) der Zelle stülpt sich im Bereich der sogenannten Führungslamelle vor und bildet dünne, blattartige Strukturen aus, die als Lamellipodien bezeichnet werden (Abbildung 5; Abercrombie et al., 1970a, Small et al., 2002). Diese beinhalten ein dichtes Netzwerk aus Aktinfilamenten, die

durch den Arp2/3-Komplex nukleiert wurden und mit ihren wachsenden Plusenden zur Membran zeigen (Pollard und Borisy, 2003). Der zweite Schritt der gerichteten Zellbewegung besteht aus der kontinuierlichen Elongation der Aktinfilamente unterhalb der Membran, was zu einem Vorschub des Lamellipodiums führt. Innerhalb des Lamellipodiums sind Bündel paralleler Aktinfilamente zu finden. Sie werden als Mikrospikes bzw. als Filopodien bezeichnet, sobald sie das Lamellipodium verlassen. (Faix und Rottner, 2006, Faix et al., 2009, Small et al., 2002). Filopodien sind fingerförmige, hochdynamische Zellfortsätze, besitzen unterschiedliche Aufgaben und vermitteln unter anderem Zell-Zell Kontakte, dienen als Tastorgane des extrazellulären Raums oder bilden Vorstufen von fokalen Kontakten und Stressfasern aus (Faix et al., 2009). Wenn Lamellipodien keinen Kontakt zum Substrat ausbilden und sich oft nach oben wölben werden sie aufgrund ihrer unregelmäßigen Morphologie als *Ruffles* bezeichnet (Abercrombie et al., 1970b). In Amöben, wie beispielweise *Dictyostelium* oder *Acanthamoeba* werden Lamellipodien als Pseudopodien (Scheinfüßchen) bezeichnet.

Im dritten Schritt der Zellbewegung entstehen innerhalb der Lamellipodien durch transmembrane Integrine Zell-Matrix-Kontakte, die durch Rekrutierung zahlreicher anderer Proteine zu fokalen Kontakten reifen (Rottner et al., 1999). Letztlich werden diese fokalen Kontakte mit Stressfasern verknüpft, die aus antiparallelen Aktinbündeln bestehen (Hotulainen und Lappalainen, 2006). Nachdem im hinteren Teil der Zelle Zell-Matrix-Kontakte gelöst wurden, wird im vierten Schritt durch eine Myosin-abhängige Kontraktion der Stressfasern die Zelle in Bewegungsrichtung nach vorn gedrückt (Lauffenburger, 1996).



**Abbildung 5: Organisation des F-Aktins in der motilen Zelle (aus Faix et al., 2009).** Die Zellfront einer migrierenden Zelle beinhaltet ein dichtes Netzwerk aus Aktinfilamenten, die das Lamellipodium und –als dichte Bündel zusammengelagert– Filopodien bilden. Hinter dem Lamellipodium und im Zellkörper sind fokale Kontakte zu finden, an denen Stressfasern verankert sind. Zusätzliche F-Aktin Strukturen werden bei der Phagozytose und der Endozytose ausgebildet.

## 1.3 Aktin-bindende Proteine

Das G-Aktin einer Zelle - in *D. discoideum* etwa  $175 \mu\text{M}$  - würde unter physiologischen  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{K}^+$  Konzentrationen spontan zu F-Aktin polymerisieren. Allerdings beträgt das Verhältnis von F- zu G-Aktin unter nicht-stimulierten Bedingungen ca.  $3,2 \pm 0,9$  zu 1, was einem Überschuss an G-Aktin mehrerer Zehnerpotenzen über der kritischen Konzentration der Filamentenden entspricht (Haugwitz et al., 1994, Koestler et al., 2009). Dieser Zustand wird *in vivo* durch die Interaktion mit Aktin-bindenden-Proteinen gewährleistet (Pollard und Borisy, 2003, Revenu et al., 2004, Winder und Ayscough, 2005):

### 1.3.1 Aktin-sequestrierende Proteine

Um Aktin in seiner monomeren Form zu halten, besitzen Zellen kleine Adapterproteine, die Aktin im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 binden und so die Bildung von Nukleationskeimen unterdrücken. Profilin ist ein  $15 \text{ kDa}$  großes Protein, das ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Profilin bindet zum einen monomeres Aktin am

Plusende, verhindert dessen spontane Nukleation und fördert den ADP→ATP Austausch (Goldschmidt-Clermont und Janmey, 1991, Mockrin und Korn, 1980, Pollard, 1984, Reichstein und Korn, 1979). Zum anderen bindet es mit  $\mu\text{M}$  Affinität an Prolin-reiche-Motive (meist mit der Sequenz GP<sub>5</sub>) (Machesky et al., 1994) und wird *in vivo* zur Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen durch viele Aktin-assoziierte Proteine verwendet (siehe Abbildung 6 und Abbildung 9). *D. discoideum* besitzt drei Profilin Isoformen, DdProfilin I, II und III wovon lediglich DdProfilin I und II in großer Menge exprimiert werden (Arasada et al., 2007, Haugwitz et al., 1994). Weitere wichtige sequestrierende Faktoren sind Proteine der  $\beta$ -Thymosin Familie (Mannherz und Hannappel, 2009). Diese kurzen, lediglich 40-50 Aminosäuren langen Peptide binden Aktin-Monomere mit hoher Affinität über ein WH2-Motiv (Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein Homology 2; siehe Kapitel 1.6).

### 1.3.2 Aktinfilament Nukleatoren

Um eine zeitlich und räumlich geordnete Polymerisation neuer Aktinfilamente auszulösen benötigt die Zelle spezialisierte Proteine, die sowohl die thermodynamische Barriere der spontanen Aktinpolymerisation überwinden als auch den Einfluss von sequestrierenden Proteinen umgehen.

Der als erstes identifizierte Aktin Nukleator ist der Arp2/3-Komplex, ein Proteinkomplex aus 7 Untereinheiten, von denen Arp2 und Arp3 (Actin related protein) hohe Sequenzhomologien zu Aktin aufweisen. Der Arp2/3-Komplex ist inaktiv und wird durch Proteine wie WASP (Wiskot-Aldrich Syndrom Protein) oder den Scar/WAVE-Komplex (Suppressor of cyclic AMP receptor mutation and WASP and Verprolin homologous protein) aktiviert, woraufhin er entweder das Plusende oder die Seite eines bestehenden Aktinfilaments bindet und ein „Tochterfilament“ nukleiert, welches dann in einem Winkel von rund 70° weiterwächst (Amann und Pollard, 2001a, Amann und Pollard, 2001b, Machesky und Gould, 1999, Mullins und Pollard, 1999). Der Arp2/3-Komplex ist essentiell für die Ausbildung des Lamellipodiums (siehe Kapitel 1.7) und bildet die Grundlage vieler Modelle der Aktin-basierenden Motilität (Pollard, 2003, Steffen et al., 2006).

Formine stellen eine weitere Klasse von Aktin Nukleatoren dar. Sie sind ubiquitär vorkommende Multi-Dömänenproteine, die an einer Vielzahl wichtiger Aktin-basierter Prozesse beteiligt sind (Faix und Grosse, 2006). Im Gegensatz zum Arp2/3-Komplex nukleieren sie lineare Aktinfilamente. Der Formin-vermittelte Nukleationsmechanismus unterscheidet sich grundlegend von dem des Arp2/3-Komplexes: Während letzterer durch molekularen Mimikry das Plusende eines Filaments durch Arp2 und Arp3 nachbildet, stabilisieren Formine die energetisch ungünstigen Aktin Di- und Trimere mit Hilfe ihrer F-

Aktin bindenden FH2-Domäne (Chesarone und Goode, 2009, Goode und Eck, 2007). Nach der Nukleation bleiben Formine prozessiv mit dem wachsenden Plusende verbunden. Sie sind unter anderem an der Ausbildung linearer, paralleler Aktinbündel in Filopodien beteiligt (Schirenbeck et al., 2005). Eine detaillierte Beschreibung der Formine ist im Kapitel 1.4. dargelegt.

Neben den bisher genannten Forminen und dem Arp2/3-Komplex wurden vor kurzem neue Aktin Nukleatoren identifiziert, die mit Hilfe von WH2-Domänen Aktinfilamente bilden. WH2-Domänen kommen in einer Vielzahl Zytoskelett-assoziiierter Proteine vor, wo sie sowohl an der Nukleation, Elongation als auch Bündelung von Aktinfilamenten beteiligt sind (Chereau et al., 2005, Dominguez, 2007). Die am besten charakterisierten Nukleatoren dieses Typs, die 4 bzw. 3 aneinandergereihte WH2-Motive enthalten und durch Rekrutierung von Aktin-Monomeren die Bildung von Nukleationskeimen begünstigen, sind Spire und Cobl (Qualmann und Kessels, 2009). Die Eigenschaften von WH2-Motiven werden in Kapitel 1.6 detailliert beschrieben.

### **1.3.3 Aktinfilament Elongatoren**

Für lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Protrusion von Lamellipodien und Filopodien durch spontan wachsende Aktinfilamente verursacht wird (Pollard et al., 2000). Dieses Dogma wurde jedoch mit der Entdeckung der Formine widerlegt. Proteine dieser Klasse nukleieren nicht nur neue Filamente, sie binden während des Filamentwachstums das Plusende des Aktinfilaments über ihre dimere FH2-Domäne und bleiben prozessiv mit ihm verbunden (Goode und Eck, 2007, Paul und Pollard, 2009b). Außerdem sind Formine in der Lage über die Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen durch ihre Prolin-reiche FH1 Domäne die Elongationsrate des Aktinfilaments je nach Formin spürbar zu erhöhen (Neidt et al., 2008, Vidali et al., 2009).

Ein ähnlicher Elongationsmechanismus wurde für Proteine der Ena/VASP Familie postuliert, da sie ebenfalls Prolin-reiche Sequenzen für die Rekrutierung von Profilin-Aktin sowie F- und G-Aktin Bindungsdomänen besitzen (Dickinson, 2009, Ferron et al., 2007, Sechi und Wehland, 2004). Eine beschleunigte Aktinpolymerisation durch Ena/VASP Proteine war zu Beginn dieser Arbeit experimentell jedoch noch nicht erbracht worden, sodass diesen Aktinregulatoren lediglich eine passive Rolle bei der Aktinpolymerisation zugesprochen wurde (Bear et al., 2002).

Da die Analyse des Ena/VASP Orthologs DdVASP aus *Dictyostelium* und die Mechanismen der Aktinpolymerisation durch Aktinfilament Elongatoren zentrale Themen dieser Arbeit sind,

werden diese Proteine sowie die Formine in den Kapiteln 1.4, 1.4.1 und 1.5 genauer beschrieben.

### 1.3.4 Aktinfilament-depolymerisierende Proteine

Bestehende Aktinfilamente müssen wieder depolymerisiert werden, um den G-Aktin-Pool der Zelle aufrecht zu erhalten. Diese Aufgabe wird vom sogenannten Aktin Depolymerisationsfaktor Cofilin (ADF/Cofilin) übernommen (Van Troys et al., 2008). Die Proteine dieser Familie sind nur etwa 15-19 kDa groß und binden bevorzugt ADP-Aktinfilamente woraufhin eine Konformationsänderung induziert wird, die das Filament destabilisiert und letztlich zum Bruch des Filaments führt (Galkin et al., 2003, McCullough et al., 2008, McGough et al., 1997). Neue Studien haben gezeigt, dass Cofilin in Zusammenspiel mit Coronin und Aip1 (*Actin interacting protein 1*) die Depolymerisation von Aktinfilamenten zusätzlich beschleunigt (Gandhi et al., 2009, Kueh et al., 2008).

### 1.3.5 Aktinfilament-verkappende Proteine

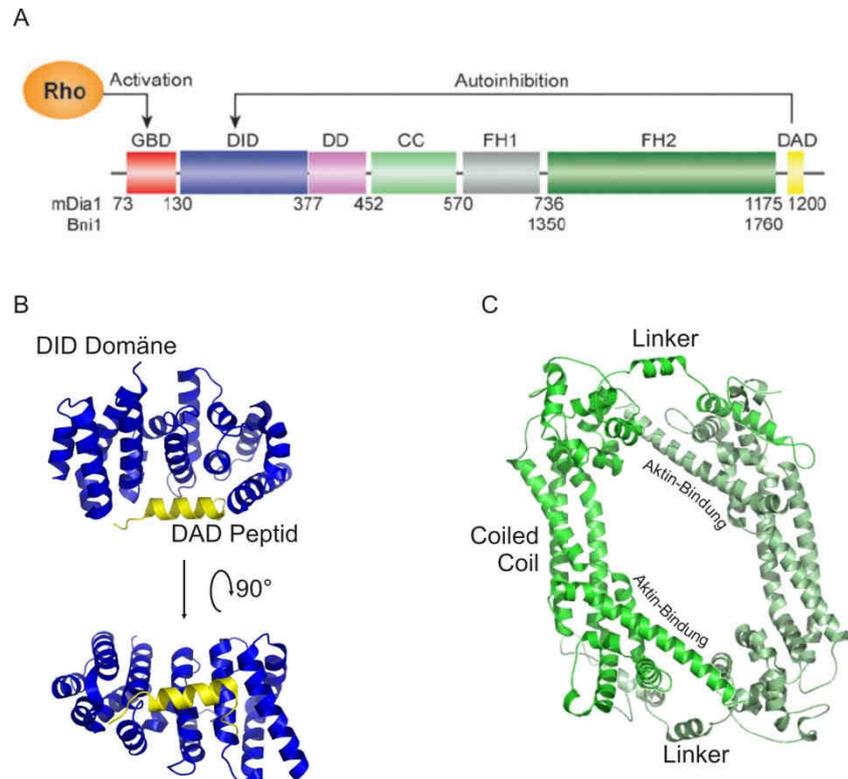
Um eine ungerichtete Polymerisation des gesamten G-Aktins der Zelle zu unterbinden, sind spezielle Inhibitor-Proteine nötig, die als *Capping* Proteine (CP) bezeichnet werden. Sie binden mit nM Affinität an die Plusenden von Aktinfilamenten und terminieren dadurch die Filamentelongation (Caldwell et al., 1989). Man unterscheidet zwischen monomeren CP, wie z.B. CapG, Fragmin und Gelsolin, und heterodimeren CP, wie z.B. CapZ aus dem Muskel oder Cap32/34 aus *Dictyostelium* (Cooper und Sept, 2008, Haus et al., 1991, Schafer et al., 1996).

## 1.4 Proteine der Formin Familie

Formine bilden eine relativ neue Proteinklasse, die eine zentrale Rolle bei dem Auf- und Umbau des Aktinzytoskeletts in nahezu allen eukaryotischen Zellen spielt. Obwohl die Domänenorganisation der Formine grundsätzlich identisch ist (siehe unten), sind sie an sehr unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt (Chesarone und Goode, 2009, Faix und Grosse, 2006, Goode und Eck, 2007). Die Formine *Diaphanous* der Fruchtfliege, sowie Cdc12 der Spalthefe sind essentiell für die Ausbildung des zytokinetischen Rings während der Zellteilung (Castrillon und Wasserman, 1994, Kovar et al., 2003). Andere Formine wie Cappuccino (Fruchtfliege) oder Bni1p (Bierhefe) sind in der Zellpolarisation involviert (Evangelista et al., 2002, Wu et al., 2006). Untersuchungen in motilen Zellen haben zudem

gezeigt, dass die Formine mDia1 und mDia2, sowie das Formin dDia2 aus *Dictyostelium* an der Ausbildung von Filopodien beteiligt sind (Block et al., 2008, Higashida et al., 2004, Schirenbeck et al., 2005).

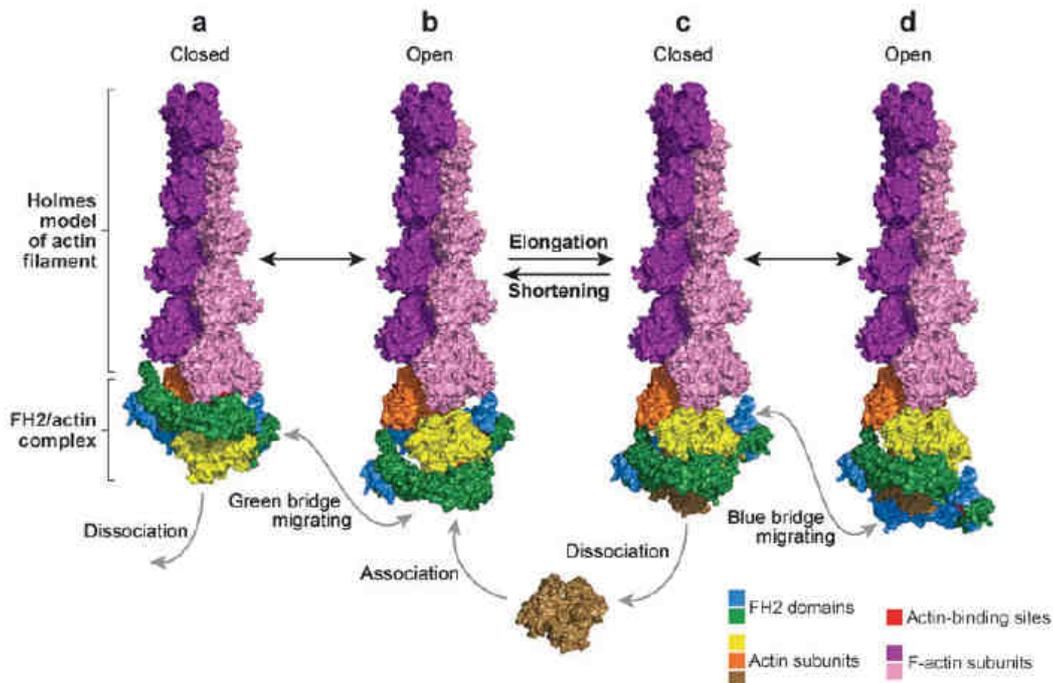
Formine sind Multidomänenproteine und sind aus mehr als 1000 Aminosäuren aufgebaut. Die über GTPasen regulierten *Diaphanous-verwandten* Formine besitzen eine charakteristische Domänenanordnung aus einer N-terminalen GTPase-Bindungsdomäne (GBD), gefolgt von einer *Diaphanous* inhibierenden Domäne (DID), einer kurzen Dimerisierungsdomäne (DD), einer Coiled-Coil (CC) und einer Prolin-reichen Formin-Homologie 1 (FH1)-Domäne, sowie der mit Aktin interagierenden, ringförmigen, dimeren FH2-Domäne (Abbildung 6; Chesarone und Goode, 2009, Faix und Rottner, 2006, Higgs, 2005). Eine *Diaphanous*-autoregulatorische-Domäne (DAD) befindet sich am C-Terminus und bewirkt durch Bindung an die DID, dass das Formin in einem inaktiven, „geschlossenen“ Zustand vorliegt (Abbildung 6A und B). Die Bindung einer aktivierten GTPase an die GBD bewirkt die Aufhebung der DID-DAD Wechselwirkung, woraufhin das Formin in den aktiven, „offenen“ Zustand wechselt (Alberts, 2001, Watanabe et al., 1997). Um Aussagen über die zelluläre Lokalisation von Forminen treffen zu können, müssen diese meist in ihrer konstitutiv aktiven Form exprimiert werden, da Volle-Länge Formin-Konstrukte sich aufgrund der Autoinhibition nur diffus in der Zelle verteilen (Alberts, 2001, Block et al., 2008, Li und Higgs, 2005). Zu diesem Zweck wird entweder die N-terminale regulatorische Domäne oder die C-terminale DAD deletiert, woraufhin eine starke Lokalisation der Formine an spezifische Regionen der Zelle erfolgt (Block et al., 2008, Seth et al., 2006).



**Abbildung 6: Domänenorganisation und Struktur der Formine. (A)** Domänenorganisation und Autoinhibierung von *Diaphanous* Forminen (aus Goode und Eck, 2007). GBD: GTPase Bindungsdomäne; DID: *Diaphanous* inhibierende Domäne; DD: Dimerisierungsdomäne; CC: Coiled-Coil; FH: Formin Homologie; DAD: *Diaphanous* autoregulatorische Domäne. **(B)** Kristallstruktur des DID-DAD-Komplexes von mDia1 (nach Nezami et al., 2006). **(C)** Kristallstruktur des FH2-Dimers aus Bni1p (nach Otomo et al., 2005). Beide FH2-Untereinheiten sind über flexible Linker miteinander verbunden.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der FH2-Domäne und der Wechselwirkung von Forminen mit Aktin wurde erstmals 2002 für das Formin Bni1 in Hefezellen beobachtet (Evangelista et al., 2002, Sagot et al., 2002). Anschließende Untersuchungen mit aufgereinigten Proteinen zeigten, dass Formine potente Aktin-Nukleatoren sind. *In vitro* Analysen des Wachstums einzelner Aktinfilamente durch TIRF-Mikroskopie von Kovar und Kollegen lieferten erstmals eindeutige Hinweise darauf, dass Formine nach der Nukleation nicht wie der Arp2/3-Komplex und Spire am Minusende des gebildeten Filaments verweilen, sondern prozessiv mit dem Filament-Plusende assoziiert bleiben (Kovar und Pollard, 2004a, Kovar, 2006, Paul und Pollard, 2009a). Die Prolin-reichen FH1-Domänen rekrutieren Profilin-Aktin-Komplexe, die von der FH2-Domäne in das wachsende Filament inkorporiert werden, was -je nach Formin- zu einer teils dramatischen Beschleunigung des Filamentwachstums führt (Kovar, 2006, Neidt et al., 2009, Paul und Pollard, 2008). Diese Entdeckungen, in

Kombination mit den bekannten Kristallstrukturen des FH2-Aktin-Komplexes, führte zur Postulierung des sogenannten *stair-stepping* Mechanismus (Abbildung 7, Kozlov und Bershadsky, 2004), bei dem das Formin schrittweise auf dem wachsenden Filament entlangläuft während Monomere inkorporiert werden.



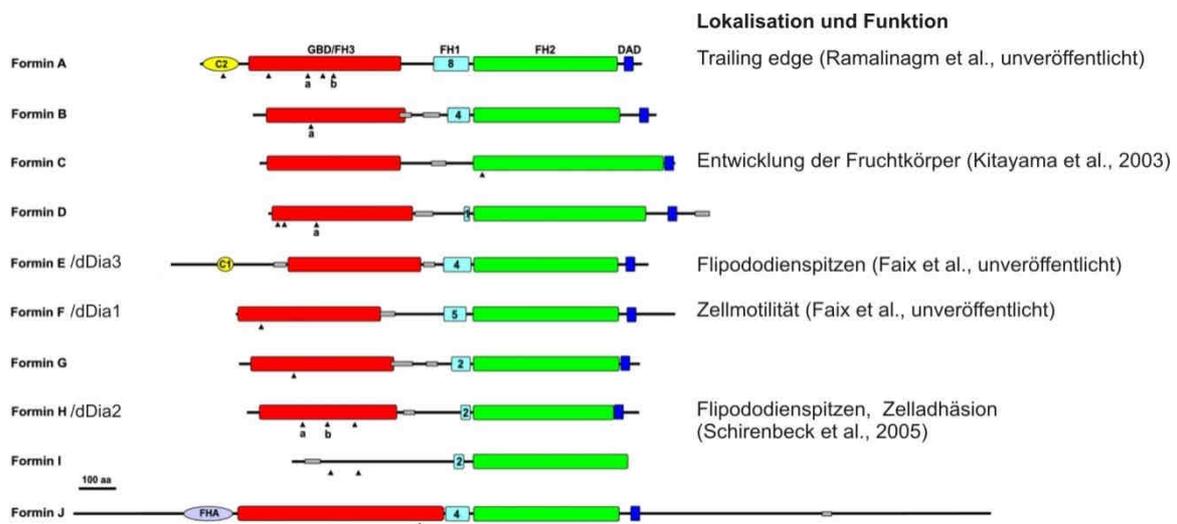
**Abbildung 7: Mechanismus der prozessiven Aktinfilament-Polymerisation durch FH2-Domänen.** Das flexible FH2-Dimer bindet das Plusende des wachsenden Filaments (*closed*). Eine FH2-Untereinheit wird abgelöst und ermöglicht die Inkorporation eines weiteren Aktin-Monomers (*open*). Die anschließende Bindung der FH2-Untereinheit begünstigt die Ablösung der anderen Untereinheit, die so wiederum Aktin-Inkorporation ermöglicht (aus Goode und Eck, 2007).

## 1.4.1 Formine in *Dictyostelium*

*Dictyostelium* Amöben zeichnen sich durch eine außerordentlich hohe Zellmotilität aus, die der von Leukozyten ähnelt. Tatsächlich besitzen *Dictyostelium* Zellen einen Großteil des Proteinapparates, der auch in Säugerzellen für Aktin-basierte Zellbewegung benötigt wird, darunter Gene für den Arp2/3-Komplex, WASP, verschiedene Profilin Isoformen, *Capping* Proteine und diverse regulatorische GTPasen und Kinasen (Eichinger et al., 2005, Han et al., 2006, Somesh et al., 2006a, Somesh et al., 2006b). *Dictyostelium* besitzt darüber hinaus zehn verschiedene Formin-Isoformen, die mit Ausnahme von Formin I zu den autoregulierten *Diaphanous* Forminen gehören (Abbildung 8; Rivero et al., 2005).

Die Deletion des Gens von Formin C, welches interessanterweise keine FH1-Domäne besitzt, führte zu einem Motilitätsdefekt sowie zu fehlerhaften Morphologien der Fruchtkörper. GFP-Konstrukte von Formin C lokalisierten an endozytotischen und makropinozytotischen Einstülpungen sowie an Zell-Zell Kontakten, was auf eine eventuelle Rolle bei der Endozytose hindeutet (Kitayama und Uyeda, 2003).

Die Deletion des *drf2*-Gens, welches für das Formin H (dDia2) codiert, führte zu einer dramatischen Verringerung der Filopodienanzahl und -länge sowie zu einer erhöhten Motilität der Zellen. GFP-dDia2 lokalisiert in Filopodienspitzen, wo es aller Wahrscheinlichkeit nach Aktinfilamente nukleiert und/oder elongiert (Schirenbeck et al., 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass dDia2 *in vitro* sogar in Gegenwart von *Capping* Proteinen die Aktinpolymerisation stark induzieren kann. Nachfolgende Untersuchungen durch *in vitro* TIRF-Mikroskopie an einzelnen Aktinfilamenten deuten jedoch darauf hin, dass das Formin dDia2 eine im Vergleich zu anderen Forminen aus Säugern nur geringe Prozessivität besitzt. Die Hauptaufgabe dieses Formins scheint also in der Nukleation neuer Filamente zu liegen, während die Elongation der Filamente eventuell durch andere Proteine wie VASP bewerkstelligt wird (Faix et al., 2009, Breitsprecher et al., unveröffentlicht). Vorläufige Ergebnisse der Deletion von ForA und ForE mit anschließender Lokalisation von GFP-Konstrukten zeigten, dass ForA als bisher erstes bekanntes Formin in der *trailing edge* der Zelle sowie in der Teilungsfurche lokalisiert, während ForE (dDia3) ähnlich wie dDia2 in Filopodienspitzen lokalisiert (Ramalingam et al., 2010, Faix et al., unveröffentlicht). Das Vorhandensein von verschiedenen Forminen in Filopodienspitzen deutet darauf hin, dass Formine eventuell überlappende Aufgabengebiete in der Zelle besitzen.

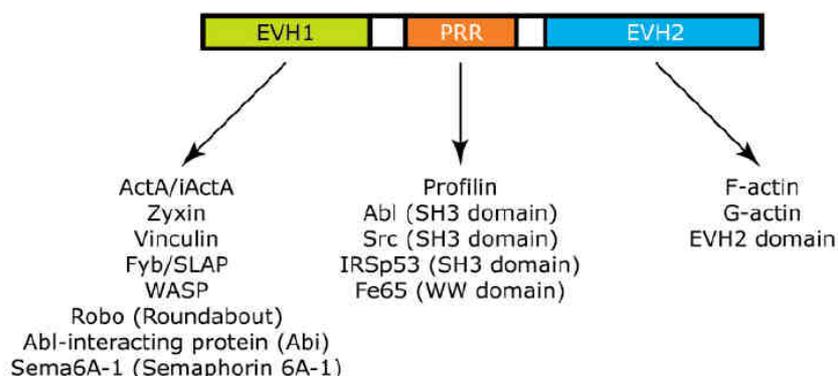


**Abbildung 8: Domänenstruktur der Formine aus *D. discoideum* (verändert nach Rivero et al., 2005).** Alle Formine bis auf Formin I und Formin C besitzen die typischen GBD, FH1- und FH2-Domänen sowie die C-terminale DAD-Domäne. Die C1- und C2-Domänen in Formin A und E sind Protein-Kinase C Domänen, die eine Interaktion mit Lipiden vermitteln. Bisher wurden nur die Funktionen von Formin C und Formin H (dDia2) detailliert untersucht.

## 1.5 Ena/VASP Proteine

Ena/VASP (*Enabled/Vasodilator-stimulated Phosphoprotein*) Proteine wurden erstmals 1989 und 1990 als Substrat der Proteinkinase A und C in Blutplättchen beschrieben, wo sie wichtige Regulatoren der Aktinpolymerisation sind (Halbrugge und Walter, 1989, Halbrugge und Walter, 1990). In Säugern werden drei Isoformen exprimiert: VASP, Mena (*Mammalian Ena*) und EVL (*Ena/VASP like*). *Dictyostelium*-Zellen hingegen besitzen mit DdVASP lediglich eine Isoform (Han et al., 2002). Alle weisen eine konservierte Domänenstruktur auf, bestehend aus einer N-terminalen *Ena/VASP homology 1* (EVH1)-Domäne, die für die Lokalisation in Aktin-reichen Regionen verantwortlich ist, gefolgt von einer *Prolin-reichen-Domäne* (PRD) mit aufeinanderfolgenden GP<sub>5</sub>-Motiven und der C-terminalen EVH2-Domäne, die die Wechselwirkung mit Aktin vermittelt. Innerhalb der EVH2-Domäne liegen zwei WH2-artige Aktin Bindungsstellen, die sogenannte GAB (*G-Aktin Bindungsstelle*) und FAB (*E-Aktin Bindungsstelle*), gefolgt von einer *coiled-coil* Region, die die Tetramerisierung des Proteins bewirkt (Abbildung 9; Bachmann et al., 1999, Fedorov et al., 1999, Huttelmaier et al., 1999, Kuhnel et al., 2004). Aufgrund der außerordentlich flexiblen Struktur der PRD und der EVH2-Domäne sind lediglich Kristallstrukturen der EVH1-Domäne im Komplex mit Peptiden der Liganden ActA (ein Oberflächenprotein des intrazellulären Pathogens *Listeria monocytogenes*) und Tes sowie eines PRR-GAB Peptids im Komplex mit Profilin Aktin und

der Tetramerisierungsdomäne bekannt (Boeda et al., 2007, Ferron et al., 2007, Kuhnel et al., 2004, Prehoda et al., 1999, Sechi und Wehland, 2004).



**Abbildung 9: Domänenorganisation und Bindungspartner von Ena/VASP Proteinen (aus Sechi und Wehland, 2004).** Alle Ena/VASP Proteine bestehen aus der N-terminalen EVH1-Domäne, einer zentralen Prolin-reichen Domäne und der C-terminalen EVH2-Domäne. Die EVH1-Domäne vermittelt die intrazelluläre Lokalisation des Proteins über eine Vielzahl von Bindungspartnern. Die PRD bindet Profilin und Profilin-Aktin und kann mit SH3 und WW-beihaltenden Proteinen wechselwirken. Die EVH2-Domäne vermittelt G- und F-Aktin Interaktion und führt zur Tetramerisierung des Proteins.

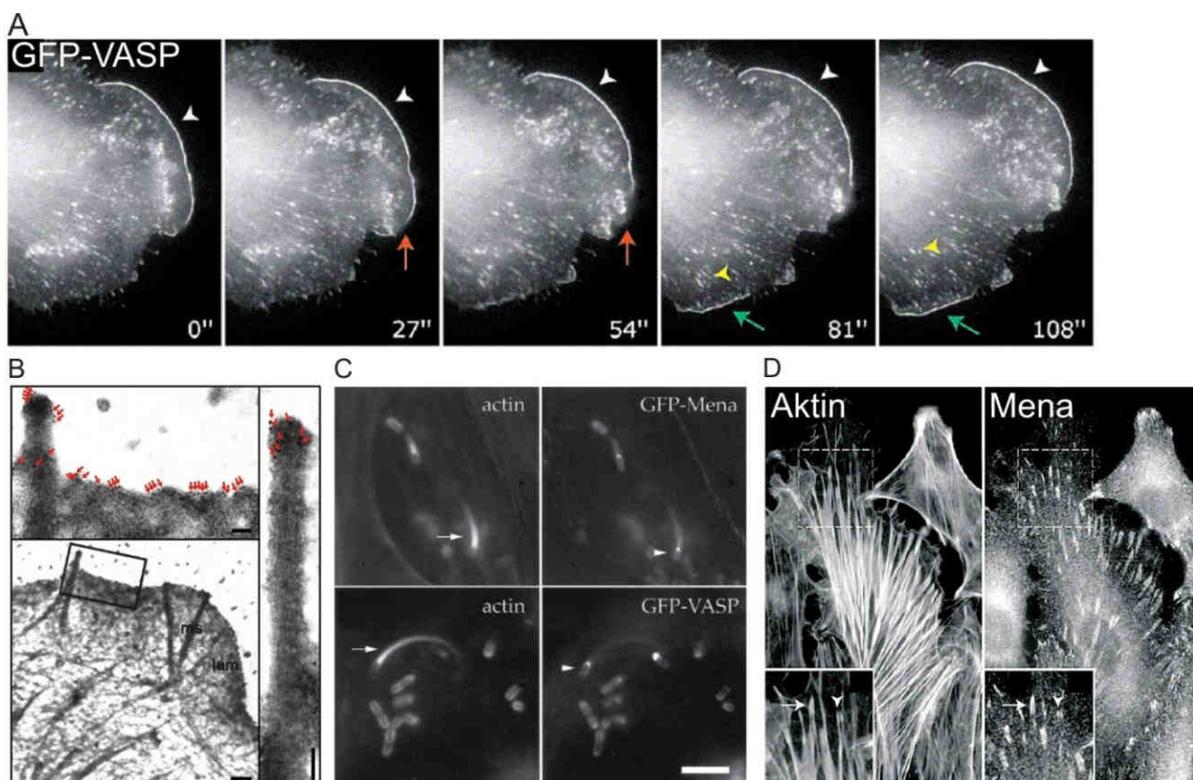
Die EVH1-Domäne gehört zur PH (*Pleckstrin homology*) -Domänen Superfamilie, bindet allerdings nicht an Lipide wie PIP<sub>2</sub> (Ball et al., 2000, Barzik et al., 2001, Beneken et al., 2000, Fedorov et al., 1999, Volkman et al., 2002). Eine Bindung erfolgt stattdessen mit Peptiden über sogenannte FP<sub>4</sub> (oder verwandte)- Motive, die die allgemeine Sequenz (F/W/Y/L)PPPPX(D/E)(D/E)(D/E) besitzen (X repräsentiert eine beliebige Aminosäure; Ball et al., 2000, Ball et al., 2002).

Die zentrale Prolin-reiche-Domäne bindet an SH3-Motive (*Src-homology 3*), WW-Motive (bestehend aus 2 konservierten Tryptophanen) und Profilin bzw. Profilin-Aktin-Komplexe (Comer et al., 1998, Ernekova et al., 1997, Gertler et al., 1995, Krugmann et al., 2001, Lambrechts et al., 2000). Als eine der Hauptaufgaben der PRD wird die Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen vermutet. Ob VASP in Lamellipodien und Filopodien jedoch tatsächlich diese Profilin-Aktin-Komplexe zur Aktinpolymerisation nutzt oder sie lediglich anderen Proteinen wie Forminen zur Verfügung stellt ist bislang unklar.

Die biochemische Charakterisierung der EVH2-Domäne führte in der Vergangenheit zu zahlreichen Kontroversen, da die Vielzahl der Effekte von VASP auf die Aktinpolymerisation und –Bindung mit den üblichen Methoden zur Untersuchung der Aktinpolymerisation (z.B. Pyrene-Assays) nur schwer separierbar waren (Bear und Gertler, 2009, Trichet et al., 2008). Eindeutig belegt war, dass die EVH2-Domäne stabile Tetramere bildet, sowohl G- als auch

F-Aktin bindet und so die Bündelung von Aktinfilamenten induziert (Bachmann et al., 1999, Bearer et al., 2002, Huttelmaier et al., 1999, Walders-Harbeck et al., 2002). Außerdem führt die Anwesenheit von VASP in Pyrene-Assays zu einer beschleunigten Aktinpolymerisation (Barzik et al., 2005, Bearer et al., 2002, Huttelmaier et al., 1999). Dieser Effekt wurde jedoch sehr widersprüchlich interpretiert: Während einige Labore eine Nukleationsaktivität von VASP entdeckten (Fradelizi et al., 2001, Huttelmaier et al., 1999, Laurent et al., 1999, Plastino et al., 2004, Schirenbeck et al., 2006), wurde in anderen gezeigt, dass VASP – bei höheren Salzkonzentrationen von 150 mM KCl - die Aktinnukleation nicht förderte (Barzik et al., 2005, Bear et al., 2000). Die Zunahme der Pyrene-Fluoreszenz wurde hier mit einer beschleunigten Aktinfilament Elongation begründet.

Erste Hinweise auf eine potentielle Interaktion mit Aktin lieferten *in vivo* Studien mit dem Humanpathogen *Listeria monocytogenes* (Chakraborty et al., 1995, Smith et al., 1996). Dieses rekrutiert über das Oberflächenprotein ActA sowohl VASP als auch den Arp2/3-Komplex und führt dann -durch Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen und dessen Nukleation zu F-Aktin- zu einer massiven Aktinpolymerisation an der Bakterienoberfläche, die ihrerseits das Bakterium durch das Zytosol der Wirtszelle befördert (Abbildung 10C, Geese et al., 2000, Geese et al., 2002, Loisel et al., 1999).



**Abbildung 10: Zelluläre Lokalisation von Ena/VASP Proteinen. (A)** GFP-VASP lokalisiert an der Plasmamembran des wachsenden Lamellipodiums in B16F1-Melanoma Zellen (grüner Pfeil) und in

Fokalen Kontakten (gelber Pfeil) (aus Sechi und Wehland, 2004). **(B)** EM-Aufnahmen von GFP-VASP exprimierenden Zellen, die mit 10 nm Gold-Partikel-konjugierten Antikörpern gegen GFP inkubiert wurden. VASP akkumuliert in Filopodien spitzen sowie in kleinen Anhäufungen an der Lamellipodienfront (rote Pfeile, aus Rottner et al., 1999). **(C)** Mena und VASP werden an die Oberfläche von cytoplasmatischen *Listerien* rekrutiert (aus Geese et al., 2002). **(D)** Mena lokalisiert an fokalen Kontakten in Fibroblasten (aus Sechi und Wehland, 2004).

Vor diesem Hintergrund war es nicht überraschend, dass Ena/VASP Proteine in der Zelle mit dynamischen Aktinstrukturen kolokalisieren: VASP ist in der Front von wachsenden Lamellipodien angereichert und die Menge an VASP in der Front korreliert direkt mit der Geschwindigkeit, mit der sich das Lamellipodium nach vorne bewegt (Abbildung 10A und B; Koestler et al., 2008, Lacayo et al., 2007, Rottner et al., 1999). Der genaue Einfluss von VASP auf die Architektur und Ausdehnung des Lamellipodiums wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert. Mislokalisierung von VASP an Mitochondrien führte in Fibroblasten zu einer geringeren Protrusionsrate des Lamellipodiums und zu einer Zunahme an kurzen und stärker verzweigten Filamenten im Lamellipodium, während die Gesamtmotilität der Zellen erhöht wurde (Bear et al., 2002). Diese Effekte wurden durch biochemische Experimente begründet, in denen gezeigt wurde, dass VASP die Bindung von *Capping* Proteinen an das Plusende von wachsenden Aktinfilamenten verhindert und so ein Filamentwachstum fördert (Barzik et al., 2005, Bear et al., 2002, Pasic et al., 2008). Diese sogenannte *anti-capping* Aktivität von VASP konnte jedoch in anderen Studien nicht nachgewiesen werden (Boujemaa-Paterski et al., 2001, Samarina et al., 2003, Schirenbeck et al., 2006). Der genaue molekulare Mechanismus der Interaktion von VASP mit Aktin im Lamellipodium blieb somit weiterhin unklar.

Neben der Regulation der Ausdehnung und Morphologie des Lamellipodiums sind Ena/VASP Proteine auch in die Bildung von Filopodien involviert, in deren Spitzen sie lokalisieren. Der genetische *Knock-out* von VASP in *Dictyostelium* Zellen führte zu einer starken Verminderung der Filopodienbildung (Han et al., 2002, Schirenbeck et al., 2006). Ähnliche Effekte auf die Filopodienbildung wurden in Neuronen und Fibroblasten dokumentiert, nachdem alle drei Ena/VASP Proteine eliminiert worden waren (Applewhite et al., 2007, Dent et al., 2007, Kwiatkowski et al., 2007). Eine Deletionsmutante des *Dictyostelium* Orthologs ohne FAB-Motiv konnte die Filopodiumbildung nicht wieder herstellen. Da diese Mutante *in vitro* im Gegensatz zum Wildtyp Protein nicht mehr in der Lage war Aktinfilamente zu bündeln, wurde postuliert, dass VASP Aktinfilamente in der Filopodien spitze transient bündelt und somit durch Stabilisierung der Filamente zur Filopodienbildung beiträgt (Schirenbeck et al., 2006). Studien in MV<sup>D7</sup> Fibroblasten, welche keine der drei Ena/VASP Isoformen exprimieren, haben gezeigt, dass die Rekonstitution mit

einer VASP Mutante ohne FAB von zu einer verminderten Filopodienbildung führt, während die Deletion der GAB eine kürzere Verweildauer des Proteins in der Filopodienspitze zur Folge hatte (Applewhite et al., 2007). Die Untersuchung der Einflüsse verschiedener VASP Deletionsmutanten auf die Filopodienbildung in *Dictyostelium* Zellen war einer der Schwerpunkte dieser Arbeit.

## 1.6 WH2-Motive

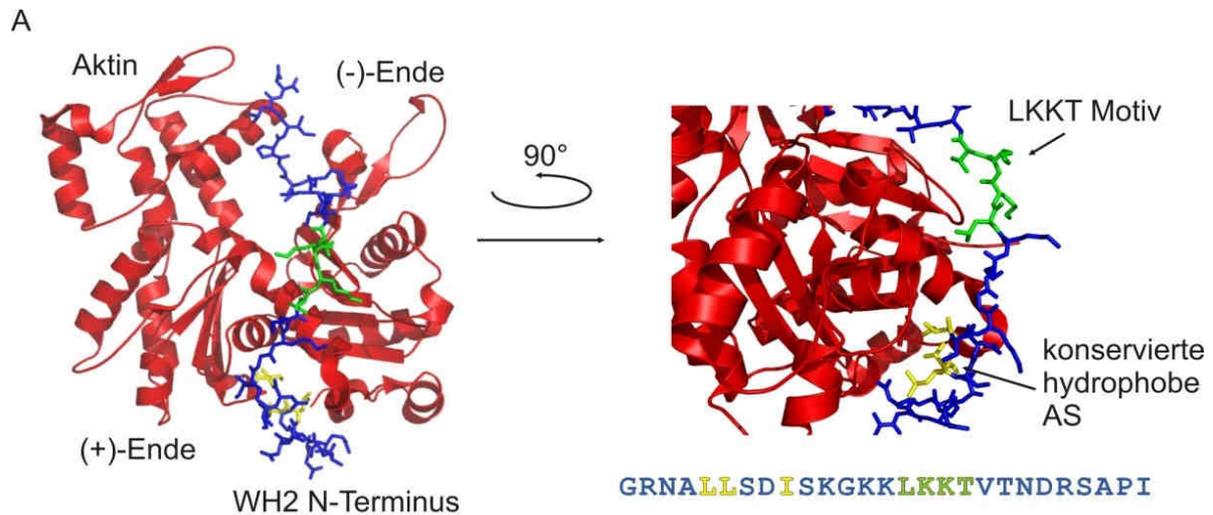
WH2-Motive sind ca. 20 Aminosäure lange Aktinbindungsmotive, die über hydrophobe Wechselwirkungen an das Plusende und an die Seite des Aktin-Monomers binden. Zuerst wurde das WH2- (WASP Homology 2) Motiv im namensgebenden WASP identifiziert, wo es ein essentielles Element für dessen Funktion als Aktivator des Arp2/3-Komplexes darstellt (Paunola et al., 2002, Suetsugu et al., 1999). Schnell wurden weitere Zytoskelett-assoziierte Proteine gefunden, die eine oder mehrere dieser WH2-Motive besaßen, darunter VASP, WIP, Spire, Verprolin, Scar/WAVE und MIM (Tabelle 1; Ferron et al., 2007, Lee et al., 2007, Thanabalu und Munn, 2001, Vaduva et al., 1999, Wellington et al., 1999, Zalevsky et al., 2001). Aufgrund der niedrigen Sequenzhomologie zwischen unterschiedlichen WH2-Motiven und deren geringer Länge war man sich lange Zeit nicht einig, ob diese Sequenzen tatsächlich einer gemeinsamen Familie von Aktinbindungsmotiven zuzuordnen sind (Edwards, 2004). Klarheit verschaffte eine detaillierte Strukturanalyse durch Dominguez und Kollegen, in der gezeigt werden konnte, dass WH2-Motive an dieselben spezifischen Bereiche des Aktin-Monomers binden (Abbildung 11; Chereau et al., 2005, Dominguez, 2007).

Protein	Anzahl WH2-Motive	Postulierte Funktion der WH2-Motive
ABBA	1	G-Aktin Bindung (Saarikangas et al., 2008)
Cordon-Bleu	3	<i>de novo</i> Aktin Nukleation (Ahuja et al., 2007)
Ena/VASP	2	Aktinflament Elongation und Bündelung (Breitsprecher et al., 2008, Ferron et al., 2007)
Formine FRL2 und 3	1-2	G-Aktin Bindung, Bündelung von F-Aktin (Vaillant et al., 2008)
IrSP53	1	F-Aktin Bindung, Bündelung (Scita et al., 2008)
JMY	3-4	<i>de novo</i> Aktin Nukleation, G-Aktin Transfer an Arp2/3-Komplex

		(Zuchero et al., 2009)
Lmod	1	G-Aktin Bindung, Nukleation (Chereau et al., 2008)
MIM	1	G-Aktin Bindung (Mattila et al., 2003)
Spire	4	<i>De novo</i> Aktin Nukleation eines linearen Aktin Tetramers, evtl. im Zusammenspiel mit Forminen (Bosch et al., 2007, Quinlan et al., 2005)
WASP	1-2	Nukleation, Bereitstellung von G-Aktin für den Arp2/3-Komplex, Filament Verankerung (Blanchoin et al., 2000, Co et al., 2007, Marchand et al., 2001)
WAVE	1-2	G-Aktin Bindung (Chereau et al., 2005)
WHAMM	2	Nukleation, Bereitstellung von G-Aktin für den Arp2/3-Komplex (Campellone et al., 2008)

**Tabelle 1: Funktion von Proteinen mit WH2-Motiven.** Abkürzungen: ABBA, *actin-bundling protein with BAIAP2 homology*; FRL, *formin-related protein*; IRSp53, *insulin receptor tyrosine kinase substrate protein of 53 kDa*; JMY, *junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor*; Lmod, *Leimodin*; MIM, *missing in metastasis*; WASP, *Wiskott-Aldrich syndrome protein*; WAVE, *WASP family Verprolin-homologous protein*; WHAMM, *WAS protein homolog associated with actin, golgi membranes and microtubules*.

WH2-Motive weisen strukturelle Verwandtschaft mit dem G-Aktin sequestrierenden Protein Thymosin- $\beta$ 4 (T $\beta$ 4) auf, welches neben seinem WH2-Motiv eine C-terminale Helix besitzt, die das Minusende des Aktinfilaments bindet und so die Nukleation inhibiert. Die Bindung des WH2-Motivs an Aktin erfolgt über Wechselwirkung von konservierten Leucin und Isoleucin Resten der WH2 mit der hydrophoben Bindungstasche am Plusende des Aktin-Monomers. Außerdem bindet das sogenannte LKKT-Motiv (allgemein LxxV/T Motiv; x = basische AS) die Seite von Aktin, wobei die zentralen, geladenen Aminosäuren nach außen weisen (Chereau et al., 2005, Dominguez, 2007). Im Gegensatz zu T $\beta$ 4 fehlt jedoch die C-terminalen Helix und erlaubt dem gebundenen Aktin-Monomer die Bindung an das Plusende eines bestehenden Filaments. Zusammenfassend stellen WH2-Motive multifunktionale Aktin-Adapter dar, die je nach Anordnung verschiedene biochemische Effekte auf die Aktinpolymerisation ausüben können (Qualmann und Kessels, 2009).



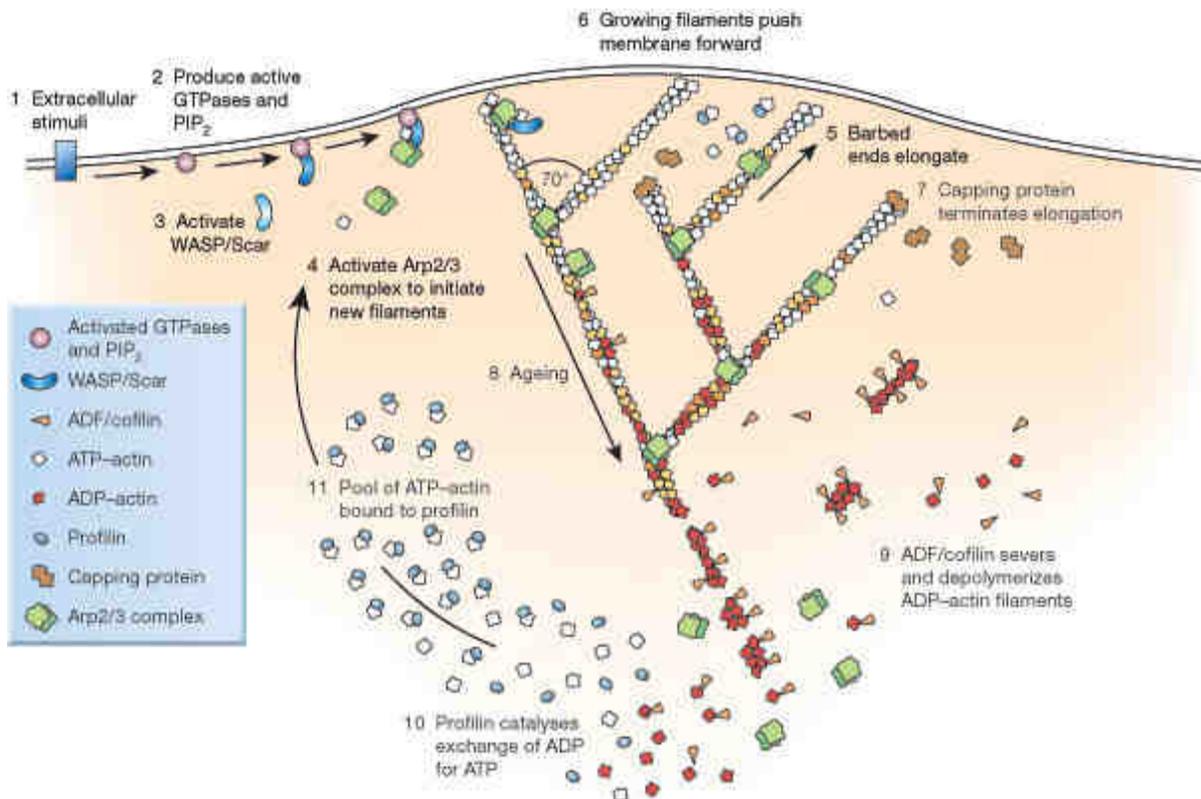
**B**

	αααααααα	linker	LKKT	βββ	αααααααα	
<b>Tβ domain</b>						
Tβ4 1			MSDKPDMAEIEK	FDKSKLKKTEIQEK	NPLPSKETIEQEK	QAGES 44
Ciboulot 1			MAAPAPALKDLPKVAENLKSQLEG	FNQDKLKNASTQEK	II LPTAEDVAAEK	TQ----- 53
Ciboulot 54			-----QSIFEGITAE	FNQNNLKHTEINEX	NPLPDKBAIEQEK	REK----- 91
Ciboulot 92			-----NQFIAGIEN	FDAKLLKHTEINEX	NVLPTKVIIEAK	QQA----- 129
<b>WH2 domain</b>						
<i>long type</i>						
Actobindin 1			MNPELQSAIGQGA	---ALKHAETVDKSAPQI	ENVTVKKV	----- 36
Actobindin 37			DRSSFLEEVAKPH	---ELKHAETVDKSGPAI	PEDVHVKKV	----- 73
Actobindin 74			DRGAFLSEIEKAAKQ			88
MIM 701			EPPSATVSPGQIPESDPADLS	PRDTPQGEDMLNAIRRGV	---KLKKTITNDRSAPRFS	755
WIP 6			PPAPPPPTFALANTEKPTLNKTEQAGRNALLSDISKGK	---	KLKKTVTNDRSAPILDKPKGAGAGGGGGGFG	75
<i>short type</i>						
VASP 196			AAHGAGGGPPPAPPLPAAQGP	GGGGAGAPGLAAAIAG	---KLRKYSKQEEASGGPTAPKAESGRSGGGGLM	263
WIP 76			-----GGGGF	GGGGGGGGGGGSGFGGGGPPGLGGLFQAGMP	---KLRSTANRDNDSSGGSRPPLLP	PPGGRSTSAKP 140
WASP 404			PSSGNGPAPPPLPPALVPAGGLAPGGGRGALLDQIRQGI	---	QLNKTPGAPESSALQPPPQSS	463
N-WASP 379			PPPPPPPPPPPLPSPDGDHQPVTAGNKAALLDQIREGA	---	QLKKVEQNSRPVSCS	----- 432
N-WASP 433			-----GRDALDQIRQGI	---	QLKSVADGQESTPPTPAPT	----- 464
WAVE2 410			ADGQPAIPPLSDTTKPKSSLPAVSDARSDLLSAIRQGF	---	QLRRVEEQREQEK	----- 462
Spire 342			KLIKASESSATTQELAKLGFNDWARFVQVVIDELRRGV	---	RLKKNHERTPIEYELT	----- 397
Spire 398			---PYEILMGDIRAKKY	---	QLRKVMVNGDIPPRVKKD	----- 429
Spire 430			---AHAMILEFIRSRP	---	PLKASDRQLGPPRMCEPS	----- 461
Spire 462			---PREQLMESIRK GK	---	ELKQITPPEAPTLRERVLPSANSTLSRSRQR	505
<b>CA region</b>						
WASP 464			---EGLV GALMHVMQ	---	KRSVAIHSSDEGEDQAG	---DEDEDEWDD 502
N-WASP 465			---SGIVGALMEVMQ	---	KRSVAIHSSDEDEDEDEEDEFEDDEWED	505
WAVE2 463			---DVVGN DVATILS	---	RRIAVEYSSEDDSS	---EF-DEDDWSD 498

**Abbildung 11: Sequenz- und Struktur von WH2-Motiven. (A)** Kristallstruktur des WH2-Motivs aus WIP im Komplex mit ATP-Aktin. Konservierte hydrophobe Aminosäuren (gelb) binden die hydrophobe Tasche des Plusendes, während das WH2-typische LKKT-Motiv (grün) an der Seite des Aktins bindet (adaptiert von Chereau et al., 2005). **(B)** Sequenzvergleich einiger WH2-Motive. Trotz teils geringer Sequenzhomologien sind die hydrophoben Aminosäuren des N-terminalen Bereichs und das LKKT-Motiv häufig konserviert.

## 1.7 Modelle der Aktin-basierenden Motilität

Der Arp2/3-Komplex wurde 1997 als essentieller Bestandteil der *actin patches* in Hefe und der Lamellipodien in Säugerzellen entdeckt (Machesky et al., 1997, Welch et al., 1997a, Winter et al., 1997). Außerdem lokalisiert der Arp2/3-Komplex auch an der Oberfläche von *L. monocytogenes*, wo er für die Ausbildung des Aktinschweifs zur intrazellulären Fortbewegung dieses Pathogens verantwortlich ist (May et al., 1999, Welch et al., 1997b, Welch et al., 1998). Mit der Bestimmung der Lokalisation des Komplexes in Bereiche der Zelle mit aktiver Aktinpolymerisation gingen erste biochemische Untersuchungen einher in denen gezeigt wurde, dass der Arp2/3-Komplex Aktinfilamente nukleiert, die Minusenden der Filamente bindet und Filamente verzweigt bzw. bündelt (Machesky, 1997, Mullins et al., 1998a, Mullins et al., 1998b, Zigmond, 1998). Arp2/3-Komplex vermittelte Nukleation und Verzweigung von F-Aktin bildet das Hauptelement des postulierten *dendritic nucleation* Models, das 1998 von Mullins und Kollegen vorgeschlagen und ein Jahr später durch elektronenmikroskopische Analysen von Svitkina und Borisy untermauert wurde, die ein dicht verzweigtes Netzwerk aus Aktinfilamenten im Lamellipodium zeigten (Abbildung 12; Mullins et al., 1998a, Svitkina und Borisy, 1999). Das Model beschreibt die Protrusion des Lamellipodiums durch kontinuierliche Nukleation und Verkappung neuer Aktinfilamente: Die Initiierung der Aktinpolymerisation erfolgt durch die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch Rho GTPasen über WASP oder Scar (Machesky und Gould, 1999, Rohatgi et al., 1999, Zigmond, 1998). Der aktivierte Komplex bindet an der Lamellipodienfront bestehende Aktinfilamente und nukleiert ein so genanntes Tochterfilament an der Seite oder Spitze des bestehenden (Mutter-) Filaments. Die Länge der wachsenden Filamente wird durch *Capping* Proteine reguliert, so dass ein Netzwerk aus kurzen, verzweigten Filamenten entsteht, die die Plasmamembran nach vorne drücken sollen (Pollard und Borisy, 2003). Die alternden ADP-Aktinfilamente werden durch ADF/Cofilin depolymerisiert und die freigewordenen Monomere nach Nukleotidaustausch durch Profilin in der Front als ATP-Aktin zur Verfügung gestellt.

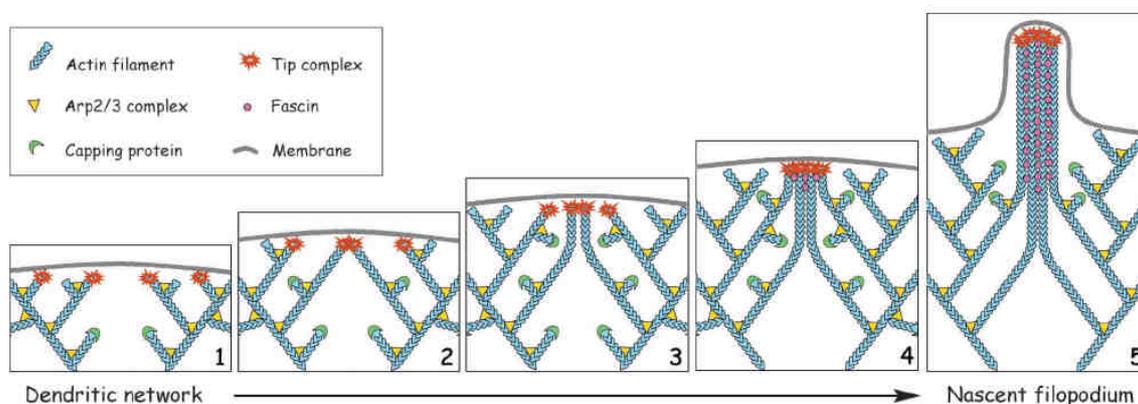


**Abbildung 12: Schema des *dendritic nucleation* Modells (aus Pollard und Borisy, 2003).** (1-4) Extrazelluläre Stimuli aktivieren GTPasen, die wiederum den Arp2/3-Komplex aktivieren, der neue Filamente nukleiert. (5-7) Nach kurzer Elongation dieser Filamente in Richtung Plasmamembran, die zur deren Protrusion führt, werden sie verkappt. (8-11) Alternde ADP-Aktinfilamente werden von ADF/Cofilin gebunden, was zur Depolymerisation führt. ADP-Aktin-Monomere werden anschließend durch Profilin zu ATP-Aktin umgewandelt, welches dann wieder für die Filamentelongation unterhalb der Plasmamembran verwendet werden kann.

Dieses Modell wird unter anderem durch *in vitro* Experimente gestützt, die zeigen, dass mit dem Arp2/3-aktivierenden C-Terminus von WASP beschichtete Kunststoffkügelchen in einem Medium aus monomeren Aktin und den oben genannten Proteinen Aktinpolymerisation auslösen, welche dann die Kügelchen durch das Medium bewegt (Wiesner et al., 2003). Dieser so genannte *biomimetic motility assay* enthielt somit alle nötigen Komponenten, um die Aktinpolymerisation im Lamellipodium zu simulieren. Seither wurden die Effekte zahlreicher anderer Proteine, unter anderem von WH2-Proteinen wie VASP, WHAMM und Spire, mit Hilfe dieser Assays untersucht (Bosch et al., 2007, Campellone et al., 2008, Samarin et al., 2003). Mittlerweile gibt es allerdings auch eine wachsende Anzahl von Studien, die das *dendritic nucleation* Modell in Frage stellen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Fixierung von reinem F-Aktin durch das von Svitkina und Kollegen verwendete *critical point drying* Verfahren bereits zahlreiche

verzweigte Filamente hervorbringt - und zwar in Abwesenheit des Arp2/3-Komplexes (Resch et al., 2002). Außerdem konnten durch elektronenmikroskopische Analysen mit einer schonenderen Fixierungsmethode und Kryotomographie keine Verzweigungen im Lamellipodium nachgewiesen werden (Koestler et al., 2008, Small et al., 2008, Urban et al., 2010). Die Entdeckung einer steigenden Anzahl von F-Aktin Elongationsfaktoren in der lamellipodialen Front in den letzten Jahren legt vielmehr die Vermutung nahe, dass die Protrusion des Lamellipodiums vor allem durch die gezielte Elongation von an der Membran verankerten Filamenten beruht und nicht auf einer Schubwirkung eines dichtverzweigten Aktinnetzwerks (Breitsprecher et al., 2008, Co et al., 2007, Koestler et al., 2008).

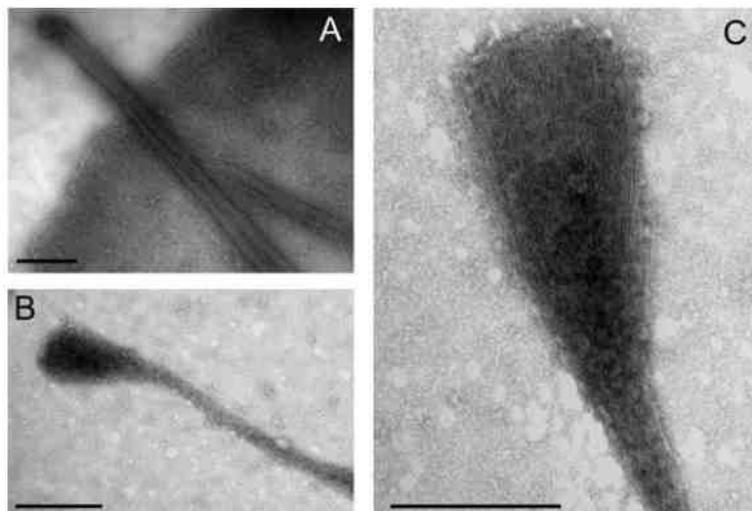
Auf dem *dendritic nucleation* Modell basierend, wurde ein Modell für die Filopodienbildung, das sogenannte *convergent elongation* Modell postuliert (Svitkina et al., 2003). In diesem Modell wird angenommen, dass die Bildung von Filopodien durch die Reorganisation des dendritischen Aktinnetzwerks im Lamellipodium erfolgt. Die Aktivierung sogenannter *Anti-Capping* Proteine (in diesem Fall VASP) an den Plusenden der Aktinfilamente verhindert, dass diese von *Capping* Proteinen verkappt werden können. Die somit weiterwachsenden Filamente laufen aufgrund der Verzweigungswinkel zwischen den Aktinfilamenten zusammen, werden von Fascin gebündelt und können so zu einem Filopodium reifen (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Convergent elongation Modell der Filopodienbildung (aus Svitkina et al., 2003).**

Einzelne Filamente des dendritischen Filamentnetzwerks im Lamellipodium werden von Proteinen des *Tip complexes* am Plusende gebunden, so dass *Capping* Proteine nicht mehr binden können. Die wachsenden Filamente treffen nach einiger Zeit an der Membran aufeinander und werden durch das Bündelungsprotein Fascin gebündelt. Die gebündelten Filamente bilden nachfolgend ein Filopodium. Das *convergent elongation* Modell der Filopodienbildung postuliert somit, dass Lamellipodien unentbehrliche Vorstufen von Filopodien sind.

Dieses Modell wird allerdings zusehends in Frage gestellt. Zum einen konnten viele unabhängige Studien zeigen, dass die Filopodienbildung in Zellen, in denen die Lamellipodienbildung durch Depletion bzw. Inaktivierung des Arp2/3-Komplexes oder seiner Aktivatoren unterdrückt wurde, nicht beeinträchtigt ist (u.a. Gomez et al., 2007, Nicholson-Dykstra und Higgs, 2008, Steffen et al., 2006). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Aktinfilament-nukleierenden Formine eine tragende Rolle bei der Filopodienbildung spielen (Block et al., 2008, Schirenbeck et al., 2005). Zellen, die ein konstitutiv aktives mDia2 $\Delta$ DAD exprimieren bilden eine höhere Zahl an Filopodien aus, die zudem eine ungewöhnliche Keulenform aufweisen. EM-Analysen dieser Filopodien ergaben, dass die Anzahl der Aktinfilamente in der Spitze erhöht war, was auf eine Nukleation neuer Filamente in der Filopodien Spitze hinweist (Abbildung 14). Basierend auf diesen Befunden wurde das *de novo* Nukleationsmodell der Filopodienbildung postuliert (Block et al., 2008, Faix und Rottner, 2006). Dieses besagt, dass Filopodien durch gezielte Bildung eines Filopodium *Tip Complexes* (FTP) unterhalb der Plasmamembran gebildet werden. Der FTP besteht aus Filament Nukleatoren (Forminen), Elongatoren (VASP und Forminen) und Proteinen, die die Membran-Rigidität und Form beeinflussen (IRSp53). Die Mechanismen der Bildung sowie die genaue Zusammensetzung des FTP sind allerdings immer noch unklar und bedürfen zusätzlicher zellbiologischer und biochemischer Studien.



**Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Filopodien spitzen (aus Block et al., 2008).** (A) Filopodium einer untransfizierten B16 Melanom-Zelle. (B und C) Filopodienbildung in Anwesenheit von konstitutiv aktivem mDia2 $\Delta$ DAD. Die Verdickung des Filopodiums zur Spitze ist deutlich zu erkennen. Der Balken entspricht 500 nm.

## 1.8 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

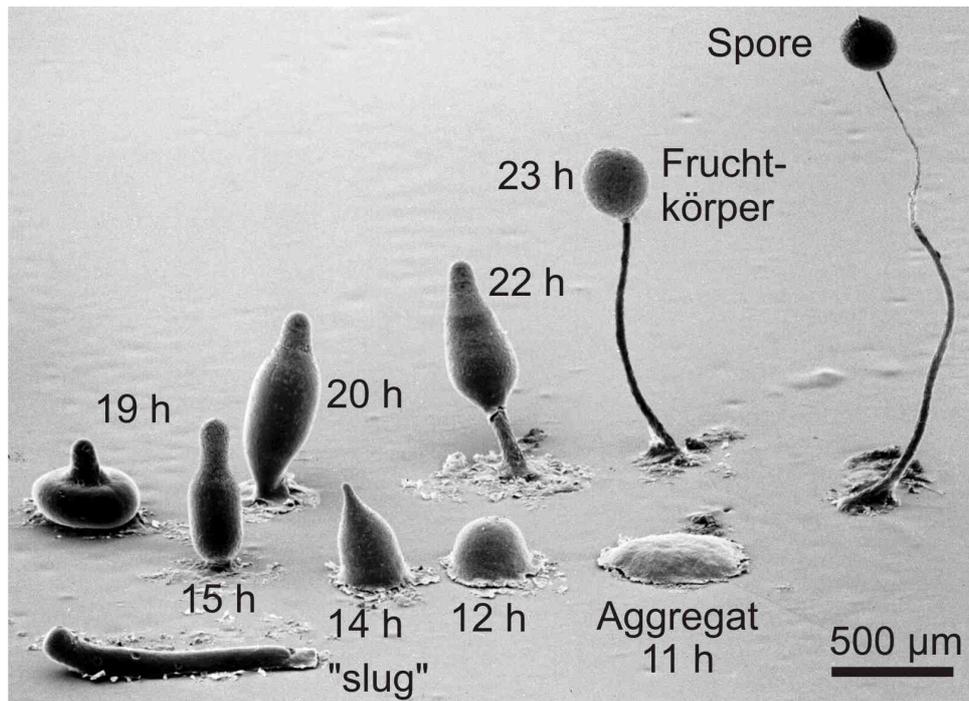
Die amöboide Protozoe *Dictyostelium discoideum* wurde 1935 erstmals von Kenneth B. Raper beschrieben (Katz, 2006). Während ihres vegetativen Wachstums existiert *D. discoideum* in Form von unabhängigen, motilen, amöboiden Zellen, die chemotaktisch Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen sowie Protozoen finden und phagozytieren und sich mitotisch teilen (Cardelli, 2001, Maniak, 2002, Saga und Yanagisawa, 1982).

Das 34 Mb große haploide Genom von *D. discoideum* wurde 2005 als das erste voll sequenzierte Genom eines frei lebenden Protozoen publiziert (Eichinger et al., 2005). Es besteht aus 6 Chromosomen mit je 4-6 Mbp Größe, ist extrem AT-reich (77%) und kodiert für etwa 11.000 Proteine. Ein Phylogenievergleich basierend auf dem Proteom zeigt, dass die Amöbozoa aus dem Tier-Pflanzen-Zweig entstanden, nachdem sich die Pflanzen und Tier-Zweige aufgespalten haben. Als haploider Organismus ist *D. discoideum* genetisch leicht zu manipulieren und Mutationen führen häufig zur Ausbildung eines spezifischen Phänotyps. Ein effizientes Transformationssystem zum Einbringen von DNA (Knecht und Pang, 1995) und eine Reihe von Vektorsystemen sind etabliert. Eine Vielzahl weiterer genetischer und biochemischer Methoden sind vorhanden, darunter die gezielte Gendisruption (De Lozanne und Spudich, 1987b, Witke et al., 1987), das *gene replacement* (Manstein et al., 1989b), eine durch *antisense*-RNA oder RNAi vermittelte Geninaktivierung (Knecht und Loomis, 1987), die *restriction-enzyme-mediated-integration* (REMI) (Kuspa und Loomis, 1992), die Expression einer „ochre“-Suppressormutante einer tRNA (tRNAGlull(UUA), negative Selektion (Morrison et al., 1997), ein cre/loxP-System zur Erzeugung multipler genetischer *knock outs* (Faix et al., 2004), sowie das GFP- und epitopische *tagging* von Proteinen (Gerisch et al., 1995, Westphal et al., 1997).

*Dictyostelium discoideum*-Zellen haben einen Durchmesser von etwa 10-20 µm, sind nicht pathogen und lassen sich sowohl auf Bakterienrasen (Verdopplungszeit 3h) als auch, durch die Einführung axenischer Mutationen (Ax2-Zellen = Wildtyp-Zellen) in Flüssigkultur (Verdopplungszeit 9h) leicht kultivieren (Loomis, 1971, Sussman und Sussman, 1967, Watts und Ashworth, 1970). Sporen einer Zelllinie können über mehrere Jahre bei -80°C gelagert werden. Die Amöben lassen sich aus dem Wachstum oder jeder der Entwicklungsstadien ernten, einfach aufschließen und weiterverarbeiten. In transformierten Zellen können hohe Mengen von ektopisch exprimierten Protein erhalten werden, wodurch sich *D. discoideum* auch für die Aufreinigung heterologer Proteine anbietet (Jung und Williams, 1997, Manstein

et al., 1989a). Als Nachteil des professionellen Phagozyten sind hier allerdings seine zahlreichen Proteasen zu nennen.

Viele Gene in *Dictyostelium* weisen eine hohe Homologie zu Metazoen auf, die in anderen Modellorganismen wie beispielsweise der Hefe nicht exprimiert werden (Goldberg et al., 2006, Kawata et al., 1997). *D. discoideum* ist auch unter entwicklungsbiologischen Gesichtspunkten interessant, da der einzellige Organismus unter Nahrungsmangel einen asexuellen Entwicklungszyklus zu einem multi-zellulären Organismus durchführt und so eine Lücke in der Reihe der Modellorganismen zwischen Hefe und höheren Eukaryoten schließt (Abbildung 15). *Dictyostelium discoideum* Zellen bleiben in Gegenwart von Nährstoffen einzellige Amöben, die sich durch den Vorschub von Pseudopodien, dem Äquivalent von Lamellipodien höher Zellen, fortbewegen (Gerisch et al., 1989). Die vegetative Lebensphase wird durch Nährstoffmangel terminiert und die Zellen durchlaufen einen gut charakterisierten Entwicklungszyklus (Gerisch, 1987, Loomis, 1996). Hierbei aggregieren etwa  $10^5$  Zellen (Devreotes, 1989, Firtel, 1996, Gerisch et al., 1975) zu einem Pseudoplasmodium. Im Gegensatz zu dem Plasmodium azellulärer Schleimpilze ist das Pseudoplasmodium eine Struktur in der Zellen zwar ihre Individualität verlieren, aber nicht fusionieren. Die als *slug* bezeichnete Zellmasse migriert chemo-, photo- und thermotaktisch um ein geeignete Stelle für die weitere Differenzierung zu erreichen, wobei sie eine schleimige Spur hinterlässt (Firtel, 1995). Anschließend formen sich Fruchtkörper aus, in denen Zellen differenzieren und sich Sporen bilden. Unter Laborbedingungen ist der gesamte Entwicklungszyklus in der Regel innerhalb von 24 h abgeschlossen (Chisholm und Firtel, 2004, Gerisch et al., 1975). Während dieses Prozesses wird eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen durchlaufen. Aus diesem Grund eignet sich *D. discoideum* zur Erforschung von Zell-Typ-Differenzierung, Zell-Zell-Adhäsion, Migration von Zellen in Geweben, Photo- und Thermotaxis, der Zell-Zell-Kommunikation und der beteiligten Signaltransduktionsmechanismen.



**Abbildung 15: Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum*.** Der Entwicklungszyklus von *D. discoideum* von der einzelnen Zelle zur Spore dauert unter Laborbedingungen etwa 24 h. EM-Aufnahme von R.L. Blanton und M. Grimson, Texas Tech University, Lubbock, TX.

## 2 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
ad	auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
ADP+Pi	Adenosindiphosphat und Phosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CIAP	<i>Calf Intestine</i> Alkalische Phosphatase
C-term	Carboxy-terminal
Da	Dalton
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DTT	Dithiothreitol
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
g	gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
Inc.	Incorporation
k	kilo
kb	kilobase
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar
m	Meter
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
n	nano

N-term	Ammino-terminal
OD	Optische Dichte
ori	<i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
s	Svedberg
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
U	Unit
UE	Untereinheit
upm	Umdrehungen pro Minute
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
μ	micro

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- oder Dreibuchstabencode abgekürzt.

Die Abkürzungen der Basen entspricht den IUB *tentative rules*.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### Allgemeines Labormaterial:

„EasyXtal Refill-Hits“	Qiagen GmbH, Hilden
24-Lochplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-Loch Mikrotiter-Platten, schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cryoröhrchen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Dounce Homogenisator	Schott AG, Mainz
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
fusselfreie Papiertücher <i>kimwipes</i>	Kimberly-Clark, Reigate, UK
<i>High Pure PCR Template</i> Präparations-Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Küvetten	Hellma GmbH & Co.KG, Müllheim
Nitrocellulose-Membran Protran	Whatman GmbH, Dassel
Parafilm M Laborfilm	Pechiney plastic packaging, Chicago, US
Petrischalen mit Glasboden ( <i>glass bottom dishes</i> )	MatTek Corporation, Ashland, USA
Petrischalen, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten 10 bis 1.000 µL	Gilson, WI, USA
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Econocolumns	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

#### Säulenmaterial:

Amylose Resin High Flow	New England Biolabs, Ipswich, MA
Glutathione Sepharose 4B	Amersham Pharmacia, Freiburg
Cyanogen-bromid-aktivierte Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

#### Gelfiltrationssäulen:

Superdex 200 prep grade	Amersham Pharmacia, Freiburg
Superdex 75 prep grade	Amersham Pharmacia, Freiburg

Sampleloop 10 mL Instrumente		Amersham Pharmacia, Freiburg
<b>Geräte:</b>		
Produktschutzwerkbank Kojair		MS-Laborgeräte GmbH, Wiesloch
Inkubationsschrank Innovens Jouan		Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Eismaschine Scotsman AF100		Enodis Deutschland GmbH, Herborn
Gefrierschrank (-80°C)		Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Geldokumentationssystem 1000/26MX	Biovision+	Vilber GmbH
Thermalcycler Px2		Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Peristaltische Pumpe LKB-pump P1		Pharmacia
Spannungsquelle Electrophoresis Supply-EPS600	Power	GE Healthcare
SDS-PAGE Apparatur		MPI Martinsried
Western-Blot-Apparatur		MPI Martinsried
Elektroporator Gene Electroporation System	Pulser Xcell	Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Inkubationsschüttler Innova 44		New Brunswick Scientific GmbH, Nürthingen
Inkubationsschüttler Excella E24		New Brunswick Scientific GmbH, Nürthingen
Fraktionssammler Frac-920		GE Healthcare
Thermomixer comfort		Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallgerät Branson Sonifiern250		G.Heinemann Ultraschalltechnik, SchwäbischGmünd
Fluoreszenz-96-Loch Plattenleser Ascent	Fluoroskan	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
<b>Zentrifugen und Rotoren:</b>		
Ultrazentrifuge L8-70 mit Rotoren 70 Ti und 45 Ti		Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
analytische Ultrazentrifuge mit Rotor AN 50Ti	ProteomeLab XL-1	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA

Avanti J-30I mit Rotoren JLA 16.250 und JA-30.50Ti	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Avanti J-26XP mit Rotor JLA-8.1000	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Tischzentrifuge Jouan BR4	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Tischzentrifuge IECMicromax Microcentrifuge	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau

**Flüssigkeits-Chromatographie Anlagen:**

ÄKTA purifier 10	Amersham Pharmacia, Freiburg
ÄkTA prime plus	Amersham Pharmacia, Freiburg

**Mikroskope:**

Konfokales Mikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Konfokales Mikroskop FV1000	Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg

**Chemikalien:**

2-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
2-Mercaptoethanol ( $\beta$ -Mercaptoethanol)	AppliChem GmbH, Darmstadt
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Aceton ( $C_3H_6O$ )	J.T. Baker, Deventer, NL
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat, Na-Salz (ATP)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Agar (Difco Agar)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Agarose (PeqGOLD Universal)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Ammoniumsulfat ( $(NH_4)_2SO_4$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Benzamidin-Hydrochlorid-Hydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BlasticidinS (Lösung 10 mg/mL)	InvivoGen, San Diego, USA
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO) 99,9%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethanol (EtOH)	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid (EtBr)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA, „Titriplex II“)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Fischgelatine G 7765 (45%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Freudsches Adjuvans, incomplete	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Geneticin (G418-Sulfat)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Gentamycin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glutathion	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Hefeextrakt („BactoYeast Extract“)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Hefeextrakt L21	Oxoid Ltd, Hampshire, UK
HL5-C Medium including Glucose	ForMedium, Norfolk, UK
Isopropanol (2-Propanol)	J.T. Baker, Deventer, NL
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Kaliumacetat (CH <sub>3</sub> COOK)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Maltose	Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Deventer, NL
N-(1-pyrene)iodoacetamide	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumacetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat-Tetrahydrat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Natriumthiosulfat-pentahydrat ( $\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge ( $\text{NaOH}$ , 1N)	Merck KGaA, Darmstadt
Nickel(II)-sulfat ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
n-Octylpolyoxyethylen (Octylpol)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Octoxinol-9 (Triton X-100)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Paraformaldehyd	AppliChem GmbH, Darmstadt
Pepton (neutralized bacteriological) LP34	Oxoid Ltd, Hampshire, UK
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85%)	Merck KGaA, Darmstadt
Pikrinsäure-Lösung (2,4,6-Trinitrophenol (TNP); 1,2%)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Merck KGaA, Darmstadt
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween20)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Rhodaminisothiocyanat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Rubidiumchlorid ( $\text{RbCl}$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure ( $\text{HCl}$ )	J.T. Baker, Deventer, NL
Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Spermidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Streptomycin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC)- conjugated Phalloidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trockenhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypanblau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Urea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

**Enzyme für die Molekularbiologie:**

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	PD Dr. Jan Faix
<i>Phusion High-Fidelity</i> DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Precision Protease	Amersham Pharmacia, Freiburg

**Antikörper:**

primäre polyklonale Antikörper:

anti-GST (aus Kaninchen) PD Dr. Jan Faix

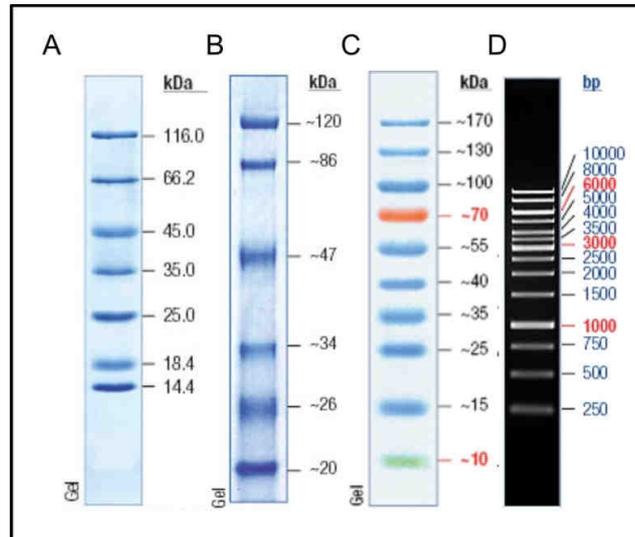
anti-GFP (aus Kaninchen) PD Dr. Jan Faix

sekundäre polyklonale Antikörper:

Ziege-anti-Kaninchen Alexa-488 gekoppelt Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Ziege-anti-Kaninchen Alkalische Phosphatase  
gekoppelt Dianova GmbH, Hamburg

**Molekülmassenstandards:**



**Abbildung 16: Molekülmassenstandards. (A)** Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot. **(B)** Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot. **(C)** PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot. **(D)** O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot.

### 3.1.1 Medien

#### 3.1.1.1 Medien für die Kultivierung von *D. discoideum*

##### **HL5-C Medium** (ready to use)

- 5 g Pepton
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g Trypton
- 1,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0,35 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 10 g Glucose

26,55 g des fertig gemischten Mediums in 1 L  $\text{dH}_2\text{O}$  lösen

##### **Ax-Medium (pH 6,7)**

- 14,3 g Pepton Oxoid
- 7,15 g Hefeextrakt
- 18 g Maltose
- 0,468 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,616 g       $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

### **Einfriermedium**

5% (v/v)      DMSO

in Ax- bzw. HL5c-Medium

### **Phosphatagar**

Soerensen-Phosphatpuffer

### **Wasseragar**

dH<sub>2</sub>O

### **SM-Agar (pH 6,0 bis 6,4)**

10 g          Pepton

10 g          Glucose

1 g          Hefeextrakt (Oxoid)

1 g           $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2,2 g         $\text{KH}_2\text{PO}_4$

1 g           $\text{K}_2\text{HPO}_4$

## **3.1.1.2 Medien für die Kultivierung von *E. coli* -Zellen**

### **LB-Medium (Vollmedium nach Luria-Bertani; pH 7,3)**

10 g          Trypton

5 g          Hefeextrakt

5 g          NaCl

### **LB-Medium-rich**

16 g         Trypton

8 g          Hefeextrakt

5 g          NaCl

10 mL        Na-Phosphatpuffer (0,5 M, pH 7,3)

### **Medium für die Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen**

2 g          Glukose

pro L LB-Medium-rich

Alle Medien wurden mit dH<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt. Für Agarplatten wurden dem jeweiligen Medium 15 g Agar pro Liter zugesetzt. Alle Medien wurden bei 120°C für 30 min autoklaviert. Zur Vermeidung von Bakterienwachstum wurde *D. discoideum* Flüssigmedium vor der Benutzung 5 µg/mL Ampicillin und 4 µg/mL Streptomycin zugesetzt. Für Agarplatten wurde das auf ca. 50°C abgekühlte Medium à 30 mL in Zellkulturschalen portioniert. Die abgekühlten Agarplatten konnten mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

### 3.1.2 Selektionsmarker

Zur Selektion von Bakterien- oder *D. discoideum*-Zellen wurde den Flüssigmedien kurz vor dem Gebrauch der entsprechende Selektionsmarker zugesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde der jeweilige Selektionsmarker dem Medium entweder vor dem Portionieren zugegeben oder erst nachträglich auf den erkalteten Agarplatten ausgestrichen.

#### 3.1.2.1 Zur Selektion von *E. coli*-Zellen

<b>Antibiotikum</b>	<b>Konzentration in Flüssigmedium</b>	<b>Konzentration in Festmedium</b>
Ampicillin	50 µg/mL (in dH <sub>2</sub> O)	50 µg/mL
Chloramphenicol	10 µg/mL (in 95% EtOH)	10 µg/mL
Kanamycin	25 µg/mL (in dH <sub>2</sub> O)	25 µg/mL
Gentamycin	10 µg/mL (in dH <sub>2</sub> O)	10 µg/mL

#### 3.1.2.2 Zur Selektion von *D. discoideum*-Zellen

<b>Selektionsmarker</b>	<b>Konzentration in Flüssigmedium</b>	<b>Konzentration in Festmedium</b>
Gentamycin (G418)	1 µg/mL	5 - 10 µg/mL
Blasticidin S	0,5 µg/mL	5 - 10 µg/mL

### 3.1.3 Häufig verwendete Puffer

#### Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0)

2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
gegebenenfalls autoklavieren

**PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7,3)**

8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
137 mM NaCl  
2,7 mM KCl

**3.1.4 Bakterienstämme**

Zur effizienten Gewinnung von Plasmid-DNA und zur Expression rekombinanter Proteine wurden folgende Abkömmlinge des *Escherichia coli*- (*E. coli*) Laborstamms K12 verwendet:

Stamm	Resistenz	Firma
DH5 $\alpha$	-	Invitrogen, Heidelberg
BL21 Rosetta	Chloramphenicol	Stratagene, La Jolla
ArcticXpress	Kanamycin	Stratagene, La Jolla

**3.1.5 *D. discoideum*-Stämme**

Stamm	Resistenz	hergestellt von:
Ax2-214 (Wildtyp)	-	(Watts und Ashworth, 1970)
DdVASP-null	Blasticidin S	(Schirenbeck et al., 2006)
DdVASP-null 1	Blasticidin S	diese Arbeit
DdVASP-null/GFP-Coronin	G418	PD Dr. Jan Faix
Ax2/GFP-Coronin	G418	(Maniak et al., 1995)

**3.1.6 Plasmide**

Plasmide kommen natürlicherweise in Prokaryoten aber auch in einigen niederen Eukaryoten wie Hefen oder *Dictyostelium* vor. Sie sind meist extrachromosomale, autonom replizierende genetische Elemente aus ringförmiger DNA und können in den Zellen in vielen Kopien vorliegen. Dabei ist die Kopienzahl abhängig von der Art des Plasmids und dessen Replikationsstartpunkt (*origin of replication*). Extrachromosomale und integrierende Plasmide

finden Verwendung als Vektoren zur Übertragung von Fremd-DNA in eine lebende Empfängerzelle.

Für die Transformation von *D. discoideum*-Zellen werden sogenannten *Shuttle*-Plasmide verwendet, die sowohl Elemente ihres Herkunftsorganismus (*D. discoideum*) als auch Sequenzen zur autonomen Replikation und Selektion in ihrem Wirtsorganismus (*E. coli*) besitzen. Zur Manipulation von *D. discoideum* wurde die DNA zunächst in ausreichender Menge in *E. coli* amplifiziert und dann zur Transformation von *D. discoideum*-Zellen eingesetzt.

### 3.1.6.1 Vektoren für die Transformation von *E. coli*

**pGEX-5X-1/-6P-1:** GST-Fusionsgene wurden durch Insertion der entsprechenden Gene in die *Bam*HI und *Sal*I Schnittstellen der *multiple cloning site* der verwendeten pGEX Vektoren pGEX-5X-1 und pGEX-6P-1 (GE Healthcare) hergestellt. Die Expression erfolgte unter der Kontrolle des *tac* Promotors, der durch das Laktose Analogon Isopropyl  $\beta$ -D Thiogalactosid (IPTG) induziert wird. Alle pGEX Vektoren enthalten zusätzlich noch ein *lacIq*-Gen, dessen Produkt ein Repressor Protein ist, welches an die Operator Region des *tac* Promoters bindet und so die Expression bis zur Induktion durch IPTG verhindert. Des Weiteren besitzen die Vektoren Sequenzabschnitte, die Erkennungssequenzen für unterschiedliche Proteasen kodieren. Somit kann das exprimierte Protein von dem Fusionsprotein durch Spaltung mit spezifischen Proteasen abgetrennt werden (Abbildung 17). Ein Vorteil des pGEX-5X-1 Vektors ist, dass der Leserahmen für die Umtransformation über die Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI und *Sal*I in den pDGFP-Mcs-Neo Vektor nicht verändert werden muss. Der Leserahmen des pGEX-6P-1 Vektors stimmt mit dem des pMAL-c2x überein

**pMAL-c2x:** Der Vektor pMAL-c2x der Firma New England Biolabs wurde zur Expression von MBP-Fusionsproteinen verwendet (Abbildung 17). Die entsprechenden Gene wurden durch Insertion in die *Bam*HI-*Sal*I Schnittstellen der *multiple cloning site downstream* des *malE*-Gens von *E. coli*, welches für das Maltose-bindende Protein (MBP) codiert, hergestellt. Auch dieser Vektor enthält den IPTG-induzierbaren *tac* Promotor, das *lacIq*-Gen und eine Protease Erkennungssequenzen für die anschließende Spaltung des Fusionsproteins mit der Protease *Factor Xa*. Durch das *lacZ $\alpha$* -Gen ist ein *Blue-white Screening* in einer zur  $\alpha$ -Komplementation fähigen Wirtszelle möglich. Im Falle des c2x-Vektors wird das Protein im Cytoplasma (c steht für Cytoplasma) der Zelle exprimiert.

**pGEX-6P-1-GFPRG:** Der Vektor pGEX-6P-1-GFPRG besteht aus dem Rückgrat des pGEX-6P-1-Vektors und des GFP-Gens aus pB16GFPXSac1A. Er wurde für die Expression

von GST-GFP-Fusionsproteinen während dieser Arbeit hergestellt (3.2.1.14 und Abbildung 17).

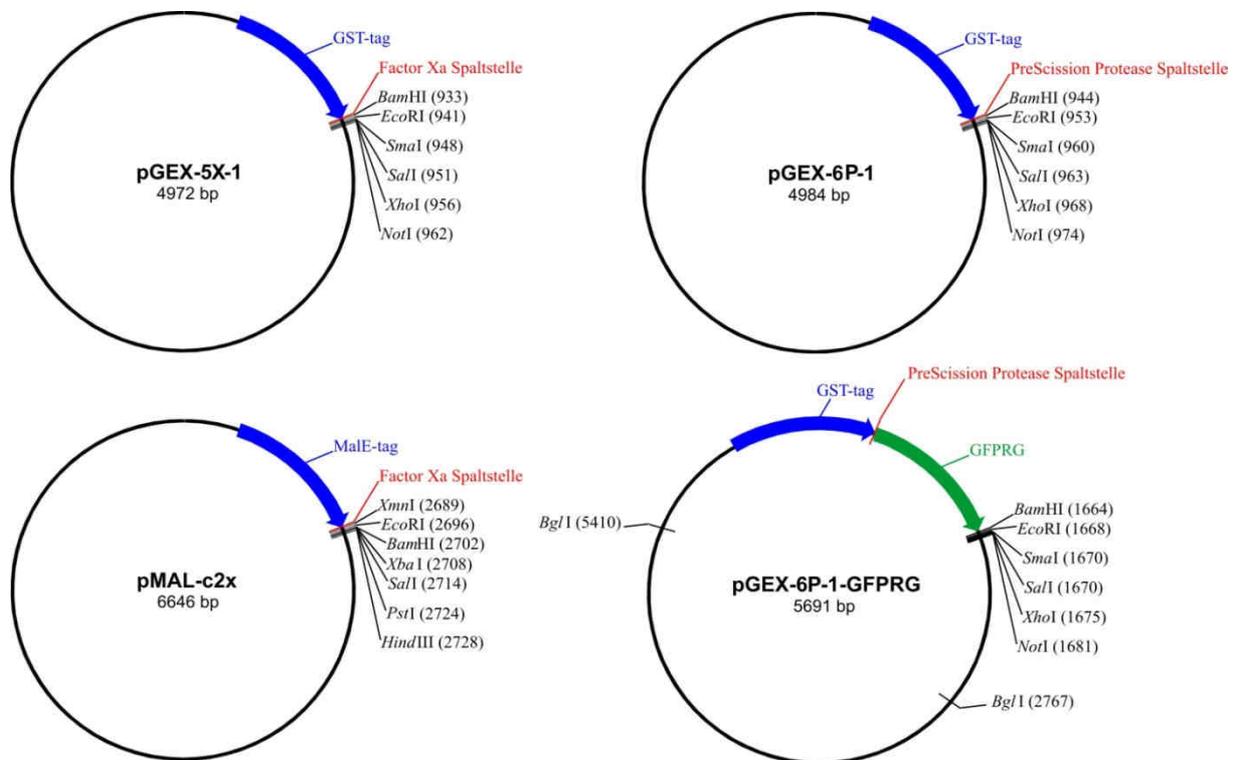


Abbildung 17: Plasmidkarten der verwendeten Vektoren.

### 3.1.6.2 Plasmide für die Transformation von *D. discoideum*

**pDGFP-MCS-Neo:** Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Vektor handelt es sich um ein Derivat des *D. discoideum*-Vektors pDGFP-MCS-Neo (Dumontier et al., 2000). Dieser integrierende Vektor wurde zur Expression von N-terminalen GFP-Fusionsproteinen unter der Kontrolle des Aktin 15 Promotors in *D. discoideum* konstruiert. Der Vektor wurde durch Ligation eines 700 bp großen Fragments des DGFP-MCS Vektors, das GFP S65T (Heim und Tsien, 1996) und die *act6* Tn5 *neoR* Kassetten für die Resistenz gegen G418p enthielt, in den Expressionsvektor pDEXH (Faix et al., 1992) konstruiert. Die Amplifikation dieses Vektors in dem *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  erfolgt über die Kontrolle eines *high-copy-number E. coli* Plasmid Replikationsursprungs.

### 3.1.6.3 Oligodesoxynukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg zur Synthese in Auftrag gegeben bzw. waren bereits im Labor vorrätig:

#### 3.1.6.3.1 Mutageneseprimer

##### **VASP:**

DdVASP-FL_BU (5X-1)	CGC GGA TCC ATG AGT GAA ACA GCA ATT TTT AAT GC
DdVASP-FL_SD (5X-1)	GCG CAG CTG AAT TAC AAC TCT ACG AGA CTA ACG
DdVASP-FL_BU (6P-1)	CGC GGA TCC AAT GAG TGA AAC AGC AAT TTT TAA TGC
DdVASP/EVH1_SD	GCG CAG CTG AAT ACC ACC TTT GAG GGA TCT TAA AAC
VASP_198_6P_BU	CGC GGA TCC AAT GCC CTT TTA GGT TC
DdVASP_dPRD_Up	ACC ACC TTT GAG GGA TCT TAA AAC ATT TTC AAA ACC (5`Phosphat)
DdVASP_dPRD_Down	GCC GCA GGT GGC GGT ACT GGA AGA AAT GC (5`Phosphat)
DdVASP_dGAB_Down	GTT GAT AAA AGC GCT GGT GTA CC (5`Phosphat)
DdVASP_dGAB_Up	AGT ACC GCC ACC TGC GGT TGG TGG (5`Phosphat)
DdVASP-dFAB_Down	TCT CAA CCA AAA GAA GAA TCA TCA GCA CCA AC (5`Phosphat)
DdVASP-dFAB_Up	ACC ACC ACC GCT AGA TTT TGG AGC TGG TGC (5`Phosphat)
DdVASP_dTet_Up	GAG TGG AGC TGATAA GGA TGG TGA AGG (5`Phosphat)
DdVASP_dTet_Down	ATC AGA GCA TCT CAA CAT TAA GTC GAC TCG (5`Phosphat)
hVASP/GAB_BU	GCG GGA TCC CCT GGT GGT GGG GGA GCT GG
hVASP/GAB_Stop_SD	CGC GTC GAC TTA GGG CCC CCC TGA GGC CTC CT
hVASP/FAB_BU	GCG GGA TCC CCC AAA GCT GAG AGT GGT CG
hVASP/FAB_Stop_SD	CGC GTC GAC TTA GGG GGT TTT CTC CCC AAC TT
DdVASP/GAB_BU	GCG GGA TCC CCA GCC GCA GGT GGC GGT AC
DdVASP/GAB_Stop_SD	GCG GTC GAC TTA TGG TGT GGT TTT TGT TGG TAC AC
DdVASP/FAB_BU	GCG GGA TCC CCA AAA TCT AGC GGT GGT GGT
DdVASP/FAB_Stop_SD	GCG GTC GAC TTA TGG AGT TGG TGC TGA TGA TT
pB15GFPXsac1A_DdVAS P_Up	GCG GAG CTC AAA ATG AGT GAA ACA GCA ATT TT
pB15GFPXsac1A_DdVAS P_Down	GCG GGA TCC ATG TTG AGA TGC TCT GAT TG

**Weitere Konstrukte**

BamHI\_DGFPcterm\_in6 GCG GGA TCC ATG AGT AAA GGA GAA GAA CT  
P-1\_antisense  
BglIII\_DGFP\_in6P- GCG AGA TCT ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG  
1\_sense

**3.1.6.3.2 Sequenzierprimer**

**Standardsequenzierprimer von GATC**

pGEX-3' GGA GCT GCA TGT GTC AGA G  
pGEX3-RP TCA AGA ATT ATA CAC TCC G  
pGEX-5' CTG GCA AGC CAC GTT TGG  
pGEX5-FP AAC GTA TTG AAG CTA TCC C  
pMalE TCA GAC TGT CGA TGA AGC

**Spezifische Sequenzierprimer**

DdVASP\_seq ACT GAA TGA TTG TGG TGG TTT GAA  
Seq\_DdVASP\_Dprd\_rc GCT CCA AAA CCA CCA GCC GCA GGT GG  
Seq\_DdVASP\_dGAB GCT AGA TTT TGG AGC TGG TGC TGG TG  
Seq\_DdVASP\_dFAB ACT GAA TGA TTG TGG TGG TTT GAA A  
Seq\_Mito\_Down CGA GAA GGT ATT GAA GGT AGA GG  
Seq\_Mito\_Up GCC AAT AGC TAA CAT TGC AAG AGT TAA CGT CG  
Seq\_delta\_FH1 GGT ATT ACA TCA TCA TCA ATT CAT ACT AGC  
Seq\_Mito\_antisense GGT GAA GAT AAA TAT ATG CAT TAG ATG TAA AAC AAC  
AGC  
Seq\_Mito\_antisense GCT GTT TTA CAT CTA ATG CAT ATA TTT ATC TTC ACC  
Seq\_pB15GFPXsac1A\_ ATA AAA ATC AGA TCC CAA GC  
sense  
dDia2\_21seq AAA TCA GTA ATC AGT TCA ATC AAT ACT AAA CAT G  
dDia2\_31seq AAT TTA TTA ACA CAA TTA GAT GTG TTT GAA G  
dDia2\_41seq CAA AAT ACT GAA AGA TGG ATG ATT GAA AGA G  
dDia2\_51seq ATT GGA TTA CAA TTC CAG CAC TTA AAG TTC  
dDia2\_61seq GAA GGT CTC GTC GAA GAT TTA GTA CCT G  
dDia2\_71seq GTT CCA AAA GAT CGC CAA AGT ACA ATA TC

**3.1.6.4 Computerprogramme**

Das Programmpaket „VectorNTI“ der Firma Invitrogen wurde zur Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen, für Sequenzvergleiche, sowie für die Erstellung von Dendrogrammen und Restriktionskarten verwendet. Mit ClustalW wurden Sequenzvergleiche

vorgenommen, die Agadir Software (<http://agadir.crg.es/>) wurde zur Vorhersage helikaler Bereiche von Proteinen benutzt und mit der Software GlobPlot 2.3. wurden globuläre Domänen innerhalb von Aminosäuresequenzen vorhergesagt. Mit dem Programm HCA (*hydrophobic cluster analysis*) wurde die Verteilung hydrophober Cluster in Aminosäuresequenzen analysiert (Callebaut et al., 1997) und mit Hilfe des Programms HMMSTR wurden mögliche Sekundär- und Tertiärstrukturen vorhergesagt.

Zur Erstellung des Literaturverzeichnisses wurde „RefWorks“ der Firma RefWorks-COS verwendet. „Unicorn 4.0“ wurde als Bedienungsprogramm für die ÄKTAPurifier-HPLC „PrimeView 5.0“ für die ÄKTAPrime-HPLC und das Programm „Spectra Manager V-500W“ sowohl für das Spektralphotometer als auch das Fluorimeter verwendet. Die Geldokumentation erfolgte mit der „Vision-Capt 14.3“-Software des Biovision Geldokumentationssystems.

Das konfokale Mikroskop LSM 510 Meta Zeiss wurde über das Programm „LSM Image Browser“ der Firma Zeiss und das Olympus FV1000 Mikroskop mit der „FLUOVIEW software“ der Firma Olympus bedient. Für die Filmauswertung und Bildbearbeitung wurde „ImageJ“, und für die Darstellung der generierten Daten wurden „Excel“ aus dem Microsoft Office Programmpaket, „Origin“ (MicroCal Inc.) und „Sigmaplot“ (Fa. Systat Software Inc.) benutzt. Zur Bildbearbeitung wurden „ImageJ“ und „Adobe Photoshop CS“ benutzt.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*-Zellen**

*E. coli*-Zellen wurden bei 37°C entweder in Schüttelkultur in LB-Medium (160 upm) oder auf Agarplatten kultiviert. Zur Selektion wurden entsprechende Antibiotika geeigneter Konzentration zugesetzt. Agarplatten mit Bakterienkolonien konnten, mit Parafilm verschlossen, mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

#### **3.2.1.2 Ermittlung der Zelldichte von Bakterienkulturen**

Die Ermittlung der Zelldichte von Bakterienkulturen erfolgte über die Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) in Plastikkuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm.

### 3.2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (Mehr-Ionen-Technik)

Bei der genetischen Transformation wird Fremd-DNA in eine Empfängerzelle überführt und damit genetische Veränderungen bewirkt (Cohen et al., 1972). In dieser Arbeit wurden kompetente Zellen entsprechend der Mehr-Ionen-Technik hergestellt (Hanahan, 1983). Die Zellen erreichen dabei Kompetenzen von  $10^6$  bis  $10^8$  Kolonien je  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA. Sie können bis zu einem Jahr kompetent bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden.

#### **TFB I-Puffer (pH 5,8)**

100 mM	RbCl
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
30 mM	Kaliumacetat
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
15% (v/v)	Glycerin

sterilfiltrieren

#### **TFB II-Puffer (pH 6,8)**

10 mM	MOPS
10 mM	RbCl
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
15% (v/v)	Glycerin

sterilfiltrieren

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 100 mL LB-Medium mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm beimpft und bei  $37^\circ\text{C}$  und 180 upm über Nacht inkubiert. 1 mL dieser Vorkultur wurden in einen 1 L Schikankolben mit 200 mL frischem LB-Medium transferiert und bei  $37^\circ\text{C}$  und 180 upm bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Nach Erreichen dieser Zelldichte wurde die Kultur für 15 min in Eiswasser abgekühlt. Ab diesem Schritt wurden alle weiteren Schritte mit gekühlten Materialien und Gegenständen auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in 4 sterile 50 mL Reaktionsgefäße überführt, 15 min bei  $4.000\times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in 10 mL eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in einem der Reaktionsgefäße vereinigt, auf 50 mL mit TFB I-Puffer aufgefüllt und 1 h auf Eis ruhen gelassen. Nun wurde für 15 min bei  $4.000\times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und das resuspendierte Pellet in 8 mL TFB II-Puffer für 1 h auf Eis gekühlt. Die Suspension wurde zu je  $600\ \mu\text{L}$  in 1,5 mL

Reaktionsgefäße aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

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

Während der Transformation versetzt man den Zellen einen Hitzeschock in Anwesenheit von Cl<sup>-</sup>-Ionen. Dadurch wird die bakterielle Zellwand für kurze Zeit für DNA durchlässig.

#### **TCM-Puffer**

10 mM Tris (pH 7,5)

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM CaCl<sub>2</sub>

autoklavieren

Kompetente *E. coli*-Zellen des entsprechenden Stamms wurden für ca. 30 min auf Eis aufgetaut. Zu 200 µL Zellen wurden etwa 1 µg DNA und 30 µL TCM gegeben, die Zellsuspension zunächst für 1 h auf Eis inkubiert, dann für 75 sek bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Dieser Transformationsansatz wurde steril mit 800 µL LB-Medium versetzt und 1 h lang bei 37°C ohne Antibiotikum inkubiert. Die transformierten Zellen wurden zur Identifikation positiver Klone auf LB-Platten ausgestrichen oder direkt in LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika inkubiert.

Davon abweichend wurde bei Verwendung des *E. coli*-Stamms ArcticXpress der Hitzeschock nur für 10 bis 15 sek bei 42°C durchgeführt.

### 3.2.1.5 Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen

Bakterien sind in der Flüssigkultur und auf Agarplatten nur begrenzt haltbar. Eine langfristige Lagerung von *E. coli*-Zellen erfolgte in Form von Glycerinkulturen bei -80°C. Zu ihrer Herstellung wurden 3 mL LB-Medium mit dem entsprechenden *E. coli* Stamm angeimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,3 bis 0,4 herangezogen. Anschließend wurden 800 µL der Bakteriensuspension zu 200 µL sterilem 87%-igem Glycerin gegeben, 30 min auf Eis inkubiert und bei -80°C eingefroren.

### 3.2.1.6 Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli*

#### **TE-Puffer**

10 mM Tris (pH 8,0)

1 mM EDTA

autoklavieren

**Low-TE-Puffer**

10 mM Tris (pH 8,0)

0,1 mM EDTA

autoklavieren

**Tris-Elutionspuffer**

10 mM Tris (pH 8,0)

autoklavieren

Die analytische Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“, entsprechend der enthaltenen Anleitung. Die Elution erfolgte in der Regel mit 50 µL sterilem dH<sub>2</sub>O, Tris-Elutionspuffer, TE oder Low-TE-Puffer. Um eine größere Menge DNA zu erhalten wurden entweder mehrere dieser analytischen Präparationen vereinigt oder eine präparative Präparation mit dem „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“, entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

**3.2.1.7 Aufreinigung von genomischer DNA aus *D. discoideum* unter Benutzung des „High pure PCR Template Preparation Kit“**

Zur Aufreinigung genomischer DNA aus *D. discoideum* wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale mit Hilfe einer 10 mL Pipette abgewaschen, pelletiert und in 150 µL 1x PBS resuspendiert. Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers.

**3.2.1.8 Bestimmung der DNA Konzentration**

Die Konzentration und Reinheit der gewonnen DNA-Lösung wurde standardgemäß spektroskopisch bestimmt. Unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten konnte so die Konzentration der gelösten Nukleotide bestimmt werden.

In der Regel wurden Verdünnungen der DNA in Wasser hergestellt, so dass die zu erwartende Absorption zwischen 0,1 und 1 OD<sub>260</sub> lag. Konzentration und Reinheit von nukleinsäurehaltigen Lösungen wurden durch Messung des Absorptionsspektrums zwischen 220 und 320 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektrophotometer gegen eine Basislinie bestimmt. Für die Konzentration der DNA gilt folgende Beziehung: 1 A<sub>260nm</sub> = 50 µg/mL dsDNA. Der Quotient A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> gibt die Reinheit einer Nukleinsäurelösung an, er sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Niedrigere Werte weisen

auf Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte auf Verunreinigungen durch niedermolekulare aromatische Verbindungen hin.

### 3.2.1.9 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

#### 3.2.1.9.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Überprüfung der Größe von inserierten DNA-Sequenzen und zur Konstruktion von Plasmiden wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II genutzt. Diese Enzyme binden an doppelsträngige DNA innerhalb bestimmter Sequenzen und hydrolysieren das Zucker-Phosphat-Rückgrat an definierten Stellen in der Basenabfolge.

Für eine analytische Restriktionsspaltung zur Überprüfung von Plasmiden und Klonierungen wurden 1 bis 2 µg Plasmid mit 10 bis 20 U Enzym in dem vom Hersteller vorgeschlagenen Reaktionspuffer für eine Stunde bei dem enzymespezifischen Temperaturoptimum inkubiert und nachfolgend durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

Bei präparativen Ansätzen zur Herstellung von Rahmen bzw. Inserts für Klonierungen wurden 0,5 bis 10 µg Plasmid mit 10 bis 40 U Enzym unter optimalen Temperaturbedingungen in entsprechenden Puffern für mehrere Stunden inkubiert. Die Restriktionsverdau wurden anschließend per Agarosegelelektrophorese analysiert und gegebenenfalls auch präparativ getrennt. Nach Aufreinigung der DNA-Fragmente (3.2.1.6) konnten diese anschließend für Ligationen verwendet werden (3.2.1.9.4).

#### 3.2.1.9.2 5'-Dephosphorylierung von DNA

Um nach Spaltung mit einer Restriktionsendonuklease eine Religation der Vektor-DNA zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase (CIAP: *cal**f* *i**n**t**e**s**t**i**n**e* *a**l**k**a**l**i**n**e* *p**h**o**s**p**h**a**t**a**s**e*) durchgeführt. Dieses Enzym entfernt die endständigen 5'-Phosphatgruppen des Zucker-Phosphatrückgrats.

Hierfür wurde 1 µg DNA mit 0,5 U CIAP für eine Stunde bei 37°C in Dephosphorylierungspuffer (10x: 0,5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5) inkubiert. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase durch fünfzehnminütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert, die Probe auf Eis abgekühlt und eine DNA-Aufreinigung (3.2.1.6) zum Entfernen von Puffer und Enzymen angeschlossen.

#### 3.2.1.9.3 Glätten von überhängenden DNA-Enden

Für eine *blunt-end*-Ligation werden nicht kompatible, 5'-überstehende Enden durch das Klenow-Fragment geglättet. Dieses Enzym besteht aus dem C-terminalen und mittleren Bereich der DNA-Polymerase I aus *E. coli* und besitzt eine DNA-Polymerase- und 3'-5'-Exonuclease-Aktivität. Durch letztere werden entständige Nukleotide am 3'-Ende entfernt,

wenn diese ungepaart vorkommen (Exonuclease) bzw. einzelsträngige 5'-Enden der DNA nach Zugabe von dNTPs aufgefüllt (Polymerase).

Dazu wurden zu 1 µg gespaltener Plasmid-DNA 2,5 U T4-DNA-Polymerase und dNTPs gegeben. Nach Mischen wurde für 5 min bei RT in Ligasepuffer inkubiert, das Enzym anschließend für 15 min bei 70°C inaktiviert und eine DNA-Aufreinigung zum Entfernen von Puffer und Enzym angeschlossen.

#### 3.2.1.9.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase aus *E. coli* ist in der Lage, Brüche in der DNA durch Bildung von Phosphodiester-Brücken zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der angrenzenden 3'-Hydroxygruppe des DNA-Rückgrats zu reparieren. Überhängende Enden werden effizienter verknüpft als glatte Enden. Standardmäßig wurden daher Enden mit Überhängen über Nacht bei 16°C, glatte Enden hingegen bei 4°C ligiert.

#### **10x Ligasepuffer**

0,5 M	Tris (pH 7,4)
0,1 M	MgCl <sub>2</sub>
0,01 M	Spermidin
0,01 M	ATP
0,02 M	DTT
1 mg/mL	BSA

à 0,5 mL aliquotieren und bei -20°C lagern

In einem Reaktionsvolumen von 20 µL wurden 60 ng dephosphorylierte Rahmen-DNA und ein fünffacher molarer Überschuss des Inserts mit 5 U T4-DNA-Ligase in Ligasepuffer versetzt. Die Inkubation wurde über Nacht bei 16°C durchgeführt. Von dem Ligationsansatz wurden 5 µL direkt für eine Transformation eingesetzt. Die Lagerung von Ligationsmischungen erfolgte bei -20°C.

#### 3.2.1.10 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR: *polymerase chain reaction*) lassen sich DNA-Sequenzen mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase, zweier gegenläufiger Oligonukleotide und dNTPs vielfach amplifizieren (Saiki et al., 1988). Zur Verifikation von Genruptionen in *D. discoideum* wurde die *Taq*-Polymerase verwendet. Aufgrund der höheren Fehlerrate der *Taq*-Polymerase wurde für die Amplifikation von Sequenzen für anschließende Klonierungen hingegen die Phusion-Polymerase (NEB) verwendet, da sie eine *proof reading* Aktivität und außerordentlich hohe Prozessivität aufweist.

**10x Taq-Puffer**

- 100 mM Tris (pH 9,0)
- 500 mM KCl
- 20 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,1% (v/v) Gelatine

à 0,5 mL aliquotieren und bei -20°C lagern

Die PCR wurde zum einen zur Identifikation von Null-Mutanten transformierter *D. discoideum*-Zellen verwendet. Zum anderen wurden präparative PCR-Ansätze benutzt, um DNA-Fragmente für eine Ligation in einen anderen Vektor herzustellen bzw. Plasmide zu konstruieren, die eine Deletion tragen.

Analytische PCRs wurden in einem Volumen von 25 µL, präparative in 300 µL durchgeführt. Die gewählte Annealingtemperatur hängt vom Schmelzpunkt der eingesetzten Primer ab und wurde gegebenenfalls durch Temperaturgradienten-PCR für jedes Primerpaar optimiert.

Pipettierschema:	analytische PCR ( <i>Taq</i> -Polymerase)			präparative PCR ( <i>Phusion</i> -Polymerase)		
Template-DNA	0,5 µl			1 µl		
dH <sub>2</sub> O	35,5 µl			214,5 µl		
10x <i>Taq</i> -Puffer	5 µl			-		
10x HF-Puffer	-			60 µl		
5'-Primer	1,5 µl			8 µl		
3'-Primer	1,5 µl			8 µl		
dNTPs (2 mM je NTP)	5 µl			6 µl		
<i>Taq</i> -Polymerase	1 µl			-		
<i>Phusion</i> -Polymerase	-			2,5 µl		
PCR-Programm:						
Denaturierung	95°C	1 min	1x	98°C	30 sek	1x
Denaturierung	95°C	30 sek	30x	98°C	30 sek	32x
Primer-Anlagerung	50-70°C	30 sek		50-70°C	30 sek	
Extension	72°C	1 kb/min		72°C	3 kb/min	
finale Extension	72°C	sek	1x	72°C	4 min	1x
		halten	1x	10°C	halten	1x

### 3.2.1.11 Reinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA nach Restriktionsverdau sowie von PCR-Produkten erfolgte nach dem Protokoll des „QIAquick PCR Purification“ Kits. Mit dieser Methode wurden DNA-Fragmente von Verunreinigungen wie z.B. DNA-Resten mit bis zu 10 kb und/oder Proteinen abgetrennt.

### 3.2.1.12 Agarose Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist ein Verfahren, das die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld zu deren Trennung ausnutzt. DNA-Moleküle wandern dabei in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat zur Anode.

#### **Loening-Puffer (pH 7,8; Loening, 1969)**

36 mM	Tris
30 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 mM	EDTA

autoklavieren

#### **5x DNA-Probenpuffer**

40%	Saccharose
0,5%	SDS
0,25%	Bromphenolblau

in TE-Puffer lösen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in Flachbett-Gelkammern in 0,7%igen Agarosegelen, mit identischem Gel- und Laufpuffer. Zur Herstellung des Gels wurden 0,7 g Agarose in 100 mL Loening-Puffer aufgekocht und zum Auspolymerisieren luftblasenfrei in eine horizontale Gelkammer gegossen. Eingesetzte Plexiglas-kämme formten dabei die Proben-taschen aus. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit Loeningpuffer überschichtet. Die zu trennende DNA wurde mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt und in die entstandenen Taschen geladen. Um eine Abschätzung der Größe und Menge der DNA-Fragmente zu ermöglichen wurden DNA-Molekül-massenstandards mit Fragmenten bekannter Größe mitgeführt. Der Gellauf erfolgte über etwa eine Stunde bei ~5 V/cm. Nach zehnmütiger Färbung mit 0,04% Ethidiumbromid und zehnmütiger Entfärbung in Wasser wurde das Gel mit dem „Biovision“ Geldokumentationssystem dokumentiert.

### 3.2.1.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um nach Restriktionsspaltungen ein gewünschtes Fragment zu isolieren, wurde DNA aus Agarosegelen extrahiert. Hierzu wurde der gesamte Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und das gewünschte Fragment nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus der Agarose wurde mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach den im Handbuch aufgeführten Protokoll durchgeführt.

### 3.2.1.14 Klonierungsstrategien

Zur Generierung von Deletionsmutanten von DdVASP wurden PCRs mit am 5'-Ende phosphorylierten Primern und den entsprechenden pGEX-5X-1-FL Vektoren als Matrize verwendet (Schirenbeck et al., 2006). Die generierten DNA-Fragmente wurden anschließend unter Verwendung des „QIAquick PCR Purification Kits“ (3.2.1.11) aufgereinigt, die PCR-Matrize mit *DpnI* verdaut, die amplifizierte DNA erneut gereinigt und anschließend ligiert.

Die so gewonnenen Deletionsmutanten konnten über ihre *Bam*HI und *Sal*I Schnittstellen in den pDGFP-Vektor umkloniert werden. Dafür wurde das entsprechende pGEX-5X-1-DdVASP-Konstrukt im präparativen Maßstab mit den beiden Enzymen verdaut, über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und das Insert in den mit *Bam*HI und *Sal*I geschnittenen, gereinigten pDGFP-Vektor ligiert.

Zur Herstellung von Fragmenten des DdVASP-Gens (EVH1 und EVH2) wurde eine PCR mit Primern mit entsprechenden flankierenden Restriktionsenzymchnittstellen durchgeführt. Die Produkte wurden aufgereinigt, zur Entfernung des Ursprungsplasmids mit *DpnI* verdaut, erneut aufgereinigt mit den beiden Enzymen verdaut und in den entsprechenden Vektor ligiert.

Zur Klonierung des Vektors pGEX-6P-1-GFPRG wurde der kodierende Bereich von GFP aus dem pB16GFPXSac1A mittels PCR amplifiziert und dabei die Schnittstellen *Bgl*II und *Bam*HI angefügt. Das Produkt wurde zur Entfernung des Templates mit *DpnI* verdaut, das verbleibende Insert aufgereinigt und in die *Bam*HI Schnittstelle des pGEX-6P-1 Vektors der Firma GE Healthcare kloniert.

Durch Amplifikation der WH2-Domänen des DdVASP bzw. hVASP-Gens mit Primern, die die Schnittstellen *Bam*HI bzw. *Sal*I enthalten, wurden DNA-Fragmente generiert, die in die *Bam*HI/*Sal*I-Schnittstellen des pMal-c2x bzw. GEX-6P-1-GFPRG inseriert wurden.

Zudem wurden die von PD Dr. Faix generierten Vektoren pDGFP-MCS-neo-mVASP, -dDia2ΔDAD und pGEX-6P-1-hVASP in der Arbeit verwendet.

Alle generierten Plasmide wurden in DH5α-Zellen transformiert, welche auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker inkubiert wurden. Die erhaltenen Bakterienkolonien wurden auf positive Klone hin untersucht. Dazu wurden zunächst einzelne Kolonien isoliert, in 5 mL Flüssigmedium überimpft und die Plasmid-DNA aus den Klonen aufgereinigt. Ein Aliquot jedes der präparierten Plasmide wurde dann mit entsprechenden Enzymen analytisch verdaut (3.2.1.9) und die korrekte Größe der Inserts durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Die DNA der so identifizierten Plasmide wurde durch Sequenzanalyse der Firma GATC überprüft.

Konstrukt	Schnittstellen	Zielvektor	DNA-Länge	Aminosäuren	AS-Länge mit tag	MW	AS-Länge ohne tag	MW ohne tag
EVH1-Domäne	BamHI und Sall	pGEX-6p-1	339 bp	AS 1-113	345 AS	39,5 kDa		
		pMAL-c2X			506 AS	55,5 kDa		
EVH2-Domäne	BamHI und Sall	pGEX-6p-1	567 bp	AS 192-381	411 AS	45 kDa		
		pMAL-c2X			572 AS	61 kDa		
DdGAB-Domäne	BamHI und Sall	pMAL-c2X	126 bp	AS 192-233	431 AS	46,7 kDa	288 AS	31,6 kDa
		pGEX-6p-1-GFP			514 AS	58 kDa		
DdFAB-Domäne	BamHI und Sall	pMAL-c2X	117 bp	AS 257-295	428 AS	46,5 kDa		
		pGEX-6p-1-GFP			511 AS	57,8 kDa	285 AS	31,4 kDa
DdGAB/FAB-Domäne	BamHI und Sall	pMAL-c2X	243 bp	AS 192-233&257-295	493 AS	52,5 kDa		
		pGEX-6p-1-GFP			576 AS	83,8 kDa	350 AS	37,4 kDa
hGAB	BamHI und Sall	pMAL-c2X	99 bp	AS 216-248	422 AS	45,6 kDa		
		pGEX-6p-1-GFP			504 AS	56,8 kDa	278 AS	39,4 kDa
hFAB	BamHI und Sall	pMAL-c2X	105 bp	AS 251-285	493 AS	52,5 kDa		
		pGEX-6p-1-GFP			506 AS	57,6 kDa	280 AS	31,2 kDa
hGAB/FAB	BamHI und Sall	pMAL-c2X	210 bp	AS 216-285	459 AS	94,5 kDa		
		pGEX-6p-1-GFP			541 AS	60,7 kDa	315 AS	34,3 kDa
DdVASP-WT	BamHI und Sall	pGEX-5x-1	1140 bp	AS 2-380	608 AS	65,7 kDa		
		pDGFP-MCS-neo						
DdVASP-WT	BamHI und Sall	pGEX-6p-1	1143 bp	AS 1-380	611 AS	66 kDa	385 AS	39,5 kDa
DdVASP $\Delta$ PRD	BamHI und Sall	pGEX-5x-1	816 bp	AS 2-113&192-380	529 AS	57,8 kDa		
		pDGFP-MCS-neo						
DdVASP $\Delta$ GAB	BamHI und Sall	pGEX-5x-1	1071 bp	AS 2-198&220-380	586 AS	63,4 kDa		
		pDGFP-MCS-neo						
DdVASP $\Delta$ GAB/FAB	BamHI und Sall	pGEX-5x-1	1005 bp	AS 2-198&220-262&284-380	523 AS	57,6 kDa		
		pDGFP-MCS-neo						
DdVASP $\Delta$ FAB	BamHI und Sall	pGEX-5x-1	1071 bp	AS 2-262&284-380	588 AS	63,7 kDa		
		pDGFP-MCS-neo						
DdVASP $\Delta$ Tet	BamHI und Sall	pGEX-5x-1	1023 bp	AS 2-341&379-380	574 AS	61,8 kDa		
		pDGFP-MCS-neo						

Tabelle 2: Aufgeführt sind die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Konstrukte, ihre Größe und die Schnittstellen, die für die Klonierung verwendet wurden. AS= Aminosäure, MW= Molekulargewicht.

## 3.2.2 Biochemische Methoden

### 3.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Es gibt mehrere Methoden zum quantitativen Nachweis von Proteinen, jedoch ist die Unschärfe von Proteinbestimmungsmethoden ein großes Problem. Des Weiteren ist jede Proteinbestimmungsmethode störanfällig für Detergenzien oder bestimmte Ionen. Die Methoden der Wahl sind SDS-PAGE/Coomassie-Blau-Färbung, Bradford-Test (Bradford, 1976) und  $A_{280}$  Messung.

Die Konzentration eines Proteins in Lösung konnte durch Vergleich der Bandenintensitäten mit einem Proteinstandard in einem Coomassie-Blau gefärbten Polyacrylamidgel ermittelt werden. Dazu wurden Verdünnungsreihen des Proteins und einer Referenz mit bekannter Konzentration durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.2.4). Die Auswertung erfolgte nach Digitalisierung des Gels mittels Geldokumentationssystem Biovision mit ImageJ. Anhand der Bandenintensitäten der Referenzproteine wurde eine Eichreihe erstellt, mit deren Hilfe dann die Proteinkonzentration des Analyten densitometrisch bestimmt wurde.

Der Bradford-Test wurde nur zur groben Einschätzung der Proteinkonzentration benutzt.

#### Bradford-Reagenz

100 mg        Coomassie-Brilliant-Blue G-250 in

50 mL        Ethanol lösen

100 mL         $H_3PO_4$  (85%) dazugeben und

mit  $dH_2O$  auf 250 mL auffüllen

Das filtrierte Reagenz ist mindestens 4 Wochen haltbar.

Es wurden 20  $\mu L$  Proteinlösung mit 200  $\mu L$  Bradford-Reagenz und 780  $\mu L$   $dH_2O$  gemischt. In Anwesenheit von größeren Proteinmengen weisen die Lösungen eine deutliche Blaufärbung auf, wodurch proteinreiche Fraktionen während der Proteinpräparation unmittelbar identifiziert werden konnten.

Zur  $A_{280nm}$ - (bzw.  $A_{290nm}$  für Aktin) Messung genügte ein Probenvolumen von 100  $\mu L$ , das in einer Quarzküvette gegen den proteinfreien Puffer bzw. einer Verdünnung des Puffers in Wasser als Referenz gemessen wurde. Unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten kann so die Konzentration der Proteinlösung über das Lambert-Beersche Gesetz ( $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ ;  $E$ = Extinktion,  $\epsilon$ = Extinktionskoeffizient,  $c$ = Konzentration,  $d$ = Schichtdicke) bestimmt werden.

Falls die Konzentration eines Fusionsproteins mit GFP (*green fluorescent protein*: grün fluoreszierendes Protein) bestimmt wurde, wurde zusätzlich die Absorption des Fluorophors gemessen.

### 3.2.2.2 Konzentrieren von Proteinlösungen

Um Proteine in Lösung zu konzentrieren, wurde vorwiegend die Ultrafiltration verwendet. Hierbei wird die Proteinlösung mittels Zentrifugalkraft durch eine Membran mit Poren einer bestimmten Größe (Ausschlussmolekulargewicht: MWCO) gepresst. Nur Flüssigkeiten und darin gelöste Salze können hierbei den Filter passieren, höhermolekulare Substanzen jedoch nicht. Dadurch wird die Konzentration des Proteins erhöht.

Die in dieser Arbeit verwendeten Membranen hatten, entsprechend der Größe des jeweiligen Proteins, ein MWCO von 5 bis 100 kDa. Die Zentrifugation erfolgte bei 4.000x g und 4°C bis die erwünschte Konzentration erreicht war.

Eine weitere Möglichkeit zum Aufkonzentrieren von Proteinlösungen besteht in der Dialyse gegen Puffer mit 55 bis 60% Glycerin. Durch die osmotisch getriebene Diffusion des Wassers der Proteinlösung in die Glycerinlösung verringert sich das Volumen der Lösung. Die so erhaltene Lösung war in der Regel um einen Faktor von 3 bis 5 aufkonzentriert und konnte direkt bei -20° gelagert werden.

### 3.2.2.3 Dialyse und Entfernung des GST-tags

Die Dialyse dient dem Entsalzen von Proteinlösungen und dem Pufferaustausch. Die Proteinlösung wurde in einen Dialyseschlauch mit einem MWCO von 6 bis 8 kDa überführt und an beiden Enden verschlossen. Die Dialyse erfolgte bei 4°C über Nacht für 15 Stunden mit Pufferwechseln unter ständigem Rühren gegen 2 L des entsprechenden Puffers.

Während der Dialyse wurde gegebenenfalls auch der *tag* des Fusionsproteins mit PreScission Protease abgespalten. Dieses Protein spaltet auch bei niedrigen Temperaturen und in Gegenwart von EDTA innerhalb einer dem GST-tag vorgelagerten, spezifischen Aminosäuresequenz. Hierzu wurden der Proteinlösung 1 µL PreScission Protease (3 mg/mL) pro mg Protein zugegeben und gegen PBS mit 1 mM DTT, 1 mM EDTA und 0,04% Na-Azid bei 4°C dialysiert. Das abgespaltene GST-Protein und die Protease wurden bei anschließender Gelfiltration oder erneuter Inkubation mit Glutathion-Sepharose entfernt.

### 3.2.2.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung der Reinheit einer Proteinpräparation, sowie zur Überprüfung der Vollständigkeit der enzymatischen Spaltung eines Fusionsproteins oder zum Nachweis der Expression eines Proteins, wurde eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

(PAGE) in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und  $\beta$ -Mercaptoethanol in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt (Laemmli, 1970). Um eine gute Auflösung in dem Molekulargewichtsbereich des jeweiligen Proteins zu erhalten wurden 10, 12 oder 15%ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet.

### **SDS-Gele**

#### **Sammelgel**

125 mM	Tris-Glycin (pH 6,8)
0,1%	SDS
3,3%	Acrylamid
pro 16 mL (für 12 Minigele):	
240 $\mu$ L	APS (20%)
8 $\mu$ L	TEMED

#### **Trenngel (für ein 10% iges Gel)**

380 mM	Tris-Glycin (pH 8,6)
0,1%	SDS
10%	Acrylamid
pro 42 mL (für 12 Minigele):	
480 $\mu$ L	APS (20%)
11 $\mu$ L	TEMED

#### **3x SDS-Probenpuffer**

500 mM	Tris (pH 6,8)
30% (v/v)	Glycerin
3% (w/v)	SDS
3% (v/v)	$\beta$ -ME
0,1% (w/v)	Bromphenolblau

#### **10x SDS-Laufpuffer**

250 mM	Tris
1,9 M	Glycin
1% (w/v)	SDS

Es wurden gleichzeitig 12 Gele der Größe 7x 5 cm und einer Dicke von 1 mm mit 12 Taschen gegossen. Das Analysegel besteht aus einem Trenngel und dem darauf aufpolymerisierten Sammelgel. Zunächst wurden die Komponenten des Trenngels gemischt

und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet. Die Mischung wurde rasch in die vorbereitete Gelapparatur überführt und mit Isopropanol überschichtet. Sobald die Polymerisation abgeschlossen war, wurde der Alkohol abgegossen und die Kammer gründlich mit Wasser gespült. Nachfolgend wurde das Sammelgel in gleicher Weise hergestellt und in direktem Anschluss die Silikonkämme eingesetzt.

Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 3x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min auf 96°C erhitzt und maximal 20 µL in die Taschen des Sammelgels geladen. 5 µL eines Protein-Molekülmassenstandard (Abbildung 16) wurden als Referenz mitgeführt. Die Gelelektrophorese wurde bei 160 V durchgeführt, bis das Bromphenolblau die untere Glasplattenkante erreicht hatte. Anschließend wurden die Gele entweder mit Coomassie-Färbelösung angefärbt (3.2.2.5) oder für das Western-Blot-Verfahren (3.2.2.6) verwendet.

### 3.2.2.5 Coomassie Färbung

Die Proteinbanden in Polyacrylamidgelen wurden durch Inkubation in einer Coomassie-Färbelösung (Nachweisgrenze etwa 10 ng) sichtbar gemacht und durch Vergleich mit einem Standard quantifiziert.

#### **Coomassie-Färbelösung**

0,1% (w/v) Coomassie Blue R 250  
0,1% (w/v) Coomassie Blue G250  
50% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Essigsäure (100%)  
mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

#### **Coomassie-Entfärbelösung**

7% (v/v) Essigsäure (100%)  
10% (v/v) Ethanol

Dazu wurden die Gele etwa 10 min in der Färbelösung gekocht und anschließend in der Entfärbelösung unter mehrmaligem Wechseln der Lösung solange durch Kochen entfärbt, bis der Hintergrund weitgehend farblos und die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Die Dokumentation erfolgte mit einem Geldokumentationssystem oder durch Einscannen.

### 3.2.2.6 Western Blot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden nach der Semy-Dry-Methode auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Towbin et al., 1992).

#### **SDS-Blotpuffer**

48 mM	Tris (pH 8,0)
39 mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol
0,02% (w/v)	SDS

#### **NCP**

0,2 M	Tris (pH 7,2)
3 M	NaCl
1% (v/v)	Tween 20
0,04% (v/w)	NaN <sub>3</sub>

#### **Blockpuffer**

4% (w/v)	BSA
0,1%(w/v)	NaN <sub>3</sub>

in NCP lösen

#### **Carbonatpuffer (pH 10,0)**

0,1 M	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
-------	---------------------------------

#### **BCIP-Lsg.**

0,2 mg/mL	BCIP
-----------	------

#### **PonceauS**

0,1% (w/v)	Ponceau S
5% (v/v)	Essigsäure

Das SDS-Gel, eine auf Gelgröße zugeschnittene Nitrocellulose-Membran und 6 auf Gelgröße zugeschnittene Whatman-Papiere wurden zunächst in Blotpuffer getränkt. Anschließend wurde der Blot luftblasenfrei in die Blotkammer geschichtet (Reihenfolge von + zu -Pol: 3x Whatman-Papier, Membran, Gel, 3x Whatman-Papier). Die Blotkammer wurde geschlossen und die Proteine bei 14 V für 60 min auf die Membran übertragen. Zur

Überprüfung der Bloteffizienz wurde das Gel mit Coomassie und evtl. die Membran mit Ponceau S gefärbt. Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst mit dH<sub>2</sub>O für 30 min entfärbt und dann in 15 mL Blockpuffer inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit NCP gewaschen, über Nacht bei RT mit dem in Blockpuffer verdünnten Primär-Antikörper inkubiert und dieser durch erneutes 3maliges Waschen mit NCP entfernt. Nun wurde der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Sekundärantikörper 1:2.000 in Blockpuffer verdünnt, bei RT für 2 h mit der Membran inkubiert und zu seiner Entfernung dreimal mit NCP gewaschen. Da die Färbereaktion nur in einem basischen Milieu abläuft, wurde die Membran dreimal mit Carbonatpuffer gewaschen und die Reaktion dann durch Zugabe von BCIP gestartet. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion durch Waschen mit Wasser gestoppt und das Gel zur Dokumentation mit dem Geldokumentationssystem Biovision fotografiert oder eingescannt.

### 3.2.2.7 Expression und Aufreinigung von Fusions-Proteinen

Zur Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie wurden diese als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) bzw. Maltose-Bindeprotein (MBP) aus *E. coli* Lysaten aufgereinigt. Das System basiert auf einer *lacZ*-Promotor induzierbaren Expression von Genen oder Genfragmenten als N-terminale Fusion mit GST von *Schistosoma japonicum* oder dem Maltose-Bindeprotein aus *E. coli*. Falls erforderlich erfolgt die Abspaltung des Fusionsproteins mit einer spezifischen Protease, deren Erkennungssequenz zwischen den beiden Proteinteilen liegt.

#### 3.2.2.7.1 GST-Fusions-Proteine

GST ist ein 26 kDa großes, dimeres Protein und wird in *E. coli* voll aktiv exprimiert. Das natürliche Substrat von GST ist Glutathion, welches in Zellen als Reduktionsmittel dient. Bei der Affinitätschromatographie wird GST mit hoher Affinität an Glutathion-Sepharose gebunden. Die anschließende Elution des Fusionsproteins von der Sepharose erfolgt durch Zugabe eines Überschusses von reduziertem Glutathion. In vielen Fällen erhöht der GST-tag Stabilität und Löslichkeit des Proteins. Für die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* empfiehlt sich die Verwendung von Protease-defizienten Stämmen (meist Derivate von BL21), da das Protein sonst abgebaut wird.

#### **IPTG Stock-Lösung**

1 M            IPTG

in dH<sub>2</sub>O lösen, steril filtrieren, bei -20°C lagern

1 M            Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

**GST-Lysispuffer (pH 7,3)**

5 mM            Benzamidin  
1 mM            EDTA  
3 mM             $\beta$ -ME  
1 mM            PMSF  
in PBS

**GST-Waschpuffer (pH 7,3)**

0,05% (w/v)    $\text{NaN}_3$   
in GST-Lysispuffer lösen

**GST-Elutionspuffer (pH 7,3)**

30 mM            Glutathion  
in GST-Waschpuffer lösen und mit 1 N NaOH den pH auf 7,3 einstellen.

**Einfrierpuffer (pH 7,2)**

20 mM            HEPES  
250 mM           KCl  
1 mM            DTT  
60% (v/v)        Glycerin

Die entsprechende *E. coli*-Rosetta oder ArcticXpress Vorkultur wurde bei 37°C über Nacht hergestellt. 6 bis 8 L LB-rich Medium wurden mit 10 mL der Vorkultur pro Liter angeimpft und bei 37°C und 180 upm bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,4$  geschüttelt. Dann erfolgte die Induktion mit 0,2 bis 0,5 mM IPTG über Nacht in Schüttelkultur bei 18 bis 22°C und 180 upm. Die Bakterien wurden am nächsten Tag für 20 min und 4°C bei 5.050 upm pelletiert und die Pellets pro 1 g Feuchtgewicht mit 10 mL GST-Lysispuffer resuspendiert.

Ab diesem Schritt wurde alles Weitere auf Eis, mit gekühlten Materialien und Gegenständen durchgeführt. Es wurden 4 mg/mL Lysozym zugegeben und die Suspension nachfolgend für 10 min bei 4°C gerührt. Der Zellaufschluss per Ultraschall wurde fünffach für 1,45 min durchgeführt. Das Lysat wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und für 60 min bei 4°C und 50.000x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf die mit 50 mL GST-Waschpuffer äquilibrierte Glutathion-Sepharose Säule aufgetragen. Nachfolgend wurde mit 200 bis 300 mL GST-Waschpuffer gewaschen und mit GST-Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde in 4 mL Fraktionen gesammelt, mit dem Bradford-Test die höchsten Protein-Konzentrationen

ermittelt und diese Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert (Größenbestimmung, Abbau, Reinheit). Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt, wenn nötig aufkonzentriert und über Nacht gegen den entsprechenden Puffer dialysiert (3.2.2.3). Falls eine proteolytische Spaltung des Fusionsproteins erforderlich war, wurde dem Protein in der Dialyse 1-2 ng *PreScission* Protease pro mg Protein zugegeben. Vor der Benutzung der Proteine in Assays wurden sie für 10 min bei 4°C und 15.000 upm zentrifugiert und der Proteingehalt mittels SDS-PAGE (3.2.2.4) oder Absorptionsmessung (3.2.2.1) bestimmt. Die Proteine konnten für eine spätere Verwendung bei -20°C gelagert werden. Dazu wurden sie über Nacht bei 4°C gegen Einfrierpuffer dialysiert.

Die Sepharose wurde für weitere Proteinreinigungen durch Waschen mit einem Säulenvolumen 6 M Harnstoff in Phosphatpuffer (0,5 M, pH 7,3) und fünf Säulenvolumen Waschpuffer regeneriert. Für eine längere Lagerung bei 4°C wurde das Säulenmaterial zweifach mit zehn Säulenvolumen 20%igem EtOH gewaschen. Vor erneutem Gebrauch wurde das Gelbett mit Waschpuffer äquilibriert.

### 3.2.2.7.2 MBP-Fusions-Proteine

MBP (*Maltose-binding protein*) ist ein 42,5 kDa großes Protein aus *E. coli* und liegt im Gegensatz zu GST als Monomer vor. Die Vorgehensweise entsprach der der Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen, allerdings wurden die unten angeführten Puffer benutzt. Die affinitätschromatographischen Aufreinigung erfolgte durch Bindung der Fusionsproteine an eine Amylosesäule und anschließende Elution mit Maltose.

#### **MBP-Lysepuffer**

20 mM	Tris (pH 7,3)
200 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	DTT
1 mM	PMSF

#### **MBP-Waschpuffer**

0,05% (w/v)  $\text{NaN}_3$   
in MBP-Lysepuffer lösen

#### **MBP-Elutionspuffer**

30 mM Maltose  
in MBP-Waschpuffer lösen

### 3.2.2.8 Gelfiltration mittels Flüssigkeitschromatographie

Die Gelfiltration (auch Ausschlußchromatographie genannt) trennt Moleküle entsprechend ihrem Molekulargewicht. Die Elution erfolgt isokratisch, d.h. mit nur einem Puffer und ohne Gradienten. Die Gelfiltration ist eine Methode, die Aussagen über den hydrodynamischen Radius der getrennten Proteine erlaubt. Auch das Entsalzen von Lösungen oder der Austausch von Puffern zählt zu den Anwendungen der Gelfiltration.

Die Gelfiltration von Proteinen wurde mittels einer HPLC (*high performance liquid chromatography*) Anlage (ÄKTAPrime oder ÄKTAPurifier) durchgeführt. Dabei wurde zunächst die jeweilige Säule mit dem entsprechenden Puffer äquilibriert. Anschließend wurde das zu trennende Proteingemisch über eine Probenschleife auf die Säule geladen. Die aufgetrennten Proteine wurden von einem Fraktionssammler in 4 mL Fraktionen gesammelt. Mit einer UV-Messzelle wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt und von dem angeschlossenen Computer mit dem Programm „Unicorn 4.0“ (ÄKTAPurifier) bzw. „PrimeView 5.0“ (ÄKTAPrime) ein Chromatogramm des Laufs erstellt.

### 3.2.2.9 Herstellung von Aktin aus Kaninchen-Skelettmuskel

Für diverse biochemische Untersuchungsmethoden wie beispielsweise Pyren-Aktin-Assays (3.2.2.11), Kosedimentationsassays (3.2.2.12), Coverslip-Assays (3.2.2.13) und analytische Ultrazentrifugation (3.2.2.14) wurde monomeres Aktin benötigt. Die Herstellung erfolgte in zwei Schritten nach Spudich und Watt (Spudich und Watt, 1971).

#### 3.2.2.9.1 Präparation des Aceton-Puders

##### **Extraktionspuffer 1 (pH 6,4)**

0,5 M	KCl
0,1 M	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,05 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

##### **Extraktionspuffer 2 (pH 6,4)**

0,5 M	KCl
0,1 M	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,05 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,5 mM	ATP

<b>1 M</b>	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>
------------	-------------------------------------

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. 1,5 kg frisches Muskelfleisch eines frisch geschlachteten Kaninchens wurde mit einem Skalpell zerkleinert, das Fett großzügig entfernt und das verbleibende Fleisch zweimal durch einen elektrischen Fleischwolf gedreht. Das Hackfleisch wurde mit einem Glasstab für 15 min in 2,5 L Extraktionspuffer 1 gerührt, 7 min bei 4.000x g zentrifugiert und das Pellet erneut für 15 min in 2,5 L Extraktionspuffer 2 gerührt und erneut bei 4.000x g für 7 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit kaltem Wasser auf 2,5 L aufgefüllt, der pH Wert mit 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf 8,5 eingestellt und der Extrakt für 10 min gerührt. Dieser Schritt wurde bis zum erkennbaren Quellen des Pellets wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 2,5 L 4°C kaltem Aceton 15 min lang gerührt und 7 min bei 4.000x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 2,5 L 4°C kaltem Aceton 15 min lang gerührt und 7 min bei 4.000x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet über Nacht bei RT auf einer Alufolie unter dem Abzug getrocknet, dabei hin und wieder zerkleinert und nach vollständiger Trocknung in 50 mL Reaktionsgefäße gefüllt und bei -80°C gelagert. Aus 1,5 kg Fleisch konnten so ca. 100 g Acetonpuder gewonnen werden.

### 3.2.2.9.2 Präparation von G-Aktin aus Acetonpuder

#### **G-Aktin-Puffer (G-Puffer, pH 8,0)**

2 mM	Tris
0,2 mM	CaCl <sub>2</sub>
0,2 mM	ATP
0,01%	NaN <sub>3</sub>

#### **50x Aktinpolymerisations-Puffer (pH 7,3)**

2,5 M	KCl
100 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	ATP

Alle Arbeitsschritte fanden wiederum bei 4°C statt. 10 g des Acetonpuders wurden für 15 min in 100 mL kaltem G-Puffer quellen gelassen und anschließend über eine Gaze filtriert. Die Extraktion wurde fünffach wiederholt und die Ausbeute mit SDS-PAGE kontrolliert. Die Überstände mit dem höchsten Aktingehalt wurden vereint und bei 30.000x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert, um grobe Verunreinigungen und verbleibende Muskelfasern abzutrennen. Die Polymerisation des Aktins im klaren Überstand wurde durch Zugabe einer entsprechenden Menge von 50x Aktinpolymerisations-Puffer über Nacht bei 4°C durchgeführt. Abschließend wurde die KCl-Konzentration auf 0,8 M erhöht, um die Interaktion mit Aktin-bindenden Proteinen zu unterbinden, und das F-Aktin anschließend für

3 h bei 150.000x g pelletiert. Das glasige Pellet wurde in 20 mL G-Puffer mit einem *Dounce* Homogenisator homogenisiert und mindestens 3 Tage mit mehreren Pufferwechseln gegen je 2 L G-Puffer bei 4°C dialysiert. Nach der Dialyse wurde das Aktin erneut bei 150.000x g zentrifugiert und nur die oberen 2/3 des Überstandes auf eine mit G-Puffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule (Superdex G-75, 3.2.2.8) geladen, um Monomere von Oligomeren abzutrennen. Die Aktin-Konzentration wurde über die Messung der OD<sub>290</sub> bestimmt ( $\epsilon_{290}$  Aktin= 26.600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

### 3.2.2.10 Pyren-Markierung von Aktin

Um die Aktinpolymerisation fluorimetrisch verfolgen zu können, wurde ein Teil des Aktins mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pyrenyl-iodoacetamid kovalent modifiziert (Cooper et al., 1983).

#### **Pyren-Stammlösung**

50 mM            N-(1-pyren) Iodoacetamid  
in DMSO

#### **Carbonat-Puffer (pH 7,4)**

5 mM            Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,1 mM        CaCl<sub>2</sub>  
0,1 mM        ATP

Da Pyren ein fotosensitiver Fluoreszenzfarbstoff ist, fanden alle Schritte der Pyrenmarkierung vor Licht geschützt statt. Der G-Aktin-haltige Überstand aus der Präparation von G-Aktin wurde gegen Carbonat-Puffer dialysiert. Die Markierung mit Pyren wurde durch Zugabe eines fünfzigfachen molaren Überschusses an Pyren unter kräftigem Rühren für 1 Stunde bei RT durchgeführt. Die Lösung wurde anschließend zur Entfernung von Präzipitaten für 30 min bei 150.000x g zentrifugiert und nicht gebundener Farbstoff im Überstand durch Gelfiltration in G-Puffer über eine Superdex G-75 entfernt.

Die Konzentration des Pyren-markierten Aktins wurde photometrisch ermittelt und errechnete sich aus  $c_{\text{Aktin}} = (\text{OD}_{290} - (0,127 \times \text{OD}_{344})) / \epsilon_{290}$  Aktin. Die Effizienz der Markierung in % errechnete sich aus: Pyren-Aktin (%) =  $c_{\text{pyren}} \times 100 / c_{\text{aktin}}$ . Der Labellinggrad für Pyren-Aktin sollte mehr als 70% betragen. Die Excitations-Wellenlänge für Pyren beträgt 343 nm, die der Emission 386 nm. Für die langfristige Lagerung wurde Pyren-Aktin in 200 µL-Aliquots in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.2.2.11 Pyren-Aktin-Assay

Zur Analyse des Einflusses von VASP und seinen Deletionsmutanten wurden sogenannte Pyren-Assays durchgeführt. Dabei werden niedrige Konzentrationen von Pyren-Aktin (1 bis 4  $\mu\text{M}$ , 10% Pyren-markiert) in Polymerisationspuffer mit dem entsprechenden Protein überführt und der Verlauf der Polymerisation photometrisch verfolgt. Die Fluoreszenzintensität des Pyrens in F-Aktin ist zwanzigfach höher als die des Monomers, was eine genaue Quantifizierung des F-Aktin-Gehalts ermöglicht.

#### **10x Polymerisationspuffer (pH 7,3)**

250 mM	KCl (bzw. 250 mM bis 2,25 M für die Messung der Salzabhängigkeit)
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	EGTA
2 mM	ATP
100 mM	Imidazol

Die für das Experiment bestimmten Proteine wurden gegen PBS-Glycerin dialysiert. Das in G-Puffer dialysierte Aktin wurde gefiltriert um Oligomere zu entfernen. Pyren-Aktin wurde nach dem Auftauen für 15 min bei 4°C und 14.000 upm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert um eventuell aufgetretene Präzipitate zu entfernen und dann auf Eis gelagert. Das für die Messung bestimmte, aufgereinigte VASP wurde kurz ebenfalls für 15 min bei 4°C und 14.000 upm zentrifugiert. Für ein Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{L}$  wurde ein entsprechendes Volumen dH<sub>2</sub>O vorgelegt und anschließend 20  $\mu\text{L}$  des 10x Polymerisationspuffers und 0,05 bis 8  $\mu\text{M}$  VASP und zugegeben. 18  $\mu\text{L}$  einer Mischung von 2  $\mu\text{M}$  Pyren-Aktin und 20  $\mu\text{M}$  unmarkiertem Aktin wurde pro Loch in einer Reihe einer 96-Loch Mikrotiter-Platte vorgelegt und die Polymerisation durch Zugabe von 162  $\mu\text{L}$  des VASP/Polymerisationspuffer-Gemisches induziert. Die Änderung der Fluoreszenz wurde bei 407 nm (Emission) und 365 nm (Anregung) über 24,5 min verfolgt (Fluoreszenz-96-Loch Plattenleser Fluoroskan Ascent).

### 3.2.2.12 Nachweis der Aktin-Bündelungsaktivität von VASP durch Kosedimentation

Der Aktin-Sedimentationsassay wird standardmäßig benutzt, um die Bündelung von F-Aktin durch quervernetzende Proteine zu analysieren (Schirenbeck et al., 2006). Das spezifische Protein wird dafür zusammen mit F-Aktin polymerisiert, entstandene F-Aktin-Bündel durch Zentrifugation pelletiert und anschließend der Gehalt von Aktin im Überstand (nicht

polymerisiertes oder nicht gebündeltes Aktin) und im Pellet (gebündeltes Aktin) mit SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Aktin wurde dazu in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der rekombinanten VASP Proteine aus *D. discoideum* und Mensch polymerisiert. Der Ansatz aus 20 µL VASP (Endkonzentrationen 0,16 bis 5 µM), 10 µL 10x Polymerisationspuffer, 25 µL G-Aktin (Endkonzentration 5 µM) und 45 µL dH<sub>2</sub>O wurde für 90 min bei RT inkubiert und die entstandenen Aktinbündel für 30 min bei 14.000 upm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Anschließend wurden 60 µL des Überstands abgenommen, der Rest des Überstandes verworfen, das Pellet in 100 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert und alle Proben 1:1 mit 3xSDS-Probenpuffer verdünnt. Das Ergebnis wurde per SDS-PAGE bestimmt.

### 3.2.2.13 Coverslip-Assay

Der so genannte Coverslip-Assay dient dazu, die Bündelungs- und F-Aktin-Bindungsaktivität von Aktin-Bindeproteinen *in vitro* mikroskopisch qualitativ nach Phalloidin- und Antikörperfärbung zu analysieren. Hierzu wurden zunächst 5 µM G-Aktin in Gegenwart von äquimolaren Mengen der jeweils angegebenen GST-VASP-Konstrukte für 1 h in Polymerisationspuffer auf mit 200 nM NEM-Myosin II beschichteten Deckgläsern polymerisiert. Für die Experimente mit DdVASP $\Delta$ FAB und  $\Delta$ Tet (ohne Bündelungsaktivität) wurde die Bündelung der Aktinfilamente durch die Zugabe von 10 µM Poly-L-Lysin induziert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Fixativ (3.2.4.1.1) gestoppt. GST-VASP Konstrukte wurden mit polyklonalen anti-GST-Antikörpern und die monomere  $\Delta$ Tet Mutante mit anti-DdVASP-EVH1-Antikörpern (3.2.2.15) markiert. Die Primärantikörper wurden mit polyklonalen Alexa-488 konjugierten anti-Kaninchen-Antikörpern detektiert (Molecular Probes, Cambridge, UK). F-Aktin wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin angefärbt (Sigma, St Louis, MO). Die mikroskopische Analyse der Bündel sowie der Co-Lokalisation von Aktin und VASP erfolgte anschließend am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM) LSM 510 Meta (Zeiss).

### 3.2.2.14 Bestimmung von Dissoziationskonstanten mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation

Mit der Analytischen Ultrazentrifugation (AUC) wird radial und zeitabhängig die Bewegung oder Konzentrationsverteilung von Proteinen während des Zentrifugationslaufs untersucht. Die Zentrifuge ist dazu mit optischen Systemen ausgestattet, die die lokale Molekülkonzentration über die Messung der optischen Dichte, der Schlierenoptik und/oder der Fluoreszenz bestimmt.

Es wurden Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente zunächst von den MBP- und dann von den GFP-Fusionskonstrukten der WH2-Domänen aus *D. discoideum* und humanem VASP zur Bestimmung ihrer Dissoziationskonstante mit ATP-G-Aktin durchgeführt. Dazu wurden die Proteine wie unter 3.2.2.7.2 bzw. 3.2.2.7.1 beschrieben aufgereinigt und der Puffer durch Ultrafiltration gegen G-Puffer ausgetauscht. Die Konzentration der GFP-Fusionsproteine wurde über den Absorptionskoeffizienten von GFP photometrisch bestimmt ( $\epsilon=33.000 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ). Die Quantifizierung der hGAB-Aktin Wechselwirkung erfolgte in G-Puffer durch Messung der Absorption bei 280 (MBP-hGAB) bzw. 490 nm (GFP-hGAB). Im Fall von GFP-DdGAB erfolgte die Quantifizierung des Aktin-GFP-DdGAB-Komplexes über Detektion der Fluoreszenz (Anregung 488 nm, Emission > 505 nm). Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurde eine konstante G-Aktin Konzentration mit unterschiedlichen Konzentrationen der GAB Konstrukte titriert. Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurde anhand des Anteils an gebundenem GAB mit der quadratischen Gleichung

$$[\text{GAB}]/[\text{A}_0]=\frac{1}{[\text{A}_0]}\left\{\frac{1}{2}\left([\text{A}_0]+[\text{GAB}_0]+K_D-\left(\frac{1}{2}\left([\text{A}_0]+[\text{GAB}_0]+K_D\right)^2-[\text{A}_0][\text{GAB}_0]\right)^{1/2}\right\}$$

bestimmt, wobei  $[\text{A}_0]$  and  $[\text{GAB}_0]$  den Gesamtkonzentrationen an eingesetztem Aktin und GFP-GAB entsprechen, während  $[\text{GAB}]$  die Konzentration des gebundenen GFP-GAB darstellt.

### 3.2.2.15 Herstellung und Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern

Polyklonale Antikörper wurden in dieser Arbeit zur Detektion von VASP-Proteinen durch Western Blotting (3.2.2.6) und in der Immunfluoreszenz fixierter Zellen (3.2.4.1) benötigt. Zur Herstellung der Antikörper wurde zunächst das entsprechende Antigen als GST-Fusionsprotein hergestellt, gegen Antigenpuffer dialysiert und in 1 mL Fraktionen bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Vor subkutaner Injektion in Kaninchen (*new zeeland white*) wurde das Antigen im Verhältnis 1:1 mit Freudschem Adjuvans versetzt und durch Ultraschall vermischt. Die Erstimmunisierung und die in zweiwöchigen Abständen folgenden *boost*-Immunistisierungen wurden mit je  $2 \times 500 \mu\text{L}$  Antigen vorgenommen. 2 Wochen nach der Erstimmunisierung wurde alle 2 Wochen, abwechselnd mit den *boost*-Immunistisierungen, Blut aus der Ohrvene entnommen. Die Menge lag bei 10 bis 20 mL Blut pro Tier. Das Blut wurde anschließend für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert bis ein Blutkuchen entstand, anschließend über Nacht bei  $8^\circ\text{C}$  gelagert und für 1 h bei  $4.000 \times g$  zentifugiert. Das Serum wurde nachfolgend mit dem gleichen Volumen Glycerin versetzt und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Nach finalem Ausbluten konnten so insgesamt ca. 100 mL Serum/Tier gesammelt werden.

**Antigenpuffer (pH 8,3)**

1 mM            DTT  
in PBS

**Kopplungspuffer (pH 8,3)**

0,1 M            NaHCO<sub>3</sub>  
0,5 M            NaCl

**Niedrig-pH-Puffer (pH 4,0)**

0,1 M            Natrium-Acetat  
0,5 M            NaCl

**Hoch-pH-Puffer (pH 8,0)**

0,1 M            Tris  
0,5 M            NaCl

Zur Isolation der spezifischen Antikörper wurden diese aus dem Serum mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu musste zunächst eine Affinitätssäule hergestellt werden. Das entsprechende Antigen wurde als MBP-Fusionsprotein aufgereinigt und über Nacht gegen Kopplungspuffer dialysiert. 3 g CNBr-konjugierte Sepharose wurden für 1 h in 1 mM HCl etwa 15 min aufgequollen, dann in eine Leersäule gefüllt und mit 30 mL Kopplungspuffer gewaschen. Das Protein wurde durch mehrstündiges Zirkulieren kovalent mit dem Säulenmaterial verbunden, mit 50 mL Kopplungspuffer gewaschen und die verbleibenden aktiven Gruppen durch 2 stündige Inkubation mit 0,1 M Tris (pH 8,0) abgesättigt. Anschließend wurde für 5 Zyklen à 50 mL abwechselnd mit Niedrig-pH-Puffer und Hoch-pH-Puffer gewaschen. Die Säule wurde vor Aufreinigung der Antikörper in PBS mit 0,5 M NaCl umgepuffert. Zur Lagerung wurde das Säulenmaterial 1:1 mit 86% Glycerin gemischt und bei -20°C eingefroren.

Zur Affinitätsreinigung der Antikörper wurden 50 mL Serum auf Eis aufgetaut, mit 5 mL 10x PBS vermischt, 0,04% NaN<sub>3</sub> zugegeben und das Säulenmaterial mit PBS mit 0,5 M NaCl und 0,04% NaN<sub>3</sub> gewaschen. Das Serum wurde zunächst für 15 min bei 13.000 upm zentrifugiert, um partikuläre Bestandteile zu entfernen und der klare Überstand durch Zirkulieren über Nacht auf die Säule geladen. Anschließend wurde die Säule mit 150 mL PBS-NaN<sub>3</sub> gewaschen und die gebundenen Antikörper mit 0,1 M Natrium-Citrat (pH 3,5) in Fraktionen zu je 150 Tropfen von der Säule eluiert. Das saure Eluat wurden durch Vorgelegen von 400 µL 2 M Tris (pH 9,0) je Fraktionsröhrchen neutralisiert. Die Säule wurde

nachfolgend mit PBS gewaschen und das Serum erneut geladen, bis die Menge der eluierten Antikörper deutlich nachließ. Nach der Analyse per SDS-PAGE wurden die Antikörper aliquotiert, gegen PBS/Glycerin dialysiert und bei -20°C gelagert.

### 3.2.2.16 Bestimmung der intrazellulären Konzentration von VASP in *D. discoideum*-Zellen

Zur Bestimmung der endogenen Konzentration von VASP in *D. discoideum* wurde zunächst eine SDS-PAGE von einem Zelllysate aus  $1 \times 10^5$  Zellen und rekombinantem DdVASP in unterschiedlichen Verdünnungen durchgeführt. Nach Western Blotting und Antikörperfärbung wurden die Bandenintensitäten mit Hilfe von ImageJ densitometrisch analysiert. Durch Abgleich mit dem rekombinanten Referenzprotein wurde die Gesamtmenge von VASP im Zelllysate bestimmt. Um die zelluläre Konzentration von VASP zu berechnen, wurde das durchschnittliche Volumen von Ax2-Zellen mikroskopisch auf 2 pL/Zelle bestimmt. Die Gesamtmenge von VASP in ng konnte nun unter Berücksichtigung des Molekulargewichts von DdVASP (39,5 kDa) in die zelluläre Konzentration in  $\mu\text{M}$  umgerechnet werden.

## 3.2.3 Zellbiologische Methoden

### 3.2.3.1 Kultivierung von *D. discoideum*-Zellen in Flüssigmedium

*D. discoideum*-Zellen wurden in Ax- bzw. HL5c-Medium entweder in Schüttelkultur (150 upm) oder in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm bei 23°C kultiviert (Claviez et al., 1982). Die Zelldichte wurde dabei in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase zwischen  $1 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen/mL gehalten. Bei transformierten Zelllinien wurde dem Medium der entsprechende Selektionsmarker zugegeben (3.1.2.2).

### 3.2.3.2 Kultivierung von *D. discoideum*-Zellen auf Bakterienrasen

Alternativ können *D. discoideum*-Zellen auf Agarplatten in einem Rasen von *Klebsiella aerogenes*-Bakterien als Nahrungsquelle kultiviert werden. Dafür wurden die *D. discoideum*-Zellen in einer *K. aerogenes* Suspension aufgenommen und auf SM-Agar- oder Phosphatagarplatten ausgebracht. Zur Selektion wurden der Suspension entsprechende Antibiotika zugesetzt (3.1.2.2). Die Platten wurden anschließend bei 23°C inkubiert. Fresshöfe wurden nach ca. 3 Tagen sichtbar und sich im Fressrand befindende *D. discoideum*-Zellen wurden gegebenenfalls isoliert und in Flüssigmedium überführt.

### 3.2.3.3 Cryokonservierung von *D. discoideum*-Zellen

#### Einfriermedium

10% DMSO (Dimethylsulfoxid)  
in HL5c-Medium

*D. discoideum*-Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^8$  Zellen/mL in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und auf Eis à 1 mL in Cryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden so in einen Stickstofftank abgesenkt, dass sich die Temperatur pro Minute um etwa  $1^\circ\text{C}$  erniedrigte. Nach 3 bis 4 h wurden die Cryoröhrchen dauerhaft in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert. Zum Auftauen wurden die Cryoröhrchen in warmes Wasser gestellt, die Zellen sofort einmal mit 10 mL kaltem HL5c-Medium gewaschen und zusammen mit frischem 10 mL Ax- oder HL5c-Medium in Petrischalen überführt. Bei Transformanten wurde nach 24 h das Medium gegen Medium mit Selektionsmarker ausgetauscht. Alternativ wurden die Zellen zusammen mit *K. aerogenes* unter Selektionsdruck auf Phosphatagarplatten ausgebracht.

### 3.2.3.4 Konservierung von *D. discoideum*-Sporen

Axenisch gewachsene Zellen wurden zweimal mit kaltem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen, in einer Dichte von  $2 \times 10^8$  Zellen/mL resuspendiert und je 500  $\mu\text{L}$  auf 3 bis 5 Phosphatagarplatten mit *K. aerogenes*-Zellen ausgebracht. Die Zellen entwickelten sich innerhalb von 2 bis 3 Tagen und bildeten Fruchtkörper aus, welche Sporen enthielten. Die Sporen zweier Platten wurden durch Abklopfen im Deckel der Petrischale gesammelt, in 10 mL eiskaltem Soerensen-Phosphatpuffer aufgenommen, à 1 mL auf 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ . Zum Animpfen der Zellen wurde ein Cryoröhrchen mit den Sporen aufgetaut und in eine mit 12 mL Ax- oder HL5c Medium befüllte Petrischale verbracht. Bei Bedarf wurde den Zellen nach 24 h der entsprechende Selektionsmarker zugegeben.

### 3.2.3.5 Bestimmung der Zellzahl von *D. discoideum*-Kulturen

Die Zellzahl wurde hämatozytometrisch mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die fusselfreie Kammer wurde so zusammengesetzt, dass sich Newtonsche Ringe auf den Auflageflächen des Deckglases bildeten. Ca. 20  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurde in die Kammer eingebracht. Ausgezählt wurden die Zellen der 4 Eckquadrate, wobei die an 2 Seiten aufliegenden Zellen mitgezählt wurden. Die Zellzahl wurde entsprechend der Formel:

Zellzahl pro ml = gezählte Zellen / Fläche ( $\text{mm}^2$ ) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung (ml)  
ermittelt.

### 3.2.3.6 Herstellung von Ganz-Zell-Lysaten aus *D. discoideum*-Zellen

Um das Expressionsniveau eines Proteins einer *D. discoideum*-Zelllinie zu ermitteln, wurden Ganz-Zell-Lysate hergestellt. Zur ihrer Präparation wurden adhärente *D. discoideum*-Zellen mit Hilfe einer Pipette von der Platte abgespült, gezählt, 2,5 min bei 1.500 upm abzentrifugiert und das Pellet von  $1 \times 10^7$  Zellen in 500  $\mu$ L SDS-Auftragspuffer gekocht.  $2 \times 10^5$  Zellen wurden pro Spur auf ein SDS-Gel geladen, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, durch Western Blotting auf einer Membran immobilisiert und durch Antikörper detektiert.

### 3.2.3.7 Transformation von *D. discoideum*-Zellen

#### **Elektroporations-Puffer**

10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,1)  
50 mM Glucose  
1,39 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
17,12 g/L Saccharose  
sterilfiltrieren

#### **Healing-solution**

100 mM  $\text{MgCl}_2$   
100 mM  $\text{CaCl}_2$   
autoklavieren

*D. discoideum*-Zellen wurden in mittlerer logarithmischer Wachstumsphase aus einer Platten- oder Schüttelkultur durch fünfminütige Zentrifugation bei 1.200x g pelletiert. Die Zellen wurden anschließend einmal in 10 mL Sörensen-Phosphatpuffer (pH 6,0), dann zweimal mit 10 mL eiskaltem Elektroporations-Puffer gewaschen und schließlich in 700  $\mu$ L Elektroporations-Puffer mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  bis  $8 \times 10^6$  Zellen/mL resuspendiert. 30 bis 40  $\mu$ g DNA wurden in vorgekühlte 4 mm Elektroporationsküvetten vorgelegt und die Zellsuspension zugegeben, gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Unmittelbar vor der Elektroporation wurden anhaftende Zellen durch kurzes Schütteln resuspendiert. Die Elektroporation erfolgte durch zwei „quadratische“ 1 kV-Pulse mit einer Dauer von jeweils 1 ms und einer Pause von 5 s. Anschließend wurden die Zellen in eine Petrischale überführt und für 15 min leicht schüttelnd bei 23°C inkubiert. Nachfolgend wurde 15  $\mu$ L sterile *healing-solution* zugegeben und die Zellen erneut für 15 min schüttelnd bei 23°C inkubiert. Danach wurden 12 mL Ax- bzw. HL5c-Medium zur Zellsuspension gegeben und nach 24 stündiger Inkubation ohne Selektion der entsprechende Selektionsmarker zugegeben. Um positive

Klone zu selektieren wurden zwei unterschiedliche Verfahren durchgeführt: Entweder wurden die Selektionsmarker den Zellen in Flüssigkultur direkt zugegeben. Nach Sichtbarwerden von resistenten Klonen wurden die Zellen abgespült und in unterschiedlichen Verdünnungen (sogenannten *spreader dilutions*) in Soerensen-Phosphatpuffer mit einer Suspension mit *K. aerogenes*-Zellen auf SM-Agarplatten ausgebracht. Nach etwa 3 Tagen konnte klonale Zelllinien mit sterilen Zahnstochern gepickt und in frisches Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt werden.

Alternativ wurden die *D. discoideum*-Zellen pellettiert und anschließend zusammen mit einer *K. aerogenes*-Suspension und G418 auf 1,5%igen Phosphatagarplatten ausgestrichen. Nach 4 bis 10 Tagen konnten klonale Zelllinien aus den Fresshöfen der Phosphatagarplatten isoliert werden. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit sterilen Zahnstochern gepickt und in frisches Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt.

Die Transformanten wurde zum einen über analytische PCR (3.2.1.10) und zum anderen mit Western Blotting und spezifischen Antikörpern (3.2.2.6) überprüft. Die Expression von GFP-Fusionsproteinen konnten zudem mikroskopisch durch Fluoreszenz nach Anregung bei 488 nm nachgewiesen werden. Verifizierte Zelllinien wurden anschließend cryokonserviert (3.2.3.3) oder in Form von Sporen (3.2.3.4) gelagert.

### 3.2.3.8 Herstellung genetischer Knockouts von *D. discoideum*-Zellen

Zur Inaktivierung des *vasP*-Gens in *D. discoideum*-Zellen wurde der in einer früheren Arbeit hergestellte *targeting* Vektor (Schirenbeck et al., 2006) eingesetzt. Dafür wurde zunächst das *knock out*-Konstrukt, welches aus 5'-VASP-Fragment – gefloxter Bsr Kasette - 3'-VASP-Fragment besteht, mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sa*II vom Vektor-Rückgrat gespalten. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der enzymatischen Reaktion wurde ein kleiner Teil des Reaktionsansatzes per Gelelektrophorese analysiert. Anschließend wurden Puffer und Enzyme mit dem PCR-Purification Kit entfernt und die DNA mit sterilem Wasser eluiert. Ax2-Zellen wurden mit ca. 35 µg dieser DNA transformiert (3.2.3.7) und die Transformanten in Flüssigmedium durch Zugabe von Blasticidin S selektioniert. Nach Sichtbarwerden der Kolonien wurden sie mit sterilen Zahnstochern in 24-Lochplatten überführt. Die Deletion des Gens wurde zum einen durch Isolierung genomischer DNA dieser Zelllinien und anschließender analytischer PCR (3.2.1.10) und zum anderen per Western Blotting (3.2.2.6) mit spezifischen Antikörpern überprüft.

### 3.2.3.9 Analyse der Wachstumsrate von *D. discoideum*-Zellen

Für die Analyse der Wachstumsraten auf Agarplatten wurden Zellen in die Mitte von SM-Agarplatten mit *K. aerogenes*-Rasen ausgebracht und in 24 stündigen Abständen die

Durchmesser der sich bildenden Fresshöfe gemessen. Zur Quantifizierung wurden die Fresshofdurchmesser gegen die Zeit aufgetragen.

### **3.2.3.10 Phagozytose-Assay**

Zur Quantifizierung der Phagozytoseaktivität unterschiedlicher *D. discoideum*-Zelllinien wurden die Unterschiede in der Aufnahme von hitzeinaktivierten, Fluoresz-markierten Hefezellen (*S. cerevisiae*) per Fluoreszenzspektroskopie über die Zeit verfolgt. Die Fluoreszenz nicht phagozytierter RITC-markierten Hefezellen wurde mit Trypanblau gequenchet.

Axenisch gewachsene Zellen wurden zunächst mit frischem HL5c-Medium auf eine Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt. 100  $\mu$ L dieser Zellsuspension wurden bei jeder Messung in ein Reaktionsgefäß gegeben und 10 sek bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, das Pellet in 20  $\mu$ L 3x SDS-Puffer resuspendiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren, um später Aussagen über die Proteinkonzentration machen zu können. 10 mL dieser Zellsuspension wurden in 25 mL Erlenmeyer-Kolben bei 150 upm und  $23^\circ\text{C}$  geschüttelt. Markierte Hefen wurden 5 min im Ultraschallbad sonifiziert und bis zur Verwendung geschüttelt. Zum Zeitpunkt 0 wurde die sechsfache Menge an Hefezellen zu den *D. discoideum*-Zellen gegeben. Zu ausgewählten Zeitpunkten (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 min) wurden je 1 mL der Zellsuspension aus dem Kolben entnommen, mit 100  $\mu$ L Trypanblau versetzt, 3 min bei RT unter Schütteln inkubiert, die Zellen bei 800x g für 2 min bei RT pelletiert und der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Das Pellet wurde in 1 mL  $4^\circ\text{C}$  kaltem Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert, kurz gevortext und die Fluoreszenzemissionsintensität bei 574 nm mit einer Anregungswellenlänge von 544 nm am Fluoreszenzspektrometer Jasco Fluor gemessen. Die Proteinkonzentration der Zellsuspensionen wurde mittels SDS-PAGE bestimmt, die relative Fluoreszenz nach Subtraktion der Fluoreszenz bei  $t=0$  gegen die Zeit aufgetragen und die Differenzen im Proteingehalt (der einzelnen Messungen vor Zugabe der Hefen) durch Normierung korrigiert. Dieser Assay wurde pro Zelllinie in 12 unabhängigen Messungen durchgeführt.

## **3.2.4 Mikroskopie**

Konfokale Mikroskopie verwendet im Gegensatz zu Durchlichtmikroskopie eine Detektionslochblende (*pinhole*) die in konjugierter Ebene zur Fokusebene des Objektivs - also konfokal- angeordnet ist. Die Lochblende dient dazu, Fluoreszenzlicht das aus Bereichen über- oder unterhalb der Fokusebene stammt, zu unterdrücken. Bei der konfokalen *Laser-scanning* Mikroskopie (LSM) wird der abzubildende Bereich der Probe

scheibenweise mit einem Punktlaser in der x und y Ebene abgerastert. Als Lichtquelle werden, je nach benutztem Fluorophor, Laser unterschiedlicher Wellenlängen verwendet. Eine dreidimensionale Darstellung der Probe erhält man durch Aufnahme mehrerer Schnitte entlang der z-Achse. Die sequentielle Aufnahme von solchen 3D-Bildstapeln wird *in vivo* 4D-Mikroskopie genannt und ermöglicht das Verfolgen dreidimensionaler Prozesse über die Zeit.

In dieser Arbeit wurde konfokale Mikroskopie an fixierten Immunfluoreszenzpräparaten und lebenden Zellen durchgeführt, die GFP-Fusionproteine exprimierten. Zur Analyse wurde das konfokale Laserscanning-Mikroskop LSM 510 Meta der Firma Carl Zeiss AG benutzt. Es wurden Laser mit Wellenlängen von 488 nm, 633 nm und 543 nm verwendet. Bei Doppelfärbungen wurden die Fluorochrome im *multi track* Modus gemessen, um das „Durchbluten“ der Signale zu vermeiden. Die Öffnung der Lochblende wurde auf die Wellenlängen beider Laserlinien abgestimmt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde ein Plan-Apochomat 63x/1,4 Immersionsöl Objektiv benutzt. Zur Analyse und Bearbeitung der Daten wurden die Programme Zeiss LSM Image Browser, ImageJ und Adobe Photoshop CS verwendet.

### 3.2.4.1 Untersuchung fixierter *D. discoideum*-Zellen

Mittels indirekter Immunfluoreszenz kann die subzelluläre Lokalisation von Proteinen bestimmt werden. Dafür werden die Zellen zunächst fixiert, die Proteine anschließend mit primären Antikörpern detektiert und ihre Bindungsstellen mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern sichtbar gemacht. Das F-Aktin der Zellen kann mit Fluoreszenz-Markiertem Phalloidin (TRITC-Phalloidin = Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate) sichtbar gemacht werden. Phalloidin ist ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes und bindet irreversibel an F-Actin was zur Stabilisierung der Filamente führt. Aus diesem Grund kann es nicht in lebenden Zellen verwendet werden.

#### 3.2.4.1.1 Fixierung und Präparation von *D. discoideum*-Zellen für die Immunfluoreszenz

##### **PBS/Glycin**

100 mM Glycin  
in PBS lösen

##### **PIPES-Puffer (pH 6,0)**

20 mM PIPES

in dH<sub>2</sub>O lösen und mit NaOH auf pH 6,0 einstellen

**PBG**

0,5% (w/v) BSA

0,1% (w/v) Fischgelatine

in PBS lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

**Na-Phosphat-Puffer (pH 8,0)**

140 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9,2)

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4,5)

0,1% NaN<sub>3</sub>

**Fixativ (pH 6,8)**

0,4 g Paraformaldehyd

7 mL dH<sub>2</sub>O

mit NaOH auf pH 6,8 einstellen

Erwärmen auf 40°C

Zufügen von 10 mL

20 mM PIPES (pH 6,0)

Zufügen von 3 mL

1,2% Pikrinsäure-Lösung

**Gelvatol**

**Schritt 1**

0,14 M NaCl

Zufügen von 100 mL einer

1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2)

25 g Polyvenylalkohol (MW 30.000 - 70.000) zugeben

über Nacht rühren

**Schritt 2**

50 mL Glycerin

16 h rühren, zentrifugieren, aliquotieren und bei -20°C lagern

Alle Antikörperlösungen wurden vor Gebrauch für 5 min bei 14.000 upm zentrifugiert und die Puffer sterilfiltriert. Entsprechend Humbel et al. (1992) wurden 300 µL einer Zell-Suspension mit einer Dichte von 5x 10<sup>5</sup> Zellen/mL in HL5c-Medium auf ein gereinigtes Deckglas gebracht (Humbel und Biegelmann, 1992). Nach Absitzen der Zellen für 45 min in einer feuchten

Kammer wurde das Medium abgesaugt, sofort 300  $\mu$ L frisch angemischtes Fixativ zugegeben und die Zellen für 15 bis 20 min fixiert. Das Deckglas wurde durch kurzes Eintauchen in 10 mM PIPES (pH 6,0) und anschließend in PBS/Glycin gewaschen, um freie Aldehydgruppen zu reduzieren. Dann wurden die Zellen nach fünfminütiger Inkubation mit PBS/Glycin für 10 min mit 70% (v/v) Ethanol nachfixiert. Nachfolgend wurde zweimal für 5 min mit 300  $\mu$ L PBS/Glycin und zweimal 15 min mit 300  $\mu$ L PBG gewaschen.

Die Primärantikörper (1:200 in PBG) wurden über Nacht bei RT inkubiert. Nach Entfernen ungebundener Primärantikörper durch sechsmaliges Waschen für 5 min mit PBG, wurden die fixierten Zellen für 2 h mit dem Sekundärantikörper (1:1.000 in PBG) inkubiert. Nach Abwaschen des ungebundenen Sekundärantikörpers wurde zweimal für 5 min mit PBG und zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Das F-Aktinzytoskeletts wurde mit TRITC-Phalloidin (1:500 in PBG für 30 min) markiert. Um beim Trocknen ein Auskristallisieren von Salz zu verhindern wurden die Deckgläschen mit deionisiertem Wasser gespült, nachfolgend vorsichtig mit Kleenextüchern abgetupft und in einen auf einem Objektträger befindlichen Tropfen Gelvatol-Lösung eingebettet. Das Präparat wurde zum Aushärten des Eibettmittels für mindestens 24 h im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Sollte lediglich das F-Aktin der Zelle sichtbar gemacht werden, wurden die Zellen nach der Fixierung eine halbe Stunde mit TRITC-Phalloidin gefärbt. Anschließend wurden sie zweimal für 5 min mit PBS/Glycin, zweimal 5 min mit PBS gewaschen und dann in Gelvatol eingebettet.

### 3.2.4.2 Aufnahme lebender *D. discoideum*-Zellen

Zur Aufnahme von lebenden Zellen wurden diese auf *glass bottom dishes* ausgebracht, 30 min in Wachstumsmedium auf der Glasoberfläche anhaften gelassen und durch Austausch des Mediums gegen Soerensen-Phosphatpuffer (3.2.4.2) sowohl Filopodienbildung als auch Motilität induziert, sowie die Hintergrund-Fluoreszenz reduziert.

#### 3.2.4.2.1 Motility-Assay

Die Motilität der unterschiedlichen Zelllinien wurde nach entsprechender Vorbereitung der Zellen (siehe 3.2.4.2) mikroskopisch mit dem Zeiss LSM im Pseudohellfeld analysiert. Als Objektiv wurde hier das Plan-Apochomat 20x/0,75 und als Lichtquelle die Laserlinie der Wellenlänge 633 nm benutzt. Um eine laserinduzierte Schädigung der Zellen zu minimieren, wurde nur mit 1% Intensität des Lasers angeregt. Über einen Zeitraum von 30 min wurde 1 Bild pro Minute aufgenommen. Mit Hilfe des ImageJ-Plugins „MTrackJ“ wurden pro Zelllinie 20 bis 80 Zellen ausgewertet.

#### 3.2.4.2.2 Bestimmung der Filopodienlänge

Die maximale Länge der Filopodien wurde nach dreißigminütiger Vorinkubation in Soerensen-Phosphatpuffer (3.2.4.2) mikroskopisch mit dem Zeiss LSM im Falle von Ax2- und VASP-null-Zellen durch Pseudohellfeld-Mikroskopie und im Falle der rekonstituierten Zelllinien durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Um eine möglichst genaue Messung der Filopodienlänge zu gewährleisten, wurde das 60x Plan-Apochomat 63x/1,4 Immersionsöl-Objektiv benutzt. Die maximale Länge der Filopodien von jeweils mindestens 60 Filopodien pro Zelllinie wurde manuell vermessen und mit der „Origin“-Software statistisch ausgewertet.

#### 3.2.4.2.3 Mikroskopischer Phagozytose-Assay

In Ax2- und VASP-null-Zellen wurde GFP-Coronin (3.1.5), welches während der Phagozytose an die Membran lokalisiert (Maniak et al., 1995), ektopisch unter Kontrolle des Aktin 15 Promotors exprimiert. Bei Zugabe von fluoreszenzmarkierter Hefe konnten so einzelne Phagozytosevorgänge beobachtet und ihre Dauer bestimmt werden.

Wie einleitend beschrieben (3.2.4.2) wurden  $5 \times 10^6$  *D. discoideum*-Zellen vorbereitet, die vierfache Menge an fluoreszierenden Hefe-Partikeln zugegeben und unmittelbar mikroskopisch untersucht. Um die zeitlichen Abstände zwischen der Aufnahme des GFP und des TRITC Signals möglichst klein zu halten wurde bei diesem Assay im *multi track* Modus gescannt. Pro Zelllinie wurde die Dauer von mindestens 50 Phagozytose-Ereignissen ausgewertet.

#### 3.2.4.2.4 Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM)

Um die Zellsubstratadhäsion verschiedener Zelllinien miteinander vergleichen zu können, wurden die Zellen per Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) untersucht (Weber et al., 1995). RICM ist eine Mikroskopiertechnik, mit deren Hilfe man den Abstand zwischen einer Zelle und dem unterliegenden transparenten Substrat analysieren kann. Die Anwendung ist auf Strukturen in unmittelbarer Nähe der Oberfläche des Substrats beschränkt.

Bei der RICM wird kohärentes Licht, üblicherweise Laserlicht, verwendet. Dieses wird an optischen Grenzflächen zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes gebrochen und teilweise reflektiert und zwar zunächst zum Teil an der Oberkante des Glassubstrats (Glas/Medium-Grenzfläche) und anschließend an der Unterseite der Zelle (Medium/Zellmembran-Grenzfläche). Durch die teilweise Reflexion tritt, abhängig vom Abstand der Zelle zur Linse, dem Brechungsindex in der Lösung, dem Winkel und der Wellenlänge, eine Differenz im Gangunterschied der beiden Strahlen auf, die sich

entsprechend der unterschiedlichen Wegstrecke abwechselnd konstruktiv und destruktiv überlagern. So werden Newtonsche Ringe sichtbar.

Für RICM-Analysen wurden die Zellen nach entsprechender Vorbereitung (3.2.4.2) für 1 h alle 6,5 s aufgenommen. Insgesamt wurden mindestens 10 verschiedene Zellen pro Zelllinie ausgewertet. Die Bestimmung der Größe der Adhäsionsfläche der Zelle auf dem Substrat erfolgte unter Zuhilfenahme des ImageJ-Hilfswerkzeugs „CellOutliner“. Die adhärierende Fläche wurde über die Zeit gemittelt und statistisch ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleich von humanem mit *Dictyostelium*

#### VASP durch Primär- und Sekundärstruktur

#### Analysen

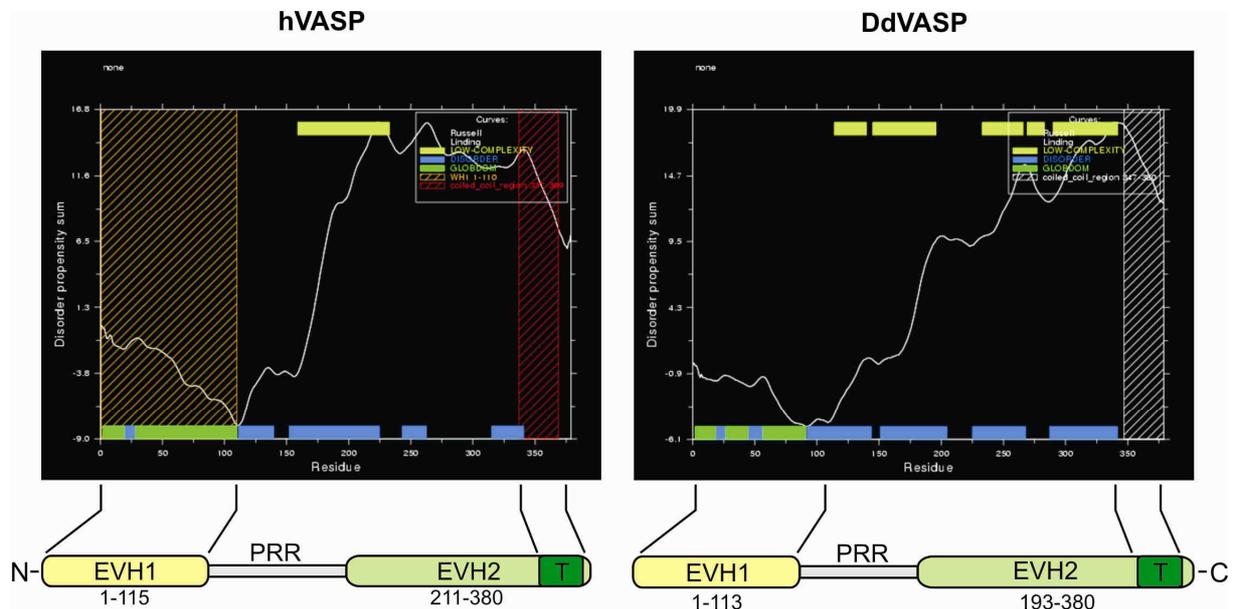
Alle Proteine der Ena/VASP Familie besitzen eine konservierte Domänenstruktur bestehend aus der N-terminalen EVH1-Domäne (*Ena/VASP Homology-1*), einer zentralen, Prolin-reichen-Domäne (PRD) und der C-terminalen EVH2-Domäne (Krause et al., 2003, Sechi und Wehland, 2004).

Ena/VASP Proteine beinhalten relativ wenige intrinsisch strukturierte Bereiche, weshalb in der Vergangenheit nur wenige Proteinkristallisationsexperimente mit kurzen Peptiden erfolgreich waren. Lediglich die Strukturen der globulären N-terminalen, hochkonservierten EVH1-Domäne im Komplex mit einigen Liganden, sowie die C-terminale Tetramerisierungsdomäne (Tet) konnten bislang ermittelt werden (Boeda et al., 2007, Fedorov et al., 1999, Kuhnel et al., 2004, Prehoda et al., 1999). Außerdem sind Strukturen des Aktin-bindenden Peptids GAB im Komplex mit G-Aktin ermittelt worden (Ferron et al., 2007). Da keinerlei Strukturdaten für DdVASP vorliegen und es während dieser Arbeit, trotz zahlreicher eigener Ansätze auch nicht gelungen ist, eine Struktur der EVH1-Domäne aus DdVASP zu ermitteln, werden im Folgenden Sequenzanalysen und Vergleiche mit bekannten Strukturen verwendet, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen DdVASP, anderen Aktin-bindenden Proteinen und dem wesentlich besser charakterisierten humanem Ortholog hVASP aufzuzeigen.

#### 4.1.1 Domänengröße und Organisation

DdVASP und hVASP besitzen ein nahezu identisches Molekulargewicht von etwa 40 kDa und weisen dieselbe Domänenorganisation auf. Wie alle Vertreter der Ena/VASP Familie besitzt auch DdVASP eine N-terminale EVH1-Domäne, gefolgt von einer Prolin-reichen-Domäne (PRD) und der C-terminalen EVH2-Domäne (Han et al., 2002). Eine Suche nach globulären Domänen mit der Software GlobPlot 2.3 ([www.globplot.embl.com](http://www.globplot.embl.com)) ergab, dass

sowohl in hVASP als auch in DdVASP lediglich die EVH1-Domäne und die Tetramerisierungsdomäne klare Sekundärstrukturen aufweisen. Sowohl die PRD als auch der Großteil der EVH2-Domäne hingegen sind vermutlich nicht strukturiert (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Sekundärstrukturanalyse von hVASP und DdVASP.** Die Vorhersage von Sekundärstrukturen erfolgte durch die Software GlobPlot 2.3. Sowohl in hVASP als auch in DdVASP wurden innerhalb der EVH1-Domäne globuläre Abschnitte erkannt (grüne Balken). Blaue Balken markieren ungeordnete Bereiche. Die C-terminale Tetramerisierungsdomäne wurde als coiled-coil Region erkannt (rot in hVASP bzw. weiß schraffiert in DdVASP). Um die Ergebnisse besser zuordnen zu können, ist die Domänenorganisation des jeweiligen Proteins unter den GlobPlot-Diagrammen schematisch dargestellt, die Nummern entsprechen den Aminosäuren. Die strukturierten Bereiche sind dem Diagramm zugeordnet.

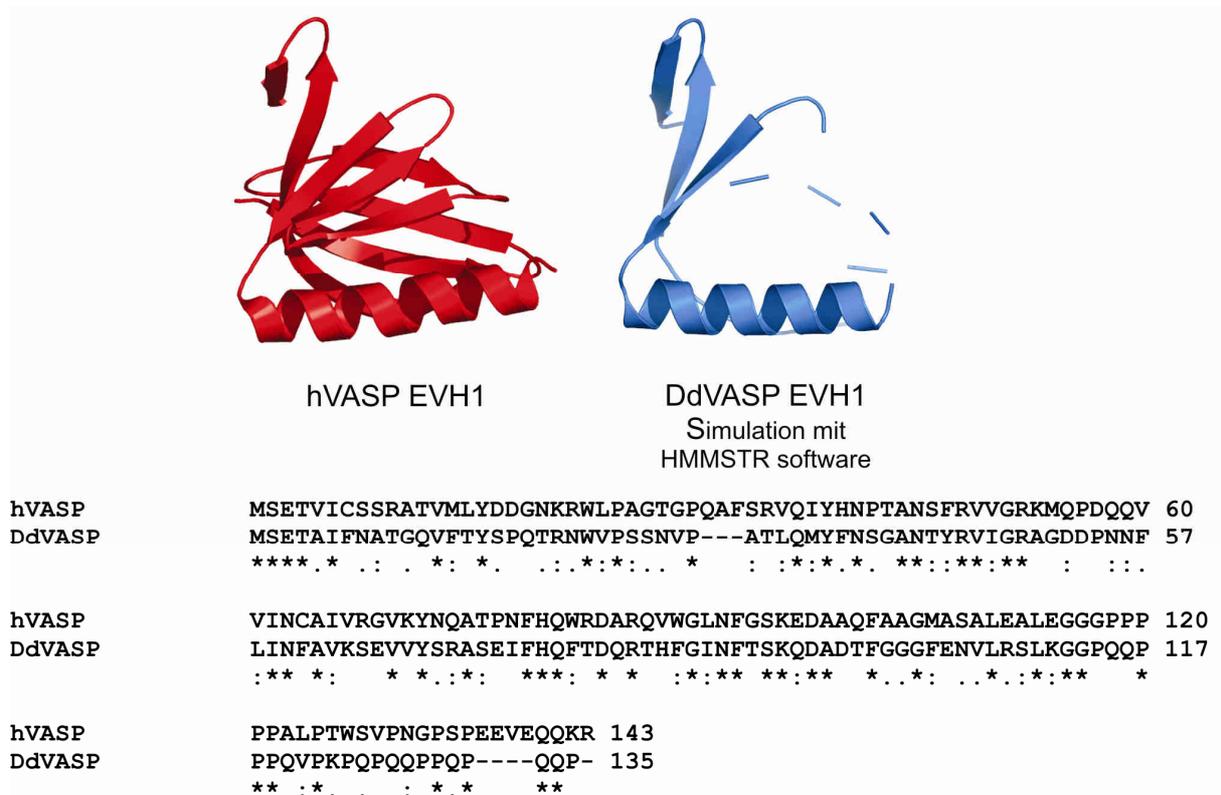
## 4.1.2 Die EVH1-Domäne

Die EVH1-Domäne ist eine ~115 AS lange, weit verbreitete Domäne aus der PH (pleckstrin homology)-Superfamilie (Ball et al., 2000, Ball et al., 2002, Barzik et al., 2001, Beneken et al., 2000, Fedorov et al., 1999, Prehoda et al., 1999). Homologe Domänen sind außer in Ena/VASP Proteinen auch in der WASP Familie sowie in Homer und Spred zu finden (Bundschu et al., 2006, Gertler et al., 1996). Diese Domäne ist für die subzelluläre Lokalisation der Proteine verantwortlich (Brindle et al., 1996, Gertler et al., 1996, Krause et al., 2004, Niebuhr et al., 1997). Die Bindung der EVH1-Domäne erfolgt über so genannte FP<sub>4</sub>-Motive, die durch die Konsensussequenz (F/W/Y/L)PPPPX(D/E)(D/E)(D/E)

gekennzeichnet sind (X= beliebige Aminosäure; Ball et al., 2000, Ball et al., 2002). Die bekanntesten Bindungspartner für die EVH1-Domäne sind Zyxin und Vinculin (Reinhard et al., 1995, Reinhard et al., 1996), welche VASP an fokale Adhäsionen rekrutieren, sowie das *Listerien* Protein ActA, welches für die Rekrutierung von VASP an die bakterielle Zelloberfläche verantwortlich ist (Beckerle, 1998, Brindle et al., 1996, Chakraborty et al., 1995). Die Rekrutierung von VASP an die Plasmamembran in der Front von Filopodien und Lamellipodien ist hingegen weit weniger gut verstanden. Interessanterweise scheint die EVH1-Domäne nicht allein für die intrazelluläre Lokalisation von VASP verantwortlich zu sein. Zellbiologische Untersuchungen zu diesem Thema lieferten allerdings teils widersprüchliche Ergebnisse. Zum einen konnte in *Dictyostelium* VASP-null-Zellen gezeigt werden, dass ein Konstrukt aus PRD und EVH2-Domäne dieselbe Funktion wie das Wildtyp-Protein besitzt, jedoch schien ein Konstrukt aus EVH1- und EVH2-Domäne nicht mehr in der Lage zu sein korrekt zu lokalisieren (Han et al., 2002). Auch im Säuger-System herrscht Unklarheit bezüglich der Rolle von EVH1- und EVH2 Domänen bei der Lokalisation von Ena/VASP: In MV<sup>D7</sup>-Zellen wurde demonstriert, dass die EVH1-Domäne von VASP für dessen Lokalisation in die Spitzen von Lamellipodien und Filopodien benötigt wird, während die EVH2-Domäne alleine nicht lokalisiert (Applewhite et al., 2007). In einer weiteren Studie wurde jedoch behauptet, dass die EVH2-Domäne von Mena für dessen Lokalisation in die lamellipodiale Spitze ausreicht (Loureiro et al., 2002). Hier führte erst die Deletion der FAB zur Mislokalisierung des Proteins. Dieser Befund war jedoch nicht für hVASP reproduzierbar, da hier die Deletion der FAB keinen Effekt auf dessen Lokalisation hatte (Schirenbeck et al., 2006). Eine wahrscheinliche Erklärung für die sehr unterschiedlichen Ergebnisse aus Lokalisationsstudien in MV<sup>D7</sup>-Zellen könnte darin begründet liegen, dass diese Zellen entgegen den bisherigen Annahmen sehr wohl signifikante Mengen EVL exprimieren (Faix et al., unveröffentlichte Beobachtung). Dies könnte zur Bildung von Heterotetrameren führen, die anders als die Mutanten lokalisieren und letztendlich die Interpretation der Ergebnisse deutlich erschweren.

Da die Struktur der EVH1-Domäne aus DdVASP bislang nicht bekannt ist, wurde eine mögliche Struktur mit Hilfe des Programms HMMSTR/Rosetta aus der Aminosäuresequenz berechnet. Die HMMSTR Software simuliert Sekundärstrukturen, lokale Strukturen (in Form von Torsionswinkeln), Supersekundärstruktur ( $\beta$ -Faltblatt Kurven etc.) sowie Tertiärstrukturen (in Form von Koordinaten) unter Zuhilfenahme bekannter Strukturen. Obwohl nur ca. 60% der Aminosäuren in Form einer Tertiärstruktur berechnet werden konnten, zeigt diese allerdings weitestgehende Übereinstimmung mit der NMR-Struktur der EVH1-Domäne von hVASP (Ball et al., 2000; Abbildung 19). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie, der simulierten Raumstruktur sowie der Beobachtung, dass die EVH1-Domäne aus DdVASP

ebenfalls an FP<sub>4</sub>-Motive bindet (Linkner et al., unveröffentlicht), ist davon auszugehen, dass die EVH1-Domäne von DdVASP dieselbe Funktion besitzt wie die von hVASP.



**Abbildung 19: Struktur- und Sequenzvergleich der EVH1-Domäne aus hVASP und DdVASP.**

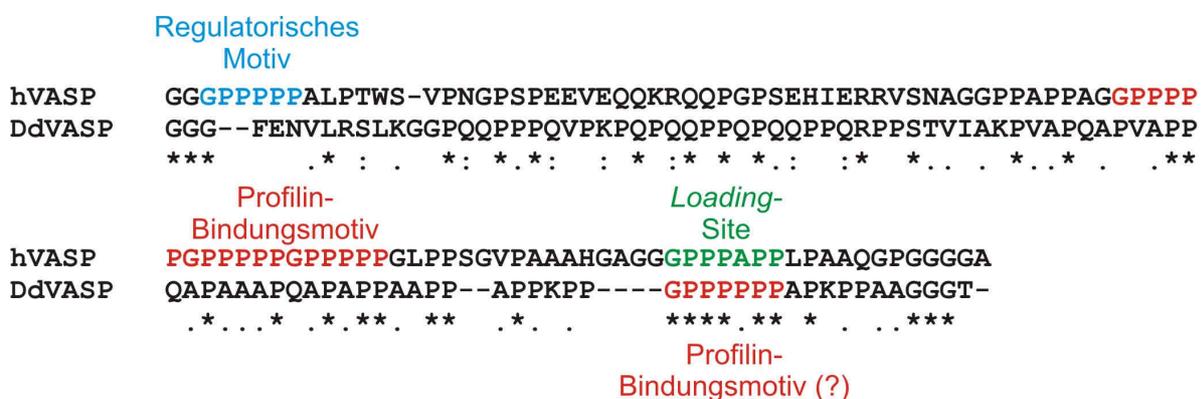
**(Oben)** Die EVH1-Domäne aus hVASP ist globulär und besteht aus mehreren  $\beta$ -Faltblattstrukturen und einer  $\alpha$ -Helix (NMR-Struktur; pdb 1EGX). Eine Berechnung der möglichen Sekundärstruktur der DdVASP EVH1-Domäne mit der HMMSTR Software aus der Aminosäuresequenz ergab eine unvollständige Struktur, in der jedoch sowohl die  $\alpha$ -Helix als auch Teile der  $\beta$ -Faltblatt Region klar zugeordnet werden konnten. **(Unten)** Der Sequenzvergleich mit ClustalW ergab eine Sequenzähnlichkeit von etwa 75% zur EVH1-Domäne aus hVASP.

### 4.1.3 Die Prolin-reiche-Domäne

Prolin-reiche-Domänen sind in einer Vielzahl von Zytoskelett-assoziierten Proteinen zu finden. Sie beinhalten Bindungsstellen für SH3-Domänen (*Src-homology 3*; ca. 60 AS lange Region, die Prolin-reiche-Motive bindet), WW-Motive (W steht für die Aminosäure Tryptophan) und das Aktin Monomer Bindepotein Profilin. Innerhalb der Ena/VASP Familie ist die PRD der am wenigsten konservierte Bereich, und ist vermutlich für spezifische

Bindungen der verschiedenen Isoformen an unterschiedliche Effektoren verantwortlich (Comer et al., 1998, Gertler et al., 1995, Gertler et al., 1996, Lambrechts et al., 2000).

Die PRD von hVASP kann in drei unterschiedliche funktionelle Einheiten unterteilt werden: Ein regulatorisches Prolin-reiches-Motiv, welches vermutlich mit SH3- und WW-Motiven interagiert und direkt hinter der EVH1-Domäne liegt, eine zentrales Profilin-Bindungsmotiv bestehend aus je drei sogenannten GP<sub>5</sub>-Motiven, sowie ein als *loading site* bezeichnetes Prolin-reiches-Motiv, welches direkt an die EVH2-Domäne angrenzt und ebenfalls Profilin-Aktin bindet (Abbildung 20; Ferron et al., 2007, Kursula et al., 2008). In theoretischen Modellen zur VASP-vermittelten Aktinpolymerisation wird davon ausgegangen, dass die zentralen GP<sub>5</sub>-Motive Profilin-Aktin-Komplexe rekrutieren und diese dann über die *loading site* an die GAB innerhalb der EVH2-Domäne weitergegeben werden, wo sie nachfolgend in ein gebundenes Aktinfilament inkorporiert werden (Ferron et al., 2007, Kursula et al., 2008). In DdVASP ist eine klare Unterteilung in die drei funktionellen Einheiten weder anhand eines Sequenzvergleiches noch anhand einer HCA-Analyse möglich (Abbildung 20 und Abbildung 22). DdVASP besitzt kein erkennbares regulatorisches Prolin-reiches-Motiv. Es ist lediglich ein klassisches GP<sub>5</sub>-Motiv zur Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen vorhanden. Da es sich unmittelbar vor der EVH2-Domäne befindet, könnte es in Analogie zum human VASP eine ähnliche Funktion wie die *loading site* ausüben (Abbildung 20).



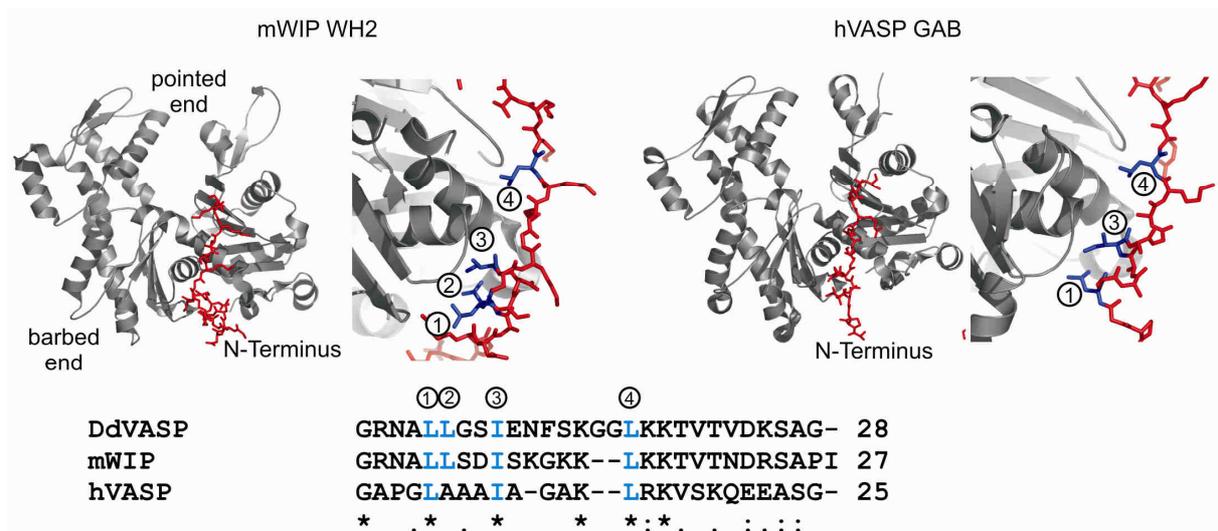
**Abbildung 20: Sequenzvergleich der PRD von hVASP und DdVASP.** Die humane PRD besitzt 3 zentrale GP<sub>5</sub>-Motive zur Rekrutierung von Profilin-Aktin, sowie ein N-terminales regulatorisches Prolin-reiches-Motiv und die sogenannte *loading site* vor der EVH2-Domäne. DdVASP besitzt lediglich ein klassisches GP<sub>5</sub>-Motiv in Position der *loading site* aus hVASP, jedoch keine weiteren klassischen Profilin Bindungsstellen.

## 4.1.4 Die EVH2-Domäne

Innerhalb der C-terminalen EVH2-Domäne liegen drei funktionelle Motive: Die N-terminale G-Aktinbindestelle (*G-Actin Binding Site* (GAB)), gefolgt von der F-Aktinbindestelle (*F-Actin Binding Site* (FAB)) und der C-terminalen Tetramerisierungsdomäne (Tet). Wie der Name schon impliziert, bindet die GAB an monomeres G-Aktin und die FAB präferentiell an filamentöses F-Aktin (Bachmann et al., 1999, Walders-Harbeck et al., 2002). Über die C-terminale Tetramerisierungsdomäne, die speziesunabhängig aus hochkonservierten, rechtsgängigen  $\alpha$ -Helices besteht, werden sehr stabile, parallele Tetramere gebildet (Kuhnel et al., 2004, Zimmermann et al., 2002).

### 4.1.4.1 Die G-Aktin Bindestelle (GAB)

Die GAB aus DdVASP ist ein typisches WH2-Motiv mit vier konservierten, hydrophoben Aminosäuren (Ile und Leu) und einem LKKT-Motiv. Es zeigt höchste Sequenzhomologie zum WH2-Motiv aus WIP (*Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) interacting protein*), dessen Röntgenkristallstruktur im Komplex mit Aktin bekannt ist und aus diesem Grund zu Strukturvergleichen herangezogen wurde (Chereau et al., 2005; Abbildung 21). Die Sequenz der hVASP GAB zeigt eine weit niedrigere Sequenzhomologie zu anderen WH2-Motiven, wobei das LKKT-Motiv durch die Sequenz LRKV ersetzt ist. Allerdings sind 3 der üblicherweise 4 hydrophoben Aminosäuren Leucin- und Isoleucin auch hier zu finden (Chereau und Dominguez, 2006, Ferron et al., 2007; Abbildung 21). Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) des hVASP GAB-Aktin-Komplexes wurde in ITC (Isotherme Titrationskalorimetrie) Experimenten ermittelt und ist im Vergleich zu anderen WH2-Motiven (z.B. aus Cobl, 40 nM oder N-WASP, 1  $\mu$ M; Ahuja et al., 2007, Co et al., 2007) mit  $120 \pm 60 \mu$ M relativ gering, was möglicherweise auf das Fehlen der vierten hydrophoben Aminosäure zurückzuführen ist (Chereau und Dominguez, 2006).



**Abbildung 21: Struktur- und Sequenzvergleich der WH2-Motive von WIP, hVASP und DdVASP.**

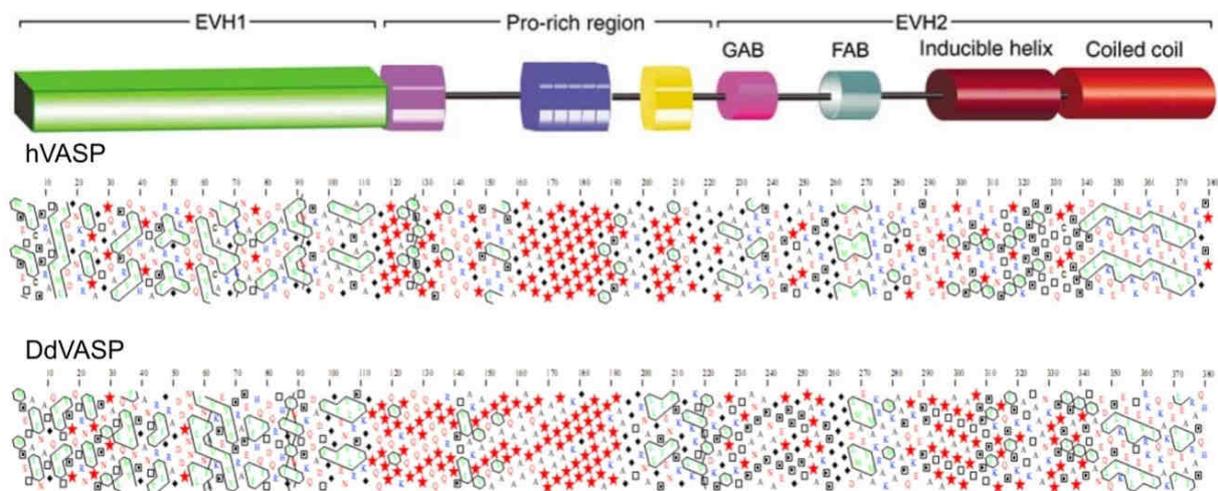
**(Oben)** Die WH2-Motive aus mWIP und hVASP (rot) binden über hydrophobe Aminosäuren (blau) in der hydrophoben Bindungstasche von Aktin (grau) (modifiziert aus Chereau et al., 2005, Ferron et al., 2007). **(Unten)** Analysen mit ClustalW zeigten, dass die GAB aus DdVASP eine hohe Sequenzhomologie zu dem WH2-Motiv aus WIP aufweist. Die Zahlen 1-4 zeigen die WH2-typischen hydrophoben Aminosäuren an. Die GAB aus hVASP besitzt lediglich drei der üblicherweise vier vorkommenden hydrophoben Aminosäuren.

#### 4.1.4.2 Die F-Aktin Bindestelle (FAB)

Das FAB-Motiv aus VASP ist das bislang am wenigsten charakterisierte Motiv der EVH2-Domäne. Frühere *in vitro* Studien zeigten, dass dieses Motiv für die Bindung von VASP an F-Aktin essentiell ist, und dass die Aktin-Affinität des VASP Tetramers vermutlich höher ist als in monomeren Mutanten (Bachmann et al., 1999). Außerdem wird über die vier FAB-Motive im VASP Tetramer *in vitro* die Quervernetzung von Aktinfilamenten zu Bündeln vermittelt (Bachmann et al., 1999, Barzik et al., 2005, Schirenbeck et al., 2006). Interessanterweise war eine VASP $\Delta$ FAB Mutante in *Dictyostelium* VASP-null-Zellen nicht in der Lage, die Filopodienbildung wiederherzustellen. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, dass VASP Aktinfilamente in den Spitzen von Filopodien bündelt und so deren Elongation fördert (Schirenbeck et al., 2006). Studien in MV<sup>D7</sup>-Zellen legten nahe, dass die FAB aus Mena essentiell für dessen Lokalisation in den Spitzen von Lamellipodien und Filopodien ist (Bear et al., 2002). Diese Ergebnisse konnten von Schirenbeck und Kollegen (2006) für hVASP allerdings nicht bestätigt werden. Unabhängig davon, ist der Mechanismus der F-Aktin Bindung durch die FAB allerdings noch weitgehend unbekannt.

Sowohl die GAB als auch die FAB in hVASP sind in der Lage, kurze Helices auszubilden (Ferron et al., 2007). Um dies für die DdVASP-Motive zu überprüfen wurde das Programm

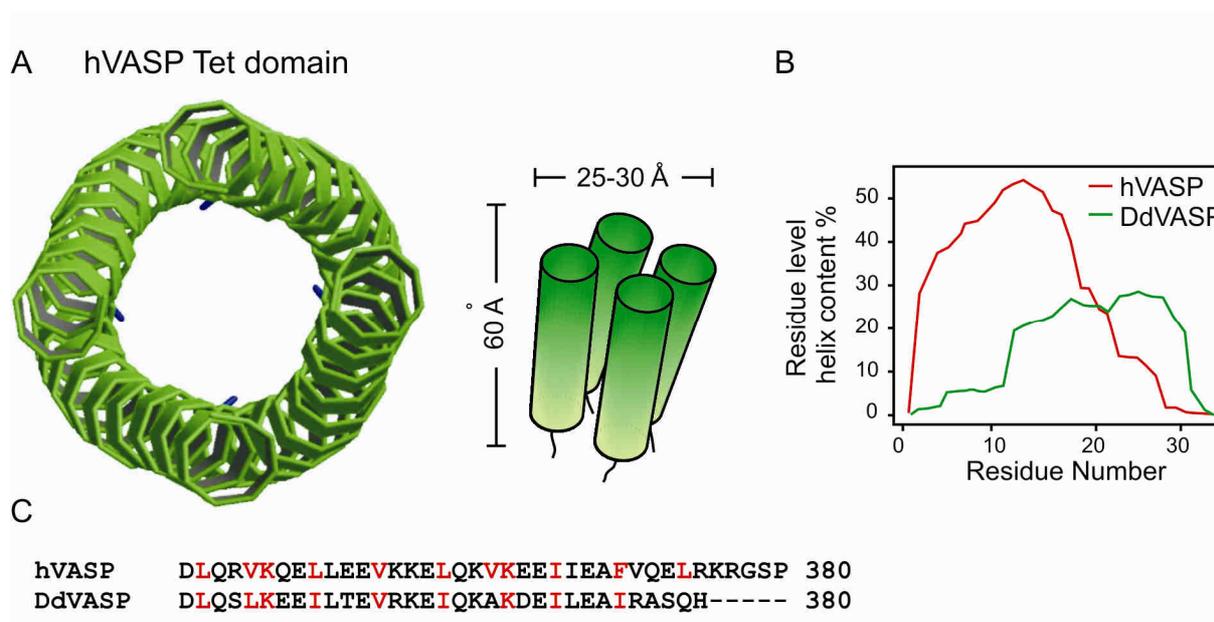
HCA verwendet (Callebaut et al., 1997), welches hydrophobe Cluster und die Möglichkeiten der Helixbildungen grafisch darstellt (Abbildung 22). Die Analyse zeigte, dass trotz der Sequenzunterschiede zwischen hVASP und DdVASP im Bereich von GAB und FAB hydrophobe Cluster mit nahezu identischer Tendenz zur Ausbildung helikaler Strukturen vorliegen. Auf Grund dieser Voraussagen ist anzunehmen, dass die Proteine ähnliche Strukturen nicht nur in ihrer EVH1- und Tetramerisierungsdomäne, sondern auch in den Bereichen von GAB und FAB annehmen können. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine ähnliche Funktion der beiden Orthologe.



**Abbildung 22: Modulare Organisation von VASP. (Oben)** Schematische Darstellung der Domänenorganisation von hVASP. **(Mitte)** Analyse möglicher Sekundärstrukturen durch das Programm HCA (Callebaut et al., 1997). Die Symbole stehen für folgende Aminosäuren: Pro, roter Stern; Gly, schwarze Raute; Thr, weißes Quadrat und Ser weißes Quadrat mit schwarzem Kästchen. Die Aminosäuren sind entsprechend ihrer chemischen Charakteristika gefärbt: grün, hydrophob; rot, negativ geladen; blau, positiv geladen; schwarz, Ala und Cys. Sowohl in der EVH1-Domäne als auch in der mit coiled-coil bezeichneten C-terminalen Region der hVASP-Sequenz, welche stabil gefaltet sind und deren Strukturen bestimmt wurden (Kuhnel et al., 2004, Prehoda et al., 1999), führt die höhere Dichte an hydrophoben Aminosäureclustern zur Ausbildung dieser Sekundärstrukturen wie z.B.  $\alpha$ -Helices (schwarz umrandet). Im Gegensatz dazu fehlen in der ausgedehnten Prolin-reichen Region (AS 116–213) hydrophobe Cluster (aus Ferron et al., 2007). **(Unten)** Die mit dem Programm HCA ermittelte Verteilung hydrophober Cluster (schwarz umrandet) aus DdVASP entspricht weitgehend der von hVASP. Auffällig sind vor allem die großen Gemeinsamkeiten der EVH1- und Tet-Domäne.

#### 4.1.4.3 Die Tetramerisierungsdomäne (Tet)

Die Struktur der Tetramerisierungsdomäne am C-Terminus der EVH2-Domäne wurde 2004 von Kühnel und Kollegen mit einer Auflösung von 1,3 Å aufgeklärt (Kuhnel et al., 2004). Sie zeigte eine außergewöhnliche, rechtsgängige  $\alpha$ -Helix, deren hydrophobe Aminosäuren auf einer Seite in das umgebende Medium reichen und in Wechselwirkung mit drei weiteren  $\alpha$ -Helices einen hydrophoben Kern ausbilden (Abbildung 23A). DSC Experimente (*Differential Scanning Calorimetry*; Dynamische Differenzkalorimetrie) zeigten, dass das hVASP-Tetramer extrem stabil ist ( $T_m = 122^\circ\text{C}$ ; Kuhnel et al., 2004). Interessanterweise sind vor allem die hydrophoben Aminosäuren der humanen Tet-Domäne im DdVASP hochkonserviert (Abbildung 23C), was darauf schließen lässt, dass beide Tetramerisierungsdomänen vergleichbare Sekundär- und Tertiärstrukturen besitzen. AGADIR und HCA-Analysen zeigen auch in diesem Fall ähnliche Tendenzen zur Ausbildung von Helices (Abbildung 22 und Abbildung 23B).



**Abbildung 23: Struktur- und Sequenzvergleich der Tetramerisierungsdomäne von hVASP und DdVASP. (A)** Die Röntgenkristallstruktur der Tet-Domäne zeigt eine ungewöhnliche, rechtsgängige  $\alpha$ -Helix, die durch die Ausbildung eines hydrophoben Kerns Tetramere bildet. **(B)** Die Analyse mit der AGADIR software (<http://agadir.crg.es/>) ergab für die Tet-Domäne aus hVASP und DdVASP eine Helix-Wahrscheinlichkeit von bis zu 25 bzw. 50%. **(C)** Vor allem die hydrophoben Aminosäuren (rot) innerhalb des zentralen Bereichs der Tetramerisierungs-Motivs sind hoch konserviert.

#### 4.1.4.4 Vergleich potentieller Phosphorylierungsstellen in hVASP und DdVASP

Proteine der Ena/VASP Familie besitzen Phosphorylierungsstellen, die durch die cAMP- und cGMP-abhängigen Serin/Threonin Proteinkinasen A und G (PKA und PKG; Eigenthaler et al., 1992, Gertler et al., 1996, Lambrechts et al., 2000) und durch die Protein Tyrosinkinase Abl (Comer et al., 1998) phosphoryliert werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Maus-VASP am Serin 153 (in der Nähe des regulatorischen Prolin-reichen-Motivs) vorwiegend durch PKA phosphoryliert wird, während Serin 235 (innerhalb der GAB) vorwiegend durch PKG phosphoryliert wird. Die dritte Phosphorylierungsstelle, Threonin 274 (innerhalb der FAB), wird sowohl durch PKA als auch PKG phosphoryliert (Harbeck et al., 2000). Die drei Phosphorylierungsstellen sind auch in humanen VASP konserviert (Ser 157, Ser 239 und Thr 278). Die Effekte der Phosphorylierung auf die Aktivitäten von VASP sind allerdings vielfältig und werden kontrovers diskutiert: Während einige *in vitro* Studien zeigten, dass durch Phosphorylierungen innerhalb der GAB und FAB die Interaktion von VASP mit Aktin verhindert wird (Barzik et al., 2005, Harbeck et al., 2000), wurde in einer anderen Studie ein dramatischer Anstieg der F-Aktin-Affinität beobachtet (Laurent et al., 1999). *In vivo* Studien zeigten, dass Maus-VASP durch Phosphorylierung in der GAB und FAB aktiviert wird (Kwiatkowski et al., 2003, Lebrand et al., 2004, Reinhard et al., 2001), während die Phosphorylierung von humanem VASP und Mena an den gleichen Phosphorylierungsstellen offenbar negative Effekte auf deren Funktion und Lokalisation in der Front von humanen Epithelzellen und MV<sup>D7</sup>-Zellen ausübt (Lindsay et al., 2007, Loureiro et al., 2002). Außerdem führte die Expression von pseudophosphorylierten VASP-Mutanten in Epithelzellen aus VASP-null Mäusen zu verringerten F-Aktin Mengen, was ebenfalls auf eine Inhibierung der VASP-Aktin Interaktion hindeutete.

Im Gegensatz zu hVASP besitzt DdVASP keine der oben genannten konservierten Phosphorylierungsstellen. In einer aktuellen Studie wurden jedoch zwei potentielle Phosphorylierungsstellen in DdVASP identifiziert: Das hinter der EVH1-Domäne gelegene Serin 141 sowie Serin 351 innerhalb der Tetramerisierungsdomäne (Lin et al., 2010). Die für die Phosphorylierung verantwortliche Kinase konnte allerdings nicht bestimmt werden. Außerdem scheint die Phosphorylierung von DdVASP lediglich eine Rolle bei dessen Lokalisation nach osmotischem Schock und während Chemotaxis eine Rolle zu spielen (Lin et al., 2010). Da beide Phosphorylierungsstellen weit von den FAB- und GAB-Motiven entfernt liegen, ist ein direkter Einfluss der Phosphorylierung auf die DdVASP-vermittelte Aktinpolymerisation eher unwahrscheinlich. Ein Sequenzanalyse mit der Software SCANSITE ergab, dass mit Threonin 221 eine weitere potentielle Phosphorylierungsstelle

innerhalb der GAB zu finden ist. Allerdings sind bislang keine experimentellen Befunde vorhanden die auf eine Phosphorylierung in dieser Position hindeuten.

## 4.2 Biochemische Charakterisierung von VASP

Die Einflüsse von Proteinen der Ena/VASP Familie auf die Aktinpolymerisation werden seit Jahren ebenfalls kontrovers diskutiert (Bear und Gertler, 2009, Trichet et al., 2008). Trotz zahlreicher Anstrengungen den Mechanismus der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation experimentell zu ermitteln, bestand zu Beginn dieser Arbeit noch immer Uneinigkeit in welcher Weise Ena/VASP Proteine die Aktinpolymerisation beeinflussen. Die umstrittensten potentiellen Aktivitäten von Ena/VASP Proteinen sind ihre Fähigkeit Aktinfilamente zu nukleieren und zu elongieren bzw. das Filamentwachstum vor der Inhibierung durch die Bindung von *Capping*-Proteinen zu schützen (*anti-capping*-Aktivität).

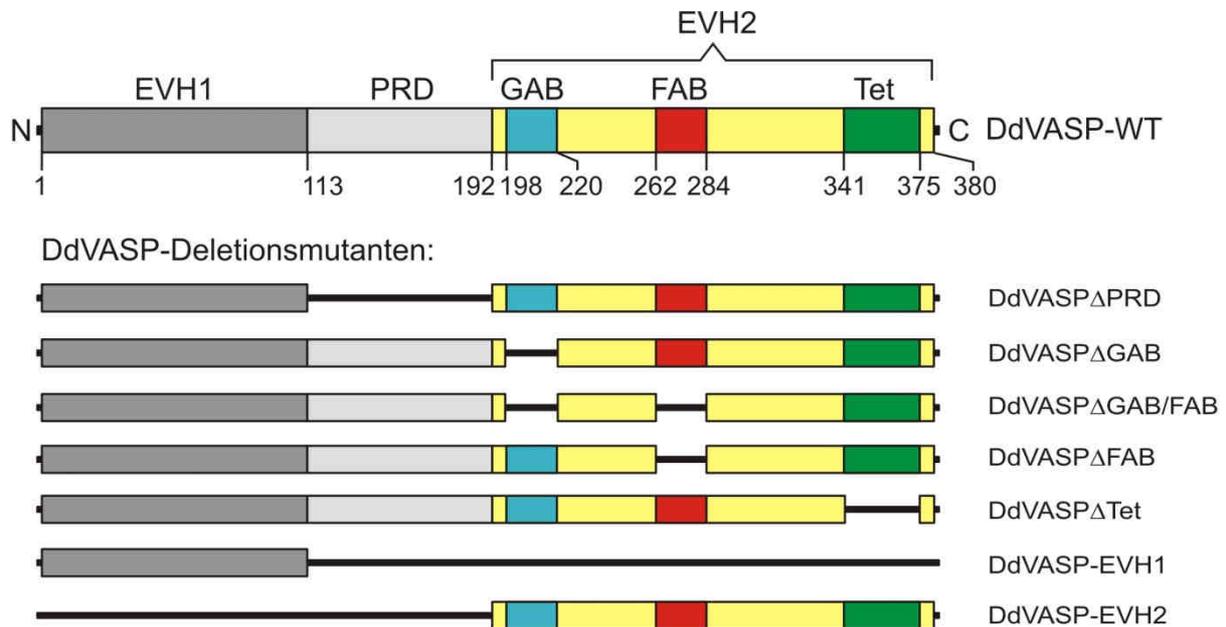
### 4.2.1 Herstellung von VASP Expressionskonstrukten

#### 4.2.1.1 Deletionsmutanten von DdVASP

Ena/VASP Proteine beeinflussen die Aktinpolymerisation durch direkte Bindung an G- und F-Aktin (Bachmann et al., 1999, Huttelmaier et al., 1999, Jonckheere et al., 1999). Für DdVASP wurde bereits gezeigt, dass es die Aktinpolymerisation stark beschleunigt und dass die FAB innerhalb der EVH2-Domäne essentiell für die Aktin-Bündelungsaktivität und die Filopodienbildung in *Dictyostelium* ist (Schirenbeck et al., 2006). Um eine umfassendere Analyse der biochemischen Effekte der GAB-, FAB- und Tet-Motive auf die Aktinpolymerisation durchzuführen, sollten entsprechende DdVASP Deletionsmutanten als GST-Fusionproteine exprimiert und aufgereinigt werden, um sie nachfolgend in Pyren- und Sedimentations-Assays zu charakterisieren. Die zu deletierenden funktionellen Bereiche wurden dabei durch Sequenzanalysen mit anderen Ena/VASP Proteinen bestimmt und sind in Abbildung 24 dargestellt.

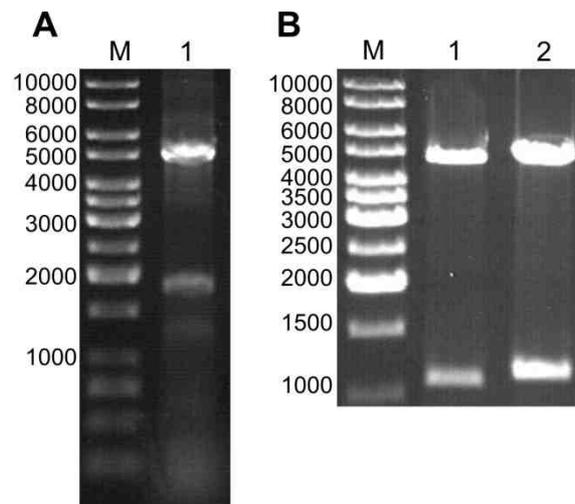
Sämtliche Deletionskonstrukte von DdVASP wurden mit inverser PCR und dem Plasmid pGEX-5X-1-DdVASP (Schirenbeck et al., 2006) als Matrize hergestellt (Abbildung 25A). Die 5'-phosphorilierten Primer wurden dafür so gewählt, dass sie die zu deletierenden Bereiche der DNA flankierten und voneinander wiesen. Während der inversen PCR wurden, bis auf Ausnahme der Deletion, der kodierende Bereich von VASP und der gesamte Vektor amplifiziert. Das Produkt der PCR wurde nachfolgend ligiert und in DH5 $\alpha$ -*E. coli*-Zellen

vermehrt. Nach Bestätigung der Mutationen durch Sequenzanalyse wurden die Konstrukte in Rosetta- oder ArcticXpress-*E. coli*-Zellen exprimiert.



**Abbildung 24: Deletionskonstrukte von DdVASP. (Oben)** Schema der Domänenorganisation von DdVASP. Die EVH1-Domäne ist dunkelgrau, die PRD hellgrau, die GAB blau, die FAB rot, die Tet grün und die Bereiche der EVH2-Domäne zwischen den funktionellen Domänen gelb dargestellt. Die Zahlen unterhalb des Konstrukts entsprechen den Positionen der Aminosäuren. **(Unten)** Schematische Darstellung der in dieser Arbeit hergestellten Deletionsmutanten. Die deletierten Bereiche sind als schwarze Balken dargestellt.

Um den GST-tag der DdVASP Konstrukte mit *PreScission*-Protease abspalten zu können, wurden entsprechende Konstrukte in den Vektor pGEX-6P-1 kloniert. Dazu wurde zunächst das *vasP*-Gen mit geeigneten Primern aus genomischer *D. discoideum* DNA amplifiziert und nachfolgend in die *Bam*HI und *Sal*I Schnittstellen von pGEX-6P-1 inseriert. Die Deletionsmutanten von DdVASP wurden analog dazu unter Verwendung der pGEX-5X-1-VASP-Konstrukte als Matrize hergestellt. Darüber hinaus wurden die Fragmente auch in die gleichen Schnittstellen des Expressionsvektors pMAL-c2X Vektor kloniert, der die Expression von Proteinen als Fusion mit dem Maltosebindeprotein (MBP) erlaubt. Die Expression dieser Konstrukte erfolgte wiederum in Rosetta- oder ArcticXpress-*E. coli*-Zellen.



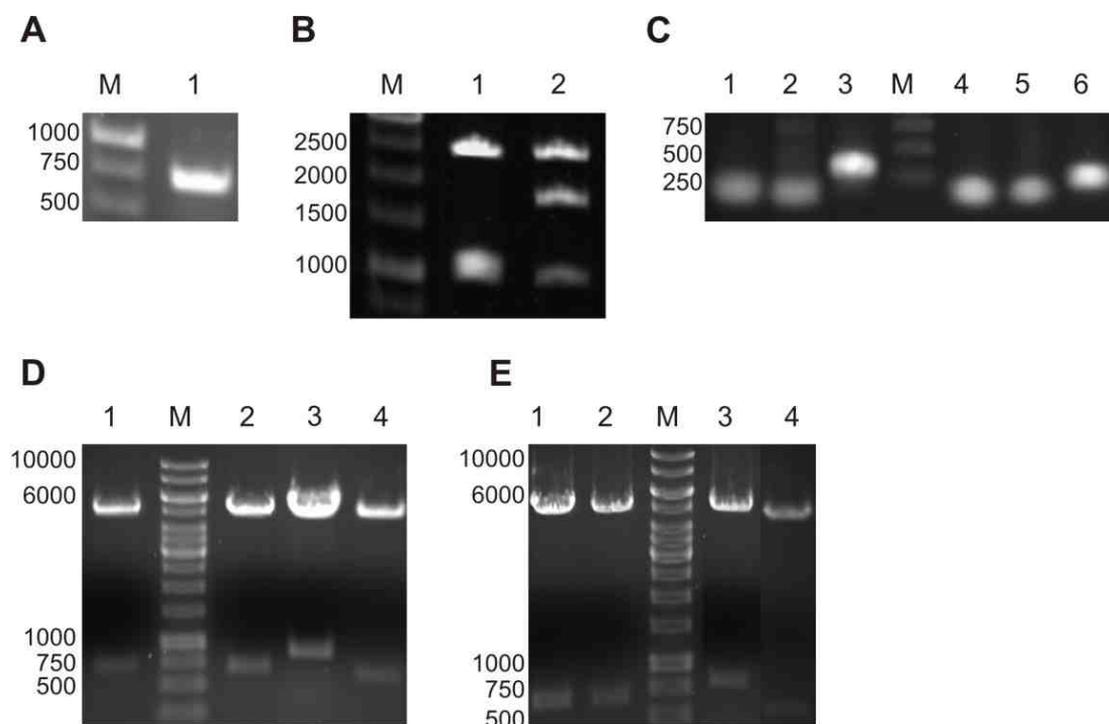
**Abbildung 25: Klonierung der Deletionsmutanten von DdVASP am Beispiel von DdVASP $\Delta$ GAB im pGEX-5X1-Vektor. (A)** Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel des Produkts der Mutagenese-PCR zur Herstellung von DdVASP $\Delta$ GAB. Die PCR wurde mit phosphorylierten Primern durchgeführt, die die zu deletierende Sequenz flankieren. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit *DpnI* geschnitten, um die Wildtyp-DNA zu entfernen. Spur 1= PCR-Produkt von DdVASP $\Delta$ GAB. **(B)** PCR-Produkte aus der Mutagenese-PCR wurden ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Isolierte Plasmide wurden anschließend mit *Bam*HI und *Sal*I geschnitten, um positive Klone zu identifizieren. Im hier gezeigten Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel war das VASP-Fragment der  $\Delta$ GAB-Mutante (Spur 1) erkennbar kleiner als die des Wildtyps (Spur 2). M= DNA-Marker.

#### 4.2.1.2 Konstrukte von humanen und *D. discoideum* VASP-WH2-Motiven

Frühere biochemische Analysen der Aktivitäten von hVASP und DdVASP durch Pyrene-Assays zeigten, dass beide Proteine die Aktinpolymerization beschleunigen, wobei DdVASP eine weit höhere Aktivität als hVASP zeigte (Breitsprecher et al., 2008, Huttelmaier et al., 1999, Schirenbeck et al., 2006). Da die Wechselwirkung von VASP mit Aktin auf den beiden WH2-artigen Aktin Bindungsmotiven GAB und FAB beruht (Bachmann et al., 1999, Dominguez, 2007, Walders-Harbeck et al., 2002), sollten im Rahmen dieser Arbeit geeignete Fusionsproteine mit beiden Bindungsmotiven hergestellt und deren Affinität zu Aktin ermittelt werden.

Da GST-Fusionsproteine dimerisieren sind sie für quantitative Bindungsanalysen nicht geeignet. Alternativ wurde daher das monomere Maltose-Bindeprotein (MBP) zur Fusion benutzt. Zur Bestimmung der spezifischen Dissoziationskonstanten der GAB wurden zunächst Fusionskonstrukte der humanen und *D. discoideum* GAB (hGAB und DdGAB) im Vektor pMAL-c2X hergestellt. Dazu wurden DdGAB und hGAB mit flankierenden Primern,

die die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I enthielten, durch PCR amplifiziert (Abbildung 26C). Die Fragmente wurden nachfolgend über die *Bam*HI/*Sal*I Schnittstellen in pMAL-c2X inseriert und in Rosetta-*E. coli*-Zellen als MBP-Fusionsprotein exprimiert. Ein Standardverfahren zur Bestimmung der Bindungskonstanten der Interaktion von WH2-Motiven mit monomerem Aktin ist die Fluoreszenztitration mit NBD (Nitrobenzoxadiazol)-markiertem Aktin (Hertzog et al., 2002). Leider konnte mit den MBP-Fusionsproteinen kein detektierbares Signal in Fluoreszenztitrationen erhalten werden. Die Ermittlung der Bindungskonstanten sollte aus diesem Grund durch analytische Ultrazentrifugation erfolgen. Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass MBP-Fusionsproteine für diese Experimente nicht geeignet waren, da MBP und Aktin einen nahezu identischen Sedimentationskoeffizienten besaßen, was eine Quantifizierung von freiem und gebundenem Aktin unmöglich machte. Aus diesem Grund wurden die Peptide in Fusion mit dem wesentlich kleineren GFP (*green fluorescent protein*) hergestellt, welches außerdem die Quantifizierung besonders starker Bindungen über die Messung der GFP-Fluoreszenz ermöglicht. Dazu wurde zunächst das GFP-Gen aus dem Vektor pB16GFPXSac1A- durch PCR als *Bgl*II-*Bam*HI-Fragment amplifiziert und in die *Bam*HI Schnittstelle des pGEX-6P-1 Vektors inseriert. Daraus resultierte der Vektor pGEX-6P-1-GFPRG (Abbildung 26A und B). In diesen Vektor wurden nun über die *Bam*HI und *Sal*I Schnittstellen die oben beschriebenen WH2-Fragmente inseriert (Abbildung 26D und E).



**Abbildung 26: Herstellung des Vektors pGEX-6P-1-GFPRG und Klonierung der WH2-Motive aus humanem und *D. discoideum* VASP. (A)** 1= PCR der kodierenden Region von GFP mit den Primern

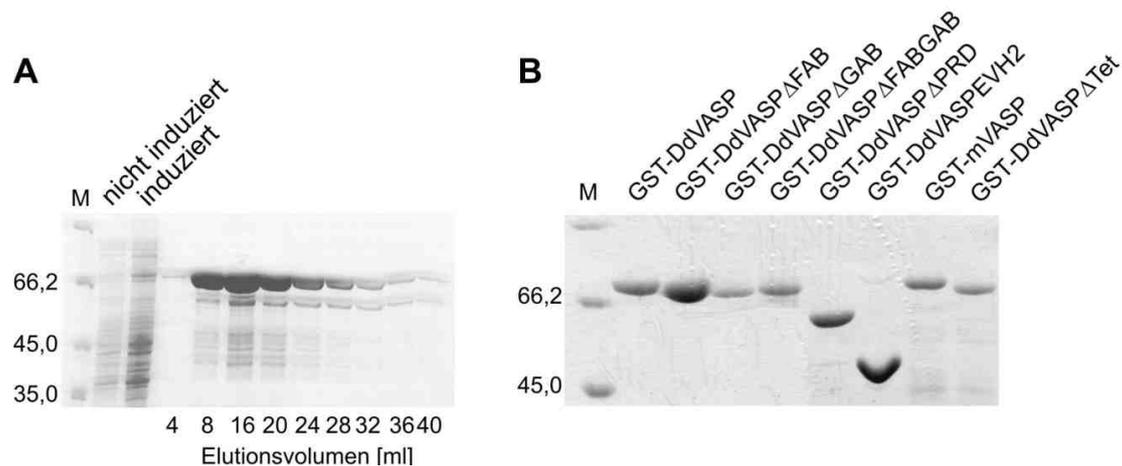
*Bam*HI\_DGFPcterm\_in6p1\_antisense und *Bgl*II\_DGFP\_in6p1\_sense und dem Vektor pB16GFPXSac1A- als Matrize. **(B)** Das GFP-Fragment wurde nachfolgend in pGEX-6P-1 kloniert. Positive Klone konnten durch Restriktionsverdau mit *Bgl*II und *Bam*HI identifiziert werden. Das auf Spur 1 aufgetragene Ausgangsplasmid pGEX-6P-1- zeigte eine mittlere Bande von 1.230 bp, die nicht von der unteren getrennt werden konnte. Spur 2= Plasmid pGEX-6P-1-GFPRG hat im Vergleich dazu durch die inserierte GFP-Sequenz eine klar abgetrennte mittlere Bande von 1.989 bp. **(C)** PCR-Produkte der WH2-Motive mit flankierenden Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I. Spur 1= DdGAB, Spur 2= DdFAB, Spur 3= DdGAB/FAB, Spur 4= hGAB, Spur 5= hFAB, Spur 6= hGAB/FAB. **(D)** Die erfolgreiche Insertion der WH2-Motive in den pGEX-6P-1-GFPRG wurde durch Restriktion mit *Nco*I und *Sal*I überprüft, da mit *Bam*HI/*Sal*I geschnittene Fragmente auf Grund ihrer geringen Größe nicht auf dem Agarosegel sichtbar waren. Spur 1= DdGAB, Spur 2= DdFAB, Spur 3= DdGAB/FAB, Spur 4= leerer Vektor. **(E)** Mit *Nco*I und *Sal*I geschnittene pGEX-6P-1-GFPRG-Vektoren, die humane WH2-Motive enthielten. Spur 1= hGAB, Spur 2= hFAB, Spur 3= hGAB/FAB, Spur 4= leerer Vektor. M= DNA-Marker

## 4.2.2 Aufreinigung und biochemische Analyse rekombinanter Proteine

### 4.2.2.1 Expression und Reinigung von humanem und *D. discoideum* VASP

Für biochemische Untersuchungen wurden die unterschiedlichen VASP Konstrukte und Deletionsmutanten als GST-Fusionsproteine aus *E. coli*-Lysaten aufgereinigt. Transformierte *E. coli*-Zellen des Expressionsstammes Rosetta bzw. ArcticXpress wurden in 6 L-Kulturen mit entsprechenden Selektionsmarkern bei 24°C angezogen und die Expression der rekombinanten Proteine durch Zugabe von 0,5 mM IPTG über Nacht induziert. Anschließend konnten die Fusionsproteine über ihren GST-tag affinitätschromatographisch gereinigt werden (Abbildung 27A).

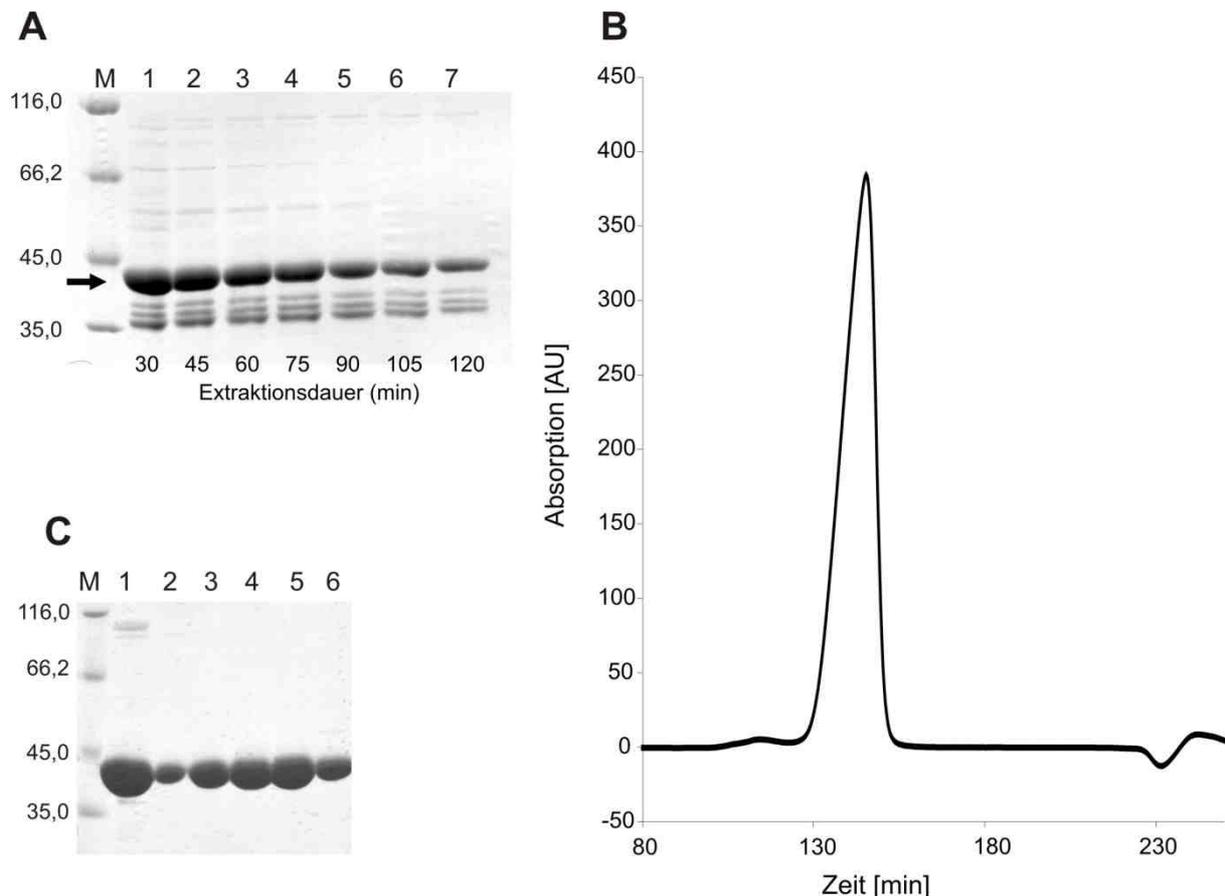
Hinsichtlich ihrer Menge und Abbauprodukte ließen sich die Proteine - je nach Deletion - unterschiedlich gut aufzureinigen (Abbildung 27B). Die Mutante DdVASP $\Delta$ Tet war in allen Aufreinigungen relativ stark degradiert, was auf eine eventuelle Proteolyse-Anfälligkeit des freien C-Terminus dieser Mutante hindeutet. Die Proteine wurden entweder durch Gelfiltration weiter aufgereinigt oder, im Falle von nur geringen Degradationen, direkt gegen PBS mit 1 mM DTT und 60% Glycerin dialysiert und bei -20°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte entweder photometrisch über Messung der Absorption bei 280 nm und den berechneten Extinktionskoeffizienten oder über quantitative SDS-PAGE mit einem Proteinstandard.



**Abbildung 27: Induktion und Aufreinigung von GST-DdVASP-Fusionsproteinen aus *E. coli*.** (A) Das Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gel zeigt exemplarisch die Aufreinigung von GST-DdVASP durch Glutathion-Sepharose-Afinitätschromatographie. Gebundene GST-Fusionsproteine wurden mit reduziertem Glutathion (30 mM) von der Säule eluiert und in Fraktionen von je 4 mL gesammelt. Zellhomogenate von *E. coli*-Zellen vor und nach der Induktion mit IPTG sind links gezeigt. (B) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel unterschiedlicher VASP-Konstrukte nach Gelfiltration auf einer präparativen S200-Sephadex-Säule. M= Protein-Marker.

#### 4.2.2.2 Präparation von Aktin aus Kaninchen-Skelettmuskel

Um die Effekte von VASP auf die Polymerisation von Aktin beobachten zu können, wurde Aktin aus Kaninchenmuskel isoliert. Die Gewinnung des Aktins aus Acetonpuder erfolgte durch mehrmalige Extraktion für jeweils 15 min mit G-Puffer. Anschließend wurde die Aktinhaltige Lösung durch Filtration über eine Gaze von größeren Partikeln abgetrennt (Abbildung 28A). Da die extrahierte Lösung immer noch eine starke Trübung aufwies, wurde sie zunächst zweimal für je 30 min bei 12.000x g zentrifugiert. Das im Überstand vorhandene Aktin wurde über Nacht durch Zugabe von Polymerisationspuffer polymerisiert und das entstandene F-Aktin nach Zugabe von 0,8 M KCl durch Ultrazentrifugation pelletiert. Das erhaltene glasige Pellet aus F-Aktin wurde in G-Puffer resuspendiert und durch mehrmalige Dialyse gegen G-Puffer depolymerisiert. Monomeres Aktin wurde durch Gelfiltration auf einer Sephadex G-75 Säule gewonnen. Abbildung 28 zeigt die Fraktionen nach der Extraktion und die in G-Puffer resuspendierten Pellets nach den Zentrifugationsschritten sowie die Fraktionen nach der Gelfiltration. Die Fluoreszenzmarkierung des Aktins mit Pyrenyl-Iodacetamid ergab einen durchschnittlichen *Labeling*-Grad von etwa 65%.



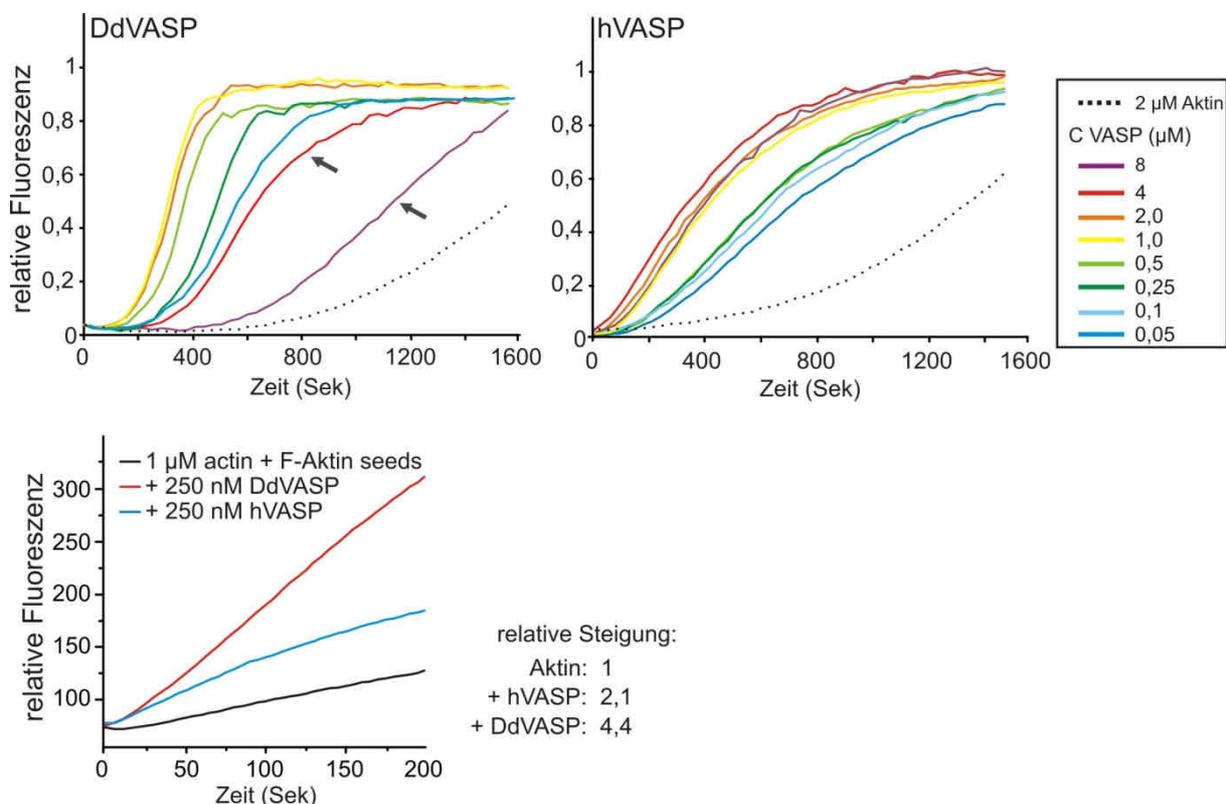
**Abbildung 28: Aufreinigung von Aktin aus Kaninchen Skelettmuskel.** (A) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel der Extraktion von Aktin aus Acetonpulver. Spuren 1-7= Filtrierter Überstand zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten. Der Pfeil markiert die Aktin-Bande. (B) Elutionsprofil von G-Aktin durch präparativer Gelfiltration mit einer Sephadex G75 Säule. (C) SDS-PAGE der Fraktionen der Gelfiltration von Aktin. Spur 1= Auftrag, Spuren 2-6= Aktin-enhaltende Fraktionen. M= Protein-Marker.

#### 4.2.2.3 Vergleich der Einflüsse von hVASP und DdVASP auf die Aktinpolymerisation

Der Einfluss von Aktin-bindenden Proteinen auf die spontane Aktinpolymerisation kann mit Hilfe von Pyrenyl-Aktin Polymerisationsassays (Pyrene-Assays) spektroskopisch untersucht werden (Cooper et al., 1983). Dazu wird der Fluoreszenzfarbstoff Pyrenyl-Iodacetamid kovalent an Cys 374 von Aktin gebunden und das markierte Aktin zu einem Anteil von 5-10% unbehandeltem, monomerem Aktin zugegeben. Nach Erhöhen der Salzkonzentration durch Zugabe von Polymerisationspuffer polymerisiert G- zu F-Aktin, wodurch die Fluoreszenz des gebundenen Pyrens um mehr als das 20-fache zunimmt, was eine genaue Quantifizierung des F-Aktin Anteils über die Zeit ermöglicht. Man unterscheidet zwischen Nukleationsassays, bei

denen die Gesamtpolymerisation von G- zu F-Aktin gemessen wird, und Elongationsassays (*seeded-Assays*), bei denen G-Aktin ein geringer Anteil von bereits polymerisiertem Aktin zugesetzt wird. Nach Zugabe von Polymerisationspuffer wird in erster Linie nur die Filamentelongation gemessen, da bereits eine Vielzahl von Nukleationskeimen in der Lösung vorhanden ist, die unmittelbar elongiert werden können. Im Gegensatz dazu wird beim Nukleationsassay die Summe aus Nukleation und Elongation beobachtet. Eine gesteigerte Nukleation zeichnet sich durch eine verkürzte *lag-Phase* zu Beginn der Polymerisationsreaktion aus, während der aufgrund der kinetischen Barriere der Aktinnukleation die Fluoreszenz nur langsam steigt.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass hVASP und DdVASP die Nukleation neuer Filamente fördert (Huttelmaier et al., 1999, Laurent et al., 1999, Schirenbeck et al., 2006). In anderen Studien wurde durch *seeded-Assays* gezeigt, dass mVASP außerdem eine leichte Erhöhung der Elongationsrate hervorruft (Barzik et al., 2005). Um genauere Aussagen über den Einfluss beider VASP Orthologe auf die Aktinpolymerisation treffen zu können, wurden mit den aufgereinigten GST-Fusionsproteinen von hVASP und DdVASP (4.2.2.1) Pyrene-Assays durchgeführt (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Einfluss von hVASP und DdVASP auf die Aktinpolymerisation. (Oben)** Pyrene-Nukleationsassay. 2  $\mu\text{M}$  G-Aktin (10% Pyrene-markiert) wurden in Anwesenheit von verschiedenen

VASP Konzentrationen durch Zugabe von 10% 10x Polymerisationspuffer (500 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 2 mM ATP, 100 mM Imidazol, pH 7,3) polymerisiert und die Pyrene Fluoreszenz bei 407 nm detektiert. Beide VASP Orthologe beschleunigten die Aktinpolymerisation, wobei ein Überschuss an DdVASP zu einer Inhibierung der Aktinpolymerisation führte (Pfeile). Derartige Effekte waren im Fall von hVASP nicht messbar. **(Unten)** Pyrene-Elongationsassay. 1 µM G-Aktin (10% Pyrene markiert) wurden in Anwesenheit von 50 nM F-Aktin *seeds* und je 250 nM DdVASP und hVASP polymerisiert und die Pyrene-Fluoreszenz bei 407 nm detektiert. Die beiden VASP Orthologe beschleunigten die Elongation von Aktinfilamenten in unterschiedlichem Maße.

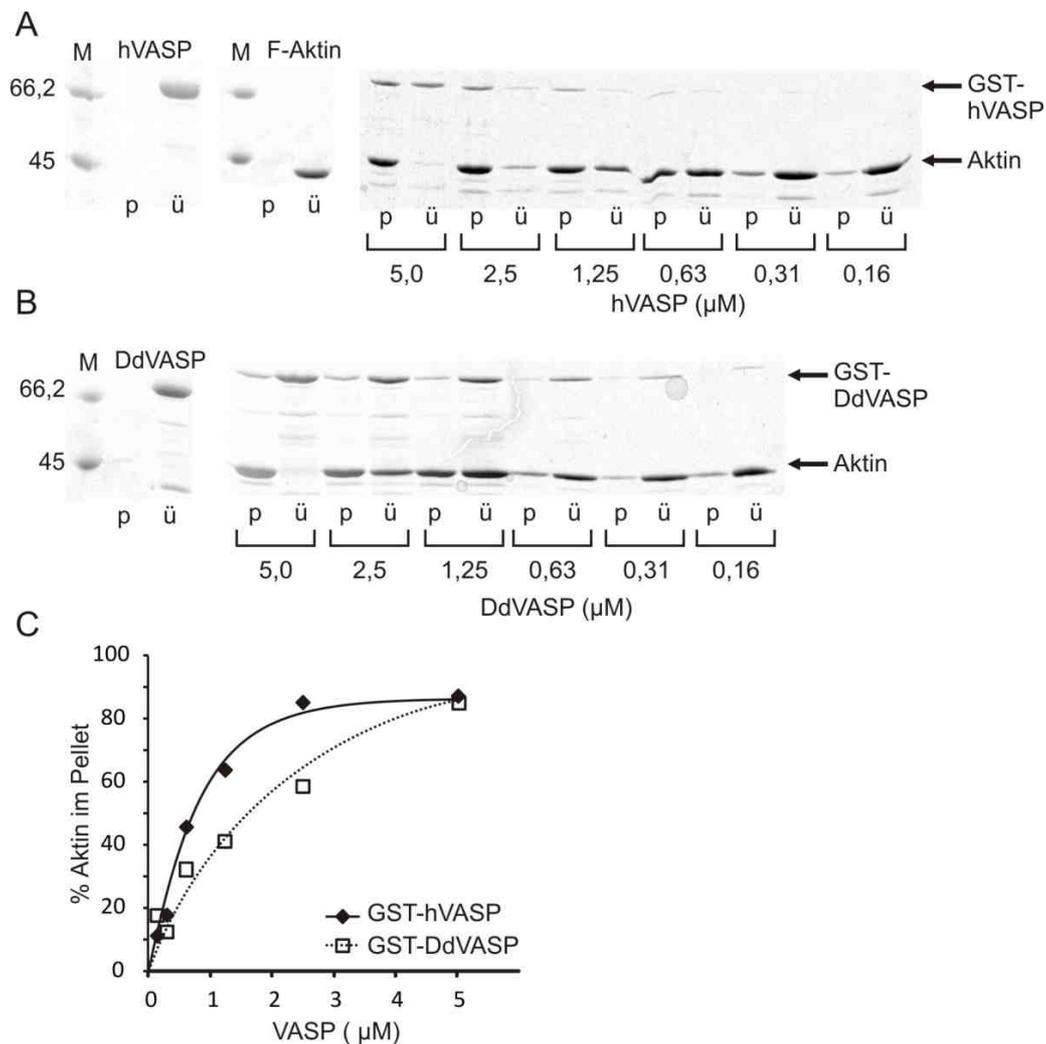
Beide VASP Orthologe steigerten die Rate der spontanen Aktinpolymerisation in Nukleationsassays. Die Zugabe von DdVASP in unterschiedlichen Konzentrationen hatte innerhalb der ersten 150 Sekunden keinen Einfluss auf die Aktinpolymerisation, was gegen eine ausgeprägte Beteiligung dieses Proteins bei der Aktinnukleation spricht. Allerdings nahm die Pyrene-Fluoreszenz im weiteren Reaktionsverlauf schnell zu, womit es offensichtlich einen starken Einfluss auf die Filamentelongation hatte. Im Fall von hVASP konnte bereits nach kürzerer Zeit eine Zunahme der Pyren-Fluoreszenz beobachtet werden, jedoch war die maximale Steigung während der anschließenden Elongationsphase bei allen Konzentrationen geringer als nach Zugabe von DdVASP. Diese Befunde legen nahe, dass das hVASP einen geringeren Einfluss auf das Filamentwachstum hat. Interessanterweise führte die Zugabe eines Überschusses von DdVASP in Relation zu Aktin zu einer Abnahme der Polymerisationsrate, während bei einem Überschuss von hVASP ein solcher Effekt nicht beobachtet werden konnte. Dies deutete auf Unterschiede beider Proteine in ihrer Wechselwirkung mit Aktin hin. Zur Untersuchung des Einflusses beider VASP Orthologe auf die Filamentelongation wurden auch *seeded*-Assays durchgeführt (Abbildung 29). In diesen Assays wird der Reaktionslösung neben G-Aktin auch ein geringer Anteil F-Aktin (50 nM) zugesetzt, so dass nach Initiierung der Polymerisation hauptsächlich die Filamentelongation zur Steigung der Pyren-Fluoreszenz beiträgt. Die Zugabe von 250 nM DdVASP führte hier zu einer 4,4-fachen Beschleunigung des Filamentwachstums, während hVASP das Filamentwachstum nur um das 2,1-fache beschleunigte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl DdVASP als auch hVASP die Elongationsrate von Aktinfilamenten erhöhen. Darüber hinaus scheint DdVASP nur eine geringe Nukleationsaktivität zu besitzen, was aus der längeren *lag*-Phase der Pyrene-Nukleationsassays abzuleiten war. Beide Proteine zeigten also trotz der konservierten Domänenorganisation deutliche Unterschiede in ihrer Fähigkeit *in vitro* Aktin zu polymerisieren.

Eine weitere biochemische Eigenschaft von VASP ist es, Aktinfilamente zu bündeln (Bachmann et al., 1999, Samarin et al., 2003, Schirenbeck et al., 2006). Die Bündelung von

Aktinfilamenten wird von der F-Aktin Bindungsstelle (FAB) innerhalb der tetrameren EVH2-Domäne vermittelt (Bachmann et al., 1999, Schirenbeck et al., 2006). Zur Quantifizierung der Bündelungsaktivität von hVASP und DdVASP wurden Aktin Sedimentationsassays bei geringen Drehzahlen (13.000 upm), sogenannte *low-speed-sedimentation*-Assays durchgeführt. Unter diesen experimentellen Bedingungen werden nur hochmolekulare Proteinkomplexe wie Aktinbündel, nicht aber einzelne Aktinfilamente pelletiert.

Die Polymerisation von 5  $\mu\text{M}$  Aktin in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen beider VASP Orthologe ergab eine maximale Bündelungseffizienz bei äquimolaren Mengen von VASP und Aktin (Abbildung 30A und B). Die Bündelungsaktivität von hVASP war allerdings etwas höher als die von DdVASP, da hier bereits 600 nM genügten, um etwa 50% des Aktins zu pelletieren. Um denselben Effekt zu erzielen mussten von DdVASP etwa 2  $\mu\text{M}$  eingesetzt werden (Abbildung 30C).

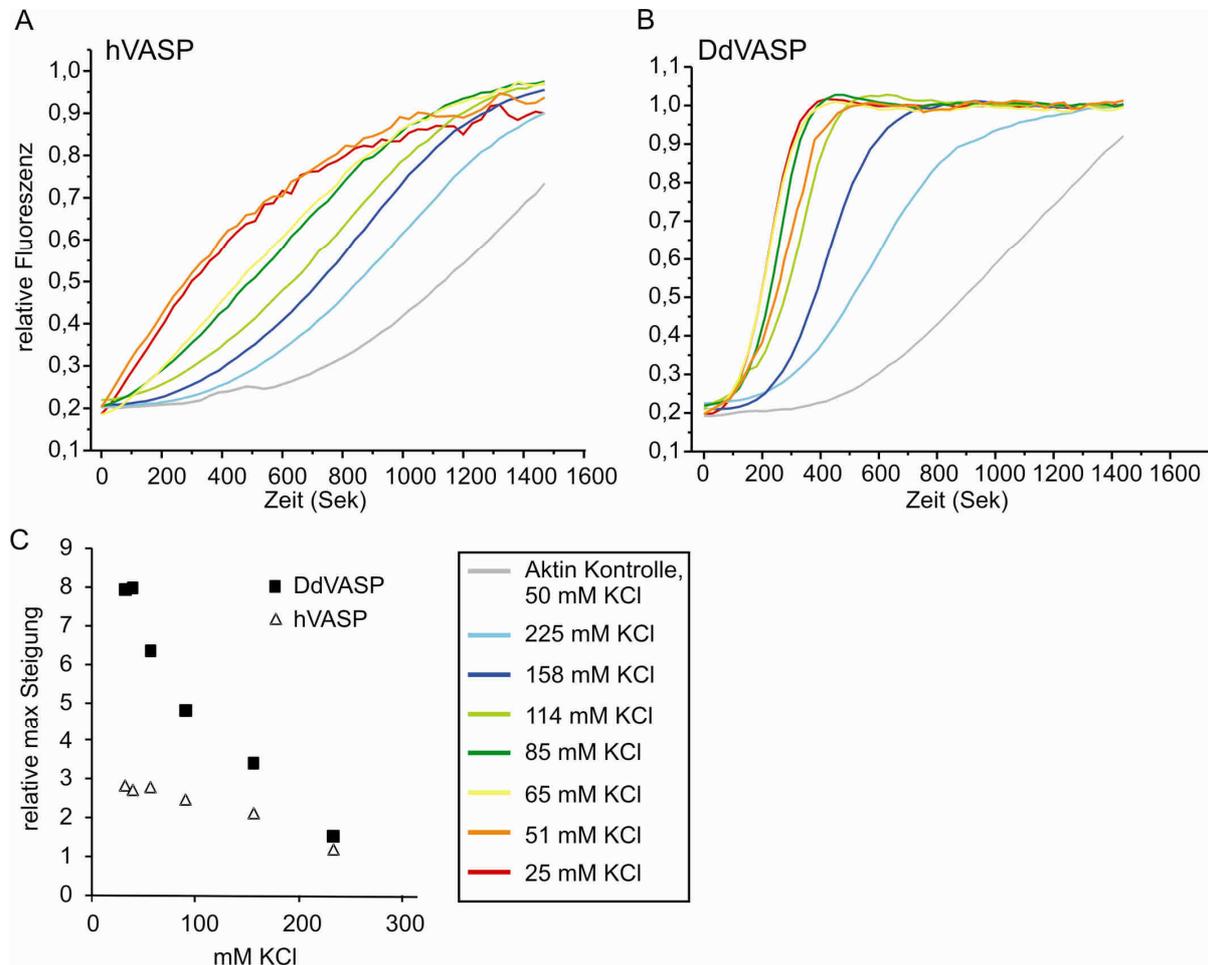


**Abbildung 30: Analyse der Aktinfilament-Bündelung durch hVASP und DdVASP. (A)** Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE von *low-speed-sedimentation*-Assays. 5  $\mu\text{M}$  G-Aktin wurden in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von GST-hVASP durch Zugabe von Polymerisationspuffer für 1 h polymerisiert und Aktinbündel nachfolgend bei 13.000 upm sedimentiert. Die Pellets (p) und Überstände (ü) wurden anschließend durch SDS-PAGE analysiert. M= Protein-Marker. **(B)** Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE von *low-speed-sedimentation*-Assays mit GST-DdVASP. M= Protein-Marker. **(C)** Quantifizierung der Bündelungseffizienz von hVASP und DdVASP. Die Auswertung erfolgte durch densitometrische Analyse der Bandenintensitäten aus den SDS-Gelen. hVASP bündelt F-Aktin effizienter als DdVASP.

#### 4.2.2.4 Salzabhängigkeit der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass höhere Salzkonzentrationen in Polymerisationsassays den Einfluss von hVASP auf die Aktinpolymerisation stark beeinträchtigen (Barzik et al., 2005, Huttelmaier et al., 1999). Um Rückschlüsse auf weitere Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Interaktionen von hVASP und DdVASP

mit Aktin ziehen zu können, wurde der Einfluss von KCl in einem Bereich von 25 bis 225 mM auf die Aktivität von hVASP und DdVASP mit Hilfe von Pyrene-Assays bestimmt (Abbildung 31).



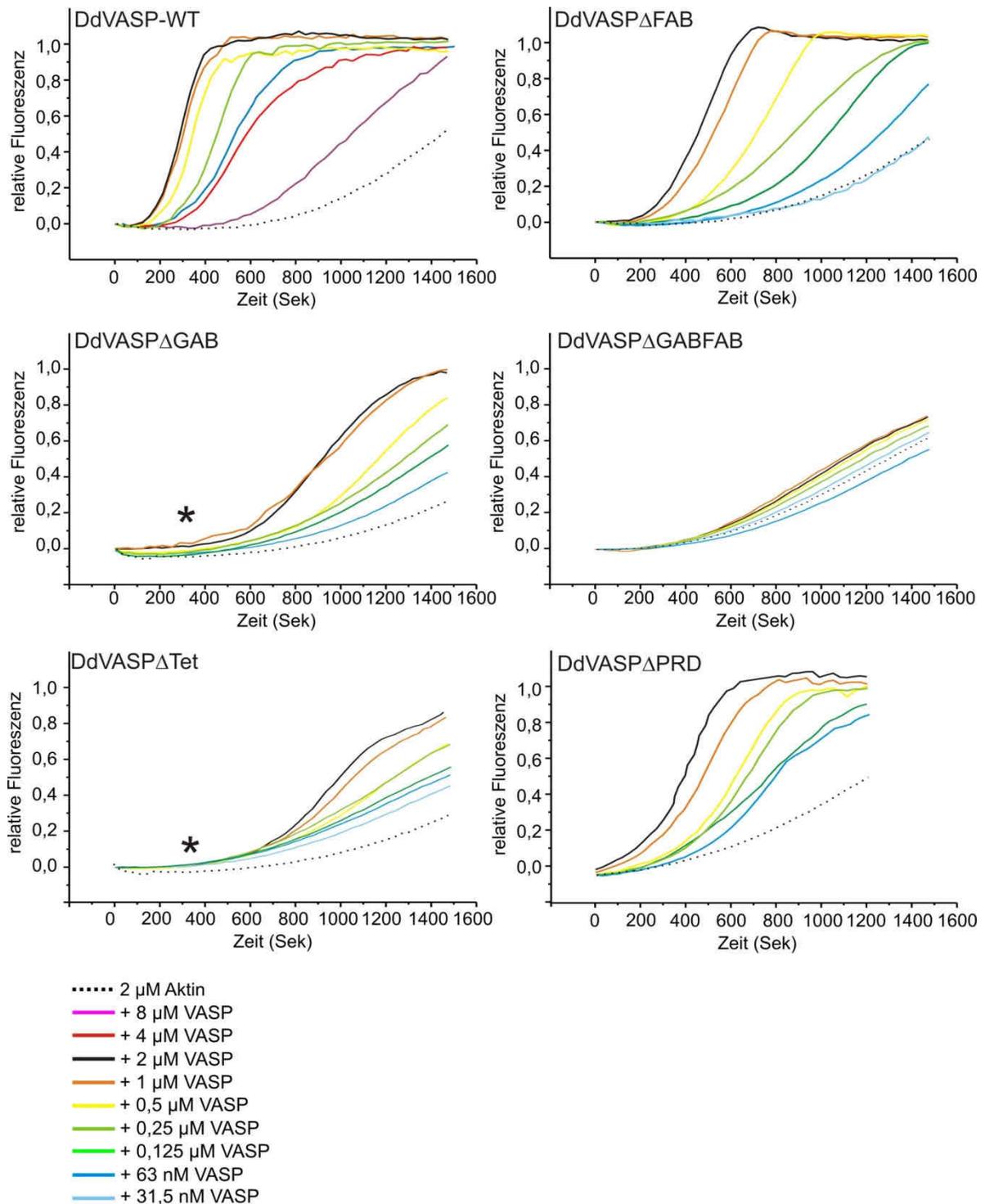
**Abbildung 31: Abhängigkeit der hVASP- und DdVASP vermittelten Aktinpolymerisation von der Salzkonzentration. (A und B)** Pyrene-Nukleationsassays mit 2  $\mu$ M G-Aktin (10% Pyrene-markiert) in Anwesenheit von 1  $\mu$ M VASP und unterschiedlichen KCl Konzentrationen. Der Einfluss beider VASP Orthologe auf die Aktinpolymerisation nahm mit steigender KCl Konzentration spürbar ab. **(C)** Graphische Darstellung der relativen Polymerisationsrate (maximale Steigung) aus den in (A) und (B) gezeigten Pyrene-Assays in Gegenwart der jeweils angegebenen KCl-Konzentrationen.

Die Aktivität beider VASP Orthologe wurde mit steigender KCl Konzentration merklich vermindert, allerdings wurde selbst bei der sehr hohen KCl Konzentration von 225 mM keine vollständige Inhibierung von hVASP oder DdVASP auf die Aktinpolymerisation beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde in vorangegangenen Studien berichtet, dass die Aktivität von

hVASP bei 100 mM KCl (Barzik et al., 2005) bzw. 150 mM KCl (Huttelmaier et al., 1999) in Nukleationsassays nicht mehr detektierbar war.

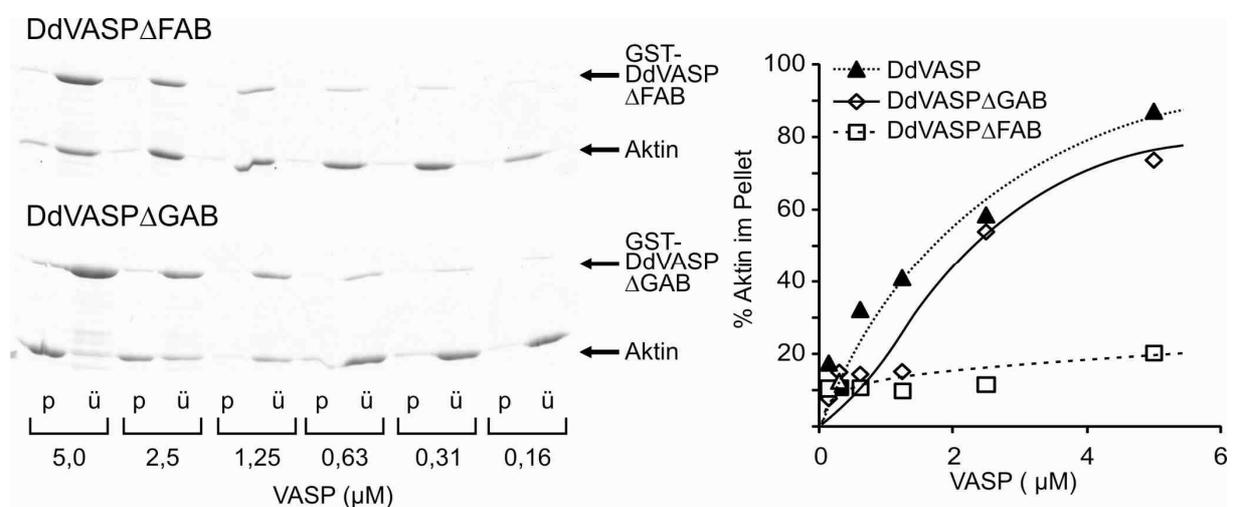
#### 4.2.2.5 Effekte der DdVASP-Deletionsmutanten auf die Aktinpolymerisation

Verantwortlich für die Interaktion von VASP mit Aktin ist die C-terminale EVH2-Domäne (Bachmann et al., 1999, Huttelmaier et al., 1999). Vorangegangene Untersuchungen mit hVASP und DdVASP zeigten, dass die FAB für die Bündelung von Aktinfilamenten *in vitro* und die Filopodienausbildung *in vivo* verantwortlich ist (Bachmann et al., 1999, Schirenbeck et al., 2006) während die GAB von hVASP G-Aktin bindet (Chereau und Dominguez, 2006, Walders-Harbeck et al., 2002). Eine eingehende Analyse der Effekte dieser Motive auf die Aktinpolymerisation wurde bisher nicht durchgeführt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass keines dieser Motive für die Bindung von Filament Plusenden essentiell ist (Pasic et al., 2008). Aus diesem Grund wurden die Effekte der Deletionsmutanten DdVASP $\Delta$ GAB, DdVASP $\Delta$ FAB, DdVASP $\Delta$ GAB/FAB, DdVASP $\Delta$ Tet und DdVASP $\Delta$ PRD auf die Aktinpolymerisation durch Pyrene-Assays untersucht (Abbildung 32). Mutante DdVASP $\Delta$ FAB zeigte in Pyrene-Assays nahezu identische Effekte wie DdVASP-WT, was auf eine unverminderte Beschleunigung der Elongationsrate der Aktinfilamente hindeutete. DdVASP $\Delta$ GAB zeigte hingegen eine deutlich längere *lag*-Phase, in der keine Beschleunigung der Aktinpolymerisation detektiert wurde. Erst nach etwa 400 Sekunden war eine konzentrationsabhängige Beschleunigung der spontanen Aktinpolymerisation erkennbar, woraus geschlossen werden konnte, dass zum einen sowohl GAB als auch FAB am Filamentelongationsprozess beteiligt sind, und dass zum anderen die G-Aktin Bindung der GAB zur Nukleation neuer Filamente beiträgt. Dementsprechend besaß die Deletionsmutante DdVASP $\Delta$ GAB/FAB, der beide Aktin-interagierenden Motive fehlen, keinerlei Einfluss auf die Aktinpolymerisation. Die Mutante DdVASP $\Delta$ Tet, in der die Tetramerisierungsdomäne eliminiert ist und die deshalb als Monomer vorliegt, zeigte eine deutlich reduzierte Fähigkeit die Aktinpolymerisation zu beschleunigen. Auffällig waren hier die extrem lange *lag*-Phase und die insgesamt stark verminderte Beschleunigung der Aktinpolymerisation. Die Mutante DdVASP $\Delta$ PRD zeigte erwartungsgemäß vergleichbare Polymerisationseigenschaften wie DdVASP-WT, da sie die gesamte EVH2-Domäne besitzt.



**Abbildung 32: Analyse der DdVASP Deletionsmutanten auf die Aktinpolymerisation.** 2  $\mu$ M G-Aktin (10% Pyrene-markiert) wurden in Anwesenheit der unterschiedlichen DdVASP Deletionsmutanten durch Zugabe von 10x Polymerisationspuffer polymerisiert und die Pyrene-Fluoreszenz bei 407 nm detektiert. (\*) Die Konstrukte DdVASP $\Delta$ GAB und DdVASP $\Delta$ Tet zeigten eine deutlich verlängerte *lag*-Phase.

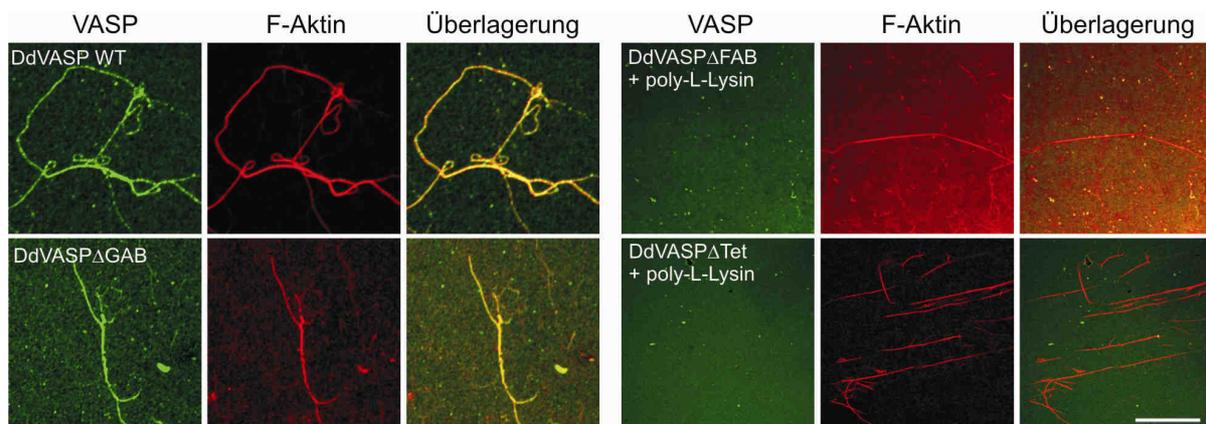
Zur Analyse der Aktinfilamentbindung von DdVASP wurden Aktin-Sedimentationsassays mit unterschiedlichen Konzentrationen an DdVASP $\Delta$ GAB und DdVASP $\Delta$ FAB durchgeführt (Abbildung 33). Es konnte gezeigt werden, dass nur Mutante DdVASP $\Delta$ FAB die Aktinbündelungsaktivität verloren hatte, während die Mutante DdVASP $\Delta$ GAB nahezu dieselbe Bündelungsaktivität wie DdVASP-WT besaß. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Analysen überein, die zeigten, dass die FAB von DdVASP und hVASP für die Bündelung von Aktin verantwortlich sind (Bachmann et al., 1999, Schirenbeck et al., 2006), und lassen weiterhin darauf schließen, dass die GAB aus DdVASP ausschließlich monomeres, aber nicht filamentöses Aktin bindet.



**Abbildung 33: Analyse der Aktinfilamentbündelung durch DdVASP $\Delta$ GAB und DdVASP- $\Delta$ FAB.** (links) 5  $\mu$ M G-Aktin wurden in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von GST-DdVASP $\Delta$ FAB bzw. GST-DdVASP $\Delta$ GAB durch Zugabe von Polymerisationspuffer polymerisiert und die Proteinlösung nachfolgend bei 13.000 upm zentrifugiert. (rechts) Die Menge an Aktin in den Pellets (p) und Überständen (ü) wurde nach SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung densitometrisch quantifiziert. Die Deletion des  $\Delta$ FAB-Motivs aus DdVASP führte zum vollständigen Verlust der Bündelungsaktivität.

Um die Assoziation der einzelnen Deletionsmutanten mit Aktinfilamenten und -Bündeln genauer zu untersuchen, wurden 5  $\mu$ M Aktin in Gegenwart von äquimolaren Mengen von GST-DdVASP und abgeleiteten Deletionsmutanten auf Objektträgern polymerisiert. Die Proben wurden anschließend mit Paraformaldehyd fixiert und mit Anti-GST-Antikörpern und TRITC-Phalloidin markiert. Diese sogenannten *coverslip*-Assays dienen der gleichzeitigen Darstellung von Aktinbündeln und gebundenen VASP-Proteinen durch Fluoreszenzmikroskopie. Im Falle der Deletionsmutanten DdVASP $\Delta$ FAB und DdVASP $\Delta$ Tet

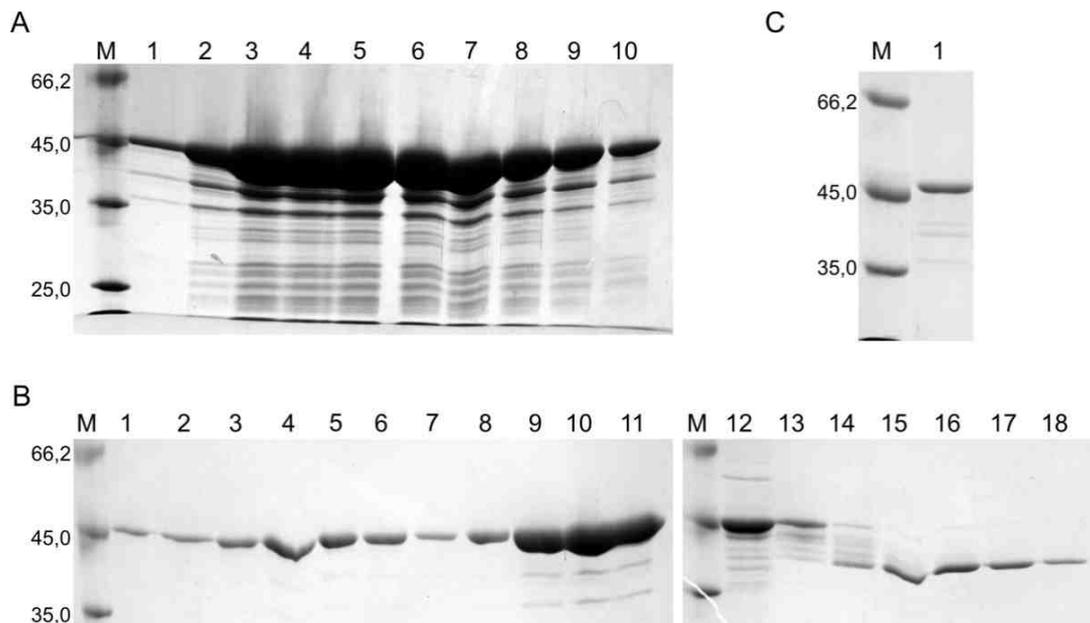
ohne Bündelungsaktivität wurde die Bildung von Aktinbündeln durch Zugabe von poly-L-Lysin induziert. In Übereinstimmung mit den Sedimentationsassays förderte die Zugabe von DdVASP und DdVASP $\Delta$ GAB die Bildung von charakteristischen Aktinbündeln, die vollständig mit VASP dekoriert waren (Abbildung 34). Im Gegensatz dazu waren die Bündel, die in Gegenwart von poly-L-Lysin und DdVASP $\Delta$ FAB bzw. - $\Delta$ Tet gebildet wurden nicht mit den VASP-Deletionskonstrukten assoziiert. Dies lässt darauf schließen, dass sowohl die Tetramerisierung als auch die F-Aktin Bindung für eine maximale Bindung von VASP an das Aktinfilament benötigt werden.



**Abbildung 34: Coverslip-Assays zur Kolo-kalisation von VASP an F-Aktin Bündeln.** 5  $\mu$ M Aktin wurden mit äquimolaren Mengen der jeweiligen DdVASP Proteine polymerisiert, fixiert, mit Anti-GST-Antikörpern und TRITC-Phalloidin markiert und die Aktinbündel durch konfokale Mikroskopie visualisiert. Balken= 20  $\mu$ m.

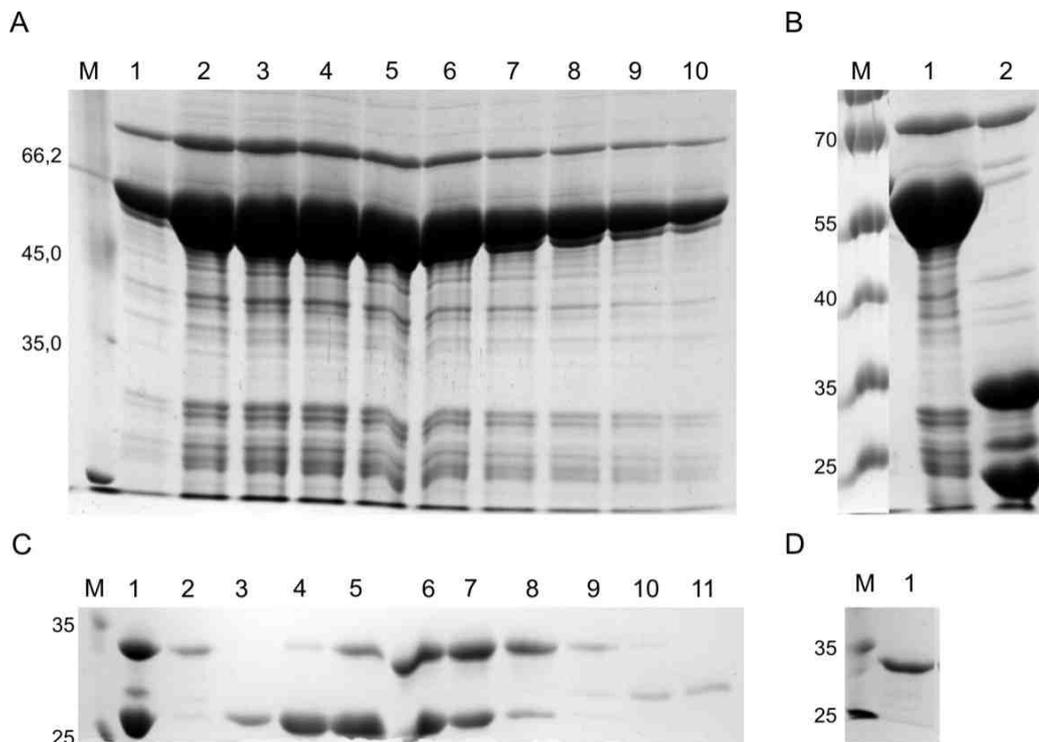
#### 4.2.2.6 Expression und Reinigung des GAB-Peptids aus hVASP und DdVASP als MBP- bzw. GST-GFP-Fusionsprotein

Um die Wechselwirkung der WH2-artigen GAB aus DdVASP und hVASP mit Aktin biochemisch näher charakterisieren zu können, wurden die jeweiligen Peptide als MBP- bzw. - GST-GFP-Fusionsprotein wie unter 4.2.2.1 beschrieben aufgereinigt und nachfolgend gefiltert und aufkonzentriert (Abbildung 35 und Abbildung 36).



**Abbildung 35: Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gele der Aufreinigung von MBP-hGAB. (A)** SDS-PAGE der Fraktionen des mit 30 mM Maltose eluierten MBP-Fusionsproteins. **(B)** Fraktionen von MBP-hGAB nach Gelfiltration mit einer präparativen Sephadex G75-Säule. Spuren 1-13= MBP-hGAB, Spuren 14-18= abgetrenntes MBP. **(C)** Aufgereinigtes MBP-hGAB nach der Gelfiltration, Spur 1=MBP-hGAB; M= Protein-Marker.

Im Falle der GST-GFP-Fusionsproteine war eine Abtrennung von GST durch Gelfiltration über eine Sephadex G75 nach der Spaltung mit *Precission* Protease nicht möglich, da beide Proteine nahezu zeitgleich von der Säule eluierten (Abbildung 36C). Aus diesem Grund wurde die gespaltene Lösung erneut über die Glutathion-Sepharose-Affinitätssäule zirkuliert, um freies GST abzutrennen. Im Durchfluss befand sich reines GFP-Fusionsprotein, welches anschließend aufkonzentriert werden konnte (Abbildung 36D).



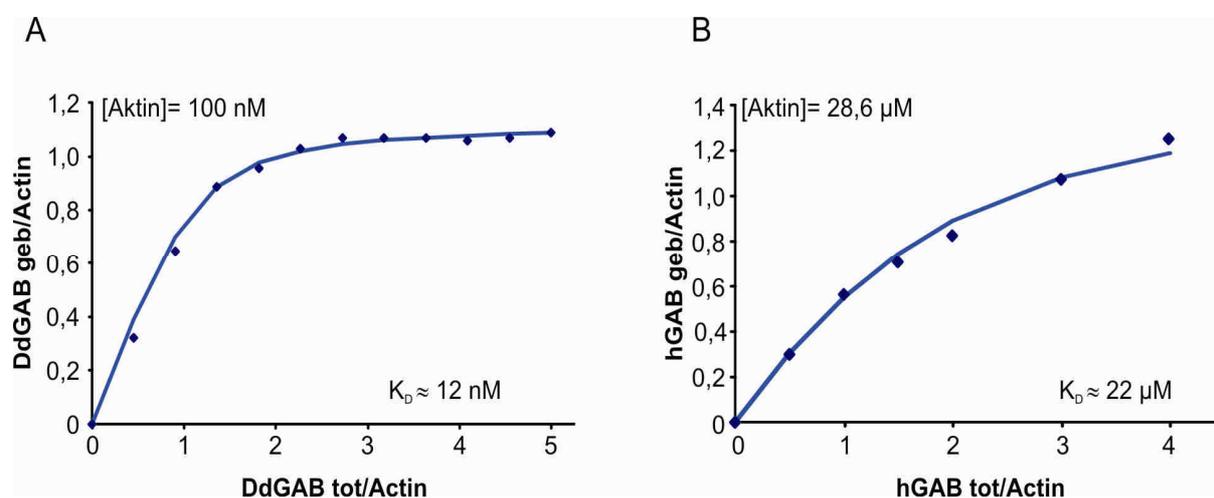
**Abbildung 36: Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gele der Aufreinigung von GFP-DdGAB.** **(A)** SDS-PAGE der mit Glutathion eluierten Fraktionen der affinitätschromatographischen Aufreinigung von GST-GFP-DdGAB. Das Fusionsprotein läuft bei einem apparenten Molekulargewicht von etwa 60 kDa. **(B)** Spaltung von GST-GFP-DdGAB mit *PreScission* Protease. Spur 1= ungespaltenes GST-GFP-DdGAB Protein, Spur 2= gespaltenes GFP-DdGAB Protein. **(C)** Gelfiltration von gespaltenem GST-GFP-DdGAB. GST und GFP-GAB ließen sich nicht effizient trennen. Spur 1= aufgetragenes Protein, Spuren 2-11= eluierte Fraktionen. GFP-DdGAB mit einem Molekulargewicht von 31 kDa ist wie das etwa 23,5 kDa große GST in fast allen Fraktionen zu finden. **(D)** Spur 1= GFP-DdGAB nach Gelfiltration sowie erneuter Inkubation auf der Glutathion-Sepharose-Säule. Unter diesen Bedingungen konnte GFP-DdGAB von GST abgetrennt werden M= Protein-Marker.

#### 4.2.2.7 Analyse der G-Aktin-GAB Interaktion

Gängige Methoden zur Bestimmung der Affinität von WH2-Motiven wie der GAB zu G-Aktin sind Fluoreszenztitrationsen mit NBD (7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol)-, Pyren (*N*-(1-pyrene)iodoacetamide)- oder Acrylodan (6-acryloyl-2-dimethylaminonaphthalene)-markierten Aktin (Hertzog et al., 2002, Hertzog et al., 2004). Die Bindung von WH2-Motiven führt idealerweise zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität des kovalent gebundenen Farbstoffs, was seinerseits zur Bestimmung von Bindungskonstanten verwendet werden kann. Zu diesem Zweck wurden MBP-GAB Fusionsproteine aufgereinigt und mit den oben aufgeführten fluoreszenzmarkierten Aktin-Spezies spektroskopisch untersucht. Leider lieferte

keine der markierten Aktin-Proben detektierbare Fluoreszenzänderungen nach Zugabe der GAB-Fusionsproteine.

Eine Untersuchung der Wechselwirkung der MBP-Fusionsproteine mit Aktin durch analytische Ultrazentrifugation war ebenfalls nicht möglich, da beide Protein-Spezies dieselben Sedimentationskoeffizienten aufwiesen. Aus diesem Grund wurde ein neuer experimenteller Ansatz gewählt und die GAB-Aktin Interaktion mit GFP fusionierten GAB-Peptiden durch analytische Ultrazentrifugation in Kollaboration mit PD Dr. Ute Curth analysiert. Dies war möglich, da die GFP-Fusionsproteine einen geringeren Sedimentationskoeffizienten als Aktin besaßen. Zudem konnte die Konzentrationsänderung von freien und gebundenen GABs direkt über die GFP-Absorption bei 490 nm bzw. die GFP-Fluoreszenz oberhalb bei 505 nm ermittelt werden.

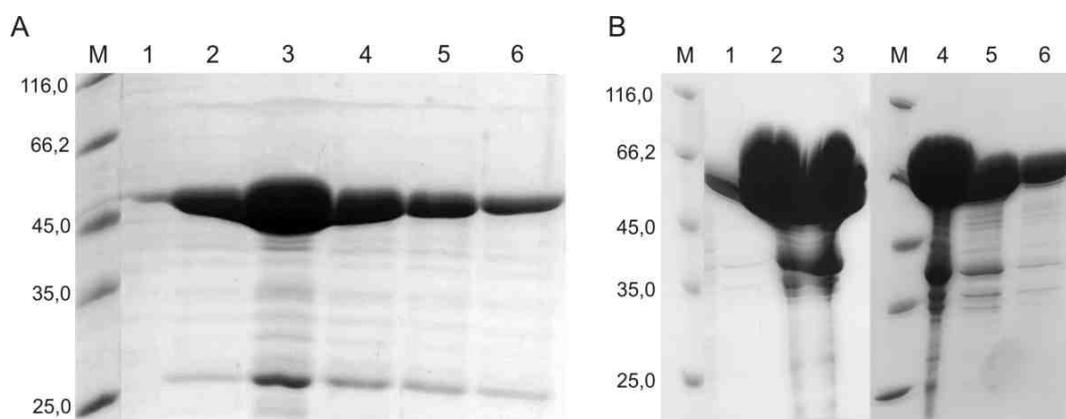


**Abbildung 37: Bestimmung der Dissoziationskonstanten der GAB-Aktin Interaktion durch analytische Ultrazentrifugation. (A)** Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) der GFP-DdGAB-Aktin-Interaktion durch analytische Ultrazentrifugation durch Detektion des GFP-Fluoreszenzsignals. **(B)** Bestimmung der Dissoziationskonstante der GFP-hGAB-Aktin-Interaktion durch analytische Ultrazentrifugation und Absorptionsmessung.

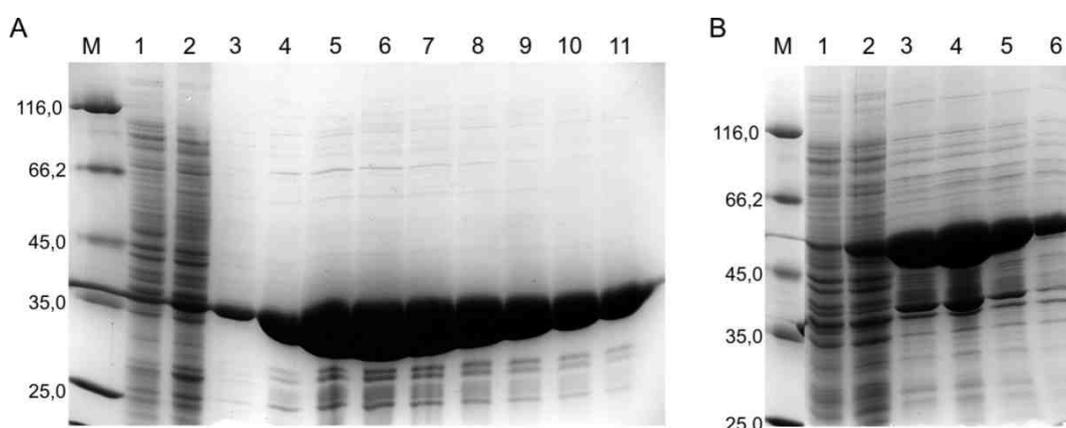
Die Ultrazentrifugationsexperimente ergaben, dass die DdGAB in G-Puffer mit einer  $K_D$  von 12 nM mehr als drei Größenordnungen stärker an G-Aktin bindet als die hGAB mit einer  $K_D$  von 22  $\mu\text{M}$  (Abbildung 37). In einer vorangegangenen Studie wurde die Dissoziationskonstante der Aktin-hGAB Interaktion mit Hilfe isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) mit  $120 \pm 60 \text{ }\mu\text{M}$  bestimmt (Chereau und Dominguez, 2006). Allerdings ist dieser Wert in Anbetracht der großen Standardabweichung nur bedingt vergleichbar - er liegt aber zumindest innerhalb derselben Größenordnung.

#### 4.2.2.8 Expression und Reinigung von VASP-Fragmenten zur Herstellung polyklonaler Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit sollten spezifische polyklonale Antikörper gegen verschiedene Bereiche von DdVASP hergestellt und nachfolgend affinitätsgereinigt werden. Diese Antikörper sollten für den Nachweis und die Quantifizierung der zellulären VASP-Konzentration durch Western Blot sowie für Lokalisationsstudien in fixierten *Dictyostelium*-Zellen verwendet werden. Die Proteinaufreinigungen wurden wie unter 4.2.2.1 beschrieben durchgeführt. Sowohl von der EVH1-Domäne als auch von der EVH2-Domäne konnten große Mengen aus *E. coli*-Lysaten gewonnen werden (Abbildung 38 und Abbildung 39).

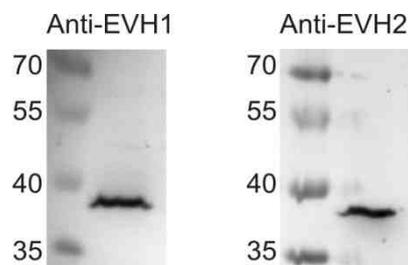


**Abbildung 38: Aufreinigung der EVH2-Domäne von DdVASP als Fusionen mit GST und MBP.** (A) Mit Coomassie-blau gefärbtes Polyacrylamidgel von GST-DdVASP/EVH2. Die ersten 6 Fraktionen der Elution sind gezeigt. (B) Mit Coomassie-blau gefärbtes Gel von MBP-DdVASP/EVH2. Die ersten 6 Fraktionen der Elution sind gezeigt. M= Protein-Marker.



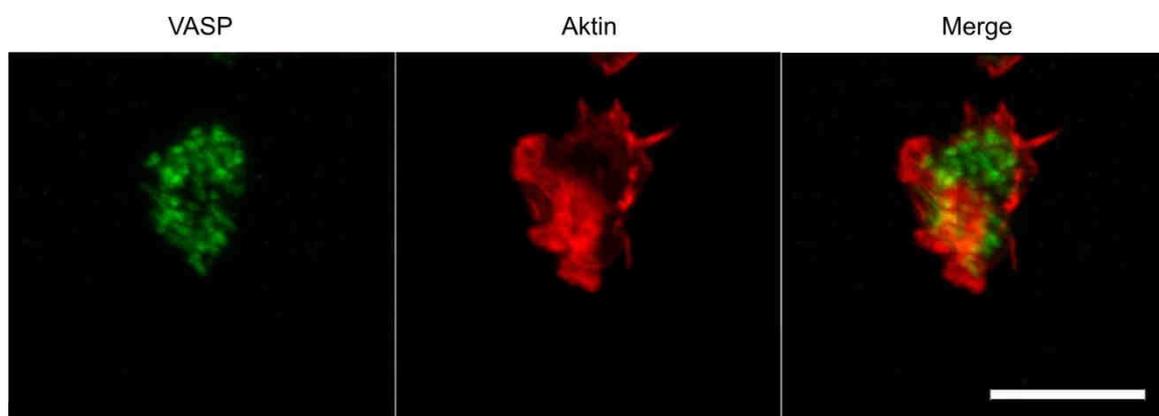
**Abbildung 39: Expression und Aufreinigung von GST- und MBP-DdVASP/EVH1.** (A) Mit Coomassie-blau gefärbtes Polyacrylamidgel von GST-DdVASP/EVH1 nach Gluthation-Sepharose-Affinitätschromatographie. Spur 1= Lysat nicht induzierter *E. coli*-Zellen, Spur 2= Lysat induzierter Zellen, Spuren 3-11= Fraktionen der Elution. (B) SDS-PAGE und Coomassie-Färbung von MBP-DdVASP/EVH1 nach Amylose-Sepharose-Affinitätschromatographie. Spur 1= Lysat nicht induzierter Zellen, Spur 2= Lysat induzierter Zellen, Spuren 3-6= Fraktionen der Elution. M= Protein Marker.

Mit den GST-EVH1 und -EVH2 Fusionsproteinen wurden weibliche Kaninchen immunisiert und die erhaltenen Antiseren zunächst in Western Blots auf ihre Spezifität mit Homogenat von Ax2-Zellen getestet. Beide Antikörper reagierten markant mit einer Bande von etwa 39 kDa, welches dem endogenen DdVASP entspricht (Abbildung 40).



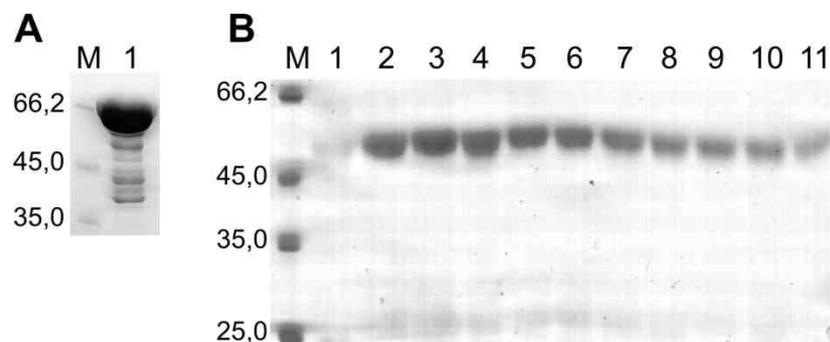
**Abbildung 40: Western Blot von Ganzzelllysat aus Ax2-Zellen mit Anti-EVH1- und Anti-EVH2-Antikörpern.** Die Antiseren gegen VASP/EVH1 und VASP/EVH2 detektierten endogenes VASP bei etwa 39 kDa.

Obwohl sowohl die EVH1- als auch die EVH2-spezifischen anti-VASP-Antikörper im Western Blot spezifische Signale lieferten (Abbildung 40), zeigten beide Antiseren in der Immunfluoreszenz lediglich eine diffuse Verteilung in der Zelle, was darauf hindeutet, dass beide polyklonalen Antikörper nur denaturiertes Protein erkennen (Abbildung 41).



**Abbildung 41: 3D-Rekonstruktion einer Ax2-Zelle zum Test des DdVASP/EVH2-Antikörpers in der Immunfluoreszenz.** Ax2-Zellen wurden nach der Fixierung mit dem Serum in einer Verdünnung von 1:1.000 über Nacht inkubiert und die gebundenen Antikörper anschließend mit Alexa 488 gekoppeltem Sekundärantikörper markiert (grün). Das F-Aktin-Zytoskelett der Zelle wurde mit TRITC-Phalloidin angefärbt (rot). Leider konnte mit diesem Antikörper keine spezifische Lokalisation von DdVASP an der Zellfront oder den Spitzen von Filopodien beobachtet werden. Der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Für die Affinitätsreinigung der Seren wurde der jeweilige Bereich von DdVASP als Fusionsprotein mit MBP aufgereinigt und kovalent an eine Cyanbromid-aktivierte Sepharose-Säule gebunden (Abbildung 42A und B). Durch dieses Verfahren konnten unspezifische Bindungen in Western Blots minimiert werden, allerdings konnte keine Verbesserung der Immunfluoreszenz erreicht werden.

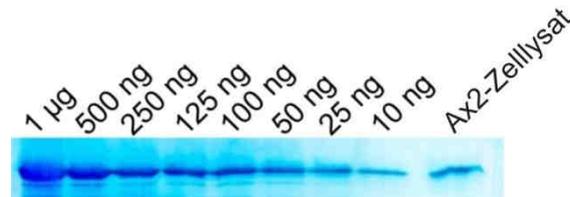


**Abbildung 42: Herstellung der Affinitätssäule und Reinigung der Antikörper gegen DdVASP/EVH2.** (A) SDS-PAGE des nachfolgend an das Säulenmaterial gebundenen MBP-DdVASP/EVH1. (B) Affinitätsreinigung der anti-DdVASP/EVH1-Antikörper. Spuren 1-11= Fraktionen nach Elution der Säule mit 0,2 M Zitronensäure pH 3,5. Das Coomassie gefärbte Gel nach SDS-PAGE zeigt bei ca. 50 kDa die schweren Ketten und bei ca. 25 kDa die leichten Ketten der Antikörper. M= Protein Marker.

#### 4.2.2.9 Bestimmung der intrazellulären Konzentration von endogenem VASP in *D. discoideum*-Zellen

Mit den anti-VASP-Antikörpern konnte die intrazelluläre Konzentration von endogenem Protein in Western Blots bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von aufgereinigtem GST-VASP-WT Protein zusammen mit  $2 \times 10^5$  Ax2-Zellen auf einem Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die immobilisierten Proteine wurden mit anti-VASP/EVH1-Antikörpern inkubiert und gebundenen Antikörper mit Sekundärantikörpern gegen Kaninchen detektiert, die mit alkalischer

Phosphatase konjugiert waren. Anschließend wurden die Bandenintensitäten densitometrisch quantifiziert und mit der Intensität der Bande von Ax2-Zellen verglichen. Um Aussagen über die durchschnittliche zelluläre Konzentration machen zu können, wurde das Zellvolumen von 3D-Rekonstruktionen abgerundeter Wildtyp-Zellen durch konfokale Mikroskopie zu etwa 2 pL/Zelle bestimmt. Die Abschätzung des Proteingehalts ergab etwa 10 ng VASP in  $2 \times 10^5$  Zellen, was somit einer zellulären Konzentration von etwa 2  $\mu\text{M}$  entspricht (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Bestimmung der intrazellulären Konzentration von endogenem VASP mittels Immunoblot.** Das Lysat von  $2 \times 10^5$  Ax2-Zellen wurde zusammen mit unterschiedlichen Mengen von GST-VASP Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Fusionsprotein anschließend per Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen DdVASP/EVH1 detektiert. Die Intensität der Proteinbanden wurde mit Hilfe von ImageJ densitometrisch bestimmt.

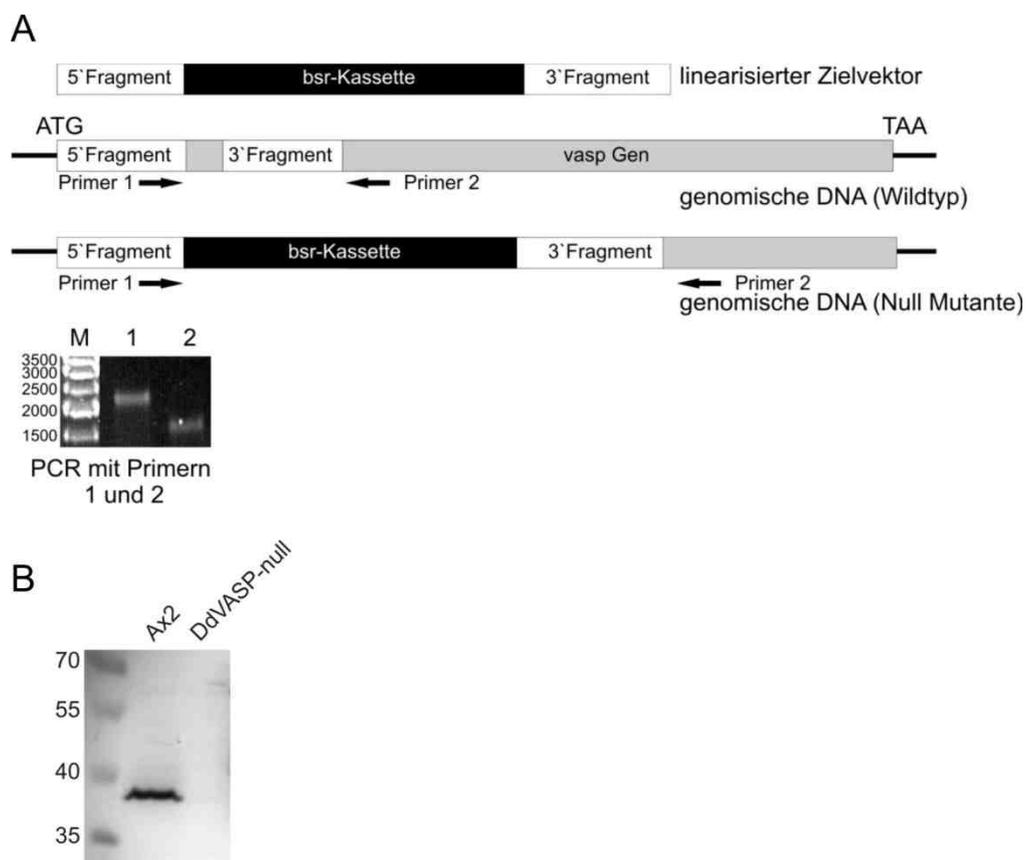
## 4.3 Zellbiologische Charakterisierung von VASP

Proteine der Ena/VASP Familie spielen bei einer Vielzahl Aktin-basierter Prozesse eine tragende Rolle. Ihre Lokalisation in Aktin-reichen Regionen und vor allem in Zellfortsätzen lässt vermuten, dass sie die Aktinpolymerisation in der Zellfront direkt beeinflussen (Rottner et al., 1999, Sechi und Wehland, 2004). Allerdings wurden die *in vivo* Funktion von VASP und sein Einfluss auf die Zellmigration und Filopodienbildung ähnlich wie die biochemischen Eigenschaften des Proteins zu Beginn meiner Arbeit noch immer kontrovers diskutiert (Trichet et al., 2008).

### 4.3.1 Herstellung einer unabhängigen VASP-null Mutante

Um die Effekte der verschiedenen Deletionskonstrukte von VASP (4.2.1.1 und Abbildung 22) *in vivo* untersuchen zu können, wurde zusätzlich zu einer bereits existierenden VASP-null-Zelle eine neue unabhängige genetische DdVASP *knock out*-Mutante hergestellt

(Schirenbeck et al., 2006). Dazu wurde eine Antibiotika-Resistenzkassette für Blasticidin S durch homologe Rekombination in das Zielgen eingebaut. Dies führt zur vollständigen Inaktivierung des Gens. Um unspezifische Insertionen des Konstruktes an anderer Stelle des Genoms zu vermeiden, werden hierfür lineare Konstrukte verwendet, die nur über 2 homologe Rekombinationen in das endogene Gen rekombinieren können. Der bereits konstruierte *targeting* Vektor (Schirenbeck et al., 2006) wurde mit *Bam*HI und *Sal*I linearisiert und durch Elektroporation in Ax2-Zellen eingebracht. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von Blasticidin S. DdVASP-null-Zellen wurden nach Isolierung genomischer DNA aus unabhängigen Bsr-resistenten Transformanten durch analytische PCR identifiziert (Abbildung 44A). Konsistent damit, zeigten sie auch kein Signal im Western Blot mit anti-VASP-spezifischen Antikörpern (Abbildung 44B). Diese unabhängigen null-Mutanten zeigten phänotypisch ebenfalls die bereits publizierten Defekte in der Filopodienbildung (Schirenbeck et al., 2006).



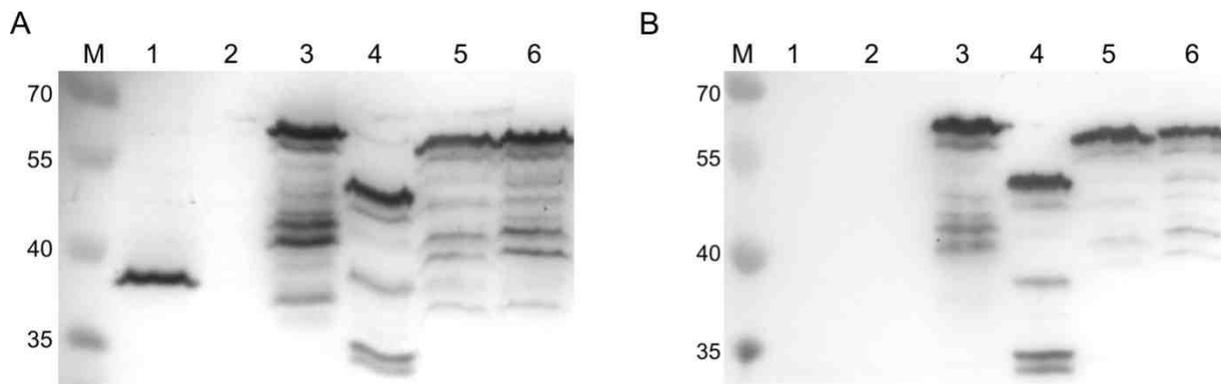
**Abbildung 44: Disruption des *vasP*-Gens in *D. discoideum*-Zellen. (A)** (Oben) Schema der Klonierungsstrategie zur Einführung und Identifizierung der Gendeletion. Der linearisierte *knock out*-Vektor trägt ein 5`und 3`-Fragment der genomischen DdVASP-DNA und wurde benutzt, um das Wildtyp-Gen in *D. discoideum*-Zellen zu ersetzen. Die anschließende Selektion von Transformanten

erfolgte mit Hilfe des Selektionsmarkers Blastocidin S. (Unten) VASP-null-Zellen wurden nach Selektion mit Blastocidin S, in Bakterienrasen vereinzelt und nachfolgend mit spezifischen Primern durch PCR an genomischer DNA identifiziert. M= DNA Marker. Spur 1= VASP Knockout, Spur 2= Wildtyp. **(B)** Western Blot aus Ganzzelllysaten aus Ax2- und VASP-null-Zellen mit anti-EVH1-Antikörpern. VASP war in VASP-null-Zellen nicht mehr detektierbar.

### 4.3.2 Herstellung von DdVASP-Konstrukten für die Expression von GFP-Fusionsproteinen

Vorangegangene Studien zur Rolle von DdVASP bei Aktin-basierenden Prozessen haben gezeigt, dass die Deletion der PRD und der GAB von murinem VASP die Geschwindigkeit von *Listerien* im Zytosol von MV<sup>D7</sup>-Zellen verringerte, während eine Deletion der FAB und der Tetramerisierungsdomäne sogar eine Beschleunigung der Bakterien zur Folge hatte (Geese et al., 2002). Zellbiologische Studien in MV<sup>D7</sup>- und *Dictyostelium*-Zellen ergaben, dass die Deletion der FAB eine starke Reduktion der Filopodien verursachte und die Lokalisation von VASP im Lamellipodium unterband (Applewhite et al., 2007, Loureiro et al., 2002, Schirenbeck et al., 2006). Die Deletion der GAB, FAB und PRD von Mena in MV<sup>D7</sup>-Zellen hatten hingegen nur geringe Effekte auf die Zellmotilität (Loureiro et al., 2002).

Um den Effekt von VASP auf die Aktinpolymerisation bei motilen Prozessen besser zu verstehen, wurde das Fehlen funktioneller Domänen von DdVASP *in vivo* untersucht. Dafür wurden die zuvor generierten DdVASP-Deletionsmutanten (4.2.1.1) in den Expressionsvektor pDGFP-MCS-neo kloniert (Dumontier et al., 2000) und nachfolgend in VASP-defiziente *D. discoideum*-Zellen transformiert (4.3.1). Nach Selektion mit G418 wurden die Transformanten auf Bakterienrasen vereinzelt und zunächst mikroskopisch auf GFP-Fluoreszenz überprüft. Anschließend wurde das Ausmaß der Expression durch Immunoblotting mit spezifischen anti-DdVASP-Antikörpern bestimmt (Abbildung 45).



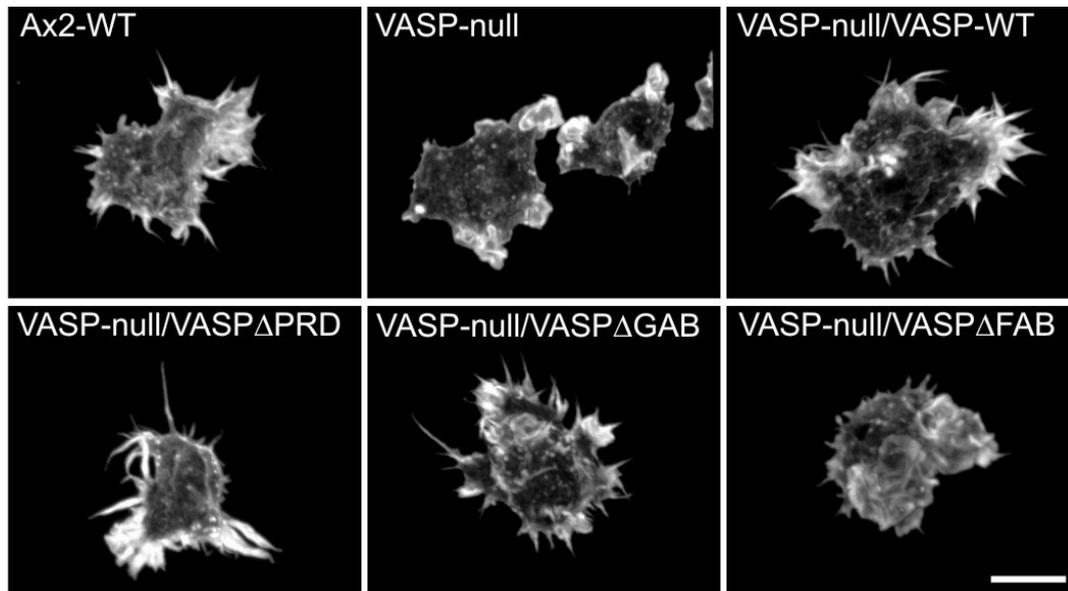
**Abbildung 45: Western Blots von Ganzzelllysaten verschiedener *D. discoideum* Zelllinien. (A)** Western Blot mit Anti-EVH1-Antikörpern. Endogenes VASP wird bei einem Molekulargewicht von ca. 39 kDa detektiert, die GFP-Fusionsproteine sind entsprechend größer. **(B)** Kontrollblot mit affinitätsgereinigtem anti-GFP-Antikörper. Spur 1= Ax2-Zellen, Spur 2= VASP-null-Zellen, Spur 3= GFP-DdVASP-WT-Zellen, Spur 4= GFP-DdVASP $\Delta$ PRD-Zellen, Spur 5= GFP-DdVASP $\Delta$ GAB-Zellen, Spur 6= GFP-DdVASP $\Delta$ FAB-Zellen.

### 4.3.3 Rekonstitution von *D. discoideum* VASP-null-Zellen mit GFP-DdVASP-Fusionsproteinen

#### 4.3.3.1 Effekte der DdVASP-Deletionsmutanten auf die Filopodienbildung

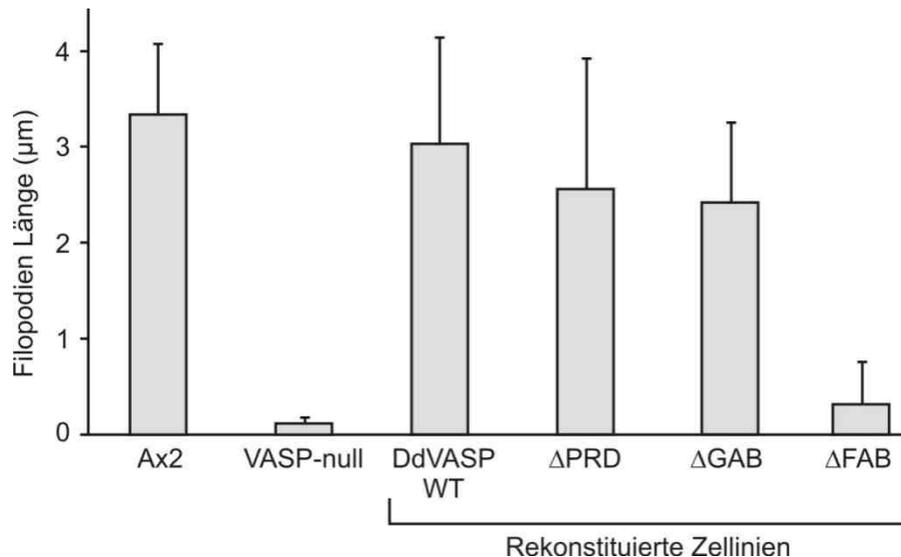
Filopodien sind fingerartige Membranausstülpungen der Zelle, die mit einem dichten Bündel aus mehreren Dutzend parallelen Aktinfilamenten gefüllt sind. Sie übernehmen unter anderem wichtige sensorische Aufgaben beim Wachstum von neuronalen Wachstumskegeln, bei dem Schließen von Epithelien und bei der Detektion von Pathogenen durch Leukozyten. Außerdem bilden sie nach Bindung an ein Substrat Vorläufer für Adhäsionsstellen der Zelle (Faix und Rottner, 2006, Faix et al., 2009, Mattila und Lappalainen, 2008). *Dictyostelium*-Zellen bilden zahlreiche Filopodien aus, die neben sensorischen Aufgaben auch an der Adhäsion der Zellen an verschiedenen Substraten beteiligt sind (Zhang et al., 2003). Obwohl *Dictyostelium*-Zellen evolutionär relativ weit von höheren Eukaryoten entfernt sind, liegt der Aktin-basierenden Motilität dieser Zellen nahezu derselbe Proteinapparat zugrunde (Jin et al., 2009). Dies trifft auch auf die Ausbildung von Filopodien zu: Bislang identifizierte Proteine, die für die Ausbildung von Filopodien in *Dictyostelium* verantwortlich sind, sind das Formin dDia2, DdVASP und Myosin VII (Schirenbeck et al., 2005, Schirenbeck et al., 2006, Tuxworth et al., 2001). Orthologe dieser drei Proteine, VASP, mDia2 und Myosin X, sind auch bei der Filopodienbildung in

Säugerzellen involviert (Applewhite et al., 2007, Block et al., 2008, Peng et al., 2003). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion von DdVASP zu einer starken Reduktion der Filopodien führt, und dass das FAB-Motiv bei der Filopodienbildung eine wichtige Rolle spielt (Han et al., 2002, Schirenbeck et al., 2006). Über den Beitrag der anderen funktionellen Bereiche von VASP lagen allerdings im *Dictyostelium*-System keine Befunde vor.



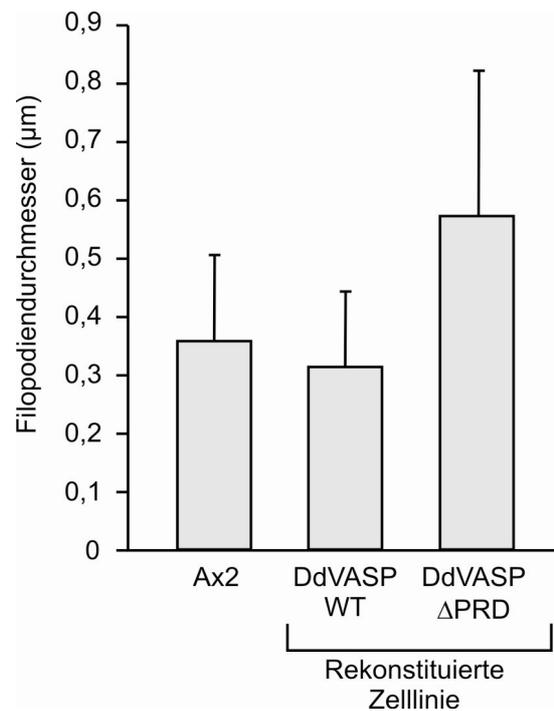
**Abbildung 46: Rekonstitution von VASP-null-Zellen mit DdVASP-Deletionsmutanten.** Während Ax2-Zellen zahlreiche Filopodien ausbildeten, waren VASP-null-Zellen praktisch nicht mehr in der Lage Filopodien auszubilden. GFP-DdVASP-WT und  $\Delta$ GAB stellten die Filopodienbildung in VASP-null-Zellen wieder her, während die Filopodien in DdVASP $\Delta$ FAB exprimierenden Zellen weit weniger zahlreich und deutlich kürzer waren. Die Expression von DdVASP $\Delta$ PRD führte zum Teil zur Ausbildung von Filopodien mit einer zum Teil ungewöhnlichen Morphologie. Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

Übereinstimmend mit vorangegangenen Publikationen war die Filopodienbildung in VASP-null-Zellen stark reduziert und konnte durch ektopische Expression von DdVASP $\Delta$ FAB nicht wiederhergestellt werden (Abbildung 46 und Abbildung 47; Han et al., 2002, Schirenbeck et al., 2006). Die Deletion der GAB hatte überraschenderweise nur geringe Effekte auf die Ausbildung von Filopodien, die im Vergleich zu Ax2-Zellen nur geringfügig kürzer waren. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde auch in MV<sup>D7</sup>-Zellen keine essentielle Funktion der GAB von VASP bei der Filopodienbildung gefunden (Applewhite et al., 2007).



**Abbildung 47: Durchschnittliche maximale Filopodienlänge in Ax2 Wildtyp- und rekonstituierten VASP-null-Zellen.** Die maximalen Filopodienlängen der untersuchten Zellen wurden anhand von fluoreszenzmikroskopischen- oder Pseudohellfeld-Aufnahmen der Zellen während der ungerichteten Migration bestimmt. Während die Mutanten DdVASP $\Delta$ GAB und - $\Delta$ PRD Filopodien mit nahezu unveränderter Länge bildeten, war die Länge der Filopodien in DdVASP $\Delta$ FAB-exprimierenden Zellen stark reduziert.  $n \geq 60$ .

DdVASP $\Delta$ PRD-exprimierende Zellen bildeten Filopodien in vergleichbarer Anzahl und Länge wie der Wildtyp aus (Abbildung 46 und Abbildung 47), jedoch waren sie zum Teil ungewöhnlich bauschig (Abbildung 48). Eine Analyse der durchschnittlichen Filopodiendurchmesser ergab, dass die Filopodien der DdVASP $\Delta$ PRD-exprimierenden Zellen fast doppelt so breit waren wie die von Ax2- oder DdVASP-WT exprimierenden Zellen, was auf eine erhöhte Anzahl von Filamenten in filopodialen Aktinbündeln schließen lässt. Somit scheint die PRD, möglicherweise durch die die Rekrutierung von Profilin-Aktin Komplexen, eine Rolle bei der Regulation der Filamentanzahl innerhalb der Filopodien zu spielen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Profilin-Aktin Rekrutierung und der Anzahl der Aktinfilamente könnte in der Inhibierung der Aktin-Nukleation durch Profilin liegen (Reichstein und Korn, 1979). Dieser Effekt tritt besonders deutlich bei Forminen auf, deren Nukleationsaktivität sich in Gegenwart von Profilin deutlich verringert (Neidt et al., 2008, Paul und Pollard, 2008). Die Deletion der PRD aus VASP könnte somit die Rekrutierung von Profilin und Profilin-Aktin in die Filopodienspitze vermindern, so dass Aktin-Nukleatoren wie das Formin dDia2 (Schirenbeck et al., 2005) eine erhöhte Nukleationsaktivität zeigen würden.



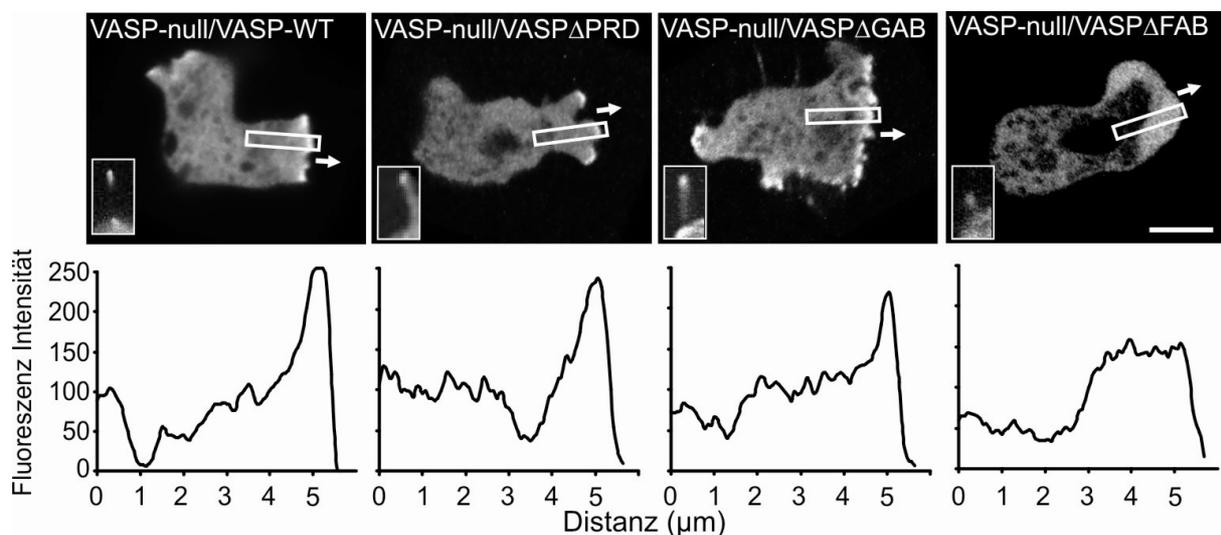
**Abbildung 48: Durchschnittliche Filopodiendurchmesser der mit GFP-DdVASP-WT und  $\Delta$ PRD rekonstituierten VASP-null-Zellen.** Verglichen mit dem Durchmesser der Filopodien von Ax2- und mit VASP-WT rekonstituierten VASP-null-Zellen war der durchschnittliche Durchmesser der Filopodien von VASP-null/DdVASP $\Delta$ PRD-Zellen deutlich erhöht. Dies deutet auf eine erhöhte Anzahl von Aktinfilamenten in den Filopodien dieser Zellen hin.  $n \geq 300$ .

#### 4.3.3.2 Einflüsse der Deletionsmutanten auf die subzelluläre Lokalisation von VASP sowie die Zellmotilität

Zellen nutzen die gerichtete Polymerisation von Aktin zu Filamenten um zelluläre Ausstülpungen wie Lamellipodien und Filopodien zu bilden und sich gerichtet fortzubewegen (Chhabra und Higgs, 2007, Pollard und Borisy, 2003). Obwohl für lange Zeit das sogenannte *dendritic nucleation* Modell den Mechanismus der Aktin-basierenden Motilität im Lamellipodium anscheinend hinreichend genau beschrieb (Svitkina und Borisy, 1999), mehrten sich in der Vergangenheit Hinweise darauf, dass Filamente unterhalb der Plasmamembran aktiv durch spezielle Filament-Elongatoren wie zum Beispiel Formine oder Proteine der Ena/VASP-Familie verlängert werden (Breitsprecher et al., 2008, Chesarone und Goode, 2009, Ferron et al., 2007, Insall und Machesky, 2009, Kovar und Pollard, 2004b, Kovar, 2006). Diese und vorangegangene Arbeiten weisen ebenfalls darauf hin, dass VASP monomeres Aktin für die Filamentelongation rekrutiert und gleichzeitig die wachsenden Filamentenden an der Membran verankert (Ferron et al., 2007, Samarin et al., 2003, Schirenbeck et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass Ena/VASP Proteine an der Lamellipodienspitze lokalisieren und dass die Menge an VASP in diesem Bereich direkt mit der Protrusionsrate des Lamellipodiums korreliert (Bear et al., 2000, Bear et al., 2002, Koestler et al., 2008, Rottner et al., 1999). Die Lokalisation des Proteins wird dabei sowohl von der EVH1-Domäne als auch von der EVH2-Domäne vermittelt, was darauf schließen lässt, dass VASP sowohl von Aktinfilamenten als auch von speziellen Adapterproteinen an die Plasmamembran rekrutiert wird (Bear et al., 2002). In *Dictyostelium* konnte gezeigt werden, dass die Deletion des VASP-Gens zu einer Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit während Chemotaxis führte (Han et al., 2002). Um die Domänen von VASP zu identifizieren, die für die subzelluläre Lokalisation des Proteins und für die schnelle Migration von *Dictyostelium* zuständig sind, wurden rekonstituierte VASP-null-Zellen mit Hilfe von Fluoreszenz- und RITC (*reflection interference contrast*)-Mikroskopie analysiert.

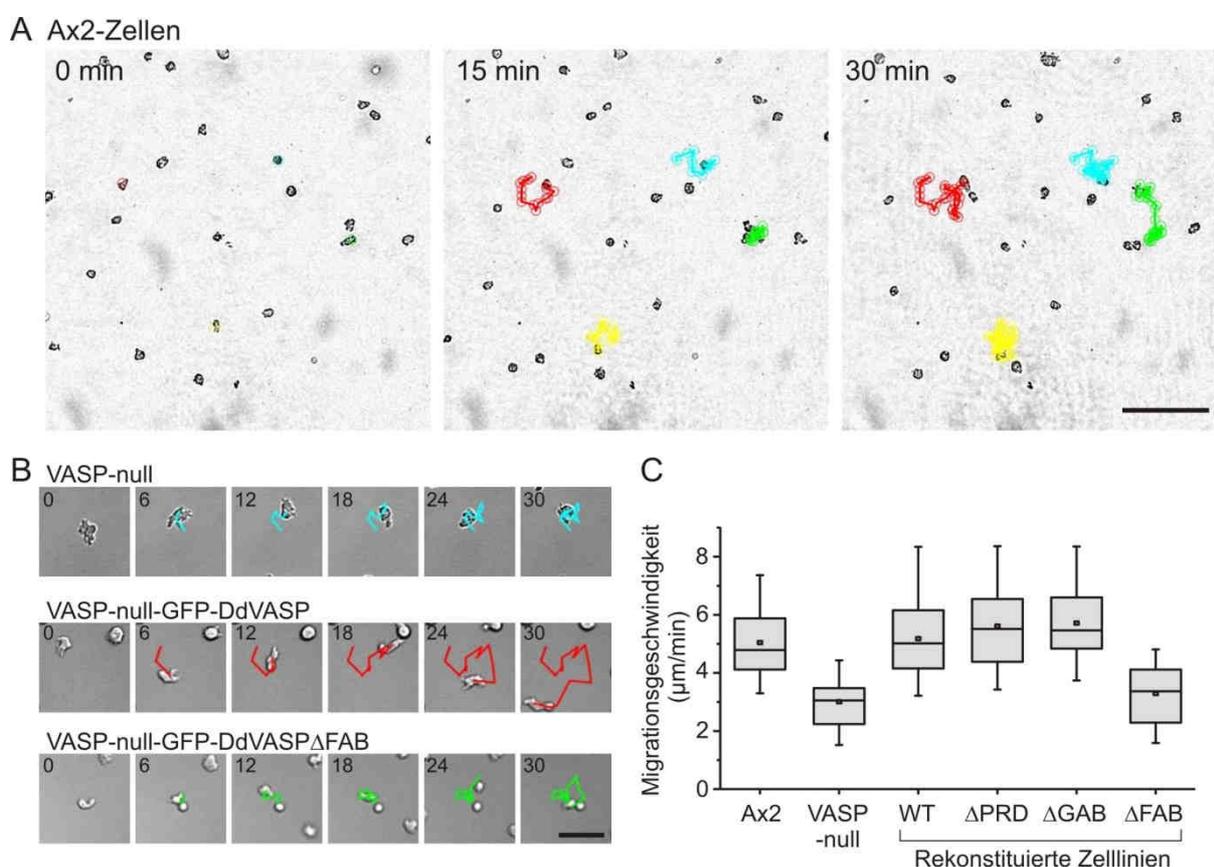
Eine Analyse der Lokalisation des GFP-Signals durch konfokale Mikroskopie während der spontanen Zellmigration nach Inkubation für 30 min in Sörensen-Phosphatpuffer (pH 6,0) zeigte in Übereinstimmung mit Studien in Säugerzellen, dass VASP prominent an der Zellfront lokalisierte (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Lokalisation von GFP-DdVASP-WT und Deletionsmutanten in DdVASP-null-Zellen.** GFP-DdVASP-WT, GFP-DdVASP $\Delta$ PRD und GFP-DdVASP $\Delta$ GAB lokalisierten an der Spitze des Leitsaums (Pseudopodiums) und an Filopodienspitzen (siehe Vergrößerungen im Einschub links unten im jeweiligen Bild). GFP-DdVASP $\Delta$ FAB hingegen lokalisierte diffus in der Zellfront, war jedoch auch schwach in den Spitzen der sehr kurzen Fortsätze zu finden. Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

Während die Mutanten DdVASP $\Delta$ GAB und  $\Delta$ PRD ebenfalls eine strikte Lokalisation an der Zellfront zeigten, war die Mutante DdVASP $\Delta$ FAB lediglich diffus innerhalb des

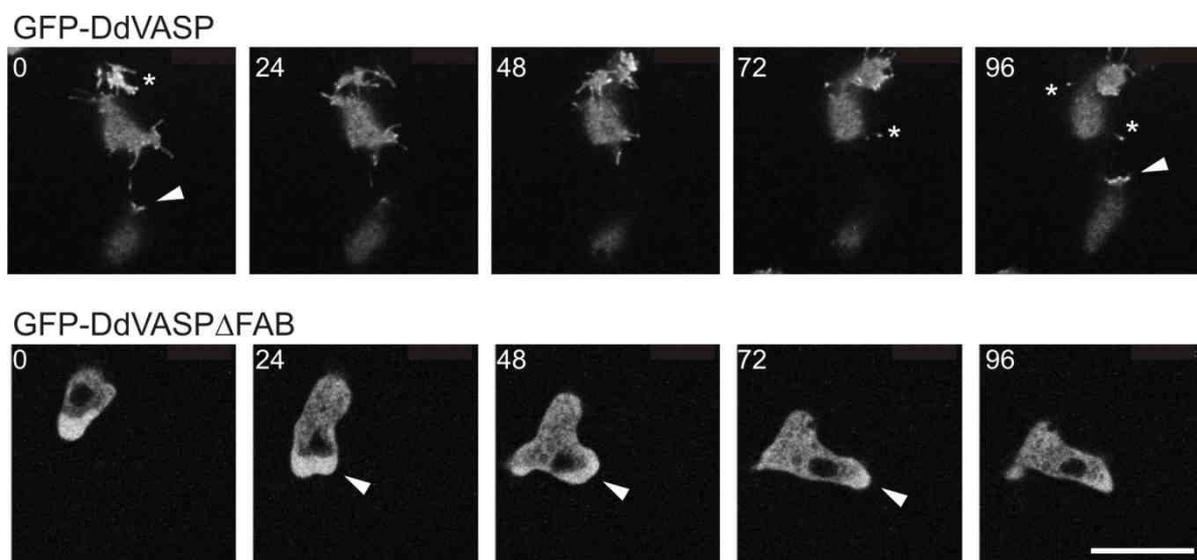
Pseudopodiums der migrierenden Zelle zu finden (Abbildung 49 und Abbildung 51). Interessanterweise lokalisierten alle Mutanten in Filopodienspitzen der Zellen, wobei die Filopodien in den DdVASP $\Delta$ FAB exprimierenden Zellen wesentlich kurzlebiger und viel kürzer waren als in den anderen rekonstituierten Zelllinien (Abbildung 49). Um Aussagen über potentielle Effekte der Deletionen innerhalb des VASP-Proteins auf die Zellmigration treffen zu können, wurde das Migrationsverhalten der unterschiedlichen rekonstituierten Zelllinien mikroskopisch mit Hellfeld-Mikroskopie analysiert. Nach 30 minütiger Inkubation der Zellen in Soerensen-Phosphatpuffer wurde die ungerichtete Migration der Zellen durch Zeitraffer-Videomikroskopie aufgenommen und die Migrationsgeschwindigkeiten auf Glasoberflächen analysiert (Abbildung 50).



**Abbildung 50: Einfluss unterschiedlicher Deletionsmutaten auf die Migrationsgeschwindigkeit von *D. discoideum*.** (A) Beispiel zur Analyse der Migrationsgeschwindigkeit von *D. discoideum*-Zellen in Sörensen-Puffer durch das ImageJ-Plugin MTrackJ. Pro Experiment wurden zeitgleich mehrere Zellen während der ungerichteten Zellmigration verfolgt und aus den zurückgelegten Wegstrecken die Migrationsgeschwindigkeit errechnet. Unterschiedliche Farben zeigen die Migrationspfade einzelner Zellen. Der Balken entspricht 100  $\mu$ m. (B) Migration einzelner, repräsentativer VASP-null- sowie rekonstituierter GFP-DdVASP-WT und GFP-DdVASP $\Delta$ FAB Zellen. Die Migration der VASP-null- und

GFP-DdVASP $\Delta$ FAB-Zelle war im Vergleich zu der GFP-DdVASP-exprimierenden Zelle deutlich verlangsamt. Die Zeit ist in Minuten angezeigt, der Balken entspricht 30  $\mu$ m. **(C)** Die Migrationsfähigkeit von VASP-null- und mit VASP $\Delta$ FAB rekonstituierten Zellen war im Vergleich zu Ax2- und den anderen rekonstituierten Zelllinien stark eingeschränkt.

Die Deletion von DdVASP in Ax2-Zellen führte zu einer deutlichen Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit der Zellen um 40% auf etwa 3  $\mu$ m/min (Abbildung 50C). Während die Expression von GFP-DdVASP-WT,  $\Delta$ GAB und  $\Delta$ PRD in VASP-null-Zellen die Zellmigration vollständig wiederherstellte, war die Expression von GFP-DdVASP $\Delta$ FAB nicht in der Lage die Zellmigration zu verbessern (Abbildung 50B und C). Somit ist die FAB aus DdVASP sowohl für die Ausbildung von Filopodien als auch für die Lokalisation des Proteins an der Zellfront und die damit zusammenhängende Migrationsgeschwindigkeit maßgeblich verantwortlich (Abbildung 51).

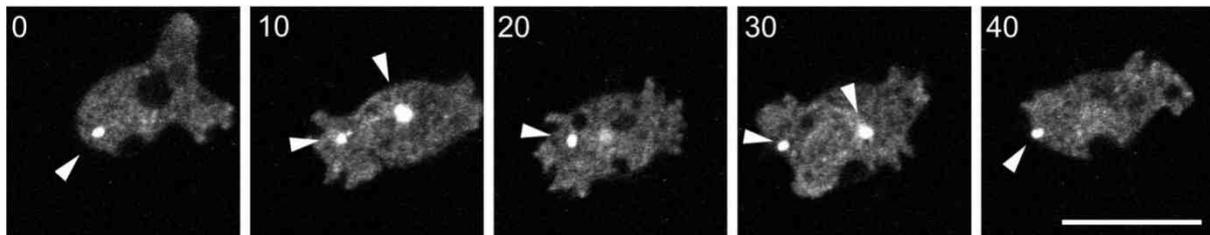


**Abbildung 51: Lokalisation von GFP-DdVASP und GFP-DdVASP $\Delta$ FAB in VASP-null-Zellen während der spontanen Zellmigration.** Während GFP-DdVASP deutlich in Filopodien (Asterisk) als auch in der Front der migrierenden Zelle (Pfeilspitze) lokalisiert, war GFP-DdVASP $\Delta$ FAB lediglich diffus in der Zellfront zu finden (Pfeilspitze). Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

Eine Analyse der GFP-DdVASP $\Delta$ Tet-Mutante auf die spontane Zellmigration und Filopodienbildung war leider nicht möglich, da das Protein offensichtlich instabil war und rasch abgebaut wurde. Häufig konnten in den GFP-DdVASP $\Delta$ Tet transformierten Zellen auch große GFP-enthaltende Aggregate gefunden werden, die keine Assoziation zur Plasmamembran aufwiesen (Abbildung 52). Eine spezifische Lokalisation des Proteins in der

Front der migrierenden Zelle oder in den wenigen filopodienartigen Zellfortsätzen war ebenfalls nicht zu finden.

DdVASP-null-GFP-DdVASP $\Delta$ Tet



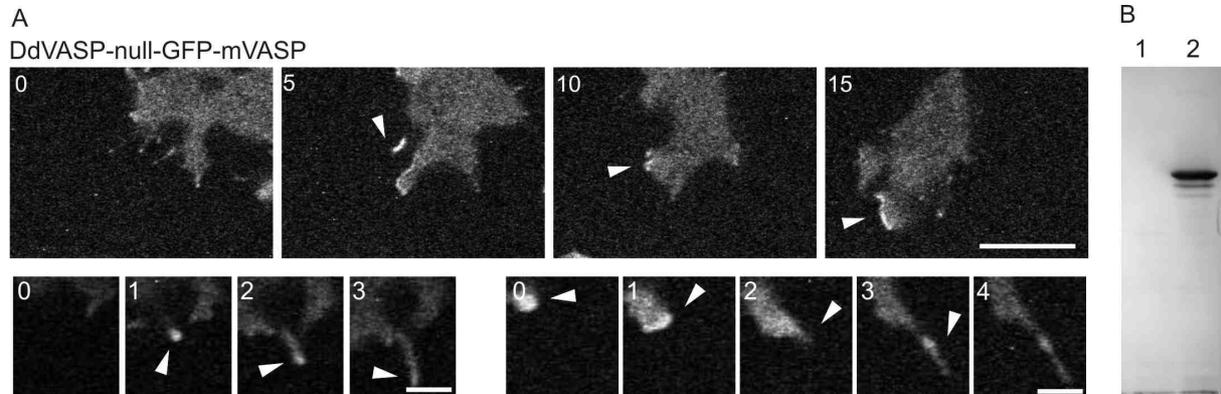
**Abbildung 52: Expression von GFP-DdVASP $\Delta$ Tet in VASP-null-Zellen führte häufig zur Ausbildung von Aggregaten.** GFP-DdVASP $\Delta$ Tet exprimierende Zellen enthielten häufig ein oder mehrere GFP-reiche Aggregate (Pfeilspitze). Eine spezifische Lokalisation des GFP-Fusionsproteins in der Zellfront war nicht detektierbar. Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

#### 4.3.4 Rekonstitution von DdVASP-defizienten *D. discoideum*-Zellen mit murinem VASP (mVASP)

DdVASP und VASP aus Vertebraten besitzen dieselbe Domänenorganisation (siehe 4.1.1), unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung, ihrer Regulation durch Phosphorylierung und ihrer Fähigkeiten, *in vitro* Aktin zu binden und zu polymerisieren (vergl. 4.2.2.3 und 4.2.2.7). Diese Unterschiede wurden von einigen Laboren angeführt um nahelegen, dass Ergebnisse zur Rolle von VASP bei der Filopodienbildung aus dem *Dictyostelium* System nicht direkt auf Säugerzellen übertragbar seien (Applewhite et al., 2007, Bear und Gertler, 2009).

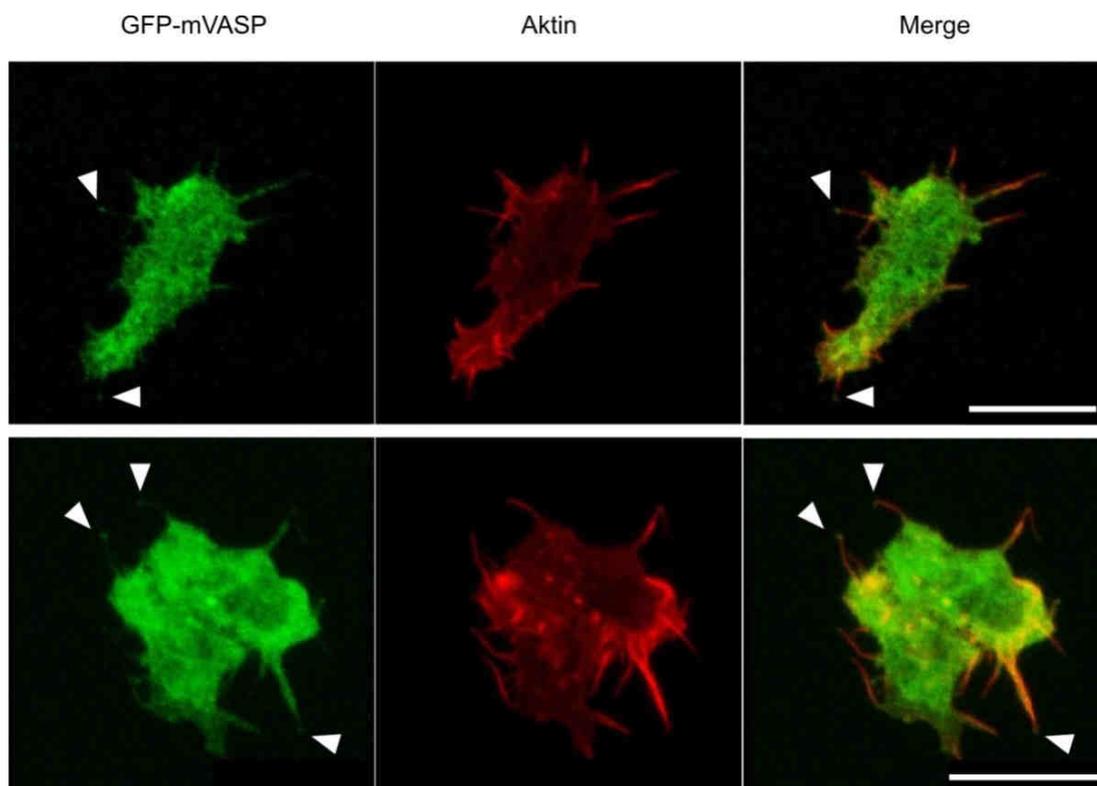
Um speziesübergreifende Gemeinsamkeiten und Unterschiede von VASP zu analysieren, wurde das GFP-markierte mVASP Ortholog in DdVASP-null-Zellen exprimiert und seine Lokalisation sowie seine Fähigkeit zur Wiederherstellung von Filopodien untersucht. GFP-mVASP exprimierende *Dictyostelium* VASP-null-Zellen zeigten eine deutliche Zunahme der Filopodienanzahl. Das Protein lokalisierte wie DdVASP dabei sowohl an der Zellfront sowie in den Spitzen der gebildeten Filopodien. Allerdings war die Lokalisation an der lamellipodialen Spitze nicht so prägnant wie bei GFP-DdVASP, was möglicherweise auf eine schwächere Affinität der EVH1-Domäne von mVASP für die EVH1 Rezeptoren aus *Dictyostelium* zurückzuführen ist (Abbildung 53A). Eine nur geringe Expression von mVASP

kann aufgrund des starken Signals im Western Blot ausgeschlossen werden (Abbildung 53B). Diese Befunde zeigen aber eindeutig, dass mVASP in der Lage ist den Filopodien-Defekt von *Dictyostelium* VASP-null-Zellen aufzuheben.



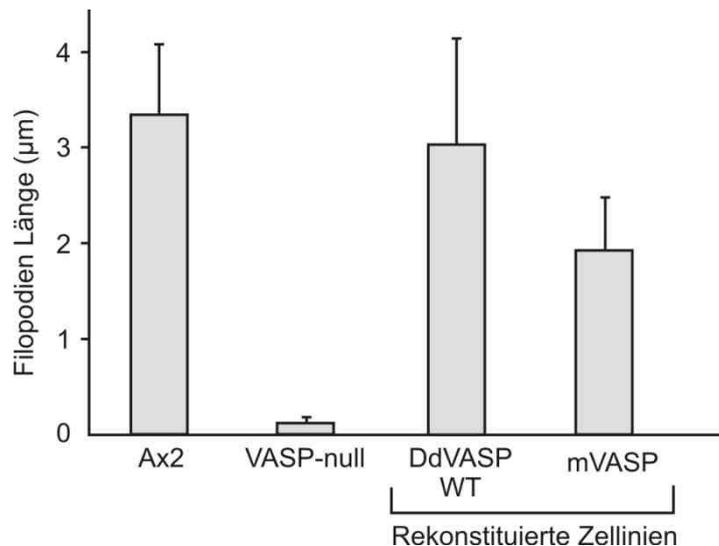
**Abbildung 53: Lokalisation von GFP-mVASP in VASP-null-Zellen. (A) (Oben)** GFP-mVASP lokalisierte deutlich in der Front der migrierenden Zelle. Der Balken entspricht 10 µm. **(Unten)** GFP-mVASP lokalisierte während der Ausbildung von Filopodien in der Spitzenregion dieser protrusiven Strukturen. Die Zeit ist in Minuten angegeben, der Balken entspricht 2 µm. **(B)** Expression von GFP-mVASP in VASP-null-Zellen. Die Expression von GFP-mVASP wurde durch Western Blotting mit anti-GFP-Antikörpern nachgewiesen. Spur 1= VASP-null; Spur2= VASP-null-GFP-mVASP.

Die 3D-Rekonstruktion von TRITC-Phalloidin und mit Anti-GFP-Antikörpern markierten Zellen zeigte eine etwas diffuse Lokalisation von GFP-mVASP. Wie im Falle des endogenen DdVASP Proteins konnte auch hier nur eine schwache Anreicherung des Proteins in den Filopodienspitzen verzeichnet werden (Abbildung 54). Da die verwendeten anti-GFP-Antikörper sowohl an denaturiertes als auch an natives GFP binden, ist naheliegend, dass die verwendete Fixierungsmethode nicht für die Immundetektion von VASP geeignet ist.



**Abbildung 54: Lokalisation von GFP-mVASP in VASP-null-Zellen.** Die Expression von GFP-mVASP in VASP-null-Zellen stellte die Filopodienbildung wieder her. Aktin wurde mit TRITC-Phalloidin und GFP-mVASP mit polyklonalen anti-GFP-Antikörpern visualisiert. Allerdings akkumulierte mVASP im Gegensatz zu lebenden Zellen, nach der Fixierung nur noch sehr schwach in Filopodienstippen (Pfeilspitzen). 3D-Rekonstruktionen konfokaler Schnitte sind gezeigt. Der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Eine Analyse der Filopodienmorphologie ergab, dass die durchschnittliche maximale Länge der Filopodien in GFP-mVASP exprimierenden Zellen mit nur etwa 2  $\mu\text{m}$  etwas kleiner ist als beim Wildtyp oder GFP-DdVASP exprimierenden Zellen mit jeweils 3-4  $\mu\text{m}$  (Abbildung 55).



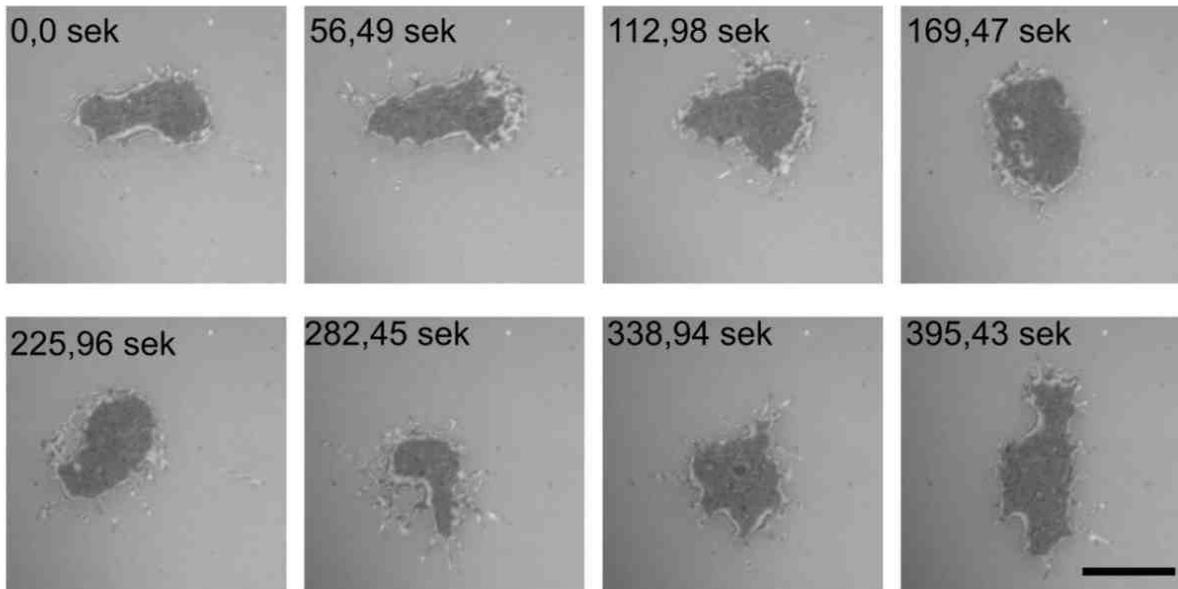
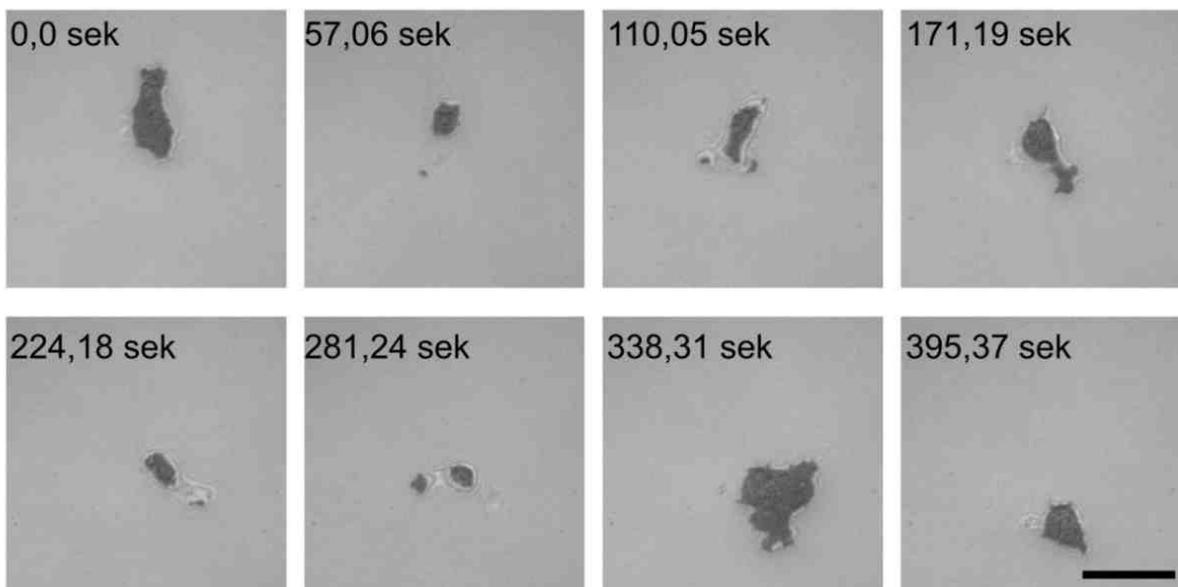
**Abbildung 55: Durchschnittliche maximale Filopodienlänge von GFP-mVASP- bzw. -DdVASP exprimierenden VASP-null-Zellen.** GFP-mVASP konnte die Filopodienbildung in DdVASP-null-Zellen widerherstellen. Allerdings war die maximale Länge der Filopodien etwas kleiner.  $n = 25$ . Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.

Da GFP-mVASP eine vergleichbare Expression wie DdVASP aufwies (Abbildung 53B), ist ein möglicher Grund für die kleineren Filopodien eine suboptimale Interaktion von mVASP mit anderen Proteinen im Filopodienkomplex von *Dictyostelium*-Zellen. Diese Ergebnisse zeigen aber eindeutig, dass VASP Proteine aus verschiedenen Spezies durchaus in der Lage sind Filopodien in *Dictyostelium*-Zellen zu induzieren.

### 4.3.5 Einfluss von VASP auf die Zell-Substrat-Adhäsion von *D. discoideum*-Zellen

Neben der etablierten Rolle bei der Lamellipodien- und Filopodienbildung sind Proteine der Ena/VASP Familie auch in die Ausbildung fokaler Kontakte involviert (Garvalov et al., 2003, Rottner et al., 2001, Vasioukhin et al., 2000). Um einen möglichen Einfluss von DdVASP auf die Adhäsionsfähigkeit von *Dictyostelium*-Zellen zu analysieren, wurden RICM-Aufnahmen (*reflection interference contrast microscopy*) von migrierenden Ax2- und VASP-null-Zellen auf einer Glasoberfläche angefertigt. RICM ist eine Mikroskopietechnik, mit deren Hilfe man den Abstand zwischen einer Zelle und dem darunterliegenden Substrat darstellt (Weber et al., 1995). Durch die Quantifizierung der kontraststarken Auflagefläche kann die Adhäsionsfähigkeit von Zellen bestimmt werden. Da keine auffälligen Unterschiede in der Gesamtgröße von Ax2- und VASP-null-Zellen durch Fluoreszenz- oder DIC-Mikroskopie

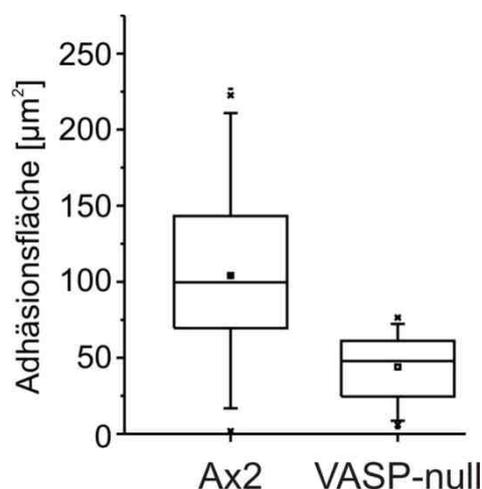
festzustellen waren, konnten durch RICM die Adhäsionsflächen beider Zelllinien direkt miteinander verglichen werden.

**A****B**

**Abbildung 56: Substratanhaftung von Wildtyp- und VASP-null-Zellen auf einer Glasoberfläche.** (A) Die Ax2-Zelle zeigte über einen Zeitraum von 6,5 min eine im Vergleich zu der in (B) gezeigten VASP-null-Zelle eine erheblich größere Adhäsionsfläche. Der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Die mittlere Kontaktfläche betrug für Ax2-Zellen  $100 \mu\text{m}^2$ , wobei sich durch die für *Dictyostelium* typische periodische Ablösung und Anheftung an das Substrat eine relativ

große Standardabweichung ergab (Abbildung 56 und Abbildung 57). Die maximale Adhäsionsfläche betrug etwa  $200 \mu\text{m}^2$  und die minimale Adhäsionsfläche lediglich  $25 \mu\text{m}^2$  (Abbildung 57). Im Fall von VASP-null-Zellen zeigte sich ein anderes Bild: Die Zellen waren meist nicht in der Lage sich mit einem großen Bereich der Zelle an das Substrat anzuheften. Stattdessen blieben sie lediglich mit einem kleinen Teil mit der Deckglasoberfläche verbunden, während der restliche Zellkörper in das darüber liegende Medium ragte (Abbildung 56B und Abbildung 57). Die durchschnittliche Adhäsionsfläche betrug hier jeweils lediglich etwa  $50 \mu\text{m}^2$ . Dieses beeinträchtigte Adhäsionsverhalten könnte unter anderem ein wesentlicher Grund für die reduzierte Zellmotilität von VASP-null-Zellen sein. Da Filopodien in *Dictyostelium* wie auch in Säugerzellen in der Lage sind, Vorläuferstrukturen für Zell-Substrat-Kontakte auszubilden (Zhang et al., 2003) und Filopodien maßgeblich zur Adhäsion beitragen (Schirenbeck et al., 2006), ist die verringerte Adhäsion von VASP-null-Zellen vermutlich direkt auf die Abwesenheit von Filopodien zurück zu führen.



**Abbildung 57: VASP-null-Zellen zeigen Defekte bei der Zell-Substrat-Adhäsion.** Box-Plot der Adhäsionsflächen von Ax2- und VASP-null-Zellen. Die Adhäsionsfläche wurde über einen Zeitraum von 30 min ermittelt. Die Box entspricht dem Bereich, in dem 50% der Messwerte liegen, die *whisker* umfassen 75% der Daten. Median und Mittelwert sind durch die Linie beziehungsweise durch das Rechteck innerhalb der Box gekennzeichnet.  $n \geq 94$ .

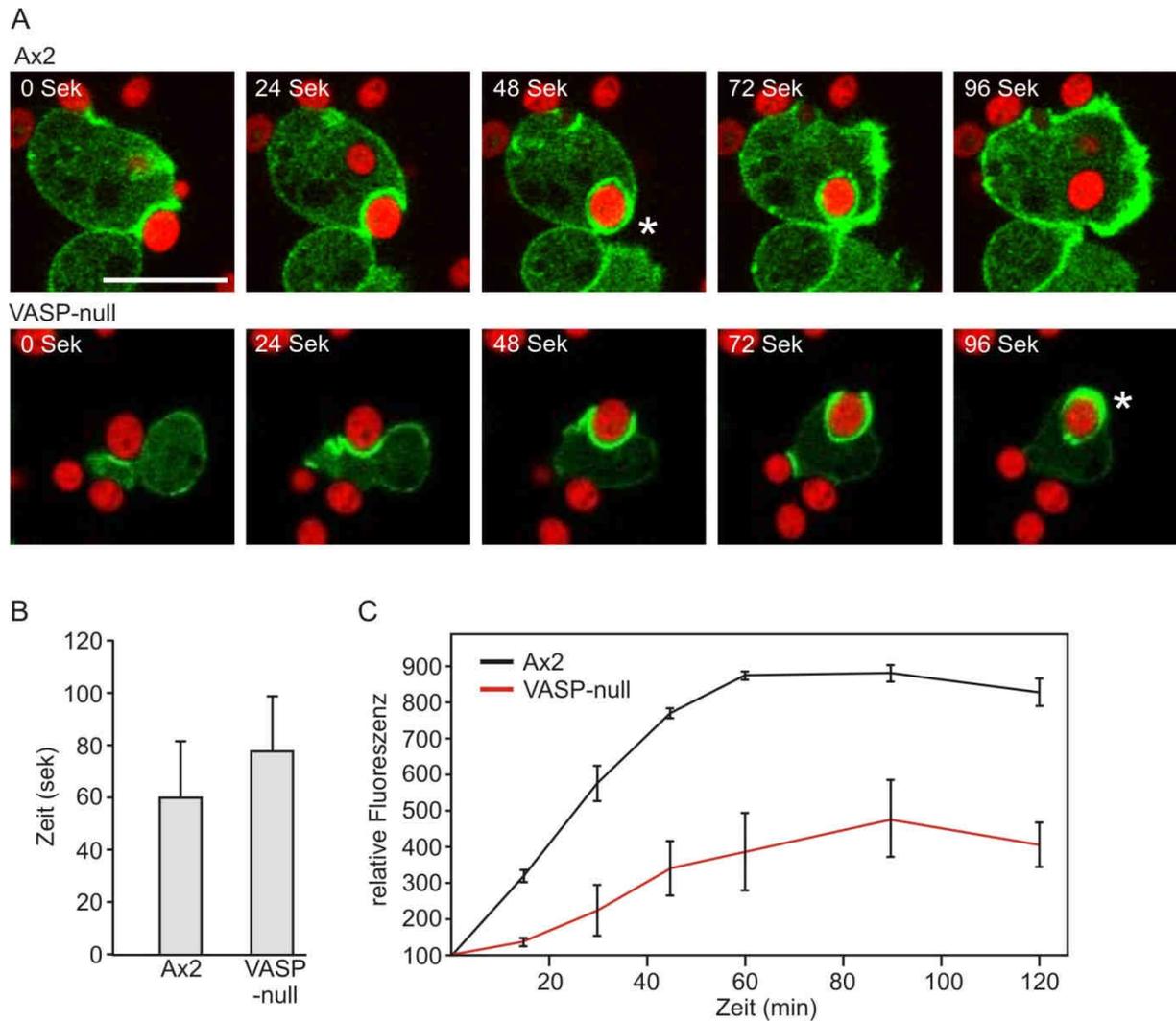
Überraschenderweise konnte der Adhäsionsdefekt der VASP-null-Zellen in diesem Fall nicht durch Expression von GFP-DdVASP-WT wiederhergestellt werden. Da VASP in Vertebraten auch mit dem Transport von Zelladhäsionsmolekülen, wie beispielsweise Integrinen an die Zelloberfläche in Verbindung gebracht wird (Tokuo und Ikebe, 2004), kann es durchaus sein, dass GFP-markiertes DdVASP in *Dictyostelium* zwar Aktinfilamente verankern und elongieren kann, dass es aber möglicherweise nicht mehr in der Lage ist, optimal mit

*Dictyostelium*-spezifischen Zelladhäsionsmoleküle wie Talin A oder Myosin VII zu interagieren. Außerdem könnte der N-terminale GFP-tag die Wechselwirkung zu EVH1-Rezeptoren stören. Erstaunlicherweise zeigen Fibroblasten einen gegenteiligen Effekt nach Inaktivierung des VASP-Gens: Hier führt die Deletion zu einer größeren Adhäsionsfläche und vergrößerten fokalen Kontakten (Galler et al., 2006, Garcia Arguinzonis et al., 2002). Die Ursache für diese Unterschiede ist allerdings bislang unklar.

### **4.3.6 VASP-null-Mutanten zeigen eine verminderte Phagozytoserate**

Die gezielte Polymerisation von Aktin unterhalb der Plasmamembran dient neben der Zellbewegung auch der phagozytotischen Aufnahme von extrazellulären Partikeln wie etwa Bakterien oder Hefen. Phagozytose in *Dictyostelium* wird durch Kontakt mit dem aufzunehmenden Partikel ausgelöst und führt zur rezeptorvermittelten Initiierung der Aktinpolymerisation, was zur Ausstülpung der Plasmamembran in Form einer kelchartigen Struktur führt (Maniak, 2003).

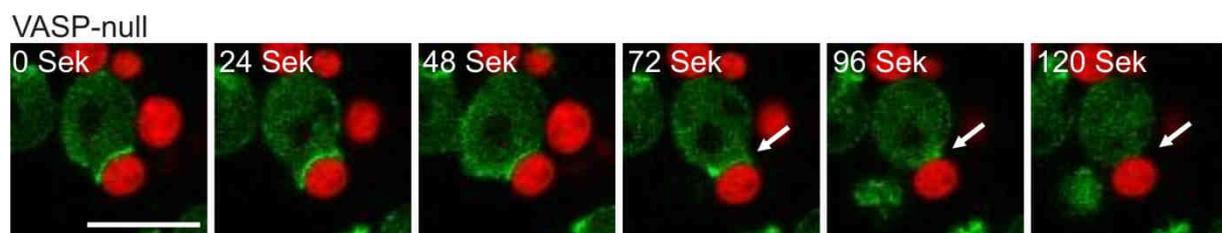
Zur Untersuchung der Funktion von VASP bei der Phagozytose wurde die phagozytotische Aufnahme von RITC (Rhodamin-Isothiocyanat)-markierten Hefezellen in Ax2-Wildtypzellen mit VASP-null-Mutanten verglichen. Hierbei wurde die intrazelluläre Fluoreszenzzunahme nach Aufnahme der markierten Hefezellen spektroskopisch verfolgt. Zum anderen wurden individuelle Phagozytoseprozesse mit Hilfe konfokaler Mikroskopie analysiert und die Dauer der Aufnahme einzelner RITC-markierter Hefezellen bestimmt, um Aussagen über die Dynamik der Phagozytose in Wildtypzellen und VASP-null treffen zu können. Hierzu wurden die Zellen mit dem Phagozytose-Marker GFP-Coronin transformiert. Coronin lokalisiert während der Phagozytose von Hefezellen an der Plasmamembran und erlaubt so die eindeutige Identifizierung von phagozytotischen Prozessen (Maniak et al., 1995).



**Abbildung 58: VASP-null-Zellen zeigen eine verminderte Phagozytoserate. (A)** Phagozytose von Hefezellen (*S. cerevisiae*) in *D. discoideum*-Zellen. GFP-Coronin-exprimierende Ax2- und VASP-null-Zellen wurde in Phosphatpuffer die 6fache Menge an RITC-markierten Hefezellen zugegeben und individuelle Phagozytoseprozesse durch konfokale Mikroskopie analysiert. Der Stern markiert die vollständige Umschließung des Hefepartikels. Der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ . **(B)** Durchschnittliche Dauer der Phagozytose von Hefezellen durch Ax2- und VASP-null-Zellen. Gemessen wurde die Zeit vom ersten Kontakt mit der Hefezelle bis zur vollständigen Internalisierung.  $n \geq 50$ . Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. **(C)** VASP-null-Zellen zeigen eine verminderte Phagozytoserate. Die Aufnahme von hitzeinaktivierten, Fluoreszenz-markierten Hefezellen wurde über einen Zeitraum von 120 min im Fluorimeter gemessen.  $n = 12$ . Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.

Die mikroskopische Analyse der Phagozytose mit RITC-markierten Hefezellen zeigte, dass einzelne Phagozytoseprozesse in VASP-null-Zellen signifikant länger dauerten als in Ax2-Zellen (Abbildung 58A und B). Die anschließende Analyse der Phagozytoserate von Ax2-

und VASP-null-Zellen ergab, dass nicht nur die Dauer der Phagozytoseprozesse sondern auch ihre Häufigkeit in Abwesenheit von DdVASP vermindert war (Abbildung 58C). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte in den mikroskopischen Assays beobachtet werden, dass VASP-null-Zellen selbst nach Ausbildung des phagozytotischen Kelchs und Rekrutierung von Coronin dazu neigten, den Phagozytoseprozess abubrechen (Abbildung 59). Diese Effekte sind mit einer verminderten Aktinpolymerisation unterhalb der Plasmamembran erklärbar, die sowohl die Ausbildung der phagozytotischen Ausstülpung als auch die Umschließung des Fremdpartikels verzögern würden. Außerdem liegt der Verdacht nahe, dass die Phagozytose ebenfalls durch die geringere Adhäsivität der VASP-null-Zellen beeinträchtigt wird, da die Partikelaufnahme erst nach dessen Bindung an die Plasmamembran fortschreiten kann. Da die Phagozytose in VASP-null-Zellen lediglich langsamer als in Wildtyp-Zellen verlief kann aus diesen Befunden geschlossen werden, dass DdVASP für die Phagozytose nicht essentiell ist, sondern lediglich die Effizienz der Partikelaufnahme durch gesteigerte Aktinpolymerisation oder Rekrutierung von Adhäsionsmolekülen steigert.

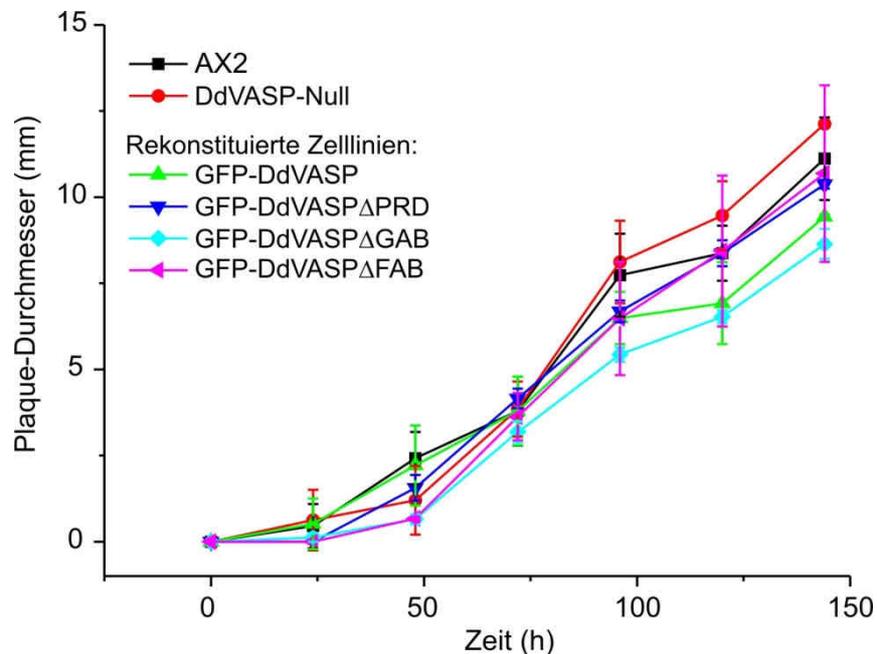


**Abbildung 59: Unvollständige Phagozytose in VASP-null-Zellen.** Gezeigt ist ein abgebrochener Phagozytoseprozess von RITC-markierter Hefe durch eine GFP-Coronin-exprimierende VASP-null-Zelle. Der Pfeil zeigt, dass sich der phagozytotische Kelch (durch GFP-Coronin-Akkumulation erkennbar) wieder zurückbildet, so dass der Hefepartikel nicht internalisiert wird.

### 4.3.7 Die Eliminierung von VASP hat keinen Einfluss auf das Wachstum von *D. discoideum*-Zellen auf Bakterienrasen

Da die Phagozytose in VASP-null-Zellen in Flüssigmedium verlangsamt abläuft sollte überprüft werden, ob das Wachstum der Mutante auf Bakterienrasen beeinträchtigt war. Zu diesem Zweck wurden sogenannte Plaque-Assays durchgeführt, bei denen die Mitte einer mit *Klebsiella*-Zellen besiedelten SM-Agar Platte mit einer geringen Anzahl von

*Dictyostelium*-Amöben inokuliert wurde. Innerhalb einiger Tage bildeten sich Plaques im Bakterienrasen aus, deren Größe mit der Wachstumsrate von *Dictyostelium* korreliert (Loomis und Ashworth, 1968).

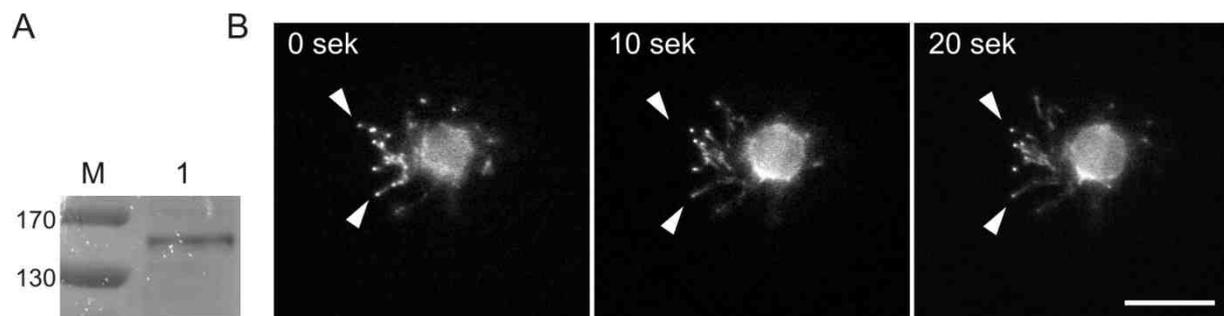


**Abbildung 60: Wachstum von DdVASP-null-Zellen und rekonstituierten Zelllinien auf Bakterienrasen.** Alle Zelllinien zeigen in etwa dieselbe Wachstumsrate. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus fünf Messungen dar.

In diesem Assay zeigten DdVASP-null-Zellen aber keine Unterschiede zu Ax2-Zellen (Abbildung 60). Auch die Expression von GFP-DdVASP oder den Deletionsmutanten hatte keinen großen Einfluss auf die Plaquebildung. Dies erscheint insoweit bemerkenswert, als dass DdVASP-null-Zellen sowohl eine langsamere Zellmigration aufweisen als auch eine verminderte Phagozytoserate in Flüssigmedium. Der Grund für diese Unterschiede könnte in der geringeren Adhäsion der VASP-null-Zellen zu finden sein: Während sich dies negativ auf die Phagozytose in Flüssigmedium auswirkt, da sich die Hefezellen frei durch das Nährmedium bewegen, ist es wahrscheinlich dass die verminderte Adhäsion der Mutante auf Agarplatten weit weniger schwer wiegt, da hier die Amöben in unmittelbarem Kontakt mit den Bakterien stehen.

### 4.3.8 Wiederherstellung der Filopodienbildung in VASP-defizienten Zellen durch die Expression des konstitutiv aktiven Formins dDia2

VASP-null-Mutanten bilden ebenso wie dDia2-null-Zellen nahezu keine Filopodien aus. Das Formin dDia2 lokalisiert wie VASP an den Spitzen von Filopodien und ist an der Ausbildung des Filopodienspitzen-Komplex beteiligt (Schirenbeck et al., 2005). Aktuelle Modelle zur Filopodienbildung ziehen in Betracht, dass ein Gleichgewicht aus Filament-Nukleation, -Elongation, -Bündelung sowie Depolymerisation für deren Ausbildung essentiell ist. So wurde vermutet, dass dDia2 die Nukleation und DdVASP die Elongation filopodialer Filamente vermittelt. Diese Annahme wurden durch experimentelle Befunde gestützt, die zeigten, dass der Defekt VASP-defizienter Zellen bei der Filopodienbildung nicht durch die Expression des kompletten dDia2 revertiert werden konnte (Schirenbeck et al., 2005).



**Abbildung 61: Wiederherstellung der Filopodienbildung in VASP-null-Zellen durch GFP-dDia2 $\Delta$ DAD.** (A) Der Western Blot mit anti-GFP-Antikörpern gegen das Zelllysate der GFP-dDia2 $\Delta$ DAD-exprimierenden *Dictyostelium* VASP-null-Zellen detektiert das Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von ca. 145 kDa. M= Protein Marker. (B) Die GFP-dDia2 $\Delta$ DAD-exprimierenden VASP-null-Zellen waren wieder in der Lage Filopodien auszubilden und das konstitutiv aktive Formin konnte deutlich in den Filopodienspitzen lokalisiert werden (Pfeilspitzen). Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

Interessanterweise konnte im Säugersystem gezeigt werden, dass die Expression eines konstitutiv aktiven Formin Konstrukts (mDia2 $\Delta$ DAD) zu einer massiven Ausbildung von Filopodien-artigen Strukturen in Fibroblasten führte (Block et al., 2008). Diese Studie zeigte außerdem, dass diese Filopodien eine erhöhte Anzahl von Aktinfilamenten in der Spitzenregion enthielten, wodurch diese Strukturen keulenartig verdickt waren. Da Formine sowohl als Aktin Nukleatoren als auch als Elongatoren fungieren, sollte in dieser Arbeit

experimentell überprüft werden, ob durch Überexpression eines konstitutiv aktiven dDia2 $\Delta$ DAD-Konstrukts die Filopodienbildung in DdVASP-null-Zellen wiederherzustellen ist. Zur Untersuchung von dDia2 wurde der Vektor pDGFP-dDia2 $\Delta$ DAD (Deletion der AS 1020 bis 1087; von PD Dr. Faix zur Verfügung gestellt) für die Transformation in VASP-null-Zellen verwendet. Stabile Transformanten wurden nachfolgend im Hinblick auf die Lokalisation des GFP-dDia2 Konstrukts mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie untersucht (Abbildung 61). Trotz zahlreicher Ansätze, war die Anzahl GFP-dDia2 $\Delta$ DAD-exprimierender Zellen stets sehr gering. Aus diesem Grund beschränkte sich die Analyse zur Filopodienbildung durch dDia2 $\Delta$ DAD in VASP-null-Zellen lediglich auf die qualitative Beschreibung der Filopodien. Tatsächlich zeigten GFP-dDia2 $\Delta$ DAD-exprimierende Zellen eine vermehrte Filopodienbildung, wie sie in untransformierten DdVASP-null-Zellen nicht zu finden ist. Dabei lokalisierte GFP-dDia2 $\Delta$ DAD besonders markant in allen Spitzen der Filopodien. Dies lässt darauf schließen, dass die Expression des konstitutiv aktiven Formins den dominant-negativen Effekt der Deletion von DdVASP auf die Filopodienbildung kompensiert. Außerdem legt es den Verdacht nahe, dass dDia2 - wie die meisten anderen Formine - sowohl Aktinfilament-Elongations- als auch -Nukleationsaktivität besitzt.

## 5 Diskussion

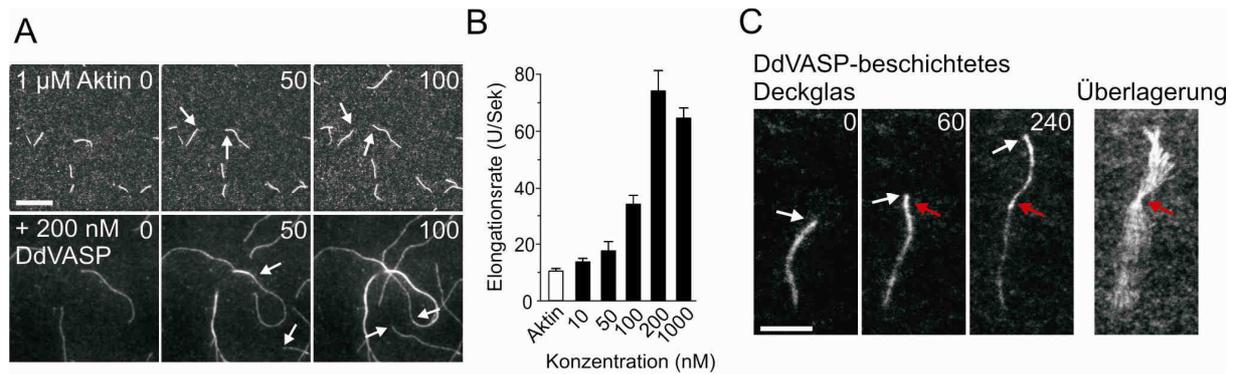
Die gerichtete Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin in der Front von Zellen und an der Oberfläche verschiedener intrazellulärer Pathogene wie *L. monocytogenes* ist essentiell für deren Motilität (Carlier und Pantaloni, 2007, Insall und Machesky, 2009, Pollard und Borisy, 2003, Rottner et al., 2005). Lange Zeit wurden diese Aktin-basierenden Prozesse durch das sogenannte *dendritic nucleation* Model beschrieben, bei dem nach Nukleation durch den Arp2/3-Komplex neue Aktinfilamente mit ihrem Plusende zur Plasmamembran gerichtet spontan wachsen, bis sie durch *Capping* Proteine verkappt werden (siehe Kapitel 1.7). Eine aktive Elongation der Filamente durch die später identifizierten Aktinfilament-Elongatoren – Formine und Ena/VASP Proteine – wurde in diesem Modell allerdings nicht berücksichtigt. Proteine der Ena/VASP Familie akkumulieren an Stellen der aktiven Aktinpolymerisation wie den Spitzen von Lamellipodien und Filopodien und interagieren über ihre WH2-verwandten Aktin-Bindungsmotive GAB und FAB direkt mit globulärem bzw. filamentösem Aktin (Ferron et al., 2007, Krause et al., 2003, Sechi und Wehland, 2004). Obwohl schon früh eine direkte Korrelation zwischen der Menge von VASP in der Zellfront und seiner Protrusionsrate beobachtet (Rottner et al., 1999) und theoretische Mechanismen einer aktiven VASP-vermittelten Aktinfilament-Elongation postuliert wurden (Chereau und Dominguez, 2006, Dickinson et al., 2002, Dickinson und Purich, 2002, Ferron et al., 2007), bestand lange Zeit eine Kontroverse bezüglich des molekularen Mechanismus der VASP-Aktin Interaktion und der Rolle von VASP bei der Zellmigration (Trichet et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl biochemische als auch zellbiologische Methoden im *Dictyostelium*-System verwendet um den Einfluss von VASP und seinen funktionellen Domänen auf die Aktinpolymerisation und den damit verknüpften zellulären Prozessen der Zellmigration, Phagozytose und Filopodienbildung zu analysieren.

### 5.1 Mechanismus der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation

Zur Analyse der Effekte von DdVASP und hVASP auf die spontane Aktinpolymerisation wurden Pyrene-Assays durchgeführt, mit denen die Zunahme an F-Aktin über die Zeit quantifiziert werden kann. Frühere Studien unter Verwendung dieser Methode zeigten, dass murines VASP (mVASP) Aktinfilamente abhängig von der verwendeten KCl-Konzentration unterschiedlich stark nukleiert (Bearer et al., 2000, Huttelmaier et al., 1999, Samarin et al.,

2003, Walders-Harbeck et al., 2002) und die Elongationsrate von Aktinfilamenten in Gegenwart von Profilin geringfügig erhöht (Barzik et al., 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass VASP die Aktinpolymerisation in Gegenwart von *Capping* Proteinen fördert, was letztlich wesentlich dazu beigetragen VASP als *anti-capping* Protein zu bezeichnen (Barzik et al., 2005, Bear et al., 2002). Im Laufe der letzten Jahre hat sich so die Annahme, dass VASP lediglich die Bindung von *Capping*-Proteinen an die Plusenden von Aktinfilamenten verhindert, weitgehend durchgesetzt, obwohl diese Wirkungsweise nach wie vor kontrovers diskutiert wurde (Bear und Gertler, 2009, Samarín et al., 2003, Schirenbeck et al., 2006, Trichet et al., 2008).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der VASP-Orthologe hVASP und DdVASP zeigten jedoch, dass beide Proteine die Aktinpolymerisation aktiv beeinflussen wobei sie die Filamentelongation allerdings unterschiedlich stark beschleunigen. Durch Pyrene-Assays mit F-Aktin *seeds* konnte gezeigt werden, dass DdVASP die Elongationsrate der Aktinfilamente um einen Faktor von 4,4 erhöht, während der Effekt von hVASP in diesem Assay nur knapp halb so groß war. Die Fähigkeit von VASP die Elongationsrate von Aktinfilamenten zu erhöhen lässt darauf schließen, dass das Protein mit dem Plusende des Filaments wechselwirkt und aktiv Aktinmonomere anfügt. Somit gehören Ena/VASP Proteine offensichtlich zur Gruppe der Aktinfilament-Elongatoren. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigten Proteine von meinem Arbeitskollegen Herrn Dennis Breitsprecher durch *Total Internal Reflection Fluorescence*-Assays (TIRF-Assays) zur Beobachtung des Wachstums einzelner Aktinfilamente verwendet (Amann und Pollard, 2001b, Breitsprecher et al., 2009, Kuhn und Pollard, 2005). Dazu wurden fluoreszenzmarkiertes, monomeres Aktin und verschiedene VASP-Deletionskonstrukte in Polymerisationspuffer gemischt, in eine mit NEM (N-ethyl-Maleimid)-inaktiviertem Myosin beschichtete Durchflusskammer überführt und die an der Deckglasoberfläche haftenden Filamente unter Verwendung eines TIRF-Mikroskops durch eine evaneszente Welle angeregt. So konnte der Einfluss von VASP auf das Wachstum einzelner durch Myosin an der Oberfläche des Deckgläschens verankerter Aktinfilamente mikroskopisch untersucht werden.



**Abbildung 62: In vitro TIRF Mikroskopie der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation in Lösung.** (A) Polymerisation von 1,3 µM Aktin (30% Alexa 488-markiert) in Gegenwart und Abwesenheit von 200 nM DdVASP. (B) Konzentrationsabhängige Erhöhung der Elongationsrate von Aktinfilamenten durch DdVASP. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. (C) Immobilisiertes DdVASP bindet Plusenden von Filamenten und bleibt anschließend an der Seite des Filaments gebunden. Zeit ist in Sekunden angegeben. Skala = 5 µm.

Diese Untersuchungen ergaben, dass DdVASP die Elongationsrate einzelner Filamente von 10 Untereinheiten/Sek konzentrationsabhängig auf einen Wert von bis zu 70 Untereinheiten/Sek erhöht (Abbildung 62A und B, Breitsprecher et al., 2008). Die einzigen weiteren bekannten Proteine, die eine Beschleunigung des Filamentwachstums hervorrufen sind Formine, die prozessiv mit dem wachsenden Plusende des Filaments verbunden bleiben und Profilin-Aktin für die Filamentelongation rekrutieren (Kovar und Pollard, 2004b, Kovar, 2006). Frühere theoretische Modelle der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation gingen auch von einem prozessiven Elongationsmechanismus dieses Proteins aus (Dickinson, 2009, Ferron et al., 2007). Eine prozessive Assoziation von VASP mit dem Plusende konnte in TIRF-Assays jedoch nicht beobachtet werden, da die Beschleunigung der Filamentelongation zum einen konzentrationsabhängig war, und da zum anderen immobilisierte VASP-Moleküle auf der Deckglasoberfläche zwar die Plusenden von Filamenten banden, anschließend jedoch nicht prozessiv mit dem wachsenden Ende assoziiert waren, sondern lediglich an der Seite des Filaments haften blieben (Abbildung 62C). Somit bindet VASP vermutlich das Plusende des wachsenden Filaments, überträgt seine gebundenen Aktinmonomere, was zu beschleunigtem Wachstum führt, und bleibt anschließend an der Seite des Filaments gebunden, was unter anderem auch die Bündelung von Aktinfilamenten hervorruft. In Übereinstimmung mit diesem hypothetischen Mechanismus war die Beschleunigung der Aktinpolymerisation von der eingesetzten VASP-Konzentration abhängig. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien (Barzik et al., 2005, Bear et al., 2002) konnte keine sogenannte *Anti-capping* Aktivität von VASP in Gegenwart

von CapZ oder Cap32/34 in Pyrene- (Schirenbeck et al., 2006) oder TIRF-Assays (Breitsprecher et al., 2008) beobachtet werden. Der Grund für diese unterschiedlichen Befunde ist jedoch unklar.

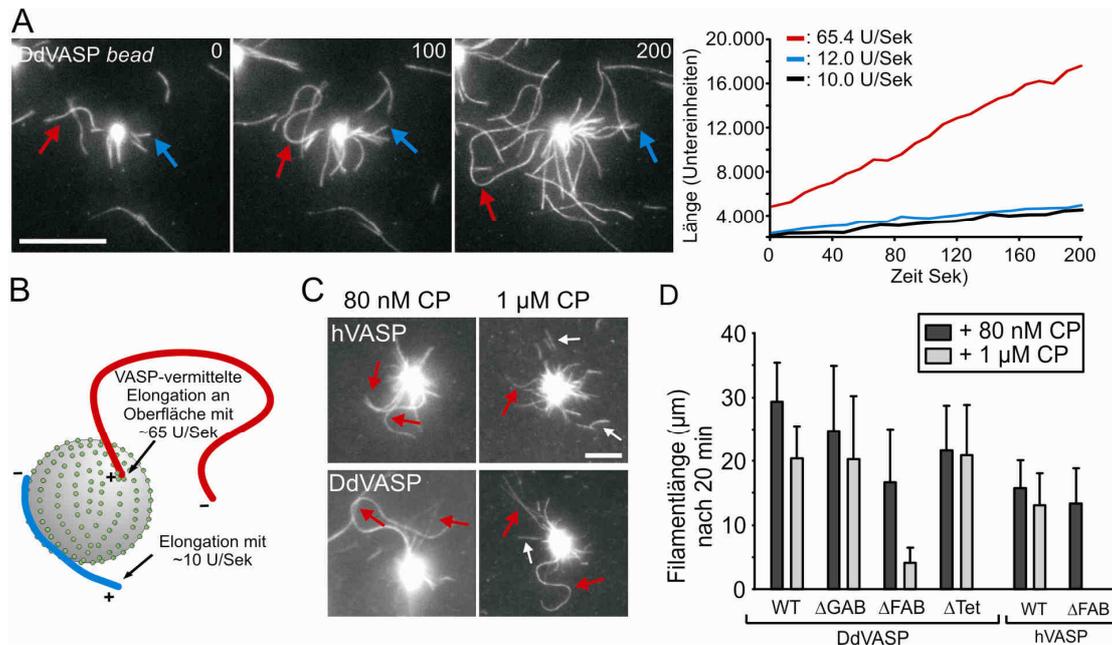
Die Analyse des Filamentwachstums in Gegenwart von hVASP ergab ebenfalls eine konzentrationsabhängige Beschleunigung mit einer maximalen Elongationsrate von etwa 20 Untereinheiten/Sek, was die durch Pyrene-Assays ermittelte geringere Aktivität dieses Orthologs bestätigt. Der Grund für diese geringere Aktivität ist vermutlich die niedrige Aktin-Affinität der GAB aus hVASP. Die Dissoziationskonstanten der GAB-Aktin Wechselwirkung wurden durch analytische Ultrazentrifugation mit GFP-Fusionspeptiden ermittelt und zeigten tatsächlich, dass das humane GAB-Motiv mit einer Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) von lediglich 22  $\mu\text{M}$  in G-Puffer um drei Größenordnungen schwächer an Aktin bindet als das DdGAB-Motiv mit einer  $K_D$  von 12 nM. Die einfachste Erklärung für die unterschiedlichen Elongationsraten der VASP Orthologe ist somit durch der Sättigung des VASP-Tetramers mit Aktin erklärbar: Während DdVASP unter den verwendeten *in vitro* Bedingungen von 1-4  $\mu\text{M}$  Aktin vollständig mit Aktin gesättigt ist, beträgt der Sättigungsgrad von hVASP lediglich etwa 10%. Dies führt dementsprechend zu einer langsameren Elongationsrate nach Bindung von hVASP an das Plusende des Filaments und Übertragung seiner gebundenen Monomere. Aufgrund der hohen Affinität zu G-Aktin führte ein Überschuss an DdVASP in Pyrene-Assays zu einer Reduktion der Aktinpolymerisation, während hVASP unter diesen Bedingungen keinen Effekt hatte. Tatsächlich zeigten Analysen von chimären VASP Proteinen mit WH2-Motiven mit unterschiedlichen Aktin Affinitäten, dass die Elongationsrate direkt mit der Aktin Affinität der WH2-Motive korreliert (Breitsprecher et al., Manuskript in Vorbereitung).

Diese Entdeckung trägt wesentlich zur Klärung der lang anhaltenden Kontroverse bei, ob VASP aus Vertebraten die Aktinpolymerisation beschleunigt oder nicht (Trichet et al., 2008). Da die G-Aktin Affinität von humanem VASP ausgesprochen gering ist und hier und in einer anderen Studie gezeigt wurde (Huttelmaier et al., 1999), dass die VASP-vermittelte Aktinpolymerisation stark von der Salzkonzentration abhängig ist, ist es nicht verwunderlich, dass in *in vitro* Experimenten mit niedrigen Aktin- und hohen KCl-Konzentrationen keine Effekte von VASP auf die Elongation detektiert werden konnten (Barzik et al., 2005, Bear et al., 2002). Unter Berücksichtigung der sehr hohen zellulären Konzentration von G-Aktin im Bereich von 150  $\mu\text{M}$  (Koestler et al., 2008) ist es jedoch naheliegend, dass hVASP *in vivo* ebenfalls ein effektiver Filamentelongator ist.

Um die erforderlichen Bereiche für schnelles Filamentwachstum von VASP zu identifizieren, wurden DdVASP Mutanten in Polymerisationsassays getestet, bei denen die funktionellen Motive GAB, FAB und Tet fehlten. Mutante DdVASP $\Delta$ FAB zeigte nahezu identische Eigenschaften wie DdVASP-WT, hatte allerdings – wie zuvor von Schirenbeck et al. (2006) mit *low speed* Sedimentationsexperimenten gezeigt – die Fähigkeit zur Bündelung von

Aktinfilamenten verloren (Schirenbeck et al., 2006). Diese Effekte konnten durch TIRF-Assays verifiziert werden, und sind konsistent mit Analysen von Bachmann et al. (1999) mit VASP aus Vertebraten (Bachmann et al., 1999). Mutante DdVASP $\Delta$ GAB vermittelte überraschenderweise ebenfalls eine beschleunigte Filamentelongation und war nach wie vor in der Lage Aktinfilamente zu bündeln, was darauf schließen lässt, dass sowohl das FAB- als auch das GAB-Motiv von DdVASP in der Lage sind, monomeres Aktin für die Filamentelongation zu rekrutieren, während die F-Aktin Bindung und Bündelung offensichtlich dem FAB-Motiv vorbehalten bleibt. Konsistent mit diesen Annahmen führte erst die gleichzeitige Deletion beider Aktin-Bindungsmotive sowohl in Pyrene- als auch in TIRF-Assays zum kompletten Verlust der Elongationsaktivität (Breitsprecher et al., 2008). Eine starke Reduktion der Elongationsaktivität war bei Mutante DdVASP $\Delta$ Tet zu beobachten. Hier war der Einfluss auf die Aktinpolymerisation in Pyrene-Assays und auch in TIRF-Assays mit einer Elongationsrate von nur etwa 18 Untereinheiten/Sek wesentlich geringer als beim Wildtyp Protein. Dies lässt darauf schließen, dass die Beschleunigung des Filamentwachstums, wie bereits zuvor vermutet, durch eine Bindung des VASP-Tetramers an das Filament Plusende und Übertragung der seiner gebundenen Aktin-Monomere erzeugt wird. Im Falle der monomeren  $\Delta$ Tet Mutante würde so die Beschleunigung der Elongation entsprechend geringer ausfallen.

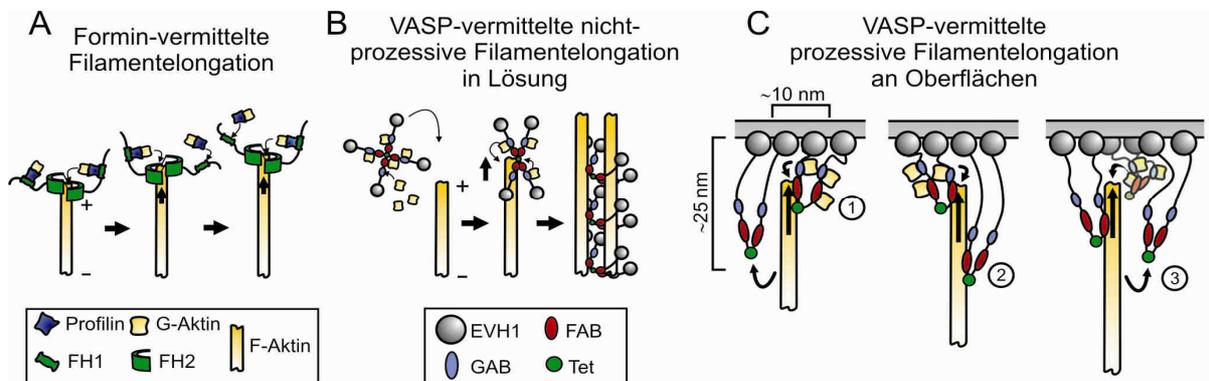
Entscheidend für die Aufklärung des grundlegenden Mechanismus der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation waren TIRF-Assays mit VASP-beschichteten Polystyren-*beads* unter Verwendung der in dieser Arbeit aufgereinigten DdVASP-Deletionsmutanten. Während Untersuchungen der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation durch Pyrene-Assays in der Vergangenheit zu widersprüchlichen Ergebnissen des Einflusses von VASP auf die Filamentelongation und seine Wechselwirkung mit dem Plusende des Aktinfilaments führten (Barzik et al., 2005, Bear et al., 2002, Huttelmaier et al., 1999, Samarin et al., 2003, Schirenbeck et al., 2006), konnte hier erstmals gezeigt werden, dass VASP nach dichter Zusammenlagerung an Oberflächen prozessiv Aktinfilamente elongierte. Bemerkenswerterweise konnte diese prozessive Filamentelongation selbst durch hohe Konzentrationen an *Capping* Protein nicht inhibiert werden (Abbildung 63, Breitsprecher et al., 2008). Die Analysen der Deletionsmutanten zeigten zum einen, dass Mutante DdVASP $\Delta$ Tet im Gegensatz zu den Experimenten mit VASP in Lösung ähnlich schnelle Elongationsraten wie DdVASP-WT erzeugte, und dass zum anderen das FAB-Motiv essentiell für die *Capping* Protein-Resistenz der prozessiven, VASP-vermittelten Aktinpolymerisation ist (Abbildung 63D).



**Abbildung 63: *In vitro* TIRF Mikroskopie der VASP-vermittelten prozessiven Aktinpolymerisation an Oberflächen.** (A) Polymerisation von 1 μM Aktin (30% Alexa 488-markiert) an DdVASP-bedeckten *beads*. Rote Pfeile markieren prozessiv elongierte Filamente, blaue Pfeile markieren interne Aktinkontrollen. Zeit ist in Sekunden angegeben. Skala = 10 μm. (B) Schema der prozessiven Filamentelongation an DdVASP-beschichteten *beads*. (C) Prozessive VASP-vermittelte Filamentelongation kann nicht durch *Capping* Proteine inhibiert werden. Skala = 5 μm. (D) Mutante DdVASP $\Delta$ FAB kann keine Filamentelongation in Gegenwart von *Capping* Proteinen vermitteln. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit in Kombination mit den Resultaten aus TIRF-Assays erlauben die Formulierung eines allgemeinen Mechanismus der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation in Lösung und an Oberflächen, der sich deutlich von dem der bereits gut charakterisierten Formine unterscheidet (Breitsprecher et al., 2008). Letztere bleiben sowohl in Lösung als auch an Oberflächen prozessiv mit dem Plusende des Filaments durch ihre dimere FH2-Domäne verbunden und benötigen Profilin-Aktin-Komplexe für eine beschleunigte Filamentelongation, da sie monomeres Aktin nicht direkt binden können (Abbildung 64A; Kovar und Pollard, 2004b, Kovar, 2006, Paul und Pollard, 2009b, Pring et al., 2003, Romero et al., 2004). Im Gegensatz dazu bindet VASP in Lösung das Plusende des Filaments transient, überträgt seine über die GAB- und FAB-Motive gebundenen Aktin Monomere und bleibt anschließend an der Seite des Filaments gebunden, was zu einer Bündelung von Aktinfilamenten *in vitro* führt (Abbildung 64). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass 1) die Filamentelongation von der VASP-Konzentration abhängt und nicht durch *Capping* Proteine inhibiert werden kann (Breitsprecher et al., 2008), 2) die Deletion

des Tet-Motivs eine starke Reduktion der Elongationsgeschwindigkeit hervorruft (Kapitel 4.2.2.5, Breitsprecher et al., 2008 und 3) die Elongationsraten der DdVASP- und hVASP vermittelten Aktinpolymerisation mit der Aktin-Affinität der GAB zusammenhängen (Kapitel 4.2.2.7; Breitsprecher et al., Manuskript in Vorbereitung).



**Abbildung 64: Mechanismus der VASP-vermittelten Filamentelongation.** (A) Formin Dimere sind während des Filamentwachstums durch ihre FH2-Domäne mit dem Plusende des Aktinfilaments verbunden, während Profilin-Aktin-Komplexe über die FH1-Domänen rekrutiert und über die FH2-Domäne in das Filament inkorporiert werden. (B) VASP in Lösung bindet das Filament Plusende, überträgt seine gebundenen Aktin-Monomere und bleibt an der Seite des Filaments gebunden, was zur Bündelung mehrere Filamente führen kann. (C) An Oberflächen zusammengelagertes VASP kann Aktinfilamente prozessiv elongieren. Nach Bindung des Plusendes und Übertragung von Aktin Monomeren (1) verbleibt es zunächst an der Seite des Filaments gebunden (2), bis es letztlich wieder abgelöst wird und einen neuen Elongationszyklus starten kann (3). Zur Vereinfachung ist VASP hier als Dimer dargestellt.

Die Zusammenlagerung von VASP an Oberflächen löst hingegen prozessives Filamentwachstum aus, bei dem das Plusende des wachsenden Filaments kontinuierlich mit einem oder mehreren VASP Molekülen verbunden ist (Breitsprecher et al., 2008). Dabei ist der erste Schritt des Elongationszyklus vermutlich identisch mit der Situation in Lösung: VASP bindet das Plusende des Filaments, überträgt seine Aktin Monomere und bleibt anschließend mit der Seite des Filaments verbunden. Im Gegensatz zu der Situation in Lösung muss sich jedoch bei fortschreitender Elongation durch benachbarte VASP Proteine diese Seitenbindung auflösen, woraufhin das zuvor gebundene VASP Protein wieder für die Elongation des Plusendes zur Verfügung steht (Abbildung 64C).

Interessanterweise wird durch die Zusammenlagerung von VASP an Oberflächen die verminderte Elongationsaktivität der Mutante DdVASP $\Delta$ Tet kompensiert, was darauf schließen lässt dass mehrere VASP Moleküle am Elongationsmechanismus beteiligt sind.

Dementsprechend wurde in Experimenten mit *Listerien* beobachtet, dass eine  $\Delta$ Tet-Mutante in der Lage war die Motilität dieser intrazellulären Pathogene in MV<sup>D7</sup>-Zellen wie das Wildtyp-Protein vollständig wiederherzustellen (Geese et al., 2002). Mutante DdVASP $\Delta$ FAB, die sowohl in Pyrene-Assays als auch im TIRF-Assay nahezu identische Elongationsaktivitäten wie DdVASP-WT zeigte, konnte im Gegensatz zu allen anderen Mutanten keine prozessive Filamentelongation in Gegenwart von *Capping* Proteinen vermitteln. Das FAB-Motiv scheint somit für die *Capping* Protein Resistenz der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation essentiell zu sein. Ähnliche Effekte wurden für mVASP $\Delta$ FAB in Pyrene-Assays beobachtet (Barzik et al., 2005), wobei aufgrund der unterschiedlichen Elongationsmechanismen in Lösung und an Oberflächen fraglich ist, ob eine *Capping* Protein-Resistenz durch Pyrene-Assays überhaupt effektiv nachweisbar ist.

## 5.2 Die Rolle von VASP bei Aktin-basierenden Prozessen in *Dictyostelium*

### 5.2.1 Einfluss von DdVASP auf die Zellmigration

Eukaryotische Zellen nutzen die Polymerisation von Aktin um ihre Plasmamembran auszustülpen und sich so zielgerichtet fortzubewegen. Proteine der Ena/VASP Familie lokalisieren in der Front von migrierenden Zellen und tragen zur schnellen Protrusion des Lamellipodiums bei (Bear et al., 2000, Bear et al., 2002, Rottner et al., 1999). Die Ergebnisse der biochemischen Analysen von VASP auf die Aktinpolymerisation in dieser Arbeit und in Breitsprecher et al. (2008) lassen vermuten, dass Ena/VASP Proteine Aktinfilamente in der Zellfront aktiv elongieren und so die Ausstülpung der Plasmamembran induzieren (Breitsprecher et al., 2008). Dementsprechend führte die Deletion des einzigen *vasP*-Gens in *Dictyostelium* zu einer Verminderung der Migrationsgeschwindigkeit der Zellen. Der vorab publizierte Defekt der Zellmotilität von VASP-null Zellen während der Chemotaxis in einem cAMP-Gradienten (Han et al., 2002) ist somit vermutlich nicht auf eine spezifische Störung in der Detektion des Lockstoffes durch die Zellen zurückzuführen, sondern ist aller Wahrscheinlichkeit nach durch die gestörte Assemblierung von Aktin unterhalb der Plasmamembran erklärbar. Konsistent damit wurden die Ergebnisse derselben Gruppe zwischenzeitlich revidiert, da in einer aktuellen Studie ebenfalls eine Verlangsamung der ungerichteten Migration durch die Deletion des *vasP*-Gens beschrieben wurde (Lin et al., 2010).

Die Analyse der Effekte von Ena/VASP Proteinen in Säugerzellen ist generell schwieriger als in *Dictyostelium*, da die drei exprimierten Isoformen Mena, EVL und VASP überlappende Funktionen besitzen (Sechi und Wehland, 2004). Zellbiologische Studien zur Auswirkung der Depletion oder Deletion von Ena/VASP Proteinen wurden deshalb meist durch Mislokalisierung von Ena/VASP an Mitochondrien oder durch Verwendung von MV<sup>D7</sup>-Fibroblasten, in denen Mena und VASP ausgeschaltet waren, durchgeführt (Bear et al., 2000, Bear et al., 2002, Loureiro et al., 2002). Überraschenderweise zeigt die Depletion von VASP in der Zellfront von Fibroblasten – im Gegensatz zu *Dictyostelium* – einen positiven Effekt auf die Zellmigration: Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von Rat2-Fibroblasten stieg nach Expression eines an Mitochondrien lokalisierenden VASP-Konstrukts von 0,5 auf etwa 1  $\mu\text{m}/\text{min}$ , während eine Überexpression von VASP in MV<sup>D7</sup>-Zellen zu einer dramatischen Verringerung der Zellmotilität führte (Bear et al., 2000). Interessanterweise erhöht die Expression von VASP jedoch die Protrusionsrate des Lamellipodiums (Bear et al., 2002, Rottner et al., 1999), was in Säugern jedoch offensichtlich nicht direkt mit der Migrationsgeschwindigkeit der Zellen korreliert. Dieser Gegensatz zu den Ergebnissen aus Experimenten mit *Dictyostelium* ist vermutlich auf die großen Unterschiede der Modellsysteme – Fibroblasten und *Dictyostelium* – zurückzuführen, und weniger auf fundamentale Unterschiede der Einflüsse von mVASP und DdVASP auf das Aktin-Zytoskeletts. Zwar besitzen DdVASP und mVASP unterschiedliche Aktivitäten betreffend ihrer Fähigkeit die Elongationsrate von Aktinfilamenten *in vitro* zu erhöhen, jedoch scheint dieser Effekt lediglich auf ihre unterschiedlichen Aktin-Affinitäten zurückzuführen zu sein. Die generellen biochemischen Aktivitäten von DdVASP und mVASP – nämlich die Beschleunigung der Filamentelongation, Bündelung von Aktin zu Filamenten und Vermittlung von prozessivem Filamentwachstum in Gegenwart von *Capping* Proteinen (Breitsprecher et al., 2008) – sind bei beiden Proteinen identisch.

Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Arbeit ist die Unfähigkeit der Mutante DdVASP $\Delta$ FAB an der Plasmamembran der Zellfront zu lokalisieren und die Migrationsgeschwindigkeit in VASP-null-Zellen wiederherzustellen. Generell wird angenommen, dass die Lokalisation von Ena/VASP Proteinen durch EVH1-bindende Proteine wie beispielweise Zyxin oder Lamellipodin vermittelt wird (Boeda et al., 2007, Jenzora et al., 2006, Krause et al., 2004, Reinhard et al., 1996). Die diffuse Lokalisation von DdVASP $\Delta$ FAB lässt jedoch darauf schließen, dass für die Lokalisation von VASP an die Plasmamembran zudem eine permanente Assoziation des Proteins mit den Plusenden der Aktinfilamente notwendig ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die biochemischen Analysen der DdVASP $\Delta$ FAB Mutante (Breitsprecher et al., 2008) deuten darauf hin, dass im Pseudopodium von DdVASP $\Delta$ FAB-exprimierenden Zellen keine VASP-vermittelte

Aktinpolymerisation mehr stattfinden kann, da das Filamentwachstum durch *Capping* Proteine inhibiert wird. Diese Ergebnisse aus dem *Dictyostelium*-System stimmen mit Studien unter Verwendung einer Mena $\Delta$ FAB-Mutante in MV<sup>D7</sup>-Zellen überein, die ebenfalls nicht an der Zellfront lokalisiert (Bear et al., 2002). Allerdings konnte eine essentielle Rolle der FAB bei der Lokalisation von hVASP in MV<sup>D7</sup>-Zellen nicht nachgewiesen werden (Schirenbeck et al., 2006). Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf die Bildung von Heterotetrameren mit EVL in MV<sup>D7</sup>-Zellen zurückzuführen sein. Um diese Diskrepanzen im Säuger-System zu klären, wären beispielsweise eine zusätzliche Geninaktivierung von EVL durch RNAi in MV<sup>D7</sup>-Zellen und anschließende Lokalisationsstudien von Nöten.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass DdVASP offenbar direkt für die Polymerisation von Aktinfilamenten in der Zellfront in Gegenwart von *Capping* Proteinen und damit für die Zellmigration verantwortlich ist, wobei die Lokalisation des Proteins an die Membran vermutlich sowohl über die Interaktion der EVH1-Domäne mit FP<sub>4</sub>-enthaltenden Liganden sowie der EVH2-Domäne mit Aktinfilament-Plusenden bestimmt wird. Außerdem scheinen die Funktionen von Ena/VASP Proteinen spezieübergreifend konserviert zu sein.

## 5.2.2 Die Rolle von VASP bei der Phagozytose

Die Phagozytose beschreibt die Aufnahme von Partikeln durch Ausbildung einer Membranausstülpung (*phagocytic cup*), welche die Partikel umschließt und so deren Internalisierung bewerkstelligt. *Dictyostelium*-Zellen sind professionelle Phagozyten, deren phagozytotische Eigenschaften denen der Makrophagen ähneln (Bozzaro et al., 2008). Die Ausbildung des phagozytotischen Kelchs wird dabei durch die Aktinpolymerisation vorangetrieben, und benötigt sowohl in Säugern als auch in *Dictyostelium* die Nukleationsaktivität des Arp2/3-Komplexes (Insall et al., 2001, May et al., 2000, Swanson, 2008). Eine potentielle Rolle von Ena/VASP Proteinen bei diesem Prozess wurde jedoch bisher nicht untersucht. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass murines VASP auch an der Plasmamembran des phagozytotischen Kelchs lokalisiert (Castellano et al., 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass VASP ähnlich wie in der lamellipodialen Front auch in phagozytotischen Kelchen die Aktinpolymerisation beschleunigt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die phagozytotische Aufnahme von Hefezellen in VASP-null-Zellen signifikant langsamer als in Wildtyp-Zellen ablief, jedoch nicht vollständig inhibiert war. Interessanterweise war neben der Geschwindigkeit auch die Häufigkeit von Phagozytoseprozessen in VASP-null-Zellen reduziert, und es konnte häufig beobachtet werden, dass bereits initiierte Phagozytoseprozesse abgebrochen wurden und

die Hefezellen sich wieder von der Plasmamembran des phagozytotischen Kelchs lösten. Diese Befunde könnten auf die insgesamt niedrigere Adhäsivität von VASP-null-Zellen zurückgeführt werden, die durch RICM-Mikroskopie bestätigt wurde. Die geringere Adhäsivität von VASP-null-Zellen könnte auf eine fehlerhafte Rekrutierung von Myosin VII, Talin oder SibA zurückzuführen sein.

Diesen Proteinen werden wichtige Funktionen bei der Ausbildung von Zell-Substrat Kontakten und der Phagozytose zugesprochen (Cornillon et al., 2006, Lim et al., 2007, Niewohner et al., 1997, Titus, 1999, Tokuo und Ikebe, 2004). Da VASP einen wichtigen Bestandteil der Proteinkomplexe der fokalen Kontakte darstellt (Sechi und Wehland, 2004) und direkt mit Myosin VII (bzw. Myosin X in Säugern) wechselwirkt, scheint es möglich, dass die Deletion von VASP die Rekrutierung dieser Proteine beeinflusst und so die Ausbildung von Zell-Substrat Kontakten stört. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Deletion des Formins dDia2 zu einer verringerten Adhäsivität von *Dictyostelium* Zellen führte (Schirenbeck et al., 2005). Da dDia2 und VASP direkt miteinander interagieren (Schirenbeck et al., 2006) ist denkbar, dass das Zusammenspiel beider Proteine eine zentrale Rolle bei der Zelladhäsion spielt.

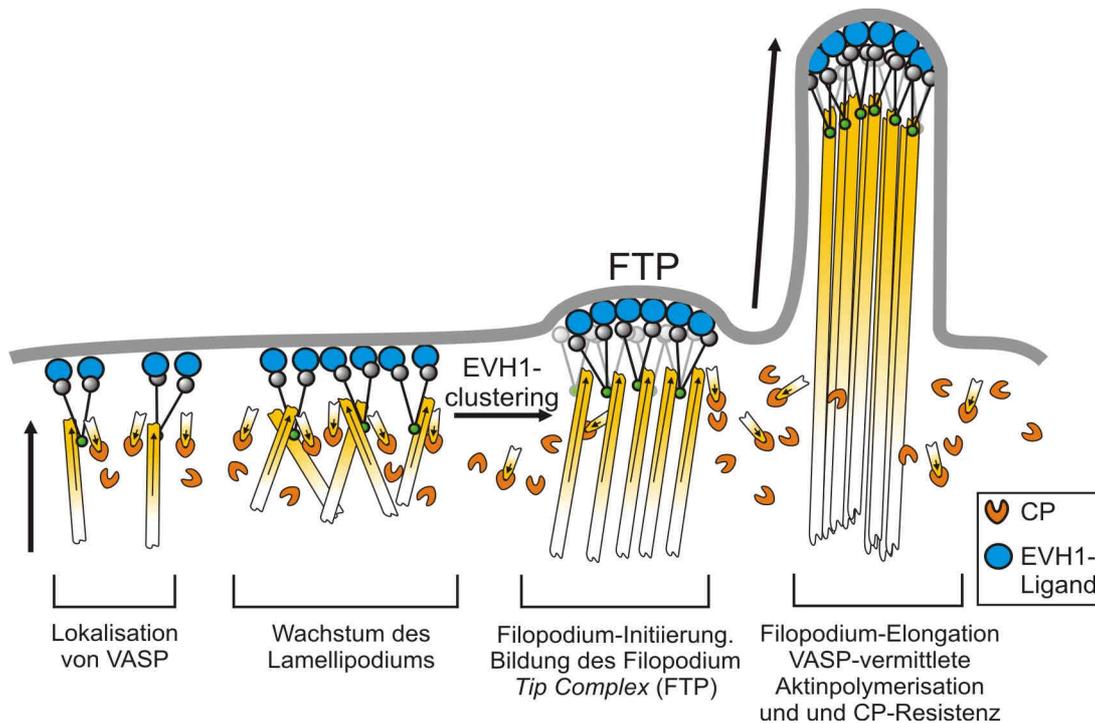
### 5.2.3 Einfluss von DdVASP auf die Filopodienbildung

Neben ihrer Rolle bei der Zellmigration sind Proteine der Ena/VASP-Familie bei der Ausbildung von Filopodien beteiligt und lokalisieren stark in deren Spitzen (Rottner et al., 1999, Sechi und Wehland, 2004). Der molekulare Mechanismus, der letztlich zur Filopodiumbildung führt, und die Rolle von Ena/VASP Proteinen bei diesem Prozess werden allerdings noch immer sehr kontrovers diskutiert (Bear und Gertler, 2009, Faix et al., 2009). Fest steht, dass Proteine der Ena/VASP Familie bei der Initiierung und Verlängerung von Filopodien tragende Rollen einnehmen (Dent et al., 2007, Han et al., 2002, Kwiatkowski et al., 2007, Schirenbeck et al., 2006).

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass VASP bei der Ausbildung von Filopodien in *Dictyostelium* eine Schlüsselrolle spielt, und dass das FAB-Motiv von VASP hierbei eine essentielle Funktion ausübt. Während in einer vorangegangenen Studie vermutet wurde, dass die FAB für die transiente Bündelung der filopodialen Aktinfilamente zuständig ist (Schirenbeck et al., 2006), legen *in vitro* Experimente mit der Mutante DdVASP $\Delta$ FAB nun vielmehr nahe, dass nicht dessen fehlende Bündelungsaktivität für die Defekte in der Filopodienbildung verantwortlich ist, sondern in erster Linie seine fehlende Resistenz gegenüber *Capping* Proteinen (siehe oben, Breitsprecher et al., 2008). Ob die Aktinfilament-

Bündelung durch VASP *in vivo* Relevanz besitzt oder ob es sich dabei lediglich um einen *in vitro* beobachtbaren Nebeneffekt aufgrund der F-Aktin Bindung handelt, ist bislang unklar. Zur Klärung dieser Frage wären *in vivo* Experimente mit einer VASP $\Delta$ Tet-Deletionsmutante nötig, welche ebenfalls keine Bündelungsaktivität besitzt, was allerdings aufgrund der schnellen Degradation dieses Proteins in *Dictyostelium* im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Möglicherweise könnte die Quervernetzung von Aktinfilamenten durch VASP überdies bei der Ausbildung von Stressfasern eine Rolle spielen, allerdings sind die Effekte von VASP auf diese Strukturen weitestgehend unbekannt.

In Filopodien spitzen scheint VASP vor allem die schnelle Aktinfilamentelongation während der Filopodien-Bildung zu vermitteln. Diese Funktion von VASP unterscheidet sich daher erheblich von der im *convergent elongation* Modell (Svitkina et al., 2003) postulierten Aufgabe als *Anti-Capper*. Nachfolgende Arbeiten aus demselben Labor deuteten bereits darauf hin, dass Ena/VASP Proteine nicht ausschließlich als *Anti-Capping* Proteine fungierten, sondern auch unabhängige Funktionen bei der Filopodienbildung besitzen (Applewhite et al., 2007). Die Daten aus den *in vivo* Studien sowie den *in vitro* Experimenten dieser Arbeit und aus Breitsprecher et al. (2008) zeigen (Breitsprecher et al., 2008), dass DdVASP ein potenter Filamentelongator ist, und erlauben die Formulierung eines allgemeinen Mechanismus der VASP-vermittelten Filopodienelongation (Abbildung 65): Während des Lamellipodienwachstums ist VASP an der Plasmamembran der Zellfront über EVH1-Liganden wie Lamellipodin (Krause et al., 2004) oder Abi1 (Dittrich et al., 2010) sowie an Aktinfilamente gebunden und gleichmäßig verteilt. Intrazelluläre Signale zur Filopodienbildung führen dann zur Ausbildung eines Filopodium *Tip Complexes* (FTP), in welchem membranständiges VASP massiv akkumuliert (*clustering*) wird. Der Mechanismus dieser Zusammenlagerung und die molekulare Zusammensetzung dieses Komplexes sind allerdings noch unklar. Durch Formin-vermittelte Filamentnukleation (Block et al., 2008, Schirenbeck et al., 2005) und Membranausstülpung durch membranbindende Proteine mit sogenannten IMD-Domänen (IRS<sub>p53</sub> (*insulin receptor tyrosine kinase substrate p53*)/MIM (*missing in metastasis*) homology domain; Yamagishi et al., 2004) im FTP wird letztlich das Filopodiumwachstum initiiert, und die Filamente in Gegenwart von *Capping* Proteinen durch Formine und/oder Ena/VASP Proteine schnell elongiert. Je nach Zelltyp werden die so entstandenen Aktinbündel durch unterschiedliche Aktin-Bündelungsproteine wie Fascin oder Fimbrin zusätzlich versteift (Faix et al., 2009).



**Abbildung 65: Mechanismus der VASP-vermittelten Filopodienbildung.** VASP Proteine werden im FTP dicht aneinandergelagert und elongieren vermutlich im Zusammenspiel mit Forminen Aktinfilamente in Gegenwart von Capping-Proteinen. Die durch die gerichtete Aktinpolymerisation ausgeübte Kraft ist groß genug um die Membran nach außen zu stülpen, was schließlich zur Ausbildung von Filopodien führt.

Dieses aktuelle Modell der Filopodienbildung unterscheidet sich in wichtigen Aspekten von dem postulierten *convergent elongation* Modell (Svitkina et al., 2003). In diesem Modell wurde davon ausgegangen, dass durch den Arp2/3-Komplex nukleierte Aktinfilamente im Lamellipodium unabdingbare Vorläufer von Filopodien sind. Zahlreiche zellbiologische Untersuchungen konnten allerdings bereits zeigen, dass die Bildung von Filopodien in Zellen mit unterdrückten Lamellipodien nicht beeinträchtigt war (Gomez et al., 2007, Nicholson-Dykstra und Higgs, 2008, Nobes und Hall, 1995, Sarmiento et al., 2008, Steffen et al., 2006, Vidali et al., 2006). Hingegen scheint die Nukleation von filopodialen Filamenten vielmehr auf der Aktivität von Forminen zu beruhen, da einige Vertreter dieser Proteinfamilie im FTP lokalisieren, konstitutiv-aktive Varianten eine starke Bildung von Filopodien hervorrufen, und vor allem, weil die Eliminierung von dDia2 zu einer drastischen Abnahme von Filopodien in *Dictyostelium*-Zellen führte (Block et al., 2008, Schirenbeck et al., 2005, Yang et al., 2007). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Filopodienbildung in VASP-null-Zellen durch Überexpression einer konstitutiv-aktiven Variante des Formins dDia2 (dDia2 $\Delta$ DAD) wiederhergestellt werden konnte. In einer früheren Arbeit wurde mit *Yeast-two-*

*Hybrid* Analysen gezeigt, dass dDia2 mit der EVH2-Domäne aus DdVASP interagiert (Schirenbeck et al., 2006). Hieraus ergibt sich die interessante Möglichkeit, dass Formine Aktinfilamente nukleieren, während VASP diese anschließend elongieren (Faix et al., 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten außerdem darauf hin, dass auch das Formin dDia2 zur Aktinfilament Elongation in Filopodien beitragen kann. Aufgrund der in den Pyrene-Assays beobachtbaren sehr schwachen Nukleationsaktivität von DdVASP kann davon ausgegangen werden, dass dieses Protein *in vivo* nicht zur Nukleation neuer Filamente beiträgt und zusätzliche Faktoren zur effektiven Filamentbildung benötigt.

Die konservierte Funktion von Ena/VASP Proteinen konnte in dieser Arbeit zusätzlich durch die Expression von GFP-mVASP in *Dictyostelium* VASP-null-Zellen bestätigt werden. mVASP akkumulierte dabei wie DdVASP an der Zellfront der migrierenden Zellen und war in der Lage, die Filopodienbildung größtenteils wiederherzustellen. Dieses Ergebnis ist insofern erstaunlich, als dass offensichtlich wenige spezifische Regulatoren der VASP Aktivität –zum Beispiel spezialisierte Kinasen oder GTPasen – für dessen Lokalisation und Funktion *in vivo* benötigt werden. Zwar konnte gezeigt werden, dass PKA und PKG die mVASP-Aktivität modulieren (Benz et al., 2009, Comer et al., 1998, Lambrechts et al., 2000, Lindsay et al., 2007), allerdings ist diese Regulation weit weniger strikt als beispielsweise bei Forminen, die intrinsisch inaktiv vorliegen und erst durch spezifische GTPasen aktiviert werden müssen (Faix und Grosse, 2006). Vielmehr scheint es, dass die Aktivität von VASP hauptsächlich über seine zeitliche und räumliche Lokalisation durch Rekrutierung über Interaktionspartner gesteuert wird, während Phosphorylierung oder allosterische Modifikationen nur einen vergleichsweise geringen Anteil an der Regulation haben. Die korrekte Lokalisation von mVASP in Filopodien und der Front von *Dictyostelium*-Zellen deutet außerdem darauf hin, dass lediglich die Interaktion der EVH1-Domäne mit ihren Liganden (deren FP<sub>4</sub>-Motive in der Regel hochkonserviert sind) und die Interaktion mit Aktin für die Funktion von VASP essentiell sind.

Natürlich stellt sich hier die Frage, ob mVASP noch eine potentielle Interaktion mit dDia2 eingehen kann, und ob diese Interaktion wichtig für den Prozess der Filopodienbildung ist. Hier hat für zukünftige Arbeiten vor allem die Herstellung einer stabilen Transformante der GFP-mVASP-exprimierenden Zellen Priorität, um detailliertere Analysen zur Filopodienprotrusion und Zellmigration dieser Zellen durchführen zu können. Weiterführende biochemische Untersuchungen zu möglichen Interaktionen von VASP und Forminen in Gegenwart und Abwesenheit von Aktin sowie anschließende zellbiologische Analysen sind nötig um diese interessanten Fragestellungen nachfolgend zu klären.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abercrombie M, Heaysman JE, & Pegrum SM (1970a) The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res* **59**: 393-398
2. Abercrombie M, Heaysman JE, & Pegrum SM (1970b) The locomotion of fibroblasts in culture. II. "RRuffling". *Exp Cell Res* **60**: 437-444
3. Aderem A & Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623
4. Ahuja R, Pinyol R, Reichenbach N, Custer L, Klingensmith J, Kessels MM, & Qualmann B (2007) Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell* **131**: 337-350
5. Alberts AS (2001) Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem* **276**: 2824-2830
6. Amann KJ & Pollard TD (2001a) The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol* **3**: 306-310
7. Amann KJ & Pollard TD (2001b) 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**: 15009-15013
8. Applewhite DA, Barzik M, Kojima S, Svitkina TM, Gertler FB, & Borisy GG (2007) Ena/VASP proteins have an anti-capping independent function in filopodia formation. *Mol Biol Cell* **18**: 2579-2591
9. Arasada R, Gloss A, Tunggal B, Joseph JM, Rieger D, Mondal S, Faix J, Schleicher M, & Noegel AA (2007) Profilin isoforms in Dictyostelium discoideum. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 631-641
10. Ayscough KR (2000) Endocytosis and the development of cell polarity in yeast require a dynamic F-actin cytoskeleton. *Curr Biol* **10**: 1587-1590
11. Bachmann C, Fischer L, Walter U, & Reinhard M (1999) The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem* **274**: 23549-23557
12. Ball LJ, Jarchau T, Oschkinat H, & Walter U (2002) EVH1 domains: structure, function and interactions. *FEBS Lett* **513**: 45-52
13. Ball LJ, Kuhne R, Hoffmann B, Hafner A, Schmieder P, Volkmer-Engert R, Hof M, Wahl M, Schneider-Mergener J, Walter U, Oschkinat H, & Jarchau T (2000) Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. *EMBO J* **19**: 4903-4914
14. Barzik M, Carl UD, Schubert WD, Frank R, Wehland J, & Heinz DW (2001) The N-terminal domain of Homer/Vesl is a new class II EVH1 domain. *J Mol Biol* **309**: 155-169
15. Barzik M, Kotova TI, Higgs HN, Hazelwood L, Hanein D, Gertler FB, & Schafer DA (2005) Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem* **280**: 28653-28662
16. Bear JE & Gertler FB (2009) Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *J Cell Sci* **122**: 1947-1953
17. Bear JE, Loureiro JJ, Libova I, Fassler R, Wehland J, & Gertler FB (2000) Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell* **101**: 717-728
18. Bear JE, Svitkina TM, Krause M, Schafer DA, Loureiro JJ, Strasser GA, Maly IV, Chaga OY, Cooper JA, Borisy GG, & Gertler FB (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* **109**: 509-521
19. Bearer EL, Prakash JM, & Li Z (2002) Actin dynamics in platelets. *Int Rev Cytol* **217**: 137-182
20. Bearer EL, Prakash JM, Manchester RD, & Allen PG (2000) VASP protects actin filaments from gelsolin: an in vitro study with implications for platelet actin reorganizations. *Cell Motil Cytoskeleton* **47**: 351-364
21. Beckerle MC (1998) Spatial control of actin filament assembly: lessons from Listeria. *Cell* **95**: 741-748
22. Beneken J, Tu JC, Xiao B, Nuriya M, Yuan JP, Worley PF, & Leahy DJ (2000) Structure of the Homer EVH1 domain-peptide complex reveals a new twist in polyproline recognition. *Neuron* **26**: 143-154

23. Benz PM, Blume C, Seifert S, Wilhelm S, Waschke J, Schuh K, Gertler F, Munzel T, & Renne T (2009) Differential VASP phosphorylation controls remodeling of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **122**: 3954-3965
24. Blanchoin L, Amann KJ, Higgs HN, Marchand JB, Kaiser DA, & Pollard TD (2000) Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**: 1007-1011
25. Block J, Stradal TE, Hanisch J, Geffers R, Kostler SA, Urban E, Small JV, Rottner K, & Faix J (2008) Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. *J Microsc* **231**: 506-517
26. Boeda B, Briggs DC, Higgins T, Garvalov BK, Fadden AJ, McDonald NQ, & Way M (2007) Tes, a specific Mena interacting partner, breaks the rules for EVH1 binding. *Mol Cell* **28**: 1071-1082
27. Bosch M, Le KH, Bugyi B, Correia JJ, Renault L, & Carlier MF (2007) Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin. *Mol Cell* **28**: 555-568
28. Boujemaa-Paterski R, Gouin E, Hansen G, Samarin S, Le Clainche C, Didry D, Dehoux P, Cossart P, Kocks C, Carlier MF, & Pantaloni D (2001) Listeria protein ActA mimics WASp family proteins: it activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex. *Biochemistry* **40**: 11390-11404
29. Bozzaro S, Bucci C, & Steinert M (2008) Phagocytosis and host-pathogen interactions in Dictyostelium with a look at macrophages. *Int Rev Cell Mol Biol* **271**: 253-300
30. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
31. Breitsprecher D, Kiesewetter AK, Linkner J, & Faix J (2009) Analysis of actin assembly by in vitro TIRF microscopy. *Methods Mol Biol* **571**: 401-415
32. Breitsprecher D, Kiesewetter AK, Linkner J, Urbanke C, Resch GP, Small JV, & Faix J (2008) Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J* **27**: 2943-2954
33. Brindle NP, Holt MR, Davies JE, Price CJ, & Critchley DR (1996) The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem J* **318 ( Pt 3)**: 753-757
34. Brun L, Rupp B, Ward JJ, & Nedelec F (2009) A theory of microtubule catastrophes and their regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 21173-21178
35. Bundschu K, Walter U, & Schuh K (2006) The VASP-Spred-Sprouty domain puzzle. *J Biol Chem* **281**: 36477-36481
36. Caldwell JE, Heiss SG, Mermall V, & Cooper JA (1989) Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin. *Biochemistry* **28**: 8506-8514
37. Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B, & Mornon JP (1997) Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci* **53**: 621-645
38. Campellone KG, Webb NJ, Znameroski EA, & Welch MD (2008) WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell* **134**: 148-161
39. Cardelli J (2001) Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic* **2**: 311-320
40. Carlier MF (1991) Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem* **266**: 1-4
41. Carlier MF & Pantaloni D (2007) Control of actin assembly dynamics in cell motility. *J Biol Chem* **282**: 23005-23009
42. Castellano F, Le Clainche C, Patin D, Carlier MF, & Chavrier P (2001) A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *EMBO J* **20**: 5603-5614
43. Castrillon DH & Wasserman SA (1994) Diaphanous is required for cytokinesis in Drosophila and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development* **120**: 3367-3377
44. Chakraborty T, Ebel F, Domann E, Niebuhr K, Gerstel B, Pistor S, Temm-Grove CJ, Jockusch BM, Reinhard M, & Walter U (1995) A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile Listeria monocytogenes and Listeria ivanovii to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J* **14**: 1314-1321
45. Chang F, Drubin D, & Nurse P (1997) 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**: 169-182
46. Chen G, Zhuchenko O, & Kuspa A (2007) Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science* **317**: 678-681

47. Chereau D, Boczkowska M, Skwarek-Maruszewska A, Fujiwara I, Hayes DB, Rebowski G, Lappalainen P, Pollard TD, & Dominguez R (2008) Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science* **320**: 239-243
48. Chereau D & Dominguez R (2006) Understanding the role of the G-actin-binding domain of Ena/VASP in actin assembly. *J Struct Biol* **155**: 195-201
49. Chereau D, Kerff F, Graceffa P, Grabarek Z, Langsetmo K, & Dominguez R (2005) Actin-bound structures of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and the implications for filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16644-16649
50. Chesarone MA & Goode BL (2009) Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 28-37
51. Chhabra ES & Higgs HN (2007) The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* **9**: 1110-21
52. Chisholm RL & Firtel RA (2004) Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 531-541
53. Claviez M, Pagh K, Maruta H, Baltes W, Fisher P, & Gerisch G (1982) Electron microscopic mapping of monoclonal antibodies on the tail region of Dictyostelium myosin. *EMBO J* **1**: 1017-1022
54. Co C, Wong DT, Gierke S, Chang V, & Taunton J (2007) Mechanism of actin network attachment to moving membranes: barbed end capture by N-WASP WH2 domains. *Cell* **128**: 901-13
55. Cohen SN, Chang AC, & Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2110-2114
56. Comer AR, Ahern-Djamali SM, Juang JL, Jackson PD, & Hoffmann FM (1998) Phosphorylation of Enabled by the Drosophila Abelson tyrosine kinase regulates the in vivo function and protein-protein interactions of Enabled. *Mol Cell Biol* **18**: 152-160
57. Conner SD & Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**: 37-44
58. Cooper JA & Sept D (2008) New insights into mechanism and regulation of actin capping protein. *Int Rev Cell Mol Biol* **267**: 183-206
59. Cooper JA, Walker SB, & Pollard TD (1983) Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J Muscle Res Cell Motil* **4**: 253-262
60. Cornillon S, Gebbie L, Benghezal M, Nair P, Keller S, Wehrle-Haller B, Charette SJ, Bruckert F, Letourneur F, & Cosson P (2006) An adhesion molecule in free-living Dictyostelium amoebae with integrin beta features. *EMBO Rep* **7**: 617-621
61. De Lozanne A & Spudich JA (1987a) Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**: 1086-1091
62. De Lozanne A & Spudich JA (1987b) Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**: 1086-1091
63. Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, Philippar U, Barzik M, Rubinson DA, Gupton S, Van Veen JE, Furman C, Zhang J, Alberts AS, Mori S, & Gertler FB (2007) Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat Cell Biol* **9**: 1347-1359
64. Devreotes P (1989) Cell-cell interactions in Dictyostelium development. *Trends Genet* **5**: 242-245
65. Dickinson RB (2009) Models for actin polymerization motors. *J Math Biol* **58**: 81-103
66. Dickinson RB & Purich DL (2002) Clamped-filament elongation model for actin-based motors. *Biophys J* **82**: 605-617
67. Dickinson RB, Southwick FS, & Purich DL (2002) A direct-transfer polymerization model explains how the multiple profilin-binding sites in the actoclampin motor promote rapid actin-based motility. *Arch Biochem Biophys* **406**: 296-301
68. Dittrich M, Strassberger V, Fackler M, Tas P, Lewandrowski U, Sickmann A, Walter U, Dandekar T, & Birschmann I (2010) Characterization of a novel interaction between vasodilator-stimulated phosphoprotein and Abelson interactor 1 in human platelets: a concerted computational and experimental approach. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**: 843-850
69. Doherty GJ & McMahon HT (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* **78**: 857-902
70. Dominguez R (2007) The beta-thymosin/WH2 fold: multifunctionality and structure. *Ann N Y Acad Sci* **1112**: 86-94
71. Dumontier M, Hocht P, Mintert U, & Faix J (2000) Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in Dictyostelium. *J Cell Sci* **113 ( Pt 12)**: 2253-2265

72. Edwards J (2004) Are beta-thymosins WH2 domains? *FEBS Lett* **573**: 231-2; author reply 233
73. Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sucgang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P et al (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**: 43-57
74. Eigenthaler M, Nolte C, Halbrugge M, & Walter U (1992) Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem* **205**: 471-481
75. Ermekova KS, Zambrano N, Linn H, Minopoli G, Gertler F, Russo T, & Sudol M (1997) The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled. *J Biol Chem* **272**: 32869-32877
76. Evangelista M, Blundell K, Longtine MS, Chow CJ, Adames N, Pringle JR, Peter M, & Boone C (1997) Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* **276**: 118-122
77. Evangelista M, Pruyne D, Amberg DC, Boone C, & Bretscher A (2002) Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol* **4**: 32-41
78. Faix J, Breitsprecher D, Stradal TE, & Rottner K (2009) Filopodia: Complex models for simple rods. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 1656-1664
79. Faix J, Gerisch G, & Noegel AA (1992) Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* **102 ( Pt 2)**: 203-214
80. Faix J & Grosse R (2006) Staying in shape with formins. *Dev Cell* **10**: 693-706
81. Faix J, Kreppel L, Shaulsky G, Schleicher M, & Kimmel AR (2004) A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res* **32**: e143
82. Faix J & Rottner K (2006) The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 18-25
83. Faix J, Steinmetz M, Boves H, Kammerer RA, Lottspeich F, Mintert U, Murphy J, Stock A, Aebi U, & Gerisch G (1996) Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin-bundling proteins with a parallel coiled-coil tail. *Cell* **86**: 631-642
84. Farbrother P, Wagner C, Na J, Tunggal B, Morio T, Urushihara H, Tanaka Y, Schleicher M, Steinert M, & Eichinger L (2006) *Dictyostelium* transcriptional host cell response upon infection with *Legionella*. *Cell Microbiol* **8**: 438-456
85. Fedorov AA, Fedorov E, Gertler F, & Almo SC (1999) Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function. *Nat Struct Biol* **6**: 661-665
86. Feierbach B & Chang F (2001) Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol* **11**: 1656-1665
87. Ferron F, Rebowski G, Lee SH, & Dominguez R (2007) Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *Embo J* **26**: 4597-606
88. Firtel RA (1996) Interacting signaling pathways controlling multicellular development in *Dictyostelium*. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 545-554
89. Firtel RA (1995) Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in *Dictyostelium*. *Genes Dev* **9**: 1427-1444
90. Fradelizi J, Noireaux V, Plastino J, Menichi B, Louvard D, Sykes C, Golsteyn RM, & Friederich E (2001) ActA and human zyxin harbour Arp2/3-independent actin-polymerization activity. *Nat Cell Biol* **3**: 699-707
91. Fujimoto LM, Roth R, Heuser JE, & Schmid SL (2000) Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic* **1**: 161-171
92. Galkin VE, Orlova A, VanLoock MS, Shvetsov A, Reisler E, & Egelman EH (2003) ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments. *J Cell Biol* **163**: 1057-1066
93. Galler AB, Garcia Arguinzonis MI, Baumgartner W, Kuhn M, Smolenski A, Simm A, & Reinhard M (2006) VASP-dependent regulation of actin cytoskeleton rigidity, cell adhesion, and detachment. *Histochem Cell Biol* **125**: 457-474
94. Gallwitz D & Seidel R (1980) Molecular cloning of the actin gene from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **8**: 1043-1059
95. Gandhi M, Achard V, Blanchoin L, & Goode BL (2009) Coronin switches roles in actin disassembly depending on the nucleotide state of actin. *Mol Cell* **34**: 364-374

96. Garcia Arguinzonis MI, Galler AB, Walter U, Reinhard M, & Simm A (2002) Increased spreading, Rac/p21-activated kinase (PAK) activity, and compromised cell motility in cells deficient in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP). *J Biol Chem* **277**: 45604-45610
97. Garrels JI & Gibson W (1976) Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell* **9**: 793-805
98. Garvalov BK, Higgins TE, Sutherland JD, Zettl M, Scaplehorn N, Kocher T, Piddini E, Griffiths G, & Way M (2003) The conformational state of Tes regulates its zyxin-dependent recruitment to focal adhesions. *J Cell Biol* **161**: 33-39
99. Geese M, Loureiro JJ, Bear JE, Wehland J, Gertler FB, & Sechi AS (2002) Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of listeria requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Mol Biol Cell* **13**: 2383-2396
100. Geese M, Schluter K, Rothkegel M, Jockusch BM, Wehland J, & Sechi AS (2000) Accumulation of profilin II at the surface of Listeria is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci* **113 ( Pt 8)**: 1415-1426
101. Gennerich A & Vale RD (2009) Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 59-67
102. Gerisch G (1987) Cyclic AMP and other signals controlling cell development and differentiation in Dictyostelium. *Annu Rev Biochem* **56**: 853-879
103. Gerisch G, Albrecht R, Heizer C, Hodgkinson S, & Maniak M (1995) Chemoattractant-controlled accumulation of coronin at the leading edge of Dictyostelium cells monitored using a green fluorescent protein-coronin fusion protein. *Curr Biol* **5**: 1280-1285
104. Gerisch G, Fromm H, Huesgen A, & Wick U (1975) Control of cell-contact sites by cyclic AMP pulses in differentiating Dictyostelium cells. *Nature* **255**: 547-549
105. Gerisch G, Segall JE, & Wallraff E (1989) Isolation and behavioral analysis of mutants defective in cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* **14**: 75-79
106. Gertler FB, Comer AR, Juang JL, Ahern SM, Clark MJ, Liebl EC, & Hoffmann FM (1995) Enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the Drosophila Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev* **9**: 521-533
107. Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, & Soriano P (1996) Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* **87**: 227-239
108. Glotzer M (2005) The molecular requirements for cytokinesis. *Science* **307**: 1735-1739
109. Glotzer M (2003) Cytokinesis: progress on all fronts. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 684-690
110. Glotzer M (2001) Animal cell cytokinesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 351-386
111. Goldberg JM, Manning G, Liu A, Fey P, Pilcher KE, Xu Y, & Smith JL (2006) The dictyostelium kinome--analysis of the protein kinases from a simple model organism. *PLoS Genet* **2**: e38
112. Goldman RD, Grin B, Mendez MG, & Kuczumski ER (2008) Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 28-34
113. Goldschmidt-Clermont PJ & Janmey PA (1991) Profilin, a weak CAP for actin and RAS. *Cell* **66**: 419-421
114. Gomez TS, Kumar K, Medeiros RB, Shimizu Y, Leibson PJ, & Billadeau DD (2007) Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity* **26**: 177-190
115. Goode BL, Drubin DG, & Barnes G (2000) Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 63-71
116. Goode BL & Eck MJ (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem* **76**: 593-627
117. Hacker U, Albrecht R, & Maniak M (1997) Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium. *J Cell Sci* **110 ( Pt 2)**: 105-112
118. Halbrugge M & Walter U (1990) Analysis, purification and properties of a 50,000-dalton membrane-associated phosphoprotein from human platelets. *J Chromatogr* **521**: 335-343
119. Halbrugge M & Walter U (1989) Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem* **185**: 41-50
120. Han JW, Leeper L, Rivero F, & Chung CY (2006) Role of RacC for the regulation of WASP and phosphatidylinositol 3-kinase during chemotaxis of Dictyostelium. *J Biol Chem* **281**: 35224-35234
121. Han YH, Chung CY, Wessels D, Stephens S, Titus MA, Soll DR, & Firtel RA (2002) Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in dictyostelium. *J Biol Chem* **277**: 49877-87
122. Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580

123. Harbeck B, Huttelmaier S, Schluter K, Jockusch BM, & Illenberger S (2000) Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem* **275**: 30817-25
124. Haugwitz M, Noegel AA, Karakesisoglou J, & Schleicher M (1994) Dictyostelium amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell* **79**: 303-314
125. Haus U, Hartmann H, Trommler P, Noegel AA, & Schleicher M (1991) F-actin capping by cap32/34 requires heterodimeric conformation and can be inhibited with PIP2. *Biochem Biophys Res Commun* **181**: 833-839
126. Hawkins T, Mirigian M, Selcuk Yasar M, & Ross JL (2010) Mechanics of microtubules. *J Biomech* **43**: 23-30
127. Hayashi T & Ip W (1976) Polymerization polarity of actin. *J Mechanochem Cell Motil* **3**: 163-169
128. Heim R & Tsien RY (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**: 178-182
129. Hertzog M, van Heijenoort C, Didry D, Gaudier M, Coutant J, Gigant B, Didelot G, Preat T, Knossow M, Guittet E, & Carlier MF (2004) The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly. *Cell* **117**: 611-23
130. Hertzog M, Yarmola EG, Didry D, Bubb MR, & Carlier MF (2002) Control of actin dynamics by proteins made of beta-thymosin repeats: the actobindin family. *J Biol Chem* **277**: 14786-14792
131. Higashida C, Miyoshi T, Fujita A, Ocegüera-Yanez F, Monypenny J, Andou Y, Narumiya S, & Watanabe N (2004) Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science* **303**: 2007-2010
132. Higgs HN (2005) Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci* **30**: 342-353
133. Holmes KC, Popp D, Gebhard W, & Kabsch W (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**: 44-49
134. Hotulainen P & Lappalainen P (2006) Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol* **173**: 383-394
135. Humbel BM & Biegelmann E (1992) A preparation protocol for postembedding immunoelectron microscopy of Dictyostelium discoideum cells with monoclonal antibodies. *Scanning Microsc*: 817-825
136. Huttelmaier S, Harbeck B, Steffens O, Messerschmidt T, Illenberger S, & Jockusch BM (1999) Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett* **451**: 68-74
137. Insall R, Müller-Taubenberger A, Machesky L, Kohler J, Simmeth E, Atkinson SJ, Weber I, & Gerisch G (2001) Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* **50**: 115-128
138. Insall RH & Machesky LM (2009) Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell* **17**: 310-322
139. Jenzora A, Behrendt B, Small JV, Wehland J, & Stradal TE (2006) PREL1 provides a link from Ras signalling to the actin cytoskeleton via Ena/VASP proteins. *FEBS Lett* **580**: 455-463
140. Jin T, Xu X, Fang J, Isik N, Yan J, Brzostowski JA, & Hereld D (2009) How human leukocytes track down and destroy pathogens: lessons learned from the model organism Dictyostelium discoideum. *Immunol Res* **43**: 118-127
141. Jonckheere V, Lambrechts A, Vandekerckhove J, & Ampe C (1999) Dimerization of profilin II upon binding the (GP5)3 peptide from VASP overcomes the inhibition of actin nucleation by profilin II and thymosin beta4. *FEBS Lett* **447**: 257-263
142. Joseph JM, Fey P, Ramalingam N, Liu XI, Rohlf M, Noegel AA, Müller-Taubenberger A, Glockner G, & Schleicher M (2008) The actinome of Dictyostelium discoideum in comparison to actins and actin-related proteins from other organisms. *PLoS One* **3**: e2654
143. Jung E & Williams KL (1997) The production of recombinant glycoproteins with special reference to simple eukaryotes including Dictyostelium discoideum. *Biotechnol Appl Biochem* **25 ( Pt 1)**: 3-8
144. Kabsch W & Vandekerckhove J (1992) Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**: 49-76
145. Kato T, Watanabe N, Morishima Y, Fujita A, Ishizaki T, & Narumiya S (2001) Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells. *J Cell Sci* **114**: 775-784
146. Katz ER (2006) Kenneth Raper, Elisha Mitchell and Dictyostelium. *J Biosci* **31**: 195-200

147. Kawata T, Shevchenko A, Fukuzawa M, Jermyn KA, Totty NF, Zhukovskaya NV, Sterling AE, Mann M, & Williams JG (1997) SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium. *Cell* **89**: 909-916
148. Kitayama C & Uyeda TQ (2003) ForC, a novel type of formin family protein lacking an FH1 domain, is involved in multicellular development in Dictyostelium discoideum. *J Cell Sci* **116**: 711-723
149. Knecht D & Pang KM (1995) Electroporation of Dictyostelium discoideum. *Methods Mol Biol* **47**: 321-330
150. Knecht DA & Loomis WF (1987) Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in Dictyostelium discoideum. *Science* **236**: 1081-1086
151. Koestler SA, Auinger S, Vinzenz M, Rottner K, & Small JV (2008) Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. *Nat Cell Biol*
152. Koestler SA, Rottner K, Lai F, Block J, Vinzenz M, & Small JV (2009) F- and G-actin concentrations in lamellipodia of moving cells. *PLoS One* **4**: e4810
153. Kohno H, Tanaka K, Mino A, Umikawa M, Imamura H, Fujiwara T, Fujita Y, Hotta K, Qadota H, Watanabe T, Ohya Y, & Takai Y (1996) Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in Saccharomyces cerevisiae. *EMBO J* **15**: 6060-6068
154. Kovar DR (2006) Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 11-17
155. Kovar DR, Kuhn JR, Tichy AL, & Pollard TD (2003) The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol* **161**: 875-887
156. Kovar DR & Pollard TD (2004a) Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14725-30
157. Kovar DR & Pollard TD (2004b) Progressing actin: Formin as a processive elongation machine. *Nat Cell Biol* **6**: 1158-1159
158. Kozlov MM & Bershadsky AD (2004) Processive capping by formin suggests a force-driven mechanism of actin polymerization. *J Cell Biol* **167**: 1011-1017
159. Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, & Gertler FB (2003) Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 541-564
160. Krause M, Leslie JD, Stewart M, Lafuente EM, Valderrama F, Jagannathan R, Strasser GA, Rubinson DA, Liu H, Way M, Yaffe MB, Boussiotis VA, & Gertler FB (2004) Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Dev Cell* **7**: 571-583
161. Krugmann S, Jordens I, Gevaert K, Driessens M, Vandekerckhove J, & Hall A (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol* **11**: 1645-1655
162. Kueh HY, Charras GT, Mitchison TJ, & Briehner WM (2008) Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J Cell Biol* **182**: 341-353
163. Kueh HY & Mitchison TJ (2009) Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. *Science* **325**: 960-963
164. Kuhn JR & Pollard TD (2005) Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys J* **88**: 1387-1402
165. Kuhn K, Jarchau T, Wolf E, Schlichting I, Walter U, Wittinghofer A, & Strelkov SV (2004) The VASP tetramerization domain is a right-handed coiled coil based on a 15-residue repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17027-17032
166. Kursula P, Kursula I, Massimi M, Song YH, Downer J, Stanley WA, Witke W, & Wilmanns M (2008) High-resolution structural analysis of mammalian profilin 2a complex formation with two physiological ligands: the formin homology 1 domain of mDia1 and the proline-rich domain of VASP. *J Mol Biol* **375**: 270-90
167. Kuspa A & Loomis WF (1992) Tagging developmental genes in Dictyostelium by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 8803-8807
168. Kwiatkowski AV, Gertler FB, & Loureiro JJ (2003) Function and regulation of Ena/VASP proteins. *Trends Cell Biol* **13**: 386-92
169. Kwiatkowski AV, Rubinson DA, Dent EW, Edward van Veen J, Leslie JD, Zhang J, Mebane LM, Philippart U, Pinheiro EM, Burds AA, Bronson RT, Mori S, Fassler R, & Gertler FB (2007) Ena/VASP Is Required for neuritegenesis in the developing cortex. *Neuron* **56**: 441-455
170. Lacayo CI, Pincus Z, VanDuijn MM, Wilson CA, Fletcher DA, Gertler FB, Mogilner A, & Theriot JA (2007) Emergence of large-scale cell morphology and movement from local actin filament growth dynamics. *PLoS Biol* **5**: e233

171. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
172. Lambrechts A, Kwiatkowski AV, Lanier LM, Bear JE, Vandekerckhove J, Ampe C, & Gertler FB (2000) cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. *J Biol Chem* **275**: 36143-36151
173. Lauffenburger DA (1996) Cell motility. Making connections count. *Nature* **383**: 390-391
174. Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Grobe L, Jockusch BM, Wehland J, Gertler FB, & Carlier MF (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* **144**: 1245-1258
175. Lebrand C, Dent EW, Strasser GA, Lanier LM, Krause M, Svitkina TM, Borisy GG, & Gertler FB (2004) Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron* **42**: 37-49
176. Lee SH, Kerff F, Chereau D, Ferron F, Klug A, & Dominguez R (2007) Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis. *Structure* **15**: 145-155
177. Li F & Higgs HN (2005) Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDia1. *J Biol Chem* **280**: 6986-6992
178. Lim J, Wiedemann A, Tzircotis G, Monkley SJ, Critchley DR, & Caron E (2007) An essential role for talin during alpha(M)beta(2)-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell* **18**: 976-985
179. Lin WH, Nelson SE, Hollingsworth RJ, & Chung CY (2010) Functional roles of VASP phosphorylation in the regulation of chemotaxis and osmotic stress response. *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**: 259-271
180. Lindsay SL, Ramsey S, Aitchison M, Renne T, & Evans TJ (2007) Modulation of lamellipodial structure and dynamics by NO-dependent phosphorylation of VASP Ser239. *J Cell Sci* **120**: 3011-3021
181. Loening UE (1969) The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. The effects of changes in conformation. *Biochem J* **113**: 131-138
182. Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D, & Carlier MF (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**: 613-616
183. Loomis WF (1996) Genetic networks that regulate development in *Dictyostelium* cells. *Microbiol Rev* **60**: 135-150
184. Loomis WF, Jr (1971) Sensitivity of *Dictyostelium discoideum* to nucleic acid analogues. *Exp Cell Res* **64**: 484-486
185. Loomis WF & Ashworth JM (1968) Plaque-size mutants of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J Gen Microbiol* **53**: 181-186
186. Lorenz M, Poole KJ, Popp D, Rosenbaum G, & Holmes KC (1995) An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels. *J Mol Biol* **246**: 108-119
187. Lorenz M, Popp D, & Holmes KC (1993) Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J Mol Biol* **234**: 826-836
188. Loureiro JJ, Rubinson DA, Bear JE, Baltus GA, Kwiatkowski AV, & Gertler FB (2002) Critical roles of phosphorylation and actin binding motifs, but not the central proline-rich region, for Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) function during cell migration. *Mol Biol Cell* **13**: 2533-46
189. Mabuchi I & Okuno M (1977) The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *J Cell Biol* **74**: 251-263
190. Machesky LM (1997) Cell motility: complex dynamics at the leading edge. *Curr Biol* **7**: R164-7
191. Machesky LM, Cole NB, Moss B, & Pollard TD (1994) Vaccinia virus expresses a novel profilin with a higher affinity for polyphosphoinositides than actin. *Biochemistry* **33**: 10815-10824
192. Machesky LM & Gould KL (1999) The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 117-121
193. Machesky LM, Reeves E, Wientjes F, Mattheyse FJ, Grogan A, Totty NF, Burlingame AL, Hsuan JJ, & Segal AW (1997) Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem J* **328 (Pt 1)**: 105-112
194. Maniak M (2003) Fusion and fission events in the endocytic pathway of *Dictyostelium*. *Traffic* **4**: 1-5
195. Maniak M (2002) Conserved features of endocytosis in *Dictyostelium*. *Int Rev Cytol* **221**: 257-287

196. Maniak M, Rauchenberger R, Albrecht R, Murphy J, & Gerisch G (1995) Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* **83**: 915-924
197. Mannherz HG & Hannappel E (2009) The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**: 839-851
198. Manstein DJ, Ruppel KM, & Spudich JA (1989a) Expression and characterization of a functional myosin head fragment in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **246**: 656-658
199. Manstein DJ, Titus MA, De Lozanne A, & Spudich JA (1989b) Gene replacement in *Dictyostelium*: generation of myosin null mutants. *EMBO J* **8**: 923-932
200. Marchand JB, Kaiser DA, Pollard TD, & Higgs HN (2001) Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* **3**: 76-82
201. Margolin W (2009) Sculpting the bacterial cell. *Curr Biol* **19**: R812-22
202. Mattila PK & Lappalainen P (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 446-454
203. Mattila PK, Salminen M, Yamashiro T, & Lappalainen P (2003) Mouse MIM, a tissue-specific regulator of cytoskeletal dynamics, interacts with ATP-actin monomers through its C-terminal WH2 domain. *J Biol Chem* **278**: 8452-8459
204. May RC, Caron E, Hall A, & Machesky LM (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat Cell Biol* **2**: 246-248
205. May RC, Hall ME, Higgs HN, Pollard TD, Chakraborty T, Wehland J, Machesky LM, & Sechi AS (1999) The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Curr Biol* **9**: 759-762
206. McCullough BR, Blanchoin L, Martiel JL, & De la Cruz EM (2008) Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J Mol Biol* **381**: 550-558
207. McGough A, Pope B, Chiu W, & Weeds A (1997) Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol* **138**: 771-781
208. Mockrin SC & Korn ED (1980) *Acanthamoeba* profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* **19**: 5359-5362
209. Morrison A, Marschalek R, Dingermann T, & Harwood AJ (1997) A novel, negative selectable marker for gene disruption in *Dictyostelium*. *Gene* **202**: 171-176
210. Mullins RD, Heuser JA, & Pollard TD (1998a) 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**: 6181-6186
211. Mullins RD, Kelleher JF, Xu J, & Pollard TD (1998b) Arp2/3 complex from *Acanthamoeba* binds profilin and cross-links actin filaments. *Mol Biol Cell* **9**: 841-852
212. Mullins RD & Pollard TD (1999) Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 244-249
213. Neidt EM, Scott BJ, & Kovar DR (2009) Formin differentially utilizes profilin isoforms to rapidly assemble actin filaments. *J Biol Chem* **284**: 673-684
214. Neidt EM, Skau CT, & Kovar DR (2008) The cytokinesis formins from the nematode worm and fission yeast differentially mediate actin filament assembly. *J Biol Chem* **283**: 23872-23883
215. Neuhaus EM, Almers W, & Soldati T (2002) Morphology and dynamics of the endocytic pathway in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* **13**: 1390-1407
216. Neuhaus JM, Wanger M, Keiser T, & Wegner A (1983) Treadmilling of actin. *J Muscle Res Cell Motil* **4**: 507-527
217. Neujahr R, Heizer C, & Gerisch G (1997) Myosin II-independent processes in mitotic cells of *Dictyostelium discoideum*: redistribution of the nuclei, re-arrangement of the actin system and formation of the cleavage furrow. *J Cell Sci* **110 ( Pt 2)**: 123-137
218. Nezami AG, Poy F, & Eck MJ (2006) Structure of the autoinhibitory switch in formin mDia1. *Structure* **14**: 257-263
219. Ng R & Abelson J (1980) Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 3912-3916
220. Nicholson-Dykstra SM & Higgs HN (2008) Arp2 depletion inhibits sheet-like protrusions but not linear protrusions of fibroblasts and lymphocytes. *Cell Motil Cytoskeleton* **65**: 904-922
221. Niebuhr K, Ebel F, Frank R, Reinhard M, Domann E, Carl UD, Walter U, Gertler FB, Wehland J, & Chakraborty T (1997) A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J* **16**: 5433-5444

222. Niewohner J, Weber I, Maniak M, Muller-Taubenberger A, & Gerisch G (1997) Talin-null cells of Dictyostelium are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J Cell Biol* **138**: 349-361
223. Nobes CD & Hall A (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* **23**: 456-459
224. Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maeda Y, & Narita A (2009) The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* **457**: 441-445
225. Oegema K, Savoian MS, Mitchison TJ, & Field CM (2000) Functional analysis of a human homologue of the Drosophila actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. *J Cell Biol* **150**: 539-552
226. O'Halloran TJ & Anderson RG (1992) Clathrin heavy chain is required for pinocytosis, the presence of large vacuoles, and development in Dictyostelium. *J Cell Biol* **118**: 1371-1377
227. Ono K, Parast M, Alberico C, Benian GM, & Ono S (2003) Specific requirement for two ADF/cofilin isoforms in distinct actin-dependent processes in Caenorhabditis elegans. *J Cell Sci* **116**: 2073-2085
228. Otomo T, Tomchick DR, Otomo C, Panchal SC, Machius M, & Rosen MK (2005) Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* **433**: 488-494
229. Otterbein LR, Graceffa P, & Dominguez R (2001) The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* **293**: 708-711
230. Pasic L, Kotova TI, & Schafer DA (2008) Ena/VASP proteins capture actin filament barbed ends. *J Biol Chem*
231. Paul AS & Pollard TD (2009a) Energetic requirements for processive elongation of actin filaments by FH1FH2-formins. *J Biol Chem* **284**: 12533-12540
232. Paul AS & Pollard TD (2009b) Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**: 606-617
233. Paul AS & Pollard TD (2008) The role of the FH1 domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation. *Curr Biol* **18**: 9-19
234. Paunola E, Mattila PK, & Lappalainen P (2002) WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett* **513**: 92-7
235. Pelham RJ & Chang F (2002) Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature* **419**: 82-86
236. Peng J, Wallar BJ, Flanders A, Swiatek PJ, & Alberts AS (2003) Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol* **13**: 534-545
237. Plastino J, Olivier S, & Sykes C (2004) Actin filaments align into hollow comets for rapid VASP-mediated propulsion. *Curr Biol* **14**: 1766-1771
238. Podolski JL & Steck TL (1990) Length distribution of F-actin in Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* **265**: 1312-1318
239. Pogliano J (2008) The bacterial cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 19-27
240. Pollard TD (2010) Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 50-56
241. Pollard TD (2003) The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature* **422**: 741-745
242. Pollard TD (1990) Actin. *Curr Opin Cell Biol* **2**: 33-40
243. Pollard TD (1986a) Assembly and dynamics of the actin filament system in nonmuscle cells. *J Cell Biochem* **31**: 87-95
244. Pollard TD (1986b) Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol* **103**: 2747-2754
245. Pollard TD (1984) Polymerization of ADP-actin. *J Cell Biol* **99**: 769-777
246. Pollard TD, Blanchoin L, & Mullins RD (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**: 545-576
247. Pollard TD & Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**: 453-465
248. Pollard TD & Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**: 1208-1212
249. Prehoda KE, Lee DJ, & Lim WA (1999) Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. *Cell* **97**: 471-480
250. Pring M, Evangelista M, Boone C, Yang C, & Zigmond SH (2003) Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* **42**: 486-496

251. Qualmann B & Kessels MM (2009) New players in actin polymerization--WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol* **19**: 276-285
252. Qualmann B, Kessels MM, & Kelly RB (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **150**: F111-6
253. Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E, & Mullins RD (2005) Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* **433**: 382-388
254. Ramalingam N, Zhao H, Breitsprecher D, Lappalainen P, Faix J, & Schleicher M (2010) Phospholipids regulate localization and activity of mDia1 formin. *Eur J Cell Biol*
255. Reichstein E & Korn ED (1979) Acanthamoeba profilin. A protein of low molecular weight from Acanthamoeba castellanii that inhibits actin nucleation. *J Biol Chem* **254**: 6174-6179
256. Reinhard M, Jarchau T, & Walter U (2001) Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem Sci* **26**: 243-249
257. Reinhard M, Jouvenal K, Tripier D, & Walter U (1995) Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7956-7960
258. Reinhard M, Rudiger M, Jockusch BM, & Walter U (1996) VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett* **399**: 103-107
259. Resch GP, Goldie KN, Hoenger A, & Small JV (2002) Pure F-actin networks are distorted and branched by steps in the critical-point drying method. *J Struct Biol* **137**: 305-312
260. Revenu C, Athman R, Robine S, & Louvard D (2004) The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 635-646
261. Rivero F (2008) Endocytosis and the actin cytoskeleton in Dictyostelium discoideum. *Int Rev Cell Mol Biol* **267**: 343-397
262. Rivero F, Muramoto T, Meyer AK, Urushihara H, Uyeda TQ, & Kitayama C (2005) A comparative sequence analysis reveals a common GBD/FH3-FH1-FH2-DAD architecture in formins from Dictyostelium, fungi and metazoa. *BMC Genomics* **6**: 28
263. Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, & Kirschner MW (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**: 221-231
264. Romero S, Le Clainche C, Didry D, Egile C, Pantaloni D, & Carlier MF (2004) Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* **119**: 419-429
265. Rottner K, Behrendt B, Small JV, & Wehland J (1999) VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol* **1**: 321-2
266. Rottner K, Krause M, Gimona M, Small JV, & Wehland J (2001) Zyxin is not colocalized with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) at lamellipodial tips and exhibits different dynamics to vinculin, paxillin, and VASP in focal adhesions. *Mol Biol Cell* **12**: 3103-3113
267. Rottner K, Stradal TE, & Wehland J (2005) Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. *Dev Cell* **9**: 3-17
268. Saarikangas J, Hakanen J, Mattila PK, Grumet M, Salminen M, & Lappalainen P (2008) ABBA regulates plasma-membrane and actin dynamics to promote radial glia extension. *J Cell Sci* **121**: 1444-1454
269. Saga Y & Yanagisawa K (1982) Macrocyst development in Dictyostelium discoideum. I. Induction of synchronous development by giant cells and biochemical analysis. *J Cell Sci* **55**: 341-352
270. Sagot I, Rodal AA, Moseley J, Goode BL, & Pellman D (2002) An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol* **4**: 626-631
271. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, & Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
272. Samarin S, Romero S, Kocks C, Didry D, Pantaloni D, & Carlier MF (2003) How VASP enhances actin-based motility. *J Cell Biol* **163**: 131-42
273. Sarmiento C, Wang W, Dovas A, Yamaguchi H, Sidani M, El-Sibai M, Desmarais V, Holman HA, Kitchen S, Backer JM, Alberts A, & Condeelis J (2008) WASP family members and formin proteins coordinate regulation of cell protrusions in carcinoma cells. *J Cell Biol* **180**: 1245-1260
274. Schafer DA, Jennings PB, & Cooper JA (1996) Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J Cell Biol* **135**: 169-179
275. Schirenbeck A, Arasada R, Bretschneider T, Schleicher M, & Faix J (2005) Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Biochem Soc Trans* **33**: 1256-1259

276. Schirenbeck A, Arasada R, Bretschneider T, Stradal TE, Schleicher M, & Faix J (2006) The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7694-9
277. Schirenbeck A, Bretschneider T, Arasada R, Schleicher M, & Faix J (2005) The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol* **7**: 619-625
278. Schroeder TE (1973) Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 1688-1692
279. Schutt CE, Myslik JC, Rozycki MD, Goonesekere NC, & Lindberg U (1993) The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* **365**: 810-816
280. Scita G, Confalonieri S, Lappalainen P, & Suetsugu S (2008) IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol* **18**: 52-60
281. Sechi AS & Wehland J (2004) ENA/VASP proteins: multifunctional regulators of actin cytoskeleton dynamics. *Front Biosci* **9**: 1294-1310
282. Seth A, Otomo C, & Rosen MK (2006) Autoinhibition regulates cellular localization and actin assembly activity of the diaphanous-related formins FRLalpha and mDia1. *J Cell Biol* **174**: 701-713
283. Sheterline P, Clayton J, & Sparrow J (1995) Actin. *Protein Profile* **2**: 1-103
284. Small JV, Auinger S, Nemethova M, Koestler S, Goldie KN, Hoenger A, & Resch GP (2008) Unravelling the structure of the lamellipodium. *J Microsc* **231**: 479-485
285. Small JV, Stradal T, Vignat E, & Rottner K (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* **12**: 112-120
286. Smith GA, Theriot JA, & Portnoy DA (1996) The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin. *J Cell Biol* **135**: 647-660
287. Somesh BP, Neffgen C, Iijima M, Devreotes P, & Rivero F (2006a) Dictyostelium RacH regulates endocytic vesicular trafficking and is required for localization of vacuolin. *Traffic* **7**: 1194-1212
288. Somesh BP, Vlahou G, Iijima M, Insall RH, Devreotes P, & Rivero F (2006b) RacG regulates morphology, phagocytosis, and chemotaxis. *Eukaryot Cell* **5**: 1648-1663
289. Spudich JA & Watt S (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem* **246**: 4866-4871
290. Steffen A, Faix J, Resch GP, Linkner J, Wehland J, Small JV, Rottner K, & Stradal TE (2006) Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol Biol Cell* **17**: 2581-2591
291. Steinert M & Heuner K (2005) Dictyostelium as host model for pathogenesis. *Cell Microbiol* **7**: 307-314
292. Steinert M, Leippe M, & Roeder T (2003) Surrogate hosts: protozoa and invertebrates as models for studying pathogen-host interactions. *Int J Med Microbiol* **293**: 321-332
293. Suetsugu S, Miki H, & Takenawa T (1999) Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun* **260**: 296-302
294. Sussman R & Sussman M (1967) Cultivation of Dictyostelium discoideum in axenic medium. *Biochem Biophys Res Commun* **29**: 53-55
295. Svitkina TM & Borisy GG (1999) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* **145**: 1009-1026
296. Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, & Borisy GG (2003) Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* **160**: 409-421
297. Swanson JA (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 639-649
298. Szent-Gyorgyi AG (2004) The early history of the biochemistry of muscle contraction. *J Gen Physiol* **123**: 631-641
299. Tammana TV, Sahasrabudhe AA, Bajpai VK, & Gupta CM (2010) ADF/cofilin-driven actin dynamics in early events of Leishmania cell division. *J Cell Sci* **123**: 1894-1901

300. Tasto JJ, Morrell JL, & Gould KL (2003) An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *J Cell Biol* **160**: 1093-1103
301. Thanabalu T & Munn AL (2001) Functions of Vrp1p in cytokinesis and actin patches are distinct and neither requires a WH2/V domain. *EMBO J* **20**: 6979-6989
302. Titus MA (1999) A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis. *Curr Biol* **9**: 1297-1303
303. Tokuo H & Ikebe M (2004) Myosin X transports Mena/VASP to the tip of filopodia. *Biochem Biophys Res Commun* **319**: 214-220
304. Towbin H, Staehelin T, & Gordon J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**: 145-149
305. Trichet L, Sykes C, & Plastino J (2008) Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP. *J Cell Biol* **181**: 19-25
306. Tuxworth RI, Weber I, Wessels D, Addicks GC, Soll DR, Gerisch G, & Titus MA (2001) A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr Biol* **11**: 318-329
307. Urban E, Jacob S, Nemethova M, Resch GP, & Small JV (2010) Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. *Nat Cell Biol* **12**: 429-435
308. Vaduva G, Martinez-Quiles N, Anton IM, Martin NC, Geha RS, Hopper AK, & Ramesh N (1999) The human WASP-interacting protein, WIP, activates the cell polarity pathway in yeast. *J Biol Chem* **274**: 17103-17108
309. Vaillant DC, Copeland SJ, Davis C, Thurston SF, Abdennur N, & Copeland JW (2008) Interaction of the N- and C-terminal autoregulatory domains of FRL2 does not inhibit FRL2 activity. *J Biol Chem* **283**: 33750-33762
310. Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerckhove J, & Ampe C (2008) Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol* **87**: 649-667
311. Vandekerckhove J & Weber K (1980) Vegetative Dictyostelium cells containing 17 actin genes express a single major actin. *Nature* **284**: 475-477
312. Vandekerckhove J & Weber K (1978) At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* **126**: 783-802
313. Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, & Fuchs E (2000) Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**: 209-219
314. Vidali L, Chen F, Cicchetti G, Ohta Y, & Kwiatkowski DJ (2006) Rac1-null mouse embryonic fibroblasts are motile and respond to platelet-derived growth factor. *Mol Biol Cell* **17**: 2377-2390
315. Vidali L, van Gisbergen PA, Guerin C, Franco P, Li M, Burkart GM, Augustine RC, Blanchoin L, & Bezanilla M (2009) Rapid formin-mediated actin-filament elongation is essential for polarized plant cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 13341-13346
316. Volkman BF, Prehoda KE, Scott JA, Peterson FC, & Lim WA (2002) Structure of the N-WASP EVH1 domain-WIP complex: insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell* **111**: 565-576
317. Walders-Harbeck B, Khaitlina SY, Hinssen H, Jockusch BM, & Illenberger S (2002) The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett* **529**: 275-280
318. Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, & Narumiya S (1997) p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J* **16**: 3044-3056
319. Watts DJ & Ashworth JM (1970) Growth of myxameobae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem J* **119**: 171-174
320. Weber I, Gerisch G, Heizer C, Murphy J, Badelt K, Stock A, Schwartz JM, & Faix J (1999a) Cytokinesis mediated through the recruitment of cortexillins into the cleavage furrow. *EMBO J* **18**: 586-594
321. Weber I, Niewohner J, & Faix J (1999b) Cytoskeletal protein mutations and cell motility in Dictyostelium. *Biochem Soc Symp* **65**: 245-265
322. Weber I, Wallraff E, Albrecht R, & Gerisch G (1995) Motility and substratum adhesion of Dictyostelium wild-type and cytoskeletal mutant cells: a study by RICM/bright-field double-view image analysis. *J Cell Sci* **108 ( Pt 4)**: 1519-1530
323. Weber K, Lazarides E, Goldman RD, Vogel A, & Pollack R (1975) Localization and distribution of actin fibers in normal transformed and revertant cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **39 Pt 1**: 363-369

324. Wegner A (1982) Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. *J Mol Biol* **161**: 607-615
325. Wegner A & Isenberg G (1983) 12-Fold Difference between the Critical Monomer Concentrations of the Two Ends of Actin Filaments in Physiological Salt Conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 4922-4925
326. Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, & Mitchison TJ (1997a) 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**: 375-384
327. Welch MD, Iwamatsu A, & Mitchison TJ (1997b) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**: 265-269
328. Welch MD, Rosenblatt J, Skoble J, Portnoy DA, & Mitchison TJ (1998) Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**: 105-108
329. Wellington A, Emmons S, James B, Calley J, Grover M, Tolia P, & Manseau L (1999) Spire contains actin binding domains and is related to ascidian posterior end mark-5. *Development* **126**: 5267-5274
330. Westphal M, Jungbluth A, Heidecker M, Muhlbauer B, Heizer C, Schwartz JM, Marriott G, & Gerisch G (1997) Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr Biol* **7**: 176-183
331. Wiesner S, Helfer E, Didry D, Ducouret G, Lafuma F, Carlier MF, & Pantaloni D (2003) A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *J Cell Biol* **160**: 387-398
332. Winder SJ & Ayscough KR (2005) Actin-binding proteins. *J Cell Sci* **118**: 651-654
333. Winter D, Podtelejnikov AV, Mann M, & Li R (1997) The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol* **7**: 519-529
334. Witke W, Nellen W, & Noegel A (1987) Homologous recombination in the Dictyostelium alpha-actinin gene leads to an altered mRNA and lack of the protein. *EMBO J* **6**: 4143-4148
335. Wu JQ, Sirotkin V, Kovar DR, Lord M, Beltzner CC, Kuhn JR, & Pollard TD (2006) Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J Cell Biol* **174**: 391-402
336. Yamagishi A, Masuda M, Ohki T, Onishi H, & Mochizuki N (2004) A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *J Biol Chem* **279**: 14929-14936
337. Yang C, Czech L, Gerboth S, Kojima S, Scita G, & Svitkina T (2007) Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells. *PLoS Biol* **5**: e317
338. Zalevsky J, Lempert L, Kranitz H, & Mullins RD (2001) Different WASP family proteins stimulate different Arp2/3 complex-dependent actin-nucleating activities. *Curr Biol* **11**: 1903-1913
339. Zhang H, Heid PJ, Wessels D, Daniels KJ, Pham T, Loomis WF, & Soll DR (2003) Constitutively active protein kinase A disrupts motility and chemotaxis in Dictyostelium discoideum. *Eukaryot Cell* **2**: 62-75
340. Zigmond SH (1998) Actin cytoskeleton: the Arp2/3 complex gets to the point. *Curr Biol* **8**: R654-7
341. Zimmermann J, Labudde D, Jarchau T, Walter U, Oschkinat H, & Ball LJ (2002) Relaxation, equilibrium oligomerization, and molecular symmetry of the VASP (336-380) EVH2 tetramer. *Biochemistry* **41**: 11143-11151
342. Zuchero JB, Coutts AS, Quinlan ME, Thangue NB, & Mullins RD (2009) p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat Cell Biol* **11**: 451-459

## 7 Publikationen und Präsentationen

### **Publikationen:**

Breitsprecher D, **Kiesewetter AK**, Linkner J, & Faix J (2009) Analysis of actin assembly by in vitro TIRF microscopy. *Methods Mol Biol* 571: 401-415

Breitsprecher D, **Kiesewetter AK**, Linkner J, Urbanke C, Resch GP, Small JV, & Faix J (2008) Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J* 27: 2943-2954

Breitsprecher D, **Kiesewetter AK**, Linkner J, Vinzenz M, Stradal TEB, Small JV, Curth U, & Faix J (2010) Affinity-based mechanism of Ena/VASP-mediated actin filament elongation. Manuskript in Vorbereitung

### **Poster:**

„Clustering of VASP Actively Promotes Processive, WH2-Domain mediated Actin Filament Elongation.“ Breitsprecher D, **Kiesewetter AK**, Linkner J, Urbanke C, Resch GP, Small JV, & Faix J. ASCB meeting 2009

## 8 Curriculum Vitae

### Persönliche Daten:

Name: Dipl.-Biol. Antje Kieseewetter  
Adresse: Sporlederweg 7  
30449 Hannover

Geburtstag und -ort: 12.11.1979 in Burgwedel

### Doktorarbeit:

04 / 2006 - 08 / 2009 Promotion in der AG Faix am Instiut für biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover

### Hochschulstudium:

09/2004 - 06/2005 Diplomarbeit am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover

*Thema der Diplomarbeit:* „Charakterisierung des katalytischen Zentrums von Dynamin A aus *Dictyostelium discoideum*“

10/1999 - 06/2005 Studium der Biologie an der Universität Hannover *Schwerpunkte:* Genetik, Mikrobiologie und Pharmakologie *Abschluss:* Diplom-Biologin

### Schulausbildung:

07/1999 Abitur am Gymnasium Großburgwedel

### Fortbildungen:

Lehrgang „Gentechnische Sicherheit“ nach §15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV