

**Identifizierung und Charakterisierung neuer an
der Filopodienbildung beteiligter Proteine aus
Dictyostelium discoideum.**

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

genehmigte Dissertation
von
Dipl. Biochem. Jörn Linkner
geboren am 20.06.1978 in Delmenhorst

(2010)

Erklärung

Prüfergruppe:

Referent: PD Dr. Jan Faix

Korreferentin: Prof. Dr. Theresia Stradal

Vorsitzender: Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer

Tag der Promotion: 29.10.2010

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, die Arbeit selbständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese oder eine gleichartige Dissertation wurde nicht an einer anderen Hochschule eingereicht bzw. endgültig nicht bestanden.

Hannover, den 15. Juni 2010

Jörn Linkner

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- Steffen, A., Faix, J., Resch, G.P., **Linkner, J.**, Wehland, J., Small, J.V., Rottner, K., and Stradal, T.E.B. (2006). Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol. Biol. Cell* 17, 2581-2591.
- Breitsprecher, D., Kieseewetter, A.K., **Linkner, J.**, Urbanke, C., Resch, G.P., Small, J.V., and Faix, J. (2008). Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J.* 27, 2943-2954.
- Breitsprecher, D., Kieseewetter, A.K., **Linkner, J.**, and Faix, J. (2009). Analysis of actin assembly by in vitro TIRF microscopy. *Methods Mol. Biol.* 571, 401-415.

Abstract

The dynamic reorganization of the actin cytoskeleton is the prerequisite of many fundamental processes in eukaryotic cells. It allows the cells for instance to establish a defined morphology and project membrane protrusions such as lamellipodia and filopodia, which in turn are crucial for cell migration. In contrast to the sheet-like lamellipodia, filopodia are rod-like projections consisting of densely packed, parallel actin bundles pointing with their barbed end towards the plasma-membrane. A complex protein machinery, referred to as the filopodial tip complex (FTC), promotes actin assembly and tethers the filaments to the membrane. Notwithstanding this, rather little is known about the molecular inventory of the complex and the interplay of its components. As yet Ena/VASP proteins, formins and unconventional myosins have been identified as key factors for the formation of filopodia. However, it is currently unclear how these proteins are recruited to the plasma membrane to form functional complexes mediating actin assembly. In vertebrates several binding partners of Ena/VASP proteins such as lamellipodin, zyxin, vinculin, Prel/RIAM have been identified. Since none of these proteins are expressed in *D. discoideum*, the objective of this work was to characterize the interplay of the known FTC-proteins and identify novel binding partners.

Electron microscopy, analytical ultracentrifugation and dynamic light scattering of murine VASP revealed that tetrameric Ena/VASP proteins are extremely flexible molecules, allowing their intrinsically disordered central region to adopt an elongated conformation of each subunit of up to 25 nm. This flexibility turned out to be critical for proper actin-filament elongation and for protection of the growing barbed-end from capping protein. Moreover, by yeast-two-hybrid assays, AbiA and DdMyosin VII could be identified as binding partners of *Dictyostelium* VASP. The discovered VASP/Abi interaction provided the basis to expand the existing models of lamellipodia and filopodia formation.

Since Abi is a core component of the Scar/WAVE complex, the contribution of each Scar/WAVE complex subunit was analyzed in regard to filopodia formation and cell motility. The genetic elimination of all complex components in

Dictyostelium revealed significantly different phenotypes of the single mutants in regard to their ability to form filopodia and to migrate. These results and the previously described interaction with Ena/VASP proteins therefore suggest a novel role of the Scar/WAVE complex subunits, in addition to their established function of Arp2/3-complex activation during lamellipodia formation. Analytical ultracentrifugation of the Scar/WAVE complex precursor HSPC300 revealed that, like its mammalian ortholog, it forms stable homotrimers. The subsequent formation of 1:1:1 heterotrimers of DdHSPC300, AbiA and Scar was shown by affinity chromatography.

Another part of this work was to analyze the contribution of the single IMD-domain protein DdIRSp53/MIM in *Dictyostelium* to filopodia formation, since this class of proteins is able to bind and deform membranes outwards and modify the actin cytoskeleton by the recruitment of other proteins, for instance N-WASP or Scar/WAVE. Endogenous DdIRSp53/MIM was accumulated at the tips of filopodia and contractile vacuoles, however, the elimination of the protein by gene targeting did neither effect filopodia formation nor the function of the contractile vacuole system. Notably, the mutant showed significant growth defects, both in suspension and when attached to substrates. A closer inspection revealed the inability of the mutant to rapidly change its cell-shape. Taken together, these data suggest that DdIRSp53/MIM operates in a signaling pathway regulating the reorganization of membranes or potentially even the underlying cortical actin cytoskeleton.

Zusammenfassung

Der hochdynamische Auf- und Abbau des Aktinzytoskeletts eukaryontischer Zellen ermöglicht eine fortwährende Anpassung des Zellkörpers an die Umgebung und die Ausbildung diverser Zellfortsätze wie Lamellipodien und Filopodien als Voraussetzung der gerichteten Zellbewegung. Im Gegensatz zum flachen Lamellipodium sind Filopodien stäbchenförmige Zellfortsätze, die durch dicht gepackte, parallel angeordnete Aktinfilamente gebildet werden und an deren schnell wachsendem Ende ein komplexes Zusammenspiel Aktin-

assoziierter Proteine die Filamentelongation unterhalb der Membran reguliert. In *Dictyostelium discoideum* wurden bislang VASP, Formine und unkonventionelle Myosine als zentrale Bestandteile des so genannten Filopodien spitzen-Komplexes (FSK) identifiziert. Jedoch konnte bislang noch nicht abschließend geklärt werden, wie diese Proteine spezifisch an die Plasmamembran rekrutiert werden, um dort funktionale Komplexe zur Assemblierung von Aktinfilamenten zu bilden. Des Weiteren ist bislang nur wenig darüber bekannt wie diese Proteine im FSK miteinander interagieren, oder welche weiteren akzessorischen Proteine an der Filopodienbildung beteiligt sind. Im Säugermodell wurden bereits mehrere Interaktionspartner von Ena/VASP Proteinen, wie z.B. Zyxin, Vinculin, Lamellipodin und Prel/RIAM identifiziert. Da in *D. discoideum* diese Proteine nicht exprimiert werden, sollten in dieser Arbeit die Interaktionen der bekannten FSK-Proteine näher charakterisiert und neue Bindungspartner dieser Proteine in *D. discoideum* identifiziert werden.

Durch Elektronenmikroskopie, analytische Ultrazentrifugation und Dynamische Lichtstreuung konnte am Beispiel des murinen VASP gezeigt werden, dass die Proteine der Ena/VASP Familie hochflexible zentrale Bereiche besitzen, welche auf eine maximale Länge von bis zu 25 nm pro Monomer elongiert werden können. Die außerordentliche Flexibilität dieser Bereiche ist für die Funktion von Ena/VASP Proteinen während der Aktinfilamentelongation, sowie dem Schutz des Plus-Endes wachsender Filamente vor Capping-Proteinen, von zentraler Bedeutung. Des Weiteren konnten durch Yeast-two Hybrid Assays die Proteine DdMyosin VII und AbiA aus *Dictyostelium* als Interaktionspartner von DdVASP identifiziert werden. Die gefundene VASP/Abi-Interaktion bietet eine Möglichkeit die aktuellen Modelle der Lamellipodien- und Filopodienbildung im Bezug auf die Rekrutierung von Ena/VASP Proteinen an die Spitze dieser Zellfortsätze zu erweitern. Da AbiA eine zentrale Rolle in der Assemblierung des Scar/WAVE-Komplexes einnimmt, wurde auch die Rolle der einzelnen Scar/WAVE-Komplexuntereinheiten in der Filopodienbildung und Zellmotilität analysiert. Durch genetischen Knock-out aller Komponenten des Scar/WAVE-Komplexes in *D. discoideum* und die Analyse der Einzelmutanten konnten signifikante

Unterschiede in den Phänotypen, im Bezug auf die Filopodienbildung und Zellmotilität, gezeigt werden. Diese Phänotypen und die Interaktion mit Ena/VASP Proteinen lassen vermuten, dass die Untereinheiten des Scar/WAVE-Komplexes auch an Prozessen außerhalb des klassischen Signalweges der Arp2/3-Komplexaktivierung beteiligt sind. Für die Untereinheit HSPC300 aus *Dictyostelium* konnte durch analytische Ultrazentrifugation gezeigt werden, dass es wie sein Ortholog in Vertebraten Brck1/HSPC300, stabile Homotrimere ausbildet. Die Bildung stabiler 1:1:1 Heterotrimere mit Scar und AbiA konnte nach Koexpression durch Affinitätschromatographie gezeigt werden.

Ein weiterer Aspekt in dieser Arbeit war die Analyse von Proteinen der IMD-Familie bei der Ausbildung von Filopodien. Die Fähigkeit dieser Proteine die Plasmamembran nach außen zu beugen und ihre Interaktion mit Scar/WAVE und N-WASP in Vertebraten war Anlass die Funktion des einzigen Vertreters dieser Familie in *Dictyostelium* DdIRSp53/MIM zu untersuchen. Obwohl endogenes DdIRSp53/MIM an der kontraktiven Vakuole und den Spitzen von Filopodien akkumulierte, führte die Eliminierung von DdIRSp53/MIM weder zu einer Beeinträchtigung der Filopodienbildung, noch zu augenscheinlichen Defekten der kontraktiven Vakuolen. Die null-Mutanten zeigten allerdings sowohl in Suspensionskultur als auch auf festem Substrat einen deutlichen Wachstumsdefekt, sowie eine stark eingeschränkte Fähigkeit zur Kontraktion ihres Zellkörpers. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse somit auf eine Funktion des Proteins bei der dynamischen Reorganisation von Membranen und eventuell auch des kortikalen Aktinzytoskeletts hin.

Schlagworte:

Aktin; Scar/WAVE-Komplex; Ena/VASP; Filopodien; Lamellipodien; Zellmigration

Keywords:

Actin; Scar/WAVE-Complex; Ena/VASP; Filopodia; Lamellipodia; Cell-migration

1	Einleitung	1
1.1	Das Mikrotubuli-System	2
1.2	Das Intermediärfilament-System	3
1.3	Das Aktinfilament-System	3
1.3.1	Aktin-nukleierende Proteine	7
1.3.2	Aktivatoren des des Arp2/3 Komplexes.....	9
1.3.3	Aktinfilament-elongierende Proteine.....	13
1.4	Mechanismus der Lamellipodienbildung	15
1.5	Mechanismus der Filopodienbildung	18
1.6	<i>D. discoideum</i> als eukaryotischer Modellorganismus.....	22
1.6.1	Eigenschaften und Entwicklungszyklus.....	22
1.6.2	Anwendungsmöglichkeiten als Modellorganismus	24
2	Ergebnisse	25
2.1	Strukturanalyse von VASP	25
2.2	Bindungspartner von VASP.....	31
2.2.1	Interaktion von Myosin VII mit DdVASP	31
2.2.2	Neue Bindungspartner der VASP EVH1-Domäne.....	33
2.2.3	DdVASP-EVH1 Pulldown aus Zellysat	40
2.3	Analyse von DdHSPC300	42
2.4	Phänotypische Charakterisierung von Scar/WAVE-Komplex Mutanten .	48
2.4.1	Herstellung von null-Mutanten einzelner Scar/WAVE-Untereinheiten	48
2.4.2	Mikroskopische Analyse der F-Aktin Verteilung	50
2.4.3	Quantifizierung der Filopodien in den Einzelmutanten	52
2.4.4	Zellmotilität der Scar/WAVE-Komplex Einzelmutanten	54
2.5	Filopodienbildung in Abwesenheit des einzigen IMD-Proteins in <i>D. discoideum</i>	56
2.5.1	IRSp53/MIM aus <i>D. discoideum</i>	56
2.5.2	Herstellung DdIRSp53/MIM-spezifischer Antikörper	58
2.5.3	Herstellung von DdIRSp53/MIM-null Zellen	58
2.5.4	Subzelluläre Lokalisation von DdIRSp53/MIM	59
2.5.5	Zellbiologische Charakterisierung von DdIRSp53/MIM-Mutanten	60
3	Diskussion	65
3.1	Die Rolle von MyTH/FERM Myosinen in der Zelle	65
3.2	IRSp53/MIM aus <i>D. discoideum</i>	67

3.3	Die Flexibilität des VASP Moleküls ist eine wesentliche Voraussetzung für seine Funktion	68
3.4	Knock out der Scar/WAVE Komplex Untereinheiten in <i>D. discoideum</i>	70
3.5	Zusätzliche Funktionen des Scar/WAVE-Komplexes	72
3.6	Die Interaktion von Abi mit Ena/VASP Proteinen	74
4	Material und Methoden.....	79
4.1	Material	79
4.1.1	Geräte	79
4.1.2	Enzyme für die Molekularbiologie.....	79
4.1.3	Verwendete polyklonale Antikörper	79
4.1.4	Verwendete monoklonale Antikörper.....	80
4.1.5	Antibiotika.....	80
4.1.6	Reagenzien	80
4.1.7	Verwendete Oligonukleotide	81
4.1.8	Materialien für die Affinitätschromatographie	83
4.1.9	Bakterienstämme	84
4.1.10	<i>Dictyostelium discoideum</i> -Stamm	84
4.2	Mikrobiologische Methoden.....	84
4.2.1	Kultivierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen in axenischem Medium.....	84
4.2.1.1	SM-Agar	84
4.2.1.2	Soerensen-Phosphatpuffer	84
4.2.1.3	Phosphatagarplatten.....	84
4.2.2	Kultivierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen auf Bakterienrasen	85
4.2.3	Sporenernte und Konservierung	85
4.2.4	Einfrieren von <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	86
4.2.5	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen	86
4.2.6	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	86
4.2.6.1	TFB I.....	86
4.2.6.2	TFB II.....	86
4.2.7	Bestimmung der Zellzahl.....	87
4.2.8	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> AH109	88
4.2.8.1	YPDA (Yeast Extract–Peptone–Dextrose plus Adenine medium)	88
4.2.8.2	10x Nitrogen Base	88
4.2.8.3	Synthetic complete drop-out Mix.....	88

4.2.8.4	Synthetic complete drop-out medium	89
4.2.9	Transfektion von <i>S. cerevisiae</i> AH109 (modifiziert LiOAc)	89
4.2.9.1	PLATE Mixture.....	89
4.2.10	Yeast-two-hybrid assay	89
4.3	Molekularbiologische Methoden	90
4.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	90
4.3.2	PCR-Mutagenese.....	91
4.3.3	PCR-Screening von <i>Dictyostelium</i> -Mutanten	91
4.3.4	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	93
4.3.4.1	Lösung 1	93
4.3.4.2	Lösung 2	93
4.3.4.3	Lösung 3	93
4.3.4.4	Puffer QBT.....	93
4.3.4.5	Puffer QC.....	93
4.3.4.6	Puffer QF	93
4.3.5	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	94
4.3.5.1	DNA-Probenpuffer	94
4.3.5.2	10x Loeningpuffer	94
4.3.6	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	95
4.3.6.1	10x CIAP-Puffer.....	95
4.3.7	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen	95
4.3.8	Ligation von DNA	95
4.3.9	Herstellung von Knock-out Konstrukten für <i>Dictyostelium</i>	95
4.4	Zellbiologische Methoden.....	96
4.4.1	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	96
4.4.2	Transformation von <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	97
4.4.2.1	Healing-solution	97
4.4.2.2	Elektroporationspuffer.....	97
4.4.3	Positive Selektion klonaler <i>D. discoideum</i> -Zellen auf <i>K. aerogenes</i> Phosphatagar	98
4.4.4	Wachstumsgeschwindigkeit von <i>D. discoideum</i> -Zellen in Flüssigkultur	98
4.4.5	Wachstumsgeschwindigkeit von <i>D. discoideum</i> -Zellen auf <i>K. aerogenes</i> Agarplatten	99
4.4.6	Quantifizierung der Motilität von <i>D. discoideum</i> -Zellen	99

4.5	Proteinbiochemische Methoden	99
4.5.1	Herstellung polyklonaler Antikörper aus Kaninchen	99
4.5.1.1	PBS Waschpuffer	99
4.5.1.2	Kopplungspuffer.....	99
4.5.1.3	Basischer Waschpuffer	100
4.5.1.4	Sauer Waschpuffer	100
4.5.2	Fluoreszenzfärbung fixierter <i>D. discoideum</i> -Zellen	101
4.5.2.1	Gelvatol (100 ml)	101
4.5.2.2	Pikrinsäure/Paraformaldehyd-Fixierung.....	101
4.5.3	Reinigung von Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	102
4.5.3.1	LB-Medium	102
4.5.3.2	LB-rich Medium.....	102
4.5.3.3	10x PBS.....	102
4.5.3.4	PBS Lysepuffer.....	103
4.5.3.5	Protease Inhibitor Cocktail 100x	103
4.5.3.6	GST-Elutionspuffer	103
4.5.3.7	MBP-Elutionspuffer.....	103
4.5.4	Spaltung und Abtrennung von GST aus Fusionsproteinen	105
4.5.5	Tris/Glycin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	106
4.5.5.1	Sammelgel.....	106
4.5.5.2	Trenngel 10%	106
4.5.5.3	3x SDS-Probenpuffer.....	106
4.5.5.4	10x Laufpuffer.....	106
4.5.6	Tris/Tricin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	107
4.5.6.1	Tricin Gelpuffer	107
4.5.6.2	Tricin-Sammelgel.....	107
4.5.6.3	Tricin-Trenngel 16%	107
4.5.6.4	3x SDS-Probenpuffer.....	107
4.5.6.5	10x Anodenpuffer	107
4.5.6.6	10x Kathodenpuffer	108
4.5.7	Coomassie-Blau-Färbung	108
4.5.7.1	Färbelösung.....	108
4.5.7.2	Entfärber	108
4.5.8	Silberfärbung von Proteinen nach SDS-PAGE.....	109

4.5.8.1	Lösung 1	109
4.5.8.2	Lösung 2	109
4.5.9	Western-Blot und Detektion von Proteinen	109
4.5.9.1	Transferpuffer	109
4.5.9.2	10x NCP	110
4.5.9.3	Blockpuffer	110
4.5.10	Pulldown	111
4.5.10.1	PD Puffer	111
4.6	Biophysikalische Methoden	112
4.6.1	Analytische Ultrazentrifugation	112
4.6.2	Volumenaustauschchromatographie	113
4.6.3	Ionenaustauschchromatographie	113
4.6.3.1	Niedrigsalzpuffer	114
4.6.3.2	Hochsalzpuffer	114
4.6.4	Dynamische Lichtstreuung	115
5	Literaturverzeichnis	116
6	Aminosäuresequenzen der untersuchten Proteine	136
6.1	AbiA	136
6.2	hAbi1	136
6.3	DdHSPC300	136
6.4	Nap1	136
6.5	PirA	137
6.6	Scar	138
6.7	DdVASP	138
6.8	mVASP	138
6.9	hVASP	138
6.10	DdIRSp53/MIM	139
6.11	DdMyosin VII	139

µm	Mikrometer
APS	Amoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-ondolyl-phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	kodierende DNA
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-octan
DMSO	Dimethylsufoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
GAR	"goat-anti-rabbit"
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalaktopyranosid
k	Kilo
LB	Luria-Bertani-Medium
mAb	monoklonaler Antikörper
min	Minute(n)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute

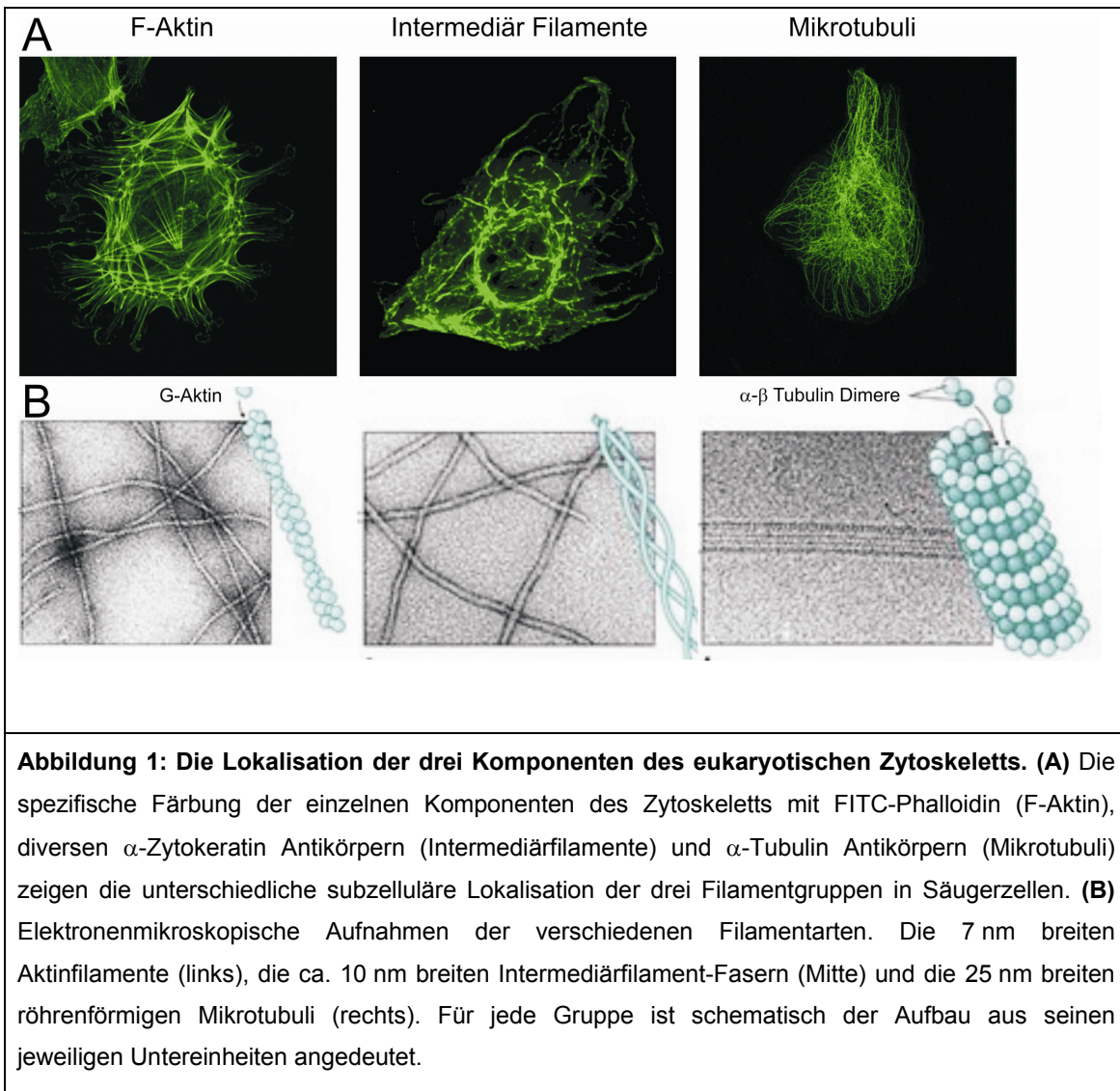
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylphosphat
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyrhodamin-isothiocyanat
Tween20	Polyethylen-sorbitan-monolaurat
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

Eukaryotische Zellen sind in der Lage ihrer Morphologie aktiv zu verändern und so auf externe Signale zu reagieren und sich äußeren Bedingungen anzupassen. Dies befähigt sie, sich z.B. gerichtet auf einem Substrat fortzubewegen (Motilität), die Form der Zelle gegen äußere Kräfte zu erhalten, die Zellteilung durchzuführen (Zytokinese), Nährstoffe in Form von Partikeln oder Flüssigkeiten aufzunehmen (Endozytose) und entstandene Stoffwechselprodukte auszuschleusen (Exozytose). Die eukaryotische Zelle ist von filamentären Strukturen durchzogen, die in ihrer Gesamtheit als das Zytoskelett bezeichnet werden. Die beteiligten Proteine können in drei Gruppen unterteilt werden (Abbildung 1):

- Das Mikrotubuli-Zytoskelett (siehe 1.1),
- das Intermediärfilament-Zytoskelett (siehe 1.2) und
- das Aktin-Zytoskelett (siehe 1.3).

Obwohl die verschiedenen Filamente aus unterschiedlichen Proteinen aufgebaut sind, liegt allen jedoch das gleiche Bauprinzip zugrunde, nämlich die Polymerisation monomerer Proteine zu faserartigen Strukturen. Die Filamente sind keine statischen Gebilde, sondern können durch Polymerisation wachsen oder durch Depolymerisation schrumpfen. Die ständige Dynamik zwischen Assemblierung und Dissoziation der Filamente des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts wird in erster Linie durch regulatorische Proteine bestimmt. Die wesentlich stabileren Intermediärfilamente dienen hauptsächlich der mechanischen Stabilisierung der Zelle.



1.1 Das Mikrotubuli-System

Allein im menschlichen Proteom sind mehr als Hundert paraloge Isoformen der etwa 55 kDa schweren und 450 Aminosäuren langen Tubuline bekannt, welche in sechs Hauptgruppen (α , β , γ , δ , ϵ , ζ) eingeteilt werden. Die bekanntesten Formen des Tubulins, die α - und β -Tubuline, sind Hauptbestandteil der Mikrotubuli (Li et al., 2002).

α - und β -Tubulin bilden Heterodimere, auch Protofilamente genannt, und sind in der Lage sich zu helikalen Hohlkörpern mit einem Durchmesser von 25 nm, den so genannten Mikrotubuli zusammenzulagern. Für eine Drehung dieser Helix sind 13 Protofilamente nötig. Ursprungspunkt dieser Mikrotubuli sind die „microtubule organizing center“ (MTOC) (Mandelkow et al., 1977). Die Elongation der Filamente findet ausgehend vom Zentrosom durch den Einbau neuer Untereinheiten am

wachsenden Ende statt. Die Filamente sind polar, was den gerichteten Transport von Vesikeln und Organellen (Stamer et al., 2002) durch die Motorproteine Kinesin (Block et al., 1990) und Dynein (Hayden, 1988) in beide Richtungen ermöglicht. Während der Zytokinese sind Mikrotubuli am Aufbau des Spindelapparats beteiligt und sorgen für die Teilung der Chromosomen (Kerssemakers et al., 2006; Mandelkow et al., 1986).

γ -Tubulin hingegen ist kein Baustein der Mikrotubuli. Es ist an der Nukleation neuer Mikrotubuli am Zentrosom und den Polkörpern beteiligt. γ -Tubulin bildet dabei einen großen ringförmigen Proteinkomplex mit weiteren Proteinen. Dieser sogenannte „ γ -Tubulin-Ring-Complex“ (γ TuRC) kann die Polymerisation von α - und β -Tubulin zur Bildung von Mikrotubuli induzieren (Mandelkow et al., 1986). Die weit weniger charakterisierten Isoformen δ - und ϵ -Tubulin findet man in den Zentriolen tierischer Zellen. Es wird vermutet, dass sie eine Rolle bei der Ausbildung der Mitosespindel spielen (Nogales et al., 2010).

1.2 Das Intermediärfilament-System

Intermediärfilamente haben einen Durchmesser von ca. 10 nm und sind bisher nur in höheren Eukaryonten beschrieben worden. Die Familie der Intermediärfilamente setzt sich aus fünf Klassen zusammen, Typ1 sind die sauren Keratine, Typ2 die basischen Keratine, Typ3 Desmin, Gliaproteine, Vimentin und Peripherin, Typ4 die neuronalen Intermediär-Filamente und Typ5 die Kernlamine (Franke, 1987; Hofmann et al., 1991). Das gemeinsame Strukturmerkmal dieser Klasse von Filamenten ist die α -helikale Anordnung zu Dimeren und die Organisation dieser Dimere zu Tetrameren als so genanntes Protofilament (Quinlan et al., 1986). Da sie deutlich stabiler als Mikrotubuli und Aktinfilamente sind, können sie besser mechanische Zugkräfte aufnehmen und dienen aus diesem Grund hauptsächlich der mechanischen Stabilisierung der Zellen.

1.3 Das Aktinfilament-System

Das Aktin-Zytoskelett erlaubt es eukaryotischer Zellen ihre Morphologie aufrecht zu erhalten, ermöglicht die Motilität und ist die Grundlage weiterer fundamentaler zellulärer Prozesse wie der Exo-/Endozytose, dem intrazellulären Transport sowie der Adhäsion an das Substrat (Chhabra and Higgs, 2007; Faix and Grosse, 2006; Le Clainche and Carlier, 2008) (Abbildung 2).

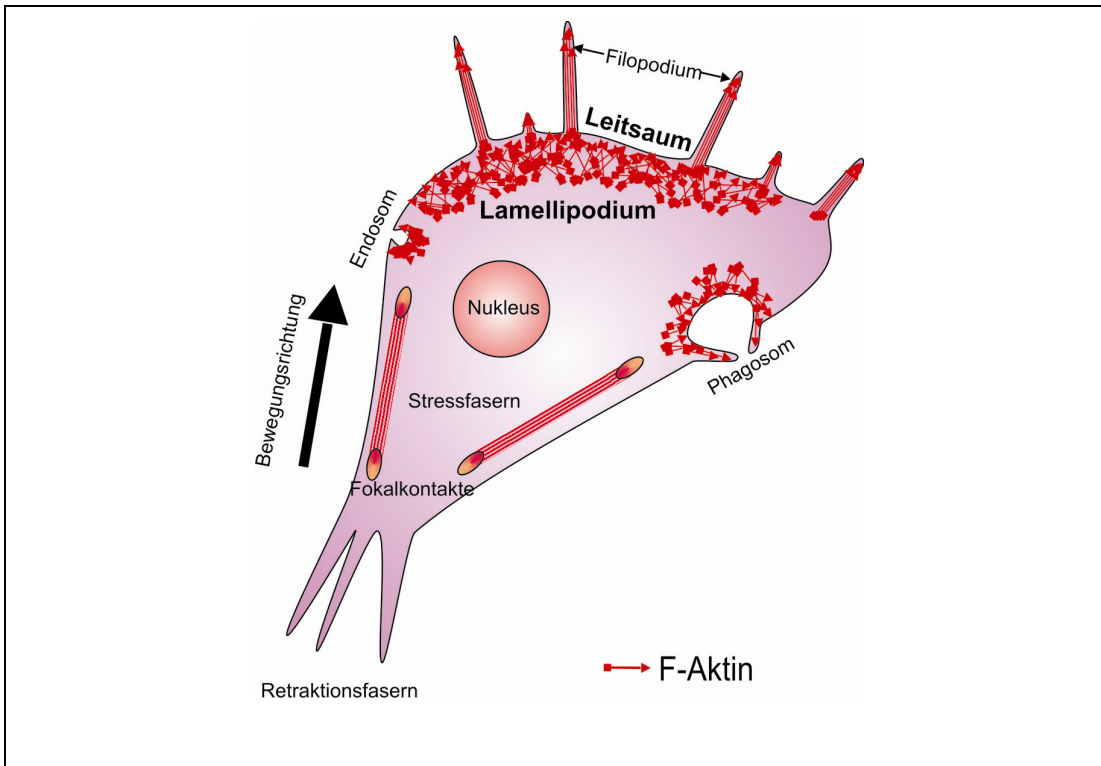


Abbildung 2: Schematische Darstellung F-Aktin enthaltender Strukturen in Säugerzellen.

Das Lamellipodium, auch Leitsaum der Zelle genannt, ist eine flächige Ausstülpungen der Plasmamembran, die ein dichtes Netzwerk von Aktinfilamenten enthält, die mit ihrem Plusende zur Plasmamembran zeigen. Bei Amöben wird das Lamellipodium als Pseudopodium bezeichnet. Die Aktinpolymerisation in diesen Strukturen schiebt die Membran nach außen und leistet so den für die Fortbewegung nötigen Vorschub. Die fingerförmigen Filopodien dagegen bestehen aus dicht gepackten parallelen Aktinfilamenten und dienen der Zelle unter anderem als sensorische Organe und adhäsive Strukturen an das Substrat. Fokalkontakte verbinden Stressfasern und fungieren ebenfalls als Anhaftpunkte an das Substrat und tragen so zur Zellbewegung bei. Die Ausbildung von Endo- und Phagosomen ist die Grundlage um Nährstoffe aus der Umgebung aufzunehmen. Die F-Aktin ummantelten Endosomen werden nach ihrer Abschnürung von der Membran internalisiert und ihr Inhalt dem Stoffwechsel der Zelle zugeführt.

Aktinfilamente (auch Mikrofilamente) sind Fasern mit 7 nm Durchmesser, die aus monomerem globulärem Aktin (G-Aktin) mit einem Molekulargewicht von 42 kDa aufgebaut sind. G-Aktin besteht aus vier Domänen, wobei durch die spezielle Konformation von zwei der Domänen eine Bindungstasche entsteht, in der ATP sowie Magnesium mit sehr hoher Affinität gebunden werden kann (Schuler, 2001). Aktinfilamente besitzen eine strukturelle und kinetische Polarität, d.h. sie weisen ein schnell wachsendes Plus-Ende (barbed end) und ein langsam wachsendes Minus-

Ende (pointed end) auf (Welch and Mullins, 2002). An Mg^{2+} ATP gebundenes G-Aktin wird am Plus-Ende in das Aktinfilament eingebaut. Dabei wird das ATP hydrolysiert und anorganisches Phosphat (P_i) freigesetzt, was zur Destabilisierung des F-Aktins führt. Die Affinität des ADP-gebundenen Aktins zum Filament am Plus-Ende ist im Vergleich zu ATP-gebundenem Aktin vermindert (Korn et al., 1987), und das ATP wird schnell in ADP und Orthophosphat hydrolysiert, so dass am Minus-Ende ADP-Aktin dissoziiert (Pollard and Borisy, 2003). Das ADP-Aktin-Monomer wird dann wiederum mit ATP beladen und zurück zum Plus-Ende transferiert, wo es erneut an das Aktinfilament polymerisiert.

Die spontane Nukleation von Aktin ist ein thermodynamisch ungünstiger und relativ langsamer Prozess. Bei der spontanen Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin werden drei Phasen unterschieden. In der ersten Phase erfolgt eine Aktivierung des G-Aktins durch mono- und divalente Kationen wie K^+ oder Mg^{2+} . In der Nukleationsphase bildet G-Aktin sogenannte Nukleationskeime. Da die Bildung von Nukleationskeimen thermodynamisch ungünstig ist, stellt die Nukleation den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Aktinpolymerisation dar. Das Gleichgewicht der Reaktion zweier Aktin-Monomere zu einem Aktin-Dimer bzw. dreier Aktin-Monomere zu einem Aktin-Trimer liegt weit auf der Seite der Rückreaktion. Der kleinste stabile Nukleus ist das Aktin-Tetramer (Chesarone and Goode, 2009; Padrick et al., 2008). Stabile Nukleationskeime werden *in vitro* spontan zu filamentösem Aktin polymerisiert, so dass Filamente die stabilste Form des Aktins sind (Pollard et al., 2001). Eine Verlängerung der Nukleationskeime in der dritten Phase der Elongation, kann nur erfolgen, wenn die Aktinkonzentration über der sogenannten kritischen Konzentration von $K_d = 0,1 \mu M$ liegt. Sie ist definiert als die Konzentration an G-Aktin, die bei stabilem Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin vorliegt. Für das Plus-Ende konnte eine K_d von $0,1 \mu M$ für das Minus-Ende eine K_d von $0,6 \mu M$ gemessen werden (Pollard et al., 2000). Dementsprechend findet die Elongation des Filaments bevorzugt am Plus-Ende statt. Am Ende der Polymerisation stellt sich ein Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin ein. Aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten der Aktinuntereinheiten für die beiden Enden des Filaments ist dieses Gleichgewicht durch die Depolymerisation von Untereinheiten vom Minus-Ende und einer Polymerisation von Untereinheiten an das Plus-Ende des Filaments gekennzeichnet. Dieses „Hindurchwandern“ der Aktinuntereinheiten durch das Filament wird als „tread-milling“ bezeichnet (Pollard, 1990).

Bestimmungen der G-Aktinkonzentrationen in Nicht-Muskelzellen ergaben Werte zwischen 30 μM bei *Acanthamoeba* (Pollard, 1976) und etwa 300 μM bei Makrophagen aus Kaninchen (Stossel and Hartwig, 1976). Die Aktinkonzentration bei *D. discoideum* liegt bei etwa 200 μM (Condeelis and Taylor, 1977; Janson et al., 1991). In *D. discoideum* wird Aktin durch 17 Gene kodiert (Joseph et al., 2008). In Muskelzellen macht Aktin sogar einen Anteil von bis zu 20 % am Gesamtprotein der Zelle aus. Ein wesentlicher Teil des Aktins umspannt die Zelle als dichtverzweigtes Netzwerk aus Filamenten im Zellkortex unterhalb der Plasmamembran. Obwohl die ionischen Bedingungen in der Zelle eine nahezu vollständige Polymerisation bewirken sollten (Pollard et al., 2000; Zigmond, 1989), sind Zellen aufgrund ihres großen Repertoires an Aktin-bindenden Proteinen in der Lage, ihren F-Aktin Gehalt so zu regulieren, dass nur etwa 50% des gesamten Aktins als Polymer vorliegt.

Die Aktin-bindenden Proteine lassen sich in diverse Gruppen einteilen: Proteine, die (1) die Nukleation von Aktin begünstigen, (2) die Elongation der Filamente katalysieren, (3) die Depolymerisation der Filamente steuern, (4) die mit monomerem Aktin assoziieren, (5) die Enden der Aktinfilamente verkappen und (6) die Aktinfilamente quervernetzen.

ADF(*Actin depolymerising factor*)/Cofilin kann sowohl monomeres als auch F-Aktin binden und beschleunigt die Depolymerisation gealterter ADP-Aktin Untereinheiten im Filament (Blanchoin et al., 2000a; Blanchoin et al., 2000b). Neben der Funktion als Depolymerisationsfaktor besitzt es auch eine Fragmentierungsaktivität und kann so unter bestimmten Bedingungen die Konzentration an Plus-Enden für die Aktinpolymerisation erhöhen (Paavilainen et al., 2004).

Profilin bindet monomeres Aktin mit hoher Affinität und katalysiert dabei den Austausch von ADP zu ATP im G-Aktin (Perelroizen et al., 1996). Im Zusammenspiel mit ADF/Cofilin verstärkt es die Geschwindigkeit des Filament-Umbaus im Treitmühlenmechanismus, da es ATP-gebundenes Aktin an das Plus-Ende anfügt, während ADF/Cofilin die Dissoziation am Minus-Ende vermittelt (dos Remedios et al., 2003). Außerdem verhindert es die Hydrolyse des an Aktin gebundenen ATPs, so dass die Aktin-Monomere in einem thermodynamisch günstigen Zustand für die Polymerisation vorliegen.

Thymosin β 4 ist ein sehr kleines Protein welches bevorzugt an ATP-G-Aktin bindet. Auf diese Weise erzeugt es ein Reservoir an ATP-gebundenen Aktin-Molekülen für

die spätere Polymerisation (Carlier and Pantaloni, 1994; Goldschmidt-Clermont et al., 1992; Hertzog et al., 2004; Pantaloni and Carlier, 1993).

Fragmentierungsproteine binden seitlich an F-Aktin und erzeugen Brüche in den Aktinfilamenten. Gelsolin schneidet nach seiner Aktivierung durch z.B. Ca^{2+} das Filament in zwei Teile (Kwiatkowski, 1999; Laine et al., 1998). Danach verbleibt das Gelsolin-Molekül am Plus-Ende des neu entstandenen Filaments haften und verkappt es (Cooper and Schafer, 2000). Villin verfügt neben seiner Fragmentierungsfunktion über eine F-Aktin-Bündelungsaktivität (Pope et al., 1994).

Capping-Proteine können Aktinfilamente am Plus- sowie am Minus-Ende bedecken, was die Polymerisation bzw. die Depolymerisation verhindert. Durch das Verkappen des Plus-Endes, wird eine weitere Anlagerung von G-Aktin unterbunden (Schafer and Cooper, 1995). Die bekanntesten Vertreter dieser Klasse sind CapG oder heterodimeres Capping Protein CapZ (Kueh et al., 2008; Schafer and Cooper, 1995). F-Aktin Vernetzungsproteine oder cross-linker sind Proteine, die die dreidimensionale Organisation von Aktinfilamenten kontrollieren. Drei Vertreter aus *D. discoideum* sind α -Actinin (Witke et al., 1993), Cortexillin (Faix et al., 1996) und Fimbrin (Prassler et al., 1997).

Die *de novo* Nukleation von Aktinfilamenten wird z.B. durch z.B. den Arp2/3-Komplex oder Formine katalysiert während ihre Elongation von Forminen oder Ena/VASP Proteinen vermittelt wird. Die Nukleation und Elongation von Filamenten wird in den Kapiteln 1.3.1 und 1.3.2 detailliert beschrieben.

1.3.1 Aktin-nukleierende Proteine

Die in Zellen zeitlich und räumlich streng regulierte Initiation der Aktinpolymerisation erfordert spezifische Aktin-Nukleatoren um den inhibitorischen Effekt der oben angeführten G-Aktin-sequestrierenden Proteine zu überwinden. Bislang konnten fünf Proteinfamilien identifiziert werden, welche Aktin nukleieren und somit den Ausgangspunkt für ein neues Filament bilden können. Zu dieser stetig wachsenden Familie der Aktin-nukleierenden Proteine gehören der Arp2/3 Komplex, die Formine, sowie die erst kürzlich entdeckten Proteine Spire, Cordon-bleu und Leiomodin (Ahuja et al., 2007; Chereau et al., 2008; Pruyne et al., 2002; Quinlan et al., 2005; Sagot et al., 2002; Welch et al., 1997). Der erste und bislang am besten charakterisierte Aktin-Nukleator ist der Arp2/3-Komplex (Machesky et al., 1997; Mullins et al., 1997). Er besteht aus sieben Untereinheiten, von welchen Arp2 and Arp3 (Actin-related

proteins), große Ähnlichkeiten mit der Struktur von Aktin aufweisen (Robinson et al., 2001). Der grundlegende Mechanismus der Arp2/3-vermittelten Aktinnukleation wurde bereits kurz nach seiner Entdeckung aufgeklärt. Nach seiner Aktivierung durch sogenannte "nucleation promoting factors" (NPFs), wie Scar/WAVE and WASP (1.3.2) bindet der Arp2/3-Komplex an die Seite oder Spitze bereits existierender Filamente an der Plasmamembran und nukleiert ein Tochterfilament, das durch die Elongation der beiden Aktin-verwandten Untereinheiten Arp2 und Arp3 Y-förmig im einem Winkel von etwa 70° zu wachsen beginnt (Mullins et al., 1997; Mullins et al., 1998; Svitkina and Borisy, 1999; Welch et al., 1998) (Abbildung 7).

Formine fördern die Aktinnukleation durch einen gänzlich anderen Mechanismus. Die katalytischen C-terminalen FH2-Domänen dieser dimeren Multidomänen-Proteine scheinen eine nur sehr geringe Affinität für G-Aktin zu besitzen. Formine nukleieren Aktin, indem sie die thermodynamisch instabilen Aktin-Dimere und Trimere durch Interaktion mit ihrer FH2-Domäne stabilisieren (Chesarone and Goode, 2009; Chesarone et al., 2010).

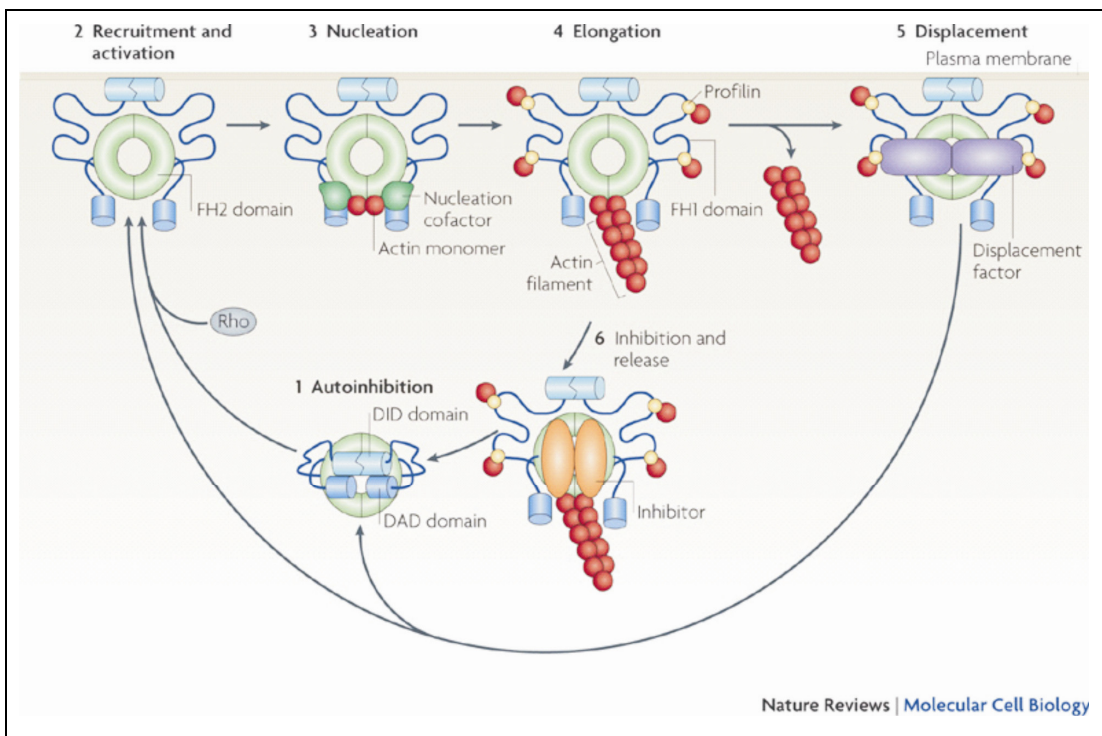


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mechanismus der Forminvermittelten F-Aktin Elongation. (1) Formin Dimere liegen durch die Interaktion ihrer N-terminalen Diaphanous inhibitory domain (DID) und ihrer C-terminalen Diaphanous autoregulatory domain (DAD) autoinhibiert im Cytosol vor. (2) Durch kleine RhoGTPasen und andere Faktoren werden die inaktiven Dimere an die Plasmamembran rekrutiert und dort aktiviert. Dies führt zur Freisetzung

der ringförmigen Formin-homology 2 (FH2)- und der benachbarten DAD-Domäne, die DID bleibt mit der Plasmamembran assoziiert. Diese Konformation erlaubt die Rekrutierung von G-Aktin als Startpunkt der Nukleation. **(3)** Die FH2 Domäne stabilisiert thermodynamisch ungünstige Zwischenschritte der Aktinnukleation. Einige Formine benötigen für eine effiziente Nukleation zusätzlich G-Aktin bindende Kofaktoren. **(4)** Das Dimere Formin bleibt mit seiner FH2-Domäne prozessiv am Plus-Ende des neu gebildeten Filaments gebunden und verlängert dieses aktiv durch den Einbau neuer Untereinheiten. Die flexiblen Formin-homology 1 (FH1)-Domänen rekrutieren Profilin Aktin Komplexe und beschleunigen somit die Filamentelongation **(5)** Die Interaktion der FH2 mit einem Formininhibitions Faktor lässt das Formin von dem neu gebildeten Filament dissoziieren. Das Dimer bleibt weiterhin an der Membran gebunden. **(6)** Alternativ dissoziiert das Formin von der Membran, bleibt aber vorerst an das gebildete Filament gebunden. (Adaptiert aus:(Chesarone et al., 2010))

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zum Arp2/3-Komplex ist, dass Formine nach Nukleation neuer Filamente kontinuierlich mit dem wachsenden Plus-Ende assoziiert bleiben und das Filament durch den Einbau weiterer Aktinuntereinheiten verlängern. Monomeres G-Aktin für die Filamentelongation wird hier durch die Bindung von Profilin-Aktin-Komplexen an die der FH2 vorgelagerten prolinreichen FH1-Domäne rekrutiert (Paul and Pollard, 2009; Pollard, 2007)(Abbildung 3).

1.3.2 Aktivatoren des des Arp2/3 Komplexes

Da der gereinigte Arp2/3 intrinsisch inaktiv ist (Goley and Welch, 2006; Pollard, 2007) benötigt dieser zusätzliche Faktoren zur Aktivierung. Diese Proteine werden als Nukleationsfördernde Faktoren (NPF) bezeichnet, und können aufgrund spezifischer Sequenzmotive in zwei Untergruppen unterteilt werden (Stradal and Scita, 2006; Welch and Mullins, 2002) (Abbildung 4). Die Klasse 1 NPFs beinhalten eine C-terminale VCA-Domäne, bestehend aus einer G-Aktin bindenden Verprolin (V) oder WASP homology 2 (WH2) Domäne, einem als "connector (C)" bezeichnetem zentralen Motiv und einer Abfolge saurer Aminosäuren (A), welche mit dem Arp2/3 Komplex interagieren. Die Klasse 2 NPFs, hier exemplarisch am Beispiel von Cortactin gezeigt, interagieren ebenfalls über einen sauren Abschnitt mit dem Arp2/3 Komplex, binden aber bevorzugt F-Aktin anstelle von monomerem Aktin (Cosen-Binker and Kapus, 2006; Daly, 2004).

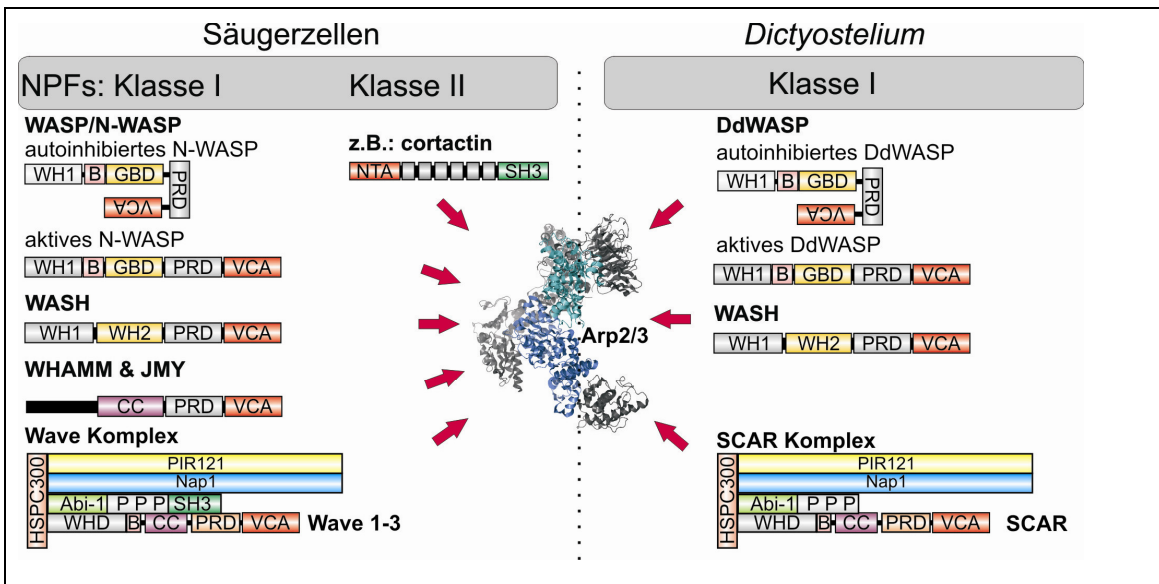


Abbildung 4: Schematischer Überblick und Domänenorganisation von NPFs in Säugerzellen und *Dictyostelium*. NPFs der Klasse I besitzen eine C-terminale VCA Domäne, welche den Arp2/3 Komplex aktiviert und G-Aktin binden kann. Die NPFs der Klasse II dagegen, hier am Beispiel des Cortactins, sind wesentlich schwächere Aktivatoren und binden F-Aktin anstatt G-Aktin. Sie binden und aktivieren den Arp2/3 über ihre N-terminale NTA Domäne. Im Gegensatz zur großen Anzahl an NPFs in Säugerzellen, wurden in *Dictyostelium* nur eine begrenzte Anzahl an NPFs der Klasse I identifiziert (DdWASP, ein WASP-ähnliches Protein, ein WASH-Ortholog und Scar) NPFs der Klasse II konnten bislang nicht in *Dictyostelium* gefunden werden. Abkürzungen: WH1 (WASP-homology 1 domain); B (basische Region); GBD (GTPase-binde Domäne); PRD (Prolin-reiche Domäne); V oder WH2 (verprolin- oder WASP-homology 2 domain); C (connector); A (acidic-motif); CC (coiled coil); SH3 (Src-homologe Domäne 3); WHD (WAVE homologe Domäne); NTA (N-terminal acidic domain)

Die bekanntesten und effektivsten Aktivatoren des Arp2/3 Komplexes gehören zu der Familie der Wiskott-Aldrich Syndrom Proteine (WASP) und der suppressor of cyclic AMP receptor/WASP family verprolin homologous (Scar/WAVE)-Proteine (Stradal and Scita, 2006; Takenawa and Suetsugu, 2007). WASP wurde im Zusammenhang mit der Erkrankung Wiskott-Aldrich Syndrom identifiziert (Ochs and Notarangelo, 2005) und wird im Gegensatz zum ubiquitären N-WASP nur im hematopoetischem System exprimiert. Nach der Entdeckung von WASP konnten die Scar/WAVE Proteine durch die Suche nach Homologien zur WASP VCA-Domäne identifiziert werden (Miki et al., 1998). NPFs liegen bis zu ihrer Aktivierung durch kleine RhoGTPasen ebenfalls in inaktiver Form vor, dies kann entweder durch Autoinhibition bei WASP/N-WASP oder Maskierung funktioneller Bereiche durch andere Proteine wie im Fall von Scar/WAVE bewerkstelligt sein (Derivery et al.,

2009). Nach ihrer Aktivierung wird die saure C-terminale Domäne (A) zugänglich und bindet an den Arp2/3-Komplex, um diesen durch eine Konformationsänderung sowie die Rekrutierung eines Aktin-Monomers zu aktivieren (Abbildung 5) (Padrick et al., 2008; Pollard and Beltzner, 2002; Robinson et al., 2001). Der Arp2/3 Komplex bildet nun einen stabilen Nukleationskeim aus, welcher die Grundlage für ein neues Aktinfilament bildet. Die Rekrutierung zusätzlicher Aktin-Monomere durch die WH2-Domäne der NPFs ist ein entscheidender Schritt in der Nukleation, da der Arp2/3 Komplex selbst nur eine geringe Affinität zu G-Aktin hat (Welch and Mullins, 2002). Die Familie der Scar/WAVE Proteine sind die hauptsächlichen NPFs in aktinbasierten Zellfortsätzen wie dem Lamellipodium und dem aufgekräuselterm Leitsaum (ruffles) und lokalisieren prominent an deren Spitzen (Hahne et al., 2001; Innocenti et al., 2004; Miki et al., 1998; Steffen et al., 2004).

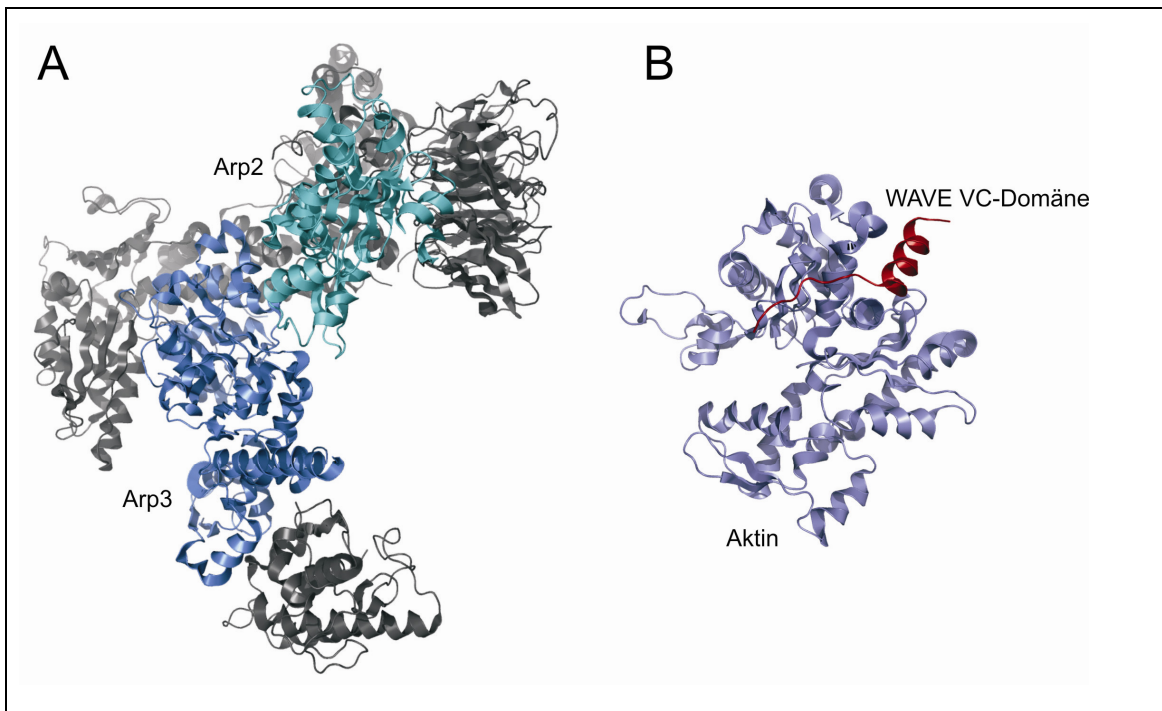


Abbildung 5: Der Arp2/3 Komplex bildet nach Aktivierung durch ein NPF einen Nukleationskeim. A) Röntgenstruktur des heteroheptameren Arp2/3-Komplexes aus Bos Taurus (PDB: 3DXK). Arp2 (türkis) und Arp3 (blau) bilden zusammen mit einem durch den NPF rekrutierten Aktin-Monomer einen trimeren Nukleationskeim. **B)** Röntgenstruktur eines Aktin-Monomers, das an die WH2-Domäne von humanem WAVE gebunden ist (PDB: 2A40). Das Aktin-Monomer (blau) bindet an die WH2- oder V-Domäne aus WAVE (rote Helix). Die connector Region C (rote Linie) ermöglicht der C-terminalen sauren Domäne (nicht dargestellt) die Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex. Durch diese Bindung wird der Arp2/3-Komplex aktiviert. Arp2, Arp3 und das monomere Aktin bilden somit einen Arp2-Arp3-Aktin-Nukleationskeim aus, wobei Aktin zum ersten Glied im Tochterfilament wird.

Im Säugersystem kodieren drei Gene für WAVE Proteine, wobei WAVE2 ubiquitär exprimiert wird, WAVE1 und WAVE3 dagegen sind eher gewebespezifisch im Gehirn zu finden (Sossey-Alaoui et al., 2003). In *Dictyostelium* konnte ebenfalls ein WAVE-Protein identifiziert werden (Bear et al., 1998). Zusätzlich wurden durch das *Dictyostelium*-Genomprojekt noch drei WASP-ähnliche Proteine entdeckt (Eichinger et al., 2005) (Abbildung 4). NPFs der Klasse 2 sind in *Dictyostelium* nicht bekannt. Knock-out und Knock-down Experimente konnten zeigen, dass die Ausbildung von Lamellipodien ohne einen funktionalen Scar/WAVE Komplex stark eingeschränkt ist (Innocenti et al., 2004; Rogers et al., 2003; Steffen et al., 2004; Steffen et al., 2006; Yamazaki et al., 2003; Yan et al., 2003).

Obwohl der Mechanismus der Arp2/3-Komplex Aktivierung durch WASP und Scar/WAVE nahezu identisch ist, unterscheidet die beiden Proteinklassen jedoch der Mechanismus ihrer Regulation. In Abwesenheit aktivierender Faktoren, ist WASP inaktiv, da es durch die intramolekulare Interaktion seiner VCA mit der zentralen GTPase-Bindedomäne (GBD) inaktiv gehalten wird (Kim et al., 2000; Prehoda et al., 2000). Im Gegensatz zu WASP ist das isolierte Scar/WAVE Protein konstitutiv aktiv (Eden et al., 2002; Innocenti et al., 2004; Machesky et al., 1999). Die Reinigung von nativem WAVE1 aus Rinderhirn zeigte, dass WAVE1 mit vier anderen Proteinen assoziiert vorliegt. Die Aufreinigungen von WAVE2 und WAVE3 bestätigten diesen Befund (Eden et al., 2002; Gautreau et al., 2004; Stovold et al., 2005).

Eine weitere Analyse zeigte, dass dieser Proteinkomplex aus den fünf verschiedenen Untereinheiten Specifically Rac1-associated protein 1 (Sra-1 oder Pir121), Nck-associated protein (Nap), Abl interactor (Abi) und Scar/WAVE, sowie einem 9 kDa Peptid Brck-1 oder HSPC300 besteht (Gautreau et al., 2004; Stradal et al., 2004; Takenawa and Suetsugu, 2007). In Säugerzellen existieren mit Ausnahme von Brck1/HSPC300 mehrere Isoformen und alternative Splicevarianten und bilden vermutlich verschiedene WAVE Komplexe mit unterschiedlichen Aufgaben (Gautreau et al., 2004; Innocenti et al., 2005; Stovold et al., 2005; Suetsugu et al., 2003). Ohne Berücksichtigung der alternativen Splicevarianten ergeben sich bereits daraus bis zu 36 mögliche Variante des Scar/WAVE Komplexes (Derivery et al., 2009). Bislang ist nicht vollständig geklärt wie die Aktivierung des Scar/WAVE-Komplexes verläuft und ob die Inaktivierung von Scar/WAVE Proteinen die einzige Funktion der Komponenten des Scar/WAVE-Komplexes ist.

1.3.3 Aktinfilament-elongierende Proteine

Zu den F-Aktin elongierenden Proteinen gehören neben der Familie der Formine, die Mitglieder der enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein (Ena/VASP)-Familie (Breitsprecher et al., 2008; Dominguez, 2009). VASP und Ena aus *D. melanogaster* sind die namensgebenden Proteine der Ena/VASP-Familie. VASP wurde 1990 als Substrat der Protein Kinasen A (PKA) und C (PKC) entdeckt (Halbrugge et al., 1990). In Vertebraten wird neben VASP und Ena auch zusätzlich noch ein als Ena/VASP-like (EVL) bezeichnetes Protein exprimiert. Alle Mitglieder dieser Familie lokalisieren in Zonen aktiver Aktinpolymerisation, wie etwa dem Leitsaum der Zelle, der Spitze wachsender Filopodien sowie fokaler Kontaktstellen (Gertler et al., 1996; Lanier et al., 1999; Laurent et al., 1999; Reinhard et al., 1992; Rottner et al., 1999). In Abwesenheit des einzigen Vertreters der Ena/VASP Familie in *Dictyostelium*-Zellen können diese keine Filopodien mehr ausbilden. Ähnliches konnte auch in neuronalen Zellen beobachtet werden, nachdem alle drei Mitglieder der Ena/VASP Familie eliminiert wurden (Dent et al., 2007; Han et al., 2002; Mattila and Lappalainen, 2008; Schirenbeck et al., 2006). Darüber hinaus konnten längere Aktinfilamente bei steigender, bzw. die Bildung wesentlich verkürzter Filamente bei verringerter Konzentration im Lamellipodium beobachtet werden (Bear et al., 2002). Neben ihrer Relevanz für Aktin-basierte Prozesse wie die Zellmigration, die Zell-Adhesion und die intrazelluläre Bewegung von Pathogenen wie z.B. *Listeria* (Laurent et al., 1999), ist der molekulare Mechanismus der Ena/VASP Proteine bisher nicht vollständig aufgeklärt. Alle Mitglieder dieser Familie zeigen einen ähnlichen Aufbau und können in drei Bereiche unterteilt werden (Abbildung 6): eine N-terminale Ena/VASP-homology 1 Domäne (EVH1), einen zentralen prolinreichen Abschnitt (PRD) und eine C-terminale Ena/VASP-homology 2 Domäne (EVH2). Die globuläre etwa 113-115 AS lange und ca. 15 kDa schwere EVH1-Domäne bindet spezifisch an prolinreiche Motive der Konsensussequenz (D/E)F/W/Y/LPPPP(D/E), im weiteren als FP₄-Motiv bezeichnet, und ist für die subzelluläre Lokalisation der Proteine verantwortlich (Ball et al., 2002; Peterson and Volkman, 2009; Renfranz and Beckerle, 2002). Das FP₄ Motiv wurde erstmals in dem Oberflächenprotein ActA aus *Listeria monocytogenes* identifiziert. Es rekrutiert Ena/VASP Proteine über die Bindung ihrer EVH1-Domäne, um sich intrazellulär durch gezielte Aktinpolymerisation fortzubewegen (Niebuhr et al., 1997). In Säugerzellen konnten bereits weitere Interaktionspartner der EVH1-Domäne identifiziert werden. Zu diesen zählen Vinculin (Reinhard et al., 1996), Zyxin

(Reinhard et al., 1995), Tes als Interaktionspartner von Mena (Boeda et al., 2007) und Abi1 (Dittrich et al., 2010). Dennoch konnte bislang nicht geklärt werden, welches Protein Ena/VASP-Proteine an die Spitze von Lamellipodien bzw. Filopodien rekrutiert.

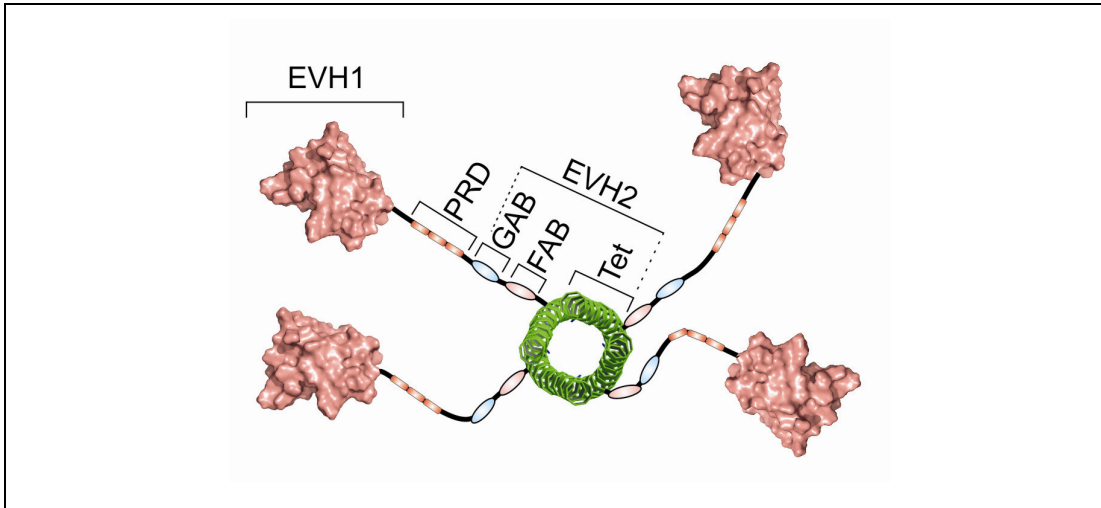


Abbildung 6: Schematische Darstellung des VASP Tetramers als Beispiel für die Proteine der Ena/VASP Familie. Die für die Lokalisation verantwortliche EVH1 Domäne hier aus humanem VASP (PDB: 1EGX) ist als berechnete Oberfläche dargestellt. Die durch Röntgenstrukturanalyse gelöste Struktur der Tetramerisationsdomänen (PDB: 1USD) ist als grüne Helix gezeigt. Die flexiblen Abschnitte zwischen der N- und C-terminalen Domäne sind als schwarze Linien gezeigt. Dieser hochflexible Bereich beinhaltet zwei WH2-artige Domänen für die Bindung an F- und G-Aktin (FAB rosa, GAB blau) sowie einen prolinreichen Abschnitt PRD (rote Quadrate) für die Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen.

Die C-terminale EVH2-Domäne ist für die Tetramerisierung verantwortlich und beinhaltet zudem zwei Aktin-bindende WASP-homology 2 Domänen (WH2-Domänen), wobei die N-terminale präferenziell mit G-Aktin (GAB) und die C-terminale mit F-Aktin (FAB) interagiert (Chereau and Dominguez, 2006). Eine *in vitro* Studie konnte zudem zeigen, dass die FAB in der Lage ist Aktinfilamente zu nukleieren und zu bündeln (Laurent et al., 1999). Eine neuere Studie, in der gezeigt werden konnte, dass *Dictyostelium* VASP-null Mutanten nach Expression einer VASP-Mutante ohne FAB-Motiv weiterhin nicht in der Lage waren Filopodien auszubilden, stützt diesen Befund (Schirenbeck et al., 2006). Die zentrale PRD enthält eine Abfolge von Motiven, meist in der Form GPPPPP (GP₅), welche auch in Forminen zu finden sind und dort spezifisch Profilin-Aktin-Komplexe für die Aktin-Filamentelongation rekrutieren (Chesarone et al., 2010). Aktuelle Röntgenstrukturen

dieser Motive im Komplex mit Profilin legen nahe, dass G-Aktin über diese Bereiche direkt der GAB für die Filamentelongation zur Verfügung gestellt werden kann (Ferron et al., 2007). Vor kurzem veröffentlichte *in vitro* Untersuchungen zum Mechanismus der VASP-vermittelten Filamentelongation haben erstaunlicherweise ergeben, dass VASP im Gegensatz zu den Forminen lediglich G-Aktin, nicht aber Profilin-Aktin-Komplexe für die beschleunigte Filamentelongation benötigt (Breitsprecher et al., 2008). Des Weiteren ist die Rekrutierung und Anhäufung mehrerer VASP-Tetramere an die Zellmembran essentiell für dessen Funktion (Breitsprecher et al., 2008).

1.4 Mechanismus der Lamellipodienbildung

Der SCAR/WAVE-Komplex ist ein Bindeglied im konservierten Signalweg der Rho-GTPase-vermittelten Aktivierung des Arp2/3-Komplexes in verschiedenen Organismen, wie z.B. im Menschen, *Drosophila melanogaster* und in *Dictyostelium discoideum*. Die durch den SCAR/WAVE-Komplex induzierte und durch den Arp2/3-Komplex vermittelte Nukleation von Aktin unterhalb der Plasmamembran im Leitsaum der Zelle ist die treibende Kraft für die Assemblierung von Aktin in Lamellipodien, und ermöglicht die gerichtete Zellbewegung. Ältere Modelle, wie das dendritische Nukleationsmodell (Abbildung 7), postulierten die Bindung des Arp2/3-Komplexes an bereits bestehende Filamente, um so die Grundlage für ein neu wachsendes Filament zu bilden (Svitkina and Borisy, 1999). Aktuelle Studien legen allerdings nahe, dass das Aktin-Netzwerk in Lamellipodien nicht zwingend aus verzweigten Filamenten, sondern aus nicht parallel wachsenden Filamenten aufgebaut ist (Small et al., 2008; Urban et al., 2010) (Abbildung 8). Ein maßgeblicher Aktivator des Arp2/3 Komplexes in Lamellipodien und Effektor kleiner RhoGTPasen wie Rac1, ist der Scar/WAVE-Komplex. Nach Aktivierung des Arp2/3-Komplexes und Rekrutierung zusätzlicher G-Aktin Untereinheiten durch NPFs, bildet dieser einen Nukleationskeim als Grundlage für ein neues Filament aus. Die schnellwachsenden Plus-Enden dieser Filamente werden durch Filamentelongatoren wie Ena/VASP oder Formine verlängert und üben dabei eine vorwärtstreibende Kraft auf die darüber liegende Plasmamembran aus (Pollard and Borisy, 2003).

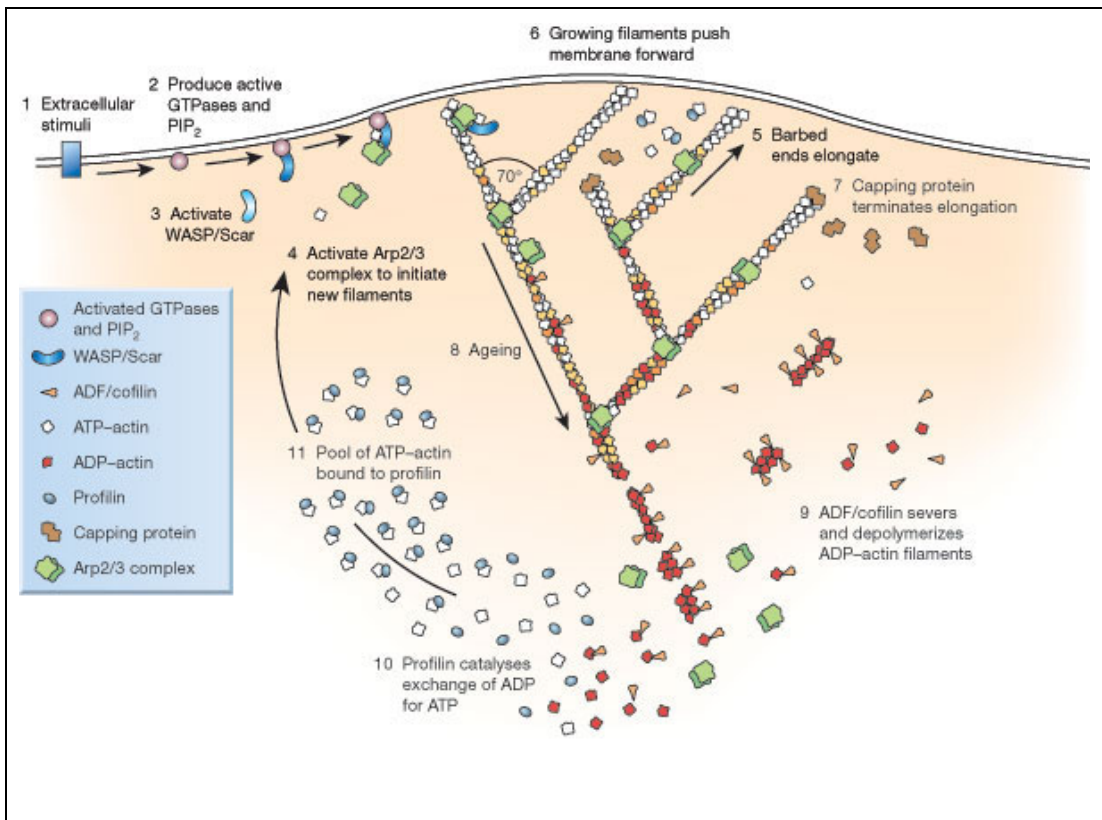
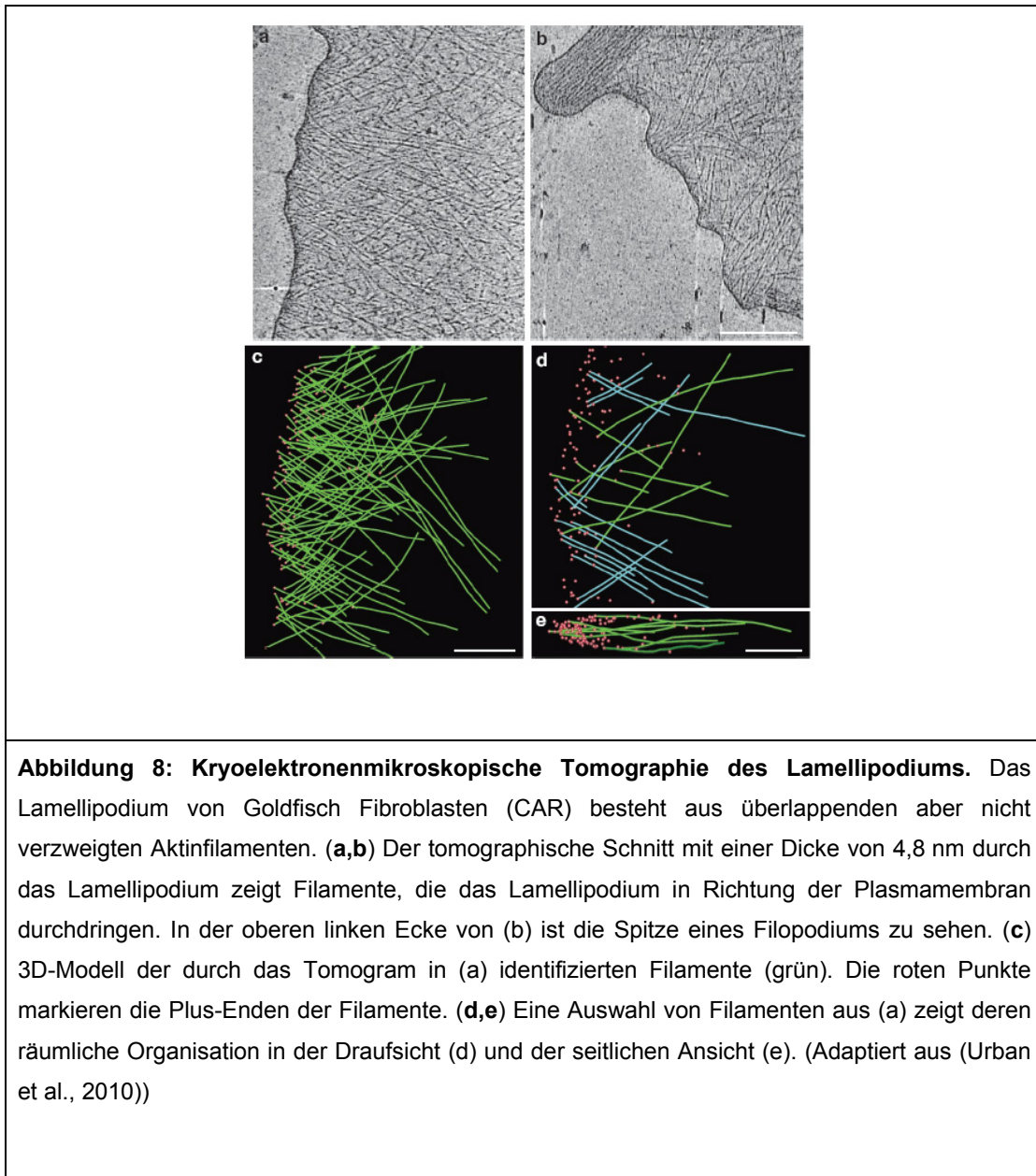


Abbildung 7: Lamellipodienbildung nach dem dendritischen Nukleationsmodell. Externe Signale **(1)** werden über spezifische Signalwege von GTPasen und anderen Signalmolekülen weitergeleitet und führen zur Aktivierung von Signalmolekülen **(2)**. Dieses führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von NPFs wie WASP und Scar/WAVE **(3)** welche dann den Arp2/3-Komplex aktivieren. Der Arp2/3-Komplex kann nun seitlich an existierende Filamente binden und dort den Nukleationskeim für ein neu entstehendes Filament bilden **(4)**. Die neu entstandenen Filamente werden durch den Einbau von ATP-Aktin Untereinheiten aus dem zytosolischen Pool von Profilin-Aktin-Komplexen schnell elongiert **(5)**. Die wachsenden Filamente erzeugen die benötigte Kraft unterhalb der Plasmamembran um diese nach außen zu schieben **(6)**. Capping-Proteine binden schließlich das wachsende Plus-Ende der Filamente und verhindern einen weiteren Einbau von G-Aktin **(7)**. ADF/Cofilin bewirkt schließlich die Depolymerisation gealterter ADP-Aktinfilamente **(8,9)**. An diesem Punkt katalysiert Profilin nun den Austausch von ADP zu ATP in den Untereinheiten. Das ATP-Aktin bleibt an Profilin gebunden und erneuert so den Vorrat an polymerisationskompetentem ATP-Aktin. (Adaptiert aus (Pollard, 2003))

Für die Rekrutierung von VASP an die Membran sind wiederum Adapterproteine wie das Lamellipodin in Lamellipodien (Krause et al., 2004) oder Vinculin und Zyxin in fokalen Adhäsionen erforderlich (Burrige and Mangeat, 1984; DeMali et al., 2002; Reinhard et al., 1995; Reinhard et al., 1996).

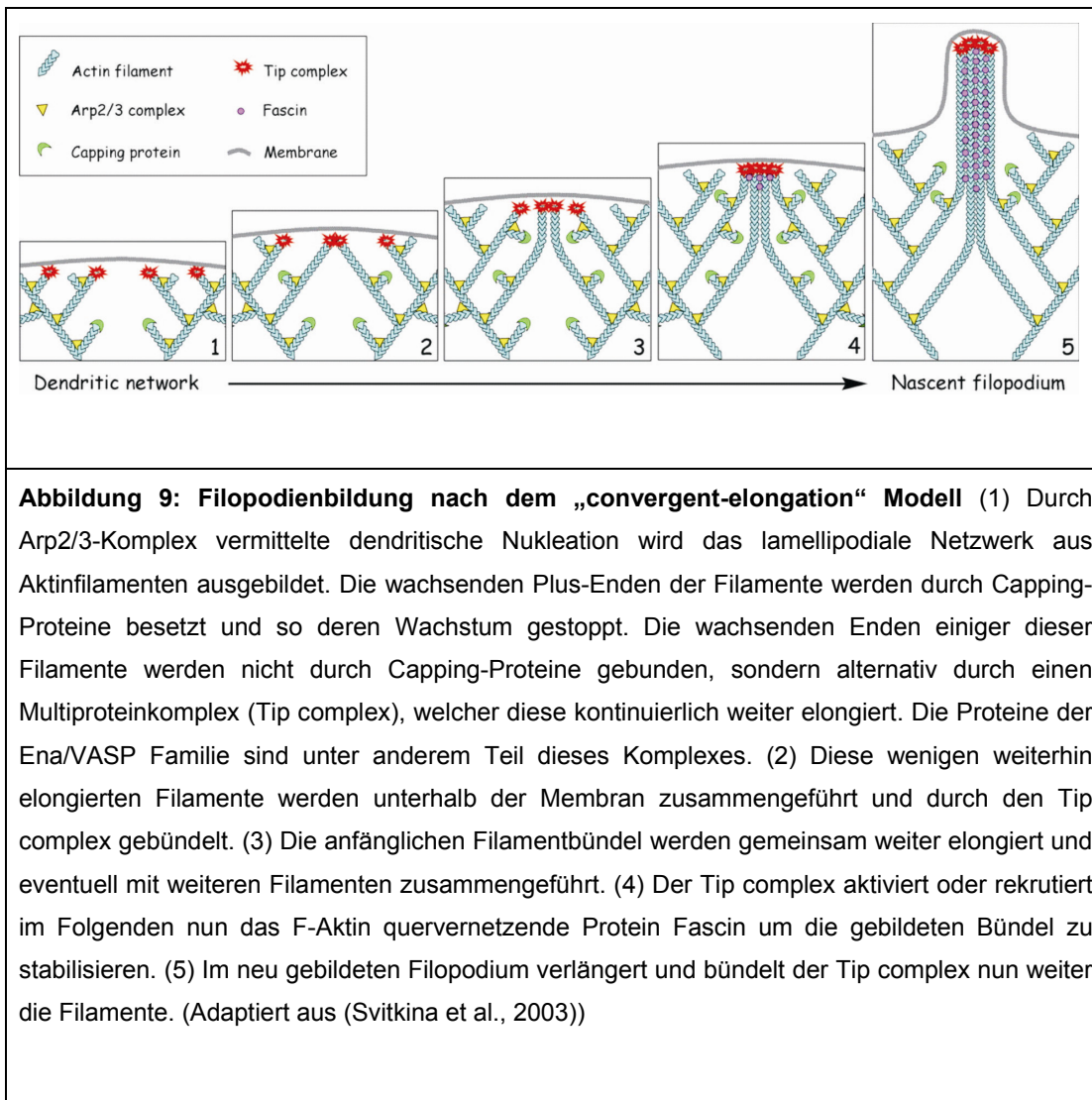


Zusammengenommen ergeben diese Daten ein Modell, nach dem die Aktivierung der Rho-GTPase Rac1 eine Signalkaskade anschaltet, welche zur Aktivierung des Scar/WAVE-Komplexes und zu dessen Rekrutierung an die Membran führt. Nach dessen Rekrutierung an die Membran bindet und aktiviert der Scar/WAVE-Komplex dort seinerseits den Arp2/3-Komplex, was zur Nukleation von Aktin in der Spitze des Lamellipodiums führt (Lai et al., 2008; Steffen et al., 2004; Stradal et al., 2004; Stradal and Scita, 2006). Nachfolgend werden die kurzen Filamente durch Ena/VASP Proteine und Formine verlängert. Die Aktinpolymerisation erlaubt eine räumlich definierte Verformung der Plasmamembran und ermöglicht es den Zellen eine

gerichtete Fortbewegung auf dem Substrat auszuführen. Der molekulare Mechanismus der Ausbildung von Lamellipodien oder auch Pseudopodien und deren Aufkräuseln „ruffling“ ist wesentlich besser verstanden, als die Ausbildung der fingerförmigen Filopodien.

1.5 Mechanismus der Filopodienbildung

Im Gegensatz zu Lamellipodien, welche aus einem dichten Netzwerk an filamentösem Aktin gebildet werden (Pollard and Borisy, 2003; Small et al., 2002; Steffen et al., 2006), bestehen die fingerförmigen Filopodien aus membranumhüllten Bündeln dicht gepackter, paralleler Aktinfilamente die ebenfalls mit ihrem Plus-Ende zur Membran zeigen. Diese Membranausstülpungen wachsen häufig aus dem Lamellipodium heraus. (Faix et al., 2009; Gupton and Gertler, 2007; Mattila and Lappalainen, 2008). Elektronenmikroskopische Aufnahmen konvergierender Aktinfilamente aus dem Lamellipodium zu Bündeln und die daraus folgende Bildung von Mikrospikes und Filopodien (Small, 1981; Small et al., 1982) führten zu der Annahme, die parallelen Aktinbündel der Filopodien würden im Netzwerk des Lamellipodiums rekrutiert (Svitkina et al., 2003). Dieses „convergent elongation“-Modell (Abbildung 9) leitet sich aus verschiedenen biochemischen und zellbiologischen Experimenten ab, und führte zu der Annahme, Filopodien entstünden durch Arp2/3-Komplex vermittelte Nukleation als Ziel einer Signalkette ausgehend von Cdc42 und der Aktivierung des NPF N-WASP (Martinez-Quiles et al., 2001; Miki et al., 1998). Aktuellere Arbeiten haben allerdings gezeigt, dass weder der Arp2/3-Komplex, noch N-WASP für die Bildung von Filopodien benötigt werden (Lommel et al., 2001; Nicholson-Dykstra and Higgs, 2008; Snapper et al., 2001; Steffen et al., 2006). N-WASP ist stattdessen eher an der Endozytose und dem Vesikeltransport beteiligt (Benesch et al., 2005; Innocenti et al., 2005; Merrifield et al., 2004). In *D. discoideum* ist das Formin dDia2, welches Filamente unabhängig vom Arp2/3-Komplex gleich wohl nukleieren und elongieren kann, für die Bildung von Filopodien maßgeblich verantwortlich (Faix and Rottner, 2006; Schirenbeck et al., 2005; Schirenbeck et al., 2005). Im Säugersystem konnten bereits ähnliche Beobachtungen mit orthologen Proteinen, im speziellen mit mDia2, gemacht werden (Faix and Grosse, 2006; Pellegrin and Mellor, 2005; Yang et al., 2007; Block et al. 2008).



Durch den Knock-down des Arp2/3-Komplexes und Knock-out des Scar/WAVE-Komplexes konnte allerdings mittlerweile gezeigt werden, dass der Arp2/3-Komplex zwar für die Lamellipodien-, nicht aber für die Filopodienbildung von essentieller Bedeutung ist. Somit spricht vieles dafür, dass Filopodien nicht notwendigerweise ihren Ursprung im Netzwerk des Lamellipodiums haben (Steffen et al., 2006).

Diese Erkenntnisse führten zu einer neuen Theorie über den Mechanismus der Filopodienbildung. Die aktuelle Theorie zum Mechanismus der Filopodienbildung setzt nun die *de novo* Nukleation von Aktinfilamenten durch Nukleatoren wie die Formine voraus (Block et al., 2008; Urban et al., 2010), zudem erfolgt das Zusammenführen der Plus-Enden nun aktiv durch beteiligte Proteine und nicht mehr nur zufällige (Abbildung 10). Die beteiligten Filamente müssen dann durch F-Aktin quervernetzende Proteine gebündelt werden um anschließend vom so genannten

Filopodienspitzenkomplex (FSK) elongiert werden zu können. Der FSK bezeichnet ein bislang nicht vollständig aufgeklärtes Zusammenspiel verschiedener Proteine, die durch Lokalisations- und Funktionsstudien an der Spitze wachsender Filopodien gefunden wurden und die maßgeblich deren Bildung beeinflussen. Zu den bereits identifizierten Proteinen im Organismus *Dictyostelium* gehören dDia2, DdMyosinVII und DdVASP (Faix et al., 2009).

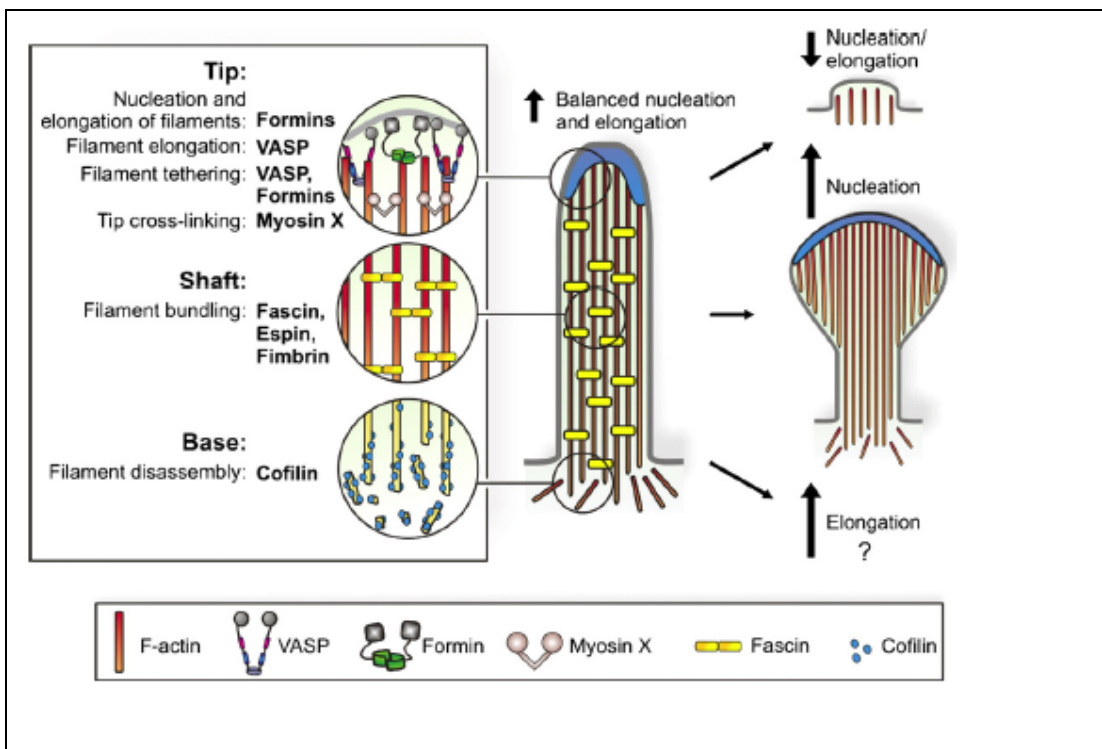
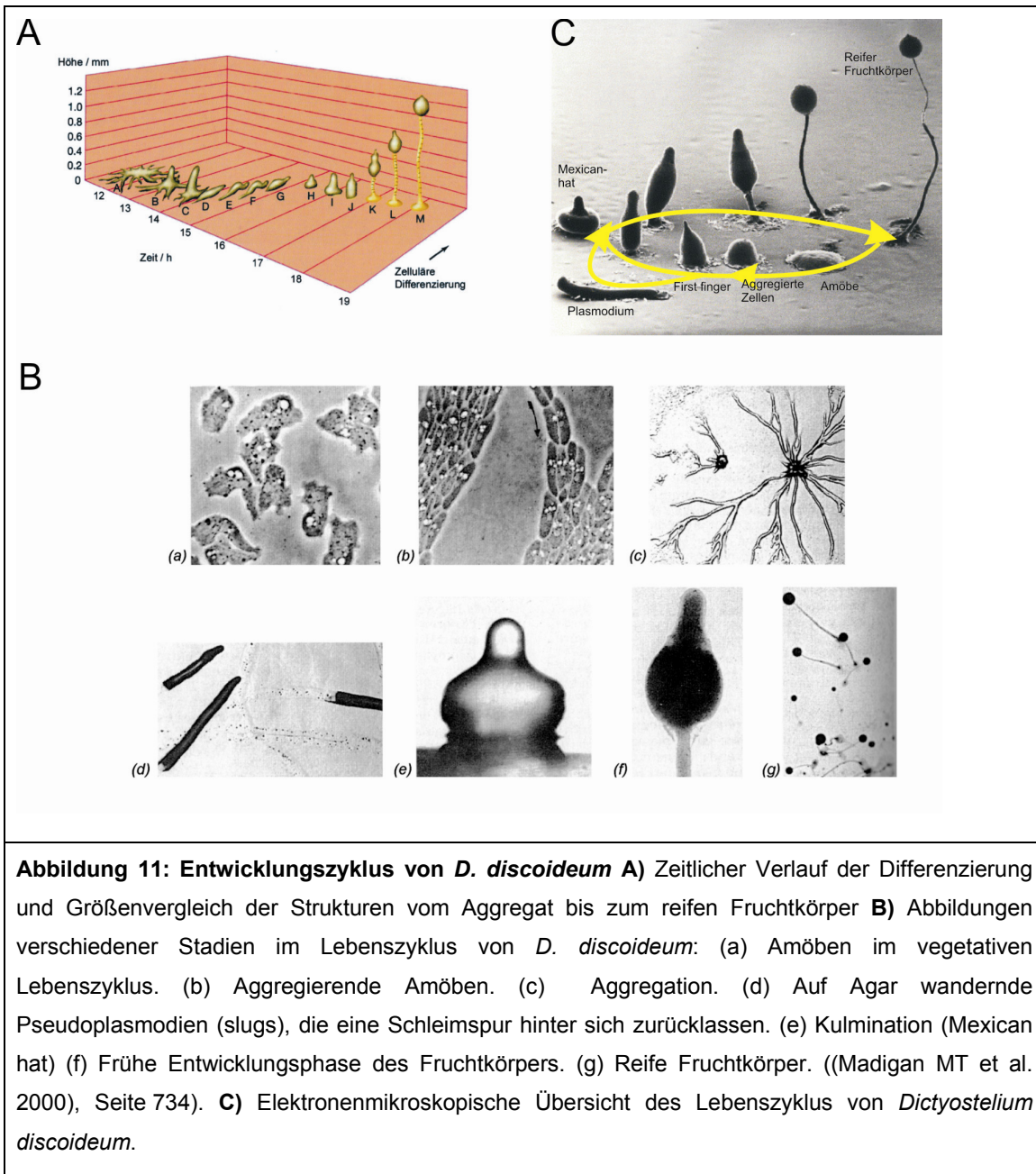


Abbildung 10: Zusammenfassung grundlegender Prozesse der Filopodienbildung. Zu Beginn der Filopodienbildung steht die *de novo* Nukleation von Aktinfilamenten durch Nukleatoren wie z.B. Formine. Die Elongation der Filamente und die Anhaftung an die Plasmamembran erfolgt im Anschluss durch elongierende Faktoren wie die Ena/VASP Proteine, und/oder die Formine. Die Bündelung und Stabilisierung der Filamente wird von Aktinquervernetzenden Proteinen übernommen, welche hier durch Espin, Fimbrin und Fascin repräsentiert werden (Vignjevic et al., 2006). Myosin X übernimmt möglicherweise unterhalb des FSK, während der Elongation und Retraktion, ebenfalls eine filamentbündelnde Funktion. Die Retraktion des Filopodiums, bzw. der gebündelten Filamente könnte durch Cofilin und zusätzliche Faktoren bewerkstelligt werden (Kueh et al., 2008). Dieses strikt regulierte Zusammenspiel der verschiedenen Proteinklassen erlaubt abhängig von der Balance zwischen Elongation und Retraktion die Ausbildung der fingerförmigen Membranfortsätze. Ein Eingriff in das Gleichgewicht, z.B. durch die Überexpression eines dauerhaft aktivierten Formins führte zur Ausbildung von keulenförmigen „Filopodien“ mit stark verbreiterter Spitze (Block et al., 2008). (Adaptiert aus (Faix et al., 2009))

Die Akkumulation des tetrameren VASP Moleküls am Leitsaum und in der Spitze wachsender Filopodien (Rottner et al., 1999; Svitkina et al., 2003) und die Möglichkeit jeder der vier einzelnen Untereinheiten, neben G-Aktin auch F-Aktin zu binden legte nahe, dass das Zusammenführen der Plus-Enden zu Beginn der Filopodienbildung durch Ena/VASP übernommen werden kann (Breitsprecher et al., 2008). Da Fascin an den gebündelten Filamenten der Filopodien lokalisiert (Adams, 2004; Nemethova et al., 2008) und sein Knock-down in B16-Melanom Zellen zu einer starken Beeinträchtigung der Filopodienbildung führte (Vignjevic et al., 2006), ist die Vermutung naheliegend, dass Fascin durch Bündelung von Aktinfilamenten zur Stabilität des Filopodiums beiträgt. Dies wird zudem durch elektronenmikroskopische Beobachtungen gestützt, welche zeigten dass Fascin auch im Lamellipodium zu finden ist und dort Aktinfilamente zu parallelen Bündeln zusammenführt, um so die Ausbildung von Mikrospikes und Filopodien zu ermöglichen (Small et al., 2002). Ein weiteres wichtiges Protein der Filopodienbildung ist das Motorprotein Myosin VII aus *Dictyostelium* bzw. sein Ortholog Myosin X in Säugerzellen (Faix et al., 2009). Der genetische Knock-out dieses Motorproteins in *Dictyostelium* unterbindet, wie auch in VASP- oder dDia2-null Zellen, die Bildung von Filopodien nahezu vollständig (Tuxworth et al., 2001). Die Überexpression im Säugermodell und in *D. discoideum* hingegen führt zu einer deutlich vermehrten Bildung von Filopodien (Berg and Cheney, 2002).

1.6 *D. discoideum* als eukaryotischer Modellorganismus

1.6.1 Eigenschaften und Entwicklungszyklus



Dictyostelium discoideum ist ein zellulärer Schleimpilz, dessen taxonomische Einordnung nach wie vor kontrovers diskutiert wird. Nach klassischer Taxonomie wird er zum Reich der Protisten, Stamm Amoebozoa, Ordnung Dictyosteliida gezählt. Heute werden Schleimpilze jedoch als eigene Gruppe angesehen, da sie

phänotypische Eigenschaften sowohl von Pilzen (Lebenszyklus, Sporenbildung) als auch von Protozoen (Bewegung) zeigen.

Natürliches Habitat von *D. discoideum* ist absterbendes Pflanzenmaterial, beispielsweise der Waldböden. Als Nahrung dienen vor allem andere Mikroorganismen, besonders Bakterien, die phagozytiert werden. Unter günstigen Nahrungsbedingungen verbleibt *D. discoideum* in einem vegetativen Lebenszyklus als selbstständige einzellige Amöbe und teilt sich mitotisch. Die Amöben sind sehr beweglich und reagieren chemotaktisch auf Folsäure und cAMP. Auch sexuelle Differenzierung durch Bildung von Makrozysten ist möglich (Saga and Yanagisawa, 1982).

Geht die Nahrung zur Neige, wird ein Differenzierungsprogramm initiiert, das zur Ausbildung eines vielzelligen Organismus führt. Nach einer Hungerperiode, beginnen die Zellen rhythmisch cAMP als chemotaktischen Lockstoff zu sezernieren. Benachbarte Zellen reagieren chemotaktisch auf cAMP und werden zur eigenen cAMP-Abgabe stimuliert, wodurch eine fortgeleitete Welle von cAMP entsteht (Malchov et al., 1972). Phosphodiesterasen bauen das extrazelluläre cAMP wieder ab. Dieses Regelsystem lässt die Zellen aus größerer Entfernung auf ein Aggregationszentrum zuwandern. Das Aggregat legt sich nachfolgend auf die Seite und wird als slug oder Pseudoplasmodium bezeichnet (Abbildung 11 B/C). In einem solchen wurmähnlichen Gebilde (Größe 1 - 2 mm) sind etwa $1 \cdot 10^5$ Zellen enthalten. Dieses wandert in Richtung des Lichts, wobei es eine Schleimspur hinterlässt. Während der Wanderung beginnen sich die Zellen zu differenzieren. Sobald das Pseudoplasmodium eine günstige Stelle erreicht hat, wird ein Stiel mit einem Fruchtkörper gebildet: Die Zellen im anterioren Teil des Pseudoplasmodiums differenzieren zu Stielzellen und die restlichen 80% der Zellen werden zu Sporenzellen. Im Rahmen der Kulmination vakuolisieren die Stielzellen, geben eine Celluloseschicht ab und bilden einen festen Stiel. Auf der Spitze sitzt der Sporenkopf mit den reifen Sporenzellen, der bei Berührung zerplatzt. Die Sporenzellen sind von einer widerstandsfähigen Kapsel umgeben, durch die die Sporen vor Umwelteinflüssen geschützt bleiben. Unter günstigen Bedingungen können die einzelnen Sporenzellen wieder auskeimen und den vegetativen Lebenszyklus einleiten (Madigan MT et al. 2000).

1.6.2 Anwendungsmöglichkeiten als Modellorganismus

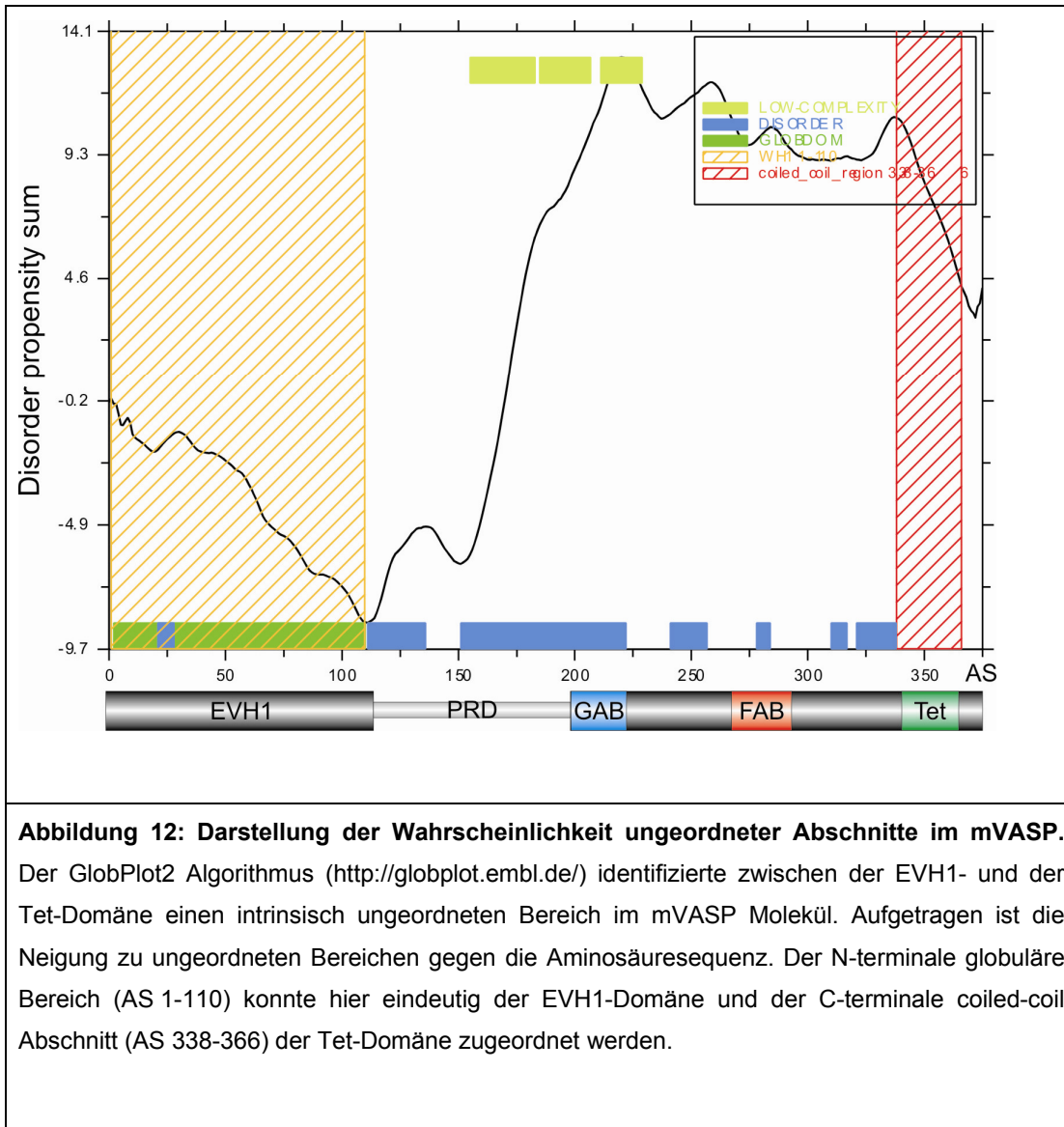
D. discoideum ist ein eukaryontischer Mikroorganismus dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Es umfasst 12500 Gene, hat eine Größe von insgesamt 34 Mbp und ist auf 6 Chromosomen verteilt (Eichinger et al., 2005). *D. discoideum* stellt ein exzellentes System für genetische, biochemische und insbesondere für zell- und entwicklungsbiologische Fragestellungen dar. Vor allem die Möglichkeit der Anwendung vielfältiger molekulargenetischer Techniken und die einfache Gewinnung großer Mengen von Zellen während jedes Stadiums der Entwicklung erlauben experimentelle Ansätze, wie sie bezüglich der biochemischen und zellbiologischen Kombination in keinem anderen Modellorganismus möglich sind. Aufgrund seiner ausgeprägten Motilität und Endozytose wird er für die Erforschung von Struktur, Regulation und Dynamik des Zytoskeletts gegenüber der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) bevorzugt. Darüber hinaus wird *D. discoideum* auch für die Untersuchung von Signaltransduktion, Zellentwicklung und Zell-Zell-Adhäsion verwendet (Soldati, 2003).

Der Stamm des Laborwildtyps Ax2 kann aufgrund von Mutationen in der Kopplungsgruppe II (axe A2, axe C2) und III (axe B2) in Flüssigmedium axenisch kultiviert werden. Unter Laborbedingungen werden *Dictyostelium*-Zellen auf Agarplatten mit einem Bakterienrasen aus *Klebsiella aerogenes* bzw. in einem axenischen Flüssigmedium gehalten. Unter axenisch Wachstumsbedingungen können Zelldichten von mehr als $1 \cdot 10^7$ Zellen / ml erreicht werden. Eine Kultivierung in dieser Form ermöglicht es, *D. discoideum* ähnlich den prokaryotischen Expressionssystemen als heterologes Proteinexpressionssystem einzusetzen.

2 Ergebnisse

2.1 Strukturanalyse von VASP

Das detaillierte Verständnis der Funktionsweise von Proteinen setzt neben den biochemischen Eigenschaften auch strukturelle Informationen voraus. Allerdings konnten bei Ena/VASP Proteinen im Wesentlichen nur die globuläre N-terminale EVH1-Domäne und die etwa 30 AS umfassende α -helikale C-terminale Tetramerisierungsdomäne (Tet) durch Röntgenstruktur- und NMR-Analysen aufgeklärt werden (Ball et al., 2002; Kuhnel et al., 2004). Der Bereich der mit Aktin interagierenden PRD und EVH2-Domänen zwischen EVH1- und Tetramerisierungsdomäne ist strukturell allerdings weitestgehend unbekannt. Eine Ausnahme bilden hier nur die GP₅-Motive, deren Strukturen in Gegenwart von Profilin-Aktin gelöst werden konnten (Ferron et al., 2007; Kursula et al., 2008). Softwarebasierte Vorhersagen der Sekundärstruktur von Ena/VASP zeigen zwischen der globulären EVH1 und der helikalen Tetramerisierungsdomäne einen nahezu vollständig ungeordneten Bereich (Abbildung 12). Um Einblicke in die Gesamtarchitektur des VASP-Moleküls zu erhalten, sollte exemplarisch murines VASP (mVASP) in voller Länge als GST-Fusionsprotein aus *E. coli*-Lysat aufgereinigt und analysiert werden (Abbildung 13). Das Plasmid für die Expression von mVASP wurde von PD Dr. Jan Faix (MHH) zur Verfügung gestellt. Nach Transformation des Plasmids in *E. coli* Rossetta-Zellen wurde die Expression durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG bei 27°C induziert.



Nach affinitätschromatographischer Reinigung und Elution von einer Glutathion-Sepharose Säule, konnte das GST-mVASP Fusionsprotein erfolgreich mit der PreScission-Protease gespalten werden. Nachfolgend konnten die beiden Spezies durch Volumenausschlusschromatographie mit einer SuperdexS200 Säule getrennt werden (Abbildung 13C). Allerdings war hier bereits auffällig, dass das mVASP Tetramer mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 158,7 kDa erheblich schneller als erwartet von der Säule eluierte.

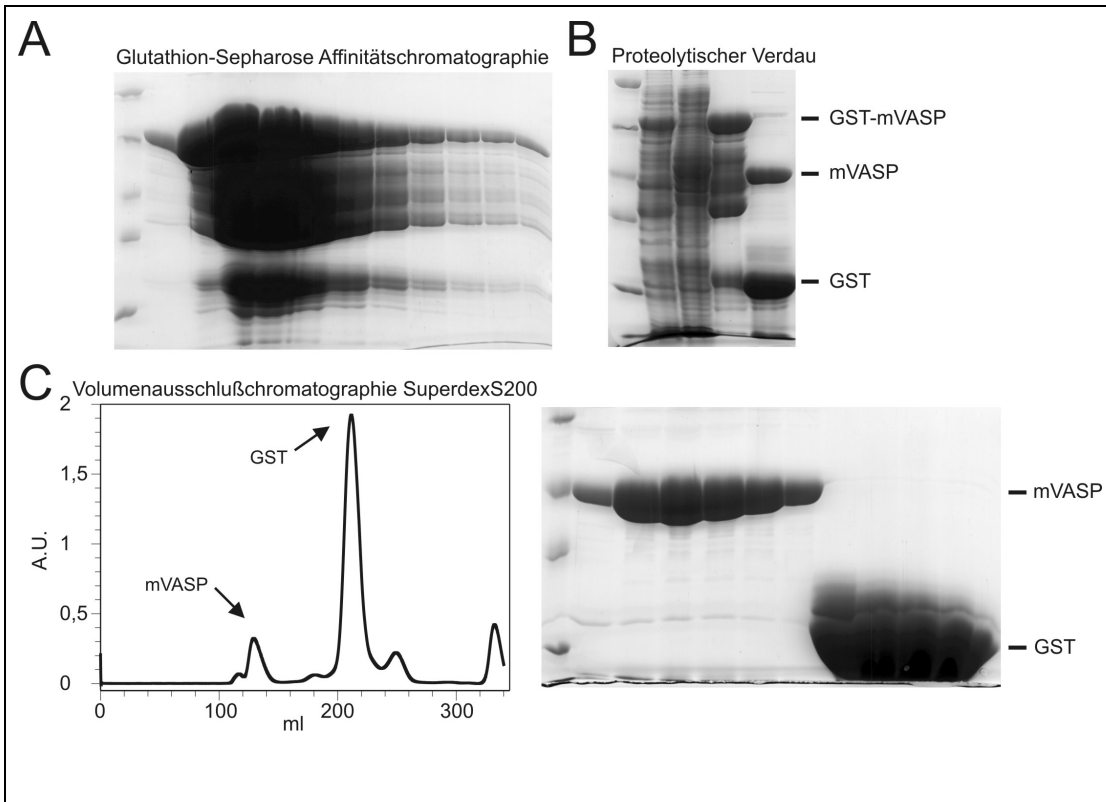


Abbildung 13: Aufreinigung von mVASP aus *E. coli*-Lysat. (A) Elutionsprofil der Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie. Das Fusionsprotein konnte mit 30 mM reduziertem Glutathion von der Säule eluiert werden. (B) Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins. GST konnte durch Inkubation mit der PreScission-Protease abgespalten werden. Gezeigt ist die Kontrolle der Induktion im *E. coli*-Homogenat bei 27°C und die Kontrolle der Spaltung des gereinigten Fusionsproteins (Spur 1: Molecular weight marker (MWM), Spur 2: Gesamtprotein nach Zugabe von 0,5 mM IPTG, Spur 3: Gesamtprotein vor Induktion durch IPTG, Spur 4: GST-mVASP nach affinitätschromatographischer Reinigung (A), Spur 5: GST-mVASP nach Spaltung mit der PreScission-Protease). (C) Volumenausschlusschromatographische Trennung von mVASP und GST. Links: Elutionsprofil (OD_{280nm} /Elutionsvolumen [ml]) der Trennung auf einer Superdex S200 Chromatographie Säule. mVASP und GST enthaltende Fraktionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet, Rechts: Das Coomassie-gefärbte SDS-Gel dieser Fraktionen zeigt die Trennung beider Spezies.

Dieses Laufverhalten in der Volumenausschlusschromatographie deutete auf eine nicht globuläre Konformation des mVASP-Tetramers hin. Um das Verhalten des Moleküls in Lösung zu untersuchen und um erste Aussagen über dessen Struktur machen zu können, wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Claus Urbanke und PD. Dr. Ute Curth (MHH) gereinigtes mVASP mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) untersucht (Abbildung 14A).

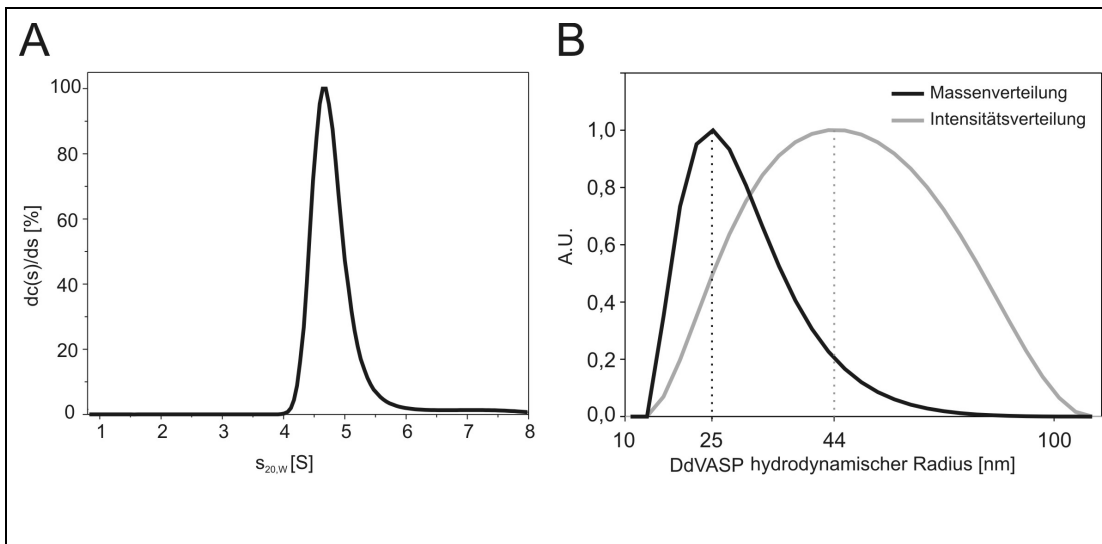


Abbildung 14: Hydrodynamisches Verhalten von VASP. (A) Im Sedimentationsexperiment konnte für mVASP ein Sedimentationskoeffizient von $s_{20,W}=4,65$ S gemessen werden. Daraus leitete sich ein Perrin-Faktor von 2,2 ab, welcher für ein stark elongiertes Protein sprach. Diese Beobachtung war mit dem Verhalten während der Gelfiltration konsistent (Abbildung 13C). Die asymmetrische Kurvenform zeigte ein Gemisch verschiedener $s_{20,W}$ -Werte. (B) DdVASP zeigte in der Analyse durch dynamische Lichtstreuung ein zum mVASP vergleichbares hydrodynamisches Verhalten. Der gemessene hydrodynamische Radius des DdVASP-Tetramers variierte zwischen 15-50 nm mit einem Maximum in der Verteilung bei 25 nm. Die Abbildung zeigt die Verteilung der Messwerte sowohl nach Intensität (grau) als auch der Massenverteilung (schwarz). Für die Berechnung wurde der durch AUZ ermittelte Perrin-Faktor zugrunde gelegt.

Die Auswertung der Sedimentations- und Gleichgewichtsexperimente ergab bei einem Molekulargewicht von 160 kDa einen Sedimentationskoeffizienten von nur $s_{20,W} = 4,65$ S, woraus sich ein Perrin Faktor von 2,2 errechnete. Da der Perrin Faktor ein Maß für die Abweichung von der perfekten unhydratisierten Kugelform eines Teilchens derselben Masse ist, hat dieser folglich als kleinsten Wert 1. Ein Perrin Faktor von 2,2 dagegen zeigte eine massive Abweichung von der Kugelform, was auf ein stark elongiertes, intrinsisch ungeordnetes Protein hindeutete. Auch die Asymmetrie der angepassten Kurve in der $c(s)$ Verteilung ist ein weiteres Argument für ungeordnete Bereiche im VASP-Tetramer, da dieser Kurvenverlauf nur entsteht, wenn Spezies mit verschiedenen Sedimentationskoeffizienten in der Messung vorhanden sind. Diese Befunde legten daher nahe, dass VASP unterschiedliche Konformationen einnehmen kann.

Zum Vergleich wurde VASP aus *D. discoideum* (DdVASP) gereinigt (Breitsprecher et al., 2009), wobei hier das Expressionsplasmid pGEX-6P-1-DdVASP von Frau Antje Kieseewetter (MHH) zur Verfügung gestellt wurde. Das hydrodynamische Verhalten wurde durch die Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) ebenfalls unter physiologischen Bedingungen in PBS analysiert. Die Vermessung von DdVASP durch DLS ergab keine einheitliche Größe für das Tetramer. Vielmehr zeigte die Messung und Auswertung nach der Verteilung der Massen ein Gemisch unterschiedlicher hydrodynamischer Radien (R_h) von etwa 15 nm bis zu mehr als 50 nm, wobei die prominenteste Spezies einen R_h von 25 nm hatte. Dies war ein Beleg dafür, dass DdVASP in Lösung unter physiologischen Salzkonzentrationen eine nicht vollständig elongierte Konformation einnimmt. Diese Erkenntnisse deuteten sowohl für mVASP als auch für DdVASP eindeutig auf ein intrinsisch ungeordnetes, flexibles Molekül hin, welches keine stabile Konformation besitzt.

Um diese Hypothese zu testen, sollte mVASP in Kooperation mit Prof. Dr. John Victor Small und Dr. Günther Resch (IMBA Wien) elektronenmikroskopisch untersucht werden. Um die Länge des ungeordneten Bereiches zu bestimmen, wurde ausgehend vom mVASP durch PCR eine Deletionsmutante des vermeintlich ungeordneten Bereiches zwischen EVH1 und Tet (mVASP Δ 118-304) hergestellt. mVASP Δ 118-304 wurde, wie für mVASP beschrieben, aufgereinigt und nach Rotationbedampfung durch Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM) visualisiert. In diesen Aufnahmen waren für das mVASP-Molekül in den meisten Fällen vier globuläre Domänen sichtbar, wobei es sich hierbei höchstwahrscheinlich um die globulären EVH1-Domänen handelte (Abbildung 15A/D). Diese EVH1-Domänen waren nicht regelmäßig zueinander ausgerichtet, sondern zeigten eine zufällige Verteilung. Im Gegensatz dazu, konnte bei Mutante mVASP Δ 118-304 eine geordnete Anordnung der EVH1-Domänen in engem Abstand um einen zentralen Punkt beobachtet werden (Abbildung 15B/D).

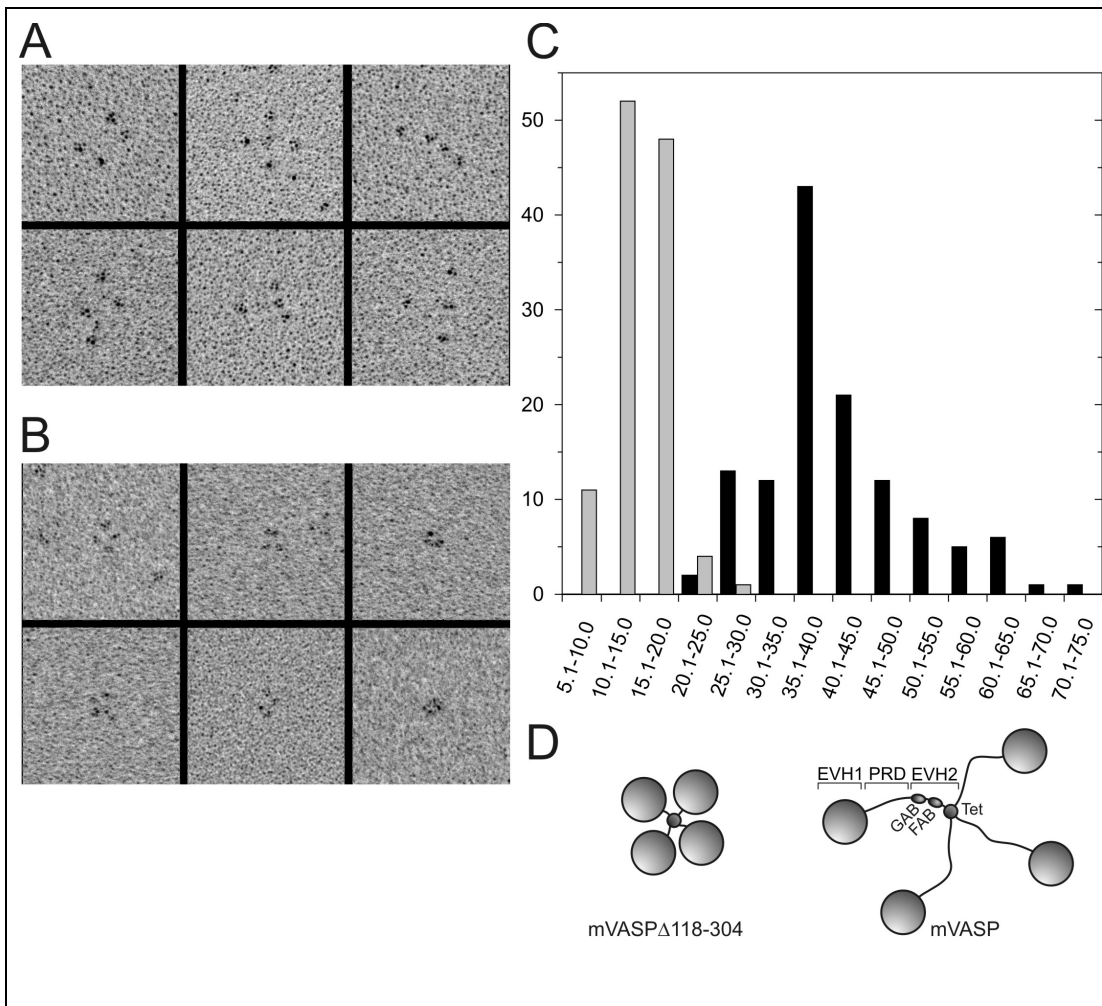


Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Analyse der mVASP Tetramere. (A,B) EM-Aufnahmen von mVASP und mVASP Δ 118-304 Molekülen. Die EVH1-Domänen der einzelnen mVASP-Tetramere sind deutlich als schwarze Punkte zu erkennen. Im mVASP (A) können diese wesentlich flexibler angeordnet werden als im mVASP Δ 118-304 (B). (C) Der Abstand zwischen den jeweils am weitest entfernt liegenden EVH1-Domänen jedes Moleküls zeigte für mVASP (schwarz) eine erheblich breitere Verteilung als für mVASP Δ 118-304 (grau). Darüber hinaus konnte für mVASP ein maximaler Durchmesser von 75 nm gemessen werden. In der Deletionsmutante wurde ein maximaler Durchmesser von 25-30 nm ermittelt. n=124 für mVASP und n=116 für mVASP Δ 118-304. (D) Schematische Darstellung der analysierten mVASP Moleküle. Im mVASP Δ 118-304 wurden alle intrinsisch ungeordneten Bereiche entfernt, sodass die flexible Anordnung der EVH1-Domänen stark eingeschränkt ist. Im mVASP können die EVH1-Domänen aufgrund der ungeordneten Bereiche flexibel angeordnet werden.

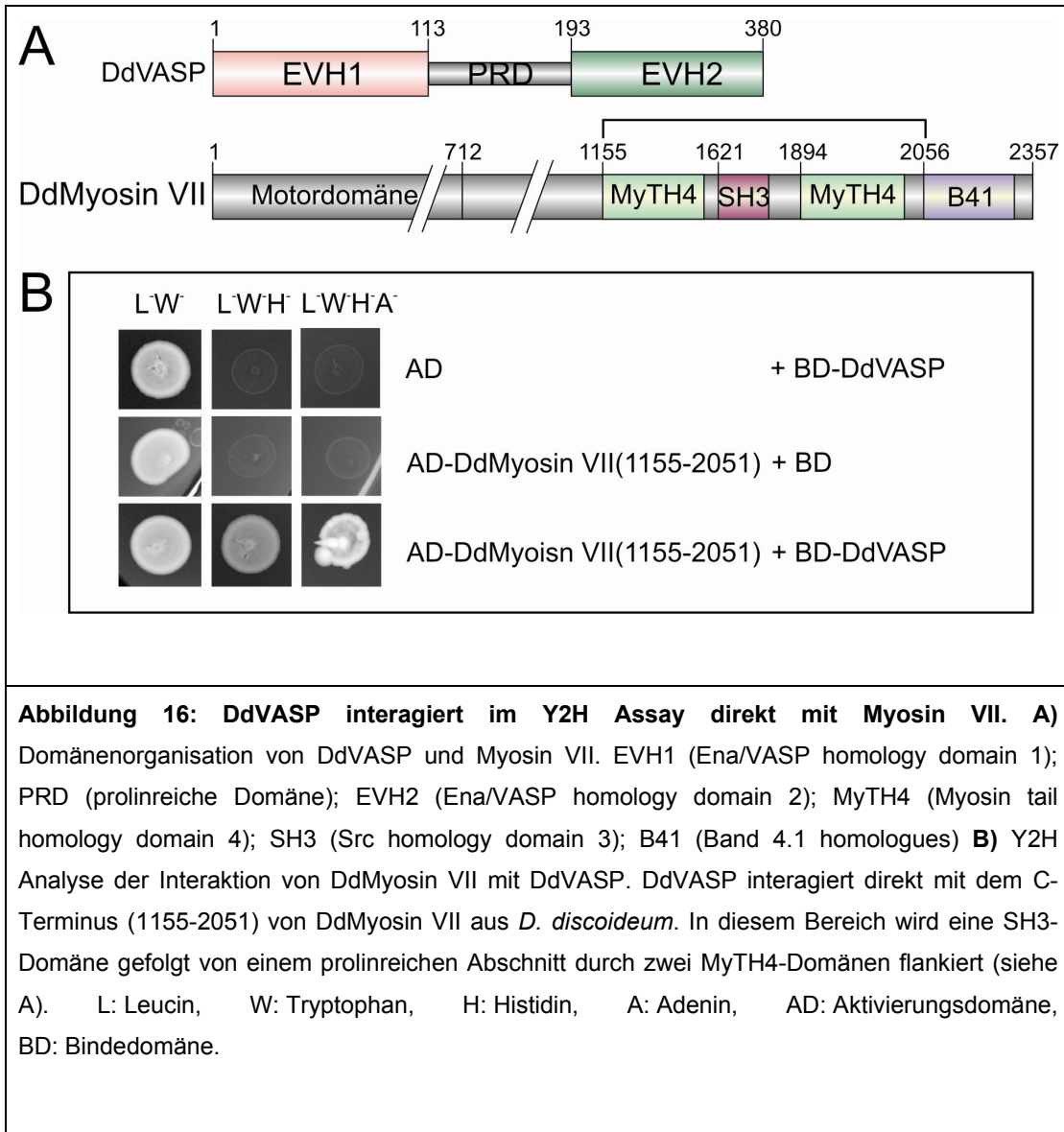
Diese Aufnahmen ermöglichten weiterhin die Vermessung der Moleküle und somit eine Abschätzung der Länge des intrinsisch ungeordneten Bereiches. Abbildung 15C

zeigt die Verteilung der Abstände zwischen den jeweils voneinander am weitesten entfernt liegenden EVH1-Domänen innerhalb eines Tetramers. Für mVASP konnte eine breite Verteilung der Abstände von mindestens 20 nm bis maximal 75 nm und einem Maximum der Verteilung von 35-40 nm für den Moleküldurchmesser ermittelt werden. Für mVASP Δ 118-304 zeigte sich eine engere Verteilung der Durchmesser von nur 5-35 nm mit einem Maximum der Verteilung zwischen 10-20 nm. Hieraus konnte geschlossen werden, dass die im mVASP Δ 118-304 deletierten 186 Aminosäuren im mVASP sehr flexibel und mit einer Länge von bis zu 25 nm pro Monomer angeordnet sein können. Diese Messungen zeigten außerdem, dass der Bereich zwischen der EVH1- und der Tet-Domäne mehr als die Hälfte der vollständig gestreckten Polypeptidkette ausmachen kann. Diese Befunde stützten die vorhergehenden Annahmen eines flexiblen, unstrukturierten Bereiches im mittleren Teil jeder VASP-Untereinheit und legen nahe, dass die außerordentlich große Flexibilität für die Funktion des Moleküls bei der Regulation des Aktinsystems sehr wichtig sein könnte (Breitsprecher et al., 2008).

2.2 Bindungspartner von VASP

2.2.1 Interaktion von Myosin VII mit DdVASP

Ein weiteres prominent an der Spitze von Filopodien lokalisierendes und für deren Ausbildung essentielles Protein ist DdMyosin VII (Faix et al., 2009). DdMyosin VII ist in *D. discoideum* das funktionelle Homolog zum humanen Myosin X. Bislang wurde eine Interaktion des HsMyosin X mit dem Ena/VASP Protein Mena (Tokuo and Ikebe, 2004), und von DdMyosin VII mit dem als Filopodin bekannten TalinA beschrieben (Tuxworth et al., 2005). Da sowohl DdVASP als auch DdMyosin VII eine vergleichbare subzelluläre Lokalisation zeigen und beide null-Mutanten bezüglich der Filopodienbildung ähnliche Phänotypen ausbilden, war dies Anlass eine Interaktion der beiden Proteine aus *Dictyostelium* zu untersuchen. Durch Yeast-two-hybrid Analyse (Y2H) sollte die direkte Interaktion von DdMyosin VII mit DdVASP *in vivo* getestet werden. Da die N-terminale Motordomäne des DdMyosin VII mit filamentösem Aktin assoziiert ist und somit für die Analyse der Interaktion mit DdVASP höchstwahrscheinlich verzichtbar ist, wurde der C-terminale Bereich von DdMyosin VII untersucht.



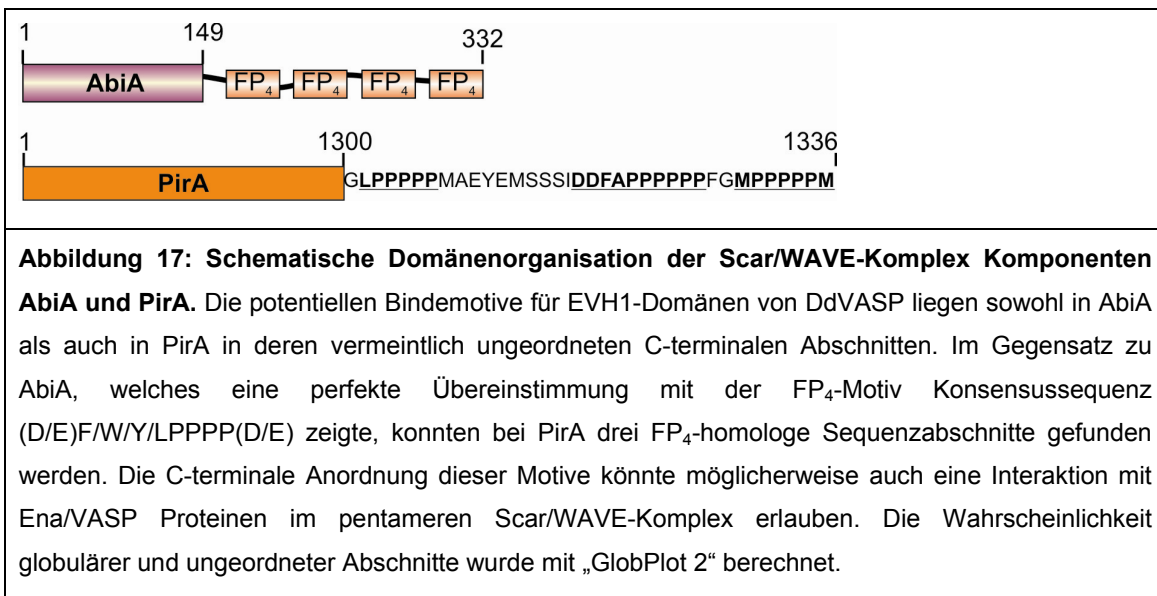
Der kodierende Bereich von DdMyosin VII(AS 1155-2057) wurde durch PCR amplifiziert und in den Hefeexpressionsvektor pGADT7 inseriert. Die gesamte kodierende Region von DdVASP wurde in den Expressionsvektor pGBKT7 kloniert. Nachfolgend wurden diese Plasmide sowie leere Plasmide als Kontrolle in den Hefestamm AH109 kotransformiert. Eine Selektion auf erfolgreiche Kotransformation erfolgte auf Leucin und Tryptophan defizienten Agarplatten (L⁻W⁻). Zur Analyse der Interaktion wurden die Klone dann auf Agarplatten mit Selektionsmedien ausgebracht, denen entweder Leucin, Tryptophan, Histidin und oder zusätzlich auch noch Adenin fehlte (L⁻W⁻H⁻, L⁻W⁻H⁻A⁻). Abbildung 16B zeigt ein Wachstum der Hefekolonien in Abwesenheit der auxotrophen Selektionsmarker nach drei Tagen bei 23°C. Das Wachstum auf L⁻W⁻H⁻A⁻Agarplatten war ein deutlicher Hinweis auf eine

direkte Interaktion von DdVASP mit dem C-terminalen Abschnitt von DdMyosin VII. Somit scheint die Interaktion von Ena/VASP Proteinen mit filopodialen Myosinen wie im Säugersystem auch in *Dictyostelium* konserviert zu sein.

2.2.2 Neue Bindungspartner der VASP EVH1-Domäne

Obwohl die essentielle Funktion von DdVASP in der Filopodienbildung bereits eindeutig gezeigt werden konnte (Han et al., 2002; Schirenbeck et al., 2006), ist die Rekrutierung von Ena/VASP Proteinen an die Spitze von Filopodien und Lamellipodien aber nach wie vor unklar. Da die EVH1-Domäne eine zentrale Rolle bei der subzellulären Lokalisation von Ena/VASP Proteinen in den oben genannten Strukturen spielt, die meisten bekannten VASP Interaktoren wie beispielsweise Zyxin oder Lamellipodin in *Dictyostelium* aber nicht vorhanden sind, war die Suche potentieller Interaktionspartner von DdVASP ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit.

Da die EVH1-Domänen von Ena/VASP Proteinen in den meisten Fällen mit FP₄-Motiven in ihren Liganden interagieren, wurden zunächst durch Sequenzvergleiche Proteine mit klassischen FP₄-Motiven oder homologen Sequenzen im Proteom von *D. discoideum* gesucht. Durch diese Sequenzvergleiche konnten mit AbiA und PirA zwei Proteine des Scar/WAVE-Komplexes als potentielle Bindungspartner von DdVASP identifiziert werden (Abbildung 17).



Da AbiA vier klassische FP₄-Motive enthält, wurde eine potentielle Interaktion von DdVASP mit AbiA weiter untersucht. Dazu wurde die cDNA mit geeigneten Oligonukleotiden durch PCR aus cDNA amplifiziert und in die *E. coli*

Expressionsvektoren pGEX-6P1 und pMal-c2x kloniert. Die Expressionsplasmide des orthologen humanen Abi1 Isoform b wurden analog generiert wobei hier eine kommerzielle cDNA-Bank aus humanen Makrophagen von Invitrogen als PCR-Vorlage diente. Das Expressionsplasmid pGEX-6P1-hVASP wurde von PD Dr. Jan Faix zur Verfügung gestellt. hVASP wurde wie vorher für mVASP beschrieben gereinigt (Abbildung 18).

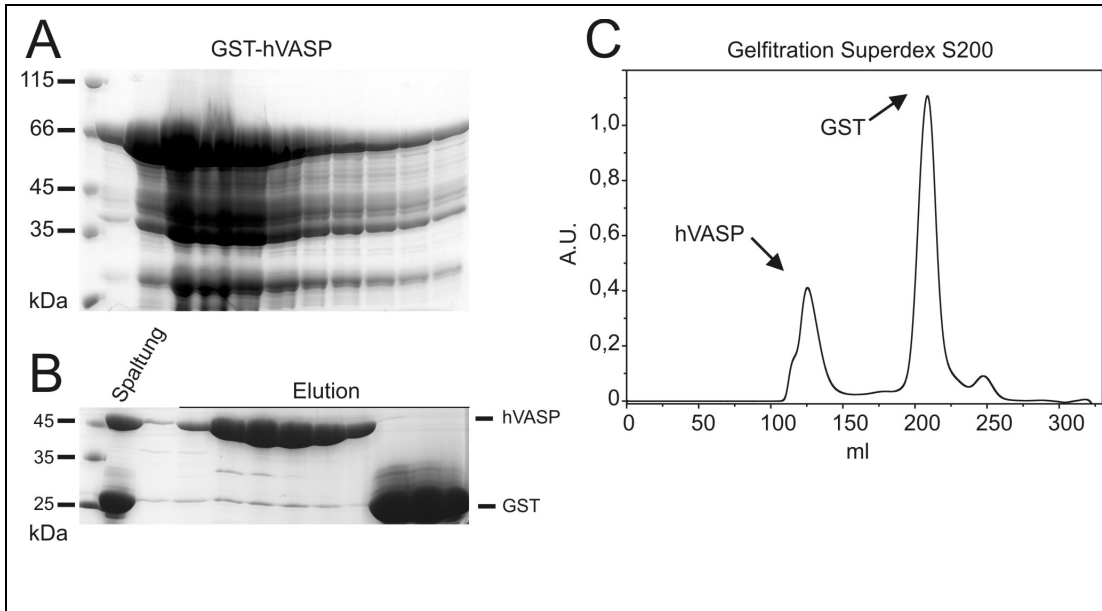


Abbildung 18: Aufreinigung von hVASP aus *E.coli*-Lysat. (A) Elutionsprofil der Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie. Das Fusionsprotein wurde nach Zugabe von 30 mM reduziertem Glutathion von der Säule eluiert. (SDS-PAGE nach Coomassie Färbung: Spur 1: MWM, Spuren 2-12: Fraktionen mit GST-hVASP nach Affinitätschromatographischer Reinigung). (B) SDS-PAGE nach Coomassie Färbung von GST-hVASP nach Spaltung mit PreScission Protease und Auftrennung der Spaltprodukte durch Gelfiltration. (Spur 1: Marker, Spur 2: GST-HsVASP nach Spaltung mit der PreScission-Protease, Spuren 3-12: Fraktionen von HsVASP und GST nach Trennung durch Gelfiltration). (C) Volumenausschlusschromatographische Trennung von hVASP und GST. Elutionsprofil der Trennung auf einer SuperdexS200 Chromatographie Säule. Aufgetragen ist die Absorption bei OD_{280nm} gegen das Elutionsvolumen in ml.

Die GST- und MBP-Fusionsproteine der C-Termini von AbiA(AS 257-332) und humanem Abi1(AS 293-481) konnten affinitätschromatographisch in großer Menge aus *E. coli*-Lysat aufgereinigt werden. Um anti-AbiA Antikörper für die Immunfluoreszenz mit *Dictyostelium*-Zellen zu erhalten, wurden polyklonale Antikörper in Kaninchen gegen GST-AbiA(AS 257-332) generiert. Als Kontrolle wurden auch Antikörper gegen Scar, einer weiteren Komponente des Scar/WAVE-

Komplexes, hergestellt. Nach Affinitätsreinigung der Antikörper wurde die subzelluläre Lokalisation von AbiA in fixierten WT-Zellen untersucht. Die immunhistologische Analyse zeigte eine deutliche Akkumulation von endogenem AbiA am Leitsaum der Zelle sowie in den Spitzen von Filopodien (Abbildung 19). Somit zeigt AbiA wie auch sein Ortholog im Säugersystem eine vergleichbare zelluläre Verteilung wie Ena/VASP Proteine (Breitsprecher et al., 2008; Pasic et al., 2008; Tokuo and Ikebe, 2004). Die Scar-Antikörper waren zwar für Western-blotting, nicht aber für Immunofluoreszenz geeignet.

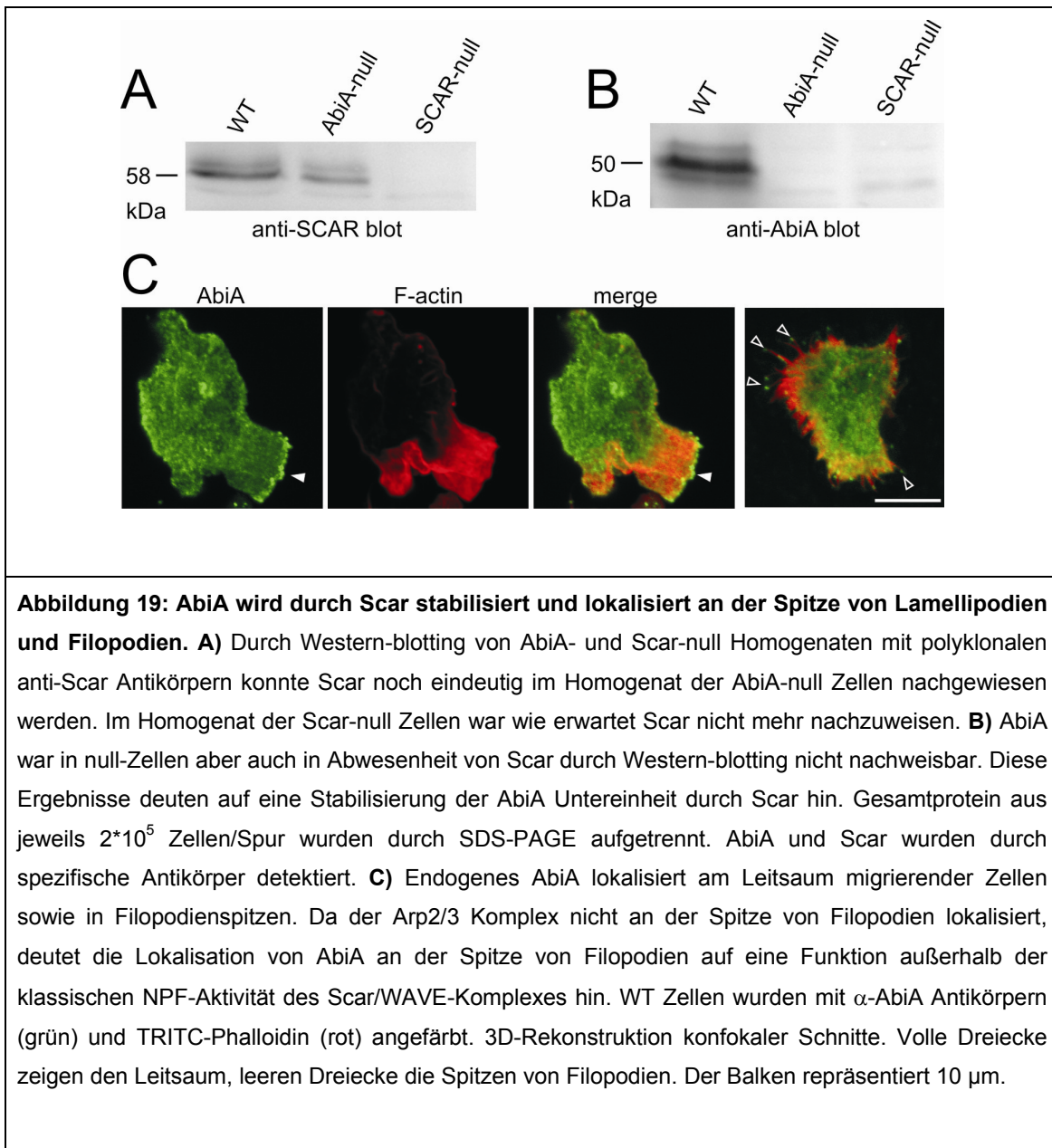


Abbildung 19: AbiA wird durch Scar stabilisiert und lokalisiert an der Spitze von Lamellipodien und Filopodien. **A)** Durch Western-blotting von AbiA- und Scar-null Homogenaten mit polyklonalen anti-Scar Antikörpern konnte Scar noch eindeutig im Homogenat der AbiA-null Zellen nachgewiesen werden. Im Homogenat der Scar-null Zellen war wie erwartet Scar nicht mehr nachzuweisen. **B)** AbiA war in null-Zellen aber auch in Abwesenheit von Scar durch Western-blotting nicht nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten auf eine Stabilisierung der AbiA Untereinheit durch Scar hin. Gesamtprotein aus jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen/Spur wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. AbiA und Scar wurden durch spezifische Antikörper detektiert. **C)** Endogenes AbiA lokalisiert am Leitsaum migrierender Zellen sowie in Filopodienstippen. Da der Arp2/3 Komplex nicht an der Spitze von Filopodien lokalisiert, deutet die Lokalisation von AbiA an der Spitze von Filopodien auf eine Funktion außerhalb der klassischen NPF-Aktivität des Scar/WAVE-Komplexes hin. WT Zellen wurden mit α -AbiA Antikörpern (grün) und TRITC-Phalloidin (rot) angefärbt. 3D-Rekonstruktion konfokaler Schnitte. Volle Dreiecke zeigen den Leitsaum, leeren Dreiecke die Spitzen von Filopodien. Der Balken repräsentiert 10 μ m.

Die vermeintliche Interaktion der EVH1-Domäne mit Abi wurde im Folgenden durch unabhängige experimentelle Ansätze untersucht. Dazu wurden zunächst Pull-down-Experimente mit gereinigten Proteinen durchgeführt. Als Kontrolle wurden zusätzlich die orthologen Proteine aus Vertebraten untersucht. Die Fusionsproteine MBP-AbiA(AS 257-332) und GST-hAbi1(AS 293-481) wurden als Köderproteine mit entsprechend beschichteten Agarosekügelchen (mit Amylose für MBP und mit Glutathion für GST) inkubiert. Die abgesättigten Agarosekügelchen wurden nach Entfernen des ungebundenen Proteins mit verschiedenen VASP Konstrukten inkubiert und die Ansätze nach mehrmaligem Waschen durch SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung analysiert. Die Pull-down-Experimente zeigten eine direkte Interaktion zwischen DdVASP und dem C-Terminus von AbiA, sowie von mVASP und hVASP mit dem C-Terminus des humanen Abi1(AS 293-481) (Abbildung 20).

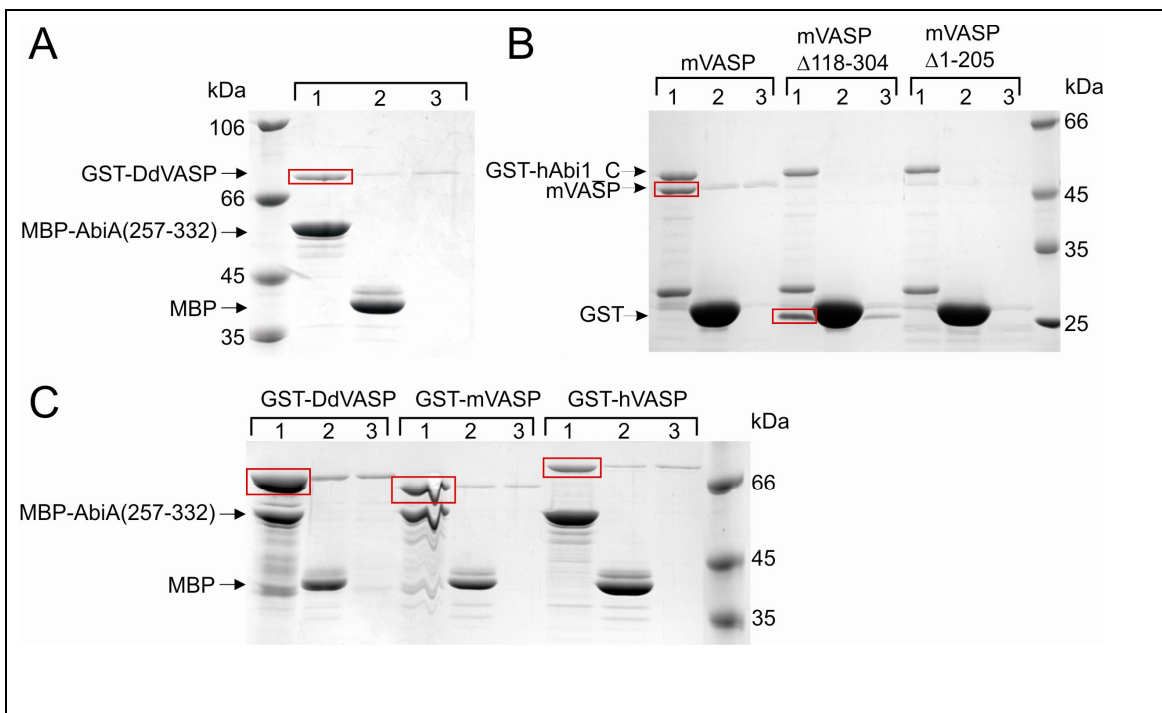


Abbildung 20 Rekombinantes VASP bindet *in vitro* an die C-terminale prolinreiche Domäne aus Abi. A) DdVASP bindet spezifisch an den C-Terminus (AS 257-332) von AbiA (Spur. 1). Die Spuren (2) und (3) zeigen die Kontrollexperimente mit MBP gesättigten Amylose-Sepharose Kügelchen (2) oder mit unbeschichteten Amylose-Sepharose Kügelchen (3). In den Kontrollen war keine Interaktion zu beobachten. **B)** Die in *Dictyostelium* gefundene Interaktion zwischen VASP und Abi wurde in einem weiteren Pull-down-Experiment mit den orthologen Proteinen aus Vertebraten verifiziert, wobei hier Glutathion-Sepharose Kügelchen mit GST-hAbi1_C beschichtet waren. Da das humane Abi1 (hAbi1) über eine C-terminale SH3-Domäne verfügt, die an prolinreiche Abschnitte binden kann, wurde eine Beteiligung der SH3-Domäne an der Interaktion mit Deletionsmutanten des murinen VASP überprüft.

mVASP und die Deletionsmutante aller prolinreichen Domänen mVASP Δ 118-304 interagierten mit dem C-Terminus des humanen Abi1(AS 293-481). Für die Deletionsmutante mVASP Δ 1-205 ohne EVH1 und PRD konnte dagegen keine Interaktion mit dem C-Terminus des humanen Abi1 nachgewiesen werden. Somit konnte eine Beteiligung der SH3-Domäne mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Die Spuren zeigen vergleichbare Kontrollen wie in (A). Spur 1: GST-Fusionsprotein, Spur 2: GST, Spur 3: Glutathion-Sepharose Kügelchen. In Spuren mit GST-hAbi1_C war auch noch ein kleines Proteinfragment bei ca. 28 kDa sichtbar, bei dem es sich vermutlich um ein Translationsabbruchprodukt handelte. **C)** Da die untersuchten VASP Proteine ein hohes Maß an Sequenzhomologien aufweisen, wurden die Interaktionen von murinem, humanem und DdVASP in einem weiteren Pulldown-Experiment mit AbiA(257-332) aus *Dictyostelium* untersucht. Diese Experimente zeigten ebenfalls eine eindeutige Interaktion der Säugerproteine mit dem AbiA aus *D. discoideum*. Zusammengenommen deuteten diese Ergebnisse auf einen evolutionär konservierten Mechanismus der Abi-Ena/VASP Interaktion hin.

Um die im Pulldown-Experiment nachgewiesene Interaktion von DdVASP mit dem C-Terminus von AbiA(AS 257-332) durch eine weitere unabhängige Methode zu verifizieren und das Verhalten des Komplexes in Lösung zu untersuchen, wurde die Methode der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) verwendet. Für dieses Experiment wurde das monomere MBP-AbiA(AS 257-332) eingesetzt. Da die Methode der DLS sehr sensitiv für Verunreinigungen ist, wurden sowohl das DdVASP, als auch MBP-AbiA(AS 257-332) vor Beginn der Messung erneut durch Gelfiltration gereinigt und dreimal gegen das 500fache Volumen PBS, 1mM EDTA, 1mM DTT dialysiert. In einer Lichtstreueküvette wurden 15 μ l einer 1 mg/ml DdVASP Lösung vorgelegt, und die Änderung des hydrodynamischen Radius bei 20°C durch Zugabe eines 2- und 4-fachen Überschusses von MBP-AbiA(AS 257-332) verfolgt (Abbildung 21).

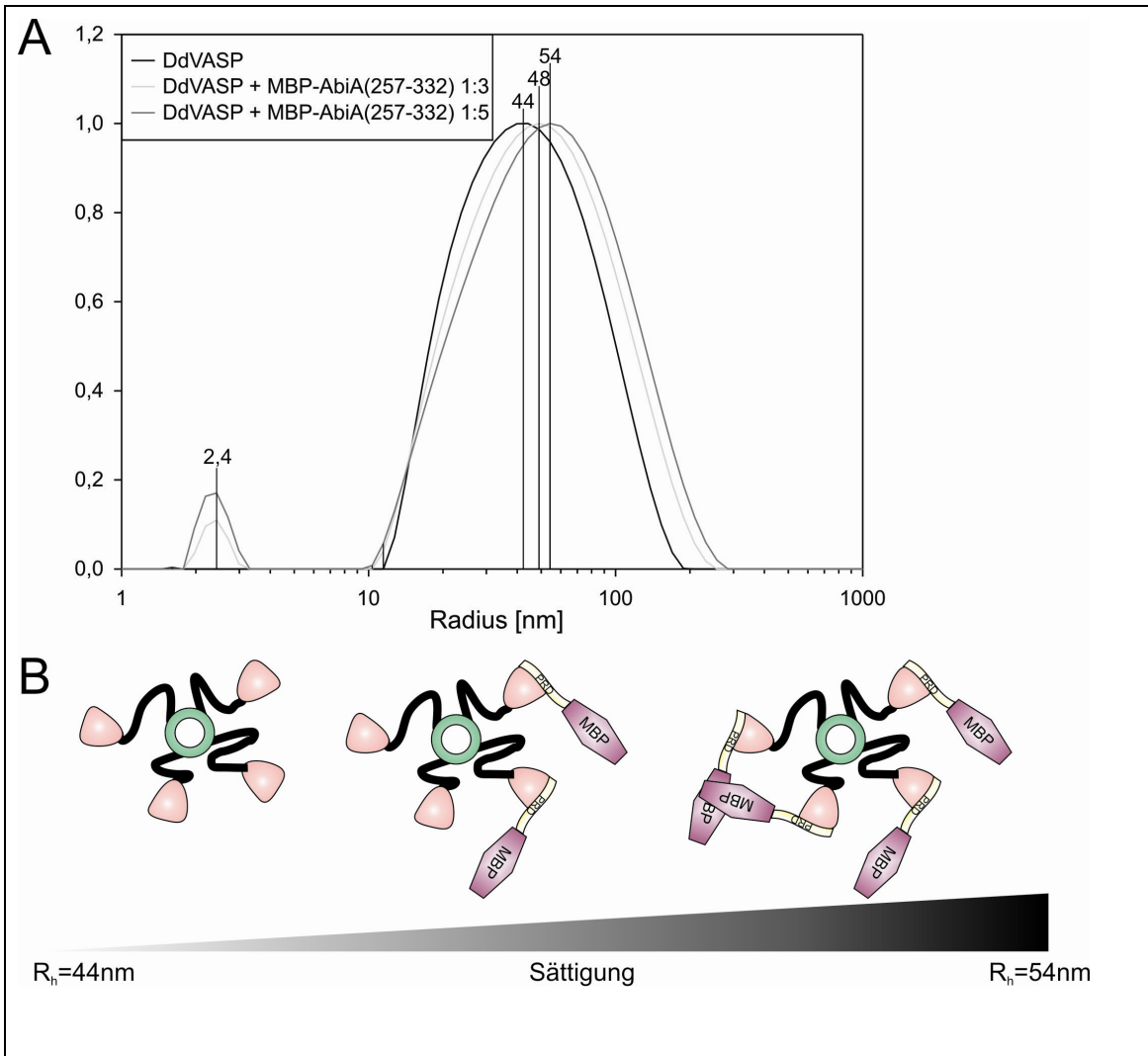
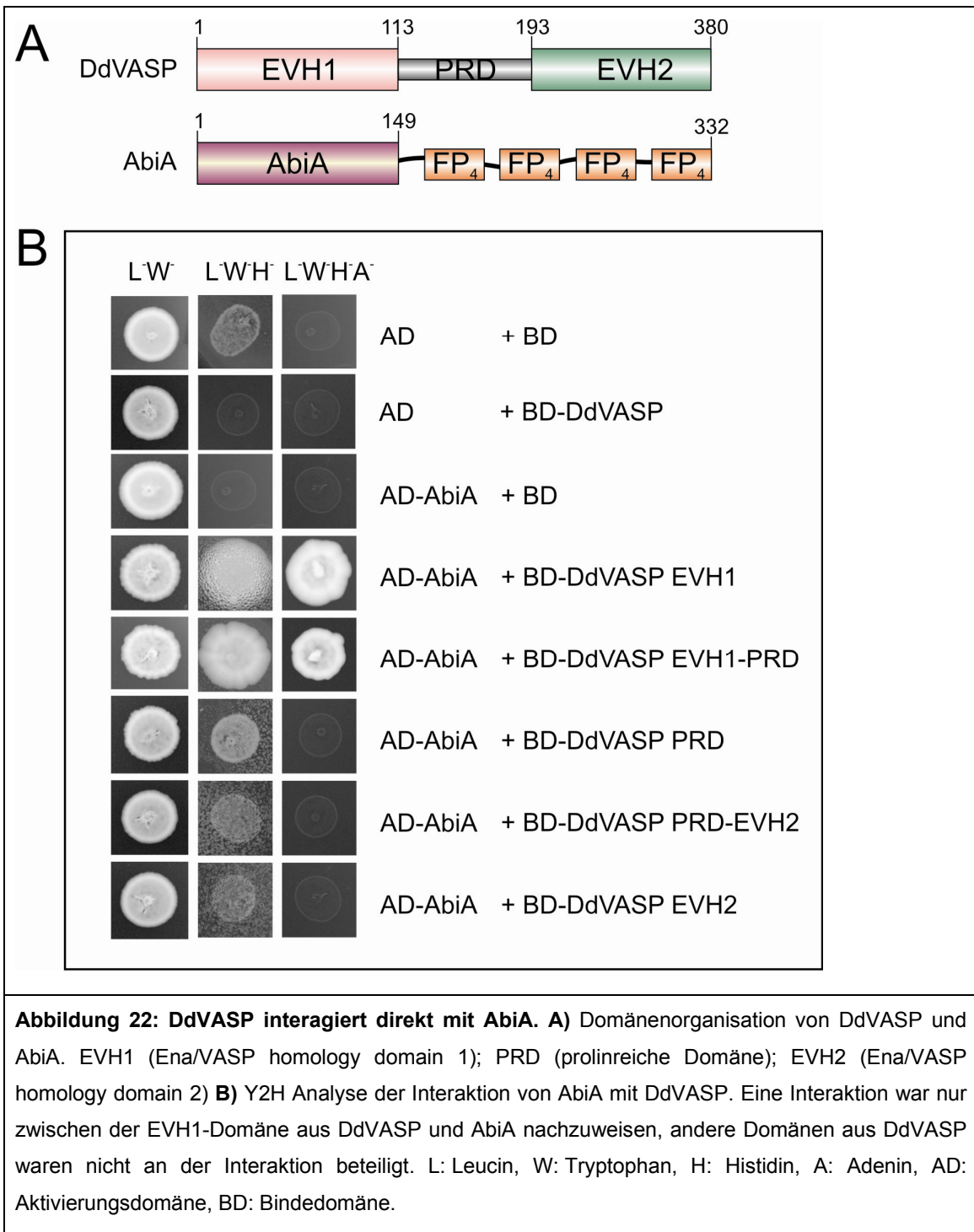


Abbildung 21 Die Bindung an MBP-AbiA(AS 257-332) beeinflusst nicht die Flexibilität des VASP-Tetramers. A) Durch die Zugabe eines mehr als 4-fachen Überschusses an MBP-AbiA(AS 257-332) vergrößerte sich der hydrodynamische Radius von DdVASP auf nicht mehr als 54 nm. Der R_h von DdVASP wurde mit 44 nm, der R_h von MBP-AbiA(AS 257-332) mit 2,4 nm gemessen. Die Zunahme des $R_{h(\text{DdVASP})}$ bei Zugabe von MBP-AbiA(AS 257-332) legte eine Bindung des Liganden an die EVH1-Domäne von DdVASP nahe. Die Verteilung der gemessenen $R_{h(\text{DdVASP})}$ blieb auch im Komplex erhalten. Somit hatte die Bindung an MBP-AbiA(AS 257-332) keinen Einfluss auf die intramolekulare Flexibilität des DdVASP Tetramers. **B)** Schematische Darstellung der in A) gemessenen Komplexe. Der R_h stieg bis zu einem 4-fachen Überschuss an Ligand von 44 nm auf 54 nm an. Demnach resultierte die Zunahme des R_h bei einem 2-fachen Überschuss aus der nicht vollständigen Besetzung aller EVH1-Domänen im VASP-Tetramer mit MBP-AbiA(AS 257-332) (Mitte). Durch Zugabe eines mehr als 4-fachen Überschusses an MBP-AbiA(AS 257-332) war keine weitere Zunahme des R_h zu messen (Daten nicht gezeigt). Somit war davon auszugehen, dass alle Bindungsstellen im Tetramer bereits besetzt waren (rechts). Jede Messung wurde 75mal durchgeführt und der R_h aus der kombinierten Autokorrelationsfunktion abgeleitet.

Der R_h von MBP-AbiA(AS 257-332) wurde mit $R_h = 2,4$ nm und der R_h von DdVASP mit $R_h = 44$ nm gemessen. Nach Zugabe eines 2-fachen Überschusses an MBP-AbiA(AS 257-332) im Vergleich zu DdVASP wurde eine Zunahme des gemessenen $R_{h(\text{DdVASP})}$ von 44 nm auf $R_{h(\text{Komplex})} = 48$ nm gemessen. Eine weitere Zugabe von MBP-AbiA(AS 257-332) auf die 4-fache Konzentration führte zu einer Zunahme des $R_{h(\text{Komplex})}$ auf 54 nm. Eine weitere Erhöhung des Ligandenüberschusses führte zu keiner weiteren Vergrößerung des $R_{h(\text{Komplex})}$ (Daten nicht gezeigt). Somit ist davon auszugehen, dass alle Bindungsstellen im DdVASP Tetramer durch den Bindungspartner MBP-AbiA(AS 257-332) bereits bei einem Verhältnis von 1:4 gesättigt sind. Weiterhin war keine Änderung in der Verteilung der hydrodynamischen Radien durch Zugabe von MBP-AbiA(AS 257-332) im Vergleich zu DdVASP alleine (Abbildung 14) zu beobachten. Dies ließ darauf schließen, dass die Bindung an MBP-AbiA(AS 257-332) die intramolekulare Flexibilität des DdVASP-Tetramers nicht beeinträchtigt.

Da in den bisherigen Experimenten die Interaktion von DdVASP mit dem C-terminalen Fragment AbiA(AS 257-332) *in vitro* durchgeführt wurden, sollte die Befunde nachfolgend mit Y2H Analyse und Pulldown Experimente mit Zelllysaten verifiziert werden. Für die Y2H Analyse wurden einzelne Domänen von DdVASP durch PCR amplifiziert und in den Hefeexpressionsvektor pGBKT7 inseriert. Volllänge AbiA wurde in den Expressionvektor pGADT7 kloniert. Die Plasmide wurden nachfolgend in den Hefestamm AH109 kotransformiert und Transformanten wie oben beschrieben analysiert. Auch dieses Experiment zeigte eine eindeutige Interaktion der EVH1-Domäne aus DdVASP mit AbiA (Abbildung 22 B).



2.2.3 DdVASP-EVH1 Pulldown aus Zellysat

Um die gefundenen Interaktionen des DdVASP in weiteren Versuchen zu verifizieren und eventuell weitere, bislang unbekannte Bindungspartner von DdVASP zu identifizieren, sollten Pulldown-Experimente mit der EVH1-Domäne aus DdVASP mit *Dictyostelium* Zellysat durchgeführt werden. Dazu wurde die als Fusionsprotein aus

E. coli Lysat in großen Mengen aufgereinigte GST-EVH1-Domäne des DdVASP, zunächst durch Gelfiltration mit einer SuperdexS200 (GE Healthcare) Chromatographiesäule von Verunreinigungen befreit (Daten nicht gezeigt) und anschließend an Glutathion-Sepharose Kügelchen gebunden. Als negative Kontrolle wurde GST in einem separaten Ansatz mitgeführt. Um die Konkurrenz durch endogenes DdVASP auszuschließen, wurden die Lysate aus DdVASP-null Mutanten verwendet (Schirenbeck et al., 2006). Nach Inkubation der Glutathion-Sepharose Kügelchen mit dem Lysat wurden die Kügelchen mehrmals gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Gebundene Proteine wurden mit 3xSDS-Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

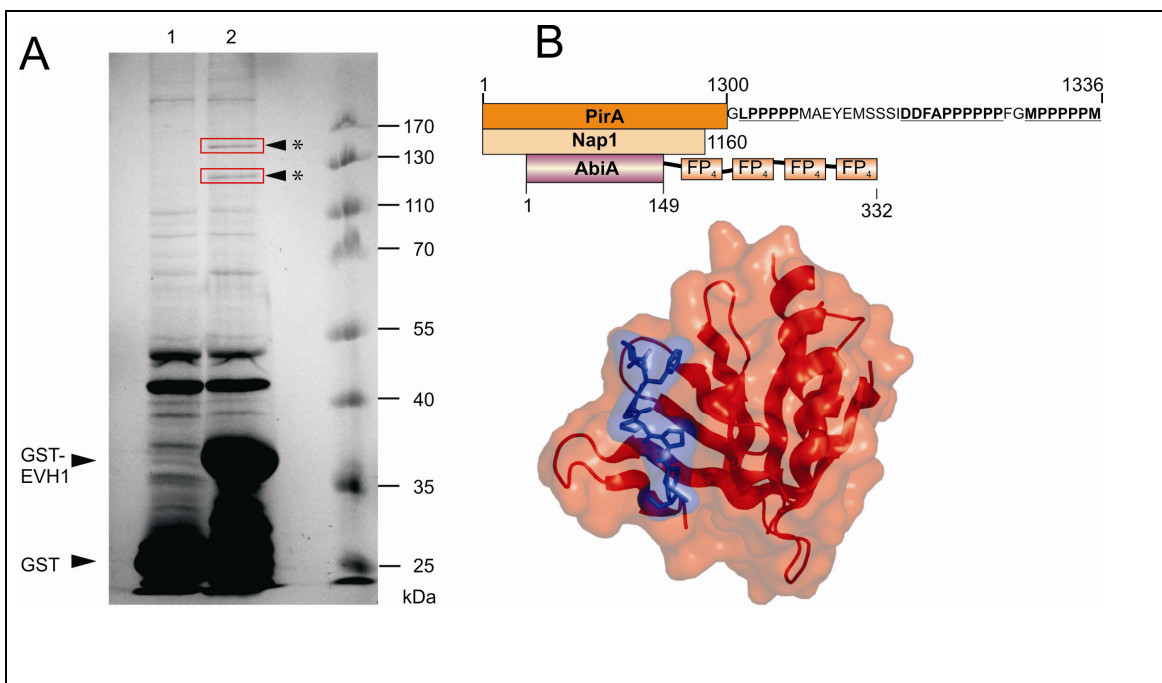


Abbildung 23: DdVASP kopräzipitiert im Pulldown-assay mit Untereinheiten des Scar/WAVE-Komplexes. **A)** Elektrophoretische Analyse des Pulldown-Experiments mit einem 10%igen Acryamidgel und anschließender Silberfärbung. Spur 1 zeigt das GST-Kontrollexperiment, Spur 2 den Ansatz mit GST-EVH1. Die durch rote Kästen gekennzeichneten Banden der Spur 2 waren nicht im Kontrollexperiment zu finden, und deuteten auf zwei DdVASP-Bindungspartner mit Molekulargewichten von ~120kDa und ~140kDa hin. Eine Massenanalyse identifizierte die obere Bande zweifelsfrei als PirA und die untere Bande als Nap1. **B)** Oben: Schematische Darstellung des Nap1/PirA/AbiA Subkomplexes. Da auch PirA prolinreiche Motive im C-Terminus enthält und AbiA durch Western-blotting im Pulldown Experiment nicht nachweisbar war, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Nap1 und PirA durch die direkte Interaktion von DdVASP mit dem C-Terminus von PirA präzipitiert wurden. Viel neheliegender ist jedoch die Präzipitation des gesamten Scar/WAVE-Komplexes durch AbiA. Prolinreiche Motive in PirA sind durch Unterschtriche markiert. Klassische

FP₄-Motive in AbiA sind in orange gekennzeichnet. Unten dargestellt ist die Röntgenstruktur der EV1-Domäne von Mena (dunkelrot) im Komplex mit einem FP₄-Peptid (blau) (PDB: 1EVH). Die Darstellung verdeutlicht die Bindung von EVH1-Domänen an intrinsisch ungeordnete FP₄ Motive.

Im EVH1-Pulldown konnten zwei Banden mit einer Größe von etwa 120 und 140 kDa identifiziert werden, welche im GST-Kontrollexperiment nicht vorhanden waren. Eine nachfolgende massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF) der gefundenen potentiellen Bindungspartner in Kooperation mit Dr. L. Jänsch (HZI Braunschweig), identifizierte die 140 kDa Bande als PirA und die 120 kDa Bande als Nap1. Da beide Proteine Bestandteile des heteropentameren Scar/WAVE-Komplexes in *D. discoideum* sind, war davon auszugehen, dass im Pulldown mit der DdVASP EVH1-Domäne der gesamte Scar/WAVE-Komplex präzipitiert wurde. Allerdings konnten die anderen Untereinheiten AbiA, Scar und HSPC300 nicht im Silbergel nachgewiesen werden. Obwohl HSPC300 mit seiner geringen Größe von nur 8,2 kDa in 10%igen SDS-PAGE Gelen nicht aufgetrennt werden kann, war es denkbar AbiA mit einer Größe von 35,3 kDa und Scar mit einer Größe von 48,4 kDa durch Western-blotting nachzuweisen. Allerdings konnte auch hier kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden, da möglicherweise die große Menge an GST-EVH1 die Detektion behinderte. Da andererseits die Interaktion von AbiA mit Nap1/PirA sowie HSPC300/Scar (Gautreau et al., 2004) bereits gezeigt werden konnte, ist dennoch anzunehmen, dass die EVH1-Domäne über AbiA als Mediator an den gesamten Scar/WAVE-Komplex bindet.

2.3 Analyse von DdHSPC300

Da die soeben beschriebenen Experimente den Scar/WAVE-Komplex oder eventuelle Subkomplexe als Bindungspartner von DdVASP identifizierten, sollte der Komplex nachfolgend näher analysiert werden. Zu Beginn wurde mit DdHSPC300 die kleinste Untereinheit des heteropentameren Komplexes aufgereinigt und charakterisiert. DdHSPC300 konnte als GST-Fusionsprotein über Affinitätschromatographie aus *E. coli*-Lysat in großer Menge gereinigt werden (Abbildung 24A). Nach proteolytischer Spaltung des Fusionsproteins, sollten DdHSPC300 und GST durch Volumenausschlusschromatographie voneinander getrennt werden. Wider erwarten konnten die Proteine durch Gelfiltration nicht voneinander getrennt werden. Stattdessen zeigte die SDS-PAGE der eluierten

Fractionen nach Coomassie-Färbung ein nahezu identisches Laufverhalten beider Proteine auf der Chromatographiesäule (Abbildung 24 B). Dieses Laufverhalten des DdHSPC300 war nur durch eine Interaktion mit GST oder eine Oligomerisierung zu erklären. Da bei dieser Methode der R_h der einzelnen Spezies für die Trennung verantwortlich ist, müsste im Falle einer Interaktion mit GST eine Änderung in dessen Wanderungsverhalten, durch einen vergrößerten R_h zu beobachten sein. Da nach Auswertung der Gelfiltrationsläufe keine Änderung im Laufverhalten von GST nachzuweisen war (Daten nicht gezeigt), war eine Oligomerisierung des DdHSPC300 naheliegend. Um eine Interaktion von DdHSPC300 mit GST auszuschließen und um die beiden Spezies voneinander zu trennen, wurde die Methode der Anionenaustauschchromatographie verwendet. Die Leitfähigkeit der Proteinlösung wurde auf 16 mS/cm eingestellt, da unter diesen Bedingungen GST kaum noch an das Säulenmaterial der verwendeten MonoQ Säule binden konnte. Somit wurde bereits während des Ladevorgangs das GST von DdHSPC300 abgetrennt, welches dagegen unter diesen Bedingungen an das Säulenmaterial binden konnte. Durch einen linearen NaCl-Gradienten konnte HSPC300 ab einer Leitfähigkeit von 18 mS/cm von der Säule eluiert werden. Da unter diesen Bedingungen eine Trennung von GST und DdHSPC300 möglich war, konnte eine Interaktion zwischen GST und DdHSPC300 ausgeschlossen werden (Abbildung 24C).

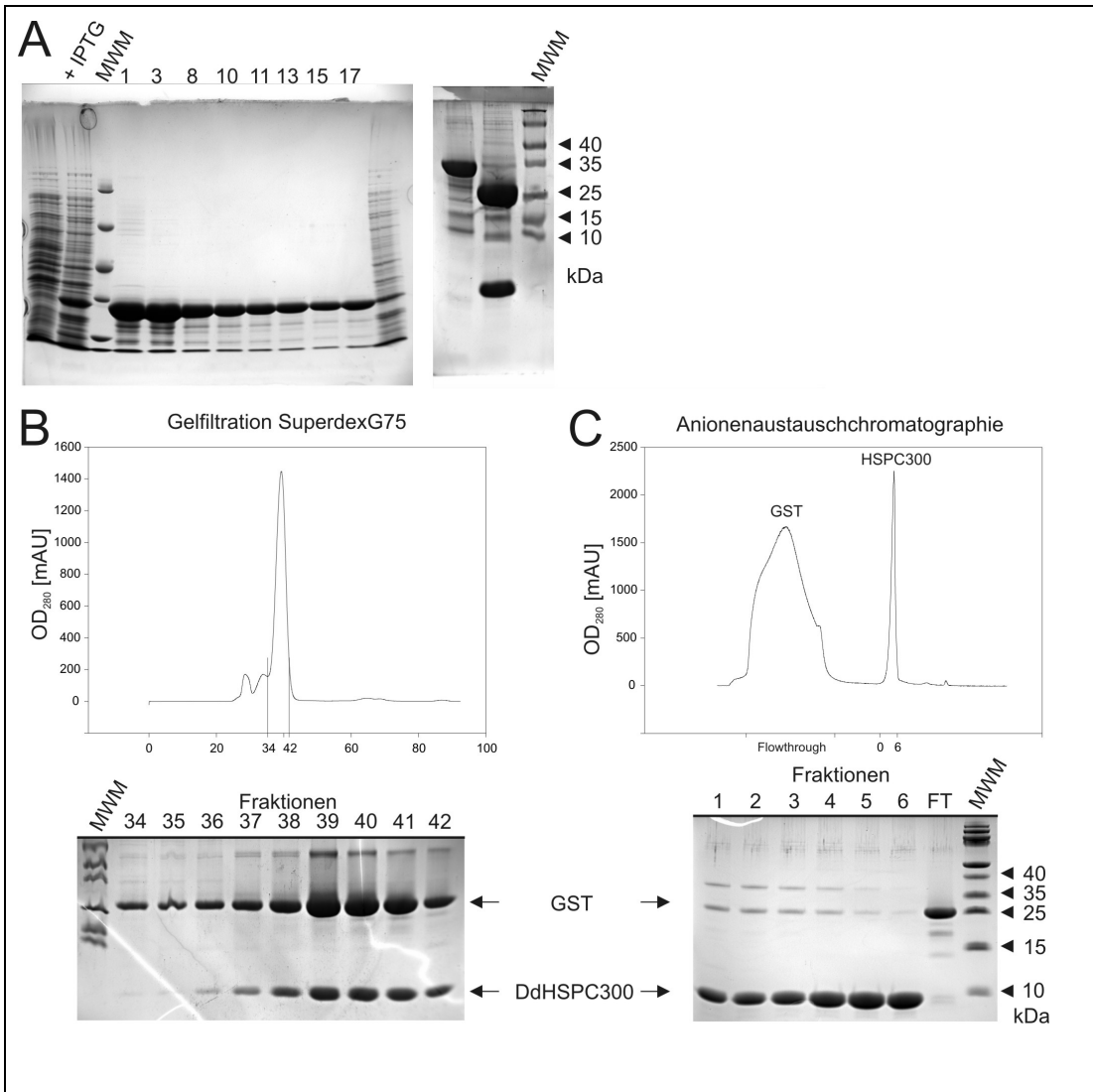


Abbildung 24: Aufreinigung von DdHSPC300 aus *E. coli*-Lysat. (A) Links: Elutionsprofil der Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie. Das Fusionsprotein konnte nach Zugabe von 30 mM reduziertem Glutathion von der Säule eluiert werden. Gezeigt sind die Kontrollen vor und nach der Induktion mit IPTG (Spuren 1 und 2) sowie die eluierten Fraktionen nach SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung. Rechts: Kontrolle der Spaltung des Fusionsproteins. GST konnte durch Inkubation mit der Precision-Protease abgespalten werden. Für die Analyse von DdHSPC300 wurden immer 16% Tris/Tricin SDS-Polyacrylamidgele verwendet (B) Durch Volumenausschlusschromatographie konnte DdHSPC300 nicht von GST getrennt werden. Oben: Elutionsprofil (OD_{280nm}/Fraktionen) auf einer SuperdexG75 Chromatographie Säule. Unten: Coomassie-Blau Färbung nach SDS-PAGE der eluierten Fraktionen. Die Trennung war aufgrund ähnlicher hydrodynamischer Radien nicht möglich. (C) Durch Anionenaustauschchromatographie mit einer MonoQ-Säule konnten die beiden Proteine aufgrund ihrer Nettoladungen getrennt werden. Oben: Elutionsprofil (OD_{280nm}/Fraktionen) der Trennung auf einer MonoQ-Säule. Unten: Coomassie-Blau Färbung nach SDS-PAGE der eluierten Fraktionen.

Das gereinigte DdHSPC300 wurde in Kooperation mit PD. Dr. Ute Curth (MHH) durch AUZ analysiert. Durch Sedimentations- und Gleichgewichtsexperimente konnte ein Sedimentationskoeffizient von $s_{20,W}=2,1$ S und ein Molekulargewicht von 24,7 kDa bestimmt werden (Abbildung 25). Aus dem gemessenen Molekulargewicht und dem gemessenen Sedimentationskoeffizient und unter Berücksichtigung des kalkulierten Molekulargewichts von DdHSPC300 mit 8,2 kDa konnte geschlossen werden dass DdHSPC300 oligomerisiert. Durch Kombination beider Experimente konnte eindeutig gezeigt werden, dass das Homotrimer die einzig mögliche Konformation des freien DdHSPC300 in Lösung ist. Für das homotrimere DdHSPC300 konnte aus diesen Werten ein R_h von 2,9 nm und ein Perrin-Faktor von 1,5 abgeleitet werden. Dieser berechnete R_h stimmt gut mit dem R_h des GST von 2,6 nm (Daten nicht gezeigt) überein, was wiederum die beobachtete Koelution beider Proteine während der Gelfiltration erklärte (Abbildung 24B). Um die Stabilität des Trimers und eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit der Komplexbildung zu untersuchen, wurden die Sedimentationsexperimente über einen großen Konzentrationsbereich von 0,1 mg/ml bis zu 3 mg/ml DdHSPC300 durchgeführt. Bis auf das übliche Verhalten nicht-idealer Lösungen wie z.B. die Zunahme der Viskosität und etwaige elektrostatische Effekte, konnte hier keine Änderung des Sedimentationsverhaltens bzw. des Oligomerisierungsgrades nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine hohe Stabilität des gebildeten Komplexes hin.

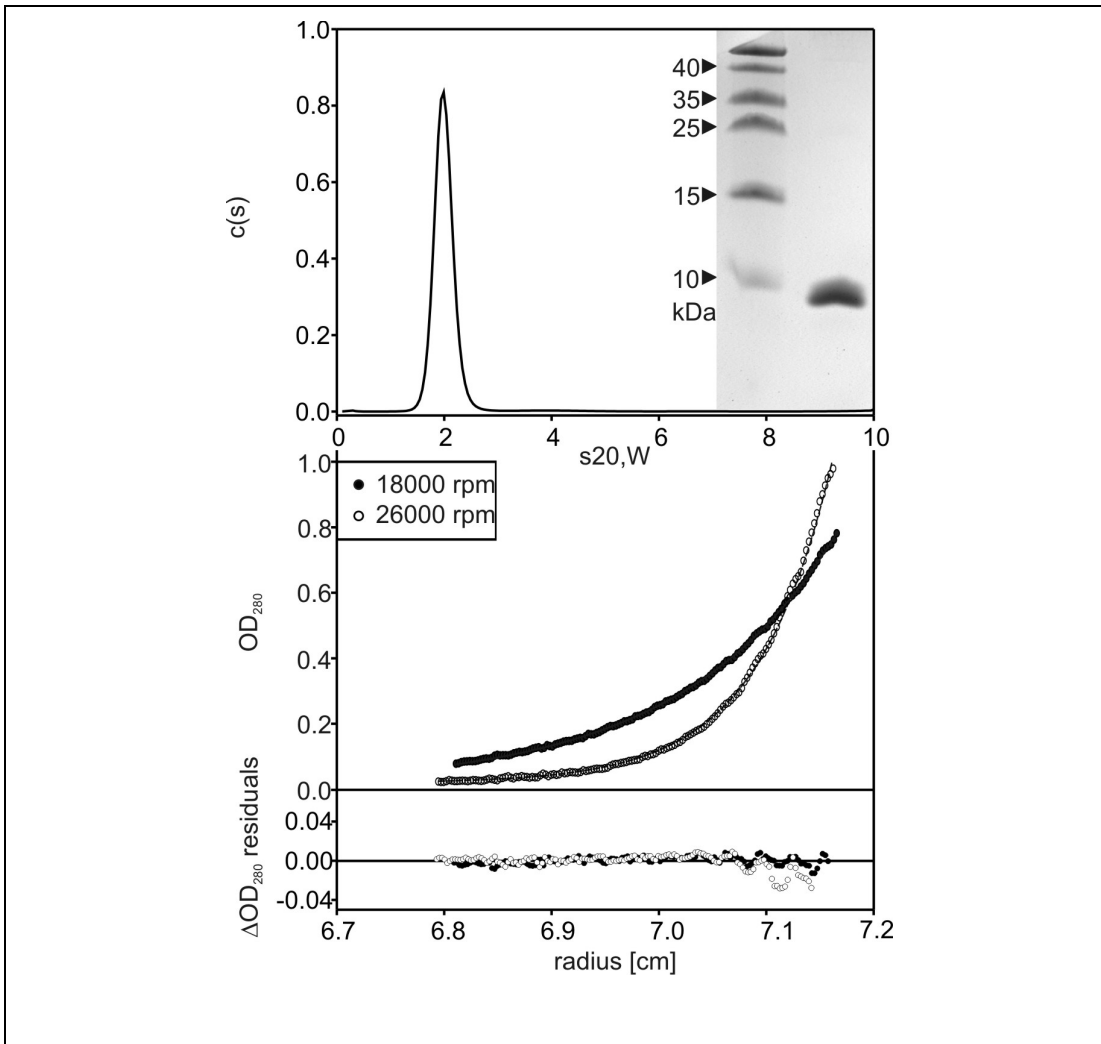


Abbildung 25: Analytische Ultrazentrifugation von DdHSPC300. Die Analyse des DdHSPC300 durch AUZ ergab einen Sedimentationskoeffizienten von $s_{20,W}=2,1$ S (oben). Durch Gleichgewichtsexperimente (unten) konnte das exakte Molekulargewicht mit 24,7 kDa bestimmt werden, was einem Oligomerisierungsgrad von $n=3$ entsprach. Aus diesen Messungen konnte auch ein Perrin-Faktor von 1,5 und der R_h mit 2,9 nm abgeleitet werden. Im oberen Abschnitt ist die parametrisierte Darstellung des Sedimentationsexperiments mit einer Proteinkonzentration von 0,37 mg/ml bei 50000 rpm gezeigt. Der Einschub zeigt das für diese Experimente eingesetzte DdHSPC300 nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. In der Mitte sind der Verlauf der Absorption OD_{280} in der Zelle nach Einstellung des Gleichgewichts bei 18000 rpm und 26000 rpm und die nichtlineare Anpassung der Auswertung gezeigt. Unten sind die Abweichungen der angepassten Kurve zu den Messwerten dargestellt.

Die durch AUZ nachgewiesene Homotrimerisierung des freien DdHSPC300 lässt auf jeweils zwei potentielle Bindungsstellen im Monomer schließen. Die Oligomerisierung

könnte durch die coiled-coil Region im Bereich von AS 39 bis AS 66 des DdHSPC300 vermittelt werden. In Übereinstimmung damit wurde der entsprechende Bereich im humanen Ortholog Brick1 als Oligomerisationsdomäne postuliert (Derivery et al., 2008). Im Anschluss wurde die Interaktion des DdHSPC300 mit zwei weiteren Untereinheiten des Scar/WAVE-Komplexes AbiA und Scar überprüft, da die beiden Proteine ebenfalls coiled-coil Bereiche mit einer ähnlichen Größe wie in DdHSPC300 besitzen. Um eine eventuelle Präferenz von Scar oder AbiA für das DdHSPC300 zu untersuchen, wurden die globulären Abschnitte der beiden Proteine, Scar(AS 1-225) und AbiA(1-149) ohne Modifikationen zusammen mit GST-DdHSPC300 in *E. coli* exprimiert.

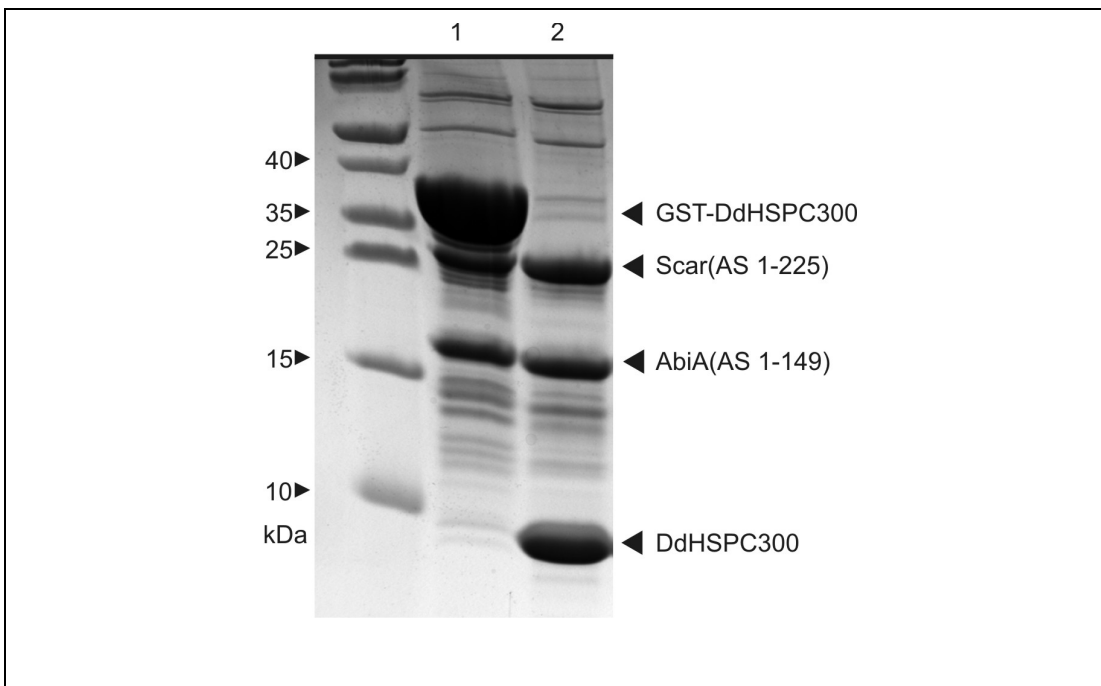


Abbildung 26: DdHSPC300 bildet einen stabile Komplex mit Scar und AbiA. DdHSPC300 war in der Lage sowohl Homotrimere als auch Heterotrimere Komplexe mit Scar(AS 1-225) und AbiA(AS 1-149) auszubilden. Spur 1 zeigt die affinitätschromatographische Reinigung des GST-DdHSPC300 nach Koexpression mit Scar und AbiA in *E. coli*. Die 16% Tris/Tricin SDS-PAGE zeigte, dass durch GST-DdHSPC300 auch Scar(AS 1-225) und AbiA(AS 1-149) mit aufgereinigt werden konnten, wobei GST nicht für die Interaktion verantwortlich war. Die densitometrische Auswertung des Gels zeigte eine 1:1 Stöchiometrie von Scar und AbiA. Spur 2 zeigt den Komplex nach der Entfernung von GST. Auch hier war weiterhin eine 1:1 Stöchiometrie von Scar und AbiA und ein deutlicher Überschuss an DdHSPC300 zu erkennen.

Nach Koexpression aller drei Proteine wurde GST-DdHSPC300 und assoziierte Proteine über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie aus dem *E. coli*-Lysat gereinigt. Nach der Elution wurde die erhaltene Probe durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 26). Zusätzlich zur prominenten Bande des GST-HSPC300 konnten ebenfalls zwei Banden der erwarteten Größe von 25 kDa (Scar(AS 1-225)) und 17 kDa (AbiA(AS 1-149)) identifiziert werden. Um eine unspezifische Interaktion von Scar und AbiA mit GST auszuschließen, wurde GST von DdHSPC300 abgespalten und GST durch Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie aus der Proteinlösung entfernt (Abbildung 26 Spur 2). Die Ergebnisse zeigten, dass DdHSPC300 mit den Fragmenten AbiA(AS 1-149) und Scar(AS 1-225) oligomerisieren kann. Allerdings lag DdHSPC300 in der Probe in einem deutlichem Überschuss vor (Abbildung 26 Spur 2). Aufgrund der von der Bandenintensität abgeschätzten 1:1 Stöchiometrie der Scar und AbiA Fragmente wurde gefolgert, dass die untersuchte Lösung sowohl Homotrimere aus DdHSPC300 als auch Heterotrimere aus DdHSPC300/AbiA(AS 1-149)/Scar(AS 1-225) enthielt. Auch diese Ergebnisse sind konsistent mit Befunden aus dem Labor von A. Gautreau (Gautreau et al., 2004). Somit ist zu vermuten, dass DdHSPC300 keinen der beiden Bindungspartner bevorzugt bindet, sondern heterotrimere Komplexe mit einer 1:1:1 Stöchiometrie ausbildet.

2.4 Phänotypische Charakterisierung von Scar/WAVE-Komplex Mutanten

2.4.1 Herstellung von null-Mutanten einzelner Scar/WAVE-Untereinheiten

Die gefundene Interaktion der EVH1 Domäne von DdVASP mit dem Scar/WAVE-Komplex deutete auf eine Beteiligung der Scar/WAVE-Komplexkomponenten an VASP vermittelten Prozessen, wie beispielsweise an der Ausbildung von Filopodien, hin. In früheren Arbeiten unserer Gruppe in Kooperation mit Prof. Dr. T. Stradal und Prof. Dr. K. Rottner (HZI) konnte in *Dictyostelium* gezeigt werden, dass sowohl Scar-null als auch Nap1-null Mutanten starke Defekte bei der Ausbildung von Pseudopodien aufwiesen, die Mutanten aber weiterhin in der Lage waren, normale Filopodien zu bilden (Steffen et al., 2006). Konsistent mit Befunden aus Vertebraten (Di Nardo et al., 2005), waren diese Ergebnisse ein klarer Beleg dafür, dass der Arp2/3 Komplex für die Bildung von Filopodien nicht essentiell war.

Bemerkenswerterweise, schienen aber Scar-null Zellen vermehrt Filopodien auszubilden wogegen Nap1-null Zellen weniger Filopodien als der WT formten (Steffen et al., 2006). Um eine detaillierte Analyse durchführen zu können, wurden nachfolgend die verbleibenden drei Untereinheiten, AbiA, HSPC300, PirA und durch homologe Rekombination zerstört. Für die Herstellung jedes Knock-out Konstrukts wurden jeweils zwei Fragmente des betreffenden Zielgens mit einer Größe von jeweils 400-700bp durch PCR von genomischer DNA amplifiziert und über angefügte Restriktionsschnittstellen in Vektor pLPBLP kloniert (Faix et al., 2004). Nach Linearisierung des Knock-out Plasmids durch Restriktionsverdau (Abbildung 27 A) wurde das Konstrukt in *D. discoideum* Ax2-Wildtypzellen elektroporiert. Nach Selektion mit Blasticidin S (Bsr) konnten stabile Transformanten erhalten und nach Verdünnung Einzellkolonien auf Bakterienrasen isoliert werden.

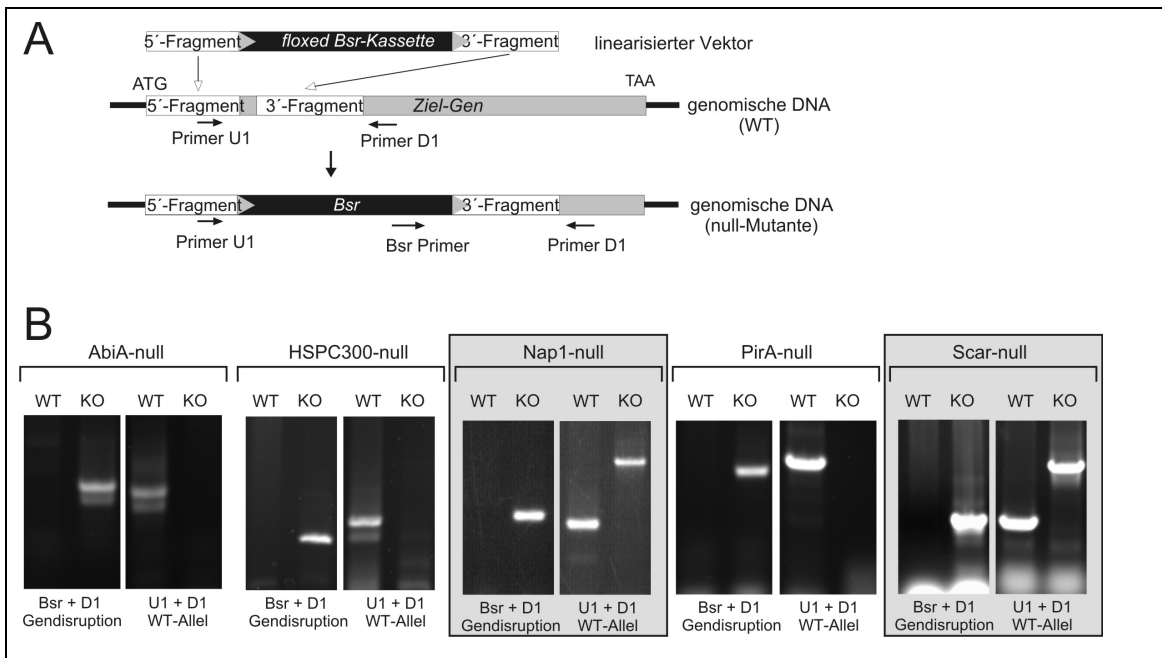


Abbildung 27: Eliminierung aller Untereinheiten des Scar/WAVE-Komplexes in *D. discoideum*.

A) Schematische Darstellung der Knock-out Strategie. Zwei jeweils etwa 400-700 bp lange Fragmente des Zielgens wurden beidseitig flankierend an eine BlasticidinS Resistenzkassette (Bsr) in Plasmid pLPBLP kloniert. Die linearisierten Knock-out Konstrukte wurde durch Elektroporation in *D. discoideum* Zellen eingebracht, wo sie durch zweifaches Crossover der flankierende Sequenzen in die Zielgene rekombinierten. **B)** Die genomische DNA von Einzellklonen wurde durch PCR sowohl auf die Disruption des endogenen Gens als auch auf die Präsenz des Wildtypallels analysiert. Unter Verwendung der in A) beschriebenen Analyseprimer konnten zu den bereits vorhandenen Nap1- und Scar-null-Mutanten (grau unterlegt) nun auch AbiA-, HSPC300-, und PirA-null-Mutanten identifiziert werden. Zur Veranschaulichung ist die die PCR Analyse aller fünf Mutanten gezeigt. WT: Wildtyp, KO: Knock-out.

Um den Knock-out zu verifizieren, wurde die genomische DNA klonaler Zellen gereinigt und durch PCR mit geeigneten Primern auf die erfolgreiche Integration der Bsr-Resistenzkassette in die Zielgene analysiert (Abbildung 27B). Knock-out Mutanten der drei fehlenden Scar/WAVE-Komplex Untereinheiten konnten erfolgreich identifiziert werden. Somit konnten nun vergleichende Studien mit allen fünf null-Mutanten des Komplexes durchgeführt werden.

2.4.2 Mikroskopische Analyse der F-Aktin Verteilung

Um die Morphologie und die subzelluläre Verteilung an F-Aktin in den einzelnen null-Mutanten der Scar/WAVE-Komplex Untereinheiten zu untersuchen, wurden die Zellen fixiert, mit TRITC-Phalloidin angefärbt und anschließend durch konfokale Mikroskopie analysiert. Aus den konfokalen Schnitten des Wildtyps und der Mutanten wurden 3D-Rekonstruktion berechnet und auf eine Bildebene projiziert (Abbildung 28). Im WT war F-Aktin typischerweise am Leitsaum und in den Pseudopodien der Zelle, sowie in den fingerförmigen Filopodien und den kronenförmigen Makropinosomen lokalisiert (Hacker et al., 1997). Makropinosomen dienen der Aufnahme von Flüssigkeiten und Partikeln wie Bakterien und Hefen. Bemerkenswerterweise zeigten die fünf analysierten Scar/WAVE-Mutanten spezifische Unterschiede in ihrer Morphologie und der Verteilung an F-Aktin (Abbildung 28). Der Scar-null Mutante fehlten fast vollständig Pseudopodien und Makropinosomen. Stattdessen war eine vermehrte Bildung von Filopodien zu beobachten. HSPC300-defiziente Zellen zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie Scar-null, sie bildeten aber augenscheinlich weniger Filopodien aus. In der Nap1-null Mutante dagegen war neben der Bildung von Filopodien auch noch ein aufgekräuselter Leitsaums zu beobachten. Dieses Ergebnis war in soweit unerwartet, da der Scar/WAVE-Komplex in anderen Systemen als essentiell für das Aufkräuseln der Membran beschrieben worden ist (Kunda et al., 2003; Steffen et al., 2004; Steffen et al., 2006; Yamazaki et al., 2003). Die AbiA-null Mutante bildete dagegen einige Pseudopodien und eine Vielzahl an Makropinosomen aus. Zusätzlich konnte die Bildung von verkürzten Filopodien beobachtet werden. Diese Strukturen hatten eine ungewöhnliche Morphologie und schienen teilweise deformiert. Den PirA-null Mutanten fehlten größtenteils Strukturen wie Makropinosomen, Pseudopodien und Filopodien. Im Gegensatz dazu bildeten diese Zellen blasenartige Fronten (blebs) aus, in denen wenig F-Aktin akkumulierte. Des Weiteren bildeten diese Zellen auffällige Büschel von Retraktionsfasern am posterioren Ende der Zellen.

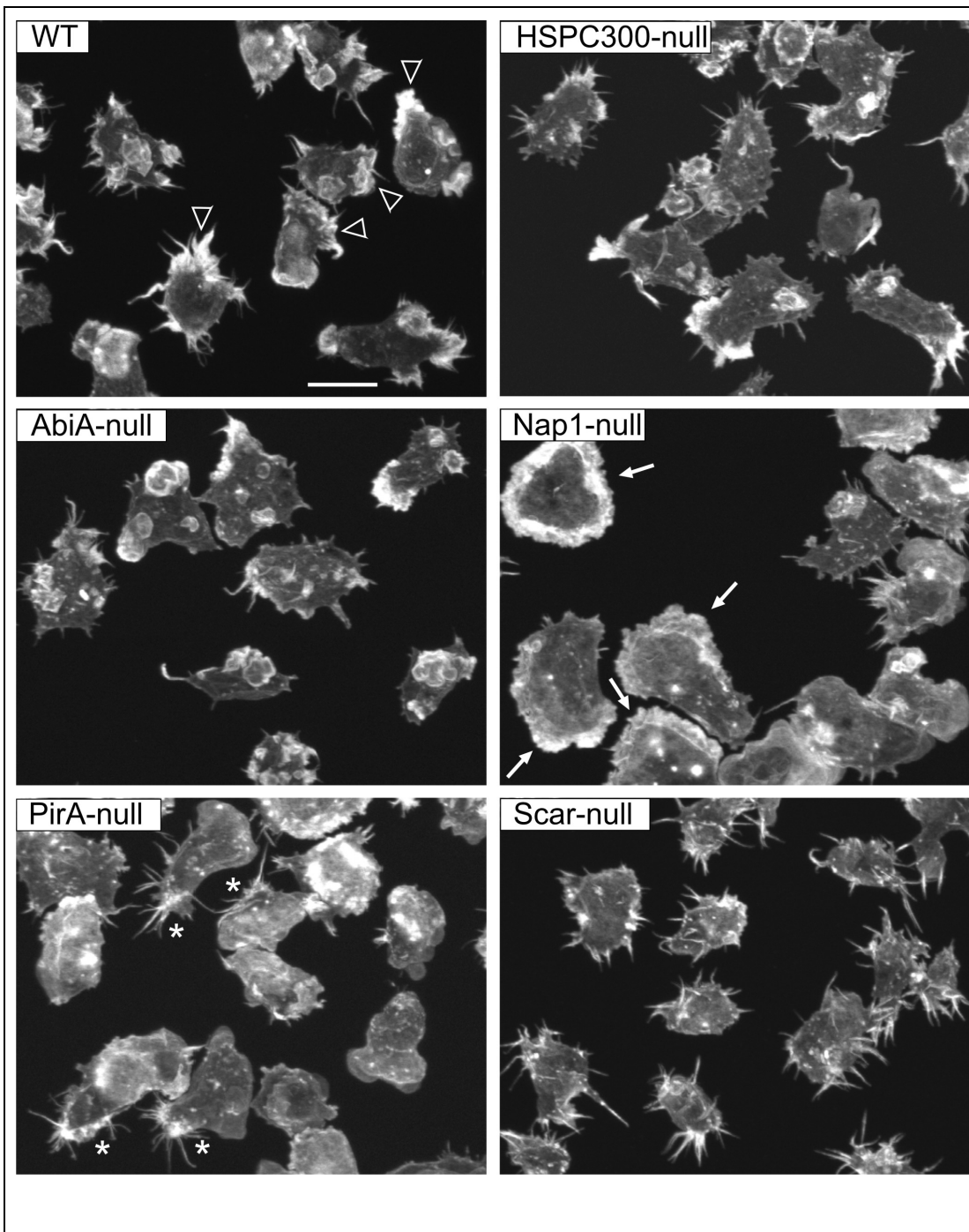
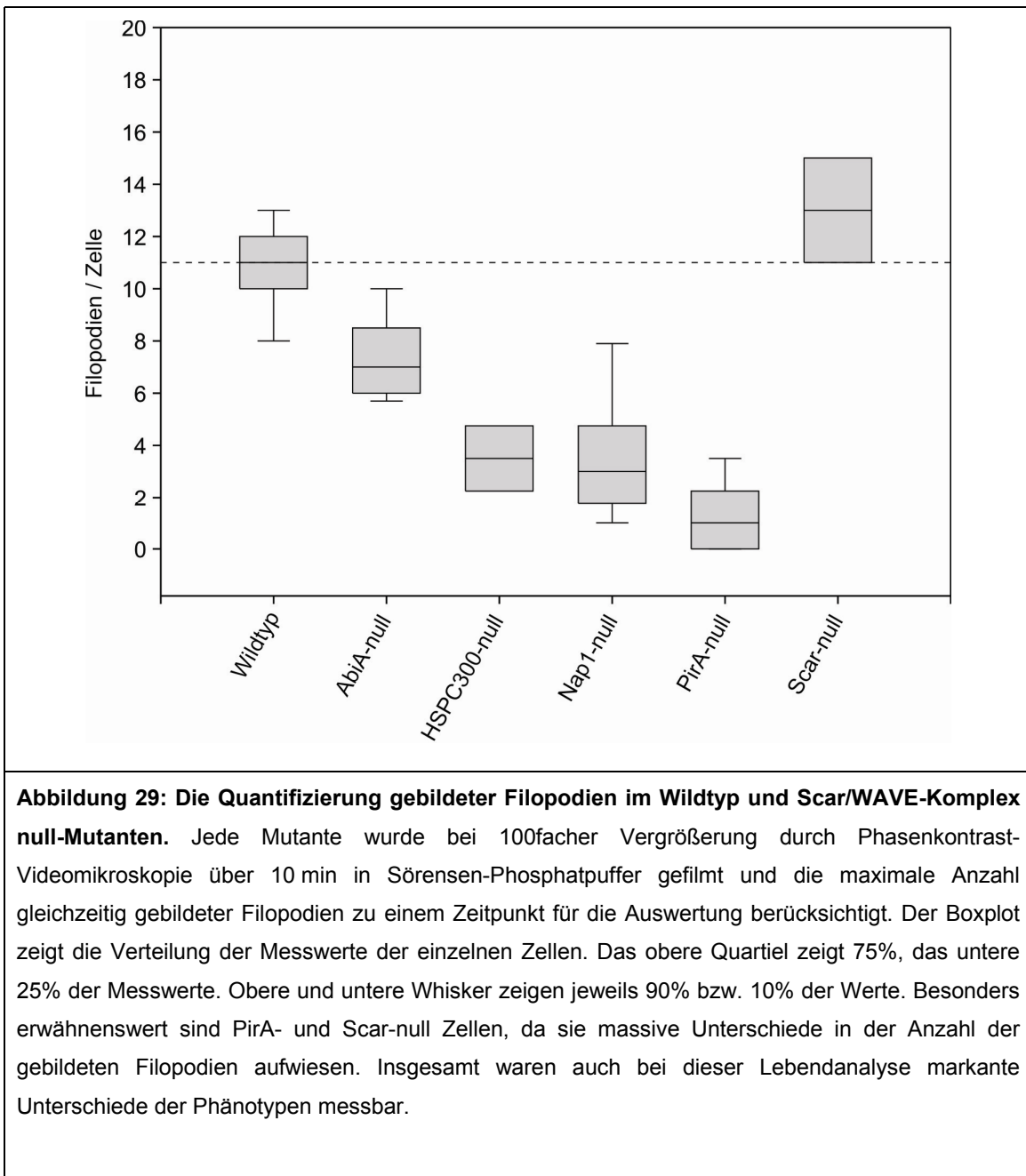


Abbildung 28: Die Einzelmutanten der Scar/WAVE-Komplex Untereinheiten zeigen deutliche Unterschiede in der Morphologie und Organisation des F-Aktinzytoskeletts. Die Zellen wurden fixiert und das F-Aktin mit TRITC-Phalloidin angefärbt. Leere weiße Dreiecke markieren typische Strukturen in WT-Zellen wie z.B. den Leitsaum oder Pseudopodien sowie Filopodien und Makropinosomen. Weiße Pfeile deuten auf Pseudopodienartige Strukturen in Nap1-null Mutanten hin und weiße Sterne weisen auf büschelartige Retraktionsfasern in PirA-null Zellen hin. Der Balken repräsentiert 10 µm.

Bislang wurde angenommen, dass das der Scar/WAVE-Komplex nur als molekulare Einheit fungiert und in einem linearen Signalweg der Arp2/3-Komplex Aktivierung zur Ausbildung von Pseudopodien führt (Gautreau et al., 2004; Kunda et al., 2003; Rogers et al., 2003). Die in die dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten interessanterweise auf zusätzliche Funktionen des Scar/WAVE-Komplexes hin.

2.4.3 Quantifizierung der Filopodien in den Einzelmutanten

Da bei fixierten Zellen eine Unterscheidung von Filopodien und Retraktionsfasern mitunter schwierig ist, war es notwendig, die Anzahl der Filopodien durch Videomikroskopie zu quantifizieren. Dazu wurden die einzelnen Mutanten in Nährmedium in Glasbodenschälchen überführt. Nach Anhaften der Zellen wurde das Medium abgenommen, durch Sörensen-Phosphatpuffer ersetzt und erneut für 30 min inkubiert. Durch die geringe Osmolarität des Phosphatpuffers wird verstärkt die Motilität und Filopodienbildung induziert (Yoshida and Soldati, 2006). Die Filopodienbildung wurde bei 100facher Vergrößerung im Phasenkontrast verfolgt. Um eine höhere Genauigkeit der Messung zu erzielen, wurden die Mutanten an 3 unabhängigen Messtagen jeweils mit den Wildtyp verglichen. Für die Auswertung wurde die in einem Zeitraum von 10 min maximale Anzahl an gleichzeitig bestehenden Filopodien pro Zelle zu Grunde gelegt und der Mittelwert aus je 15 Zellen gebildet.



Die Auswertung zeigte unterschiedlich schwere Defekte der Filopodienbildung in den einzelnen Mutanten. Die AbiA-null Mutante bildete mit etwa 7 zeitgleich existierenden Filopodien etwa 30% weniger als der Wildtyp mit 11 Filopodien. Die Nap1- und HSPC300-null Mutanten zeigten mit etwa 3 Filopodien eine Reduktion um etwa 70%, wogegen die PirA-null Mutante eine dramatische Abnahme der gebildeten Filopodien um etwa 90% auf nur etwa 1 Filopodium im untersuchten Zeitraum zeigte. Einzig die Scar-null Mutante wies eine verstärkte Bildung der Zellfortsätze um etwa 18% auf 13 Filopodien auf. Die insgesamt stark unterschiedlichen Werte deuten ebenfalls auf

weitere Funktionen der einzelnen Scar/WAVE-Komplex Untereinheiten neben der Aktivierung des Arp2/3 Komplexes hin. Obwohl die Abwesenheit von vier der fünf Untereinheiten zu einer Verminderung der Filopodien in *Dictyostelium* führten, was eigentlich für eine Beteiligung des Scar/WAVE und in Konsequenz auch des Arp2/3-Komplexes bei der Bildung von Filopodien spräche, zeigten interessanterweise Scar-null Zellen eine vermehrte Bildung von Filopodien, obgleich in Wildtypzellen die Scar-Untereinheit mit ihrer NPF-Aktivität den Arp2/3-Komplex aktiviert, der seinerseits nicht für die Filopodienbildung essentiell ist (Di Nardo et al., 2005; Steffen et al., 2006).

2.4.4 Zellmotilität der Scar/WAVE-Komplex Einzelmutanten

Wie in anderen Organismen ist auch in *Dictyostelium* der Scar/WAVE-Komplex ein Bindeglied im Signalweg der Rho-GTPase-vermittelten Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (Insall and Machesky, 2009). Die durch Scar/WAVE induzierte und durch den Arp2/3-Komplex vermittelte Nukleation von Aktin unterhalb der Plasmamembran im Leitsaum der Zelle ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand die treibende Kraft für die Assemblierung von Aktin in Pseudopodien, um die Zellbewegung zu ermöglichen. Da Filopodien durch ihre Anhaftung an das Substrat auch einen Beitrag zur Motilität von Zellen leisten können (Schirenbeck et al., 2005; Weber et al., 1999), war es naheliegend, auch die Motilität der Mutanten zu analysieren. Dazu wurden die ungerichtete Motilität der Knock-out Mutanten durch Phasenkontrast-Videomikroskopie für 30 min analysiert. Die Mutanten wurden wie oben für die Analyse der Filopodienausbildung in Petrischalen mit einem Glasboden überführt und das Medium nach Anhaftung der Zellen mit Phosphatpuffer ersetzt. Um wiederum eine von äußeren Faktoren unabhängige Messung mit größerer Genauigkeit zu erzielen, wurde an 3 unabhängigen Messtagen die ungerichtete Motilität der Mutanten gemessen und mit dem Wildtyp verglichen. Die so generierten videomikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Software MetaMorph analysiert. Aus den Messwerten lies sich die durchschnittliche Geschwindigkeit der Zellen über den beobachteten Zeitraum ermitteln.

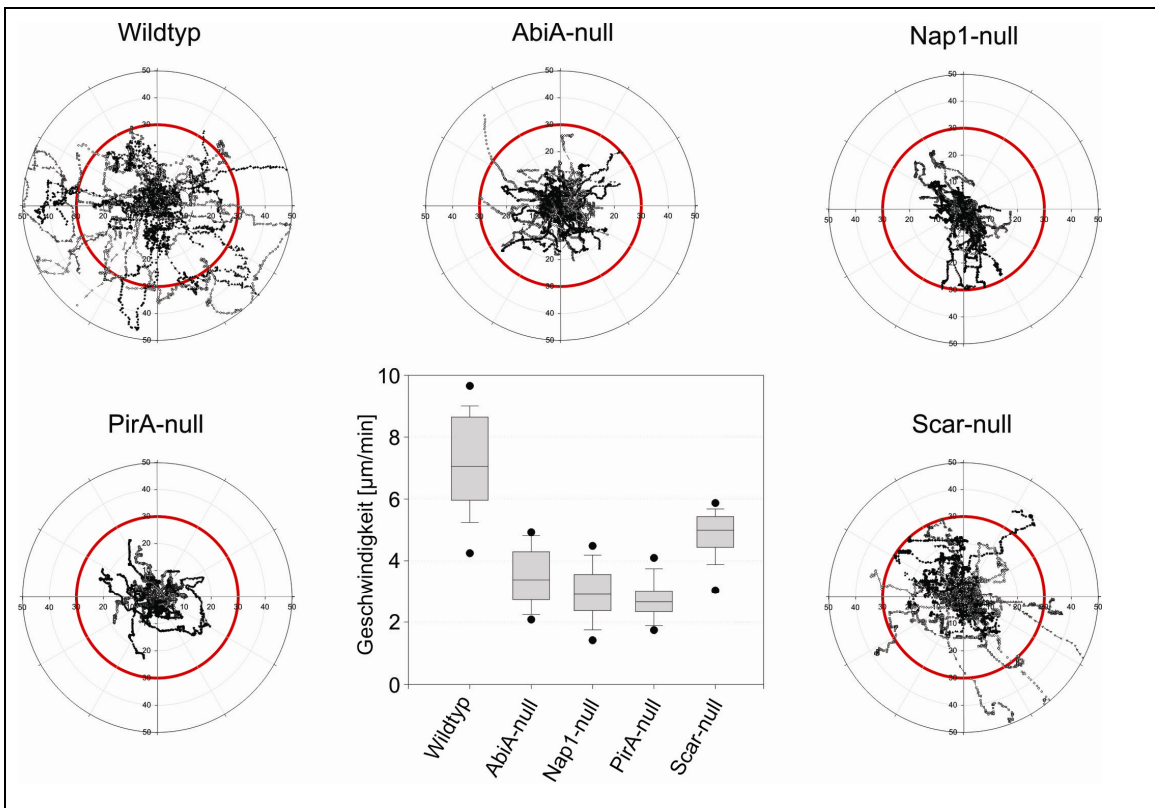


Abbildung 30: Null-Mutanten einzelner Untereinheiten des Scar/WAVE-Komplexes zeigen unterschiedliche Defekte in der Zellmotilität. Für die Analyse der Zellmotilität wurden mindestens 50 Zellen pro null-Mutante ausgewertet. Die Radar-Plots zeigten die Bewegung jeder einzelnen analysierten Zelle, ausgehend von einem gemeinsamen Ursprung. Der Box-Plot zeigt die Verteilung der gemessenen Gesamtwanderungstrecke über die gesamte Beobachtungsdauer von 30 min. Auffällig ist die signifikant höhere Wanderungsgeschwindigkeit der Scar-null Mutante im Vergleich zu den AbiA, Nap1 und PirA-null Mutanten. Zudem waren Unterschiede in der Motilität dieser drei Mutanten zu beobachten. Die Messung wurde nach 30 min Inkubation in Sörensen-Phosphatpuffer durchgeführt und pro Messung mindestens 50 Zellen ausgewertet.

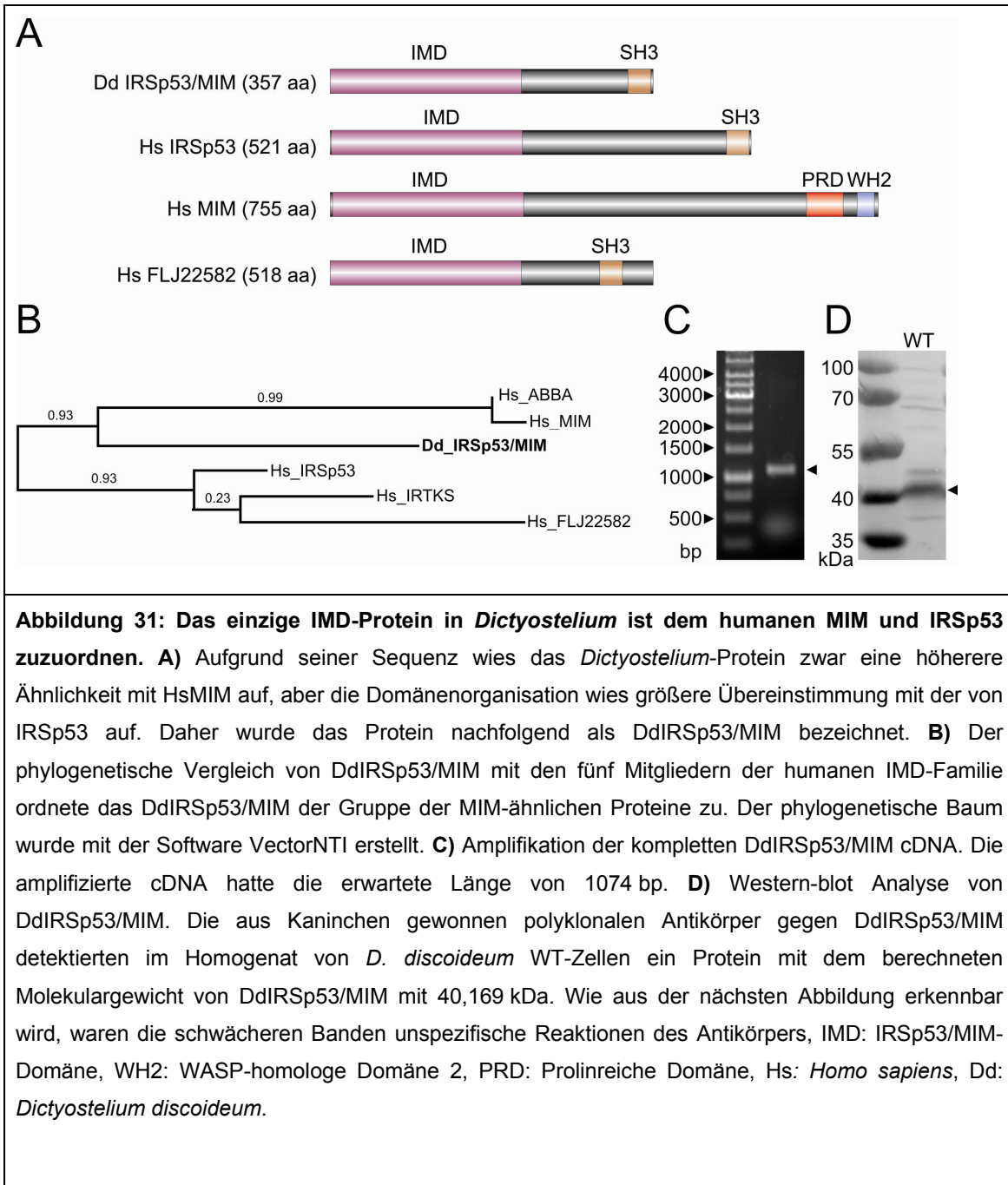
Widerrum wurden für die Einzelmutanten unterschiedliche Geschwindigkeiten gemessen. Für den Wildtyp konnte eine mediane Geschwindigkeit von etwa $7 \mu\text{m}/\text{min}$ gemessen werden, für AbiA-null, Nap1-null und PirA-null Zellen wurden Wanderungsgeschwindigkeiten von $3,7 \mu\text{m}/\text{min}$, $2,5 \mu\text{m}/\text{min}$ und $2,2 \mu\text{m}/\text{min}$ gemessen. Die Scar-null Mutante zeigte überraschenderweise eine deutlich höhere Motilität von $5 \mu\text{m}/\text{min}$ (Abbildung 30). Diese Messungen zeigten, dass die Abwesenheit der einzelnen Untereinheiten einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Zellmotilität hatte. Die größte Reduktion der Geschwindigkeit war in Abwesenheit der PirA Untereinheit zu beobachten. Der kleinste Effekt war in der Scar-null Mutante zu beobachten. Somit waren die Daten zwar im Einklang mit der vorherrschenden

Meinung, wonach der Scar/WAVE-Komplex eine maßgebliche Rolle bei der Aktivierung des Arp2/3-Komplexes bei der Zellmigration spielt (Blagg and Insall, 2004; Ibarra et al., 2006; Steffen et al., 2006). Es blieb aber unklar, warum gerade nach der Eliminierung der Scar-Untereinheit der geringste Effekt auf die Zellbewegung zu beobachten war, da diese Untereinheit eigentlich für die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes verantwortlich ist. Somit war zu vermuten, dass die Aktivität der Scar Untereinheit innerhalb des Scar/WAVE-Komplex nicht alleine für die Arp2/3-vermittelte Zellmigration verantwortlich ist. So könnte der Arp2/3-Komplex möglicherweise auch noch durch andere NFPs aktiviert werden.

2.5 Filopodienbildung in Abwesenheit des einzigen IMD-Proteins in *D. discoideum*

2.5.1 IRSp53/MIM aus *D. discoideum*

Von Proteinen, die gleichzeitig die Aktindynamik regulieren und Membranen deformieren können wird vermutet, dass sie auch eine wichtige Funktion bei der Ausbildung von Filopodien ausüben (Faix et al., 2009; Scita et al., 2008). Die namensgebenden Vertreter der fünf Proteine umfassenden IMD-Familie sind IRSp53 (insulin receptor tyrosine kinase substrate protein of 53 kDa) und MIM (missing-in-metastasis) (Scita et al., 2008). Die etwa 250 AS lange IMD-Domäne im N-terminalen Bereich dieser Proteine ist für die Deformation der Membran nach außen verantwortlich und die Überexpression der IMD-Domäne von IRSp53 war bereits ausreichend, um in Zellen Filopodien-artige Strukturen zu induzieren (Mattila et al., 2007; Millard et al., 2005; Nakagawa et al., 2003). Darüber hinaus konnte IRSp53 im Säugersystem am Leitsaum der Zelle und an der Spitze wachsender Filopodien beobachtet werden (Nakagawa et al., 2003). Allerdings wird die Analyse im Vertebraten durch die Anwesenheit weiterer homologer Proteine erschwert (Abbildung 31), so dass z.B. keine Aussagen darüber getroffen werden konnten, ob IMD-Proteine bei der Ausbildung von Filopodien eine bedeutende Funktion ausüben. Da das Genom von *Drosophila melanogaster* wie auch von *D. discoideum* jeweils nur ein einziges bisher nicht näher charakterisiertes IMD-Protein enthält, wurde die Beteiligung der IMD-Domäne an der Filopodienbildung in *Dictyostelium* untersucht. Das *Dictyostelium* Protein besteht aus 357 AS mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 40,169 kDa. Die IMD-Domäne umfasst die AS 15 bis 219 und die C-terminale SH3 (Src homology 3) Domäne besteht aus AS 303 bis AS 355.



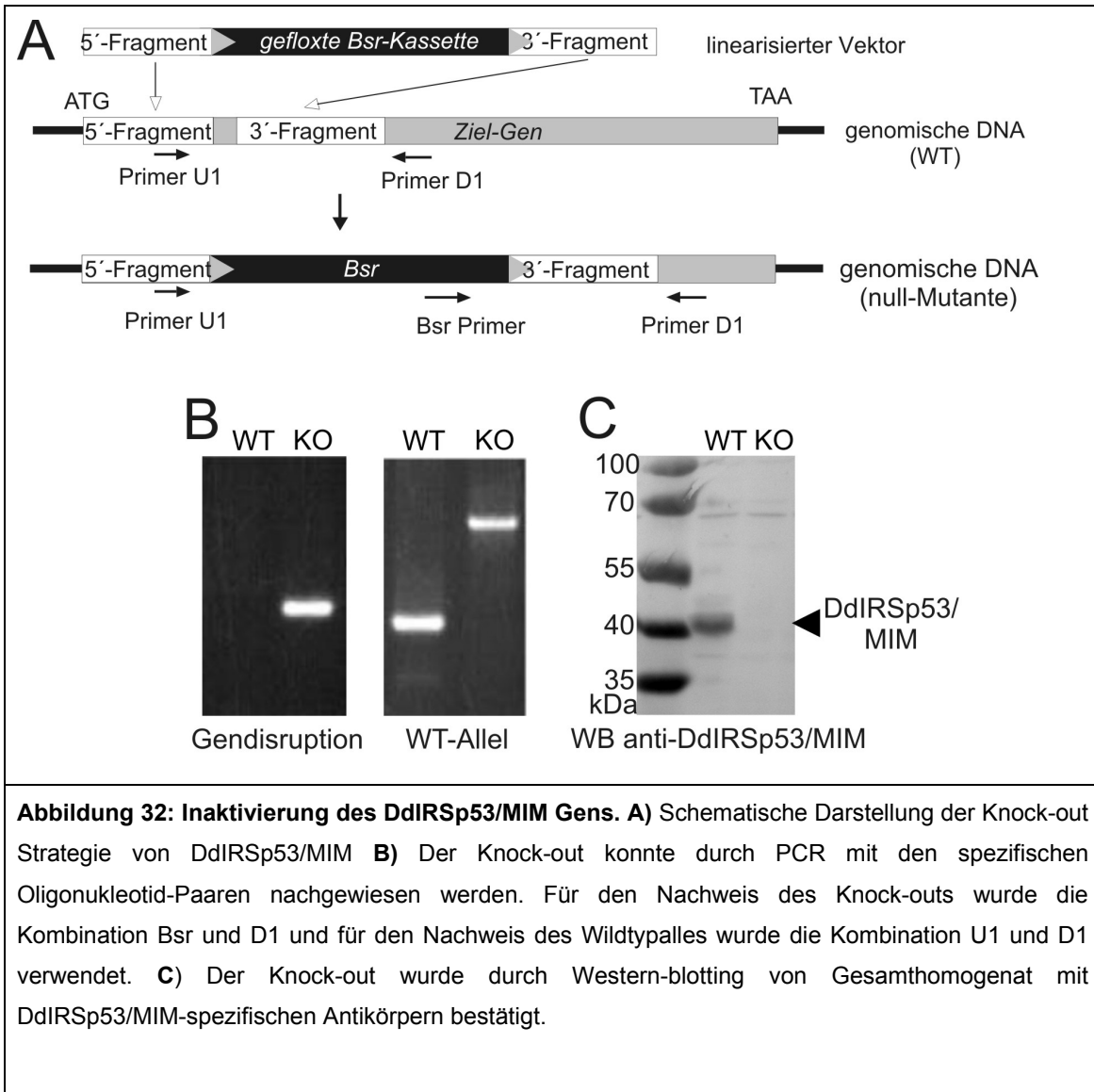
Die Sequenzanalyse ordnete das *Dictyostelium* Protein aufgrund von Sequenzhomologien der Gruppe MIM-ähnlicher Proteine zu. Die Anwesenheit der SH3-Domäne bei gleichzeitiger Abwesenheit der Aktin-bindenden WH2-Domäne entsprach dagegen eher der Organisation IRSp53-ähnlicher Proteine (Abbildung 31). Aus diesem Grund wurde das IMD-Protein aus *Dictyostelium* im Weiteren als DdIRSp53/MIM bezeichnet.

2.5.2 Herstellung DdIRSp53/MIM-spezifischer Antikörper

Um das Protein in Western-blots und Immunofluoreszenz detektieren zu können, wurden polyklonale Antikörper aus Kaninchen gegen ein C-terminales Fragment (AS 224-357) von DdIRSp53/MIM generiert. Der kodierende Bereich dieses Fragments wurde durch PCR generiert und in Plasmid pGEX-6P-1 inseriert. Nach Expression in *E. coli*, wurde das GST-Fusionsprotein in großer Menge affinitätschromatographisch gereinigt und zur Immunisierung verwendet. Die im Serum enthaltenen polyklonalen Antikörper wurden in Western-blots auf ihre Spezifität überprüft und detektierten eine prominente Bande des berechneten Molekulargewichts von DdIRSp53/MIM bei ca. 40 kDa im Homogenat der WT-Zellen (Abbildung 31D).

2.5.3 Herstellung von DdIRSp53/MIM-null Zellen

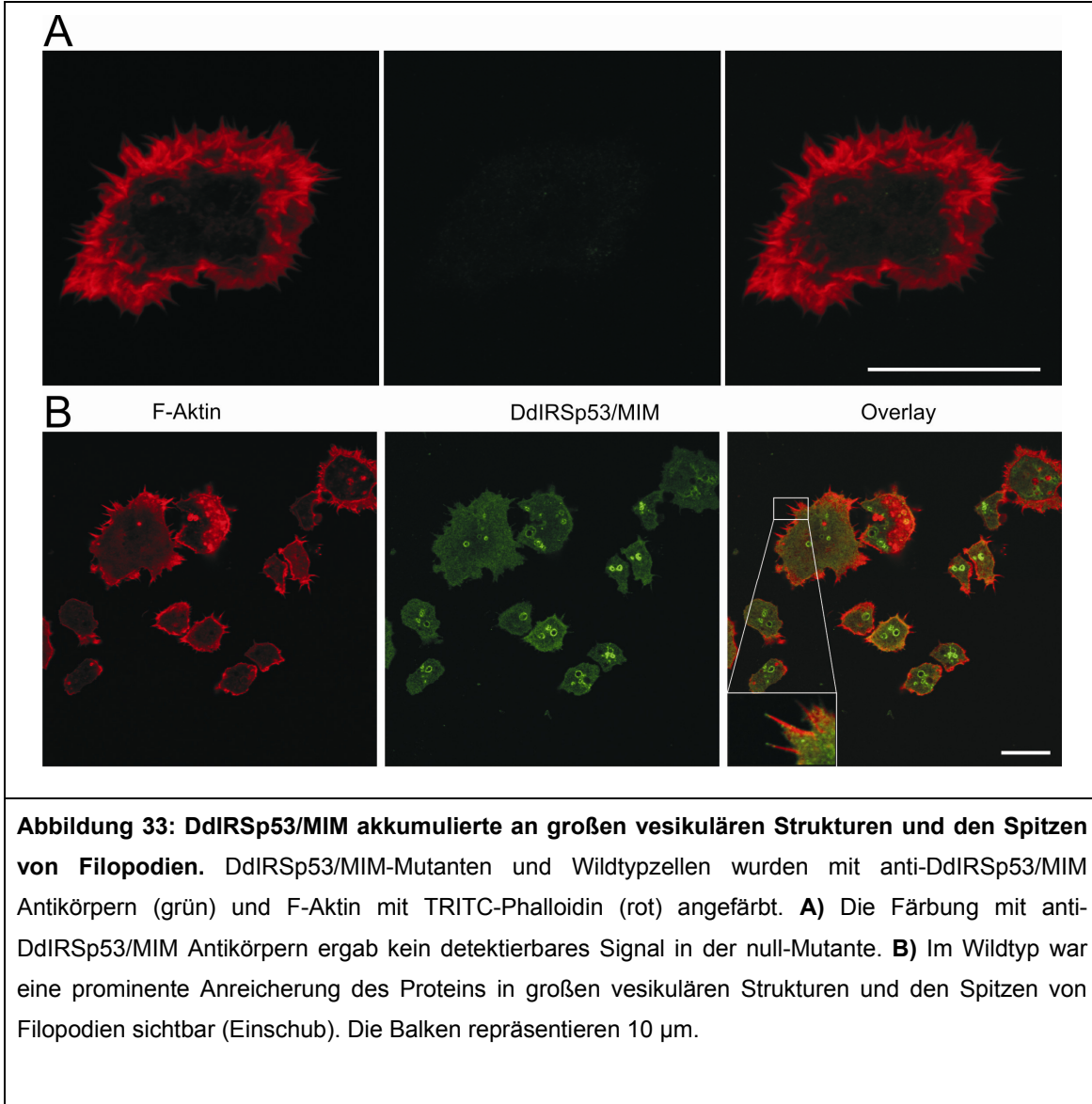
Um Informationen über die physiologische Funktion zu erhalten, wurden das Gen von DdIRSp53/MIM durch Gendisruption wie oben für Scar/WAVE-Komplex-untereinheiten beschrieben, zerstört. Der Knock-out wurde durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden verifiziert (Abbildung 32A/B). Konsistent damit, war DdIRSp53/MIM im Homogenat der null-Mutante durch Western-blotting nicht mehr nachweisbar (Abbildung 32C).



2.5.4 Subzelluläre Lokalisation von DdIRSp53/MIM

Um Erkenntnisse über die subzelluläre Lokalisation von DdIRSp53/MIM zu erlangen, wurden *Dictyostelium*-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Um Aussagen über die Spezifität der Antikörper machen zu können, wurde zunächst die null-Mutante mit polyklonalen anti-DdIRSp53/MIM Antikörper inkubiert. Wie in Abbildung 33A gezeigt, wurde die Null-Mutante nicht angefärbt, so dass mit diesen Antikörpern nichts anderes als DdIRSp53/MIM in Wildtypzellen detektiert werden würde. Im Wildtyp war endogenes DdIRSp53/MIM prominent an vesikulären Strukturen angereicht, bei den es aufgrund ihrer Größe vermutlich um Endosomen oder kontraktile Vakuolen handelte (Abbildung 33B). Darüber hinaus war das Protein

auch deutlich an den Spitzen filopodialer Aktinbündel angereichert, die durch TRITC-Phalloidin angefärbt worden waren. Somit war eine Beteiligung von DdIRSp53/MIM an der Ausbildung von Filopodien denkbar, obgleich Filopodien-artige Strukturen auch in der null-Mutante vorhanden waren (Abbildung 33A).



2.5.5 Zellbiologische Charakterisierung von DdIRSp53/MIM-Mutanten

Um eindeutig nachzuweisen, dass es sich bei den Finger-artigen Zellfortsätzen der DdIRSp53/MIM-null Mutanten tatsächlich um Filopodien handelte und um außerdem die Dynamik dieser Strukturen in lebenden Zellen verfolgen zu können, wurde in der Mutante das Filopodienmarkerprotein DdMyosin VII als Fusion mit GFP exprimiert und durch konfokale Mikroskopie analysiert (Galdeen et al., 2007). Als Kontrolle

wurden GFP-DdMyosin VII exprimierende Wildtypzellen verwendet. Wie im Wildtyp, war auch in der Mutante GFP-DdMyosin VII in den Spitzen der stäbchenförmigen Zellfortsätze deutlich angereichert, so dass diese eindeutig als Filopodien identifiziert werden konnten (Abbildung 34). Darüber hinaus war auch die Dynamik der Protrusion und Retraktion sowie die Länge der Filopodien im Vergleich zum Wildtyp unverändert, so dass geschlossen werden konnte, dass DdIRSp53/MIM keine essentielle Rolle bei der Filopodienausbildung in *Dictyostelium* ausübt.

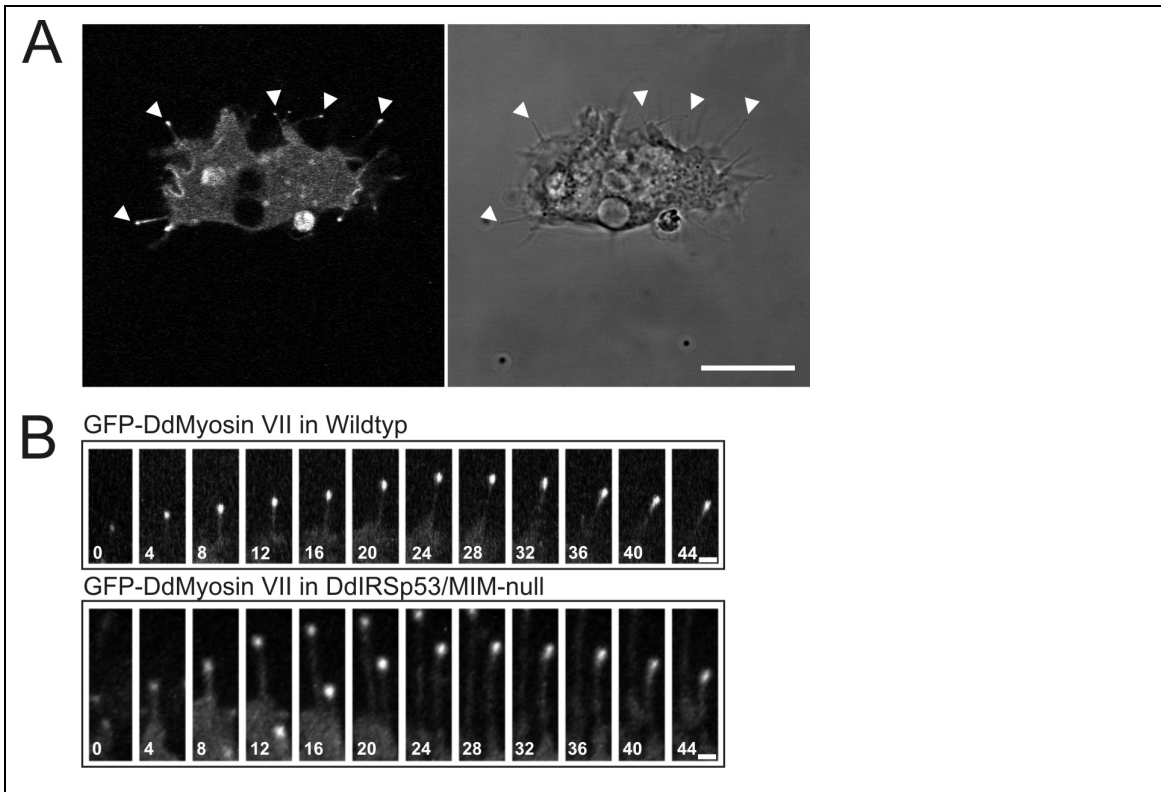


Abbildung 34: Unveränderte Filopodienbildung in Abwesenheit von DdIRSp53/MIM. **A)** Nach Expression von GFP-Myosin VII konnten die Zellfortsätze in DdIRSp53/MIM-null Zellen als Filopodien identifiziert werden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer DdIRSp53/MIM-null Zelle (links) und zeitgleiche Hellfeldaufnahme derselben Zelle (rechts). **B)** Die Analyse einzelner Filopodien durch Fluoreszenzvideomikroskopie in DdIRSp53/MIM-null und Wildtypzellen zeigte keine signifikanten Unterschiede in Morphologie und Dynamik der Filopodien. Gezeigt ist eine Zeitserie repräsentativer Filopodien aus dem Wildtyp (oben) und der Mutante (unten), die sich im gezeigten Zeitraum elongierten, um danach wieder zu schrumpfen. Die Zahlen geben die Zeit in Sekunden an. Die Balken entsprechen 10 µm in A und 1 µm in B.

Da DdIRSp53/MIM besonders stark an großer Vesikel akkumulierte, bei den es sich aufgrund ihre Morphologie vermutlich um kontraktile Vakuolen handelte, wurde

nachfolgend untersucht ob DdIRSp53/MIM-Mutanten phänotypische Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen. Zur mikroskopischen Analyse der Morphologie der kontraktile Vakuolen im WT und in der null-Mutante wurden diese Organellen mit dem Lipidfarbstoff FM2-10 angefärbt und in vegetativen Zellen durch Fluoreszenzvideomikroskopie beobachtet (Abbildung 35A). FM2-10 fluoresziert erst nach Insertion in Membranen und ist in *Dictyostelium* spezifisch für die Markierung der kontraktile Vakuolen geeignet (Heath and Insall, 2008), die in Protozoen osmoregulatorische Funktionen ausüben (Allen and Naitoh, 2002; Clarke et al., 2002; Malchow et al., 2006). Die Analyse durch konfokale Mikroskopie ergab, dass die Anzahl der Vakuolen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert war. Auch die Funktion der Vakuolen war in den null-Mutanten nicht beeinträchtigt. Sie durchliefen wie die Wildtypzellen die Stadien der Befüllung, Fusion mit der Plasmamembran und der Entleerung in den extrazellulären Raum (Abbildung 35 B).

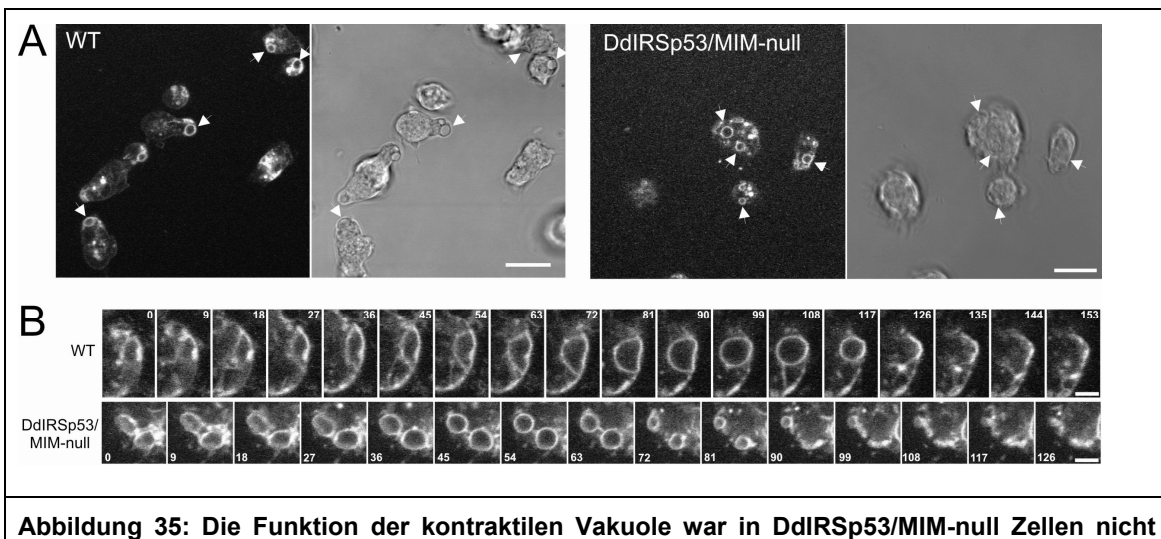
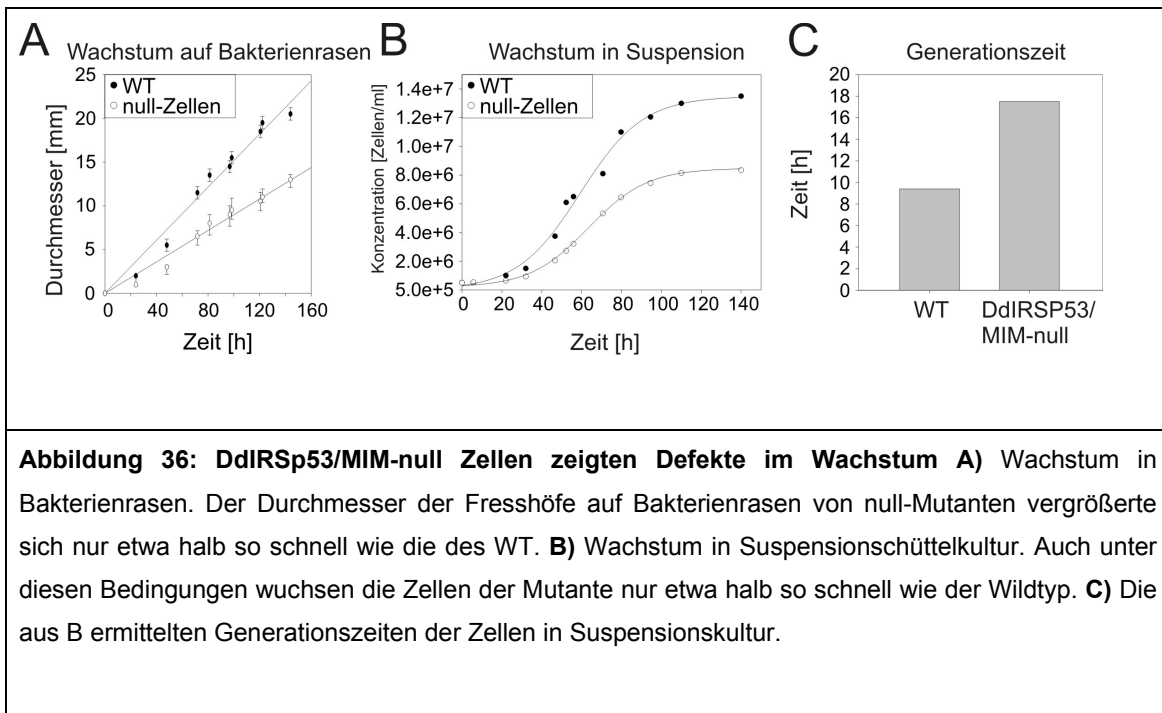


Abbildung 35: Die Funktion der kontraktile Vakuole war in DdIRSp53/MIM-null Zellen nicht beeinträchtigt. A) Morphologie der kontraktile Vakuolen in Wildtypzellen und null-Mutanten. Die Vakuolen wurden durch den fluoreszierenden, lipophilen Farbstoff FM2-10 angefärbt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen sind links und Hellfeldaufnahmen derselben Zellen sind rechts gezeigt. Die weißen Pfeile markieren die kontraktile Vakuolen. Der Balken repräsentiert 10 µm. **B)** Die Befüllung und der Entladevorgang der kontraktile Vakuolen war in den null-Zellen nicht beeinträchtigt. Die gezeigten Zellen wurden in Sørensen-Phosphatpuffer inkubiert und durch konfokale Mikroskopie über die Zeit gefilmt. Die Zeit ist in Sekunden gezeigt. Die Balken repräsentieren 2 µm.

Des Weiteren wurden die DdIRSp53/MIM-null Mutanten im Bezug auf ihr Wachstum auf Bakterienrasen und in Suspensionskultur untersucht. Beim ersten Test wurden

die Zellen mit einem Zahnstocher auf mit Bakterien bewachsene Agarplatten überführt. Die durch Phagozytose aufgenommenen Bakterien ließen nach kurzer Zeit Fresshöfe entstehen, deren Durchmesser über die Zeit verfolgt wurde. Hier zeigte die null-Mutante einen deutlichen Defekt in der Wachstumsgeschwindigkeit von etwa Faktor 2 (Abbildung 36A). In Suspensionskultur wurden die Zellen mit einer Dichte von $5,0 \times 10^5$ angeimpft und die Zunahme der Zellzahl zeitabhängig bestimmt. Auch hier war eine um die Hälfte Wachstumsgeschwindigkeit während der exponentiellen Phase des Wachstums zu messen (Abbildung 36B). Darüber hinaus erreichten DdIRSp53/MIM-null Mutanten nur eine Zelldichte von $8,0 \times 10^6$ Zellen/ml im Vergleich zum Wildtyp, der erst bei $1,4 \times 10^7$ die stationäre Phase erreichte. Aufgrund ihrer normalen Größe der Zellen waren deshalb Defekte in der Zytokinese nicht wahrscheinlich.



Zum Abschluss wurde die Zell-Substratadhäsion der Zellen näher untersucht, da durch frühere Arbeiten zweifelsfrei belegt ist, dass sowohl die Beweglichkeit der Zellen als auch die Phagozytose der Zellen durch die Adhäsion beeinflusst werden (Fey et al., 2002; Tuxworth et al., 2001). Dazu wurden die Zellen nach Anhaftung an Glas durch Reflektions-Interferenz-Kontrastmikroskopie (RICM), da diese untersucht. Die Technik eignet sich hervorragend, um die Kontaktfläche zu bestimmen (Abbildung 37A). Die durchschnittliche Kontaktfläche der Mutante über die Zeit war nur unwesentlich kleiner als im Wildtyp (Abbildung 37B). Allerdings zeigten diese

Untersuchungen, dass die Mutante starke Defekte in der Dynamik der Zellformänderung aufwies, da die sie im Gegensatz zum Wildtyp nur sehr langsam in der Lage war die Zellform zu verändern. Somit deutet die starke Beeinträchtigung der Zellformänderung in Abwesenheit von DdIRSp53/MIM auf eine wesentliche Funktion dieses Proteins in der Reorganisation von Membranen hin, wie sie beispielweise bei der Endozytose erforderlich sind.

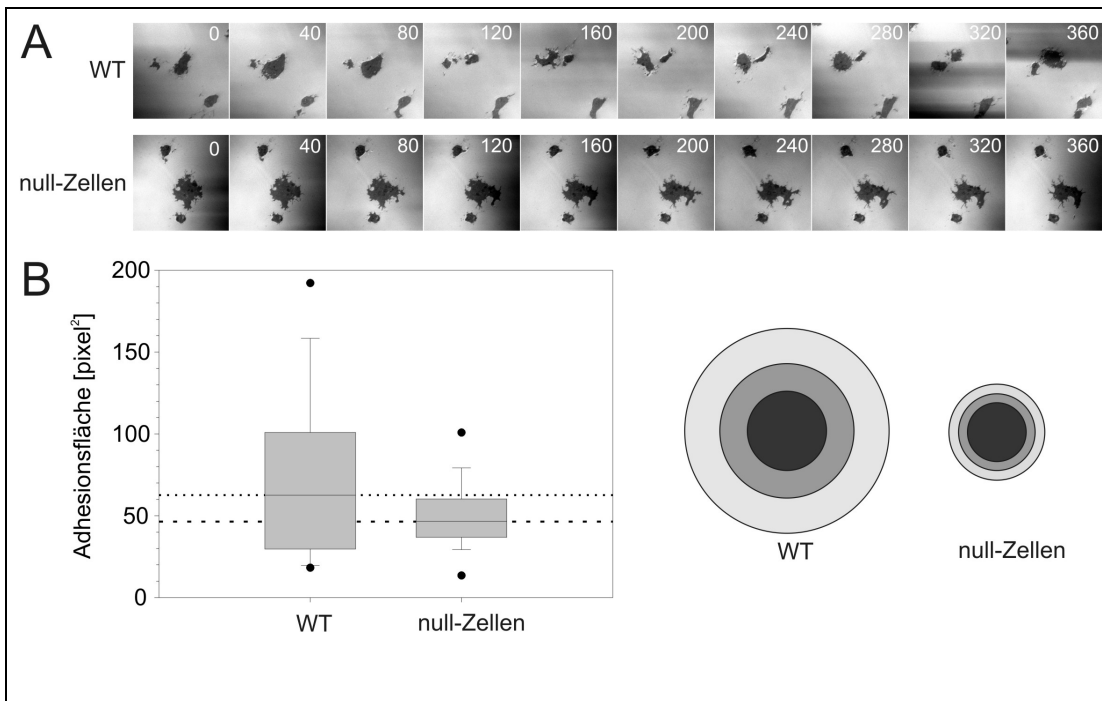


Abbildung 37: DdIRSp53/MIM-null Zellen zeigten starke Defekte bei der Änderung der Zellform. **A)** Die zeitliche Änderung der Kontaktfläche auf Glas von Wildtypzellen und der null-Mutante. Die zeitliche Änderung der Kontaktflächen wurde durch RICM ermittelt. Gezeigt sind Aufnahmen repräsentativer Zellen. Die Zeit ist in Sekunden angezeigt. **B)** Zeitliche Änderung der Kontaktflächen im Wildtyp und der Mutante. Die alle 5 s gemessenen Kontaktflächen in pixel² änderte sich über den Beobachtungszeitraum von 8 min bei Wildtypzellen erheblich stärker als bei der null-Mutante. Der Box-Plot zeigt die Verteilung aller ermittelten Kontaktflächen für den Wildtyp und die DdIRSp53/MIM-null Mutante (links). Die Zielscheiben verdeutlichen die Verteilung der ermittelten Flächen. Die Durchmesser der Kreise korrelieren mit den Daten des Box-Plot. Die Durchmesser der schwarzen Kreise repräsentieren den Median, die der grauen Kreise zeigen das 75. Perzentil und weiße Kreise das 25. Perzentil an.

3 Diskussion

3.1 Die Rolle von MyTH/FERM Myosinen in der Zelle

Die unkonventionellen Myosine VII aus *D. discoideum* und dessen Orthologe in Säugerzellen Myosin X und XV besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal so genannte MyTH4/FERM (myosin tail homology 4/band 4.1, ezrin, radixin, and moesin) Domänen, welche benachbart in den C-terminalen Regionen dieser Motorproteine liegen. MyTH4 Domänen binden an Mikrotubuli und sind in einer Vielzahl an Proteinen zu finden, unter anderem auch in Kinesinen aus Pflanzen (Narasimhulu and Reddy, 1998; Weber et al., 2004). FERM Domänen dagegen binden Membranrezeptoren und sind charakteristischer Bestandteil von Adapterproteinen, die den Kontakt zwischen dem Aktin-Zytoskelett und Zell-Substrat Adhäsionsrezeptoren vermitteln (Chishti et al., 1998). Konsistent damit, sind die als MyTH/FERM Myosine bezeichneten Proteine an der Zell-Substratadhäsion beteiligt. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle in der Ausbildung spezialisierter Zellfortsätze wie zum Beispiel Filopodien und Stereozilien (Krendel and Mooseker, 2005; Tuxworth et al., 2005). Die Eliminierung von Myosin VII in *D. discoideum* und die Verminderung von Myosin X durch RNA Interferenz in Säugerzellen führte zu einem vollständigen Verlust von Filopodien (Bohil et al., 2006; Tokuo et al., 2007; Tuxworth et al., 2001). Diese Experimente belegten eine essentielle Funktion von MyTH/FERM Myosinen bei der Ausbildung dieser Zellfortsätze. Bislang ist allerdings noch unklar, welchen spezifischen Beitrag sie bei der Ausbildung von Filopodien leisten. Es wird vermutet, dass diese Myosine über ihre FERM Domäne verschiedene Proteine binden können, um diese nachfolgend durch ihre Motoraktivität über Aktinfilamente an spezifische Stellen in der Zelle zu transportieren (Tokuo and Ikebe, 2004; Tokuo et al., 2007). Myosin X aus Säugerzellen beispielsweise bindet über seine FERM-Domäne an β -Integrin. Es wird vermutet, dass diese Zelladhäsionsmoleküle (CAM) so an die Zellperipherie und die Spitzen von Filopodien gelenkt werden, um dort eine stabile Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett und dem Substrat herzustellen (Tuxworth et al., 2005; Watanabe et al., 2010; Zhang et al., 2004). In *Drosophila* bindet Myosin XV an das CAM DE-Cadherin, um dieses vermutlich innerhalb von Filopodien an Orte der Zell-Zell Adhäsion zu transportieren (Liu et al., 2008). Für Myosin X aus Säugerzellen konnte, ebenfalls durch eine Y2H-Analyse, eine Interaktion mit dem Ena/VASP Protein Mena

gezeigt werden (Tokuo and Ikebe, 2004). Zudem lässt eine zeitaufgelöste Kolokalisationsstudie in Hela S Zellen einen Transport von Mena durch Myosin X in die Spitze von Filopodien vermuten (Tokuo and Ikebe, 2004). Diese Daten stützen die in dieser Arbeit durch Y2H-Assays gefundene Interaktion des DdMyosin VII mit VASP aus *D. discoideum*. Da durch Y2H-Analyse allerdings nicht eindeutig zwischen einer direkten oder einer durch zusätzliche Faktoren vermittelten Interaktion unterschieden werden kann, muss dieses Ergebnis noch durch weitere Methoden verifiziert werden. Dazu würden sich z.B. analytische Ultrazentrifugation, dynamische Lichtstreuung, Oberflächenplasmonresonanz oder Pulldownexperimente mit gereinigten Proteinen eignen. Die stark ähnlichen Phänotypen der Knock-out Zellen von DdMyosin VII und DdVASP sprechen für eine Kooperation der beiden Proteine in der Bildung von Filopodien (Faix et al., 2009). Welche konkrete Funktion das DdMyosin VII, neben dem eventuellen Transport von DdVASP an die Spitze von Filopodien ausübt, müssen nachfolgende Arbeiten zeigen. Denkbar wäre hier ebenfalls der Transport von CAMs in der Filopodienspitze. In Übereinstimmung damit, wurde gezeigt, dass DdMyosin VII mit TalinA koimmunopräzipitiert (Tuxworth et al., 2005). Darüber hinaus zeigen sowohl DdMyosin VII-null und TalinA-null Mutanten eine verminderte Adhäsion zum Substrat. Zusätzlich könnte natives DdMyosin VII, wie Myosin X in Vertebraten, Dimere ausbilden, welche aufgrund ihrer Motoraktivität und Spezifität für filopodiale Aktinfilamente an die Spitze von Filopodien wandern und dort die von Forminen und VASP generierten Aktinfilamente durch Quervernetzung stabilisieren (Nagy et al., 2008; Nagy and Rock, 2010; Tokuo et al., 2007; Watanabe et al., 2010). Des Weiteren muss z.B. durch Pulldown-assays und Yeast-two-hybrid Studien geklärt werden, welches Motiv bzw. welche Domäne aus DdMyosin VII für die Interaktion mit DdVASP verantwortlich ist. Nach Identifizierung dieser Bereiche und biophysikalischer Charakterisierung der Interaktion, könnten Einblicke in die Funktion und den Mechanismus von DdMyosin VII während der Filopodienbildung z.B. durch *in vitro*-Studien der Aktindynamik mit gereinigten Proteinen, wie z.B. DdVASP, DdMyosin VII, Cofilin und Formine, gewonnen werden. Zu diesem Zweck würde sich beispielsweise die Methode der TIRF-Mikroskopie hervorragend eignen.

3.2 IRSp53/MIM aus *D. discoideum*

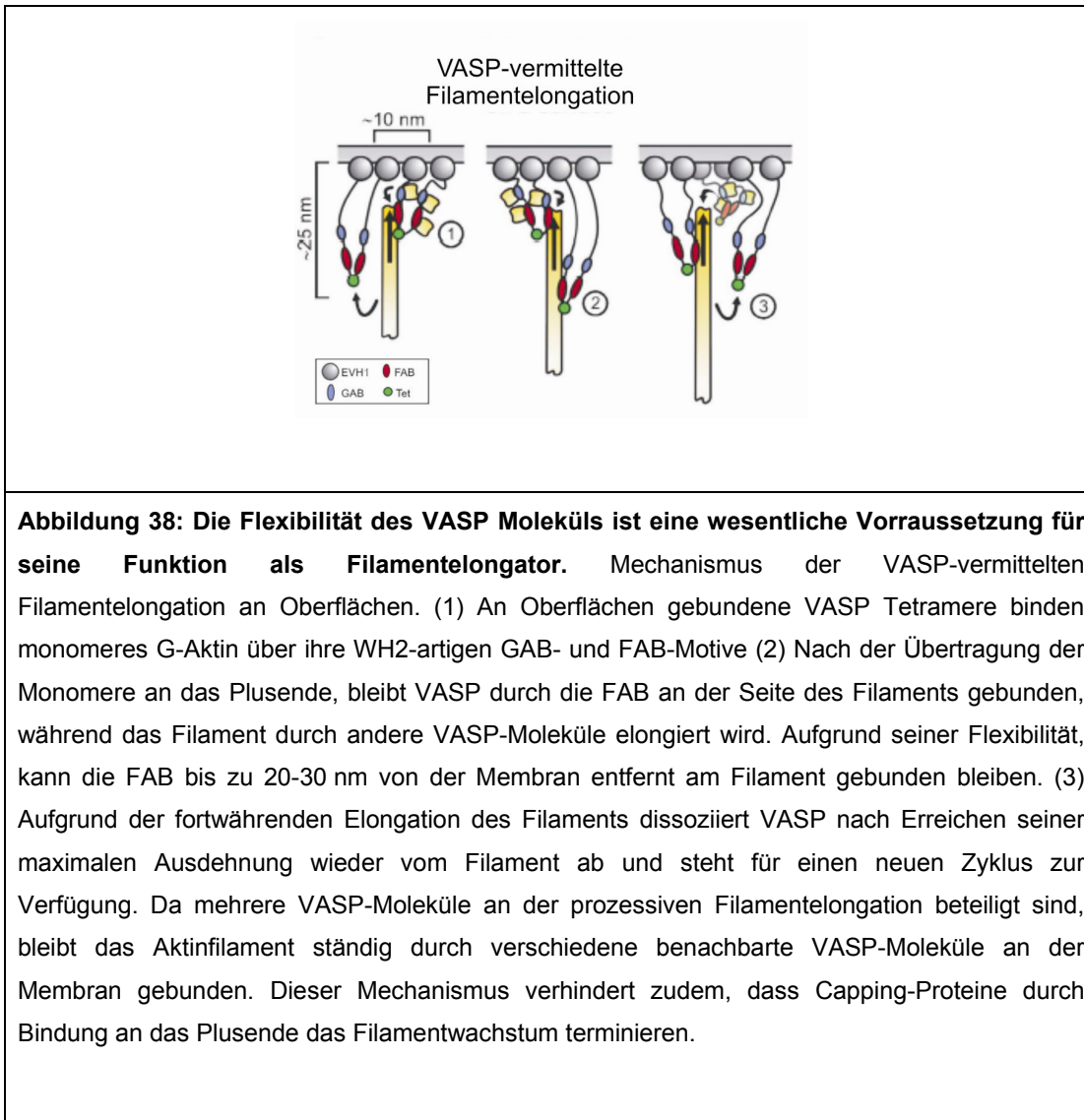
Die Familie der BAR-Domänen Proteine umfasst eine Vielzahl verschiedener Proteine, deren gemeinsames Merkmal die N-terminale BAR-Domäne ist. Die aus drei α -Helices aufgebauten BAR-Domänen, bilden antiparallele Dimere aus und binden und deformieren Lipidmembranen (Saarikangas et al., 2010). Die klassische BAR-Domäne wie in Amphiphysin beugt Membranen ins Innere der Zelle und ist an der Endozytose beteiligt (Bhatia et al., 2009; Peter et al., 2004; Saarikangas et al., 2010). IRSp53 und MIM dagegen gehören zu der Unterfamilie der IMD oder inversen BAR-Domänen Proteine (Scita et al., 2008). Die Familie dieser Proteine umfasst im Säugersystem fünf Mitglieder, die als IRSp53, IRTKS, FLJ22582, MIM und ABBA bezeichnet werden und welche allesamt die Fähigkeit haben PIP₂-reiche Plasmamembranen nach außen zu beugen (Mattila et al., 2007; Scita et al., 2008). Mit Ausnahme von MIM und ABBA, welche C-terminal eine prolinreiche Sequenz gefolgt von einer WH2-Domäne beinhalten, verfügen alle Mitglieder der IMD-Proteinfamilie über eine C-terminale SH3 Domäne. Für IRSp53 konnte eine Interaktion der SH3-Domäne mit Scar/WAVE Proteinen beschrieben werden, die zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes führt (Nakagawa et al., 2003; Suetsugu et al., 2006a; Suetsugu et al., 2006b). Das Genom von *D. discoideum* enthält nur ein Gen für das IMD-Domänenprotein DdIRSp53/MIM (Eichinger et al., 2005; Shevchuk et al., 2009). DdIRSp53/MIM weist zwar eine höhere Sequenzübereinstimmung mit MIM auf, ist aber wie IRSp53 aufgebaut. Da *D. discoideum* in der Lage ist Filopodien auszubilden und die bisher entschlüsselten Signalwege häufig evolutionär konserviert sind (Faix et al., 2009), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob DdIRSp53/MIM eine tragende Rolle bei der Filopodienausbildung ausübt. Endogenes DdIRSp53/MIM war zwar wie in Vertebraten an Filopodienspitzen lokalisiert, aber die Eliminierung von DdIRSp53/MIM führte zu keinem augenscheinlichen Defekt in der Filopodienbildung. Darüber hinaus war DdIRSp53/MIM stark an vesikulären Strukturen angereichert, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um kontraktile Vakuolen handelt. Auch diese Strukturen waren in der null-Mutante unverändert erhalten. Eine Analyse zur Dynamik von DdIRSp53/MIM war leider nicht möglich, da sowohl N-terminale wie C-terminale Fusionen mit GFP nicht mehr die Lokalisation des endogenen Proteins aufwiesen, sondern diffus im Zytoplasma verteilt waren. Die Untersuchungen der null-Mutanten zeigten aber starke Defekte in der Dynamik der Zellformänderung. Somit könnte DdIRSp53/MIM eine wesentliche Funktion bei der

Reorganisation von Membranen und möglicherweise des darunter liegenden kortikalen Zytoskeletts ausüben.

3.3 Die Flexibilität des VASP Moleküls ist eine wesentliche Voraussetzung für seine Funktion

Bisherige Arbeiten haben gezeigt, dass VASP eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Membranfortsätzen, der Zellmotilität und der Bewegung intrazellulärer Pathogene hat (Carlier and Pantaloni, 2007; Pollard and Borisy, 2003; Pollard, 2007; Rottner et al., 2005). Frühere biochemische und zellbiologische Arbeiten mit VASP ergaben kein klares Bild über die Funktion dieses Moleküls bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Trichet et al., 2008). So blieb beispielweise ungeklärt, ob Ena/VASP Proteine mit Capping-Proteinen (CP) um das Plus-Ende von Aktinfilamenten konkurrieren und so die Aktinpolymerisation in Gegenwart von CP erlauben (Barzik et al., 2005; Bear et al., 2002; Pasic et al., 2008; Samarina et al., 2003; Schirenbeck et al., 2006). Ebenso unklar blieb, ob die Proteine direkt an der Filamentelongation beteiligt sind. Daher wurde in unserer Arbeitsgruppe die Assemblierung von Aktinfilamenten in Gegenwart von DdVASP und humanen VASP (hVASP) mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie untersucht (Breitsprecher et al., 2008). Diese Untersuchungen zeigten, dass sowohl humanes als auch *Dictyostelium* VASP die Filamentelongation durch die Rekrutierung von G-Aktin mittels seiner WH2-artigen GAB und FAB-Motive an das Plus-Ende beschleunigen. In Lösung bindet das mit Aktin-Monomeren beladene VASP an das Plus-Ende und bleibt nach Einbau der Untereinheiten mit seiner FAB-Motif seitlich am Filament haften. Unter diesen Bedingungen wurde deshalb die Filamentelongation bereits durch geringe Mengen an Capping Protein gehemmt. Im Gegensatz dazu, war an mit VASP dicht beschichteten Latexkugeln, eine prozessive Filamentelongation zu beobachten, welche selbst in Gegenwart sehr hoher Konzentrationen an Capping-Protein nicht beeinträchtigt wurde. Auch unter diesen Bedingungen bringen die beiden WH2 Motive des VASP Tetramers G-Aktin in die Nähe des Plus-Endes von bestehenden Filamenten bzw. von Nukleationskeimen. Nachdem das G-Aktin an das wachsende Ende übertragen wurde, bleibt die FAB auch hier seitlich am Aktinfilament gebunden. Da mehrere VASP Untereinheiten an der Elongation beteiligt sind, wird das Filament sukzessive weiter verlängert, wobei die FAB-Motive seitlich am Filament gebunden bleiben und sich immer weiter von der Oberfläche nach unten bewegen. Nach dem

Erreichen der maximalen Ausdehnung des VASP-Moleküls muss die FAB allerdings vom Filament dissoziieren, so dass ein neuer Zyklus der Elongation eingeleitet werden kann (Abbildung 38).



Für diesen Mechanismus der prozessiven Aktinfilamentelongation durch Ena/VASP Proteine, ist zum einen hohe intramolekulare Flexibilität des Tetramers sowie die Anhäufung (Clustering) der Moleküle an der Plasmamembran erforderlich. Die in dieser Arbeit gezeigte Analyse des hydrodynamischen Verhaltens und die Vermessung von mVASP durch Elektronenmikroskopie zeigen eindeutig die außergewöhnlich hohe intramolekulare Flexibilität von VASP, welche auch durch die Bindung von Liganden an die EVH1-Domäne nicht beeinträchtigt wird. Die Elektronenmikroskopie erlaubt zwar die Vermessung einzelner Moleküle, jedoch wird

dieses Experiment im Vakuum und nicht unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Dadurch besteht theoretisch die Möglichkeit, dass VASP eventuell durch die Behandlung teilweise denaturiert wurde. Um dieses auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit analytischer Ultrazentrifugation und dynamische Lichtstreuung in Lösung durchgeführt. Diese bestätigten die durch Elektronenmikroskopie gefundenen Ergebnisse unter physiologischen Bedingungen. In dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass im Gegensatz zum Mechanismus der Formin-vermittelten Filamentelongation, die Anwesenheit von Profilin für die Funktion von Ena/VASP Proteinen nicht erforderlich ist (Breitsprecher et al., 2008). Man kann deshalb vermuten, dass das benötigte G-Aktin als Profilin-Aktin Komplex an die Plasmamembran rekrutiert wird und der Komplex nachfolgend dort durch die Bindung von Profilin an PIP₂ dissoziiert (Carlsson et al., 1977; Lassing and Lindberg, 1985; Yoo et al., 2010). Da Ena/VASP Proteine ebenfalls im Bereich des Leitsaums unterhalb der Plasmamembran lokalisieren, könnten die freien G-Aktin Untereinheiten hier nach der Bindung von Profilin-Aktin an PIP₂ und der Dissoziation an VASP rekrutiert werden. Dieses würde eine Regulation der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation durch Phosphatidylinositolkinasen wie PI2K und PI3K oder Phosphatasen wie PTEN ermöglichen. Dies ist konsistent mit der vor kurzem gezeigten Beteiligung dieser Lipidkinasen an der Zellmotilität und der Polarisierung von *Dictyostelium*-Zellen (van Haastert and Veltman, 2007; van Haastert et al., 2007).

3.4 Knock out der Scar/WAVE Komplex Untereinheiten in *D. discoideum*

Die Inaktivierung von Genen in *D. discoideum* durch Gendisruption ist ein unverzichtbares Mittel, um die spezifischen Funktionen von Proteinen zu studieren. Im Vergleich zu Vertebraten existieren in *D. discoideum* keine Isoformen der Scar/WAVE-Komplexuntereinheiten. Ebenso konnten bislang keine alternativen Splicevarianten beschrieben oder identifiziert werden (Eichinger et al., 2005). Dieser Umstand und das haploide Genom erlauben eine schnelle Generierung und Analyse von Knock-out Mutanten (Faix et al., 2004). Im Gegensatz zu Knock-down Experimenten durch RNAi in anderen Modellsystemen ist durch einen genetischen Knock-out sichergestellt, dass die zu untersuchenden Proteine vollständig aus der Zelle entfernt wurden und nicht Restmengen an Protein die Interpretation des

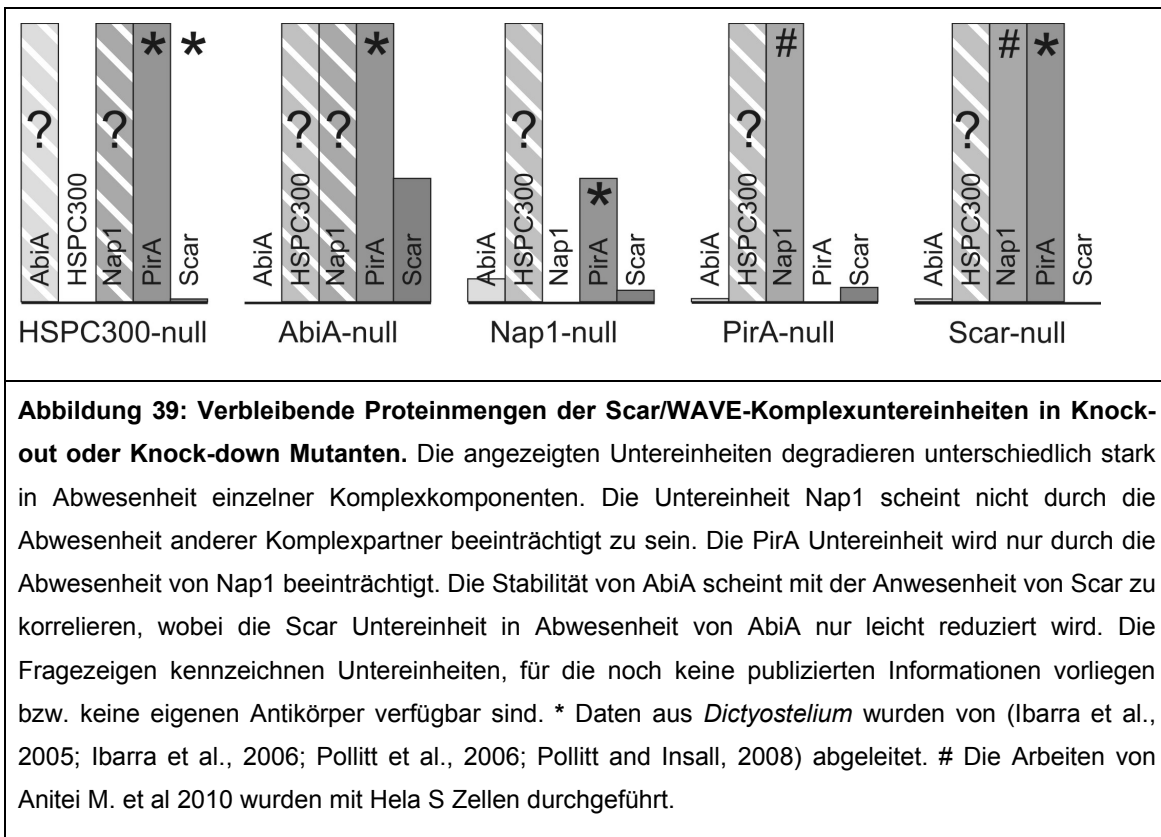
Phänotyps erschweren. Im hier untersuchten Fall des systematischen Knock-outs aller Untereinheiten eines stabilen Multiproteinkomplexes muss allerdings berücksichtigt werden, dass durch die Abwesenheit einzelner Komponenten auch die Stabilität der übrigen beeinflusst wird. Bisherige Knock-down und Knock-out Studien in verschiedenen Systemen haben ebenfalls übereinstimmend gezeigt, dass auch andere Scar/WAVE Komplex Untereinheiten durch die Abwesenheit einer Untereinheiten degradieren (Blagg et al., 2003; Derivery et al., 2008; Kunda et al., 2003; Le et al., 2006; Steffen et al., 2004). Dieser Aspekt ist einerseits ein starker Hinweis auf die *in vivo* Assemblierung der fünf Proteine zu einem funktionalen Scar/Wave-Komplex, erschwert aber andererseits die Analyse der spezifischen Funktionen der einzelnen Untereinheiten. Da der Knock-out einer Komplexkomponente auch die intrazelluläre Konzentration der übrigen Untereinheiten beeinflusst, wird bei der Analyse eventuell ein kumulativer Effekt beobachtet. Um diesen Umstand in die Bewertung der Ergebnisse mit einzubeziehen, ist es dringend erforderlich die verbleibenden Mengen der einzelnen Untereinheiten in jeder null-Mutante zu quantifizieren. Zu diesem Zweck ist die Herstellung spezifischer Antikörper für jede der fünf Untereinheiten unverzichtbar. Da die Degradation von Komplexuntereinheiten nach dem Knock-out einzelner Komponenten auch für andere F-Aktin regulierende Proteinkomplexe, wie etwa WIP/N-WASP und den Arp2/3-Komplex gezeigt werden konnte, ist der proteolytische Abbau unvollständiger bzw. nicht mehr regulierbarer Komplexe vermutlich ein genereller Schutzmechanismus vor unregulierter Aktinpolymerisation (Chou et al., 2006; de la Fuente et al., 2007; Steffen et al., 2006). Somit sollte der Knock-out stabilisierender Bindungspartner und der daraus resultierende proteolytische Abbau der verbliebenen Proteine, wie in den Beispielen der Proteinkomplexe WIP/N-WASP und Arp2/3, immer zu einem identischen oder zumindest stark ähnlichen Phänotyp führen (Chou et al., 2006; Martinez-Quiles et al., 2001). Die in dieser Arbeit generierten und analysierten null-Mutanten der Scar/WAVE-Komplex Untereinheiten, zeigten aber im direkten Vergleich miteinander markante Unterschiede im Phänotyp, beispielweise bei der Filopodienbildung oder der Zellmotilität. Die bisherigen Annahme, dass der Scar/WAVE-Komplex in seiner pentameren Form überwiegend Teil eines linearen Signalweges der Arp2/3-Komplex Aktivierung ist, liefert somit keine ausreichende Erklärung für die in dieser Arbeit beschriebenen Unterschiede in

den Phänotypen der null-Mutanten einzelner Scar/WAVE-Komplexuntereinheiten in *D. discoideum*.

3.5 Zusätzliche Funktionen des Scar/WAVE-Komplexes

Neben seiner klassischen Funktion als NPF bei der Arp2/3-vermittelten Aktinnukleation, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst mit aktuellen Untersuchungen weitere Funktionen der Scar/WAVE-Komplexuntereinheiten vermuten. In Knock-out Studien von HSPC300, AbiA und Scar bzw. Kombinationen dieser Proteine in *Dictyostelium*, konnte bereits gezeigt werden, dass die Untereinheit PirA durch die Abwesenheit von HSPC300, AbiA oder Scar nicht beeinflusst wurde (Pollitt and Insall, 2008; Pollitt and Insall, 2009). Eine deutliche Verringerung an PirA von mehr als 50% konnte dagegen nur in der Nap1 Knock-out Mutante nachgewiesen werden (Ibarra et al., 2006). Eine aktuelle Studie mit HeLa S Zellen konnte belegen, dass Nap1 in Abwesenheit von Pir121 oder WAVE2 stabil bleibt (Anitei et al., 2010).

Dagegen war die Scar Untereinheit, mit Ausnahme in AbiA-null Zellen, in allen anderen *Dictyostelium* Knock-out Mutanten nahezu nicht mehr nachweisbar (Pollitt and Insall, 2008). Eine weitere aktuelle Studie konnte zeigen, dass HSPC300 im Säugersystem zu einem nicht unerheblichen Teil in einen stabilen homooligomeren Komplex vorliegt, welcher mit großer Wahrscheinlichkeit neu synthetisierte Untereinheiten stabilisiert und so als Vorläufer des Scar/WAVE-Komplexes fungiert (Derivery et al., 2008). Eine frühere Beobachtung, dass neben dem pentameren Scar/WAVE-Komplex noch ein erheblicher Überschuss an HSPC300 im Zytosol von HeLa S Zellen vorliegt stimmt zudem mit diesem Ergebnis überein (Gautreau et al., 2004). Die Bildung stabiler Homotrimere konnte in dieser Arbeit durch die biophysikalische Charakterisierung von HSPC300 aus *Dictyostelium* bestätigt werden.



Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Scar/WAVE-Komplex nicht zu allen Zeiten die einzig stabile Form ist, sondern dass mindestens noch drei Subkomplexe aus Nap1/PirA, HSPC300/Scar/AbiA sowie das HSPC300 Homotrimer möglich sind (vergl. Abbildung 39). Zudem liefert die unabhängige Koexpression und Aufreinigung von rekombinantem Nap1/Pir121-Subkomplex aus *Sf9*-Zellen und HSPC300/WAVE/Abi1-Subkomplex aus *E. coli* und deren *in vitro* Assemblierung zu einem funktionalen pentameren Komplex ein weiteres Argument für die Stabilität dieser Subkomplexe (Ismail et al., 2009). Darüber hinaus, wurden verschiedene alternative Interaktionspartner der Scar/WAVE-Komplexkomponenten außerhalb des Komplexes identifiziert. Beispielsweise konnte eine regulatorische Funktion von N-WASP durch die Interaktion mit Abi im Säugermodell nachgewiesen werden (Innocenti et al., 2005) und auch in *Drosophila* wurde eine ähnliche Funktion beschrieben. Hier aktiviert Abi das an der Entwicklung sensorischer Organe beteiligte WASP (Bogdan et al., 2005). Für die Untereinheit Pir121/Sra1 wurde neben der Bindung an die kleine RhoGTPase Rac1 noch eine direkte Interaktion mit dem „fragile X mental retardation proteine“ (FMRP) und eine Beteiligung an der Etablierung von Nervenverbindungen gezeigt (Schenck et al., 2003). Des Weiteren

konnte kürzlich eine Interaktion von Pir121 mit der schweren Kette von Clathrin am trans-Golgi Netzwerk nachgewiesen werden (Anitei et al., 2010).

3.6 Die Interaktion von Abi mit Ena/VASP Proteinen

Ein zentraler Punkt im Modell der VASP-vermittelten Aktinpolymerisation *in vivo* ist das Clustering von Ena/VASP Proteinen an die Plasmamembran (Breitsprecher et al., 2008). Die Rekrutierung der Ena/VASP Proteine an Orte aktiver Aktinpolymerisation wird durch die Interaktion der EVH1-Domäne mit Proteinen wie Zyxin und Vinkulin vermittelt, die prolinreiche Motive mit der FP₄-Konsensussequenz enthalten (Brindle et al., 1996; Gertler et al., 1996; Niebuhr et al., 1997). Obwohl in der Folge eine Vielzahl weiterer Bindungspartner identifiziert werden konnte, ist die Rekrutierung von Ena/VASP Proteinen in Filopodienspitzen nach wie vor unklar. Ein potentieller Kandidat in Vertebraten ist Lamellipodin/Mig-10, da es in den Spitzen von Lamellipodien und Filopodien lokalisiert (Krause et al., 2004). Allerdings zeigte der Knock-down in B16 Melanom-Zellen keinen spürbaren Effekt auf die Ausbildung von Filopodien. Dies könnte einerseits an der Komplementierung durch weitere Proteine, wie das mit dem Lamellipodin verwandten PREL1/RIAM liegen (Jenzora et al., 2005; Lafuente et al., 2004), andererseits ist auch denkbar, dass andere und bislang noch nicht identifizierte Proteine die Rekrutierung von VASP vermitteln. Da in *Dictyostelium* keines dieser oben genannten Proteine vorkommt, und in dieser Arbeit eine direkte Interaktion der Scar/WAVE-Komplexuntereinheit Abi mit Ena/VASP Proteinen nachgewiesen werden konnte, wäre eine alternative Rekrutierung von Ena/VASP durch den Scar/WAVE-Komplex denkbar.

Die in dieser Arbeit gefundenen Interaktionen von *Dictyostelium* AbiA mit DdVASP und Abi1 mit humanem und murinem VASP werden durch aktuelle Studien in Vertebraten bestätigt (Dittrich et al., 2010; Tani et al., 2003). Die Relevanz dieser Interaktion wird durch vor kurzem publizierte Befunde gestützt, die zeigen, dass zum einen die Rekrutierung und das Clustering von VASP an Membranen für die Aktinfilamentelongation essentiell sind (Breitsprecher et al., 2008), und zum anderen, dass VASP und Abi in vergleichbarer Zeit an die Membran rekrutiert werden (Lai et al., 2008). Die Halbwertszeit von WAVE in diesen zuletzt genannten FRAP-Experimenten unterscheidet sich mit $t_{1/2}=8,6$ s deutlich von der Abi Halbwertszeit mit $t_{1/2}=13,6$ s und VASP mit $t_{1/2}=14,4$ s (Lai et al., 2008). Beachtenswert sind die hier vergleichbaren Halbwertszeiten von Abi und VASP. Diese Beobachtung stützt die

Annahme, dass der Scar/WAVE-Komplex nach seiner Aktivierung Subkomplexe und/oder Komplexe mit anderen Proteinen bilden kann. Da Abi direkt an Scar/WAVE bindet (Gautreau et al., 2004), und Scar über eine basische Region direkt mit PIP_3 interagiert (Oikawa et al., 2004), wäre es denkbar, dass VASP über die Interaktion mit Abi im Scar/WAVE-Komplex spezifisch an Membranen rekrutiert und dort zu funktionalen Clustern zusammengeführt wird. Da Scar/WAVE über seine C-terminale VCA-Domäne seinerseits den Arp2/3-Komplex bindet und aktiviert, ist ein Szenario denkbar, in dem nach Arp2/3-Komplex vermittelter Aktinnukleation in der Spitze des Lamellipodiums Filamente durch die an Abi gebundenen Ena/VASP Proteine elongiert werden. Somit wäre die Aktinnukleation in der Zelle unmittelbar mit der Filamentelongation verknüpft, wobei die wachsenden Plus-Enden der Filamente zudem vor Capping Proteinen geschützt wären. Eine aktuelle Publikation zur Architektur des Lamellipodiums erwägt bereits ein Modell (Urban et al., 2010), in dem Ena/VASP Proteine durch den Scar/WAVE-Komplex an die Plasmamembran rekrutiert werden könnten (Abbildung 40). In diesem Modell wird allerdings postuliert, dass Ena/VASP Proteine an den Scar/WAVE-Komplex durch Adapterproteine wie z.B. IRSp53 rekrutiert werden (Urban et al., 2010).

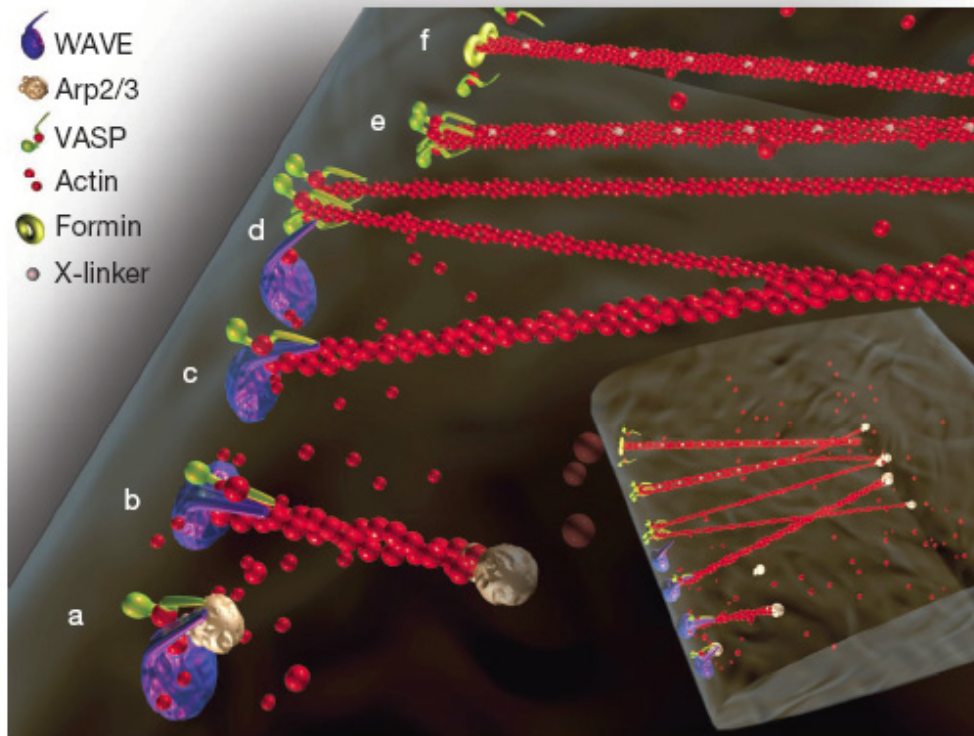


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Entstehung des F-Aktinnetzwerkes in Lamellipodien. Als Ziel verschiedener Signalkaskaden, z.B. kleiner RhoGTPasen, werden NPFs wie der Scar/WAVE-Komplex und Elongatoren (Ena/VASP Proteine und Formine) an die Membran rekrutiert. Die Bildung verschiedener Superkomplexe in unterschiedlichen Stöchiometrien dieser Proteine regulieren die Bildung von Netzwerken oder Bündeln aus neu gebildeten Filamenten. Einige mögliche Szenarien sind hier Dargestellt: **(A)** Der Arp2/3-Komplex bildet nach Bindung an den Scar/WAVE-Komplex unterhalb des Plasmamembran Nukleationskeime aus. **(B)** Die Filamente beginnen nun zu wachsen und bleiben anfänglich an die WH2-Domäne aus Scar/WAVE gebunden, während das Minus-Ende mit dem Arp2/3-Komplex assoziiert bleibt. **(C)** Mit dem Scar/WAVE-Komplex assoziierte und dadurch vermutlich geclusterte VASP-Moleküle übernehmen im Weiteren die Elongation dieser Filamente. Dadurch wird Scar/WAVE von dem Filament abgelöst und steht erneut der Aktivierung des Arp2/3 Komplexes zur Verfügung. **(D)** Einige mit VASP-Molekülen assoziierte Filamente werden an der Membran zusammengeführt und **(E)** bilden mit geeigneten quervernetzenden Proteinen (X-linker) Paare und Bündel von Filamenten aus. **(F)** Paare von Aktinfilamenten könnten alternativ auch direkt durch Formine in Kombination mit einem F-Aktin bündelndem Protein nukleiert und elongiert werden. Abschließend stabilisieren große quervernetzende Proteine wie Filamin oder α -Actinin dieses Netzwerk, in dem sie bestehende Filamente miteinander verbinden. (Adaptiert aus (Urban et al., 2010))

Zusammengenommen lassen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen, dass die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes nicht die einzige Funktion des Scar/WAVE-Komplexes ist. Denkbar wäre eine zusätzliche Funktion des Scar/WAVE-Komplexes durch die Rekrutierung von Ena/VASP-Proteinen an die Plasmamembran. Das Szenario der Lamellipodienbildung lässt sich leicht modifiziert auch auf die Bildung von Filopodien übertragen. So wurden neben VASP auch Abi und Scar/WAVE in Filopodien spitzen nachgewiesen (Faix et al., 2009; Stradal et al., 2001). Konsistent mit diesem Modell ist die Übereinstimmung des ermittelten maximalen Abstandes von max. 13 nm zwischen den einzelnen Ena/VASP Tetrameren für die prozessive Aktinfilamentelongation (Breitsprecher et al., 2008), und zum anderen der durch EM-Tomographie gemessene Abstand zwischen den Filamenten in der Filopodien spitze von etwa 11-13 nm (Urban et al., 2010). Widersprüchlich sind hier allerdings die in *Dictyostelium* Scar-null Mutanten deutlich gesteigerte Anzahl an Filopodien und der Befund, dass in Scar-null Zellen auch AbiA praktisch nicht mehr nachweisbar ist. Dieser Befund deutet darauf hin, dass VASP auch in Abwesenheit von Abi in die Spitzen von Filopodien transportiert werden kann. Ein weiterer Aspekt ist die normale Filopodienbildung nach Knock-down des Arp2/3-Komplexes in B16-F1 Melanom-Zellen und VA-13 Fibroblasten (Steffen et al., 2006). Konsistent damit belegen vorangegangene Arbeiten, dass Formine die Nukleation filopodialer Aktinfilamente bewerkstelligen. So zeigen *Dictyostelium*-Mutanten in Abwesenheit des Formins dDia2 massive Defekte bei der Ausbildung von Filopodien (Schirenbeck et al., 2005). Vergleichbar damit konnte auch für das konstitutiv aktive mDia2/Drf3 aus Vertebraten die Nukleation von Aktinfilamenten in Filopodien nachgewiesen werden (Block et al., 2008).

Die erhöhte Anzahl an Filopodien in Scar-null Zellen deutet augenscheinlich auf eine fehlerhafte Regulierung oder Rekrutierung der beteiligten Proteine hin (Steffen et al., 2006). Weiterführende Lokalisationsstudien mit Immunfluoreszenz oder GFP-Fusionsproteinen der einzelnen Untereinheiten, müssten zeigen, ob der pentamere Scar/WAVE-Komplex an der Spitze wachsender Filopodien lokalisiert, oder ob nur bestimmte Untereinheiten bzw. Subkomplexe dort zu finden sind. In diesem Zusammenhang muss auch noch geprüft werden, ob VASP in Abwesenheit von AbiA noch an der Spitze wachsender Filopodien lokalisiert. Ein weiterer wichtiger Aspekt wäre die Untersuchung der Filopodienbildung in einem Doppelknock-out der NPFs N-WASP und Scar, um vollständig ausschließen zu können, dass der Arp2/3-Komplex

an der Nukleation von Filopodien in *D. discoideum* beteiligt ist. Zudem sollten *in vitro* Bindungsstudien mit Ena/VASP Proteinen und dem Scar/WAVE-Komplex die Frage beantworten, ob der pentamere Komplex oder Subkomplexe in der Lage sind, mit Ena/VASP-Proteinen zu interagieren.

Die in dieser Arbeit gefundene Interaktion von Ena/VASP Proteinen mit der Scar/WAVE Komplexuntereinheit Abi, und die Kollokalisierung beider Proteine an der Spitze lamellipodiale und filopodiale Aktinfilamente, deuten auf einen genereller und organismusübergreifenden Mechanismus für die Rekrutierung von Ena/VASP durch den Scar/WAVE Komplex an die Plasmamembran bei der Ausbildung von Zellfortsätzen hin.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Schüttelinkubatoren	New Brunswick Scientific
Tischschüttelinkubatoren	Eppendorf
Heizblöcke	Eppendorf
Kühlzentrifuge Avanti J-30I	Beckmann Coulter
Konfokales Mikroskop Zeiss LSM510	Carl Zeiss
Olympus FV1000	Olympus
Ultrazentrifuge XL-I	Beckmann Coulter
Tischzentrifuge Pico21	Heraeus
Ultraschallgerät zur Zelllyse	Branson
HPLC Äkta Purifier	GE Healthcare
FPLC Äkta Prime	GE Healthcare
HPLC/FPLC Chromatographiesäulen	GE Healthcare
Peristaltische Pumpen J1	GE Healthcare

4.1.2 Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Roche
DNAseI (Rinderpankreas)	Sigma
<i>MuLV</i> Reverse Transkriptase	New England Biolabs
Phusion™ DNA-Polymerase	New England Biolabs
Precision-Protease™	GE Healthcare
Restriktionsendonukleasen	Roche
RNaseA	Sigma
T4 DNA-Ligase	Roche
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Roche

4.1.3 Verwendete polyklonale Antikörper

anti-GFP (aus Kaninchen)	(Faix et al., 2001)
anti-GST (aus Kaninchen)	PD Dr. Jan Faix, Hannover
anti-DdSCAR (aus Kaninchen)	Jörn Linkner, Hannover

anti-DdAbiA (aus Kaninchen)	Jörn Linkner, Hannover
anti-DdIRSp53/MIM (aus Kaninchen)	Jörn Linkner, Hannover
anti-DdHiston H1 (aus Kaninchen)	Jörn Linkner, Hannover
anti-mRPF (aus Kaninchen)	Jörn Linkner, Hannover
anti-MBP (aus Kaninchen)	Jörn Linkner, Hannover

4.1.4 Verwendete monoklonale Antikörper

anti-Coronin (aus Maus)	(Maniak et al., 1995)
anti-IQGAP (aus Maus)	(Faix and Ditttrich, 1996)
anti Kaninchen AP-Konjugat (aus Ziege)	Dianova
anti Kaninchen Alexa488-Konjugat (aus Ziege)	Invitrogen
anti Kaninchen Alexa532-Konjugat (aus Ziege)	Invitrogen

4.1.5 Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth
Blasticidin S	Invivogen
Chloramphenicol	Carl Roth
Geneticin (G418)	Sigma
Gentamycin	Carl Roth
Kanamycin	Sigma
Streptomycin	Carl Roth
Nitrofurantoin	Carl Roth

4.1.6 Reagenzien

Acrylamid	Carl Roth
Agarose	Serva
Bacto-Agar	Becton-Dickinson
Bacto-Pepton	Becton-Dickinson
Bacto-Trypton	Becton-Dickinson
Bromphenolblau	Sigma
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Carl Roth
Chloroform	J.T. Baker
Coomassie-Brilliant-Blue G250	Carl Roth
Coomassie-Brilliant-Blue R250	Carl Roth
DE-52 (Diethylaminoethyl-Cellulose)	Whatman

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Sigma
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck
Essigsäure	J.T. Baker
Ethanol 96% (vergällt)	J.T. Baker
Ethanol 96%	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Hefeextrakt	Oxoid
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure)	Sigma
HL5c Medium mit Glukose (vorgemischt)	Formedia
Jod (zweifach sublimiert)	Sigma
Kaliumhydroxid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth
Methanol	J.T. Baker
MOPS (2-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	Serva
N,N'-Methylen-Bisacrylamid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumfluorid	Sigma Ultra
Pikrinsäure 1.2%	Appllichem
PIPES (Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure))	Sigma
Salzsäure	J.T. Baker
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth
Tween20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma

4.1.7 Verwendete Oligonukleotide

Abi_KO_H3U_XXL	GCGAAGCTTCCAATTTCTTATGGTATTAGTGCATCTG
Abi_KO_SD_XXL	GCGGTCGACCATTATGATCATAGAATTGAGATTGTGG
AbiA_3'_AD	GAGGTTGGTGGTGGTGGTGGTACATTCATTACAGGT
AbiA_5'_AU	GGTGATGCAGCTCAAGCATATGAACAAAC
AbiA_769-999_*BD	GCGGGATCCTTACATTGGTGGAGGTGGTGGTGGGAAA
AbiA_769-999_BU+2	GCGGGATCCGGGCCCATCGAATGATTTCCCACCACCAC
AbiA_769-999_RU	GCGGAATTCGCCCATCGAATGATTTCCCACCACCAC

AbiA_769-999_SD+1	GCGGTCGACGCATTGGTGGAGGTGGTGGTGGG
AbiA_AD	ATAGAATTGAGATTGTGGACGAGC
AbiA_AD2	ATCTCCACCAGATGATGATGATGATGG
AbiA_BU	GCGGGATCCATGAGTGAATCAATCGATATTAACGTTT
AbiA_BU+1	GCGGGATCCATGAGTGAATCAATCGATATTAACGTTT
AbiA_FL_*SD	GCGGTCGACTTACATTGGTGGAGGTGGTGGTGGGAAATCATTATGATCATA
AbiA_glob_*XhoD	GCGCTCGAGTTAAATACCATAAGAAATTGGTTTATG
AbiA_glob_BglII+1U	GCGAGATCTCATGAGTGAATCAATCGATATTAACGTTTATT
AbiA_KO_H3U	GCGAAGCTTAAAACCATATAAATCATCATTAAAGAAT
AbiA_KO_PstD	GCGCTGCAGCATGAATCATTCTTACTCTTTGTGTAA
AbiA_KO_PstI2	GCGCTGCAGTGAATTTCAATATTTAATTTCTCC
AbiA_KO_SalD	GCGGTCGACGGTGGTGGTGGTGGGAAATCATTTCGATG
AbiA_Nco+2	GCGCCATGGGCATGAGTGAATCAATCGATATTAACGTTT
AbiA-200_*SD	GCGGTCGACTTATTGACTTGAATAAGATGGTGATTGATAG
Bsr3'_seq	GATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCC
Bsr5'_seq	GTGAGCGCGCGTAATACGACTCAC
Bsr-KO	CAGTTACTCGTCCTATATACG
DdHSPC300_*H3D	GCGAAGCTTTTATTCTTGACAGTCTTGAATGT
DdMIM_BD	GCGGGATCCTACGTATTCAATATAAGTTGAAGG
DdMIM_H3U	GCGAAGCTTAAAAATGTCAAACGCTAAAAACAAC
DdMIM_KpnU	GGATGGTACCATGTCAAACGCTAAAAA
DdMIM-IMD_*SD	GCGGTCGACTTATGCATATGAAATACGATATGCATC
DdMIM-IMD_*SD	GCGGTCGACTTATGCATATGAAATACGATATGCATC
dSCAR_PRD_*SD	GCGGTCGACGTTATTTGGTTTAAATGTCAGAGGCACCTCCA
dSCAR_PRD_BU	GCGGGATCCGGTACCAATCAATACCAAGCACCACCAC
GST_RU+1	CGCGAATTCGATGTCCCCTATACTAGGTTATTG
hAbi1_*XhoD_SD	GCGGTCGACCTCGAGTTAATCAGTATAGTGCATGATTGA
hAbi1-C_877-1446_RU	GCGGAATTCGACACAACCTCTACTACTTCTTCGACAT
hAbi1C_BU+2_mito	GCGGGATCCGCCGACACAACCTCTACTACTTCTTCGAC
hAbi1C_SD+1_mito	GCGGTCGACGATCAGTATAGTGCATGATTGATTCAAC
hHSPC300_*SD_2	GCGGTCGACAGTGAAGTGTCTCACCTTTTGTCCAC
HSPC300_*SD	CGCGTCGACTTATTCTTGTACAGTCTTGAATGT
HSPC300_BU	CGCGGATCCATGTCAACAAAAACAAATATTCAA
HSPC300_KO_BU	CGCGGATCCGACGATTTCAATTGGGATGATAATGGT
HSPC300_KO_H3U	CGCAAGCTTGTTGAATTTTTAAATAAATTTGGT
HSPC300_KO_PstD	GCGCTGCAGCTCTTTGTTCCCAATCTTTTGAATATTTGT
HSPC300_KO_SD	CGCGTCGACCAAATCAACAAAAGATATTAC
mAbi1_*BD	GCGGGATCCCTATCAGCAATGTTTTCTGCACCCTG
mAbi1_964-1428_RU	GCGGAATTCTATTCTCAAAATTCATTTCTGTTGCC
mAbi1_BU	GCGGGATCCATGGCAGAGCTGCAGATGTTACTAGAGG
mAbi1_FL_*SD	GCGGTCGACCTAATCAGTATAGTGCATGATTGATTCAACATAGTT
mAbi1_FL_RU	GCGGAATTCATGGCAGAGCTGCAGATGTTACTAGAG
mVASP_Xho+2U	GCGCTCGAGGCATGAGCGAGACGGTCATCTGTTCC
Myo7_SH3_BD	CGCGGATCCTTATACATCAGATAATAAAATTTCAACATG
Myo7_SH3_RU	CGCGAATTCAGAAACAATGCTAAATATGCCAGAGCCTTA
MyTH1_6P1_R1U	CGCGAATTCATCAAAAATCTCATATCAA
MyTH1_6P1_SalD	CGCGTCGACTTATTTAATTGATTCTAATTCAGTTACAGATGG
MyTH2_6P1_R1U	CGCGAATTCITTAACAAGGATCCAATTAA
MyTH2_6P1_SalD	CGCGTCGACTTAACGGAATGATTGAATTTCAAGTGGC
NAP1_AD	AATGTACTTTTAGCTGCTCTCTCCATGGCA
NAP1_AG1_*SD	CGCGTCGACTTATGATTGACGCATATATTGCTTGAGTGC
Nap1_AG1_BU	CGCGGATCCCAATCGAACCTGCTAGTGAGTCACAA
NAP1_AG2_*SD	CGCGTCGACTTATTTTTATGAGTATGAACTAATTGAACTAAATGATCAA

NAP1_AG2_BU	CGCGGATCCAAAAATTATAAGAGTAAACTATA
Nap1_BU	CGCGGGATCCATGGCACATACAAATTTACCAGAAA
NAP1_BU_ko	CGCGGGATCCGCATGGCACATACAAATTTACCAGAAA
NAP1_H3_ko	CGCAAGCTTGATGGTGCCCTCAATCTCATCCTTAAACCT
NAP1_Pst_ko	TTACAGTCAATTTCAATTCATAATGAACTGCAGGCG
NAP1_Sal_ko	CGCGTGCACACATGGTTTATCTCTAAACAAATTCCA
PirA_AG1_*SD	CGCGTGCAGCTTATGGACAATATGTATTGAGTATACT
PirA_AG1_BU	CGCGGATCCCCAGATAATGGTGTCAATTTGCGTTGAT
PirA_AG2_*SD	CGCGTGCAGCTTACATTGGTGGGGGTGGTGGCATTCCA
PirA_AG2_BU	CGCGGATCCTGTCCACCACCACCACCTTCTAATATG
PirA_AG3_*SD	CGCGTGCAGCTAAGATTCAGAAGCTGAGATTGTTTC
PirA_AG3_BU	CGCGGATCCATGTCAGTAGATCCAAAACAATCAAAA
pirA_KO_AD	CCGATTGTTGAAGTACTCTTGAGGT
pirA_KO_BU	GCGGGATCCATGTCAGTAGATCCAAAACAATCA
pirA_KO_H3U	GCGAAGCTTGCAACTGGATTTTTAAGAAAAACAAA
pirA_KO_PstD	GCGCTGCAGTGAAAGTACATGAAATCCTTTAATT
pirA_KO_SD	GCGGTGCACCCTCAAACCCATCAATGTGATTGCTTG
PirA-C_*SD	CGCGTGCAGCTTACATTGGTGGGGGTGGTGGCATT
PirA-C_BU	CGCGGATCCCGTCATGATTGGTCTGGTGCTCCT
Scar_*XhoD	GCGCTCGAGTTATTTAACCTCTACTTCATTCTTTTTC
SCAR_*XhoD	GCGCTCGAGTTAATCCCAATCAGAATCATCAGA
SCAR_6P_SalD	GCGGTGCAGCTTATGCTTGGTATTGATTGGTACCAAAGTG
SCAR_AD	ATGGCTAAAGCTGGTGGAGGTGCCTCTGAC
SCAR_AG1_*SD	CGCGTGCAGCTTATGGTGAATGTTGTTGAGATGGTGA
SCAR_AG1_BU	CGCGGATCCCCAGACTTTTTTCATGGATGAATGGGTTGCTGAACA
SCAR_AG2_*SD	CGCGTGCAGCTAATCCCAATCAGAATCATCAGATTCATCTTCAGAGGAATC
SCAR_AG2_BU	CGCGGATCCCCAATGGCTAAAGCTGGTGGAGGTGCCTCTGACAT
Scar_blunt+1	AATGGTATTAATTACAAGATATTTACC
SCAR_BU	CGCCGGATCCGCATGGTATTAATTACAAGATATTTACCA
Scar_glob_*SD	GCGGTGCAGCTTATGGACTTTCAATATTGATAGTAAT
Scar_glob_NcoU	GCGCCATGGTATTAATTACAAGATATTTACCATC
SCAR_H3U_ko	GCGAAGCTTTTCATTAATAACTCTACACCAATCCAGAC
SCAR_NdeU	GCGCATATGGTATTAATTACAAGATATTTA
SCAR_NdeU	GCGCATATGGTATTAATTACAAGATATTTA
SCAR_Pst_ko	TGGACCCATACATGGACGATGGTCCTGCAGCGC
SCAR_Sal_ko	CGCGTGCAGCTTTGCAGCTCCACCATTTTTGTTGCAT
SCAR_SD	GAATCTGATGATTCTGATTGGGATTAAGTCGACCGC
ScarCC_*XhoD	GCGCTCGAGTTATTTAACCTCTACTTCATTCTTTTTC
ScarCC_NdeU	GCGCATATGGCTGAACAACAAAACTTCATGAAGAGGCC
ScarCC_NdeU	GCGCATATGGCTGAACAACAAAACTTCATGAAGAGGCC
Y2H_MyTH2b_ClaU	GCGATCGATCCTTTAACAAGGATCCAATTAAGAGTCAT
Y2H_MyTH2b_XhoD	GCGCTCGAGACGGAATGATTGAATTTCAAGTGGCTGAT
Y2H_TH1_BD	ACTACCATTCAACAAAGTGATGTTTAAGGATCCGCG
Y2H_TH1_RU	CGCGAATTCGGTATGATTGATCCAATTTTAGGTGCA
Y2H_TH2_ClaU	GCGCATCGATACCCAACACTTTCAACTCCACCACCAATTTCA
Y2H_TH2_XhoD	GCGCTCGAGTTAAATTGCAATATTTCTTGACATTAA

4.1.8 Materialien für die Affinitätschromatographie

Glutathione Sepharose 4B

GE Healthcare

Amylose Resin High Flow

New England Biolabs

CNBr-Sepharose

Sigma

NiNTA-Agarose

Qiagen

4.1.9 Bakterienstämme

E. coli DH5a

Takara Bio Inc.

E. coli BL21 Rosetta

Merck4Biosciences

E. coli BL21 Artic Xpress™

Stratagene

K. aerogenes

(Williams and Newell, 1976)

4.1.10 *Dictyostelium discoideum*-Stamm

Ax2-214: Der Stamm des Laborwildtyps Ax2 Klon 214 kann aufgrund von Mutationen in der Kopplungsgruppe II (axe A2, axe C2) und III (axe B2) in Flüssigmedium axenisch kultiviert werden. Dieser Laborstamm ist ein Abkömmling des Freilandisolats NC4 (Raper, 1935).

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von *D. discoideum*-Zellen in axenischem Medium

4.2.1.1 SM-Agar

15	g	Bacto-Agar
10	g	Peptone
10	g	Glucose
1	g	Yeast Extract
1	g	MgSO ₄ *7H ₂ O
2,2	g	KH ₂ PO ₄
1	g	K ₂ HPO ₄

mit H₂O auf 1l auffüllen und autoklavieren.

4.2.1.2 Soerensen-Phosphatpuffer

0,356	g	Na ₂ HPO ₄
1,99	g	KH ₂ PO ₄

in 1l H₂O lösen auf pH 6,1 kontrollieren und autoklavieren

4.2.1.3 Phosphatagarplatten

15	g	Bacto-Agar
----	---	------------

mit Soerensen-Puffer (pH 6,1) auf 1l auffüllen und autoklavieren.

D. discoideum-Zellen wurden in HL5C Medium entweder in Schüttelkultur oder ,auf Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm (Greiner bio one™), in Submerskultur bei 21°C kultiviert. Dem Medium wurde zur Vermeidung von Bakterienzellenwachstum 50 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Bei einer Zelldichte von maximal 5×10^6 Zellen/ml wurde das Medium gewechselt, bzw. die Zellen verdünnt. Da eine Submerskultur in 10 cm Schalen bei dieser Zellkonzentration konfluent bewachsen ist, wurden die Zellen möglichst vollständig abgespült und 1 ml der Zellsuspension in der Schale belassen. Die Kulturschale wurde nun mit 10 ml frischem HL5c Medium befüllt und bei 21°C inkubiert.

Abgespülte Zellen können entweder direkt für analytische Proteinpräparation, Transformation oder zum Animpfen von Schüttelkulturen verwendet werden.

Schüttelkulturen wurden in Erlenmeyerkolben (50 ml bis 2 l Gefäße) herangezogen. Die Kolben wurden maximal ein Viertel befüllt und bei 23°C und 150 rpm geschüttelt. Die Zelldichte wurde dabei in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase von 1×10^5 bis maximal 1×10^7 Zellen/ml gehalten.

4.2.2 Kultivierung von *D. discoideum*-Zellen auf Bakterienrasen

D. discoideum-Zellen können alternativ auch auf Agarplatten kultiviert werden. Dazu wurden die *D. discoideum* Zellen in einer *K. aerogenes* Suspension aufgenommen und auf 1,5%igen SM-Agar oder Phosphatagarplatten ausgebracht. Zur Selektion von Transformanten auf Phosphatagarplatten wurde der Suspension Blasticidin S oder G418 (Geneticin) in einer finalen Konzentration von 15 µg/ml, bezogen auf das Volumen der Agarplatten, zugesetzt. Die Platten wurden nachfolgend bei 21°C inkubiert. Klonale *D. discoideum*-Zellen konnten nach ca. 3-7 Tagen selektioniert werden.

4.2.3 Sporenernte und Konservierung

Axenisch gewachsene Zellen wurden zweimal mit kaltem Soerensen-Puffer pH 6,0, gewaschen und in einer Dichte von 2×10^8 Zellen/ml resuspendiert. Jeweils 500 µl wurden auf 3-5 Phosphatagarplatten ausgebracht. Die Zellen differenzierten und bildeten innerhalb von 3 Tagen Fruchtkörper aus. Die Sporen konnten durch Abklopfen der Petrischale im Deckel gesammelt werden und wurden in 10 ml kaltem Soerensen-Puffer aufgenommen. Aliquots von je 1 ml Volumen wurden auf sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Sporen wurden nachfolgend bei -80°C gelagert. Zum Animpfen wurde ein Aliquot bei

Raumtemperatur aufgetaut in eine Petrischale mit 10 ml HL5c Medium gegeben. Nach 24 h waren die Sporen zu Zellen herangewachsen.

4.2.4 Einfrieren von *D. discoideum*-Zellen

Axenisch gewachsene *D. discoideum* Zellen wurden geerntet und mit einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium (HL5c Medium mit 5% DMSO, v/v) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots auf Einfrierröhrchen (Nunc) verteilt und auf Eis gehalten. Nachfolgend wurden die Ampullen in Einfrierköpfe von Stickstofftanks gestellt, so dass sich die Temperatur pro Minute um etwa 1°C erniedrigte. Nach 3-4 Stunden wurden die Ampullen dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die eingefrorenen Zellen wieder anzuziehen, wurde eine Ampulle auf Eis aufgetaut, die Zellen unverzüglich einmal mit kaltem HL5c Medium gewaschen und mit 10 ml des HL5c Mediums in eine Petrischale überführt. Bei Transformanten wurde nach 24 Stunden das Medium gewechselt und $10 \mu\text{g/ml}$ G418 bzw. Blastocidin S zugegeben.

4.2.5 Kultivierung von *E. coli*-Zellen

E. coli-Zellen wurden bei 37°C entweder als Schüttelkultur oder auf Agarplatten mit LB-Medium kultiviert. Zur Selektion wurden entsprechende Antibiotika zugesetzt ($50 \mu\text{g/ml}$ Ampicillin, $25 \mu\text{g/ml}$ Kanamycin, $10 \mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol, $20 \mu\text{g/ml}$ Gentamycin).

4.2.6 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

4.2.6.1 TFB I

100	mM	RbCl
50	mM	MnCl ₂
30	mM	Kaliumacetat (pH 5,8)
10	mM	CaCl ₂
15	%	Glycerol

4.2.6.2 TFB II

10	mM	MOPS
10	mM	RbCl
75	mM	CaCl ₂
15	%	Glycerol

mit KOH pH 6,8 einstellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid Methode, wurden 100 ml LB Medium mit DH5 α oder einem anderen *E. coli* Stamm als Vorkultur angeimpft und bei 37°C über Nacht in Schüttelkultur kultiviert. 5 ml der Kultur wurden in einen 1 l Kolben mit 200 ml frischem LB Medium überführt und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 - 0,6 inkubiert und zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Die Zellen wurden dann im 1 l Gefäß für 15 min in Eiswasser rasch abgekühlt. Alle folgenden Schritte sollten soweit möglich bei 0°C durchgeführt werden. Die Zellen wurden anschließend in 4 sterile 50 ml Falkonröhrchen überführt und bei 4000 g 15 min und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in einem Endvolumen von 50 ml eiskaltem TFB I Puffer resuspendiert und in einem 50 ml Falcon vereinigt und für eine 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach erneut bei 4000 g 15 min und 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 8 ml TFB II Puffer resuspendiert und wieder für 1 h auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde zum Schluss in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße zu je 200 μ l aliquotiert und unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

4.2.7 Bestimmung der Zellzahl

Um bestimmte Zellkonzentrationen in Lösungen einzustellen, muss die Zellzahl in einem spezifischen Volumen bestimmt werden. Das mittlere Quadrat der Neubauer Zählkammer (Abbildung 41) und die vier Quadrate in den Ecken des Rasters haben eine Fläche von je 1 mm². Nach Auflegen eines Deckgläschens beträgt der Abstand zum Raster 0,1 mm. Daraus ergibt sich somit ein Volumen von 0,1 mm³ über jedem der fünf Quadrate. Die Zellkonzentration in Anzahl der Zellen pro ml berechnet sich aus der Anzahl gezählter Zellen pro Quadrat bzw. 0,1 mm³ multipliziert mit 10⁴. Zur Erhöhung der Zählgenauigkeit, wurde immer ein Mittelwert über alle ausgezählten Quadrate gebildet.

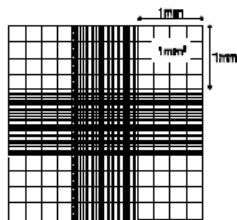


Abbildung 41: Prinzip der Neubauer-Zählkammer

4.2.8 Kultivierung von *S. cerevisiae* AH109

4.2.8.1 YPDA (Yeast Extract–Peptone–Dextrose plus Adenine medium)

10	g	Yeast Extract
20	g	Peptone
20	g	Glukose
0,1	g	Adenin hemisulphat

für Agarplatten

16,7	g	Bacto Agar
------	---	------------

in 1l H₂O, autoklavieren.

4.2.8.2 10x Nitrogen Base

67	g	Yeast Nitrogen Base
20	g	Glukose

in 1l H₂O, steril filtrieren.

4.2.8.3 Synthetic complete drop-out Mix

2	g	Adenin hemisulfat
2	g	Arginin HCl
2	g	Histidin HCl
2	g	Isoleucin
2	g	Leucin
2	g	Lysine HCl
2	g	Methionin
3	g	Phenylalanin
6	g	Homoserin
3	g	Tryptophan
2	g	Tyrosin
1,2	g	Uracil
9	g	Valin

Ausgenommen der fettgedruckten Aminosäuren werden alle Komponenten gemischt.
Hier wurden drei verschiedene Medien verwendet, L⁻W⁻, L⁻W⁻H⁻ und L⁻W⁻H⁻A⁻.

4.2.8.4 Synthetic complete drop-out medium

0,8 g Synthetic Complete Drop Out Mix
900 ml H₂O
pH 5,6 kontrollieren, autoklavieren
15 g Bacto Agar
nach dem Autoklavieren
100 ml 10x Nitrogen Base

4.2.9 Transfektion von *S. cerevisiae* AH109 (modifiziert LiOAc)

4.2.9.1 PLATE Mixture

90 ml 50% PEG 4000
10 ml LiOAc
1 ml 1M Tris-Cl (pH 7,5)
0,2 ml 0,5 M EDTA

Der Hefestamm AH109 wurde über Nacht bei 30 °C in 200 ml YPDA schüttelnd inkubiert. 50 ml wurden dann in ein Falcon überführt und 2 min bei 4000g sedimentiert und, um die Zellkonzentration zu erhöhen, erneut mit 50 ml aufgefüllt pelletiert und resuspendiert. Je 1 ml Hefezellsuspension pro Transformationsansatz wurden in je ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und kurz an zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 50-100 µl verbleibendes Medium verworfen. Dem mit 5 µl Träger-DNA versetzten Pellet wurde je 5 µg der beiden Plasmide zugesetzt und die Suspension gevortext. Die Suspension wurde mit 0,5 ml PLATE Mixture und 50 µl 1M DTT versetzt erneut gevortext und danach für 6-8 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (Inkubation auch über Nacht möglich). Anschließend folgte der Hitzeschock für 10 min bei 42°C. Die Ansätze wurden anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl H₂O (autoklaviert) resuspendiert und auf Leu⁻Try⁻ Platten ausgestrichen und diese bei 30°C inkubiert.

4.2.10 Yeast-two-hybrid assay

Die transformierten Hefen wurden auf L⁻ W⁻ SC drop out Medium Platten ausplattiert und bei 30°C für mindestens 72 h inkubiert. Die transformierten und auf L⁻ W⁻ SC drop out Medium Agarplatten kultivierten AH109 Klone wurden über Nacht in 3 ml L⁻

W⁻ SC-drop-out Medium Flüssigkultur mit 25 µg/ml Kanamycin schüttelnd kultiviert. Je 5 µl der einzelnen Suspensionen wurden auf eine in 50 Quadrate unterteilte Selektionsplatte aus L⁻W⁻- und L⁻W⁻H⁻-SC-drop-out Medium getropft und erneut für mindestens 72 Stunden bei 30°C inkubiert. Wachsende Kolonien auf L⁻,W⁻,H⁻-Platten können als erster Hinweis auf Proteininteraktion betrachtet werden. Das Wachstum auf L⁻,W⁻,H⁻,A⁻-Platten ist ein Hinweis auf eine starke Interaktion der zu untersuchenden Bindungspartner.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dazu wurden eine DNA-Vorlage und zwei begrenzende Oligonukleotide in einer repetitiven Abfolge von Denaturierung, Oligonukleotidhybridisierung und DNA-Elongation in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und einer hitzestabilen Polymerase wie beispielweise der Taq-Polymerase aus *T. aquaticus* inkubiert. Für präparative Zwecke wurde ein Fusionskonstrukt aus Polymerase und DNA-Bindedomäne (Phusion™) verwendet. Die Phusion™ DNA-Polymerase verfügt zusätzlich über eine Exonukleaseaktivität und kann dadurch falsch eingebaute Basenpaare ersetzen. Dies führt zu einer deutlich kleineren Fehlerrate im Vergleich zur Taq-Polymerase. Die Oligonukleotide trugen am 5'-Ende nicht hybridisierende Überhänge, um Restriktionsschnittstellen an die präparativ amplifizierten Fragmente anzufügen. Diese Überhänge ermöglichten nach Restriktionsverdau die spätere Ligation der Fragmente in Vektoren mit komplementären Schnittstellen.

Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Vorlage wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide mit der zu amplifizierenden Matrize wurde thermodynamisch nach dem „nearest-neighbour“ Prinzip abgeschätzt. Hierzu wurden die Standardbildungsenthalpien der Inkremente der Basenpaarzusammensetzung addiert und aus der resultierenden Standardbildungsenthalpie die Hybridisierungstemperatur berechnet.

Die präparative Gewinnung der PCR-Produkte erfolgte mit einem geeigneten Qiagen Kit. Gereinigte Fragmente wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und nach Gelextraktion für die Ligation in geeignete Vektoren eingesetzt.

4.3.2 PCR-Mutagenese

Die Mutagenese PCR diente der gezielten Deletion einzelner DNA-Abschnitte in einem Plasmid. Diese, auch inverse PCR genannte Technik, setzt eine zirkuläre methylierte DNA-Matrize voraus. Der zu deletierende Bereich wurde durch die 5'-Enden der verwendeten Oligonukleotide begrenzt, wobei die 3'-Enden der Oligonukleotide voneinander wegweisen. Die Primer trugen zudem je eine Phosphatgruppe an ihrem 5'-Ende, um die spätere Ausbildung von Phosphodiesterbindungen durch die DNA-Ligase zu ermöglichen. Durch die inverse PCR wird das vorgelegte Plasmid, mit Ausnahme des durch die Primer begrenzten Bereiches, amplifiziert. Die Zeit der Elongationsphase der DNA-Polymerase wurde der Produktlänge nach Herstellerangaben angepasst. Die Ausbeute der PCR-Reaktion wurde anschließend durch Gelelektrophorese und EtBr-Färbung überprüft. Da das PCR-Produkt nach Ablauf der Reaktion auch noch das unmutierte Ausgangsplasmid enthielt, wurde dieses durch Restriktionsverdau mit *DpnI* bei 37°C für 2h verdaut, da dieses Enzym nur methylierte DNA als Substrat verwendet. Nach dem Verdau wurde das lineare PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und in einem geeigneten Volumen TE pH 8.0 aufgenommen. Die phosphorylierten Enden des linearen PCR-Produkts wurden nun durch die T4-DNA-Ligase zu einem ringförmigen Plasmid verknüpft. Dazu wurden 10 µl des gereinigten PCR-Produkts in einem 20 µl Ansatz nach Herstellerangaben mit der T4-DNA-Ligase (Roche) versetzt und ü.N. bei 15°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde nachfolgend in *E. coli* DH5α transformiert. Nach der Selektion gewachsener Klone, konnte das Plasmid durch Plasmid-Mini Präparation (Qiagen) aus *E. coli*-Lysat erhalten werden. Vor der Weiterverarbeitung, wurden die erhaltenen Plasmide durch Sequenzierung (GATC) überprüft und verifiziert.

4.3.3 PCR-Screening von *Dictyostelium*-Mutanten

Um den Erfolg einer Gendisruption in *D. discoideum* zu überprüfen, wurde zunächst die genomische DNA klonaler Zellen gereinigt. Die Aufreinigung der chromosomalen DNA erfolgte mit dem High-Pure PCR Template Purification Kit™ (Roche) nach Angaben des Herstellers. Die genomische DNA wurde nachfolgend durch PCR überprüft. Die linearisierten Knock-out Konstrukte bestehen aus einer zentralen Blastocidin S Resistenzkassette, welche zu beiden Seiten von jeweils 400-700 bp des entsprechenden Zielgens flankiert wird (Abbildung 42). In den null-Mutanten erfolgte

die Disruption einzelner Gene durch homologe Rekombination auf beiden Seiten des linearisierten KO- Konstrukts in homologe Bereiche des Zielgen.

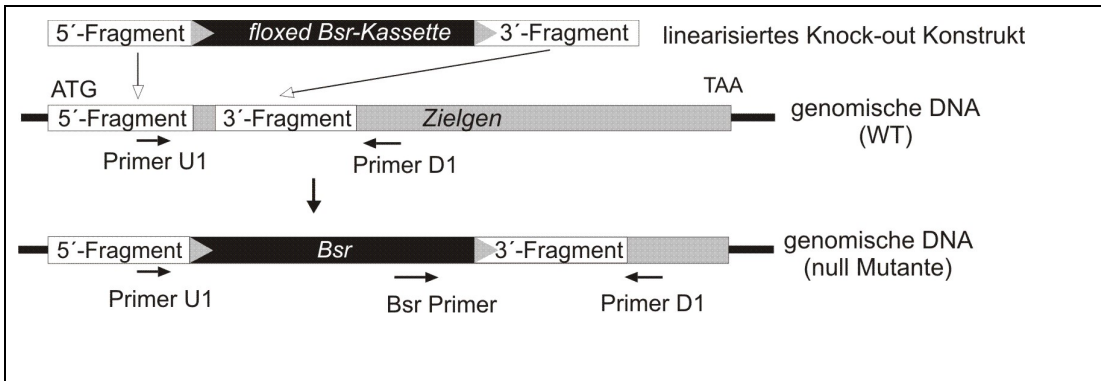


Abbildung 42: Nachweis der homologen Rekombination durch PCR. Die Blasticidin S Resistenzkassette wird zu beiden Seiten von 400-700 bp langen Abschnitten des Zielgens flankiert. Die flankierenden Sequenzen ermöglichen nach Elektroporation in die Zelle die gezielte Integration in das Zielgen. Nach Selektion mit Blasticidin S und Extraktion genomischer DNA aus stabilen Transformanten, wurde diese durch PCR mit der Primerkombination Primer U1 / Primer D1 auf das Vorhandensein der Wildtyp (WT)-Sequenz überprüft. Bei diesem Ansatz entsteht nur ein Produkt mit der genomischen DNA von WT-Zellen, aber nicht in den null-Mutanten. Die zweite PCR Reaktion mit der Primerkombination Bsr-Primer / Primer D1 weist eindeutig die Integration des KO-Konstrukts in das Zielgen nach. Hier entstand ein PCR-Produkt ausschließlich mit der Mutanten-DNA , nicht aber mit der des WT.

Durch die Wahl geeigneter Oligonukleotide konnte die Integration der Resistenzkassette in das Zielgen durch PCR eindeutig überprüft werden. Dazu wurden jeweils zwei PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Kombinationen an Oligonukleotiden durchgeführt. Um die Integration der Resistenzkassette in das Zielgen zweifelsfrei nachzuweisen, wurde ein Primer innerhalb der Bsr-Resistenzkassette (Bsr-Primer) und ein weiterer am 3'-Ende des Zielgens, aber außerhalb des KO-Konstrukts (Primer D1) gewählt. Als Kontrolle wurde eine weitere PCR durchgeführt, in welcher bei genomischer Ax2-DNA die WT-Sequenz amplifiziert wurde. Dazu wurden Oligonukleotide 5' des Zielgens (Primer U1) und 3' der klonierten Sequenz (Primer D1) verwendet (Abbildung 42). In dieser Reaktion wurde für null-Mutanten ein um die Länge der Resistenzkassette vergrößertes PCR Produkt von etwa 1,3 kb erwartet. Als Kontrolle diente jeweils eine PCR Reaktionen mit der genomischen DNA von Ax2 WT-Zellen.

4.3.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

4.3.4.1 Lösung 1

10	mM	Tris pH 8,0
1	mM	EDTA
10	µg/ml	RNAse A-Lösung

4.3.4.2 Lösung 2

0,2	M	NaOH
1	%	SDS

4.3.4.3 Lösung 3

2,55	M	K-Acetat (pH 4,8)
------	---	-------------------

4.3.4.4 Puffer QBT

400	mM	NaCl
50	mM	MOPS (pH 7,0)
0,15	%	Triton X-100

4.3.4.5 Puffer QC

750	mM	NaCl
50	mM	MOPS (pH 7,0)
15	%	EtOH

4.3.4.6 Puffer QF

1,25	mM	NaCl
50	mM	MOPS (pH 8,2)
15	%	EtOH

Eine 500 ml LB-Flüssigkultur, die geeignete Antibiotika enthielt wurde mit transformierten klonalen *E. coli*-Zellen angeimpft und ü.N. bei 37°C und 250 rpm in Schüttelkultur kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 8000 g 10 min bei 4°C pelletiert und nach dem Qiagen PlasmidMaxi Protokoll in 10 ml Lösung 1 resuspendiert und durch Zugabe von 10 ml Lösung 2 5 min bei RT lysiert. Durch Zugabe von Lösung 3 wurden Proteine und übrige Zellrückstände bei 4°C für 20 min präzipitiert und diese Rückstände bei 30000 g für 1 h und 4°C abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine mit 10 ml Puffer QBT equilibrierte Qiagen Maxi500 Säule gegeben. Hier binden die DNA und RNA-Reste an das

Anionenaustauschmaterial der Säule. Um verblieben Rückstände zu entfernen wurde die Säule zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Nach Durchlauf der 15 ml QF, wurden diese erneut auf die Säule gegeben, um noch gebundene Plasmid Reste zu eluieren. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 12 ml kaltem Isopropanol ausgefällt. Um die Menge an präzipitiertem Plasmid zu maximieren, erfolgte die Isopropanolfällung bei 4°C über Nacht. Die mit Isopropanol gefällte DNA wurde nun 1 h mit 20000 g pelletiert, der Überstand unmittelbar verworfen und das Pellet vorsichtig in 5 ml eiskaltem 70% EtOH gewaschen und nachfolgend unter Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde dann in 500 µl TE pH 8,0 aufgenommen, die Konzentration photometrisch bestimmt und bei -20°C gelagert.

4.3.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

4.3.5.1 DNA-Probenpuffer

40	%	Saccharose
10	mM	Tris/HCl pH8.0
1	mM	EDTA
0,5	%	SDS
0,25	%	Bromphenolblau

4.3.5.2 10x Loeningpuffer

43	g	Tris
41,4	g	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
3,7	g	EDTA-dinatriumsalz Dihydrat

Mit H₂O auf 1 l auffüllen pH 7,8 kontrollieren

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 0,7-1,0%igen Agarosegelen in 1x Loeningpuffer. Die Gele wurden in Flachbett-Gelkammern verschiedener Größe gegossen. Die zu trennende DNA wurde mit 5 x Probenpuffer versetzt und geladen. Die Trennung erfolgte bei 5 V/cm. Nach dem Lauf wurden die Gele mit Ethidiumbromid (100 µl einer 1%igen Lösung pro 100 ml Wasser) für 5 min gefärbt und 5 min schüttelnd in Wasser entfärbt. DNA Banden wurden unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und dokumentiert.

4.3.6 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

4.3.6.1 10x CIAP-Puffer

500	mM	Tris/HCl, pH 9,0
10	mM	MgCl ₂
1	mM	ZnCl ₂
10	mM	Spermidin

Um die Ligation eines durch Restriktionsenzyme linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) hydrolytisch abgespalten. In einem 50 µl Ansatz wurden 1-5 µg linearisierte Vektor-DNA mit 1-2 U alkalischer Phosphatase in CIAP-Puffer bei 37°C für 60 min umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 10 mM EDTA-Lösung und Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C (10 min) gestoppt.

4.3.7 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA mit einem oder einer Kombination aus mehreren Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Temperaturbedingungen. Pro µg DNA wurden 1-2 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Der Verdau von Plasmid-DNA wurde nach 1 h durch Zugabe von Probenpuffer beendet und auf einem analytischen 0,7-1%igem Agarosegel überprüft. Präparative Ansätze wurden über Nacht verdaut und die Fragmente aus einem präparativen 0,7%igem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und nachfolgend mit dem Qiagen Gel-Extraktions Kit extrahiert.

4.3.8 Ligation von DNA

Individuelle DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase verknüpft. Zur Knüpfung der Phosphodiesterbindung wurden sowohl die glatten Enden als auch komplementäre Überhänge der DNA-Fragmente in einem 20 µl Reaktionansatz mit entsprechendem Ligationspuffer für 12-16 h bei 15°C inkubiert.

4.3.9 Herstellung von Knock-out Konstrukten für *Dictyostelium*

Um Gene gezielt durch homologe Rekombination zu zerstören, wurden die benötigten DNA-Konstrukte auf Grundlage des pLPBLP-Plasmids hergestellt (Faix et al., 2004). Der kodierende Bereich und Steuerelemente der Blastocidin S Resistenz

wird von zwei multiplen Klonierungsstellen (MCS) flankiert. Die Resistenzkassette wird zu beiden Seiten von Erkennungssequenzen der cre-Rekombinase flankiert und 5' von drei Stop-Kodons in allen Leserahmen begrenzt. Im 5'-Bereich wurden die Restriktionsschnittstelle *Bam*HI und *Pst*I und im 3'-Bereich *Hind*III und *Sal*I Schnittstellen für die Insertion von DNA-Fragmenten verwendet. Zur Herstellung eines linearisierten Knock-out Konstrukts, wurden je zwei etwa 400-700 bp lange Abschnitte des Zielgens durch PCR mit geeigneten Primern amplifiziert (4.3.1). Durch die verwendeten Oligonukleotide wurde dem 5'-Fragment die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pst*I und dem 3'-Fragment die Schnittstellen *Hind*III und *Sal*I angefügt. Die Fragmente wurden mit den geeigneten Enzymen verdaut (4.3.7) und in zwei Schritten in die komplementären Schnittstellen der beiden MCS kloniert. Nach Amplifikation des Plasmids in *E. coli*, wurde dieses durch Plasmid-Maxi-Präparation (Qiagen) gereinigt. Um die homologe Rekombination über die beiden flankierenden Bereiche des Konstrukts in das *Dictyostelium* Genom zu ermöglichen, wurde das Plasmid vor der Elektroporation mit *Bam*HI/*Sal*I linearisiert und anschließend durch Alkalische Phosphatase dephosphoryliert (4.3.6). Etwa 30-50 µg DNA des linearisierten Konstrukts wurden für die Elektroporation (4.4.2) von *D. discoideum*-Zellen eingesetzt.

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Transformation von *E. coli*-Zellen

Der *E. coli* Stamm DH5 α wurde für die Klonierung und Vervielfältigung von Plasmid-DNA, die Stämme BL21DE3 Rosetta und ArcticExpress zur Expression rekombinanter Proteine verwendet. Dazu wurden 200 µl kompetente Zellen (4.2.6) auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA und 50 µl TCM-Puffer vermischt, der 100 mM CaCl₂ und 100 mM MgCl₂ enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C (für DH5 α , BL21DE3 Rosetta von 65 s, für BL21DE3 Arctic Express von 25 s). Anschließend wurde der Ansatz rasch auf Eis abgekühlt und nachfolgend mit 800 µl LB-Medium versetzt und die Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Einzelne Kolonien wurden über Nacht sichtbar und konnten zum Animpfen von Schüttelkulturen verwendet werden.

4.4.2 Transformation von *D. discoideum*-Zellen

4.4.2.1 Healing-solution

100 mM MgCl₂

100 mM CaCl₂

4.4.2.2 Elektroporationspuffer

50 mM Glucose

10 mM NaH₂PO₄, pH 6,1

Zur Transformation von *D. discoideum*-Zellen wurden die Zellen in mittlerer logarithmischer Wachstumsphase aus einer Submers- oder Schüttelkultur geerntet und durch 2 min Zentrifugation bei 1300 g pelletiert. Nach Waschen des Zellpellets in Soerensen-Puffer pH 6,0 und zweimaligem Waschen mit eiskaltem Elektroporations-Puffer (max. +4°C) wurden die Zellen in 700 µl Elektroporations-Puffer bei einer Dichte von 5x10⁶ bis 8x10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (4 mm, Biorad) überführt, die 30 - 40 µg DNA enthielten und 5 min auf Eis inkubiert.

Unmittelbar vor der Elektroporation wurden anhaftende Zellen durch kurzes Vortexen durchmischt. Die Elektroporation erfolgte im GenePulser Xcell™ mit zwei „quadratischen“ 1 kV-Pulsen, mit einer Dauer von jeweils 1 ms und einer Pause von 5 s, gemäß den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 min auf Eis inkubiert, anschließend in einer Petrischale für 15 min leicht schüttelnd bei 23°C inkubiert, dann 15 µl sterile healing-solution zugegeben und diese erneut 15 min schüttelnd bei 23°C inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension mit 12 ml HL5C Medium mit Glukose aufgefüllt, das 50 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Streptomycin enthielt. Zur Selektion der transfizierten Zellen wurden dem Medium nach 24 h entsprechend der verwendeten Plasmide 10 µg/ml G418 oder 10 µg/ml Blastocidin S hinzugefügt. Die transfizierten Zellen wurden für mindestens eine Woche mit Selektionsdruck inkubiert. Das Selektionsmedium wurde dabei mehrmals gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen von den Kulturschalen abgespült und in unterschiedlicher Verdünnung mit einer *K. aerogenes* Suspension auf SM-Agar ausgebracht. Die auf *K. aerogenes* SM-Agar gewachsenen Einzelkolonien wurden mit Zahnstochern gepickt und in 24 Lochplatten überführt, die je 1 ml HL5C Medium mit Glucose und Antibiotika befüllt waren. Durch

mehrmaliges Wechseln des Mediums wurden die Transformanten von Bakterien befreit.

Alternativ wurden transformierte Zellen nach 24h in Flüssigmedium ohne Selektion von der Kulturschale abgespült, für 2 min bei 1500 rpm pelletiert und nachfolgend mit einer Suspension von *K. aerogenes* auf Phosphatagarplatten ausgebracht, die 15 µg/ml G418, bezogen auf das Volumen der Phosphatagarplatte, enthielt. Nach 7-10 Tagen konnten hier Einzelklone gepickt werden, die dann wie oben beschrieben in Flüssigkulturen herangezogen werden konnten.

4.4.3 Positive Selektion klonaler *D. discoideum*-Zellen auf *K. aerogenes* Phosphatagar

Um klonale *D. discoideum*-Zellen selektieren zu können, wurden diese nach der Elektroporation mit 11 ml HL5c Medium mit Glukose (50 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Streptomycin) in Kulturschalen für 24 h bei 21°C kultiviert. Anschließend wurden zunächst die Bakterien einer mit *K. aerogenes* dicht bewachsenen Platte oder Flüssigkultur wurden in Sörensen-Phosphatpuffer pH 6,1 gewaschen und die Zellen auf $2 \cdot 10^9$ /ml im selben Puffer aufgenommen, der 50 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Streptomycin enthielt. Anschließend wurden die Dictyostelium-Zellen von den Petrischalen abgespült und 2,5 min bei 1300 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde mit der Bakteriensuspension aufgenommen und mit 50-100 µg G418 bzw. 200 µg BlastidicinS pro Ansatz versetzt. Die Suspensionen wurden auf je zwei 1,5 %ige Phosphatagarplatten verteilt und ausgestrichen. Nach ca. einer Woche wurden Plaques im Bakterienrasen sichtbar. Klonale *D. discoideum*-Zellen wurden mit einem sterilen Zahnstocher in 24-Lochplatten mit Nährmedium und geeigneten Antibiotika überführt.

4.4.4 Wachstumsgeschwindigkeit von *D. discoideum*-Zellen in Flüssigkultur

Axenisch gewachsene Zellen ($2-4 \cdot 10^6$ Zellen/ml) wurden auf eine Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. 50 ml dieser Zellsuspension wurden in 100 ml Kölbchen bei 150 rpm und 23°C geschüttelt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde je 1 ml der Zellsuspension entnommen und die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt.

4.4.5 Wachstumsgeschwindigkeit von *D. discoideum*-Zellen auf *K. aerogenes* Agarplatten

Einzellkolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und auf frische SM-Agarplatten mit einem Rasen von *K. aerogenes* ausgebracht. Der Durchmesser der entstandenen Fresslöcher im Bakterienrasen wurde zeitabhängig gemessen.

4.4.6 Quantifizierung der Motilität von *D. discoideum*-Zellen

Zur Quantifizierung der Zellmotilität von *D. discoideum* Zellen wurden axenisch gewachsene Zellen ($2-5 \times 10^6$ /ml) auf eine Dichte von 5×10^4 /ml in HL5c-Medium eingestellt und auf 3,5 cm Glassbodenschalen (MatTek) ausplattiert. Nach Anhaftung der Zellen wurde das HL5c-Medium entfernt und die Zellen zwei mal mit sterilfiltriertem Sörensen-Phosphatpuffer gewaschen und anschließend mit 3 ml von diesem Puffer überschichtet. Nach 30 min Inkubation bei 21°C wurden die Zellen bei 20x-facher Vergrößerung im Phasenkontrast für 30 min videomikroskopisch verfolgt. Die mit einer CCD-Kamera (Visitron) im Abstand von 5 s aufgenommenen Bilder wurden anschließend mit der Software MetaMorph™ (MolecularDevices) analysiert. Die MetaMorph™ Software ermittelt automatisiert die zeitliche Änderung der xy-Koordinaten jeder zuvor definierten Zelle. Aus der zeitlich aufgelösten Positionsänderung lässt sich die durchschnittliche Wanderungsgeschwindigkeit ermitteln. Diese Daten wurden für mindestens 100 verschiedene Zellen einer Zelllinie erhoben.

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Herstellung polyklonaler Antikörper aus Kaninchen

4.5.1.1 PBS Waschpuffer

500 mM NaCl

In PBS lösen.

4.5.1.2 Kopplungspuffer

500 mM NaCl

100 mM Na-CO₃ pH 8,3

4.5.1.3 Basischer Waschpuffer

500	mM	NaCl
100	mM	Tris/HCl pH 8,5

4.5.1.4 Sauer Waschpuffer

500	mM	NaCl
100	mM	Na-Acetat pH 4,0

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wurden junge weibliche „New Zealand white“ Kaninchen mit dem entsprechenden Antigen immunisiert. 0,8 mg des Antigens wurden in PBS aufgenommen, durch Hitze denaturiert und zur Verstärkung der Immunreaktion mit „Freund-Adjuvans“ (Sigma) nach Herstellerangaben versetzt. Die Kaninchen wurden im Abstand von vier Wochen über mehrere Monate wiederholt durch subkutane Injektion immunisiert. Zu Testzwecken wurde dem Kaninchen alle drei Wochen etwa 20 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Das Blut wurde bei 37°C für 2-4 Stunden inkubiert und anschließend das Serum durch Zentrifugation bei 5000 g für 30 min bei 4°C vom Blutkuchen getrennt. Das so gewonnene Serum wurde in Western-Blots und Immunfluoreszenzfärbungen auf die Spezifität der polyklonalen Antikörper getestet.

Nach Beendigung der Immunisierung wurden die Tiere im Tierhaus der MHH herzkpunktiert und ausgeblutet. Um spezifische Antikörper zu erhalten, wurde das Antigen kovalent an eine aktivierte CNBr-Sepharose (Sigma) Matrix gekoppelt und die Antikörper aus dem Serum affinitätsgereinigt. Die Kopplung der Aminogruppen an die aktivierte CNBr-Sepharose erfolgte unter alkalischen Bedingungen in Natriumcarbonat Kopplungspuffer über Nacht bei 4°C. Nach der Kopplungsreaktion wurden unbesetzte Bindungsstellen mit 1 M Tris pH8,0 für 2 h bei RT inaktiviert und die Säule je zweimal alternierend mit saurem und basischem Waschpuffer gewaschen. Das Serum wurde mit 0.5 M NaCl versetzt und durch eine peristaltische Pumpe über Nacht auf die mit PBS-Waschpuffer equilibrierte Affinitätssäule geladen. Ungebundene Antikörper durch erneutes Waschen mit 5 Säulenvolumen PBS-Waschpuffer entfernt. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem 50 mM Na-Citrat Puffer pH 3,5 eluiert, und mit einem Fraktionssammler in 4 ml Fraktionen gesammelt. Um den pH-Wert nach der Elution möglichst schnell wieder auf physiologische Bedingungen zu korrigieren, wurde jedem Fraktionsröhrchen 200 µl einer 2 M

Tris/HCl pH 8,9 Lösung vorgelegt. Die Konzentration der Antikörper wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt, wobei 1 OD einer Konzentration von 0.8 mg/ml entspricht. Geeigneten Fraktionen wurden vereinigt, gegen 1 l PBS dialysiert und nachfolgend filtriert, um präzipitierte Antikörper abzutrennen. Abschließend wurden die Antikörper PBS mit 55% (v/v) Glycerin dialysiert und wurden bei -20°C gelagert. Die erhaltenen Antikörper konnten für Western-Blots und Immunfluoreszenz in Verdünnungen von 1:500 bis 1:5000 eingesetzt werden.

4.5.2 Fluoreszenzfärbung fixierter *D. discoideum*-Zellen

4.5.2.1 Gelvatol (100 ml)

0,14 M NaCl

10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ Lösung pH 7,2

in 100 ml H_2O

Diesen 100 ml wurden unter Rühren 25 g Polyvenylalkohol zugesetzt und über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurde der pH-Wert wieder auf 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde nachfolgend mit 50 ml Glycerin versetzt und erneut für 16 h gerührt. Abschließend wurde die Lösung zentrifugiert, um partikuläre Bestandteile abzutrennen. Das Einbettmittel wurde mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DABCO versetzt und bei -20°C gelagert.

4.5.2.2 Pikrinsäure/Paraformaldehyd-Fixierung

0,4 g Paraformaldehyd wurden in 7 ml Wasser durch Zugabe von 6 Tropfen 1 M NaOH und kurzes Erwärmen auf 50°C gelöst. Anschließend wurden 10 ml 20 mM PIPES, pH 6,0 und 3 ml 1,2%ige Pikrinsäure-Lösung zugegeben. Der pH-Wert des Fixativs sollte pH6,0 betragen.

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in HL5c eingestellt. 300 μl dieser Zellsuspension wurden auf staubfreie Deckgläschen ausgebracht, die auf einer mit Parafilm bespannten Glasplatte gelegt wurden. Nachdem sich die Zellen gesetzt hatten, wurde die überstehende Pufferlösung mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Zellen einmal mit Sörensen-Phosphatpuffer pH 6,0 gewaschen und diese sofort fixiert. Zur Fixierung wurden 500 μl des Fixatives auf die Deckgläschen pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur in einer geschlossenen Kammer inkubiert. Die Deckgläschen wurden dann mit 10 mM PIPES und anschließend mit PBS/Glycin gewaschen. Die Deckgläschen wurden erneut mit PBS/Glycin gewaschen und nachfolgend mit

70%igem Ethanol für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Deckgläschen wurden dann wieder zweimal mit PBS/Glycin gewaschen, und danach zweimal mit PBG gewaschen.. Primäre Antikörper wurden in PBG verdünnt und ü.N. inkubiert. Nach dem Abwaschen ungebundener Antikörper, wurden die Präparate mit sekundären Antikörpern markiert, die mit Alexa-Farbstoffen konjugiert waren. F-Aktin wurde mit TRITC-Phalloidin (5 µg/ml) Lösung gefärbt. Abschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit PBG und dreimal mit PBS gewaschen. Kurz vor dem Einbetten der Zellen wurden die Deckgläschen kurz mit H₂O geschwenkt, überschüssige Flüssigkeit mit Laborwischtüchern entfernt und die Deckgläschen vorsichtig in kleine Tropfen von Gelvatol auf Objektträger gelegt. Die Objektträger wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

4.5.3 Reinigung von Fusionsproteinen aus *E. coli*

4.5.3.1 LB-Medium

5	g	NaCl
5	g	Hefeextrakt
10	g	Tryptone/Peptone

4.5.3.2 LB-rich Medium

5	g	NaCl
8	g	Hefeextrakt
16	g	Tryptone/Peptone
10	mM	Kaliumphosphatpuffer pH7,3

gelöst in 1 l H₂O und autoklaviert

4.5.3.3 10x PBS

1,4	M	NaCl
27	mM	KCl
100	mM	Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O
18	mM	K ₂ HPO ₄

4.5.3.4 PBS Lysepuffer

3	mM	β -Mercaptoethanol
5	mM	Benzamidin
1	mM	EDTA
0,1	mM	PMSF

in PBS (siehe 4.5.3.1)

4.5.3.5 Protease Inhibitor Cocktail 100x

5	mg	Antipain-dihydrochlorid
5	mg	Bestatin-hydrochlorid
5	mg	Pepstatin A
5	mg	Leupeptin-trifluoroacetat

in 50 ml Methanol

4.5.3.6 GST-Elutionspuffer

30	mM	reduziertes Glutathion
1	mM	EDTA
1	mM	DTT

in 50 ml PBS pH 7,3 gelöst.

4.5.3.7 MBP-Elutionspuffer

30	mM	Maltose
1	mM	EDTA
1	mM	DTT

in 50 ml PBS pH 7,3 gelöst.

Um Proteine effizient und in hoher Ausbeute aufzureinigen zu können, wurden kodierende DNA-Fragmente relevanter Proteine in die *E. coli* Expressionsvektoren pGEX-6P-1 oder pMal-c2x inseriert. Durch die Klonierung in den pGEX-6P-1 Vektor wurde N-terminal Glutathione-S-transferase (GST) und durch den pMALc2x Vektor N-terminal das Maltose-Bindeprotein (MBP) an das Protein fusioniert. Die Fusion von GST bzw. MBP an das Polypeptid verbessert die Löslichkeit und ermöglicht dessen Aufreinigung über Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose bzw. Amylose-Sepharose. Die Expression von Fusionsproteinen wurde mit 0,1-1 mM IPTG bei einer OD_{600} der Zellkultur von 0,4 – 0,6 induziert und bei 30°C und 180 rpm in Schüttelkultur über Nacht fortgesetzt. Um die Expression zu überprüfen wurden

1,5 ml der induzierten Kultur in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 15.000 rpm für 20s in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet mit 300 µl 3x SDS Auftragspuffer versetzt und 10 min gekocht. Als Negativkontrolle wurden Zellen in Abwesenheit von IPTG verwendet. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf die Expression der Fusionsproteine analysiert. Positive Klone wurden als Vorkultur in 200 ml LB-Medium (4.5.3.1) mit 50-100 µg/ml Ampicillin und zusätzlich, für *E. coli* Rosetta BL21(DE3) Kulturen, mit 10 µg/ml Chloramphenicol bzw. für ArcticXpress mit 20 µg/ml Gentamycin, angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm in Schüttelkultur inkubiert. Von der Vorkultur wurden immer 1,5 ml abgenommen und als nicht induzierte Negativkontrolle aufbewahrt. Die verbliebene Kultur wurde auf 6 l LB-rich Medium (4.5.3.1) mit 50-100 µg/ml Ampicillin und den zusätzlich benötigten Antibiotika in geeigneter Konzentration aufgeteilt. Die Kultur wurde nachfolgend bei 30°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 geschüttelt und die Temperatur auf die für die Expression optimale Temperatur von 23° bis 27°C abgesenkt. Nach dem Erreichen der gewünschten Temperatur und einer OD₆₀₀ von 0,4-0,7 wurde die Expression mit einer Endkonzentration von 0,1-1 mM IPTG induziert und die Zellen über Nacht unter gleichbleibenden Bedingungen weiter kultiviert. Durch die Inkubation bei niedriger Temperatur über Nacht kann mitunter die Expressionsrate erhöht werden und die Wahrscheinlichkeit der Aggregatbildung in Form von „inclusion bodies“ nimmt ab. Von der induzierten Kultur wurden 1,5 ml als Kontrolle abgenommen und auf Eis gelagert. Die *E. coli* Zellen wurden nachfolgend bei 4°C und 8000 g für 20 min sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet für alle folgenden Schritte auf Eis gehalten. Das aus einem Liter Kultur erhaltene Pellet wurde mit 10 ml kaltem PBS Lysepuffer (4.5.3.4) resuspendiert und in ein vorgekühltes Gefäß überführt und zusätzlich mit Proteaseinhibitoren versetzt. Nach der Zugabe von 0,2 mg /ml Lysozym wurde die Zellsuspension 15 min rührend bei 4°C inkubiert. Da Lysozym die Zellwand von *E. coli* angreift, indem es bestimmte glykosidische Bindungen hydrolysiert, wird die Zellwand derart geschädigt, dass die Bakterien später durch Ultraschall leichter lysiert werden können. Zur vollständigen Lyse der Bakterienzellen wurden sie sechs Mal für 30 s mit 30 s Pause Ultraschall bei 80% Leistung und 70%iger Beschallungsdauer ausgesetzt. Um ein Erwärmen der Zellsuspension zu vermeiden wurde das Gefäß dabei in einem Eis-Wasser Gemisch gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann in vorgekühlten Zentrifugenröhrchen für 60 min bei 40000 g zentrifugiert und der Überstand in einen vorgekühlten 50 ml

Glaskolben überführt. Die Affinitätschromatographiesäule war zuvor mit PBS Lysepuffer gewaschen und equilibriert worden. Die klare Proteinlösung wurde mit einer peristaltischen Pumpe (GE Healthcare) bei einer Flussrate von 1 ml/min dreimal über die Säule zirkuliert, so dass das Fusionsprotein an das Säulenmaterial binden konnte. Nach dem Laden der Säule wurde diese mit mindestens fünf Säulenvolumina PBS Lysepuffer gewaschen. GST-Fusionsproteine wurden mit 30 mM reduzierten Glutathion und MBP-Fusionsproteine mit 30 mM Maltose von den Säulen eluiert und in Fraktionen zu je 4 ml gesammelt. Um bei GST-Fusionsproteinen eine Abspaltung des fusionierten GST mit der PreScission Protease zu ermöglichen, war es notwendig alle Proteaseinhibitoren ausgenommen EDTA zu entfernen. In diesem Fall wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen PBS gewaschen. Abschließend wurde das Fusionsprotein mit dem entsprechenden GST-Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt überprüft. Dazu wurden je 20 µl der einzelnen Fraktionen in 780 µl Wasser aufgenommen und mit 200 µl Bradford Reagenz versetzt. Anhand der Blaufärbung der Lösung wurden Fraktionen für Analysen durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung ausgewählt.

4.5.4 Spaltung und Abtrennung von GST aus Fusionsproteinen

Nach Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen mit dem pGEX-6P System konnte das fusionierte GST durch proteolytischen Verdau mit PreScission Protease abgespalten werden. Dazu musste die Proteinlösung frei von Proteaseinhibitoren sein. Da es sich bei der PreScission Protease nicht um eine Metalloprotease handelt, konnte EDTA der Lösung zugesetzt werden. Wurde das Protein in 4.5.3 Gegenwart von Inhibitoren eluiert, mussten diese durch dreimalige Dialyse gegen 500 ml PBS, 1 mM EDTA, 1mM DTT entfernt. Die Proteinlösung wurde nachfolgend mit 1 µg PreScission Protease pro 1 mg GST-Fusionsprotein versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Nach erfolgtem Verdau konnte GST durch Gelfiltration aus dem Gemisch abgetrennt werden. War dies aufgrund ähnlicher hydrodynamischer Radien von GST und abgespaltenem Protein nicht möglich, wurde GST durch Ionenaustauschchromatographie bzw. Affinitätschromatographie mit einer Glutathion-Sepharose Säule abgetrennt.

4.5.5 Tris/Glycin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4.5.5.1 Sammelgel

125	mM	Tris-Glycin, pH 6,8
0,1	%	SDS
3,3	%	Acrylamid (1:38 Bisacrylamid)

pro 16 ml (Minigel):

240	µl	20%iges Ammoniumperoxodisulfat
8	µl	TEMED

4.5.5.2 Trenngel 10%

380	mM	Tris-Glycin, pH 6,8
0,1	%	SDS
10	%	Acrylamid (1:38 Bisacrylamid)

pro 42 ml (Minigel):

480	µl	20%iges Ammoniumperoxodisulfat
11	µl	TEMED

4.5.5.3 3x SDS-Probenpuffer

65	mM	Tris/HCl, pH 6,8
10	%	Glycerol
2,3	%	SDS
5	%	β-Mercaptoethanol
0,2	%	Bromphenolblau

4.5.5.4 10x Laufpuffer

250	mM	Tris
1,9	M	Glycin
1	%	SDS

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli *et al.* 1970) wurden in der Regel 10%ige Trenngele (Standardgele: 10 x 11 x 0,1 cm; Minigele 7,5 x 10 x 0,05 cm) mit 3%igen Sammelgelen verwendet. Zu der aufzutrennenden Proteinlösung wurde 1/3 Volumen 3x konzentrierter SDS-Probenpuffer gegeben und die Lösung für 5 min gekocht. Es wurden 5 µl Marker und maximal 15 µl Probenvolumen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 45 min mit 180 V pro Minigel. Nach dem Gellauf wurde

das Gel entweder direkt für Western-Blots eingesetzt oder mit Coomassie™ Brilliant Blue gefärbt.

4.5.6 Tris/Tricin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4.5.6.1 Tricin Gelpuffer

3 M Tris/HCl pH8,45
0,3 % SDS
gelöst in H₂O

4.5.6.2 Tricin-Sammelgel

7,2 ml Acrylamid
9 ml Tricin Gelpuffer
19,8 ml H₂O

pro 16 ml (Minigel):

240 µl 20%iges Ammoniumperoxodisulfat
8 µl TEMED

4.5.6.3 Tricin-Trenngel 16%

33 ml Acrylamid
20,4 ml Tricin Gelpuffer
6,6 ml H₂O

pro 42 ml (Minigel):

480 µl 20%iges Ammoniumperoxodisulfat
11 µl TEMED

4.5.6.4 3x SDS-Probenpuffer

65 mM Tris/HCl, pH 6,8
10 % Glycerol
2,3 % SDS
5 % β-Mercaptoethanol
Bromphenolblau

4.5.6.5 10x Anodenpuffer

2 M Tris/HCl pH 8,9
gelöst in H₂O

4.5.6.6 10x Kathodenpuffer

1	M	Tris/HCl pH 8,35
1	M	Tricine pH 8,25 (muss)
1	%	SDS

gelöst in H₂O

Für die SDS-PAGE wurden in der Regel 16%ige Trenngele (Standardgele: 10 x 11 x 0,1 cm; Minigele 7,5 x 10 x 0,05 cm) mit 6%igen Sammelgelen verwendet. Zu der aufzutrennenden Proteinlösung wurde 1/3 Volumen des 3x SDS-Probenpuffer gegeben und die Lösung für 5 min gekocht. Es wurden 5 µl Marker und maximal 15 µl Probenvolumen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 90 min mit 50 mA pro Minigel. Nach dem Gellauf wurde das Gel entweder direkt für Western-Blots eingesetzt oder mit Coomassie™ Brilliant Blue gefärbt.

4.5.7 Coomassie-Blau-Färbung

4.5.7.1 Färbelösung

0,2	%	Coomassie-Brilliant Blue R250
0,2	%	Coomassie-Brilliant Blue G250
50	%	Methanol
10	%	Essigsäure

filtrieren

4.5.7.2 Entfärber

10	%	Ethanol
7	%	Essigsäure

gelöst in H₂O

SDS-Gele wurden in Coomassie™ Brilliant Blue Färbelösung kurz aufgeköcht und Standardgele (10 x 11 x 0,1 cm) für mindestens 30 min, Minigele (7,5 x 10 x 0,05 cm) für mindestens 10 min gefärbt. Die Gele wurden anschließend kurz mit Wasser gewaschen und durch schütteln mit 10%iger Entfärbelösung entfärbt. Das Gel wurde anschließend digital dokumentiert.

4.5.8 Silberfärbung von Proteinen nach SDS-PAGE

4.5.8.1 Lösung 1

2	ml	1M NaOH
1,4	ml	25%ige Ammoniaklösung
92,6	ml	H ₂ O
4	ml	AgNO ₃ -Lösung (0,2 mg/ml)

Tropfenweise zugeben

4.5.8.2 Lösung 2

0,1	ml	Formaldehyd
50	mg	Zitronensäure
10	ml	Methanol
90	ml	H ₂ O

Die Silberfärbung von Proteinen in Acrylamidgelen wurde im Wesentlichen nach der Methode von durchgeführt (Oakley et al., 1980). Hierbei wurde das Gel zweimal für je 30 min in einer wässrigen Lösung, die 5% Methanol und 7% Essigsäure enthielt, fixiert und dann 30 min in einer 10% Glutaraldehyd-Lösung nachfixiert. Nach fünf Waschschritten in Wasser (jeweils 20-30 min) wurde das Gel für 30 min mit Lösung 1 inkubiert und danach kurz mit Wasser gewaschen. Die anschließende Färbung erfolgte durch Inkubation des Gels in Lösung 2. Um die Färbereaktion zu stoppen wurde das Gel in einer Lösung aus 5% Methanol und 7% Essigsäure inkubiert.

4.5.9 Western-Blot und Detektion von Proteinen

4.5.9.1 Transferpuffer

15	g	Tris
72	g	Glycine
20	%	MeOH
1	g	0,02% SDS

Mit H₂O auf 5l auffüllen.

4.5.9.2 10x NCP

12,1	g	Tris
87	g	NaCl
5	ml	Tween20
0,1	%	Na-Azid

Mit H₂O auf 1l auffüllen pH8,0 kontrollieren.

4.5.9.3 Blockpuffer

4	%	BSA
---	---	-----

in NCP pH8,0

Proteine können durch Western-Blot und nachfolgende Inkubation mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Hierzu wurde das SDS-Gel direkt nach dem Lauf zunächst einige Minuten in Transferpuffer inkubiert. Eine Nitrozellulose-Membran (Protran, Schleicher-Schuell, Dassel) und zweimal 3 Schichten Filterpapier (Whatman) wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Alle Komponenten wurden in Transferpuffer equilibriert und feucht gehalten. Die Komponenten wurden blasenfrei und in folgender Reihenfolge in die Blotkammer geschichtet: drei Schichten Filterpapier, Nitrozellulosemembran, SDS-Gel und abschließend erneut drei Schichten Filterpapier. Die Kammer wurde verschlossen und die Proteine bei 12 V für eine Dauer von 45-60 min auf die Membran transferiert. Durch anschließende Färbung des Gels mit Coomassie™ Brilliant Blue konnte die Effizienz des Transfers überprüft werden. Alternativ konnte das Protein auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Färbung nachgewiesen werden. Einzelne Proteine wurden kolorimetrisch durch spezifische mono- und polyklonale IgG aus Kaninchen detektiert.

Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 30 min zunächst in 15 ml NCP-4% BSA Blockpuffer inkubiert und anschließend dreimal mit NCP gewaschen. Die Inkubation mit dem in Blockpuffer verdünnten Primär-Antikörper erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Fusionsproteine wurden mit polyklonalen Kaninchen in einer Verdünnung von 1:2000 markiert. Nach drei Waschschritten mit NCP erfolgte die Inkubation mit dem sekundären anti-Kaninchen Antikörpern aus der Ziege. Bei dem Sekundäntikörper handelte es sich um ein Anti-IgG₁-Konjugat mit alkalischer Phosphatase (AP) (Goat anti rabbit (GAR-AP)). Die Inkubation mit dem Sekundäntikörper erfolgte bei Raumtemperatur für 2 h in einer Verdünnung des

Antikörpers von 1:3000. Nach der Inkubation wurde dreimal mit NCP gewaschen, um nicht gebundene IgGs zu entfernen. Durch zweimaliges Waschen mit einem 100 mM Carbonatpuffer pH 10, wurde ein basisches Milieu für die nachfolgende Färbereaktion geschaffen. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 0,16 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und 0,32 /ml *p*-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) gestartet. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion durch Waschen der Membran mit Wasser gestoppt. Die gefärbte Membran wurde dann mit einem Geldokumentationssystem (Biovision) dokumentiert.

4.5.10 Pulldown

4.5.10.1 PD Puffer

25	mM	Tris8.0
50	mM	NaCl
1	mM	EDTA
1	mM	DTT
5	mM	Benzamidin
20	mM	PMSF
gelöst in H ₂ O		

200 µl Glutathion-Sepharose wurden dreimal mit PD-Puffer gewaschen um Konservierungstoffe aus dem Affinitätssäulenmaterial zu entfernen. Um alle GST-Bindungsstellen abzusättigen wurde die Sepharose mit einem 1,5 fachen Überschuß seiner Bindekapazität mit Köderprotein für 1 h bei 4°C rollend inkubiert. Um ungebundenes Protein zu entfernen wurde die Sepharose dreimal mit PD-Puffer gewaschen. Die mit dem Köderprotein gesättigte Sepharose wurde nachfolgend mit dem Testprotein oder Zelllysaten für mindestens 1 h bei 4°C rollend inkubiert. Alle Ansätze werden nun 5 mal mit PD-Puffer gewaschen und dann in 200 µl SDS-Auftragspuffer aufgenommen und 10 min gekocht. Um das Säulematerial zu entfernen, wurden die Proben erneut zentrifugiert und die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Jeweils 20 µl der Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und nachfolgend durch Coomassie-Färbung, Silber-Färbung oder Western-blotting analysiert.

4.6 Biophysikalische Methoden

4.6.1 Analytische Ultrazentrifugation

Bei der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) handelt es sich um eine Methode, die das hydrodynamische Verhalten von Makromolekülen im Schwerfeld analysiert. Im Sedimentationsexperiment sedimentiert die angelegte Zentrifugalkraft die Partikel in der Lösung entgegen der Reibungskraft bei konstanter Temperatur. Die Proteinkonzentration der Lösung in der Messzelle wird zeitaufgelöst an verschiedenen Positionen wahlweise durch Absorptions-, Fluoreszenz- oder Interferenzmessungen verfolgt. Das hier verwendete Instrument, Beckman XL-I, verfügt über alle drei Messverfahren, und ermöglicht so die Analyse über einen großen Konzentrationsbereich. Da diese Methode sehr sensitiv auf Verunreinigungen reagiert, müssen die zu analysierenden Bestandteile der Lösung bekannt sein. Die Messung der ortsabhängigen Konzentrationsänderung ergibt nach direkter Auftragung der Absorption gegen die Position in der Küvette eine Schar sigmoider Kurven bei verschiedenen Zeitpunkten. Aus diesen lässt sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel ermitteln. Dazu wird eine nichtlineare Anpassung jeder einzelnen Kurve mit der Lamm'schen Differentialgleichung durchgeführt (Brown et al., 2009; Lamm, 1929). Dadurch lässt sich unter Berücksichtigung der Sedimentation und der Diffusion bei bekannter Viskosität des Lösungsmittels der stoffspezifische Sedimentationskoeffizient errechnen. Die Viskosität wird aus der Zusammensetzung der Lösung mit dem Programm SEDNTERP (<http://www.rasmb.bbri.org/>) berechnet. Um die Messungen miteinander vergleichen zu können, wurden die Sedimentationskoeffizienten auf eine Temperatur von 20°C und die Viskosität von Wasser normalisiert ($s_{20,W}$).

Im Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtsexperiment wurden die Partikel nicht sedimentiert, sondern die ortsabhängige Konzentration nach der Gleichgewichtseinstellung zwischen Sedimentation und Diffusion gemessen. Durch dieses Experiment lässt sich aus dem Verlauf der Proteinkonzentration, im Gleichgewicht aus Sedimentation und Diffusion, in der Zelle direkt das Molekulargewicht der Partikel bestimmen. Aus den gemessenen Daten der beiden Experimente lassen sich weitere Parameter wie der Perrin-Faktor und der Oligomerisierungsgrad von Proteinen ableiten.

4.6.2 Volumenaustauschchromatographie

Die Methode der Gelfiltration trennt Gemische von Proteinen aufgrund unterschiedlicher hydrodynamischer Radien (R_h). Das Gelbett dieser Chromatographiesäulen besteht aus Hohlkugeln definierter Größe. In einem konstanten Pufferstrom diffundieren die Proteine der Mischung, abhängig von ihrem R_h , unterschiedlich oft durch die Poren in die Kugeln hinein. Je kleiner das Protein ist, umso länger wird somit sein Weg über die Säule. Die hier verwendete Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) Anlage Äkta™-Purifier (GE-Healthcare) und die verwendete Steuerungssoftware Unicorn™ misst und dokumentiert zusätzlich verschiedene Parameter des Laufes, wie Flussrate, Druck, pH-Wert, Leitfähigkeit und die Absorption bei 280 nm. Der für die Läufe verwendete Puffer war stets eine wässrige Salzlösung mit physiologischen pH-Werten und wurde vor Beginn des Laufes durch Filtration (0,22 μ m Porengröße) entgast und von Partikeln befreit. Reagenzien mit einer Absorption im Bereich von 280 nm wurden soweit möglich vermieden. Die Puffersubstanzen und der Salzgehalt variierten je nach Verwendungszweck der gereinigten Proteine. Die Agarose-Matrices der hier verwendeten fertig gepackten Gelfiltrationssäulen bestanden aus Superdex der Trennkapazität S200 (600-30 kDa) oder G75 (75-3 kDa) und einem Gelbettvolumen von 320 ml. Die angegebenen Molekulargewichte beziehen sich auf globuläre Proteine. Vor Beginn jedes Laufes wurden die Säulen mit dem entsprechenden Laufpuffer equilibriert. Dazu wurde die Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min und einen maximalen Druck von 0,5 MPa mit mindestens einem Säulenvolumen Puffer gespült. Die zu trennende Proteinlösung wurde nach Herstellerangaben auf ein maximales Ladevolumen von 10 ml eingengt. Der nachfolgende Trennungslauf wurde bei Flussraten von 1-3 ml/min, abhängig von der benötigten Trennschärfe, mit ebenfalls mindestens einem Säulenvolumen durchgeführt. Das Eluat des gesamten Trennungslaufes wurde in 4 ml Fraktionen (Frac950; GE-Healthcare) gesammelt und die Fraktionen durch SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung analysiert.

4.6.3 Ionenaustauschchromatographie

Die Methode der Ionenaustauschchromatographie trennt Gemische von Proteinen aufgrund unterschiedlicher Nettoladungen. Das Gelbett dieser Chromatographiesäulen besteht aus überwiegend aus Polystyrenen, an welche entweder Amine (Anionenaustauschchromatographie) oder Carboxylgruppen

(Kationenaustauschchromatographie) kovalent gekoppelt sind. Die hier verwendete MonoQ-Säule 4.6/100 PE (GE-Healthcare) ist mit einem starken Anionenaustauscher gepackt. Hier sind tertiäre Amine an das Polystyren-Trägermaterial gekoppelt, so dass sich die Ladung der Säule nicht pH-abhängig verändert. Die Proteinlösung lag zum Laden auf die Säule in einem Nidrigsalzpuffer mit geeignetem pH-Wert vor, so dass die elektrostatische Bindung an die Matrix möglichst wenig durch freie Ionen inhibiert wurde. Die Elution erfolgte mit steigender Salzkonzentration in linearen oder Stufengradienten mit einem Volumen von 10-30 Säulenvolumina. Das Mischen von Nidrig- und Hochsalzpuffer für die fraktionierte Elution wurde durch die verwendete (HPLC) Anlage Äkta™-Purifier (GE-Healthcare) gesteuert und dokumentiert. Die steigende Konzentration von freien negativ geladenen Ionen, meistens Cl⁻, verdrängte so die gebundenen Proteine und löste diese in aufsteigender Reihe ihrer negativen Nettoladungen von der Säule. Das Eluat wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt (Frac950; GE-Healthcare) und enthaltene Proteine durch SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung analysiert.

Speziell für die Trennung von DdHSPC300 von GST, wurden folgende Puffer verwendet:

4.6.3.1 Nidrigsalzpuffer

20	mM	Tris/HCl 7,3
30	mM	NaCl
1	mM	EDTA
10	%	Glycerin

4.6.3.2 Hochsalzpuffer

20	mM	Tris/HCl 7,3
1000	mM	NaCl
1	mM	EDTA
10	%	Glycerin

4.6.4 Dynamische Lichtstreuung

Trifft Licht auf Makromoleküle in Lösung wird es in alle Richtungen gestreut. Dies wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet. Bei dem hier verwendeten Gerät Viscothek, der Firma Malvern, wird bei einem festen Winkel von 90° gemessen. Diese Anordnung ermöglicht die Verwendung einer einfachen quaderförmigen Küvette mit einem Füllvolumen von $12 \mu\text{l}$. Da das Streulicht der verschiedenen Streuzentren interferiert und hier kohärentes und monochromatisches Licht eines 830 nm Lasers verwendet wird, führt diese Interferenz aufgrund der sich durch die Brownsche Molekularbewegung ständig ändernden Abstände der Streuzentren zueinander zu kleinen Fluktuationen in der Streuintensität. Die Analyse dieser Fluktuationen in Abhängigkeit von der Zeit unter Verwendung einer Autokorrelationsfunktion ergibt als messbare Größe den Diffusionskoeffizienten der gelösten Spezies. Bei bekannter Viskosität des Lösungsmittels konnte unter Verwendung der Stoke's-Einstein Beziehung der hydrodynamischen Radius gemessen werden. Die Viskosität des Lösungsmittels wurde mit der Software SEDNTERP (<http://www.rasmb.bbri.org/>) berechnet.

5 Literaturverzeichnis

- Adams, J.C. (2004). Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 590-596.
- Ahuja, R., Pinyol, R., Reichenbach, N., Custer, L., Klingensmith, J., Kessels, M.M., and Qualmann, B. (2007). Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell* *131*, 337-350.
- Allen, R.D., and Naitoh, Y. (2002). Osmoregulation and contractile vacuoles of protozoa. *Int. Rev. Cytol.* *215*, 351-394.
- Anitei, M., Stange, C., Parshina, I., Baust, T., Schenck, A., Raposo, G., Kirchhausen, T., and Hoflack, B. (2010). Protein complexes containing CYFIP/Sra/PIR121 coordinate Arf1 and Rac1 signalling during clathrin-AP-1-coated carrier biogenesis at the TGN. *Nat. Cell Biol.* *12*, 330-340.
- Ball, L.J., Jarchau, T., Oschkinat, H., and Walter, U. (2002). EVH1 domains: structure, function and interactions. *FEBS Lett.* *513*, 45-52.
- Barzik, M., Kotova, T.I., Higgs, H.N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F.B., and Schafer, D.A. (2005). Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J. Biol. Chem.* *280*, 28653-28662.
- Bear, J.E., Rawls, J.F., and Saxe III, C.L. (1998). SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J. Cell Biol.* *142*, 1325-1335.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., and Gertler, F.B. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* *109*, 509-521.
- Benesch, S., Polo, S., Lai, F.P., Anderson, K.I., Stradal, T.E., Wehland, J., and Rottner, K. (2005). N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J. Cell. Sci.* *118*, 3103-3115.
- Berg, J.S., and Cheney, R.E. (2002). Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility. *Nat. Cell Biol.* *4*, 246-250.
- Bhatia, V.K., Madsen, K.L., Bolinger, P.Y., Kunding, A., Hedegard, P., Gether, U., and Stamou, D. (2009). Amphipathic motifs in BAR domains are essential for membrane curvature sensing. *EMBO J.* *28*, 3303-3314.

- Blagg, S.L., and Insall, R.H. (2004). Control of SCAR activity in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 1113-1114.
- Blagg, S.L., Stewart, M., Sambles, C., and Insall, R.H. (2003). PIR121 regulates pseudopod dynamics and SCAR activity in *Dictyostelium*. *Curr. Biol.* **13**, 1480-1487.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Mullins, R.D. (2000a). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr. Biol.* **10**, 1273-1282.
- Blanchoin, L., Robinson, R.C., Choe, S., and Pollard, T.D. (2000b). Phosphorylation of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure. *J. Mol. Biol.* **295**, 203-211.
- Block, J., Stradal, T.E., Hanisch, J., Geffers, R., Kostler, S.A., Urban, E., Small, J.V., Rottner, K., and Faix, J. (2008). Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. *J. Microsc.* **231**, 506-517.
- Block, S.M., Goldstein, L.S., and Schnapp, B.J. (1990). Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* **348**, 348-352.
- Boeda, B., Briggs, D.C., Higgins, T., Garvalov, B.K., Fadden, A.J., McDonald, N.Q., and Way, M. (2007). Tes, a specific Mena interacting partner, breaks the rules for EVH1 binding. *Mol. Cell* **28**, 1071-1082.
- Bogdan, S., Stephan, R., Lobke, C., Mertens, A., and Klambt, C. (2005). Abi activates WASP to promote sensory organ development. *Nat. Cell Biol.* **7**, 977-984.
- Bohil, A.B., Robertson, B.W., and Cheney, R.E. (2006). Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12411-12416.
- Breitsprecher, D., Kiesewetter, A.K., Linkner, J., and Faix, J. (2009). Analysis of actin assembly by in vitro TIRF microscopy. *Methods Mol. Biol.* **571**, 401-415.
- Breitsprecher, D., Kiesewetter, A.K., Linkner, J., Urbanke, C., Resch, G.P., Small, J.V., and Faix, J. (2008). Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J.* **27**, 2943-2954.
- Brindle, N.P., Holt, M.R., Davies, J.E., Price, C.J., and Critchley, D.R. (1996). The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem. J.* **318 (Pt 3)**, 753-757.

- Brown, P.H., Balbo, A., and Schuck, P. (2009). On the analysis of sedimentation velocity in the study of protein complexes. *Eur. Biophys. J.* **38**, 1079-1099.
- Burridge, K., and Mangeat, P. (1984). An interaction between vinculin and talin. *Nature* **308**, 744-746.
- Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (2007). Control of actin assembly dynamics in cell motility. *J. Biol. Chem.* **282**, 23005-23009.
- Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (1994). Actin assembly in response to extracellular signals: role of capping proteins, thymosin beta 4 and profilin. *Semin. Cell Biol.* **5**, 183-191.
- Carlsson, L., Nystrom, L.E., Sundkvist, I., Markey, F., and Lindberg, U. (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* **115**, 465-483.
- Chereau, D., Boczkowska, M., Skwarek-Maruszewska, A., Fujiwara, I., Hayes, D.B., Rebowski, G., Lappalainen, P., Pollard, T.D., and Dominguez, R. (2008). Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science* **320**, 239-243.
- Chereau, D., and Dominguez, R. (2006). Understanding the role of the G-actin-binding domain of Ena/VASP in actin assembly. *J. Struct. Biol.* **155**, 195-201.
- Chesarone, M.A., DuPage, A.G., and Goode, B.L. (2010). Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 62-74.
- Chesarone, M.A., and Goode, B.L. (2009). Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 28-37.
- Chhabra, E.S., and Higgs, H.N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1110-1121.
- Chishti, A.H., Kim, A.C., Marfatia, S.M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S.C., Low, P.S., Rouleau, G.A., Mohandas, N., *et al.* (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 281-282.
- Chou, H.C., Anton, I.M., Holt, M.R., Curcio, C., Lanzardo, S., Worth, A., Burns, S., Thrasher, A.J., Jones, G.E., and Calle, Y. (2006). WIP regulates the

- stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr. Biol.* *16*, 2337-2344.
- Clarke, M., Kohler, J., Arana, Q., Liu, T.Y., Heuser, J., and Gerisch, G. (2002). Dynamics of the vacuolar H⁺-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of Dictyostelium cells. *J. Cell Sci.* *115*, 2893-2905.
 - Condeelis, J.S., and Taylor, D.L. (1977). The contractile basis of amoeboid movement. V. The control of gelation, solation, and contraction in extracts from Dictyostelium discoideum. *J. Cell Biol.* *74*, 901-927.
 - Cooper, J.A., and Schafer, D.A. (2000). Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 97-103.
 - Cosen-Binker, L.I., and Kapus, A. (2006). Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology (Bethesda)* *21*, 352-361.
 - Daly, R.J. (2004). Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem. J.* *382*, 13-25.
 - de la Fuente, M.A., Sasahara, Y., Calamito, M., Anton, I.M., Elkhail, A., Gallego, M.D., Suresh, K., Siminovitch, K., Ochs, H.D., Anderson, K.C., *et al.* (2007). WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 926-931.
 - DeMali, K.A., Barlow, C.A., and Burridge, K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J. Cell Biol.* *159*, 881-891.
 - Dent, E.W., Kwiatkowski, A.V., Mebane, L.M., Philippar, U., Barzik, M., Rubinson, D.A., Gupton, S., Van Veen, J.E., Furman, C., Zhang, J., *et al.* (2007). Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1347-1359.
 - Derivery, E., Fink, J., Martin, D., Houdusse, A., Piel, M., Stradal, T.E., Louvard, D., and Gautreau, A. (2008). Free Brick1 is a trimeric precursor in the assembly of a functional wave complex. *PLoS ONE* *3*, e2462.
 - Derivery, E., Lombard, B., Loew, D., and Gautreau, A. (2009). The Wave complex is intrinsically inactive. *Cell Motil. Cytoskeleton*
 - Di Nardo, A., Cicchetti, G., Falet, H., Hartwig, J.H., Stossel, T.P., and Kwiatkowski, D.J. (2005). Arp2/3 complex-deficient mouse fibroblasts are viable and have normal leading-edge actin structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16263-16268.

- Dittrich, M., Strassberger, V., Fackler, M., Tas, P., Lewandrowski, U., Sickmann, A., Walter, U., Dandekar, T., and 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.*
- Dominguez, R. (2009). Actin filament nucleation and elongation factors--structure-function relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *44*, 351-366.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., and Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* *83*, 433-473.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* *418*, 790-793.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glockner, G., Rajandream, M.A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., *et al.* (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* *435*, 43-57.
- Faix, J., Breitsprecher, D., Stradal, T.E., and Rottner, K. (2009). Filopodia: Complex models for simple rods. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1656-1664.
- Faix, J., and Dittrich, W. (1996). DGAP1, a homologue of rasGTPase activating proteins that controls growth, cytokinesis, and development in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* *394*, 251-257.
- Faix, J., and Grosse, R. (2006). Staying in shape with formins. *Dev. Cell.* *10*, 693-706.
- Faix, J., Kreppel, L., Shaulsky, G., Schleicher, M., and Kimmel, A.R. (2004). A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucl. Acids Res.* *32*, E143.
- Faix, J., and Rottner, K. (2006). The making of filopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 18-25.
- Faix, J., Steinmetz, M., Boves, H., Kammerer, R.A., Lottspeich, F., Mintert, U., Murphy, J., Stock, A., Aebi, U., and 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.

- Faix, J., Weber, I., Mintert, U., Kohler, J., Lottspeich, F., and Marriott, G. (2001). Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins. *EMBO J.* 20, 3705-3715.
- Ferron, F., Rebowski, G., Lee, S.H., and Dominguez, R. (2007). Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J.* 26, 4597-4606.
- Fey, P., Stephens, S., Titus, M.A., and Chisholm, R.L. (2002). SadA, a novel adhesion receptor in Dictyostelium. *J. Cell Biol.* 159, 1109-1119.
- Franke, W.W. (1987). Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: a growing multigene family. *Cell* 48, 3-4.
- Galdeen, S.A., Stephens, S., Thomas, D.D., and Titus, M.A. (2007). Talin influences the dynamics of the myosin VII-membrane interaction. *Mol. Biol. Cell* 18, 4074-4084.
- Gautreau, A., Ho, H.Y., Li, J., Steen, H., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W. (2004). Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4379-4383.
- Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., and Soriano, P. (1996). Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 87, 227-239.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Furman, M.I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V.T., and Pollard, T.D. (1992). The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell* 3, 1015-1024.
- Goley, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 713-726.
- Gupton, S.L., and Gertler, F.B. (2007). Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci. STKE* 2007, re5.
- Hacker, U., Albrecht, R., and Maniak, M. (1997). Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium. *J. Cell Sci.* 110, 105-112.
- Hahne, P., Sechi, A., Benesch, S., and Small, J.V. (2001). Scar/WAVE is localised at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett.* 492, 215-220.
- Halbrugge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P., and Walter, U. (1990). Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in

- human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J. Biol. Chem.* *265*, 3088-3093.
- Han, Y.H., Chung, C.Y., Wessels, D., Stephens, S., Titus, M.A., Soll, D.R., and Firtel, R.A. (2002). Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* *277*, 49877-49887.
 - Hayden, J.H. (1988). Microtubule-associated organelle and vesicle transport in fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton* *10*, 255-262.
 - Heath, R.J., and Insall, R.H. (2008). *Dictyostelium* MEGAPs: F-BAR domain proteins that regulate motility and membrane tubulation in contractile vacuoles. *J. Cell. Sci.* *121*, 1054-1064.
 - Hertzog, M., van Heijenoort, C., Didry, D., Gaudier, M., Coutant, J., Gigant, B., Didelot, G., Preat, T., Knossow, M., Guittet, E., and Carlier, M.F. (2004). The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly. *Cell* *117*, 611-623.
 - Hofmann, I., Herrmann, H., and Franke, W.W. (1991). Assembly and structure of calcium-induced thick vimentin filaments. *Eur. J. Cell Biol.* *56*, 328-341.
 - Ibarra, N., Blagg, S.L., Vazquez, F., and Insall, R.H. (2006). Nap1 regulates *Dictyostelium* cell motility and adhesion through SCAR-dependent and - independent pathways. *Curr. Biol.* *16*, 717-722.
 - Ibarra, N., Pollitt, A., and Insall, R.H. (2005). Regulation of actin assembly by SCAR/WAVE proteins. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 1243-1246.
 - Innocenti, M., Gerboth, S., Rottner, K., Lai, F.P., Hertzog, M., Stradal, T.E., Frittoli, E., Didry, D., Polo, S., Disanza, A., *et al.* (2005). Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nat. Cell Biol.* *7*, 969-976.
 - Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L.B., Steffen, A., Stradal, T.E., Di Fiore, P.P., Carlier, M.F., and Scita, G. (2004). Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat. Cell Biol.* *6*, 319-327.
 - Insall, R.H., and Machesky, L.M. (2009). Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev. Cell.* *17*, 310-322.
 - Ismail, A.M., Padrick, S.B., Chen, B., Umetani, J., and Rosen, M.K. (2009). The WAVE regulatory complex is inhibited. *Nat. Struct. Mol. Biol.*

- Janson, L.W., Kolega, J., and Taylor, D.L. (1991). Modulation of contraction by gelation/solution in a reconstituted motile model. *J. Cell Biol.* *114*, 1005-1015.
- Jenzora, A., Behrendt, B., Small, J.V., Wehland, J., and Stradal, T.E. (2005). PREL1 provides a link from Ras signalling to the actin cytoskeleton via Ena/VASP proteins. *FEBS Lett.* *579*, 455-463.
- Joseph, J.M., Fey, P., Ramalingam, N., Liu, X.I., Rohlf, M., Noegel, A.A., Muller-Taubenberger, A., Glockner, G., and Schleicher, M. (2008). The actinome of *Dictyostelium discoideum* in comparison to actins and actin-related proteins from other organisms. *PLoS One* *3*, e2654.
- Kerssemakers, J.W., Munteanu, E.L., Laan, L., Noetzel, T.L., Janson, M.E., and Dogterom, M. (2006). Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature* *442*, 709-712.
- Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-Manan, N., Liu, G.A., and Rosen, M.K. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* *404*, 151-158.
- Korn, E.D., Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (1987). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* *238*, 638-644.
- Krause, M., Leslie, J.D., Stewart, M., Lafuente, E.M., Valderrama, F., Jagannathan, R., Strasser, G.A., Rubinson, D.A., Liu, H., Way, M., *et al.* (2004). Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Dev. Cell.* *7*, 571-583.
- Krendel, M., and Mooseker, M.S. (2005). Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* *20*, 239-251.
- Kueh, H.Y., Charras, G.T., Mitchison, T.J., and Briehner, W.M. (2008). Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J. Cell Biol.* *182*, 341-353.
- Kuhnel, K., Jarchau, T., Wolf, E., Schlichting, I., Walter, U., Wittinghofer, A., and Strelkov, S.V. (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.
- Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V., and Baum, B. (2003). Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr. Biol.* *13*, 1867-1875.

- Kursula, P., Kursula, I., Massimi, M., Song, Y.H., Downer, J., Stanley, W.A., Witke, W., and 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**, 270-290.
- Kwiatkowski, D.J. (1999). Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 103-108.
- Lafuente, E.M., van Puijenbroek, A.A., Krause, M., Carman, C.V., Freeman, G.J., Berezovskaya, A., Constantine, E., Springer, T.A., Gertler, F.B., and Boussiotis, V.A. (2004). RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Dev. Cell.* **7**, 585-595.
- Lai, F.P., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E., Dunn, G.A., Small, J.V., and Rottner, K. (2008). Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J.* **27**, 982-992.
- Laine, R.O., Phaneuf, K.L., Cunningham, C.C., Kwiatkowski, D., Azuma, T., and Southwick, F.S. (1998). Gelsolin, a protein that caps the barbed ends and severs actin filaments, enhances the actin-based motility of *Listeria monocytogenes* in host cells. *Infect. Immun.* **66**, 3775-3782.
- Lamm, O. (1929). Die Differentialgleichung der Ultrazentrifugierung. *Ark Mat Astr Fys* 1-4.
- Lanier, L.M., Gates, M.A., Witke, W., Menzies, A.S., Wehman, A.M., Macklis, J.D., Kwiatkowski, D., Soriano, P., and Gertler, F.B. (1999). Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* **22**, 313-325.
- Lassing, I., and Lindberg, U. (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* **314**, 472-474.
- Laurent, V., Loisel, T.P., Harbeck, B., Wehman, A., Grobe, L., Jockusch, B.M., Wehland, J., Gertler, F.B., and Carlier, M.F. (1999). Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **144**, 1245-1258.
- Le Clainche, C., and Carlier, M.F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* **88**, 489-513.

- Le, J., Mallery, E.L., Zhang, C., Brankle, S., and Szymanski, D.B. (2006). Arabidopsis BRICK1/HSPC300 is an essential WAVE-complex subunit that selectively stabilizes the Arp2/3 activator SCAR2. *Curr. Biol.* *16*, 895-901.
- Li, H., DeRosier, D.J., Nicholson, W.V., Nogales, E., and Downing, K.H. (2002). Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure* *10*, 1317-1328.
- Liu, R., Woolner, S., Johndrow, J.E., Metzger, D., Flores, A., and Parkhurst, S.M. (2008). Sisyphus, the Drosophila myosin XV homolog, traffics within filopodia transporting key sensory and adhesion cargos. *Development* *135*, 53-63.
- Lommel, S., Benesch, S., Rottner, K., Franz, T., Wehland, J., and Kuhn, R. (2001). Actin pedestal formation by enteropathogenic Escherichia coli and intracellular motility of Shigella flexneri are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep.* *2*, 850-857.
- Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E., and Pollard, T.D. (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 3739-3744.
- Machesky, L.M., Reeves, E., Wientjes, F., Mattheyse, F.J., Grogan, A., Totty, N.F., Burlingame, A.L., Hsuan, J.J., and Segal, A.W. (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.
- Malchow, D., Lusche, D.F., Schlatterer, C., De Lozanne, A., and Muller-Taubenberger, A. (2006). The contractile vacuole in Ca²⁺-regulation in Dictyostelium: its essential function for cAMP-induced Ca²⁺-influx. *BMC Dev. Biol.* *6*:31, 8 pages.
- Mandelkow, E., Thomas, J., and Cohen, C. (1977). Microtubule structure at low resolution by x-ray diffraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 3370-3374.
- Mandelkow, E.M., Schultheiss, R., Rapp, R., Muller, M., and Mandelkow, E. (1986). On the surface lattice of microtubules: helix starts, protofilament number, seam, and handedness. *J. Cell Biol.* *102*, 1067-1073.

- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J., and Gerisch, G. (1995). Coronin involved in phagocytosis: Dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag. *Cell* **83**, 915-924.
- Martinez-Quiles, N., Rohatgi, R., Anton, I.M., Medina, M., Saville, S.P., Miki, H., Yamaguchi, H., Takenawa, T., Hartwig, J.H., Geha, R.S., and Ramesh, N. (2001). WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat. Cell Biol.* **3**, 484-491.
- Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Mattila, P.K., Pykalainen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V.O., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Lappalainen, P. (2007). Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J. Cell Biol.* **176**, 953-964.
- Merrifield, C.J., Qualmann, B., Kessels, M.M., and Almers, W. (2004). Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 13-18.
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* **17**, 6932-6941.
- Millard, T.H., Bompard, G., Heung, M.Y., Dafforn, T.R., Scott, D.J., Machesky, L.M., and Futterer, K. (2005). Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. *EMBO J.* **24**, 240-250.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). 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.
- Mullins, R.D., Stafford, W.F., and Pollard, T.D. (1997). Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J. Cell Biol.* **136**, 331-343.
- Nagy, S., Ricca, B.L., Norstrom, M.F., Courson, D.S., Brawley, C.M., Smithback, P.A., and Rock, R.S. (2008). A myosin motor that selects bundled actin for motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9616-9620.

- Nagy, S., and Rock, R.S. (2010). A structured post-IQ domain governs selectivity of myosin X for fascin-actin bundles. *J. Biol. Chem.*
- Nakagawa, H., Miki, H., Nozumi, M., Takenawa, T., Miyamoto, S., Wehland, J., and Small, J.V. (2003). IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J. Cell. Sci.* *116*, 2577-2583.
- Narasimhulu, S.B., and Reddy, A.S. (1998). Characterization of microtubule binding domains in the Arabidopsis kinesin-like calmodulin binding protein. *Plant Cell* *10*, 957-965.
- Nemethova, M., Auinger, S., and Small, J.V. (2008). Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella. *J. Cell Biol.* *180*, 1233-1244.
- Nicholson-Dykstra, S.M., and Higgs, H.N. (2008). Arp2 depletion inhibits sheet-like protrusions but not linear protrusions of fibroblasts and lymphocytes. *Cell Motil. Cytoskeleton* *65*, 904-922.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J., and 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.
- Nogales, E., Ramey, V.H., and Wang, H.W. (2010). Cryo-EM studies of microtubule structural intermediates and kinetochore-microtubule interactions. *Methods Cell Biol.* *95*, 129-156.
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R., and Morris, N.R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* *105*, 361-363.
- Ochs, H.D., and Notarangelo, L.D. (2005). Structure and function of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Curr. Opin. Hematol.* *12*, 284-291.
- Oikawa, T., Yamaguchi, H., Itoh, T., Kato, M., Ijuin, T., Yamazaki, D., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2004). PtdIns(3,4,5)P₃ binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat. Cell Biol.* *6*, 420-426.
- Paavilainen, V.O., Bertling, E., Falck, S., and Lappalainen, P. (2004). Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* *14*, 386-394.

- Padrick, S.B., Cheng, H.C., Ismail, A.M., Panchal, S.C., Doolittle, L.K., Kim, S., Skehan, B.M., Umetani, J., Brautigam, C.A., Leong, J.M., and Rosen, M.K. (2008). Hierarchical regulation of WASP/WAVE proteins. *Mol. Cell* 32, 426-438.
- Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* 75, 1007-1014.
- Pasic, L., Kotova, T., and Schafer, D.A. (2008). Ena/VASP proteins capture actin filament barbed ends. *J. Biol. Chem.* 283, 9814-9819.
- Paul, A.S., and Pollard, T.D. (2009). Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 606-617.
- Pellegrin, S., and Mellor, H. (2005). The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr. Biol.* 15, 129-133.
- Perelroizen, I., Didry, D., Christensen, H., Chua, N.H., and Carlier, M.F. (1996). Role of nucleotide exchange and hydrolysis in the function of profilin in actin assembly. *J. Biol. Chem.* 271, 12302-12309.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303, 495-499.
- Peterson, F.C., and Volkman, B.F. (2009). Diversity of polyproline recognition by EVH1 domains. *Front. Biosci.* 14, 833-846.
- Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 451-477.
- Pollard, T.D. (2003). The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature* 422, 741-745.
- Pollard, T.D. (1990). Actin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 33-40.
- Pollard, T.D. (1976). The role of actin in the temperature-dependent gelation and contraction of extracts of *Acanthamoeba*. *J. Cell Biol.* 68, 579-601.
- Pollard, T.D., and Beltzner, C.C. (2002). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 768-774.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2001). Actin dynamics. *J. Cell. Sci.* 114, 3-4.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545-576.

- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Pollitt, A.Y., Blagg, S.L., Ibarra, N., and Insall, R.H. (2006). Cell motility and SCAR localisation in axenically growing Dictyostelium cells. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 1059-1068.
- Pollitt, A.Y., and Insall, R.H. (2009). Loss of Dictyostelium HSPC300 causes a scar-like phenotype and loss of SCAR protein. *BMC Cell Biol.* 10, 13.
- Pollitt, A.Y., and Insall, R.H. (2008). Abi mutants in Dictyostelium reveal specific roles for the SCAR/WAVE complex in cytokinesis. *Curr. Biol.* 18, 203-210.
- Pope, B., Way, M., Matsudaira, P.T., and Weeds, A. (1994). Characterisation of the F-actin binding domains of villin: classification of F-actin binding proteins into two groups according to their binding sites on actin. *FEBS Lett.* 338, 58-62.
- Prassler, J., Stocker, S., Marriott, G., Heidecker, M., Kellermann, J., and Gerisch, G. (1997). Interaction of a Dictyostelium member of the plastin/fimbrin family with actin filaments and actin-myosin complexes. *Mol. Biol. Cell* 8, 83-95.
- Prehoda, K.E., Scott, J.A., Mullins, R.D., and Lim, W.A. (2000). Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* 290, 801-806.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* 297, 612-615.
- Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E., and Mullins, R.D. (2005). Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* 433, 382-388.
- Quinlan, R.A., Hatzfeld, M., Franke, W.W., Lustig, A., Schulthess, T., and Engel, J. (1986). Characterization of dimer subunits of intermediate filament proteins. *J. Mol. Biol.* 192, 337-349.
- Raper, K.B. (1935). Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* 50, 135-147.
- Reinhard, M., Halbrugge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B.M., and Walter, U. (1992). The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human

platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J.* 11, 2063-2070.

- Reinhard, M., Jouvenal, K., Tripiet, D., and 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.
- Reinhard, M., Rudiger, M., Jockusch, B.M., and Walter, U. (1996). VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett.* 399, 103-107.
- Renfranz, P.J., and Beckerle, M.C. (2002). Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 88-103.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S., and Pollard, T.D. (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* 294, 1679-1684.
- Rogers, S.L., Wiedemann, U., Stuurman, N., and Vale, R.D. (2003). Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J. Cell Biol.* 162, 1079-1088.
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J.V., and Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat. Cell Biol.* 1, 321-322.
- Rottner, K., Stradal, T.E., and Wehland, J. (2005). Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. *Dev. Cell.* 9, 3-17.
- Saarikangas, J., Zhao, H., and Lappalainen, P. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol. Rev.* 90, 259-289.
- Saga, Y., and 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.
- Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L., and Pellman, D. (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.* 4, 626-631.
- Samarin, S., Romero, S., Kocks, C., Didry, D., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (2003). How VASP enhances actin-based motility. *J. Cell Biol.* 163, 131-142.

- Schafer, D.A., and Cooper, J.A. (1995). Control of actin assembly at filament ends. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 497-518.
- Schenck, A., Bardoni, B., Langmann, C., Harden, N., Mandel, J.L., and Giangrande, A. (2003). CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron* 38, 887-898.
- Schirenbeck, A., Arasada, R., Bretschneider, T., Schleicher, M., and Faix, J. (2005). Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Bioch. Soc. Trans.* 33, 1256-1259.
- Schirenbeck, A., Arasada, R., Bretschneider, T., Stradal, T.E.B., Schleicher, M., and Faix, J. (2006). The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7694-7699.
- Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M., and Faix, J. (2005). The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nature Cell Biol.* 7, 619-U24.
- Schuler, H. (2001). ATPase activity and conformational changes in the regulation of actin. *Biochim. Biophys. Acta* 1549, 137-147.
- Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P., and Suetsugu, S. (2008). IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol.* 18, 52-60.
- Shevchuk, O., Batzilla, C., Hagele, S., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Haas, A., Heuner, K., Glockner, G., and Steinert, M. (2009). Proteomic analysis of Legionella-containing phagosomes isolated from *Dictyostelium*. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 489-508.
- Small, J.V. (1981). Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks. *J. Cell Biol.* 91, 695-705.
- Small, J.V., Auinger, S., Nemethova, M., Koestler, S., Goldie, K.N., Hoenger, A., and Resch, G.P. (2008). Unravelling the structure of the lamellipodium. *J. Microsc.* 231, 479-485.
- Small, J.V., Rinnerthaler, G., and Hinssen, H. (1982). Organization of actin meshworks in cultured cells: the leading edge. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 46 Pt 2, 599-611.

- Small, J.V., Stradal, T., Vignal, E., and Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12, 112-120.
- Snapper, S.B., Takeshima, F., Anton, I., Liu, C.H., Thomas, S.M., Nguyen, D., Dudley, D., Fraser, H., Purich, D., Lopez-Illasaca, M., *et al.* (2001). N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat. Cell Biol.* 3, 897-904.
- Soldati, T. (2003). Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a menage a trois? *Traffic* 4, 358-366.
- Sossey-Alaoui, K., Head, K., Nowak, N., and Cowell, J.K. (2003). Genomic organization and expression profile of the human and mouse WAVE gene family. *Mamm. Genome* 14, 314-322.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J. Cell Biol.* 156, 1051-1063.
- Steffen, A., Faix, J., Resch, G.P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J.V., Rottner, K., and Stradal, T.E.B. (2006). Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol. Biol. Cell* 17, 2581-2591.
- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J., and Stradal, T.E. (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* 23, 749-759.
- Stossel, T.P., and Hartwig, J.H. (1976). Interactions of actin, myosin, and a new actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophages. II. Role in cytoplasmic movement and phagocytosis. *J. Cell Biol.* 68, 602-619.
- Stovold, C.F., Millard, T.H., and Machesky, L.M. (2005). Inclusion of Scar/WAVE3 in a similar complex to Scar/WAVE1 and 2. *BMC Cell Biol.* 6, 11.
- Stradal, T., Courtney, K.D., Rottner, K., Hahne, P., Small, J.V., and Pendergast, A.M. (2001). The Abl interactor proteins localize to sites of actin polymerization at the tips of lamellipodia and filopodia. *Curr. Biol.* 11, 891-895.
- Stradal, T.E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M., and Scita, G. (2004). Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14, 303-311.
- Stradal, T.E., and Scita, G. (2006). Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 4-10.

- Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., and Takenawa, T. (2006a). Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J. Cell Biol.* *173*, 571-585.
- Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T., and Yokoyama, S. (2006b). The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *J. Biol. Chem.* *281*, 35347-35358.
- Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2003). Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev. Cell.* *5*, 595-609.
- Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (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.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M., and Borisy, G.G. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell Biol.* *160*, 409-421.
- Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 37-48.
- Tani, K., Sato, S., Sukezane, T., Kojima, H., Hirose, H., Hanafusa, H., and Shishido, T. (2003). Abl interactor 1 promotes tyrosine 296 phosphorylation of mammalian enabled (Mena) by c-Abl kinase. *J. Biol. Chem.* *278*, 21685-21692.
- Tokuo, H., and Ikebe, M. (2004). Myosin X transports Mena/VASP to the tip of filopodia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *319*, 214-220.
- Tokuo, H., Mabuchi, K., and Ikebe, M. (2007). The motor activity of myosin-X promotes actin fiber convergence at the cell periphery to initiate filopodia formation. *J. Cell Biol.* *179*, 229-238.
- Trichet, L., Sykes, C., and Plastino, J. (2008). Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP. *J. Cell Biol.* *181*, 19-25.
- Tuxworth, R.I., Stephens, S., Ryan, Z.C., and Titus, M.A. (2005). Identification of a myosin VII-Talin complex. *J. Biol. Chem.* *280*, 26557-26564.

- Tuxworth, R.I., Weber, I., Wessels, D., Addicks, G.C., Soll, D.R., Gerisch, G., and Titus, M.A. (2001). A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr. Biol.* *11*, 318-329.
- Urban, E., Jacob, S., Nemethova, M., Resch, G.P., and Small, J.V. (2010). Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. *Nat. Cell Biol.* *12*, 429-435.
- van Haastert, P.J., Keizer-Gunnink, I., and Kortholt, A. (2007). Essential role of PI3-kinase and phospholipase A2 in Dictyostelium discoideum chemotaxis. *J. Cell Biol.* *177*, 809-816.
- van Haastert, P.J., and Veltman, D.M. (2007). Chemotaxis: navigating by multiple signaling pathways. *Sci. STKE* *2007*, pe40.
- Vignjevic, D., Kojima, S., Aratyn, Y., Danciu, O., Svitkina, T., and Borisy, G.G. (2006). Role of fascin in filopodial protrusion. *J. Cell Biol.* *174*, 863-875.
- Watanabe, T.M., Tokuo, H., Gonda, K., Higuchi, H., and Ikebe, M. (2010). Myosin-X induces filopodia by multiple elongation mechanism. *J. Biol. Chem.*
- Weber, I., Niewohner, J., and Faix, J. (1999). Cytoskeletal protein mutations and cell motility in Dictyostelium. *Biochem. Soc. Symp.* *65*, 245-265.
- Weber, K.L., Sokac, A.M., Berg, J.S., Cheney, R.E., and Bement, W.M. (2004). A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly. *Nature* *431*, 325-329.
- Welch, M.D., Iwamatsu, A., and Mitchison, T.J. (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of Listeria monocytogenes. *Nature* *385*, 265-269.
- Welch, M.D., and Mullins, R.D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *18*, 247-288.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A., and Mitchison, T.J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the Listeria monocytogenes ActA protein in actin filament nucleation. *Science* *281*, 105-108.
- Williams, K.L., and Newell, P.C. (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mould Dictyostelium discoideum using complementation analysis. *Genetics* *82*, 287-307.
- Witke, W., Hofmann, A., Koppel, B., Schleicher, M., and Noegel, A.A. (1993). The Ca²⁺-binding domains in non-muscle type alpha-actinin - biochemical and genetic analysis. *J. Cell Biol.* *121*, 599-606.

- Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S., Fujiwara, T., Yoshida, N., and Takenawa, T. (2003). WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature* 424, 452-456.
- Yan, C., Martinez-Quiles, N., Eden, S., Shibata, T., Takeshima, F., Shinkura, R., Fujiwara, Y., Bronson, R., Snapper, S.B., Kirschner, M.W., *et al.* (2003). WAVE2 deficiency reveals distinct roles in embryogenesis and Rac-mediated actin-based motility. *EMBO J.* 22, 3602-3612.
- Yang, C., Czech, L., Gerboth, S., Kojima, S., Scita, G., and Svitkina, T. (2007). Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells. *PLoS Biol.* 5, e317.
- Yoo, S.K., Deng, Q., Cavnar, P.J., Wu, Y.I., Hahn, K.M., and Huttenlocher, A. (2010). Differential regulation of protrusion and polarity by PI3K during neutrophil motility in live zebrafish. *Dev. Cell.* 18, 226-236.
- Yoshida, K., and Soldati, T. (2006). Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J. Cell Sci.* 119, 3833-3844.
- Zhang, H., Berg, J.S., Li, Z., Wang, Y., Lang, P., Sousa, A.D., Bhaskar, A., Cheney, R.E., and Stromblad, S. (2004). Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 6, 523-531.
- Zigmond, S.H. (1989). Cell locomotion and chemotaxis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 80-86.

6 Aminosäuresequenzen der untersuchten Proteine

6.1 AbiA

```

1  MSESIDINVY SQTTPNAMA ELMDNHNKME QISAYCKSLY ANGDAAQAYE
51  QTQGYAKNAL LNVAYHIQTV GTHITSLQL QTNEMEKLNI EIQTLTQVRV
101 MIHDSTGTNV FSNQDAAKPY KSSLKNRKVD TEATKAPVKY VHKPISYGIS
151 ASDINQNGVP PPLNHSNSSA NLTSSSGHLA ASSTSNSSTP SYQSPSYSSQ
201 PTISSGTPPP IQKQPPRVGN APPPPSLVSP AAPPVVMMNV PPPPPTSQRP
251 SSVNNNAPSN DFPPPPPPSS SSSGGDLPPP PSFGLPPPPT LGDDFPPPPP
301 PPGVSYDFPP PPARPQSQFY DHNDFPPPPP PM

```

6.2 hAbi1

```

1  MAELQMLLEE EIPSGKRALI ESYQNLTRVA DYCENNYIQA TDKRKALEET
51  KAYTTQSLAS VAYQINALAN NVLQLLDIQA SQLRRMESSI NHISQTVDIH
101 KEKVARREIG ILTTNKNTSR THKIIAPANM ERPVRYIRKP IDYTVLDDVG
151 HGVKWLKAKH GNNQPARTGT LSRTNPPTQK PPSPPMSGRG TLGRNTPYKT
201 LEPVKPPTVP NDYMTSPARL GSQHSPGRTA SLNQRPRTHS GSSGGSGSRE
251 NSGSSSIGIP IAVPTSPPT IGPAAPGSAP GSQYGTMTRO ISRHNSTTSS
301 TSSGGYRRTF SVTAQFSAQP HVNGGPLYSQ NSISIAPPPP PMPQLTPQIP
351 LTGFVARVQE NIADSPTPPP PPPDDIPMF DDSPPPPPPP PVDYEDEEAA
401 VVQYNDPYAD GDPAWAPKNY IEKVVAIYDY TKDKDDELSF MEGAIIVYIK
451 KNDDGWYEGV CNRVTGLFPG NYVESIMHYT D

```

6.3 DdHSPC300

```

1  MSTKTNIQKD WEQREFIEDM SINIQKIVEF LNKFELSTRN KLSDLNEKLT
51  ILDRQVDYLE ATFKTVQE

```

6.4 Nap1

```

1  MAHTNLPEKF QVVIENGENI LQRVYNTYKL FQNNKVKPSF FNDEKISKIL
51  KNLIAKYPEL PENNDKSITG FDLLTSRAKQ HLEELEDHYY TITDAYDWKE
101 ASFILMQEIS SNTVSINFNN NIQLCSKFLD VLVLYGKINY LVSLIPDKKI
151 ITAVYAKLFL YTRSASEPTF SKMGRWINDI EQPFKKIQEE FRVLNDAVGH
201 ALSSFELTYA KRRVITQLRK DGALNLILKP EDIARPVQDS YRIELAYAGR
251 IQQWILFGYL FAPGTLSTPQ SIELLRFTLS ECFYLSVFKD ISISIHNEFN
301 TLFKNYKSKT INLQKQKKII KDAQAQASTQE APRKHAERRV YIRQELEAMW
351 NLFRDKPCLL APKINVLLAA LSMAKEEIFW YFRHTDVIPP EKVKKFYNKQ
401 NEVREKRIS LSLVDHLVQ LVHTHKKMIQ NYYLEYISGA DILGLQKVIT
451 PQLLQNAGSI VTQAVNTIVN ELKSLNANGQ DYSFEGFRAN WMRLGYLLQS
501 NSCPLKESES KQITSRLNLI YTHSKNVDCL DQLLDEYGNM TQLWSYKEPL

```

551 FHSFDAAIVD MTCDDQPSHSM IYLKLLSQFP NHVANQFYPE EKELIGKECV
 601 ELANSCLTKI TNRIVSIMAN TIASTFLSDE QQLADVNAAF PLLQKKKDWK
 651 PPKDFVPPIE PASESQFRNR ANLEQLRSEE KNAFQLCTAL NEFLDITIYD
 701 HIFVPREFLR EKLGSALKQY MRQSIQPPAP TSSSSQIDIN ITRLSTYESQ
 751 LRVFIGVLIL VENHVDIDIG DLIRETILTE FYAKALGKSG RVDWFPEGEI
 801 EMNELTLHSI TSYVVDLVSK KLNTPGVVFS PVKLGFIKA GTPFRAEEHA
 851 DLTEMRALCD LVGPYGIKVI EREILRFILT TTTSMKEILS LNAANLEEFA
 901 SNYYKPKAME LLKKFKTTDL DLIVTKSIAI GNALHLRSMI RESMKDVITD
 951 NFPYINNAVA NAFDQYNRNT FMFPDFLGVD TLALDSGLNV GIADQYLKVI
 1001 LRKVSSEADK RIWELLPVMF SLTFYGNLWK ETQYKATIDA HSNNVHVLK
 1051 TIIDLIAFG AINSTTGNEA ELFQSFKRFL EISSVNILRM FKGKQGEKRV
 1101 PNEIQSVIIF LDKFTQQCPL LSKDSLEQYI PYSLIRNMYK DLYEHKNLQK
 1151 QQSETSEQNF

6.5 PirA

1 MSVDPKQSKI ADVFERCDVL ESFPFHDDQS EIEEQSPSIG YDAYDKSLNY
 51 TDRGAYETQW SEETIGMEKM EEVLKQGDSF INMVYTYRSC SKALPTVKTA
 101 EQVNTQIYE GNFEVLEPEI KKLKDFMYFQ KDTIKLFCDH IKKLASTYDK
 151 KKETISASES FINYLVRILD LLAILDALKN MKACLNNDFS FFKRATGFLR
 201 KQMSGTEDQT QENHTLYLFL ANQNSITSSL KLELHNIDKF DDILPMIVNQ
 251 CADYLEQEKY ILPSEKHCLL RVMPFVLFLLI DENDSKHNIN KNKNLNISRY
 301 AKIFKKNPVV PLYGDMQITL ESLVKRSPHF DEKAWGTSTL DSKSALDYEI
 351 IHVLDQTRSL YNEYMARFAN MVNEIRAAKA RGPKEPLPLA ESDIQAITLM
 401 GLRILSDWTS RVLQQSAWKY SKPNDPTIS ATFDYERVVK FNYTKEERTA
 451 LVQLIAMIKS LASLMMKSET LLQPILRKTII HQELQEFVQI NLKETIKSFV
 501 KNNPKKKDNI KLEMSQLKNI SVDWFSGFEP AEAVPNKSKS EVEEKVQIPA
 551 RAVPPSPTQL ELILTLVSSL MDKKKDFSSD QYRDFEAFSS KAFFYRYLLS
 601 LSSSIISITD LADLWYREFY LELNNRVQFP IETSLPWILT DHILESDDPS
 651 LIEHLFYPLG LYNDTAQRAL LSLNQRFLYD EIEAELNLCF DQLLYKLSGK
 701 VYTHFKTQAS SILLDKPYKT QLELAHFNGK LHTPKSRFDV LLRQKHITLL
 751 GRSIDLCGLL AQRQNNTIRQ NLDYAISRFE ACDLTSIVEL ETQIANIKLT
 801 HKLLSEYFDI DPFESIFNEI NESTSLVSYH GRIVLHIIFE LVADFAPNYT
 851 FNSITQRFIK APYTFTEELK RDALPKTNPV FLFGNKYLNA AYANSIELYK
 901 NFIGVPHIQS ILRIVGKKNL PLIVAEVLRN IEIKITNVLS PYVSELLQGM
 951 PASTKLPIYD YGTEGGYGYF QLKLDIYIY PDLRPEVLQT FRELGNSLVF
 1001 MNLLDQVITQ TDSYNFAKAA PFLGITPETW KDLEPSTEDP TLQSPLYSQL
 1051 QKLAQLLESR PEVAKSSQSL NDMVANAWRA DKFYRPEQN FSLFKSVLQR
 1101 FSSILNIVRH DWSGAPPDNG VICVDSSTEF YRLWSALQFV ICWPLSNEND
 1151 KSFHELFGDG LMWAGCSLIH FLGQQYRFEL FDFCYHILNV EEAAAVRSDK
 1201 PALKNFFKNA QIIKDINNQI FSILNTYCPP PPPSNMILSP PATEQAEQFI
 1251 VTTTVEEQSI QQQQQQQQQQ QLQQSTNSG SLSLSAAGA PPPPPPSTN
 1301 GLPPPPMAE YEMSSSIDDF APPPPPPFGM PPPPPM

6.6 Scar

1 MVLITRYLPS VTDNNQPALE GQSKDQIVDT VITSTTVGII NQLTMLVAHS
 51 NSIFTALAND ANLVTQRIEK LGSRIRPLIQ SIPSIEDYHR NTSIDTMNSK
 101 PRAEFHADNS ERNQHFTHAS IPASINTVYE KCKPPPNLQL LDPYMDDGQK
 151 SLKLYTNPDP FMDEWVAEQQ KLHEEARQRK RERREARLKK KGEKNEVEVK
 201 KVKSVTKVRY DPVTGEKITI NIESPHTSSP QIQHQSNNTA TPQHTTQHFG
 251 TNQYQAPPPP PLSQSSPSQQ HSPINSYTPP PPPLNTSTPS PSSSFQGRPP
 301 STGFNTPPPP MSNNNMPPP PPMQONGGAA NNRLSVHNSA PIVAAPAPP
 351 PPPPSAPAP PPPPMKAGG GASDIKPKAS GARSDDLSSI MQGMALKPAE
 401 ERKVAEAPKK EEALNVADIL ARRIAWAGDS DSSEDESDDS DWD

6.7 DdVASP

1 MSETAIFNAT GQVFTYSPQT RNWVPSSNVP ATLQMYFNNG ANTYRVIGRA
 51 GDDPNNFLIN FAVKSEVVYS RASEIFHQFT DQRTDFGINF TSKQDADTFG
 101 GGFENVLRSL KGGPQQPPPQ VPKPQQQPP QPQQPPQRPP STVIAKPVAP
 151 QAPVAPPQAP AAAPQAPAPP AAPPAPPKPP GPPPPPPAPK PPAAGGGTGR
 201 NALLGSIENF SKGGLKKTVT VDKSAGVPTK TTPSANSAAAS NAGSEPSSGG
 251 STPAPAPKSS GGGGGDLMA EVMKRAKMK AAASQPKEES SAPTPAPTPA
 301 PTPAPTPSST SFKPPQSFSSK PATKTAAANK PPSPLSAPL PSTVANEDLQ
 351 SLKEEILTEV RKEIQKAKDE ILEAIRASQH

6.8 mVASP

1 MSETVICSSR ATVMLYDDSN KRWLPAAGTGP QAFSRVQIYH NPTANSFRVV
 51 GRKMOPDQQV VINCAIRGV KYNQATPIFH QWRDARQVWG LNFGSKEDAI
 101 QFATGMANAL EALEGGGPPP APAPPAWSAQ NGPSPEELEQ QKRQPEHMER
 151 RVSNAGGPPA PPAGGPPPPP GPPPPPGPPP PPGLPSSGVS GAGHGAGAAP
 201 PPAPPLPTAQ GPNSGGSGAP GLAAAIAAGAK LRKVSQEEA SGGPLAPKAE
 251 NSRSTGGGLM EEMNAMLARR RKATQVGEKP PKDESASEES EARLPAQSEP
 301 VRRPWEKNST TLPRMKSSSS VTTSEAHPST PCSSDDSDLE RVKQELLEEV
 351 RKELQKMKEE IIEVFVQELR KRGSP

6.9 hVASP

1 MSETVICSSR ATVMLYDDGN KRWLPAAGTGP QAFSRVQIYH NPTANSFRVV
 51 GRKMOPDQQV VINCAIVRGV KYNQATPNFH QWRDARQVWG LNFGSKEDAA
 101 QFAAGMASAL EALEGGGPPP PPALPTWSVP NGPSPEEVEQ QKRQQPGPSE
 151 HIERRVSNAG GPPAPPAGGP PPPPGPPPPP GPPPPPGPLPP SGVPAAAHGA
 201 GGGPPPAPPL PAAQPGGGG AGAPGLAAAI AGAKLRKVSQ QEEASGGPTA
 251 PKAESGRSGG GGLMEEMNAM LARRRKATQV GEKTPKDESA NQEEPEARVP
 301 AQSESRRPW EKNSTTLPRM KSSSSVTTSE TQPCTPSSSD YSDLQRVKQE
 351 LLEEVKKELO KVKEEIEAF VQELRKRKSP

6.10 DdIRSp53/MIM

```

1   MSNAKKQQNP VIEITLKTIN NLKVNSPPLF TEVIKAANKY QQQAQALSQA
51  GLVLADTLTR LTIHNGGDFG EGFKKLADAI KDLENRRDDV AKVLLNEFIT
101 PNKQAIEDDQ KAIATFEKNY KKDRDQMRQD ILKLEAKTRK AGKKTTPPEVL
151 KQQITELNDK IKESEQLNAN KLRDVVLMER RKHATFLSQF NQFLEKEIEL
201 SADTMSKFST NLNTHRDIXIN SQSQLPLEME SMISKQERTL VQIQPQGDG
251 SDAYRISYAP GTIQTTGGGD QYYESYESYD NYDNYDNYDD GSGGGLGGSE
301 LQARALYDYE SAEPSDLNLK AGDIISVIQQ DDGSGWTKGR NYEGNEGIFP
351 STYIEYV

```

6.11 DdMyosin VII

```

1   MEDDDTLNGE YFQPVEDMIT LPILTEESLL LNLKMRYKKK EIYTYTGSIL
51  VAVNPYEILP IYTADIVKSY FAKSRNLMLP HIFAVSDAAF TNMIEEGKNQ
101 SIIISGESGA GKTESTKLII QYLAARTNRH SQVEQMIVES SPILEAFGNA
151 KTIRNNSSR FGKFIEIQFN REGHISGARI INYLLEKSRI SHQASSERNY
201 HIFYQLLAGA SDELKEKLLK GEPEDYHYLS QSGCIRIENI NDVEDFEHVK
251 YAMNVLGLPE DKQFTIFSIV SAVLHIGNLK FEKSEKTQGA EGSEVSNKDT
301 LKIIAQLLSV DPVKLETCLT IRHVLIRGQN FVIPLKVNEA EDTRDSLAKA
351 LYGNVFNWL V FINSKIHKP QKNSTFIGVL DIFGFENFKK NSFQFCINF
401 ANEKLQQHFN QHIFKLEQEE YEKEKINWSK IVYNDNQECL DLIEKRPLGI
451 LSLLEESRF PQATDLTYLD KLHTNHEKHP YYEKPRRSKN TFVVKHYAGE
501 VHYDTQGFLD KNKDTVSDDL SSSLQGSKSK FIIELFTPPR EEGDDSDKGR
551 EKKKTTAGQT FKTQLQSLIN ILSSTQPHYV RCIKPNTTKE PAVYDRELIQ
601 AQLRYAGMME TIRIRKLGYP IRHTHKEFRD RYLILDYRAR STDHKQTCAG
651 LINLLSGTGG LERDEWQLGN TKVFIRDHGY LKLEELRKLK LLKKVTLIQS
701 VWRMYRCKKR YQQIRASAKI LGAAMLSSHSS RRDFQEQRQA VQRIKGGFFKM
751 LTYQKQFKII QINLRIVQNN IRSFIARRHS RNAVLLKRDR NARMLEIQRE
801 KDEEERNRQE KEERDRQEKE DKEKETADDR QLQEEQKRRE EELRAKREEE
851 ELKKLEEKKS QLKELNQIDE LSSLERMLKE QQDKNINELD DFNVSLEAFS
901 FEGGVDDSQP YSFNHKMYEM SPEALDKISI TDLLQGLKQT VRSVTKFEVD
951 ESKFELPPGI ENVLKRAPGI KRQASSFLPG QPIPDVYSSP QYPVDEADDD
1001 DSNNNYINSN NGDLPLPTSQ SSDFSLPPP SSSSMDFGLP PPPPSSSSGG
1051 TYSLPPMPVF DFGMIDPILG APPPPPSTSD STSPSATATG NNTPNSSSAS
1101 ASQSTNQVNP QPTVSVVELP QILNDEEISL YSFYDYANKN FNIEKCLKQD
1151 DIFSYQKSHI KSSLLVHSDA EQTKVAVEIF SKVLHYMNSN PLVSKKDPAD
1201 FYSPVKFILT KGLAIESLRD EIYCQLIKQS TSNPIQDLNI RVWELIHFTC
1251 STFPPTRCLI KYFAAYLKTT IQQSDVSKSV KDSAQASYFI LQRFTLNGAR
1301 KQVPSVTELE SIKENRPIFV RITATDGSLK GLHIDSATTC QESSNDLSQR
1351 SRMRVNSKEN GFTIIESFNG IERDIAPTDK LCDVLSKVEN LQATLSSKIQ
1401 VNFKVFVKKK LFFDNITNNV PTTINVENE FYYHQLFNDL FNSNYCKDQD
1451 YQISIGSLKL QFESSDYTDE IRAWLPGNGR GKYFTTDIEK NRFDDFINKY

```

1501 KSHKGLSPED AKKQMVQLLE KHPLANCSLV VCEHQSESLEP YPKNFVLALN
1551 VNGINIYDPA TSKMLESVKY SNQSQQNLKS DDKSVSIILE NKSTLQAFTG
1601 DVQKLVSLIK EYSLYLRNNA KYARALKDYN VSDTSLLPFK RNDIITITFK
1651 DQENKWFMGQ LNGKEGSFPV DHVEILLSDV PPPQPVHPVA TLSPPMSPTI
1701 PNITNTPPPP PSISDSMSPP PQVGMLPPPP PPSVMGSTKP IEIPSLGIPP
1751 PPPSSSNSSV PNSPIGSPMM GIPPPPPTIS VHSLNSNGNS TPPPPLPSLS
1801 TPPTLSTPPP ISSPPNFRSS LRVSMNNTSN DGGDNSSDDP SKRLTVSPAI
1851 GTDSQLAQWA STRFRSFKRA STLNQQAATL KRKAPVDPNT AFYFNKDPIK
1901 ESLIEMEAKL SKKAIKNFSE IMMWMGDYPI PKGQTASLVI QSIISRGIEN
1951 HELRDEIYCQ AYRQTNKNPK VESAKKGFEL IYFLSITFSP SDSLLQPFME
2001 QLMSRNIAIQ SSSPQLASLI AVCIEKLESH PIPSYQQRKM GPSATEIQSF
2051 RSNLENGDIS TCKIRFIDQS TKLAKINTYT TIREITDTVC RQYGISQQSI
2101 KMFGISAVNE TAGISKVVSE TDMIYDVLAR WEQSEEKGEF YFQVRRRFFL
2151 DDVNKILDQE HLWTDDDICF ELTYCQIRDE WMKGLYTNVN EKDSSIIAAI
2201 LIQLLYPNQS KLVLTKEVVR QVLPDQILNS QNIKVVWISMI ESQIFELVSQ
2251 TPEYLKLMFI NLIGSKSPLF GCTLFNIQOK ENPPKAWLAI NKKGVSIFDP
2301 HTKESKNEWT FQISISNVAFT DDTFCIMTGN LMKPIKQTFE TDEHSSIASV
2351 YQFYSSQ

Publikationen:

- Steffen A, Faix J, Resch GP, **Linkner J**, Wehland J, Small JV, Rottner K, Stradal TE. **Filopodia Formation in the Absence of Functional WAVE- and Arp2/3-Complexes.** Mol Biol Cell. 2006 Jun;17(6):2581-91. Epub 2006 Apr 5
- Breitsprecher D, Kieseewetter AK, **Linkner J**, Urbanke C, Resch GP, Small JV, Faix J. **Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation.** EMBO J. 2008 Nov 19;27(22):2943-54. Epub 2008 Oct 16
- Breitsprecher D, Kieseewetter AK, **Linkner J**, Faix J. **Analysis of actin assembly by in vitro TIRF microscopy.** Methods Mol Biol. 2009;571:401-15.

Poster:

- J. Faix, A. Steffen, A. Schirenbeck, R. Arasada, **J. Linkner**, M. Schleicher, K. Rottner, T. Stradal
Dissection of Filopodium Formation in Dictyostelium and Mammalian Cells.
The American Society for Cell Biology; 46th annual meeting
- **Joern Linkner**, Guenter P. Resch, J. Victor Small, Claus Urbanke, Jan Faix,
Profilin-binding properties and structure of murine VASP determined by electron microscopy and analytical ultracentrifugation.
16th International Symposium Analytical Ultraentrifugation March 1st and 2nd, 2007
- J. Faix, D. Breitsprecher, A. K. Kieseewetter, **J. Linkner**, C. Urbanke, G. P. Resch, J. V. Small
Clustering of VASP Actively Promotes Processive, WH2 Domain-Mediated Actin Filament Elongation.
The American Society for Cell Biology; 48th annual meeting
- **J. Linkner**, A. Akhdar, J. Faix
Elimination of the single I-BAR domain protein DdMIM in Dictyostelium affects growth and cell morphology but is not required for filopodia formation.
The American Society for Cell Biology; 49th annual meeting

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen:

Mein besonderer Dank Prof. Dr. Dietmar Manstein für die nette Aufnahme in sein Institut und die Bereitstellung neuester Geräte und Methodik, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Jan „Hans“ Faix für die vertrauensvolle Bereitstellung dieses überaus interessanten Themas, sowie für seine engagierte, kompetente, ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und das kritische Lesen dieser Arbeit. Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Theresia Stradal und Prof. Dr. Klemens Rottner für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe, hier möchte ich mich besonders bei Antje Kiesewetter, Annette Breskott und Dennis Breitsprecher bedanken, die durch ihre stete Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreudigkeit für eine nette Arbeitsatmosphäre sorgten.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, welche mir diese Ausbildung ermöglicht haben.