

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Claudia Kistler
aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Funktionelle Charakterisierung
von Myosin IK
in *Dictyostelium discoideum*

Gutachter: Prof. Dr. Kenneth C. Holmes

Prof. Dr. Ingrid Haas

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	01
2	Einleitung	03
2.1	Die Familie der Myosine und ihre vielfältigen Funktionen	03
2.2	<i>D. discoideum</i> als Modellorganismus in der Zellbiologie	06
2.3	Die modulare Struktur von Myosinen	08
2.4	Die Actin-Polymerisation.....	09
2.5	Der Arp2/3 Komplex	10
2.6	Profilin	11
2.7	Myosine der Klasse I	12
2.8	Endocytose und das Actin-Cytoskelett	13
2.9	Phagocytose und das Actin-Cytoskelett.....	14
2.10	Myosin K, das exotische Mitglied der Klasse I Myosine	16
2.11	Zielsetzung	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.1.1	Chemikalien	18
3.1.2	Proteinase - Inhibitoren	19
3.1.3	Enzyme	19
3.1.4	Seren und Antikörper	20
3.1.5	Antibiotika	21
3.1.6	Vektoren	21
3.1.7	Bakterienstämme	21
3.1.8	Eukaryontische Zelllinien.....	21
3.2	Allgemein verwendete Puffer, Lösungen und Medien	22
3.2.1	Puffer und Lösungen	22

3.2.2	Medien für die Bakterien- und Zellkultur.....	23
3.3	Gentechnische Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	24
3.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	24
3.3.2	Herstellung elektroporationskompetenter Zellen.....	24
3.3.3	Transformation durch Elektroporation.....	24
3.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA	25
3.4	Präparative und analytische Methoden für Nukleinsäuren	26
3.4.1	Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung von DNA.....	26
3.4.2	Aufreinigung synthetischer Oligonukleotide.....	26
3.4.3	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	26
3.4.4	Amplifizierung von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion	27
3.4.5	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	28
3.4.6	Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	28
3.4.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	28
3.4.8	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	29
3.4.9	Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	29
3.4.10	Ligation.....	29
3.4.11	Der „Blau/Weiß-Test“ zur Identifizierung rekombinanter Plasmide	30
3.4.12	Sequenzanalyse von DNA.....	30
3.5	Zellbiologische Methoden.....	31
3.5.1	Kultur und Ernte von <i>D. discoideum</i>	31
3.5.2	Konservierung von <i>D. discoideum</i> Stämmen.....	31
3.5.2.1	Konservierung von Zellen	31
3.5.2.2	Konservierung von Sporen.....	31
3.5.3	Transformation und Selektion.....	32
3.5.4	Vereinzelung von Transformanden.....	32
3.5.5	Mikroskopische Techniken.....	33
3.5.5.1	Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz.....	33
3.5.5.2	Elektronenmikroskopie: Dekoration von Actin-Filamenten	33
3.5.6	Triton unlösliches „rigor“ Cytoskelett.....	34
3.5.7	Fraktionierung von <i>D. discoideum</i> Zellen in Cytosol und Membranen	34

3.6	Proteinchemische Methoden	35
3.6.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	35
3.6.2	Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen.....	36
3.6.3	Proteintransfer und Immunfärbung auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot).....	36
3.6.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese	36
3.6.5	Herstellung von Zellextrakten.....	38
3.6.5.1	Herstellung von Zellextrakten für die 2D-Gelelektrophorese	38
3.6.5.2	Herstellung von Zellextrakten für Western blotting	38
3.6.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	38
3.6.7	TCA (Trichloressigsäure)-Fällung	38
3.6.8	Pulldown-Experiment	39
3.6.9	Protein-Bindungsassays	39
3.7	Methoden zur Proteinaufreinigung	40
3.7.1	Präparation von Actin aus Acetonpuder (modifiziert nach Spudich).....	40
3.7.2	Aufreinigung von MyoK	40
3.7.2.1	Analytische Reinigung von MyoK aus <i>D. discoideum</i>	40
3.7.2.2	Präparative Reinigung von MyoK aus <i>D. discoideum</i>	41
3.7.3	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>E. coli</i>	42
3.7.3.1	GPR-Loop (Glutathion-S-Transferase-Markierung).....	42
3.7.3.2	Profilin.....	43
3.7.3.3	Abp1 (GST-Fusionsprotein) und PRD (prolinreiche Domäne) aus WASp (GST-Fusionsprotein)	44
3.8	Immunologische Methoden.....	44
3.8.1	Herstellung polyklonaler Antikörper.....	45
3.8.1.1	Antikörper gegen <i>D. discoideum</i> Abp1	45
3.8.1.2	Antikörper gegen die prolinreiche Domäne aus <i>D. discoideum</i> WASp.....	46

4	Ergebnisse	47
4.1	Charakterisierung der MyoK Sequenz und MyoK Mutanten	47
4.2	Charakterisierung der Funktion von MyoK	50
4.2.1	Die intrazelluläre Lokalisation von MyoK	50
4.2.2	Subzelluläre Verteilung von endogenem MyoK	51
4.2.3	Herstellung stabil exprimierender MyoK-CLIQ Zellen	52
4.2.4	Der Carboxyterminus von MyoK enthält ein Signal für Protein-Prenylierung	55
4.2.5	MyoK wird wahrscheinlich über Phosphorylierung reguliert	57
4.2.6	MyoK bindet reversibel an F-Actin	59
4.2.7	Funktioniert MyoK als Motor?	60
4.2.8	Reinigung von MyoK aus <i>D. discoideum</i> im analytischen Maßstab	60
4.2.9	Versuch einer "präoperativen" Isolierung von MyoK aus <i>D. discoideum</i>	61
4.3	Charakterisierung der Funktion des GPR-Loop	64
4.3.1	Der GPR-Loop hat eine potentielle sekundäre Actin-Bindestelle	64
4.3.2	Reinigung von rekombinanten GPR-Loop aus <i>E. coli</i>	64
4.3.3	Der GPR-Loop bindet an F-Actin	66
4.3.4	Elektronenmikroskopische Untersuchung der F-Actin Bindung	69
4.3.5	Intrazelluläre Lokalisation des GPR-Loops	71
4.4	Bindungspartner des GPR-Loop	73
4.4.1	Das Profil der MyoK Expression deckt sich mit dem Expressionsmuster von Profilin II	73
4.4.2	Der GPR-Loop bindet <i>in vivo</i> an Profilin	74
4.4.3	Der GPR-Loop bindet nicht über die Prolinreihe an Profilin	75
4.4.4	Ein kurzes prolinreiches Motiv scheint für die Profilin-Bindung verantwortlich zu sein	77
4.4.5	Der GPR-Loop bindet <i>in vitro</i> direkt an Profilin II	78
4.4.6	Die prolinreiche Domäne von WASp aus <i>D. discoideum</i> bindet <i>in vitro</i> nicht an Profilin II	79
4.4.7	Der GPR-Loop enthält ein klassisches SH3-Bindemotiv	80
4.4.8	Der GPR-Loop bindet direkt an <i>D. discoideum</i> Abp1	83
4.4.9	Arp3 aus einem cytosolischen Extrakt bindet an den GPR-Loop	85
4.4.10	<i>D. discoideum</i> Dynamin A interagiert <i>in vitro</i> mit <i>D. discoideum</i> Abp1	85

5	Diskussion	87
5.1	MyoK als Manager des Actin-Cortex	87
5.2	Mögliche Regulationsmechanismen für MyoK.....	90
5.3	MyoK als Actin-Quervernetzer	93
5.4	Bindungspartner von MyoK.....	95
5.4.1	MyoK bindet an Profilin aus <i>D.discoideum</i>	96
5.4.2	MyoK interagiert mit Abp1 (<u>A</u> ctin <u>b</u> inding <u>p</u> rotein <u>1</u>) aus <i>D.discoideum</i>	98
5.5	MyoK als Mitglied eines Multi-Protein-Komplex, der die Polymerisation von Actin fördert	99
5.6	MyoK- ein Ausblick	101
6	Literatur	103
7	Anhang	117
7.1	Oligodesoxyribonucleotide (Primer)	117
7.2	Die cDNA-Sequenz von MyoK.....	118
7.3	Abkürzungsverzeichnis	119

Danksagung

1. Zusammenfassung

Das Actin-Cytoskelett eukaryontischer Zellen ist ein dynamisches System. Es ist wichtig für den Aufbau und Erhalt der Zellmorphologie, für die Bewegung von Zellen, für Zell-Zellkontakte und unerlässlich für intrazelluläre Transportprozesse. Eine Vielzahl Actin-bindender Proteine regulieren die Dynamik der jeweils benötigten Actin-Strukturen. Dazu zählen auch Myosine, die Actin-abhängigen Motorproteine, die durch Hydrolyse von ATP gerichtete Bewegung erzeugen.

Die hochbewegliche Amöbe *D. discoideum* exprimiert 12 verschiedene Myosin-Isoformen, von denen sieben der Klasse I angehören. Myosin IK, ein Mitglied dieser Klasse, hat eine außergewöhnliche Struktur. Es besitzt nicht die modulare Struktur aus Motor-, Hals- und Schwanzdomäne, sondern zeichnet sich durch eine überdimensionale Motordomäne und sehr kurzen Halsregion aus. Die Schwanzdomäne fehlt offensichtlich ganz. Bisherige Studien belegten die Beteiligung von MyoK bei der Phagocytose, Motilität und dem Aufbau bzw. Erhalt der Cortexspannung.

In vivo Studien von endogenem MyoK während des Entwicklungszyklus zeigten, daß in den mobilen Phasen ca. 10% des Proteins an Membranen assoziiert, die restlichen 90% cytosolisch vorliegen. Immunfluoreszenzen bestätigten eine Assoziation von MyoK nur an bestimmten Regionen der Plasmamembran. Diese Regionen befanden sich häufig in der Frontlamelle oder an phagocytotischen Bechern, eben dort, wo ein dynamisches Actin-Cytoskelett wichtig ist. Der absolute Carboxyterminus enthält ein Signal zur Protein-Prenylierung (CaaX Box), wodurch MyoK über einen Farnesylanker theoretisch in jede Membran inseriert werden kann. Eine GFP-Fusion mit dem Carboxyterminus von MyoK lokalisierte jedoch gleichmäßig an der gesamten Plasmamembran, so daß von einer strengen Regulation des endogenen MyoK auszugehen ist. Vorläufige Ergebnisse aus einer 2D Gelelektrophorese mit Extrakten von MyoK überexprimierenden Zellen legen eine Regulation durch Phosphorylierung nahe.

Innerhalb der Motordomäne in der Region der Oberflächenschleife 1 (Loop 1) befindet sich eine etwa 150 Aminosäuren lange Insertion (GPR-Loop). Diese enthält einen hohen Anteil an den Aminosäuren Prolin (P), Glycin (G) und Arginin (R) und weist hohe Homologie zu einer ATP-unabhängigen Actin-bindenden Subdomäne auf, die in der Schwanzdomäne anderer Myosine I zu finden ist. Trotz dieser Insertion verhält sich MyoK wie ein klassisches Myosin, in dem es in ATP-abhängiger Weise an F-Actin bindet. Allerdings ist die Freisetzung von Actin nicht nur von ATP, sondern auch von der Salzkonzentration abhängig. Der in *E. coli* exprimierte und biochemisch gereinigte GPR-Loop zeigte eine salzabhängige Actin-Bindung *in vitro*. Die Existenz dieser beiden Actin-Bindestellen innerhalb der Motordomäne könnte MyoK eine Funktion als neue Art von Actin-Kreuzvernetzer zusprechen.

Der GPR-Loop enthält poly-Prolin Motive (ZPPX) und ein klassisches SH3 Bindungsmotiv. Zur Untersuchung einer möglichen Bindung an weitere Proteine wurden Interaktionsstudien des GST-GPR-Loops mit zellulären Extrakten durchgeführt. Die gefundene *in vivo* Assoziation zwischen GPR-Loop und Profilactin (Profilin-Actin-Komplex) wurde *in vitro* direkt als Bindung über Profilin bestätigt. Die Ansequenzierung weiterer Liganden führte zu der Identifizierung von *D. discoideum* Abp1, einem Actin-bindenden Protein, das bisher nur in *S. cerevisiae* und *M. musculus* beschrieben ist. Für diese *in vivo* bestehende Interaktion wurde mit einem Overlay-Experiment bestätigt, daß sie direkt ist. Damit eröffnete sich eine neue Sichtweise bezüglich der zellulären Funktion von MyoK. Abp1 gilt als Aktivator des Arp2/3 Komplex, durch den beschleunigte Actin-Nukleation stattfindet. Damit scheint MyoK nicht nur eine mechanische Rolle innerhalb des Actin-Cortex zu spielen, sondern kann als Regulator die Actin-Polymerisation in dynamischen Regionen aktiv beeinflussen. Diese Hypothese wird durch die Detektion von Arp3 in dem GPR-Loop Proteinkomplex aus der Bindungsstudie gestärkt.

2. Einleitung

Die Fähigkeit der Eukaryontenzelle verschiedene Formen anzunehmen und gerichtete Bewegungen auszuführen, beruht auf ihrem Cytoskelett. Das Cytoskelett besteht aus einem komplexen Geflecht aus Proteinfilamenten, das sich durch das gesamte Cytoplasma erstreckt. Ähnlich einem Knochenskelett verleiht es der Zelle Festigkeit und Stabilität, allerdings ist es kein starres Gerüst, sondern eine höchst dynamische Struktur, die sich ständig neu organisiert, wenn die Zelle sich bewegt, sich teilt oder auf ihre Umwelt reagiert. Die vielfältigen Aufgaben des Cytoskeletts hängen von drei Typen von Filamenten ab, den Intermediärfilamenten, Mikrotubuli und Mikro- oder Actin-Filamenten. Dem Actin-Cytoskelett insbesondere kommt die Funktion eines Bewegungsapparates zu, mit dem die Zelle die Form ihrer Oberfläche durch Ausstülpung und Rückzug von Lamellipodien, Mikrosplikes oder Filopodien verändern und sich dadurch auch fortbewegen kann.

Mit der Größenzunahme von Zellen (Eukaryonten sind ca. 1000 mal größer als Bakterien) wurden intrazelluläre Transportvorgänge notwendig. Für den gerichteten Transport von Organellen, Membranvesikeln und RNA/Proteinkomplexen werden Motorproteine benötigt. Diese bringen, mit Hilfe von Mikrotubuli und Actin-Filamenten als Schienen, die jeweiligen Partikel aktiv zu bestimmten und manchmal recht weit entfernten Reaktionsräumen. Ohne diesen motorisierten Transport müßten zelluläre Komponenten, wie auch ganze Zellen selbst, ihren Bestimmungsort über Diffusion erreichen. Freie Diffusion stellt jedoch einen vergleichbar langsamen und ineffizienten Prozeß dar, denn die Proteinkonzentration beträgt im Cytosol ca. 200 mg/ml und die Bestandteile liegen zwar teilweise löslich, aber auch als Netzwerke von Biopolymeren vor.

Es gibt verschiedene Arten von Motorproteinen. Während die F₁ ATPase in der mitochondrialen Membran eine rotierende Maschine ist, gehören die Kinesine, Dyneine wie auch die Myosine zu den Motoren, die sich an Schienen entlang bewegen. Die Familien der Kinesine und Dyneine benutzen dabei das Mikrotubulisystem als Schienennetz, während Myosine an Mikrofilamenten entlanggleiten.

2.1 Die Familie der Myosine und ihre vielfältigen Funktionen

Myosine gehören zu einer außerordentlich großen Familie strukturell unterschiedlicher Mechanoenzyme, die Energie aus der ATP-Hydrolyse nutzen, um Kraft und Bewegung entlang von Actin-Filamenten zu erzeugen. Ursprünglich wurde Myosin schon Ende des 19. Jahrhunderts aus Muskelgewebe beschrieben, denn die dicken zusammengelagerten Filamente können lichtmikroskopisch erkannt werden. Dennoch dauerte es bis in die dreißiger Jahre des 20. Jahrhunderts, bis Myosin II (konventionelles Myosin) erstmals aus dem Muskel isoliert wurde. Alle weiteren, erst viel später entdeckten Klassen wurden davon abgrenzend als

unkonventionelle Myosine bezeichnet. Bis heute werden 18 verschiedene Klassen der Myosin-Superfamilie beschrieben und es gilt als sicher, daß noch weitere hinzukommen. Manche Myosinklassen kommen weit verbreitet in fast allen Organismen vor, während andere dagegen nur in bestimmten Arten exprimiert werden. Myosine der Klasse III scheinen beispielsweise nur in *Drosophila* und im Mensch eine Rolle zu spielen. Im Pflanzenreich wurden zusätzlich separate Myosin-Isoformen entwickelt, da die Klassen VIII, XI und XIII bisher nur dort vertreten sind.

Myosine sind an einer Vielzahl wichtiger zellulärer Mechanismen beteiligt (siehe Abb. 2.1). Myosine der Klasse V können beim Transport von Organellen beteiligt sein, da sie die Voraussetzungen eines prozessiven Motors erfüllen. Subzelluläre Lokalisationsstudien belegen, daß sie zumindest zeitweise mit Organellen assoziiert sind. Organellbewegung durch Myosine V konnte direkt beim Transport der Vakuole in *Saccharomyces cerevisiae* (Hill *et al.*, 1996) beobachtet werden. Es gibt ebenso Hinweise auf eine Beteiligung von Myosin V für den Transport von glattem endoplasmatischem Retikulum in Neuronen (Takagishi *et al.*, 1996) und der lichtinduzierten Translokation von Pigmentgranulen in Melanozyten (Rodionov *et al.*, 1998; Rogers & Gelfand, 1998; Wei *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998).

Myosine sind zudem essentiell in einer Reihe sensorischer Systeme, wie beispielweise dem Seh- oder Hörvorgang. In Photorezeptorzellen der Säugerretina ist Myosin VIIa am Transport von Rhodopsin durch das Cilium zum Außersegment in Interaktion mit dem ciliären Actinsystem beteiligt. Defekte im Gen von Myosin VIIa führen beim Menschen zum Usher Syndrom 1B, das die häufigste Form kombinierter erblicher Blind- und Taubheit darstellt (Weil *et al.*, 1995; Weil *et al.*, 1996). Auch eine Mutation in Myosin VI wird mit erblicher Taubheit in Verbindung gebracht. In der *Snell's Waltzer* Maus (eine natürlich auftauchende Myosin VI Nullmutante) fusionieren bald nach der Geburt die Stereocilien, die sich von der Kutikularplatte im inneren Ohr erstrecken. Myosin VI scheint somit wichtig für eine korrekte Erhaltung der Stereocilien-Struktur zu sein (Avraham *et al.*, 1995).

In letzter Zeit wurde erkannt, daß Myosine nicht nur bei hoch spezialisierten sensorisch-neuronalen Prozessen wichtig sind, sondern auch immer mehr Myosine bei allgemein verbreiteten Wegen der intrazellulären Signalübermittlung eine bedeutende Rolle spielen. Myosine der Klasse IX wurden bisher in Mensch (Bement *et al.*, 1994; Wirth *et al.*, 1993) und Ratte (Reinhard *et al.*, 1995) identifiziert und besitzen eine Domäne mit GTPase-stimulierender (GAP) Aktivität für Rho-Proteine (Reinhard *et al.*, 1995; Wirth *et al.*, 1996). Proteine der Rho-Familie haben eine entscheidende Funktion bei der Umorganisation des Cytoskeletts, bei Mechanismen des Membrantransports und der Regulation von Transkription. Kleine GTPasen wechseln zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen und einer aktiven, GTP-gebundenen Konformation. Der Austausch von GDP zu GTP wird von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) reguliert und interessanterweise wurde das bisher

erste Myosin mit einer GEF-Domäne, Myosin M, in *D. discoideum* identifiziert (Schwarz *et al.*, 1999; Geissler *et al.*, 2000).

Myosine der Klasse I sind in den meisten Organismen mit den zahlreichsten Isoformen vertreten. Die Beteiligung der Myosine I in der Erhaltung und Regulierung der Cortexspannung ist wichtig für zelluläre Prozesse, die mit einer Umgestaltung der Zellrinde einhergehen. So wurde bereits für verschiedene Zelllinien aus Säugern, Amöben oder Hefe gezeigt, daß bei Deletion oder Überexpression von Myosin I, Defekte in der Motilität, Endo- und Exocytose resultierten (Durbach *et al.*, 1996), (Jung *et al.*, 1996; Novak *et al.*), (Geli & Riezmann, 1996; Geli *et al.*, 1998). Die Aufklärung dieser äußerst dynamischen Vorgänge auf molekularer Ebene ist allerdings trotz intensiver Untersuchungen noch nicht zusammenhängend beschrieben.

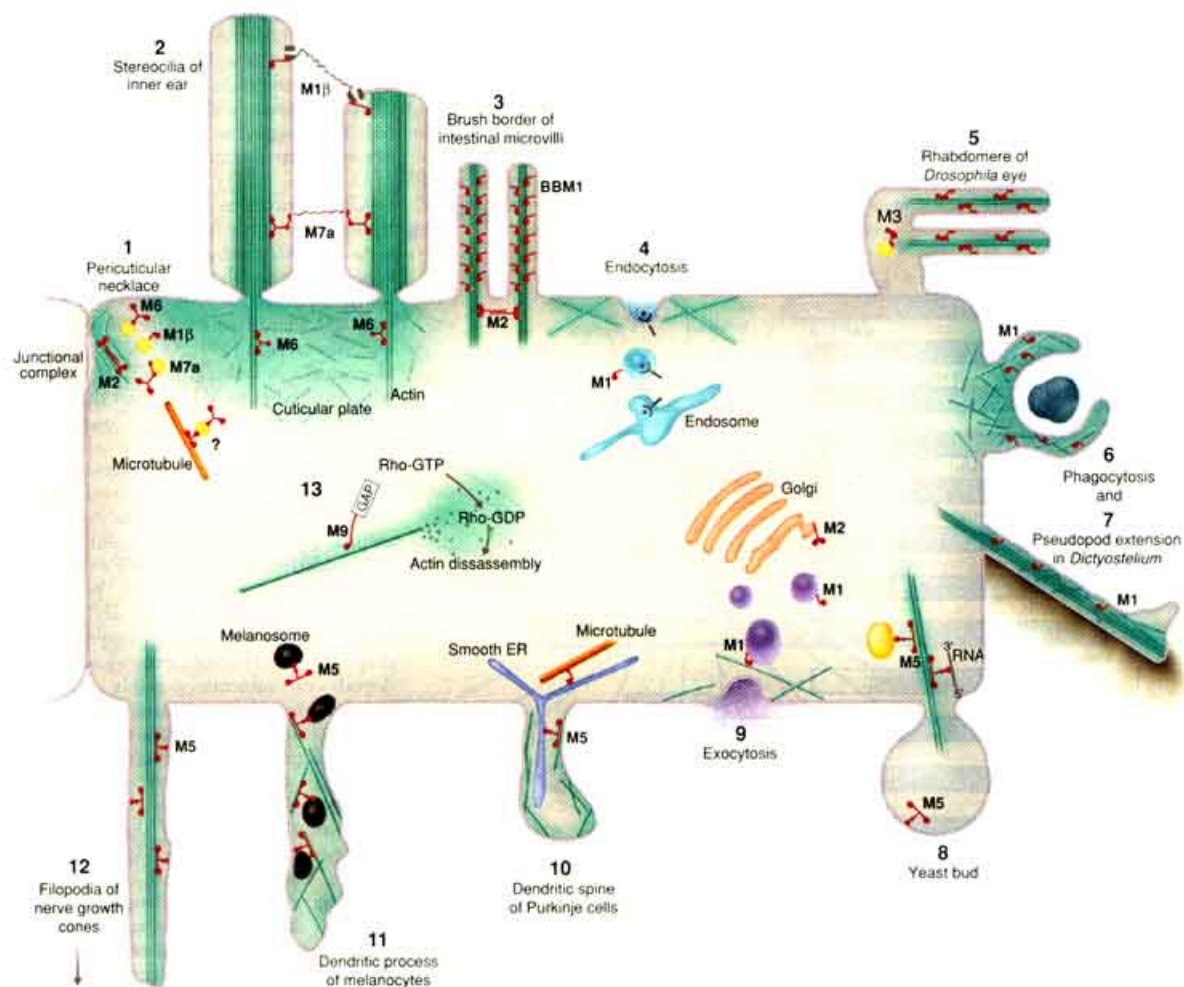


Abb. 2.1: Mögliche Funktionen von Myosinen in einer imaginären Zelle.

(nach Mermall *et al.*, 1998; entnommen aus Science Vol.279;

M1-M9 bezeichnet die unterschiedlichen Myosinklassen)

2.2 *D. discoideum* als Modellorganismus in der Zellbiologie

D. discoideum ist im vegetativen Zustand ein amöboider Einzeller, der im Erdboden vorkommt. Die taxonomische Einordnung von *D. discoideum* ist bis heute kontrovers. Einige seiner Merkmale wie Chemotaxis, Phagozytose oder die Produktion von Glycogen als Speicherform für Kohlenhydrate gleichen denen des Tierreichs, während die Produktion von Zellulose eigentlich charakteristisch für Pflanzen ist. Die phylogenetische Analyse zeigt eine Abzweigung vom eukaryontischen Stammbaum nach den Hefen, aber noch vor der Auseinanderentwicklung der mehrzelligen Organismen (Baldauf & Doolittle, 1997).

Unter normalen Umständen vermehrt sich *D. discoideum* durch einfache Zellteilung. Bei Nahrungsmangel wird der asexuelle Lebenszyklus ausgelöst. Die einzelnen Amöben formen sich zu einem Aggregat und bilden eine soziale multizelluläre Struktur. In diesem Prozeß dient cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP) als chemotaktisches Signal (Konijn, 1975), das *D. discoideum* Zellen in Pulsen sezernieren. Die Zellen bewegen sich entlang des cAMP Gradienten und bilden ein Aggregat, das aus etwa 10^5 Zellen besteht. Liegen günstige Bedingungen in der Umgebung vor, nimmt der gesamte Zellklumpen eine zum Substratum horizontale Position ein und bewegt sich phototaktisch fort. In dieser Migrationsphase können die Zellen bereits in zwei Typen unterschieden werden. Die vorderen 15-20 % des Zellaggregats bestehen aus Zellen, die sich zu Stielzellen differenzieren, während der restliche hintere Teil die Prä-Sporenzellen umfaßt (Bonner, 1974). Die Culmination wird eingeleitet, indem die Spitze des Zellklumpens die vorwärtsgerichtete Bewegung stoppt, der hintere Teil sich jedoch weiter fortbewegt, so daß alle Zellen direkt unter der Spitze positioniert werden. Aus dem Zellklumpen bildet sich nun ein Fruchtkörper mit Basalplatte, Stiel und Sporenkopf aus. In diesem Stadium werden die Zellen des Stiels und der Basalplatte stark vakuolisiert und entwickeln eine Zellwand, die Zellulose enthält. Diese Zellen sterben nach Abschluß der Entwicklung. Die Sporen bilden ebenfalls eine Zellwand, verlieren Wasser und werden metabolisch inaktiv (Loomis, 1975). Der Entwicklungsprozeß von *D. discoideum* ist 24-30 Stunden nach Beginn der Aggregation beendet. Bei Berührung des Sporenkopfes werden die Sporen freigesetzt und keimen unter geeigneten Bedingungen, wobei einzelne Amöben freigesetzt werden und der Lebenszyklus von *D. discoideum* abgeschlossen ist (siehe Abb.2.2).

D. discoideum verfügt als Modellorganismus über praktische Vorteile gegenüber anderen eukaryontischen Zellsystemen. *D. discoideum* besitzt 6 oder 7 Chromosomen (dies ist noch nicht geklärt) und das Genom ist mit 3.5×10^7 etwa hundertmal kleiner als das von Säugerzellen. Ein entschiedener Vorteil ist, daß im parasexuellen Zyklus das Genom im haploiden Zustand vorliegt, wodurch jede Mutation sich direkt auf den Phänotyp des Organismus auswirkt. Dadurch wird die Isolation von Mutanten im Vergleich zu anderen gentechnisch manipulierbaren, eukaryontischen Systemen sehr erleichtert. Eine weitere Möglichkeit stellt die gezielte Unterbrechung und Deletion von Genen durch homologe

Rekombination dar, die in *D. discoideum* mit relativ hoher Effizienz durchgeführt werden kann.

D. discoideum wurde in den letzten Jahrzehnten als Modellsystem für die Untersuchung vieler verschiedener zellbiologischer Gebiete herangezogen. Einen besonderen Vorteil bietet *D. discoideum* für das Studium von Entwicklungsprozessen, da hier, im Gegensatz zu den meisten vielzelligen Organismen, das Wachstum unabhängig von der Differenzierung ist. Gegenüber *S. cerevisiae*, dem länger genutzten und weiter verbreiteten Modellorganismus, hebt sich *D. discoideum* gerade durch seine Ähnlichkeit zu Säugetier-Granulozyten bezüglich Morphologie, Beweglichkeit, phagocytotischer und chemotaktischer Fähigkeiten ab und wird deshalb auch oft als „Mini-Makrophage“ bezeichnet. Aufgrund seines äußerst dynamischen Cytoskeletts ist *D. discoideum* zum Studium der Zellmotilität besonders geeignet (Noegel, 1995). Dabei liegt ein Schwerpunkt in der Aufklärung des Signalübertragungsweges, den cAMP bei Bindung an seinen Rezeptor auslöst. Auch die Untersuchung gerichteter Transportvorgänge in *D. discoideum*, in denen molekulare Motoren und Cytoskelett-Filamente wesentliche Bestandteile sind, ist inzwischen zu einem beachtlichen Forschungsgebiet herangewachsen. Besonders der myosin-abhängige Organelltransport an Actin-Filamenten ist nur unvollständig aufgeklärt, obgleich eine Vielzahl der daran beteiligten Motorproteine, die sogenannten ungewöhnlichen Myosine, bereits identifiziert werden konnten.

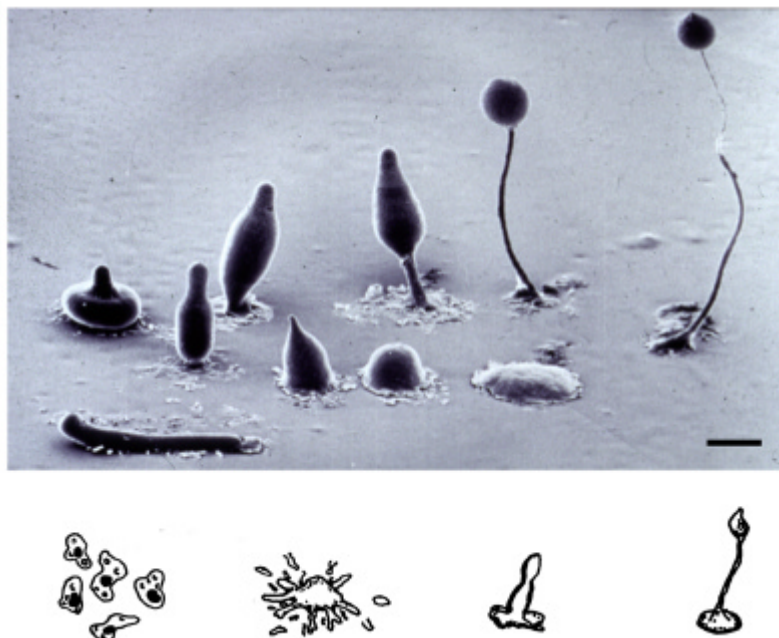


Abb.2.2: Der Entwicklungszyklus von *D. discoideum*. Die durch Nahrungsmangel ausgelöste Entwicklung zu überdauerungsfähigen Sporen dauert etwa 24 h. Skizziert sind die einzelnen Entwicklungsstadien. Der Balken entspricht 0.5 mm. Die elektronenmikroskopische Aufnahme wurde freundlicherweise von Dr. L. Blanton, Texas Tech. Univ., zur Verfügung gestellt.

2.3 Die modulare Struktur von Myosinen

Obwohl Myosine durch das ganze Tier- und Pflanzenreich verbreitet sind, und eine enorme Formenvielfalt entwickelt haben, besitzen alle Mitglieder der Myosin-Familie einen grundlegend gleichen Aufbau aus drei Modulen. Die aminoterminal Domäne ist die Motoreinheit. In dieser hochkonservierten Kopf- oder Motordomäne liegen die ATP-abhängige Bindestelle für Actin und die ATPase-Aktivität. Hier erfolgt auch die katalytische Umwandlung der in ATP gespeicherten chemischen Energie in den Kraftschlag, mit dem sich das Molekül an Actinfilamenten fortbewegt. Eine weitere Charakteristik fast aller Myosin-Motordomänen ist das Vorhandensein einer negativ geladenen Aminosäure an einer konservierten Position innerhalb der Actin-Kontaktregion. In den meisten Myosinen ist dort entweder ein Aspartat (D)- oder Glutamatrest (E). In Klasse I-Myosinen aus einzelligen Organismen und Klasse VI-Myosinen hingegen wird diese Stelle von einem Serin (S)- oder Threoninrest (T) besetzt, auf den die negative Ladung durch Phosphorylierung übertragen werden kann. Nach dem Einbuchstabencode der Aminosäuren wird dies als die TEDS-Regel bezeichnet (Bement & Mooseker, 1995). Inzwischen wurden allerdings Ausnahmen bekannt, die nicht dieser Regel folgen, da sie an der entsprechenden Position einen Asparaginrest aufweisen, wie beispielsweise einige Myosine aus *Toxoplasma gondii* (Hettmann *et al.*, 2000). Im Mensch führt eine bestimmte Mutation in der Actin-Binderegion im Myosin IIa zur hypertrophen Cardiomyopathie (*cardio-myopathy loop*) (Seidman *et al.*, 1991).

Die mittlere Domäne, auch Halsdomäne genannt, bildet eine verlängerte α -Helix und dient als Hebelarm beim Kraftschlag des Moleküls (Uyeda *et al.*, 1996). An diesen können leichte Ketten an sogenannte IQ-Motive in der Sequenz binden (Cheney und Mooseker, 1992) und dadurch eine Versteifung des Hebelarms bewirken. Alle bisher identifizierten leichten Ketten gehören zur Familie der Calmodulin/EF-Hand-Proteine (Sellers und Goodson, 1995).

An die Halsregion schließt sich die Schwanzdomäne an, die für eine jeweilige Myosinklasse charakteristisch ist. Die außerordentlich große Divergenz bezüglich Länge und Domänenkomposition reflektiert die unterschiedlichen Funktionen der Myosine in der Zelle. Die meisten Schwanzdomänen enthalten bekannte funktionelle Elemente wie α -helikale Bereiche, die durch Ausbildung von Doppelwendeln dimerisieren, oder in Vertretern der Klasse I Phospholipid-bindende Motive und ATP-unabhängige Bindungsstellen für Actin. Weitere Domänen innerhalb der Schwanzregion wurden bereits in anderen, an Signalübertragung beteiligten Proteinen charakterisiert, die dort Protein-Protein Wechselwirkungen vermitteln, z.B. src-homology 3 (SH3)-Domänen in Myosinen I oder Pleckstrin-homologe (PH-)Domänen in Myosin X (Solc *et al.*, 1994).

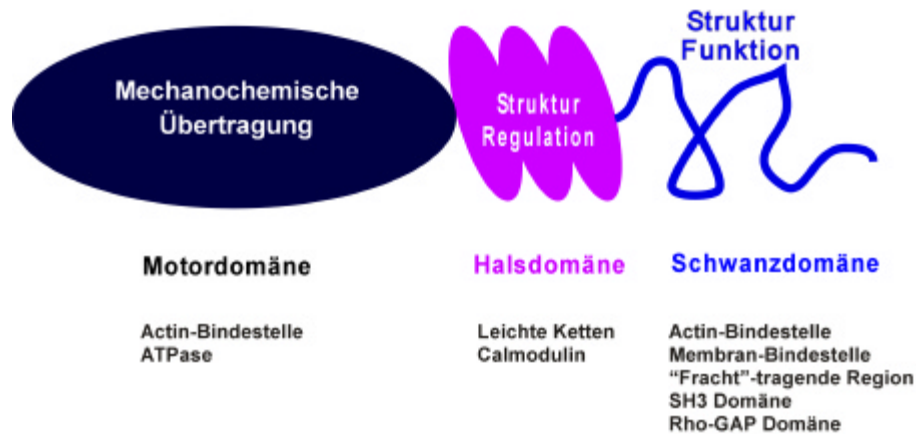


Abb.2.3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur. Die Actin-aktivierte ATPase- und damit die Motor-Aktivität des Proteins liegt innerhalb der hochkonservierten Kopfdomäne. In der Halsregion befinden sich ein bis sechs Bindungsstellen für Calmodulin oder andere, spezialisierte leichte Ketten der EF-Hand-Proteinfamilie. Für sie wurde in vielen Fällen eine regulierende Wirkung auf die Motoraktivität beschrieben. Die Schwanzregion ist bei den verschiedenen Myosinklassen sehr unterschiedlich gestaltet und bestimmt durch ihre Subdomänen die Funktion und Bindungspartner des Myosins, z.B. Filamentbildung bei Myosin II durch die Zusammenlagerung der langgestreckten Dimeren-Schwänze; Kreuzvernetzung von Actin-Filamenten im Zellcortex und Anheftung an die Plasmamembran bei Myosinen I durch eine zweite, ATP-unabhängige Actin-Bindungsstelle und eine Membranbindungsstelle; oder Signalübermittlung bei Myosinen IX durch eine GAP-Domäne.

2.4 Die Actin-Polymerisation

Die Polymerisation von Actin-Filamenten ist essentiell für unterschiedliche zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die Änderung der Zellform und die Bewegung. Darin inbegriffen ist die Ausbildung von Ausstülpungen der Zelloberfläche wie Lamellipodien und Filopodien am Leitsaum einer beweglichen Zelle. Diese dynamischen Strukturen sind mit Actin-Filamenten gefüllt, welche mit ihrem schnell wachsendem Ende (dem sogenannten stumpfen Ende) nach außen in Richtung der Ausweitung der Zelle orientiert sind. Actin-Polymerisation, die direkt an der Membran stattfindet, ist straff an einer Membranausstülpung gekoppelt und kann so die treibende Kraft liefern. Dies wird deutlich in solch komplexen Vorgängen wie Chemotaxis (in Leukozyten) oder dem Auswachsen von Neuronen. Hier führen extrazelluläre Signale schnell zu einer Umordnung des Cytoskeletts, um mit Änderung der Zellpolarität und der Bewegungsrichtung zu reagieren. Eine bisher weitgehend unbeantwortete Frage befaßt sich damit, wie Zellen die eingehenden Signale in die verschiedenen Übertragungswege integrieren, die letztendlich bestimmen bzw. kontrollieren, wo Actin-Polymerisation stattfindet. Die Filamente wachsen aus einem riesigen Vorrat an unpolymerisierten Actinmolekülen, die durch Proteine im Monomer-Zustand gehalten werden. Da diese Proteine in hohem Überschuß vorliegen, wird eine spontane Polymerisation ausgeschlossen (Pollard und Cooper; 1986).

2.5 Der Arp2/3 Komplex

Man denkt, daß die hauptsächliche Komponente für Actin-Assemblierung der Arp2/3 Komplex ist, der Actin-Monomere zusammenbringt, so daß ein neuer Actin-Keim entsteht, an dem dann die Polymerisation zu einem neuen Filament stattfindet. Der Arp2/3 Komplex wurde 1994 in *Acanthamoeba* als Komponente des Actin-Cortex entdeckt (Machesky, 1994). Er ist in vielen unterschiedlichen Zelltypen am Leitsaum lokalisiert. *In vitro* bindet Arp2/3 unter anderem seitlich an schon existierende Actin-Filamente und stimuliert die Bildung neuer Filamente. In diesem Modell (dendritische Nukleation, Mullins 1998) fördert der Arp2/3 Komplex die Oligomerisierung von Actin-Monomeren und verbleibt eng assoziiert mit den langsam wachsenden „spitzen“ Enden der neuen Filamente. Dadurch können weitere Monomere an das schnell wachsende „stumpfe“ Ende addiert werden. Dieser Prozess führt so zu einem verzweigtem Netzwerk an Actin-Filamenten, das zum Beispiel die Ultrastruktur des Leitsaums eines beweglichen Keratozyten oder einer stimulierten Karzinoma-Zelle widerspiegelt.

Der Arp2/3 Komplex alleine beschleunigt nur schwach die Actin-Assemblierung. Seine Aktivität wird jedoch stark durch die sauren carboxy-terminale Domänen von Proteinen der WASp-Familie (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein) stimuliert. Zu dieser Familie gehören WASp, N-WASp und die WAVE/SCAR Proteine. N-WASp und WASp, die am besten charakterisierten Proteine, liegen in einer inaktiven Form gefaltet vor und werden erst durch extrazelluläre Signale aktiviert. Die vollständigen Details, wie, wann und wo die WASp Proteine aktiviert werden, ist jedoch nicht geklärt. *In vitro* wurde festgestellt, daß Cdc42 in prenylierter GTP-gebundener Form in Synergie mit Phosphatidylinositol 4,5 Bisphosphat (PIP₂), N-WASp aktivieren können. Cdc42 bindet an die GBD Region (GTPase Binde Domäne), während PIP₂ an eine basische Region bindet, die direkt neben der GBD Region liegt. Dadurch wird wahrscheinlich die Autoinhibition des C-Terminus von N-WASp aufgehoben. Prenyliertes Cdc42 und PIP₂ befinden sich beide in der Plasmamembran, so daß N-WASp Aktivierung und nachfolgende Arp2/3 Komplex-vermittelte Actin-Polymerisation auf ein Gebiet nahe der Plasmamembran beschränkt sind. WASp und N-WASp binden über ihre prolinreiche Region viele Proteine, die eine SH3 Domäne enthalten, wie z.B. die Adaptoren Grb2 und Nck. Es konnte gezeigt werden, daß N-WASp den Arp2/3 Komplex aktiviert, wenn Grb2 an N-WASp gebunden hat. Grb2 bindet ebenfalls an aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen, wodurch ein direkter Zusammenhang zwischen Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen und der Assemblierung von Actin hergestellt werden kann (und zwar durch die Rekrutierung von N-WASp und Arp2/3 Komplex).

SCAR-Proteine scheinen auf andere Weise reguliert zu werden. SCAR wurde erstmals in *D. discoideum* entdeckt, als ein Protein, das den Phänotyp des Defektes des zyklischen AMP Rezeptor cAR2 unterdrückt (Bear *et al.*, 1998). In *D. discoideum* wirkt extrazelluläres cAMP als Botenstoff, der über G-Protein gekoppelte Rezeptoren die chemotaktische Bewegung

stimuliert. SCAR scheint ein negativer Regulator der cAMP Rezeptor 2 vermittelten Chemotaxis zu sein, da ein gleichzeitiger Defekt in *SCAR* den Defekt, der durch die Deletion des *cAR2* Gens entsteht, unterdrückt. Wenn nur das *SCAR* Gen deletiert wird, haben die *D.discoideum* Zellen während des vegetativen Wachstums nur ungefähr 25 % ihrer normalen Größe und einen verringerten Gehalt an F-Actin. Während der chemotaktischen Zellwanderung zeigen sie eine abnorme Zellmorphologie und keine starke F-Actin Ansammlung an der Frontlamelle, sondern pseudopodienartige Ausläufer, mit nur schwacher F-Actin Konzentration. Dennoch sind sie zur chemotaktischen Zellwanderung fähig (Bear *et al.*, 1998).

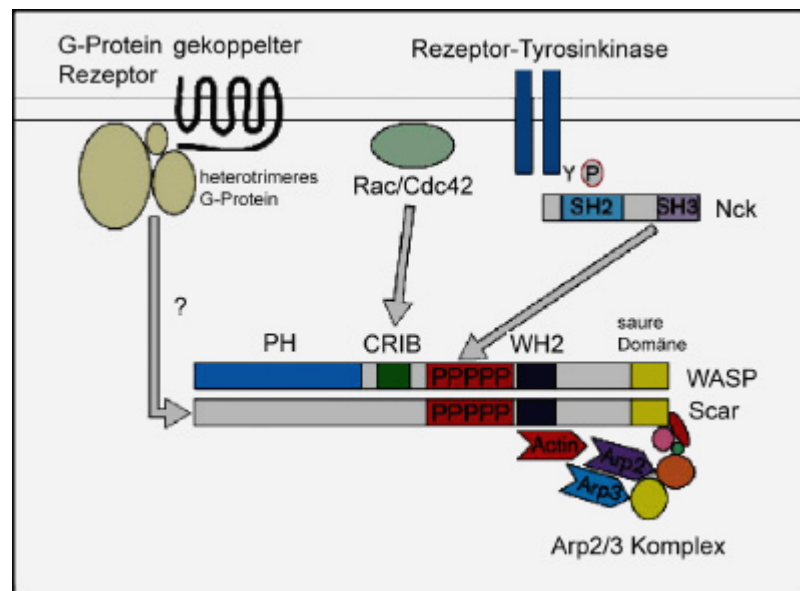


Abb.2.4: Potentieller Regulationsmechanismus der WASp/Scar Proteinfamilie.

(verändert nach Machesky & Insall, 1998; ausführliche Beschreibungen befinden sich im Text. Die WH2 Domäne bindet an Actin-Monomere; CRIB entspricht GBD, das ist die Cdc 42 bindende Region, PH: Pleckstrin Homologie Domäne)

2.6 Profiline

Es wurde *in vitro* gezeigt, daß für die Cdc42 induzierte Actin-Polymerisation N-WASp und der Arp2/3 Komplex ausreichend sind. In Anwesenheit des Proteins Profilin kann die Geschwindigkeit der Actin-Nukleation beschleunigt werden, wenn bestimmte Bedingungen in der Zelle vorliegen.

Profiline sind ubiquitär, haben ein niedriges Molekulargewicht zwischen 12 und 15 kDa, und können an Actin-Monomere, Poly-L-Prolin, Polyphosphoinositide und an Proteine mit

prolinreichen Regionen (z.B. WASP, VASP/ENA) binden (Witke *et al.*, 1998; Holt und Koffer, 2001; Übersichtsartikel). In *D. discoideum* liegt Profilin in zwei Isoformen vor, Profilin I und II. Während das Ausknocken (Ausschalten) eines der Gene keine signifikanten Änderungen der Zellstruktur oder -funktion verursacht, schädigt ein Knockout beider Gene die Zelle erheblich. Der F-Actingehalt ist erhöht, die Beweglichkeit erniedrigt und sowohl Veränderungen im Entwicklungszyklus als auch in Schüttelkultur finden statt (Haugwitz *et al.*, 1994). Daraus ist zu folgern, daß Profilin tatsächlich ein wichtigen Faktor in der Maschinerie der Actin-Polymerisation ist. *In vitro* können Profiline die Actin-Polymerisation entweder fördern oder verhindern. Wenn sie an Actin-Monomere binden und diese sozusagen „beschlagnahmen“, verhindert das den Zusammenbau von Actin zu Filamenten. Andererseits kann Profilin die Polymerisation fördern, was jedoch von der Verfügbarkeit freier stumpher Enden, und zumindest in Vertebraten von weiteren Actin-bindenden Proteinen wie Thymosin β abhängt. (Pantaloni und Carlier, 1993). Zusätzlich können sie in Synergie mit dem Actin-Depolymerisierenden Faktor ADF/Cofilin für einen erhöhten Umsatz an Actin-Filamenten sorgen (Didry *et al.*, 1998). Profilin ist ebenfalls der Nukleotid-Austauschfaktor für Actin und fördert den Austausch von ADP zu ATP. Profilin bindet dann fest an ATP-Actin-Monomere und füllt so den Actin-Monomer Vorrat wieder auf. Wenn der Profilactin-Komplex an PIP2 gebunden hat, dissoziiert Profilin vom Actin-Monomer. Diese Interaktion zwischen PIP2 und Profilin scheint somit eine der Strategien von Zellen zu sein, das Actin-Cytoskelett mit externen Signalen zu koppeln (Machesky *et al.*, 1990).

2.7 Myosine der Klasse I

Mit großer Wahrscheinlichkeit sind N-WASp/WASp Proteine nicht für die Lokalisation des Arp2/3 Komplexes in Lamellipodien verantwortlich. Nicht nur die SCAR-Proteine könnten die notwendigen interagierenden Partner dafür sein, sondern auch Myosine der Klasse I. Es konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß Myosine der Klasse I direkt oder indirekt mit dem Arp2/3 Komplex interagieren. In *Saccharomyces cerevisiae* existieren zwei Myosin I Gene: *myo3* und *myo5*. Die Myo3 und Myo5 Proteine sind ungewöhnlich hinsichtlich der Existenz einer carboxyterminalen sauren Domäne, die in anderen Klasse I Myosinen nicht vorhanden ist. Durch diese Domäne binden sie direkt an den Arp2/3 Komplex. Neuere Forschungsergebnisse belegen außerdem, daß sowohl Cdc42, der Arp2/3 Komplex und Bee1 (das *S. cerevisiae* Homolog zu WASp) notwendig für neue Actin-Assemblierung sind. Eine genauere Analyse von Bee1 zeigte, daß dessen zentrale prolinreiche Domäne mit der SH3-Domäne von Myo3 bzw. Myo5 interagiert, die daraufhin durch ihre carboxyterminale saure Domäne mit dem Arp2/3 Komplex in Wechselwirkung treten können. In Hefezellen, denen beide Myosingene fehlen, findet keine Actinpatch Assemblierung (lokale Ansammlung von Actin in Form von Flecken) statt und wenn die sauren Domänen von Bee1, Myo3 und Myo5 entfernt werden, sind Hefezellen nicht

lebensfähig. Ein weiterer Hinweis, der die wichtige Rolle von Myosinaktivität hinsichtlich der Actinpatch-Formation belegt, liegt in der Beobachtung, daß der Myosin ATPase Inhibitor 2,3-Butanedione-2-Monoxime die Actinpatch-Formation verhindert. Die Regulation von Myo3 und Myo5 läuft über Phosphorylation der TEDS-Position in der Kopfregeion durch die *S.cerevisiae* p21-aktivierten Kinasen (PAKs) Ste20 und Cla4. Diese Kinasen wiederum sind Effektoren für Cdc42, so daß man sich eine Signalkaskade vorstellen kann, in der Cdc42 die Actinpolymerisation nicht direkt durch Bee1 vermittelt (wie es in Säugerzellen durch WASp der Fall ist), sondern indirekt über Myosine der Klasse I, welche in Folge dann Bee1 und den Arp2/3 Komplex rekrutieren. Tatsächlich kann konstitutiv aktives Myo3 oder Myo5, in denen Serin gegen Aspartat ausgetauscht wurde, eine temperatursensitive Cdc42 Mutante wiederherstellen (retten). Damit scheint klar zu sein, daß WASp/SCAR homologe Proteine nicht immer die direkten Bindungspartner des Arp2/3 Komplexes sind.

Eine weitere Verbindung zwischen Myosinen I und dem Arp2/3 Komplex wurde kürzlich in *D.discoideum* entdeckt (Jung *et al.*, 2001). Die unkonventionellen Myosine IB und IC aktivieren allerdings indirekt die Actin-Polymerisation über den Arp2/3 Komplex, indem sie mittels ihrer SH3 Domäne an das Protein p116 binden. Dieses Protein ist das *D.discoideum* Homolog zu *Acanthamoeba* Acan 125, von dem ebenfalls gezeigt wurde, daß es an Myosine I binden kann.

Die molekulare Analyse von p116 klärte, daß die Bindung an die SH3 Domäne von Myosin I über das klassische SH3 Bindemotiv **PXXP** (P=Prolin, X=irgendeine Aminosäure) vermittelt wird, während die Wechselwirkung mit dem Arp2/3 Komplex höchstwahrscheinlich mittels einer carboxyterminalen sauren Domäne stattfindet. Diese saure Domäne ist den sauren Domänen homolog, die in den Proteinen der WASp/SCAR Familie vorhanden sind.

2.8 Endocytose und das Actin-Cytoskelett

Der endocytotische Prozess kann in fünf zeitliche Abschnitte unterteilt werden, in denen jeweils Actin eine Rolle spielen kann (Qualmann *et al.*, 2000; Übersichtsartikel):

Zum einen schaffen cytoskeletale Strukturen den Komponenten der Endocytosemaschinerie die Möglichkeit, sich lateral zu einer definierten Stelle (*hot spot of endocytosis*) hinzubewegen.

Die Deformation und Einstülpung der Plasmamembran kann ebenfalls durch Actin unterstützt werden. Dabei würde die planare Plasmamembran gebogen werden bzw. eine Krümmung erfahren, die es der Maschinerie einfacher machen würde, die Membraneinstülpung abzuschneiden. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, daß Actin entfernt werden muß, um Endocytose zu erlauben. Das relativ starre Actin-Cytoskelett des Cortex könnte eine hemmende (inhibitorische) Wirkung auf Membranbewegung haben (Trifaro *et al.*, 1993), die erst durch einen erhöhten lokalen Actin-Umsatz aufgehoben würde. Allerdings ist wohl

sicher, daß Actin nicht ausschließlich eine hemmende Rolle spielt. An der apikalen Seite einer polarisierten Zelle wird Endocytose verhindert, wenn Actin depolymerisiert wurde (Gottlieb *et al.*, 1993), während eine Stabilisierung der Actin-Filamente mit Jasplakinolide keinen Effekt zeigte. Jasplakinolide verhinderte zwar Endocytose an der apikalen Oberfläche, aber stimulierte basolaterale Aufnahme (Shurety *et al.*, 1998).

Die vierte mögliche Funktion des Actin Cytoskeletts besteht in der Mitwirkung bei der Abschnürung der Membran, wodurch Vesikel aus der Plasmamembran entlassen werden (=Vesikelentstehung). Hier könnte Actin-Polymerisation am "Hals" des Vesikels die notwendige Kraft erzeugen, um die Abschnürung der Plasmamembran oder das Ablösen des Vesikels zu erreichen.

Schließlich könnte Actin den abgeschnürten Vesikeln den Weg durch das viskose Cytoplasma ermöglichen. Es wurde gezeigt, daß Endosomen, Pinosomen, Clathrin-bedeckte als auch sekretorische Vesikel mit einem sogenannten Actinschweif im Cytoplasma assoziiert sind (Frischknecht *et al.*, 1999; Merrifield *et al.*, 1999; Rozelle *et al.*, 2000). Diese Actinschweife ähneln sehr dem Mechanismus, den das pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* benutzt, um sich durch das Cytoplasma einer infizierten Wirtszelle zu bewegen.

Im späteren Verlauf der Endocytose könnten Actin-abhängige Motorproteine beteiligt sein. In Lamellipodien und Filopodien findet man eine F-Actin Orientierung, die mit dem schnell wachsenden stumpfen Ende der Plasmamembran zugewendet ist. Für die endocytotischen Prozesse würden demnach Motorproteine gebraucht, die gegen das spitze Ende gerichtet sind. Das ungewöhnliche Myosin VI ist das bisher einzige Myosin, das sich zum spitzen Ende von Actin-Filamenten bewegt (Wells *et al.*, 1999) und somit diese Aufgabe erfüllen könnte

2.9 Phagocytose und das Actin-Cytoskelett

Phagocytose ist ein Prozeß, bei dem Zellen sich große Partikel einverleiben ($>1 \mu\text{m}$ Durchmesser), wie z.B. Bakterien oder Zelltrümmer. In höheren Zellen sind phagocytierende Zellen sehr wichtig für die wirtseigene Abwehr von eingedrungenen Pathogenen. Der Prozeß kann ebenfalls in verschiedene Stadien eingeteilt werden. Nach der Annäherung und dem Anhaften der phagocytierenden Zelle an den Partikel (*phagocytotischer Becher*), umschließt sie ihn vollständig, so daß ein Phagosom entsteht. Um dieses Umschlingen des Partikels zu ermöglichen, ist eine Umbildung des Actin Cytoskeletts notwendig.

D.discoideum Zellen nehmen über Phagocytose ihre Nahrung in Form von Bakterien auf. Viele Actin-bindende Proteine sind kurzfristig mit dem Phagosom assoziiert. Das wurde direkt für Coronin (Maniak *et al.*, 1995), Daip1 (Konzok *et al.*, 1999) und das 34kDa-bundling Protein (Rezabek *et al.*, 1997) gezeigt. Außerdem ist die Phagocytose in vielen *D. discoideum* Zelllinien vermindert, die eine Mutation in Genen für Actin-bindende Proteine tragen, wie ABP 120 (Rivero *et al.*, 1996), Coronin (Maniak *et al.*, 1995), Daip1 (Konzok *et*

al., 1999). Myosin I Mutanten zeigen ebenfalls reduzierte Internalisationsraten, zum Beispiel phagozytieren MyoB, MyoC und MyoK Deletionsmutanten Partikel deutlich langsamer. Neben Klasse I Myosinen ist auch MyoI, das einzig bekannte Myosin der Klasse VII in *D. discoideum* an der Aufnahme von Partikeln beteiligt (Jung *et al.*, 1996; Schwarz *et al.*, 2000; Titus, 1999). Neuere Studien an Makrophagen belegen die Anwesenheit von Myosinen der Klassen I, IIa, Va, und IXb an der Phagosomenmembran. Für Myo IC wird angenommen, daß es für die kontraktile Aktivität verantwortlich ist, die zum Abschluß des Phagosoms in eine intrazelluläre Vakuole führt (Swanson *et al.*, 1999).

Da Phagozytose mit der Umorganisation des Actin-Cytoskeletts einhergeht, überrascht es nicht, daß Proteine der Rho Familie, WASp und der Arp 2/3 Komplex in diesem Prozeß beteiligt sind. Der Arp 2/3 Komplex und WASp kolokalisieren beispielsweise mit den Actin-Filamenten, welche die Phagosomen umgeben. Zusätzlich wird durch die Expression eines Scar-WA Fragments die Phagozytose in Makrophagen verhindert, da dieses Fragment zwar mit Arp 2/3 interagiert, jedoch die Rekrutierung des Arp 2/3 Komplexes nicht stattfindet (May *et al.*, 1999). Außerdem ist die Phagozytose in WASp-deletierten neutrophilen Zellen gegenüber normalen Zellen um 50% verringert (Zang *et al.*, 1999). Proteine der Rho-Familie spielen ebenso eine Rolle bei der Phagozytose. Zwei verschiedene phagozytotische Übertragungswege wurden bisher in Makrophagen beschrieben: Typ I wird über Cdc42 und Rac an Immunglobulin Rezeptoren wie den Fc-gamma Rezeptor (FcR) vermittelt. Typ II benutzt den Komplement Rezeptor (CR 3) und wird durch Rho vermittelt (Caron *et al.*, 1998). Die beteiligten Mechanismen in phagozytierenden *D. discoideum* Zellen ähneln stark denen von phagozytierenden Säugerzellen, denn auch hier spielen das Actin-Cytoskelett und Rac F1, ein Mitglied der Familie der Rho GTP-bindenden Proteine, eine Rolle. Studien belegen, daß es in *D. discoideum* mindestens zwei Rezeptortypen gibt, die für Phagozytose verantwortlich sind: Ein bisher nicht identifizierter Rezeptor des Lektin-Typs und ein sogenannter nicht spezifischer Rezeptor, der bei Phagozytose der meisten hydrophilen Partikel in Medium notwendig ist (Vogel *et al.*, 1980). Neuere Untersuchungen identifizierten ein neues Protein Phg1p in *D. discoideum*, das dieser Rezeptor sein kann (Cornillon *et al.*, 2000).

2.10 Myosin K, das exotische Mitglied der Klasse I Myosine

Myosin I K wurde in einem umfassenden Screening des *D. discoideum* Genoms entdeckt, das die Erstellung eines vollständigen Myosinkatalogs in *D. discoideum* zum Ziel hatte (Schwarz *et al.*, 1999). Phylogenetisch konnte es der Klasse I zugeordnet werden, allerdings zeichnet sich dieses Myosin durch eine außergewöhnliche Struktur aus: MyoK besitzt eine überdimensionale Motordomäne, eine sehr kurze Halsregion, und die Schwanzdomäne fehlt vollständig (beziehungsweise keine Halsregion und nur eine extrem kurze Schwanzdomäne; je nach Auffassung). Auswirkungen auf die Morphologie von *D. discoideum* Zellen, die MyoK überhaupt nicht ($MyoK^-$) oder vermehrt ($MyoK^+$) bildeten, wurden bereits intensiv untersucht (Schwarz *et al.*, 2000). $MyoK^-$ Zellen zeigten vermehrt große und sehr dünne, mit Actin gefüllte Lamellipodien. Dagegen erschien die Oberfläche der $MyoK^+$ Zellen äußerst unregelmäßig, mit zum Teil großen Ausstülpungen, die Organellen enthielten. Diese morphologischen Veränderungen haben anscheinend einen direkten Einfluß auf die Spannung des Zellcortex. Messungen belegten einen Abfall der cortikalen Spannung in Abwesenheit von MyoK, während dessen Überexpression zu einer signifikanten Erhöhung führte. Dadurch wird das cortikale Actin-Cytoskelett direkt betroffen, so daß Auswirkungen auch auf funktioneller Ebene beobachtet wurden, denn beide veränderte Zelllinien hatten eine anfänglich verringerte Phagocytoserate. Da der Steady-State-Level dem von Wildtyp-Zellen gleich, kann man davon ausgehen, daß die Zellen nur im Anfangsstadium der Phagocytose Probleme haben, weil sie entweder keinen sauberen Kontakt mit dem Partikel aufnehmen oder ihn nicht richtig umschließen können.

Die starke Erweiterung der Motordomäne kommt durch eine Insertion von ca. 150 Aminosäuren zustande, die große Homologie zu einer Domäne in der Schwanzregion anderer Myosine der Klasse I besitzt. Für diese Domäne wurde gezeigt, daß sie in ATP-unabhängiger Weise an F-Actin bindet (Jung und Hammer, 1994; Rosenfeld und Renner, 1994). Da beide Actin-Bindestellen sich bei MyoK innerhalb der Motordomäne befinden, wurde schon früh postuliert, daß dieses Myosin eine neue Art von Actin-Kreuzvernetzern repräsentieren könnte.

2.11 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die zelluläre Funktion von Myosin IK (MyoK) zu charakterisieren. Vorausgegangene Arbeiten belegten, daß MyoK eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Integrität des Actin-Cortex spielt, und an dynamischen Prozessen wie Phagocytose und Motilität beteiligt ist (Schwarz *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse wurden hauptsächlich durch Untersuchungen gewonnen, die auf der Analyse phänotypischer Veränderungen von MyoK überexprimierender- oder MyoK deletierter Zellen beruhte.

Auf diesem Wissen aufbauend, sollte aufgeklärt werden, in welcher Weise MyoK an diesen komplexen Prozessen beteiligt ist. Die entworfene Strategie enthielt *in vivo* und *in vitro*

Untersuchungen des gesamten Proteins sowie auch einzelner funktioneller Domänen. Die intrazelluläre und insbesondere die subzelluläre Lokalisation von MyoK sollte ermittelt werden, da sich herausstellte, daß MyoK ein Signal zur Prenylierung von Proteinen enthält. Die Motoreigenschaften eines Myosins sagen häufig viel über dessen Funktion in der Zelle aus. Deshalb sollte MyoK aus *D. discoideum* gereinigt werden, um eine kinetische Charakterisierung durchzuführen. Dies war auch unter dem Gesichtspunkt wichtig, daß MyoK eine ungewöhnliche, ca. 150 Aminosäuren lange Insertion im Oberflächenloop1 (innerhalb der Motordomäne) besitzt, der den Nukleotidaustausch moduliert. Diese Insertion hat einen hohen Anteil an den Aminosäuren Glycin, Prolin und Arginin (GPR-Loop) und Sequenzvergleiche zeigten eine starke Ähnlichkeit mit einer Domäne aus dem Schwanzbereich anderer Klasse I Myosine. Um die Funktion des GPR-Loops zu analysieren, sollte dieser als GFP- und GST-Chimäre hergestellt werden. Das GFP-Konstrukt würde es ermöglichen, die intrazelluläre Lokalisation in lebenden *D. discoideum* Zellen zu beobachten. Die Aufreinigung der GST-Chimäre sollte die Beantwortung biochemischer Fragestellungen erlauben. Dazu gehörten sowohl Kosedimentationsexperimente mit F-Actin als auch Bindungsexperimente mit cytosolischen Extrakten zur Identifizierung von Interaktionspartnern.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, mit dem Reinheitsgrad p.a. von der Firma Merck AG, Darmstadt bezogen. Die übrigen Chemikalien stammen von folgenden Herstellern:

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	National Diagnostics
Agarose	Gibco BRL
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Bacto-Agar	Difco Labs
Bacto-Trypton	Difco-Labs
Benzamidin	Sigma-Aldrich
Bicinchoninsäure, Natriumsalz	Pierce
Blasticidin S	ICN, Calbiochem
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
CHAPS	Calbiochem
Complete Proteaseinhibitor	Roche Mannheim
Deoxynukleotide „Ultra-Pure“ für PCR	Pharmacia Biotech
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid)	Molecular Probes
DMSO	Sigma-Aldrich
DTT (Dithiothreitol)	Serva
Ethidiumbromid	Bio-Rad
Glucose	Roth
Glutathion (reduziert)	Sigma-Aldrich
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia Biotech
Hefe-Extrakt	Difco Labs
HEPES	Gerbu
Hexadecyl- trimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma-Aldrich
Hexamincobaltchlorid	Sigma-Aldrich
IPTG (1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid)	Serva
Mowiol Einbettmedium	Sigma-Aldrich, Calbiochem
Ni-NTA-Sepharose	Qiagen

Nonidet-P 40	Fluka
NZYM Broth	Gibco BRL
Octylglucopyranosid	Calbiochem
Ovalbumin	Sigma-Aldrich
Pepton aus Casein	Merck
Pepstatin	Calbiochem
AquaPhenoI™	Appligene
PMSF	Sigma-Aldrich
Prolong Eindeckmedium	Molecular Probes
Proteasepepton	Merck
Ponceau S	Sigma-Aldrich
TAME	Sigma-Aldrich
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
TLCK	Calbiochem
TPCK	Calbiochem
Tris	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Serva
Trockenmilch	Carnation
Tween 20	Sigma-Aldrich
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-indoyl-β-D-galactopyranosid)	Promega

3.1.2 Proteinase - Inhibitoren

Die Inhibitoren wurden von den Firmen Sigma oder Roche bezogen. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen der angewendeten Endkonzentration.

Benzamidin	5 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	100 μM
Proteinase-Inhibitor „Cocktail“:	
Complete™ EDTA free	Roche Mannheim

3.1.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Promega, MBI Fermentas, New England Biolabs, Stratagene
---------------------------	--

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP)	Roche Mannheim
T4 DNA-Ligase	Roche Mannheim
Lysozym	Sigma-Aldrich
Cloned Pfu-Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Roche Mannheim
RNase A	Qiagen
RNase H	Gibco BRL
Taq-Polymerase	Perkin-Elmer

3.1.4 Seren und Antikörper

Folgende Primärantikörper wurden verwendet: mAK steht für monoklonaler Antikörper (aus Maus) und pAK steht für polyklonaler Antikörper (aus Kaninchen). Aufgelistet sind die Antigene, gegen die die Antikörper gerichtet sind.

Actin (mAk 224-236-1)	Dr. G. Gerisch, MPI für Biochemie, Martiensried
Arp3 (pAk)	Dr. R. Insall, Birmingham
Coronin (mAk 176-306-3)	Dr. G. Gerisch, MPI für Biochemie, Martiensried
Dynamin (pAk)	Dr. D.J. Manstein, MPI für med. Forschung, Heidelberg
GST (pAk)	Sigma-Aldrich
MyoK (pAk)	Dr. T. Soldati, Imperial College, London
Myosin II (mAk 56-396-5)	„
Profilin I (mAk 153-246-10)	Dr. M. Schleicher, Universität München
Profilin II (mAk 174-380-3)	„
Ty1 (mAk)	
His (mAk)	Qiagen
Sekundärantikörper	
Ziege-anti-Maus IgG Alexa488-Konjugat	Molecular Probes
Ziege-anti-Kaninchen IgG Cy3-Konjugat	Rockland
Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen	Bio-Rad
Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus	„

3.1.5 Antibiotika

<u>Antibiotikum</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Kultur</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Ampicillin	100 µg/ml	<i>E. coli</i>	Sigma
Kanamycindisulfat	50 µg/ml	<i>E. coli</i>	Sigma
Tetracyclin	50 µg/ml	<i>E. coli</i>	Sigma
Blasticidin S	10 µg/ml	<i>D. discoideum</i>	Calbiochem
Geneticin (G418)	10 µg/ml	<i>D. discoideum</i>	GibcoBRL
Penicillin (10000U/ml)/	100 U/ml	<i>D. discoideum</i>	GibcoBRL
Streptomycin (10000 µg/ml)	100 µg/ml		

3.1.6 Vektoren

pBluescript SKII	Stratagene
pCR-Script	Stratagene
pDX-HVTS	Dr. T. Soldati; Imperial College, London
pDXA-HC	Dr. D. Manstein; MPI Heidelberg
pDD-GSTII	Dr. D. Manstein; MPI Heidelberg
pGEX-3X	Pharmacia Biotech

3.1.7 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue (Stratagene) recA1 gyrA46 thi-1
hsdR17 supE44 relA1 lac,
{F' {proAB⁺, lacI^q, LacZ DM15, Tn10(tet^R)}}

E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene) ?(mcrA)183
?(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1
supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac
{F' proAB⁺, lacI^q, LacZ ? M15, Tn10(tet^R)}

E. coli BL21(DE3) (Novagen) F⁻ ompT
hdsS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)

Klebsiella aerogenes

3.1.8 Eukaryontische Zelllinien

Dictyostelium discoideum AX2 und AX3 (axenische Stämme), Prof. Dr. G. Gerisch (MPI Martinsried)

3.2 Allgemein verwendete Puffer, Lösungen und Medien

3.2.1 Puffer und Lösungen

Laemmli-Probenpuffer (3x)	125 mM 30% 3% 300 mM	Tris-HCl, pH 6,8 Glycerol SDS DTT
Ponceau S (100 ml) (10x)	2 g 30 g 30 g	Ponceau S TCA Sulfosalicylsäure
PBS pH 7,2	171 mM 3,4 mM 1,8 mM 10 mM	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄
Sørensen-Puffer (pH 6,0)	14,7mM 2 mM	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄
TBS	20 mM 150 mM	Tris-HCl, pH 7,4 NaCl
40x TAE	1,6 M 80 mM	Tris/NaOAc, pH 8,0 EDTA
5x TBE	450 mM 10 mM	Tris/Borat, pH 8,0 EDTA
1x TE	10 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA
Elektroporations- (EP) –Puffer, pH 6,2	10 mM 50 mM	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ Saccharose
TEDABP, pH 8,0	10 mM 1 mM 1 mM 0.02 % 1 mM 0.5 mM	Tris/Cl EGTA DTT NaN ₃ Benzamidin PMSF

3.2.2 Medien für die Bakterien- und Zellkultur

DDSM/2-Agar (1 L) (pH 6,4)	5 g 5 g 5 g 0,5 g 0,85 g 0,5 g 20 g	Glucose•H ₂ O Bacto Pepton Bacto Hefe-Extrakt MgSO ₄ •7 H ₂ O KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ Bacto Agar
HL-5c Medium (1 L) (pH 6,5)	5 g 2,5 g 2,5 g 5 g 10 g 1,2 g 0,35 g	Bacto Hefe-Extrakt Bacto Trypton Pepton aus Casein Proteasepepton D-Glucose KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄
LB-Medium (1 L)	10 g 5 g 10 g	Bacto Trypton Bacto Hefe-Extrakt NaCl
LB-Agar	1,5%	Agar in LB-Medium
MES-Hungerpuffer (pH 6,8)	20 mM 2 mM 0,2 mM	MES-Puffer MgCl ₂ CaCl ₂
Hunger-Platten	2%	Agar in MES-Hungerpuffer
Top-Agarose (100 ml)	1 g 0,5 g 0,7 g	Bacto Trypton NaCl Agarose
nach Autoklavieren	1 ml	1 M MgSO ₄ zugeben

3.3 Gentechnische Arbeiten mit *Escherichia coli*

Die in Abschnitt 3.3 und 3.4 beschriebenen Methoden sind, sofern nicht anders vermerkt, den Laborhandbüchern von Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1992) entnommen.

3.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Zur Anzucht von Bakterien wurde LB-Medium in Glas-Erlenmeyerkolben oder LB-Agarplatten unter den geforderten Selektionsbedingungen mit Glycerinkulturen des gewünschten *E. coli* Stammes angeimpft. Ampicillin und Tetrazyklin wurden in Konzentrationen von 150 µg/ml bzw. 12,5 µg/ml eingesetzt. Um Rearrangements oder Deletionen der AT-reichen *D. discoideum*-DNA durch die Bakterien zu verhindern, wurden Flüssigkulturen (geschüttelt mit 230 - 240 rpm) sowie Agarplatten bei 30°C inkubiert, weil die Bakterien bei niedrigerer Umgebungstemperatur weniger stoffwechselaktiv sind.

Zur längerfristigen Konservierung wurden von den Stämmen Glycerinkulturen angelegt, indem 1,7 ml dichte Bakteriensuspension mit 0,3 ml sterilem Glycerin (86%) gemischt und sofort schockgefroren wurden. Die Glycerinkulturen wurden bei -80°C gelagert.

3.3.2 Herstellung elektroporationskompetenter Zellen

1 l LB-Medium (+ 12,5 µg / ml Tetracyclin) wurde mit 5 ml ÜNK von *E. coli* angeimpft und unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5 - 0,9$ wachsen gelassen. Nach 15 min Abkühlung auf Eis wurde die Kultur 15 min bei 6000 rpm (Beckman JA-10 Rotor), 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dreimal in eiskaltem bidest. H₂O gewaschen (1 l; 500 ml; 50 ml) und schließlich in 2 ml 10% Glycerol aufgenommen. Aliquots von 85 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz der elektroporationskompetenten Zellen wurde durch Transformation mit pUC18-Vektor überprüft und lag je nach Präparation bei $0,5 - 1 \times 10^8$ Kolonien/µg DNA.

3.3.3 Transformation durch Elektroporation

Für jeden Transformationsansatz wurden 40 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl eines 10 µl-Ligationsansatzes oder einer verdünnten Plasmid-DNA-Lösung versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in eine sterile, vorgekühlte Elektroporations-Küvette (Spaltbreite 0,2 cm) pipettiert, sofort in das Elektroporationsgerät eingesetzt und ein Puls von 2,0 kV bei einem Widerstand von 72 Ω appliziert (resultierende Pulslänge 4,3 - 4,6 msec). Unmittelbar danach wurde 1 ml kaltes LB-Medium zugegeben, die Zellsuspension aus der Küvette in ein Reagenzglas überführt und unter Schütteln 1 h bei 30°C inkubiert. Jeweils 200 µl - 1 ml wurden auf selektive Medien ausplattiert und bei 30°C solange inkubiert, bis Bakterienkolonien sichtbar wurden (36 - 48 h).

3.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Mini- und Maxi-Präparationen (Aufarbeitung von 3 ml bzw. 100 - 500 ml (je nach Kopienanzahl des Plasmids) ÜNK) durchgeführt. ÜNK wurden mit Einzelklonen aus einer Transformation oder Material aus Glycerin-Dauerkulturen angeimpft und 12 - 16 h bei 30°C unter Schütteln gezogen.

Mini-Präparationen wurden nach der CTAB-Methode durchgeführt. Von einer dichten Kultur wurden zweimal 1.5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 3 min bei 6000 rpm in einer Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 207 µl Lysispuffer gut resuspendiert. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT wurde die Suspension 60 sec im Wasserbad gekocht und anschließend 10 min zentrifugiert. Das zähe Pellet aus Zelltrümmern, denaturiertem Protein und chromosomaler DNA wurde mit einem Zahnstocher entfernt. Zum Überstand wurden 8 µl CTAB-Lösung (5% w/v Hexadecyl-trimethyl-ammoniumbromid in 0,5 M NaCl) pipettiert, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Der dabei entstehende feinflockige Niederschlag wurde 1 min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und nach Abziehen des Überstands in 300 µl 1,2 M NaCl gelöst. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 750 µl absoluten Ethanol und mindestens 15 min Inkubation bei -80°C wieder gefällt und 30 min bei 4°C in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde einmal mit 80% Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 20 µl 1x TE aufgenommen.

Lysispuffer:

2,4 ml STET-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0;
50 mM EDTA; 8% Saccharose; 0,1% Triton-
X100)

60 µl Lysozym	(50 mg/ml in 50 mM Tris-HCl pH 8,0)
30 µl RNase A	(20 mg/ml)

Für die Extraktion im größeren Maßstab wurde ein kommerzielles Kit (Plasmid Maxi-Kit, Qiagen) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Präparationsmethode beruht auf Anionenaustausch-Chromatographie der Plasmid-DNA nach alkalischer Lyse der Bakterien und Abzentrifugation von denaturierten Proteinen und chromosomaler DNA.

Je nach gefordertem Reinheitsgrad der Plasmid-DNA wurde die Säulenchromatographie im Protokoll durch eine Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-EtBr-Dichtegradienten ersetzt. Dazu der Überstand aus der 30 minütigen Zentrifugation des neutralisierten Bakterienlysats durch eine Lage Mull in ein 50 ml Röhrchen gegeben, in dem 21 ml Isopropanol vorgelegt waren. Nach kurzem Mischen wurde für 30 min bei 10,000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Sediment in 2 ml TE gelöst. Zu der Lösung wurden 5 g CsCl und 200 µl EtBr (10 mg/ml) gegeben und gut gemischt. Die Probe wurde in 'Quick-Seal' Röhrchen über Nacht bei 55000 rpm, 20°C (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor 75Ti) zentrifugiert. Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden im langwelligen UV-Licht sichtbar gemacht. In der Mitte des Röhrchens waren in der Regel zwei Banden zu erkennen. Die untere Bande, die die supercoiled Plasmid-DNA enthält, wurde mit einer 1 ml-Spritze abgezogen. Anschließend

wurde die DNA-Lösung mit einer CsCl-gesättigten Butanol-Lösung (1 g CsCl/ml H₂O; Butanol : CsCl-Lösung = 1:1) ausgeschüttelt, um das EthBr zu entfernen. Dieser Vorgang wurde sofort wiederholt, bis die Butanolphase farblos blieb. Die DNA wurde aus der wässrigen Phase mit Isopropanol gefällt, einmal mit 70% Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und im gewünschten Volumen 1x TE aufgenommen.

3.4 Präparative und analytische Methoden für Nukleinsäuren

3.4.1 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung von DNA

DNA-Lösungen wurden zur Abtrennung von Proteinen mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt und 10 sec auf dem Vortex-Schüttler durchgemischt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 14.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) für 3 min bei RT beschleunigt. Phenolreste in der wässrigen Phase ließen sich durch anschließende Extraktion mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernen. Die DNA wurde dann aus der wässrigen Phase durch Ethanolfällung präzipitiert. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,5 und 2,5 Volumen Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde mindestens 20 min bei -80°C inkubiert und anschließend 30 min bei 14.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge), 4°C zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 1x TE-Puffer aufgenommen.

3.4.2 Aufreinigung synthetischer Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden vom Syntheselabor in deprotektierter Form geliefert. Die Substanz wurde in 3 ml Loading-Puffer (100 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA) aufgenommen und zur besseren Bindung zweimal hintereinander auf eine mit 10 ml Methanol und 10 ml Wasser gewaschene "sep Pak C18" Kartusche aufgetragen. Nach Waschen mit 20 ml sterilem Wasser wurden die Oligonukleotide mit 2 ml Elutionspuffer (100 mM Triethylaminoacetat pH 7,3, Methanol 1:1) in vier Fraktionen von 0,5 ml eluiert. Aus jeder Fraktion wurde die DNA durch Ethanolfällung gewonnen und in 50 µl 1x TE aufgenommen. Die Fraktionen wurden vereinigt und die Oligonukleotid-Konzentration photometrisch bestimmt.

3.4.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte bei 260 nm gegen TE bzw. Wasser in einer Spezial-Quarzküvette mit 50 µl Fassungsvermögen. Eine optische Dichte von $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von:

50 µg / ml für doppelsträngige DNA

40 µg / ml für RNA und einzelsträngige DNA

33 µg / ml für Oligodesoxynukleotide

Das Verhältnis der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) gibt einen Anhaltspunkt für die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren. Der Quotient liegt zwischen 1,8 und 1,9 für reine DNA-Lösungen und 1,9 bis 2,0 für RNA-Lösungen. Geringere Werte weisen auf eine Kontamination der Präparation durch Proteine hin, da diese bei 280 nm absorbieren.

3.4.4 Amplifizierung von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis, 1986) ist ein Verfahren zur enzymatischen Vervielfältigung kleiner DNA-Mengen. Die eingesetzten Oligonukleotid-Primer, die zu den terminalen Bereichen des zu amplifizierenden DNA-Stücks komplementär sind, können bei Bedarf zusätzliche 5'-Sequenzen, z.B. Restriktionsschnittstellen, enthalten. Sie werden durch dieses Verfahren an die ursprüngliche Sequenz angehängt.

Analytische Reaktionen wurden in einem 20 µl-Ansatz mit Taq-Polymerase (2,5 U/µl, Perkin-Elmer) durchgeführt, präparative je nach bei den Vorversuchen festgestellter Ausbeute in 50 oder 100 µl-Ansätzen mit Pfu DNA-Polymerase (2,5 U/µl, Stratagene), die eine höhere Fehlerkorrektur-Aktivität besitzt. Die Ansätze wurden auf Eis aus folgenden Komponenten zusammenpipettiert und mit sterilem H₂O auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt:

10x PCR-Puffer:	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl mit pH 7,5
10x Cloned Pfu-Puffer:	
200 mM Tris-HCl, pH 8.8	MgCl ₂ -Stammlösung: 25 mM in H ₂ O
100 mM KCl	Endkonzentration 1.5 – 3.5 mM
20 mM MgSO ₄	
100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	dNTP-Mix (Pharmacia Biotech)
1% Triton X-100	je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
1 mg/ml BSA	Endkonzentration je 200 µM
Primer-Stammlösung: 10 µM	Matrizen-DNA: 1 – 100 ng Plasmid-DNA
Endkonzentration je 0.1 µM	100 – 250 ng genomische DNA

Zu jedem Experiment wurden Negativkontrollen mit jeweils nur einem der Primer angesetzt. Das unten angeführte Temperatur-Programm wurde mit einem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer Cetus) gefahren. Die Annealing (Primer-Hybridisierungs)-Temperatur wurde je nach Matrizen-Primer-Kombination zwischen 45°C und 55°C gewählt. Die vergleichsweise niedrige Temperatur für die Strangverlängerung, 62°C statt wie üblich 72°C, hat sich als vorteilhaft für die Amplifizierung AT-reicher DNA herausgestellt (Su *et al.*, 1996).

	Erstmaliges Aufschmelzen	5 min	95°C
	Aufschmelzen	30 sec	95°C
30 - 40 Zyklen	Primer-Hybridisierung	30 sec	45 - 55°C
	Strangverlängerung	1 - 3 min	62°C
	Abschließende Verlängerung	5 - 7 min	62°C

3.4.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Ein Zehntel jedes Reaktionsansatzes wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese auf Reinheit und Ausbeute überprüft. Wenn Nebenprodukte entstanden waren, wurde das gewünschte Produkt mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Elektroelution isoliert. Reine PCR-Produkte wurden durch Chromatographie an vorgefertigten Zentrifugationssäulen (QIAquick-spin PCR Purification Kit, Qiagen) von überschüssigen Nukleotiden, Primern und Enzymen abgetrennt.

3.4.6 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde unter den Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt, die der jeweilige Hersteller (Promega, MBI Fermentas, Oncor Appligene, Stratagene, New England Biolabs) für die Enzyme vorgab. Für analytische Zwecke wurden 0,7 - 1 µg DNA in 10 µl Endvolumen restringiert. In präparativen Ansätzen wurden gewöhnlich 10 - 20 µg eines Konstrukts in einem Volumen von 40-60 µl verdaut. Nach Zugabe von ca. 2-3 U/µg DNA Restriktionsendonuklease(n), höchstens jedoch 10% des Reaktionsvolumens, wurde 1-2 h bei der angegebenen Temperatur (i.d.R. 37°C) inkubiert. Die DNA wurde anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

Auf eine Hitzedenaturierung der Enzyme wurde aufgrund der Temperatur-Empfindlichkeit der *D. discoideum*-DNA verzichtet; wenn notwendig, wurden die Enzyme im Ansatz durch Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanol-Fällung inaktiviert.

3.4.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA wurde in horizontalen Agarosegelen in Gegenwart von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Agarosekonzentration betrug je nach gewünschtem Auflösungsbereich zwischen 0,6% und 2% Agarose (ultraPURE, Gibco-BRL) wurde in 1x TAE durch Kochen gelöst, auf ca. 50°C abgekühlt, mit 5 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid je 100 ml Gellösung versetzt und in eine Gelwanne mit eingehängtem Teflonkamm (Hoefer und Gibco-BRL) gegossen. Nach Entfernen des Kamms wurde das Gel in die Elektrophoresekammer (MPI, Werkstatt) gelegt und knapp mit Elektrophoresepuffer (1x TAE) überschichtet.

Der DNA-Ansatz wurde mit 6x DNA-Auftragspuffer (Promega) gemischt und in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von $U = 60 - 100 \text{ V}$. Die DNA wurde anschließend auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht und fotografiert. Als Größenstandard wurden EcoRI / HindIII fragmentierte Lambda-DNA (Promega), die "1 kb ladder" (Invitrogen) oder die "100 bp Ladder" (Invitrogen) verwendet.

3.4.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Für *D.discoideum*-DNA mit ihrer extrem niedrigen Schmelztemperatur hat sich Elektroelution als geeignete Methode zur Aufreinigung aus Agarosegelen herausgestellt.

Die Salzfalle wurde zuvor über Nacht in 5%iger Essigsäure eingeweicht und dann gut gespült, um Nukleinsäuren aus vorherigen Präparationen zu entfernen. Die Apparatur wurde bis zur Oberkante des mittigen Plexiglas-Blocks mit kaltem 0,5x TBE-Puffer gefüllt. Die gewünschte DNA-Banden wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, fein zerteilt und in die Vertiefungen des Plexiglas-Blocks überführt. Dann wurden die einmündenden Dreiecks-Schenkel vorsichtig mit 150 μl 10 M Ammoniumacetat (pH 7), gefärbt mit Bromphenolblau, befüllt. Bei einer angelegten Spannung von 180V wandert die DNA aus den Gelstücken in das Ammoniumacetatkissen, wo aufgrund der hohen Ionenkonzentration ihre Migrationsgeschwindigkeit deutlich absinkt. Nach 1 h wurde das Eluat (ca. 200 μl) mit einer 1 ml-Spritze entnommen und mit Wasser auf 600 μl aufgefüllt. Aus dieser Lösung wurde die DNA durch Zugabe von 1,5 ml kaltem Ethanol ausgefällt, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE oder Wasser aufgenommen.

3.4.9 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung von Religation wurde der Phosphatrest an den 5'-Enden restringierter Vektor-DNA enzymatisch entfernt. Hierzu wurden 0,1 - 10 pmol DNA bei 37°C für 10 min im Volumen von 10 μl mit 0,5 U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm in 1x CIAP-Puffer (des Herstellers) inkubiert. Vor Einsetzen der behandelten DNA in die Ligation wurde das Enzym durch Phenol-Extraktion und anschließende Ethanolfällung entfernt.

3.4.10 Ligation

Für eine Ligation im 10 - 20 μl -Ansatz wurden 50 - 100 ng Vektor mit einem zwei- bis vierfachen molaren Überschuß des DNA-Fragments gemischt, das berechnete Volumen an Wasser zugesetzt und für 5 min bei 45°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden 1 μl 10x Ligasepuffer (660 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl_2 , 100 mM DTT, 10 mM ATP) und 0,5 μl 1 U/ μl T4-DNA-Ligase (Roche Mannheim) zugegeben und der Ansatz 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Ligationen mit glatten Enden wurden in Gegenwart von 1,5 μM Hexamincobaltchlorid durchgeführt. Vor der Elektroporation wurde die DNA mit n-Butanol gefällt (Williamson und Slocum, 1993), getrocknet und in 5 μl Wasser aufgenommen. Davon wurden 2 μl für die Elektroporation eingesetzt.

3.4.11 Der „Blau/Weiß-Test“ zur Identifizierung rekombinanter Plasmide

Die transformierten Zellen wurden auf LB-Platten (mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion) ausplattiert. Für den Blau/Weiß-Test wurde den Zellen kurz vor dem Ausplattieren 3,4 µl 1 M IPTG und 16 µl X-Gal zugesetzt. Das X-Gal ist in für die Bakterien toxischem Formaldehyd gelöst. Die Bakterien wurden deswegen sofort nach Zugabe ausplattiert auf einer 10 cm große LB-Platte (ungefähr 30 ml LB/Agar) ausplattiert. Kolonien, die ein rekombinantes Plasmid tragen, sollten der Theorie nach weiß werden, und die, die keines nur das Plasmid enthalten sollten sich blau anfärben (Horwitz *et al.*, 1966).

3.4.12 Sequenzanalyse von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden auf einem automatischen Sequenzierer (ABI 377, Applied Biosystems) durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion und die angeschlossene Probenaufarbeitung erfolgte nach dem Protokoll des "PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems). Ein Ansatz enthielt 0,5 µg Plasmid-DNA (bei einem Plasmid von 5 kb, entsprechend 0,15 pmol), 5 pmol des gewünschten Sequenzier-Primers und 4 µl Fertigreagenz (Big Dye) in einem Gesamtvolumen von 10 µl.

Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem Temperaturprogramm in einem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer Cetus) durchgeführt:

	Erstmaliges Aufschmelzen	1 min	94°C
25 Zyklen	Aufschmelzen	15 sec	96°C
	Primer-Hybridisierung	15 sec	50 - 60°C
	Strangverlängerung	4 min	60°C
	Abschließende Verlängerung	4 min	60°C

Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und durch Ethanol-fällung aufgereinigt. Dazu wurden sie in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 10 µl Wasser, 2 µl 3 M Natriumacetat pH 5 sowie 50 µl Ethanol versetzt und anschließend 20 min bei 14.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge), 4°C zentrifugiert. Der DNA-Niederschlag wurde einmal mit kaltem 70%igen Ethanol gewaschen, kurz in der Speed-Vac getrocknet und zur Sequenzierungs-Einrichtung des Instituts gebracht.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Kultur und Ernte von *D. discoideum*

Als Wildtyp wurde der fakultativ axenische Stamm AX2 verwendet. Er ist in HL-5c Medium bei RT (20 - 23°C) auf Substraten (in Petrischalen) kultivierbar. Zur Dauerkultur auf Platten waren die Zellen etwa alle drei Tage 1:20 in frisches Medium umzusetzen. In Schüttelkultur (190 rpm) wurden die Zellen in Dichten zwischen 10^5 - 10^7 Zellen/ml gehalten.

Zur Kultur auf Bakterien wurde eine ÜNK von *Klebsiella aerogenes* in LB-Medium gezogen, zweimal mit Sørensen-Puffer gewaschen und mit Sørensen-Puffer auf das ursprüngliche Volumen resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit *D. discoideum* zu einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml angeimpft und wie axenische Kulturen bei 190 rpm, 23°C geschüttelt. Die Verdopplungszeit sinkt unter diesen Bedingungen von 8 - 9 h auf 3 - 4 h; bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml beginnen die Zellen zu verklumpen.

Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation bei 500 - 800g, 4°C geerntet. Bei dieser Geschwindigkeit sedimentieren Bakterienzellen kaum und lassen sich so durch mehrmaliges Waschen des Pellets gut von den Protozoen entfernen. Die niedrige Temperatur verlangsamt den Stoffwechsel der Protozoen, wodurch deren Sauerstoffbedarf abnimmt. Die Mangelversorgung der Zellen im Pellet erweist sich demnach als weniger gravierend.

3.5.2 Konservierung von *D. discoideum* Stämmen

3.5.2.1 Konservierung von Zellen

Die Zellen einer konfluenten Kulturschale von 10 cm Durchmesser (ca. 2×10^7) wurden mit Sørensen-Puffer abgespült und bei 500 g, 4°C für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in kaltem Einfriermedium (HL-5c/10% DMSO) auf eine Dichte von ca. 1×10^7 Zellen/ml resuspendiert und in Cryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox („Cryoman“, Nalgene) bei -80°C bei einer kontrollierten Abkühlrate von ca 1°C/min eingefroren und langfristig bei -140°C gelagert.

Eingefrorene Zellen wurden zur Rekultivierung im Wasserbad bei RT zügig aufgetaut und in eine Petrischale mit 20 ml HL-5c überführt. Das Medium wurde nach einer Stunde, während der intakte Zellen absitzen konnten, und weiterhin alle 24 h gewechselt, bis die Zellen etwa 50% Konfluenz erreicht hatten.

3.5.2.2 Konservierung von Sporen

Bei Nährstoffmangel formieren sich *Dictyostelium*-Zellen zu einem Pseudoplasmodium aus etwa 10^5 Zellen. Das Zellaggregat differenziert in einen aus Stiel und Köpfchen bestehenden Fruchtkörper, in dem Sporen heranreifen. Die Sporen sind bei geeigneter Lagerung (s.u.) mehrere Jahre haltbar und haben als Konservierungsform gegenüber der Cryokonservierung von Zellen den Vorteil, daß sie bei Rekultivierung wieder schnell auskeimen.

Zellen aus axenischer Schüttelkultur mit einer Dichte von höchstens 5×10^6 Zellen/ml wurden bei 500 g, 4°C für 6 min zentrifugiert, zweimal mit kaltem Sørensen-Puffer gewaschen und in Sørensen-Puffer zu einer Dichte von $1,2 \times 10^8$ Zellen/ml resuspendiert. Je 1 ml dieser Suspension wurde auf Hungerplatten gegeben und ohne Deckel in der Sterilbank für 1-2 h inkubiert, um die Zellen absitzen zu lassen. Die Platten wurden mit dem Deckel nach unten für 2-3 Tage bei RT in einer geschlossenen Kiste inkubiert, um die Austrocknung der Platten zu vermeiden. Für die Ernte wurden die Agarplatten auf die Arbeitsplatte geschlagen, so daß die reifen Sporen in den Deckel fallen. Diese wurden dann mit Sørensen-Puffer in ein Röhrchen gespült, auf eine Dichte von 1×10^7 Sporen/ml eingestellt und in Einfrierröhrchen aliquotiert. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Sporen bei -140°C aufbewahrt.

3.5.3 Transformation und Selektion

Zellen aus einer frisch angesetzten Schüttelkultur wurden 3 min bei 1600 rpm zentrifugiert, zweimal mit dem gleichen Volumen kaltem Elektroporations-Puffer (10 mM K_2HPO_4 , 10 mM KH_2PO_4 , 50 mM Saccharose; pH 6,2) gewaschen und auf eine Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml resuspendiert. Je 400 µl der Zellsuspension wurden mit 20 - 40 µg DNA in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (0,2 cm Spaltbreite) überführt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Wandung wieder aufgewirbelt und bei einer Spannung von 0,68 kV ($R = 24 \text{ ?}$) elektroporiert. Diese Bedingungen erzeugen Pulse von 0,9-1,0 ms. Die Küvetten wurden anschließend sofort für 10 min auf Eis gestellt. Ein Ansatz wurde auf zwei Petrischalen mit je 10 ml HL-5c verteilt. Nach einer Erholungsphase von etwa 24 h wurde mit der Selektion durch Zusatz von 10 µg/ml Blasticidin S bzw. G 418 in das Medium begonnen. Ab dem zweiten Tag wurde die Antibiotikum-Konzentration auf 5 µg/ml herabgesetzt. Zur Entfernung toter Zellen wurde das Selektivmedium in Abständen von 1 bis 2 Tagen erneuert. Erste Kolonien waren nach frühestens einer Woche erkennbar.

3.5.4 Vereinzlung von Transformanden

In einer Kulturschale mit sichtbaren Kolonien wurde das Medium vorsichtig gewechselt. Von einzelnen Kolonien wurden unter Beobachtung durch das Mikroskop mit einer Pipette 50 µl durch rasches Aufziehen abgesaugt und die aufgenommenen Zellen in kleine Zellkulturschalen (3,5 cm Durchmesser) mit 2 ml Selektivmedium überführt. Nach einigen Tagen waren die Platten konfluent. Vom Boden der Schalen wurden dann 50 µl abgesaugt, mit 200 µl einer dichten *K. aerogenes*-Suspension vermischt und auf DDSM/2-Platten verteilt. Die Platten wurden mit Deckel nach unten im Dunkeln bei RT aufbewahrt. Nach 3 - 4 Tagen waren erste Plaques im Zellrasen sichtbar. Vegetative Zellen dieser Klone wurden vom Rand der Plaques, wo noch hinreichend Bakterien als Nahrungsquelle zur Verfügung stehen, gewonnen und in kleinen Petrischalen mit Selektivmedium herangezogen.

3.5.5 Mikroskopische Techniken

3.5.5.1 Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz

Durch Immunfluoreszenz kann die Expression und die zelluläre Lokalisierung eines Proteins in fixierten Zellen oder Geweben unmittelbar durch Betrachtung unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Nach der Vorbehandlung der Zellen (Fixieren/Permeabilisieren) werden sie mit einem für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper inkubiert. In einem zweiten Schritt wird an diesen ein zweiter Antikörper gebunden, an den ein Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt ist. Durch Betrachtung mit Licht der geeigneten Wellenlänge kann man die fluoreszierenden Immunkomplexe in den Zellen erkennen.

Die Fixierung erfolgte nach der EFMF-Cryofixationsmethode (Neuhaus *et al.*, 1998). Kulturschalen, in die Ø 12 mm-Deckgläschen vorgelegt waren, wurden mit *D. discoideum*-Zellen bis etwa 50% Konfluenz bewachsen. Die Deckgläschen wurden mit einer Pinzette herausgenommen, kurz auf einem Kleenex-Tuch abgetupft und dann sofort in -85°C-kaltes Methanol mit einem Winkel von ca. 15° aus der Vertikalen getaucht. Nach kontrollierter Erwärmung auf -35°C (2°C / min) wurden die Deckgläschen herausgenommen und mit PBS vorsichtig gewaschen, um restliches Methanol zu entfernen. Nach einer Inkubationszeit von 15 min in PBS wurden die Deckgläschen für weitere 15 min in PBS + 0,2% Gelatine blockiert. Der Erst-Antikörper wurde im gleichen Puffer verdünnt, als Tropfen auf die Deckgläschen gegeben und in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT mit den Zellen inkubiert. Nach dreimaligen Waschen für je 5 min in PBS wurde der verdünnte (1 : 500) Zweit-Antikörper aufgetragen und ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde zweimal in PBS gewaschen und eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt (DAPI Konzentration 1 µg/ml). Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Mowiol bzw. Prolong eingedeckt und im Luftstrom eines Abzugs vollständig ausgehärtet. Die Präparate wurden bei 4°C im Dunklen aufbewahrt. Die mikroskopische Betrachtung erfolgte am Axiophot und Axiovert (Zeiss), oder mit einem konfokalen Mikroskop (Leica confocal microscope DM/IRB).

3.5.5.2 Elektronenmikroskopie: Dekoration von Actin-Filamenten

Nativer gereinigter GST-GPR-Loop wurde gegen KMT-Puffer dialysiert und auf eine Konzentration von 2mg/ml eingengt. GPR-Loop wurde mit F-Actin aus Kaninchenmuskel in einem molaren Verhältnis von 1:3 und 1:6 gemischt.

KMT-Puffer: 20 mM Tris
2 mM MgCl₂
50 mM KCl pH 7,4

Das Mischen von GPR-Loop mit Actin wurde in unterschiedliche Weise ausgeführt: Zum einen wurde erst F-Actin auf das *grid* aufgebracht und danach die GPR-Loop Lösung zugegeben. Überschüssige Lösung wurde vorsichtig abgesaugt. Zum anderen wurden beide Proteine erst in einer Küvette vorgemischt und dann auf das *grid* gebracht. Anschließend erfolgte die Färbung mit 2% Uranylacetat (*negative staining*). Das saure

Uranylacetat fixiert über Quervernetzung (*cross linking*). Die *grids* wurden mit einem Philips 400 T TEM untersucht. (Die EM wurde freundlicherweise von Dr. Heiko Stegmann (MPI, Heidelberg) durchgeführt).

3.5.6 Triton unlösliches „rigor“ Cytoskelett

Das in Triton X-100 unlösliche Cytoskelett wurde hergestellt wie bei (Manstein und Hunt, 1995) beschrieben, und wie folgt modifiziert: 2×10^8 Zellen wurden für jeden Ansatz verwendet, für die Kosedimentation mit Actin und für die Freisetzung der Myosine von Actin durch Zugabe von ATP. Die Zellen wurden in Soerensen gewaschen und mit $500 \times g$ 10 min bei $2^\circ C$ zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 4 ml Puffer A (50 mM Tris/Cl pH 8,1, 2,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM Benzamidin und der Cocktail aus Proteinase Inhibitoren, vgl. 3.1.2) und 0,04 % NaN_3 gewaschen und wiederum zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1,5 ml Puffer A und 5 U alkalischer Phosphatase (Roche Mannheim) resuspendiert und durch Zugabe der gleichen Menge Puffer und 1% Triton X-100 lysiert. Der Ansatz wurde 10 min bei RT und 1 h auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde 15 min mit $280000 \times g$ zentrifugiert, und das Sediment wurde in dem gleichen Puffer, aber ohne NaN_3 gewaschen. Um sicherzustellen, daß die Kosedimentation mit Actin ATP-abhängig ist, wurde ein weiterer Ansatz ohne NaN_3 oder alkalische Phosphatase, aber in Anwesenheit von 10 mM Mg-ATP und einem ATP-regenerierenden System (25 U/ml Creatin Phosphokinase (CPK, Sigma) und 20 mM Creatinphosphat) parallel behandelt.

Die Freisetzung der Myosine von Actin in Abhängigkeit von ATP wurde getestet, indem die Sedimente nach Ultrazentrifugation (siehe oben) in vier verschiedenen Bedingungen resuspendiert wurden. Dafür wurden 200 μl Puffer R verwendet (Puffer A und 10 mM ATP) mit den folgenden Zusätzen: a) nichts, b) 250 mM NaCl, c) 1% Triton-X100, d) 250 mM NaCl und 1% Triton-X100. Die Proben wurden 10 min mit $435000 \times g$ bei $2^\circ C$ zentrifugiert. Die ATP-abhängige Freisetzung wurde wiederholt, und die Überstände von beiden Zentrifugationen wurden vereint. Die verschiedenen Sedimente und Überstände wurden mittels Western Blotting analysiert.

3.5.7 Fraktionierung von *D. discoideum* Zellen in Cytosol und Membranen

Zum Verdau von Bakterien und Hefen, die im natürlichen Lebensraum die Hauptnahrungsquelle darstellen, besitzt *D. discoideum* eine hohe Konzentration an hydrolytischen Enzymen. Aus diesem Grund wurden bei der Herstellung von Extrakten aus *D. discoideum* die Zellen schonend durch Scherung aufgebrochen, um die Lysosomen möglichst intakt zu erhalten, sowie ein Cocktail aus Protease-Inhibitoren zugegeben.

Verwendete Protease-Inhibitoren: CompleteTM EDTA free

Die Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur wurden mit kaltem HESES-Puffer (20 mM Hepes-KOH, pH 7,2, 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 1mM DTT) gewaschen und dann in

4 ml Lysepuffer pro 10^9 Zellen resuspendiert (Lysepuffer = HESES⁺⁺: 20 mM Hepes-KOH, pH 7,2, 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10mM ATP, 10 mM MgCl₂, 0.1 M KCl). Die Zellen wurden durch 8-10 Passagen in einem Ball-Homogenisator (Ø 8,020 mm mit Ø 8,010 mm-Kugel) auf Eis aufgebrochen. Der postnukleäre Überstand aus der anschließenden Zentrifugation (3 min bei 800xg, 4°C) wurde zur Abtrennung aller vesikulären Bestandteile 40 min bei 100.000 rpm (400.000 g), 2°C ultrazentrifugiert (TL 100.4-Rotor, Tisch-Ultrazentrifuge; Beckman). Die daraus resultierende klare Cytosolfraktion wurde sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Die sedimentierten Membranen wurden im gleichen Volumen HESES⁺⁺ resuspendiert und ebenfalls schockgefroren.

3.6 Proteinchemische Methoden

3.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden nach ihrem apparenten Molekulargewicht durch denaturierende diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) in vertikalen Kammern (Bio-Rad) aufgetrennt. Je nach zu betrachtenden Molekulargewichtsbereich wurden Gele mit 5 – 15 % Polyacrylamid verwendet. Die auspolymerisierten Gele wurden mit Elektrophorese-Laufpuffer (33 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1% SDS; pH 6,8) überschichtet, die Proteinproben in Laemmli-Probenpuffer 3 min bei 95°C denaturiert und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Stromstärke von $I = 15$ mA/Gel gestartet. Sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hatten, wurde die Stromstärke auf $I = 20$ mA/Gel erhöht. Als Größenstandards kamen folgende kommerzielle Präparationen (SDS-PAGE Standards, Bio-Rad) zum Einsatz:

I. Broad Range*

Myosin, 200 kDa; β -Galactosidase, 116,3 kDa; Phosphorylase B, 97,4 kDa;
Serumalbumin, 66,2 kDa; Ovalbumin, 45 kDa; Carbonatanhydrase, 31 kDa; Trypsin
Inhibitor, 21,5 kDa; Lysozym 14,4 kDa; Aprotinin, 6,5 kDa

II. Prestained, High Range*

Myosin, 207 kDa; β -Galactosidase, 120 kDa; Serumalbumin, 78 kDa; Ovalbumin, 47 kD

III. Prestained, Low Range*

Phosphorylase B, 103 kDa; Serumalbumin, 76 kDa; Ovalbumin, 49 kDa;
Carbonatanhydrase, 33,2 kDa; Trypsin Inhibitor, 28 kDa; Lysozym 19,9 kDa

* Der kovalent an die Proteine gekoppelte Farbstoff erhöht deren apparentes Molekulargewicht in SDS-PAGE. Je nach Effizienz der Kopplungsreaktion kann das Molekulargewicht von Charge zu Charge um ± 5 kDa abweichen.

3.6.2 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel in Coomassie-Färbelösung (50% Methanol, 10% Essigsäure, 0,125% Coomassie Brilliant Blue R-250) gelegt und über Nacht geschüttelt. Zum Entfärben wurde die gleiche Lösung ohne Coomassie Blue verwendet. Anschließend wurde das Gel zusammen mit zwei Cellophan-Folien 30 min in Geltrocknungslösung (40% Methanol, 10% Glycerin, 5% Essigsäure) getränkt und dann zwischen den Folien in einen Trockenrahmen eingespannt.

3.6.3 Proteintransfer und Immunfärbung auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)

Proteine wurden von Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose-Membran (Protran 0,45 μm , Schleicher & Schüll) in einer Tankblot-Apparatur (Bio-Rad; Puffer: 25 mM Tris, 144 mM Glycin, 20% Methanol) über Nacht bei 30 V, 4°C transferiert. Die Proteine auf der Membran wurden anschließend durch Färbung mit Ponceau-S sichtbar gemacht. Dieses wurde photographisch dokumentiert, die Membran mit TBST (1x TBS / 0,1% Tween 20) entfärbt und anschließend unspezifische Bindungsstellen durch Übernacht-Inkubation in Blockpuffer (5% Magermilchpulver in TBST) abgeblockt. Der Erst-Antikörper wurde in 3% Milchpulver in TBST spezifisch verdünnt (s. bei Abbildungen) und über Nacht bei 4°C bzw. 2 h bei RT inkubiert. Nach vier Waschgängen mit TBST wurde eine 1 : 2.000-Verdünnung des Zweit-Antikörpers (Peroxidase-gekoppelter Ziege anti-Maus oder Ziege anti-Kaninchen Antikörper) in 3% Blockpuffer auf die Membran gegeben und 1 - 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde wiederum viermal für 5 min gewaschen, und der Blot mit kommerziell erhältlichen Chemilumineszenz-Reagenzien entsprechend den Herstellerangaben entwickelt (ECL / ECL Plus, Amersham; SuperSignal, Pierce).

Die Filter konnten durch 2x 30 min Inkubation in Stripping-Puffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 1% β -Mercaptoethanol) bei 68°C, gefolgt von 4x Waschen mit TBST, regeneriert werden (Kaufmann et al., 1986). Vor erneuter Entwicklung mit Antikörper mußten die Filter wieder, wie oben beschrieben, blockiert werden.

3.6.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die erste Dimension wurde mit freundlicher Unterstützung des ZMBH Heidelberg von Daniel Gotthardt (MPI für med. Forschung, Heidelberg) durchgeführt.

Die isoelektrische Fokussierung wurde in der IPGphor- bzw. der Multiphor II Kammer (Amersham Pharmacia Biotech) vorgenommen. Es wurden 7 cm lange Streifen mit immobilisierten pH-Gradienten von 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet.

Isoelektrische Fokussierung im IPGphor

Vorteil des IPGphors gegenüber dem Multiphor sind die höhere maximale Spannung (bis 8000 V gegenüber 3500 V) und die voll programmierbare und so automatisch ablaufende Rehydratisierung und Fokussierung, was eine wesentliche Zeitersparnis bringt. Die bei -20°C

gelagerten, getrockneten IPG-Streifen mußten vor der isoelektrischen Fokussierung rehydratisiert werden. Dabei hat man gleichzeitig die Möglichkeit, die aufzutrennende Probe mit in die Streifen quellen zu lassen, was den Vorteil bietet, daß auch verdünnte Proben aufgetragen werden können. Im IPGphor erfolgte die Rehydratisierung unter Spannung (aktive Rehydratisierung). Dabei wurden vor allem hochmolekulare Proteine besser in die Gelmatrix des IPG-Streifens überführt. Die Proben wurden mit Rehydratisierungspuffer auf das entsprechende Volumen aufgefüllt (125 µl für 7 cm-lange Streifen), in das Keramikscheffchen pipettiert und dabei zwischen den Elektroden verteilt. Die Gelstreifen wurden luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten darübergelegt, das angespitzte (anodische) Ende dabei zum angeschrägten Ende des Schiffchens hin, und mit Paraffinöl (IPG Cover fluid) überschichtet. Die Deckel wurden aufgesetzt, und die Elektrodendrähte der Schiffchen über den Elektroden des IPGphors plaziert.

Rehydratisierung und Fokussierung liefen dann nach dem einprogrammierten Spannungsprofil vollautomatisch ab. Fokussierte Streifen konnten direkt equilibriert oder längere Zeit bei -78°C gelagert werden.

Equilibrierung

Bevor die IPG-Streifen in der 2. Dimension aufgetrennt wurden, mußten sie mit SDS beladen und mit DTT und Iodacetamid behandelt werden. Dazu inkubierte man bis zu zwei Streifen zweimal 10 min mit 10 ml Equilibrierungspuffer unter leichtem Schütteln. Beim ersten Mal wurde 0,1 g DTT, beim zweiten Mal 0,46 g Iodacetamid zugesetzt.

Auftrennung in der 2. Dimension

Die Auftrennung in der 2. Dimension erfolgte in vertikalen Polyacrylamid-Tris/Glycin-SDS-Gelen. Nach Anleitung in 3.6.1 wurde die entsprechende Gellösung zusammenpipettiert, nach Zusatz von APS zwischen die Glasplatten bis zu 0,5 cm unter den oberen Rand gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach einer Stunde war das Gel polymerisiert und wurde oben mit dest. Wasser abgespült. Der equilibrierten IPG-Streifens wurde an der Plastikseite kurz mit dest. Wasser abgespült, direkt zwischen den Glasplatten auf das SDS-Gel gelegt und luftblasenfrei mit heißer Agaroselösung (0,8% in dest. Wasser) fixiert. Dabei wurde auch eine Tasche für einen Molekulargewichtsmarker gegossen. Die Auftrennung erfolgte bei 20-30 mA pro Gel, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

3.6.5 Herstellung von Zellextrakten

3.6.5.1 Herstellung von Zellextrakten für die 2D-Gelelektrophorese

Dictyostelium discoideum-Zellen (5×10^6 Zellen) wurden in 250 μ l Lysepuffer resuspendiert und unter ständiger Kühlung bei 4° C durch drei 10sekündige Ultraschallimpulse im Ultraschallbad aufgeschlossen. Um möglichst viele Proteine zu solubilisieren, wurde die Zellsuspension unter gelegentlichem Schütteln 2 h bei RT inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch 60minütiges Ultrazentrifugieren bei 75.000 g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde in Aliquots (3x50ul, 4x25ul) bei -78°C gelagert und sollte nicht zu oft aufgetaut werden (höchstens zweimal). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford-Tests gemessen und sollte bei 2 bis 5 mg/ml liegen.

3.6.5.2 Herstellung von Zellextrakten für Western blotting

D. discoideum Zellen wurden mit 5 ml Sørensen-Puffer in der Petrischale gewaschen, durch kräftiges Klopfen vom Substrat gelöst und mit 1 ml Puffer in ein Eppendorfgefäß überführt, das bis zur Sedimentation der Zellen für 2 min bei 3.000 rpm (4°C) auf Eis aufbewahrt wurde. Zu dem Zellpellet wurden 250 μ l heißer 3x Laemmli-Probenpuffer gegeben, gemischt und für 10 min bei 95°C gekocht. Zur Fragmentierung von genomischer DNA, die das Laufverhalten der Probe beeinträchtigt, wurden die Extrakte nach der Hitzebehandlung für 10 min in ein Ultraschall-Bad gestellt und vor Auftrag auf das Gel 5 min bei RT abzentrifugiert.

3.6.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für Proteinbestimmungen nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) wurde das Protein Assay Kit von Bio-Rad verwendet. Bei Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue an Protein, insbesondere an basische und aromatische Aminosäuren, verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung.

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde an Hand einer BSA-Eichkurve (1-15 μ g/ml) bestimmt. Die Proben wurden mit Wasser auf 800 μ l Endvolumen gebracht. Anschließend wurde 200 μ l Bradford-Lösung (Bio-Rad) zugegeben, kurz gemischt und für ca. 15 min bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte in Plastikküvetten bei 595 nm. Alle Proben wurden in mehreren Verdünnungen gemessen.

3.6.7 TCA (Trichloressigsäure)- Fällung

Die Proteinproben wurden mit 15% TCA (v/v) versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation (15800 x g, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment mit 90% Aceton (v/v) gewaschen (Zugabe von 1 ml Aceton, vortexen, zentrifugieren wie oben und den Überstand absaugen). Das Sediment wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C gekocht.

3.6.8 Pulldown-Experiment

Zur Identifizierung potentieller Liganden eines Proteins wird dieses als GST-Fusionsprotein an Sepharose gekoppelt und mit cytosolischen Extrakten inkubiert. Die Sättigung der Glutathion-Agarose-Beads ist vom Molekulargewicht des GST-Fusionsprotein abhängig (Frangioni & Neel, 1993). GST-GPR-Loop hat ein Molekulargewicht von 43 kDa; an 10 μ l Beads-Suspension binden 2 – 3 μ g des Proteins. Nach diesen Richtlinien wurden 250 μ l Beads-Suspension für die Kopplung von etwa 50 μ g eingesetzt und über Nacht bei 4° C auf einem Roller inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation (3000 UPM, 4 min, 4° C) wurde der Überstand verworfen, die Beads-Suspension zweimal in HESES-Puffer gewaschen und 10 μ l Beads zwecks Überprüfung der Kopplungseffizienz in einer SDS-PAGE überprüft. Anschließend wurde Cytosol aus *D. discoideum* in vierfachem Überschuß zugegeben und mind. 4 Stunden auf einem Roller bei 4° C inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert und dreimal mit HESES-Puffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation erfolgte der erste Elutionsschritt. Dazu wurde poly-L-Prolin in ca. 100fachem molaren Überschuß zugegeben und 30 min bei 4° C leicht bewegt. Es wurde zentrifugiert und der Überstand (das Eluat) sofort mit TCA gefällt. Die Beads wurden wieder dreimal mit HESES gewaschen und abschließend mit 1 M NaCl Endkonzentration eluiert (30 min, 4° C). Der nach der Zentrifugation entnommene Überstand wurde ebenfalls sofort mit TCA gefällt. Nach der Fällung wurden die Proteine in 50 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C gekocht.

3.6.9 Protein-Bindungsassays

Durch die Inkubation eines Western Blot (Blot-Overlay Assay) mit einem Protein als Sonde können bestimmte Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht werden, die keine intakte Faltung des auf der Blotmembran immobilisierten Bindungspartners voraussetzen. Dazu wurden Proteine oder Zellextrakte elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert (siehe 3.6.2 Western Blot) und unspezifische Bindungsstellen mit 5% fettarmer Magermilch in PBS-T abgesättigt. Anschließend wurde ca. 100 μ g Protein-Sonde in PBS zugegeben und mindestens 4 h bis höchstens 12 h bei 4° C inkubiert. Nach einem ausgiebigem Waschschrift (4 x 10 min in PBS-T) folgte die einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper, der gegen das Protein, das als Sonde verwendet wurde, gerichtet war. Nach wiederholtem Waschen in PBS-T wurde mit 0.15% Glutaraldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur (RT) quervernetzt. Stattgefundene Assoziationen und dadurch entstandene Proteinkomplexe sollen somit stabiler werden. Der sekundäre, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper wurde ebenfalls 1 h bei RT inkubiert. Vorhandene Signale konnten mit ECL detektiert werden.

3.7 Methoden zur Proteinaufreinigung

3.7.1 Präparation von Actin aus Acetonpuder (modifiziert nach Spudich)

Das actinhaltige Acetonpuder, das aus Kaninchen-Skelettmuskel gewonnen wurde, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Manstein (Abteilung Biophysik des MPI) zur Verfügung gestellt. 4 g Acetonpuder wurden in 60 ml Puffer A' für 45 min bei 4° C gerührt. Dies führte zur Depolymerisation von Actin. Danach wurde der Extrakt unter Vakuum vorsichtig gefiltert (Abtrennung von Troponin und Tropomyosin) und anschließend bei 4° C und 20.000 UPM zentrifugiert. Zur Polymerisation des Actins wurde zum Überstand 1M KCl und 1 M MgCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 50 mM und 3 mM zugegeben und die Lösung zwei Stunden bei Raumtemperatur langsam gerührt. Die Lösung blieb über Nacht bei 4° C stehen und zur Entfernung von Actin-bindenden Proteinen wurde am nächsten Tag 0.8 M KCl (Endkonzentration) zugegeben. Aus dieser Lösung wurde filamentöses Actin durch 45 minütiges Zentrifugieren (90.000 UPM, 4° C) gewonnen werden. Das F-Actinsediment wurde in 3 ml Puffer A' homogenisiert und anschließend 2 mal für 2 Stunden gegen Puffer A' dialysiert (4° C). Dadurch wurde eine Depolymerisation erwirkt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand (G-Actin) nochmals mit finaler Konzentration von 2 mM MgCl₂ und 50 mM KCl versetzt. Die Lösung wurde zur Polymerisation des Actins erst für 15 min bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4° C inkubiert. Die Reinheit des F-Actins wurde in einer SDS-Gelelektrophorese überprüft. Die Proteinkonzentration betrug 4 mg/ml. Zur Aufbewahrung wurde ein Teil des Actins mit Flüssig-Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Der Rest konnte für ca. zwei Wochen bei 4° C gelagert werden.

Puffer A', pH 8.0:	2	mM	Tris-HCl
	0.5	mM	ATP
	0.5	mM	DTT
	0.2	mM	CaCl ₂
	0.02	%	Na-Azid

3.7.2 Aufreinigung von MyoK

3.7.2.1 Analytische Reinigung von MyoK aus *D. discoideum*

Für die Optimierung der Extraktionsbedingungen und Abschätzung des Expressionsniveaus von rekombinanten Myosinkonstrukten in *D. discoideum* Zellen wurde von Manstein und Hunt (1995) ein analytisches Extraktionsverfahren entwickelt. Dazu wurden 5×10^7 bis 1×10^8 Zellen aus Schüttelkulturen oder Petrischalen geerntet und mit Soerensen Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 600 µl Lysepuffer, dem zusätzlich 2-5 U alkalische Phosphatase und 20 µg/ml RNase A hinzugegeben wurde, resuspendiert und nach Zugabe

von 600 µl Triton-X 100 haltigen Lysepuffer (=1% Triton final) für eine Stunde auf Eis lysiert. Danach wurde zentrifugiert (15.000 UPM, 4° C, 30 min) und das Sediment mit 500 µl Lysepuffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen. Die Extraktion erfolgte durch Zugabe von 500 µl Lysepuffer unter Zusatz von 10 mM ATP und 12 mM MgCl₂ mit Hilfe eines Eppendorf-Pistills. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation (15.000 UPM, 4° C) wurde der Extrakt abgezogen und zur Analyse in einer SDS-Gelelektrophorese mit Probeauftragspuffer versetzt.

Lysepuffer :	50 mM	Tris, pH 8,0
	2 mM	EDTA
	0,2 mM	EGTA
	1 mM	DTT
	5 mM	Benzamidin
	0,02 %	NaN ₃
	0,1 mM	PMSF

3.7.2.2 Präparative Reinigung von MyoK aus *D. discoideum*

MyoK überexprimierende Zellen aus Schüttelkultur wurden bei 800xg und 4° C für 10 min abzentrifugiert, einmal in eiskaltem Soerensen Puffer gewaschen und das Feuchtwicht des Zellsediments bestimmt. Es wurden ca. 9 g Zellen verwendet. Die Zellen wurden in 6 Volumen Lysepuffer unter Zusatz von Hexokinase und Glucose resuspendiert. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurde 5 mal für etwa 5 s mit einem Ultraschallhomogenisator behandelt. Anschließend wurde der Zellsuspension final 1% Triton-X 100 zugegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4° C für 45 min mit . Die Extraktion von MyoK aus dem Sediment, das den unlöslichen Actomyosin-Komplex enthielt erfolgte in 1,6 Volumen Extraktionspuffer mit 10 mM ATP mittels eines Dounce-Homogenisators. Die Suspension wurde für 45 min bei 4° C und 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4° C aufbewahrt und das Sediment erneut mit Extraktionspuffer und ATP homogenisiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurden beide Überstände vereinigt und bei 4° C mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine zuvor mit Niedrigsalzpuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen. Die Säule wurde aufeinanderfolgend mit Niedrigsalz-, Hochsalz- und letztendlich mit Niedrigsalzpuffer, der 20 mM Imidazol enthielt, gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linear aufsteigenden Imidazol-Gradienten von 20 mM bis 100 mM. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 1.5 ml gesammelt und sofort mit einer Amidoschwarzfärbung auf ihren Proteingehalt untersucht. Zur Aufbewahrung bei -80° C wurden die Fraktionen mit 10% Saccharose stabilisiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Extraktionspuffer:	50 mM	Tris, pH 8
	12,5 mM	MgCl ₂
	0,5 M	NaCl
	10 mM	ATP
Protease-Inhibitoren: Complete™ von Roche		
Niedrigsalzpuffer:	50 mM	HEPES, pH 7.3
	30 mM	KaAc
	5 mM	Benzamidin
Hochsalzpuffer:	50 mM	HEPES, pH 7.3
	300 mM	KaAc
	5 mM	Benzamidin

3.7.3 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli*

Zur Expression von rekombinantem Protein wurde das entsprechende Konstrukt frisch in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert und mit einzelnen Kolonien daraus Vorkulturen angeimpft, die über Nacht bei 30°C gezogen wurden. Das Medium (LB) der Vorkulturen enthielt 200 µg/ml Ampicillin, um die Vermehrung nicht-transformierter Bakterien zu verhindern, sowie 2% Glucose, um die lac-Promotor gesteuerte Transkription des Konstrukts noch stringenter zu unterdrücken. Die Vorkulturen wurden am folgenden Tag 1:20 mit LB-Medium (100 µg/ml Amp) verdünnt und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,9 wachsen gelassen.

3.7.3.1 GPR-Loop (Glutathion-S-Transferase-Markierung)

Vorexperimente hatten ergeben, daß bei Induktion mit 0,1 mM IPTG die höchsten Ausbeuten an löslichem Protein mit Übernachtwachstum bei 16°C zu erzielen waren. Bei der Affinitätsreinigung am folgenden Tag wurde im wesentlichen das Handbuch von Pharmacia befolgt. Die Kultur (500–3000ml) abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 30 ml PBS⁺ (s.u.) resuspendiert. Nacheinander wurden DTT zu 1 mM, TLCK zu 150 µM und Lysozym zu 0,1 mg/ml Endkonzentration zugegeben. Die Lösung wurde 30 min bei 4°C gerührt und die Zellen dann auf Eis durch Ultraschall-Behandlung mit 6 Pulsen (30 - 40% output) von jeweils 10 sec mit Kühlpausen von je 60 sec aufgeschlossen. Zum Solubilisieren von Aggregaten vor allem periplasmatischer Proteine wurde dann Triton-X100 zu einer Konzentration von 1% zugegeben und für weitere 30 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden schließlich bei 19.000 rpm, 2°C durch 20 min Zentrifugation abgetrennt und der Überstand wurde in ein 50 ml-Falconröhrchen mit 7,5 ml in PBS⁺ äquilibrierter GSH-Sepharose 4B (Pharmacia) überführt.

Die Suspension wurde zur Bindung des Fusionsproteins an die GSH-Matrix 1 h bei 4°C unter sanftem Schütteln inkubiert und dann in eine Säule gegossen. Die folgenden Wasch- und

Elutionsschritte wurden bei 4°C und mit niedrigen Flußraten durchgeführt. Nach Auffangen des Durchlaufs wurde zweimal mit 50 ml PBS⁺ gewaschen. Dann wurden 5 ml Elutionspuffer vorsichtig auf das Gelbett pipettiert, einsinken gelassen und für 10 min inkubiert. Der Puffer wurde abgelassen, gesammelt und damit nochmals eluiert, allerdings ohne Inkubation. Der gesamte Elutionsschritt wurde mit 5 ml Puffer wiederholt und nochmals zweimal mit 5 ml bei RT. Abschließend wurde alle Fraktionen und Proben aus den einzelnen Aufreinigungsstadien per SDS-PAGE analysiert.

PBS⁺ (Lyse- und Waschpuffer): 1x PBS, 5 mM EDTA, 10% Glycerin, 5 mM Benzamidin, 0,5 mM PMSF.

Elutionspuffer: 0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 20 mM GSH, pH 8

Der Puffer wurde am Tag des Gebrauchs frisch angesetzt und GSH als Festsubstanz eingewogen. Als weiterer Reinigungsschritt, besonders zur Abtrennung des in mM-Konzentration vorliegenden GSH, folgte eine Gelfiltration der Fraktion mit der höchsten Konzentration an Fusionprotein im FPLC-Verfahren an einer HiLoad 16/60 Superdex 75-Säule (Pharmacia) bei 4°C. Mit ca. 5 ml entsprach das aufgetragene Volumen der Obergrenze der Trennkapazität dieser Säule. Je nach Ausbeute wurden die vereinigten übrigen Eluate der Affinitätsreinigung durch Ultrafiltration (YM 30-Membran, Amicon) auf 4 - 5 ml konzentriert und später ebenfalls der Gelfiltration unterworfen. Die Säule war zuvor mit steril-filtrierte und entgastem 1x PBS äquilibriert worden und wurde nach Injektion der Probe mit 310 ml des gleichen Puffers (bei 1 ml/min bis 15 ml, 1,5 ml/min bis 180 ml, Rest bei 3 ml/min) gespült. Die Proteinkonzentration in der Lösung zwischen 0 ml und 180 ml wurde am Ausgang der Säule durch UV-Absorptionsmessung verfolgt, und das Volumen zwischen 30 ml und 90 ml in 1 ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen des Proteinpeaks wurden per SDS-PAGE analysiert und nach Proteingehalt und Reinheit vereinigt. Die hochkonzentrierten Pools wurden auf 10% Glycerin eingestellt, aliquotiert und schockgefroren; niedriger konzentrierte Pools wurden zuvor durch Ultrafiltration ca. fünffach aufkonzentriert.

3.7.3.2 Profilin

Bei der Aufreinigung von Profilin I oder II wurde größtenteils das Protokoll befolgt, wie es bei Lee et al. beschrieben ist, da sich bei eigenen Vorexperimenten herausstellte, daß diese Proteine sich hauptsächlich in Einschlußkörpern befinden und deshalb nicht unter nativen Bedingungen gereinigt werden können. Für die Reinigung wurde der Umstand ausgenutzt, daß Profilin mit hoher Affinität an Poly-L-Prolin bindet. Deshalb war es auch nicht notwendig, die rekombinanten Proteine mit einem zusätzlichen Tag zu versehen. Die PLP-Säule wurde selbst hergestellt, indem Poly-L-Prolin mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 15 kDa über Nacht an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt wurde. Die hochgezogene Kultur wurde mit 0,2 mM IPTG bei 30°C für drei Stunden induziert, abzentrifugiert und einmal in

gleichem Volumen eiskaltem TE-Puffer gewaschen. Die Sedimente wurden schließlich in TEDABP-Puffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach langsamen Auftauen der Zellen wurde Lysozym in 0,1 mg/ml Endkonzentration zugegeben und ca 30 min sanft bewegt. Es folgte eine Ultraschall-Behandlung mit 6 Pulsen (30 - 40% output) von jeweils 10 sec mit Kühlpausen von je 60 sec, um die Zellen aufzuschließen. Nach einem Zentrifugationsschritt (10000xg, 30 min) wurde der Überstand, welcher lösliches Profilin enthält, abgenommen und direkt auf die mit TEDABP äquilibrierte PLP-Säule geladen. Das Sediment wurde in einem Potter mit TEDABP/7 M Harnstoff resuspendiert, um Profilin zu extrahieren. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde wiederum das Sediment in TEDABP/7 M Harnstoff resuspendiert. Insgesamt waren drei dieser Zyklen notwendig, um die beste Profilinausbeute zu erhalten. Die abgenommenen Überstände wurden dann langsam gegen TEDABP-Puffer dialysiert und nochmals zentrifugiert, bevor sie auf die Säule gegeben wurden. Anschließend wurde die Säule mit mind. 50ml TEDABP/2 M Harnstoff und 50ml TEDABP gewaschen. Da die Elution von Profilin mit 7 M Harnstoff durchgeführt wird, mußte dieser Schritt bei Raumtemperatur erfolgen (bei 4°C fällt 7 M Harnstoff aus). Es wurden 4ml TEDABP/7 M Harnstoff vorsichtig auf das Gelbett pipettiert und für 15 min stehengelassen. Der Elutionspuffer wurde langsam abgelassen und in Fraktionen a 2ml gesammelt. Es wurden insgesamt 20 ml Puffer auf die Säule gegeben und in mehreren Fraktionen gesammelt. Abschließend wurden die Fraktionen wiederum langsam gegen Puffer mit absteigender Harnstoffkonzentration dialysiert und durch Ultrazentrifugation (YM 10-Membran, Amicon) aufkonzentriert.

3.7.3.3 Abp1 (GST-Fusionsprotein) und PRD (prolinreiche Domäne) aus WASp (GST-Fusionsprotein)

Die Reinigung dieser beiden Fusionsproteine wurde genau wie für den GPR-Loop beschrieben, durchgeführt. Da diese Proteine nur gering proteolytisch abgebaut wurden, folgte nach der Elution von der Affinitätssäule keine weitere Reinigung mittels FPLC.

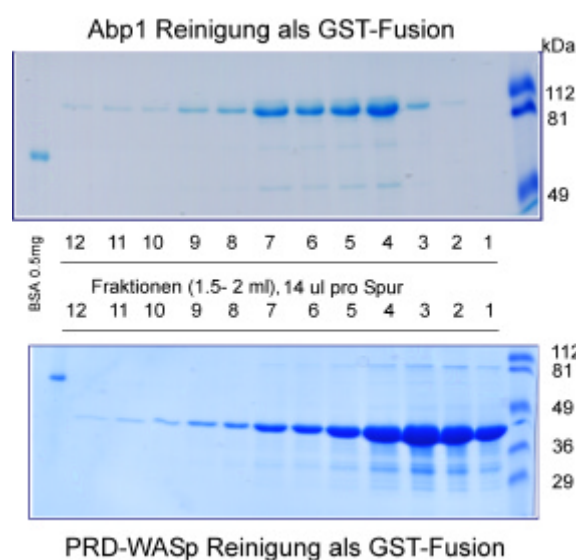


Abb. 3.1: Die verschiedenen Fraktionen aus der Reinigung von GST-Abp1 und GST-PRD-WASp. Die Reinigung aus je 1.5 l *E. coli* Kulturen ergab eine Ausbeute von insgesamt etwa 10 mg GST-Abp1 und 20 mg GST-PRD-WASp. Es wurden Fraktionen von 1.5 – 2 ml gesammelt. Proben von 14 µl wurden elektrophoretisch auf einem 10 % SDS Polyacrylamidgel getrennt und die Proteine mit Comassie-Blau gefärbt. Die Molmassen der Markerproteine sind rechts gekennzeichnet (in kDa).

3.8 Immunologische Methoden

3.8.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

Antiseren gegen Peptide oder rekombinante Proteine wurden von Eurogentec, Belgien hergestellt. Als Antigene können auch rekombinante Proteine verwendet werden, die als GST-Fusionsproteine hergestellt wurden. Diese sollten dann nochmals affinitätsgereinigt werden, wenn es unspezifische Reaktionen gegen GST gibt.

3.8.1.1 Antikörper gegen *D. discoideum* Abp1

Es wurden je zwei Kaninchen gegen das Fusionsprotein GST-Abp1 immunisiert. Dazu wurde den Kaninchen fünf mal in einem Zeitraum von 3 Monaten je 100 µg reines Protein injiziert. Die Immunisierung ist jedoch noch nicht abgeschlossen. Die nach zwei Monaten entnommenen Blute (entnommen nach dem dritten Boost) zeigen schon gute Ergebnisse bezüglich der Spezifität.

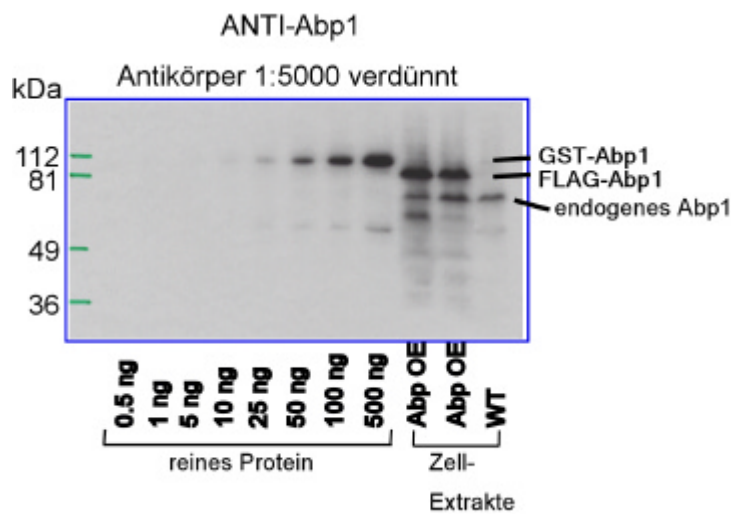


Abb. 3.2: Die anti-Abp1 Antikörper aus der zweiten Blutung. Es wurde eine Konzentrationsreihe von 0.5 – 500 ng gereinigtes GST-Abp1 aufgetragen, um die Sensitivität zu testen. Zusätzlich wurde von *D. discoideum* Zellen, die Abp1 als FLAG-Fusion exprimieren, ein Zellextrakt hergestellt und elektrophoretisch aufgetrennt. WT- Zellextrakt wurde mitgeführt, um endogenes Abp1 zu detektieren.

3.8.1.2 Antikörper gegen die prolinreiche Domäne aus *D. discoideum* WASp

Die Immunisierung erfolgte nach demselben Protokoll wie in 3.8.1.1 Auch hier zeigen Antikörper aus der zweiten Blutung schon gute Ergebnisse. Allerdings ist die Kreuzreaktivität gegen GST sehr stark, so daß die Antikörper affinitätsgereinigt werden müssen.

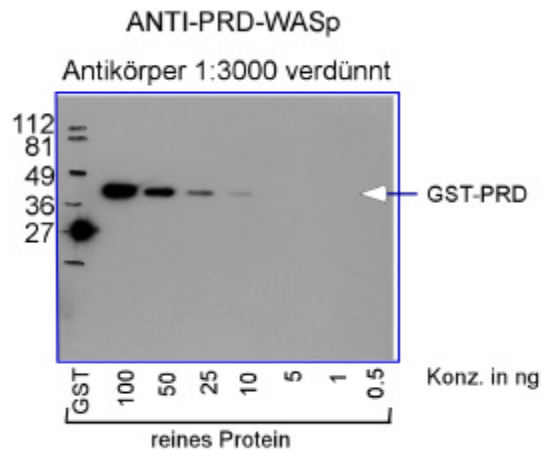


Abb. 3.3: Die anti-PRD-WASp Antikörper aus der zweiten Blutung. Gereinigtes GST-PRD-WASp wurde in verschiedenen Konzentrationen (0.5 – 100 ng) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Reines GST (in der Spur des Markers) wurde aufgetragen, um die Reaktivität der Antikörper gegen GST zu überprüfen.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der MyoK Sequenz und MyoK Mutanten

Wichtige Einblicke in die mögliche Funktion von Myosin IK wurden von Eva Schwarz im Rahmen ihrer Dissertation gewonnen. Dazu analysierte sie phänotypische Veränderungen, die entweder durch Abwesenheit oder Überexpression von MyoK resultierten. Augenfällig war besonders eine veränderte Morphologie des Actin-Cortex. *D. discoideum* Zellen, denen MyoK fehlt, weisen im Gegensatz zum Wildtyp mehr dünne, stark vergrößerte Lamellipodien auf. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß diese frei von Organellen und mit Actin gefüllt waren. Zusätzlich wurde ein ungewöhnlich dicker, unregelmäßiger Actin-Cortex am Fuß der Zelle beobachtet. Hinzu kam eine erhöhte Anzahl von kronenartigen Ausstülpungen (*crowns*). Im Gegensatz dazu zeigten MyoK überexprimierende Zellen an ihrer Oberfläche actingetriebene Ausstülpungen, die Organellen enthielten. Die Vermutung, daß MyoK eine bedeutende Rolle in der Erhaltung der Integrität des Actin-Cortex spielt, wurde durch Messung unterschiedlicher Cortex-Spannungen erhärtet. *MyoK*⁻ Zellen hatten eine deutlich erniedrigte Spannung, während *MyoK*⁺ Zellen eine erhöhte Cortex-Spannung aufwiesen. Ein disorganisierter Actin-Cortex könnte so für die anfänglich verminderte Phagozytose-Rate verantwortlich sein, die bei den veränderten MyoK Zelllinien beobachtet wurde. Da erstaunlicherweise aber nur die anfängliche Phagozytose erniedrigt war, nach 30 min jedoch der gleiche Steady-State Level von Wildtyp-Zellen erreicht wurde, scheint es für die Zellen problematisch zu sein, einen tauglichen Kontakt mit Partikeln herzustellen bzw. diese zu umschlingen. Trotz einer erhöhten Cortex-Spannung in den überexprimierenden Zellen war die Bewegungsfähigkeit dieser Zellen nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu bewegten sich *myoK*⁻ Zellen langsamer, was sich während der chemotaktischen Aggregationsphase in einer zweistündigen Verzögerung widerspiegelte (Schwarz, 2000).

Die Analyse der Primärstruktur von MyoK brachte einige auffällige Besonderheiten zum Vorschein, die in anderen Myosinen der Klasse I nicht vorhanden sind (s. Abb. 4.1 und 4.2).

Auf den ersten Blick ist das Auffälligste das Fehlen einer Schwanzdomäne in MyoK. Nach dem letzten carboxyterminal gelegenen konservierten Motiv innerhalb der Motordomäne, das mit den Aminosäuren Lys, Ile und Phe (KIF) endet, folgen nur noch 53 Aminosäuren. Somit fehlt offensichtlich eine traditionelle Cargo-Bindestelle, die charakteristisch für eine jeweilige Myosinklasse ist. Stattdessen besitzt das Protein eine Insertion von 143 Aminosäuren innerhalb der Motordomäne (siehe Abb. 4.1). Interessanterweise befindet sich diese im Loop1, der dadurch beträchtlich erweitert wird. Die Insertion hat einen hohen Anteil der Aminosäuren Glycin (G), Prolin (P) und Arginin (R) und wird deshalb im folgenden GPR-Loop genannt. Vergleicht man jedoch die Sequenz mit anderen Myosinen der Klasse I, findet man eine dem GPR-Loop ähnliche Domäne. Allerdings befindet sie sich dort an einer ganz

anderen Stelle, nämlich in der Schwanzdomäne (s. Abb.4.2). Für diese als GPQ oder GPA bezeichneten Schwanzdomänen wurde *in vitro* gezeigt, daß sie in ATP-unabhängiger Weise an F-Actin binden.

```

1  MFRLFSSGVD DLVLVSNPSN GEVTSQIGAR FDRELIYTNI GEVLIAVNPY
51  KALPITGPEF IKLYQNASGS DASPFIYALA ERAYRRMVDE NESQCVIISG
101 ESGAGKTVSA KLILQYVTSV SPNNSSGGGI GSGGGGNGGI POYDGGSDDR
151 PSPPMGRGMG MPGMVGRGGL PTRGGGPPSR GGGPPPTRGR GGPPPIPQN
201 RGAPPPVSNP GAPPPVARGP VAPPPTRGAP PTRGGGPANR GGRGGGPPPV
251 STSRGGGGYG GSSKTVDVEH IKKVILDSNP LMEAIGNAKT VRNDNSSRFG
301 KYLEIQFDDN NAPVGGLIST FLLEKTRVTF QQKNERNFHI FYQMLGGLDQ
351 TTKSEWGLTQ ATDFYYLAQS KCTTVEDVDD GKDFHEVCAA METVGISRDE
401 QTEIFRILAA ILHVGNIQFQ GEAPASVIDE TPLQWAASLL GCDPTFLCQS
451 LNHRQIQSGS ARHTQYQVPO NPDQSAGLRD ALAKTLYERI FDFIVARVNK
501 AMSFSGNCKV IGVLDIYGFE VFERNSEFQF CINYVNERLQ QIFIDLTVRG
551 EQREYHEEGM KWKDISFFDN KIVVDLIDGN KPPGIMRVLD DVCKTVHAVD
601 SAAADIKFME KLIHSIQSHP HLVISNTGSS ADEFTIKHYA GEVSYISIEEF
651 CFKNNDNLCA SIVGCLQNST YQFIVSLFPE NIQDNKQAPT TSSFKIRQSS
701 SYLVTRLSAC TPHYIRCIKP NDKKQPMNFV SSRVEHQVKY LGILENIKVK
751 RSGYAYRQLK DIFLNRFGKI MDVQPRNVQE FVEYITRTHK DINADEFEEG
801 KTKIFVKNPE TIFVMEDLLM QKIDPIGYKN RVQAYKENEK LAQMKGKHS
851 MKQKCLIQ

```

Abb. 4.1: Die vollständige Proteinsequenz von Myosin IK.

MyoK ist 858 Aminosäuren lang und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 94 kDa und ist damit das bisher kleinste identifizierte Myosin in *D. discoideum*. Die 143 lange Insertion innerhalb der Motordomäne ist blau unterlegt. Sie enthält besonders zahlreich die Aminosäuren Glycin (G), Prolin (P) und Arginin (R) und wird im folgenden GPR-Loop genannt. Das klassische SH3 Bindungsmotiv RXXPXXP im GPR-Loop ist zusätzlich unterstrichen. Die in rot unterlegten Aminosäuren stellen die konservierten Stellen dar, die mit der TEDS-Regel beschrieben werden (Bement und Mooseker, 1995). Das phosphorylierbare Threonin in der Sequenz ist grün eingerahmt. Die kurze Hals/Schwanz Region ist lila unterlegt. Sie beginnt direkt hinter dem KIF Motiv (türkis), das das letzte konservierte Motiv innerhalb der Motordomäne ist (Cope *et al.*, 1996). Die letzten vier Aminosäuren CLIQ (Cystein, Leucin, Isoleucin, Glutamin) sind ein Signal zur Prenylierung von Proteinen (Fenton *et al.*, 1992).

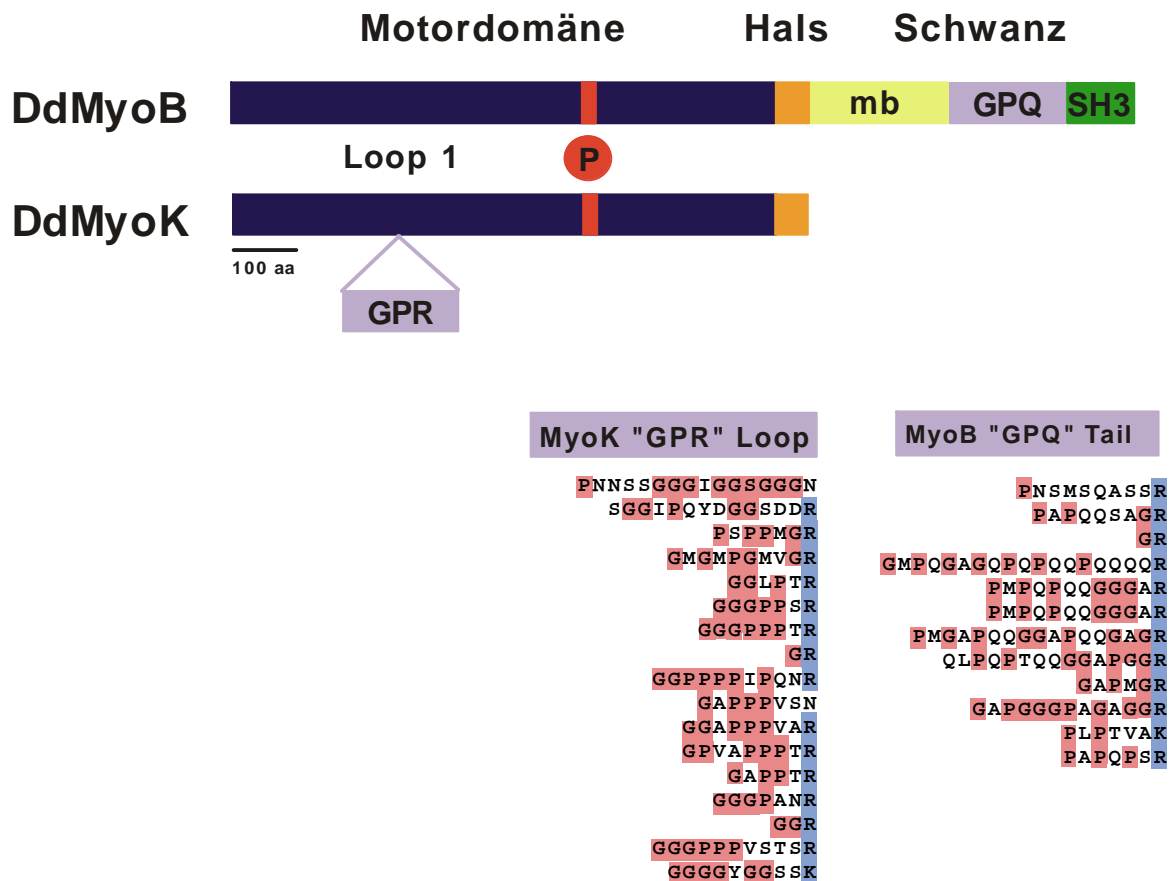


Abb. 4.2: Vergleich von Myo IK mit einem repräsentativen Myosin der Klasse I.

Schematischer Vergleich mit Myo IB. Das eingekreiste P steht für die phosphorylierbare Aminosäure im TEDS Motiv (MyoK mit Threonin 464, MyoB mit Serin 332); mb für Membran Bindestelle; GPQ und GPR für Gly, Pro und Gln bzw. Arg reiche Sequenzen; SH3 für Src Homology 3 Domäne.

Vergleich der GPX-Domänen. Die beiden Domänen zeigen eine sehr ähnliche Primärstruktur, die im Schaubild vom N-Terminus zum C-Terminus dargestellt sind. Die Sequenzen bestehen aus G- und P- reichen Pseudorepetitionen (rot unterlegt), die mit einer positiv geladenen Aminosäure(R, blau unterlegt) enden

Um ein tieferes Verständnis der Funktion von MyoK in der Zelle zu erhalten, ist es notwendig, das Protein vollständig zu charakterisieren. Diese Arbeit enthält sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimente mit dem gesamten Protein oder einzelnen funktionellen Domänen.

Die bisherige Analyse von MyoK liefert eindeutige Hinweise darauf, daß dieses strukturell außergewöhnliche Myosin eine wichtige Rolle in der Erzeugung und dem Erhalt der Cortexspannung spielt. Dynamische Prozesse wie Motilität und Phagocytose waren bei Abwesenheit von MyoK beeinträchtigt, so daß sich die Frage stellt, wo genau MyoK in diesen komplexen Prozessen beteiligt ist.

Zuerst war es deshalb wichtig *in vivo* zu untersuchen, wo MyoK in der Zelle lokalisiert, und ob MyoK in bestimmten Regionen angereichert ist. Dabei wurden sowohl vegetative als auch sich entwickelnde Zellen untersucht.

4.2 Charakterisierung der Funktion von MyoK

4.2.1 Die intrazelluläre Lokalisation von MyoK

Innerhalb der Doktorarbeit von Eva Schwarz wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht, wo sich MyoK innerhalb der Zelle befindet. Endogenes MyoK wird nicht stark exprimiert. Deshalb wurde ein Konstrukt hergestellt, in dem MyoK unter der Kontrolle des Actin 15 Promotors stabil in *D. discoideum* exprimiert wurde. Immunlokalisationsstudien demonstrierten, daß MyoK tatsächlich in den dynamischen Regionen des Actin-Cortex angereichert ist (siehe Abb. 4.3), obwohl auch ein beträchtlicher Teil im gesamten Cytoplasma verteilt war. MyoK kolokalisiert mit Coronin, einem Actin-assoziiertem Protein (de Hostos *et al.*, 1991), von dem gezeigt wurde, daß es an der Phagocytose beteiligt ist (Maniak *et al.*, 1995). Interessanterweise war diese Kolokalisation in chemotaktischen Zellen jedoch nicht genau deckungsgleich, da MyoK zusätzlich an Zellkontaktstellen und peripheren Ausstülpungen konzentriert war.

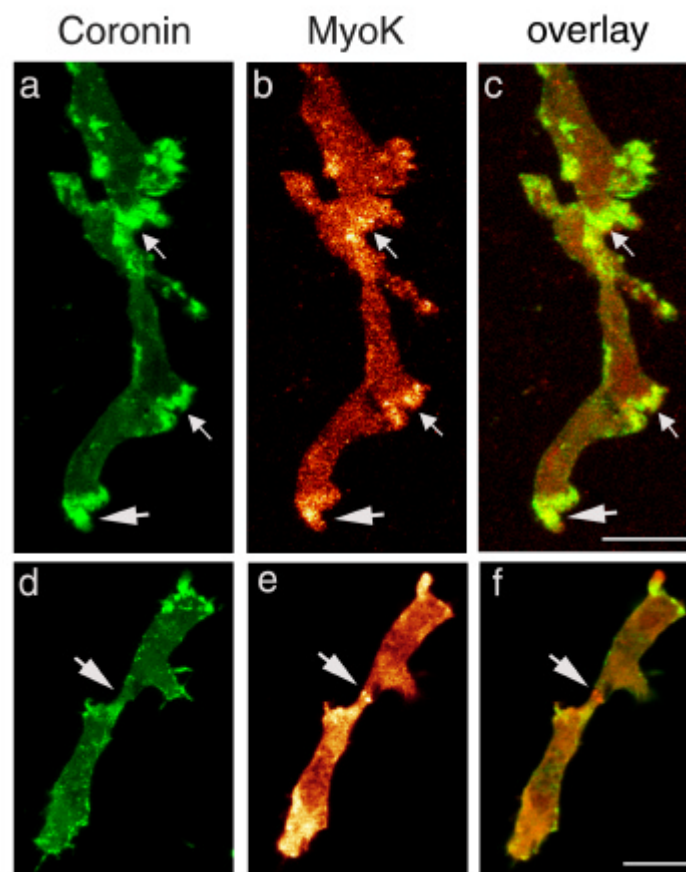


Abb. 4.3: Intrazelluläre Lokalisation von MyoK. Sich entwickelnde, strömende WT Zellen wurden in einer Doppelfärbung gegen Coronin (grün) (a) und MyoK (rot) (b) analysiert. MyoK und Coronin waren in actinreichen Ausstülpungen (kleine Pfeile) und am vorderen Ende der Zelle zu finden (große Pfeile). Zusätzlich wurde MyoK an Zell-Zellkontakten lokalisiert (siehe Pfeil in f). Die Balken entsprechen 10 µm. Die Bilder wurden freundlicherweise von Eva Schwarz zur Verfügung gestellt.

4.2.2 Subzelluläre Verteilung von endogenem MyoK

Die Untersuchung der Expression von MyoK während des Entwicklungszyklus von *D. discoideum* zeigte, daß diese entwicklungspezifisch reguliert wird. Die maximale Expression liegt bei acht bis zehn Stunden, genau dann, wenn die Zellen am beweglichsten sind. Die Proteinmenge fällt abrupt ab, wenn die Aggregationsphase beendet ist (von 100% auf 13%): Diese Untersuchung wurde allerdings bisher nur im ganzen Zellextrakt vorgenommen (Schwarz *et al.*, 2000). Berücksichtigt man den Aspekt der möglichen Modifizierung von MyoK durch Anbringen eines Farnesylankers, stellt sich Frage, ob dieses Signal auch wirklich genutzt wird, um MyoK an Membranen zu bringen. Zusätzlich wäre es eine wichtige Information zu erfahren, ob sich während der Entwicklung von *D. discoideum* das Verhältnis von cytosolischem und membrangebundenem MyoK verändert. Da endogenes MyoK, wie schon erwähnt, nicht stark exprimiert wird, wurde diese Fragestellung mittels eines präparativen Gels untersucht. Das Ergebnis in Abb. 4.4 zeigt, daß MyoK hauptsächlich im Cytosol bleibt und konstant ungefähr ein Zehntel des gesamten Proteins an Membranen assoziiert ist. Während der Entwicklung erfolgt demnach keine Verlagerung der Lokalisation.

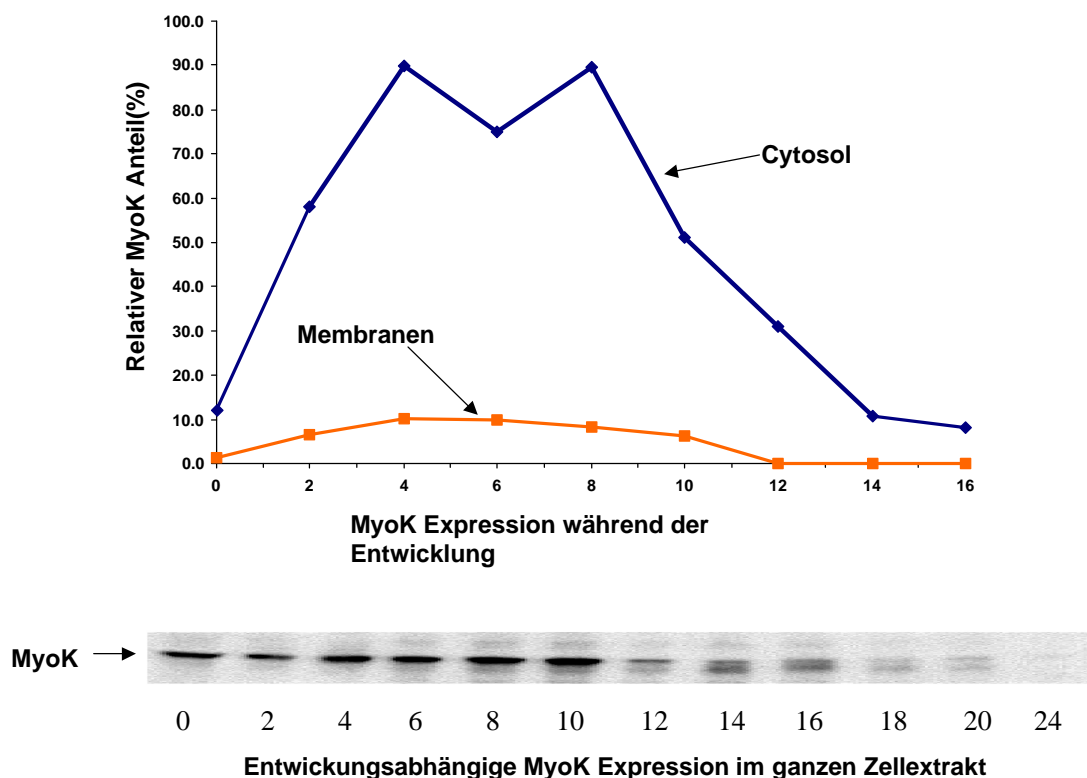


Abb. 4.4: Prozentuale Verteilung von endogenem MyoK in Cytosol und Membranen.

Vergleichbare Mengen an Cytosol- und Membranextrakt von *Dictyostelium* Wildtyp-Zellen wurden aufgetragen und im Western Blot unter Verwendung des MyoK Antikörpers analysiert. Die Intensität der Banden wurden quantifiziert und die maximale Expression von MyoK (bei 4 h im Entwicklungszyklus) gleich 100% gesetzt. Im Vergleich ist die Expression von endogenem MyoK im ganzen Zellextrakt gezeigt.

4.2.3 Herstellung stabil exprimierender MyoK-CLIQ Zellen

Erst im Verlauf dieser Arbeit wurde die carboxyterminale CaaX Box als Signal für Protein-Prenylierung erkannt (C ist Cystein, a ist eine aliphatische Aminosäure, X bestimmt die Art des anzufügenden Isoprenoids). Das hatte zur Folge, daß zuvor hergestellte Konstrukte mit MyoK cDNA zur funktionellen Untersuchung dieser Domäne nicht geeignet waren. Denn diese Konstrukte wurden sowohl aminoterminal als auch carboxyterminal mit verschiedenen Markern (*tags*) versehen, um MyoK mit verschiedenen Methoden untersuchen zu können. Der *His*- und *VSVG-tag* am Aminoterminus sollte für die Untersuchung der Prenylierung bedeutungslos sein. Das Problem stellen der am Carboxyterminus angefügte *Ty1-tag* und *Streptavidin-tag* dar, denn das CLIQ Motiv wird nur erkannt, wenn es sich tatsächlich am Carboxyende befindet. Für manche biochemischen Experimente muß die fehlende Prenylierung nicht störend wirken; beispielsweise sollte die F-Actin Bindung nicht davon abhängen. Absolut notwendig ist das komplette Protein jedoch für Lokalisationsstudien, denn das Anfügen eines Isoprenoids (hier ein Farnesyl) als Möglichkeit MyoK in Membranen zu verankern, hat höchstwahrscheinlich einen wichtigen Einfluß auf dessen Lokalisation innerhalb der Zelle. Deshalb mußte ein neues Konstrukt hergestellt werden. Dazu wurde die vollständige MyoK cDNA in einen leicht veränderten *D. discoideum* Expressionsvektor der Serie pDXA-HC (Manstein *et al.*, 1995) unter der Kontrolle des Actin 15 Promoters kloniert. Am Aminoende von MyoK blieben der *His*- und der *VSVG-tag* erhalten, während am Carboxyende direkt nach der Aminosäuresequenz CLIQ ein Stopp-Codon folgte. Das Konstrukt wurde in AX2-Zellen und AX3-Zellen transformiert. AX3-Zellen tragen stabil, aber extrachromosomal, das Expressionsplasmid und werden bevorzugt verwendet, um hohe Proteinexpression zu erhalten. Nachdem verschiedene Klone direkt mit der Pipette von der Petrischale gepickt wurden, erfolgte die Überprüfung der Expression von MyoK mittels Western Blot. Zusätzlich mußte sichergestellt werden, daß das Stopp-Codon wirklich gelesen wird und die Signalsequenz somit erkennbar ist, da die ursprünglichen carboxyterminalen *tags* direkt hinter dem Stopp noch vorhanden waren. Es zeigte sich, daß alle Transformanden das MyoK Protein unterschiedlich stark exprimieren und das Stopp gelesen wird (siehe Kontroll-Blot mit anti-Ty1 in Abb. 4.5). Die AX3-Transformanden, die MyoK extrachromosomal exprimieren, zeigten interessanterweise keine stärkere Produktion des Proteins.

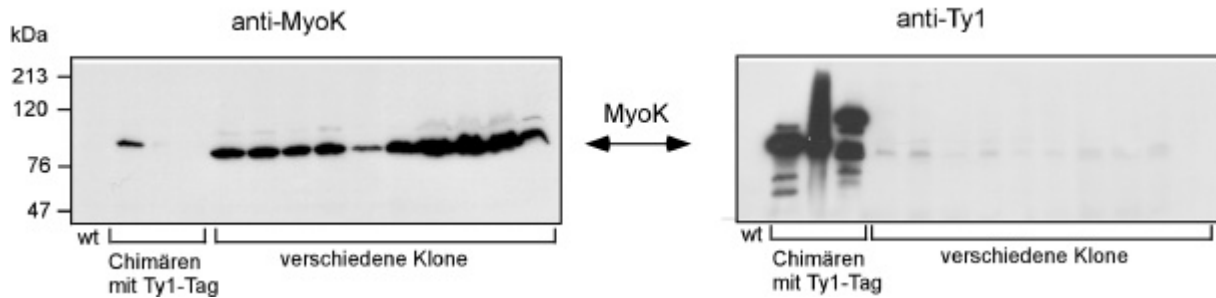


Abb. 4.5: Die unterschiedliche Expressionsstärke von MyoK-CLIQ in MyoK⁺ Zelllinien. In der ersten Spur wurde Wildtyp-Extrakt als Vergleich aufgetragen. Die Spuren 2,3 und 4 dienen als Kontrollen; in 2 und 3 wurde Extrakt aus MyoK überexprimierenden Zellen aufgetragen, die den *Ty1-tag* exprimieren. Spur 4 ist ein 120 kDa großes Konstrukt aus der MyoM Motordomäne, ebenfalls mit exprimierten *Ty1-tag*. In den nachfolgenden Spuren wurden MyoK-CLIQ exprimierende Zelllinien aufgetragen, die keinen *Ty1-tag* exprimieren. Spur 5-8 sind AX3-Transformanten, in den Spuren 9-14 wurden Extrakte aus AX2-Transformanten aufgetrennt. Die Blots wurden entweder mit anti-MyoK oder anti-Ty1 inkubiert. In den Kontrolleextrakten wurde der *Ty1-tag* erkannt, die kaum sichtbare Bande in den MyoK-CLIQ Zelllinien ist nicht MyoK, da sie bei genauem Vergleich etwas höher läuft. Zu beachten ist, daß das MyoK-CLIQ Protein im Gel einen kleinen Shift nach unten erfährt.

Erfahrungsgemäß ist die Expressionstärke innerhalb eines von der Petrischale gepickten Klons sehr heterogen. Aus diesem Grund wurden drei Klone, welche MyoK unterschiedlich stark exprimierten, ausgewählt, über *K. aerogenes* subkloniert (siehe M & M 3.6.4) und davon wiederum 40 Klone bezüglich der Expressionstärke von MyoK untersucht. Erneut wurden vier Klone ausgewählt, die für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

Die Lokalisation von MyoK-CLIQ (im folgenden nur MyoK genannt) in der Zelle wurde mit Immunfluoreszenz analysiert. Die Expression war in allen Klonen sehr niedrig, es scheint, daß die Zellen nur einen geringen Level von MyoK tolerieren. MyoK wurde wiederum in einer Doppelfärbung mit Coronin analysiert. Es zeigte sich, daß die Kolokalisation der beiden Proteine nicht in dem Maße zu finden war, wie es für die Studie mit MyoK ohne das Prenylierungssignal beschrieben wurde. Sowohl MyoK als auch Coronin waren am vorderen Ende der Zelle (anterior) angereichert (Abb. 4.6,a-a``). Beide Proteine wurden an der Plasmamembran detektiert, allerdings nicht gleichmäßig über die Plasmamembran verteilt. Vielmehr war eine Konzentration in bestimmten Regionen zu beobachten, die jedoch zwischen MyoK und Coronin meist nicht identisch waren (Bilderreihen in Abb. 4.6, b und c). Betrachtet man eine Zelle während der Einverleibung von Hefezellen, erkennt man ebenfalls eine unterschiedliche Anreicherung. MyoK scheint eher seitlich an den pseudopodienartigen Fortsätzen oder Vorstülpungen zu lokalisieren, während sich Coronin am gesamten Rand des sich bildenden phagocytotischen Becher befindet (Bilderreihe 4.6,d-d``).

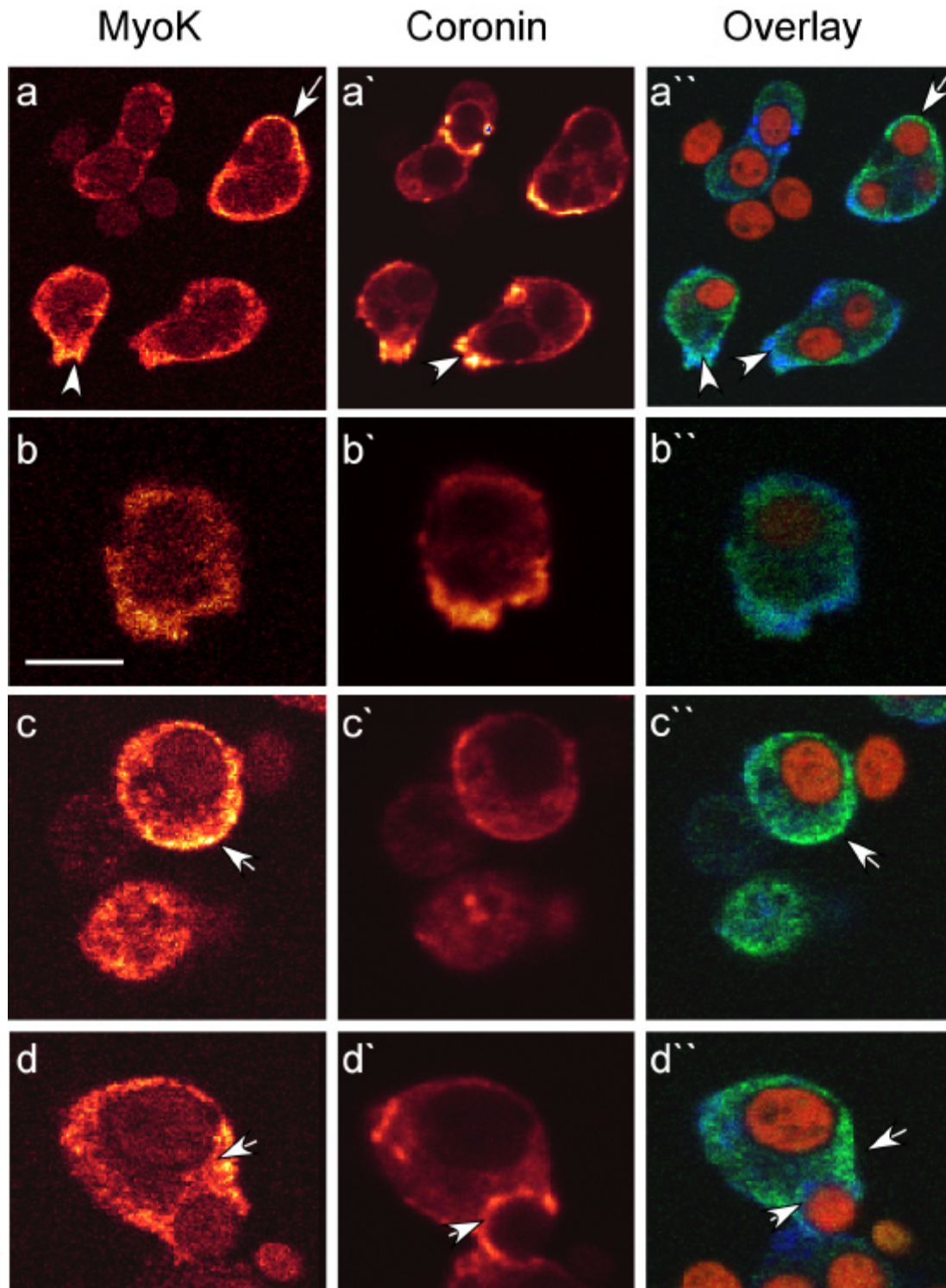


Abb. 4.6: Intrazelluläre Lokalisation von MyoK-CLIQ. MyoK-CLIQ und Coronin sind beide am anterioren Ende der Zelle angereichert (siehe Pfeilköpfe in **a-a''**). An der Plasmamembran kolokalisieren beide Proteine nur teilweise (Pfeile in **a''** und **c''**). Sowohl MyoK-CLIQ als auch Coronin sind an den phagozytotischen Bechern angereichert, allerdings an unterschiedlichen Stellen. MyoK-CLIQ befindet sich an den seitlichen Rändern (Pfeil in **d**), während Coronin am ganzen Rand angereichert ist (Pfeil in **d'**). Der Balken entspricht 10µm.

4.2.4 Der Carboxyterminus von MyoK enthält ein Signal für Protein-Prenylierung

In Myosinen der Klasse I kann die polybasische Domäne innerhalb der Schwanzregion an anionische Phospholipide binden, so daß prinzipiell eine Verankerung an eine Membran möglich ist. MyoK fehlt eine solche Domäne, allerdings kann dieses ungewöhnliche Myosin trotzdem potentiell an Membranen verankert werden. MyoK besitzt am direkten Carboxy-Terminus ein sogenanntes CaaX Motiv, das ein Signal für Protein-Prenylierung darstellt (s. Abb. 4.7). Diese post-translationale Modifizierung wurde bisher in keinem anderen Myosin gefunden. Im Fall von MyoK würde ein Farnesylanker angehängt, da die letzte Aminosäure ein Glutamin (Q) ist (Fenton *et al.*, 1992).

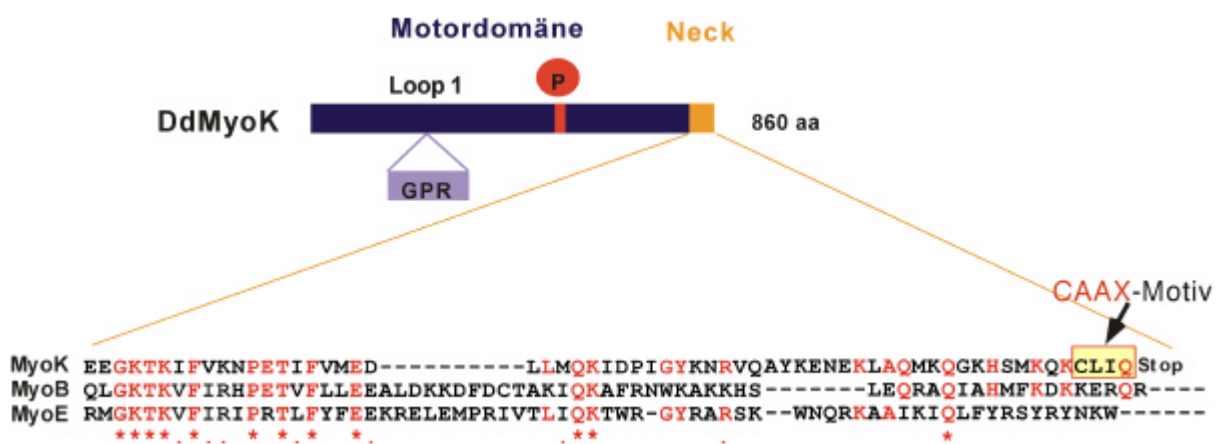


Abb. 4.7: Darstellung der Position des CAAX-Motivs von MyoK im Vergleich zu anderen Myosinen der Klasse I. Die Aminosäureabfolge CLIQ befindet sich direkt vor dem Stoppcodon und wird dadurch zum Prenylierungssignal. Andere Myosine der Klasse I, wie MyoB oder MyoE besitzen eine Schwanzdomäne, in der sich eine polybasische Region befindet (nicht gezeigt). Hochkonservierte Aminosäuren wurden mit einem roten Stern markiert.

Um festzustellen, ob tatsächlich mittels dieses Signals eine Translokation zu Membranen stattfindet, wurde bereits von Eva Schwarz ein Konstrukt hergestellt, in dem der Carboxyterminus von MyoK an GFP fusioniert wurde. Sowohl die mikroskopische Untersuchung von transformierten *D. discoideum* Zellen während der Phagozytose als auch die biochemische Analyse von Cytosol- und Membranfraktionen (siehe Abb. 4.8 A, 4.8 B) ergab, daß dieses Konstrukt zu Membranen rekrutiert wird. Augenfällig ist die Lokalisation fast des gesamten Fusionsprotein in der Plasmamembran, allerdings verschwindet es schnell vom Phagosom, während eine konstante Assoziation mit der Plasmamembran bestehen bleibt. Dieses Verschwinden bedeutet nicht unbedingt, daß der GFP-Carboxyterminus von MyoK von der Phagosomenmembran dissoziiert, wahrscheinlicher ist, daß die Membran zurück zur Plasmamembran transportiert und dort wiederverwendet wird (*membrane recycling*). Betrachtet man die Phagosomenmembran in der linken unteren Aufnahme genauer, erkennt man kleine Vesikel, die sich gerade von der Phagosomenmembran abschnüren.

Interessanterweise lokalisiert ein Teil des GFP-Carboxyterminus in einer Region nahe des Kerns, wobei es sich um den Golgi-Apparat handeln könnte.

A

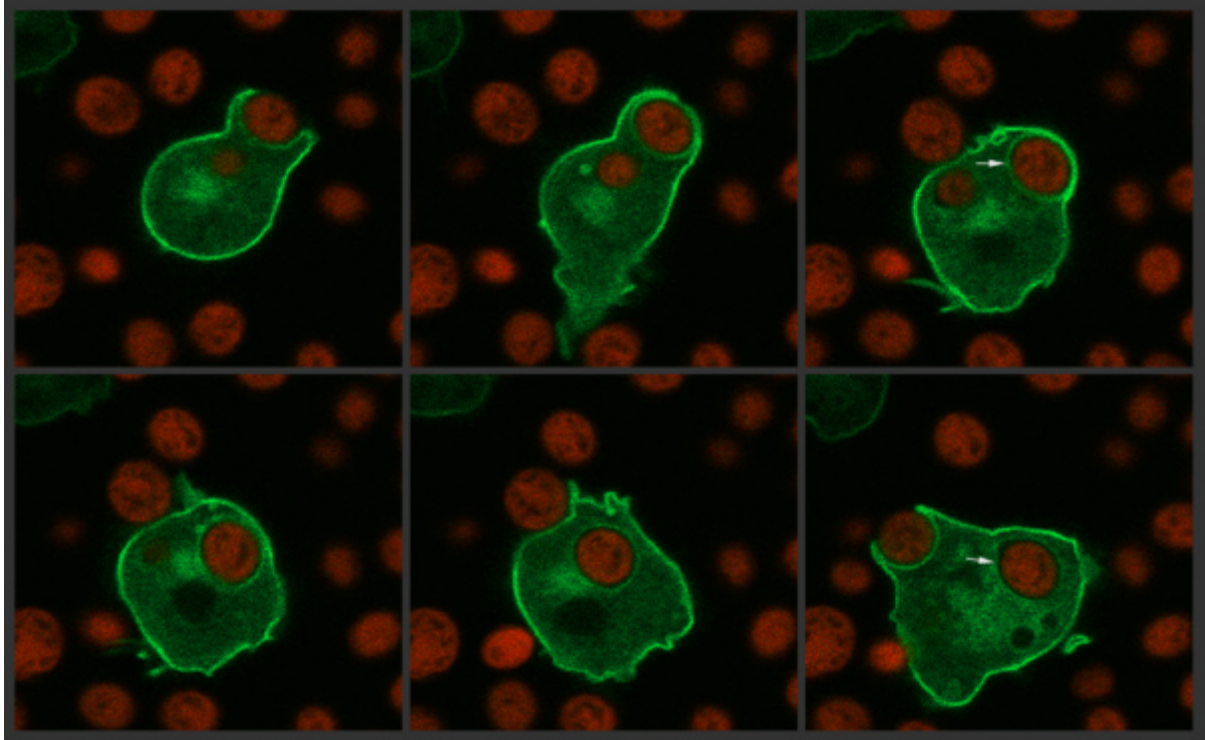
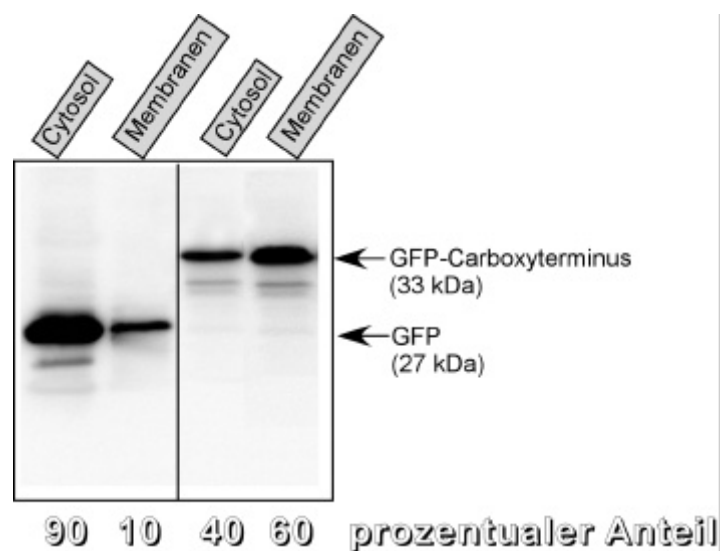


Abb. 4.8: Das GFP-Konstrukt mit dem Carboxyende von MyoK lokalisiert an Membranen.

(A) Die Beobachtung einer lebenden phagocytierenden *D. discoideum* Zelle. Der Zeitrahmen der kompletten Bilderreihe beträgt ca. 1 Minute. Das Konstrukt ist konstant stark an der Plasmamembran und an einer Region nahe des Zellkerns konzentriert. Die Anreicherung an der Phagosomenmembran ist nur sehr kurz sichtbar.

(B) Die prozentuale Verteilung des GFP-Konstrukts und GFP (Vergleichskontrolle) wurde mittels Western Blotting und anti-GFP Antikörpern untersucht und mit einem Chemilumineszenz-Imager quantifiziert.

B



Die *in vivo* Untersuchungen zeigten deutlich, daß MyoK seine Aktivität im Actin-Cortex entfaltet. Interessanterweise wird die carboxyterminale Domäne zu einem weitaus größeren Anteil an die Plasmamembran transferiert als das ganze Protein (60% gegenüber 10%; vergleiche Abb. 4.8 B und 4.4). Es scheint demnach ein Regulationsmechanismus zu existieren, der verhindert, daß MyoK generell in der Plasmamembran verankert wird.

4.2.5 MyoK wird wahrscheinlich über Phosphorylierung reguliert

Die bisher untersuchten amöboiden Myosine der Klasse I besitzen alle die charakteristischen biochemischen Eigenschaften eines Myosins, wie beispielsweise die Actin-aktivierte ATPase Aktivität (Pollard *et al.*, 1991) und die ATP-abhängige Beweglichkeit *in vitro* (Albanesi *et al.*, 1985; Zot *et al.*, 1992). Diese Aktivität wird durch die Phosphorylierung eines Serins (S) oder Threonins (T) streng reguliert, der sich in einer Konsensus-Phosphorylierungsstelle in der Kopfdomäne (der Motordomäne) des Myosins befindet (Breszka und Korn, 1996). Da in weiteren Myosinen an der relevanten Stelle auch ein Glutamat (E) oder Aspartat (D) sein kann, benannten Bement und Mooseker dies als die TEDS-Regel (Bement und Mooseker, 1995). Für MyoK liegen hinsichtlich der Motoraktivität leider noch keine Ergebnisse vor; jedoch kann man davon ausgehen, daß dieses Protein ebenfalls reguliert wird. MyoK verfügt an der TEDS-Position über ein phosphorylierbares Threonin.

Um zu untersuchen, ob MyoK phosphoryliert wird, wurde die 2D Gel Elektrophorese angewendet (s. Abb. 4.9). Zell-Lysat eines MyoK überexprimierenden Klon (ohne CLIQ Motiv) und Wildtyp Lysat wurden in der ersten Dimension entlang eines pH-Gradienten nach Ladung aufgetrennt (*Isoelectric focusing*). Anschließend folgte die zweite Dimension, in der Proteine aufgrund ihres Molekulargewicht getrennt werden. Der Nachweis von MyoK nach Transfer der Proteine auf eine Membran erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Die Identifizierung von MyoK auf dem entwickelten Film fiel nicht schwer, da schon im voraus der theoretische isoelektrische Punkt (iP) von MyoK ohne posttranslationale Modifikationen berechnet wurde. MyoK hat seinen iP bei pH 8,5, das heißt bei diesem pH Wert ist die Nettoladung des Proteins gleich Null. Die für MyoK gesuchten Koordinaten (pH 8,5 und Molekulargewicht 94 kDa) zeigten in den aufgetrennten Extrakten der überexprimierenden Zellen jeweils deutlich zwei direkt nebeneinanderliegende Spots (Signale). Der schwächere Spot, der sich mehr in Richtung saurem pH-Wert befindet, könnte die phosphorylierte Form von MyoK darstellen (s. Abb 4.9). Durch die Übertragung einer Phosphatgruppe auf das Protein addiert sich zusätzlich ein negativer geladener Rest auf das Protein, so daß sich der isoelektrische Punkt etwas in den sauren Bereich verschiebt. Wurden die MyoK überexprimierenden Zellen zuvor mit Phosphatase-Inhibitoren behandelt, zeigte sich ein insgesamt stärkeres Signal. Dies kann einerseits durch unterschiedlichen Probenauftrag bedingt sein, oder andererseits bedeuten, daß mehr MyoK in phosphorylierter Form vorliegt (siehe die kürzeren Belichtungszeiten des Films). Endogenes MyoK ist in Wildtyp Zellen leider nicht detektierbar.

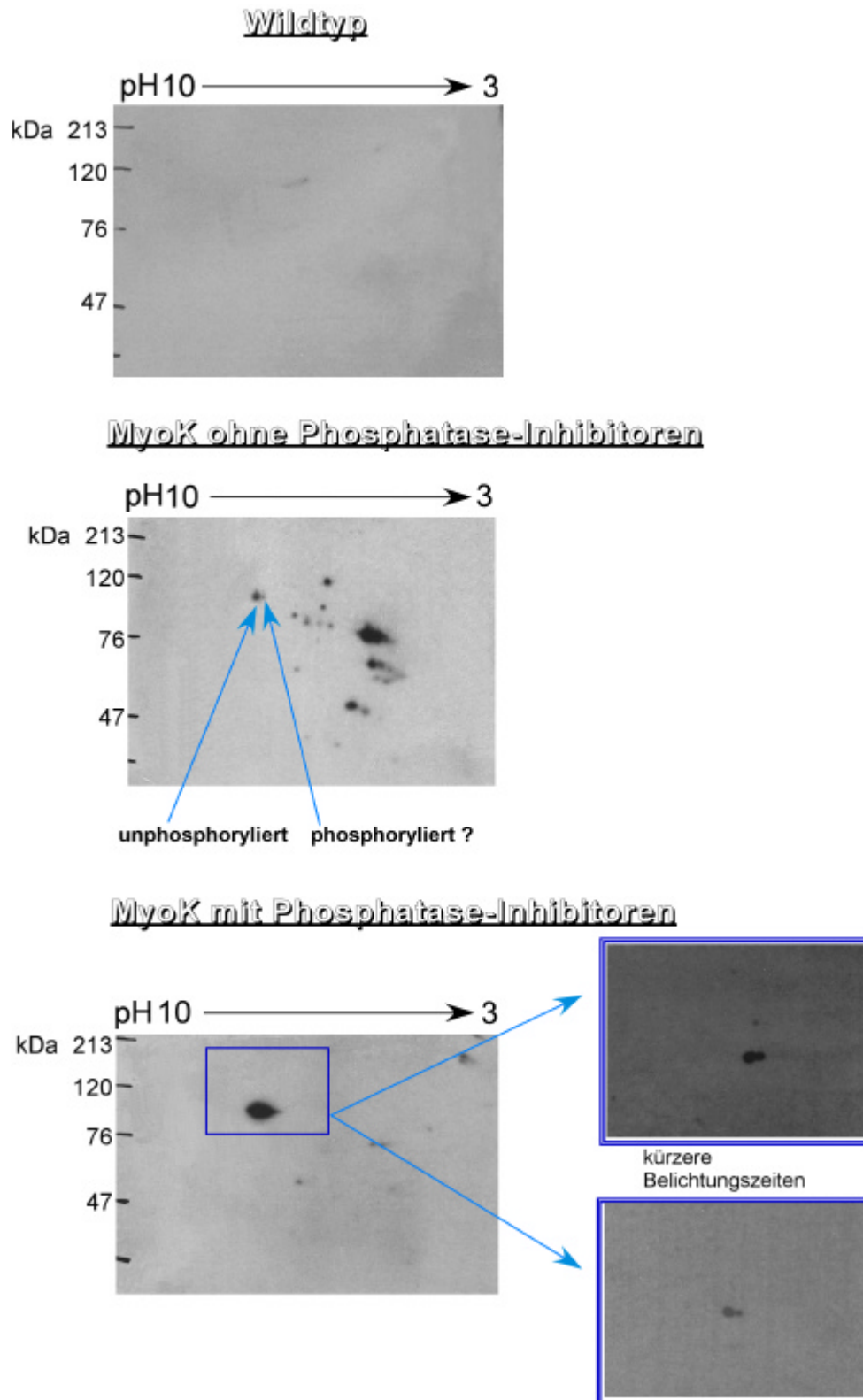


Abb. 4.9: MyoK in der 2D-Gelelektrophorese.

Die Zellextrakte wurden wie im Methodenteil 3.7.6.1 beschrieben, hergestellt und in folgenden Konzentrationen aufgetragen: MyoK⁺ Zellextrakt mit beziehungsweise ohne Phosphatase-Inhibitoren ca. 25 µg und Wildtyp Zellextrakt ca. 30 µg. Die erste Dimension wurde mit freundlicher Unterstützung am ZMBH durchgeführt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte in einem 10% PAA-Gel, das anschließend auf eine PVDF Membran geblottet wurde. Die Analyse erfolgte immunologisch mit dem Antikörper gegen MyoK, der allerdings nicht spezifisch gegen eine phosphorylierte Form ist.

4.2.6 MyoK bindet reversibel an F-Actin

Eine Charakteristik von Myosinen besteht in der ATP-abhängigen Bindung an Actin. Um zu untersuchen, ob sich MyoK trotz der ungewöhnlichen GPR-Loop Insertion ebenfalls wie ein klassisches Myosin verhält, wurde ein Kosedimentationsexperiment mit Triton-unlöslichem Cytoskelett unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung an F-Actin sowohl ATP- als auch salzabhängig war (Schwarz *et al.*, 2000). Da jedoch keine Quantifizierung des Ergebnisses mittels eines Lumi-Imagers, sondern eine Abschätzung mit dem Auge vorgenommen wurde, sollte der Test wiederholt werden, um genaue Werte zu erhalten. *D. discoideum* Zellen wurden entweder in Abwesenheit oder Anwesenheit von ATP inkubiert und lysiert. Um intrazelluläres vorhandenes ATP zu eliminieren, wurde ein ATP-verbrauchendes System in Form von Hexokinase und Glucose (Hexokinase überträgt einen Phosphatrest auf Glucose) eingesetzt. Als ATP-regenerierendes System dienten Kreatinphosphat und Kreatinphosphatkinase. In Anwesenheit von ATP blieben 68% des gesamten MyoK im Überstand, also nicht an F-Actin gebunden. In nukleotidfreiem Medium sedimentierten 90% von MyoK mit dem Cytoskelett. Um sicherzustellen, daß diese Bindung reversibel ist, wurde dieses Sediment mit konstant 10 μ M ATP und aufsteigender Salzkonzentration bis zu 1 M Natriumchlorid inkubiert (s. Abb. 4.10). So wie es für Myosine beschrieben ist, wurde MyoK mit ATP wieder freigesetzt. Im Gegensatz zu Myosin II reicht ATP alleine jedoch für eine quantitative Freisetzung von MyoK nicht aus. Es konnten nur 42% von MyoK aus dem Cytoskelett gelöst werden, aber durch Zugabe von Salz wurde dieser Anteil kontinuierlich auf bis zu 81% erhöht.

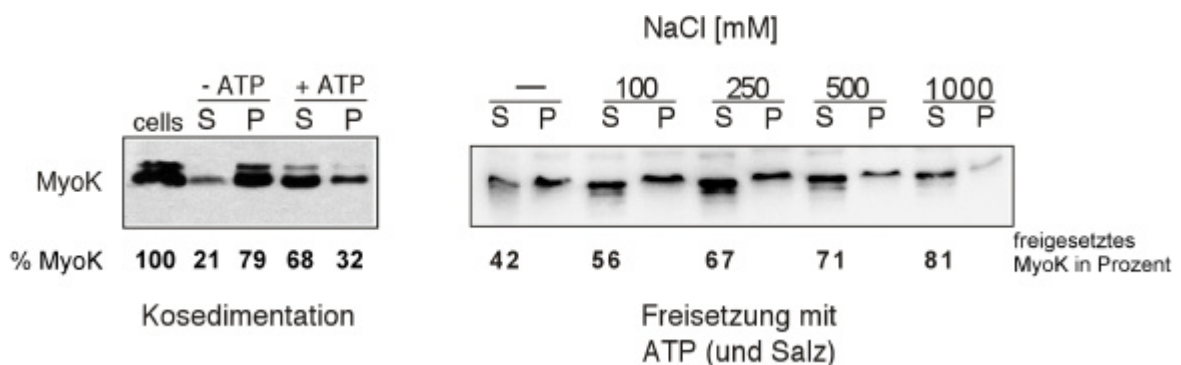


Abb. 4.10: Kosedimentation von MyoK mit Triton-unlöslichem Actin-Cytoskelett und dessen Freisetzung. Zur Überprüfung der ATP-Abhängigkeit wurden MyoK⁺ Zellen in 0.5% Triton X-100 entweder mit 10 mM ATP oder in Abwesenheit von ATP lysiert und zentrifugiert. Die Sedimente (P) und Überstände (S) wurden in gleichen Volumina im Vergleich zu Zellen vor der Lyse (cells) gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot unter Verwendung des anti MyoK Antikörpers analysiert. Das Sediment aus der Kosedimentation ohne ATP (linkes Schaubild, dritte Spur) wurde dann erst mit 10 mM ATP inkubiert (-) und zentrifugiert und nachfolgend mit ATP und zusätzlichem Salz (NaCl) in Konzentrationen von 100-1000 mM. Der jeweils freigesetzte MyoK Anteil im Überstand sowie der Anteil im Sediment wurden ebenfalls im Western Blot untersucht und densitometrisch quantifiziert.

4.2.7 Funktioniert MyoK als Motor?

Im vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß MyoK in ATP-abhängiger Weise an F-Actin bindet, wie es klassisch für Myosine ist. Um aber den Beweis zu erbringen, daß MyoK tatsächlich als molekularer Motor arbeitet, ist die kinetische Charakterisierung unerlässlich. Vor allem im Hinblick auf die ungewöhnlich große Insertion innerhalb des Oberflächenloops 1, der den Nukleotidaustausch moduliert und damit verantwortlich für die Geschwindigkeit des Austausches ist, könnte dies einen nicht zu unterschätzenden Einfluß auf die gesamte Geschwindigkeit des Proteins ausüben, mit der es sich an Actin entlangbewegt. Die kinetischen Eigenschaften eines Myosins können außerdem dazu beitragen, Aufschluß über seine physiologische Funktion zu erhalten. Die Steady-State Kinetik ermittelt sowohl die basale als auch Actin-aktivierte ATPase-Aktivität. Transientenkinetische Methoden werden angewendet, um einzelne Schritte innerhalb des Myosin-ATPase Zyklus zu untersuchen, die innerhalb von Millisekunden ablaufen. Für eine vollständige kinetische Charakterisierung von MyoK werden mindestens 5 mg des gereinigten Proteins benötigt.

4.2.8 Reinigung von MyoK aus *D. discoideum* im analytischen Maßstab

Das von Manstein und Hunt (1995) entwickelte analytische Extraktionsverfahren erlaubt die Abschätzung der Expressionsstärke von rekombinanten Myosinkonstrukten in *D. discoideum*. Dabei handelt es sich im Prinzip um eine Präzipitation des Actomyosin-Komplexes in einem ATP-depletierendem System. Das Myosinkonstrukt wird nachfolgend mit ATP aus dem Sediment extrahiert und befindet sich im Überstand, der gelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert wird. Für die Reinigung von MyoK wurden mehrere Klone ausgewählt, die MyoK mit der durch den *Ty1-tag* maskierten CaaX Box überexprimieren, um eine maximale Ausbeute an cytosolischem MyoK zu gewinnen. Das Expressionsniveau einer Zelllinie sollte mindestens so hoch sein, daß das entsprechende Myosin in einem mit Coomassie gefärbtem Gel sichtbar ist. Vergleicht den Überstand von Wildtyp-Zellen, die als Kontrolle dienen, mit den Überständen verschiedener MyoK überexprimierender Klone, kann man keine Bande zwischen 80 und 90 kDa erkennen, die stärker in den überexprimierenden Zellen vorhanden ist (s. Abb. 4.11). Das bestätigt das vorangegangene Experiment, daß MyoK nur limitiert exprimiert wird.

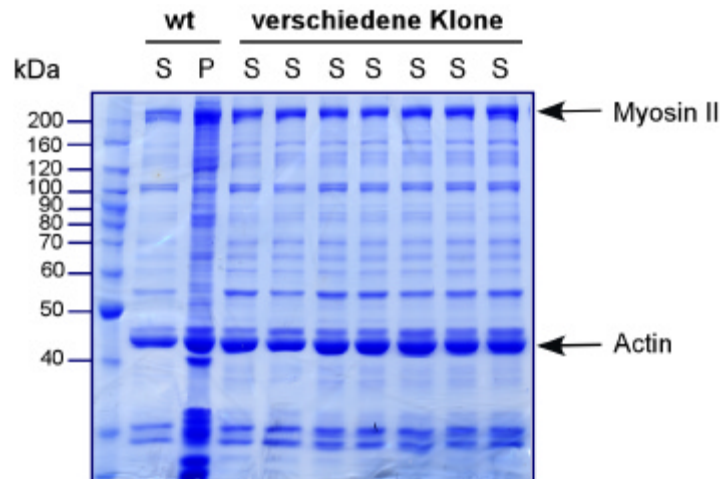


Abb. 4.11: Coomassie-Färbung der analytischen Proteinextraktion

In einem 10 % PAA-Gel wurden die Überstände (S) verschiedener MyoK überexprimierender Klone im Vergleich zu Wildtyp Zellen aufgetragen. Der Überstand und das Sediment (P) der Wildtyp Zellen diente als Referenz beziehungsweise als Negativkontrolle. MyoK hat ein Molekulargewicht von 94 kDa und wird im SDS-Page zwischen 80 und 90 kDa als Bande sichtbar. In der Coomassie-Färbung konnte in keinem Klon MyoK erkannt werden.

4.2.9 Versuch einer “präoperativen” Isolierung von MyoK aus *D. discoideum*

Obwohl das Ergebnis der analytischen Extraktion nicht erfolgsversprechend bezüglich der Expression von MyoK schien, wurde dennoch versucht, dieses Protein zu isolieren. Die Hoffnung bestand darin, aus einem großem Ansatz genügend MyoK reinigen zu können, um damit einige kinetische Daten zu erhalten. Dazu wurde wie in Abschnitt 3.7.2.2 beschrieben, verfahren. Kurz zusammengefasst, wurden ca. 7.5 g feuchtes Zellsediment in vierfachem Volumen Lysepuffer aufgebrochen; im ATP-depletierten System kosedimentierten die Myosine (endogene Myosine ebenso wie MyoK) als Komplex mit Actin und wurden in zwei Schritten unter Hochsalzbedingungen aus dem Actomyosin-Komplex wieder extrahiert. Die Präzipitation mit Actin ist besonders wichtig, da sie sowohl einen Reinigungsschritt vor der Säulenchromatographie darstellt als auch MyoK dadurch aufkonzentriert wird. Über den aminoterminalen *His-tag* soll dann die Bindung von MyoK an die Nickel-NTA Säule erfolgen. Abschließend wird MyoK in einer aufsteigender Imidazolkonzentration eluiert. Trotz mehrfacher Wiederholung dieser Aufreinigung, war es nicht möglich, MyoK in annähernd ausreichender Menge zu isolieren. Dieses Myosin konnte nie im Coomassie Gel, sondern immer nur im Western Blot nachgewiesen. Ein repräsentativer Western Blot ist in Abbildung 4.12 gezeigt. Die Sedimentation mit Actin verlief immer erfolgreich, fast das gesamte MyoK wurde im Triton-unlöslichen Cytoskelett nachgewiesen (s. Abb. 4.12 A, Spur 2). Die Extraktion von MyoK aus dem Sediment schwankte zwischen 40 bis 65 %.

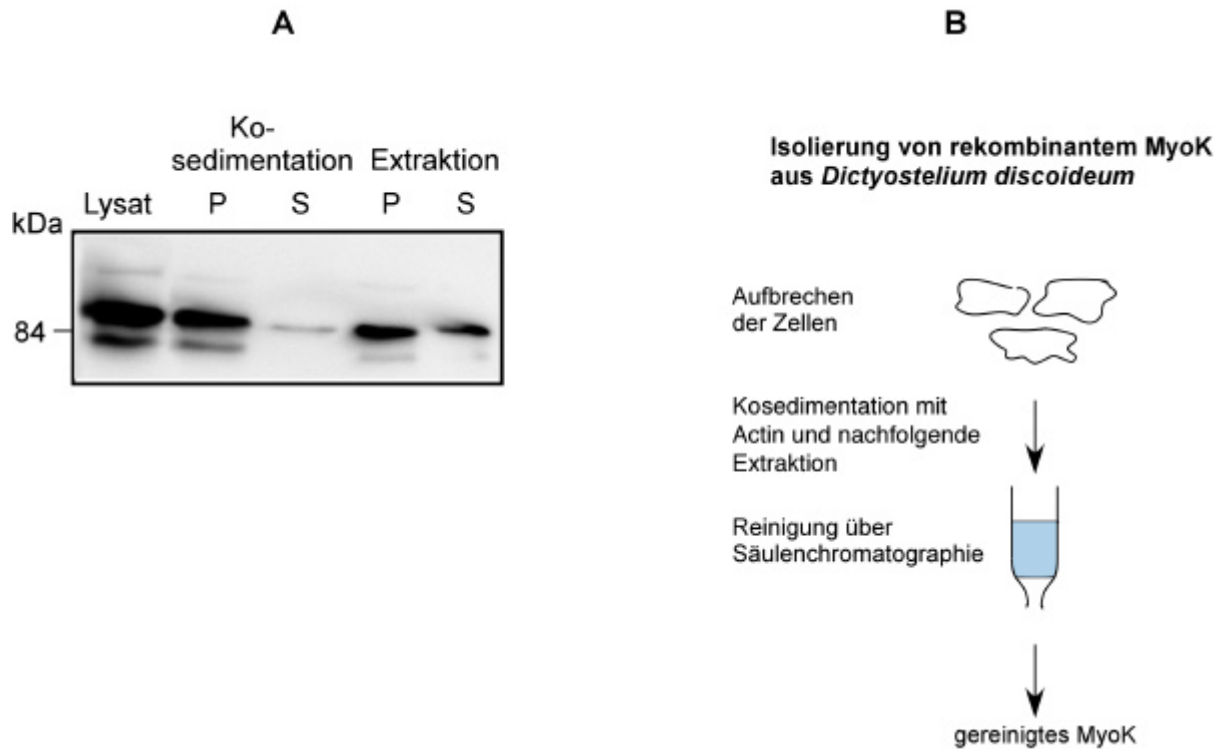


Abb. 4.12: MyoK Reinigung

(A) Kosedimentation von rekombinanten MyoK mit dem Triton-unlöslichen Actin-Cytoskelett und die Freisetzung durch ATP. MyoK überexprimierende *D. discoideum* Zellen wurden in Abwesenheit von ATP in 1% TritonX 100 lysiert und zentrifugiert. Fast das gesamte MyoK sedimentierte mit dem Actin-Cytoskelett (Kosedimentation, P). Durch Zugabe von 20 mM ATP und 0.5 M NaCl wurden die Myosine wieder freigesetzt (Extraktion, S). Die jeweiligen Sedimente (P) und Überstände (S) wurden im Western Blot mit Hilfe des anti-MyoK Antikörpers analysiert.

(B) Schematische Zeichnung des kompletten Reinigungsprozesses. Nach Aufbruch der *D. discoideum* Zellen erfolgt die Actin-Präzipitation und Extraktion des Myosins mit ATP. Der lösliche Anteil der Myosine wird auf eine Nickel-NTA Matrix gebracht, an die nur MyoK über seinen 6xHistidin-Tag binden sollte. Nach ausgiebigem Waschen der Matrix wird das Myosin in einer aufsteigenden Imidazolreihe von 20-100 mM eluiert.

Nicht nur die niedrige Expression von MyoK erwies sich als problematisch. Nachdem der Überstand aus der Extraktion auf die Nickelsäule geladen wurde und nach den üblichen Waschsritten die Elution erfolgte, wurden die gesammelten Fraktionen auf ihren Proteingehalt untersucht. Dazu diente als Schnelltest die Färbung mit Amidoschwarz (s. Abb. 4.13), mit der nicht die Reinheit des eluierten Proteins überprüft werden kann, da alle enthaltenen Proteine angefärbt werden. Da MyoK wahrscheinlich stark anfällig gegen Degradation ist, sollten aber mit dieser Färbung die proteinhaltigsten Fraktionen so schnell wie möglich auffindig gemacht werden. Die gesammelten Fraktionen enthielten wiederholt nur äußerst geringe Mengen an Protein, so daß eine kinetische Untersuchung nicht möglich war.

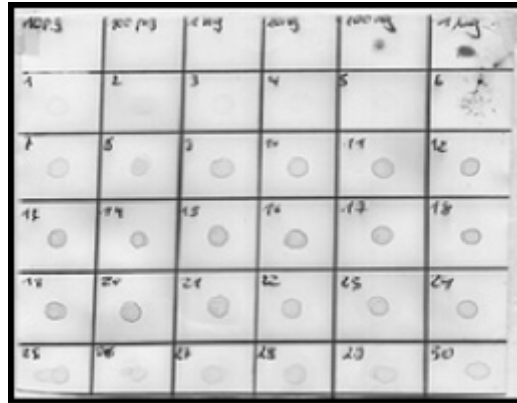


Abb. 4.13: Amidoschwarz-Färbung der verschiedenen Fraktionen auf Nitrozellulose. Um die in den Fraktionen enthaltene Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde als Referenz BSA (bovines Serumalbumin) in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen (siehe Reihe 1; 10pg-1 μ g). Aus den einzelnen Fraktionen (1ml) wurde jeweils 5 μ l direkt auf die Nitrocellulose aufgetragen (Fraktionen 1-30). Die Färbereaktion war nach 3 Minuten beendet.

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse war die MyoK Reinigung offensichtlich gescheitert und damit eine kinetische Charakterisierung vorerst nicht möglich. Um herauszufinden, wo die Reinigung ineffizient wird, wurden Proben analysiert, die aus unterschiedlichen Schritten des Reinigungsprozesses stammten.

Eine Analyse mit Antikörpern gegen MyoK zeigte, daß die Extraktion aus dem Triton-unlöslichen Cytoskelett effizient war. Stattdessen war die Bindung an die Nickel-NTA Säule nur unzureichend, denn im Durchfluß konnte mehr MyoK detektiert werden als auf dem Säulenmaterial (s. Abb. 4.14, rechtes Schaubild). Zusätzlich schien die Elution mit Imidazol ungenügend, denn trotz Anwendung eines aufsteigenden Gradienten bis 100 mM Imidazol, blieb der Großteil von Myok auf der Säule hängen.

Durch die Überprüfung der verschiedenen Proben mit dem Antikörper, der gegen den aminoterminalen *His-tag* gerichtet ist, wurde schließlich erkannt, daß die Probleme mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund der Degradation des Proteins zustande kamen. Da nach dem Extraktionsschritt kaum noch MyoK mit *His-tag* in den nachfolgenden Proben nachgewiesen wurde, ist es naheliegend, daß vom Aminoterminus beginnend das Protein durch Proteasen abgebaut wurde (s. Abb. 4.14, linkes Schaubild). Damit war keine spezifische Interaktion zwischen dem *His-tag* und der Nickel-Matrix mehr möglich. Das mit anti-MyoK detektierte Protein präzipitierte demnach auf der Nickelmatrix und konnte nicht mit Imidazol eluiert werden.

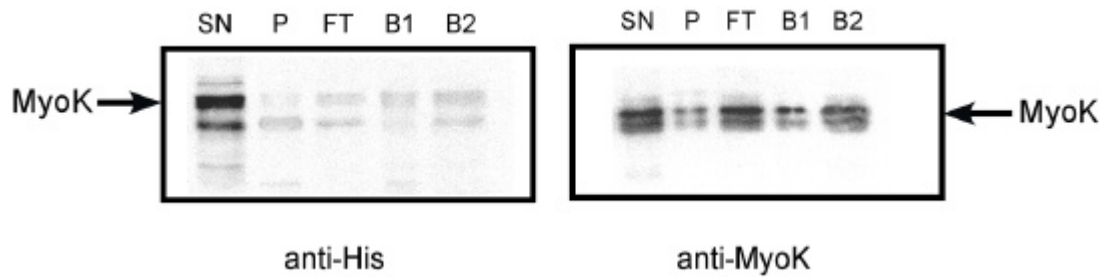


Abb. 4.14: Dokumentation der einzelnen Schritte im MyoK Reinigungsprozeß. Die gesammelten Proben wurden in vergleichbaren Mengen in einem PAA-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Membran mittels anti-His Antikörper (linkes Schaubild) oder anti-MyoK Antikörper (rechtes Schaubild) analysiert (gezeigt sind zwei unterschiedliche Gele mit dem gleichen Probenauftrag). Der Überstand (SN) aus der Extraktion enthält lösliches MyoK. Anti-MyoK-Blot: Im Sediment (P) ist kaum MyoK nachweisbar. Im Durchfluß der Säule (FT) befindet sich ein Großteil des Proteins wohingegen wenig MyoK an die Beads gebunden hatte (B1). Auch nach der Elution wurde MyoK noch auf der Säule detektiert (B2). Der anti-His Antikörper erkannte nur im Überstand intaktes MyoK, so daß davon auszugehen ist, daß ein proteolytischer Abbau stattgefunden hatte.

4.3 Charakterisierung des GPR-Loop

4.3.1 Der GPR-Loop hat eine potentielle sekundäre Actin-Bindestelle

Die Tatsache, daß im vorangegangenen Experiment (Abschnitt. 4.2.6) ATP alleine nicht ausreichte, um MyoK quantitativ aus dem Triton-unlöslichen Cytoskelett freizusetzen, sondern zusätzlich eine hohe Salzkonzentration notwendig war, legte die Vermutung nahe, daß weitere elektrostatische Interaktionen zwischen MyoK und Actin bestehen. Die ungewöhnliche Insertion in der Motordomäne von MyoK (der sogenannte GPR-Loop) hat eine starke Ähnlichkeit mit den GPA bzw. GPQ Domänen anderer Klasse I Myosine, von denen bereits *in vitro* gezeigt wurde, daß sie in ATP-unabhängiger Weise an F-Actin binden (Jung und Hammer, 1994; Rosenfeld und Rener, 1994). Deshalb wurde untersucht, ob der GPR-Loop tatsächlich die gleiche Funktion einer zweiten, Nukleotid-insensitiven Actin-Bindestelle übernehmen kann, wie die GPA/GPQ Domänen der anderen Myosine I.

4.3.2 Reinigung von rekombinanten GPR-Loop aus *E. coli*

Um den GPR-Loop in *E. coli* zu exprimieren, wurde ein Konstrukt hergestellt, in dem die für den GPR-Loop codierende Sequenz carboxyterminal an das bakterielle Protein GST (Glutathion-S-Transferase) ligiert wurde. Die Domäne des GPR-Loop wurde mittels PCR aus der cDNA von *myoK* gewonnen, welche bereits im *D. discoideum* Vektor pDXA-HC vorlag. Für die Klonierung in den bakteriellen Vektor pGEX-3X mußten sowohl am 5' als auch am 3' Ende der codierenden Sequenz eine Xma I Restriktionsstelle eingeführt werden. Im Hinblick auf die Möglichkeit einer weiteren Subklonierung des GPR-Loops in einen Expressionsvektor in *D. discoideum* wurde zusätzlich eine BamHI sowie eine XhoI Schnittstelle generiert

(s.Abb. 4.15). Die PCR-Produkte wurden mit dem pCR-Script-System kloniert und über die Xma I-Schnittstelle in pGEX-3X kloniert.

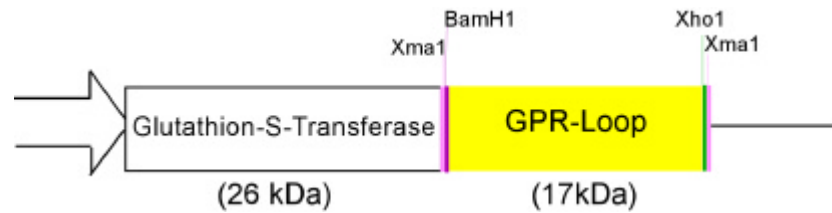


Abb. 4.15: Schematische Darstellung der GST-Chimäre. (nicht maßstabsgetreu abgebildet). Der Pfeil illustriert den bakteriellen Promotor, unter dessen Kontrolle die GST-Chimäre gebildet wird. In Klammern ist das Molekulargewicht der beiden Proteine gezeigt. Das Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von 43 kDa.

GST funktioniert nur unter nativen Bedingungen als Ligand für eine Affinitätsreinigung. Deshalb wurde getestet, ob eine Absenkung der Temperatur während Induktion der Proteinexpression zu höheren Ausbeuten an (löslichem) Protein führt. In der Tat wurde die Ausbeute an löslichem Protein deutlich gesteigert, wenn bei den Präparationen bei 16°C über Nacht induziert wurde. Deshalb wurden die nachfolgenden Präparationen immer bei niedriger Temperatur induziert und nicht, wie es standardmäßig in der Literatur beschrieben ist, bei 30 °C für wenige Stunden. Zur Isolierung der rekombinanten Proteine wurde im Grundsatz das vom GSH-Sepharose-Hersteller vorgeschlagene Protokoll befolgt. Die ersten gesammelten Fraktionen enthielten soviel Protein, daß auf eine Anreicherung verzichtet werden konnte (s. Abb. 4.16). Da das Fusionsprotein jedoch gegen Degradation sehr anfällig war, wurde die proteinreichste Fraktion anschließend zur Gelfiltration im FPLC-Verfahren auf eine HiLoad 16/60 Superdex 75-Säule (Pharmacia) aufgetragen, um degradiertes Protein und niedermolekulare Kontaminanten abzutrennen.

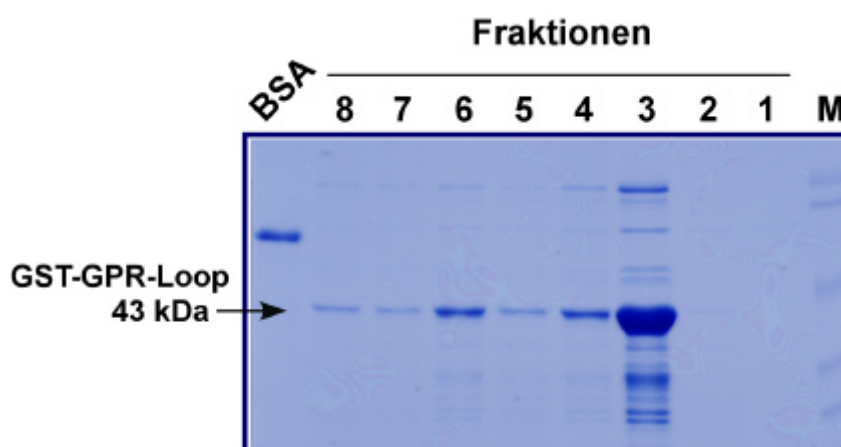


Abb.4.16: Die präparative Reinigung des GPR-Loops als GST-Fusionsprotein. Gezeigt ist die Coomassie-Färbung der einzelnen Fraktionen nach der Elution mit 20 mM Gluthation. Jede Bande aus den Fraktionen entspricht 10 µl des Gesamtvolumens von jeweils 2 ml. Um die Konzentration abzuschätzen, wurde 2µg BSA als Vergleich aufgetragen (Spur 1). Die Fraktion 3 wurde direkt auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, um die Degradationsprodukte abzutrennen. Die Fraktionen 4-7 wurden sofort aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gesamte Ausbeute an GST-GPR-Loop aus zwei Litern exprimierenden *E. coli* BL21 Zellen betrug durchschnittlich ca. 7 bis 8 mg.

Die Fraktionen 4-7 wurden sofort aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gesamte Ausbeute an GST-GPR-Loop aus zwei Litern exprimierenden *E. coli* BL21 Zellen betrug durchschnittlich ca. 7 bis 8 mg.

4.3.3 Der GPR-Loop bindet an F-Actin

Zur Überprüfung der möglichen Existenz einer zweiten Actin-Bindestelle innerhalb des GPR-Loops wurde ein *in vitro* Kosedimentations-Experiment durchgeführt. Dazu wurde eine variable Konzentration des GST-GPR-Loops (0.25 μM - 10 μM) mit einer konstanten Konzentration (4 μM) F-Actin aus Kaninchen Skelettmuskel in Abwesenheit von ATP inkubiert. Da Actin und der GST-GPR-Loop ein fast gleiches Molekulargewicht besitzen (42 kDa bzw 43 kDa), konnte nicht durch eine Coomassie Färbung festgestellt werden, ob eine direkte Bindung stattfindet, sondern mußte mittels Western Blot der Anteil des mit Actin sedimentierten GPR-Loops analysiert werden. Bei niedrigen Konzentrationen des GPR-Loop sedimentierte der größte Teil des Proteins mit F-Actin und wurde dort detektiert. Mit Einsatz höherer Konzentrationen an GPR-Loop wurde eine Sättigung erreicht, was im Western Blot leicht anhand der Tatsache nachgewiesen wurde, daß sich dann mehr Protein im Überstand befand. Durch densitometrische Quantifizierung wurde eine 1:2 Stöchiometrie von GPR-Loop zu Actin abgeschätzt, da sich bei 4 μM ungefähr die Hälfte des GPR-Loops im Sediment befindet (s. Abb. 4.17).

Zusätzlich wurde untersucht, ob diese Actin-Bindung nicht nur ATP-, sondern auch salzunabhängig ist. Das könnte physiologisch von Bedeutung sein, da die Ionenkonzentration im Cytosol von *D. discoideum* ungefähr zwischen 40 bis 80 mM Salzäquivalenten liegt (Marin und Rothman, 1980; Steck *et al.*, 1997). Diesmal wurden konstante Konzentrationen von GPR-Loop und F-Actin verwendet. Jeweils 2 μM GPR-Loop Konstrukt wurden mit 4 μM F-Actin und ansteigender Salzkonzentration inkubiert. Bei niedrigen Salzkonzentrationen bis 40 mM KCl sedimentierte der Hauptteil des GPR-Loops mit F-Actin. Die Bindung an F-Actin reduzierte sich jedoch stetig ab 40 mM KCl und wurde komplett ab 100 mM KCl unterdrückt (s. Abb. 4.18).

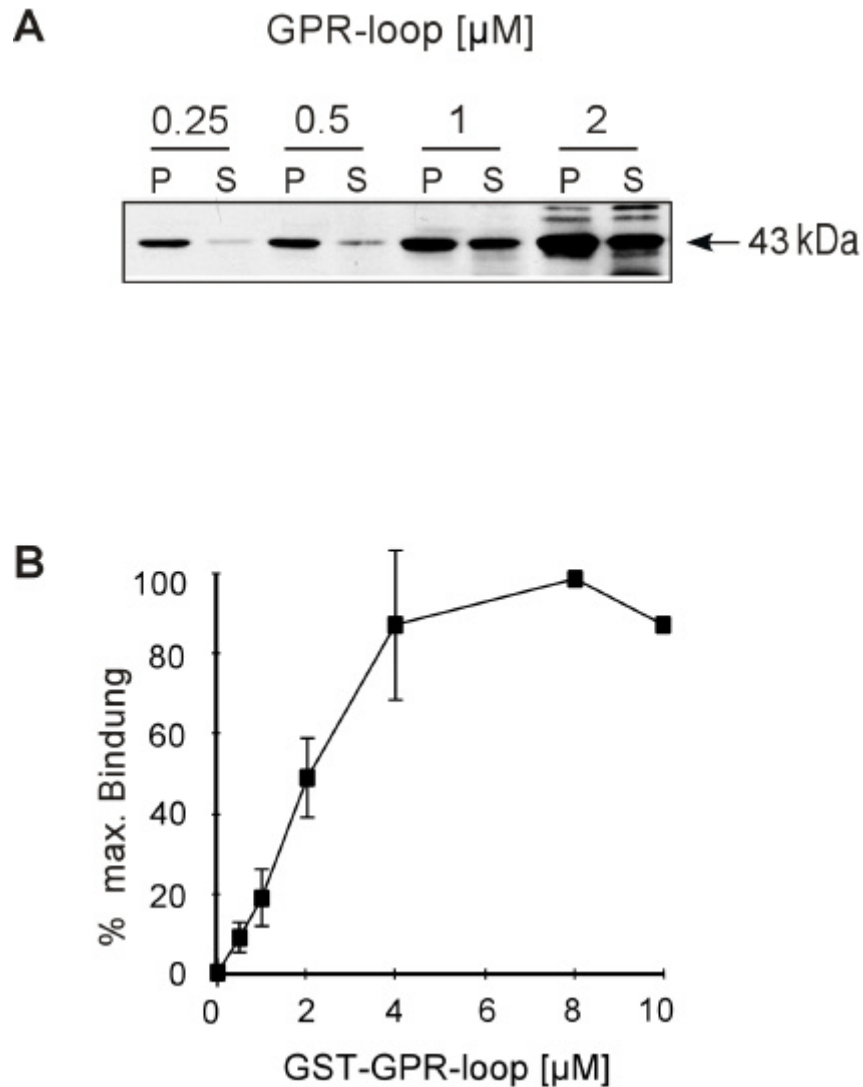


Abb. 4.17: Die ATP-unabhängige Bindung des GPR-Loop an F-Actin

(A) ***In vitro* Kosedimentation.** Repräsentativer Ausschnitt einer Kosedimentation mit rekombinanten GPR-Loop und gereinigtem F-Actin aus Kaninchenmuskel. Verschiedene Konzentrationen des GPR-Loops wurden in Abwesenheit von ATP mit $4 \mu\text{M}$ Actin inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die Sedimente (P) und Überstände (S) im Western Blot mit polyklonalen anti-GST Antikörpern analysiert.

(B) **Quantitative Auswertung.** Es wurden vier verschiedene Experimente in die Auswertung mit einbezogen. Der prozentuale Anteil der gebundenen Chimäre wurde gegen die Konzentration von GPR-Loop aufgetragen.

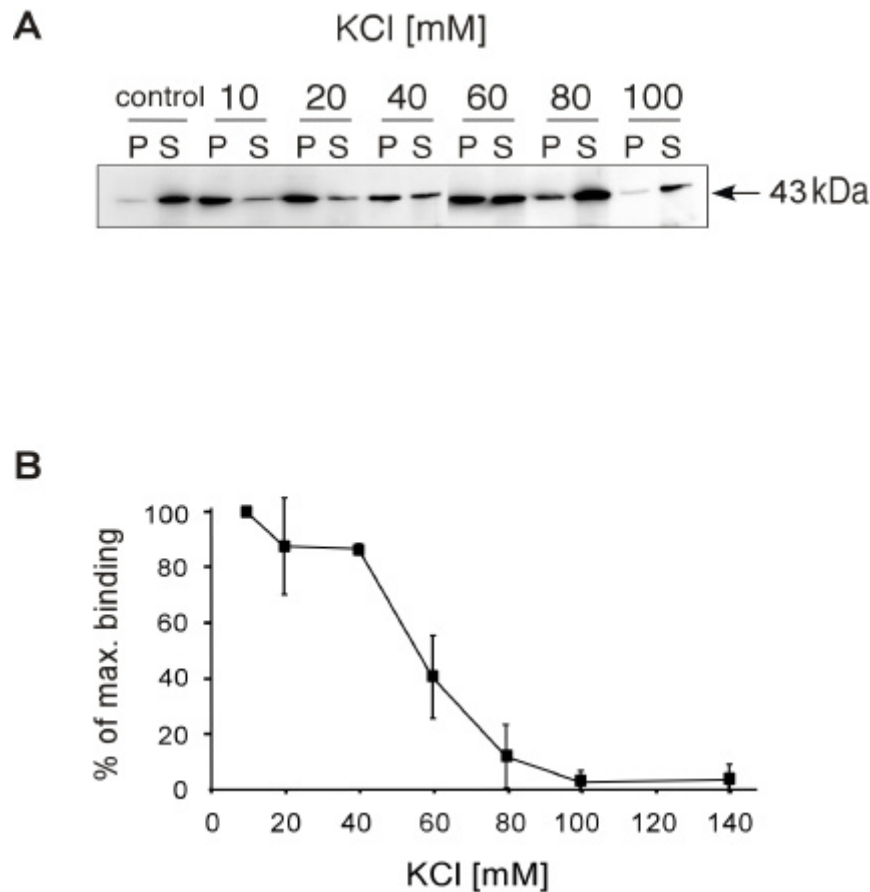
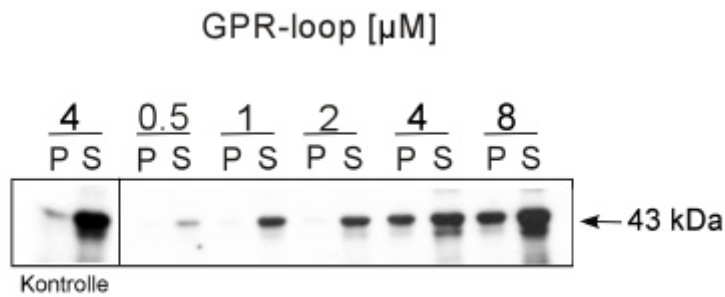


Abb. 4.18: Die salzabhängige Bindung des GPR-Loop an F-Actin.

In (A) ist ein Western Blot gezeigt, der die Kosedimentation des GPR-Loops mit F-Actin in Abhängigkeit der Salzkonzentration demonstriert. Konstante Konzentrationen von GPR-Loop ($2\mu\text{M}$) und F-Actin ($4\mu\text{M}$) wurden mit ansteigenden KCL Konzentrationen inkubiert und zentrifugiert. Als Kontrolle diente reiner GPR-Loop ohne Actin in Niedrigsalz (20 mM KCl). Die Sedimente (P) und Überstände (S) von vier unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch quantifiziert und in (B) graphisch dargestellt.

Nachdem gezeigt wurde, daß der GPR-Loop in ATP-unabhängiger Weise an F-Actin bindet und diese Bindung eine Sättigung aufweist, sollte in einem Kontrollexperiment geprüft werden, ob diese Bindung wirklich spezifisch ist. Falls der GPR-Loop unspezifisch an Actin-Filamente bindet, würden wahrscheinlich schon bei geringer Proteinkonzentration ganze Actin-Bündel entstehen, die bei niedriger Umdrehungszahl sedimentieren. Zur Klärung dieser Frage wurde in Analogie zu 4.3.3 ein Experiment durchgeführt, bei dem lediglich der Zentrifugationsschritt geändert wurde. Dieser wurde bei 1500 UPM in einer Tischzentrifuge ausgeführt. Bis zur eingesetzten Konzentration von $4\mu\text{M}$ GPR-Loop ist keine Kosedimentation mit F-Actin zu beobachten, was für eine Actin-Bindung spricht. Ab $4\mu\text{M}$ Loop-Konstrukt sedimentiert ein Teil mit Actin (s. Abb. 4.19), jedoch in geringerem Maß als es in dem vorangegangenen Experiment gezeigt worden ist.

**Abb. 4.19:**

Kontrollexperiment: Ko-sedimentation des GPR-Loop mit F-Actin bei geringer Drehzahl. Je 4 μM F-Actin wurden mit GST-GPR-Loop von 0.5 - 8 μM inkubiert und zentrifugiert. Als Kontrolle wurde 4 μM

GST-GPR-Loop ohne F-Actin mitgeführt, um festzustellen, wieviel Protein präzipitierte (unspezifischer Hintergrund). Die Überstände (S) und Sedimente (P) der Proben wurden mittels anti-GST Antikörper im Western Blot analysiert.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß MyoK im Actin-Cortex eine Rolle spielt. Die Existenz zweier Actin-Bindestellen innerhalb der Motordomäne ist bisher einzigartig. Dadurch könnte MyoK eine neue Art von Actin-Kreuzvernetzer darstellen, und eine genau angepaßte Struktur für die Erhaltung der Integrität des Actin-Cortex zeigen

4.3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung der F-Actin Bindung

Isolierte Myosin-II-Köpfchen besitzen nach wie vor, wie das vollständige Myosin-II-Molekül, sowohl die ATPase-Aktivität als auch die Fähigkeit an Actin zu binden. Jedes Actin-Molekül in einem Actin-Filament ist in der Lage, ein Myosin-II-Köpfchen zu binden, und der dadurch entstandene Komplex zeigt deutlich die polare Struktur des Actin-Filaments. Bei Negativfärbung erkennt man im Elektronenmikroskop, daß solche Komplexe eine charakteristische, regelmäßige Form haben: Jedes Myosin-Köpfchen bildet einen kleinen Vorsprung, und wenn viele Köpfchen gebunden haben, sehen diese wie Pfeilspitzen aus. Dadurch wird auch die Polarität des Filaments deutlich sichtbar: Die Spitze des Pfeils entspricht dem *minus-Ende*, die stumpfe Seite ist das *plus-Ende*.

Es wurde untersucht, ob der GPR-Loop in gleicher Weise Actin-Filamente dekoriert. In Kollaboration mit Dr. Heiko Stegmann aus der Abteilung Biophysik wurde versucht, die Interaktion des GPR-Loops mit F-Actin darzustellen. Dazu wurden im molaren Verhältnis 1:3 oder 1:6 F-Actin aus Kaninchenmuskel mit gereinigtem GST-GPR-Loop gemischt, auf ein EM-Netzchen (*mesh-grid*) aufgebracht und mit einer Uranylacetatlösung kontrastiert. Als Vergleich wurde eine Probe mit F-Actin alleine mitgeführt. Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Untersuchung konnte allerdings keine Bindung des GPR-Loops an F-Actin bestätigen. Dieses negative Ergebnis bedeutet nicht unbedingt, daß prinzipiell keine Interaktion zwischen dem GPR-Loop und Actin-Filamenten bestehen kann. Es ist denkbar, daß eine Abänderung des verwendeten Standardprotokolls zur erfolgreichen Dekoration der Actin-Filamente führen kann. Aus Zeitgründen konnte dieser Teil des Projekts nicht weitergeführt werden.

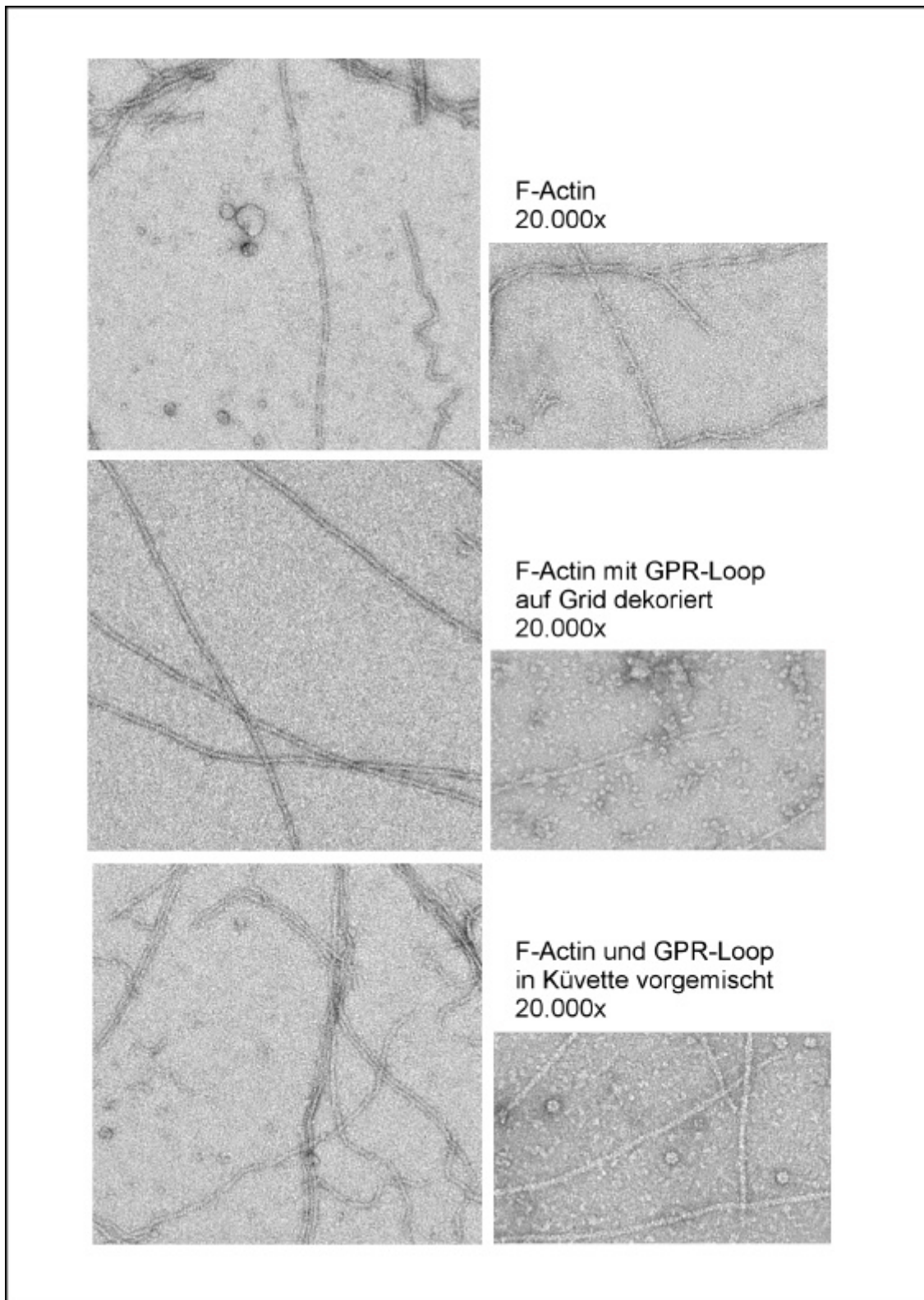


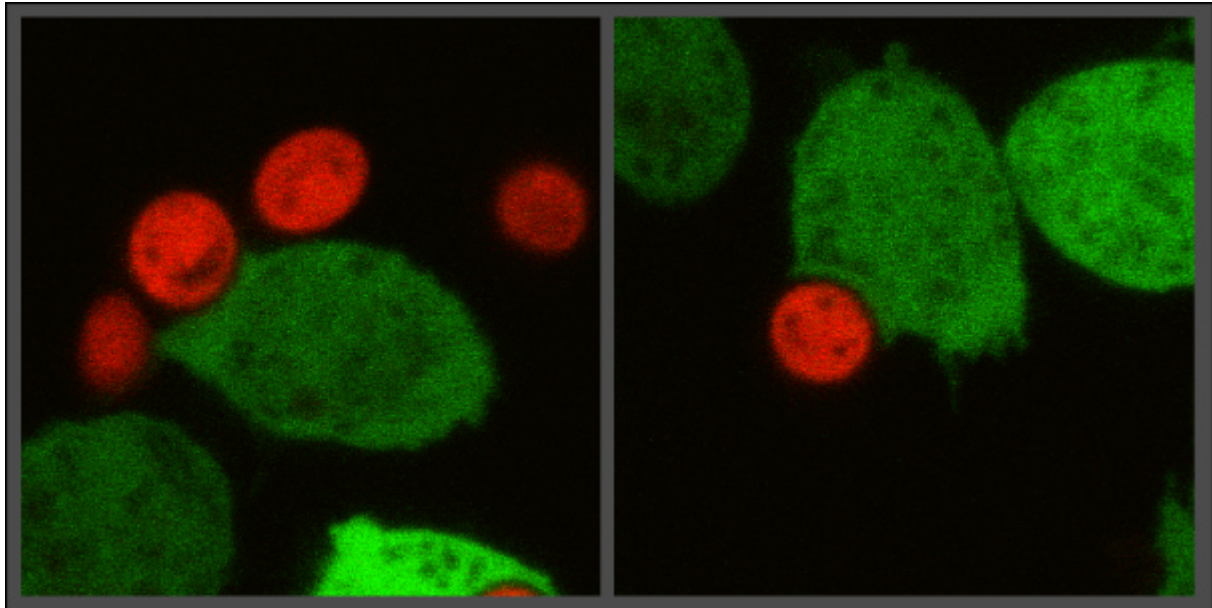
Abb. 4.20: Versuch einer F-Actin Dekoration mit GPR-Loop von MyoK. Gezeigt sind Aufnahmen aus je zwei unterschiedlichen Experimenten. Die linken Bilder stammen aus dem molaren Mischungsverhältnis 1:3 GPR-Loop zu F-Actin (bzw. nur Actin; obere Reihe). In den Bilderausschnitten rechts wurden GPR-Loop und F-Actin im Verhältnis 1:6 gemischt. Für die Untersuchung wurde ein Phillips 400 T Transmissions-elektronenmikroskop verwendet (freundlicherweise von Dr. Heiko Stegmann durchgeführt).

4.3.5 Intrazelluläre Lokalisation des GPR-Loops

Mit Immunfluoreszenz wurde bereits gezeigt, daß MyoK im gesamten Cytoplasma verteilt ist, sich aber eine signifikante Anreicherung in dynamischen Regionen des Actin-Cortex findet, wie z.B. in den macropinocytotischen Bechern. Zusätzlich konnte belegt werden, daß MyoK über seine carboxyterminale Domäne in der Plasmamembran verankert werden kann. Um festzustellen, ob der GPR-Loop beziehungsweise eine Domäne innerhalb dieses Loops ebenfalls zur Lokalisation von MyoK an dynamische Stellen des Actin-Cortex beiträgt, wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) an den Aminoterminus des GPR-Loops fusioniert. Der enorme Vorteil der Verwendung von GFP-Konstrukten liegt darin, daß es möglich ist, in lebenden Zellen die markierten Proteine zu beobachten. Für die Analyse des GPR-Loops ist es besonders aufschlußreich, was während eines Prozesses wie der Phagozytose geschieht, da sowohl *myoK* deletierte als auch MyoK überexprimierende Zellen eine anfänglich reduzierte Aufnahmerate zeigen. Dazu wurden die GFP-GPR-Loop überexprimierenden *D. discoideum* Zellen mit TRITC-markierten Hefen gefüttert. Die Beobachtung von lebenden Zellen, die das GFP-Fusionsprotein exprimierten, zeigten weder eine veränderte Morphologie noch eine auffällige Anreicherung in bestimmten Regionen der Zelle. Stattdessen wurde eine gleichmäßige Verteilung im gesamten Cytoplasma festgestellt (s. Abb. 4.21, A).

Zusätzlich zu der mikroskopischen Untersuchung an lebenden *D. discoideum* Zellen, wurde auf biochemischem Wege analysiert, wie sich der GPR-Loop prozentual auf Cytosol und Membranen verteilt. Dazu wurden die GFP-GPR-Loop überexprimierenden Zellen schonend aufgebrochen und wie im Methodenteil beschrieben, in Cytosol und Membranen fraktioniert. Es bestätigte sich, daß der weitaus größte Teil cytosolisch ist (über 80 %) und weniger als 20 % mit Membranen assoziiert sind (s. Abb. 4.21, B). Der membran-assoziierte Anteil ist wahrscheinlich noch geringer, da die Kontrolle mit GFP (ein cytosolisches Protein) ebenfalls mit einem Anteil von ca. 10 % in der Membranfraktion detektiert wurde.

A



B

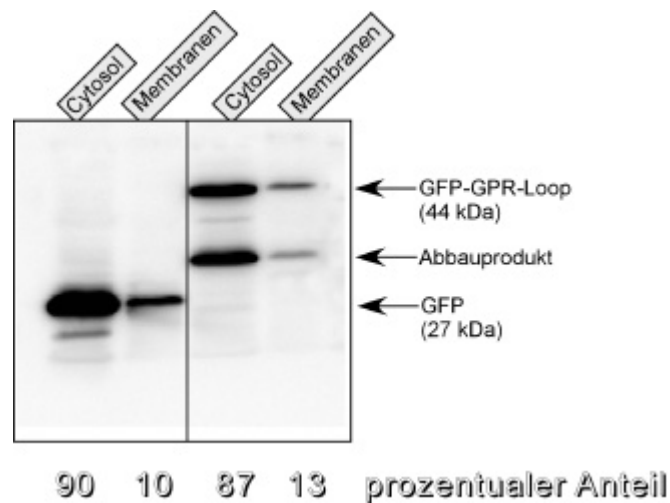


Abb. 4.21: Beobachtung lebender GFP-GPR-Loop exprimierenden Zellen während der Phagozytose.

(A) Gezeigt sind verschiedene Zellen, die Kontakt mit den Nahrungspartikeln (TRITC markierte Hefen) aufgenommen haben. In der rechten Aufnahme bildet sich gerade der phagozytische Becher, um die Hefe ganz zu umschlingen und sich einzuverleiben. Die Zellen exprimieren zwar die GFP-Chimäre unterschiedlich stark, aber zeigen alle deren gleichmäßige Verteilung im Cytoplasma. Die Beobachtung erfolgte mit einem konfokalen Laser Scan Mikroskop.

(B) Quantifizierung des jeweiligen Anteils an GPR-Loop im Cytosol oder in Membranen im Vergleich zu GFP (Kontrolle). Nach dem Western Blotting wurde ein polyklonaler anti-GFP Antikörper eingesetzt. Die Intensität der Banden wurde in einem Chemilumineszenz-Imager quantifiziert.

Die Wahrscheinlichkeit, daß der GPR-Loop außer der zweiten ATP-unabhängigen Bindung an F-Actin, weitere Interaktionspartner besitzt, ist sehr hoch. Sieht man sich die Primärstruktur genau an, findet man prolinreiche Sequenzen, in denen mehrfach drei Proline aufeinanderfolgen (s. Abb. 4.1). In der Mitte des GPR-Loops sind sogar fünf Prolin-Reste vorhanden, die nur durch ein Isoleucin getrennt sind. Für Proteine, die poly-Prolin Motive besitzen, wurde gezeigt, daß sie an Profilin binden können (Holt und Koffer, 2001; Übersichtsartikel). Die Vermutung, daß eine Interaktion zwischen dem GPR-Loop von MyoK und Profilin existiert, sollte *in vitro* und *in vivo* geprüft werden.

4.4 Bindungspartner des GPR-Loop

4.4.1 Das Profil der MyoK Expression deckt sich mit dem Expressionsmuster von Profilin II

Wie bereits gezeigt (Schwarz *et al.*, 2000), wird die Expression von MyoK in *D. discoideum* entwicklungsabhängig reguliert. Dabei zeigte sich, daß eine maximale Expression zwischen acht und zehn Stunden erreicht wird, wenn die Zellen am beweglichsten sind. Dies überrascht nicht, da bereits gezeigt wurde, daß MyoK in enger Beziehung zum Actin-Cortex steht.

In *D. discoideum* existieren zwei Isoformen von Profilin; Profilin I und Profilin II, welche in diesem Organismus hauptsächlich für die Sequestrierung von G-Actin verantwortlich zu sein scheinen. Die Expression von Profilin II korreliert perfekt mit der Expression von MyoK, während Profilin I erst in den späteren Entwicklungsstadien gebildet wird (s. Abb. 4.22).

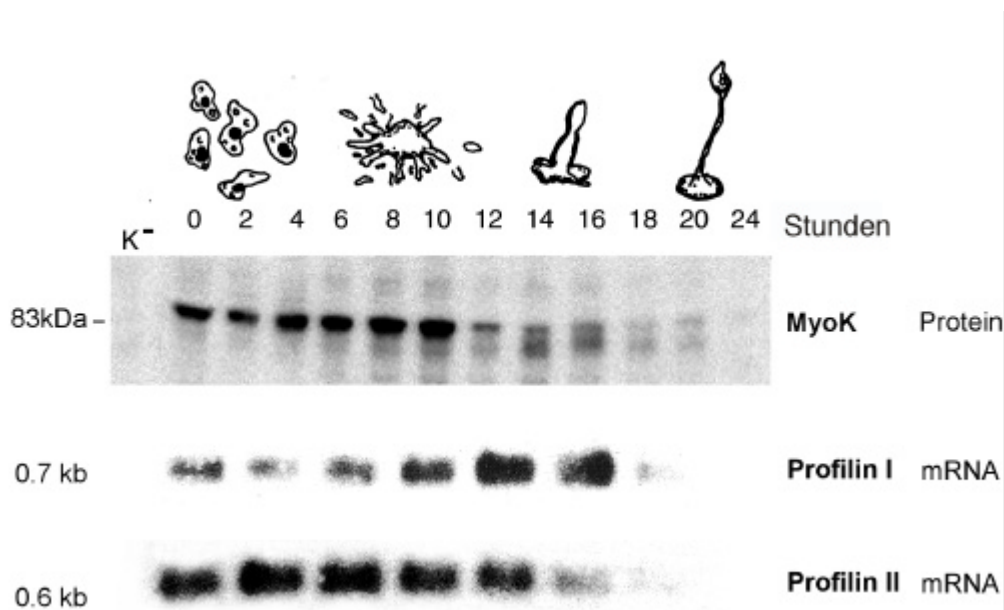


Abb. 4.22: Die Expressionsprofile von MyoK und den beiden Profilin Isoformen in *D. discoideum*. Die MyoK Expression ist auf Proteinebene gezeigt und wurde aus Schwarz *et al.*, 2000 entnommen. Die Expression der mRNA für Profilin I und Profilin II wurde einer Veröffentlichung von Haugwitz *et al.* von 1991 entnommen.

4.4.2 Der GPR-Loop bindet *in vivo* an Profilin

Der an Glutathion-Sepharose Beads gekoppelte GST-GPR-Loop wurde mit Cytosol von *D. discoideum* Wildtyp-Zellen in ca. fünffachem Überschuß inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen der Sepharose, sollte mit einem Überschuß an Poly-L-Prolin eventuell gebundenes Profilin eluiert werden. Die Poly-L-Prolin Ketten hatten ein durchschnittliches Molekulargewicht von 5000 Dalton. Diese Methode wurde angewandt, da M. Tanaka schon 1985 erkannt hatte, daß Profilin eine hohe Affinität zu Poly-L-Prolin (PLP) hat und dieses deshalb zur Aufreinigung von Profilin aus Lysaten benutzt wird.

Elektrophoretische Auftrennung der gebundenen Proteine und anschließende Analyse im Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen Profilin und gegen Actin zeigte, daß sowohl Profilin als auch Actin von den Beads eluiert werden konnten (s. Abb. 4.23). Auch wenn auf den Beads nach dem Elutionsschritt noch wenig Profilin und etwas mehr Actin vorhanden war, spricht dies nicht gegen eine Assoziation des GPR-Loops mit Profilin, da in der Zelle Profilin hauptsächlich als Profilin-Actin (Profilactin)-Komplex vorliegt.

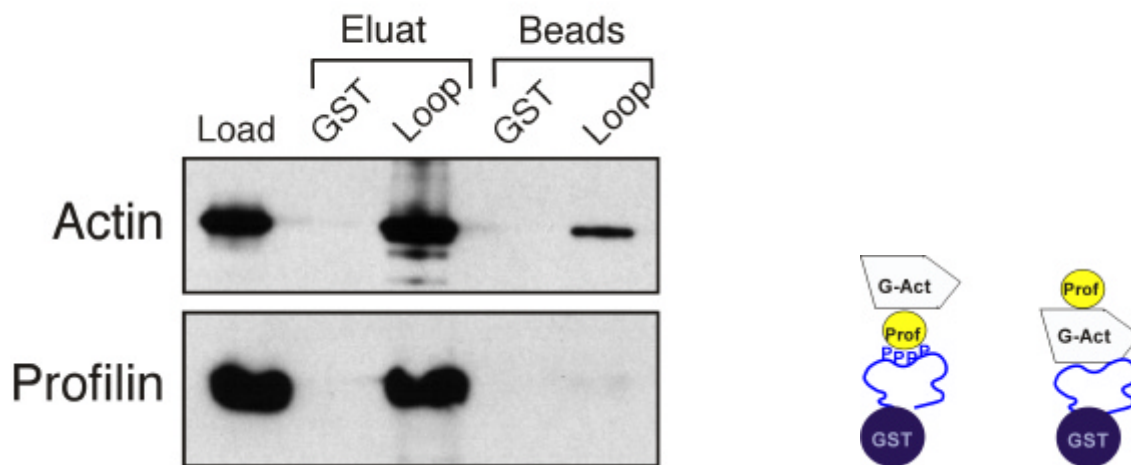


Abb. 4.23: Der GPR-Loop bindet Profilin aus einem cytosolischen Extrakt.

Gezeigt ist der analysierte Western Blot eines Pulldown-Experiments. Ungefähr 500 µg der GST-Fusion beziehungsweise GST alleine, wurden an Glutathion-Sepharose Beads gekoppelt. Die Kopplungseffizienz wurde in einem PAA-Gel überprüft (nicht gezeigt). Cytosol aus *D. discoideum* wurde in fünffachem Überschuß (2.5mg) zugegeben und über Nacht inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen wurde eine Probe der beladenen Beads entnommen (Load) und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Außerdem wurden Proben aus der Elution mit 1 mM poly-L-Prolin (Eluat) und von den restlichen verbliebenen Beads (Beads) im gleichen Volumenverhältnis in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. Da sowohl der Antikörper gegen Profilin/I/II als auch der gegen Actin monoklonal sind, wurde der Blot auseinandergeschnitten und der obere Teil mit anti-Actin, und der untere Teil mit anti-Profilin I/II inkubiert und anschließend analysiert.

Mit diesem *in vivo* Pulldown-Experiment konnte allerdings nicht die Art der Assoziation zwischen dem Profilactin-Komplex und GPR-Loop aufgeklärt werden. Einerseits besteht die Möglichkeit, daß der GPR-Loop den Profilactin-Komplex über Profilin bindet, andererseits könnte die Interaktion auch über Actin stattfinden (s. Abb. 4.23). Natürlich sollte auch nicht die Alternative ausgeschlossen werden, daß sowohl G-Actin als auch Profilin unabhängig voneinander mit dem GPR-Loop assoziieren. Die quantitative Elution von Profilin mit Poly-L-Prolin gibt jedoch den Hinweis, daß die Bindung wahrscheinlich über Profilin bewirkt wird.

4.4.3 Der GPR-Loop bindet nicht über die Prolinreihe an Profilin

G-Actin liegt in *D. discoideum* größtenteils nicht als freies Monomer vor, sondern assoziiert mit Profilin, um ungerichtete Polymerisation von Actin-Filamenten zu verhindern. Im Pulldown-Experiment wurde gezeigt, daß der GPR-Loop von MyoK an Profilin bindet. Dieses Experiment erlaubt aber keine Aussage darüber, ob der GPR-Loop den Profilactin-Komplex über Profilin oder über Actin bindet. Um diese Frage zu klären, wurden weitere Pulldown-Experimente durchgeführt. Wie in 4.4.2 wurde an Sepharose-Beads gekoppelter GST-GPR-Loop mit Cytosol aus *D. discoideum* inkubiert. Der entscheidende Unterschied war jedoch die Wahl des Cytosols. Statt Wildtyp-Cytosol wurde Cytosol von Profilin-Mutanten verwendet. Diese mutierten Zelllinien besitzen kein *profilin I* Gen mehr, sondern exprimieren nur noch Profilin II Mutanten mit veränderten Bindungseigenschaften (Lee *et al.*, 2000). In der Mutante K114E wurde Lysin gegen Glutamat ausgetauscht, was eine drastische Verringerung der Fähigkeit an Actin zu binden, zur Folge hat. Die Bindung an Poly-L-Prolin ist dagegen unverändert. In der Punktmutante W3N wurde am direkten N-terminalen Ende von Profilin II Tryptophan gegen Asparagin getauscht. W3N-Profilin bindet nicht mehr an Poly-L-Prolin, und auch die Bindung an Actin ist leicht vermindert.

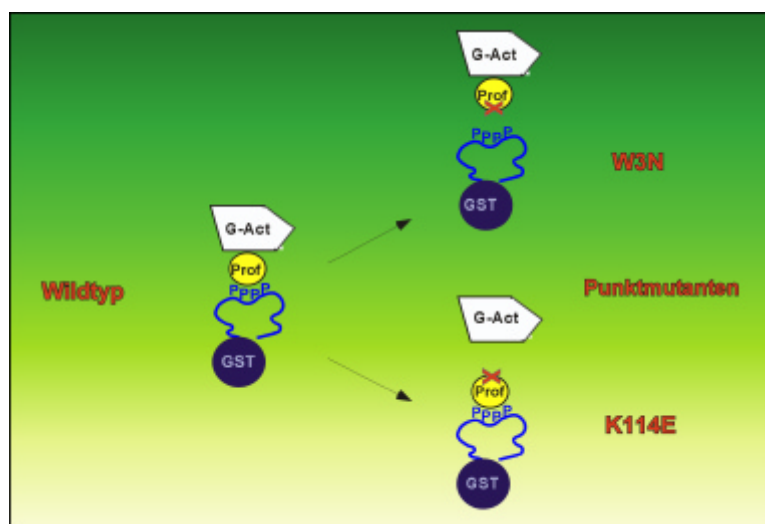


Abb. 4.24: Cartoon zur Darstellung der Profilin II Mutanten.

Wildtyp Profilin bindet monomeres Actin und an die prolinreiche Reihe im GPR-Loop. Die W3N Punktmutation bewirkt, daß Profilin nicht mehr mit poly-Prolin interagiert. K114E Profilin kann kaum noch an G-Actin binden (die Bindung ist jedoch nicht komplett unterdrückt wie im Cartoon dargestellt wurde.), aber die Bindung an poly-Prolin ist intakt.

Die Durchführung der Pulldown-Experimente und Detektierung von Profilin II und Actin im Western Blot ergaben folgendes Ergebnis (s. Abb. 4.25): Bei Verwendung von Cytosol der K114E Mutante wurde Profilin II mittels PLP eluiert. Es wurde ebenfalls Actin eluiert. Da die Bindung von K114E an Actin nicht zerstört, sondern nur drastisch reduziert ist, und die Konzentration dieser veränderten Profilin-Isoform im Vergleich zu Wildtyp Zellen erhöht ist (28 μ M im Wildtyp; 40 μ M in K114E), ist die Detektion von Actin nicht verwunderlich. Überraschenderweise wurde bei der Analyse der Eluate des Pulldowns mit dem W3N Cytosol ebenfalls Profilin II und Actin nachgewiesen. Selbst wenn man davon ausgeht, daß die Bindung an PLP durch diese Punktmutation eventuell doch nicht komplett vernichtet wurde, sondern extrem stark vermindert, erklärt dies jedoch nicht die Tatsache, daß mehr Profilin II eluiert werden konnte als mit der Mutante K114E, welche die Fähigkeit an PLP zu binden, besitzt. Auch die Tatsache, daß die Konzentration vom W3N Profilin II in der Zelle noch stärker erhöht ist (70 μ M), kann nicht als Erklärung dienen.

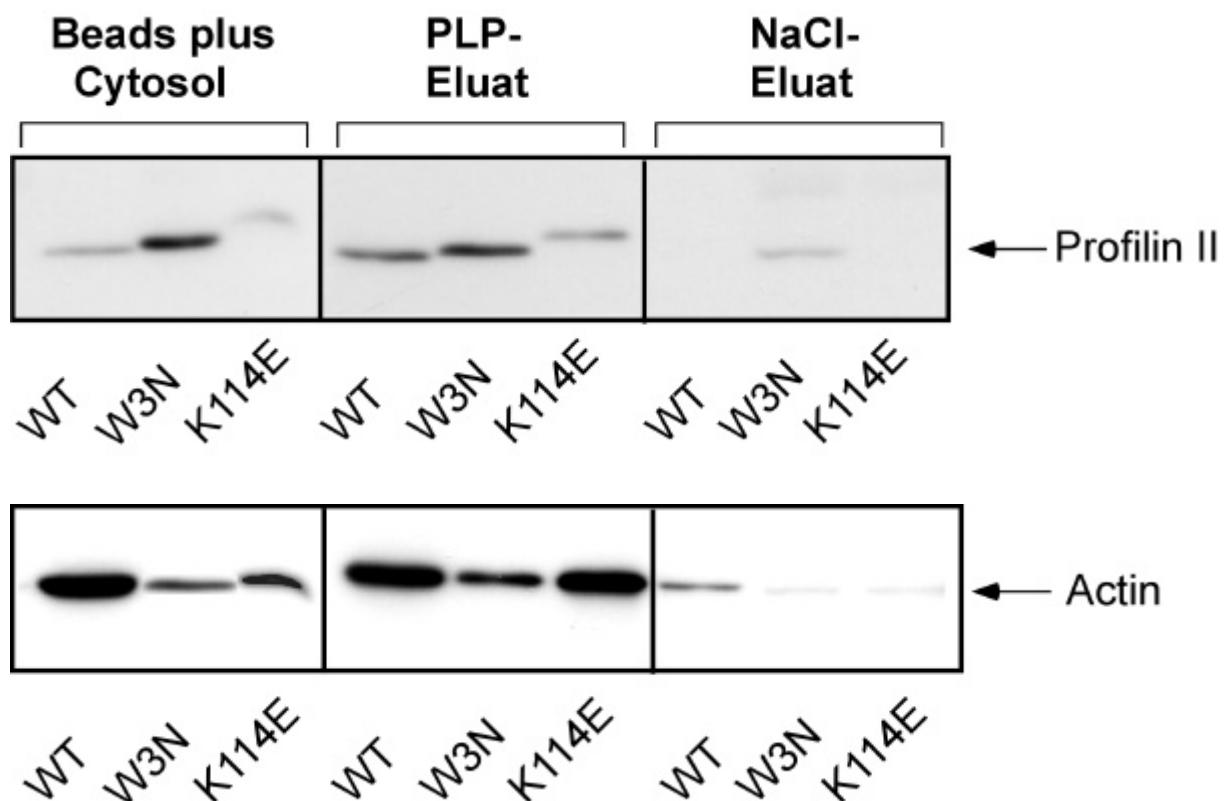


Abb. 4.25: Pulldown mit Cytosol verschiedener Profilinmutanten

Mit dem GST-GPR-Loop Fusionsprotein beladene Gluthation-Sepharose wurde entweder mit Cytosol aus Wildtyp-Zellen (WT) oder den Profilinmutanten (W3N bzw. K114E) inkubiert. Nach kräftigem Waschen wurde untersucht, ob Profilin II an den GPR-Loop gebunden hatte (Beads plus Cytosol). Es folgte die erste Elution mit poly-L-Prolin im ca. zehnfachen molaren Überschuß (PLP-Eluat) und nach wiederholtem Waschen eine Elution mit 1M NaCl (NaCl-Eluat = Hochsalzelution). Die gezogenen Proben wurden mittels 15% PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen Profilin II oder Actin analysiert.

4.4.4 Ein kurzes prolinreiches Motiv scheint für die Profilin-Bindung verantwortlich zu sein

Es wurde in den vorangehenden Experimenten gezeigt, daß der GPR-Loop *in vivo* an Profilin bindet. Interessanterweise erfolgt die Bindung jedoch nicht über den prolinreichen Abschnitt innerhalb des Proteins. Damit stellt sich die Frage nach der Natur der Profilin-GPR-Loop Interaktion. Ein wichtiger Hinweis konnte aus einer Veröffentlichung von W. Witke aus dem Jahr 1998 (Witke *et al.*, 1998) gewonnen werden. Auf der Suche nach Bindungspartnern von Profilin I beziehungsweise Profilin II wurden mehrere Proteine in den Profilin-Komplexen identifiziert, die ebenfalls keine langen Prolinreihen enthalten. Dazu gehören unter anderem Clathrin, Dynamin oder Synapsin aus der Maus. Im Gegenteil, das Protein ASP56/CAP hat zwar eine Reihe von 12 Prolinen, die nur durch ein Glycin unterbrochen wird, aber es bindet nicht an Profilin II- Sepharose (Gieselmann und Mann, 1992). Poly-Prolin kann also nicht das einzige Kriterium sein, das für eine Bindung von Profilin an einen Liganden Voraussetzung ist. Witke und Kollegen konnten durch Sequenzvergleiche der unterschiedlichen Proteine eine Konsensus-Sequenz identifizieren, die in allen Liganden vorhanden war, die nicht über Prolinreihen verfügten. Dabei handelt es sich um ein **ZPPX-Motiv**, wobei Z allgemein ein Prolin, Glycin, Alanin oder gelegentlich eine geladene Aminosäure darstellt und es sich bei X vorzugsweise um eine hydrophobe Aminosäure handelt. Allerdings besitzen tausende von Proteinen in der Datenbank das ZPPX-Motiv, so daß dieses kurze Motiv wohl nicht ausreichend für eine selektive Profilin-Bindung ist. Es müssen mindestens zwei oder mehr Kopien dieses speziellen Motivs innerhalb einer kurzen Sequenz von nicht mehr als 100 Aminosäuren enthalten sein, um die Bindung von Profilin zu ermöglichen. Diese Bedingungen treffen exakt auf die Aminosäuresequenz des GPR-Loop zu, denn nach Durchmusterung der Sequenz wurden vier Kopien des ZPPX-Motivs gefunden (s. Abb.4.2.6).

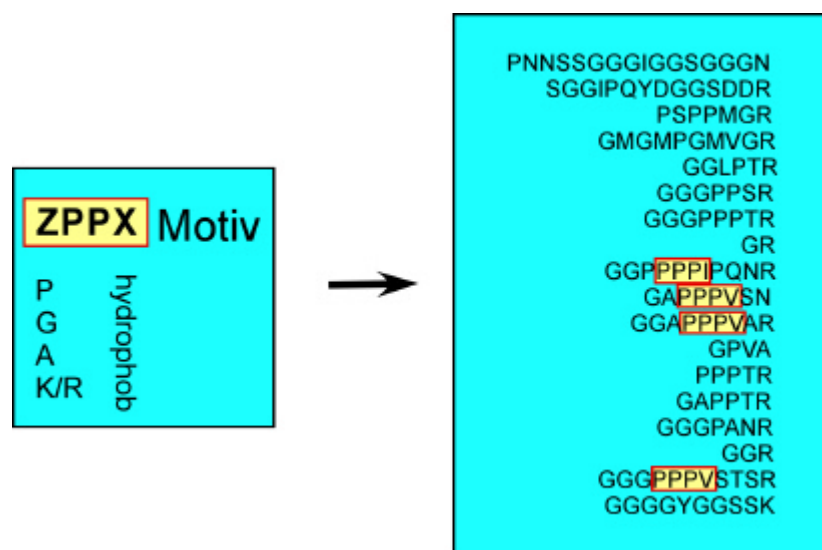


Abb. 4.26: Das ZPPX Motiv innerhalb des GPR-Loop von Myok

4.4.5 Der GPR-Loop bindet *in vitro* direkt an Profilin II

Durch Pulldown-Experimente aus cytosolischen Extrakten können zwar Interaktionspartner eines Proteins identifiziert werden, aber es ist nicht möglich zu bestimmen, ob die Interaktion direkt ist. Die Verwendung der Profilin II Mutanten konnte nicht eindeutig klären, ob der GPR-Loop von MyoK direkt an Profilin II binden kann. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Overlay Experiment durchgeführt. In einem solchen Blot-Overlay-Assay werden ausschließlich gereinigte Proteine verwendet, so daß eine direkte Interaktion *in vitro* nachgewiesen werden kann. Durch die Inkubation eines Western Blots mit gereinigtem Protein als Sonde können so bestimmte Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht werden, die keine intakte Faltung des auf der Blotmembran immobilisierten Bindungspartner voraussetzen. Das GPR-Loop GST-Fusionsprotein wurde elektrophoretisch im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Nach Inkubation mit Profilin II als Sonde wurde die Membran in Anwesenheit von Detergenzien gewaschen und mit einem monoklonalen Antikörper gegen Profilin II inkubiert (s. Abb. 4.27). Stattgefundene Interaktionen wurden in einer kurzen Inkubation mit Glutaraldehyd chemisch quervernetzt. Durch Zugabe eines zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörpers wurden mittels Chemilumineszenz spezifische Signale untersucht. In diesem Blot-Overlay wurde nur der GPR-Loop mit Profilin II markiert, womit zusätzlich *in vitro* bewiesen wurde, daß eine direkte Interaktion zwischen Profilin II und dem GPR-Loop von MyoK existiert.

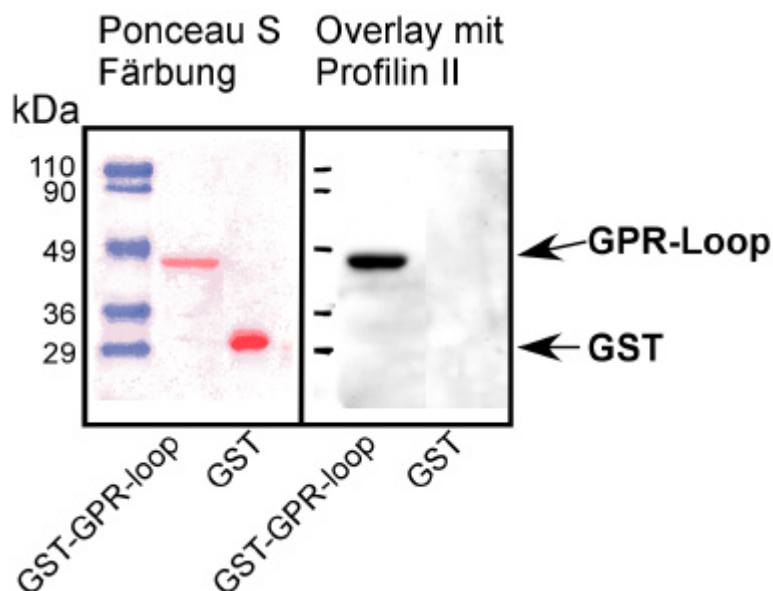


Abb. 4.27: Profilin II assoziiert *in vitro* direkt mit dem GPR-Loop. GST (Kontrolle) und GST-GPR-Loop wurden nach ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Membran transferiert (Anfärbung mit Ponceau S) und mit 25 µg/ml Profilin II inkubiert. Die Verwendung von Profilin II Antikörpern erlaubte die Detektion spezifisch stattgefundener Interaktion.

4.4.6 Die prolinreiche Domäne von WASp aus *D. discoideum* bindet *in vitro* nicht an Profilin II

Der erste Schritt in der *de novo* Nukleation von Actin-Filamenten besteht in der Lokalisation und Aktivierung der Actin-Nukleationsmaschinerie. Diese Nukleationsmaschinerie besteht aus dem Arp2/3 Komplex und einem nukleationsförderndem Faktor, der an den Arp2/3 Komplex bindet und somit dessen Actin-Nukleation-Aktivität erhöht. Der mit am besten untersuchte nukleationsfördernde Faktor ist WASp aus der Familie der WASp/Scar Proteine. Interessanterweise enthält WASp eine prolinreiche Domäne, in der bis zu 10 Proline direkt aufeinanderfolgen. Die Vermutung liegt also nahe, daß auch WASp an Profilin bindet. Dies wurde zudem schon für N-WASp aus Säugern *in vivo* durch Immunpräzipitation in PC 12 Zellen und *in vitro* durch eine direkte Interaktion zwischen bovinem Profilin und rekombinantem N-WASp demonstriert (Suetsugu *et al.*, 1998). Für WASp aus *D. discoideum* wurde diese Interaktion noch nicht überprüft. Besonders aufschlußreich ist der direkte Vergleich von *D. discoideum* WASp und MyoK auch unter dem Aspekt, daß der GPR-Loop von MyoK 40-50 % Homologie zu der prolinreichen Domäne von WASp verschiedener Spezies zeigt

```

PRD-WASp (Hs)  QEPLPPPPPPSRGGNQLPRPPIVGGNKGRSGPLPPVPLGIAPPPPTPRGPPPPGRGGPPP
GPR-Loop (Dd) PNSSSGGGIGSGGGNGGI PQYDGGSDDR--PSPMGRGMGMGMVGRGLPTRGGGPPS
      : . . . . . ** : * * * . . . * * * : * : . * . ** * . ****.

PRD-WASp (Hs)  P---PPPATGRSGPLPPPPGAGGPP-----MPPP-----PPPPP-----PPSSGNGPAP
GPR-Loop (Dd)  RGGGPPPTRGRGGPPPI PQNRGAPPVSNNGAPPVARGPVAPPTRGAPPTRGGGPAN
      ***: *.** ** * . *.*          ***      * .***      **: *.***

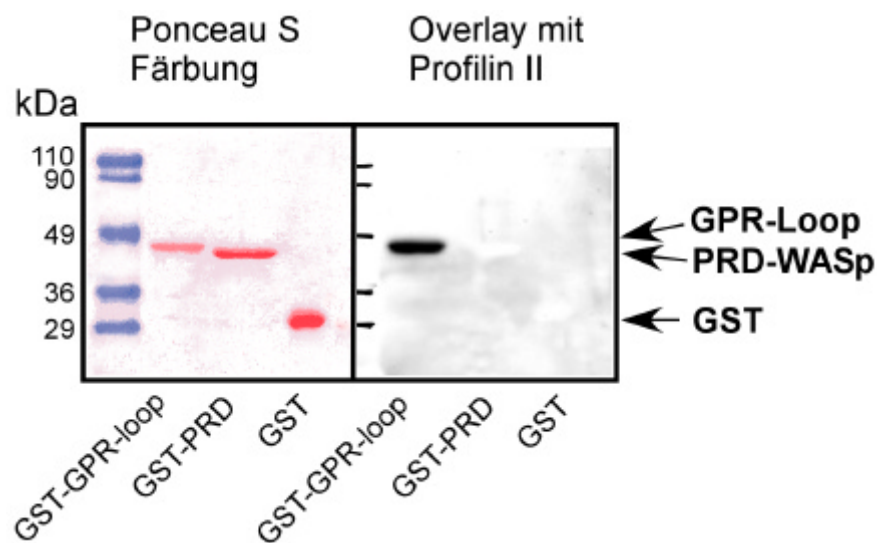
PRD-WASp (Hs)  PP-----LPPALVPAGGLAPGGG--
GPR-Loop (Dd)  RGGRGGGPPPVSTSRGGGYGGSSK
      ** . . ** . **

```

Abb. 4.28: Sequenzvergleich zwischen den prolinreichen Domänen von humanem WASp und GPR-Loop von MyoK. Identische Aminosäuren sind mit einem blauen Stern gekennzeichnet, grün (2 Punkte) zeigt Aminosäuren mit gleichen Eigenschaften ihrer Seitenkette. Blauer Punkt sind Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften ihrer Seitenketten. Hs=Homo sapiens; Dd=Dictyostelium discoideum.

Die Überprüfung einer direkten Interaktion zwischen *Dd* WASp und Profilin II wurde im selben Overlay wie in Abschnitt 4.4.5 durchgeführt, so daß dieselben Bedingungen vorlagen (s. Abb. 4.27). Die prolinreiche Domäne aus WASp wurde als GST-Fusion (GST-PRD) aufgetragen und wie der GST-GPR-Loop mit Profilin II als Sonde inkubiert. Obwohl mehr GST-PRD vorhanden war, konnte im Western Blot kein Signal detektiert werden. Eine Wiederholung des Experiments zeigte das gleiche negative Ergebnis. Somit kann *in vitro* keine direkte Interaktion mit Profilin II bestätigt werden. Die Durchmusterung der prolinreichen Domäne aus WASp von *D. discoideum* brachte nur ein ZPPX-Motiv zum Vorschein, so daß unter diesem Kriterium keine Interaktion mit Profilin erfolgt (s. Abb. 4.29).

A



B

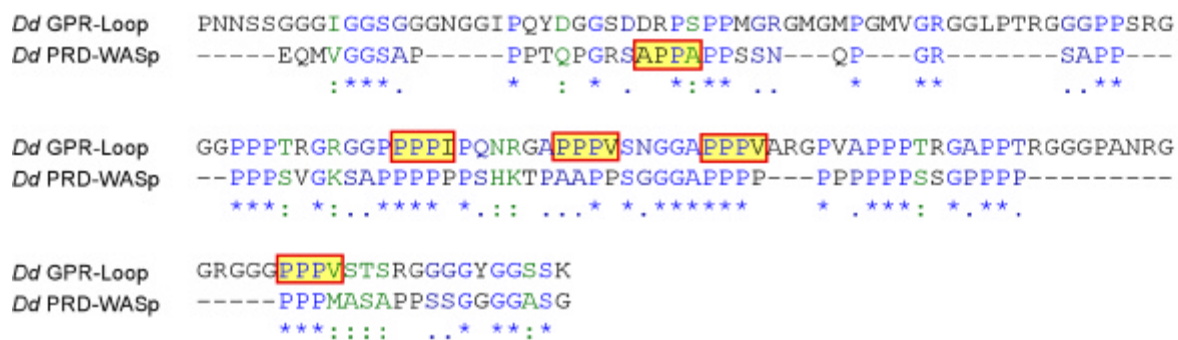


Abb. 4.29:

(A) Die prolinreiche Domäne aus *D. discoideum* WASp bindet nicht an Profilin II. Gezeigt ist derselbe Blot wie in Abb.4.2.7, um zu demonstrieren, daß PRD-WASp keine Interaktion mit Profilin II zeigt. GST-GPR-Loop kann hier als positive Kontrolle gewertet werden.

(B) Das ZPPX-Motiv in den prolinreichen Domänen von GPR-Loop oder WASp aus *D. discoideum*. Der GPR-Loop aus MyoK besitzt vier ZPPX-Motive. Die prolinreiche Domäne aus *D. discoideum* WASp (PRD-WASp) enthält nur ein ZPPX-Motiv. Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW erstellt.

4.4.7 Der GPR-Loop enthält ein klassisches SH3-Bindemotiv

Src Homology 3 (SH3) Domänen sind kleine modulare Domänen von 50-70 Aminosäuren, die in vielen Proteinen gefunden werden, die in Signalübertragungswegen eine wichtige Rolle spielen, beispielsweise Src- und Abl Tyrosin Kinasen. Diese Domäne vermittelt Protein-Protein Interaktionen, welche für die Kopplung intrazellulärer Signalwege, die Regulation der katalytischen Aktivität von Proteinen und auch für die Lokalisation von Proteinen zu ihrem spezifischen subzellulären Kompartiment wichtig sind. Durch zahlreiche Studien wurde herausgefunden, daß SH3 Domänen spezifisch zelluläre Proteine binden, indem sie kurze

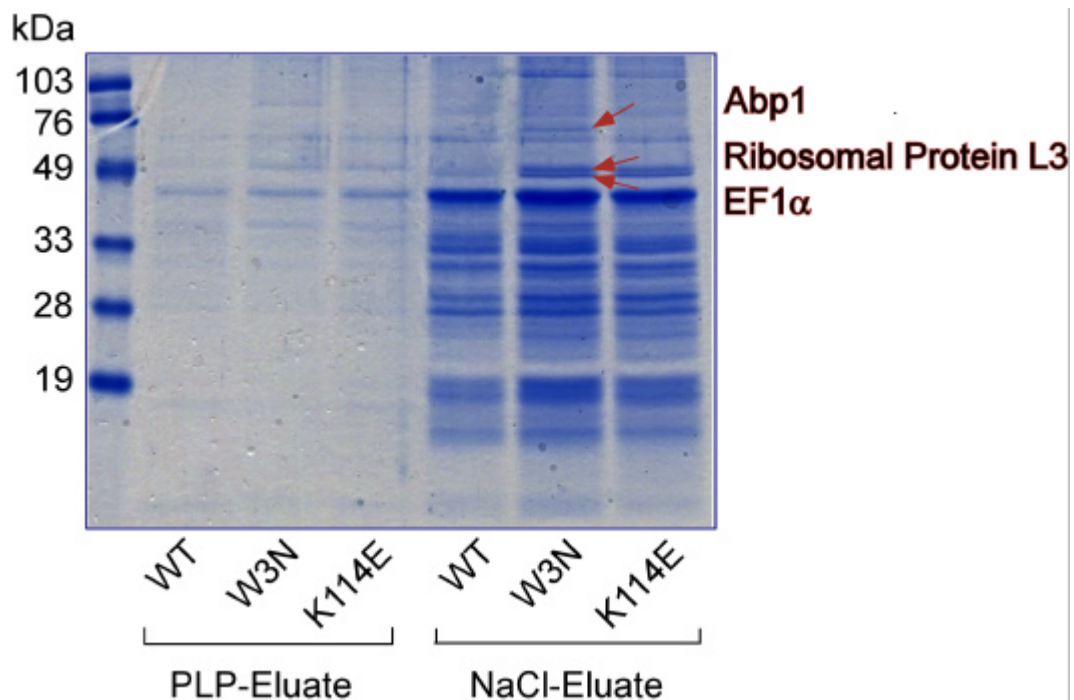
prolinreiche Peptidsequenzen erkennen. Alle bisher bekannten SH3 Liganden besitzen mindestens ein **PXXP**-Motiv. Die SH3 Domänen verschiedener Proteine erkennen alle dieses hochkonservierte PXXP-Motiv, man denkt jedoch, daß die Spezifität für Bindung an einen bestimmten Liganden durch Aminosäuren bestimmt wird, die diese Kernregion flankieren (Sparks *et al.*; 1996). SH3 Liganden der Klasse I haben N-terminal ein Arginin in der Konsensussequenz **RXXPXXP**, wohingegen Liganden der Klasse II dieses Arginin am C-Terminus besitzen: **XPPXPXR** (Weng *et al.*; 1995).

Innerhalb der Sequenz des GPR-Loops befindet sich das Motiv **RGGPPPP**, was den Loop theoretisch als einen SH3 Liganden der Gruppe I auszeichnet. MyoK könnte also Komponente eines spezifischen Multi-Proteinkomplexes sein, der bei Umbildung des Cytoskeletts in dynamischen Regionen der Zelle wichtig ist. Zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner wurde deshalb der GPR-Loop als GST-Fusionsprotein an Sepharose gekoppelt und mit Cytosol von *D. discoideum* inkubiert. Nach anschließenden Elutionen mit Poly-L-Prolin und Hochsalz, wurden die Eluate gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Einzelne Banden wurden aus dem Gel geschnitten, „in-gel“ mit Trypsin verdaut, mittels MALDI analysiert und anschließend verschiedene Datenbanken durchsucht. Das Experiment wurde zweimal wiederholt, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Das Proteinmuster im GPR-Loop Komplex unterschied sich etwas bei Inkubation mit Wildtyp-Cytosol oder dem Cytosol der Profilin-Mutanten. Hauptsächlich wurden genau die Banden für die Analyse ausgesucht, die bei Inkubation mit W3N-Cytosol prominenter waren als beim Wildtyp, da zu diesem Zeitpunkt noch angenommen wurde, daß der GPR-Loop über seine prolinreiche Region an Profilin bindet und W3N Profilin eben nicht mehr fähig sein sollte, an Polyprolin zu binden (s. Abb. 4.24). Mit Verwendung dieses Cytosols sollte die kompetitive Bindung von Profilin an den GPR-Loop ausgeschlossen werden, da die Prolinreihe in der Sequenz des GPR-Loops mit dem SH3 Bindemotiv überlappt.



Abb. 4.30: Die Aminosäuresequenz des GPR-Loop. In der Mitte der Sequenz überlappt die Prolinreihe mit dem SH3 Bindungsmotiv. Die Aminosäurenabfolge ist vom Aminoterminus bis zum Carboxyterminus gezeigt.

Es wurden nur die Komponenten aus dem GPR-Loop Komplex berücksichtigt, die mehrfach gefunden wurden (s. Abb. 4.31). Es wurden Proteine identifiziert, die schon in einer Datenbank registriert sind und somit eine direkte Zugangsnummer haben. Dazu gehören der Translations-Elongationsfaktor EF-1 α (P18624; Swissprot) und das ribosomale Protein L3 (P34113; Swissprot). Zusätzlich konnte ein Protein gefischt werden, das als SH3P7R2 identifiziert wurde. Dieses Protein ist noch nicht in einer *D. discoideum* Datenbank registriert, zeigt aber eine hohe Homologie zu dem Actin-binding-protein1 (Abp1) aus *S. cerevisiae*, das als das erste Actin-bindende Protein in Hefe identifiziert wurde. Mit der Sequenzinformation von SH3P7R2 wurde die "Expressed sequence tag" (EST) Datenbank am National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchsucht und ein homologer EST-Klon von Abp1 in *D. discoideum* gefunden. Daraufhin sollten entsprechende Primer gegen das 3'Ende und das 5'Ende dieses ORFs (Open Reading Frame) generiert werden, um aus der genomischen *D. discoideum* DNA das Gen mittels PCR zu isolieren und amplifizieren. Zwischenzeitlich wurde jedoch bekannt, daß die kanadische Arbeitsgruppe von G. Côté eben dieses Gen schon als cDNA in Expressionsvektoren für *E. coli* und *D. discoideum* kloniert hatten. Freundlicherweise wurden diese Vektoren zur Verfügung gestellt, so daß für weitere Experimente das Protein als GST-Fusion in *E. coli* und als FLAG-Fusion in *D. discoideum* exprimiert werden konnte.



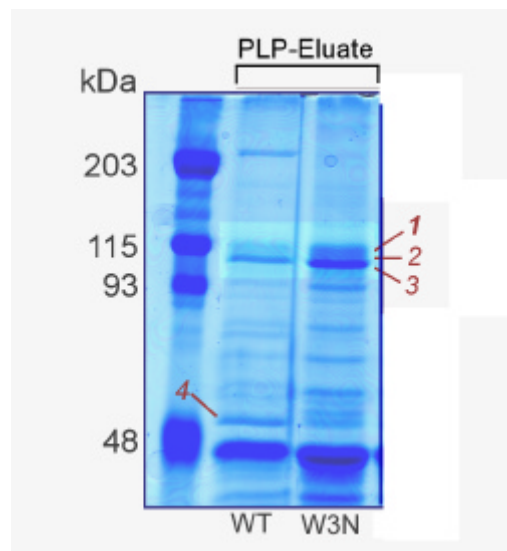


Abb. 4.31: Verschiedene Proteine interagieren *in vivo* mit dem GPR-Loop. Die Eluate aus dem Pulldown-Experiment (Abschnitt 4.4.2) wurden in vergleichbarer Menge in einem 10% PAA-Gel aufgetrennt und anschließend mit kolloidalem Coomassie Blau angefärbt (oberes Gel). Die im unteren Gel ausgeschnittenen Banden (aus einem zweiten Gel) mit der Bezeichnung 1,2 und 3 wurden alle als SH3P7R2 (Abp1) identifiziert; Bande 4 entpuppte sich als EF1 α .

4.4.8 Der GPR-Loop bindet direkt an *D.discoideum* Abp1

Zunächst sollte geprüft werden, ob der GPR-Loop direkt an SH3P7R2 bindet. Dieses Genprodukt, das anscheinend das *D. discoideum* Homolog zu Abp1 aus Maus und Hefe ist (de la Roche, 1999), schien besonders als potentieller Interaktionspartner interessant, da für mAbp1 (Abp1 der Maus) schon demonstriert worden ist, daß es an endocytotischen Prozessen beteiligt ist. MAbp1 ist ein F-Actin bindendes Protein und besitzt eine SH3 Domäne, die an Dynamamin I aus Maus bindet (s. Abb.4.3.2). Abp1 könnte also eine funktionelle Verbindung zwischen cortikalem F-Actin und der endozytotischen Maschinerie darstellen (Qualmann *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde gezeigt, daß dieses Protein den Arp2/3 Komplex aktivieren und so die Bildung neuer Actin-Filamente gestartet werden kann (Goode *et al.*, 2001).



Abb. 4.32: Schematische Darstellung von Abp1 aus der Maus.

Die einzelnen funktionellen Domänen sind verschiedenfarbig unterlegt. Für die ADF-H/C Domäne wurde gezeigt, daß sie an F-Actin bindet. Die zwei sauren Domänen (AA) aktivieren den Arp2/3 Komplex. Proteine mit SH3 Domäne können an die prolinreiche Region binden (gezeigt für Rvs167/Amphiphysin). Die carboxyterminale SH3 Domäne bindet an Dynamamin. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu abgebildet.

Um eine eventuell vorhandene Interaktion zwischen *D. discoideum* Abp1 und dem GPR-Loop von MyoK nachzuweisen, wurde wieder die Blot-Overlay Technik angewendet. Da sowohl der GPR-Loop als auch *D. discoideum* Abp1 als GST-Fusionsproteine aus *E. coli* gereinigt wurden, der Antikörper gegen MyoK jedoch der sensitivere ist, wurde Abp1 gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Danach wurde der GPR-Loop als Sonde verwendet und der polyklonale Antikörper gegen MyoK als Erstantikörper eingesetzt. Das intensive Signal knapp über der 90 kDa Marke ist GST-Abp1, an das der GPR-Loop gebunden hat (s. Abb. 4.33). Im Gegensatz zeigen zwei Negativkontrollen (GST und das Kopfsegment aus Myosin ID) absolut keine Interaktion mit der Sonde. Zur Überprüfung der Aktivität des Antikörpers wurde zusätzlich GPR-Loop aufgetragen und wie die anderen Proben inkubiert.

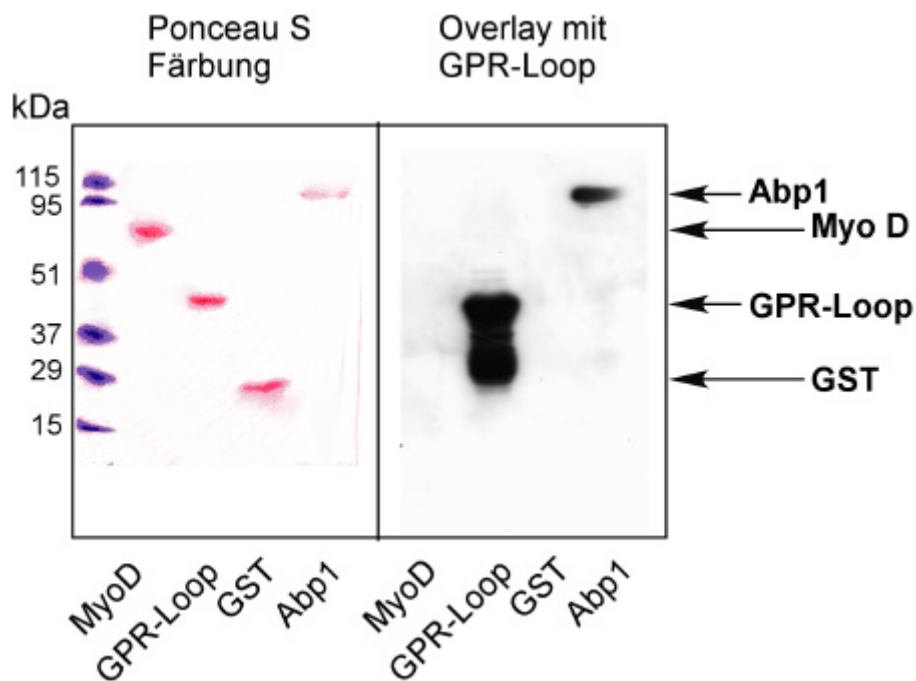


Abb. 4.33: Direkte *in vitro* Interaktion zwischen Abp1 und GPR-Loop. Zugunsten einer übersichtlicheren Darstellung wurde darauf verzichtet, die *tags* bzw. Fusionen auszuschreiben. Bei der Negativkontrolle Myo ID handelt es sich nur um die 70 kDa große Kopfdomäne, welche mit einem *His-tag* versehen ist. Sowohl Abp1 als auch der GPR-Loop sind GST-Fusionsproteine. Die Sonde (GST-GPR-Loop) wurde in der Konzentration 25 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

4.4.9 Arp3 aus einem cytosolischen Extrakt bindet an den GPR-Loop

MyoK lokalisiert in Regionen mit dynamischer Actin-Reorganisation. Der GPR-Loop von MyoK interagiert direkt mit Abp1, einem Arp2/3 Komplex Aktivator. Deshalb wurden die mit poly-L-Prolin gewonnenen Eluate aus dem Pulldown-Experiment von 4.4.2 auf Anwesenheit von Arp2/3 untersucht. Mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch die Untereinheit 3 (Arp3) des Komplexes erkennt, konnte in allen Eluaten Arp3 detektiert werden (s. Abb. 4.34). Die Anwesenheit des Arp2/3 Komplex in den Eluaten muß nicht bedeuten, daß eine direkte Interaktion zwischen *D. discoideum* Abp1 und diesem Komplex besteht. Auch Profilin aus *Acanthamoeba* bindet direkt an den Arp2/3 Komplex (Machesky *et al.*, 1994).

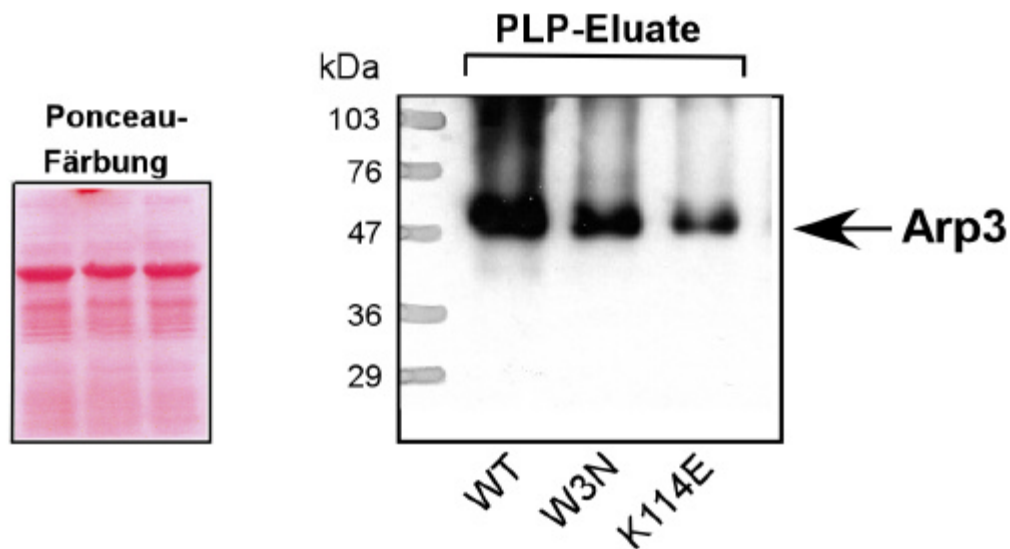


Abb. 4.34: Arp3 eluiert mit poly-L-Prolin vom GPR-Loop-Proteinkomplex. Die Ponceau-Färbung zeigt, daß ungefähr gleiche Mengen an Eluat aufgetragen wurde. Arp3 hat ein Molekulargewicht von 47 kDa und wurde im Western Blot mittels eines polyklonalen anti-Arp3 Antikörpers in allen Eluaten nachgewiesen. WT ist Wildtyp Cytosol; W3N bzw. K114E sind Cytosole der Profilin Mutanten, mit denen der GPR-Loop zuvor inkubiert wurde. Anschließend wurde mit ca. zehnfachem molaren Überschuß an poly-L-Prolin eluiert.

4.4.10 *D. discoideum* Dynamin A interagiert *in vitro* mit *D. discoideum* Abp1

Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits erwähnt, daß in der Maus Abp1 mit Dynamamin interagiert. Dynamamin ist eine GTPase und an endocytotischen Vorgängen beteiligt, da dominant negative Expression von Dynamamin in Säugerzellen verschiedene Formen der Endocytose blockiert. In Säugerzellen bindet Dynamamin an weitere actin-assoziierten Proteine wie Profilin und Syndapin (Qualmann *et al.*, 1999; Witke *et al.*, 1998; Kessels *et al.*, 2001). Die Struktur von Dynamamin besteht aus unterschiedlichen Domänen, neben der GTPase Domäne besitzt Dynamamin unter anderem eine prolinreiche Region (PRD). Dynamamin kann sich

selbst zu Ringen assemblieren und durch diese Oligomerbildung könnte Dynamin theoretisch mehrere (unterschiedliche) Liganden binden.

In *D. discoideum* existieren bisher zwei Isoformen von Dynamin, Dynamin A und Dynamin B. Dynamin A wird ebenfalls eine Funktion bei der Endocytose in *D. discoideum* zugeschrieben, da die Deletion dieses Gens eine verminderte Endocytoserate verursacht (Wienke *et al.*, 1999). Nur Dynamin A enthält ein prolinreiches Modul in seiner Sequenz. Um zu untersuchen, ob auch in *D. discoideum* eine direkte Interaktion zwischen Abp1 und Dynamin besteht, wurde ein Blot-Overlay mit rekombinanten Proteinen durchgeführt (s. Abb. 4.35). Dynamin A wurde diesmal als Bait (Köder) verwendet und Abp1 als Sonde dazugegeben. Die Analyse bestätigte tatsächlich eine zumindest *in vitro* bestehende Assoziation von Abp1 mit Dynamin A. GST zeigte sehr starke Signale, was nicht verwunderlich ist, da der verwendete anti-Abp1 Antikörper gegen das GST-Abp1 Fusionsprotein gerichtet ist und noch nicht affinitätsgereinigt wurde. Damit konnte GST hier nicht als Negativkontrolle dienen. Stattdessen wurde das MyoD Kopffragment verwendet, das wie Dynamin A mit einem *His-tag* versehen ist. Eine zusätzliche Kontrolle wurde durchgeführt, um sicherzustellen, daß der Antikörper nicht unspezifisch mit Dynamin reagiert. In diesem Ansatz wurde deshalb nicht Abp1 als Sonde zugegeben, sondern direkt mit anti-Abp1 Antikörpern inkubiert. Auch diese Kontrolle bestätigte zusätzlich die spezifische Interaktion von Abp1 mit Dynamin A.

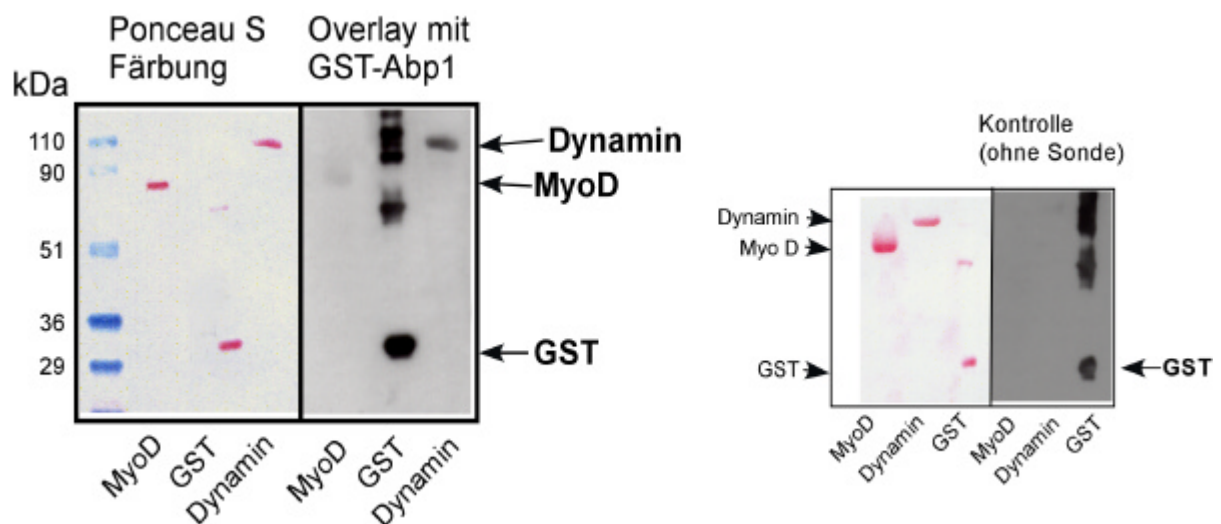


Abb. 4.35: Interaktion zwischen Abp1 und Dynamin A. Es wurden jeweils ca. 1 μ g MyoD, GST und Dynamin A in einem 10 % PAA-Gel aufgetrennt und mit Ponceau sichtbar gemacht (rote Banden). Nach dem Transfer auf Nitrozellulose wurde GST-Abp1 als Sonde zugegeben (50 μ g/ml), (siehe linkes Schaubild) und dann mit Abp1 inkubiert. Im Kontroll-Blot wurde direkt nach dem Transfer mit dem Primärantikörper anti-Abp1 inkubiert (rechtes Schaubild).

5. Diskussion

Das Actin-Cytoskelett ist für die meisten Bewegungsprozesse auf zellulärer und intrazellulärer Ebene notwendig. Während die Zelle für die Ausübung einer Muskelkontraktion eher eine statische Organisation cytoskeletaler Proteine benötigt, beruht die Bewegungsfähigkeit amöboider Zellen auf einem beeindruckend schnellen Umsatz des filamentösen Netzwerks im Zeitraum von Sekunden an bestimmten Regionen innerhalb der Zelle. Myosine, die verantwortlichen Motorproteine, sind nicht nur für die Bewegung der Zelle notwendig, sondern auch für intrazelluläre Transportvorgängen. Ebenso sind sie in Signalübertragungswegen beteiligt, die auf eine Umgestaltung des Cytoskeletts abzielen. Aufgrund der ausgeprägten Motilität und der starken Endocytoseaktivität benötigt der amöboide Einzeller *D. discoideum* ein äußerst dynamisches und flexibles Actin-Cytoskelett. Darauf beruht wohl die Expression einer Vielzahl von mit Actin wechselwirkenden Proteinen, darunter zwölf verschiedene Myosine, von denen nur ein einzelner Vertreter der Klasse II angehört, während die Mehrzahl der Klasse I zugeordnet sind (Soldati *et al.*, 1999). In *D. discoideum* sind alle essentiellen Klassen von Actin-bindenden Proteinen vorhanden, die bisher in Eukaryonten gefunden wurden und mit dem Actin-Cytoskelett assoziiert sind. Aus diesem Grund kann die Untersuchung der actomyosin-abhängigen Prozesse wertvolle Beiträge für die Aufklärung allgemeingültiger Mechanismen leisten.

5.1 MyoK als Manager des Actin-Cortex

Myosin I K aus *D. discoideum* wurde erst 1999 identifiziert und vollständig kloniert, so daß im Gegensatz zu anderen Myosinen der Klasse I über dessen Funktion in der Zelle relativ wenig bekannt ist. MyoK unterscheidet sich allerdings auffallend in seiner Struktur von allen anderen Mitgliedern der Klasse I: es besitzt keine Schwanzdomäne im herkömmlichen Sinn. Nach dem letzten carboxyterminal gelegenen konservierten Motiv innerhalb der Motordomäne, das mit den Aminosäuren Lys, Ile und Phe (KIF) endet, folgen nur noch 53 Aminosäuren. Somit fehlt offensichtlich eine traditionelle Cargo-Bindestelle, die charakteristisch für eine jeweilige Myosinklasse ist. Stattdessen findet man eine übergroße Insertion in der Motordomäne, wodurch diese beträchtlich erweitert wird. Zusätzlich kann in der 53 aa langen Sequenz keine klassische Leichte-Ketten-Bindestelle (IQ-Motiv) identifiziert werden. Damit ist die Existenz einer Halsdomäne ebenfalls in Frage gestellt, denn ohne stabilisierende leichte Kette kann dieser Bereich nicht als Hebelarm funktionieren. Dieser ist jedoch notwendig, um den Kraftschlag eines Myosins auszuführen. MyoK zählt zu den kürzesten bisher bekannten Myosinen und scheint in *D. discoideum* überhaupt das kürzeste Myosin zu sein. Da es aber durch Sequenzvergleich der Motordomänen aller Klassen der Myosin-Superfamilie eindeutig der Klasse I zugeordnet wurde, wurde zunächst im Rahmen der Doktorarbeit von Eva Schwarz untersucht, ob MyoK trotz der strukturellen Einzigartigkeit

eine funktionelle Ähnlichkeit zu den Myosinen der Klasse I aufzeigt. Myosine der Klasse I sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, die eine dynamische Umgestaltung des Actin-Cortex erfordern. Tatsächlich zeigten *Dictyostelium* Zellen, denen MyoK fehlte oder die MyoK überexprimierten, schwerwiegende Veränderungen in der Morphologie des Actin-Cortex, die von verminderter Phagozytoserate und eingeschränkter chemotaktischer Motilität begleitet wurden. Hervorzuheben ist, daß der Phänotyp der MyoK Nullmutanten ausgeprägter ist als bei anderen einzeln ausgeschalteten Myosingenen der Klasse I (Novak *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1996; Ostap und Pollard, 1996b). Diese Beobachtung beschränkt sich nicht nur auf *D. discoideum*; auch in *S. cerevisiae* und *A. castellani* wurde gezeigt, daß das Fehlen einzelner Myosine keine oder kaum Auswirkungen nach sich zieht (Goodson und Spudich, 1995; Goodson *et al.*, 1996). Die sieben verschiedenen Klasse I Myosine in *D. discoideum* können anscheinend teilweise das Fehlen eines Myosins kompensieren, da die parallele Ausschaltung von zwei oder mehr Myosinen der Klasse I auf die Zelle viel stärkere Auswirkungen hat als ein einzelner Knockout (Deletion des Gens). So scheint MyoK eine bedeutendere Rolle zu haben, denn Zellen ohne MyoK zeigten eine um 24% verringerte Cortex-Spannung, welche dagegen bis 70% erhöht war in MyoK überexprimierenden Zellen (Schwarz *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu beeinflussten einzelne Knockouts von Myosingenen der Klasse I die Cortexspannung überhaupt nicht; erst bei Mutanten, denen mindestens zwei Klasse I Myosine fehlten, verringerte sich die Spannung um ca. 50% (Dai *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse demonstrieren eindeutig, daß die Myosine der Klasse I an der Erzeugung und dem Erhalt der corticalen Spannung beteiligt sind. Interessanterweise zeigten Zellen, die MyoK überexprimierten, jedoch keinen Defekt in der Motilität wie es bei einer Überexpression von MyoB und MyoC der Fall ist (Novak und Titus, 1997; Dai *et al.*, 1999), obwohl sich die Morphologie des Actin-Cortex zwischen den verschiedenen Zelllinien stark ähnelte. Alle Mutanten hatten eine unregelmäßige und scheinbar „kontraktierte“ Oberfläche. Ein weiterer Unterschied betraf die Makropinocytose, der rezeptorunspezifischen Aufnahme von Flüssigmedium, denn die MyoK Mutanten hatten im Gegensatz zu anderen Myosin-Klasse I Mutanten keinerlei Schwierigkeiten mit der Internalisierung. Aus diesem Grund sollte die Aussage von Dai und Titus nochmals überdacht werden, die aufgrund ihrer Ergebnisse vorschlugen, daß die Überproduktion eines Klasse I Myosins in der Zelle dazu führt, daß der Cortex eine Konstriktion erfährt (sich zusammenzieht) und dadurch dynamische Prozesse wie Makropinocytose und Beweglichkeit gestört werden (Dai *et al.*, 1999).

Durch die vorangegangenen Untersuchungen von Eva Schwarz konnte demnach belegt werden, daß MyoK eine wichtige Rolle im Erhalt der Cortexspannung spielt, die nicht von anderen Myosinen der Klasse I übernommen werden kann (oder zumindest nicht in vollem Umfang). Da die Manipulation des MyoK Levels in der Zelle auch nicht zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen G- und F-Actin führte und es kein Protein ist, das im Überfluss vorhanden ist, scheint MyoK eher eine regulative Funktion auszuüben (Schwarz *et al.*, 2000).

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend, sollte in der vorliegenden Arbeit das Verständnis über MyoK und seine Funktion in der Zelle vertieft werden.

Die Untersuchung der entwicklungspezifischen Expression von MyoK zeigte, daß ein Maximum zwischen vier bis zehn Stunden erreicht wird, dann fällt die Expression abrupt ab und MyoK wird in den späten Entwicklungsstadien von *D. discoideum* praktisch nicht mehr produziert. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, daß MyoK seine Funktion in Prozessen ausübt, die eine hohe Beweglichkeit der Zelle fordern, wie gerade in der Chemotaxis oder Endocytose/Phagocytose. Um diese komplexen Prozesse effizient durchführen zu können, muß die Zelle ihr Actin-Cytoskelett und insbesondere das cortikale Actin-Cytoskelett schnell umgestalten. Die Bestimmung des Expressionsmusters von endogenem MyoK wurde von Eva Schwarz zuvor nur im gesamten Zellextrakt vorgenommen. Es war jedoch wichtig zu erfahren, wieviel MyoK sich prozentual im Cytosol oder an Membranen befindet, da . Die zelluläre Fraktionierung von *D. discoideum* Wildtyp Zellen in Cytosol und Membranen lies erkennen, daß MyoK hauptsächlich im Cytoplasma zu finden ist (90%), und nur ein kleiner Anteil (10%) an Membranen assoziiert. Eine Vergleichsstudie mit den anderen Klasse I Myosinen von *D. discoideum*, in der die subzelluläre Verteilung von MyoA, MyoB, MyoC und MyoD untersucht wurde, zeigte ebenfalls einen membranassoziierten Anteil zwischen 7-15% des jeweiligen Myosins (Senda *et al.*, 2001). In der gleichen Studie wurde mittels einer weiteren Fraktionierung der Membranen demonstriert, daß diese Myosine nur spezifisch mit der Plasmamembran assoziiert waren. Die Identifizierung des intrazellulären Kompartiments, an dessen Membran MyoK bindet, ist noch nicht abgeschlossen. Mit Hilfe der Immunlokalisation konnte zwar an bestimmten Regionen der Plasmamembran eine Anreicherung beobachtet werden, allerdings ist die mikroskopische Auflösung zu gering, um zwischen einer direkten Assoziation mit der Plasmamembran oder dem Actin-Cortex, der sich direkt unter der Plasmamembran befindet, zu unterscheiden. Die Anreicherung der Klasse I Myosine an der Plasmamembran ist nicht nur in *D. discoideum* beobachtet worden, sondern scheint für alle bisher untersuchten Myosine I in unterschiedlichen Organismen charakteristisch zu sein. *Acanthamoeba* Myosin IA ist zwar hauptsächlich cytosolisch, aber die nah verwandten *Acanthamoeba* Myosine IB und IC sind mit einem großen Anteil membranassoziiert (Baines *et al.*, 1992). Myr1 und Myr2, die zu den nicht-amöboiden Myosinen I aus Säugern gehören, sind jeweils in Leber und Nichtmuskelzellen der Ratte identifiziert worden, und Myr1 ist sowohl an der Golgi- als auch der Plasmamembran angereichert (Ruppert *et al.*, 1995). Diese Beobachtungen sprechen für eine gezielte Steuerung des jeweiligen Klasse I Myosin an ein spezifisches Membrankompartiment. Zusätzlich muß eine Regulation stattfinden, die bestimmt, wie groß der Anteil an cytosolischem und membrangebundenen Myosin I ist.

5.2 Mögliche Regulationsmechanismen für MyoK

Alle Myosine der Klasse I außer MyoK haben in ihrer Schwanzdomäne eine polybasische Region, mit der sie an Membranen binden können (zuerst 1989 *in vitro* von T. Pollard gezeigt für *Acanthamoeba*). MyoK kann potentiell auch in Membranen verankert werden, allerdings über einen gänzlich unterschiedlichen Mechanismus. Am absoluten Carboxyterminus befindet sich die sogenannte CaaX Box, die ein Signal zur Prenylierung eines Proteins darstellt. Damit kann die Myosin-Klasse I theoretisch einen ganz anderen Aktionsmodus erfüllen als Myosin II, nämlich die Bewegung von Membranen und Actin relativ zueinander innerhalb der Zelle. Die kinetische Analyse der *Acanthamoeba* Myosine IA und IB zeigte allerdings, daß sie nicht als prozessive Motoren arbeiten (Ostap und Pollard, 1996). Nach einer Schätzung von Ostap und Pollard wäre eine direkte Anhäufung (Cluster) von mindestens 20 Myosin I Molekülen notwendig, um die Kraft zu erzeugen, welche eine Bewegung entlang F-Actin ermöglicht. Wenn man in Betracht zieht, daß MyoK nur in geringem Maße exprimiert wird, erscheint es fraglich, ob diese Funktion von MyoK ausgeübt wird. Andererseits zeigte die Immunlokalisation eine Anreicherung von MyoK nur in bestimmten Regionen, wie beispielsweise an der Frontlamelle einer sich bewegenden Zelle. Interessanterweise wurde für Myo IB aus *D.discoideum* ein Rechenmodell aufgestellt, das andeutet, daß Myo B theoretisch in der Lage ist, die nötige Kraft zu erzeugen, um Bewegung entlang von Actin-Filamenten zu ermöglichen (Senda *et al.*, 2001). Ein Vergleich von MyoK und MyoB lohnt sich in dieser Hinsicht, da diese zwei Myosine der Klasse I in *D. discoideum* anscheinend mehr Gemeinsamkeiten haben als andere Klasse I Myosine untereinander. Beide Myosine sind am Actin-Cortex angereichert und dort vor allem in Pseudopodien und Lamellipodien am Leitsaum der Zelle, an Seiten von Zell-Zellkontakten und am phagocytotischen Becher, der bei der Internalisierung von größeren Partikeln (z.B. Hefezellen) gebildet wird. Wurde das jeweilige Myosin durch eine Mutation ausgeschaltet, zeigten beide Zelllinien eine verringerte Phagocytoseaktivität um ungefähr 30%. In frühen Entwicklungsphasen war die Motilität der aggregationskompetenten Zellen in beiden Mutanten 50% langsamer als die von Wildtyp Zellen. Der einzig signifikante Unterschied besteht darin, daß MyoB mutierte Zellen nicht fähig sind, in gleichem Maß wie Wildtyp Zellen Pinocytose zu betreiben (um 11% erniedrigt), während MyoK mutierte Zellen normal pinocytieren.

Es ist sicher aufschlußreich zu erfahren, wie sich eine Doppelmutante von MyoB und MyoK auf Funktionen wie Phagocytose und Motilität auswirkt. Für MyoB/C Doppelmutanten und selbst für eine Tripelmutante in MyoB/C/D änderte sich der Phagocytosedefekt im Vergleich zu der MyoB Einzelmutante nicht. Das bedeutet, daß die Funktionen, zumindest dieser einzelnen Myosine, nicht additiv sind.

Alle amöboiden Myosine der Klasse I, außer MyoK, besitzen in ihrer Schwanzdomäne eine polybasische Region (TH 1 für Tail Homology 1), mit der Kapazität, an jede Membran zu

binden, die eine negative Nettoladung aufweist (Adams und Pollard, 1989; Miyata *et al.*, 1989). MyoK kann allerdings über seinen Farnesylanker ebenfalls, zumindest theoretisch, mit einer beliebigen Membran assoziieren.

Es gibt offensichtlich einen Mechanismus, der reguliert, wo eine spezifische Membranassoziation mit einem bestimmten Myosin der Klasse I stattfindet. Senda und Titus untersuchten in Membran-Bindungs-Experimenten, wie MyoB aus *D. discoideum* spezifisch an die Plasmamembran bindet, und stellten ein schlüssiges Modell hinsichtlich der Regulation auf. In diesem Modell könnte cytosolisches MyoB an einen Faktor gebunden sein, der verhindert, daß es zu einer Membranbindung kommt. Eine spezifische Membranassoziation findet nur statt, wenn der Komplex aus MyoB und dem cytosolischen Faktor in Kontakt mit einer Membran kommt, die ein sogenanntes regulatorisches Membranprotein (Membranfaktor) enthält. Interaktion zwischen dem Membranfaktor und dem MyoB Proteinkomplex führt dann zu einer Freisetzung des cytosolischen Faktors und erlaubt somit die Bindung an die Membran. Über die Identität der Faktoren kann momentan nur spekuliert werden, beispielsweise könnte es sich bei dem cytosolischen Faktor um eine leichte Kette von MyoB handeln (Senda und Titus, 2000).

Myosine der Klasse I, jedoch nicht MyoK (und MyoF, das allerdings noch nicht vollständig kloniert wurde), enthalten in ihrer Halsregion eine Konsensus-Sequenz (IQ-Motiv), an die leichte Ketten der Calmodulin-Familie oder Calmodulin selbst binden können. Bisher gibt es keine Hinweise, ob MyoK trotz fehlendem IQ-Motiv an leichte Ketten bindet. Die zielgerichtete Translokation der amöboiden Myosine I an Membranen könnte auch über eine Domäne innerhalb der Schwanzregion stattfinden. Beispielsweise wird für die SH3 Domäne von Myo5p aus Hefe angenommen, daß diese zwar nicht alleine für die korrekte Lokalisation am Zell-Cortex verantwortlich ist, jedoch dazu beiträgt (Anderson *et al.*, 1998). Wird eine mutierte Form von Myo5p ohne die SH3 Region in den Zellen exprimiert, resultierte daraus eine Depolarisation der vormals am Zell-Cortex befindlichen Myo5p Ansammlungen. Andererseits beeinträchtigte die Entfernung der SH3 Domäne in MyoB aus *D. discoideum* dessen normale Lokalisation nicht (Novak und Titus, 1998). Zumindest ist sicher, daß die jeweiligen SH3 Domänen benötigt werden, um die Funktionalität der Myosine aufrechtzuerhalten, denn in beiden Modellorganismen führte die Expression der deletierten Myosinformen zu Beeinträchtigungen. Auch eine ähnliche Deletion in myr3 aus Ratte hatte keinen Effekt auf dessen Lokalisation an Zell-Zellkontakten in HeLa Zellen (Stoffler *et al.*, 1998). Da in MyoK keine SH3 Domäne vorhanden ist, muß für dessen Lokalisation prinzipiell ein anderer Mechanismus gelten. Außerdem scheint mit großer Wahrscheinlichkeit die Region, an der Regulation stattfindet, nicht in dem kurzen Halsbereich beziehungsweise Schwanzbereich (je nach Beurteilung des kurzen Carboxyendes von MyoK) zu liegen. Begründet wird dies durch die Beobachtung, daß zwar das GFP-Carboxyterminus Konstrukt von MyoK stark an der gesamten Plasmamembran angereichert wurde, jedoch MyoK in voller

Länge nur an ganz bestimmten Regionen an der Plasmamembran konzentriert war. Ganz besonders deutlich zeigte es sich beim Prozess der Phagozytose: Das GFP Konstrukt befand sich gleichmäßig verteilt an der Membran, die zuerst den phagozytotischen Becher ausbildet und dann nach der Abschnürung die Phagosomenmembran bildet. Vollständiges MyoK lokalisierte bei der Internalisierung von Hefe nur an ganz bestimmten Regionen an der Membran. Hier ist MyoK stärker an den Seiten der Ausläufer konzentriert, die den Partikel umschlingen. Damit scheint klar, daß einerseits die Verankerung mittels eines angefügten Isoprenoids (Farnesyl) funktioniert, aber andererseits dies nicht die komplette *in vivo* Situation widerspiegelt.

Die Regulation der zielgerichteten Translokation von den verschiedenen Isoformen der Myosinklasse I hängt vermutlich auch von deren Aktivierung selbst ab.

Phosphorylierung der Klasse I Myosine in *Acanthamoeba* und *Dictyostelium* ist für die Aktivierung ihrer ATPase-Aktivität durch Actin notwendig (Albanesi *et al.*, 1983; Cote *et al.*, 1985). Wahrscheinlich gilt dies auch für Hefe und *Aspergillus* Myosine I, allerdings wurden diese Proteine noch nicht gereinigt und charakterisiert. Die phosphorylierbare Stelle befindet sich an einer konservierten Position innerhalb der Motordomäne und wird als die TEDS-Regel bezeichnet (Bement und Mooseker, 1995). Diese Regel wurde aus der Beobachtung abgeleitet, daß in nahezu allen Myosinen genau 16 Aminosäuren vor dem hochkonservierten DALAK-Motiv ein Threonin-, Glutamat-, Aspartat- oder Serinrest positioniert ist. Nach dem Strukturmodell liegt dieser Bereich exponiert an einer Oberfläche der Motordomäne, die im Actomyosin-Komplex in Kontakt mit dem Actin-Molekül steht. Dort scheint eine negative Ladung für die Entfaltung der Motoraktivität von großer Bedeutung zu sein; während diese bei den amöboiden Klasse I Myosinen durch Phosphorylierung eingeführt wird (Brzeska und Korn, 1996), sollten mit einem Aspartat- oder Glutamatrest die Myosine der anderen Klassen quasi konstitutiv aktiv sein. Es gibt innerhalb der Myosinklassen jedoch auch Isoformen, welche nicht der TEDS-Regel folgen. Myosin IA aus *Drosophila melanogaster* und einige Myosine aus *Toxoplasma gondii* besitzen einen Asparaginrest (Strom Morgan *et al.*, 1994; Hettmann *et al.*, 2000), so daß wohl auch andere Regulationsmechanismen existieren. In *D. discoideum* haben alle Mitglieder der Klasse I einen Serin- oder Threoninrest an der TEDS-Stelle, doch wurde bisher nur für MyoD der direkte Beweis einer notwendigen Phosphorylierung zur Aktivitätsentfaltung erbracht (Lee und Cote, 1995, 1996). Denn von den bisher identifizierten und klonierten drei MIHCK (Myosin I Heavy Chain Kinasen) war nur eine aktiv auf MyoD; für die anderen wurde noch kein Substrat identifiziert. Die Beweisführung erfolgte sonst nur mittels Mutationanalysen, in denen der phosphorylierbare Threonin- oder Serinrest entweder durch Glutamat (negativ geladen) oder Alanin (ungeladen) ausgetauscht wurde und die Actin-aktivierte ATPase-Aktivität im Vergleich zu Wildtyp Zellen gemessen wurde.

MyoK folgt wie alle anderen Myosine I aus *D. discoideum* der TEDS-Regel mit einem phosphorylierbaren Threoninrest an Position 464. Die Eignung von MyoK als Substrat für eine der MIHCK könnte geprüft werden, wenn es möglich wäre, dieses Protein in biochemischen Mengen zu reinigen. Die *D. discoideum* MIHCK gehören wie die homologen Enzyme aus *A. castellanii* und *S. cerevisiae* zu der Familie der p21-aktivierten Kinasen PAK/Ste20, die durch Cdc42 und Rac aktiviert werden (Lee *et al.*, 1996; Brzeska *et al.*, 1999). Das Substrat-Erkennungsmotiv dieser Kinasen, die auch in höheren Organismen vorkommen, umfaßt die Sequenz RxS/TxY (Wu *et al.*, 1996) und ist auch in MyoK vorhanden. Die Problematik, daß MyoK nicht stark in Zellen exprimiert werden kann, selbst dann nicht, wenn der Carboxyterminus mit dem Signal zur Prenylierung maskiert wurde, verhinderte jedoch dessen Aufreinigung und nachfolgende Experimente in dieser Richtung.

Der Phosphorylierungsstatus eines Proteins kann auch über die isoelektrische Fokussierung ermittelt werden. Um zumindest einen Hinweis zu erhalten, ob MyoK phosphoryliert vorliegen könnte, wurde von überexprimierenden Zellen ein Extrakt hergestellt und in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Am theoretisch berechneten pI von MyoK konnten zwar tatsächlich zwei dicht aufeinanderliegende Spots (Signale) erkannt werden, da jedoch die Identifizierung im Western Blot mittels eines Antikörpers gegen MyoK durchgeführt wurde, der nicht speziell gegen eine phosphorylierte Form gerichtet ist, kann nur mit großer Vorsicht darüber spekuliert werden, ob es sich um unphosphoryliertes und phosphoryliertes MyoK handelt. Auch die Auftrennung eines Zellexttrakts, der zuvor mit Phosphatase-Inhibitoren inkubiert wurde, konnte in dieser Hinsicht keine klarere Aussage bringen. Insgesamt wurden die beiden Signale zwar intensiver, allerdings schien sich das Verhältnis von angenommener phosphorylierter zu unphosphorylierter Form nicht sichtbar zu ändern. Versuchsweise sollte deshalb ein Zellextrakt mit Phosphatasen behandelt werden, um zu überprüfen, ob das eine Signal in der 2D-Gelelektrophorese verschwindet. Ein Nachteil dieser Versuchsanordnung besteht darin, daß, falls es sich bei der Modifikation tatsächlich um Phosphorylierung handelt, nicht bestimmt werden kann, wo genau in der Sequenz von MyoK eine Phosphatgruppe addiert wird. Wird MyoK an der TEDS-Position phosphoryliert, kann eine Mutation an dieser Stelle in eine nicht-phosphorylierbare Aminosäure mehr Aufschluß geben. Unabhängig von Phosphatasen bzw. Phosphatasen-Inhibitoren würde nur ein Spot (Signal) sichtbar.

5.3 MyoK als Actin-Quervernetzer

Die Sequenz der MyoK-Motordomäne hebt sich von allen anderen Myosinen durch eine 143 Aminosäuren lange Insertion ab, die sich im Loop1 befindet. Außer MyoK besitzt nur MyoJ aus *D. discoideum* eine 47 Aminosäuren lange Insertion im Loop1, der normalerweise nur 3-20 Aminosäuren umspannt (Hammer und Jung, 1996). Der katalytische Myosinkopf wurde aus historischen Gründen in drei Segmente von 25, 50 und 20 kDa unterteilt. Die Verbindungsstücke zwischen den Segmenten wurden als Loop1 (25-50 K Loop) und als

Loop2 (50-20 K Loop) bezeichnet, da deren Struktur röntgenkristallographisch nicht vollständig gelöst werden konnte, was auf eine erhöhte Flexibilität der Peptidkette hinweist. Die Verbindungsstücke ragen demnach als Oberflächenschleifen (Loops) aus der ansonsten globulären Struktur der Motordomäne heraus. Loop1 liegt in der Nähe der ATP-Bindungstasche und moduliert die ADP-Affinität, wodurch die Gleitgeschwindigkeit der Actin-Filamente bestimmt wird (Murphy, 1998; Kurzawa-Goetz *et al.*, 1998). In chimären Studien, in denen Loop1 aus der Motordomäne von *D. discoideum* gegen die entsprechenden Abschnitte aus Skelettmuskel- oder Acanthamoeba- Myosin ausgetauscht wurde, korrelierte die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit mit der des Myosins, aus dem der jeweilige Loop stammte (Murphy und Spudich, 1998).

Damit stellte sich natürlich die Frage, wie sich eine so große Insertion, wie die 143 Aminosäuren lange GPR-Domäne im Loop1, auf die Eigenschaften der MyoK Motordomäne auswirkt. Die Grundvoraussetzung für die Funktion als Motor, nämlich die ATP-abhängige Bindung an Actin ist gegeben, allerdings ist sie beeinträchtigt. Im Gegensatz zu konventionellem Myosin II reichte ATP alleine nicht aus, um MyoK quantitativ von F-Actin freizusetzen. Zusätzliches Salz war notwendig und bei 1 M NaCl konnte fast das gesamte gebundene MyoK wieder freigesetzt werden. Dies legte die Vermutung nahe, daß weitere elektrostatische Bindungen bestehen, die erst durch die erhöhte Salzkonzentration gelöst wurden. Die GPR Domäne hat große Ähnlichkeit mit der TH2 Domäne aus der Schwanzregion anderer Myosine der Klasse I aus *D. discoideum* und *A. castellani*, für die bereits gezeigt wurde, daß sie ATP-unabhängig an F-Actin binden (Lynch *et al.*, 1986; Rosenfeld und Rener, 1994; Jung und Hammer, 1994). Mit Bindungs-Experimenten konnte auch für MyoK *in vitro* festgestellt werden, daß der GPR-Loop ATP-unabhängig, aber salzabhängig an F-Actin bindet. Interessanterweise verringerte sich die Bindung an F-Actin, wenn die Ionenstärke mehr in Richtung des physiologisch relevanten Bereichs von 40-80 mM KCl verschoben wurde. Diese Beobachtung korreliert mit früheren Untersuchungen, die feststellten, daß die GPQ-Domäne von MyoB als auch die GPA-Domäne von MyoD niedrigere Bindungskonstanten für Actin aufwiesen, wenn die Ionenstärke erhöht wurde. Für den GPR-Loop wurde eine 1:2 Stöchiometrie mit F-Actin abgeschätzt; ob es der Realität entspricht, daß ein Molekül GPR-Loop an zwei Actineinheiten bindet, kann momentan nicht beurteilt werden. Die entsprechenden Domänen von MyoB und MyoC hatten jedenfalls eine maximale Bindung von ca. 1 Mol pro 1 Mol Actineinheiten (Rosenfeld und Rener, 1994; Jung und Hammer, 1994). Die Möglichkeit von zwei Bindungsstellen sollte man nicht ausschließen, denn auch Myr3, ein Myosin I aus Ratte, kann trotz offensichtlicher Abwesenheit einer GPX-Domäne in ATP-unabhängiger Weise an Actin binden (Stöffler und Bähler, 1998).

Obwohl die Myosine der Klasse I nicht in der Lage sind, sich zu Dimeren zusammenzulagern, wie es den Klassen V und XI möglich ist, können sie an zwei Actin-Filamente binden. Die

Existenz einer ATP-abhängigen und einer ATP-unabhängigen, aber salzsensitiven Actin-Bindestelle ermöglicht ihnen, Actin-Filamente zu bündeln oder quervernetzen und Filamente relativ zueinander zu bewegen. Die Besonderheit von MyoK liegt darin begründet, daß diese beiden Actin-Bindestellen innerhalb der Motordomäne liegen und nicht auf Kopf und Schwanz verteilt, wie man es in den anderen Myosinen der Klasse I findet. MyoK kann so als eine neue Art von Actin-Quervernetzer bezeichnet werden, der im Actin-Cortex ähnlich agieren kann wie andere Myosine der Klasse I, sich aber durch seine besondere Struktur auszeichnet (siehe Abb. 5.1).

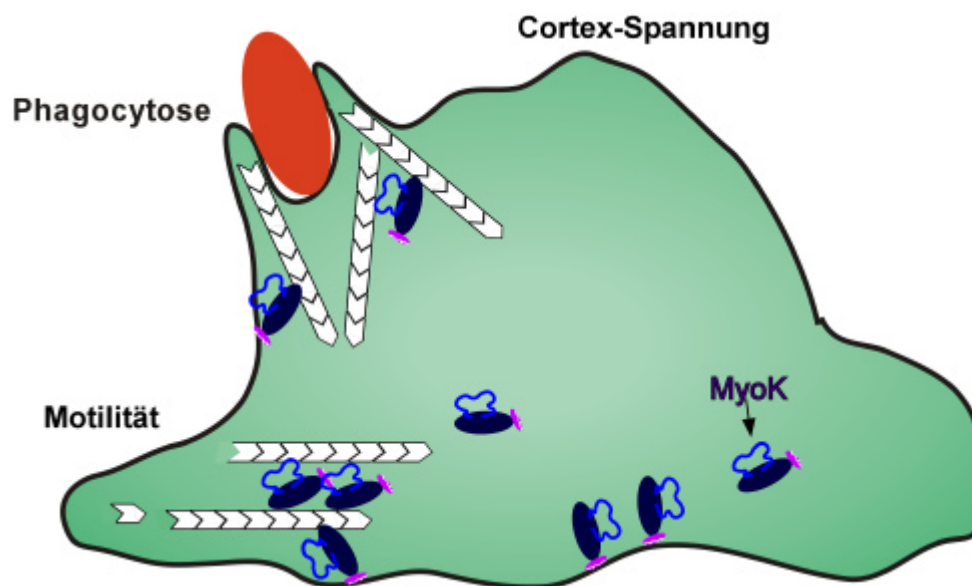


Abb. 5.1: Erstes Modell möglicher MyoK Funktionen. Skizziert ist eine *D. discoideum* Zelle, die gerade einen Partikel (rote Ellipse) internalisiert. MyoK tritt in Aktion, wenn eine dynamische Umgestaltung des Actin-Cytoskeletts gefordert ist, wie beispielsweise bei der Phagocytose oder bei Bewegung von Zellen. Hier kann MyoK als Actin-Quervernetzer wirken. An der Erhaltung und Erzeugung der Cortexspannung scheint MyoK ebenfalls beteiligt zu sein. MyoK kann über seinen Farnesylanker an die Plasmamembran assoziieren und auf diese Weise den direkt darunterliegenden Actin-Cortex koppeln.

5.4 Bindungspartner von MyoK

Da MyoK, anders als die anderen amöboiden Myosine der Klasse I, keinen, beziehungsweise nur einen extrem verkürzten Schwanzbereich hat, war es von großer Bedeutung zu erfahren, ob dieses Myosin noch andere Funktionen in der Zelle erfüllen kann, außer der Möglichkeit als Actin-Kreuzvernetzer oder Plasmamembran-Actin Koppler zu dienen.

Da man den GPR-Loop eventuell als in den Kopf transferierte Schwanzdomäne bezeichnen kann, welche ja die jeweilige Charakteristik eines Klasse I Myosins ausmacht, wurde besonders dessen Sequenz auf vorhandene Motive untersucht, die schon für Protein-Protein-Interaktionen bekannt sind.

5.4.1 MyoK bindet an Profilin aus *D.discoideum*

Der GPR-Loop von MyoK enthält einen hohen Anteil der Aminosäuren Glycin, Prolin und Arginin, weshalb er seinen Namen erhielt. Augenfällig war jedoch auch die Aneinanderreihung von fünf Prolinresten. Diese Sequenz wird nur nach dem vierten Prolin durch ein Isoleucin unterbrochen. Seit einigen Jahren ist bekannt, daß das G-Actin bindende Protein Profilin eine Bindungsdomäne für poly-L-Prolinmotive hat, wie sie z.B. in VASP, MENA und dem ARP2/3 Komplex vorkommen. Für diese Proteine wurde bereits eine Interaktion gezeigt (Reinhard *et al.*, 1995; Gertler *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, Machesky *et al.*, 1994). Dies ist von besonderer Bedeutung, denn die drei Proteine wurden sowohl in den Actin-Schweiften von *Listeria* als auch an Fokalkontakten in der Zelle gefunden und scheinen eine Rolle in der Rekrutierung von Profilin-Actin (Profilactin) an Stellen der Actin-Polymerisation zu spielen; am Bakterium, das sich so durch das Zellinnere bewegt, ebenso wie bei physiologischen Prozessen in der Zelle.

Die zellulären Funktionen der Profiline sind noch nicht vollständig aufgeklärt, aber unter dem Aspekt betrachtet, daß sie in hoch dynamischen Regionen der Zelle lokalisieren und in Assoziation mit ENA/VASP Proteinen die Umorganisation des Cytoskeletts modulieren können, stellte sich die Frage, ob auch MyoK Bindungspartner ist.

In *D. discoideum* existieren zwei Isoformen von Profilin, Profilin I und Profilin II. Da das Expressionsmuster von Profilin II exakt mit dem von MyoK korreliert, lag die Untersuchung auf eine Interaktion dieser beiden Proteine nahe. Tatsächlich konnte mit *in vivo* und *in vitro* Experimenten eine Bindung zwischen MyoK und Profilin II nachgewiesen werden. Damit ist MyoK das bisher einzige Myosin, das als Profilin-Bindungspartner identifiziert wurde. Die Interaktion erfolgte wahrscheinlich nicht über die Prolinreihe in MyoK, da die Profilinmutante W3N, die nicht mehr fähig ist, an poly-L-Prolin zu binden, eine starke Assoziation mit MyoK zeigte. Inzwischen ist bekannt, daß Profilin über verschiedene Erkennungssequenzen an Proteine binden kann und dafür lange Prolinreihen nicht essentiell sind. Das Motiv **ZPPX**, das mindestens zweifach innerhalb einer definierten Länge von ca 100 Aminosäuren vorkommen muß, wurde schon 1998 von Witke als Sequenz erkannt, die z.B. für die Interaktion von Dynamin oder Synapsin mit Profilin verantwortlich ist (Witke *et al.*, 1998). Obwohl für MyoK noch keine Daten vorliegen, wo die genaue Bindungsstelle für Profilin liegt, wird die Bindung wahrscheinlich durch ZPPX vermittelt, denn dieses Motiv befindet sich viermal in der Aminosäuresequenz des GPR-Loops. Es sollte also nicht nur eine prolinreiche Folge als Grundlage der Profilin-Bindung in Betracht gezogen werden, denn diese Schlußfolgerung kann auch in die Irre leiten. So wurde innerhalb dieser Arbeit festgestellt, daß die isolierte prolinreiche Domäne (PRD) von WASp aus *D. discoideum* nicht an Profilin II bindet, während das der WASp-Familie zugehörige N-WASp aus Rind sehr wohl an Profilin bindet (Suetsugu *et al.*, 1998). Interessanterweise zeigte ein direkter Sequenzvergleich der beiden prolinreichen Domänen eine unterschiedliche Anzahl

vorhandener ZPPX Motive: während die PRD aus WASp von *D. discoideum* nur ein einziges ZPPX enthält, besitzt die PRD aus bovinem WASp fünf dieser Motive. Damit könnten die unterschiedlichen Bindungseigenschaften dieser Proteinfamilie in bezug auf Profilin erklärt werden. Auch die prolinreiche Domäne aus *Dd* SCAR hat kein ZPPX Motiv, allerdings wurde noch nicht untersucht, ob SCAR *in vivo* oder *in vitro* an Profilin binden kann. In dieser Arbeit konnten die Bindungskonstanten jedoch nicht ermittelt werden. Es wurde versucht, einen ELISA zu etablieren, um im nanomolaren Bereich arbeiten zu können. Leider konnten unspezifische Hintergrundprobleme nicht zufriedenstellend gelöst werden, so daß über die Affinität der Bindung keine Daten vorhanden sind.

Über die Bedeutung der Interaktion zwischen MyoK und Profilin kann momentan nur spekuliert werden: MyoK könnte als Lieferant von Profilactin wirken und somit ATP-Actin-Monomere dorthin bringen, wo dynamische Actin-Umorganisation gefordert wird. Auffallend ist, daß einige profilinbindende Proteine wie beispielsweise N-WASp oder p140mDia aus Säugern direkt an aktivierte kleine G-Proteine der Rho-Familie (Cdc42, Rac, Rho) binden und Profiline sich somit direkt an der Schnittstelle zwischen Signaltransduktion und dem Aktin-Cytoskelett befinden. Für MyoK gibt es in dieser Hinsicht noch keine Hinweise.

MyoK ist sicher nicht der einzige Profilactin-Ligand in *D. discoideum*, da sonst das Ausschalten von MyoK wohl einen dramatischeren Effekt auf die ganze Zelle hätte. Diese Vermutung wird auch durch eine Studie aus der Arbeitsgruppe von M. Schleicher bestätigt: Die Profilinmutanten W3N und K114E wurden in Profilin-Minus *D. discoideum* Zellen exprimiert und ihre Auswirkungen analysiert. Während K114E-Profilin mit der intakten poly-L-Prolin Bindestelle den Profilin-Minus Phänotyp (Defekte im F-Actin-Gehalt, Cytokinese und Entwicklung) schon in geringer Konzentration rettete, mußte W3N-Profilin mit der zerstörten poly-L-Prolin Stelle stark überexprimiert werden, um den normalen Phänotyp wiederherzustellen (Lee *et al.*, 2000). Das bedeutet, daß ausschließlich die funktionelle poly-L-Prolin-Bindungsaktivität wichtig für den Erhalt der Zelle ist. Da MyoK nicht mittels poly-L-Prolin an Profilin bindet, ist es wohl nicht für Funktionen wie F-Actin-Konzentration, Cytokinese oder Entwicklung essentiell. Die Analyse der *MyoK*⁻ Zellen zeigte ebenfalls keine Defekte, die dem Phänotyp der Profilinmutanten entsprechen würden (Schwarz *et al.*, 2000). Aufschlußreich für die MyoK Funktion kann allerdings die Beobachtung von Schleicher und Kollegen sein, daß sowohl Wildtyp als auch die mutierten Profilin-Formen in den phagocytotischen Bechern während der Aufnahme von Hefe angereichert sind. Diese Lokalisation scheint demnach unabhängig von der poly-L-Prolin-Bindestelle oder der G-Actin-Bindung zu sein (die K114E Mutation bewirkt eine sehr stark reduzierte Bindung zu G-Actin). Damit könnte MyoK sehr gut als Kandidat in Frage kommen, um Actin-Monomere in Form von Profilactin dorthin zu liefern, wo Phagocytose stattfindet, denn die Bindung über poly-L-Prolin ist bei der Interaktion zwischen MyoK und dem Profilactin-Komplex nicht gegeben.

Phagocytose ist ein höchst komplexer Prozess, der auf einer dynamischen Umgestaltung des Actin-Cytoskeletts beruht, und die Zelle dadurch große Partikel in einer membranumhüllten Vakuole (Phagosom) internalisieren kann. Eine Reihe von Studien hat inzwischen die Actin-Abhängigkeit bei verschiedenen Schritten dieses Prozesses belegt. Ein entscheidender Schritt in der Phagocytose ist die Ausweitung des actinreichen phagocytotischen Bechers, der das Partikel umschließt. Die dafür notwendige Kraft könnte von molekularen Motoren, wie den Myosinen, bereitgestellt werden. Da jedoch noch keine Hinweise existieren, daß MyoK tatsächlich als molekularer Motor arbeitet und dieses Myosin nur in geringem Maße in *D. discoideum* exprimiert wird, kann man sich statt einer mechanischen auch gut eine regulative Aufgabe vorstellen. Dazu paßt auch die Beobachtung, daß MyoK nur kurzzeitig an der Membran von frühen Phagosomen assoziiert ist, während MyoB erst viel später an der Phagosomenmembran detektiert wird und auch länger daran gebunden bleibt (D. Gotthardt, persönliche Mitteilung).

5.4.2 MyoK interagiert mit Abp1 (Actin binding protein 1) aus *D. discoideum*

Um die zelluläre Funktion von MyoK besser zu verstehen, wurde untersucht, ob außer der Bindung an den Profilactin-Komplex weitere Interaktionspartner vorhanden sind. Im GPR-Loop ist ein klassisches SH3-Bindemotiv mit der Sequenz RXXPXXP enthalten. Da Proteine mit SH3 Domänen häufig in Signalübertragungswegen zu finden sind, die auf eine Umorganisation des Cytoskeletts abzielen, stellte sich die Frage, ob MyoK hier von Bedeutung ist. Aus der Inkubation von Cytosol aus *D. discoideum* mit an Sepharosegekoppeltem GPR-Loop resultierte unter anderem die Identifizierung von SH3P7R2, das *D. discoideum* Homolog zu Abp1 aus *S. cerevisiae*. Das Actin-bindende-protein 1 (Abp1) wurde bereits 1988 kloniert und sequenziert. Lokalisationsstudien zeigten, daß es sich an cortikalen Actin-Patches befindet; dies sind Actin-Anreicherungen, die in Hefezellen an der wachsenden Oberfläche in Form von Flecken sichtbar sind. Ähnlich wie bei den meisten Myosinen der Klasse I verursacht auch die Deletion von Abp1 keine offensichtlichen Defekte, während eine Überexpression zu depolarisierten Actin-Patches und Verlust der räumlichen Regulation vom Zellwachstum führt (Drubin *et al.*, 1988). Interessanterweise wurde schon 1990 eine Homologie zwischen Abp1 und den Myosinen I hinsichtlich ihrer SH3 Domäne angeführt und spekuliert, daß diese Domäne in ansonsten nicht verwandten Proteinen, welche aber mit dem cortikalen Actin-Cytoskelett assoziieren, dazu dienen könnte, Proteine der Signaltransduktion und deren Substrate bzw. Regulatoren im Actin-Cortex zusammenzuführen (Drubin *et al.*, 1990). Inzwischen ist bekannt, daß sowohl *Sc* Abp1 als auch Myo1p aus *S. pombe* den Arp2/3 Komplex direkt aktivieren, welcher als zentraler Regulator des Actin-Cytoskeletts gilt (May, 2001; Übersichtsartikel). Allerdings erfolgt die Aktivierung nicht über die SH3 Domäne, sondern über saure Regionen, die sich in Abp1 und Myo1p befinden.

5.5 MyoK als Mitglied eines Multi-Protein-Komplex, der die Polymerisation von Actin fördert

Der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen MyoK und Abp1 aus *D. discoideum* ist ein wichtiger Schritt für die Aufklärung der molekularen Verbindung von MyoK und der Actin-Dynamik in hochbeweglichen Prozessen. In Säugerzellen interagiert Abp1 nicht nur mit F-Actin und cytoskeletalen Proteinen wie Dynamin an dynamischen Actin-Strukturen, sondern auch mit Rvs167p/Amphiphysin, ein weiterer Faktor, der für die Endocytose notwendig ist. Nach Aktivierung der GTPase Rac, erfolgt eine Verlagerung von Abp1 in die Führungslamelle der Zellen und kolokalisiert dort präzise mit dem Arp2/3 Komplex (Lila und Drubin, 1997; Kessels *et al.*, 2000; Qualmann *et al.*, 2000). Abp1 funktioniert jedoch nicht nur als physikalische Verbrückung von cortikalem F-Actin zu der endocytotischen Maschinerie, sondern aktiviert auch direkt den Arp2/3 Komplex und stellt somit eine aktive Verbindung zwischen Arp2/3 Komplex-vermittelter Actin-Polymerisation und endocytotischer Funktion her (Goode *et al.*, 2001).

Es stellte sich somit die Frage, ob der Arp2/3 Komplex auch als Komponente im GPR-Loop Komplex des Pulldown-Experiments zu finden ist. Die Analyse im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die Untereinheit Arp3 zeigte tatsächlich ein starkes Signal. Ob MyoK tatsächlich über die Bindung an Abp1 den Arp2/3 Komplex an Regionen rekrutieren kann, an denen Actin-Polymerisation gefordert wird, kann mit diesen ersten Ergebnissen bisher nur vermutet, aber nicht bewiesen werden. Dazu müssen noch weitere Experimente mit gereinigten Proteinen durchgeführt werden, die eine direkte Interaktion zwischen Abp1 und Arp2/3 demonstrieren, während die *in vivo* Relevanz dieses Multi-Proteinkomplex mittels Immunpräzipitation bewiesen werden kann.

Die Wahrscheinlichkeit, daß MyoK eine aktive Rolle in der Integration von Krafterzeugung und Actin-Polymerisation spielt, scheint jedoch recht hoch zu sein, denn seit kurzem werden immer mehr Myosine der Klasse I aus unterschiedlichen Organismen bekannt, die direkt oder indirekt an den Arp2/3 Komplex binden (siehe Übersichtsartikel de la Roche und Côté, 2001). Dabei ist dort jedoch die SH3 Domäne äußerst wichtig, welche die Klasse I Myosine aus *D. discoideum*, *S. cerevisiae* und *A. castellani* über Verbindungsproteine an den Arp2/3 Komplex koppelt, während die Interaktion bei MyoK mittels des SH3 Bindungsmotiv erfolgt. Für Myo3p und Myo5p aus Hefe wurde bereits gezeigt, daß sie über ihre SH3 Domäne an Bee1p, das zur WASp Familie gehört, und an Vrp1p binden. Diese Proteine und Myo3/5p besitzen eine saure Domäne, über welche die Kopplung und Aktivierung des Arp2/3 Komplexes stattfindet. Die Fähigkeit von Myo3/5p Actin-Polymerisation zu fördern, ist strikt von ihrer Motorfunktion abhängig und erlischt, wenn an der TEDS-Stelle Serin gegen Alanin ausgetauscht wird. Dies deutet darauf hin, daß die durch Cdc42 induzierte Actin-Polymerisation durch von PAKs aktivierte Myosine I vermittelt wird (Evangelista *et al.*, 2000; Lechler *et al.*, 2000). Zieht man die Beobachtungen hinzu, daß durch die aktivierte

GTPase Rac1 eine Verschiebung von Säuger Abp1 aus dem Cytoplasma zu dynamischen Actin-Strukturen erfolgt (Kessels *et al.*, 2001) und Abp1 aus *D. discoideum* mit einer Myosin-I-Schwere-Ketten-Kinase (MIHCK) interagiert (de la Roche und Côté, 1999), könnte man sich für MyoK eine ähnliche Funktion vorstellen (siehe Abb. 5.2): MyoK würde durch eine MIHCK aktiviert und im Komplex mit Profilactin und Abp1 an Stellen innerhalb der Zelle gebracht, an denen eine Reorganisation des Actin-Cytosketts notwendig ist, wie bei Bewegung oder Phagocytose. Durch gleichzeitige Rekrutierung des Arp2/3 Komplex und dessen Aktivierung durch Abp1 kann *de novo* Actin-Polymerisation stattfinden. Bei einer solchen Konstellation würde die Bereitstellung aktivierter Actin-Monomere (ATP-G-Actin) durch MyoK sehr vorteilhaft sein, denn im Gegensatz zum Arp2/3 Aktivator WASp/SCAR hat Abp1 keine Bindestelle für G-Actin. Die G-Actin Bindestelle (WH2 Domäne) ist allerdings wichtig, denn WASp-Proteine ohne diese Domäne aktivieren den Arp2/3 Komplex nicht mehr effizient (Machesky *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999).

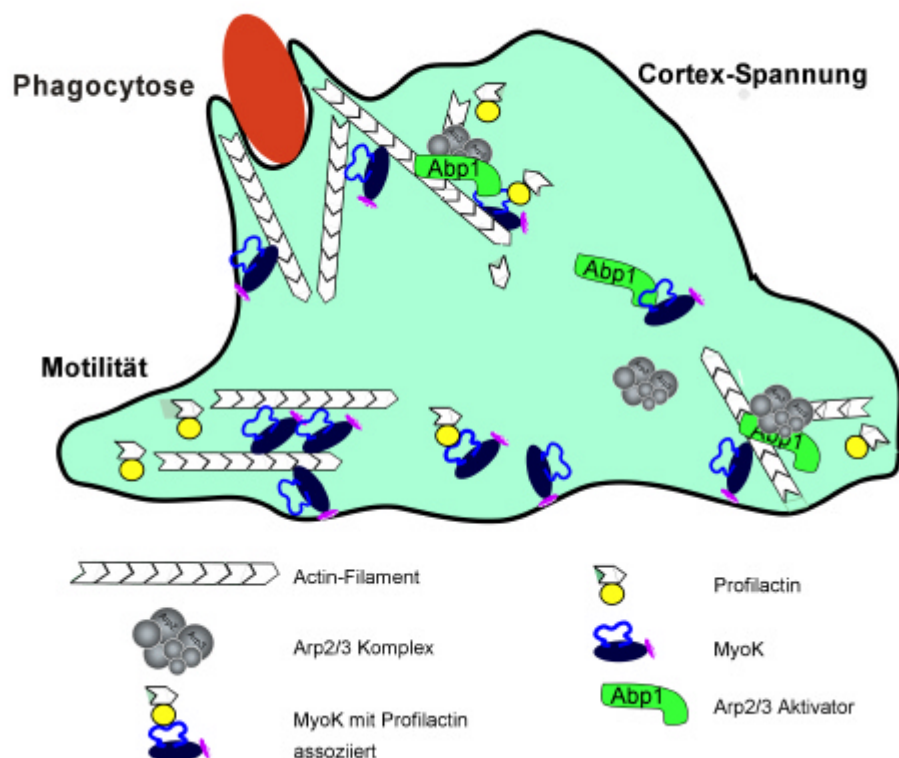


Abb. 5.2: Erweitertes Modell für die Funktionen von MyoK. In diesem Arbeitsmodell wirkt MyoK als Plattform multifunktioneller Protein-Protein Interaktionen. Der GPR-Loop von MyoK kann sowohl an F-Actin, Profilactin und Abp1 binden. Ob eine gleichzeitige Assoziation mit allen Bindungspartnern möglich ist, ist unbekannt. MyoK könnte als Lieferant von Profilactin und Abp1 dienen, und damit festlegen, wo neue Actinpolymerisation stattfindet. Abp1 bindet an ein Actin-Filament und wirkt so als Stabilisator für den rekrutierten Arp2/3 Komplex, an den G-Actin angefügt und somit die Actin-Nukleation gestartet wird. Würde MyoK ebenfalls an F-Actin gebunden sein, könnte es eventuell den Komplex aus Profilactin, Abp1 und dem Arp2/3 Komplex gegen andere Actin-Filamente bewegen. (Das Modell ist nicht maßstabsgetreu wiedergegeben).

Diese Überlegungen sind als Arbeitshypothese zu verstehen, die sich hauptsächlich auf in verschiedenen Organismen und Zelltypen gewonnenen Erkenntnisse stützt. Die indirekte Verbindung zwischen MyoK und dem Arp2/3 Komplex scheint attraktiv und auch nicht ungewöhnlich zu sein, denn auch für MyoB und MyoC aus *D. discoideum* konnte bereits ein solcher Zusammenhang demonstriert werden (Jung *et al.*, 2001).

5.6 MyoK- ein Ausblick

MyoK ist innerhalb der Klasse I strukturell das außergewöhnlichste Myosin. Man könnte es als „Minimal-Myosin“ bezeichnen, da es mit Abstand das kürzeste Myosin von allen Klassen in *D. discoideum* ist, aber aufgrund seiner Primärstruktur allen Anforderungen eines Motorproteins gerecht wird. Leider war es nicht möglich, dieses Myosin in Mengen zu reinigen, die eine kinetische Charakterisierung ermöglichte. Einerseits ist MyoK stark gegen proteolytischen Abbau anfällig. Andererseits wurde es auch dann in Zellen nur limitiert überexprimiert, wenn es hinter den starken Actin 15 Promotor kloniert wurde. Abhilfe könnte vielleicht das Tetrazyklin-regulierbare Genexpressionssystem schaffen, das inzwischen erfolgreich in *D. discoideum* etabliert wurde und es erlaubt, die Expression von Genen reguliert an- oder auszuschalten.

Unkonventionelle Myosine in voller Länge zu reinigen, ist generell problematisch. Aus diesem Grund werden oft nur die Kopfdomänen exprimiert, um die Motorfunktion zu überprüfen. Da MyoK so gesehen fast nur aus der überdimensionierten Kopfdomäne besteht, könnte eventuell der GPR-Loop innerhalb des Oberflächenloops 1 auf die Expression limitierend wirken. Es wurde bereits begonnen, ein Konstrukt ohne den GPR-Loop herzustellen. Falls tatsächlich dieser Loop das Problem darstellt, könnten mit dem neuen Konstrukt erste kinetische Daten gewonnen werden. Allerdings stellt sich dann die Frage, ob nicht gerade die Anwesenheit des GPR-Loops dem Myosin besondere kinetische Eigenschaften verleiht.

Es wird zwar angenommen, daß MyoK zur Entfaltung seiner Aktivität an der TEDS-Stelle phosphoryliert werden muß, allerdings steht die Beweisführung noch aus. Es sind einige potentielle Myosin I Kinasen im Labor vorhanden, allerdings wird auch hierfür gereinigtes MyoK (mit oder ohne den GPR-Loop) benötigt. Es wäre sehr interessant zu erfahren, ob die Myosin-I-Schwere-Kette-Kinase, die im Komplex mit Abp1 aus *D. discoideum* gefunden wurde (de la Roche, 1999) für MyoK aktiv ist. MyoK scheint nämlich das bisher einzige Myosin zu sein, das mit Abp1 interagiert. Diese Interaktion bedeutet, daß MyoK eine aktive Rolle in der regulierten Actin-Polymerisation spielt. Damit soll seine Funktion als Actin-Kreuzvernetzer nicht ausgeschlossen werden, sondern die Vielschichtigkeit dieses ungewöhnlichen Myosins hervorgehoben werden. Wie die Verbindung von MyoK in seiner

Funktion als Regulator der Cortex-Spannung zu den dynamischen Prozessen wie Motilität oder Phagocytose in einen Kontext gebracht werden kann, bleibt Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten.

Dabei sollten auch Ergebnisse miteinbezogen werden, die auf den ersten Blick schwierig in das Gesamtbild einzuordnen sind. Neben Abp1 wurden auch die Proteine EF1 α (Elongationfaktor 1 α) und rL3 (ribosomales Protein L3) als potentielle Bindungspartner gefunden. Diese beiden Proteine gehören der Proteinsynthese-Maschinerie an, aber ob MyoK an der Regulation von Proteinsynthese beteiligt ist, erscheint fraglich. EF1 α , ein F-Actin bindendes Protein, interagiert *in vitro* jedenfalls nicht mit MyoK, wie in einem Overlay-Experiment festgestellt wurde. Ob dies auch für rL3 zutrifft, konnte nicht untersucht werden, da dieses Protein nicht im Labor vorhanden ist. Interessanterweise wurden in Hefe die drei Proteine EF1 α , rL3 und Abp1 als Bindungspartner der prolinreichen Domäne P2 aus CAP (Cyclase Associated Protein) identifiziert (Yanagihara *et al.*, 1997). Es existiert auch in *D. discoideum* ein homologes Protein zu CAP, aber dieses besitzt keine prolinreiche Domäne P2 (Gottwald *et al.*, 1996). Bis jetzt ist noch nicht bekannt, ob *Dd* CAP mit der Adenylyl-Cyclase assoziiert ist, wie es in Hefe vorkommt. Sicher ist jedoch, daß in CAP-Minus *D. discoideum* Zellen die Aktivität der Adenylyl-Cyclase nicht beeinträchtigt wird, während in Hefe der Verlust von CAP zu Defekten in der Ras-vermittelten Aktivierung der Adenylyl-Cyclase führte (Noegel *et al.*, 1999; Fedor-Chaikin *et al.*, 1988; Nishida *et al.*, 1998). Ob MyoK in Ras-vermittelter Signalübertragung eine funktionelle Bedeutung hat, bleibt zunächst Spekulation.

Bisher wurde noch kein Ortholog zu MyoK gefunden, aber affinitätsgereinigte anti-MyoK Antikörper detektierten ein Protein in erwarteter Größe in einem Zellextrakt aus Mausherz (E.Schwarz, persönliche Mitteilung). Mehr Aufschluß versprechen die laufenden Genomsequenzierungsprojekte für verschiedene Organismen und Studien, die ähnlich wie in Projekten für *D. discoideum* versuchen, die Gesamtheit aller Myosinformen in einem Zell- oder Gewebetyp zu erfassen.

Es besteht kein Zweifel daran, daß die Myosine der Klasse I in verschiedenen Organismen an der Regulation der Actin-Polymerisation beteiligt sind. Die Umsetzung der extrazellulären Signale, die zu einer dynamischen Reorganisation des Actin-Cytoskeletts führen, muß in den verschiedenen Organismen jedoch nicht durch identische Faktoren stattfinden. Proteine, die funktionell, aber nicht strukturell homolog sind, erfüllen letztendlich dieselbe Aufgabe. Die vielfältigen möglichen Funktionen von MyoK könnten in Säugerzellen beispielsweise auch auf verschiedene Proteine verteilt sein. Gerade für höhere Organismen wäre dies von Vorteil, da dadurch eine größere Flexibilität und gleichzeitig bessere Kontrolle erreicht würde.

6. Literatur

- Adams R.J. & Pollard T.D. (1989) Binding of myosin I to membrane lipids. *Nature* 340: 565-568.
- Albanesi J.P., Hammer J.A. 3rd, Korn E.D. (1983) The interaction of F-actin with phosphorylated and unphosphorylated myosins IA and IB from *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem.* 16:10176-81.
- Anderson B.L., Boldogh I., Evangelista M., Boone C, Greene L.A. & Pon L.A. (1998) The src homology domain-3 (SH3) of a yeast type-I myosin, myo5p, binds to verprolin and is required for targeting to sites of actin polarization. *J Cell Biol* 141: 1357-1370.
- Avraham K.B., Hasson T., Steel K.P., Kingsley D.M., Russell L.B., Mooseker M.S., Copeland N.G. & Jenkins N.A. (1995) The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nature Genetics* 11: 369-375.
- Bähler M., (1996) Myosins on the move to signal transduction. *Current Opin. Cell Biol.* 8: 18-22.
- Baines I.C., Brzeska H., Korn E.D. (1992) Differential localization of *Acanthamoeba* myosin I isoforms. *J Cell Biol.* 5:1193-203.
- Baines, I.C. & Korn, E.D. (1990) Localisation of myosin IC and myosin II in *Acanthamoeba castellanii* by indirect immunofluorescence and immunogold electron microscopy. *J. Cell Biol.* 111: 1895-1904.
- Baker J.P. & Titus M.A., (1998) Myosins: matching functions with motors. *Curr. Op. Cell. Biol.* 10: 80-86.
- Bear J.E., Rawls J.F., Saxe C.L. 3rd. (1998) SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late *Dictyostelium* development. *J Cell Biol.* 5:1325-35.
- Bearer E.L., DeGiorgis J.A., Medeiros N.A., & Reese T.S. (1996) Actin-based motility of isolated axoplasmic organelles *Cell Motility & the Cytoskeleton* 33: 106-114.
- Bement W.M., Hasson T., Wirth J.A., Cheney R.E. & Mooseker M.S., (1994) Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes in vertebrate cell types. *Proc. Natl. Acad. Soc, USA* 91: 6549-6553.
- Bement W.M., & Mooseker M.S., (1995) TEDS rule: A molecular rationale for differential regulation of myosin by phosphorylation of the heavy chain head. *Cell Motil Cytosk* 31: 87-92.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brzeska H., Young R., Knaus U., Korn E.D. (1999) Myosin I heavy chain kinase: cloning of the full-length gene and acidic lipid-dependent activation by Rac and Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2:394-9.
- Brzeska H. & Korn E.D. (1996) Regulation of class I and class II myosins by heavy chain phosphorylation. *J Biol Chem* 271: 16983-16986.
- Caron E., Hall A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science.* 5394:1717-21.
- Cheney R.E. & Mooseker M. S. (1992) Unconventional myosins. *Curr. Op. Cell. Biol.* 4, 27-35.

- Cheney R.E., O'Shea M.K., Heuser J.E., Coelho M.V., Wolenski J.S., Espreafico E. M., Forscher P., Larson R. E., & Mooseker M. S. (1993) Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 75: 13-23.
- Chieregatti E., Gartner A., Stöffler H.E. & Bähler M. (1998) Myr 7 is a novel myosin IX-RhoGAP expressed in rat brain. *J. Cell Sci.* 111: 3597-3608.
- Cope M.J.T., Whisstock J., Rayment I, & Kendrick-Jones J (1996) Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure* 4: 969-987.
- Cornillon S, Pech E, Benghezal M, Ravanel K, Gaynor E, Letourneur F, Bruckert F, Cosson P. (2000) Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem.* 44:34287-92.
- Côté G.P., Albanesi J.P., Ueno T., Hammer J.A. III & Korn E.D. (1985) Purification from *Dictyostelium discoideum* of a low-molecular weight myosin that resembles myosin-I from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.* 260: 4543-4546.
- Coudrier E., Reggio H.& Louvard D. (1981) Immunolocalization of the 110,000 molecular weight cytoskeletal protein of intestinal microvilli. *J. Mol. Biol.* 152: 49-66.
- Dai J., Ting-Beall H.P., Hochmuth R.M., Sheetz M.P., Titus M.A. (1999) Myosin I contributes to the generation of resting cortical tension. *Biophys J.* 2:1168-76.
- De la Roche M.A. & Côté G.P. (2001) Regulation of *Dictyostelium* myosin I and II. *Biochim Biophys Acta.* 3:245-61. Review.
- De la Roche M.A. & Côté G.P. (1999) Characterization of a *Dictyostelium* homolog of yeast Abp1 that interacts with the N-terminus of myosin I heavy chain kinase. *Mol. Biol. Cell.* 10:165a. Abstract
- DeLozanne A., & Spudich J.A. (1987) Disruption of the *Dictyostelium discoideum* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 236: 1086-1091.
- Didry D., Carlier M.F., Pantaloni D. (1998) Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J Biol Chem.* 40:25602-11.
- Doberstein S.K., Baines I.C., Wlegans G., Korn E.D. & Pollard T.D. (1993) Inhibition of contractile vacuole function in vivo by antibodies against myosin-I. *Nature* 365: 841-843.
- Drubin D.G., Mulholland J., Zhu Z.M., Botstein D. (1990) Homology of a yeast actin-binding protein to signal transduction proteins and myosin-I. *Nature.* 6255:288-90.
- Drubin D.G. (1990) Actin and actin-binding proteins in yeast. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1:7-11. Review.
- Durbach A., Collins K., Matsudaira P., Louvard D. & Coudrier E. (1996) Brush border myosin-I truncated in the motor domain impairs the distribution and the function of endocytic compartments in an hepatoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7053-7058.
- Egelhoff T.T., Lee R.J. & Spudich J.A. (1993) *Dictyostelium* myosin heavy chain phosphorylation sites regulate myosin filament assembly and localization in vivo. *Cell* 75: 363-371.
- Egelhoff T.T., Naismith T.V. & Brozovich F.V. (1996) Myosin-based cortical tension in *Dictyostelium* resolved into heavy and light chain-regulated components. *J Muscle Res Cell Motil* 17: 269-274.

- Evangelista M., Klebl B.M., Tong A.H., Webb B.A., Leeuw T., Leberer E., Whiteway M., Thomas D.Y., Boone C. (2000) A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol.* 2:353-62.
- Evans L.L., Lee A.J., Bridgman P.C. & Mooseker M.S. (1998) Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J Cell Sci* 111: 2055-2066.
- Fath K. & Burgess D. R. (1993) Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically-oriented peripheral membrane protein. *J. Cell Biol.* 120: 117-127.
- Fedor-Chaikin M., Deschenes R.J., Broach J.R. (1990) SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast. *Cell.* 1990 2:329-40.
- Fenton R.G., Kung H.F., Longo D.L., Smith M.R. (1992) Regulation of intracellular actin polymerization by prenylated cellular proteins. *J Cell Biol.* 2:347-56.
- Frischknecht F., Cudmore S., Moreau V., Reckmann I., Rottger S., Way M. (1999) Tyrosine phosphorylation is required for actin-based motility of vaccinia but not *Listeria* or *Shigella*. *Curr Biol.* 2:89-92.
- Fukui Y., Lynch T.J., Brzeska H. & Korn E.D. (1989) Myosin I is located at the leading edges of locomoting *Dictyostelium* amoebae. *Nature* 341: 328-331.
- Geissler H., Ullmann R., Soldati T. (2000) The tail domain of myosin M catalyses nucleotide exchange on Rac1 GTPases and can induce actin-driven surface protrusions. *Traffic.* 5:399-410.
- Geli M.I. & Riezman H. (1996) Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* 272: 533-535.
- Geli M.I., Wesp A., & Riezman H. (1998) Distinct functions of calmodulin are required for the uptake step of receptor-mediated endocytosis in yeast - the type-I myosin myo5p is one of the calmodulin targets. *EMBO J* 17:635-647.
- Gertler F.B., Niebuhr K., Reinhard M., Wehland J., Soriano P. (1996) Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell.*2:227-39.
- Gibson F., Walsh J., Mburu P., Varela A., Brown K.A., Antonio M., Beisel K.W., Steel K.P. & Brown S.D. (1995) A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature* 374: 62-64.
- Gillespie P.G. & Corey D.P. (1997) Myosin and adaptation by hair-cells. *Neuron* 19: 955-958.
- Goode B.L., Rodal A.A., Barnes G., Drubin D.G. (2001) Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *J Cell Biol.* 3:627-34.
- Goodson H.V., Anderson B.L., Warrick H.M., Pon L.A., Spudich J.A. (1996) Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (MYO5): myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 6:1277-91.
- Goodson H.V. & Spudich J.A. (1995) Identification and molecular characterization of a yeast myosin I. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1:73-84.
- Goodson H. V. & Spudich J. A. (1993) Molecular evolution of the myosin family: relationships derived from comparisons of amino acid sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 659-663.

- Gottlieb T.A., Ivanov I.E., Adesnik M, Sabatini D.D. (1993) Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* 3:695-710.
- Gottwald U., Brokamp R., Karakesisoglou I., Schleicher M., Noegel A.A. (1996) Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in *Dictyostelium discoideum* and characterization of its interaction with actin. *Mol Biol Cell.* 2:261-72.
- Govindan B, Bowser R, & Novick P. (1995) The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J Cell Biol* 128: 1055-1068.
- Haarer B.K., Petzold A., Lillie S.H. & Brown S.S. (1994) Identification of MYO4, a second class V myosin gene in yeast. *J. Cell Sci.* 107: 1055-1064.
- Hacker U., Albrecht R., & Maniak M. (1997) Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 110: 105-112.
- Hammer J.A. III (1994) Regulation of *Dictyostelium* Myosin II by Phosphorylation: What is essential and what is important? *J. Cell Biol.* 127: 1779-1782.
- Hasson T. (1999) Molecular motors: sensing a function for myosin-VIIa. *Curr Biol.* Nov 18;9(22):R838-41. Review.
- Hasson T, Gillespie P.G., Garcia J.A., MacDonald R.B., Zhao Y.D., Yee A.G., Mooseker M.S., & Corey D.P. (1997) Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia *J Cell Biol* 137: 1287-1307.
- Hasson T. & Mooseker M.S. (1994) Porcine myosin-VI: characterization of a new mammalian unconventional myosin. *J. Cell Biol.* 127: 425-440.
- Hasson T., Heintzelman M.B., Santos-Sacchi J., Corey D.P. & Mooseker M.S. (1995) Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9815-9819.
- Haugwitz M, Noegel AA, Karakesisoglou J, Schleicher M. (1994) *Dictyostelium* amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell.* 2:303-14.
- Heintzelman M.B., Hasson T. & Mooseker M.S. (1994) Multiple unconventional myosin domains of the intestinal brush border cytoskeleton. *J Cell Sci* 107: 3535-3543.
- Hettmann C., Herm A., Geiter A., Frank B., Schwarz E., Soldati T., Soldati D. (2000) A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. *Mol Biol Cell.* 4:1385-400.
- Hicks J.L., Liu X. & Williams D.S. (1996) Role of the ninaC proteins in photoreceptor cell structure: Ultrastructure of ninaC deletion mutants and binding to actin filaments. *Cell Motil Cytosk* 35:367-379.
- Hicks J.L. & Miller K.G. (1996) The role of 95F myosin in the *Drosophila* nervous system. *Mol Biol Cell* 7: 38a.
- Higgs H.N., Pollard T.D. (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem.* 70:649-76. Review.

- Hill K.L., Catlett N.L. & Weisman L.S. (1996) Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 135: 1535-1549.
- Holt M.R., Koffer A. (2001) Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. *Trends Cell Biol.* 1:38-46. Review.
- Howard J. (1997) Molecular motors - structural adaptations to cellular functions. *Nature* 389:561-567.
- Huang J.D., Mermall V., Strobel MC., Russell LB., Mooseker M.S., Copeland N.G. & Jenkins N.A. (1998) Molecular-genetic dissection of mouse unconventional myosin-Va tail-region mutations. *Genetics* 148: 1963-1972.
- Jansen R.P., Dowzer C., Michaelis C., Galova M. & Nasmyth K. (1996) Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* 84: 687-697.
- Jung G, Remmert K, Wu X, Volosky J.M., Hammer J.A. 3rd. (2001) The *Dictyostelium* CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *J Cell Biol.* 7:1479-97.
- Jung G., Fukui Y., Martin B. & Hammer III J.A. (1993) Sequence, expression pattern, intracellular localization, and targeted disruption of the *Dictyostelium* myosin ID heavy chain isoform. *J Biol Chem* 268: 14981-14990.
- Jung G., Saxe III C.L., Kimmel A.R. & Hammer III J.A. (1989) *Dictyostelium discoideum* contains a gene encoding a myosin I heavy chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6186-6190.
- Jung G. & Hammer III J.A. (1994) The actin binding site in the tail domain of *Dictyostelium* myosin IC (myoc) resides within the glycine- and proline-rich sequence (tail homology region 2). *FEBS Lett* 342: 197-202.
- Jung G., Wu X.F. & Hammer III J.A. (1996) *Dictyostelium* mutants lacking multiple classic myosin I isoforms reveal combinations of shared and distinct functions. *J Cell Biol* 133: 305-323.
- Kaiser D.A., Goldschmidt-Clermont P.J., Levine B.A., Pollard T.D. (1989) Characterization of renatured profilin purified by urea elution from poly-L-proline agarose columns. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2:251-62.
- Kessels M.M., Engqvist-Goldstein A.E., Drubin D.G., Qualmann B. (2001) Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin. *J Cell Biol.* 2:351-66.
- Konzok A., Weber I., Simmeth E., Hacker U., Maniak M., Muller-Taubenberger A. (1999) DAip1, a *Dictyostelium* homologue of the yeast actin-interacting protein 1, is involved in endocytosis, cytokinesis, and motility. *J Cell Biol.* 2:453-64.
- Kurzawa-Goertz S.E., Perreault-Micale C.L., Trybus K.M., Szent-Gyorgyi A.G., Geeves M.A. (1998) Loop I can modulate ADP affinity, ATPase activity, and motility of different scallop myosins. Transient kinetic analysis of S1 isoforms. *Biochemistry.* 20:7517-25.
- Kuspa A., Maghakian D., Bergesch P. & Loomis, W.F. (1992) Physical mapping of genes to specific chromosomes in *Dictyostelium discoideum*. *Genomics* 13, 49-61.

- Kuznetsov S.A., Langford G.M. & Weiss D.M. (1992) Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* 356: 722-725.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- Leberer E., Thomas D.Y. & Whiteway M. (1997) Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Curr. Op. Gen. Dev.* 7: 59-66.
- Lechler T., Shevchenko A., Li R. (2000) Direct involvement of yeast type I myosins in Cdc42-dependent actin polymerization. *J Cell Biol.* 2:363-73.
- Lee S.F. & Côté G.P. (1995) Purification and characterization of a *Dictyostelium* protein kinase required for actin activation of the Mg²⁺ ATPase activity of *Dictyostelium* myosin ID. *J Biol Chem* 270: 11776-11782.
- Lee S.F. & Côté G.P. (1993) Isolation and characterization of three *Dictyostelium* myosin-I isozymes. *J. Biol. Chem.* 268: 20923-20929.
- Lee S.F., Egelhoff T.T., Mahasneh A. & Côté G.P. (1996) Cloning and characterization of a *Dictyostelium* myosin I heavy chain kinase activated by Cdc42 and Rac. *J Biol Chem* 271: 27044-27048.
- Lee S.S., Karakesisoglou I., Noegel A.A., Rieger D., Schleicher M. (2000) Dissection of functional domains by expression of point-mutated profilins in *Dictyostelium* mutants. *Eur J Cell Biol.* 2:92-103.
- Lenhard J. M., Mayorga L. & Stahl, P.D. (1992) Characterization of endosome-endosome fusion in a cell-free system using *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 267:1896-1903.
- Lila T. & Drubin D.G. (1997) Evidence for physical and functional interactions among two *Saccharomyces cerevisiae* SH3 domain proteins, an adenylyl cyclase-associated protein and the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 2:367-85.
- Lindberg U, Schutt CE, Hellsten E, Tjader AC, Hult T. (1988) The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochim Biophys Acta.* 1988 Dec 3:391-400.
- Liu X.Z., Ondek B. & Williams D.S. (1998a) Mutant myosin VIIa causes defective melanosome distribution in the rpe of shaker-1 mice. *Nature Genetics* 19: 117-118.
- Liu X.Z., Hope C., Walsh J., Newton V., Ke X.M., Liang C.Y., Xu L.R., Zhou J.M., Trump D., Steel K.P., Bunday S. & Brown S.D.M. (1998b) Mutations in the myosin VIIa gene cause a wide phenotypic spectrum, including atypical usher-syndrome. *Am J of Hum Gen* 63: 909-912.
- Liu X.Z., Newton V.E., Steel K.P., Brown S.D. (1997) Identification of a new mutation of the myosin VII head region in Usher syndrome type 1. *Hum Mutat.* 10(2):168-70.
- Liu X.Z., Walsh J., Tamagawa Y., Kitamura K., Nishizawa M., Steel K.P. & Brown S.D.M. (1997) Autosomal-dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIa gene. *Nature Genetics* 17: 268-269.
- Loomis W.F. (1987) Genetic tools for *Dictyostelium discoideum*. *Meths Cell Biol.* 28: 31-66.
- Loomis W.F. & Kuspa, A (1997) The genome of *D. discoideum* in *Dictyostelium* - A model system for cell and developmental biology, pp. 15-30 (Maeda, M., Inouye, K. and Takeuchi, I., Eds.), Universal Academy Press 1997, Tokyo, Japan.
- Luby-Phelps K. (1994) Physical properties of cytoplasm. *Current Op Cell Biol* 6: 3-9.

- Lynch T.J., Albanesi J.P., Korn E.D., Robinson E.A., Bowers B., Fujisaki H. (1986) ATPase activities and actin-binding properties of subfragments of *Acanthamoeba* myosin IA. *J Biol Chem.* 36:17156-62.
- Maeda M. in: *Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology*, pp. 193-203 (Maeda, M., Inouye, K. and Takeuchi, I., Eds.), Universal Academy Press 1997, Tokyo, Japan.
- Machesky L.M., Mullins R.D., Higgs H.N., Kaiser D.A., Blanchoin L., May R.C., Hall M.E., 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.* 7:3739-44.
- Machesky L.M., Atkinson S.J., Ampe C., Vandekerckhove J., Pollard T.D. (1994) Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol.* 1:107-15.
- Machesky L.M., Goldschmidt-Clermont P.J., Pollard T.D. (1990) The affinities of human platelet and *Acanthamoeba* profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C. *Cell Regul.* Nov;1(12):937-50
- Maniak M., Rauchenberger R., Albrecht R., Murphy J., Gerisch G. (1995) Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* 83: 915-924.
- Manstein D.J. Schuster H.P., Morandini P. & Hunt D.M. (1995) Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene.* 162: 129-134.
- Manstein D.J. & Hunt D.M. (1995) Overexpression of myosin motor domains in *Dictyostelium*: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein. *J Muscle Res Cell Motil.* 3:325-32.
- Marin F.T., Rothman F.G. (1980) Regulation of development in *Dictyostelium discoideum*. IV. Effects of ions on the rate of differentiation and cellular response to cyclic AMP. *J Cell Biol.* 3 Pt 1:823-7.
- May R.C. (2001) The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton. *Cell Mol Life Sci.* 11:1607-26. Review.
- May R.C., Caron E., Hall A., Machesky L.M. (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat Cell Biol.* 4:246-8.
- McGoldrick C.A., Gruver C. & May GS (1995) MyoA of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J Cell Biol* 128: 577-587.
- Mercer J.A., Seperack P.K., Strobel M.C., Copeland N.G. & Jenkins N.A. (1991) Novel myosin heavy chain encoded by murine *dilute* coat colour locus. *Nature* 349: 709-713.
- Mermall V., McNally J.G. & Miller K.G. (1994) Transport of cytoplasmic particles catalysed by an unconventional myosin in living *Drosophila* embryos. *Nature* 369: 560-562.
- Mermall V. & Miller K.G. (1995) The 95F unconventional myosin is required for proper organization of the *Drosophila* syncytial blastoderm. *J Cell Biol* 129: 1575-1588.
- Mermall V., Post P.L. & Mooseker M.S. (1998) Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal-transduction. *Science* 279: 527-533.

- Merrifield C.J., Moss S.E., Ballestrem C., Imhof B.A., Giese G., Wunderlich I., Almers W. (1999) Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol.* 1:72-4.
- Mitchison T.J. & Cramer L.P. (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84: 371-379.
- Miyata H., Bowers B. & Korn E.D. (1989) Plasma membrane association of *Acanthamoeba* myosin I. *J Cell Biol* 109: 1519-1528.
- Mooseker M.S. (1993) A multitude of myosins. *Curr. Biol.* 3: 245-248.
- Morgan N.S., Skovronsky D.M., Artavanis-Tsakonas S., Mooseker M.S. (1994) The molecular cloning and characterization of *Drosophila melanogaster* myosin-IA and myosin-IB. *J Mol Biol.* 3:347-56.
- Morita Y.S., Jung G., Hammer III J.A. & Fukui Y. (1996) Localization of *Dictyostelium* myoB and myoD to filopodia and cell-cell contact sites using isoform-specific antibodies. *Eur J Cell Biol* 71: 371-379.
- Müller R.T., Honnert U., Reinhard J. & Bähler M. (1997) The rat myosin myr 5 is a GTPase-activating protein for rho in vivo - essential role of arginine 1695. *Mol Biol Cell* 8: 2039-2053.
- Mullins R.D., Heuser J.A., 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.* 11:6181-6.
- Mullis K., et al & Erlich H. (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273.
- Murphy C.T. & Spudich J.A. (1999) The sequence of the myosin 50-20K loop affects myosin's affinity for actin throughout the actin-myosin ATPase cycle and its maximum ATPase activity. *Biochemistry* 38: 3785-3792.
- Murphy C.T., Spudich J.A. (1998) *Dictyostelium* myosin 25-50K loop substitutions specifically affect ADP release rates. *Biochemistry.* 19:6738-44.
- Miyata H., Bowers B., Korn E.D. (1989) Plasma membrane association of *Acanthamoeba* myosin I. *J Cell Biol.* 4 Pt 1:1519-28.
- Nascimento A.A.C., Cheney R.E., Tauhata S.B.F., Larson R.E. & Mooseker M.S. (1996) Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J Biol Chem* 271: 17561-17569.
- Neuhaus E.M., Horstmann H., Almers W., Maniak M. & Soldati T. (1998) Ethane-freezing/methanol-fixation of cell monolayers: a procedure for improved preservation of structure and antigenicity for light and electron microscopies. *J. Struct. Biol.* 121: 326-342.
- Neujahr R., Albrecht R., Kohler J., Matzner M., Schwartz J.M., Westphal M. & Gerisch G. (1998) Microtubule-mediated centrosome motility and the positioning of cleavage furrows in multinucleate myosin-II null-cells. *J Cell Sci* 111: 1227-1240.
- Neujahr R., Heizer C. & Gerisch G. (1997) Myosin II-independent processes in mitotic cells of *Dictyostelium discoideum*: Redistribution of the nuclei, rearrangement of the actin system and formation of the cleavage furrow. *J Cell Sci* 110: 123-137.
- Newell P.C. (1995) Signal transduction and motility of *Dictyostelium*. *Bioscience Rep.* 15: 445-462.

- Nishida Y., Shima F., Sen H., Tanaka Y., Yanagihara C., Yamawaki-Kataoka Y., Kariya K., Kataoka T. (1998) Coiled-coil interaction of N-terminal 36 residues of cyclase-associated protein with adenylyl cyclase is sufficient for its function in *Saccharomyces cerevisiae* ras pathway. *J Biol Chem.* 43:28019-24.
- Noegel A.A., Rivero F., Albrecht R., Janssen K.P., Kohler J., Parent C.A., Schleicher M. (1999) Assessing the role of the ASP56/CAP homologue of *Dictyostelium discoideum* and the requirements for subcellular localization. *J Cell Sci.* Pt 19:3195-203.
- Noegel A.A. & Luna J.E. (1995) The *Dictyostelium* cytoskeleton. *Experientia.* 12:1135-43. Review.
- Novak K.D. & Titus M.A. (1997) Myosin-I overexpression impairs cell migration. *J Cell Biol* 136:633-647.
- Novak K.D., Peterson M.D., Reedy M.C. & Titus M.A. (1995) *Dictyostelium* myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. *J Cell Biol* 131: 1205-1221.
- Novak K.D. & Titus M.A. (1998) The myosin-I SH3 domain and TEDS rule phosphorylation site are required for in vivo function. *Mol Biol Cell* 9: 75-88.
- Ostap E.M., Pollard T.D. (1996) Overlapping functions of myosin-I isoforms? *J Cell Biol.* 2:221-4. Review
- Ostap E.M., Pollard T.D. (1996) Biochemical kinetic characterization of the *Acanthamoeba* myosin-I ATPase. *J Cell Biol.* 6:1053-60.
- Pantaloni D, Carlier MF. (1993) How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell.* 5:1007-14.
- Peterson M.D., Novak K.D., Reedy M.C., Ruman J.I. & Titus M.A. (1995) Molecular genetic analysis of myoC, a *Dictyostelium* myosin I. *J. Cell. Sci.* 108: 1093-1103.
- Pollard, T.D. & Cooper, J. A. (1986) Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 55,987-1035.
- Pollard, T.D., Doberstein S.K. & Zot, H.G. (1991) Myosins-I. *Annu Rev Physiol* 53: 653-681.
- Post, P.L., Bokoch, G.M. & Mooseker, M.S. (1998) Human myosin -Ixb is a mechanically active motor and a GAP for rho. *J Cell Sci* 111: 941-950.
- Qualmann B, Kessels M.M., Kelly R.B. (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 5:F111-6. Review.
- Rayment I., et al., & Milligan R.A. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment 1: a molecular motor. *Science* 261: 50-58.
- Rayment I., et al., & Milligan R.A. (1993) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261: 58-65.
- Reinhard J., Scheel A.A., Diekmann D., Hall A., Ruppert C. & Bähler M. (1995) A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases. *EMBO J* 14: 697-704.
- Rezabek B.L., Rodriguez-Paris J.M., Cardelli J.A., Chia CP. (1997) Phagosomal proteins of *Dictyostelium discoideum*. *J Eukaryot Microbiol.* 4:284-92.
- Ridley A.J., Hall A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399.

- Rivero F., Furukawa R., Noegel A.A., Fechheimer M. (1996) Dictyostelium discoideum cells lacking the 34,000-dalton actin-binding protein can grow, locomote, and develop, but exhibit defects in regulation of cell structure and movement: a case of partial redundancy. *J Cell Biol.* 4:965-80
- Rodionov V.I., Hope A.J., Svitkina T.M. & Borisy G.G. (1998) Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores. *Current Biol* 8: 165-168.
- Rogers S.L. & Gelfand V.I. (1998) Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Curr. Biol* 8: 161-164.
- Rohatgi R., Ma L., Miki H., Lopez M., Kirchhausen T., Takenawa T., Kirschner M.W. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell.* 2:221-31.
- Rosenfeld S.S. & Renner B. (1994) The GPQ-rich segment of *Dictyostelium* myosin IB contains an actin binding site. *Biochem* 33: 2322-2328.
- Rozelle A.L., Machesky L.M., Yamamoto M., Driessens M.H., Insall R.H., Roth M.G., Luby-Phelps K., Marriott G., Hall A., Yin H.L. (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol.* 6:311-20.
- Ruppert C., Godel J., Muller R.T., Kroschewski R., Reinhard J., Bahler M. (1995) Localization of the rat myosin I molecules myr 1 and myr 2 and in vivo targeting of their tail domains. *J Cell Sci.* 1995 Dec;108 (Pt 12):3775-86.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schwarz E.C., Neuhaus E.M., Kistler C., Henkel A.W., Soldati T. (2000) Dictyostelium myosin IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis. *J Cell Sci.* 2000 Feb;113 (Pt 4):621-33.
- Schwarz E.C., Geissler H. & Soldati T. (1999) A potentially exhaustive screening strategy reveals two novel divergent myosins in *Dictyostelium*. *Cell Biochem Biophys*, in press.
- Seidman C.E., (1991) Mutations in cardiac myosin heavy chain genes cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Biol Med*, 8:159-166
- Sellers J.R. & Goodson H.V. (1995) Motor proteins 2: myosin. *Protein Profile* 2: 1323-1423.
- Senda S., Lee S.F., Cote G.P., Titus M.A. (2001) Recruitment of a specific amoeboid myosin I isoform to the plasma membrane in chemotactic Dictyostelium cells. *J Biol Chem.* 4:2898-904.
- Senda S., Titus M.A. (2000) A potential mechanism for regulating myosin I binding to membranes in vivo. *FEBS Lett.* 2:125-8.
- Shurety W., Stewart N.L., Stow J.L. (1998) Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly-promoting drug Jasplakinolide. *Mol Biol Cell.* 4:957-75.
- Smith P.K., et al Klenk D.C. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analyt. Biochem.* 150: 76-85.

- Sobe T., Taggart R.T., Vasquez D.A., Ahituv N. & Avraham K.B. (1997) Myosin-VI (myo6) - a candidate gene for non-syndromic sensorineural deafness. *Am J Hum Gen* 61: 2299-2299.
- Soisson S.M., Nimnual A.S., Uy M., Bar-Sagi D. & Kuriyan, J. (1998) Crystal structure of the Dbl and Pleckstrin homology domains from the human son of sevenless protein. *Cell* 95: 259-268.
- Solc C.F., Derfler R.H., Duyk G.M. & Corey D.R. (1994) Molecular cloning of myosins from the bullfrog saccular macula: a candidate for the hair cell adaptation motor. *Aud Neurosci* 1: 63-75.
- Soldati T., Schwarz E.C. & Geissler H. (1999) Unconventional myosins at the crossroad of signal transduction and cytoskeleton remodeling. *Protoplasma*, *in press*.
- Sparks A.B., Rider J.E., Hoffman N.G., Fowlkes D.M., Quillam L.A., Kay B.K. (1996) Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4:1540-4.
- Spudich J.A. (1994) How molecular motors work. *Nature* 372: 515-518.
- Spudich J.A. & Watt S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. Biochemical study I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246: 4866-4871.
- Steck T.L., Chiaraviglio L., Meredith S. (1997) Osmotic homeostasis in *Dictyostelium discoideum*: excretion of amino acids and ingested solutes. *J Eukaryot Microbiol.* 5:503-10.
- Stöffler H.-E., Hönnert U., Bauer C.A., Hofer D., Schwarz H., Müller R.T., Drenckhahn D. & Bähler M. (1998) Targeting of the myosin-I myr3 to intercellular adherens type junctions induced by dominant active Cdc42 in HeLa cells. *J Cell Sci* 111: 2779-2788.
- Stöffler H.E. & Bähler M. (1998) The ATPase activity of myr3, a rat myosin-I, is allosterically inhibited by its own tail domain and by Ca²⁺ binding to its light-chain calmodulin. *J Biol Chem* 273:14605-14611
- Stöffler H.E., Ruppert C., Reinhard J. & Bähler M. (1995) A novel mammalian myosin I from rat with an SH3 domain localizes to Con A-inducible, F-actin-rich structures at cell-cell contacts. *J Cell Biol* 129: 819-830.
- Su XZ, Wu Y, Sifri CD, Wellems TE. (1996) Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:1574-5.
- Suetsugu S., Miki H., Takenawa T. (1998) The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *EMBO J.* 22:6516-26.
- Takagishi Y., Oda S-I., Hayasaka S., Dekker-Ohno K., Shikata T., Inouye M. & Yamamura H. (1996) The dilute-lethal (d^l) gene attacks a Ca²⁺ store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. *Neurosci Lett* 215: 169-172.
- Tanaka M, Shibata H. (1985) Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur J Biochem.* 2:291-7.
- Temesvari L.A., Bush J.M., Peterson M.D., Novak K.D., Titus M.A. & Cardelli J.A. (1996) Examination of the endosomal and lysosomal pathways in *Dictyostelium discoideum* myosin I mutants. *J Cell Sci* 109: 663-673.
- Titus M.A. (1999) A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis. *Curr Biol.* 22:1297-1303.

- Titus M.A. (1997) An unconventional myosin required for phagocytosis. *Mol Biol Cell* 8: 352a.
- Titus M.A. (1993) Myosins. *Curr. Op. Cell. Biol.* 5: 77-81.
- Titus M.A., Wessels D., Spudich J.A. & Soll D. (1993) The unconventional myosin encoded by myoA gene plays a role in *Dictyostelium* motility. *Mol. Cell. Biol.* 12: 3540-3547.
- Titus M.A., Kuspa A. & Loomis W.F. (1994) Discovery of myosin genes by physical mapping in *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9446-9450.
- Trifaro J.M., Vitale M.L. (1993) Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 11:466-72. Review.
- Uyeda T.Q.P., Ruppel K.M. & Spudich J.A. (1994) Enzymatic activities correlate with chimaeric substitutions in at the actin-binding face of myosins. The unconventional myosin encoded by myoA gene plays a role in *Dictyostelium* motility. *Nature* 368: 567-569.
- Uyeda T.Q.P., Abramson P.D. & Spudich J.A. (1996) The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4459-4464.
- Uyeda T.Q.P. & Titus M.A. 1997 The myosins of *Dictyostelium* In *Dictyostelium-A model system for cell and developmental biology* Y Maeda, Inouye, K , and Takeuchi, I , editor Universal Academy Press, Inc , Tokyo, Japan pp 43-64.
- Vogel G., Thilo L., Schwarz H., Steinhart R. (1980) Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *J Cell Biol.* 2:456-65.
- Wagner M.C., Barylko B. & Albanesi J.P. (1992) Tissue distribution and subcellular localization of mammalian Myosin I. *J. Cell Biol.* 119: 163-170.
- Wang A.H., Liang Y., Fridell R.A., Probst F.J., Wilcox E.R., Touchman J.W., Morton C.C., Morell R.J., Nobentrauth K., Camper S.A. & Friedman T.B. (1998) Association of unconventional myosin myo15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* 280: 1447-1451.
- Wang Z.-Y., Sakai J., Matsudaira P.T., Baines I.C., Sellers J.R., Hammer III J.A. & Korn E.D. (1997) The amino acid sequence of the light chain of *Acanthamoeba* myosin IC. *J Muscle Res Cell Motil* 18: 395-398.
- Watanabe N., Madaule P., Reid T., Ishizaki T., Watanabe G., Kakizuka A., Saito Y., Nakao K., Jockusch B.M., Narumiya S. (1997) p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* 11:3044-56.
- Wei Q., Wu X.F., & Hammer III J.A. (1997) The predominant defect in dilute melanocytes is in melanosome distribution and not cell-shape, supporting a role for myosin- v in melanosome transport. *J Muscle Res Cell Motil* 18: 517-527.
- Weil D., Blanchard S., Kaplan J., Guilford P., Gibson F., Walsh J., Mburu P., Varela A., Levilliers J., Weston M.D. & et al (1995) Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 374: 60-61.
- Weil D., Levy G., Sahly I., Levi-Acobas F., Blanchard S., El-Amraoui A., Crozet F., Philippe H., Abitbol M. & Petit C. (1996) Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B syndrome: a predicted membrane-

- associated motor protein expressed in developing sensory epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3232-3237.
- Weiss A. & Leinwand L.A. (1996) The mammalian myosin heavy chain gene family. *Ann Rev Cell Dev Biol* 12:417-439.
- Weston M.D., Kelley P.M., Overbeck L.D., Wagenaar M., Orten D.J., Hasson T., Chen Z.Y., Corey D., Mooseker M., Sumegi J., Cremers C., Moller C., Jacobson S.G., Gorin M.B., & Kimberling W.J. (1996) Myosin VIIA mutation screening in 189 Usher syndrome type 1 patients. *Am J Hum Gen* 59: 1074-1083.
- Wienke D.C., Knetsch M.L., Neuhaus E.M., Reedy M.C., Manstein D.J. (1999) Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* 1:225-43.
- Wirth J.A., Jensen K.A., Post P.L., Bement W.M. & Mooseker MS (1996) Human myosin-IXb, an unconventional myosin with a chimerin-like rho/rac GTPase-activating protein domain in its tail. *J Cell Sci* 109: 653-661.
- Witke W., Podtelejnikov A.V., di Nardo A., Sutherland J.A., Gurniak C.B., Dotti C., Mann M., (1998) In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J* 4:967-76.
- Witke W., Schleicher M. & Noegel A.A. (1992) Redundancy in the microfilament system - abnormal development of *Dictyostelium* cells lacking two F-actin cross-linking proteins. *Cell* 68: 53-62.
- Wu C., Lee S.F., Furmaniak-Kazmierczak E., Côté G.P., Thomas D.Y. & Leberer E. (1996) Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family. *J Biol Chem* 271: 31787-31790.
- Wu X.F., Kocher B., Wei Q. & Hammer III J.A. (1998) Myosin Va associates with microtubule-rich domains in both interphase and dividing cells. *Cell Motil Cytosk* 40: 286-303.
- Xu P., Mitchelhill K.I., Kobe B., Kemp B.E. & Zot H.G. (1997) The myosin-I-binding protein Acan125 binds the SH3 domain and belongs to the superfamily of leucine-rich repeat proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3685-3690.
- Yanagihara C., Shinkai M., Kariya K., Yamawaki-Kataoka Y., Hu C.D., Masuda T., Kataoka T. (1997) Association of elongation factor 1 alpha and ribosomal protein L3 with the proline-rich region of yeast adenylyl cyclase-associated protein CAP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2:503-7.
- Yazu M., Adachi H. & Sutoh K. (1999) Novel *Dictyostelium* unconventional Myosin MyoK is a class I Myosin with the longest Loop-1 insert and the shortest tail. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 255: 711-716.
- Yumura S. & Uyeda T.Q.P. (1997a) Myosin II can be localized to the cleavage furrow and to the posterior region of *Dictyostelium* amoebae without control by phosphorylation of myosin heavy and light chains. *Cell Motil Cytoskel* 36: 313-322.
- Yumura S. & Uyeda T.Q.P. (1997b) Transport of myosin II to the equatorial region without its own motor activity in mitotic *Dictyostelium* cells. *Mol Biol Cell* 8: 2089-2099.
- Zhang J., Shehabeldin A., da Cruz L.A., Butler J., Somani A.K., Mc Gavin M., Kozieradzki I., dos Santos A.O., Nagy A., Grinstein S., Penninger J.M., Siminovitch K.A. (1999) Antigen receptor-induced activation and

- cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *J Exp Med.* 9:1329-42.
- Zhao Z.S., Leung T., Manser E. & Lim L. (1995) Pheromone signalling in *Saccharomyces cerevisiae* requires the small GTP-binding protein Cdc42 and its activator Cdc24. *Mol. Cell Biol.* 15: 5246-5257.
- Zheng Y., Bender A. & Cerione R.A. (1995) Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270: 626-630.
- Zheng Y., Fischer D.J., Santos M.F., Tigyo G., Pasteris N.G., Gorski J.L. & Xy Y. (1996) The Faciogenital Dysplasia Gene Product FDG1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 271: 33169-33172.
- Zheng Y., Hart M.J. & Cerione R.A. (1995) Guanine nucleotide exchange catalyzed by *dbl* oncogene product. *Meths Enzymol.* 256: 77-84.
- Zheng Y., Zangrilli D., Cerionell A. & Eva A. (1996) The Pleckstrin Homology Domain Mediates Transformation by Oncogenic Intracellular Targeting. *J Biol. Chem.* 271: 19017-19020.
- Zhu Q. & Clarke M. (1992) Association of Calmodulin and an unconventional myosin with the contractile vacuole complex of *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol.* 118: 347-358.

7. Anhang

7.1 Oligodesoxyribonucleotide (Primer)

Die aufgeführten Primer wurden im Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in der Abteilung Zellphysiologie hergestellt. DNA-Sequenzierungen wurden im selben Institut in der Abteilung Molekulare Neurobiologie durchgeführt.

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in 5`- 3` Richtung aufgeführt. **Forw** steht für einen Primer in sense- und **rev** für einen Primer in anti-sense-Richtung.

Klonierung des GPR-Loops aus pDXA-MyoK (Fragment 6406-6860).

Loop.forw	-TATCCCGGGGATCCTTACAATATGTTACATCAGTATCAC-
Loop.rev	-TATCCCGGGCTCGAGTTATTTAATATGTTCAACATCAACTG-

Klonierung des Carboxyterminus von MyoK (CLIQ Motiv) aus pDXA-MyoK (Fragment 8475-8643).

K-KIF-Bam.forw	-ATATGGATCCGGAAAAACAAAAATCTTTGTAAAAAATCCAG-
K-CLIQ-Xho.rev	-ATATCTCGAGTTATTGAATAAGACATTTTGTTCATTGAGTG-

Klonierung von MyoK mit CLIQ Motiv aus pDXA-MyoK (Fragment 6066-8643).

MyoK-expr.forw	-TGAGGTACCTTTCGTTATTTTCATCAGGTG-
K-CLIQ-Xho.rev	siehe obige Sequenz

Klonierung der prolinreichen Domäne von WASp aus genomischer DNA von *D. discoideum*.

PRD-WASp.forw	-TATCCCGGGGATCCGGTGAACAAATGGTTGG-
PRD-WASp.rev	-TATCCCGGGCTCGAGTTAAAGATCATTCTTCCAC-

7.2 Die cDNA-Sequenz von MyoK

Die codierende Sequenz von MyoK beträgt 2577 Basenpaare bis zum Stoppcodon.

```

ATGTTTCGTTTATTTTCATCAGGTGTTGATGATTTAGTTTTAGTTTTCAAATCCAAGTAATGGTGAGGTAA 70
CAAGTCAAATTGGTGCTAGATTTGATAGAGAATTAATTTATACAAATATTGGTGAAGTATTAATTTGCTGT 140
TAACCCTTATAAAGCATTACCAATTACTGGTCCTGAATTTATTAATTTGTATCAAAATGCATCAGGATCA 210
GATGCTTCACCACATATTTATGCATTAGCAGAAAGAGCATATAGAAGAATGGTTGATGAAAAATGAATCAC 280
AATGTGTTATTATTTTCAGGTGAATCAGGTGCTGGTAAAACAGTCTCTGCAAAATTAATTTTACAATATGT 350
TACATCAGTATCACCAAATAATAGTAGCGGTGGTGGCATTGGTGGTAGCGGTGGTGGAAATGGCGGAATT 420
CCACAATATGATGGTGGTAGTGATGACCGTCCTTCACCACCAATGGGTAGAGGTATGGGTATGCCAGGTA 490
TGGTTGGTAGAGGTGGTTTGCCAACTAGAGGGGGTGGTCCACCATCAAGAGGTGGAGGTCCACCACCAAC 560
TAGAGGTAGAGGTGGTCCACCACCACCAATTCCTCAAAATAGAGGAGCACCACCACCAGTTTCAAATGGA 630
GGAGCACCACCACAGTTGCAAGAGGTCCAGTTGCACCACCACCAACCAGAGGAGCACCACCAACAAGAG 700
GGGGAGGTCCAGCAAATAGAGGTGGTAGAGGTGGTGGTCCACCACCAGTTTCAACATCAAGAGGTGGAGG 770
TGGTTATGGTGGTAGTAGTAAACAGTTGATGTTGAACATATTTAAAAGGTAATTTTATAGATTCAAATCCA 840
TTAATGGAAGCAATTGGTAATGCTAAAACAGTTAGAAATGATAATTCATCACGTTTTTGGTAAATATTTAG 910
AGATTCAATTCGATGATAATAATGCACCAGTTGGTGGATTAATTTCAACCTTTCTTTTAGAGAAAAACAAG 980
AGTAACATTCCAACAAAAGAATGAAAGAAATTTCCATATTTTTCTATCAAATGTTGGGTGGATTAGATCAA 1050
ACCACTAAATCTGAATGGGGATTAAGTCAAGCCACCGATTTCTATTATCTTGCCCAAAGTAAATGTACAA 1120
CCGTTGAGGATGTTGATGATGGTAAAGATTTTCATGAAGTTAAAGCAGCAATGGAGACCGTTGGAATTTTC 1190
AAGAGATGAACAAACTGAAATCTTTAGAATTTCTTGCTGCCATTTTACATGTTGGTAATATTCGTTTCCAA 1260
GGTGAAGCACCAGCTTCGGTCATTGATGAAACTCCATTACAATGGGCTGCTTCATTGCTGGGTTGTGATC 1330
CAACATTCCTTTGTCAATCATTGAATCATAGACAAATTCAAAGTGGTAGTGCAAGACACACTCAATATCA 1400
AGTACCACAAAATCCTGATCAATCCGCTGGTCTAAGAGATGCATTGGCAAAAACCTATATGAACGTATT 1470
TTCGATTTTCATTGTAGCTCGTGTTAACAAGGCAATGTCTTTTCAGTGGAAATTGCAAGGTCATTTGGTGT 1540
TGGATATCTATGGTTTTCGAAGTATTTGAACGTAAGTCTTTTGAACAATTTTGTATCAATTTATGTCAATGA 1610
ACGTCCTTCAACAGATCTTTATTGATCTTACAGTTTCGTGGTGAACAACGTGAGTATCACGAAGAGGGTATG 1680
AAATGGAAGGATATCAGTTTTCTTTGATAATAAAATTTGTAGTAGATCTAATCGATGGAAATAAACCACCTG 1750
GTATCATGAGAGTTTTAGATGACGTTTGTAAAACGGTTCATGCTGTGATAGTGCCGCTGCAGATATTAA 1820
ATTCATGGAGAAATTAATTCCTCCATTCAAAGTCATCCCCATTTAGTCATTTCAAATACTGGTTCCCTCT 1890
GCTGATGAATTCACAATCAAACATTATGCCGGTGAAGTATCTTATTCAATAGAAGAGTTTTGTTTCAAAA 1960
ATAATGATAACCTTTGCGCTTCAATCGTTGGTTGTCTTCAAATTCACCTATCAATTCATCGTATCTTT 2030
GTTCCCTGAAAATATTCAAGATAATAACAAGCTCCTACCACTTCAAGTTTCAAATTCGTCATCTTCA 2100
AGTTATTTAGTAACTCGTTTTATCCGCTTGTACTCCACATTACATTAGATGTATTAAACCAAAATGATAAAA 2170
AACAACCAATGAATTTTCGTCTCGTCAAGAGTTGAACATCAAGTTAAATATTTAGGTATTTTAGAAAAATAT 2240
TAAAGTTAAAAGATCTGGTTACGCTTATAGACAATTAAGATATCTTTTTAAATAGATTTGGTAAAAAT 2310
ATGGATGTTCAACCAAGAAATGTTCAAGAATTTGTTGAATATATAACTAGAACTCATAAAGATATTAATG 2380
CTGATGAATTTGAAGAAGGAAAAACAAAATCTTTGTAAAAAATCCAGAAACAATCTTTGTAATGGAAGA 2450
TTTATTAATGCAAAGATTGATCCAATTTGGTTACAAGAATAGAGTACAAGCATACAAAAGAAAAATGAAAAA 2520
TTGGCTCAAATGAAACAAGGTAAACACTCAATGAAACAAAATGTCTTATTCAAATAA 2577

```

7.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
Bis-AA	N, N'-Methylen-Bisacrylamid
BSA	Rinder-Serumalbumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
c	Zellen (cells)
°C	Grad Celsius
dNTP	deoxy-Nukleosid 5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EFMF	Ethane-Freezing/Methanol-Fixation (Cryofixierung)
EtBr	Ethidiumbromid
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatographie</i>
g	Gramm / Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HEPES	4-(Hydroxyethyl)-1-piperazin-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	<i>Liquid Broth</i> Medium
M, mM, μ M	molar (mol/l), millimolar, mikromolar
mAk	Monoklonaler Antikörper
min	Minuten
μ g, μ l	Mikrogramm, Mikroliter
mg, ml	Milligramm, Milliliter
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (isotonischer Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PRD	Prolinreiche Domäne (zB. Aus WASp)
PLP	Poly-L-Prolin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
primer	Oligonukleotid als Starter der Amplifikation von DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SH3	Src Homologie 3
TAE	Tris-acetat/EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	Triethylmethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (aktive Enzymeinheit)
ÜNK	Übernachtkultur
UPM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WASp	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteine
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid
2 D	2 Dimensionen (in der Gelelektrophorese)

Es werden die allgemeinen SI-Einheiten, die chemischen Elementsymbole sowie der Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren verwendet.

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde von Juli 1998 bis April 2002 am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in der Abteilung Molekulare Zellforschung durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K. Holmes und Frau Prof. Dr. I. Haas danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Erst- und Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Thierry Soldati für die engagierte Betreuung meiner Arbeit und für die weit über das übliche Maß hinausgehende Unterstützung, die er mir gewährt hat. Seine stete Bereitschaft zur Diskussion und seine Motivation in schwierigen Phasen während der Anfertigung dieser Arbeit, haben mir sehr geholfen.

Ganz besonders möchte ich Frau Dr. Schwarz für die Entdeckung von MyoK danken. Wäre die wissenschaftliche Welt ohne dieses Myosin nicht farbloser? Auch wurde meine Disziplin durch das tägliche gemeinsame Sammeln von Landliebemärkchen sehr gefördert.

Ich danke auch Frank Reichardt sehr für seine tatkräftige Unterstützung. Nur ihm ist es zu verdanken, daß ich meine Arbeit an diesem schönen Institut zu Ende führen konnte. Er erkannte gerade noch rechtzeitig die Gefahr einer Kakerlakeninvasion und veranlasste die Benachrichtigung eines Teams von Kammerjägern.

Desweiteren danke ich Daniel Gotthardt bzw. seiner Mutter dafür, daß nach den Feiertagen niemals Nahrungsmangel herrschte, so daß ich statt lästige Einkäufe erledigen zu müssen, die Zeit sinnvoll im Labor verbringen konnte.

Uschi Buhre danke ich für die hervorragende molekularbiologische Unterstützung.

Bei allen anderen Kollegen der ehemaligen Abteilung molekulare Zellforschung bedanke ich mich für die kollegiale und angenehme Zusammenarbeit während der letzten Jahre.

Meine Kollegen Ulrike Dürrwang, Sven Gensler und Johann Bollmann, mit denen ich einige Pausen auf der Terrasse verbracht habe, haben ebenfalls zu einer schönen Zeit im MPI beigetragen.

Michel Eberle ist besonders zu danken, daß er in hektischen Phasen die Betreuung von Hase und Elch übernahm, um mir den nötigen Freiraum zu schaffen.

Meinen Eltern möchte ich für ihre fortlaufende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit danken.

