



Charakterisierung des Kalzium- und Integrin- bindenden Proteins CIB1 als Regulator von Chronophin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Axel Hoffmann
aus Lingen (Ems)

Düsseldorf, Juli 2009

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Prof. Dr. Antje Gohla
Koreferent:	Prof. Dr. Peter Westhoff
Tag der mündlichen Prüfung:	03.11.09

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen	5
I Einleitung	8
I.1 Das Aktin-Zytoskelett und seine Regulation.....	9
I.2 Die ADF/Cofilin-Familie	14
I.3 Regulationsmechanismen der Cofilin-Aktivität.....	19
I.4 Die Cofilin-spezifische Phosphatase Chronophin.....	23
I.5 Das Kalzium- und Integrin-bindende Protein 1	25
II Fragestellung	28
III Material und Methoden	29
III.1 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme.....	29
III.2 Plasmide	29
III.3 Chemikalien und Enzyme	31
III.4 Antikörper und Antiseren	34
III.5 Oligonukleotide.....	35
III.6 Sonstige Materialien.....	36
III.7 Molekularbiologische Methoden	36
III.7.1 Plasmidisolierung in kleinem Maßstab (Minipräparation)	36
III.7.2 Plasmidisolierung in großem Maßstab (Maxipräparation)	37
III.7.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	37
III.7.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	37
III.7.5 Elution von DNA aus Agarosegelen	38
III.7.6 Ligation	38
III.7.7 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	38
III.7.8 Quantifizierung von DNA durch photometrische Messung	38
III.7.9 Isolierung von RNA aus murinem Gewebe.....	39

III.7.10	PCR-Techniken	39
III.7.11	Ortsgerichtete Punktmutagenese	41
III.7.12	Computergestützte Analyse von DNA-Sequenzen.....	41
III.7.13	Konstruktion von Expressionsplasmiden.....	41
III.8	Zellbiologische Methoden.....	44
III.8.1	Zellkultur und Transfektion	44
III.8.2	Immunfluoreszenz	44
III.8.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	45
III.8.4	Synchronisierung von GC-1 spg-Zellen.....	46
III.8.5	Herstellung von stabilen Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion.....	46
III.8.6	RNA-Interferenz.....	47
III.8.7	Das Two-Hybrid System.....	48
III.8.8	Kultivierung von Bakterienzellen.....	50
III.8.9	Bakterielle Expression von His ₆ -CIN, MBP-CIN und GST-CIB1	50
III.9	Proteinbiochemische Methoden	50
III.9.1	Herstellung von Zelllysaten für die Immunoblot-Analyse.....	50
III.9.2	Herstellung von Gewebelysaten für die Immunoblot-Analyse	51
III.9.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	51
III.9.4	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
III.9.5	Immunoblot-Analyse	52
III.9.6	Detektion von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen.....	53
III.9.7	Aufreinigung von rekombinantem His ₆ -CIN-Fusionsprotein	54
III.9.8	Aufreinigung von rekombinantem MBP-CIN-Fusionsprotein	54
III.9.9	Aufreinigung von rekombinantem GST-CIB1-Fusionsprotein.....	55
III.9.10	Anionenaustauschchromatographie	55
III.9.11	Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung eines CIB1-spezifischen polyklonalen Antikörperserums.....	56
III.9.12	Aufreinigung eines polyklonalen CIB1-Antikörpers aus Kaninchenantikörper- serum.....	56
III.9.13	<i>In vitro</i> -Bindungsassays.....	58
III.9.14	Bestimmung der CIN-Phosphataseaktivität <i>in vitro</i>	59
III.9.15	Densitometrische Auswertung von Immunoblot-Banden.....	60

IV	Ergebnisse	61
IV.1	Identifizierung und initiale Charakterisierung des CIN-Interaktors CIB1	61
IV.1.1	Nachweis der CIN/CIB1-Interaktion in einem <i>yeast two-hybrid assay</i>	61
IV.1.2	Synthese und Reinigung von rekombinantem His ₆ -CIN und GST-CIB1 aus <i>E. coli</i>	63
IV.1.3	Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen CIN- sowie eines polyklonalen CIB1-Antikörpers	65
IV.1.4	Nachweis der direkten CIN- und CIB1-Interaktion <i>in vitro</i> und in Zellen.....	67
IV.2	Die Regulation der CIN-Phosphataseaktivität <i>in vitro</i>.....	69
IV.2.1	Einfluss von freiem Kalzium auf die CIN/CIB1-Bindung	69
IV.2.2	Einfluss der Kalzium-induzierten CIN/CIB1-Interaktion auf die CIN- Phosphataseaktivität	70
IV.2.3	Analyse der Interaktion von Calmodulin, CIN und CIB1 <i>in vitro</i>	73
IV.2.4	Calmodulin ist für eine Aktivierung der Phosphatase CIN essentiell	75
IV.3	Analyse der subzellulären Lokalisation von CIN und CIB1 in Zellen	77
IV.3.1	Einfluss von Kalzium auf die subzelluläre Lokalisation von CIN und CIB1.....	77
IV.3.2	Einfluss von CIB1 auf die subzelluläre Lokalisation von CIN	80
IV.4	Die Rolle von CIN und CIB1 während der Zellteilung.....	81
IV.4.1	Analyse der subzellulären Lokalisation von CIN und CIB1 während der Mitose	81
IV.4.2	Einfluss von CIB1 auf die Cofilin-Aktivität von CIN während der Mitose	84
IV.4.3	Auswirkungen der Depletion von CIN und CIB1 auf die Zellteilung.....	87
IV.5	Die Kartierung von putativen CIN- und CIB1-Bindedomänen	89
IV.6	Identifizierung neuer CIN-Phosphataseinhibitoren	94
V	Diskussion	96
V.1	Initiale Charakterisierung der CIN/CIB1-Interaktion	96
V.2	Einfluss von Kalzium auf die CIN/CIB1-Bindung	100
V.3	Regulation der CIN-Phosphataseaktivität <i>in vitro</i>	102
V.4	Einfluss von Kalzium auf die subzelluläre Lokalisation von CIN und CIB1.....	109

V.5	Regulation der Cofilin-Phosphorylierung in mitotischen GC-1 spg-Zellen	111
V.6	Kartierung von CIN- und CIB1-Bindedomänen.....	114
VI	Zusammenfassung	116
VII	Summary	118
VIII	Literaturverzeichnis.....	120
IX	Lebenslauf.....	137
X	Danksagung	139
XI	Erklärung	140

Abkürzungen

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten nach dem SI-System (Cordes, 1972) sind nicht aufgeführt.

A	Ampere
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i> , Variante des GFP
CIB1	Kalzium- und Integrin-bindendes Protein 1
CIN	Chronophin
d	Schichtdicke
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> , NaCl/Glukose/Phosphatpuffer
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EB	<i>elution buffer</i> , Elutionspuffer
EC ₅₀	Konzentration eines Wirkstoffs, bei der die Hälfte des maximalen Effektes erreicht wird
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Bakterienzellen
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	<i>ethyleneglycoltetraacetic acid</i> , Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
G	Gauge (1 G = 38,1 mm)
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

GAPDH	Glycerolaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein der Qualle <i>Aequoria victoria</i>
ggfs.	gegebenenfalls
GST	Gluthation-S-Transferase
H ₂ O	entionisiertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His-Tag	Sequenz aus 6 Histidinen zur Aufreinigung von Proteinen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IB	Immunoblot
Ig	Immunglobulin
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i> , Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Konstante
Kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
CLSM	<i>confocal laser-scanning microscope</i> , Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
MCS	<i>multiple cloning site</i> , Polylinker
MBP	<i>maltose binding protein</i> , Maltose-bindendes Protein
M _r	relatives Molekulargewicht
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , „messenger“ Ribonukleinsäure
N	Normal
N ₂	Stickstoff
NA	numerische Apertur, Bestimmt das Auflösungsvermögen eines Objektivs, Produkt aus dem Sinus des halben objektseitigen Öffnungswinkels und dem Brechungsindex der Umgebung
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol

PFA	Paraformaldehyd
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RZPD	Resourcenzentrum Primärdatenbank / Deutsches Resourcenzentrum für Genomforschung
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , kleine interferierende RNA
SOC	Luria Broth (Miller)-Medium für die Bakterienanzucht
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i> , Tris gepufferte Lösung mit Tween 20
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-monolaurat
U	Units, definiert als diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen je min ein μmol Substrat umsetzt
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
w/o	<i>without</i> , ohne
wt	<i>wild type</i> , Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranosid
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , Variante des GFP
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

I Einleitung

Eukaryotische Zellen haben innerhalb eines Organismus verschiedenste Aufgaben zu erfüllen: In Abhängigkeit von intrinsischen und extrazellulären Signalen müssen sie wachsen, sich teilen, bewegen, ihre Gestalt adaptieren, Stoffe aufnehmen oder abgeben. Viele dieser biologischen Prozesse gehen mit der dynamischen Reorganisation eines dreidimensionalen Netzwerks aus fibrillären Proteinen, dem sogenannten Zytoskelett, einher. Die Organisation des Zytoskeletts beeinflusst dabei maßgeblich eine ganze Reihe fundamentaler Prozesse innerhalb von Geweben, wie die individuelle Morphologie und Funktion von Zellen, die Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionen oder die koordinierte Migration von Zellen. In Eukaryoten bilden Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente die Hauptbestandteile des remodellierbaren Zytoskeletts.

Aktinfilamente bestehen aus zwei polaren, helikalen Aktinpolymerketten mit einem Durchmesser von etwa 7 nm, deren Auf- und Abbau einer hohen Dynamik unterliegt. Ihre Funktion erstreckt sich von der Formgebung und Stabilisierung der Zelle (vor allem an der Plasmamembran) über den Kurzstreckentransport von Vesikeln bis zur Kontrolle der Zellmotilität durch die gerichtete Polymerisation (Alberti, 2009).

Bei Mikrotubuli handelt es sich um polare Protofilamente, die sich aus Alpha- und Beta-Einheiten zusammensetzen. Diese Einheiten polymerisieren in helikaler Form und bilden so einen stabilen Mikrotubulus (Durchmesser ca. 25 nm). Von den sogenannten MTOCs (*microtubule organizing centers*) oder dem Golgi-Apparat ausgehend, formen Mikrotubuli dynamische Netzwerke, die für Motorproteine der Kinesin- oder Dynein-Familien als Transportbahnen fungieren und für gerichtete Vesikeltransporte über längere Strecken sowie die Formgebung der Zelle verantwortlich sind. Darüber hinaus nehmen Mikrotubuli auch eine essentielle Funktion bei der Zellteilung ein, da sich aus ihnen der mitotische- und meiotische Spindelapparat zusammensetzt (Mallik et al., 2004; Efimov et al., 2007).

Intermediärfilamente bestehen dagegen aus verschiedenen Typen von Proteinfilamenten (Keratinen, Desminen, Neurofilamenten oder Laminen) mit ähnlichen Eigenschaften. Sie zeichnen sich durch eine konservierte Struktur aus, welche eine spontane und unpolare Selbst-Assemblierung in Filamenten von etwa 10 nm Durchmesser erlaubt. Diese Filamente können wiederum übergeordnete Strukturen, sogenannte Tonofibrillen, ausbilden. Die Dynamik der Intermediärfilamente ist im Gegensatz zu Aktinfilamenten und Mikrotubuli sehr begrenzt. Sie sind in der Lage, mechanische Zugkräfte zu absorbieren und fungieren daher als Stützgerüst bei der mechanischen Stabilisierung einer Zelle oder dienen der Fixierung von Organellen. Während für monomere Aktin- und Tubulin-Untereinheiten eine, für die Assemblierung essentielle, intrinsische ATPase- bzw. GTPase-Aktivität beschrieben wurde,

sind für die monomeren Bausteine der Intermediärfilamente keine enzymatischen Aktivitäten bekannt (Strelkov et al., 2003; Chou et al., 2007; Alberti, 2009).

I.1 Das Aktin-Zytoskelett und seine Regulation

Das Aktin-Zytoskelett ist aufgrund seiner hohen Plastizität an einer großen Anzahl fundamentaler Vorgänge in der Zelle beteiligt. Dazu zählen die Regulation von Wachstum und Teilung, Differenzierung, Adhäsion, Motilität und Apoptose (dos Remedios et al., 2003). Aktin kann dabei als globuläres Monomer (G-Aktin, M_r 42 kDa) oder als filamentöses Polymer vorliegen (F-Aktin). Die atomare Struktur von Aktin wurde in einem Komplex mit DNase I gelöst. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass ein G-Aktin-Molekül zwei Hauptdomänen besitzt, die durch eine Furche getrennt sind. In dieser Furche liegen entweder ADP oder ATP sowie zweiwertige Kationen wie Kalzium- oder Magnesium-Ionen gebunden vor (Kabsch et al., 1990). Aus *in vitro*-Untersuchungen zum Mechanismus der Aktin-Polymerisation ist bekannt, dass ATP-gebundenes G-Aktin zu polaren Filamenten polymerisieren kann. Dabei erfolgt zu Beginn der langsamste und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt: Die Bildung von Nukleationskeimen aus Aktin-Trimeren (Cooper et al., 1983).

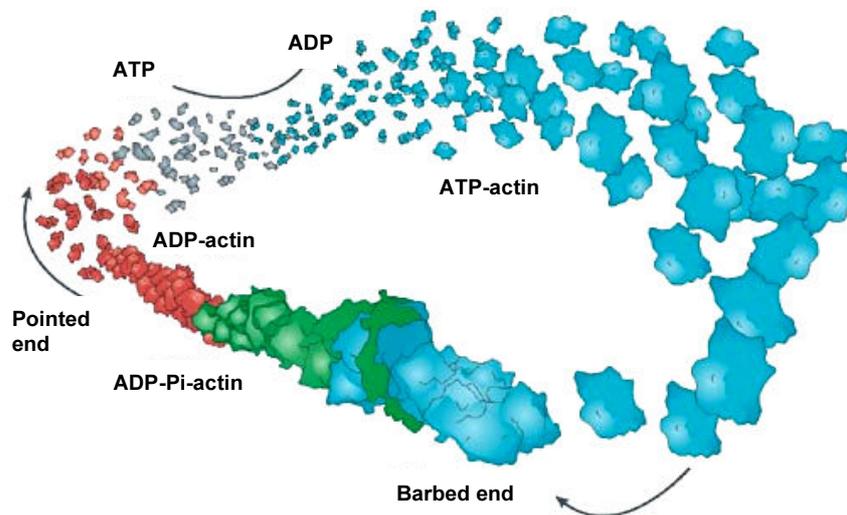


Abbildung 1.1: Darstellung der Aktin-Dynamik. ATP-assoziiertes G-Aktin bindet bevorzugt an das Plus-Ende (*barbed end*) der Aktinfilamente. ATP wird im Aktinfilament hydrolysiert. Die Depolymerisation des ADP-gebundenen G-Aktins erfolgt am Minus-Ende (*pointed end*) der Aktinfilamente. Nach der Depolymerisation wird an freiem G-Aktin ADP zu ATP ausgetauscht. (Übernommen aus Pak et al., 2008).

Wenn eine kritische Konzentration an ATP-gebundenem G-Aktin vorliegt, kann anschließend die Anlagerung weiterer G-Aktin-Monomere erfolgen. So entstehen lineare, unverzweigte Polymere mit einem Durchmesser von 5 - 7 nm (Oosawa, 2001). Da diese kritische Konzentration für die beiden Enden des Filaments unterschiedlich ausfällt, unterscheidet man ein schnell wachsendes Plus-Ende (*barbed end*) sowie ein langsamer wachsendes Minus-Ende (*pointed end*). Die dynamische Polymerisation und Depolymerisation von Aktin ist schematisch in Abb. 1.1 dargestellt. Unter *in vitro*-Bedingungen hydrolysiert am Minus-

Ende beständig ATP-Aktin zu ADP-Aktin, welches anschließend vom Filament dissoziiert. Bei hohen ATP-G-Aktin-Konzentrationen lagert sich das G-Aktin zwar an beide Enden des Filaments an, zeigt jedoch eine höhere Affinität für das Plus-Ende (Cleveland, 1982). *In vivo* liegen die Aktin-Umschlagsraten aufgrund der Assoziation mit Aktin-bindenden Proteinen (ABPs) etwa 100-fach höher als *in vitro* (Pak et al., 2008).

Die präzise zeitliche und räumliche Kontrolle der dynamischen Aktinfilament-Organisation bildet zum Beispiel eine entscheidende Voraussetzung für die Steuerung der gerichteten Migration von Zellen. Dabei unterstützen Aktinfilamente die Zellmigration insbesondere durch den dynamischen Auf-/Abbau von sogenannten Filopodien, Lamellopodien und Aktin-Stressfasern. Filopodien stellen dichte Aktinbündel dar, die zylinderförmig zur Bewegungsrichtung hin ausgerichtet sind. Lamellopodien befinden sich ebenfalls am vorderen Ende der Zelle und bilden verzweigte Netzwerke, welche die Vorwärtsbewegung der Zelle initiieren. Stressfasern bestehen dagegen aus Bündeln kurzer Aktinfilamente mit eingelagerten Myosinfilamenten und durchspannen parallel zu den Längsseiten den Zellkörper. Sie bewegen durch Kontraktion den Zellkörper vorwärts (Mitchison et al., 1996). Für die Regulation dieser Prozesse ist (1) die Verfügbarkeit von freien Plus-Enden als Ausgangspunkte für neue Aktinfilamente sowie (2) die Bereitstellung ausreichender Mengen an Assemblierungs-kompetentem G-Aktin entscheidend. Daher werden diese beiden Mechanismen durch eine Vielzahl von ABPs strikt reguliert (dos Remedios et al., 2003). ABPs sind in der Lage, Filamentenden zu verschliessen (*capping*-Proteine), die *de novo*-Nukleierung von Aktinfilamenten zu initiieren, Aktinfilamente zu fragmentieren und/oder depolymerisieren oder den ADP-ATP-Umschlag zu modulieren (Pak et al., 2008).

Capping-Proteine wie CapZ, Severin, Gelsolin oder Villin können durch eine Bindung an die Plus-Enden der Aktinfilamente eine weitere Anlagerung von Aktin-Monomeren und somit die Elongation der Filamente verhindern (Weeds et al., 1993). Ein solches *capping* führt auch zu einer lokalen Erhöhung des freien G-Aktin-Spiegels, da die Dissoziation von ADP-Aktin am Minus-Ende in der Regel weiterläuft (Disanza et al., 2005). Andere *capping*-Proteine wie Tropomodulin, DNase 1 oder der Arp2/3-Komplex binden dagegen an die Minus-Enden der Aktinfilamente und können auf diese Weise eine weitere (De-)polymerisation der Filamente blockieren (Podolski et al., 1988; Mullins et al., 1998; Fowler et al., 2003). Im Gegensatz dazu binden Proteine wie Thymosine oder Profilin ATP-gebundene Aktin-Monomere und entziehen sie so dem Polymerisationsgleichgewicht, was ebenfalls in einer verstärkten Depolymerisation von Filamenten resultiert (Carlsson et al., 1977; Safer et al., 1994; dos Remedios et al., 2003). Profilin unterstützen jedoch auch die verstärkte Bildung von Aktinfilamenten, indem sie den Nukleotidaustausch von ADP zu ATP in Aktin-Monomeren fördern (Goldschmidt-Clermont et al., 1992) und die notwendige kritische ATP-G-Aktin-Konzentration am Plus-Ende von Filamenten vermindern (Goode et al., 2007).

Die Bereitstellung von Plus-Enden für die Generierung neuer Aktinfilamente kann auf drei verschiedene Arten bewerkstelligt werden: (1) durch eine Dissoziation der *capping*-Proteine von vorhandenen Filamenten, (2) durch die *de novo*-Nukleierung neuer Aktinfilamente aus Monomeren und (3) durch die regulierte Fragmentierung bereits bestehender Filamente.

Die Dissoziation von *capping*-Proteinen ermöglicht die schnelle Generierung einer großen Anzahl von freien Plus-Enden für die Anlagerung von Monomeren und die Elongation neuer Filamente. Dieser Mechanismus steht zumindest teilweise unter der Kontrolle des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) (Wear et al., 2003). So führt beispielsweise eine Aktivierung von Thrombozyten zu einer Gelsolin-vermittelten Fragmentierung von Aktinfilamenten, wobei Gelsolin jedoch zunächst mit den neu entstehenden Plus-Enden assoziiert bleibt. Erst die Stimulus-induzierte, intrazelluläre Erhöhung der PIP₂-Level führt zu einer Dissoziation von Gelsolin und der Exposition freier Aktinfilament-Enden, wodurch die Bildung von Filopodien und Lamellopodien ermöglicht wird (Barkalow et al., 1996). Allerdings zeigen neuere Befunde, dass Phosphoinositide alleine für eine Dissoziation der *capping*-Proteine von Aktinfilamenten offenbar nicht ausreichen (Kuhn et al., 2007). Hier spielen möglicherweise zusätzliche Regulatoren, wie Proteine der Ena/Vasp-Familie (Bear et al., 2002) oder Myotrophine (Bhattacharya et al., 2006), eine Rolle.

Die Nukleierung (Keimbildung) stellt den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt bei der *de novo*-Synthese neuer Aktinfilamente dar. Derzeit sind fünf Proteine/Protein-Familien bekannt, die einen solchen Prozess initiieren oder beschleunigen können: Der Arp2/3 (*actin related protein 2/3*)-Komplex, Formine und deren Homologe, Proteine der Spire-Familie, das Protein Cobl (*cordon-bleu*) sowie Mitglieder der ADF/Cofilin-Familie (Mullins et al., 1998; Kovar et al., 2004; Quinlan et al., 2005; Andrianantoandro et al., 2006; Ahuja et al., 2007; Ono, 2007). Im Folgenden werden die beiden wichtigsten Mechanismen der Aktin-Nukleierung kurz erläutert.

Der Arp2/3-Komplex wurde erstmals aus *Acanthamoeba* isoliert. Es handelt sich um einen großen (ca. 220 kDa), evolutionär konservierten Komplex aus sieben Untereinheiten, den Aktin-verwandten Proteinen 2 und 3 (Arp2/3), dem WD-40 β -Propellerprotein (ARPC1) sowie vier weiteren Untereinheiten (ARPC2 - 5, (Mullins et al., 1998)). Der Arp2/3-Komplex generiert neue Verzweigungen des Aktinnetzwerkes, indem er an das Minus-Ende bestehender Aktinfilamente bindet und hier die *de novo*-Nukleierung von Tochterfilamenten einleitet. Diese Tochterfilamente werden anschließend in einem 70°-Winkel zum Ursprungsfilament an ihrem Plus-Ende verlängert, was dem entstehenden Netzwerk eine charakteristische, Y-förmige Zweigstruktur verleiht (Blanchoin et al., 2000; Pollard et al., 2000; Higgs et al., 2001). Die Kristallstruktur des Arp2/3-Komplexes lässt vermuten, dass die Proteine Arp2 und Arp3 als Kristallisationskeime für die Anlagerung des ersten Aktin-

Monomers dienen (Robinson et al., 2001). Da Aktinfilamente als Koaktivatoren des Arp2/3-Komplexes fungieren (Pantaloni et al., 2000), verläuft der weitere Prozess autokatalytisch, wobei die jeweils neu gebildeten Aktinfilamente die Generierung weiterer Filamente initiieren (Pollard et al., 2003). Der Arp2/3-Komplex zeigt *per se* nur eine relativ geringe intrinsische Nukleierungsaktivität (Pollard und Borisov, 2003).

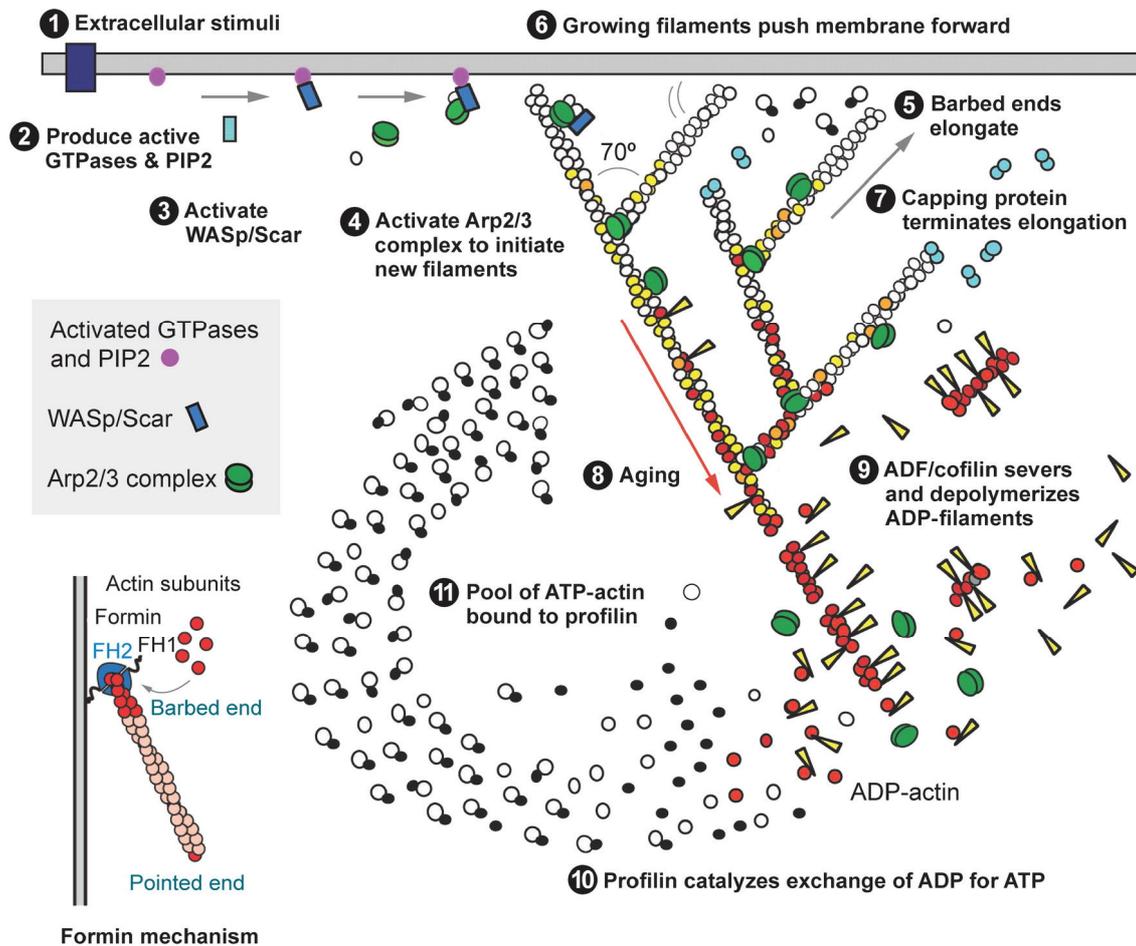


Abbildung 1.2: Regulation der Nukleierung von Aktinfilamenten und Recycling der Aktin-Monomere in den G-Aktin pool. (1) Stimulus-induzierte Rezeptoraktivierung. (2 - 4) Der Arp2/3-Komplex wird durch Rho-GTPasen und die Adaptorproteine WASp/Scar aktiviert und initiiert die Nukleierung neuer Aktinfilamente. (5 - 7) Die neu gebildeten Filamente werden elongiert und drücken gegen die Plasmamembran. (8) Alterung der Aktinfilamente durch Hydrolyse des γ -Phosphats von ATP-Aktin zu ADP-Pi-Aktin, gefolgt von der Dissoziation des anorganischen Phosphats (Pi). (9) Proteine der ADF/Cofilin-Familie binden an ADP-Aktin und fördern die Pi-Dissoziation. Anschließend erfolgt die ADF/Cofilin-vermittelte Fragmentierung von Filamenten oder die Depolymerisation von ADP-Aktin vom Filamentende. (11 - 12) Profiline katalysieren den Austausch von ADP- zu ATP-G-Aktin und erneuern so den *pool* an Assemblierungs-kompetentem G-Aktin. (Übernommen aus Pollard, 2007).

Seine Aktivität wird maßgeblich durch die NPF (*nucleation promoting factors*)-Proteine der WASP (*wiscott-aldrich syndrome protein*)-, WAVE (*WASP family Verprolin homologues*)- und Scar (*suppressor of cAMP receptor*)-Familien kontrolliert (Machesky et al., 1998; Carlier et

al., 2003; Stradal et al., 2006). Proteine der WASP-Familie sind Multidomänenproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 500 kDa, die über eine gemeinsame Domänenorganisation verfügen. WASP-Proteine besitzen am C-Terminus drei charakteristische Domänen: Die V (Verprolin)-, die zentrale C (*central*)-Domäne sowie die A (*acidic*)-Domäne. Diese formen zusammen die sogenannte VCA-Domäne (Higgs et al., 1999), welche essentiell für die Arp2/3-abhängige Aktinnukleierung *in vitro* ist. Dabei bindet die V-Region Aktin-Monomere (Miki et al., 1998), das A-Motiv den Arp2/3-Komplex (Machesky und Insall, 1998), während die C-Domäne nach der Assoziation mit dem Arp2/3-Komplex durch eine Konformationsänderung die Keimung der neuen Filamente einleitet (Panchal et al., 2003). Interessanterweise liegt die VCA-Domäne im inaktiven Zustand des WASP-Proteins unstrukturiert vor und assembliert erst nach der Bindung von Aktin-Monomeren und dem Arp2/3-Komplex (Chereau et al., 2005). Der Arp2/3-Nukleierungsmechanismus ermöglicht dabei eine Polarisierung der Zelle, da das neu gebildete Aktinnetzwerk die Plasmamembran lokal ausstülpt und die sogenannte *leading edge* bildet (s. Abb. 1.2). Dieser Prozess ist essentiell für die gerichtete Migration von Zellen, und wird unter anderem durch *capping*-Proteine reguliert, die ein unkontrolliertes Wachstum des Aktinnetzwerks verhindern (Cooper et al., 2000).

Proteine der Formin-Familie stellen ebenfalls eine wichtige Klasse an Aktinnukleatoren dar. Während der Arp2/3-Komplex die Polymerisation neuer Filamente vom langsam wachsenden Minus-Ende initiiert, katalysieren Formine die Bildung von F-Aktin vom Plus-Ende aus und bleiben dabei während der Elongation mit den wachsenden Filamenten assoziiert (Kovar und Pollard, 2004; Romero et al., 2004; Watanabe et al., 2004). Im Gegensatz zu der Arp2/3-vermittelten, verzweigten Aktin-Polymerisation entstehen durch Formine unverzweigte Aktinfilamente. Dabei verhindern die Formine das *capping* der Plus-Enden und fördern die Elongation der Filamente durch die Rekrutierung von Profilin-Aktin (Kovar et al., 2006). So gesehen stellen Formine also eher kleine Motorproteine dar, die sich durch einen streng kontrollierten Mechanismus auf den neu geschaffenen Aktinbahnen fortbewegen. Die Regulation der Formin-Aktivität erfolgt hauptsächlich über kleine GTPasen der Rho-Familie (Otomo et al., 2005).

Die Fragmentierung bereits bestehender Filamente stellt einen weiteren, essentiellen Mechanismus für die Generierung neuer Aktinfilamente dar. Die so entstehenden Plus-Enden können wiederum als Grundlage für das Anwachsen neuer Filamente dienen. Ob es dabei letztendlich zu einem Nettogewinn oder -verlust an Aktinfilamenten kommt, hängt maßgeblich von dem Vorhandensein eines ausreichenden ATP-G-Aktin *pools* sowie dem regulierenden Eingreifen von *capping*-Proteinen ab. Unter G-Aktin-limitierenden Bedingungen stehen nicht genug G-Aktin-Moleküle für das Erreichen der kritischen Konzentration an den freien Plus-Enden zur Verfügung und es kommt zu einem Nettoverlust

an Filamenten aufgrund der kontinuierlich voranschreitenden Alterung und Depolymerisation von F-Aktin. Ist die Konzentration an Assemblierungs-kompetentem Aktin dagegen hoch, kann eine Netto-Polymerisation an den neugebildeten Plus-Enden der Aktinfilamente stattfinden. Die Aktinfilament-Fragmentierung wird durch Proteine der Gelsolin- und ADF/Cofilin-Familie räumlich und zeitlich präzise kontrolliert.

Gelsoline bestehen aus sechs homologen Domänen, die durch Linkerregionen verschiedener Länge miteinander verbunden sind (Kwiatkowski et al., 1986). Die Gelsolin-Aktivität wird vor allem durch die Bindung von Kalziumionen reguliert. Unter basalen intrazellulären Kalziumionen-Konzentrationen können Gelsoline zwar an Aktin binden, ihre Aktin-fragmentierende Aktivität ist unter diesen Bedingungen jedoch gering. Bei Kalziumionen-Konzentrationen im mikromolaren Bereich, wie sie typischerweise nach Rezeptor-Stimulation in der Zelle auftreten, können Gelsoline Kalzium binden. Dies führt zu einer signifikanten Verstärkung ihrer Aktin-Fragmentierungs-Aktivität (Kinosian et al., 1998). Wie oben beschrieben, fungieren Proteine der Gelsolin-Familie ebenfalls als *capping*-Proteine und bleiben nach der erfolgten Aktin-Fragmentierung mit den neuen Plus-Enden assoziiert (Sun et al., 1999). Darüberhinaus können Gelsoline jedoch auch durch die Bindung von zwei Aktin-Monomeren oder die Stabilisierung bereits bestehender Aktinnuklei die *de novo*-Synthese von Aktinfilamenten anregen (Ditsch et al., 1994; Kinosian et al., 1998; Ono, 2007). Weitere Regulationsmechanismen der Gelsolin-Aktivität umfassen die Inhibierung der Fragmentierungs-Aktivität durch Phosphoinositide (Barkalow et al., 1996), eine Erhöhung des intrazellulären pH-Werts (Lamb et al., 1993) oder die kompetitive Bindung an andere Aktin-bindende Proteine, wie Tropomyosine (Ishikawa et al., 1989).

I.2 Die ADF/Cofilin-Familie

Der ubiquitär exprimierte, Aktin-depolymerisierende Faktor Cofilin gilt als Schlüsselregulator der Stimulus-induzierten Aktin-Zytoskelett-Dynamik (Moon et al., 1995; Bamburg, 1999). Proteine der ADF/Cofilin-Familie bzw. Homologe finden sich in allen Eukaryoten (Bamburg, 1999), so z.B. Depactin in Wirbellosen (Mabuchi, 1983), Destrin im Säugern (Moriyama et al., 1990), Actophorin in *Acanthamoeba* (Maciver et al., 1991), Coactosin in *Dictostelium* (Bretschneider et al., 2004), Twinstar in *Drosophila* (Gunsalus et al., 1995) und verschiedene Isoformen in *A. thaliana* (Maciver et al., 2002). Säuger verfügen über drei Isoformen mit einem Molekulargewicht von 15 - 21 kDa, das ubiquitäre Cofilin-1 (*non-muscle cofilin*, *n-cofilin*), muskelspezifisches Cofilin-2 und ADF (*actin depolymerizing factor* oder Destrin).

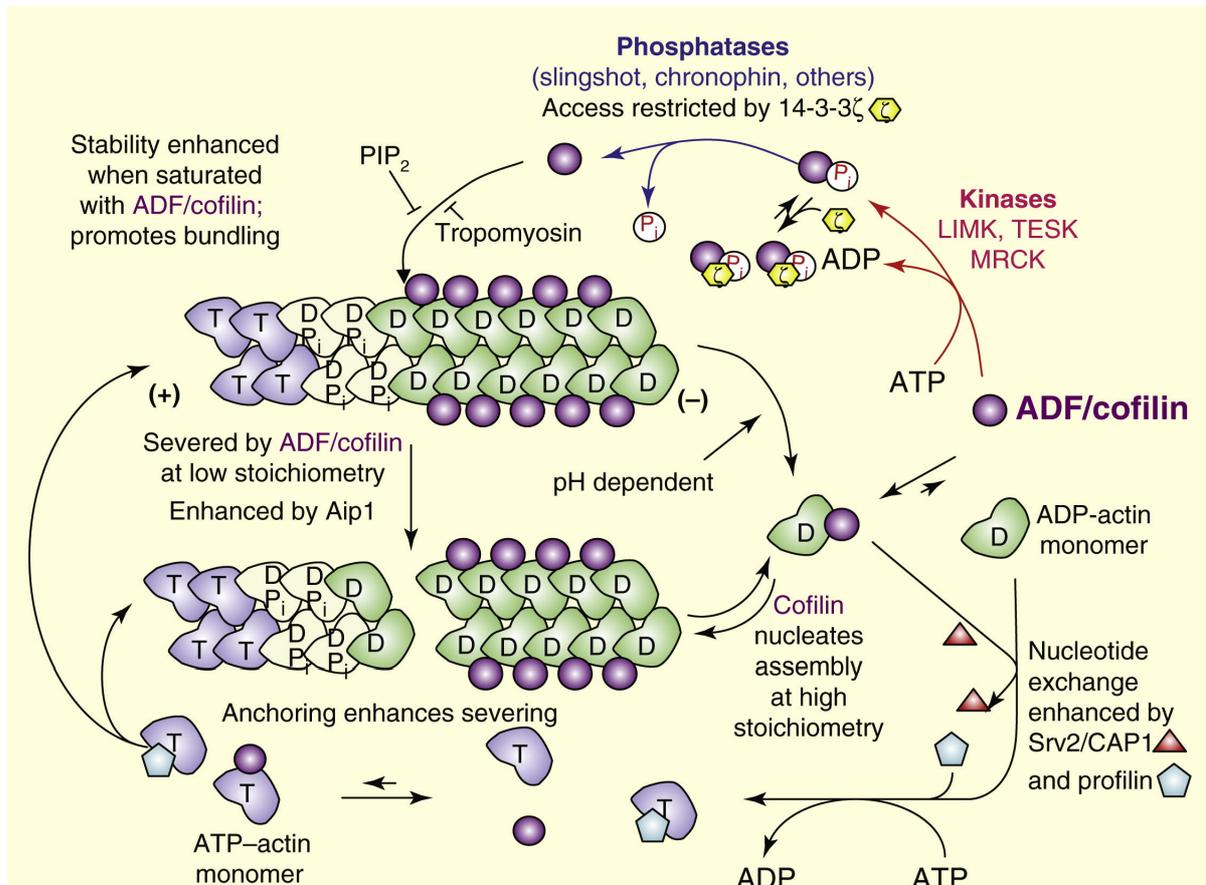


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der dynamischen F-Aktin-Regulation durch Proteine der ADF/Cofilin-Familie in Vertebraten. Die Aktivität des Aktin-depolymerisierenden Faktors ADF/Cofilin wird durch eine Balance zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Durch Filament-Fragmentierung und Erhöhung der Aktin Monomer Dissoziations-Rate von den Minus-Enden der Aktinfilamente erhöht Cofilin deren Umschlagrate. Ist die Konzentration an Assemblierungs-kompetentem Aktin in Regionen gesteigerter Cofilin-Aktivität hoch, kann eine Netto-Polymerisation an den neugebildeten Plus-Enden der Aktinfilamente stattfinden. Ist der *pool* an verfügbaren Aktin-Monomeren hingegen niedrig, kommt es zu einer Netto-Depolymerisation. Säuger-Cofilin wird durch Kinasen, die den konservierten Serin-3-Rest phosphorylieren, in seiner Aktin-Bindung und -Dynamik inhibiert. Eine Dephosphorylierung durch Phosphatasen aktiviert Cofilin. (Übernommen aus Bamberg et al., 2008).

Alle Mitglieder sind durch eine sogenannte ADF-Homologie-Domäne charakterisiert, die man auch in anderen ABPs, wie den nahe verwandten Twinfilinen (Paavilainen et al., 2007) oder Proteinen der Gelsolin-Familie finden kann (Van Troys et al., 1997) und unterscheiden sich hauptsächlich in der zell- und organspezifischen Expression (Vartiainen et al., 2002; Gurniak et al., 2005) sowie ihrer biochemischen Funktion. So zeigt ADF die stärkere Aktin-depolymerisierende Aktivität, während Cofilin-1 Aktinfilamente eher fragmentiert (Ono, 2007). In Mäusen stellt Cofilin-1 die prädominante Isoform während der Entwicklung dar und bleibt auch in den adulten Geweben ubiquitär exprimiert (Vartiainen et al., 2002). Mit der späten Embryogenese wird Cofilin-1 in Skelettmuskelzellen zunehmend durch Cofilin-2 ersetzt, welches hier dann die alleinige und im Herzmuskelgewebe die vorherrschende Isoform

darstellt (Nakashima et al., 2005). Im Folgenden bezieht sich der Terminus Cofilin auf Cofilin-1.

Cofilin bindet sowohl G-Aktin als auch F-Aktin stöchiometrisch (Nishida et al., 1984), wobei ADP-Aktin mit einer etwa 100-fach höheren Affinität gebunden wird, als ATP-Aktin (Carlier et al., 1997). Dabei interkaliert je ein Cofilin-Molekül zwischen zwei Aktin-Moleküle (Renoult et al., 1999), was innerhalb des Aktinfilaments eine Veränderung des helikalen Drehwinkels um 5° zur Folge hat (Bamburg, 1999). Dies führt zu einer Destabilisierung des Aktinfilaments und beschleunigt die Dissoziation von ADP-gebundenem Aktin am Minus-Ende um das 30-fache (Carlier et al., 1997; Blanchoin et al., 1999; Galkin et al., 2003). Auf der anderen Seite besitzt Cofilin auch Aktinfilament-fragmentierende Eigenschaften (Bamburg et al., 2002; Pavlov et al., 2007). Diese Fragmentierungsaktivität ist jedoch schwächer ausgeprägt als bei Proteinen der Gelsolin-Familie (Blondin et al., 2001).

Zudem reguliert Cofilin die Aktin-Umschlagraten, indem es an die dissoziierten Aktin-Monomere gebunden bleibt und den Austausch von ADP gegen ATP inhibiert, was eine schnelle Wiederverwertung der Aktin-Monomere für die Polymerisation weiterer Filamente verhindert (Blanchoin et al., 1998). Der Austausch von ADP gegen ATP in Aktin-Monomeren kann durch Profilin katalysiert werden (Mockrin et al., 1980), was den *pool* an ATP-gebundenem G-Aktin erhöht, welcher dann für die Polymerisation zur Verfügung steht (Kovar et al., 2006). Darüber hinaus kann Cofilin auch die *de novo*-Keimung von Aktinfilamenten initiieren (Chen et al., 2004; Andrianantoandro und Pollard, 2006; Kudryashov et al., 2006). Neuere Studien legen nahe, dass das Resultat der Cofilin-Aktivität von der lokalen Cofilin-Konzentration abhängt. Ist die lokale Cofilin-Konzentration niedrig, kommt es vor allem zur Aktinfilament-Fragmentierung. Ist die lokale Cofilin-Konzentration hingegen hoch, wird vorwiegend eine erhöhte *de novo*-Filamentbildung beobachtet (Andrianantoandro und Pollard, 2006; Bobkov et al., 2006; Pavlov et al., 2007).

Die Cofilin-vermittelte Fragmentierung und/oder Depolymerisation von Aktinfilamenten hat in der Zelle oft komplexe Folgen (Carlier et al., 1997; Lappalainen et al., 1997; Ghosh et al., 2004). Einerseits führt die Filament-Disassemblierung durch aktiviertes Cofilin primär zu einer Abnahme polymerisierten Aktins. Andererseits kann es sekundär zu einer lokalen Zunahme an polymerisiertem Aktin kommen, da als Resultat der Filament-Fragmentierung rasch eine grosse Anzahl freier Filament-Enden generiert wird. Diese können als Keime für das Aufwachsen neuer Aktinfilamente dienen (Ichetovkin et al., 2002; Ghosh et al., 2004). Ob es dabei letztendlich zu einem Nettoverlust oder -gewinn von Aktinfilamenten kommt, hängt maßgeblich von der Verfügbarkeit an freiem, monomerem ATP-Aktin ab. Aus diesen Zusammenhängen erklärt sich die zentrale Bedeutung von Cofilin für die Umschlagraten der Aktinfilamente *in vivo*.

Eine korrekte Cofilin-Expression und -Aktivität ist wesentlich für so fundamentale, Aktin-basierte, Prozesse wie die Zellteilung, -wachstum und -migration, sowie Endozytose und Phagozytose (Bamburg, 1999; Samstag et al., 2003; Mouneimne et al., 2006; Klemke et al., 2008; Le Clairche et al., 2008). Zusätzlich hat Cofilin weitere, erst kürzlich identifizierte und ebenfalls Aktin-involvierende Funktionen. Dazu zählt die durch apoptotische Stimuli ausgelöste Umverteilung von Cofilin an mitochondriale Membranen zur Freisetzung von Cytochrom C (Chua et al., 2003). Weiterhin ist die LIM-Kinase-induzierte Cofilin-Regulation auch an der Extension von tubulären Membranen aus dem Golgi-Apparat im Rahmen des *protein sorting* beteiligt (Rosso et al., 2004). Aufgrund der Vielfalt dieser Funktionen ist Cofilin offensichtlich essentiell für den Ablauf komplexer morphogenetischer und entwicklungsbiologischer Programme und so ist es wenig verwunderlich, dass Veränderungen der Cofilin-Produktion, -Regulation oder -Lokalisation als wichtige Faktoren bei der Entstehung und/oder Progression einer Vielzahl von pathologischen Veränderungen diskutiert werden (Bamburg und Wiggan, 2002; Wang et al., 2007).

So stellt das Cofilin-Ortholog Unc60B in *C. elegans* die korrekte Integration von F-Aktin in Myofibrillen in die Körperwallmuskeln sicher (Ono et al., 1999). Die genetische Inaktivierung des Cofilin-1-Gens in Mäusen ist embryonal letal und führt zu Defekten in der Neuralleisten-Morphogenese sowie einem kompletten Verlust des Neuralrohr-Schlusses. Dabei spielt Cofilin eine wichtige Rolle bei der Migration und Polarisierung der Neuralleisten-Zellen, und ist essentiell für die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen (Gurniak et al., 2005). Interessanterweise scheint Cofilin-1 darüberhinaus essentiell für die Kontrolle der Zellmigration und Zellzyklus-Progression im zerebralen Kortex von Mäusen zu sein (Bellenchi et al., 2007). Im Gegensatz dazu sind ADF^{-/-}-Mäuse lebensfähig und zeigen eine normale embryonale Entwicklung was die Vermutung nahe legt, dass hier das Fehlen von ADF durch Cofilin erfolgreich kompensiert werden kann. Allerdings entwickeln diese Mäuse kurz nach der Geburt eine Verdickung der Kornea aufgrund einer Hyperproliferation der kornealen Epithelzellen, was in einem Erblinden der Mäuse resultiert (Ikeda et al., 2003; Verdoni et al., 2008). Hier wird deutlich, dass die verschiedenen ADF/Cofilin-Isoformen offenbar keine vollständig redundanten Funktionen einnehmen.

Cofilin-Dysregulationen mit der Folge einer veränderten Aktin-Zytoskelett-Dynamik sind zudem mit der Initiation und Progression verschiedenster pathophysiologischer Zustände wie maligner Tumoren, Immundefizienz, neurodegenerativer und kardiovaskulärer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht worden (Bamburg und Wiggan, 2002; Bernstein et al., 2006; Maloney et al., 2007). Es sind mindestens drei Aspekte der Tumorzellbiologie bekannt, bei denen die Phosphoregulation von Cofilin eine wichtige Rolle spielt: die initiale Zelltransformation (Pawlak et al., 2002), die aberrante Zellteilung (Gunsalus et al., 1995; Amano et al., 2002; Kaji et al., 2003; Yang et al., 2004; Gohla et al., 2005) und die

dysregulierte Zellmotilität im Kontext von Tumorprogression und Metastasierung (Ghosh et al., 2004; Song et al., 2006; Wang et al., 2006). So wurden eine veränderte Cofilin-Aktivierung oder veränderte Expressionsmuster von Cofilin-Regulatoren in einer Vielzahl verschiedener Krebsarten und Modellzelllinien beschrieben (Ono, 2007; Wang et al., 2007). Desweiteren scheint Cofilin eine Rolle bei der Ausbildung sogenannter Invadopodien zu spielen. Bei Invadopodien handelt es sich um die Aktin-reichen Auswüchse aggressiver Tumorzellen, die in der Lage sind, in die Zellmatrix anderer Zellen einzudringen. Sie stellen aktive Zentren der proteolytischen Degradation und des Abbaus von extrazellulärer Matrix dar (Gimona, 2008). Dabei führt die Depletion von Cofilin in MTLn3-Zellen zu einer reduzierten Invadopodien-Ausbildung (Yamaguchi et al., 2005), während die Expression einer konstitutiv aktiven Cofilin-Variante mit einer verstärkten Expression von Matrix-degradierenden Enzymen, wie den Metalloproteinasen 2 und 14 einhergeht (Dang et al., 2006). Weiterhin hat die Cofilin-Aktivität direkte Auswirkungen auf die Motilität von Krebszellen (Mouneimne et al., 2006; Wang et al., 2006; Sidani et al., 2007), ist an der Aktivierung und Chemotaxis von T-Zellen wesentlich beteiligt (Lee et al., 2000; Nishita et al., 2002), und scheint zudem eine wichtige Rolle bei der verminderten T-Zell-Aktivität nach oxidativem Stress zu spielen (Klemke et al., 2008). Eine strikte Regulation der Cofilin-Aktivität ist aber offenbar auch für eine gerichtete Migration von Neuronen des cerebralen Cortex (Bellenchi et al., 2007; Wen et al., 2007), das Auswachsen von Neuriten (Meberg, 2000) oder die Axogenese (Garvalov et al., 2007) essentiell. Desweiteren führt ATP-Stress in Axonen und Neuriten von hippocampalen Neuronen zu einer rapiden Dephosphorylierung von Cofilin. Dieser Effekt geht mit einem starken Anstieg der Alterung von Aktinfilamenten einher. Da Cofilin eine höhere Affinität für ADP-Aktin besitzt, kann die Anzahl von Cofilin-besetzten Aktinfilamenten schnell eine kritische Konzentration erreichen, was zu einer Akkumulation der Filamente in charakteristischen bündelförmigen Strukturen führt (Minamide et al., 2000). Diese Strukturen können sowohl von transienter als auch persistierender Natur sein und so Neuriten komplett verschließen oder die Mikrotubuli zerstören, was deren distale Funktionen blockiert (Minamide et al., 2000; Pfannstiel et al., 2001). Diese bündelförmigen Aktin-Cofilin-Komplexe wurden auch in Amyloid-Plaques des frontalen Kortex und Hippocampus von Alzheimer-Patienten und in Mausmodellen der Alzheimer'schen Erkrankung gefunden (Fulga et al., 2007). Möglicherweise führt die Blockierung des axonalen Transportes durch diese Komplexe zur intrazellulären Anhäufung des APP (*amyloid precursor protein*) und verstärkt dadurch die Plaquetbildung (Maloney und Bamburg, 2007). Auch die sogenannten Hirano-Körperchen, die vor allem im Gehirn dementer Menschen nachgewiesen wurden, enthalten Aktin und Cofilin in großen Mengen (Maciver et al., 1995) und ähnliche Aggregate wurden in den Gehirnen von Zwillingen mit juveniler Dystonie gefunden (Gearing et al., 2002). Diese bündelförmigen Aktin-Cofilin-Strukturen

könnten möglicherweise einen allgemeinen Marker für pathologische Veränderungen des neurodegenerativen Systems darstellen.

I.3 Regulationsmechanismen der Cofilin-Aktivität

Die zelluläre Cofilin-Aktivität wird durch Faktoren wie den intrazellulären pH-Wert, eine Bindung an Membranlipide, die Interaktion mit anderen ABPs oder eine posttranslationale Modifikation (Phosphorylierung) eng kontrolliert.

So scheint die Cofilin-vermittelte Disassemblierung von F-Aktin pH-abhängig zu sein (Bernstein et al., 2000; Bamburg und Wiggan, 2002). In saurem Milieu ($\text{pH} < 6,8$) wird F-Aktin durch Cofilin eher stabilisiert, während ein alkalisches Umfeld ($\text{pH} > 7,3$) die Depolymerisation von Filamenten fördert. Dabei konnten Studien belegen, dass die pH-Abhängigkeit eine Rolle bei der Zytoskelett-Dynamik in der Nähe von Na^+/H^+ -Antiportern in der Zellmembran spielt, wo es kurzfristig zu starken pH-Schwankungen kommen kann (Bamburg und Wiggan, 2002; Chiang et al., 2008).

Ein wichtiger Regulationsmechanismus von Cofilin besteht in der Interaktion mit Membran-assoziierten Phosphoinositiden, für die bereits eine wesentliche Beteiligung an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts und der Zellmigration nachgewiesen wurde (Ling et al., 2006). Sowohl PIP_2 als auch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) können an Cofilin binden (Yonezawa et al., 1990). Da die Bindungsstelle von PIP_2 auf Cofilin innerhalb der Aktin-bindenden Domäne liegt, wird durch eine Interaktion der beiden Moleküle eine Bindung von Cofilin an Aktin verhindert und somit die Aktivität von Cofilin inhibiert (Kusano et al., 1999; Van Troys et al., 2000). In vielen Zelllinien kann zwar aktives (dephosphoryliertes) Cofilin in der Nähe der Plasmamembran nachgewiesen werden, nicht jedoch inaktives Phosphocofilin (Song et al., 2006; van Rheenen et al., 2007). So wird vermutet, dass PIP_2 dephosphoryliertes Cofilin vernetzen und akkumulieren kann. Durch eine Stimulus-induzierte PIP_2 -Hydrolyse ließen sich auf diesem Wege relativ schnell hohe lokale Konzentrationen an aktiviertem Cofilin in solchen subzellulären Regionen realisieren, in denen eine dynamische Aktin-Reorganisation erforderlich ist (Van Troys et al., 2008). Ein PIP_2 -hydrolysierendes Enzym ist die Phospholipase C (PLC), für die bereits eine Rolle bei der Stimulus-induzierten Cofilin-Aktivierung belegt wurde (Zhan et al., 2003; Mouneimne et al., 2004; Zhou et al., 2007). Dabei transloziert Cofilin nach PLC-vermittelter PIP_2 -Hydrolyse von der Plasmamembran an Aktinfilamente, was zu einer lokalen Erhöhung der freien Aktin-Enden führt (van Rheenen et al., 2007).

Die Cofilin-Aktivität wird aber auch durch die kooperative oder kompetitive Interaktion mit anderen Aktin-bindenden Proteinen moduliert. Eine solche Interaktion kann beispielsweise

einen Einfluss auf die ADP-Aktin-Assoziation oder die Fragmentierungsaktivität von Cofilin haben.

Tabelle 1.1: Cofilin-spezifische Kinasen und Phosphatasen

Enzyme	LIM-Kinasen	TES-Kinasen	Slingshot (SSH)-Phosphatasen	Chronophin (CIN)
Isoformen	LIMK1 LIMK2 (humane Varianten 1a, 2a, 2b)	TESK1 TESK2	SSH1L SSH2L SSH3 (SSH1S, SSH2, SSH3L)	unbekannt
Strukturelle Eigenschaften	2 LIM-Domänen, PDZ-Domäne, C-terminale Kinase-Domäne	N-terminale Kinase-Domäne	Phosphatase-Domäne, C-terminale Domäne mit F-Aktin- und/oder 13-3-3-bindenden Eigenschaften	3 HAD-Motive, Phosphatase-Domäne
Gewebeverteilung	LIMK1: ubiquitär LIMK2: ubiquitär LIMK1+2: in verschiedenen Testis-Zelltypen	Weit verbreitet, verstärkt in Testis exprimiert. TESK1: in Keimzellen TESK2: in Sertoli-Zellen	Weit verbreitet, häufig parallele Expression von SSH1, 2 und 3	Ubiquitär, stärkste Expression in Hirn und Testis
Substrate Aktivierung (+) Inhibierung (-)	(-) Cofilin, ADF (+) CREB (-) Nurr1 (-) p25 α	(-) Cofilin, ADF	(+) Cofilin, ADF (-) LIMK1 und 2 Coronin 1B	(+) Cofilin, ADF Pyridoxal-5'-Phosphat
Zelluläre Aktivatoren (+) und Inhibitoren (-)	(+) Rho-GTPasen über: PAKs, MRCK α , ROCKs, CIB1-PAK1, (-) Autoinhibition, SSH1L, PAR2- β -Arrestin, LATS-1, LIMK2 : Par-3	(+) Rac1 (-) α -Parvin, Sprouty-4, 14-3-3 β	(+) Calcineurin, PI3-Kinasen (-) PAK4, 14-3-3	(+) β -Arrestin

LIM: Lin-11/Isl-1/Mec-3, TES : testicular protein, SSH1L : Slingshot 1 long, SSH1S : Slingshot 1 short, PDZ: Akronym für post synaptic density protein (PSD95), drosophila disc large tumor suppressor (DlgA), und zonula ocludens-1 protein (zo-1), HAD: haloacid dehalogenase, ADF : actin-depolymerizing factor, CREB: cAMP response element-binding protein, Nurr1 : nuclear receptor related 1 protein, PAK : p21-activated kinase, MRCK : mytotic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase, ROCK : Rho-associated coiled coil-containing protein kinase, CIB1 : calcium-and integrin-binding protein 1, PAR2 : protease-activated receptor 2, LATS-1 : large tumor suppressor 1, Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1. (Modifiziert nach Van Troys et al., 2008).

So zeigt Aip1 (actin-interacting protein 1) *per se* nur einen geringen Einfluss auf die Aktinfilament-Assemblierung *in vitro*. Erst durch seine Bindung an Cofilin wird die Cofilin-vermittelte Fragmentierung von Aktinfilamenten signifikant erhöht (Iida et al., 1999; Ono,

2007), was in T-Zellen zu starken Migrationsdefekten führt (Li et al., 2007). Tropomyosine hingegen können die Fragmentierungsaktivität von Cofilin blockieren (Bernstein et al., 1982). Dabei ist die Bindung von Tropomyosin und Cofilin an Aktin kompetitiv, d.h. die Bindung des einen Proteins inhibiert die Bindung des anderen Moleküls. Dadurch können Zellen einen stabilen *pool* an Tropomyosin-gebundenem Aktin sowie einen dynamischen Pool an Cofilin-gebundenem Aktin aufrechterhalten, was unter anderem für die Zelldifferenzierung und -polarisierung von Bedeutung ist (DesMarais et al., 2002; Danuser, 2005; Ono, 2007; Kuhn et al., 2008).

Als wichtige Komponente bei der direkten Regulation der Cofilin-Aktivität hat sich in Metazoen die reversible Phosphorylierung des Serin-3 in Cofilin herausgestellt („Phosphocofilin“). Durch diese Phosphorylierung wird die Bindung von Cofilin an Aktin sterisch blockiert (Wriggers et al., 1998) und die Aktin-remodellierenden Eigenschaften von Cofilin blockiert (Bamburg und Wiggan, 2002). Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die bisher bekannten Cofilin-spezifischen Kinasen und Phosphatasen sowie ihre wichtigsten Eigenschaften.

Als spezifische Cofilin-Kinasen wurden die verwandten Lin-11/Isl-1/Mec-3 (LIM)-Domänen enthaltenden LIM-Kinasen (LIMK, Arber et al., 1998; Yang et al., 1998) und die testikulären Protein-Kinasen (*testicular protein kinases*, TESK) identifiziert (Toshima et al., 2001; Toshima et al., 2001). Signaltransduktionswege, die zur Cofilin-Inaktivierung durch Phosphorylierung führen, sind inzwischen relativ gut verstanden. So werden LIMKs durch Phosphorylierung eines Threonins in der katalytischen Domäne aktiviert. Diese LIMK-spezifischen Kinasen stehen wiederum unter der Kontrolle von kleinen GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac, Cdc42), die über eine Vielzahl G-Protein-gekoppelter und Tyrosinkinase-Rezeptoren regulierbar sind und jeweils spezifische Reorganisationsformen des Aktin-Zytoskeletts induzieren (Scott et al., 2007). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass LIMKs eine wichtige Funktion bei der Rac-abhängigen Lamellopodien-Formation sowie der Rho-vermittelten Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen einnehmen (Sumi et al., 1999). Es gibt jedoch auch Unterschiede bei der Regulation der beiden LIMK-Isoformen: Die Funktion von LIMK1 und 2 wird zwar durch Rho und Cdc42 sowie deren Effektoren ROCK I + II und die Cdc42-bindende Kinase MRCK α moduliert, auf der anderen Seite kontrolliert aber ein über Rac und die p21-aktivierte Kinasen 1 und 4 (PAK1 und 4) führender Signalweg ausschließlich die LIMK1-Funktion. Die Aktivierung von LIMKs kann dabei auch GTPase-unabhängig erfolgen. So ist der Wachstumsfaktor VEGF in der Lage, über den MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase-Signalweg eine Phosphorylierung und somit Aktivierung von LIMK1 in Endothelzellen zu induzieren (Kobayashi et al., 2006). Die testikulären TES-Kinasen werden dagegen unabhängig von PAKs durch Integrin-initiierte Signalwege reguliert (Toshima et al., 2001).

Die Frage der Reaktivierung der Cofilin-Funktionen durch Dephosphorylierung an Serin-3 wurde erst später geklärt. Insbesondere ist die Identität spezifischer Cofilin-Phosphatasen lange Zeit unklar geblieben. Die Serin/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A sind zwar in der Lage, Cofilin in T-Lymphozyten zu aktivieren (Ambach et al., 2000), in anderen Systemen kann Cofilin jedoch auch in Gegenwart von Inhibitoren dieser Phosphatasen aktiviert werden. Vor kurzem wurde gezeigt, dass Slingshot (SSH), eine Protein-Phosphatase mit Aktin-bindenden Eigenschaften, Cofilin in kultivierten Zellen und in zellfreien Assays dephosphorylieren kann (Niwa et al., 2002). SSH-Proteine (SSH1 - 3) sind Mitglieder der Familie dual-spezifischer Phosphatasen und weisen Ähnlichkeiten zu MAPK-Phosphatasen auf. Die Aktivität von SSH wird dabei durch eine direkte Rac und PAK4-vermittelte Phosphorylierung inhibiert. Darüber hinaus können 14-3-3-Proteine PAK4-phosphoryliertes SSH binden, im Zytoplasma vernetzen und so die SSH-Aktivität ebenfalls inhibieren (Nagata-Ohashi et al., 2004; Kim et al., 2009). Die Dephosphorylierungs-Aktivität von SSH gegenüber Cofilin wird hingegen *in vitro* und *in vivo* durch eine Bindung der Phosphatase an F-Aktin signifikant verstärkt (Nagata-Ohashi et al., 2004; Soosairajah et al., 2005; Yamamoto et al., 2006; Kurita et al., 2008). Bisher wurde nicht nur eine Regulation der SSH-Aktivität durch die Ca^{2+} /Calmodulin-induzierte Aktivierung der Protein-Phosphatase Calcineurin nachgewiesen (Wang et al., 2005), sondern es scheint auch eine Abhängigkeit der SSH-Aktivität von PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*)-vermittelten Signalprozessen zu bestehen (Nishita et al., 2004). Als SSH-Substrate wurden neben Cofilin auch die Aktin-regulierenden Proteine LIMK1 + 2 sowie Coronin 1B identifiziert (Soosairajah et al., 2005; Cai et al., 2007). Während ein Verlust der SSH-Funktion in *D. melanogaster* zu erhöhten F-Aktin- und Phosphocofilin-Leveln und in Folge dessen zu Störungen der epidermalen Zellmorphogenese führt (Niwa et al., 2002), spielt SSH in kultivierten und/oder primären Säugerzellen eine entscheidende Rolle bei der polarisierten Migration (Endo et al., 2003; Nagata-Ohashi et al., 2004; Nishita et al., 2005; Endo et al., 2007; Kligys et al., 2007; Wen et al., 2007; Kligys et al., 2009), der Regulation der Zytokinese (Kaji et al., 2003), der Migration und Invasion von Tumorzellen (Horita et al., 2008) und der Morphogenese (Rogers et al., 2005). Dabei ist SSH jedoch offenbar nicht in die Phosphoregulation sämtlicher bekannter Cofilin-abhängiger Prozesse involviert. So kann beispielsweise die Cofilin-vermittelte Aktin-Reorganisation im Rahmen von Zellproliferation und Zellteilung auch in Abwesenheit von SSH funktionell verlaufen (Niwa et al., 2002; Rogers et al., 2003). Diese Daten weisen klar auf die Existenz weiterer Cofilin-regulatorischer Phosphatasen hin.

I.4 Die Cofilin-spezifische Phosphatase Chronophin

Durch die Kombination von klassischer Säulenchromatographie und einem spezifischen Aktivitätsscreening wurde Chronophin (CIN), eine neuartige und strukturell nicht mit SSH verwandte Cofilin-aktivierende Phosphatase, von unserer Arbeitsgruppe aus Hirngewebe gereinigt und mittels biochemischer und zellbiologischer Methoden charakterisiert (Gohla et al., 2005).

Aufgrund seiner charakteristischen Domänenstruktur (s. Abb. 1.4), der kritischen Funktion eines hochkonservierten Aspartatrests im HAD (*haloazid dehalogenase*)-Motiv I für die Phosphataseaktivität und der beobachteten Insensitivität gegenüber konventionellen Phosphataseinhibitoren, wurde CIN als ein neues Mitglied der HAD-Superfamilie von Hydrolasen klassifiziert. Enzyme dieser Superfamilie wurden bisher im wesentlichen in Bakterien beschrieben (Burroughs et al., 2006). Dort konstituieren sie eine funktionell diverse Enzymfamilie, die eine grosse Anzahl an Haloazid-Dehalogenasen, Epoxid-Hydrolasen, P-Typ ATPasen und zahlreiche uncharakterisierte Phosphatasen umfasst (geschätzt werden insgesamt ca. 2000 Mitglieder).

	<u>Motif I</u>	<u>Motif II</u>	<u>Motif III</u>	
H. sapiens	²¹ GVLFD ^ψ CDGVL	⁵¹ GKAA ^ψ LFV ^ψ SNN	²⁰³ LVVGRPS... ²³⁴ LMVGRLETD	(NP_064711)
R. norvegicus	²¹ GVLFD ^ψ CDGVL	⁵¹ GKAT ^ψ LFV ^ψ SNN	²⁰⁵ LVVGRPS... ²²⁰ LMVGRLETD	(XP_216983)
M. musculus	²¹ GVLFD ^ψ CDGVL	⁵¹ GKNT ^ψ LFV ^ψ SNN	²⁰⁵ LVVGRPS... ²³⁰ LMVGRLETD	(AAR12209)
D. rerio	²³ QVLFD ^ψ CDGVI	⁵³ GKQV ^ψ FFV ^ψ TNN	²¹⁶ QVVGRPS... ²⁴¹ LMVGRRLD ^ψ TD	(AAH45860)
D. melanogaster	⁴¹ SVITD ^ψ CDGVL	⁷¹ GKSI ^ψ YFC ^ψ TNN	²³⁴ VVIGKPN... ²⁵⁹ LMIGRANTD	(NP_649015)
C. elegans	⁵⁸ TFIFD ^ψ ADGVI	⁸⁸ NKQI ^ψ IVL ^ψ TNN	²⁵³ LTVGRPC... ²⁸⁴ MMIGRINTD	(NP_504511)
A. thaliana	²⁶ TFIFD ^ψ CDGVI	⁵⁶ GKRL ^ψ VFV ^ψ TNN	²⁰⁴ LVVGRPS... ²²⁹ CMVGRRLD ^ψ TD	(BAA97552)
S. cerevisiae	²⁶ TFLF ^ψ DCD ^ψ GVL	⁵⁶ GKQL ^ψ IFV ^ψ TNN	²¹⁵ SYCGKPN... ²⁵⁰ CMVGRRLN ^ψ TD	(NP_010045)
S. pombe	²⁰ VFLFD ^ψ CDGVL	⁵⁰ GKQI ^ψ IFV ^ψ SNN	²¹⁶ KILGKPY... ²⁴¹ CFVGRRLN ^ψ TD	(NP_596255)
E. coli	⁵ NVICD ^ψ IDGVL	³⁵ GLPLVLL ^ψ TNY	¹⁷² FYVGRPS... ¹⁹⁷ VIVGNLRL ^ψ TD	(NP_752680)
H. sapiens CIN (D25N)	²¹ GVLFN ^ψ CDGVL	⁵¹ GKAA ^ψ LFV ^ψ SNN	²⁰³ LVVGRPS... ²³⁴ LMVGRLETD	
H. sapiens PSP	¹⁶ AVCFD ^ψ VDS ^ψ TV	¹⁰¹ NVQV ^ψ FLISGG	¹⁵⁵ ESGGRGK... ¹⁷⁵ IMIGD ^ψ GAT ^ψ DM	(AAH_63614)
Consensus	ψψψDXDX(V/T)	ψψψS/T	K(X _n)...ψψψGD(X _n)(D/E)	

Abbildung 1.4: Alignment der konservierten HAD-Motive von putativen CIN-Orthologen. Alle Mitglieder der HAD-Superfamilie verfügen über drei kurze, hochkonservierte Sequenzmotive. Die Phosphatasen dieser Familie sind durch das erste HAD-Motiv DXDY(V/T) charakterisiert, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Hochkonservierte Aminosäuren wurden schwarz, konservierte hydrophobe Reste grau markiert (ψ). Die GenBank-Identifikationsnummern sind auf der rechten Seite dargestellt. (Übernommen aus Gohla et al., 2005).

Die Funktionen der mehr als 40 im menschlichen Genom identifizierbaren Mitglieder der HAD-Typ-Hydrolasen (Duraphe & Gohla, unveröffentlichte Daten) sind derzeit grösstenteils unbekannt. Aufgrund von Sequenzvergleichen wird davon ausgegangen, dass es sich bei der Mehrzahl der HAD-Enzyme in Säugern um Mg²⁺-abhängige Phosphatasen handelt (Burroughs et al., 2006).

HAD-Phosphatasen besitzen eine strukturell ungewöhnliche, aus drei hochkonservierten HAD-Motiven zusammengesetzte Phosphatase-Domäne (Collet et al., 1998), und sind durch einen unkonventionellen und gegenüber klassischen Phosphatase-Inhibitoren insensitiven Phospho-Aspartat-Transferase Mechanismus gekennzeichnet (Aravind et al., 1998; Allen et al., 2004). Derzeit sind die Kenntnisse über die physiologischen Substrate und zellulären Aufgaben von HAD-Phosphatasen besonders in eukaryoten Organismen noch extrem limitiert. Interessant ist, dass der für die Organentwicklung in *D. melanogaster* und Mäusen wichtige Transkriptionsfaktor EYA (*eyes absent*) HAD-Domänen enthält und eine Protein-Phosphataseaktivität aufweist (Rayapureddi et al., 2003; Tootle et al., 2003). Zudem konnte für EYA kürzlich mit dem Histon H2AX ein erstes, physiologisch relevantes Protein-Substrat charakterisiert werden (Krishnan et al., 2009).

CIN ist evolutionär konserviert, und weist ein breites Expressionsmuster in Säugergewebe auf (Gohla et al., 2005). Die für das humane und murine CIN kodierenden Gene sind auf Chromosom 22q13.1 bzw. 15E1 lokalisiert, wobei die entsprechenden Genprodukte auf Aminosäure-Ebene ca. 93% Sequenzidentität besitzen. Endogenes CIN kolokalisiert mit Aktin und Cofilin in subzellulären Bereichen, in denen eine rasche Aktin-Remodellierung für die Zellmotilität und Mitose essentiell ist. Die Depletion von endogenem CIN durch RNA-Interferenz oder die Expression einer dominant negativen CIN-Mutante blockiert das physiologische Phospho-Cycling von Cofilin, stabilisiert F-Aktin Strukturen und verursacht massive Zellteilungsdefekte sowie die Anhäufung aneuploider Zellen (Gohla et al., 2005).

Während zwar allgemein akzeptiert ist, dass Cofilin eine entscheidende Rolle bei der zytoskelettalen Reorganisation während der Zellteilung spielt, sind die Mechanismen, die seine Aktivität und subzelluläre Lokalisation im Verlauf der Mitose bestimmen, jedoch nach wie vor nicht ausreichend verstanden. Bisherige Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass CIN in den verschiedenen Stadien der Mitose zusammen mit Cofilin eine dynamische Relokalisation in Bereiche aktiver Aktin-Reorganisation erfährt, welche für die Zellteilung essentiell sind. So kolokalisieren CIN und Cofilin während der späten Anaphase/Telophase an den dynamischen Zellpolen und akkumulieren dann transient und zeitgleich an der sich einschnürenden Teilungsfurche. Während der Zytokinese sind CIN und Cofilin im kontraktilen Aktomyosin-Ring zu finden und kolokalisieren in den späten Phasen der Zytokinese auch transient an der Plasmamembran (Gohla et al., 2005). In mitotischen HeLa-Zellen reduziert Wildtyp-CIN die zelluläre Phosphocofilin-Konzentration während der Mitose und Zytokinese, wohingegen die Expression einer Phosphatase-inaktiven CIN-Punktmutante oder die siRNA-vermittelte Depletion von CIN zu einer robusten Erhöhung des Phosphocofilin-Pools führt. Mitotische Zellen mit erhöhter oder erniedrigter CIN-Aktivität sind durch eine häufige Regression der Teilungsfurche, gefolgt vom Abbruch der Mitose oder

Zytokinese charakterisiert. Dies resultiert in einer Anhäufung multinukleärer Zellen (Gohla et al., 2005).

CIN ist auch in die PAR-2 (*protease-activated receptor-2*)- und β -Arrestin vermittelte Cofilin-Aktivierung impliziert worden (Zoudilova et al., 2007). Mit dem Hsp90 (*heat shock protein 90*) konnte kürzlich ein erster direkter Inhibitor der CIN-vermittelten Cofilin-Dephosphorylierung identifiziert werden. Unter ATP-Mangelbedingungen wird die Hsp90/CIN-Interaktion aufgehoben. Dies resultiert in einer Desinhibierung von CIN und damit einer erhöhten Cofilin-Dephosphorylierung. In kultivierten hippocampalen Neuronen kann dieser Mechanismus zu einer Akkumulation von Cofilin zusammen mit Aktin in charakteristischen bündelartigen Strukturen, den sogenannten *actin/cofilin rods*, führen. Dieser Mechanismus trägt möglicherweise dazu bei, dass Neuronen unter energetischen Stressbedingungen aktives Cofilin transient in diesen Strukturen akkumulieren, um auf diese Weise die dynamische Aktin-Reorganisation zu limitieren und den Energiebedarf der Zelle zu senken (Huang et al., 2008).

Nach der Isolierung und Charakterisierung von CIN als Cofilin-Phosphatase wurde deutlich, dass CIN bereits zuvor als Pyridoxal-Phosphatase (PDXP) entdeckt und beschrieben worden war (Fonda, 1992). Fonda und Kollegen waren dabei die Ersten, die CIN aus Erythrozyten isolierten und eine spezifische Phosphatase-Aktivität gegenüber den niedermolekularen Vitamin B₆-Komponenten Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP), Pyridoxin-Phosphat, Pyridoxamin-Phosphat, 4-Pyridoxinsäure-Phosphat und 4-Deoxypyridoxin-Phosphat nachweisen konnten (Fonda, 1992; Gao et al., 1994; Gao et al., 1994; Fonda et al., 1995). Hier wurde ebenfalls deutlich, dass die CIN-Aktivität gegenüber diesen Substraten Mg²⁺-abhängig verläuft und Michaelis-Menten-Kinetiken folgt. Später wurde PDXP durch Jang und Mitarbeiter molekular identifiziert, in *E. coli* als katalytisch-aktive PLP-Phosphatase produziert und basal charakterisiert (Jang et al., 2003). Neuere Befunde lassen vermuten, dass die CIN-vermittelte Dephosphorylierung von PLP an der Entstehung von morphologischen Veränderung des Aktin-Zytoskeletts im Hippocampus von Patienten mit Epilepsie beteiligt ist (Kim et al., 2008) und möglicherweise auch eine Rolle bei Aktin-Reorganisationsprozessen im Zuge von Langzeit-Potenzierung und synaptischer Plastizität von hippocampalen Neuronen spielt (Kim et al., 2009).

1.5 Das Kalzium- und Integrin-bindende Protein 1

Das *Calcium and integrin binding protein 1* (CIB1, auch bekannt als Calmyrin oder KIP, für *kinase interacting protein*; ist ein evolutionär konserviertes und in Säugern weit verbreitet exprimiertes Mitglied der EF-Hand-Familie von neuronalen Kalzium-Sensoren (Naik et al., 1997), zu der neben den vier CIB-Isoformen (CIB1 - 4) (Gentry et al., 2005) auch Proteine

wie NCS-1 (*neuronal calcium sensor 1*), Hippocalcin, Recoverin oder die KChIP (*Kv channel-interacting protein*)-Subfamilie gehören. Während die Funktion und Struktur von CIB1 derzeit intensiv untersucht wird, ist über die restlichen Isoformen noch fast nichts bekannt. Bei murinem CIB1 handelt es sich um ein kleines Protein von 191 Aminosäuren (M_r 22 kDa), das sich durch eine relativ hohe Sequenzhomologie (57%) zu Calcineurin B, der regulatorischen Untereinheit der heterodimeren, Kalzium-abhängigen Protein Phosphatase 2B (PP2B/Calcineurin) sowie dem Kalziumsensor Calmodulin auszeichnet (Gentry et al., 2005). CIB1 kann N-terminal myristoyliert werden, und so an Membranen translozieren (Stabler et al., 1999). Ein sogenannter Kalzium-Myristoyl-Switch konnte für CIB1 jedoch nicht nachgewiesen werden (Blazejczyk et al., 2006). Bei diesem Mechanismus kommt es durch die sequenzielle Bindung von zwei Kalzium-Ionen zu einer Konformationsänderung, welche die Freisetzung eines kovalent gebundenen Myristoylrestes aus einer hydrophoben Tasche induziert und dem Protein so die Bindung an Lipidmembranen ermöglicht (Babu et al., 1985; Zozulya et al., 1992). CIB1 besitzt insgesamt vier sogenannte EF-Hand-Motive, jeweils zwei in der N- und C-terminalen Domäne. Diese Motive sind in der Lage, Kalzium und/oder Magnesium spezifisch zu binden (Gifford et al., 2007). Es sind jedoch nur die C-terminalen EF-Hände (EF-Hand III und IV) funktionell: Die EF-Hand III weist mit $1,9 \mu\text{M}$ zwar die niedrigere Affinität für Kalzium auf, ist jedoch auch in der Lage Magnesium zu binden (Yamniuk et al., 2004). Demgegenüber handelt es sich bei der EF-Hand IV um eine reine Kalziumbindestelle mit relativ hoher Affinität ($0,54 \mu\text{M}$, Gentry et al., 2005). Die N-terminalen Motive können aufgrund von Insertionen und Punktmutationen keine divalenten Metallionen mehr binden (Yamniuk et al., 2008). Die Bindung von Kalzium und/oder Magnesium zeigt dabei stabilisierende Auswirkungen auf die sekundäre und tertiäre Struktur der beiden Domänen sowie auf die Gesamtstruktur des Proteins (Yamniuk et al., 2007).

CIB1 ist ein multifunktionales Protein und in der Lage, verschiedene Effektorproteine zu binden und deren Funktion und/oder Lokalisation zu modifizieren. Am eingehendsten wurde die Rolle von CIB1 bei der Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -vermittelten Signaltransduktion im Rahmen der Thrombozyten-Aggregation charakterisiert. Die Integrin-Aktivierung ist ein komplexer und bidirektional verlaufender Vorgang, bei dem das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ eine entscheidende Komponente darstellt. Das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ wird von Thrombozyten im Ruhezustand konstitutiv exprimiert, befindet sich aber in einem Zustand niedriger Affinität für Liganden, wie Fibrinogen oder den von Willebrand-Faktor. Intrazelluläre Signale führen zu einer Agonist-induzierten Konformationsänderung des Rezeptors, der dadurch in die Lage versetzt wird, Liganden mit hoher Affinität zu binden. Durch die Ligandenbindung wird anschließend ein spezifisches intrazelluläres Signal ausgelöst (Leisner et al., 2007). So konnten Studien belegen, dass die Überexpression von CIB1 in Megakaryozyten zu einer nahezu vollständigen Inhibierung der Agonist-induzierten Bindung an Fibrinogen führt, während die

siRNA-vermittelte Depletion von CIB1 in einer verstärkten Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung resultiert. Bei CIB1 handelt es sich also offenbar um einen negativen Regulator des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins (Barry et al., 2002; Yuan et al., 2006). Darüberhinaus scheint CIB1 auch während der Adhäsion von Thrombozyten an der Bildung von Lamellopodien, nicht jedoch Filopodien beteiligt zu sein (Naik et al., 2003). Kürzlich wurde auch eine Interaktion mit Talin, einem wesentlichen Mediator der Integrin-vermittelten Thrombozyten-Aktivierung nachgewiesen, wobei CIB1 die Bindung von Talin an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu regulieren scheint (Yuan et al., 2006). Weitere bekannte CIB1-Interaktoren sind PAK1 (Leisner et al., 2005), die kleine GTPase Rac3 (Haataja et al., 2002), die Ubiquitin-Ligase EDD (Henderson et al., 2002), der Transkriptionsfaktor Pax3 (Hollenbach et al., 2002), das Alzheimer-assoziierte Protein Presenilin-2 (Stabler et al., 1999; Blazejczyk et al., 2006), die Zellzyklus-regulatorischen, Polo-artigen Kinasen Fnk und Snk (Kauselmann et al., 1999; Ma et al., 2003) und die in die DNA-Reparatur involvierte, DNA-abhängige Proteinkinase (Wu et al., 1997). Interessanterweise wird bei einer Interaktion von CIB1 mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ die hydrophobe Ligandenbindungstasche von CIB1 erst nach einer Kalzium-induzierten Konformationsänderung zugänglich (Vallar et al., 1999). Zudem verfügt CIB1 offenbar über einen weiteren protektiven Mechanismus, bei dem die Ligandenbindungstasche konstitutiv durch eine Assoziation mit dem C-Terminus blockiert wird. Potentielle Bindungspartner müssen daher zunächst diesen verdrängen, bevor sie die Bindungstasche nutzen können. Dieser Mechanismus könnte eine Selbst-Assoziation der N- und C-terminalen Domäne von CIB1 verhindern oder die unspezifische Bindung anderer Proteine blockieren und funktioniert Kalzium-unabhängig (Yamniuk et al., 2006).

Mäuse, bei denen das CIB1-Gen durch homologe Rekombination deletiert wurde, zeigen zwar eine normale Entwicklung, jedoch erweisen sich die männlichen Tiere als steril. Dieser Phänotyp geht mit einer reduzierten Hodengröße sowie einer verminderten Spermienproduktion einher (Yuan et al., 2006) und ist mechanistisch noch völlig unverstanden. Darüberhinaus scheint CIB1 eine Rolle bei der Angiogenese nach pathologischen Veränderungen zu spielen, nicht jedoch bei der Angiogenese während der Embryonalentwicklung (Zayed et al., 2007). Interessanterweise zeigen CIB1^{-/-}-Mäuse jedoch offenbar keine pathologischen Merkmale, die auf eine Störung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelten Signalwegs schließen lassen würden, wie Hämorrhagien oder die vermehrte Bildung von Thromben (Yuan et al., 2006). Dies könnte auf eine mögliche Kompensation der CIB1-Funktionen in Thrombozyten durch andere Mitglieder der CIB-Familie hindeuten (Denofrio et al., 2008). Aufgrund der bereits beschriebenen Rolle von CIN bei der Cofilin-vermittelten Regulation des Aktin-Zytoskeletts während der Zellteilung und dem Einfluss des Cofilin-Signalwegs auf die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen, sollten in dieser Arbeit neue CIN-regulatorische Proteine und Signalwege untersucht werden.

II Fragestellung

Die Dynamik der Aktinfilament-Organisation ist essentiell für die Entwicklung und Funktion eukaryoter Organismen und wird daher durch eine Vielzahl Aktin-bindender Proteine räumlich und zeitlich strikt reguliert. Hierbei gilt der ubiquitär exprimierte Aktin-depolymerisierende Faktor Cofilin als Schlüsselregulator der Stimulus-induzierten Aktin-Zytoskelett-Dynamik. Die Cofilin-aktivierende Phosphatase Chronophin, ein neuartiges Mitglied der HAD-Superfamilie von Protein-Phosphatasen in Säugern, spielt in kultivierten Zellen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts während der Zellmigration und Mitose. Bisher existieren praktisch keine Informationen zur zellulären Regulation von CIN.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den in einem *yeast two-hybrid screen* identifizierten, potentiellen CIN-Interaktor CIB1 zu charakterisieren, um neue Erkenntnisse über die Regulation und Funktion von CIN auf zellulärer Ebene zu gewinnen. Dazu wurde:

- zunächst eine direkte Bindung von CIN und CIB1 mit Hilfe molekulargenetischer und biochemischer Methoden *in vitro* und in Zellen geprüft
- ein möglicher Einfluss der CIN/CIB1-Interaktion auf die CIN-Phosphataseaktivität *in vitro* getestet und
- eine putative Rolle von CIB1 bei der Regulation der CIN-Aktivität während der Mitose in einem zellulären Modellsystem untersucht.

Die Identifikation neuer CIN-Regulationsmechanismen könnte in Zukunft zu einem besseren Verständnis der Rolle von CIN bei der Kontrolle des dynamischen Aktin-Zytoskeletts sowie darauf basierender pathologischer Veränderungen führen.

III Material und Methoden

III.1 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme

Zelllinien:

GC-1 spg (ATCC): murine spermatogoniale Keimzelllinie, ATCC CRL-2053

HEK293T (DSMZ): humane Nierenzelllinie, ATCC CRL-1573

HeLa (ATCC): humane Epithelzelllinie aus einem Zervixkarzinom, ATCC CCL-2

Bakterienstämme:

E. coli TOP10 (Invitrogen, Leek, Niederlande): F⁻, *mcrA* D(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) f80*lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*

E. coli DH5 α (Invitrogen): F' Phi80*dlacZ DeltaM15 Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17*(rK-mK+) *phoA supE44 lambda- thi-1*

E. coli BL21 (DE3) pLysS (Merck, Darmstadt): F⁻, *ompT, hsdS_B* (r_B⁻, m_B⁻), *dcm, gal, lambda*(DE3), pLysS, Cm^r

E. coli XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande): *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac- F'*[*proAB+ lacIq lacZDM15 Tn10*(tetr)]

Hefestämme:

EGY48 (Clontech, Palo Alto, CA, USA): MATa *trp1 his3 ura3 LexAop(x6)-LEU2*

III.2 Plasmide

pcDNA3	Invitrogen, Leek, Niederlande
pEYFP-C1	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pEGFP-N1	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pECFP-N1	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pTrcHis A	Invitrogen, Leek, Niederlande
pGEX-4T-1	GE Healthcare, München

pMal-c2E	New England Biolabs, Frankfurt am Main
pB42AD	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pLexA	Clontech, Palo Alto, CA, USA
p8op-lacZ	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pCR 2.1-TOPO	Invitrogen, Leek, Niederlande
CIN (Maus) in pcDNA3	diese Arbeit
CIN (Maus) in pTrcHis A	diese Arbeit
CIN (Maus) in pCR 2.1-TOPO	diese Arbeit
CIN (Maus) in pMal-c2E	diese Arbeit
CIN (Maus) in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) in pEYFP-C1	diese Arbeit
CIB1 (Maus) in pcDNA3	diese Arbeit
CIB1 (Maus) in pGEX-4T-1	diese Arbeit
CIB1 (Maus) in pECFP-N1	diese Arbeit
CIB1 (Maus) in pEGFP-N1	diese Arbeit
CIB1 (Maus) G2A in pECFP-N1	diese Arbeit
CIB1 (Maus) in pB42AD	diese Arbeit
CIB1 (Maus) D127N in pGEX-4T-1	diese Arbeit
CIB1 (Maus) E172Q in pGEX-4T-1	diese Arbeit
CIN (Maus) 51-292 AS in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) 65-292 AS in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) 80-292 AS in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) 85-292 AS in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) 100-292 AS in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) 153-292 AS in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) 1-140 AS in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) 1-104 AS in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) 1-96 AS in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) 1-85 AS in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) 1-80 AS in pLexA	diese Arbeit
CIN (Maus) 1-76 AS in pLexA	diese Arbeit
CIB1 (Maus) 1-178 AS in pB42AD	diese Arbeit
CIB1 (Maus) 1-173 AS in pB42AD	diese Arbeit
CIB1 (Maus) 1-160 AS in pB42AD	diese Arbeit
CIB1 (Maus) 1-128 AS in pB42AD	diese Arbeit
CIB1 (Maus) 1-173 AS in pGEX-4T-1	diese Arbeit

Hippocalcin in pEGFP-N1	diese Arbeit
pLKO.1-puro	Sigma, Deisenhofen

III.3 Chemikalien und Enzyme

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Merck KgaA (Darmstadt), Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz) und Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim) bezogen. Alle Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser (Millipore, Molsheim) angesetzt und soweit erforderlich für 21 Minuten bei 120 °C und 1,2 bar autoklaviert oder mit einer 0,22 µm-Sterilfiltrationseinheit (Millipore) sterilfiltriert.

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Applichem, Darmstadt
bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Sigma, Deisenhofen
bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V, Protease-frei	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	GE Healthcare, München
Coomassie blue Serva R	Serva, Heidelberg
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Genaxxon, Stafflangen
4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Sigma, Deisenhofen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluca, St. Gallen, Schweiz
Dithiothreitol (DTT)	ICN, Eschwege
DNA aus Heringssperma	Clontech, Palo Alto, CA, USA
DNase	Sigma, Deisenhofen
<i>Dropout-Zusätze (DO supplement)</i>	Clontech, Palo Alto, CA, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Gibco BRL, Eggenstein
<i>Dulbecco's Phosphat Bufferd Saline w/o Ca²⁺/Mg²⁺</i> (D-PBS)	Genaxxon, Stafflangen
<i>Dulbecco's Phosphat Bufferd Saline +Ca²⁺/Mg²⁺</i> (D-PBS)	Genaxxon, Stafflangen
<i>ECL Western Blot Detection System</i>	GE Healthcare, München

Enterokinase	Roche Diagnostics, Mannheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EGTA)	Serva, Heidelberg
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
Galaktose	Sigma, Deisenhofen
Gelatine	Difco Laboratories, Detroit, USA
Glukose	Sigma, Deisenhofen
Glutathion Sepharose 4B	GE Healthcare, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren	Difco Laboratories, Detroit, USA
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
<i>High Fidelity RNA PCR Kit</i>	Takara Bio Inc., Saint- Germain-en-Laye, Frankreich
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Deisenhofen
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Calbiochem, Frankfurt
LB-Flüssigmedium	Applichem, Darmstadt
LB-Medium für Agarplatten	Applichem, Darmstadt
Leupeptin	Applichem, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Leek, Niederlande
Lithiumacetat (LiAc)	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Serva, Heidelberg
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt

Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Maltose	Sigma, Deisenhofen
MBP-Agarose	New England Biolabs, MA, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Deisenhofen
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Nocodazole	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P40 (NP40)	Calbiochem, Frankfurt
Okadainsäure	Calbiochem, Frankfurt
Oligonukleotide	Operon, Köln
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Deisenhofen
Pefabloc SC PLUS	Roche Diagnostics, Penzberg
PEG 4000	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Pepstatin	Applichem, Darmstadt
Pepton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Platinum <i>Pfx</i> DNA-Polymerase	Invitrogen, Leek, Niederlande
Poly-L-Lysine	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
ProLong Gold Antifade Reagent	Invitrogen, Leek, Niederlande
n-Propanol	Roth, Karlsruhe
PLP	Sigma, Deisenhofen
Raffinose	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>TALON Metal Affinity Resin</i>	Clontech, Palo Alto, CA, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Thrombin Protease	GE Healthcare, München
Thymidin	Sigma, Deisenhofen
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Merck, Darmstadt

Tris (hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trizol	Invitrogen, Leek, Niederlande
Trypton	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Appllichem, Darmstadt
X-Gal	Sigma, Deisenhofen
Yeast-Pepton-Dextrose-Medium (YPD-Vollmedium)	Roth, Karlsruhe

III.4 Antikörper und Antiseren

anti- β -Aktin, monoklonal, aus Maus (Klon C4)	ICN, Eschwege
anti-Calmodulin, monoklonal, aus Maus	Upstate, MA, USA
anti-CIB1, polyklonal, aus Kaninchen	diese Arbeit
anti-CIN, monoklonal, aus Kaninchen	diese Arbeit/ Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
anti-Cofilin, polyklonal, aus Kaninchen	Cytoskeleton, Denver, CO, USA
anti-GAPDH, polyklonal, aus Maus	GeneTex Inc, CA, USA
anti-Kaninchen-IgG, polyklonal, HRP-gekoppelt, aus Ziege	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
anti-LexA, polyklonal, aus Kaninchen	Invitrogen, Leek, Niederlande
anti-Maus-IgG, polyklonal, HRP-gekoppelt, aus Kaninchen	Dako, Glostrup, Dänemark
anti-Phosphocofilin, polyklonal, aus Kaninchen	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
anti-Tubulin (clone DM1A), monoklonal, aus Maus	Sigma, Deisenhofen
Alexa Fluor 488, anti-Kaninchen IgG, aus Ziege, (H + L), <i>highly cross absorbed</i>	Invitrogen, Leek, Niederlande
Alexa Fluor 488, anti-Maus IgG, aus Ziege, (H + L), <i>highly cross absorbed</i>	Invitrogen, Leek, Niederlande
Alexa Fluor 546, anti-Kaninchen IgG, aus Ziege (H + L), <i>highly cross absorbed</i>	Invitrogen, Leek, Niederlande
Alexa Fluor 546 Phalloidin	Invitrogen, Leek, Niederlande

III.5 Oligonukleotide

Für PCR und DNA-Ligationen wurden salzfreie Oligonukleotide der Firma Operon Biotechnologies GmbH (Köln) eingesetzt. Die Schmelztemperatur (T_M) wurde nach der Formel, $T_M = 69,3 + G/C\text{-Gehalt [\%]} \times 0,41 - 650 / \text{Länge des Oligonukleotids [nt]}$, (Chester et al., 1993) berechnet. Restriktionsschnittstellen, welche über die Oligonukleotide in Sequenzen eingefügt wurden, sind unterstrichen dargestellt (s. Tabelle III.1).

Tabelle III.1: Verwendete Oligonukleotide:

Oligonukleotid	Orientierung	Sequenz	Spezies
mCINforw	Forward	5'- <u>GAATTCGGATCC</u> ATGGCGCGCGCTGCGAGC-3'	Maus
mCINrev	Reverse	5'- <u>CTGCAGTCATCTCGAGT</u> AGTCCTCCAGCCCCTCCATC-3'	Maus
EFIIImutaforw	Forward	5'-CCCTGGACAGAGAAAACCTGAGCCAGCTTGTG-3'	Maus
EFIIImutarev	Reverse	5'-CACAAGCTGGCTCAGGTTTTCTGTCCAGGG-3'	Maus
EFIVmutaforw	Forward	5'-GACCATCAATCTTTCCAGTTCAGCATGTCATCTCG-3'	Maus
EFIVmutarev	Reverse	5'-CGAGATGACATGCTGGAAGTGGAAAGATTGATGGTC-3'	Maus
CIBpcDNA3forw	Forward	5'-ATCTAGAATTCGCCACCATGGGAGGTTCCGGGCAG-3'	Maus
CIBpTriExstoprev	Reverse	5'-CGTCGCTCGAGTCACAGGACAATCTTAAAGG-3'	Maus
mCINy2hdIforw	Forward	5'-ATTGAGAATTCATGGCGCGCGCTGCGAGCGG-3'	Maus
mCINy2hdIrev	Reverse	5'-ATTGACTCGAGTCAGCGCACGCGCGGGTCC-3'	Maus
mCINy2hdVIIIrev	Reverse	5'-CTTCCCTCGAGTCAGGGCGGCCCGACAGCCG-3'	Maus
mCINy2hdIXrev	Reverse	5'-CTTCCCTCGAGTCACAGGAGGAGGCGCGCGGCACA-3'	Maus
mCINy2hdXIrev	Reverse	5'-CTTCCCTCGAGTCAGAGCTGCT-CGGCGCGCAG-3'	Maus
mCINy2hdXIIrev	Reverse	5'-ATTGAGTCGACTCACAGCCCCGGAAGCC-3'	Maus
mCINy2hdXIVrev	Reverse	5'-ATTGAGTCGACTCAGCCCAGGCGGGCGAAG-3'	Maus
mCINy2hdIIrev	Reverse	5'-ATTGACTCGAGTCAGTCCTCCAGCCCCTCCATC-3'	Maus
mCINy2hdIIIforw	Forward	5'-CTTCCGAATTCATGGGCAAGAACACGCTG-3'	Maus
mCINy2hdVforw	Forward	5'-ATTGAGAATTCATGCCCGAGCTGGCG-CTG-3'	Maus
mCINy2hdVIforw	Forward	5'-ATTGAGAATTCATGCGCGCCGAGCAGCTC-3'	Maus
mCINy2hdXIIIforw	Forward	5'-CTTCCGAATTCATGTTTCAGCTCCGCGCTG-3'	Maus
mCINy2hdIVforw	Forward	5'-ATTGAGAATTCATGTC-CGGGCGGCCGAC-3'	Maus
mCINy2hdIVrev	Reverse	5'-CTTCCCTCGAGTCACGAGATGACATGCTGGAA-3'	Maus
CIBy2hrev1	Reverse	5'- <u>ACTCGAGTC</u> AGAAGTTCGAAAGATTGATG-3'	Maus
CIBy2hrev2	Reverse	5'- <u>ACTCGAGTC</u> ATGACTCTCCAGGATATTG-3'	Maus
CIBy2hrev3	Reverse	5'- <u>ACTCGAGTC</u> CACAGGTCTTCTGTCCAG-3'	Maus
CIBpTrcHisAforw	Forward	5'-ATCT <u>ACTCGAG</u> ATGGGAGGTTCCGGGCAG-3'	Maus
CIB-pEGFPprev3	Reverse	5'-CGTCGGGATCCGTCAGGACAATCTTAAAGGAGC-3'	Maus
mCIN-pEXFPforw	Forward	5'-ATTGAAAGCTTGTATGGCGCGCGCTGCGAGCGG-3'	Maus
mCIN-pEXFPprev	Reverse	5'-GTTAAGGATCCTCAAGTCGACTCGTCTCCAGCCCCT-3'	Maus

III.6 Sonstige Materialien

Bio-Spin/Micro Bio-Spin Säulen	Bio-Rad, CA, USA
Centricons, Trenngrenze 3 kDa	Millipore, MA, USA
Deckgläser	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Econo-Glassäulen	Bio-Rad, CA, USA
<i>GeneRuler 1 kb DNA Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
Hybond C Nitrozellulose-Membran	GE Healthcare, München
<i>Micro BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce/Thermo Scientific, Bonn
Mikrotiterplatten Falcon 3912	BD Biosciences, Heidelberg
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Precision Plus Protein Standard</i>	Bio-Rad, CA, USA
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Qiagen Plasmid Purification Kits</i>	Qiagen, Hilden
<i>QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Röntgenfilme (SuperRX)	Fuji Photo Film, Tokyo, Japan
<i>TOPO TA Cloning Kit</i>	Invitrogen, Leek, Niederlande
Transferpapier GB002	Schleicher und Schuell, Dassel

III.7 Molekularbiologische Methoden

III.7.1 Plasmidisolierung in kleinem Maßstab (Minipräparation)

Zur Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) verwendet. Dazu wurde jeweils eine 3 ml Bakterienkultur des entsprechenden Klons in Medium mit 50 µg/ml Ampicillin (LBamp) oder 50 µg/ml Kanamycin (LBkan) über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Die Bakterien wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 14.000 rpm für eine Minute bei RT in der Tischzentrifuge (Zentrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei das gereinigte DNA Pellet in 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) gelöst wurde.

Im Anschluss konnte die Konzentration der DNA in einer 1:100 Verdünnung photometrisch bestimmt werden (s. III.7.8). Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

III.7.2 Plasmidisolierung in großem Maßstab (Maxipräparation)

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurde das *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden über Nacht 250 ml Bakterienkultur des entsprechenden Klons in LB-Medium unter den in Abschnitt III.7.1 beschriebenen Bedingungen angezogen. Die Bakterienkultur wurde für 10 min bei 4 °C und 6000 x *g* zentrifugiert (Avanti J-20 XP, Beckman Coulter, Krefeld) und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes den Herstellerangaben entsprechend weiterverarbeitet. Dabei wurden die Volumina der Lösungen an das Ausgangsvolumen der Bakterienkultur angepasst. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in ca. 200 - 500 µl EB-Puffer aufgenommen und die DNA-Konzentration im Spektralphotometer bestimmt (s. III.7.8) und auf 1 µg/µl eingestellt, anschließend wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

III.7.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Der enzymatische Verdau von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Puffer für Einzel- und Doppelverdaue. Die Spaltung der Plasmid-DNA erfolgte mit 10 U Enzym/µg DNA bei einer Temperatur von 37 °C (Thermomixer compact, Eppendorf) für eine Stunde. Die Effizienz der Verdaue wurde mittels Agarosegelelektrophorese (s. III.7.4) überprüft.

III.7.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarosegelelektrophorese in Flachbettapparaturen mit einfach TAE (40 mM Tris-Acetat, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8) als Laufpuffer. Je nach Größe der zu erwartenden Fragmente wurde ein 1 - 2%iges Agarosegel mit einfach TAE angesetzt. Zur späteren Detektion wurde dem Gel der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit sechsfach DNA-Probenpuffer versetzt. Als Größenmarker diente der Marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas). Die Auftrennung wurde auf einem UV-Tisch ausgewertet und mittels *DIANA Chemiluminescence Detection System* (Raytest, Straubenhardt) dokumentiert.

III.7.5 Elution von DNA aus Agarosegelen

Um ein bestimmtes DNA-Fragment zu isolieren, wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell möglichst exakt ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (s. III.7.8) und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

III.7.6 Ligation

Mit Hilfe des Enzyms Ligase können überhängende komplementäre oder glatte Enden doppelsträngiger DNA miteinander verbunden werden. Hier wurde Insert zu Vektor in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Es wurden ca. 100 ng Vektor, ca. 300 ng Insert, 3 µl 10 x Ligations-Puffer (Fermentas), 1 µl T4 DNA Ligase (5 U/µl, Fermentas) verwendet und mit H₂O auf 30 µl aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei RT inkubiert und ein Teil zur Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet.

III.7.7 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Transformation der chemisch kompetenten *E. coli* TOP10-, D5α- und BL21 (DE3) pLysS-Zellen wurden 50 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5 - 10 µl des Ligationsansatzes vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock der Zellen für 45 s bei 42 °C (Thermomixer compact, Eppendorf). Anschließend wurden die Zellen wieder auf Eis transferiert und mit 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glukose, pH 7) versetzt. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln bei 120 rpm im Schüttelinkubator. Für die Selektion wurden jeweils zwischen 50 - 250 µl des Transformationsansatzes auf mit Ampicillin oder Kanamycin versetzten LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Verifizieren der positiven Klone erfolgte nach Plasmidisolierung (s. III.7.1) durch Restriktionsverdau (s. III.7.3) und gegebenenfalls Sequenzierung (GATC, Konstanz).

III.7.8 Quantifizierung von DNA durch photometrische Messung

Für die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration wurde das Spektralphotometer DU 800 Spektrophotometer (Beckman Coulter) verwendet. Die Messung der Extinktion erfolgte in Quarzküvetten (d = 1 cm) bei 260 und 280 nm gegen H₂O. Für die

Konzentrationsberechnung wurde zugrunde gelegt, dass eine OD_{260} von eins einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ entspricht. Der Reinheitsgrad der isolierten DNA wurde über den Quotienten A_{260}/A_{280} ermittelt.

III.7.9 Isolierung von RNA aus murinem Gewebe

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Hirngewebe wurde ein Mäusehirn (ca. 180 mg Gewebe) in 5 ml Trizol (Invitrogen, Leek, Niederlande) aufgenommen und anschließend mit Hilfe des Euro Turrax T20S (Ika Labortechnik, Staufen) auf Eis homogenisiert. Zu dem Gewebelysat wurde 0,2 ml Chloroform/ml Trizol zugegeben, die Reaktionsgefäße für 15 s vorsichtig geschüttelt und für zwei Minuten bei RT inkubiert. Durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 x g wurde der Ansatz in drei Phasen getrennt: Die obere farblose Phase, in der sich die Gesamt-RNA befand, eine Interphase, welche die Proteine enthielt und eine untere Phenol/Chloroform-Phase. Die obere Phase wurde abgenommen und die RNA mit 0,5 ml Isopropanol gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 15.000 x g wurde die RNA mit 75% Ethanol/DEPC-H₂O gewaschen, 10 min getrocknet und in DEPC-H₂O gelöst. Um einer Kontamination der RNA mit genomischer DNA vorzubeugen, wurde zusätzlich ein DNA-Verdau durchgeführt. Dazu wurde folgender Ansatz hergestellt: 20 μl RNA, 2,5 μl 10 x DNase-Puffer und 2,5 μl DNase. Die Reaktion erfolgte 30 min bei 37 °C und im Anschluss wurde das Enzym bei 65 °C für 15 min hitzeinaktiviert. Die extrahierte RNA wurde einer photometrischen Konzentrationsbestimmung (s. III.7.8) unterzogen, wobei der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm zwischen 1,8 und 2 liegen sollte. Anschließend wurde die RNA direkt weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

III.7.10 PCR-Techniken

Die Polymerasekettenreaktion diente der Vervielfältigung von DNA-Bereichen, welche durch spezifische Oligonukleotide (Primer) definiert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die PCR verschiedene thermostabile Polymerasen verwendet. Für die reverse Transkriptase-PCR (s. III.7.10.2) wurde die reverse Transkriptase des *High Fidelity RNA PCR Kit* (Takara Bio Inc.) eingesetzt. Für das Synthetisieren von DNA-Fragmenten, bei denen die Genauigkeit der Sequenz von besonderer Bedeutung war, wurde eine Proof-Reading-DNA-Polymerase aus *Thermococcus* sp. (Platinum *Pfx*-DNA-Polymerase, Invitrogen) verwendet, die über eine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität (Korrekturlesefähigkeit) verfügt. Alle PCR-Reaktionen wurden in 500 μl Reaktionsgefäßen im Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt. Das Verifizieren der PCR-Ergebnisse erfolgte über Agarosegelelektrophorese (s. III.7.4).

III.7.10.1 Standard-PCR

Das Ansetzen der PCR wurde nach den jeweiligen Herstellerangaben der verwendeten Enzyme in einem Volumen von 25 μl durchgeführt. Die verwendeten dNTPs wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Um Restriktionsschnittstellen oder His-Tag-Sequenzen in die PCR-Produkte einzufügen, folgten einer fünfminütigen initialen Denaturierung der DNA bei 95 °C, 25 Reaktionszyklen von Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation. Hierbei erfolgte die Denaturierung bei 95 °C für 1 min. Das Anlagern der Primer wurde für 1 min bei einer Temperatur durchgeführt, welche in der Regel 3 °C unter der niedrigeren der berechneten T_M (s. III.5) beider Oligonukleotide lag. Die Elongation erfolgte für 1 min (CIB1) oder 1,5 min (CIN) bei einer Temperatur von 68 °C. Nach einer terminalen Elongation von 1 min bei der vorangegangenen Elongationstemperatur wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (s. III.7.4) analysiert.

III.7.10.2 Reverse Transkriptase-PCR

Zur Gewinnung von cDNA aus Geweben oder Zellysaten wurde dem PCR-Verfahren eine reverse Transkriptase (RT)-Reaktion vorgeschaltet. Dazu wird aus der RNA mit Hilfe spezifischer Primer und dem Enzym reverse Transkriptase eine einzelsträngige cDNA hergestellt. Die RT-PCR wurde in dieser Arbeit zur Gewinnung von CIN-cDNA aus murinem Hirngewebe eingesetzt. Hierzu wurde Gesamt-RNA, wie unter Abschnitt III.7.9 beschrieben, aus Mäusehirn isoliert. Zur Herstellung der cDNA wurden 3,5 μg Gesamt-RNA, sowie 1 μl RTase (Takara), 4 μl MgSO_4 (25 mM), 1 μl dNTPs (10 mM), 0,5 μl RNase-Inhibitor, 10 μl 2x RTase-Puffer und 1 μl Oligo dT Primer (Roche, Mannheim) verwendet und mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 20 μl gebracht. Die Reaktion wurde für 17 Zyklen (65 °C für 1 min, 30 °C für 1 min, 30 °C für 30 s, +1 °C/Zyklus) durchgeführt.

Für die nachfolgende PCR wurden 5 μl der so generierten cDNA als Matrize, Platinum *Pfx* DNA-Polymerase nach Herstellerangaben und die Oligonukleotide mCINforw und mCINrev (s. Tabelle III.1) eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde initial für 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend erfolgte die Amplifikation für 26 Zyklen (95 °C für 1 min, 60 °C für 1 min, 68 °C für 2 min). Nach einer terminalen Elongation von einer Minute bei der vorangegangenen Elongationstemperatur wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (s. III.7.4) analysiert.

III.7.11 Ortsgerichtete Punktmutagenese

Zum gezielten Austausch von einzelnen Aminosäuren innerhalb eines Proteins wurde das *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene nach Herstellerangaben verwendet. Die Punktmutagenese der CIB1 EF-Hand-Motive III (D127N) und IV (E172Q) erfolgte dabei mit Hilfe der HPLC-gereinigten Oligonukleotide EFIIImutaforw und EFIIImutarev sowie EFIVmutaforw und EFIVmutarev (s. Tabelle III.1), wobei murines CIB1 in pGEX-4T-1 als Matrize diente. Die PCR wurde für 12 Zyklen (95 °C für 30 s, 55 °C für 1 min, 68 °C für 6 min) durchgeführt und das erhaltene Produkt anschließend in XL1 Blue-Zellen transformiert (s. III.7.7).

III.7.12 Computergestützte Analyse von DNA-Sequenzen

Die Analyse von Sequenzen sowie deren graphische Darstellung erfolgte mit den Programmen *ContigExpress* und *AlignX* aus dem Programmpaket *VectorNTI Suite 10* (Invitrogen) sowie mit dem Programm *Chromas, Version 1.43* (C. McCarthy, Brisbane, Australien).

III.7.13 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Für die Herstellung von Expressionsplasmiden wurde die nachfolgende Strategie verwendet. Das Einfügen von geeigneten Schnittstellen direkt vor und nach der cDNA erfolgte mittels PCR (s. III.7.10) unter Verwendung der Platinum *Pfx*-Polymerase. Die dabei entstandenen Fragmente wurden entweder zunächst in pCR 2.1-TOPO inseriert, mittels Restriktionsenzymen herausgeschnitten (s. III.7.3) und weiter in die finalen Vektoren subkloniert (s. III.7.6), oder nach der PCR gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. III.7.4), eluiert (s. III.7.5), mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und dann in die finalen Vektoren eingefügt. Die Sequenzen aller PCR-generierten Fragmente wurden durch Sequenzierung verifiziert (GATC Biotech). Für die bakterielle Proteinexpression wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS verwendet.

Murines CIN für die eukaryotische Expression:

Für die Generierung von Vektoren für die CIN-Expression in eukaryotischen Systemen wurde die CIN-cDNA mittels reverser Transkriptase-PCR (s. III.7.10.2) und Standard-PCR mit den Oligonukleotiden mCINforw und mCINrev (s. Tabelle III.1) aus murinem Hirnlysats (s. III.7.9) amplifiziert, in pCR 2.1-TOPO inseriert und anschließend über die *BamHI*- und

EcoRI-Schnittstellen in den Vektor pcDNA3 für die Expression in Säugerzellen, sowie über *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pLexA für die Expression in Hefezellen subkloniert. N-terminal YFP-markiertes CIN (YFP-CIN) wurde mittels PCR und den Primern mCIN-pEXFPforw und mCIN-pEXFPfrev (s. Tabelle III.1) aus CIN in pcDNA3 amplifiziert und mit Hilfe der *HindIII*- und *BamHI*-Schnittstellen in den Vektor pEYFP-C1 eingefügt.

Die Erstellung von CIN-Deletionskonstrukten für Reporter-Experimente im *two-hybrid*-System erfolgte über PCR mit CIN in pcDNA3 als Matrize sowie den folgenden Oligonukleotid-Kombinationen (s. Tabelle III.2). Die erhaltenen Fragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SalI* in den Vektor pLexA inseriert.

Tabelle III.2: Oligonukleotide für die Herstellung von CIN-Deletionskonstrukten:

Oligonukleotid Forward/Reverse		Vektor	Aminosäuren
mCINy2hdIforw	mCINy2hdVIIrev	pLexA	1-104
mCINy2hdIforw	mCINy2hdIXrev	pLexA	1-96
mCINy2hdIforw	mCINy2hdXIrev	pLexA	1-85
mCINy2hdIforw	mCINy2hdXIIrev	pLexA	1-80
mCINy2hdIforw	mCINy2hdXIVrev	pLexA	1-75
mCINy2hdIIforw	mCINy2hdIIrev	pLexA	51-292
mCINy2hdVforw	mCINy2hdIIrev	pLexA	65-292
mCINy2hdVIforw	mCINy2hdIIrev	pLexA	80-292
mCINy2hdXIIIforw	mCINy2hdIIrev	pLexA	85-292
mCINy2hdIVforw	mCINy2hdIIrev	pLexA	100-292

Murines CIN für die bakterielle Expression:

Für die Produktion von rekombinantem His₆- oder MBP-markierten CIN in Bakterien wurde die CIN-cDNA ausgehend von dem Vektor CIN in pCR 2.1-TOPO über die *BamHI*- und *EcoRI*-Schnittstellen in den Vektor pTrcHis A inseriert (His-Tag-CIN). Aus pTrcHis A wurde die CIN-cDNA wiederum mit Hilfe von *BamHI*- und *HindIII*-Schnittstellen in den Vektor pMal-c2E subkloniert (MBP-CIN).

Murines CIB1 für die eukaryotische Expression:

Für die Generierung von eukaryotischen Expressionsvektoren wurde die CIB1-cDNA aus dem Vektor pB42AD-CIB1 mittels PCR sowie den Oligonukleotiden CIBpcDNA3forw und CIBpTriExstoprev (s. Tabelle III.1) amplifiziert, wobei gleichzeitig eine Kozak-Sequenz am 5'-Ende des cDNA-Fragments eingefügt wurde. Anschließend wurde das Fragment über *EcoRI*- und *XhoI*-Schnittstellen in den Vektor pcDNA3 inseriert. C-terminal GFP- oder CFP-markiertes CIB1 (CIB1-GFP, CIB1-CFP) wurde mittels PCR und den Primern CIBpTrcHisAforw und CIB-pEGFPprev3 (s. Tabelle III.1) aus CIB1 in pcDNA3 amplifiziert und mit Hilfe der *XhoI*- und *BamHI*-Schnittstellen in die Vektoren pEGFP-N1 oder pECFP-N1 eingefügt.

Die Herstellung von CIB1-Deletionskonstrukten für Reporteragen-Experimente im *two-hybrid* System erfolgte ebenfalls über PCR mit CIB1 in pB42AD als Matrize sowie den folgenden Oligonukleotid-Kombinationen (s. Tabelle III.3). Die erhaltenen Fragmente wurden anschließend über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pB42AD inseriert.

Tabelle III.3: Oligonukleotide für die Erstellung von C-terminalen CIB1-Deletionskonstrukten:

Oligonukleotid Forward/Reverse		Vektor	Aminosäure	Konstrukt
CIBpcDNA3forw	CIBy2hdIVrev	pB42AD	1-178	CIB1 ¹⁻¹⁷⁸
CIBpcDNA3forw	CIBy2hrev1	pB42AD	1-173	CIB1 ¹⁻¹⁷³
CIBpcDNA3forw	CIBy2hrev2	pB42AD	1-160	CIB1 ¹⁻¹⁶⁰
CIBpcDNA3forw	CIBy2hrev3	pB42AD	1-128	CIB1 ¹⁻¹²⁸

Murines CIB1 für die bakterielle Expression:

Für die Produktion von rekombinantem GST-markierten CIB1 wurde die CIB1-cDNA aus dem Vektor pcDNA3 über die *NcoI*- und *XhoI*-Schnittstellen in den Vektor pGEX-4T-1 eingefügt. Das CIB1-Deletionskonstrukt 1-173 wurde desweiteren für die Proteinproduktion in *E. coli* aus dem Vektor pB42AD über die *EcoRI*- und *XhoI*-Schnittstellen in den Vektor pGEX-4T-1 subkloniert.

III.8 Zellbiologische Methoden

III.8.1 Zellkultur und Transfektion

Die Kultivierung von GC-1 spg-, HeLa und HEK293T erfolgte in DMEM mit 4,5 g/l Glukose, versetzt mit 10% FCS, (Gibco), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco, Vollmedium) bei 5% CO₂ und 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (Inkubator B 5060, Heraeus, Hanau). Für mikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen auf Glasplättchen ausgebracht.

Die transiente Transfektion von subkonfluenten Zellen für biochemische Analysen und konfokale Fluoreszenzuntersuchungen wurde mit Hilfe von Lipofectamine™ 2000 durchgeführt. Für Ø 3 cm Schalen wurde pro Ansatz 3 µl Lipofectamine™ 2000 mit 250 µl OptiMEM gemischt und für 5 min bei RT inkubiert (für Ø 10 cm Schalen wurde die fünffache Menge verwendet). Anschließend wurden jeweils 0,1 - 1 µg Plasmid-DNA (pcDNA3-CIN, YFP-CIN, pcDNA3-CIB1, CIB1-GFP, CIB1-CFP oder Hippocalcin-GFP) bzw. 12 - 25 nM siRNAs in 250 µl OptiMEM verdünnt, mit dem Lipofectamine-Ansatz durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden adhären Zellen zweimal mit Ca²⁺/Mg²⁺-freiem D-PBS gewaschen und je 1 ml OptiMEM/Ø 3 cm Schale zugegeben. Abschließend wurde die Lipofectamine-DNA-Lösung tröpfchenweise zu den Zellen gegeben und durch Schwenken verteilt. Nach sechs Stunden Inkubation wurde Vollmedium zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen für biochemische Analysen verwendet oder mikroskopisch untersucht.

III.8.2 Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von endogenen oder transient überexprimierten Proteinen wurden die HeLa- oder GC-1 spg-Zellen für 20 min in 4% Paraformaldehyd bei RT fixiert. Im Fall der Überexpression fluoreszierender Proteine wurden die Zellen direkt nach der Fixierung in *ProLong Gold Antifade* Reagenz eingebettet und später konfokalmikroskopisch ausgewertet. Zur Detektion nicht Fluoreszenz-markierter Proteine wurden die Zellen nach der Fixierung für 10 min mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert. Die permeabilisierten Zellen wurden für eine Stunde in 3% BSA in Ca²⁺/Mg²⁺-freiem D-PBS blockiert und nachfolgend für 2 h mit einem anti-CIN (1:200) oder anti-CIB1 (1:100) Antikörper in 1% BSA in Ca²⁺/Mg²⁺-freiem D-PBS bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Ca²⁺/Mg²⁺-freiem D-PBS gewaschen und für 1 h mit einem sekundären Alexa Fluor-488 oder -546-markierten anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (1:400) in Ca²⁺/Mg²⁺-freiem D-PBS mit 1% BSA bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Proben

für 5 min mit DAPI gefärbt (1:5000 in D-PBS), in *ProLong Gold Antifade* Reagenz eingebettet und konfokalmikroskopisch ausgewertet.

Für die Stimulation von lebenden Zellen mit Ionomycin wurden die transfizierten Zellen für 30 min bei 37 °C mit 0,2 µg Fura Red in Vollmedium beladen. Anschließend wurden die Glasplättchen mit den darauf adhärierenden Zellen aus den Kulturschälchen entnommen, vorsichtig mit HBS-Puffer (10 mM HEPES pH 7,5, 128 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 3 mM CaCl₂ und 5,5 mM Glukose) abgespült, in eine Kammer eingespannt und mit HBS-Puffer überschichtet. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 3 µM Ionomycin in HBS-Puffer und die subzelluläre Lokalisation der Fluoreszenz-markierten Proteine wurde mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510-Meta und einem Plan-Apochromat 63x/NA1,4-Objektiv verfolgt. Um eine konstante Temperatur von 37 °C zu gewährleisten, wurde das Mikroskop in einen Zeiss Inkubator XL integriert.

III.8.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die subzelluläre Lokalisation von endogenen oder exogenen Proteinen wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) untersucht. Im Vergleich zu einem konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskop ist das CLSM in der Lage, eine wesentlich geringere Schichtdicke bei höherer räumlicher Auflösung abzubilden. Dies wird optisch durch das Einbringen von zwei Lochblenden in den Strahlengang erreicht. Die erste Lochblende befindet sich dabei direkt hinter der Lichtquelle, wodurch die Probe Punkt für Punkt durch den fokussierten Laser angeregt werden kann. Um die Detektion von Streulicht aus den Ebenen ober- und unterhalb des angeregten Punktes zu verhindern, wird vor dem Detektor eine zweite Lochblende eingebracht, die im Brennpunkt mit der ersten Blende übereinstimmt. Durch das Rastern einer Ebene entsteht auf diese Art und Weise ein Querschnitt durch die untersuchte Zelle, der es ermöglicht, eine etwa 1 µM durchmessende Zellschicht zu betrachten und so exakt zwischen z.B. zytosolischer oder membranärer Fluoreszenz zu unterscheiden (Emptage, 2001).

Die lebenden bzw. fixierten und Antikörper-markierten Zellen wurden mit den konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopen LSM 510-Meta (Carl Zeiss, Jena) oder TCS SP5 (Leica, Wetzlar) mit einem Plan-Apochromat 40x/NA1.3- bzw. 63x/NA1.4-Objektiv ausgewertet. CFP, GFP oder YFP wurden mit dem Licht eines Argon-Lasers mit Hilfe der Wellenlängen 458, 488 oder 514 nm angeregt und das emittierte Fluoreszenzlicht durch einen 458, 488 oder 514 nm-Hauptfarbteiler und den 475-525 nm, 505-530 nm oder 530-600 nm Bandpassfiltern detektiert. Alexa 488-markierte Proteine wurden mit dem Licht eines Argon-Lasers mit Hilfe der Wellenlänge 488 nm angeregt und das emittierte Fluoreszenzlicht durch einen 488 nm-Hauptfarbteiler und den 475-525 nm Bandpassfiltern detektiert. Alexa 546-markierte

Proteine wurden mit Hilfe eines Helium/Neon-Lasers mit der Wellenlänge 543 nm angeregt. Das Fluoreszenzlicht wurde mit Hilfe des UV/488/543/633 nm-Hauptfarbteilers, sowie dem 530 - 600 nm Bandpassfilter detektiert. Die konfokalen Blenden wurden so eingestellt, dass die optischen Schichtdicken zwischen 0,5 und 1,0 μm lagen.

III.8.4 Synchronisierung von GC-1 spg-Zellen

Um den Einfluss der CIN/CIB1-Interaktion auf endogene Phosphocofilin-Level während der Mitose biochemisch untersuchen zu können, wurden GC-1 spg-Zellen über einen Thymidin/Nocodazol-Block in der G2-Phase des Zellzyklus synchronisiert (Gohla et al., 2005). Je 3×10^5 GC-1 spg-Zellen wurden in 75 m^2 -Kulturflaschen ausgesät und am nächsten Tag mit CIN-, CIB1 oder Kontroll-siRNAs transfiziert (III.8.6). Nach einer Inkubation von 48 h wurde Vollmedium mit 2 mM Thymidin zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen zweimal gewaschen und für 4 h in Vollmedium mit 100 ng/ml Nocodazol inkubiert. Anschließend wurden die mitotischen Zellen durch Abklopfen von der Kulturflasche gelöst, zweimal mit Vollmedium gewaschen und je 2×10^4 Zellen in einer entsprechenden Anzahl Poly-L-Lysin beschichteten Vertiefungen (0,1 mg/ml Poly-L-Lysin in H_2O für 1 h bei 37 °C) einer 24-well Platte ausgebracht. 2×10^4 Zellen wurde dabei als Zeitpunkt 0 min direkt in 30 μl 1 x Lämmli-Puffer lysiert. Die verbleibenden Zellen wurden 45 - 180 min nach dem Aussetzen in 30 μl 1 x Lämmli-Puffer lysiert, die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. III.9.4) und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. III.9.5) untersucht.

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen während der Mitose wurden je 3×10^5 GC-1 spg-Zellen in 75 m^2 -Kulturflaschen ausgesät und am nächsten Tag mit Plasmid-DNA für CIN (0,1 μg) oder CIB1 (0,5 μg) transfiziert. Nach der Synchronisierung wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen (0,1 mg/ml Poly-L-Lysin in H_2O für 1 h bei 37 °C) in Vertiefungen einer 6-well Platte ausgebracht und 45 - 180 min nach dem Aussetzen fixiert, gefärbt und konfokalmikroskopisch ausgewertet (s. III.8.2, III.8.3).

III.8.5 Herstellung von stabilen Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion

Die stabile Depletion von CIN in GC-1 spg-Zellen erfolgte über ein lentivirales shRNA-Vektorsystem. Dazu stand ein Set bestehend aus fünf gegen murines CIN gerichteten shRNA-Sequenzen in dem Vektor pLKO.1-puro zur Verfügung (SHGLY-NM_020271, Sigma-Aldrich). Als Kontrolle diente eine sogenannte *non-targeting* shRNA (SHC002, Sigma), welche auf kein bekanntes Gen der Maus oder des Menschen abzielt, jedoch in der Lage ist, den RNAi-Signalweg zu aktivieren (www.sigmaaldrich.com).

III.8.5.1 Herstellung lentiviraler Partikel

Für die Produktion von lentiviralen Partikeln wurden $4,5 \times 10^6$ HEK293T-Zellen in einer gelatinierten \varnothing 10 cm Zellkulturschale (2% Gelatine in PBS, für 30 min bei RT) ausgebracht und am folgenden Tag mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Dazu wurden 20 μg des lentiviralen Vektors sowie 15 bzw. 10 μg der Verpackungsplasmide psBAX2 und VSV-G mit 470 μl H_2O , 500 μl zweifach BBS (50 mM BES, 280 mM NaCl_2 und 1,5 mM Na_2HPO_4 , pH 7,02) und 50 μl 2,5 M CaCl_2 gemischt. Nach einminütiger Inkubation wurde die Lösung tröpfchenweise zum Medium gegeben und das Medium nach 16 h Inkubation durch 6 ml frisches Vollmedium mit 10 mM Natriumbutyrat ersetzt. Nach weiteren 6 h wurde der virale Überstand geerntet und durch einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 45 μm filtriert.

III.8.5.2 Etablierung stabiler Zelllinien

Für die virale Transduktion wurden je $3,5 \times 10^4$ GC-1 spg-Zellen pro \varnothing 3 cm-Schale ausgesät und am folgenden Tag mit 3 ml der viralen Suspension versetzt. Nach einer Inkubation von 16 h wurden die Zellen zweimal mit D-PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und anschließend in Vollmedium mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin zu Selektionszwecken weiterkultiviert.

III.8.6 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) stellt einen evolutionär konservierten zellulären Abwehrmechanismus dar, der die Expression artfremder Gene in Eukaryoten kontrolliert. Auf dieser Basis wurde eine neue und effiziente Methode entwickelt, um die Funktion eines Gens in embryonalen und somatischen Zellen zu erforschen (Elbashir et al., 2001). Dabei wird doppelsträngige RNA (dsRNA), die homolog zu einer Sequenz in der Ziel-mRNA ist, in die Zellen eingeführt, was zu einem Post-Transkriptionellen Gene-Silencing (PTGS)-Phänomen führt. Nachfolgend kommt es zu einer siRNA-vermittelten Degradation der komplementären mRNA, wodurch die Synthese des entsprechenden Proteins unterdrückt wird (Hannon, 2002).

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon, (Bonn) bezogen. Dabei wurde zunächst jeweils ein Set von vier verschiedenen synthetischen Oligonukleotiden, die gegen murines CIN (LQ-040273-01-02) oder CIB1 (LQ-040182-01-02) gerichtet waren auf Proteindepletion in GC-1 spg-Zellen überprüft. Dazu wurden je 3×10^4 -Zellen mit 25 nM der individuellen Oligonukleotide transfiziert und der Effekt auf die endogenen CIN- oder CIB1-Spiegel anschließend im Immunoblot analysiert.

Als Kontrolle diente eine *non-targeting* Kontroll-siRNA (D-001810-01, 5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3') in einer korrespondierenden Konzentration, welche zwar die Endonuklease DICER aktiviert, jedoch keine nachweisbare Auswirkung auf die Expression bekannter muriner Gene hat.

Für die anschließende siRNA-vermittelte Depletion von CIN- und CIB1 in GC-1 spg-Zellen wurden pro Ø 3 cm Schale 3×10^4 Zellen ausgebracht und am folgenden Tag mit einer der CIN- und/oder CIB1-spezifischen siRNAs (CIN: J-040273-11, 5'-CGUCCAGUGUUGAUGGCUU-3', CIB1: J-040182-09, 5'-CCAUCAAUUUCCGAGUU-3') in einer Endkonzentration von 25 bzw. 12,5 nM transfiziert (s. III.8.1). Auch hier diente die *non-targeting* Kontroll-siRNA in einer korrespondierenden Konzentration als Kontrolle. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder für die Zellsynchronisation eingesetzt (s. III.8.4) oder lysiert (s. III.9.1) und einer Immunoblot-Analyse (s. III.9.5) unterzogen.

III.8.7 Das Two-Hybrid System

Das von Fields (Fields et al., 1989) erstmalig beschriebene *yeast two-hybrid* System stellt eine effiziente Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* dar. Das Prinzip des *MATCHMAKER LexA Two-Hybrid* Systems der Firma Clontech beruht auf dem modularen Aufbau des prokaryotischen Transkriptionsfaktors LexA. Dieser besteht aus einer transaktivierenden Domäne (AD) und einer DNA-bindenden Domäne (BD), welche physikalisch voneinander getrennt wurden. Potentielle Interaktionspartner werden in Form einer cDNA-Bibliothek als Fusionsproteine entweder mit der DNA-Bindedomäne oder der transaktivierenden Domäne exprimiert. Bei einer *in vivo*-Interaktion der beiden Proteine entsteht ein funktionsfähiger LexA-Transkriptionsfaktor, der die Transkription von nachgeschalteten Reportergenen (*lacZ* und *LEU2*) in der Hefe aktiviert. Da sich Hefezellen gut kultivieren und genetisch manipulieren lassen, kann mit Hilfe dieses Systems unter Verwendung einer cDNA-Bibliothek ein bestimmtes Köderprotein auf Protein-Interaktionen mit einer großen Zahl möglicher Bindepartner untersucht werden. Weiterhin können putative Interaktionspartner, die bei der Analyse einer Bibliothek gefunden wurden, mit Hilfe des *yeast two-hybrid*-Systems direkt getestet werden.

III.8.7.1 Kultur von Hefezellen

EGY48-Hefezellen wurden in Flüssigkultur oder auf Agarplatten bei 30 °C gezüchtet. Falls keine Selektion erforderlich war, wurde YPD-Vollmedium (20 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt und 2% Glukose in H₂O, Clontech) verwendet. YPD-Agar enthielt zusätzlich 20 g/l Agar. Für die Selektion transformierter Hefezellen wurde Wachstumsmedium (6,7 g/l Nitrogen-

Hefebasis in H₂O, pH 5.8, DO-Aminosäurezusatz, Clontech) verwendet, dem eine oder mehrere der Aminosäuren Histidin, Uracil und Tryptophan fehlten. Für die Selektion auf Proteininteraktionen im *two-hybrid*-System wurde Wachstumsmedium mit 2% Galaktose/1% Raffinose und 80 µg/ml X-Gal ohne Histidin, Uracil, Tryptophan und Leuzin (Selektionsmedium) verwendet. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden Hefekulturen mit Einfriermedium (25 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM MgSO₄ und 65% Glycerol) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

III.8.7.2 Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen

Für die Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA wurde die Lithiumacetat-Methode verwendet. EGY48-Hefezellen wurden über Nacht in 10 ml YPD- oder SD-Medium angezogen und in 60 ml YPD-Medium überimpft. Die Kultur wurde solange inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 erreicht hatte. Nach Zentrifugation bei 3000 x g für 5 min wurde das Pellet mit 25 ml H₂O gewaschen, in 25 ml Lösung A (0,1 M LiAc, pH 7.5 in H₂O) resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Pro Transformationsansatz wurden 50 µl kompetente Hefezellen, 0,5 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA, 5 µg Heringssperma-DNA und 300 µl Lösung B (0,1 M LiAc, pH 7.5, 40% PEG 4000 in H₂O) eingesetzt. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 20 min bei 42 °C wurden die Transformationsansätze auf Wachstumsmedium oder Selektionsmedium ausgebracht und für 3 - 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

III.8.7.3 Reportergergen-Experimente

Zur Selektion auf interagierende Proteine im *two-hybrid*-System standen zwei Reportergergen-Systeme zur Verfügung. Erstens enthielt der verwendete Hefestamm EGY48 das stabil integrierte *leu2*-Gen unter Kontrolle eines LexA-sensitiven Promotors. Die nichtkovalente Bindung von Köder- und Beuteprotein rekonstituiert die Funktion des LexA-Transkriptionsfaktors und aktiviert damit das *lexA*-Operon-*leu2*-Reportergergen. Für die Blau-Weiss-Selektion wurden Hefezellen zusätzlich mit dem Plasmid p8op-lacZ transfiziert. Dieses enthält das β-Galaktosidasegen unter der Kontrolle eines LexA-sensitiven Promotors. Im Fall einer Interaktion von Köder- und Beute-Fusionsprotein wird dieses Enzym exprimiert und kann anhand der Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff nachgewiesen werden. Beide Selektionsverfahren erfolgten auf Agarplatten. Es wurden nur solche Klone als positiv gewertet, die sowohl *leu2*-auxotroph waren, als auch β-Galaktosidase

exprimierten. Stark interagierende Proteine zeigten eine deutliche Blaufärbung der Klone innerhalb von 24 Stunden.

III.8.8 Kultivierung von Bakterienzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli*-Stämme TOP10, DH5 α , XL-1 Blue MRF⁻ und BL21 (DE3) pLysS wurden bei 37 °C und 180 rpm in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl in H₂O, pH 7.2) in einem Schüttelinkubator (CH4103, Infors AG, Bottmingen) oder auf LB-Agarplatten (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1,5% Agar in H₂O, pH 7.2) im Brutschrank (Certomat BS1, B. Braun Biotech International) kultiviert. Zu Selektionszwecken wurde dem Medium 50 μ g/ml Ampicillin oder 50 μ g/ml Kanamycin zugesetzt. Die längerfristige Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80 °C.

III.8.9 Bakterielle Expression von His₆-CIN, MBP-CIN und GST-CIB1

Von einem *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Klon, der das Plasmid pTrcHisA-CIN (His₆-CIN), pMal c2E-CIN (MBP-CIN) oder pGEX4-T1-CIB1 (GST-CIB1) enthielt, wurden Übernachtskulturen in je 10 ml LBamp-Medium angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden am nächsten Tag zu je 500 ml LBamp-Medium gegeben und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 inkubiert. Anschließend wurde die Produktion von His₆-CIN, MBP-CIN oder GST-CIB1 durch die Zugabe von je 1 mM IPTG induziert und für 4 h bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) fortgeführt. Die Zellen wurden in Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 6000 x g pelletiert, anschließend einmal mit Resuspensionspuffer (40 mM TEA, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.002% mM Triton X-100) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

III.9 Proteinbiochemische Methoden

III.9.1 Herstellung von Zelllysaten für die Immunoblot-Analyse

GC-1 spg-Zellen bzw. HeLa-Zellen wurden mit Ca²⁺/Mg²⁺-freiem D-PBS gewaschen, anschließend wurde eiskalter Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% NP-40, 1% Natriumdesoxycholat, 10 μ g/ml Aprotinin, 1 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin und 1 mM PMSF) zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden auf Eis von der Platte geschabt und durch mehrmaliges Aufziehen in eine Spritze mit einer 20 G-Kanüle (Braun,

Melungen) homogenisiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C entfernt.

III.9.2 Herstellung von Gewebelysaten für die Immunoblot-Analyse

Für die Herstellung von Gewebelysaten wurden die entsprechenden Gewebe freundlicherweise von Frau Olga Felda adulten C57/B6-Maus entnommen. Weiche Gewebe, wie beispielsweise Hirngewebe, wurden in eiskaltem Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% NP-40, 1% Natriumdesoxycholat, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin und 1 mM PMSF) aufgenommen und auf Eis homogenisiert. Feste Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend durch Mörsern in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und durch das mehrmalige Aufziehen in eine Spritze mit einer 20 G-Kanüle (Braun) weiter homogenisiert. Anschließend wurde der partikuläre Anteil bei 15.000 x g für 15 min und 4 °C abzentrifugiert, die Lysate aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

III.9.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration von Zell- oder Gewebelysaten wurde mit dem *Micro BCA Protein Assay Kit* (Pierce/Thermo Scientific) nach Herstellerangaben bestimmt. Dieser Assay ermöglicht die sensitive und selektive colorimetrische Detektion und Quantifizierung des Gesamt-Proteingehalts von Proben. Der Assay beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch die Proteine in den Lysaten unter alkalischen Bedingungen (Biuret-Reaktion). Das Cu¹⁺ kann anschließend durch Zugabe eines Reagenz mit Bicinchoninsäure (*Bicinchoninic acid*, BCA, Smith et al., 1985) bei einer Absorption von 562 nm nachgewiesen werden.

Je 3 µl der Zell- (s. III.9.1) oder Gewebelysate (s. III.9.2) wurde mit 147 µl deionisiertem Wasser in Kavitäten einer 96-well Platte verdünnt. Parallel wurde eine BSA-Standardkurve von 1 - 8 µg in 150 µl deionisiertem Wasser angesetzt. Anschließend wurden je 150 µl BCA-Lösung zu den Proben gegeben und der Ansatz bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Detektion erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm im Mikrotiterplattenreader (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Offenburg). Zur Auswertung der Messergebnisse wurde die Software FLUOstar Optima (Version 1.32, BMG Labtech) genutzt.

III.9.4 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer relativen molekularen Masse wurde ein von Laemmli (Laemmli, 1970) entwickeltes, denaturierendes, diskontinuierliches Elektrophoresesystem verwendet. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurden je Probe 25 µg der Lysate (s. III.9.1 und III.9.2) mit vierfach Laemmli-Puffer (250 mM Tris-HCl, 40% Glycerol, 20% β-ME, 4% SDS, 0,08% Bromphenolblau) versetzt, so dass eine einfache Konzentration entstand. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin und 0,1% SDS) mit Hilfe des Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei einer konstanten Stromspannung von 35 mA je Gel (1 mm Schichtdicke). Zur Konzentrierung der Proteine diente ein relativ großporiges Sammelgel, während für die Auftrennung ein kleinporiges Trenngel verwendet wurde.

	Sammelgel	Trenngel
30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	4,5%	12 oder 15%
SDS	0,1%	0,1%
APS	0,1%	0,1%
TEMED	0,1%	0,1%
Tris-HCl	125 mM, pH 6.8	375 mM, pH 8.8

III.9.5 Immunoblot-Analyse

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine (s. III.9.4) auf Nitrozellulose-Membranen (Hybond C extra) erfolgte nach Towbin (Towbin et al., 1992) mit Hilfe des *Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell Systems* (Bio-Rad Laboratories GmbH). Die Membran, sowie sechs Lagen Transferpapier wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Zwei Stücke Transferpapier wurden in Anodenpuffer I getränkt und auf der Anode plaziert, ein weiteres mit Anodenpuffer II getränktes Papier wurde darüber geschichtet. Die Membran wurde für zwei Minuten in H₂O gegeben und anschließend für fünf Minuten in Anodenpuffer II äquilibriert, bevor sie auf die Filterpapiere aufgelegt wurde. Das Gel inkubierte zehn Minuten in Kathodenpuffer und wurde dann auf der Membran plaziert. Den Abschluss zur Kathode bildeten drei Lagen Transferpapier, welche in Kathodenpuffer getränkt waren. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten des Blots wurden entfernt. Der Transfer dauerte 30 - 45 min bei einer Stromstärke von 70 mA pro Gel.

Als Blotpuffer dienten für:

	Proteine größer 40 kDa	Proteine kleiner 40 kDa
Anode I	300 mM Tris, 20% Methanol	300 mM Tris, 40% Methanol
Anode II	25 mM Tris, 20% Methanol	25 mM Tris, 40% Methanol
Kathode	25 mM Tris, 40 mM Glycin, 10% Methanol, 0,005% SDS	25 mM Tris, 40mM Glycin, 10% Methanol

Die Nitrozellulose-Membranen wurden mit Ponceau S-Lösung angefärbt und der überschüssige Farbstoff durch Spülen mit deionisiertem Wasser entfernt. Die transferierten Proteine wurden dabei durch Bindung des roten Farbstoffs reversibel sichtbar gemacht und zur Dokumentation eingescannt. Das Blockieren der Membran, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, erfolgte in 20 ml Blockierungslösung (50 mM Tris, pH 8, 2 mM CaCl_2 , 80 mM NaCl, 0.2% NP-40, 5% Magermilchpulver) für 30 min bei RT. Im Anschluss daran folgte über Nacht die Inkubation bei 4 °C mit spezifischen primären Antikörpern (1:1000 - 1:5000) in einem Antikörperpuffer (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% BSA und 0,01% NaN_3). Nach mehrmaligem Waschen der Nitrozellulose-Membranen mit deionisiertem Wasser wurden diese für eine Stunde mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (anti-Maus- oder anti-Kaninchen-IgG 1:4000 - 1:10.000) in Blockierungslösung inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden nach erneutem Waschen der Membranen mit deionisiertem Wasser über die Peroxidase-Aktivität durch Chemilumineszenz nachgewiesen (ECL).

III.9.6 Detektion von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Das Anfärben von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte in Coomassielösung (2,5 g/l Coomassie Blau Serva R in 10% Essigsäure und 45% Methanol) bei Raumtemperatur direkt nach der Elektrophorese für mindestens eine Stunde oder über Nacht. Zum Entfärben der Gele wurden diese in Entfärberlösung (10% Essigsäure und 20% Methanol in H_2O) auf dem Taumelschüttler Unimax 1010 (Heidolph, Schwabach) inkubiert, bis der Hintergrund klar war. Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Scanners (HP Scanjet 8300, Hewlett-Packard, CA, USA) durchgeführt.

III.9.7 Aufreinigung von rekombinantem His₆-CIN-Fusionsprotein

Die Aufreinigung von His₆-CIN nach bakterieller Expression (s. III.8.9) erfolgte mit Hilfe der immobilisierten Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an einer Talon-Matrix (BD Biosciences Clontech). Die Talon-Matrix wurde vor Verwendung durch dreimaliges Waschen mit Talon-Resuspensionspuffer (40 mM TEA, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂, 0,002% Triton X-100, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin und 1 mM Pefabloc SC PLUS, pH 7) äquilibriert. Die pelletierten Bakterien wurden in 10 ml Talon-Resuspensionspuffer mit Zusatz von 10 mg/ml Lysozym und 20 µg/ml DNase resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 20 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde mit 1 ml Talon-Suspension/l Kultur versetzt und über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Matrix sechsmal mit je 15 ml Talon-Waschpuffer (40 mM TEA, 30 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM MgCl₂, 0,002% Triton X-100, pH 7.4) im *batch*-Verfahren gewaschen und in eine 5 ml Bio-Spin-Säule (Bio-Rad Laboratories) gegeben. Das gebundene Protein wurde mit 3 - 5 ml Talon-Elutionspuffer (40 mM TEA, 150 mM Imidazol, 30 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,002% Triton X-100, pH 7.4) eluiert. Das Eluat wurde gesammelt und die His₆-Sequenz durch proteolytische Spaltung entfernt. Der pTrcHis A-Vektor enthält zu diesem Zweck eine Enterokinase-Schnittstelle zwischen dem His₆-Motiv und der MCS. Dazu wurde die eluierte Proteinlösung mit 30 µg Enterokinase/l Kultur sowie 5% Glycerol (50% in H₂O) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Unlösliche Präzipitate wurden durch Zentrifugation bei 4 °C für 15 min und 13.000 rpm entfernt, anschließend erfolgte die weitere Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie (s. III.9.10).

III.9.8 Aufreinigung von rekombinantem MBP-CIN-Fusionsprotein

MBP-Fusionsproteine können an immobilisiertem MBP affinitätsgereinigt werden. Für die Reinigung von N-terminal MBP-markiertem CIN nach bakterieller Expression (s. III.8.9) wurde MBP-Agarosesuspension (New England Biolabs) verwendet. Diese wurde vor Gebrauch dreimal mit MBP-Resuspensionsspuffer (40 mM TEA, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,002% Triton X-100, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin und 1 mM Pefabloc SC PLUS, pH 7.4) äquilibriert und in einem gleichen Volumen Resuspensionspuffer aufgenommen. Die pelletierten Bakterien wurden in 10 ml MBP-Resuspensionspuffer mit Zusatz von 10 mg/ml Lysozym und 20 µg/ml DNase resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 20 min bei 10.000 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde mit 1 ml MBP-Agarosesuspension/l

Kultur versetzt und über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Agarosesuspension sechsmal mit je 15 ml MBP-Waschpuffer (40 mM TEA, 30 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,002% Triton X-100, pH 7.4) im *batch*-Verfahren gewaschen und in eine 5 ml Bio-Spin-Säule (Bio-Rad) gegeben. Das gebundene Protein wurde mit 5 ml MBP-Elutionspuffer (40 mM TEA, 30 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,002% Triton X-100, 15 mM Maltose, pH 7.4) eluiert und das Eluat gesammelt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie (s. III.9.10).

III.9.9 Aufreinigung von rekombinantem GST-CIB1-Fusionsprotein

GST-Fusionsproteine können an immobilisiertem Glutathion affinitätsgereinigt werden. Für die Aufreinigung von N-terminal GST-markiertem CIB1 nach bakterieller Expression (s. III.8.9) wurde Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare) verwendet. Die Sepharose-Suspension wurde vor Gebrauch dreimal mit GST-Resuspensionsspuffer (40 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM β-ME, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin und 1 mM PMSF, pH 7.4) äquilibriert und in einem gleichen Volumen Resuspensionsspuffer aufgenommen. Die pelletierten Bakterien wurden in 10 ml GST-Resuspensionsspuffer mit Zusatz von 10 mg/ml Lysozym und 20 µg/ml DNase resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 20 min bei 10.000 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde mit 1,5 ml Glutathion-Sepharosesuspension/l Kultur versetzt und über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Sepharosebeads sechsmal mit je 15 ml GST-Waschpuffer (40 mM TEA, 30 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM β-ME, pH 7.4) im *batch*-Verfahren gewaschen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die GST-CIB1-Sepharose wurde entweder aliquotiert, in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80 °C gelagert oder CIB1 wurde proteolytisch von der GST-Markierung gespalten. Der pGEX-4T-1 Vektor verfügt zu diesem Zweck über eine Thrombin-Schnittstelle zwischen GST-Markierung und MCS. Das Abspalten von CIB1 erfolgte durch Zugabe von 30 µg Thrombin/l Kultur und 5% Glycerol (50% in H₂O) über Nacht unter Rotation bei Raumtemperatur. Das Eluat wurde gesammelt und die Reinigung mit der Anionenaustauschchromatographie fortgesetzt (s. III.9.10).

III.9.10 Anionenaustauschchromatographie

Die weitere Aufreinigung und Konzentrierung der bakteriell hergestellten rekombinanten Proteine wurde mit Hilfe einer Resource Q-Anionenaustauschermatrix (GE Healthcare) unter Verwendung einer Äkta Purifier 10-Chromatographieanlage (GE Healthcare) durchgeführt. Die jeweilige Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer A (20 mM TEA, 1 mM MgCl₂, 0,002%

Triton X-100) äquibrierte Resource Q HR 5/5-Säule (1 ml Bettvolumen) aufgetragen (0,4 ml/min) und anschließend mit 9 ml Puffer A gewaschen. Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,5 M NaCl in Puffer A (CIN, His₆-CIN, MBP-CIN) oder 0 - 0,8 M NaCl in Puffer A (CIB1, GST-CIB1) über 10 ml mit einer Flussrate von 0,4 ml/min eluiert und in Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt. Anschließend wurden die Fraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. III.9.4) und mittels Coomassiefärbung analysiert (s. III.9.6). Fraktionen, welche das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt, aliquotiert, in N₂ schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

III.9.11 Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung eines CIB1-spezifischen polyklonalen Antikörperserums

Die Immunisierung und anschließende Serumgewinnung von Kaninchen zur Herstellung eines polyklonalen CIB1-Antikörpers wurde von der Firma Charles River Laboratories, Kisslegg durchgeführt. Hierzu wurden 3 mg GST-CIB1 aufgereinigt (s. III.9.9) und mittels Slide-A-Lyzer-Kammern (Thermo Scientific) mit einer Trenngrenze von 10.000 Dalton dialysiert. Die Dialyse erfolgte gegen 3 x 1 l PBS bei 4 °C über Nacht unter Rühren. Anschließend wurde die Proteinlösung in 500 µl Aliquots zu je 0,3 mg GST-CIB1 aufgeteilt, lyophilisiert und Charles River übergeben.

III.9.12 Aufreinigung eines polyklonalen CIB1-Antikörpers aus Kaninchenantikörperserum

Ein CIB1-spezifischer Antikörper wurde aus einem polyklonalen Kaninchenantikörperserum gegen GST-CIB1 aufgereinigt. Die Isolierung des Antikörpers erfolgte dabei mittels Säulen-Affinitätschromatographie. Alle Lösungen wurden auf Eis vorgekühlt. In zwei Econo-Säulen (10 ml; Bio-Rad Laboratories) wurde je 1 g Cyanogen-Bromid-aktivierte Sepharose 4B (GE Healthcare) mit 100 ml 1 mM HCl-Lösung gequollen. Nach Entfernen der HCl-Lösung mit 25 ml H₂O wurden die Säulen mit 10 ml Bindepuffer (0,1 M NaHCO₃, pH 8.3, 0,5 M NaCl) äquilibriert. Die Säulenmatrix wurde mit 12 mg GST (GST-Säule) oder 12,5 mg GST-CIB1 (CIB1-Säule) in 3 ml Bindepuffer resuspendiert und über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler Reax 2 (Heidolph) inkubiert. Anschließend wurden die Säulen mit 15 ml Bindepuffer gewaschen und die Effizienz der Bindung von GST und GST-CIB1 an die Matrix im Photometer bei OD₂₈₀ bestimmt, sie betrug jeweils etwa 80%. Die freien Bindungsstellen der Sepharose wurden mit 1 M Ethanolamin (pH 8) für 2 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler abgesättigt. Abschließend wurden die Säulen je sechsmal alternierend mit 9 ml Trispuffer (0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, pH 8.5) und 9 ml Natriumacetatpuffer (0,1 M

C₂H₃O₂Na, 0,5 M NaCl, pH 3.5) gewaschen und bis zu ihrer Verwendung in 20%igem Ethanol bei 4 °C gelagert.

10 ml des polyklonalen Antikörperserums wurden für 30 min bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand anschließend vorsichtig in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Dazu wurde Ammoniumsulfat zu einem feinen Pulver gemörsert und 1,44 g (entspricht einer Sättigung von 25%) in kleinen Portionen über 10 h unter Rühren (Magnetrührer MR3001, Heidolph) auf Eis zu dem Serum gegeben. Zwischen den einzelnen Zugaben lagen jeweils 20 - 30 min, nach der letzten Zugabe wurde das Serum über Nacht bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Die Präzipitate wurden am nächsten Tag bei 3000 x g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert und der Überstand in einen neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Auf dieselbe Art wurden jetzt 1,58 g Ammoniumsulfat zugegeben (entspricht einer Sättigung von 50%), um die Antikörperfraktion des Serums zu präzipitieren, und ebenfalls über Nacht unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperfraktion bei 3000 x g, 4 °C für 30 min pelletiert, der Überstand möglichst vollständig abgenommen, das Pellet in 4 ml Bindepuffer resuspendiert und mittels Slide-A-Lyzer-Kammern (Thermo Scientific) mit einer Trenngrenze von 3000 Dalton nach Herstellerangaben gegen 3 x 1 l Bindepuffer bei 4 °C über Nacht dialysiert.

Die dialysierte Antikörperlösung wurde zuerst mit der GST-Säule für 72 h bei 4 °C inkubiert, um die GST-spezifischen Antikörper aus dem Serum zu entfernen. Die Bindung der CIB1-spezifischen Antikörper erfolgte bei einer nachfolgenden Inkubation der depletierten Antikörperfraktion für 72 h bei 4 °C mit der CIB1-Säule. Die Säule wurde anschließend für 4 h mit 500 ml Waschpuffer (50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7.5) gewaschen und die CIB1-spezifischen, polyklonalen Antikörper zuerst mit 3 ml einer Magnesiumchlorid-Lösung (50 mM Tris Base, 3.5 M MgCl₂) eluiert. Das Eluat wurde in 7 ml Trispuffer (50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7.5) aufgenommen. Nachfolgend wurde die Säule erneut mit 5 ml Trispuffer (50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8) gewaschen und die verbleibenden CIB1-spezifischen Antikörper mit 4 ml Glycinpuffer (200 mM Glycin, pH 2.5) von der Matrix eluiert. Das Eluat wurde in 500 µl 1 M Tris, pH 8.8 aufgefangen, um den pH möglichst schnell wieder in einen physiologischen Bereich zu bringen. Das Magnesium- und das Glycin-Eluat wurden durch Zentrifugation mittels Centricons (Millipore, MA, USA) mit einer Trenngrenze von 3000 Dalton auf ein Volumen von einem Milliliter eingengt und dreimal gegen je 1 l PBS dialysiert. Beide Eluate wurden anschließend mittels Immunoblot gegen gereinigtes CIB1 auf ihre Sensitivität geprüft. Da hier das Glycin-Eluat ein signifikant besseres Ergebnis lieferte, wurde 500 µl der Glycin-Antikörperlösung auf eine Endkonzentration von 50% Glycerol, 100 µg/µl BSA (Protease-frei) und 0.02% NaN₃ gebracht und stellten die Gebrauchslösung dar, welche bei -20 °C gelagert wurde. Die verbleibende Glycin-Antikörperlösung wurde aliquotiert und zusammen mit dem Magnesium-Eluat bei -80 °C gelagert.

III.9.13 *In vitro*-Bindungsassays

III.9.13.1 Festphasenbindungs-Experimente

Für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurde ein *in vitro*-Bindungsassay mit gereinigten, rekombinanten Proteinen entwickelt. Dabei wurde rekombinantes Protein A (CIN, CIB1, Calmodulin) durch nichtkovalente Wechselwirkungen an Kavitäten einer 96-well-Mikrotiterplatte gebunden und die Bindung des jeweiligen Partners (Protein B, ebenfalls CIN, CIB1 oder Calmodulin) unter verschiedenen Bedingungen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Protein B detektiert.

Protein A wurde in Bindepuffer (40 mM TEA, pH 7.4, 30 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) auf eine Konzentration von 40 µg/ml eingestellt und anschließend je 50 µl auf eine entsprechende Anzahl von Kavitäten einer 96-well-Mikrotiterplatte (Falcon 3912, BD Biosciences, Heidelberg) verteilt. Die Bindung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die freien Bindungsstellen in den Kavitäten wurden für 1 h mit 250 µl Blockierungslösung (40 mM TEA, pH 7.4, 30 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 3% BSA, Peroxidase-frei, Serva) bei RT geblockt. Währenddessen wurde Protein B auf Konzentrationen von 1,25 - 60 µg/ml in Probenpuffer (40 mM TEA, pH 7.4, 30 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% BSA) verdünnt. Für Ca²⁺-Dosis-Wirkungskurven wurde der Probenpuffer mit CaCl₂ und EGTA auf die angegebenen freien Kalziumkonzentrationen eingestellt, wobei die Kalkulation der eingesetzten CaCl₂/EGTA-Mengen mit dem Programm MaxChelator (Version 2.2, <http://www-leland.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxc22.htm>) erfolgte. In diesem Fall wurde die jeweilige freie Kalziumkonzentration auch bei allen nachfolgenden Wasch- und Inkubationsschritten konstant gehalten. Nach dem Blockieren wurden die Kavitäten einmal mit Probenpuffer gewaschen und anschließend je 50 µl der Protein B-Konzentrationen als Doppelproben auf die Kavitäten verteilt. Als Negativkontrolle dienten Kavitäten ohne Protein A, welche nur mit Blockierungslösung behandelt worden waren. Die Bindung erfolgte für 2 h bei RT. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Probenpuffer gewaschen und 50 µl/Kavität eines Protein B-spezifischen Antikörpers in einer Verdünnung von 1:2500 in Probenpuffer aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligen Waschen wurden 50 µl/Kavität eines mit Meerrettichperoxidase konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziege (Thermo Fisher) oder eines anti-Maus-Antikörpers aus Kaninchen mit einer Verdünnung von 1:2500 in Probenpuffer zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion durch die Zugabe von 100 µl TMB/Kavität (Merck). Die Farbreaktion wurde als Kinetik bei einer Extinktion von 380 nm oder 650 nm im Mikrotiterplattenreader (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Offenburg) gemessen. Zur Auswertung der Messergebnisse wurde die Software FLUOstar Optima (Version 1.32, BMG Labtech) genutzt.

Verwendete Kalzium- und EGTA-Konzentrationen:

Freie Kalzium-Konzentration [μM]	Kalzium [μM]	EGTA [μM]
0,1	1000	1550
0,5	1000	1113
1	1000	1065
5	1000	1010
10	1000	995
25	1000	980
50	1000	950
100	100	-

III.9.13.2 *Pulldown*-Experimente

Eine weitere Methode zum biochemischen Nachweis von Proteininteraktionen *in vitro* stellen so genannte *Pulldown*-Experimente dar. Bakteriell hergestelltes GST-CIB1 oder GST alleine wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt (GST-CIB1-Matrix/GST-Matrix, s. III.9.9). Für *Pulldown*-Experimente mit rekombinanten Proteinen wurden je 5 μg GST-CIB1-Matrix bzw. GST-Matrix mit je 5 μg CIN in 300 μl Bindepuffer (40 mM TEA, 30 mM TEA, 1 mM MgCl_2 , 1 mM β -ME, 0,1% Triton X-100, pH 7.4) für 4 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Um die Bindung von GST-CIB1 an überexprimiertes CIN zu testen, wurden HeLa-Zellen in 3 cm-Schalen mit 0,2 μg des Plasmids pcDNA3-CIN transfiziert (s. III.8.1) und die Zellen nach 16 h lysiert (s. III.9.1). 100 μg des Zelllysats wurden mit je 5 μg der CIB1-GST- bzw. GST-Matrix für 4 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Für *Pulldown*-Experimente mit endogen exprimiertem CIN wurde ein Lysat aus Hirngewebe einer adulten C57/Bl6-Maus hergestellt (s. III.9.2) und anschließend 5 μg der CIB1-GST- oder GST-Matrix mit je 100 μg des Hirnlysats für 4 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Sepharose-Beads viermal mit Bindepuffer gewaschen und herunterzentrifugiert (500 x g, 3 min). Der Überstand wurde präzise abgenommen und die Beads in 30 μl 1x Lämmli-Puffer resuspendiert. Anschließend konnten die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. III.9.4) und mittels Immunoblot-Analyse (s. III.9.5) untersucht werden.

III.9.14 Bestimmung der CIN-Phosphataseaktivität *in vitro*

Die Phosphataseaktivität von rekombinantem CIN wurde mit Hilfe eines *in vitro*-Nachweissystems detektiert. Das System basierte auf dem Farbstoff Malachit Grün in dem Reagenz BIOMOL GREEN (Biomol, Hamburg). Malachit Grün ist in der Lage, in Anwesenheit von Molybdat freies anorganisches Orthophosphat (P_i) in einem

Phosphomolybdat-Komplex zu binden. Dieser Komplex kann anschließend anhand seiner veränderten Absorption bei einer OD von 620 nm photometrisch detektiert werden (Van Veldhoven et al., 1987; Ekman et al., 1993). Aus praktischen Gründen wurde die CIN-Phosphataseaktivität gegen das niedermolekulare Substrat Pyridoxal-5-Phosphat (PLP), der aktiven Form des Vitamin B6 gemessen, das von Fonda und Mitarbeitern bereits als ein spezifisches Nicht-Protein-Substrat für Chronophin beschrieben wurde (Fonda, 1992).

0,8 - 1 µg CIN wurden alleine oder mit den angegebenen Mengen an CIB1 und/oder Calmodulin in 50 µl Phosphatasepuffer (40 mM TEA, pH 7.4, 30 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) in Kavitäten einer 96-well Mikrotiterplatte für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µM PLP gestartet und bei 37 °C für 30 min durchgeführt. Die Reaktion wurde durch 100 µl des BIOMOL GREEN-Reagenz gestoppt und die Freisetzung von anorganischem Orthophosphat nach 2 min bei einer OD von 620 nm photometrisch im Mikrotiterplattenreader (FLUOstar Optima) bestimmt. Für Kalzium-Versuche wurde die freie Kalzium-Konzentration des Phosphatasepuffers vor der Zugabe von PLP mit 1 mM CaCl₂ und den zuvor kalkulierten EGTA-Mengen (Programm MaxChelator) auf die gewünschten Konzentrationen eingestellt.

III.9.15 Densitometrische Auswertung von Immunoblot-Banden

Die densitometrische Quantifizierung von Immunoblot-Banden erfolgte mit Hilfe eines HP Scanjet 8300 Flachbettscanners (Hewlett-Packard) und der ImageJ Software (Version 1.41, National Institutes of Health, MD, USA <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

IV Ergebnisse

IV.1 Identifizierung und initiale Charakterisierung des CIN-Interaktors CIB1

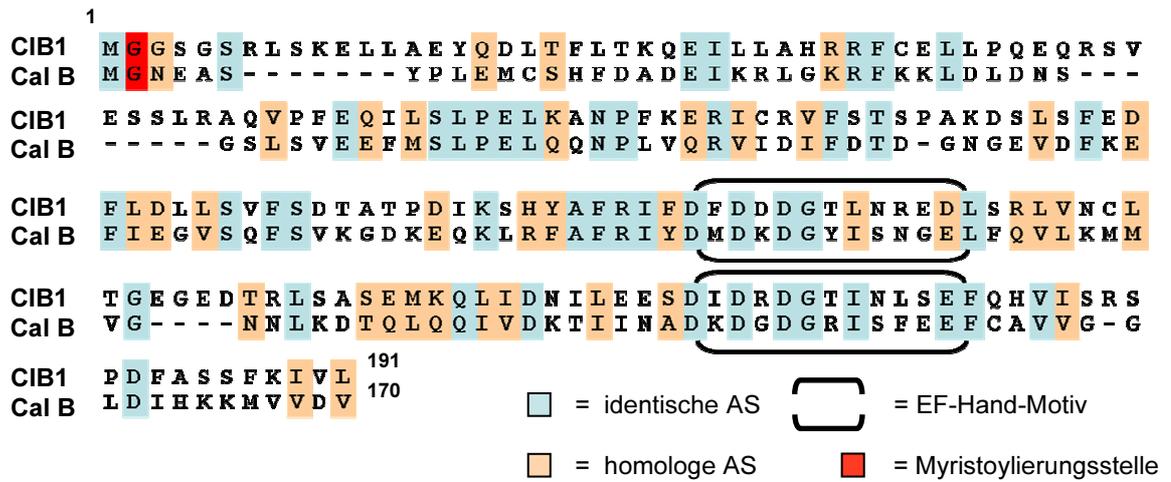
IV.1.1 Nachweis der CIN/CIB1-Interaktion in einem *yeast two-hybrid assay*

Über die Regulation der CIN-Phosphataseaktivität in Zellen war zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenig bekannt. Daher wurde von Dr. Elisabeth Jeanclos ein *yeast two-hybrid screen* mit einer cDNA-Bibliothek aus Mäusehirn sowie humanem CIN als Köderprotein durchgeführt, um neue, putative CIN-regulatorische Proteine identifizieren zu können. Aus diesem *screen* resultierten 23 positive Klone, die anschließend von mir sequenziert und bioinformatisch mit Hilfe einer EST-Datenbank-Analyse ausgewertet wurden.

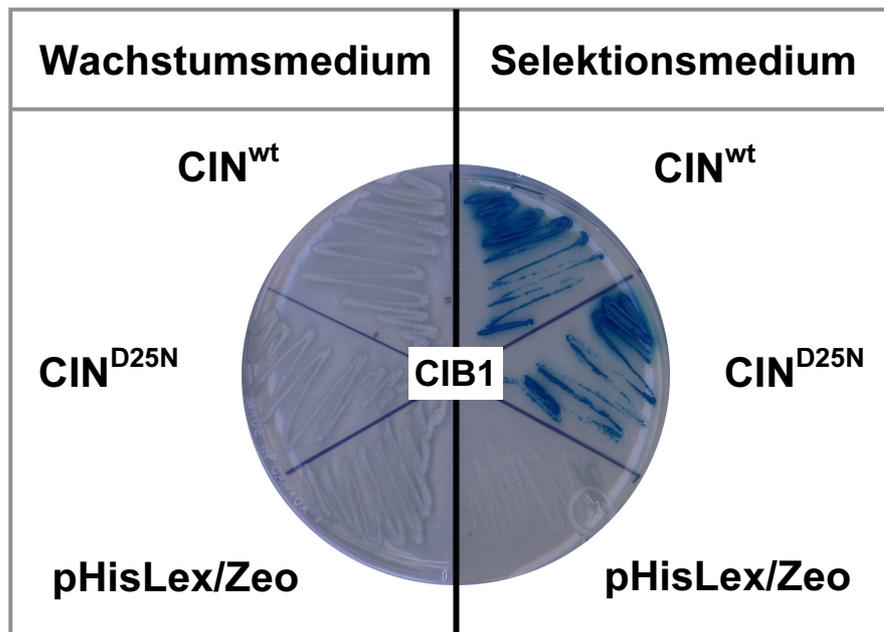
Unter den 18 kodierten Proteinen konnte auch das Kalzium- und Integrin-bindende Protein 1 (CIB1) als putativer neuer CIN-Interaktor identifiziert werden. CIB1 ist ein kleines, evolutionär konserviertes und in Säugern weit verbreitet exprimiertes Mitglied der EF-Hand-Familie von Kalzium-Sensoren. Wesentlich für die zellulären Funktionen von CIB1 sind zwei funktionelle EF-Hände sowie eine N-terminale Myristoylierung, über die CIB1 an Membranen translozieren kann (Stabler et al., 1999). Besonders interessant für diese Arbeit ist die relativ hohe Sequenz- und Strukturähnlichkeit von CIB1 zu den EF-Hand Proteinen Calcineurin B (57%) und Calmodulin (54%, s. Abb. IV.1, A, (Naik et al., 1997; Gentry et al., 2005)). Bei Calcineurin B handelt es sich um die regulatorische Untereinheit der heterodimeren, Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Protein Phosphatase 2B (PP2B), während Calmodulin als essentieller Kalziumsensor an so fundamentalen zellulären Prozessen wie der Zellmotilität, der Ionen-Homeostase oder der Signaltransduktion durch Neurotransmitter und Hormone massgeblich beteiligt ist (Kahl et al., 2003). Aufgrund dieser Eigenschaften und der Tatsache, dass CIB1 mehrmals als positiver Klon in dem *screen* identifiziert werden konnte, sollte im Laufe dieser Arbeit eine mögliche CIN/CIB1-Interaktion eingehender geprüft und charakterisiert werden.

Zunächst wurde die spezifische Interaktion von CIN und CIB1 mit Hilfe des *two-hybrid*-Systems verifiziert. Hierzu wurden EGY-Hefezellen, welche das Reporter-gen-Plasmid p8op-LacZ enthielten, mit CIB1-Wildtyp sowie CIN-Wildtyp (CIN^{wt}) oder einer Phosphatase-inaktiven CIN-Mutante (CIN^{D25N}) kotransformiert und nach der Selektion von Kotransformanten auf Wachstums- oder Selektionsmedium ausgestrichen. CIB1 war dabei in der Lage, sowohl mit Wildtyp CIN als auch mit der Phosphatase-inaktiven Mutante spezifisch zu interagieren, nicht jedoch mit der Vektorkontrolle (s. Abb. IV.1, B).

A



B



C

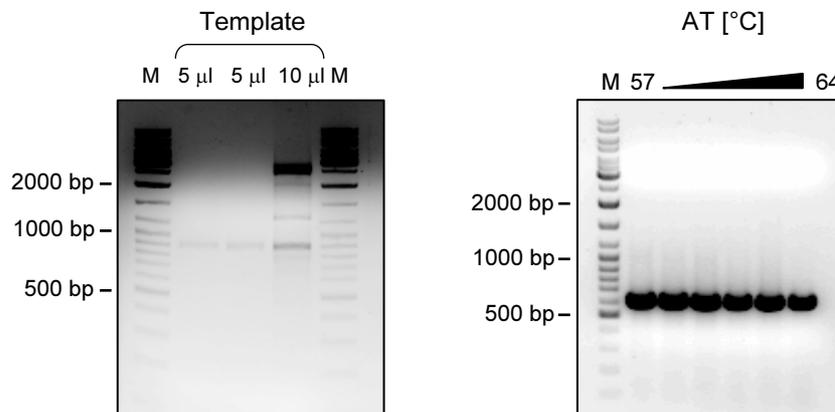


Abbildung IV.1: CIN und CIB1 interagieren spezifisch in einem yeast two-hybrid assay. (A) Schematischer Aufbau von murinem CIB1 und Calcineurin B (Cal B). Homologe und identische Aminosäuren wurden farblich gekennzeichnet. **(B)** CIN^{wt} und die Phosphatase-inaktive CIN^{D25N}-Mutante interagieren spezifisch mit CIB1 in einem yeast two-hybrid assay. CIN und CIB1 wurden in EGY48-Hefezellen kotransformiert, welche zusätzlich das p8op-LacZ Reporter-gen enthielten. Nach Selektion der Kotransformanten wurden die Hefen entweder auf Wachstums- oder Selektionsmedium (minus Leuzin, plus X-Gal) ausgestrichen, um ihre Fähigkeit zu testen, in Abwesenheit von Leuzin zu wachsen und X-Gal zu prozessieren. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pHisLexA/Zeo. **(C)** Gewinnung der murinen CIN-cDNA aus Hirngewebe mittels reverser Transkriptase-PCR (linkes Panel) und der CIB1-cDNA mit Hilfe einer Standard-PCR (rechtes Panel) aus einem positiven Hefeklon des yeast two-hybrid screens. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, dabei wurden Fragmente von 880 bp (CIN) und 580 bp (CIB1) erwartet. Verwendete Abkürzungen: AS = Aminosäuren, AT = *annealing*-Temperatur, Cal B = Calcineurin B, M = Größenstandard. Die in Abbildung B dargestellten Daten sind Ergebnisse von Dr. Elisabeth Jeanclos und wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Der Beutevektor pHisLex/Zeo ohne das CIN-Insert diente hier als Negativkontrolle, um eine eventuelle autonome Transkriptionsaktivität von CIB1 auszuschließen. Für weiterführende Analysen wurden anschließend zunächst die cDNAs der beiden Proteine isoliert. Die CIN-cDNA wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase-PCR-Technik aus Hirngewebe der Maus isoliert (s. Abb. IV.1, C, links) und über den Vektor pCR 2.1-TOPO in verschiedene bakterielle und Säuger-spezifische Expressionsvektoren subkloniert (s. III.7.13), darunter der Vektor pTrcHisA, welcher Zielproteine in *E. coli* mit einer Sequenz von sechs Histidinen (His₆-Markierung) am N-Terminus exprimiert. Für die Gewinnung der murinen CIB1-cDNA wurde der Vektor CIB1-pB42AD aus positiven EGY48-Hefezellen des yeast two-hybrid screens isoliert und als Matrize für eine PCR verwendet (s. Abb. IV.1, C, rechts). Das so generierte CIB1-Fragment wurde anschließend in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-4T-1 für die Synthese von N-terminal GST-markiertem CIB1 inseriert (s. III.7.13).

IV.1.2 Synthese und Reinigung von rekombinantem His₆-CIN und GST-CIB1 aus *E. coli*

Nachdem die entsprechenden Expressionsvektoren zur Verfügung standen, sollte die genetische Interaktion auch biochemisch durch eine direkte Bindung von CIN und CIB1 *in vitro* geprüft werden. Dazu wurde für beide Proteine zunächst ein Expressions- sowie Aufreinigungsprotokoll etabliert. N-terminal Histidin-markiertes CIN (His₆-CIN) und N-terminal GST-markiertes CIB1 (GST-CIB1) wurden rekombinant in *E. coli*-Zellen mittels IPTG-Induktion produziert. Die anschließende Reinigung erfolgte bei CIN über die immobilisierte Metall-Ionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) an einer Metall-Ionen-Matrix (Talon-Matrix) im Batch-Verfahren, während CIB1 über eine Glutathion-Sepharose-Matrix ebenfalls im Batch-Verfahren angereichert wurde.

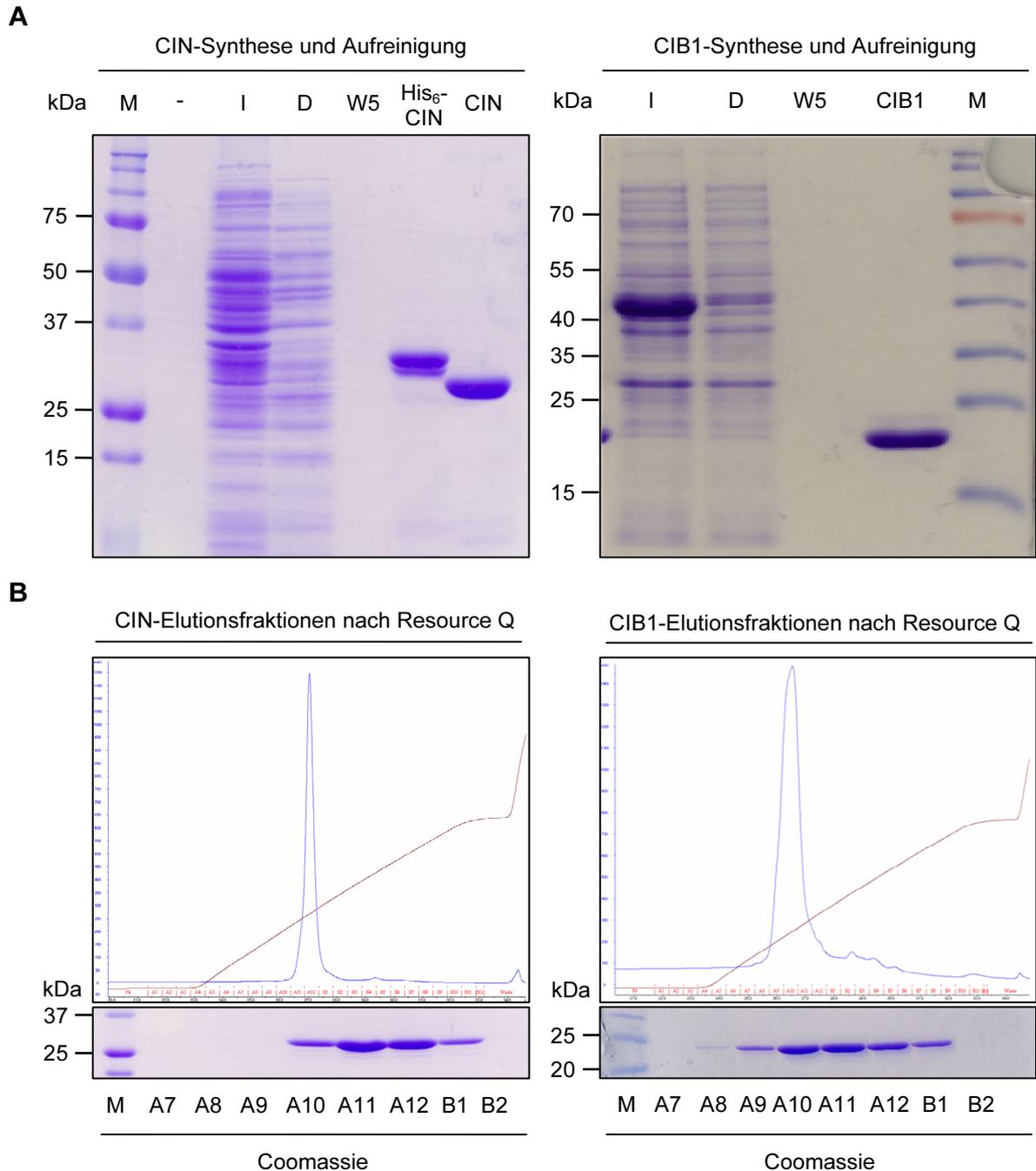


Abbildung IV.2: Analyse der bakteriellen Proteinsynthese von His₆-CIN und GST-CIB1. (A) His₆-CIN (links) oder GST-CIB1 (rechts) wurde in *E. coli* produziert und mittels Talon- oder Glutathion-Sepharose-Matrix aufgereinigt. Anschließend wurde die His₆- oder GST-Markierung proteolytisch entfernt und jeweils ein Aliquot der Reinigungsschritte mittels Coomassiefärbung auf Proteingehalt und Reinheit überprüft. (B) Exemplarisches Chromatogramm der beiden Proteine nach Resource Q-Säulenchromatographie: In rot sind die jeweiligen Fraktionen dargestellt, braun gibt den Elutionsgradienten (0 - 500 mM NaCl) wieder, während der blaue *peak* die Absorption bei UV 280 nm zeigt. Die untere Abbildung stellt die zu den Elutionsfraktionen korrespondierenden Coomassiefärbungen dar. Zu erwartende Molekulargewichte: CIN ≈ 32 kDa, CIB1 ≈ 22 kDa. Verwendete Abkürzungen: I = Aliquot des bakteriellen Überstandes nach IPTG-Induktion, D = Aliquot des Durchflusses, W5 = Waschfraktion 5, CIB1 = CIB1 nach Thrombin-Spaltung, CIN = CIN nach Enterokinase-Spaltung, M = Größenstandard.

In beiden Fällen wurde die His₆- bzw. GST-Markierung nachfolgend durch eine proteolytische Spaltung mit Vektor-spezifischen Proteasen (Enterokinase für His₆-CIN und Thrombin für GST-CIB1) entfernt und die gereinigten Proteine abschließend einer Resource Q-Anionenaustauschchromatographie unterzogen, um die verwendeten Proteasen zu entfernen und die Proteine in einen für nachfolgende Anwendungen geeigneten Puffer zu bringen.

Hierbei ist zu beachten, dass unmarkiertes CIB1 idealerweise durch eine direkte Inkubation von Sepharose-Matrix gebundenem GST-CIB1 mit Thrombin ohne eine vorherige Elution von der Matrix gewonnen werden konnte, weshalb CIB1 bereits nach der Thrombin-Spaltung in einem sehr hohen Reinheitsgrad vorlag. Für CIN war dies nicht möglich. Hier mussten die gebundenen Proteine zunächst durch Imidazol von der Talon-Matrix eluiert werden und erst dann konnte die His₆-Markierung durch eine Enterokinase-Spaltung entfernt werden. In Abbildung IV.2 ist exemplarisch der Verlauf einer solchen Aufreinigung sowie jeweils ein Resource Q-Chromatogramm dargestellt. Es wurden dabei Banden von 32 kDa (CIN) und 22 kDa (CIB1) erwartet. Wie die Coomassie-Färbungen in Abbildung IV.2, A deutlich machen, konnten beide Proteine in ausreichendem Maß synthetisiert und aufgereinigt werden, wobei in beiden Fällen der überwiegende Anteil als lösliche Fraktion vorlag (Daten nicht gezeigt). Die anschließende Säulenchromatographie brachte nur noch einen geringen Reinigungseffekt, diente aber in erster Linie dem Puffertausch sowie dem Entfernen der Proteasen. Auch hier konnten beide Proteine klar detektiert werden, wobei ein Reinigungsgrad von > 90% erreicht wurde.

IV.1.3 Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen CIN- sowie eines polyklonalen CIB1-Antikörpers

Da zu Beginn dieser Arbeit kommerzielle Antikörper gegen CIN oder CIB1 nicht zur Verfügung standen, beide Proteine jedoch mit relativ hoher Ausbeute und Reinheit in *E. coli* hergestellt werden konnten, wurde beschlossen, die gereinigten Proteine auch für die Herstellung eigener CIN- und CIB1-spezifischer Antikörper einzusetzen. Da sich größere Proteine für eine Immunisierung von Kaninchen erfahrungsgemäß besser eignen, wurde die CIN-cDNA in den bakteriellen Expressionsvektor pMal-c2E umklontiert. Dieser Vektor exprimiert Zielproteine als Fusionsprotein mit einer N-terminalen MBP (*maltose binding protein*)-Markierung von ca. 45 kDa. Ein CIN-Fusionsprotein mit GST wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert, jedoch verworfen, da es nahezu ausschließlich als unlösliches Aggregat in sogenannten *inclusion bodies* produziert wird und sich die anschließende Isolierung und Rückfaltung des Proteins als zeitaufwändig und schwierig erweist (persönliche Mitteilung, Dr. Antje Gohla). Für die Herstellung eines polyklonalen

10 mg. Desweiteren wurden von unserer Arbeitsgruppe die jeweiligen Zwischenstufen sowie der finale monoklonale Antikörper extensiv evaluiert.

Dabei zeigten sowohl der CIN- als auch der CIB1-spezifische Antikörper eine exzellente Spezifität und Sensitivität gegenüber den rekombinanten, gereinigten Proteinen. Beide Antikörper waren in der Lage, ihre Antigene noch im Pikogramm-Bereich zu detektieren, wobei sich der CIN-Antikörper als der sensitivere erwies (s. Abb. IV.3, A). Selbiges galt auch für den Test gegen verschiedene Gewebelysate der Maus. Hier konnte der CIN-spezifische Antikörper endogenes CIN in allen untersuchten Geweben klar und zumeist ohne weitere Banden erkennen (s. Abb. IV.3, B, links). Die stärkste Expression ließ sich dabei in Hoden- bzw. Hirngewebe nachweisen. Bei den beobachteten zusätzlichen Banden der Herz-, Haut- und Skelettmuskellysate könnte es sich um gewebespezifische CIN-Spleißvarianten bzw. Isoformen handeln. Für den CIB1-spezifischen Antikörper ergab sich ein ähnliches Bild. Auch dieser Antikörper war in der Lage, CIB1 in allen untersuchten Geweben spezifisch zu detektieren, wobei das Expressionsmaximum hier interessanterweise ebenfalls im Hoden lag, während sich dagegen in der Haut und im Skelettmuskel nur wenig CIB1 nachweisen ließ (s. Abb. IV.3, B, rechts).

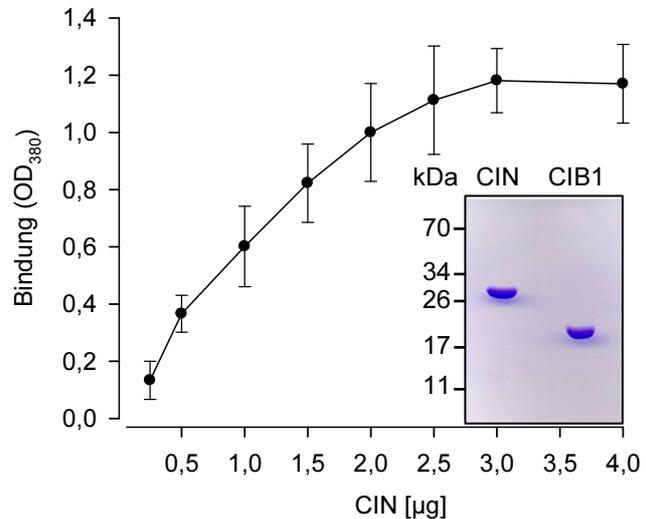
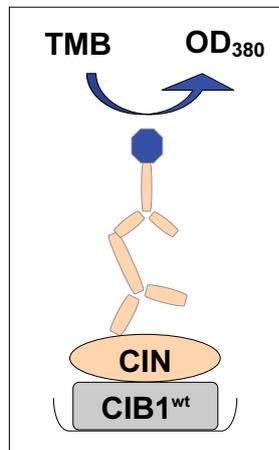
IV.1.4 Nachweis der direkten CIN- und CIB1-Interaktion *in vitro* und in Zellen

Mit Hilfe der in den vorangegangenen Experimenten etablierten Techniken sollte die im *yeast two-hybrid assay* beobachtete genetische Interaktion von CIN und CIB1 auch biochemisch verifiziert werden. Um eine direkte Assoziation beider Proteine *in vitro* nachweisen zu können, wurde zunächst ein sogenannter Festphasen-Bindungsassay mit rekombinanten, gereinigten Proteinen entwickelt, der auf dem klassischen ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Prinzip beruht (s. Abb. IV.4, A, links). Hier wurde in der Regel CIB1 durch nichtkovalente Wechselwirkungen an Kavitäten einer 96-well-Platte gebunden und die freien Bindungsstellen dann mit BSA blockiert. Anschließend wurde CIN in definierten Konzentrationen zugegeben und die Bindung der beiden Proteine mit Hilfe des CIN-spezifischen Antikörpers sowie einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper photometrisch bestimmt (s. Abb. IV.4, A, links).

In einem solchen Festphasen-Bindungsassay war CIN in der Lage, CIB1 konzentrationsabhängig und saturierbar zu binden (s. Abb. IV.4, A, rechts), wobei sich die Bindung auch in der umgekehrter Reihenfolge nachweisen ließ (Abbildung nicht gezeigt). Dieser Befund wurde weiterhin durch *pull-down*-Experimente mit rekombinanten, gereinigten und endogenen Proteinen abgesichert. Hier konnte rekombinantes GST-CIB1 sowohl rekombinantes CIN als auch endogenes CIN aus einem Hirngewebelysate der Maus

spezifisch binden (s. Abb. IV.4, B). Eine signifikante unspezifische Bindung an die GST-Kontrolle wurde in beiden Fällen nicht beobachtet.

A



B

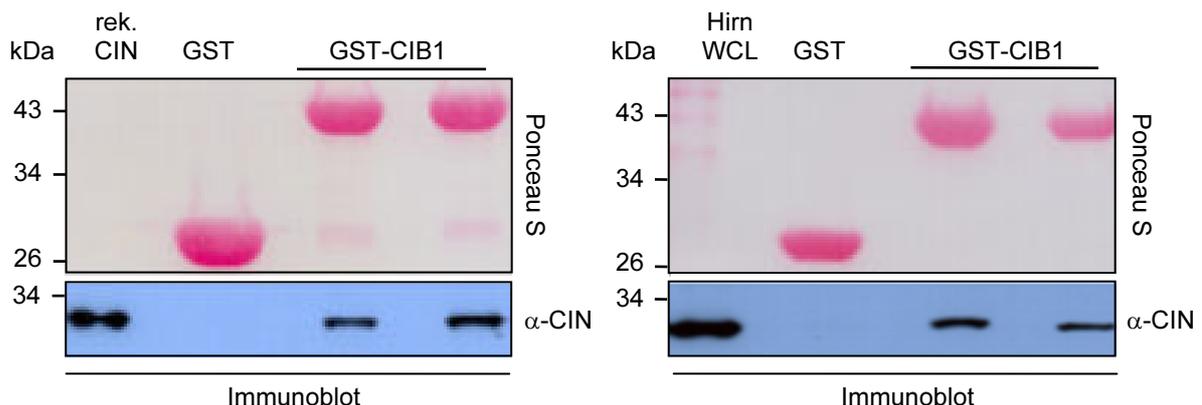


Abbildung IV.4: CIN und CIB1 interagieren spezifisch und direkt *in vitro* und in Zellen. (A) Festphasen-Bindungsassay mit rekombinanten, gereinigten Proteinen. Linkes Panel: Schematische Darstellung des Assays. Rechtes Panel: Je 2 µg CIB1 wurde an Kavitäten einer Mikrotiterplatte immobilisiert und in einer Konzentrations-Wirkungskurve mit den indizierten CIN-Konzentrationen inkubiert. Die Bindung von CIN an das immobilisierte CIB1 wurde mit Hilfe des CIN-spezifischen Antikörpers photometrisch bestimmt. CIN war dabei in der Lage, CIB1 direkt, konzentrationsabhängig und saturierbar zu binden. Kleine Abbildung: Coomassie der verwendeten aufgereinigten Proteine (je 3 µg aufgetragen). (B) *Pull-down*-Experimente mit Sepharose-immobilisiertem GST-CIB1/GST und CIN. GST-markiertes CIB1 (5 µg) oder GST alleine (5 µg) wurden mit 5 µg rekombinantem CIN (links) oder 300 µg eines Lysats aus murinem Hirngewebe (rechts) inkubiert und das gebundene CIN mittels Immunoblot-Analyse detektiert. GST-CIB1 konnte dabei sowohl rekombinantes als auch endogenes CIN spezifisch binden, nicht jedoch die GST-Kontrolle. Die Ponceau S-Färbung diente als Ladekontrolle. Verwendete Abkürzungen: Hirn WCL = *whole cell lysate*, 10 µg des Lysats als Positivkontrolle, rek. CIN = 15 ng rekombinantes CIN als Positivkontrolle.

Auffällig war an dieser Stelle die offensichtlich schwache Bindung von CIN an GST-CIB1 in den *pull-down*-Experimenten. Hier mussten selbst unter diesen forcierten *in vitro*-

Bedingungen mit 5 μg der gereinigten Proteine, bzw. 300 μg des Hirnlysats erhebliche Proteinmengen eingesetzt werden, um eine nachweisbare Bindung erzielen zu können. Dieser Umstand spricht möglicherweise für eine nur transiente Assoziation der beiden Proteine. Nichtsdestotrotz konnte mit diesen biochemischen Ansätzen eine direkte Interaktion von CIN und CIB1 sowohl mit gereinigten, rekombinanten als auch mit endogenen Proteinen klar gezeigt werden.

IV.2 Die Regulation der CIN-Phosphataseaktivität *in vitro*

IV.2.1 Einfluss von freiem Kalzium auf die CIN/CIB1-Bindung

CIB1 ist in der Lage, über die zwei funktionellen EF-Hand-Motive III und IV Ca^{2+} mit Bindungsaffinitäten von 1.9 bzw. 0,54 μM zu binden, was einer etwa 5 - 10-mal höheren Ca^{2+} -Affinität als beispielsweise der des Kalziumsensors Calmodulin entspricht (Cox et al., 1981; Burgoyne et al., 2001; Yamniuk et al., 2004). Yamniuk und Mitarbeiter konnten zudem zeigen, dass die Bindung von Ca^{2+} an CIB1 zu einer Stabilisierung der gesamten CIB1-Struktur führt (Yamniuk et al., 2007). Darüber hinaus wurde bereits für CIB1-Interaktoren wie die p21-aktivierte Kinase 1 (PAK1, Leisner et al., 2005) oder den InsP_3 -Rezeptor (White et al., 2006) eine Ca^{2+} -Abhängigkeit der Interaktion nachgewiesen, während bei anderen Proteinen, wie dem Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (Leisner et al., 2007) oder Presenilin-2 (Zhu et al., 2004; Blazejczyk et al., 2006) eine mögliche Rolle von Kalzium bei der Assoziation mit CIB1 momentan kontrovers diskutiert wird.

Um daher auch eine mögliche Ca^{2+} -Abhängigkeit der CIN/CIB1-Interaktion *in vitro* testen zu können, wurde wiederum die Methode des Festphasen-Bindungsassays verwendet. Dabei wurde CIB1 an Kavitäten einer Mikrotiterplatte gebunden und die Bindung von löslichem CIN in An- oder Abwesenheit verschiedener freier Ca^{2+} -Konzentrationen mit Hilfe des CIN-spezifischen Antikörpers detektiert. In Abbildung IV.5, A ist eine Coomassie-Färbung der verwendeten Proteine sowie eine schematische Darstellung des Festphasen-Bindungsassays dargestellt. Anhand von Abbildung IV.5, B wird deutlich, dass beide Proteine auch in Abwesenheit von Kalzium offenbar eine konstitutive Bindung eingehen. Während dabei eine basale Ca^{2+} -Konzentration von 50 - 100 nM nur einen geringen Einfluß auf die Interaktion hat, ist die CIN/CIB1-Assoziation bei einer Konzentration von etwa 10 μM freiem Ca^{2+} maximiert. Diese Kalzium-abhängige Stimulation der Bindung beruht vermutlich auf einer Interaktion von Kalzium mit CIB1, da sich der Effekt durch eine Inaktivierung der EF-Hand IV mittels Punktmutation der Aminosäure 172 ($\text{CIB1}^{\text{E172Q}}$, s. Abb. IV.5, B, oberes Panel) nahezu vollständig inhibieren ließ. Hier war nur noch eine basale Bindung zu beobachten, welche durch Zugabe von Kalzium nicht weiter stimuliert werden konnte. Die

CIN/CIB1-Interaktion wird also durch physiologische Ca^{2+} -Konzentrationen moduliert und ist von einer Ca^{2+} -Bindung an CIB1 sowie einer möglicherweise damit einhergehenden Konformationsänderung abhängig.

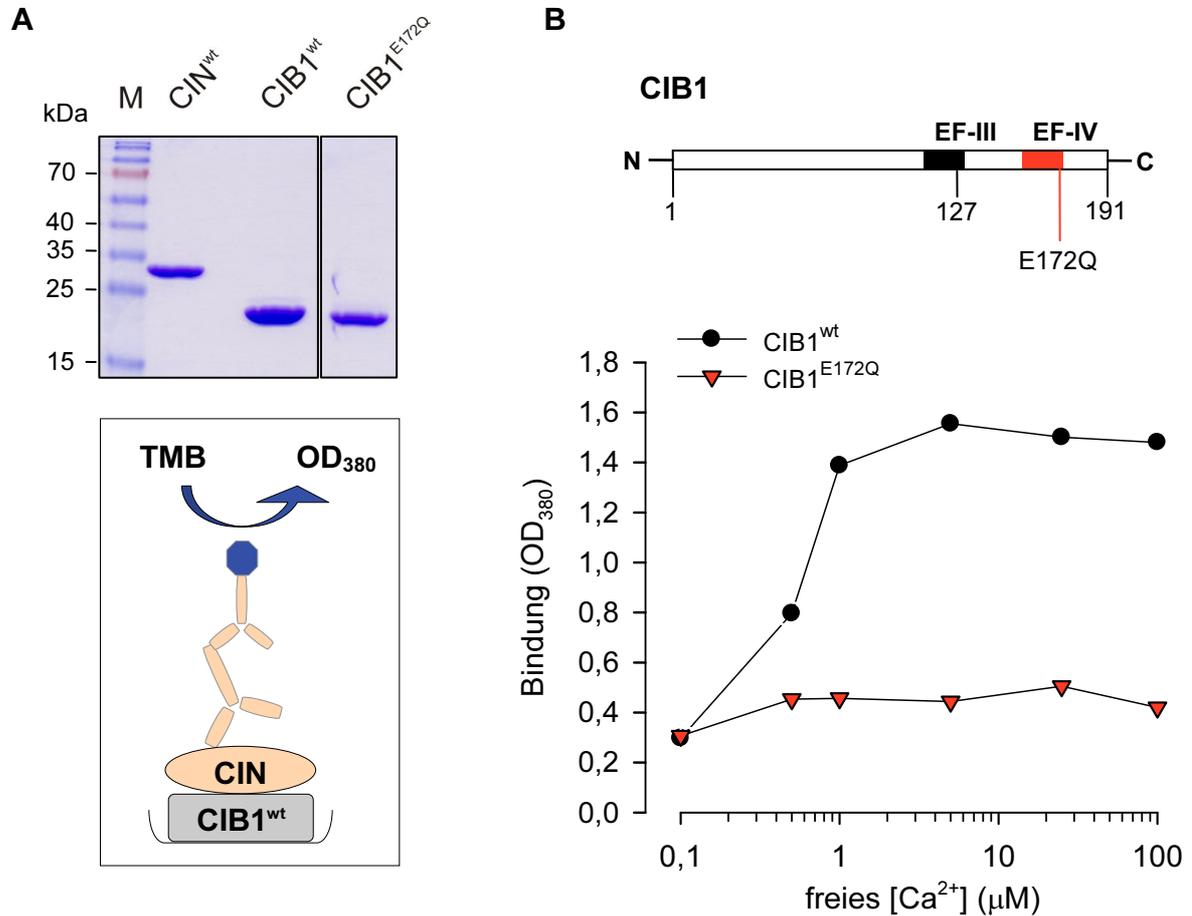


Abbildung IV.5: Die CIN/CIB1-Bindung ist konstitutiv und wird durch freies Ca^{2+} erhöht. (A) Coomassiefärbung der verwendeten rekombinanten Proteine sowie eine schematische Darstellung des Festphasen-Bindungsassays. (B) Die obere Abbildung zeigt ein Piktogramm von CIB1 zur Verdeutlichung wichtiger Proteinmerkmale. Im unteren Panel ist das Ergebnis des Festphasen-Bindungsassay mit rekombinanten Proteinen dargestellt. Je 2 μg CIB1 oder CIB1^{E172Q} wurden an Kavitäten einer Mikrotiterplatte gebunden und in An- oder Abwesenheit steigender Ca^{2+} -Konzentrationen mit 0,5 μg CIN inkubiert. Anschließend wurde das gebundene CIN mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert.

IV.2.2 Einfluss der Kalzium-induzierten CIN/CIB1-Interaktion auf die CIN-Phosphataseaktivität

In einem nächsten Schritt sollte ein möglicher Einfluss dieser Kalzium-stimulierten Bindung auf die Phosphataseaktivität von CIN untersucht werden. Dazu wurde zunächst eine geeignete Methode für die Detektion von freigesetztem, inorganischen Phosphat als Marker für die CIN-Phosphataseaktivität etabliert.

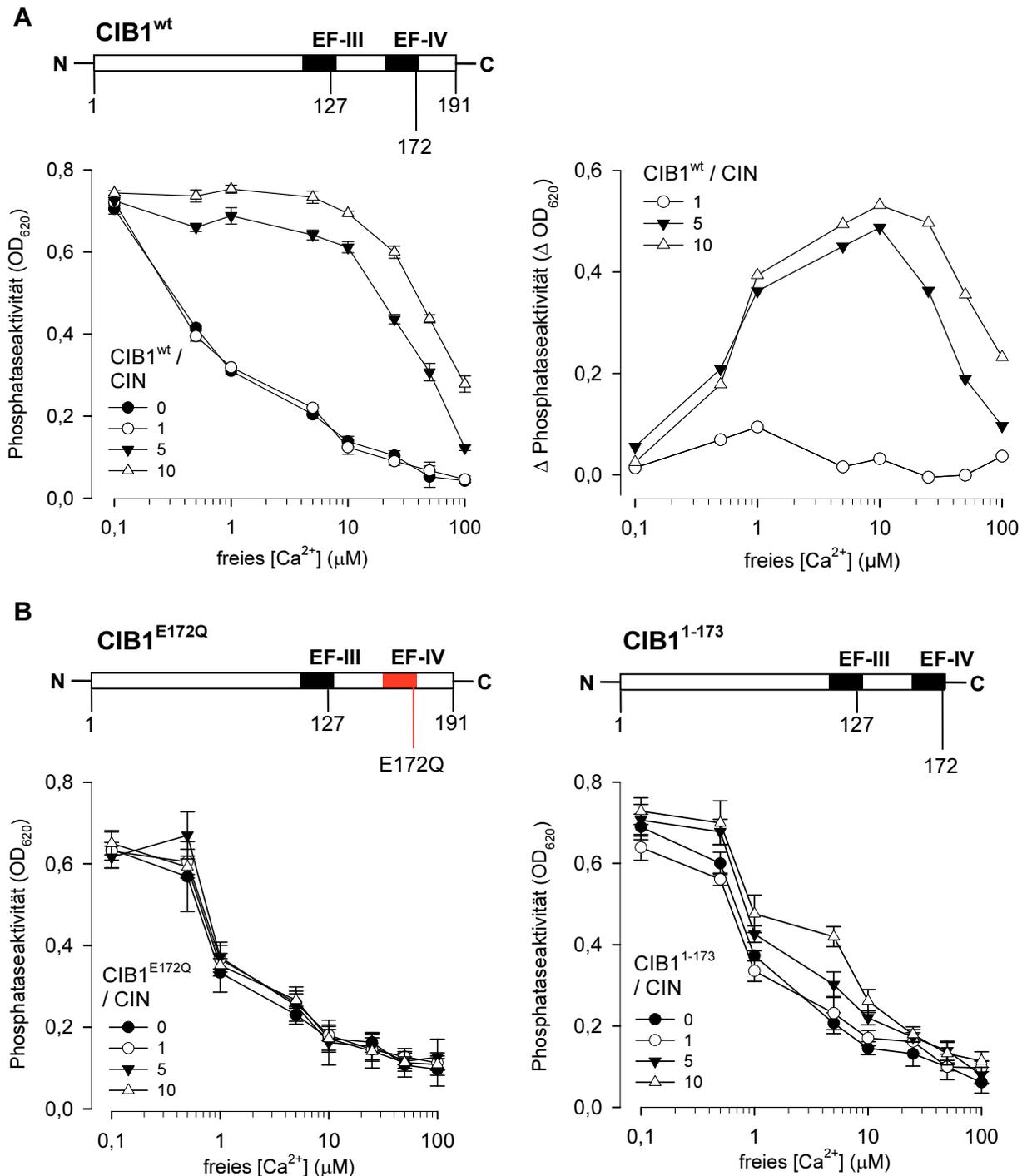


Abbildung IV.6: Nach Bindung an Ca²⁺ und CIN erhält CIB1 die CIN-Phosphataseaktivität über einen physiologisch relevanten Kalziumbereich. CIN (0,8 μM) und CIB1 wurden in den angegebenen molaren Verhältnissen in An- oder Abwesenheit von freiem Ca²⁺ inkubiert und die Phosphataseaktivität gegen PLP mit Hilfe des Malachit Grün-Assays analysiert. **(A)** Die CIN-Phosphataseaktivität wurde durch freies Ca²⁺ effektiv inhibiert, mit einem IC₅₀-Wert von etwa 1 μM. Während die Zugabe von 0,8 μM (1x) CIB1 keinen erkennbaren Einfluss auf die Aktivität von CIN hatte, war CIB1 in hohen Konzentrationen (5x, 10x) in der Lage, die CIN-Phosphataseaktivität über einen weiten Bereich physiologisch relevanter Ca²⁺-Konzentrationen (0,1-10 μM) aufrechtzuerhalten. Im rechten Panel sind dieselben Daten als Differenz der CIN-Phosphataseaktivität dargestellt. Demgegenüber konnte weder mit der bereits beschriebenen inaktivierten EF IV-Hand-Mutante (CIB1^{E172Q}), noch mit einer C-terminal deletierten CIB1-Variante (CIB1¹⁻¹⁷³) ein solcher Effekt beobachtet werden **(B)**.

Das in dieser Arbeit verwendete *in vitro*-Nachweissystem basierte auf dem Farbstoff Malachit Grün, der in Anwesenheit von Molybdat freies inorganisches Orthophosphat (P_i) in einem Phosphomolybdat-Komplex bindet. Dieser Komplex kann anschließend anhand seiner veränderten Absorption von 620 nm photometrisch detektiert werden (Van Veldhoven und Mannaerts, 1987; Ekman und Jager, 1993). Aus praktischen Gründen wurde die CIN-Phosphataseaktivität mit dem niedermolekularen Substrat Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP), der koenzymatisch-aktiven Form des Vitamin B6 gemessen, welches von Fonda und Mitarbeitern bereits als ein spezifisches Nicht-Protein-Substrat für Chronophin beschrieben wurde (Fonda, 1992).

Die CIN-Phosphataseaktivität gegen PLP wird durch steigende Konzentrationen an freiem Kalzium sehr effektiv inhibiert, wobei der IC_{50} -Wert bei etwa 1 μ M lag (s. Abb. IV.6, A). Diese Kalzium-vermittelte CIN-Inhibierung konnte jedoch durch die Zugabe von steigenden molaren Mengen an CIB1 über einen weiten, physiologisch relevanten Kalziumbereich verhindert werden. Dabei hatte die CIB1-Zugabe bei einem molaren Verhältnis von 1:1 keine Auswirkungen, erst bei einem CIB1-Überschuss von 5:1 wurde ein deutlich stabilisierender Effekt sichtbar, der durch eine weitere Erhöhung (10x) noch verstärkt werden konnte und die CIN-Aktivität bis zu einer Konzentration von etwa 10 μ M freiem Kalzium in etwa auf dem Ausgangsniveau hielt (s. Abb. IV.6, A, linkes und rechtes Panel). Bei diesem Effekt war jedoch kein proportionaler Anstieg zu beobachten, was den Schluss nahe legt, dass die CIN/CIB1-Bindung bei einem CIN/CIB1-Konzentrationsverhältnis von 1:5 oder 1:10 nahezu gesättigt ist. Eine Stimulierung der Phosphataseaktivität über das Ausgangsniveau hinaus ließ sich jedoch nicht nachweisen. Interessanterweise wurde dieser protektive Effekt durch eine Inaktivierung der Kalzium-bindenden EF-Hand IV auf CIB1 stark reduziert. Die Anwesenheit dieser Mutante hatte in Gegenwart von Ca^{2+} nur noch einen geringen Einfluss auf die CIN-Aktivität im Vergleich zu Wildtyp-CIB1 (s. Abb. IV.6, B, links). Ein ähnlicher Befund wurde auch für die Inaktivierung der EF-Hand III erhalten (Abbildung nicht gezeigt). Auch ließ sich bei dem Einsatz einer CIB1-Trunkante, bei der eine potentielle CIN-Bindungsstelle am C-Terminus von CIB1 deletiert worden war (CIB1¹⁻¹⁷³, s. IV.5 und Abb. IV. 16, unteres Panel), in keiner der verwendeten Konzentrationen ein protektiver Effekt gegen Kalzium beobachten. Dabei ist zu beachten, dass bei diesem Protein die Aminosäuresequenz der EF-Hand-Motive intakt geblieben ist. Für die Aufrechterhaltung der CIN-Phosphataseaktivität in Gegenwart von freiem Kalzium stellen offenbar sowohl die Bindung von Kalzium an CIB1 als auch eine Bindung von CIB1 an CIN unverzichtbare Voraussetzungen dar.

IV.2.3 Analyse der Interaktion von Calmodulin, CIN und CIB1 *in vitro*

CIB1 weist mit 57% bzw. 53% eine starke Sequenzähnlichkeit zu Calcineurin B und Calmodulin auf. Die Kalzium-abhängige Serin/Threonin-Protein Phosphatase Calcineurin ist ein heterodimeres Enzym, bestehend aus der katalytischen Untereinheit Calcineurin A (M_r 61 kDa) und der Kalzium-sensitiven, regulatorischen Untereinheit Calcineurin B (M_r 19 kDa). Die regulatorische Untereinheit Calcineurin B gehört zur Familie der EF-Hand Kalzium-Bindeproteine und besitzt, ebenso wie der Kalziumsensor Calmodulin, vier dieser Kalzium-bindenden EF-Hand-Motive mit unterschiedlicher Affinität, sowie eine N-terminale Myristoylierungsstelle. Die Calcineurin-Phosphataseaktivität ist dabei von zwei entscheidenden Faktoren abhängig: Durch eine Bindung von Kalzium an Calcineurin B wird die Substrataffinität der Phosphatase verstärkt, während eine anschließende, ebenfalls Kalzium-vermittelte, Bindung des Kalziumsensors Calmodulin an die Phosphatase die Enzymaktivität von Calcineurin weiter verstärkt (Feng et al., 1999). Calmodulin ist ein hitze- und säurestabiles monomeres Protein von 17 kDa, das ubiquitär in allen eukaryotischen Organismen vorkommt (Yang et al., 2003) und über vier integrale EF-Hand-Motive Kalziumionen (Affinitäten: EF-Hand 1-3: 6 μ M, EF-Hand IV: 200 μ M) binden kann (Klee et al., 1980; Cox et al., 1981). Die Kalzium-Bindung induziert dabei letztlich den Konformationswechsel von einem größtenteils hydrophilen, geschlossenen Zustand in eine weniger kompakte, offene Struktur mit Ausstülpung großer hydrophober Bindungstaschen auf beiden Domänen, was eine Aktivierung des Calmodulin für die Interaktion mit seinen zahlreichen Effektoren zur Folge hat. Die von Calmodulin gebundenen Zielproteine sind äußerst vielfältig und an allen Bereichen zellulärer Steuervorgänge beteiligt (Yang und Poovaiah, 2003, Snedden und Fromm, 1998; Reddy, 2001; Zielenski, 1998).

Da bereits ein Kalzium-abhängiger Einfluss von CIB1 auf die CIN-Phosphataseaktivität nachgewiesen werden konnte (s. Abb. IV.6), sollte weiterhin die Hypothese geprüft werden, ob es sich bei CIB1 möglicherweise um eine Strukturkomponente von CIN handelt und ob Calmodulin einen Einfluss auf die Bindung/Aktivität des CIN/CIB1-Dimers besitzt. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Aminosäuresequenzen von CIN und CIB1 mit Hilfe der *Calmodulin Target Database* (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca>) einer bioinformatischen Sequenzanalyse unterzogen, um potentielle Calmodulin-Bindestellen identifizieren zu können. Dabei ist zu beachten, dass die bisher identifizierten Calmodulin-Bindungsregionen auf verschiedenen Proteinen keine bemerkenswerten Sequenzähnlichkeiten gezeigt haben. Es konnten dennoch Gemeinsamkeiten abgeleitet werden, die sich als Richtlinien für die Vorhersage von Calmodulin-Erkennungsregionen als brauchbar erwiesen haben.

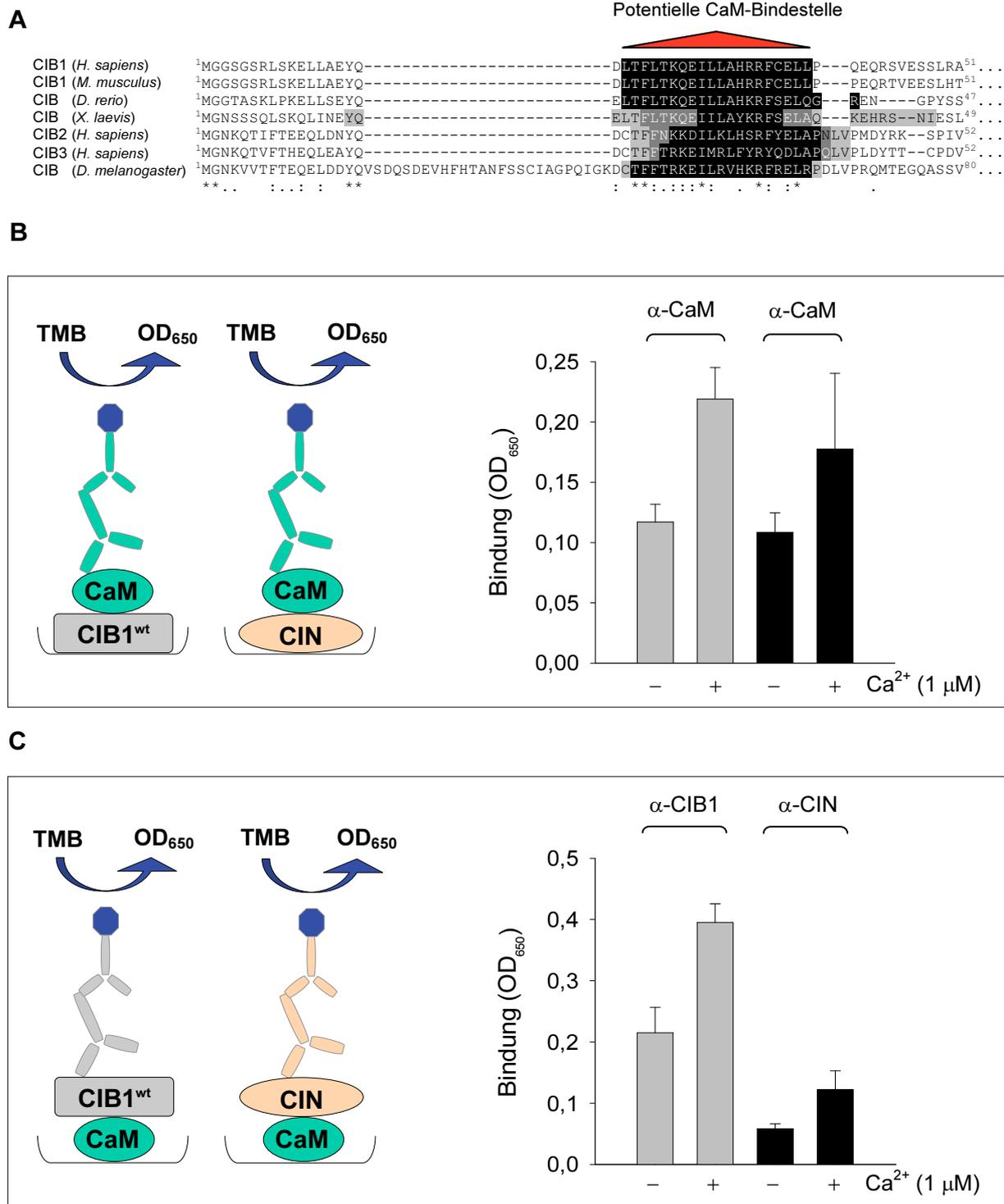


Abbildung IV.7: Calmodulin interagiert Kalzium-abhängig mit CIN und CIB1 *in vitro*. (A) Schematische Darstellung der bioinformatischen Sequenzanalyse von CIB-Orthologen auf mögliche Calmodulin-Bindestellen. (B + C) *In vitro*-Analyse der Bindung von CIN/CaM bzw. CIB1/CaM mittels Festphasen-Bindungsassay und rekombinanten Proteinen. (B) CIN oder CIB1 wurden immobilisiert und mit CaM in An- oder Abwesenheit von 1 μM freiem Ca²⁺ inkubiert. Anschließend wurde die CaM-Bindung mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers photometrisch bestimmt. Analog dazu wurde CaM immobilisiert und die Bindung von CIN bzw. CIB1 in An- oder Abwesenheit von 1 μM freiem Ca²⁺ mittels eines Calmodulin-Antikörpers detektiert (C).

Diese sind jedoch nicht zwingend, da auch Calmodulin-Bindungsmotive bekannt sind, die keine dieser Kriterien erfüllen ((Crivici et al., 1995; Rhoads et al., 1997; Hoeflich et al., 2002), <http://calcium.uhnres.utoronto.ca>). Typische Kalzium-abhängige Calmodulin-Bindungsmotive formen kleine, etwa 20 Aminosäuren umfassende amphiphile Helices mit hydrophoben Resten an konservierten Positionen, einer positiven Nettoladung und aromatischen Aminosäuren in der Nähe ihrer Enden.

Während bei dieser Analyse für CIN keine putative Calmodulin-Bindedomäne identifiziert werden konnte, ergab die Suche bei CIB1 ein überraschendes Ergebnis. Hier ließ sich eine 20 Aminosäuren umfassende, evolutionär hochkonservierte putative Calmodulin-Binderegion am N-Terminus von CIB1, sowie den Isoformen CIB2 und 3 nachweisen, bei humanem und murinem CIB1 dabei mit dem höchst möglichen *score* (s. Abb. IV.7, A).

Um daher eine direkte Interaktion von CIN, CIB1 und/oder Calmodulin *in vitro* mit rekombinanten Proteinen testen zu können, wurde wiederum der Festphasen-Bindungsassay eingesetzt. Dabei wurden zunächst CIN oder CIB1 immobilisiert und die Bindung von löslichem Calmodulin detektiert. Aus Abbildung IV.7 B wird ersichtlich, dass sowohl CIB1 als auch CIN Calmodulin (CaM) *in vitro* direkt binden können, wobei die Interaktion in beiden Fällen durch Kalzium stimuliert wird. Ein ähnliches Bild ergab sich für den umgekehrten Versuchsaufbau, bei dem CaM immobilisiert und eine anschließende Bindung von CIN und CIB1 nachgewiesen wurde. Auch hier waren beide Kandidaten in der Lage, Calmodulin spezifisch und Kalzium-induziert zu binden (s. Abb. IV.7, C).

Zur weiteren Absicherung dieser Befunde wurde die Bindung der drei Proteine von Dr. Elisabeth Jeanclos mit Hilfe von *pull-down*-Experimenten geprüft. Hier ließ sich ebenfalls eine direkte Interaktion von rekombinantem CaM mit gereinigtem CIN oder CIB1, sowie auch eine Calmodulin-Bindung an endogen exprimiertes CIN oder CIB1 *in vitro* nachweisen (Daten nicht gezeigt).

IV.2.4 Calmodulin ist für eine Aktivierung der Phosphatase CIN essentiell

Nachdem eine direkte Interaktion von CIN, CIB1 und Calmodulin in den vorherigen Experimenten klar gezeigt werden konnte, sollte weiterhin ein möglicher Einfluss von Calmodulin auf die CIN-Phosphataseaktivität getestet werden. Dazu wurde die CIN-Phosphataseaktivität in verschiedenen Ansätzen gegen das Substrat PLP untersucht (s. Abb. IV.8). Hier hatten weder Calmodulin alleine noch CIB1 zusammen mit Calmodulin in den angegebenen Konzentrationen einen nennenswerten Einfluss auf die Phosphataseaktivität von CIN. Auch die Zugabe von steigenden Konzentrationen an Calmodulin konnte die bereits beobachtete Inhibierung von CIN durch Kalzium nicht reduzieren. Erst das Zusammenspiel von Kalzium, CIB1 und Calmodulin ergab eine von der

Calmodulin-Konzentration abhängige Aktivierung der CIN-Phosphataseaktivität (s. Abb. IV.8, A). Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Kalzium-Dosis-Wirkungskurve mit CIN und den CIB1- bzw. Calmodulin-Konzentrationen, welche im vorherigen Versuch den stärksten Effekt auf die CIN-Aktivität zeigten. Hier wurde CIN ebenfalls durch Kalzium dosisabhängig inhibiert, wobei dieser Effekt wie erwartet durch die Zugabe von CIB1 bis zu einer Konzentration von 10 μM Kalzium nahezu auf dem Ausgangsniveau gehalten werden konnte. Durch eine zusätzliche Gabe von Calmodulin ließ sich auch in diesem Fall der schon beobachtete Anstieg der Aktivität über das Kontrollniveau hinaus nachweisen. Interessanterweise lag das Maximum des Calmodulin-Effektes in dem physiologisch relevanten Ca^{2+} -Bereich von 1 - 10 μM . Der Effekt fiel anschließend jedoch parallel zu dem CIB1-vermittelten Effekt stark ab, und zwar und bei Ca^{2+} -Konzentrationen, bei denen die EF-Hand-Motive von CIB1 und CaM Ca^{2+} -gesättigt vorlagen (s. Abb. IV.8, B).

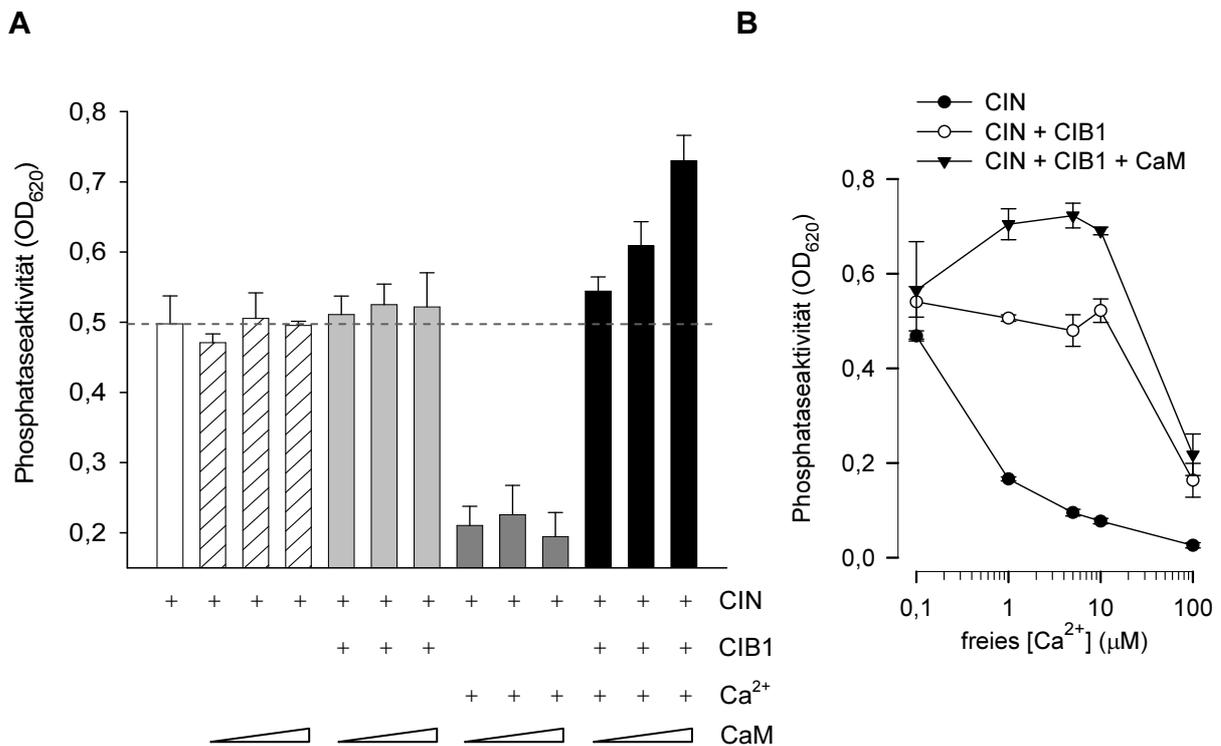


Abbildung IV.8: Calmodulin wird für die Stimulierung der CIN-Phosphataseaktivität in Gegenwart von Ca^{2+} und CIB1 benötigt. (A) Die Phosphataseaktivität von 1 μg CIN gegen 50 μM PLP wurde in An- oder Abwesenheit von 1 μM Ca^{2+} , 10x CIB1 und/oder steigenden Konzentrationen an Calmodulin (0,3x/1x/3x) gemessen. (B) Ca^{2+} -Dosis-Wirkungskurve der Aktivität von 1 μg CIN gegen 50 μM PLP in An- oder Abwesenheit von 10x CIB1 und 3x CaM.

IV.3 Analyse der subzellulären Lokalisation von CIN und CIB1 in Zellen

IV.3.1 Einfluss von Kalzium auf die subzelluläre Lokalisation von CIN und CIB1

Wie bereits erwähnt, gehört CIB1 zur Familie der NCS-Proteine. Am N-Terminus fast aller Mitglieder dieser Proteinfamilie findet sich eine Konsensussequenz für eine Myristoylierung (Ames et al., 1997) und tatsächlich konnte für viele NCS-Proteine eine N-terminale Myristoylierung oder Acetylierung bereits experimentell gezeigt werden. Die Bindung von Kalzium löst in manchen NCS-Proteinen eine Konformationsänderung aus, die zur Exposition des Myristoyl-Restes aus einer hydrophoben Tasche in das umgebende Milieu führt, so dass diese Struktur für Interaktionen mit putativen Zielmolekülen und/oder zellulären Membranen zugänglich wird (Ames et al., 1997). Die häufigste Funktion einer Myristoylierung ist dabei die Assoziation des Proteins mit der Plasmamembran oder anderen intrazellulären Membrankompartimenten, wobei der Myristoylrest zwar essentiell für die Assoziation ist, für eine stabile Verankerung jedoch nicht ausreicht (Peitzsch et al., 1993). Es wurde bereits für die NCS-Mitglieder NCS-1, KChIP1 (*K⁺ channel-interacting protein 1*), Recoverin, Hippocalcin und Proteine der VILIP-Subfamilie ein solcher Kalzium-Myristoyl-Mechanismus nachgewiesen (Senin et al., 2002; O'Callaghan et al., 2003; Spilker et al., 2003; Jeromin et al., 2004; R, 2004). Für andere Mitglieder der NCS-Familie, darunter auch CIB1, wurde die Existenz eines solchen Mechanismus noch nicht abschließend geklärt.

Um in einem zellulären Modellsystem zu überprüfen, ob CIB1 Kalzium-abhängig an Membranen transloziert oder CIN eine mögliche subzelluläre Relokalisation nach einem Einstrom von extrazellulärem Kalzium zeigt, wurde zunächst C-terminal GFP-markiertes Hippocalcin, C-terminal GFP-markiertes CIB1 oder N-terminal YFP-markiertes CIN in HeLa-Zellen transient überexprimiert.

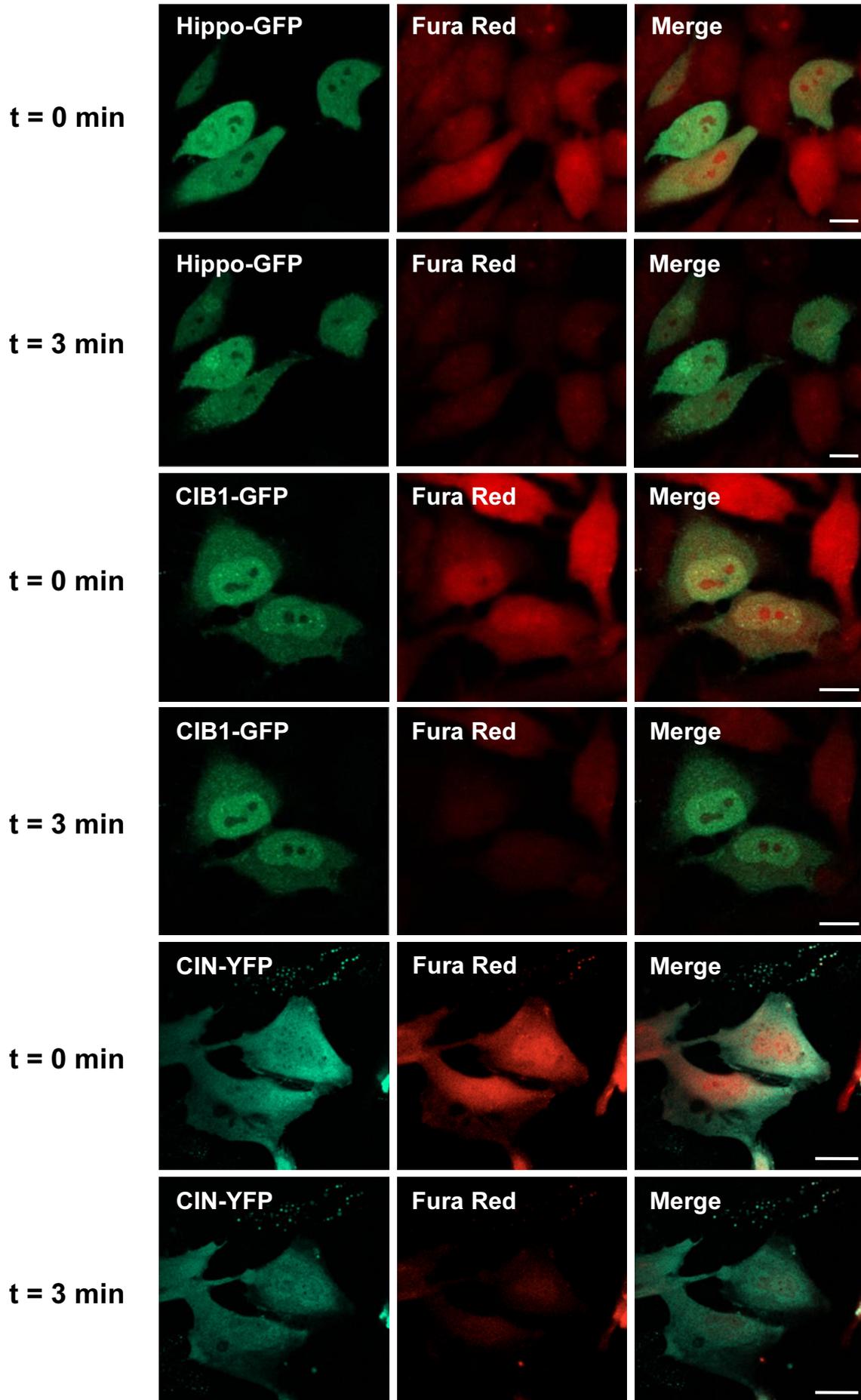


Abbildung IV.9: CIN und CIB1 zeigen in HeLa-Zellen keine Kalzium-abhängige Translokation an Membranen. HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden für C-terminal GFP-markiertes Hippocalcin, C-terminal GFP-markiertes CIB1 oder N-terminal YFP-markiertes CIN transfiziert und nach 16 h mit dem Farbstoff Fura Red beladen (0,2 µg, 30 min). Anschließend wurden die Zellen in Kalzium-supplementiertem (3 mM) HBS-Puffer für 3 min mit dem Ionophor Ionomycin stimuliert (3 µM) und die subzelluläre Lokalisation der drei Proteine über die Zeit mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie in den lebenden Zellen verfolgt. Dabei ist hier jeweils eine representative Aufnahme vor der Ionomycin-Stimulation (t = 0 min) und nach 3 min Stimulation (t = 3 min) dargestellt. Auf der rechten Seite sind die Überlagerungen der beiden Fluoreszenzkanäle (*Merge*) abgebildet. Verwendete Abkürzungen: Hippo = Hippocalcin. Weiße Balken = 10 µm).

Die Zellen wurden anschließend mit dem Lebendzell-Kalzium-Indikator Fura Red beladen (0,2 µg, 30 min), um einen Ionophor-vermittelten Einstrom von extrazellulärem Kalzium visualisieren zu können. Die Fura Red-Fluoreszenz wird durch Wellenlängen von 450 - 500 nm angeregt und besitzt ein Emissionsmaximum von etwa 660 nm. Dabei nimmt die Fluoreszenz-Emission nach Bindung von Ca^{2+} Konzentrations-abhängig ab. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart von extrazellulärem Kalzium (3 mM) mit dem Ionophor Ionomycin stimuliert (3 µM, 3 min) und die subzelluläre Lokalisation von Hippocalcin, CIB1 und CIN mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie in den lebenden Zellen verfolgt. Bei Ionomycin handelt es sich um einen kleinen mobilen Ionen-Transporter, der in der Lage ist, divalente Kationen spezifisch zu binden und durch die Zellmembran zu transportieren. So ist es beispielsweise möglich, in Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium und Ionomycin die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration Rezeptor-unabhängig zu modulieren. Allerdings sind dem System enge Grenzen gesetzt, da es hierbei zu einem mehr oder weniger unkontrollierten Kalziumeinstrom kommt und sich so exakte intrazelluläre Kalziumlevel nicht einstellen lassen. Für das NCS-Protein Hippocalcin wurde bereits eine Kalzium-abhängige Relokalisation aus dem Zytosol an die Plasmamembran sowie intrazelluläre Membranen des trans-Golgi-Netzwerks (TGN) beschrieben (O'Callaghan et al., 2003), daher diente es hier als Positivkontrolle.

Erwartungsgemäß zeigte Hippocalcin nach der Ionomycin-Stimulation eine deutliche Relokalisation an membranäre Strukturen des TGN, während das Protein in den ruhenden HeLa-Zellen in einer relativ gleichmäßigen Verteilung sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden war (s. Abb. IV.9). Die Abnahme des Fura Red-Signals zeigt dabei den Einstrom von extrazellulärem Kalzium an. Demgegenüber waren CIN und CIB1 in ruhenden HeLa-Zellen ebenfalls gleichmäßig verteilt, in beiden Fällen ließ sich jedoch nach einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Spiegel keine signifikante Veränderung der subzellulären Lokalisation beider Proteine detektieren (s. Abb. IV.9). CIB1 scheint also zumindest unter diesen Versuchsbedingungen nicht über einen funktionellen Kalzium-Myristoyl-Mechanismus zu verfügen.

IV.3.2 Einfluss von CIB1 auf die subzelluläre Lokalisation von CIN

Für CIB1 konnte unter den gewählten Bedingungen zwar keine Kalzium-abhängige Relokalisation gezeigt werden, dennoch lassen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen vermuten, dass CIB1 in Zellen durchaus mit membranären Strukturen interagiert (Zhu et al., 2004). So geht die Punktmutation der Myristoylierungsstelle (CIB1^{G2A}) mit einer schwächeren membranären Lokalisation und einem stärkeren Vorkommen von CIB1 im Zellkern einher (Zhu et al., 2004).

Daher sollte in einem nächsten Schritt geprüft werden, ob CIB1 möglicherweise als eine Art *shuttle* die subzelluläre Lokalisation von CIN beeinflusst. Um diese Hypothese zu testen, wurden in HeLa-Zellen C-terminal GFP-markiertes Wildtyp-CIB1 oder die C-terminal GFP-markierte CIB1^{G2A}-Mutante zusammen mit N-terminal YFP-markiertem CIN transient überexprimiert und die Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie auf eine mögliche, CIB1-abhängige Veränderung der subzellulären Lokalisation von CIN untersucht.

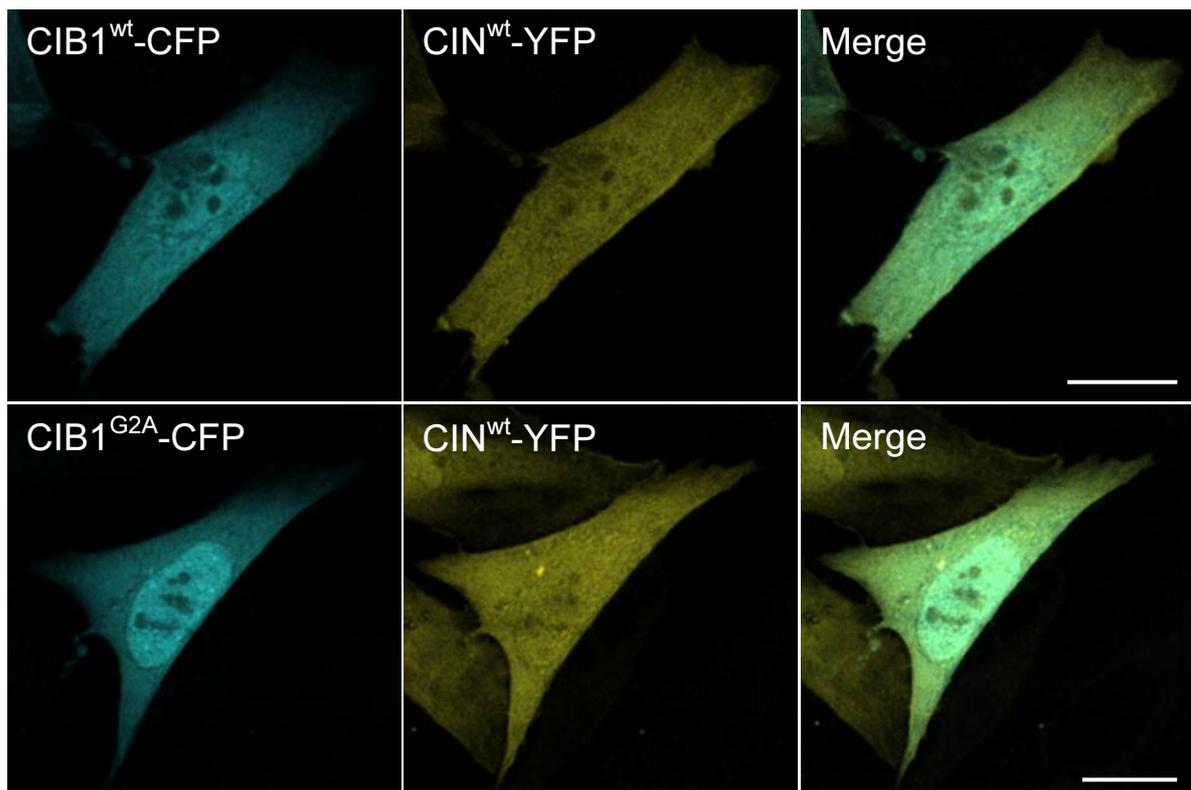


Abbildung IV.10: Die subzelluläre CIN-Lokalisation wird durch CIB1 nicht signifikant beeinflusst. HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden für CIB1^{wt}-CFP und CIN^{wt}-YFP (oberes Panel) oder einer CFP-markierten CIB1-Variante, bei der die Myristoylierungsstelle durch eine Punktmutation inaktiviert wurde (CIB1^{G2A}) und CIN^{wt}-YFP (unteres Panel) kotransfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen fixiert und die subzelluläre Lokalisation der beiden Proteine mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Auf der rechten Seite sind jeweils die Überlagerungen der beiden Fluoreszenzkanäle (*Merge*) dargestellt. Weiße Balken = 10 µm.

Während CIN und CIB1 auch hier sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden waren, zeigte sich im Fall der CIB1^{G2A}-Mutante zwar eine deutlich stärkere Lokalisation im Zellkern (s. Abb. IV.10), jedoch war die subzelluläre Distribution von CIN in diesen Zellen unverändert. Hier ließ sich keine signifikante Relokalisation von CIN in den Zellkern feststellen (s. Abb. IV.10). Auch nach einer Stimulation von CIB^{wt}-GFP/CIN^{wt}-YFP oder CIB1^{G2A}-GFP/CIN-YFP überexprimierenden HeLa-Zellen mit Ionomycin blieb die Lokalisation der beiden Proteine unverändert (Daten nicht gezeigt).

IV.4 Die Rolle von CIN und CIB1 während der Zellteilung

IV.4.1 Analyse der subzellulären Lokalisation von CIN und CIB1 während der Mitose

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass CIN in den verschiedenen Stadien der Mitose zusammen mit Cofilin eine dynamische Relokalisation in Bereiche aktiver Aktin-Reorganisation erfährt, welche für die Zellteilung essentiell sind. So kolokalisieren CIN und Cofilin beispielsweise während der späten Anaphase/Telophase an den dynamischen Zellpolen, und akkumulieren dann transient und zeitgleich an der sich einschnürenden Teilungsfurche. Während der Zytokinese sind CIN und Cofilin im kontraktile Aktomyosin-Ring zu finden und kolokalisieren in den späteren Phasen der Zytokinese auch transient an der Plasmamembran (Gohla et al., 2005). Interessanterweise reduziert Wildtyp-CIN in mitotischen HeLa-Zellen die zelluläre Phosphocofilin-Konzentration während der Mitose und Zytokinese, wohingegen eine siRNA-induzierte Depletion von CIN zu einer Erhöhung des Phosphocofilin-Spiegels führt. Mitotische Zellen mit erhöhter oder erniedrigter CIN-Aktivität sind häufig durch eine Regression der Teilungsfurche charakterisiert, gefolgt von einem Abbruch der Mitose oder Zytokinese, was letztendlich in einer Anhäufung multinukleärer Zellen resultiert (Gohla et al., 2005).

Um eine mögliche Rolle von CIB1 bei diesen CIN-vermittelten Effekten während der Mitose in einem zellulären System zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt die Lokalisation der beiden Proteine während der Mitose/Zytokinese mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie überprüft (s. Abb. IV.11). Dazu wurde die Methode der Zellsynchronisation verwendet. Bei dieser Technik werden Zellen zunächst mit Hilfe eines kombinierten Thymidin/Nocodazol-Blocks in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert und anschließend auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen (für die Immunfluoreszenz) oder Kavitäten einer 24-well-Platte (für biochemische Analysen) ausgebracht und aus dem Block entlassen. Die Synchronisierung ermöglicht dabei ein möglichst gleichmäßiges Durchlaufen der Mitose durch alle Zellen. Die einzelnen Stadien der Mitose nach einer solchen Zellsynchronisierung wurden anhand von HeLa-Zellen bereits zeitlich korreliert (Gohla et al.,

2005). So befindet sich der überwiegende Teil der Zellen zum Zeitpunkt des Ausbringens (0 min) in der Prometaphase. Nach etwa 45 min erreicht ein Grossteil die Metaphase, nach 90 - 110 min die Telophase und nach 180 min hat die Mehrheit der Zellen bereits die Zytokinese bzw. G1-Phase erreicht.

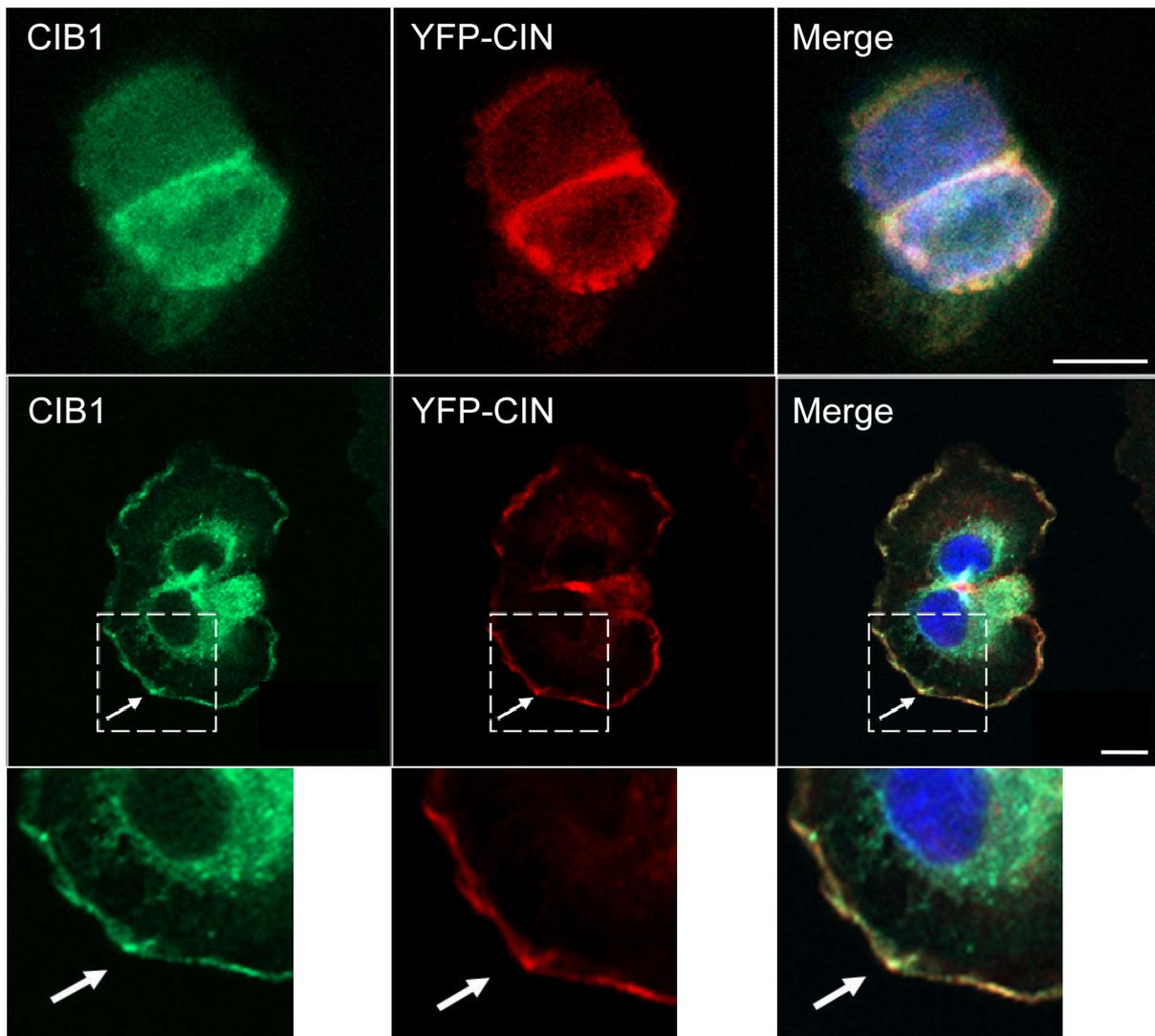


Abbildung IV.11: YFP-CIN und CIB1 kolokalisieren im kontraktiven Aktomyosin-Ring (oberes Panel) und in Lamellopodien (unteres Panel) während der Mitose/Zytokinese. GC-1 spg-Zellen wurden mit einem Plasmid für YFP-CIN transfiziert und die Zellen anschließend mit Hilfe eines Thymidin/Nocodazol-Blocks in der G2-Phase des Zellzyklus synchronisiert. 90 - 110 min nach Beendigung des Blocks wurden die Zellen fixiert und mit einem Alexa 488 (CIB1)-markierten Antikörper gefärbt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI. Anschließend wurden die Zellen konfokalmikroskopisch ausgewertet. Die kleinen Abbildungen zeigen Vergrößerungen der indizierten Abschnitte, während auf der rechten Seite jeweils die Überlagerungen der beiden Fluoreszenzkanäle (*Merge*) zusammen mit der DAPI-Färbung dargestellt sind. Weiße Balken = 10 μ m.

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation von CIN und CIB1 während der Mitose wurde jedoch nicht auf HeLa-Zellen, sondern auf die murine spermatogoniale Keimzelllinie GC-1 spg als Modellsystem zurückgegriffen. Diese Zelllinie wurde aus sogenannten

Spermatogonien, den Vorläuferzellen von Spermien, generiert und zeichnet sich unter anderem durch eine hohe Proliferationsrate aus (Hofmann et al., 1992). Desweiteren enthalten GC-1 spg-Zellen die für diese Arbeit interessanten Proteine CIN, CIB1, Calmodulin und Cofilin in biochemisch gut nachweisbaren Konzentrationen (Daten nicht gezeigt). Auch in dieser Zelllinie musste CIN jedoch für Immunfluoreszenz-Analysen als N-terminales YFP-Fusionsprotein transient überexprimiert werden, da sich der zur Verfügung stehende CIN-Antikörper für eine Detektion von endogenem CIN in der Immunfluoreszenz als nicht ausreichend sensitiv erwies.

Nach der transienten Transfektion von GC-1 spg-Zellen mit Plasmid-DNA für CIN und einer anschließenden Synchronisierung wurden die Zellen etwa 90 - 110 min nach Beginn der Mitose fixiert oder mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Dabei ließ sich eine signifikante Kollokalisierung von CIN und CIB1 während der Telophase bzw. Zytokinese am kontraktile Aktomyosin-Ring (s. Abb. IV.11, obere Panel) und in späteren Phasen der Zytokinese an der Plasmamembran von Lamellopodien beobachten (s. Abb. IV.11, unteres Panel). Beide Regionen sind für ihre gesteigerte, Cofilin-abhängige Aktin-Dynamik bekannt (Bamburg, 1999) und in beiden Bereichen kollokalisiert CIN auch transient mit Cofilin (Gohla et al., 2005). Folglich ist CIB1 für einen putativen regulatorischen Einfluss auf die CIN-Aktivität während der Zytokinese ideal positioniert.

Auch für Calmodulin konnte während der Mitose eine Relokalisation an die sich einschnürende Teilungsfurche gezeigt werden (Li et al., 1999). Daher sollte weiterhin die subzelluläre Lokalisation von transient überexprimiertem Calmodulin, CIN und CIB1 während der Mitose überprüft werden. Da für die Immunfluoreszenz kein adäquater kommerzieller Calmodulin-Antikörper erhältlich war, wurde uns von der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Lohse freundlicherweise ein N-terminal DsRed-markiertes Calmodulin-Konstrukt zur Verfügung gestellt. Obwohl bereits stabile, Calmodulin exprimierende Zelllinien publiziert wurden, führte hier die transiente Überexpression von Calmodulin während der Mitose zu einem reproduzierbaren Absterben der GC-1 spg-Zellen. Die überlebenden Zellen stellten sich entweder als untransfiziert heraus oder die Calmodulin-Expression war zu schwach für eine Auswertung der Immunfluoreszenz. Dieser Effekt konnte sowohl bei einer Kotransfektion von allen drei Proteinen, als auch bei der Transfektion von solitärem DsRed-markierten Calmodulin beobachtet werden. Ob es sich hierbei um einen Zelltyp-spezifischen Effekt in den GC-1 spg-Zellen handelte wurde nicht weiter verfolgt.

IV.4.2 Einfluss von CIB1 auf die Cofilin-Aktivität von CIN während der Mitose

Da CIN und CIB1 während der Mitose in Bereichen gesteigerter Cofilin-Aktivität lokalisieren, sollte als Nächstes die Frage geklärt werden, ob CIB1 möglicherweise einen Einfluss auf die CIN-vermittelte Cofilin-Dephosphorylierung während der Mitose hat. Um diese Hypothese zu testen, wurden endogenes CIN und CIB1 vor Beginn der Mitose aus GC-1 spg-Zellen depletiert und die Auswirkungen dieser Depletion auf die Phosphocofilin-Level anschließend biochemisch untersucht. Calmodulin wurde hier nicht mit einbezogen, da die Zellen in den vorherigen Versuchen sehr sensitiv auf Manipulationen der Calmodulin-Proteinlevel reagierten.

Für die transiente Depletion der endogenen Proteine in Zellen wurde in diesem Fall die Methode der RNA-Interferenz (siRNA) gewählt, welche zunächst für beide Proteine etabliert werden musste. Dabei wurden je fünf spezifische siRNA-Sequenzen für CIN und CIB1 der Firma Dharmacon in GC-1 spg-Zellen auf ihre Effizienz getestet (Daten nicht gezeigt) und die aussichtsreichsten Sequenzen für beide Proteine anschließend eingehender charakterisiert (s. Abb. IV.12). Für CIN erwies sich dabei eine Konzentration von 25 nM siRNA als ausreichend für eine nahezu vollständige Reduktion der Proteinlevel in den untersuchten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Hier ergab auch der Einsatz höherer siRNA-Konzentration nur eine minimale Verbesserung. Demgegenüber ließ sich für CIB1 ein maximaler Depletions-Effekt bei einer Konzentration von 12 nM beobachten, wobei auch hier eine Reduzierung der CIB1-Level von mehr als 50% erreicht wurde. Interessanterweise führte in diesem Fall eine Erhöhung der siRNA-Konzentration zu einem gegenteiligen Effekt, nämlich der Abschwächung der CIB1-Depletion.

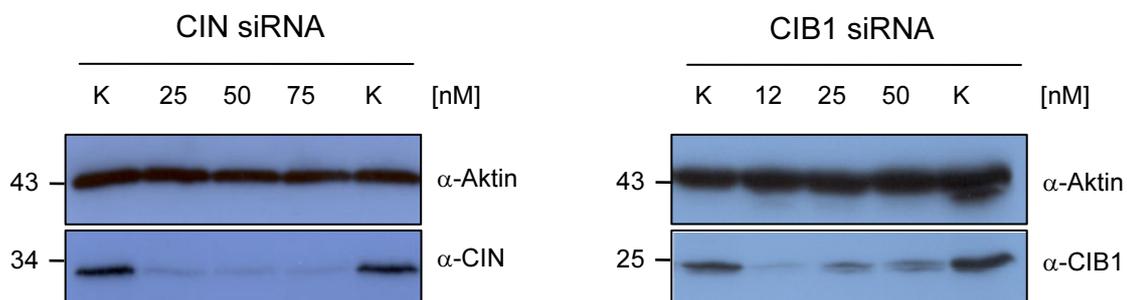


Abbildung IV.12: Validierung der siRNA-vermittelten Depletion von endogenem CIN oder CIB1 in GC-1 spg-Zellen. Die Zellen wurden jeweils mit einer siRNA-Sequenz für CIN (links) oder CIB1 (rechts) in den angegebenen Konzentrationen transfiziert und nach 72 h Inkubation lysiert. Anschließend wurden je 30 µg Totalprotein im Immunoblot auf die endogenen CIN- oder CIB1-Spiegel untersucht, wobei Aktin als Ladekontrolle diente. Es ließ sich für beide Proteine eine signifikante Reduktion der endogenen CIN- und CIB1-Level von mehr als 50% beobachten. Verwendete Abkürzungen: K = Kontrolle, Zellen die mit 75 nM (CIN) oder 50 nM (CIB1) einer *non-targeting* Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

In HeLa-Zellen konnten durch die Methode der Zellsynchronisation nicht nur die einzelnen Stadien der Mitose mit definierten Zeitpunkten korreliert werden, sondern darüber hinaus wurde auch das Phosphorylierungsmuster von Cofilin während der mitotischen Progression eingehend untersucht und beschrieben. Dabei steigt der Anteil an inaktivem Phosphocofilin in HeLa-Zellen während der Mitose kontinuierlich an und erreicht seinen Zenit nach etwa 45 min in der Prophase/Metaphase. Anschließend sinken die Phosphocofilin-Spiegel jedoch wieder bis auf das Ausgangsniveau in der Telophase/Zytokinese ab (Amano et al., 2002; Gohla et al., 2005).

Mit den validierten siRNA-Sequenzen sowie der Methode der Zellsynchronisation wurde nun die Auswirkung der Depletion von CIN und/oder CIB1 auf die endogenen Phosphocofilin-Spiegel während der Mitose analysiert. In GC-1 spg-Zellen, welche mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, stieg die Phosphocofilin-Konzentration bis zur Metaphase (45 min) nahezu auf das doppelte Niveau an und ging anschließend langsam wieder bis in etwa auf das Ausgangsniveau zurück (s. Abb. IV.13, A + C).

Nach der siRNA-vermittelten Depletion von endogenem CIN oder CIB1 ließ sich ebenfalls ein massiver Anstieg der Phosphocofilin-Level bis zur Metaphase detektieren. Die in den Kontrollzellen beobachtete anschließende Abnahme blieb jedoch größtenteils aus (s. Abb. IV.13, A + C). Nur in den mit CIB1-siRNA behandelten Zellen gingen die Phosphocofilin-Spiegel in den späteren Phasen der Mitose (Telophase/Zytokinese, 110 min) wieder leicht zurück. Dabei wurde für CIN eine durchgehend gute Wirkung der siRNA mit durchschnittlichen CIN-Restlevel von unter 40% beobachtet, während die endogenen CIB1-Level nur etwa halbiert wurden oder aufgrund von Problemen mit dem Immunoblot nicht ausgewertet werden konnten (s. Abb. IV.13, A, 0 min und 180 min). Interessanterweise resultierte die parallele Depletion von endogenem CIN und CIB1 in einem massiven Anstieg der Phosphocofilin-Spiegel von der Metaphase bis zur Telophase/Zytokinese um das bis zu Zweifache der Kontrollzellen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass in diesem Experiment der Effekt der CIB1-siRNA relativ stark war, während die CIN-Depletion etwas schwächer ausfiel (s. Abb. IV.13, B + C).

Es bleibt festzuhalten, dass Cofilin auch in GC-1 spg-Zellen offenbar zur Metaphase eher phosphoryliert/inaktiviert wird, während in späteren Phasen der Mitose scheinbar eine Reaktivierung durch Dephosphorylierung stattfindet. Diese Reaktivierung ist jedoch zumindest partiell CIN- und CIB1-abhängig, da eine Depletion der beiden Proteine zu erhöhten Phosphocofilin-Spiegeln während der Telophase/Zytokinese und auch nach Abschluss der Mitose führt. Offenbar verläuft dieser Effekt auch additiv, da eine gleichzeitige Reduktion der CIN- und CIB1-Proteinspiegel in einer nochmals verstärkten Cofilin-Phosphorylierung und damit Inaktivierung resultiert, wobei sich dieser Effekt jedoch nicht nur auf die Telophase/Zytokinese, sondern auch auf die Metaphase erstreckt.

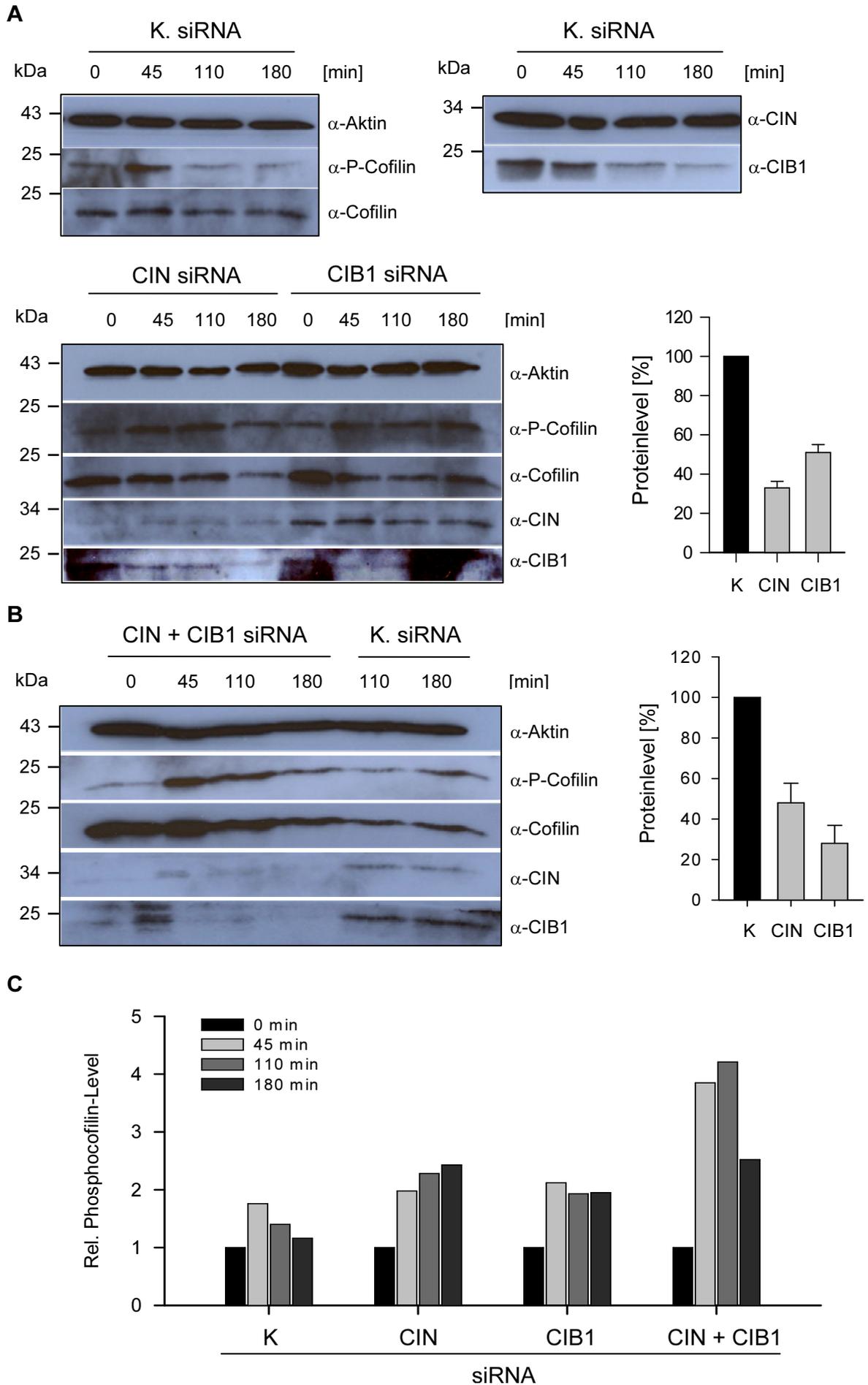


Abbildung IV.13: Die Depletion von CIN und CIB1 führt in GC-1 spg-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der endogenen Phosphocofilin-Level in der Mitose. Zellen wurden mit CIN (25 nM)-, CIB1 (12 nM)- oder Kontroll-siRNAs (25 nM) transfiziert und nach 48 h in der G2-Phase des Zellzyklus durch einen Thymidin-Nocodazol-Block synchronisiert. Nach Beendigung des Blocks wurden die Zellen nach 0 - 180 min lysiert und die endogenen CIN-, CIB1-, Cofilin- und Phosphocofilin-Level im Immunoblot bestimmt. Die Immunoblot-Ergebnisse wurden anschließend densitometrisch ausgewertet, um für jedes Experiment die relativen CIN-, CIB1- und Phosphocofilin-Level zu ermitteln. Dabei wurden CIN und CIB1 gegen Aktin normiert, und für die Berechnung der relativen Phosphocofilin-Level wurden die Cofilin-Konzentrationen herangezogen. **(A)** zeigt die Immunoblot-Daten von Zellen, die mit einer Kontroll-, CIN- oder CIB1-spezifischen siRNA transfiziert wurden, wobei für die densitometrische Bestimmung der CIN- bzw. CIB1-Konzentrationen die Banden der jeweils anderen Proteins als Kontrolle dienten. **(B)** zeigt Zellen, welche mit beiden siRNAs transfiziert wurden. Auf der rechten Seite ist in beiden Fällen die densitometrische Auswertung der relativen CIN- und CIB1-Level dargestellt. In **(C)** wurden die relativen Phosphocofilin-Level der einzelnen Experimenten für alle vier Zeitpunkte miteinander verglichen. Dabei wurden die auf die Aktin-Level normierten Phosphocofilin-Spiegel zum Zeitpunkt 0 min als 1 gesetzt und die weiteren Werte extrapoliert. Verwendete Abkürzungen: K = Kontroll-siRNA (*non-targeting* siRNA).

CIN und CIB1 beeinflussen also das Phospho-Cycling von Cofilin in Phasen der Mitose, in denen sie an denselben subzellulären Strukturen lokalisieren.

IV.4.3 Auswirkungen der Depletion von CIN und CIB1 auf die Zellteilung

Daher sollte weiterhin geprüft werden, ob das Zusammenspiel von CIN und CIB1 während der Mitose auch einen Einfluss auf den Ausgang der Zellteilung hat. Zu diesem Zweck wurden GC-1 spg-Zellen mit den CIN- und/oder CIB1-spezifischen siRNAs transfiziert, anschließend synchronisiert und dann gemeinsam in die Mitose entlassen. Nach 16 h wurden die Zellen fixiert, gefärbt und mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet, wobei die Anzahl der multinukleären Zellen für jede Bedingung bestimmt wurde.

Während die Depletion von CIN oder CIB1 alleine nur einen geringen Einfluss auf die Entstehung multinukleärer Zellen hatte, führte eine parallele Reduktion der endogenen CIN- und CIB1-Spiegel zu einem signifikanten Anstieg an mehrkernigen Zellen (s. Abb. IV.14). Da in diesem Versuch die Effizienz der jeweiligen siRNA-vermittelten Proteindepletion aus technischen Gründen nicht mitverfolgt wurde, lässt sich über das tatsächliche Ausmaß der Depletion keine Aussage treffen. Es ist also durchaus möglich, dass eine stärkere Reduktion der endogenen Proteinlevel zu einem erheblich drastischeren Ergebnis führt. Die transiente Herunterregulation von Genen mittels siRNA kann zwar häufig relativ schnell und unkompliziert durchgeführt werden, birgt jedoch aufgrund wechselnder Transfektionseffizienzen und einer zeitlichen Limitierung der Depletion auch Nachteile. Für weitergehende Analysen sollte daher eine stabile, CIN-depletierte GC-1 spg-Zelllinie etabliert werden.

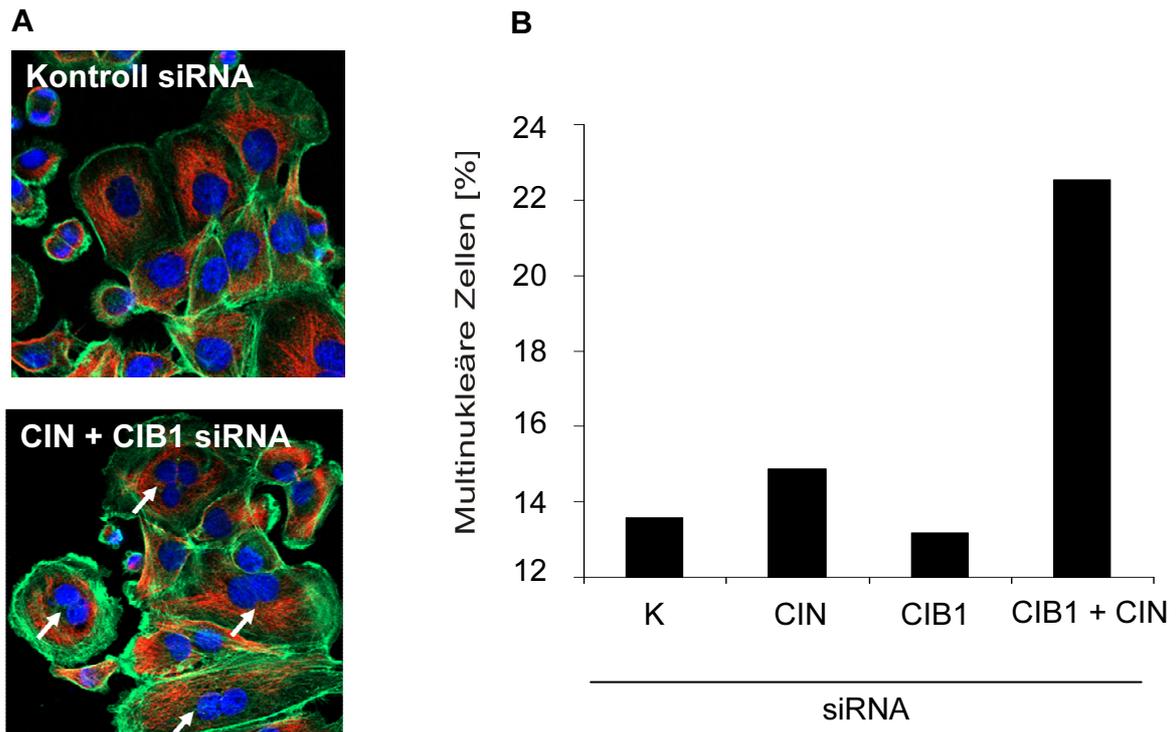


Abbildung IV.14: Die siRNA-vermittelte Depletion von CIN und CIB1 induziert die Akkumulation multinukleärer Zellen. (A) GC-1 spg-Zellen wurden mit CIN (25 nM)-, CIB1 (12 nM)- oder Kontroll-siRNAs (25 nM) transfiziert und nach 48 h in der G2-Phase des Zellzyklus durch einen Thymidin/Nocodazol-Block synchronisiert. Nach dem erneuten Ausbringen wurden die Zellen nach 16 h fixiert und mit einem Aktin- (Alexa Phalloidin 546, rot) und einem α -Tubulin-spezifischen Antikörper (grün) inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (blau). Exemplarisch sind hier Zellen gezeigt, die mit der Kontroll-siRNA (oberes Panel) oder CIB1- und CIN-spezifischen siRNAs (unteres Panel) transfiziert wurden. Multinukleäre Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. (B) Es wurden mindestens 500 Zellen pro Ansatz auf das Vorkommen multipler Zellkerne untersucht und die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Die Wahl fiel hierbei auf ein lentiviral-gestütztes shRNA-System der Firma Sigma (s. III.8.5). Für die Generierung einer solchen stabilen Zelllinie wurde ein Set aus fünf verschiedenen, CIN-spezifischen shRNA-Sequenzen sowie eine Kontrollsequenz über lentivirale Transduktion in GC-1 spg-Zellen eingebracht (s. III.8.5) und die so generierten Zelllinien anschließend in Immunoblot-Analysen auf ihre endogenen CIN-Proteinlevel überprüft. Von diesen fünf Zelllinien zeigten vier eine Reduktion der endogenen CIN-Spiegel in unterschiedlichen Ausprägungen (s. Abb. IV.15). Mit diesen Zelllinien steht nun ein wichtiges Werkzeug zur Verfügung, um zu prüfen, inwieweit die CIN-Aktivität während der Mitose tatsächlich von einer Regulation durch CIB1 abhängt und ob CIB1 in diesem Zusammenhang auch durch eine PAK1-LIMK1-vermittelte Signaltransduktion die Cofilin-Phosphorylierung beeinflusst. Auch eine mögliche Rolle von Calmodulin sowie der Cofilin-Phosphatase SSH in diesem Prozess bleibt noch zu klären.

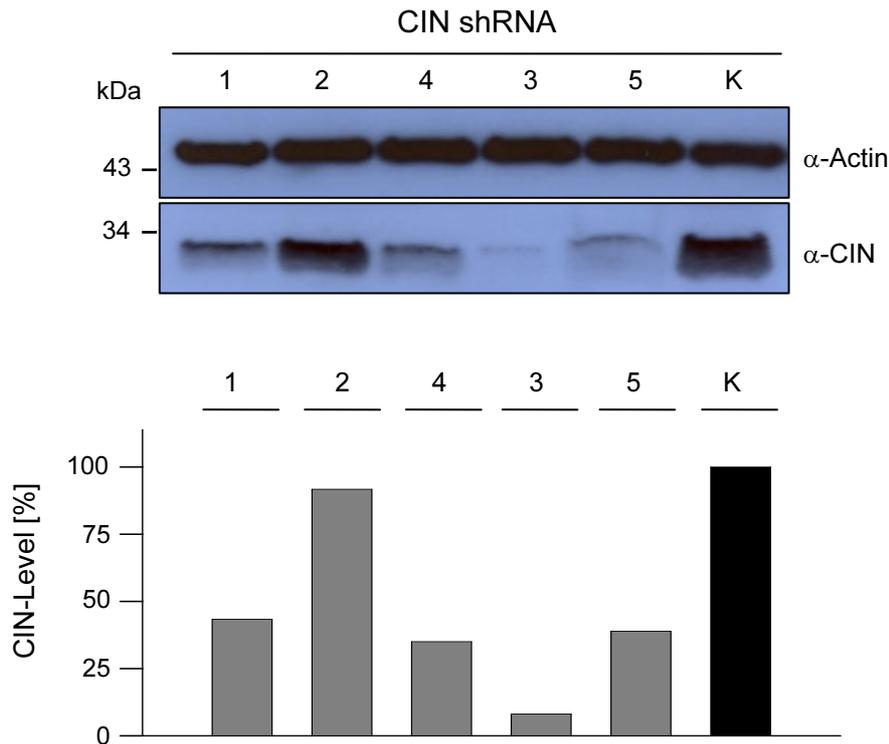


Abbildung IV.15: Etablierung einer stabilen, CIN-depletierten GC-1 spg-Zelllinie mittels shRNA. GC-1 spg-Zellen wurden mit den fünf verschiedenen CIN-spezifischen shRNA-Sequenzen (1 - 5) oder einer Kontroll-shRNA stabil transduziert und die Depletion von endogenem CIN anschließend in der Immunoblot-Analyse verglichen, wobei Aktin als Ladekontrolle diente (oberes Panel). Es wurde je 30 μ g Totalprotein aufgetragen. Unteres Panel: Densitometrische Auswertung der endogenen CIN-Level in den verschiedenen shRNA-Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dabei wurden die CIN-Spiegel der Kontroll-Zelllinie als 100% gesetzt. Verwendete Abkürzungen: K = Kontrolle, *non-targeting* shRNA.

IV.5 Die Kartierung von putativen CIN- und CIB1-Bindedomänen

Die Veränderung der endogenen Proteinspiegel durch Methoden wie die si- oder shRNA stellt ein wichtiges Werkzeug für die funktionelle Analyse einzelner Proteine dar. Allerdings stellte sich in diesem Fall das Problem, dass eine Depletion von CIB1 nicht nur die CIN/CIB1-Interaktion verhindern würde, sondern darüber hinaus auch die CIB1-vermittelte PAK1-Aktivierung und einen damit verbundenen Einfluss von CIB1 auf die Cofilin-Phosphoregulation. Daher wurde nach Wegen gesucht, um die endogene CIN/CIB1-Interaktion selektiv zu inhibieren.

Ein Ansatzpunkt stellt hier die Identifizierung von spezifischen Bindedomänen auf den jeweiligen Bindungspartnern dar, mit dem Ziel, die Interaktion durch eine gezielte Intervention an dieser Stelle zu blockieren. Je nach Länge der putativen Bindestellen bietet sich beispielsweise die Mutation von einzelnen, für die Bindung essentiellen, Aminosäuren an, wobei sich dieses Verfahren bei langen Aminosäureabschnitten als sehr zeitaufwendig erweisen kann. Darüber hinaus müssen die so manipulierten Proteine in den Zellen

überexprimiert werden, bei gleichzeitigem Vorhandensein des endogenen Wildtyp-Proteins, was oft in keinem oder nur einem partiellen Effekt resultiert.

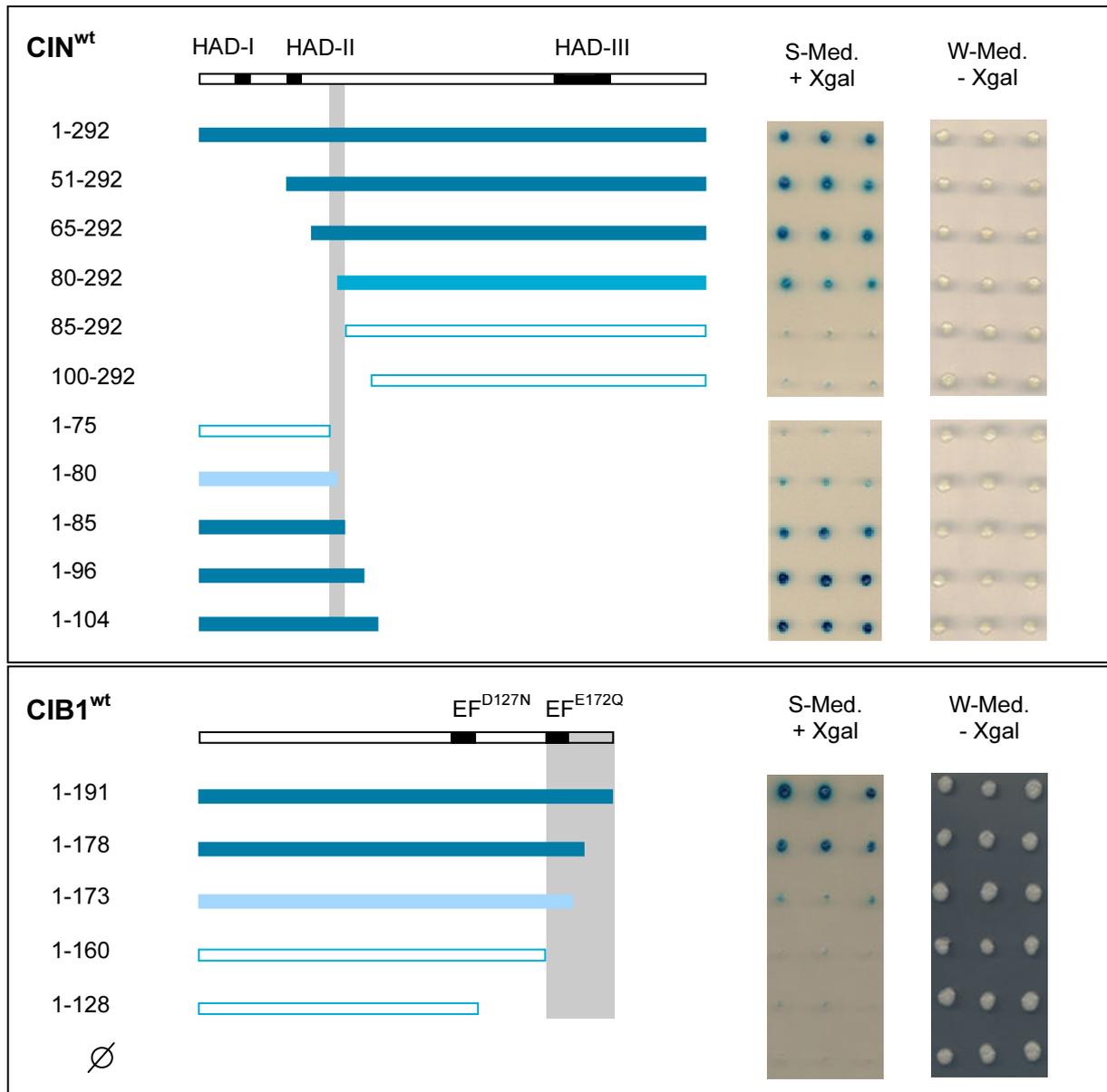


Abbildung IV.16: Kartierung der CIN/CIB1-Interaktionsdomänen mit Hilfe des yeast two-hybrid assays. CIN- und CIB1-Deletionskonstrukte wurden mittels PCR generiert und mit den jeweiligen Wildtyp-Konstrukten in EGY48-Hefezellen kotransformiert, welche zusätzlich das p8op-LacZ Reportergen enthielten. Nach Selektion der Kotransformanten wurden die Hefen entweder auf Wachstums- (W-Med.) oder Selektionsmedium (S-Med., minus Leuzin, plus X-Gal) ausgestrichen, um ihre Fähigkeit zu testen, in Abwesenheit von Leuzin zu wachsen und X-Gal zu prozessieren. Als Positivkontrolle dienten die jeweiligen Wildtyp-Konstrukte. Die linke Seite repräsentiert jeweils eine schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte mit Aminosäure-Angaben sowie einer einfachen Farbkodierung zur besseren Visualisierung der Bindungseffizienz, während rechts die korrespondierenden Hefe-Klone abgebildet sind.

Alternativ kann mit einem synthetischen Peptid, welches zu der Sequenz einer der putativen Bindestellen korrespondiert, die Interaktion der endogenen Proteine durch kompetitive

Inhibition manipuliert werden. Im Folgenden sollte daher eine Methode zur spezifischen Inhibierung der CIN/CIB1-Interaktion entwickelt werden, um die physiologische Relevanz dieser Interaktion in Zellen besser charakterisieren zu können.

Für die Identifizierung von putativen CIN/CIB1-Interaktionsdomänen auf den jeweiligen Proteinen mit Hilfe des bereits etablierten *yeast two-hybrid assays* wurden zunächst verschiedene N- oder C-terminale Deletionskonstrukte von CIN mittels PCR erstellt, und zusammen mit Wildtyp-CIB1 in Hefezellen exprimiert. Die Kombinationen wurden anschließend durch Selektionsmedium auf ihre Fähigkeit zur Interaktion getestet, wobei wiederum nur solche Hefe-Klone als positiv gewertet wurden, die sowohl auf Selektionsmedium gewachsen sind als auch X-Gal zu einem blauen Farbstoff prozessieren konnten.

So ließ sich auf CIN eine etwa 20 Aminosäuren umfassende, diskrete Region zwischen den HAD-Motiven II und III als putative Bindestelle von CIB1 lokalisieren (s. Abb. IV.16, oberes Panel), wobei die Aminosäuresequenz ⁸⁰RAEQL⁸⁵ besonders wichtig zu sein schien. Auf dieselbe Weise wurden auch C-terminale Deletionskonstrukte von CIB1 generiert und auf ihre Interaktionsfähigkeit mit CIN-Wildtyp überprüft. So konnte eine putative Bindedomäne von CIN durch die schrittweise Trunkierung von CIB1 als die Aminosäuresequenz ¹⁷³QHVIS¹⁷⁸ in der Nähe des C-Terminus identifiziert werden (s. Abb. IV.16, unteres Panel). Die vergleichbare Expression der jeweiligen Trunkanten wurde dabei mittels Immunoblot-Analysen anhand von Hefe-Zellysaten verifiziert (Daten nicht gezeigt).

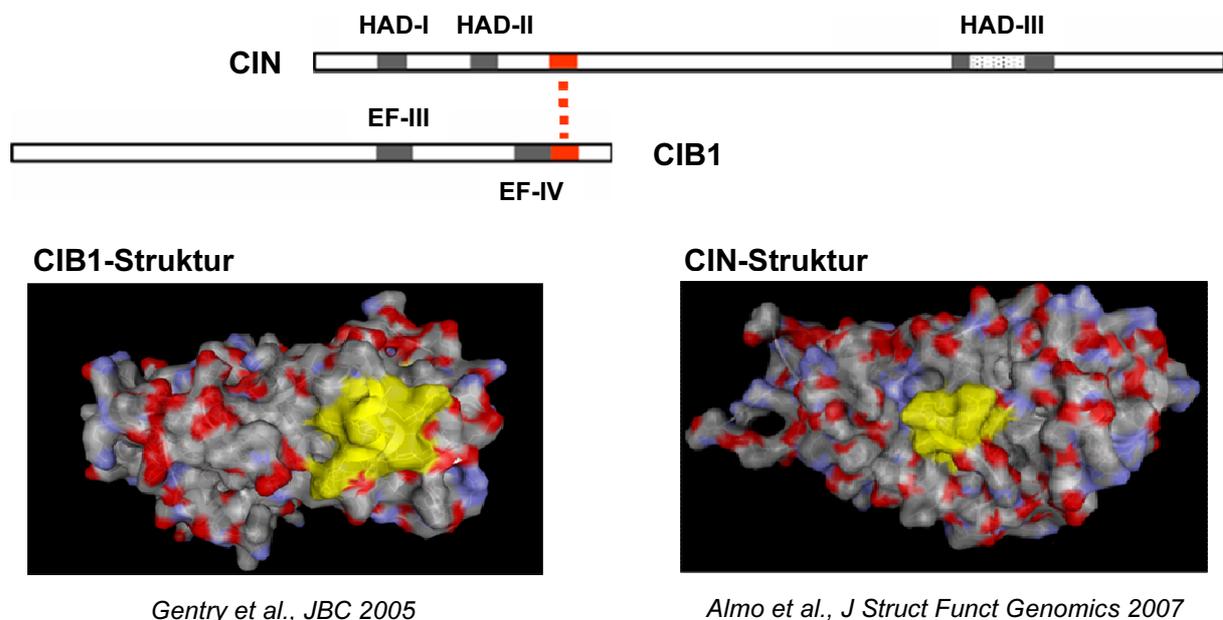


Abbildung IV.17: Darstellung der putativen Bindedomänen auf CIN und CIB1. Oberes Panel: Schematische Darstellung der beiden Bindedomänen (jeweils in rot dargestellt). Unterem Panel: Die wahrscheinliche Lage der putativen Interaktionsdomänen von CIB1 und CIN (gelb markiert) wurde anhand verfügbarer Kristallstrukturen bestimmt.

Da aus der Literatur die CIN- (Almo et al., 2007) und CIB1-Kristallstrukturen (Gentry et al., 2005) bekannt waren, wurde zusätzlich die Lokalisation der putativen CIN- und CIB1-Interaktionsdomänen untersucht. Abbildung IV.17 verdeutlicht sehr schön, dass beide Domänen auf den jeweiligen Proteinen (in gelb dargestellt) offenbar Oberflächen-exponiert vorliegen und somit vielversprechende Ansatzpunkte für eine mögliche Intervention darstellen.

Um die identifizierten Bindedomänen auch biochemisch verifizieren zu können, wurde in einem nächsten Schritt die CIB1¹⁻¹⁷³-Mutante für die bakterielle Proteinexpression in den Vektor pGEX-4T-1 umklontiert und rekombinantes GST-CIB1¹⁻¹⁷³ hergestellt, aufgereinigt und die GST-Markierung proteolytisch entfernt. Anschließend wurde eine Dosis-Wirkungskurve mit immobilisiertem CIB1^{wt} oder CIB1¹⁻¹⁷³ und steigenden Konzentrationen von CIN in einem Festphasen-Bindungsassay durchgeführt, um zu testen, inwieweit die CIN/CIB1-Assoziation durch diese Deletion beeinflusst wird. Während sich für die CIN^{wt}/CIB1^{wt}-Interaktion eine gewohnt robuste Bindung ergab, waren für die CIN^{wt}/CIB1¹⁻¹⁷³-Kombination sehr hohe CIN-Konzentrationen notwendig, um überhaupt eine Bindung detektieren zu können. Dabei war die Bindung durchschnittlich um mehr als 75% reduziert und ließ sich auch durch die Zugabe von Kalzium nicht weiter stimulieren (s. Abb. IV.18, A und Daten nicht gezeigt). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass durch die Deletion von 18 Aminosäuren am C-Terminus die strukturelle Integrität zumindest der EF-Hand IV, wenn nicht sogar des ganzen Proteins stark gefährdet wird (persönliche Mitteilung, PD Dr. Reza Ahmadian) und die Reduktion der Bindung auf den strukturellen Integritätsverlust zurückzuführen ist. Der C-Terminus von CIB1 ist zudem als Bindestelle für mehrere CIB1-Interaktoren bekannt. So wurden beispielsweise die Aminosäuren 179 - 188 als wichtige Bindestelle für den Thrombozyten-spezifischen Fibrinogenrezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf CIB1 identifiziert (Tsuboi, 2002). Da diese Sequenz unmittelbar an die von uns gefundene putative CIN-Bindedomäne angrenzt, wäre der Einsatz eines überlappenden inhibitorischen Peptids an dieser Stelle in einem zellulären System riskant.

Aus diesem Grund wurde auch die putative Bindedomäne auf CIN näher untersucht. Da diese Sequenz nur etwa fünf Aminosäuren umfasst, wäre eine sequentielle Mutation der in Frage kommenden Aminosäuren theoretisch möglich gewesen. Die CIN-cDNA weist jedoch einen sehr hohen Gehalt an GC-Basenpaaren (ca. 73%) auf, weshalb sich die genetische Manipulation als äußerst schwierig heraus. Dabei blieben sowohl Versuche mit herkömmlichen, kommerziell erhältlichen Kits für die Punktmutagenese erfolglos, als auch Versuche mit selbstentwickelten Ansätzen. Daher wurde in diesem Fall ein 21 Aminosäuren umfassendes synthetisches Peptid (AnaSpec, CA, USA) gewählt, welches die Aminosäuren 65 - 85 der CIB1-Bindedomäne auf CIN beinhaltet und als kompetitiver Inhibitor der CIN/CIB1-Interaktion fungieren sollte.

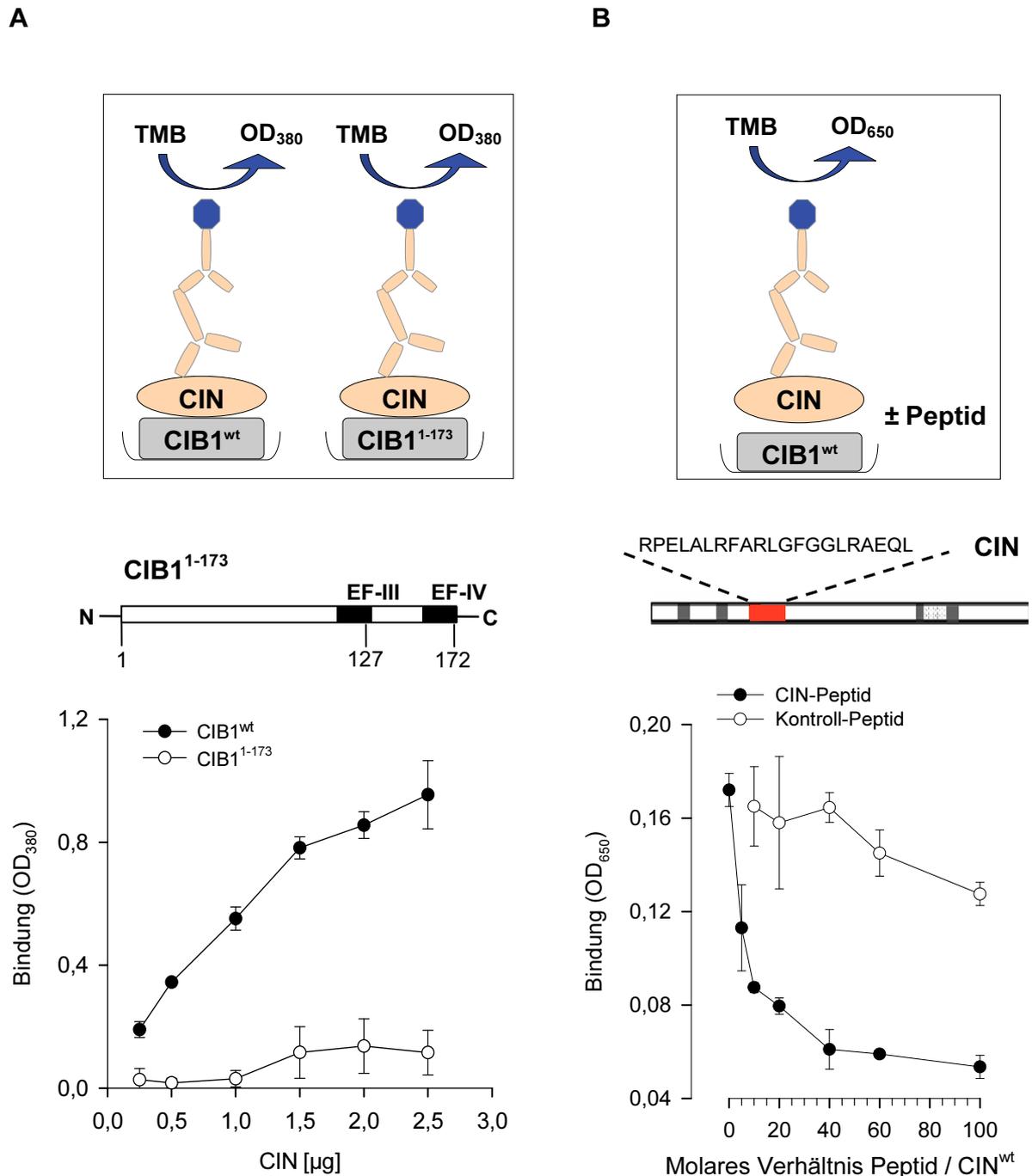


Abbildung IV.18: Biochemische Charakterisierung der putativen Bindedomänen auf CIN und CIB1 *in vitro*. Die schematischen Abbildungen zeigen jeweils den Versuchsaufbau sowie relevante Merkmale der eingesetzten Proteine. **(A)** Festphasen-Bindungsassay als Dosis-Wirkungskurve mit rekombinanten Proteinen. CIB1^{wt} oder CIB1¹⁻¹⁷³ wurden immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen an CIN inkubiert, anschließend wurde das gebundene CIN mit Hilfe des CIN-spezifischen Antikörpers photometrisch detektiert. **(B)** Festphasen-Bindungsassay als Dosis-Wirkungskurve mit 2 μ g immobilisiertem CIB1 und 10 nM CIN in An- oder Abwesenheit von steigenden molaren Konzentrationen des synthetischen CIN-Peptids. Die Bindung von CIN an CIB1 wurde mit Hilfe des CIN-spezifischen Antikörpers detektiert. Ein Peptid, bei dem die Aminosäuren des CIN-Peptids in einer zufälligen Reihenfolge vorlagen, diente hier als Kontrolle. Die in Abbildung B dargestellten Daten sind Ergebnisse von Dr. Elisabeth Jeanclos und wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Als Kontrolle wurde ein sogenanntes *scrambled*-Peptid derselben Aminosäuresequenz eingesetzt, bei dem die Aminosäuren in beliebiger Reihenfolge vorlagen. Dieses Peptid wurde anschließend von Dr. Elisabeth Jeanclos in einem Festphasen-Bindungsassay auf seine Wirksamkeit getestet, indem es in steigenden Dosen zu konstanten CIN- und CIB1-Konzentrationen zugegeben wurde. Während das Kontroll-Peptid nur einen geringen Einfluss auf die CIN/CIB1-Assoziation zeigte, erwies sich das CIN-Peptid schon in relativ geringen Dosen als äußerst wirksamer Inhibitor der CIN/CIB1-Bindung. Bereits bei einem 10-fachen Überschuss des Peptids ließ sich nur noch eine etwa 50%ige Bindung der beiden Proteine nachweisen, wobei die Bindung Dosis-abhängig bis zu einem vernachlässigbaren Level reduziert werden konnte (s. Abb. IV.18, B).

IV.6 Identifizierung neuer CIN-Phosphataseinhibitoren

Neben der Kartierung der CIN/CIB1-Bindedomänen wurde auch ein Ansatz zur gezielten Inaktivierung der CIN-Phosphataseaktivität in Zellen verfolgt. Hierbei sollte das ungewöhnliche Inhibitorprofil von CIN näher charakterisiert werden, um durch die Identifizierung eines CIN-spezifischen, niedermolekularen Inhibitors in der Lage zu sein, die CIN-Aktivität möglichst unabhängig von den hochexprimierten Serin/Threonin-Phosphatasen der PP1/PP2A/PP2B-Familien modulieren zu können und so ein wertvolles Werkzeug für weitere Analysen der physiologischen Rolle von CIN in Zellen zu erhalten.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die klassischen Thiol-basierenden Serin/Threonin-Phosphataseinhibitoren auf die CIN-Aktivität keinen Einfluss haben, CIN jedoch effektiv durch Molybdat, Orthovanadat (wirken kompetitiv mit Phosphat) sowie die divalenten Metallionen Zn^{2+} , Ca^{2+} und Mn^{2+} (wirken kompetitiv mit Mg^{2+}) inhibiert werden kann (Fonda und Zhang, 1995; Gohla et al., 2005). Da das Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund über eine umfangreiche Bibliothek von mehr als 32000 putativen Phosphatase-Inhibitoren verfügt, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof Dr. H. Waldmann ein *screening* zur Identifizierung neuer putativer CIN-Inhibitoren durchgeführt. Dieses *screening* beruhte auf der Aktivität von rekombinant in Bakterien synthetisiertem CIN gegen das generelle Phosphatase-Substrat pNPP (para-Nitrophenylphosphat). Im Zuge dieser Analysen wurden etwa 50 mg an rekombinantem CIN von mir hergestellt und aufgereinigt. Die anschließende Analyse der Substanz-Bibliotheken wurde dann von der Arbeitsgruppe Waldmann übernommen. Von den untersuchten Substanzen zeigte nur ein Isomerengemisch aus schwarzem Tee, Theaflavin Monogallat, ein schwaches inhibitorisches Ergebnis mit einem IC_{50} -Wert von 80 μ M.

Da die Inhibition der CIN-Phosphatase-Aktivität jedoch auch auf unspezifische (z.B. antioxidative) Effekte von Theaflavin Monogallat zurückzuführen sein könnte (persönliche

Mitteilung, PD Dr. Heino Prinz) und die Einzelkomponenten des Gemisches nicht kommerziell erhältlich sind, wurde dieser Ansatz vorerst nicht weiter verfolgt. Von zukünftigem Interesse dürfte jedoch die Tatsache sein, dass die Trefferrate im Zuge dieser Analyse ungewöhnlich niedrig lag und die Spezifität von CIN mit keiner der bisher von der Arbeitsgruppe Waldmann untersuchten Phosphatasen übereinstimmte (persönliche Mitteilung, PD Dr. Heino Prinz).

V Diskussion

Aufgrund der komplexen und weitreichenden Folgen einer dysregulierten Cofilin-Aktivität für die Funktionsfähigkeit von Zellen, erscheint ein besseres Verständnis der Cofilin-regulierenden Signaltransduktionswege von zentraler Bedeutung. Ein essentieller regulatorischer Mechanismus der Cofilin-Aktivität stellt dabei das Phospho-*Cycling* zwischen der inaktiven, phosphorylierten und der aktiven, dephosphorylierten Cofilin-Form da. Die kürzlich identifizierte HAD-Typ Phosphatase CIN zeigt in mitotischen (Gohla et al., 2005) und motilen Zellen (Delorme et al., 2007), sowie unter ATP-Stressbedingungen (Huang et al., 2008) eine spezifische Cofilin-Phosphataseaktivität. Über regulatorische Mechanismen der CIN-Aktivität ist jedoch nur sehr wenig bekannt. Daher sollten in Verlauf dieser Arbeit putative CIN-regulatorische Proteine identifiziert und funktionell charakterisiert werden.

So konnte das Kalzium- und Integrin-bindende Protein 1 (CIB1) als neuer CIN-Interaktor bestätigt werden. Die Bindung der beiden Proteine wurde dabei durch Ca^{2+} stimuliert und CIB1 war *in vitro* in der Lage, die CIN-Aktivität gegen das niedermolekulare Substrat PLP in Gegenwart von freiem Ca^{2+} zu stabilisieren. Darüber hinaus wurde die Aktivität von CIN gegen PLP durch den Kalzium-Sensor Calmodulin Ca^{2+} - und CIB1-abhängig stimuliert. In einem zellulären System führte die Depletion von CIN und CIB1 in mitotischen Zellen zu einer verstärkten Inaktivierung von Cofilin und zu einer Akkumulation von multinukleären Zellen.

V.1 Initiale Charakterisierung der CIN/CIB1-Interaktion

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation wurde von unserer Arbeitsgruppe ein *yeast two-hybrid screen* mit einer cDNA-Bibliothek aus murinem Hirn durchgeführt, da CIN in diesem Gewebe die stärkste Expression zeigt (Gohla et al., 2005). Das *yeast two-hybrid*-System bietet den Vorteil, dass es im Milieu einer eukaryotischen Zelle abläuft. Daher können sowohl die Köder- als auch die Beuteproteine posttranslational modifiziert und in Gegenwart von Chaperonen exprimiert und gefaltet werden. Das System weist Protein-Protein-Interaktionen durch die Rekonstitution eines Transkriptionsfaktors nach und ermöglicht es so, cDNA-Bibliotheken nach möglichen Interaktionspartnern des interessierenden Proteins zu durchsuchen. Aus System-immanenten Gründen besteht bei einem *yeast two-hybrid*-System jedoch eine relativ hohe Gefahr von falsch-positiven Treffern (Schätzungen gehen von bis zu 50% aus), bzw. von nicht erkannten Interaktionen aufgrund von strukturellen Problemen oder veränderten Aktivitätsprofilen der untersuchten Proteine, weshalb die Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten sind und nur einen ersten Hinweis liefern können (Deane et al., 2002). Nichtsdestotrotz zeigen neuere Studien, dass die so gewonnenen Ergebnisse in Bezug

auf Verlässlichkeit und Aussagekraft in etwa mit denen konventioneller proteinbiochemischer Ansätze, wie Ko-Immunopräzipitationen oder Affinitäts-basierten *pull-down*-Experimenten, vergleichbar sind (Yu et al., 2008). Eine Alternative könnte hier auch die sensitive TAP (*tandem affinity purification*)-Methode darstellen, bei der das Köderprotein mit zwei abspaltbaren Affinitäts-Markierungen versehen wird, welche eine effiziente und rasche Aufreinigung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen ermöglichen (Rigaut et al., 1999).

Mit dem *yeast two-hybrid*-Ansatz konnten 18 neue Interaktionspartner von CIN identifiziert werden. Einer dieser Interaktionspartner, das Kalzium- und Integrin-bindende Protein 1 (CIB1, s. Abb. IV.1), wurde für die weiterführende Charakterisierung ausgewählt, da CIB1 nicht nur an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts über eine Interaktion mit Proteinen wie WASP, der kleinen GTPase Rac3 oder FAK (*focal adhesion kinase*) beteiligt ist (Haataja et al., 2002; Naik und Naik, 2003; Tsuboi et al., 2006), sondern auch über die Kinase PAK1 in die Kontrolle des Aktin-depolymerisierenden Faktors Cofilin eingreift (Leisner et al., 2005). Desweiteren bestand die interessante Möglichkeit, dass es sich bei CIB1 aufgrund seiner Sequenzhomologie zu Calcineurin B um eine regulatorische Untereinheit von CIN handeln könnte.

Bemerkenswert war ebenfalls, dass bisher der überwiegende Teil der stetig wachsenden Anzahl beschriebener CIB1-Interaktionspartner mit Hilfe der *yeast two-hybrid*-Technik identifiziert wurde (Leisner et al., 2007). Die Aufklärung der CIB1-Struktur lässt vermuten, dass die Ursache hierfür in der hydrophoben Bindungstasche von CIB1 zu finden ist (Gentry et al., 2005). Eine solche hydrophobe Bindungsregion wird häufig bei Proteinen der EF-Hand-Familie angetroffen und interagiert vorzugsweise mit ebenfalls hydrophoben, α -helikalen Strukturen auf Bindungspartnern (Gentry et al., 2005). Hydrophobe Interaktionen sind zwar relativ salzstabil, jedoch sensitiv gegenüber Detergenzien wie Triton X-100 oder NP-40. Diese werden häufig im Zuge von Immuno- oder Ko-Immunopräzipitation während der Zelllyse für die Solubilisierung von Proteinen oder die Reduktion von unspezifischen Bindungen eingesetzt. Zudem verfügt CIB1 offenbar über einen ungewöhnlichen Schutzmechanismus, bei dem die hydrophobe Bindungstasche durch eine Assoziation mit dem C-Terminus verdeckt wird. Dies dient möglicherweise als Schutz vor einer Selbstassoziation der beiden globulären Domänen von CIB1 oder soll unerwünschte Interaktionen mit nicht-physiologischen Bindungspartnern verhindern (Yamniuk et al., 2006). Aus diesem Grund lassen sich Interaktionen mit CIB1 durch Methoden wie die Immuno- oder Ko-Immunopräzipitation offenbar nur schwer nachweisen.

Unabhängig von dem gewählten Ansatz zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen ist jedoch eine Bestätigung der putativen Interaktionspartner durch weitere Techniken unerlässlich. Diese sollten sich durch eine höhere Spezifität auszeichnen und im Idealfall

auch die Interaktionsanalyse endogener Proteine unter möglichst physiologischen Bedingungen einschliessen. Biochemische und zellbiologische Methoden, wie die Ko-Immunopräzipitation, Kollokalisationsstudien oder FRET (*Förster resonance energy transfer*)-Experimente, werden häufig für eine Analyse solcher Protein-Interaktion in Zellen eingesetzt. Da zu Beginn dieser Arbeit jedoch keine immunpräzipitierenden Antikörper für CIN oder CIB1 zur Verfügung standen, wurde zunächst C-terminal GFP-markiertes CIB1 und Wildtyp-CIN in HeLa-Zellen überexprimiert. Anschließend wurde CIB1-GFP mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers aus den HeLa-Zellysaten präzipitiert und das gebundene CIN im Immunoblot detektiert. Auf diese Weise konnte jedoch keine Ko-Immunopräzipitation zwischen CIN und CIB1-GFP schlüssig nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das ist wenig verwunderlich. In der Literatur konnte bisher, trotz der beeindruckenden Anzahl an bekannten CIB1-interagierenden Proteinen, kaum eine dieser Interaktionen durch die Methode der Ko-Immunopräzipitation belegt werden. Auch hier liegt der Grund vermutlich in der bereits beschriebenen hydrophoben Bindungstasche, bzw. dem Schutzmechanismus (Zhu et al., 2004). Im Fall der CIN/CIB1-Interaktion wäre jedoch auch ein anderes Szenario denkbar. So wurde im Verlauf dieser Arbeit gezeigt, dass die Bindung von CIN an CIB1 wesentlich von den letzten 17 Aminosäuren am C-Terminus von CIB1 abhängt (s. Abb. IV.18). Da in dem obigen Experiment CIB1 als C-terminales Fusionsprotein mit GFP verwendet wurde, könnte auch eine veränderte Konformation des Fusionsproteins die Interaktion mit CIN verhindern.

Um die CIN/CIB1-Interaktion näher charakterisieren zu können, wurden die murinen cDNAs der beiden Proteine isoliert und in geeignete Expressions-Vektoren kloniert (s. Abb. IV.1) und anschließend einige grundlegende Methoden für weiterführende Analysen etabliert. Dazu gehörte nicht nur die bakterielle Produktion und affinitätschromatographische Aufreinigung von CIN und CIB1 (s. Abb. IV.2), sondern auch die Generierung und Validierung eines monoklonalen CIN-Antikörpers aus Kaninchen in Zusammenarbeit mit der Firma Cell Signaling, sowie eines polyklonalen CIB1-spezifischen Antikörpers mittels Affinitätschromatographie. Beide Antikörper zeigten dabei eine hervorragende Sensitivität und Spezifität gegenüber den gereinigten Proteinen in der Immunoblot-Analyse (s. Abb. IV.3, A). Mit Hilfe dieser Antikörper wurde auch das Expressionsmuster der beiden Proteine in verschiedenen murinen Geweben untersucht (s. Abb. IV.3). Hier konnte CIN in allen untersuchten Geweben detektiert werden, was frühere Befunde unserer Arbeitsgruppe bestätigt (Gohla et al., 2005). Mit dem CIB1-Antikörper wurde das bis dato umfangreichste Expressionsprofil für das CIB1-Protein in murinen Geweben erstellt, wobei sich CIB1 ebenfalls in nahezu allen getesteten Geweben nachweisen ließ (s. Abb. IV.3, B, rechtes Panel).

Da die Analyse der Bindung mit Hilfe der Ko-Immunopräzipitation ohne eindeutiges Ergebnis geblieben war, wurde die Verifizierung einer direkten CIN/CIB1-Bindung *in vitro* mit gereinigten Proteinen und proteinbiochemischen *pulldown*-Experimenten sowie einem in dieser Arbeit etablierten Festphasen-Bindungsassay fortgesetzt (s. Abb. IV.4). Dabei zeigte lösliches CIN in dem Bindungsassay unter Ca^{2+} -freien Bedingungen eine konzentrationsabhängige und saturierbare Bindung an immobilisiertes CIB1 (s. Abb. IV.4, A). Aber auch eine umgekehrte Bindung von löslichem CIB1 an immobilisiertes CIN konnte so nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Festphasen-Bindungsassay wurde hier gewählt, da er bereits in der Literatur erfolgreich für die Analyse einer großen Bandbreite an Protein- und DNA-Effektoren eingesetzt wurde und zudem die Grundlage zahlreicher Patente bildet. Unter anderem konnte mit Hilfe dieser Technik die Bindung von CIB1 an PAK1 und Talin näher charakterisiert werden (Leisner et al., 2005; Yuan et al., 2006). Die Vorteile des Bindungsassays gegenüber *pulldown*-Experimenten oder Immunopräzipitationen liegen in seiner Schnelligkeit und seiner hohen Sensitivität, da die zu untersuchenden Proteine hier nicht gelelektrophoretisch aufgetrennt und transferiert werden müssen und alle Reaktionen in vergleichsweise kleinen Volumina ablaufen. Zudem bietet er eine gute Skalierbarkeit, so dass eine große Anzahl verschiedener Bedingungen parallel getestet werden kann.

Auch in den *pulldown*-Experimenten zeigten sowohl rekombinantes, als auch endogenes CIN aus einem murinen Hirnlysats eine spezifische Bindung an immobilisiertes CIB1. Interessanterweise mussten hier jedoch für eine detektierbare Bindung mit je 5 μg der rekombinanten Proteine, bzw. 300 μg Gesamtprotein des Hirnlysats bereits relativ hohe Proteinmengen eingesetzt werden. Dies könnte auf eine transiente Interaktion der beiden Proteine mit schnellen on-/off-Raten hindeuten. Für diese Hypothese spricht auch die Tatsache, dass in Gelfiltrationsexperimenten unter Ca^{2+} -freien Bedingungen keine CIN/CIB1-Komplexe nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Affinitäten und on-/off-Raten von Protein-Bindungen lassen sich durch Methoden wie die ITC (*i*sot*h*ermal *t*itration *c*alorimetry), SPR (*s*urface *p*lasmon *r*esonance) oder NMR (*n*uclear *m*agnetic *r*esonance)-Spektroskopie gut untersuchen, welche die thermodynamische oder quantenmechanische Charakterisierung von biomolekularen Wechselwirkungen erlauben (Liang, 2008) und bereits für Analysen von CIB1-Proteininteraktionen eingesetzt wurden (Shock et al., 1999; Vallar et al., 1999; Yamniuk et al., 2004). Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hermann Schindelin am Rudolf-Virchow-Zentrum in Würzburg bereits mit der Etablierung von ITC-Experimenten begonnen, um die Stöchiometrie und Bindungseigenschaften der CIN/CIB1-Interaktion detailliert aufzuklären.

Darüber hinaus belegen auch die in dieser Arbeit mit GC-1 spg-Zellen durchgeführten Kolokalisations-Experimente (s. Abb. IV.11), dass CIN und CIB1 zusammen in den späten

Phasen der Mitose in Bereichen Cofilin-abhängiger Aktin-Dynamik lokalisieren. Hier war vor allem eine Kolo-kalisation am kontraktiven Aktomyosin-Ring während der Telophase/frühen Zytokinese und in Lamellopodien bei der Ausbreitung der Zellen in späteren Phasen der Zytokinese auffällig. Interessanterweise wurde für CIN bereits eine transiente Kolo-kalisation mit Cofilin an diesen subzellulären Strukturen gezeigt (Gohla et al., 2005). CIN, CIB1 und Cofilin befinden sich also in Stadien der Mitose in enger räumlicher Nähe, die entscheidend von einer präzisen Kontrolle der Cofilin-Aktivität abhängen. Somit ist CIB1 ideal positioniert, um in diesen Phasen einen, möglicherweise Ca^{2+} -abhängigen, regulatorischen Einfluss auf die CIN-Aktivität und/oder -Lokalisation auszuüben.

Diese Annahme wird auch durch FRET-Experimente von Herrn Oleg Fedorchenko gestützt, die in unserer Arbeitsgruppe mit N-terminal YFP-markiertem CIN und C-terminal CFP-markiertem CIB1 in HeLa-Zellen durchgeführt wurden. Hier konnte ein robuster Energietransfer zwischen den beiden fluoreszenzmarkierten Proteinen in bestimmten subzellulären Kompartimenten gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

V.2 Einfluss von Kalzium auf die CIN/CIB1-Bindung

Das zweiwertige Kalziumion ist einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe und spielt eine herausragende Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Vorgänge. Die durch Kalzium gesteuerten Prozesse reichen von Skelett- und Herzmuskelkontraktion, Blutgerinnung und Sekretion bis hin zu Genexpression, Zellproliferation, Differenzierung und Zelltod (Berridge et al., 2000; Bootman et al., 2001; Clapham, 2007). Die strikte Regulation der intrazellulären Konzentration von Kalzium ist dabei Voraussetzung für seine vielfältigen Wirkungsweisen und darüber hinaus überlebenswichtig für die Zelle, da eine Überladung mit Kalzium zum Zelltod durch Nekrose, Apoptose oder Autophagie führen kann (Berridge et al., 1998; Giorgi et al., 2008; Pinton et al., 2008). Die intrazelluläre Kalziumkonzentration liegt in Vertebratenzellen mit 10^{-7} M etwa 10000-mal niedriger als außerhalb der Zelle und kann durch extrazelluläre Signale intrazellulär transient um das 10 - 100-fache erhöht werden (Carafoli et al., 1985). Änderungen der Kalziumsignale werden oftmals durch Bindung des Kalziumions an spezielle Effektoren, sogenannte Kalziumsensoren, in physiologisch distinkte Zellantworten überführt (Carafoli und Penniston, 1985; Yang und Poovaiah, 2003; Clapham, 2007).

Da CIB1 über zwei integrale Kalzium-bindende EF-Hand-Motive verfügt, wurde eine mögliche Kalzium-Abhängigkeit der Bindung *in vitro* durch Festphasen-Bindungsexperimente in Gegenwart unterschiedlicher freier Ca^{2+} -Konzentrationen untersucht (s. Abb. IV.5). Dabei nahm die Interaktion von CIN und CIB1 bereits ab einer freien Ca^{2+} -Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ zu, erreichte bei $5 \mu\text{M}$ mit einer etwa 3-fachen Erhöhung ihr Maximum und blieb bis

zu einer Kalziumionen-Konzentration von 100 μM stabil. Die Bindung wird also offenbar durch physiologisch relevante Ca^{2+} -Konzentrationen moduliert. Eine Inaktivierung des EF-Hand-Motivs IV (CIB1^{E172Q}-Mutante) konnte die zuvor beobachtete Ca^{2+} -abhängige, gesteigerte Bindung der beiden Proteine signifikant inhibieren, wobei die basale, Ca^{2+} -unabhängige Bindung von CIN an CIB1 jedoch unverändert blieb (s. Abb. IV.5). Dies ist interessant, da die weiterhin intakte EF-Hand III keine reine Kalzium-Bindestelle ist (wie EF-Hand IV), sondern auch Magnesium-Ionen (K_d 120 μM) binden kann (Yamniuk et al., 2004). Eine Interaktion mit Magnesium-Ionen führt dabei zu einer drastischen Verringerung der Affinität des Motivs für Ca^{2+} , von 1,9 μM auf ca. 190 μM (Yamniuk et al., 2004). Da unter den hier verwendeten Bedingungen (1 mM MgCl_2 konstant im Puffer) davon ausgegangen werden kann, dass die EF-Hand III der CIB1^{E172Q}-Mutante überwiegend Magnesium-gebunden vorlag, ist die Bindung von Magnesium-Ionen zwar für eine basale Bindung von CIN an CIB1 ausreichend, eine weitergehende Interaktion erfordert jedoch offenbar die Bindung von Kalzium an die hochaffinen EF-Hand IV. Diese Hypothese wird auch durch die Tatsache gestützt, dass eine Punktmutation der EF-Hand III zu einer schwächeren Reduktion der Kalzium-vermittelten Bindung führte (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wurden für die Bindung von CIB1 an das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ähnliche Eigenschaften beobachtet. So ist CIB1 zwar in der Lage, in Abwesenheit von Kalziumionen $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ zu binden, die Interaktion wird jedoch durch die Bindung von Ca^{2+} an CIB1 signifikant verstärkt (Shock et al., 1999; Vallar et al., 1999; Barry et al., 2002; Tsuboi, 2002).

Ein Einfluss von Ca^{2+} auf die Bindung wurde auch für andere CIB1-Interaktoren beschrieben. So wird beispielsweise die Bindung von CIB1 an PAK1 ebenfalls durch Ca^{2+} verstärkt, was negative Auswirkungen auf die Motilität und Adhäsion kultivierter Zellen haben kann (Leisner et al., 2005). Aber auch für den InsP_3 -Rezeptor (*inositol 1,4,5-triphosphate receptor*) (White et al., 2006) konnte eine Kalzium-induzierte Bindung an CIB1 nachgewiesen werden, welche offenbar in der anschließenden Inhibierung der InsP_3 -vermittelten Stimulation des Rezeptors resultiert. Für andere Proteine, wie das Presenilin-2 (Stabler et al., 1999; Zhu et al., 2004; Blazejczyk et al., 2006), wird eine solche Regulation momentan kontrovers diskutiert.

In vitro-Strukturanalysen von Kalzium- oder Magnesium-gebundenem CIB1 versus apoCIB1 machen deutlich, dass CIB1 gegenüber anderen EF-Hand-Proteinen einige Besonderheiten aufweist. So scheint die Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hand-Motive von CIB1 sequenziell und nicht kooperativ zu verlaufen, wie es beispielsweise bei Calmodulin der Fall ist (Linse et al., 1991). Dies könnte CIB1 spezifische Antworten auf einen erweiterten Ca^{2+} -Bereich ermöglichen. Auch das Vorkommen einer kombinierten Bindestelle für Magnesium- und Kalzium-Ionen ist für EF-Hand-Proteine eher ungewöhnlich (Yamniuk et al., 2004). Aufgrund dieser Eigenschaften, der beschriebenen Affinitäten von CIB1 für divalente Kationen und der Tatsache, dass die intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration in Vertebratenzellen etwa 10^4 -mal

höher liegt, als die von Kalzium (Berridge et al., 1998), wurde von Yamniuk und Mitarbeitern ein Modell vorgeschlagen, bei dem CIB1 unter Ruhebedingungen überwiegend in Magnesium-gebundener Form vorliegt und nach einem Stimulus-induzierten Kalzium-Signal in eine Ca^{2+} -gebundene Form übergeht (Yamniuk et al., 2004). Dabei hat sowohl die Bindung von Ca^{2+} als auch Mg^{2+} einen stabilisierenden, aber leicht unterschiedlichen Einfluss auf die strukturelle Integrität von CIB1. Der größte Effekt geht von einer Ca^{2+} -Bindung an die EF-Hand IV aus (Gentry et al., 2005). Möglicherweise regulieren diese Konformationsänderungen zusammen mit dem bereits beschriebenen protektiven Einfluss des C-Terminus die Exposition der hydrophoben Bindungstasche von CIB1 und bilden so die Grundlage für spezifische Interaktionen mit Effektoren unter verschiedenen zellulären Bedingungen (Vallar et al., 1999; Barry et al., 2002; Gentry et al., 2005; Yamniuk et al., 2005; Yamniuk et al., 2006; Yamniuk et al., 2007). Vielleicht bindet Mg^{2+} -CIB1 jedoch auch konstitutiv an putative Effektoren wie CIN oder das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ und die Bindung von Ca^{2+} initiiert dann einen regulatorischen Einfluss von CIB1 auf die Aktivität des Bindungspartners, ähnlich wie es bei Calcineurin A und B, der katalytischen und der regulatorischen Untereinheit der Protein-Phosphatase Calcineurin zu beobachten ist (Stewart et al., 1982). Ob und inwieweit sich die CIN/CIB1-Interaktion von bisher publizierten Interaktionen unterscheidet, müssen zukünftige Studien zeigen. Mit dem Start von ITC-Experimenten wurden jedoch bereits erste Anstrengungen zur Aufklärung dieser Fragestellung unternommen.

V.3 Regulation der CIN-Phosphataseaktivität *in vitro*

Um weiterhin zu testen, ob es sich bei CIB1 um eine regulatorische Komponente in einem CIB1/CIN-Phosphatase-Komplex handelt, wurde ein *in vitro*-Phosphataseassay verwendet (s. Abb. IV.6). Für diesen Ansatz wurde aus praktischen Gründen nicht Phosphocofilin, sondern die koenzymatisch aktive Form des Vitamin B₆ (Pyridoxal-5'-Phosphat, PLP) als niedermolekulares CIN-Substrat verwendet. Wie unter (I.4) beschrieben, wurde CIN ursprünglich als PLP-Phosphatase (PLPP) isoliert (Fonda, 1992) und molekular charakterisiert (Jang et al., 2003). Später wurde CIN dann als Cofilin-aktivierende Protein-Phosphatase neu identifiziert und beschrieben (Gohla et al., 2005). Das CIN-spezifische Proteinsubstrat Cofilin konnte für diese Analysen nicht eingesetzt werden, da das in dieser Arbeit verwendete rekombinante CIN keine nachweisbare Phosphataseaktivität gegen rekombinantes Cofilin besaß (Daten nicht gezeigt). Dies könnte in einer geänderten, inaktiven Konformation des rekombinant in Bakterien hergestellten CINs begründet liegen. So wurde bereits beschrieben, dass GST-markiertes CIN in unlöslichen *inclusion bodies* akkumuliert und sich nur unter erheblichem Aufwand als enzymatisch aktives Protein

gewinnen lässt (Gohla et al., 2005). Die Verwendung alternativer Vektoren (pQE30, ebenfalls His₆-Markierung oder pMalc2E, MBP-Markierung) für die bakterielle Expression resultierte entweder in einer sehr geringen CIN-Ausbeute oder das gereinigte CIN zeigte nur eine schwache Phosphataseaktivität gegen die niedermolekularen Substrate *p*-NPP und PLP (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte sowohl in dieser Arbeit (s. Abb. IV.13), als auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass CIN in mitotischen (Gohla et al., 2005) und motilen Zellen (Delorme et al., 2007), sowie unter ATP-Streßbedingungen (Huang et al., 2008) als eine spezifische Cofilin-Phosphatase fungiert. Zusammengenommen sprechen diese Befunde für sterische Probleme der rekombinanten Phosphatase und/oder deuten auf das Fehlen von weiteren, derzeit unbekanntem Faktoren, wie z.B. Chaperonen oder Lipiden hin, welche die CIN Proteinphosphatase-Aktivität gegenüber Cofilin beeinflussen könnten.

Für die Detektion des durch CIN freigesetzten anorganischen Phosphates wurde ein Nachweissystem verwendet, welches den Farbstoff Malachit Grün enthält. Malachit Grün kann mit anorganischem Phosphat einen Phosphomolybdansäure-Komplex bilden, dessen Absorption sich photometrisch detektieren lässt und proportional zur Menge des gebildeten Phosphates ist. Diese Methode wurde bereits für frühere Aktivitätsstudien von PLPP (CIN) eingesetzt (Fonda, 1992; Jang et al., 2003). Die Aktivität von CIN gegen PLP wurde effektiv durch freies Ca²⁺ inhibiert (IC₅₀ etwa 1 µM; s. Abb. IV.6, A). Eine solche Inhibierung konnte auch durch Fonda und Mitarbeiter gezeigt werden, die für natives, aus Erythrozyten isoliertes PLPP (CIN) einen IC₅₀-Wert für freies Ca²⁺ von 12,8 µM ermittelt haben (Fonda und Zhang, 1995). Die unterschiedlichen gemessenen Ca²⁺-Sensitivitäten von rekombinantem und nativem CIN lassen sich möglicherweise durch sterische Unterschiede oder durch das Fehlen von posttranslationalen Modifikationen bei bakteriell hergestelltem CIN erklären.

Interessanterweise konnte CIB1 die Inaktivierung von CIN durch Ca²⁺ konzentrationsabhängig bis zu einer Ca²⁺-Konzentration von etwa 20 µM nahezu vollständig verhindern (s. Abb. IV.6, A). Dabei scheint der protektive Einfluss von CIB1 sowohl die Bindung von Kalzium an CIB1 als auch die Bindung von CIN an CIB1 zu erfordern, da eine Inaktivierung der EF-Hand IV in CIB1 (s. Abb. IV.6, B) und auch die Entfernung einer putativen CIN-Bindestelle auf CIB1 (s. Abb. IV.6, C) diesen Effekt nahezu vollständig inhibieren konnten. Möglicherweise spielt auch hier die Tatsache eine Rolle, dass CIB1 nach Kalziumbindung eine signifikante Konformationsänderung/Stabilisierung erfährt (Gentry et al., 2005; Yamniuk et al., 2007) und die Bindung von CIN an CIB1 durch eine Bindung von Ca²⁺ signifikant verstärkt wird (s. Abb. IV.5). Da Kalziumsensoren sich durch eine Kalzium-induzierte Konformationsänderung auszeichnen, welche ihnen die Bindung und/oder Regulation von Effektoren ermöglicht (Burgoyne et al., 2004), lässt der obige Befund vermuten, dass CIB1 eher als Kalziumsensor denn als Kalziumpuffer fungiert.

Bei Kalziumkonzentrationen von mehr als 20 μM nimmt der protektive Einfluss von CIB1 auf die CIN Phosphatase-Aktivität dagegen massiv ab (s. Abb. IV.6, A). Dieser Effekt beruht möglicherweise ebenfalls auf einer Kalzium-vermittelten Konformationsänderung von CIN. Eine solche strukturelle Veränderung könnte sich auf das katalytische Zentrum von CIN beschränken und seine Phosphataseaktivität gegen PLP negativ beeinflussen, die Bindung der beiden Proteine jedoch nicht inhibieren. Für diese Hypothese spricht, dass die CIN/CIB1-Bindung ab etwa 10 μM und bis 100 μM stabil ist (s. Abb. IV.5).

CIN scheint zwar keine klassischen Kalzium-bindenden Domänen zu enthalten, interessanterweise konnte PLP-gebundenes CIN jedoch nur in Gegenwart hoher Konzentrationen von Kalziumacetat kristallisiert werden (Almo et al., 2007). Dabei wurde gezeigt, dass Kalzium mit dem katalytischen Aspartat 25 interagiert und so die Dephosphorylierung von PLP inhibiert. PLP bleibt dabei vermutlich mit CIN assoziiert und ist daher im Kristall zu finden.

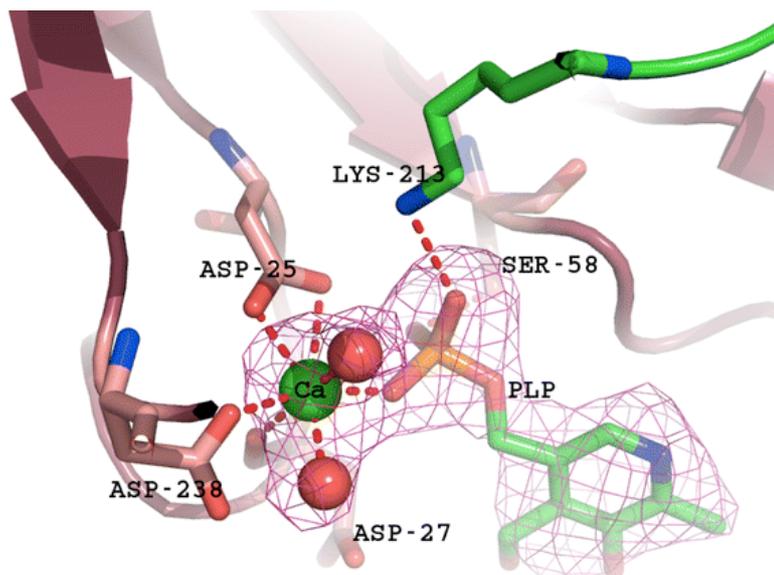


Abbildung V.1: Darstellung des katalytisch-aktiven Zentrums von CIN mit gebundenem PLP und Ca^{2+} . Dabei interagiert Ca^{2+} mit dem katalytischen Aspartat 25 und inhibiert so die Dephosphorylierung von PLP. (Übernommen aus Almo et al., 2007).

Auch für die HAD-Phosphatase HPSP (*human phosphoserine phosphatase*) wurde bereits ein solcher inhibitorischer Einfluss von Ca^{2+} auf die Phosphataseaktivität beschrieben (Peeraer et al., 2004). Anhand von Kristallstrukturen konnte dabei der Mechanismus dieser Ca^{2+} -vermittelten Inhibition näher aufgeklärt werden. So wird durch die Bindung eines Mg^{2+} -Ions im aktiven Zentrum das katalytisch-aktive Aspartat der Phosphatase mit dem Substrat in einer oktaedrischen Struktur räumlich koordiniert und auf diese Weise der nukleophile Angriff unterstützt. Im Gegensatz dazu führt die Bindung eines Ca^{2+} -Ions, aufgrund seines größeren Ionenradius, zu einer Störung der oktaedrischen Konformation und damit zu einer Beeinträchtigung der Dephosphorylierungs-Reaktion (Peeraer et al., 2004).

Über die spezifische Regulation der CIN-Phosphataseaktivität ist darüber hinaus nur sehr wenig bekannt. So wurden bis auf die drei HAD-Motive mit dem katalytisch aktiven Zentrum bisher keine weiteren regulatorischen oder strukturellen Elemente charakterisiert. Auch eine inhibitorische Domäne ist für CIN noch nicht beschrieben worden, jedoch wurde anhand der kristallographischen Analyse eine C-terminale *capping*-Domäne identifiziert, welche das katalytische Zentrum fast vollständig abschirmt (Almo et al., 2007). Die Kristall-Strukturen anderer HAD-Enzyme (MDP-1 und T4-Polynukleotidkinase der SCP-Familie) zeigen dagegen ein relativ offenes katalytisches Zentrum ohne *capping*-Domäne (Burroughs et al., 2006). Für eine Substrat-Bindung von CIN ist also möglicherweise eine weitreichende strukturelle Reorganisation der *capping*-Domäne notwendig, wobei der genaue Mechanismus und eine biologische Relevanz noch ungeklärt sind (Almo et al., 2007). Abgesehen von CIB1 wurde bisher nur für das Hsp90 ein regulatorischer Einfluss auf die CIN-vermittelte Cofilin-Dephosphorylierung *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Huang et al., 2008). Dabei scheint Hsp90 ein Inhibitor der CIN-vermittelten Cofilin-Dephosphorylierung in Neuronen mit ATP-Stress zu sein.

Zusammengenommen legen unsere Daten nahe, dass CIB1 als eine regulatorische Komponente von CIN fungieren kann. Zukünftige Untersuchungen müssen jetzt klären, ob CIN als eine heterodimere Phosphatase konstitutiv mit CIB1 assoziiert vorliegt, oder ob diese Interaktion *in vivo* einer strikten räumlichen und/oder zeitlichen Kontrolle unterliegt.

Das CIN/CIB1-Dimer weist interessante Ähnlichkeiten zu der Kalzium-abhängigen Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin (PP2B) auf. Säuger-Calcineurin besteht aus der katalytischen Untereinheit Calcineurin A (ca. 60 kDa) und der regulatorischen Untereinheit Calcineurin B (ca. 19 kDa). Beide liegen bereits unter basalen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vor (Klee et al., 1988). Calcineurin A enthält das katalytische Zentrum in der N-terminalen Domäne sowie drei regulatorische Domänen im C-terminalen Bereich. Dabei handelt es sich um die Calcineurin B-Bindedomäne, die Calmodulin-Bindedomäne und die autoinhibitorische Domäne (Hubbard et al., 1989). Die regulatorische Untereinheit Calcineurin B gehört wie CIB1 und Calmodulin zur Familie der EF-Hand-Proteine und bindet ebenso wie der Kalziumsensor Calmodulin vier Ca^{2+} -Ionen. Die Affinitäten der EF-Hand-Motive für Ca^{2+} liegen dabei wie bei CIB1 im nano-mikromolaren Bereich. Eine weitere Gemeinsamkeit von Calcineurin B und CIB1 findet sich in der N-terminalen Myristoylierung beider Proteine (Aitken et al., 1982), wobei die Myristoylierung von Calcineurin B weder einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Bindung oder Enzymaktivität, noch auf die Assoziation von Calcineurin mit Membranen zu haben scheint (Kennedy et al., 1996). Die beiden N-terminal gelegenen EF-Hand Domänen von Calcineurin B übernehmen eine regulatorische Funktion und werden für die Enzymaktivität und Substraterkennung benötigt. Die Affinitäten der beiden C-terminalen EF-Hände liegen

unter 100 nM und sind daher praktisch permanent Kalzium-assoziiert (Feng und Stemmer, 1999).

Die Regulation der Calcineurin-Phosphataseaktivität ist in zweifacher Hinsicht von Ca^{2+} -Ionen abhängig. Bei basalen Ca^{2+} -Konzentrationen in der Zelle liegen Calmodulin und Calcineurin ungebunden vor und die autoinhibitorische Domäne blockiert sterisch das aktive Zentrum der Phosphatase. Durch die Kalzium-Bindung an Calcineurin B wird der K_M -Wert der Phosphatase erniedrigt und somit die Affinität für das Substrat erhöht, was in einer leichten Erhöhung der Aktivität resultiert. V_{\max} wird dabei nicht verändert (Stewart et al., 1982). Eine Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an die Calmodulin-Bindestelle von Calcineurin A führt darüber hinaus zu einer Konformationsänderung, in deren Folge sich die autoinhibitorische Domäne verlagert und das katalytische Zentrum freigibt (Kissinger et al., 1995). Dabei erhöht die Ca^{2+} /Calmodulin Bindung V_{\max} 5 - 10-fach, ohne jedoch den K_M -Wert zu beeinflussen (Perrino et al., 1992; Stemmer & Klee, 1994). Aus diesem Grund wird Calcineurin auch als Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Phosphatase bezeichnet (Klee et al., 1983; Tonks et al., 1983) und nimmt wegen des dualen Regulationsmechanismus bis heute einen Sonderstatus unter den bekannten Phosphatasen ein. Calcineurin ist an verschiedensten Signalübertragungskaskaden beteiligt, welche die Entwicklung und Funktion von Immun-, Nerven-, Kardiovaskular- und Muskelskelettsystemen steuern, wodurch es wenig verwundert, dass Calcineurin auch mit pathologischen Veränderungen wie der Alzheimerschen Krankheit (Lian et al., 2001) oder Schizophrenie (Miyakawa et al., 2003) in Verbindung gebracht wurde.

Bei Calmodulin handelt es sich um einen essentiellen und eingehend untersuchten Kalziumsensor, der neben seiner Funktion als Kalziumsensor auch mit einer Reihe von Proteinen in Kalzium-unabhängiger Form interagieren kann. Details zu Funktionen des apoCaM werden von (Jurado et al., 1999) zusammengefasst und diskutiert. CaM kann in Kalzium-freiem, partiell Kalzium-gebundenem oder in Kalzium-gesättigtem Zustand unterschiedliche Bindungen eingehen (Jurado et al., 1999). Die mechanistischen Details der Effektor-Erkennung und -Aktivierung durch Ca^{2+} /Calmodulin sind in den meisten Fällen noch unbekannt. Genaue strukturelle Untersuchungen werden durch die multimere und transmembranäre Natur vieler Effektoren erschwert. Die Existenz von nur transient gebildeten Calmodulin-Effektor-Präassoziationen ist ein weiteres Hindernis. Die von Calmodulin gebundenen Zielproteine sind äußerst vielfältig und auf alle Bereiche der zellulären Steuervorgänge verteilt (Yang und Poovaiah, 2003, Snedden und Fromm, 1998; Reddy, 2001; Zielenski, 1998).

Aufgrund der beschriebenen Gemeinsamkeiten von CIN und CIB1 mit Calcineurin wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auch ein möglicher Einfluss von Calmodulin auf die CIN/CIB1-Interaktion geprüft.

Anhand einer Datenbankanalyse konnte eine putative Calmodulin-Bindungsstelle am N-Terminus von CIB1 identifiziert werden (s. Abb. IV.7, A). Anschließende *in vitro*-Bindungsstudien mit rekombinanten Proteinen haben gezeigt, dass sowohl CIN als auch CIB1 an Calmodulin binden können und dass die Interaktion in beiden Fällen durch Ca^{2+} signifikant (2-fach) stimuliert wird (s. Abb. IV.7, B + C). Allerdings ergab sich hier das Problem, dass bei der Immobilisierung von Calmodulin aufgrund von Konzentrations- oder Affinitätsunterschieden zwischen dem CIN- und CIB1-spezifischen Antikörper ein direkter Vergleich der Bindungsstärken beider Proteine für Calmodulin unmöglich war. Auf der anderen Seite konnte bei einer Immobilisierung von CIN oder CIB1 eine Bindung der beiden Proteine mit gleicher Affinität an die Matrix der Kavität nicht gewährleistet werden. Darüber hinaus war es mit der Methode des Festphasen-Bindungsassay trotz ausgedehnter Optimierungsversuche nicht möglich, eine veränderte Bindung der einzelnen Proteine an bereits vorgeformte und immobilisierte Proteinkomplexe reproduzierbar zu analysieren. Hier stieß die Methode klar an ihre Grenzen.

Die Assoziation von Calmodulin mit CIN und CIB1 wurde daher zusätzlich von Dr. Elisabeth Jeanclos durch *pull-down*-Experimente mit Sepharose-gekoppeltem CaM und rekombinanten oder endogenen Proteinen untersucht, wobei sich auch hier der bereits beobachtete positive Effekt von Ca^{2+} auf die Bindung von CIN-CaM und CIB1-CaM nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt).

Die unerwartete Bindung von Calmodulin an CIN lässt sich durch die Tatsache erklären, dass die bekannten Calmodulin-Bindedomänen äußerst heterogen sind und Sequenzanalysen anhand solcher Algorithmen nur als Indiz angesehen werden können (Crivici und Ikura, 1995; Rhoads und Friedberg, 1997; Hoeflich und Ikura, 2002). Bemerkenswerterweise lokalisieren Calmodulin-Bindedomänen häufig in oder zumindest in der Nähe von autoinhibitorischen Domänen, so beispielsweise auf Calcineurin, der NO-Synthase, PDE oder MLCK (Swulius et al., 2008; Tadross et al., 2008; Wayman et al., 2008). Daher wäre es interessant zu testen, ob ein solcher Mechanismus auch für CIN existiert. Hierzu müsste aber zunächst eine Bindedomäne von Calmodulin auf CIN bestimmt werden, z.B. mit Hilfe von CIN-Deletionsmutanten in einem *yeast two-hybrid assay* oder durch konventionelle proteinbiochemische Methoden, wie *pull-down*-Experimente oder Immunopräzipitationen.

Anschließend wurde untersucht, ob die Anwesenheit von CaM auch die CIN-Phosphataseaktivität gegen PLP beeinflusst. Die Gegenwart von solitärem CaM oder CaM und CIB1 hatte dabei keinen Einfluss auf die Aktivität von CIN. Erwartungsgemäß wurde die CIN-Aktivität durch eine freie Ca^{2+} -Konzentration von $1 \mu\text{M}$ um ca. 50% reduziert. Dagegen führte eine Inkubation von CIN, CIB1 und CaM in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ an freiem Ca^{2+} nicht nur zu einer Aufrechterhaltung, sondern zu einer schwachen aber signifikanten Stimulation

der CIN-Phosphataseaktivität gegen PLP (s. Abb. IV.8, A). Dieser Effekt blieb dabei über einen intrazellulären Kalziumbereich von bis zu 10 μM stabil, nahm dann jedoch stark ab (s. Abb. IV.8, B). Eine eingehendere Analyse der stöchiometrischen Verhältnisse wurde aufgrund der Komplexität der Interaktion und den Limitierungen der bisher verwendeten proteinbiochemischen Techniken als nicht sinnvoll erachtet. Daher wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hermann Schindelin am Rudolf-Virchow-Zentrum in Würzburg erste Gelfiltrationsexperimente mit CIN, CIB1 und CaM gestartet, um Pufferbedingungen für eine optimale Komplexbildung zwischen den dimeren- oder trimeren Proteinkomplexen zu identifizieren. Diese Bedingungen sollen dann als Ausgangspunkt für mögliche Kristallisationsexperimente dienen.

Dass es sich bei CIN nicht nur *in vitro*, sondern auch in einem zellulären System um eine physiologisch-relevante, Kalzium-aktivierte Cofilin-Phosphatase handelt, wurde darüber hinaus mit Hilfe einer in dieser Arbeit etablierten CIN-depletierten shRNA-Zelllinie (s. Abb. IV.15) durch Dr. Elisabeth Jeanclos in GC-1 spg-Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). In diesen Zellen lässt sich nach einer Ionophor-vermittelten Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Spiegel eine schnelle Cofilin-Dephosphorylierung beobachten. Dieser Effekt konnte durch eine shRNA-vermittelte Reduktion der endogenen CIN-Spiegel signifikant inhibiert werden.

Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass in HeLa-Zellen auch die Ca^{2+} /Calmodulin-aktivierte Phosphatase Calcineurin über eine Dephosphorylierung und somit Aktivierung der Phosphatase SSH die Kalzium-induzierte Cofilin-Dephosphorylierung vermitteln kann. Dabei scheint Cofilin jedoch kein direktes Calcineurin-Substrat zu sein (Wang et al., 2005). Allerdings erreicht die CIN-vermittelte Cofilin-Dephosphorylierung bereits nach zwei Minuten Stimulation ihr Maximum, während die Ca^{2+} /Calcineurin/SSH-induzierte Dephosphorylierung von Cofilin erst nach 10 - 15 Minuten maximiert ist (Wang et al., 2005). Hierbei handelt es sich entweder um einen Zelltyp-spezifischen Unterschied in der Cofilin-Aktivierung oder es existieren zwei Signaltransduktionswege, die intrazelluläre Kalziumsignale in eine spezifische Cofilin-Antwort umsetzen. Interessanterweise wurden bereits einige klare Unterschiede zwischen CIN und SSH bezüglich ihrer Cofilin-Aktivität beschrieben. So wird die basale Phosphataseaktivität von SSH gegenüber Cofilin maßgeblich durch die Bindung an F-Aktin stimuliert (Nagata-Ohashi et al., 2004; Kiuchi et al., 2007), was *in vitro* zu einer um das 1200-fache gesteigerten Cofilin-Dephosphorylierung führt (Kurita et al., 2008). Darüber hinaus scheint SSH zumindest *in vitro* auch F-Aktin stabilisierende und vernetzende Eigenschaften zu besitzen, über deren physiologische Rolle bisher nur wenig bekannt ist (Kurita et al., 2007). Durch eine Dephosphorylierung und damit Inaktivierung von LIMK1 verstärkt SSH vermutlich seinen aktivierenden Einfluss auf Cofilin (Soosairajah et al., 2005). Dagegen ist CIN offenbar eine direkte Cofilin-Phosphatase, für die bisher weder eine F-

Aktin-bindende Eigenschaft noch eine Interaktion mit LIMK1 nachgewiesen werden konnte (Gohla et al., 2005).

Eine solche duale Regulation könnte bei einer Kalzium-vermittelten Cofilin-Regulation von so wichtigen zellulären Prozessen, wie der Thrombin-induzierten Aggregation von Thrombozyten (Davidson et al., 1994; Falet et al., 2005) oder der Chemotaxis von Neutrophilen (Zhan et al., 2003) beteiligt sein. Eine solche duale Regulation könnte aber auch in Neuronen eine Rolle spielen, wo intrazelluläre Kalzium-Signale wichtig für die Motilität und Wegfindung von Wachstumskegeln sind (Henley et al., 2004). So wurde beispielsweise eine Rolle von Kalzium, Calcineurin und SSH bei der Cofilin-abhängigen Regulation der neuronalen Plastizität, Gedächtnisbildung und synaptischen Funktion belegt (Endo et al., 2003; Groth et al., 2003; Sato et al., 2003; Pak et al., 2008).

V.4 Einfluss von Kalzium auf die subzelluläre Lokalisation von CIN und CIB1

CIB1 ist nahe mit Proteinen der NCS (*neuronal calcium sensor*)-Familie verwandt. Diese Familie umfasst heute mehr als 40 Mitglieder, welche vorwiegend im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert werden und an verschiedensten neuronalen Kalzium-abhängigen Prozessen, wie der synaptischen Transmission und Lernvorgängen, Regulation von Genexpression, Transport von Rezeptoren sowie die Modulation von Ionenkanälen und membranassoziierten Enzymen beteiligt sind (Burgoyne, 2007). Analog zu CIB1 verfügen diese Proteine über zwei bis vier funktionelle EF-Hand-Motive sowie eine Myristoylierungsstelle am N-Terminus (Ames et al., 1997). Die Bindung von Ca^{2+} durch die EF-Hand-Motive löst dabei eine Konformationsänderung aus, die zwei Effekte zur Folge haben kann: Erstens wird eine hydrophobe Bindungstasche zugänglich, die dann für Interaktionen mit putativen Effektoren zur Verfügung steht. Und zweitens führt die Bindung von Kalziumionen bei Proteinen wie Recoverin, Hippocalcin oder KChIP1 zu einer Exposition des Myristoyl-Restes aus einer hydrophoben Tasche in das umgebende Milieu (Ames et al., 1997), wodurch diese Proteine Kalzium-induziert mit der Zellmembran oder anderen intrazelluläre Membrankompartimenten interagieren können (Braunewell et al., 1999; Burgoyne und Weiss, 2001; O'Callaghan und Burgoyne, 2003; O'Callaghan et al., 2004).

Es wurde noch nicht abschließend geklärt, ob CIB1 ebenfalls über einen Kalzium-Myristoyl-Mechanismus induzierbar an Membranen transloziert oder über die N-terminale Myristoylierung konstitutiv mit Membranen assoziiert (Stabler et al., 1999; Blazejczyk et al., 2006). Falls es über einen solchen Mechanismus verfügt, wäre es denkbar, dass CIB1 als Kalzium-abhängiges *shuttle* CIN möglicherweise in Bereiche gesteigerter Aktin-Dynamik transportiert. Ein solcher Effekt könnte beispielsweise in Zellen mit erhöhter migratorischer

Aktivität, wie z.B. invasiven oder metastasierenden Tumorzellen von Bedeutung sein (Wang et al., 2007). Auch in hippocampalen Neuronen, die sowohl CIB1 (Bernstein et al., 2005) als auch CIN (Huang et al., 2008) exprimieren, spielt die Kalzium-induzierte Aktin-Reorganisation eine wichtige funktionelle Rolle.

Um eine solche Hypothese in unserem Zellsystem zu überprüfen, wurden C-terminal GFP-markiertes CIB1 oder N-terminal YFP-markiertes CIN in HeLa-Zellen transient exprimiert und die Zellen mit dem Lebendzell-Kalzium-Indikator Fura Red beladen, um den Ionophor-vermittelten Einstrom von Kalzium in denselben Zellen visualisieren zu können. Anschließend wurde mit Hilfe der cLSM die subzelluläre Lokalisation von YFP-CIN und CIB1-GFP in den lebenden Zellen nach Ionomycin-Stimulation verfolgt (s. Abb. IV.10). Unter diesen Versuchsbedingungen ist es uns nicht gelungen, eine Kalzium-abhängige Relokalisation von CIN oder CIB1 zu detektieren, während GFP-markiertes Hippocalcin wie erwartet an die Plasmamembran und membranäre Strukturen des Trans-Golgi-Netzwerks translozierte (s. Abb. IV.10).

CIB1 verfügt also entweder über keinen Kalzium-Myristoyl-Mechanismus oder dieser ist nur in bestimmten Zelltypen/Kompartimenten aktiv. Möglicherweise reagiert CIB1 auch bereits auf sehr geringe Veränderungen der Kalziumionen-Konzentration. Für diese These spricht die Tatsache, dass CIB1, wie auch NCS-Proteine, eine 10-fach höhere Ca^{2+} -Affinität als beispielsweise Calmodulin aufweist und daher wahrscheinlich bereits bei intrazellulären Kalziumkonzentrationen aktiv ist, die nur eine kleine Fraktion von Calmodulin aktivieren (Gentry et al., 2005). Möglicherweise war der unkontrollierte, Ionomycin-induzierte Kalzium-Einstrom zu massiv und schnell für eine detektierbare CIB1-Relokalisation. Hier würde sich eine Modulation der intrazellulären Kalzium-Spiegel durch Substanzen wie Thapsigargin anbieten. Thapsigargin inhibiert die SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} *ATPase*)-Pumpen des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums und führt so zu einer Depletion dieser intrazellulären Ca^{2+} -Depots und zu einer Erhöhung der Kalzium-Konzentration im Zytosol. Alternativ wäre auch eine Rezeptor-induzierte Steigerung der intrazellulären Kalzium-Level über G-Protein gekoppelte Signalwege durch beispielsweise Histamin denkbar. Möglicherweise ist aber auch ein Stimulus, wie die gerichtete Migration von Zellen, für das Auslösen eines solchen Mechanismus notwendig oder die Myristoylierung von CIB1 hat einfach andere, bisher unbekannt funktionelle Konsequenzen. Für letzteres spricht, dass eine Punktmutation der Myristoylierungsstelle nicht nur mit einer veränderten subzellulären Distribution von CIB1 einher geht, sondern auch zu einer reduzierten Halbwertszeit des Proteins führt (Zhu et al., 2004).

Weiterhin wurde auch geprüft, ob CIB1 möglicherweise die subzelluläre Lokalisation von CIN in Zellen beeinflusst. Die Koexpression einer CIB1-Mutante mit punktmutierter Myristoylierungsstelle (CIB1^{G2A}) zusammen mit YFP-CIN in HeLa-Zellen ergab jedoch keine

signifikante Veränderung der subzellulären Lokalisation von CIN im Vergleich zu CIB1^{wt}-GFP und YFP-CIN (s. Abb. IV.11). CIB1 scheint daher zumindest unter den getesteten Bedingungen nicht als *shuttle* für CIN zu fungieren.

V.5 Regulation der Cofilin-Phosphorylierung in mitotischen GC-1 spg-Zellen

Die Cofilin-vermittelte Aktinreorganisation nimmt eine essentielle Rolle im Rahmen der Mitose und besonders der Zytokinese ein, wo sie unter anderem an der dynamischen Reorganisation des kontraktiven Aktomyosinrings während der sich ausbildenden Teilungsfurche beteiligt ist (Nagaoka et al., 1995; Noguchi et al., 2001; Tanaka et al., 2005; Kaji et al., 2008). Veränderungen der Cofilin-Aktivität führen daher in verschiedenen Organismen zu massiven Störungen der mitotischen Progression, was häufig in einem Abbruch der Mitose und einer Akkumulation von multinukleären Zellen resultiert (Gunsalus et al., 1995; Bamburg, 1999; Ono et al., 2003; Hotulainen et al., 2005). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass CIN eine essentielle Rolle bei der Regulation der Cofilin-Aktivität während der Mitose und Zytokinese spielt (Gohla et al., 2005).

CIN und CIB1 kolokalisieren während der Zytokinese am kontraktiven Aktomyosinring und an der Plasmamembran von Lamellopodien (s. Abb. IV.11). Eine mögliche Kolokalisation mit Calmodulin konnte unter unseren Versuchsbedingungen nicht untersucht werden, da die Überexpression von Calmodulin zu einem kontinuierlichen Absterben von mitotischen GC-1 spg-Zellen führte (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde für Calmodulin in der Literatur bereits eine Lokalisation an der sich bildenden Teilungsfurche während der Mitose belegt (Li et al., 1999; Yu et al., 2004), wobei für diese Studien jedoch stabile, Calmodulin-überexprimierende Zelllinien verwendet wurden.

Aufgrund der interessanten Lokalisation von CIN und CIB1 während der Mitose wurde auch ein möglicher Einfluss von CIB1 auf die Regulation der CIN-Aktivität gegenüber Cofilin in mitotischen GC-1 spg-Zellen untersucht. Da sich diese Zellen mit hoher Effizienz transfizieren lassen, wurde in diesem Fall die relativ schnelle siRNA-vermittelte Depletion der beiden Proteine gewählt.

Je vier CIN- und CIB1-spezifische siRNA-Sequenzen wurden in Immunoblot-Analysen zunächst auf ihre Fähigkeit zur Reduktion der endogenen CIN- und CIB1-Level in GC-1 spg-Zellen getestet (Daten nicht gezeigt) und für die jeweils vielversprechendste Sequenz beider Proteine wurde anschließend die optimale Oligonukleotid-Konzentration bestimmt (s. Abb. IV.12). Mit Hilfe dieser validierten siRNA-Oligonukleotide wurde anschließend endogenes CIN und/oder CIB1 in GC-1 spg-Zellen depletiert und die möglichen

Auswirkungen der Depletion auf den Phosphocofilin-Spiegel in diesen Zellen im Immunoblot untersucht.

In den Kontroll-Zellen stieg der Phosphocofilin-Spiegel bis zur Metaphase kontinuierlich an und ging in den späteren Phasen der Mitose bis in etwa auf das Ausgangsniveau zurück (s. Abb. IV.13). Dagegen führte die solitäre Depletion von CIN zu einem durchgehenden Anstieg des Phosphocofilins bis zum Ende der Mitose (s. Abb. IV.13). In CIB1-depletierten GC-1 spg-Zellen wiederum erreichte Phosphocofilin sein Maximum in der Metaphase und blieb dann annähernd stabil (s. Abb. IV.13). Eine parallele Reduktion der endogenen CIN- und CIB1-Level resultierte dagegen in einem massiven Anstieg der Phosphocofilin-Konzentrationen während der Metaphase und Telophase/Zytokinese. Diese Daten lassen vermuten, dass sowohl CIN als auch CIB1 in die Regulation der Cofilin-Aktivität während der Mitose involviert sind.

Ein direkter Vergleich dieser Befunde mit bereits publizierten Ergebnissen aus HeLa-Zellen macht deutlich, dass der Verlauf der Phosphocofilin-Spiegel in den jeweiligen Kontroll-Zellen ähnlich verläuft (Amano et al., 2002; Gohla et al., 2005). In CIN-depletierten HeLa-Zellen blieb das in den Kontroll-Zellen beobachtete Phosphocofilin-Muster zwar erhalten, es zeigte sich jedoch eine generelle Erhöhung der Phosphocofilin-Spiegel um das 2,3 - 2,8-fache in allen Stadien der Mitose (Gohla et al., 2005). Möglicherweise handelt es sich hier um ein Zelltyp-spezifisches Phänomen. Beide Befunde passen aber zu der Beobachtung, dass Cofilin in Säugerzellen offenbar in den frühen Phasen der Mitose eher phosphoryliert (inaktiviert) und erst zu Beginn der Telophase und Zytokinese verstärkt reaktiviert wird (Amano et al., 2002).

Ob es sich hier tatsächlich um einen synergistischen Effekt von CIN und CIB1 auf die Cofilin-Phosphoregulation während der Mitose handelt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Dies wird jedoch durch die Tatsache erschwert, dass CIB1 auch über eine direkte Interaktion mit PAK1 die Cofilin-spezifische Kinase LIMK1 aktiviert und so auch einen negativen Einfluss auf die Cofilin-Aktivität in mitotischen Zellen ausüben könnte (Leisner et al., 2005).

Um zu testen, ob die beobachteten signifikanten Veränderungen der Cofilin-Phosphoregulation während der Mitose nach CIN- und/oder CIB1-Depletion auch einen Einfluss auf den Ausgang der Zellteilung haben, wurden GC-1 spg-Zellen erneut mit Kontroll-, CIN- und/oder CIB1-spezifischen siRNAs transfiziert und die Zellen nach 16 h konfokalmikroskopisch auf das Vorkommen von multinukleären Zellen untersucht (s. Abb. IV.14). Während dabei die solitäre Depletion von CIN oder CIB1 keine signifikante Auswirkung auf das Auftreten von multinukleären Zellen hatte, führte eine parallele Depletion der beiden Proteine in GC-1 spg-Zellen zu einem um den Faktor zwei verstärkte Akkumulation mehrkehrniger Zellen (s. Abb. IV.14). Hier verhindert möglicherweise die

Depletion von CIN eine Dephosphorylierung und damit Reaktivierung von Cofilin zu Beginn der Telophase, was dann zu einer Störung oder dem vollständigen Abbruch der mitotischen Progression und somit letztendlich zu einer Anhäufung von multinukleären Zellen führt. Dieser Effekt wird durch CIB1 signifikant verstärkt, wobei der genaue Mechanismus hier noch ungeklärt ist. Da unter diesen Bedingungen ein Nachweis der Protein-Depletion aus technischen Gründen nicht möglich war, liegt das vergleichsweise niedrige, bzw. im Fall der solitären CIN-siRNA, nahezu fehlende Auftreten von Zellen mit mehreren Kernen möglicherweise schlicht an einer schlechten Transfektionseffizienz. Für diese Hypothese spricht auch, dass eine CIN-Depletion oder die Überexpression einer katalytisch-inaktiven CIN-Mutante in HeLa-Zellen zu einer Rate von bis zu 35% an Zellen mit mehreren Kernen führt (Gohla et al., 2005). Dabei ist jedoch auch zu beachten, dass HeLa-Zellen häufig für mitotische Studien verwendet werden, da sie auf Störungen des Zellzyklus mit massiven Zellteilungsdefekten reagieren.

Für den kontrollierten Ablauf der Zytokinese spielen auch IP₃-Rezeptor-vermittelte Kalziumsignale eine wichtige Rolle (Wong et al., 2007; Li et al., 2008). Daher könnten transiente Erhöhungen der lokalen Ca²⁺-Konzentration eine Assoziation von CIN und CIB1 induzieren oder potenzieren, was CIB1 einen verstärkten regulatorischen Einfluss auf die CIN-Aktivität während der Zytokinese ermöglichen würde. Dabei ist auch zu beachten, dass zumindest in HeLa-Zellen offenbar auch die Cofilin-Phosphatase SSH in die Regulation der Cofilin-Aktivität an der Teilungsfurche involviert ist (Kaji et al., 2003; Tanaka et al., 2005). Jedoch scheinen sich die subzellulären Lokalisationen von SSH und CIN während der Mitose zu unterscheiden: So kolokalisiert SSH in diesen Zellen eher mit F-Aktin, während die CIN-Lokalisation der von Cofilin entspricht (Kaji et al., 2003; Gohla et al., 2005). Auch LIMK1 lokalisiert an der sich bildenden Teilungsfurche, ihre Aktivität beschränkt sich jedoch eher auf die frühen Phasen der Mitose (Amano et al., 2002; Sumi et al., 2006). Zukünftige Studien müssen dabei zeigen, ob auch CIB1 über den PAK1-LIMK1-Signalweg einen Einfluss auf die Inaktivierung von Cofilin während der Mitose ausübt.

Neuere Arbeiten belegen weiterhin, dass die Regulation der Cofilin-Aktivität komplexen Mechanismen unterliegt und es vermutlich nicht ausreichend ist, den Phosphorylierungs-Status von Cofilin als alleiniges Maß der Aktivität heranzuziehen (van Rheenen et al., 2009). Ein Ausweg bietet hier der sogenannte *barbed end assay*, welcher die Visualisierung von neu gebildeten Plus-Enden als Ausmaß der Aktinfilament Fragmentierungs-Aktivität von Cofilin in lebenden oder fixierten Zellen ermöglicht (Lorenz et al., 2004). Mit Hilfe dieses Ansatzes und einer stabilen Depletion von CIN oder CIB1 in Zellen ließe sich ein möglicher Einfluss von CIN und/oder CIB1 auf die Cofilin-Aktivität in mitotischen Zellen näher bestimmen. Zu diesem Zweck wurde auch eine stabile, CIN-depletierte GC-1 spg-Zelllinie etabliert (s. Abb. IV.15). Hierbei wurde auf die lentivirale Transduktion zurückgegriffen.

Zunächst wurden fünf verschiedenen shRNA-Sequenzen gegen murines CIN in GC-1 spg-Zellen transduziert und auf ihre Fähigkeit zur Reduktion der endogenen CIN-Spiegel überprüft (s. Abb. IV.15). Hier zeigte eine mit der Sequenz 3 transduzierte Zelllinie eine um etwa 90% reduzierte CIN-Expression und damit den deutlichsten Effekt und steht nun für weitere Analysen zur Verfügung.

V.6 Kartierung von CIN- und CIB1-Bindedomänen

Die Veränderung der endogenen Proteinspiegel durch Methoden wie si- oder shRNA stellt ein wichtiges Werkzeug für die funktionelle Analyse einzelner Proteine dar. Allerdings stellte sich in diesem Fall das Problem, dass eine Depletion von CIB1 nicht nur die CIN/CIB1-Interaktion verhindern würde, sondern darüber hinaus auch die CIB1-vermittelte PAK1-Aktivierung und einen damit verbundenen Einfluss von CIB1 auf die Cofilin-Phosphoregulation. Daher wurde nach Wegen gesucht, um die endogene CIN/CIB1-Interaktion selektiv zu inhibieren. In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck die Identifizierung von spezifischen Bindedomänen auf den jeweiligen Bindungspartnern gewählt, um die Interaktion durch eine gezielte Intervention an dieser Stelle blockieren zu können.

Dafür wurden zunächst die Bindedomänen von CIN und CIB1 mit Hilfe des *yeast two-hybrid* assays auf den jeweiligen Partnern identifiziert und später biochemisch charakterisiert. Für CIN konnte so eine putative Bindestelle von etwa 18 Aminosäuren hinter dem EF-Hand-Motiv IV auf CIB1 identifiziert werden (s. Abb. IV.16, unteres Panel). Eine CIB1-Deletionsmutante (CIB1¹⁻¹⁷²), der dieser Bereich fehlte, zeigte in *in vitro*-Bindungsexperimenten eine stark reduzierte Bindung an CIN (s. Abb. IV.18, A). Dabei konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Deletion des C-Terminus bis zur EF-Hand IV die strukturelle Integrität des Proteins so stark beeinträchtigt wurde, dass eine Bindung an CIN nicht mehr möglich war.

Aus diesem Grund wurde auch eine putative Bindestelle von CIB1 auf CIN identifiziert. Hier schienen fünf Aminosäuren essentiell für die Bindung der beiden Proteine zu sein (s. Abb. IV.16, oberes Panel). Aufgrund der Notwendigkeit einer Überexpression der Punktmutanten bei gleichzeitiger Anwesenheit des endogenen Proteins wurde von der sequentiellen Mutation der Aminosäuren abgesehen. Stattdessen wurde ein synthetisches Peptid entworfen, welches die kritischen Aminosäuren umfasste und die Bindung von CIN an CIB1 durch kompetitive Bindung inhibieren sollte. Dr. Elisabeth Jeanclos konnte in *in vitro*-Bindungsexperimenten zeigen, dass dieses Peptid die Bindung von CIN an CIB1 konzentrationsabhängig inhibieren kann (s. Abb. IV.18, B).

Für die weitere Verwendung des Peptids in einem zellulären System bietet sich die Kopplung an eine Penetratin-Sequenz an. Bei Penetratin handelt es sich um ein patentiertes Peptid von 16 Aminosäuren, das der dritten Helix der Homeodomäne des Antennapedia-Transkriptionsfaktors von *D. melanogaster* entspricht. Dieses Peptid ist in der Lage, biologische Membranen durch einen Energie-unabhängigen Mechanismus zu passieren und wurde bereits in der Literatur verwendet, um kovalent gebundene Peptide oder Oligonukleotide Rezeptor-unabhängig in verschiedene Säugerzellen zu transportieren (Derossi et al., 1996; Derossi et al., 1998). Darüber hinaus wäre auch eine Kopplung des CIN-Peptids mit einem sogenannten TAT-Peptid möglich, ein weiteres Zell-penetrierendes Peptid, das als Vehikel für das unspezifische Einschleusen von biologisch aktiven Molekülen in Kulturzellen aber auch *in vivo* verwendet werden kann (Kashio et al., 2007; Kersemans et al., 2008; Vives et al., 2008; Heitz et al., 2009). Ein solcherart präpariertes CIN-Peptid würde ein wertvolles Werkzeug für zukünftige, detaillierte Analysen zur biologischen Relevanz der CIN/CIB1-Interaktion z.B. in mitotischen Zellen darstellen. Aber auch Thrombozyten würden sich für solche Untersuchungen anbieten, da die Thrombozyten-Aktivierung durch Liganden wie Thrombin oder Fibrinogen zu einer massiven Veränderung der Zellform führt, die maßgeblich durch das Aktin-Zytoskelett kontrolliert wird. Die dafür notwendige Reorganisation der Aktinfilamente verläuft in zwei Phasen, von denen die Erste vermutlich durch Kalzium-aktivierte Mitglieder der Gelsolin-Familie kontrolliert wird, die zweite Phase jedoch Cofilin-abhängig erfolgt und maßgeblich von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelten Signaltransduktionswegen beeinflusst wird (Falet et al., 2005). Dabei kommt es zu einer drastischen, offenbar Kalzium-vermittelten, Cofilin-Dephosphorylierung deren Regulation noch völlig unverstanden ist (Pandey et al., 2007). Da auch CIB1 über eine direkte Interaktion mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in dessen Regulation der Aktin-Dynamik involviert ist, erscheint die Untersuchung einer möglichen Rolle der CIN/CIB1-Interaktion in diesen Prozessen durchaus lohnenswert.

Interessanterweise führt die genetische Inaktivierung von CIB1 bei Mäusen zu einer männlichen Sterilität, über deren Ursache bisher nur spekuliert werden kann (Yuan et al., 2006). Dabei zeigen preliminäre Daten unserer Arbeitsgruppe eine Kolo-kalisation von CIN und CIB1 in den sogenannten Sertoli-Zellen (Daten nicht gezeigt). Diese Zellen sind essentiell für die Reifung der Keimzellen, da sie in den Samenkanälen das entsprechende Mikromilieu für deren Entwicklung bereitstellen und darüber hinaus auch Nährstoffe und Wachstumsfaktoren sezernieren. Weiterhin verfügen Sertoli-Zellen über phagozytierende Eigenschaften, welche für die finale Reifung der Keimzellen essentiell sind. Eine veränderte CIN-Aktivität aufgrund der CIB1-Depletion könnte in Störungen der Sertoli-Funktion und somit der Keimzellreifung resultieren.

VI Zusammenfassung

Die Dynamik der Aktinfilament-Organisation ist essentiell für die Entwicklung und Funktion eukaryoter Organismen und wird daher durch eine Vielzahl Aktin-bindender Proteine räumlich und zeitlich strikt reguliert. Dabei gilt der ubiquitär exprimierte Aktin-depolymerisierende Faktor Cofilin als Schlüsselregulator der Stimulus-induzierten Aktin-Zytoskelett-Dynamik. Die Cofilin-aktivierende Phosphatase Chronophin (CIN), ein neuartiges Mitglied der HAD-Superfamilie von Protein-Phosphatasen in Säugern, spielt in kultivierten Zellen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts während der Zellmigration und Mitose. Die Regulation der CIN-Aktivität auf zellulärer Ebene ist jedoch noch völlig unverstanden. Ein primäres Ziel dieser Arbeit war es daher, Regulatoren von CIN zu identifizieren und zu charakterisieren, um grundlegende Einblicke in CIN-regulierende Signaltransduktionswege zu erhalten.

Von unserer Arbeitsgruppe wurde das Kalzium- und Integrin-bindende Protein 1 (CIB1) im Rahmen eines *yeast two-hybrid screens* als putativer CIN-Interaktor identifiziert. Im Verlauf dieser Dissertation wurde die direkte und spezifische Bindung der beiden Proteine biochemisch mit Hilfe von rekombinanten, gereinigten sowie mit endogenen Proteinen nachgewiesen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von CIN und CIB1 *in vitro* durch physiologisch relevante Ca^{2+} -Konzentrationen moduliert wird. CIB1 ist darüber hinaus in der Lage, eine Ca^{2+} -vermittelte Inhibierung der CIN-Phosphataseaktivität gegen das niedermolekulare Substrat Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) konzentrationsabhängig und über einen weiten Ca^{2+} -Bereich hinweg aufrecht zu erhalten.

Durch eine Sequenzanalyse wurde eine theoretische Bindestelle des Kalziumsensors Calmodulin auf CIB1 identifiziert. In der anschließenden biochemischen Analyse konnte nachgewiesen werden, dass sowohl CIB1 als auch CIN *in vitro* Ca^{2+} -abhängig an Calmodulin binden können. Interessanterweise resultierte das Zusammenspiel von CIN, CIB1, Calmodulin und Ca^{2+} in einer signifikanten Stimulation der CIN-Phosphataseaktivität gegen PLP. Dieser Befund stellt CIN in eine Reihe mit Calcineurin, der bisher einzigen bekannten Ca^{2+} -abhängigen Protein-Phosphatase.

Durch Mutationsanalysen wurde im Verlauf dieser Arbeit eine essentielle Bindungsstelle von CIB1 auf CIN1 lokalisiert. Dies resultierte in der erfolgreichen Etablierung eines Peptids, das die CIB1/CIN-Interaktion *in vitro* spezifisch blockieren kann. Somit steht nun für weiterführende zelluläre Analysen ein vielseitiges experimentelles Werkzeug zur Verfügung, mit dem die Interaktion von CIN und CIB1 spezifisch inhibiert werden kann.

Durch Untersuchungen in mitotischen Zellen konnte gezeigt werden, dass CIN und CIB1 während der Mitose und Zytokinese in Bereichen gesteigerter Aktin-Dynamik kolokalisieren. Die Phosphocofilin-Profile nach siRNA-vermittelter CIN- und CIB1-Depletion deuten auf eine

wichtige Rolle von CIB1 bei der Regulation der CIN-Aktivität während der Mitose hin. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass die Depletion von CIB1 und CIN zu Zellteilungsstörungen und zu einer verstärkten Akkumulation multinukleärer Zellen führt. Somit scheint die Ca^{2+} -abhängige CIB1/CIN-Interaktion eine wichtige Rolle bei der CIN-vermittelten Cofilin-Aktivierung und Aktin-Dynamik während der Mitose zu spielen.

Zusammen legen unsere Befunde die Hypothese nahe, dass es sich bei CIB1 (analog zur Assoziation von Calcineurin B mit der katalytischen PP2B-Untereinheit Calcineurin A) um eine Strukturkomponente von CIN handelt.

VII Summary

The dynamic reorganisation of the actin cytoskeleton is essential for the development and function of eukaryotic organisms and is therefore tightly controlled in space and time by numerous actin binding proteins. Proteins of the ADF/cofilin family are key regulators of actin cytoskeletal dynamics, and their activity is inhibited by phosphorylation of a single serine residue. Our group has recently identified Chronophin (CIN), a novel ADF/cofilin-specific phosphatase with unique structural and biochemical properties that is a member of the largely unexplored family of haloacid dehalogenase (HAD)-type hydrolases. CIN plays an important role in the regulation of cofilin-dependent actin dynamics during cell motility and division. Currently, nothing is known about CIN regulatory proteins. Therefore, the goal of this study was to elucidate mechanisms by which CIN activity is regulated to gain insights into the dynamics of cytoskeletal reorganisation.

A yeast two-hybrid screen was performed by our group in order to identify CIN-regulatory proteins. This screen resulted in the identification of the calcium- and integrin binding protein 1 (CIB1) as a putative CIN interactor. CIB1 shares a significant structural similarity to the non-catalytic subunit of protein phosphatase 2B/calcineurin. This dissertation work demonstrates that CIB1 is able to directly and specifically interact with CIN *in vitro*, as shown by biochemical pulldown and solid phase binding experiments, using both purified, recombinant and endogenously expressed proteins. For an in-depth analysis of the CIN/CIB1 interaction a monoclonal CIN- and a polyclonal CIB1-specific antibody was generated and validated. Furthermore, solid phase binding experiments with purified proteins revealed a calcium-dependent association of CIN and CIB1 *in vitro*, resulting in a markedly stimulated CIN phosphatase activity towards the CIN-specific low molecular weight compound pyridoxal-5'-phosphate. Moreover, both CIN and CIB1 were able to specifically interact with the calcium sensor calmodulin (CaM) in a calcium-dependent manner *in vitro*. The interplay of CIN, CIB1, CaM and calcium led to a significantly enhanced activity of CIN towards PLP. Interestingly, the composition of the CIN/CIB1 complex bears a striking resemblance with the serine/threonine-phosphatase calcineurin, a master regulator of important signaling cascades governing development and function of the immune, nervous and cardiovascular system. So far, Calcineurin has been believed to be unique among phosphatases in its ability to sense calcium through its activation by calcium.

The binding site of CIB1 on CIN was mapped in yeast two-hybrid assays to a discrete region of 5 amino acids, and a region of 13 amino acids in the C-terminus of CIB1 was identified as critical for CIN binding. Both regions are surface exposed and were confirmed as important interaction sites in solid phase binding experiments using a truncated CIB1 protein and a synthetic peptide derived from CIN. This peptide was able to inhibit the association of CIN

and CIB1 with high efficiency, thus presenting a valuable tool for future studies addressing the biological roles of the CIB1/CIN interaction.

Evidence for a physiological relevance of the CIN/CIB1 interaction was obtained by subcellular localisation studies using confocal microscopy. In mitotic cells, CIN and CIB1 colocalised to regions of dynamic actin cytoskeletal reorganisation, *e.g.* the ingressing cleavage furrow during telophase or dynamic membrane areas during the later phases of cytokinesis. Here, knockdown of CIN and CIB1 protein levels by RNA interference in mitotic GC-1 spg cells lead to increased phospho-cofilin levels during cytokinesis and a significantly enhanced accumulation of multinucleated cells. Therefore, the Ca^{2+} -dependent CIB1/CIN-interaction appears to play an important role for the CIN-mediated cofilin activation and actin reorganisation during mitotic cell division.

In analogy to the association of the structural subunit Calcineurin B with the catalytic subunit Calcineurin A, our results suggest that CIB1 constitutes a structural component of CIN.

VIII Literaturverzeichnis

- Ahuja, R., R. Pinyol, N. Reichenbach, L. Custer, J. Klingensmith, et al. (2007). "Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology." Cell **131**(2): 337-50.
- Aitken, A., P. Cohen, S. Santikarn, D. H. Williams, A. G. Calder, et al. (1982). "Identification of the NH₂-terminal blocking group of calcineurin B as myristic acid." FEBS Lett **150**(2): 314-8.
- Alberti, C. (2009). "Cytoskeleton structure and dynamic behaviour: quick excursus from basic molecular mechanisms to some implications in cancer chemotherapy." Eur Rev Med Pharmacol Sci **13**(1): 13-21.
- Allen, K. N. and D. Dunaway-Mariano (2004). "Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold." Trends Biochem Sci **29**(9): 495-503.
- Almo, S. C., J. B. Bonanno, J. M. Sauder, S. Emtage, T. P. Diloranzo, et al. (2007). "Structural genomics of protein phosphatases." J Struct Funct Genomics **8**(2-3): 121-40.
- Amano, T., N. Kaji, K. Ohashi and K. Mizuno (2002). "Mitosis-specific activation of LIM motif-containing protein kinase and roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation in mitosis." J Biol Chem **277**(24): 22093-102.
- Ambach, A., J. Saunus, M. Konstandin, S. Wesselborg, S. C. Meuer, et al. (2000). "The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes." Eur J Immunol **30**(12): 3422-31.
- Ames, J. B., R. Ishima, T. Tanaka, J. I. Gordon, L. Stryer, et al. (1997). "Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches." Nature **389**(6647): 198-202.
- Andrianantoandro, E. and T. D. Pollard (2006). "Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin." Mol Cell **24**(1): 13-23.
- Aravind, L. and E. V. Koonin (1998). "The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases." Trends Biochem Sci **23**(12): 469-72.
- Arber, S., F. A. Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C. A. Stanyon, et al. (1998). "Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase." Nature **393**(6687): 805-9.
- Babu, Y. S., J. S. Sack, T. J. Greenhough, C. E. Bugg, A. R. Means, et al. (1985). "Three-dimensional structure of calmodulin." Nature **315**(6014): 37-40.
- Bamburg, J. R. (1999). "Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 185-230.
- Bamburg, J. R. and B. W. Bernstein (2008). "ADF/cofilin." Curr Biol **18**(7): R273-5.
- Bamburg, J. R. and O. P. Wiggan (2002). "ADF/cofilin and actin dynamics in disease." Trends Cell Biol **12**(12): 598-605.
- Barkalow, K., W. Witke, D. J. Kwiatkowski and J. H. Hartwig (1996). "Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by gelsolin and capping protein." J Cell Biol **134**(2): 389-99.
- Barry, W. T., C. Boudignon-Proudhon, D. D. Shock, A. McFadden, J. M. Weiss, et al. (2002). "Molecular basis of CIB binding to the integrin alpha IIb cytoplasmic domain." J Biol Chem **277**(32): 28877-83.

- Bear, J. E., T. M. Svitkina, M. Krause, D. A. Schafer, J. J. Loureiro, et al. (2002). "Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility." Cell **109**(4): 509-21.
- Bellenchi, G. C., C. B. Gurniak, E. Perlas, S. Middei, M. Ammassari-Teule, et al. (2007). "N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex." Genes Dev **21**(18): 2347-57.
- Bernstein, B. W. and J. R. Bamburg (1982). "Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF)." Cell Motil **2**(1): 1-8.
- Bernstein, B. W., H. Chen, J. A. Boyle and J. R. Bamburg (2006). "Formation of actin-ADF/cofilin rods transiently retards decline of mitochondrial potential and ATP in stressed neurons." Am J Physiol Cell Physiol **291**(5): C828-39.
- Bernstein, B. W., W. B. Painter, H. Chen, L. S. Minamide, H. Abe, et al. (2000). "Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins." Cell Motil Cytoskeleton **47**(4): 319-36.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and P. Lipp (1998). "Calcium--a life and death signal." Nature **395**(6703): 645-8.
- Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Bhattacharya, N., S. Ghosh, D. Sept and J. A. Cooper (2006). "Binding of myotrophin/V-1 to actin-capping protein: implications for how capping protein binds to the filament barbed end." J Biol Chem **281**(41): 31021-30.
- Blanchoin, L. and T. D. Pollard (1998). "Interaction of actin monomers with Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) and profilin." J Biol Chem **273**(39): 25106-11.
- Blanchoin, L. and T. D. Pollard (1999). "Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments." J Biol Chem **274**(22): 15538-46.
- Blanchoin, L., T. D. Pollard and R. D. Mullins (2000). "Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks." Curr Biol **10**(20): 1273-82.
- Blazejczyk, M., U. Wojda, A. Sobczak, C. Spilker, H. G. Bernstein, et al. (2006). "Ca²⁺-independent binding and cellular expression profiles question a significant role of calmyrin in transduction of Ca²⁺-signals to Alzheimer's disease-related presenilin 2 in forebrain." Biochim Biophys Acta **1762**(1): 66-72.
- Blondin, L., V. Sapountzi, S. K. Maciver, C. Renoult, Y. Benyamin, et al. (2001). "The second ADF/cofilin actin-binding site exists in F-actin, the cofilin-G-actin complex, but not in G-actin." Eur J Biochem **268**(24): 6426-34.
- Bobkov, A. A., A. Muhlrاد, D. A. Pavlov, K. Kokabi, A. Yilmaz, et al. (2006). "Cooperative effects of cofilin (ADF) on actin structure suggest allosteric mechanism of cofilin function." J Mol Biol **356**(2): 325-34.
- Bootman, M. D., P. Lipp and M. J. Berridge (2001). "The organisation and functions of local Ca²⁺ signals." J Cell Sci **114**(Pt 12): 2213-22.
- Braunewell, K. H. and E. D. Gundelfinger (1999). "Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function." Cell Tissue Res **295**(1): 1-12.
- Bretschneider, T., S. Diez, K. Anderson, J. Heuser, M. Clarke, et al. (2004). "Dynamic actin patterns and Arp2/3 assembly at the substrate-attached surface of motile cells." Curr Biol **14**(1): 1-10.
- Burgoyne, R. D. (2007). "Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling." Nat Rev Neurosci **8**(3): 182-93.

- Burgoyne, R. D., D. W. O'Callaghan, B. Hasdemir, L. P. Haynes and A. V. Tepikin (2004). "Neuronal Ca²⁺-sensor proteins: multitasking regulators of neuronal function." Trends Neurosci **27**(4): 203-9.
- Burgoyne, R. D. and J. L. Weiss (2001). "The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins." Biochem J **353**(Pt 1): 1-12.
- Burroughs, A. M., K. N. Allen, D. Dunaway-Mariano and L. Aravind (2006). "Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes." J Mol Biol **361**(5): 1003-34.
- Cai, L., T. W. Marshall, A. C. Uetrecht, D. A. Schafer and J. E. Bear (2007). "Coronin 1B coordinates Arp2/3 complex and cofilin activities at the leading edge." Cell **128**(5): 915-29.
- Carafoli, E. and J. T. Penniston (1985). "The calcium signal." Sci Am **253**(5): 70-8.
- Carrier, M. F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, et al. (1997). "Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility." J Cell Biol **136**(6): 1307-22.
- Carrier, M. F., C. Le Clainche, S. Wiesner and D. Pantaloni (2003). "Actin-based motility: from molecules to movement." Bioessays **25**(4): 336-45.
- Carlsson, L., L. E. Nystrom, I. Sundkvist, F. Markey and U. Lindberg (1977). "Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells." J Mol Biol **115**(3): 465-83.
- Chen, H., B. W. Bernstein, J. M. Sneider, J. A. Boyle, L. S. Minamide, et al. (2004). "In vitro activity differences between proteins of the ADF/cofilin family define two distinct subgroups." Biochemistry **43**(22): 7127-42.
- Chereau, D., F. Kerff, P. Graceffa, Z. Grabarek, K. Langsetmo, et al. (2005). "Actin-bound structures of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and the implications for filament assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(46): 16644-9.
- Chester, N. and D. R. Marshak (1993). "Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction." Anal Biochem **209**(2): 284-90.
- Chiang, Y., C. Y. Chou, K. F. Hsu, Y. F. Huang and M. R. Shen (2008). "EGF upregulates Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 by post-translational regulation that is important for cervical cancer cell invasiveness." J Cell Physiol **214**(3): 810-9.
- Chou, Y. H., F. W. Flitney, L. Chang, M. Mendez, B. Grin, et al. (2007). "The motility and dynamic properties of intermediate filaments and their constituent proteins." Exp Cell Res **313**(10): 2236-43.
- Chua, B. T., C. Volbracht, K. O. Tan, R. Li, V. C. Yu, et al. (2003). "Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction." Nat Cell Biol **5**(12): 1083-9.
- Clapham, D. E. (2007). "Calcium signaling." Cell **131**(6): 1047-58.
- Cleveland, D. W. (1982). "Treadmilling of tubulin and actin." Cell **28**(4): 689-91.
- Collet, J. F., V. Stroobant, M. Pirard, G. Delpierre and E. Van Schaftingen (1998). "A new class of phosphotransferases phosphorylated on an aspartate residue in an amino-terminal DXDX(T/V) motif." J Biol Chem **273**(23): 14107-12.
- Cooper, J. A., E. L. Buhle, Jr., S. B. Walker, T. Y. Tsong and T. D. Pollard (1983). "Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization." Biochemistry **22**(9): 2193-202.

- Cooper, J. A. and D. A. Schafer (2000). "Control of actin assembly and disassembly at filament ends." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 97-103.
- Cox, J. A., A. Malnoe and E. A. Stein (1981). "Regulation of brain cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin. A quantitative analysis." J Biol Chem **256**(7): 3218-22.
- Crivici, A. and M. Ikura (1995). "Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin." Annu Rev Biophys Biomol Struct **24**: 85-116.
- Dang, D., J. R. Bamburg and D. M. Ramos (2006). "Alphavbeta3 integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion." Exp Cell Res **312**(4): 468-77.
- Danuser, G. (2005). "Coupling the dynamics of two actin networks--new views on the mechanics of cell protrusion." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1250-3.
- Davidson, M. M. and R. J. Haslam (1994). "Dephosphorylation of cofilin in stimulated platelets: roles for a GTP-binding protein and Ca²⁺." Biochem J **301** (Pt 1): 41-7.
- Deane, C. M., L. Salwinski, I. Xenarios and D. Eisenberg (2002). "Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations." Mol Cell Proteomics **1**(5): 349-56.
- Delorme, V., M. Machacek, C. DerMardirossian, K. L. Anderson, T. Wittmann, et al. (2007). "Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks." Dev Cell **13**(5): 646-62.
- Denofrio, J. C., W. Yuan, B. R. Temple, H. R. Gentry and L. V. Parise (2008). "Characterization of calcium- and integrin-binding protein 1 (CIB1) knockout platelets: potential compensation by CIB family members." Thromb Haemost **100**(5): 847-56.
- Derossi, D., S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, et al. (1996). "Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent." J Biol Chem **271**(30): 18188-93.
- Derossi, D., G. Chassaing and A. Prochiantz (1998). "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery." Trends Cell Biol **8**(2): 84-7.
- DesMarais, V., I. Ichetovkin, J. Condeelis and S. E. Hitchcock-DeGregori (2002). "Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge." J Cell Sci **115**(Pt 23): 4649-60.
- Disanza, A., A. Steffen, M. Hertzog, E. Frittoli, K. Rottner, et al. (2005). "Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement." Cell Mol Life Sci **62**(9): 955-70.
- Ditsch, A. and A. Wegner (1994). "Nucleation of actin polymerization by gelsolin." Eur J Biochem **224**(1): 223-7.
- dos Remedios, C. G., D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, et al. (2003). "Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments." Physiol Rev **83**(2): 433-73.
- Efimov, A., A. Kharitonov, N. Efimova, J. Loncarek, P. M. Miller, et al. (2007). "Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network." Dev Cell **12**(6): 917-30.
- Ekman, P. and O. Jager (1993). "Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green." Anal Biochem **214**(1): 138-41.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**(2): 188-200.

- Emptage, N. J. (2001). "Fluorescent imaging in living systems." Curr Opin Pharmacol **1**(5): 521-5.
- Endo, M., K. Ohashi and K. Mizuno (2007). "LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension." J Biol Chem **282**(18): 13692-702.
- Endo, M., K. Ohashi, Y. Sasaki, Y. Goshima, R. Niwa, et al. (2003). "Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin." J Neurosci **23**(7): 2527-37.
- Falet, H., G. Chang, B. Brohard-Bohn, F. Rendu and J. H. Hartwig (2005). "Integrin alpha(IIb)beta3 signals lead cofilin to accelerate platelet actin dynamics." Am J Physiol Cell Physiol **289**(4): C819-25.
- Feng, B. and P. M. Stemmer (1999). "Interactions of calcineurin A, calcineurin B, and Ca²⁺." Biochemistry **38**(38): 12481-9.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-6.
- Fonda, M. L. (1992). "Purification and characterization of vitamin B6-phosphate phosphatase from human erythrocytes." J Biol Chem **267**(22): 15978-83.
- Fonda, M. L. and Y. N. Zhang (1995). "Kinetic mechanism and divalent metal activation of human erythrocyte pyridoxal phosphatase." Arch Biochem Biophys **320**(2): 345-52.
- Fowler, V. M., N. J. Greenfield and J. Moyer (2003). "Tropomodulin contains two actin filament pointed end-capping domains." J Biol Chem **278**(41): 40000-9.
- Fulga, T. A., I. Elson-Schwab, V. Khurana, M. L. Steinhilb, T. L. Spires, et al. (2007). "Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo." Nat Cell Biol **9**(2): 139-48.
- Galkin, V. E., A. Orlova, M. S. VanLoock, A. Shvetsov, E. Reisler, et al. (2003). "ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments." J Cell Biol **163**(5): 1057-66.
- Gao, G. and M. L. Fonda (1994). "Identification of an essential cysteine residue in pyridoxal phosphatase from human erythrocytes." J Biol Chem **269**(11): 8234-9.
- Gao, G. J. and M. L. Fonda (1994). "Kinetic analysis and chemical modification of vitamin B6 phosphatase from human erythrocytes." J Biol Chem **269**(10): 7163-8.
- Garvalov, B. K., K. C. Flynn, D. Neukirchen, L. Meyn, N. Teusch, et al. (2007). "Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity." J Neurosci **27**(48): 13117-29.
- Gearing, M., J. L. Juncos, V. Procaccio, C. A. Gutekunst, E. M. Marino-Rodriguez, et al. (2002). "Aggregation of actin and cofilin in identical twins with juvenile-onset dystonia." Ann Neurol **52**(4): 465-76.
- Gentry, H. R., A. U. Singer, L. Betts, C. Yang, J. D. Ferrara, et al. (2005). "Structural and biochemical characterization of CIB1 delineates a new family of EF-hand-containing proteins." J Biol Chem **280**(9): 8407-15.
- Ghosh, M., X. Song, G. Mounemne, M. Sidani, D. S. Lawrence, et al. (2004). "Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility." Science **304**(5671): 743-6.
- Gifford, J. L., M. P. Walsh and H. J. Vogel (2007). "Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs." Biochem J **405**(2): 199-221.
- Gimona, M. (2008). "The microfilament system in the formation of invasive adhesions." Semin Cancer Biol **18**(1): 23-34.

- Giorgi, C., A. Romagnoli, P. Pinton and R. Rizzuto (2008). "Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death." Curr Mol Med **8**(2): 119-30.
- Gohla, A., J. Birkenfeld and G. M. Bokoch (2005). "Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics." Nat Cell Biol **7**(1): 21-9.
- Gohla, A., J. Birkenfeld and G. M. Bokoch (2005). "Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics." Nature Cell Biology **7**(1): 21-+.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., M. I. Furman, D. Wachsstock, D. Safer, V. T. Nachmias, et al. (1992). "The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells." Mol Biol Cell **3**(9): 1015-24.
- Goode, B. L. and M. J. Eck (2007). "Mechanism and function of formins in the control of actin assembly." Annu Rev Biochem **76**: 593-627.
- Groth, R. D., R. L. Dunbar and P. G. Mermelstein (2003). "Calcineurin regulation of neuronal plasticity." Biochem Biophys Res Commun **311**(4): 1159-71.
- Gunsalus, K. C., S. Bonaccorsi, E. Williams, F. Verni, M. Gatti, et al. (1995). "Mutations in twinstar, a Drosophila gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis." J Cell Biol **131**(5): 1243-59.
- Gurniak, C. B., E. Perlas and W. Witke (2005). "The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration." Dev Biol **278**(1): 231-41.
- Haataja, L., V. Kaartinen, J. Groffen and N. Heisterkamp (2002). "The small GTPase Rac3 interacts with the integrin-binding protein CIB and promotes integrin alpha(IIb)beta(3)-mediated adhesion and spreading." J Biol Chem **277**(10): 8321-8.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." Nature **418**(6894): 244-51.
- Heitz, F., M. C. Morris and G. Divita (2009). "Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics." Br J Pharmacol.
- Henderson, M. J., A. J. Russell, S. Hird, M. Munoz, J. L. Clancy, et al. (2002). "EDD, the human hyperplastic discs protein, has a role in progesterone receptor coactivation and potential involvement in DNA damage response." J Biol Chem **277**(29): 26468-78.
- Henley, J. and M. M. Poo (2004). "Guiding neuronal growth cones using Ca²⁺ signals." Trends Cell Biol **14**(6): 320-30.
- Higgs, H. N., L. Blanchoin and T. D. Pollard (1999). "Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization." Biochemistry **38**(46): 15212-22.
- Higgs, H. N. and T. D. Pollard (2001). "Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins." Annu Rev Biochem **70**: 649-76.
- Hoeflich, K. P. and M. Ikura (2002). "Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms." Cell **108**(6): 739-42.
- Hofmann, M. C., S. Narisawa, R. A. Hess and J. L. Millan (1992). "Immortalization of germ cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen." Exp Cell Res **201**(2): 417-35.
- Hollenbach, A. D., C. J. McPherson, I. Lagutina and G. Grosveld (2002). "The EF-hand calcium-binding protein calmyrin inhibits the transcriptional and DNA-binding activity of Pax3." Biochim Biophys Acta **1574**(3): 321-8.

- Horita, Y., K. Ohashi, M. Mukai, M. Inoue and K. Mizuno (2008). "Suppression of the invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by knockdown of Slingshot or LIM kinase." J Biol Chem **283**(10): 6013-21.
- Hotulainen, P., E. Paunola, M. K. Vartiainen and P. Lappalainen (2005). "Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells." Mol Biol Cell **16**(2): 649-64.
- Huang, T. Y., L. S. Minamide, J. R. Bamburg and G. M. Bokoch (2008). "Chronophin mediates an ATP-sensing mechanism for cofilin dephosphorylation and neuronal cofilin-actin rod formation." Dev Cell **15**(5): 691-703.
- Hubbard, M. J. and C. B. Klee (1989). "Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis." Biochemistry **28**(4): 1868-74.
- Ichetovkin, I., W. Grant and J. Condeelis (2002). "Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex." Curr Biol **12**(1): 79-84.
- Iida, K. and I. Yahara (1999). "Cooperation of two actin-binding proteins, cofilin and Aip1, in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Cells **4**(1): 21-32.
- Ikeda, S., L. A. Cunningham, D. Boggess, N. Hawes, C. D. Hobson, et al. (2003). "Aberrant actin cytoskeleton leads to accelerated proliferation of corneal epithelial cells in mice deficient for destrin (actin depolymerizing factor)." Hum Mol Genet **12**(9): 1029-37.
- Ishikawa, R., S. Yamashiro and F. Matsumura (1989). "Differential modulation of actin-severing activity of gelsolin by multiple isoforms of cultured rat cell tropomyosin. Potentiation of protective ability of tropomyosins by 83-kDa nonmuscle caldesmon." J Biol Chem **264**(13): 7490-7.
- Jang, Y. M., D. W. Kim, T. C. Kang, M. H. Won, N. I. Baek, et al. (2003). "Human pyridoxal phosphatase - Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution." Journal of Biological Chemistry **278**(50): 50040-50046.
- Jeromin, A., D. Muralidhar, M. N. Parameswaran, J. Roder, T. Fairwell, et al. (2004). "N-terminal myristoylation regulates calcium-induced conformational changes in neuronal calcium sensor-1." J Biol Chem **279**(26): 27158-67.
- Jurado, L. A., P. S. Chockalingam and H. W. Jarrett (1999). "Apocalmodulin." Physiol Rev **79**(3): 661-82.
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes (1990). "Atomic structure of the actin:DNase I complex." Nature **347**(6288): 37-44.
- Kahl, C. R. and A. R. Means (2003). "Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways." Endocr Rev **24**(6): 719-36.
- Kaji, N., A. Muramoto and K. Mizuno (2008). "LIM kinase-mediated cofilin phosphorylation during mitosis is required for precise spindle positioning." J Biol Chem **283**(8): 4983-92.
- Kaji, N., K. Ohashi, M. Shuin, R. Niwa, T. Uemura, et al. (2003). "Cell cycle-associated changes in Slingshot phosphatase activity and roles in cytokinesis in animal cells." J Biol Chem **278**(35): 33450-5.
- Kashio, A., T. Sakamoto, K. Suzukawa, S. Asoh, S. Ohta, et al. (2007). "A protein derived from the fusion of TAT peptide and FNK, a Bcl-x(L) derivative, prevents cochlear hair cell death from aminoglycoside ototoxicity in vivo." J Neurosci Res **85**(7): 1403-12.
- Kauselmann, G., M. Weiler, P. Wulff, S. Jessberger, U. Konietzko, et al. (1999). "The polo-like protein kinases Fnk and Snk associate with a Ca(2+)- and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity." EMBO J **18**(20): 5528-39.

- Kennedy, M. T., H. Brockman and F. Rusnak (1996). "Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function." J Biol Chem **271**(43): 26517-21.
- Kersemans, V., K. Kersemans and B. Cornelissen (2008). "Cell penetrating peptides for in vivo molecular imaging applications." Curr Pharm Des **14**(24): 2415-47.
- Kim, J. E., D. W. Kim, S. E. Kwak, O. S. Kwon, S. Y. Choi, et al. (2008). "Potential role of pyridoxal-5'-phosphate phosphatase/chronopin in epilepsy." Exp Neurol **211**(1): 128-40.
- Kim, J. E., D. W. Kim, S. E. Kwak, H. J. Ryu, S. I. Yeo, et al. (2009). "Pyridoxal-5'-phosphate phosphatase/chronophin inhibits long-term potentiation induction in the rat dentate gyrus." Hippocampus.
- Kim, J. S., T. Y. Huang and G. M. Bokoch (2009). "Reactive oxygen species regulate a slingshot-cofilin activation pathway." Mol Biol Cell **20**(11): 2650-60.
- Kinosian, H. J., J. Newman, B. Lincoln, L. A. Selden, L. C. Gershman, et al. (1998). "Ca²⁺ regulation of gelsolin activity: binding and severing of F-actin." Biophys J **75**(6): 3101-9.
- Kissinger, C. R., H. E. Parge, D. R. Knighton, C. T. Lewis, L. A. Pelletier, et al. (1995). "Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex." Nature **378**(6557): 641-4.
- Kiuchi, T., K. Ohashi, S. Kurita and K. Mizuno (2007). "Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers." J Cell Biol **177**(3): 465-76.
- Klee, C. B., T. H. Crouch and P. G. Richman (1980). "Calmodulin." Annu Rev Biochem **49**: 489-515.
- Klee, C. B., G. F. Draetta and M. J. Hubbard (1988). "Calcineurin." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **61**: 149-200.
- Klee, C. B., M. H. Krinks, A. S. Manalan, P. Cohen and A. A. Stewart (1983). "Isolation and characterization of bovine brain calcineurin: a calmodulin-stimulated protein phosphatase." Methods Enzymol **102**: 227-44.
- Klemke, M., G. H. Wabnitz, F. Funke, B. Funk, H. Kirchgessner, et al. (2008). "Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions." Immunity **29**(3): 404-13.
- Kligys, K., J. N. Claiborne, P. J. DeBiase, S. B. Hopkinson, Y. Wu, et al. (2007). "The slingshot family of phosphatases mediates Rac1 regulation of cofilin phosphorylation, laminin-332 organization, and motility behavior of keratinocytes." J Biol Chem **282**(44): 32520-8.
- Kligys, K., J. Yao, D. Yu and J. C. Jones (2009). "14-3-3zeta/tau heterodimers regulate Slingshot activity in migrating keratinocytes." Biochem Biophys Res Commun **383**(4): 450-4.
- Kobayashi, M., M. Nishita, T. Mishima, K. Ohashi and K. Mizuno (2006). "MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration." EMBO J **25**(4): 713-26.
- Kovar, D. R., E. S. Harris, R. Mahaffy, H. N. Higgs and T. D. Pollard (2006). "Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin." Cell **124**(2): 423-35.
- Kovar, D. R. and T. D. Pollard (2004). "Progressing actin: Formin as a processive elongation machine." Nat Cell Biol **6**(12): 1158-9.
- Krishnan, N., D. G. Jeong, S. K. Jung, S. E. Ryu, A. Xiao, et al. (2009). "Dephosphorylation of the C-terminal tyrosyl residue of the DNA damage-related histone H2A.X is mediated by the protein phosphatase eyes absent." J Biol Chem.

- Kudryashov, D. S., V. E. Galkin, A. Orlova, M. Phan, E. H. Egelman, et al. (2006). "Cofilin cross-bridges adjacent actin protomers and replaces part of the longitudinal F-actin interface." J Mol Biol **358**(3): 785-97.
- Kuhn, J. R. and T. D. Pollard (2007). "Single molecule kinetic analysis of actin filament capping. Polyphosphoinositides do not dissociate capping proteins." J Biol Chem **282**(38): 28014-24.
- Kuhn, T. B. and J. R. Bamburg (2008). "Tropomyosin and ADF/cofilin as collaborators and competitors." Adv Exp Med Biol **644**: 232-49.
- Kurita, S., E. Gunji, K. Ohashi and K. Mizuno (2007). "Actin filaments-stabilizing and -bundling activities of cofilin-phosphatase Slingshot-1." Genes Cells **12**(5): 663-76.
- Kurita, S., Y. Watanabe, E. Gunji, K. Ohashi and K. Mizuno (2008). "Molecular dissection of the mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase Slingshot-1." J Biol Chem **283**(47): 32542-52.
- Kusano, K., H. Abe and T. Obinata (1999). "Detection of a sequence involved in actin-binding and phosphoinositide-binding in the N-terminal side of cofilin." Mol Cell Biochem **190**(1-2): 133-41.
- Kwiatkowski, D. J., T. P. Stossel, S. H. Orkin, J. E. Mole, H. R. Colten, et al. (1986). "Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain." Nature **323**(6087): 455-8.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lamb, J. A., P. G. Allen, B. Y. Tuan and P. A. Janmey (1993). "Modulation of gelsolin function. Activation at low pH overrides Ca²⁺ requirement." J Biol Chem **268**(12): 8999-9004.
- Lappalainen, P. and D. G. Drubin (1997). "Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo." Nature **388**(6637): 78-82.
- Le Clainche, C. and M. F. Carlier (2008). "Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration." Physiol Rev **88**(2): 489-513.
- Lee, K. H., S. C. Meuer and Y. Samstag (2000). "Cofilin: a missing link between T cell co-stimulation and rearrangement of the actin cytoskeleton." Eur J Immunol **30**(3): 892-9.
- Leisner, T. M., M. Liu, Z. M. Jaffer, J. Chernoff and L. V. Parise (2005). "Essential role of CIB1 in regulating PAK1 activation and cell migration." J Cell Biol **170**(3): 465-76.
- Leisner, T. M., W. Yuan, J. C. DeNofrio, J. Liu and L. V. Parise (2007). "Tickling the tails: cytoplasmic domain proteins that regulate integrin α 5 β 3 activation." Curr Opin Hematol **14**(3): 255-61.
- Li, C. J., R. Heim, P. Lu, Y. Pu, R. Y. Tsien, et al. (1999). "Dynamic redistribution of calmodulin in HeLa cells during cell division as revealed by a GFP-calmodulin fusion protein technique." J Cell Sci **112** (Pt 10): 1567-77.
- Li, J., W. M. Briehner, M. L. Scimone, S. J. Kang, H. Zhu, et al. (2007). "Caspase-11 regulates cell migration by promoting Aip1-Cofilin-mediated actin depolymerization." Nat Cell Biol **9**(3): 276-86.
- Li, W. M., S. E. Webb, C. M. Chan and A. L. Miller (2008). "Multiple roles of the furrow deepening Ca²⁺ transient during cytokinesis in zebrafish embryos." Dev Biol **316**(2): 228-48.
- Lian, Q., C. J. Ladner, D. Magnuson and J. M. Lee (2001). "Selective changes of calcineurin (protein phosphatase 2B) activity in Alzheimer's disease cerebral cortex." Exp Neurol **167**(1): 158-65.

- Liang, Y. (2008). "Applications of isothermal titration calorimetry in protein science." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **40**(7): 565-76.
- Ling, K., N. J. Schill, M. P. Wagoner, Y. Sun and R. A. Anderson (2006). "Movin' on up: the role of PtdIns(4,5)P(2) in cell migration." Trends Cell Biol **16**(6): 276-84.
- Linse, S., A. Helmersson and S. Forsen (1991). "Calcium binding to calmodulin and its globular domains." J Biol Chem **266**(13): 8050-4.
- Lorenz, M., V. DesMarais, F. Macaluso, R. H. Singer and J. Condeelis (2004). "Measurement of barbed ends, actin polymerization, and motility in live carcinoma cells after growth factor stimulation." Cell Motil Cytoskeleton **57**(4): 207-17.
- Ma, S., M. A. Liu, Y. L. Yuan and R. L. Erikson (2003). "The serum-inducible protein kinase Snk is a G1 phase polo-like kinase that is inhibited by the calcium- and integrin-binding protein CIB." Mol Cancer Res **1**(5): 376-84.
- Mabuchi, I. (1983). "An actin-depolymerizing protein (depactin) from starfish oocytes: properties and interaction with actin." J Cell Biol **97**(5 Pt 1): 1612-21.
- Machesky, L. M. and R. H. Insall (1998). "Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex." Curr Biol **8**(25): 1347-56.
- Maciver, S. K. and C. R. Harrington (1995). "Two actin binding proteins, actin depolymerizing factor and cofilin, are associated with Hirano bodies." Neuroreport **6**(15): 1985-8.
- Maciver, S. K. and P. J. Hussey (2002). "The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins." Genome Biol **3**(5): reviews3007.
- Maciver, S. K., D. H. Wachsstock, W. H. Schwarz and T. D. Pollard (1991). "The actin filament severing protein actophorin promotes the formation of rigid bundles of actin filaments crosslinked with alpha-actinin." J Cell Biol **115**(6): 1621-8.
- Mallik, R. and S. P. Gross (2004). "Molecular motors: strategies to get along." Curr Biol **14**(22): R971-82.
- Maloney, M. T. and J. R. Bamberg (2007). "Cofilin-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and other amyloidopathies." Mol Neurobiol **35**(1): 21-44.
- Meberg, P. J. (2000). "Signal-regulated ADF/cofilin activity and growth cone motility." Mol Neurobiol **21**(1-2): 97-107.
- Miki, H. and T. Takenawa (1998). "Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization." Biochem Biophys Res Commun **243**(1): 73-8.
- Minamide, L. S., A. M. Striegl, J. A. Boyle, P. J. Meberg and J. R. Bamberg (2000). "Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function." Nat Cell Biol **2**(9): 628-36.
- Mitchison, T. J. and L. P. Cramer (1996). "Actin-based cell motility and cell locomotion." Cell **84**(3): 371-9.
- Miyakawa, T., L. M. Leiter, D. J. Gerber, R. R. Gainetdinov, T. D. Sotnikova, et al. (2003). "Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8987-92.
- Mockrin, S. C. and E. D. Korn (1980). "Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate." Biochemistry **19**(23): 5359-62.
- Moon, A. and D. G. Drubin (1995). "The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics." Mol Biol Cell **6**(11): 1423-31.

- Moriyama, K., E. Nishida, N. Yonezawa, H. Sakai, S. Matsumoto, et al. (1990). "Destrin, a mammalian actin-depolymerizing protein, is closely related to cofilin. Cloning and expression of porcine brain destrin cDNA." J Biol Chem **265**(10): 5768-73.
- Mouneimne, G., V. DesMarais, M. Sidani, E. Scemes, W. Wang, et al. (2006). "Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis." Curr Biol **16**(22): 2193-205.
- Mouneimne, G., L. Soon, V. DesMarais, M. Sidani, X. Song, et al. (2004). "Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation." J Cell Biol **166**(5): 697-708.
- Mullins, R. D., J. A. Heuser and T. D. Pollard (1998). "The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6181-6.
- Nagaoka, R., H. Abe, K. Kusano and T. Obinata (1995). "Concentration of cofilin, a small actin-binding protein, at the cleavage furrow during cytokinesis." Cell Motil Cytoskeleton **30**(1): 1-7.
- Nagata-Ohashi, K., Y. Ohta, K. Goto, S. Chiba, R. Mori, et al. (2004). "A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia." J Cell Biol **165**(4): 465-71.
- Naik, M. U. and U. P. Naik (2003). "Calcium-and integrin-binding protein regulates focal adhesion kinase activity during platelet spreading on immobilized fibrinogen." Blood **102**(10): 3629-36.
- Naik, U. P., P. M. Patel and L. V. Parise (1997). "Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin α IIb cytoplasmic domain." J Biol Chem **272**(8): 4651-4.
- Nakashima, K., N. Sato, T. Nakagaki, H. Abe, S. Ono, et al. (2005). "Two mouse cofilin isoforms, muscle-type (MCF) and non-muscle type (NMCF), interact with F-actin with different efficiencies." J Biochem **138**(4): 519-26.
- Nishida, E., S. Maekawa and H. Sakai (1984). "Characterization of the action of porcine brain profilin on actin polymerization." J Biochem **95**(2): 399-404.
- Nishita, M., H. Aizawa and K. Mizuno (2002). "Stromal cell-derived factor 1 α activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis." Mol Cell Biol **22**(3): 774-83.
- Nishita, M., C. Tomizawa, M. Yamamoto, Y. Horita, K. Ohashi, et al. (2005). "Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration." J Cell Biol **171**(2): 349-59.
- Nishita, M., Y. Wang, C. Tomizawa, A. Suzuki, R. Niwa, et al. (2004). "Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion." J Biol Chem **279**(8): 7193-8.
- Niwa, R., K. Nagata-Ohashi, M. Takeichi, K. Mizuno and T. Uemura (2002). "Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin." Cell **108**(2): 233-46.
- Noguchi, T. and I. Mabuchi (2001). "Reorganization of actin cytoskeleton at the growing end of the cleavage furrow of *Xenopus* egg during cytokinesis." J Cell Sci **114**(Pt 2): 401-12.
- O'Callaghan, D. W. and R. D. Burgoyne (2003). "Role of myristoylation in the intracellular targeting of neuronal calcium sensor (NCS) proteins." Biochem Soc Trans **31**(Pt 5): 963-5.

- O'Callaghan, D. W. and R. D. Burgoyne (2004). "Identification of residues that determine the absence of a Ca²⁺/myristoyl switch in neuronal calcium sensor-1." J Biol Chem **279**(14): 14347-54.
- O'Callaghan, D. W., A. V. Tepikin and R. D. Burgoyne (2003). "Dynamics and calcium sensitivity of the Ca²⁺/myristoyl switch protein hippocalcin in living cells." J Cell Biol **163**(4): 715-21.
- Ono, K., M. Parast, C. Alberico, G. M. Benian and S. Ono (2003). "Specific requirement for two ADF/cofilin isoforms in distinct actin-dependent processes in *Caenorhabditis elegans*." J Cell Sci **116**(Pt 10): 2073-85.
- Ono, S. (2007). "Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics." Int Rev Cytol **258**: 1-82.
- Ono, S., D. L. Baillie and G. M. Benian (1999). "UNC-60B, an ADF/cofilin family protein, is required for proper assembly of actin into myofibrils in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle." J Cell Biol **145**(3): 491-502.
- Oosawa, F. (2001). "A historical perspective of actin assembly and its interactions." Results Probl Cell Differ **32**: 9-21.
- Otomo, T., C. Otomo, D. R. Tomchick, M. Machius and M. K. Rosen (2005). "Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1." Mol Cell **18**(3): 273-81.
- Paavilainen, V. O., M. Hellman, E. Helfer, M. Bovellan, A. Annala, et al. (2007). "Structural basis and evolutionary origin of actin filament capping by twinfilin." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3113-8.
- Pak, C. W., K. C. Flynn and J. R. Bamberg (2008). "Actin-binding proteins take the reins in growth cones." Nat Rev Neurosci **9**(2): 136-47.
- Panchal, S. C., D. A. Kaiser, E. Torres, T. D. Pollard and M. K. Rosen (2003). "A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex." Nat Struct Biol **10**(8): 591-8.
- Pandey, D., P. Goyal and W. Siess (2007). "Lysophosphatidic acid stimulation of platelets rapidly induces Ca²⁺-dependent dephosphorylation of cofilin that is independent of dense granule secretion and aggregation." Blood Cells Mol Dis **38**(3): 269-79.
- Pantaloni, D., R. Boujemaa, D. Didry, P. Gounon and M. F. Carlier (2000). "The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins." Nat Cell Biol **2**(7): 385-91.
- Pavlov, D., A. Muhrlad, J. Cooper, M. Wear and E. Reisler (2007). "Actin filament severing by cofilin." J Mol Biol **365**(5): 1350-8.
- Pawlak, G. and D. M. Helfman (2002). "MEK mediates v-Src-induced disruption of the actin cytoskeleton via inactivation of the Rho-ROCK-LIM kinase pathway." J Biol Chem **277**(30): 26927-33.
- Peeraer, Y., A. Rabijns, J. F. Collet, E. Van Schaftingen and C. De Ranter (2004). "How calcium inhibits the magnesium-dependent enzyme human phosphoserine phosphatase." Eur J Biochem **271**(16): 3421-7.
- Peitzsch, R. M. and S. McLaughlin (1993). "Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins." Biochemistry **32**(39): 10436-43.
- Pfannstiel, J., M. Cyrklaff, A. Habermann, S. Stoeva, G. Griffiths, et al. (2001). "Human cofilin forms oligomers exhibiting actin bundling activity." J Biol Chem **276**(52): 49476-84.
- Pinton, P., C. Giorgi, R. Siviero, E. Zecchini and R. Rizzuto (2008). "Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis." Oncogene **27**(50): 6407-18.

- Podolski, J. L. and T. L. Steck (1988). "Association of deoxyribonuclease I with the pointed ends of actin filaments in human red blood cell membrane skeletons." J Biol Chem **263**(2): 638-45.
- Pollard, T. D., L. Blanchoin and R. D. Mullins (2000). "Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells." Annu Rev Biophys Biomol Struct **29**: 545-76.
- Pollard, T. D. and G. G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." Cell **112**(4): 453-65.
- Quinlan, M. E., J. E. Heuser, E. Kerkhoff and R. D. Mullins (2005). "Drosophila Spire is an actin nucleation factor." Nature **433**(7024): 382-8.
- R, D. B. (2004). "The neuronal calcium-sensor proteins." Biochim Biophys Acta **1742**(1-3): 59-68.
- Rayapureddi, J. P., C. Kattamuri, B. D. Steinmetz, B. J. Frankfort, E. J. Ostrin, et al. (2003). "Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases." Nature **426**(6964): 295-8.
- Renoult, C., D. Ternent, S. K. Maciver, A. Fattoum, C. Astier, et al. (1999). "The identification of a second cofilin binding site on actin suggests a novel, intercalated arrangement of F-actin binding." J Biol Chem **274**(41): 28893-9.
- Rhoads, A. R. and F. Friedberg (1997). "Sequence motifs for calmodulin recognition." FASEB J **11**(5): 331-40.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, et al. (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." Nat Biotechnol **17**(10): 1030-2.
- Robinson, R. C., K. Turbedsky, D. A. Kaiser, J. B. Marchand, H. N. Higgs, et al. (2001). "Crystal structure of Arp2/3 complex." Science **294**(5547): 1679-84.
- Rogers, E. M., F. Hsiung, A. B. Rodrigues and K. Moses (2005). "Slingshot cofilin phosphatase localization is regulated by receptor tyrosine kinases and regulates cytoskeletal structure in the developing Drosophila eye." Mech Dev **122**(11): 1194-205.
- Rogers, S. L., U. Wiedemann, N. Stuurman and R. D. Vale (2003). "Molecular requirements for actin-based lamella formation in Drosophila S2 cells." J Cell Biol **162**(6): 1079-88.
- Romero, S., C. Le Clainche, D. Didry, C. Egile, D. Pantaloni, et al. (2004). "Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis." Cell **119**(3): 419-29.
- Rosso, S., F. Bollati, M. Bisbal, D. Peretti, T. Sumi, et al. (2004). "LIMK1 regulates Golgi dynamics, traffic of Golgi-derived vesicles, and process extension in primary cultured neurons." Mol Biol Cell **15**(7): 3433-49.
- Safer, D. and V. T. Nachmias (1994). "Beta thymosins as actin binding peptides." Bioessays **16**(8): 590.
- Samstag, Y. and G. Nebl (2003). "Interaction of cofilin with the serine phosphatases PP1 and PP2A in normal and neoplastic human T lymphocytes." Adv Enzyme Regul **43**: 197-211.
- Sato, T., Y. Fukazawa, H. Kojima, Y. Ohta and T. Iguchi (2003). "Multiple mechanisms are involved in apoptotic cell death in the mouse uterus and vagina after ovariectomy." Reprod Toxicol **17**(3): 289-97.
- Scott, R. W. and M. F. Olson (2007). "LIM kinases: function, regulation and association with human disease." J Mol Med **85**(6): 555-68.

- Senin, I., T. Fischer, K. E. Komolov, D. V. Zinchenko, P. P. Philippov, et al. (2002). "Ca²⁺-myristoyl switch in the neuronal calcium sensor recoverin requires different functions of Ca²⁺-binding sites." J Biol Chem **277**(52): 50365-72.
- Shock, D. D., U. P. Naik, J. E. Brittain, S. K. Alahari, J. Sondek, et al. (1999). "Calcium-dependent properties of CIB binding to the integrin α IIb cytoplasmic domain and translocation to the platelet cytoskeleton." Biochem J **342 Pt 3**: 729-35.
- Sidani, M., D. Wessels, G. Mouneimne, M. Ghosh, S. Goswami, et al. (2007). "Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells." J Cell Biol **179**(4): 777-91.
- Song, X., X. Chen, H. Yamaguchi, G. Mouneimne, J. S. Condeelis, et al. (2006). "Initiation of cofilin activity in response to EGF is uncoupled from cofilin phosphorylation and dephosphorylation in carcinoma cells." J Cell Sci **119**(Pt 14): 2871-81.
- Soosairajah, J., S. Maiti, O. Wiggan, P. Sarmiere, N. Moussi, et al. (2005). "Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin." EMBO J **24**(3): 473-86.
- Spilker, C. and K. H. Brauneis (2003). "Calcium-myristoyl switch, subcellular localization, and calcium-dependent translocation of the neuronal calcium sensor protein VILIP-3, and comparison with VILIP-1 in hippocampal neurons." Mol Cell Neurosci **24**(3): 766-78.
- Stabler, S. M., L. L. Ostrowski, S. M. Janicki and M. J. Monteiro (1999). "A myristoylated calcium-binding protein that preferentially interacts with the Alzheimer's disease presenilin 2 protein." J Cell Biol **145**(6): 1277-92.
- Stewart, A. A., T. S. Ingebritsen, A. Manalan, C. B. Klee and P. Cohen (1982). "Discovery of a Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80)." FEBS Lett **137**(1): 80-4.
- Stradal, T. E. and G. Scita (2006). "Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly." Curr Opin Cell Biol **18**(1): 4-10.
- Strelkov, S. V., H. Herrmann and U. Aebi (2003). "Molecular architecture of intermediate filaments." Bioessays **25**(3): 243-51.
- Sumi, T., A. Hashigasako, K. Matsumoto and T. Nakamura (2006). "Different activity regulation and subcellular localization of LIMK1 and LIMK2 during cell cycle transition." Exp Cell Res **312**(7): 1021-30.
- Sumi, T., K. Matsumoto, Y. Takai and T. Nakamura (1999). "Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2." J Cell Biol **147**(7): 1519-32.
- Sun, H. Q., M. Yamamoto, M. Mejillano and H. L. Yin (1999). "Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein." J Biol Chem **274**(47): 33179-82.
- Swulius, M. T. and M. N. Waxham (2008). "Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases." Cell Mol Life Sci **65**(17): 2637-57.
- Tadross, M. R., I. E. Dick and D. T. Yue (2008). "Mechanism of local and global Ca²⁺ sensing by calmodulin in complex with a Ca²⁺ channel." Cell **133**(7): 1228-40.
- Tanaka, K., Y. Okubo and H. Abe (2005). "Involvement of slingshot in the Rho-mediated dephosphorylation of ADF/cofilin during *Xenopus* cleavage." Zoolog Sci **22**(9): 971-84.
- Tonks, N. K. and P. Cohen (1983). "Calcineurin is a calcium ion-dependent, calmodulin-stimulated protein phosphatase." Biochim Biophys Acta **747**(1-2): 191-3.

- Tootle, T. L., S. J. Silver, E. L. Davies, V. Newman, R. R. Latek, et al. (2003). "The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase." Nature **426**(6964): 299-302.
- Toshima, J., J. Y. Toshima, T. Amano, N. Yang, S. Narumiya, et al. (2001). "Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation." Mol Biol Cell **12**(4): 1131-45.
- Toshima, J., J. Y. Toshima, K. Takeuchi, R. Mori and K. Mizuno (2001). "Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells." J Biol Chem **276**(33): 31449-58.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1992). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979." Biotechnology **24**: 145-9.
- Tsuboi, S. (2002). "Calcium integrin-binding protein activates platelet integrin alpha IIb beta 3." J Biol Chem **277**(3): 1919-23.
- Tsuboi, S., S. Nonoyama and H. D. Ochs (2006). "Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in alphaIIb beta3-mediated cell adhesion." EMBO Rep **7**(5): 506-11.
- Vallar, L., C. Melchior, S. Plancon, H. Drobecq, G. Lippens, et al. (1999). "Divalent cations differentially regulate integrin alphaIIb cytoplasmic tail binding to beta3 and to calcium- and integrin-binding protein." J Biol Chem **274**(24): 17257-66.
- van Rheenen, J., J. Condeelis and M. Glogauer (2009). "A common cofilin activity cycle in invasive tumor cells and inflammatory cells." J Cell Sci **122**(Pt 3): 305-11.
- van Rheenen, J., X. Song, W. van Roosmalen, M. Cammer, X. Chen, et al. (2007). "EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells." J Cell Biol **179**(6): 1247-59.
- Van Troys, M., D. Dewitte, J. L. Verschelde, M. Goethals, J. Vandekerckhove, et al. (1997). "Analogous F-actin binding by cofilin and gelsolin segment 2 substantiates their structural relationship." J Biol Chem **272**(52): 32750-8.
- Van Troys, M., D. Dewitte, J. L. Verschelde, M. Goethals, J. Vandekerckhove, et al. (2000). "The competitive interaction of actin and PIP2 with actophorin is based on overlapping target sites: design of a gain-of-function mutant." Biochemistry **39**(40): 12181-9.
- Van Troys, M., L. Huyck, S. Leyman, S. Dhaese, J. Vandekerckhove, et al. (2008). "Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation." Eur J Cell Biol **87**(8-9): 649-67.
- Van Veldhoven, P. P. and G. P. Mannaerts (1987). "Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range." Anal Biochem **161**(1): 45-8.
- Vartiainen, M. K., T. Mustonen, P. K. Mattila, P. J. Ojala, I. Thesleff, et al. (2002). "The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics." Mol Biol Cell **13**(1): 183-94.
- Verdoni, A. M., R. S. Smith, A. Ikeda and S. Ikeda (2008). "Defects in actin dynamics lead to an autoinflammatory condition through the upregulation of CXCL5." PLoS ONE **3**(7): e2701.
- Vives, E., J. Schmidt and A. Pelegrin (2008). "Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery." Biochim Biophys Acta **1786**(2): 126-38.
- Wang, W., R. Eddy and J. Condeelis (2007). "The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis." Nat Rev Cancer **7**(6): 429-40.

- Wang, W., G. Mouneimne, M. Sidani, J. Wyckoff, X. Chen, et al. (2006). "The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors." J Cell Biol **173**(3): 395-404.
- Wang, Y., F. Shibasaki and K. Mizuno (2005). "Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin." J Biol Chem **280**(13): 12683-9.
- Watanabe, N. and C. Higashida (2004). "Formins: processive cappers of growing actin filaments." Exp Cell Res **301**(1): 16-22.
- Wayman, G. A., Y. S. Lee, H. Tokumitsu, A. Silva and T. R. Soderling (2008). "Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity." Neuron **59**(6): 914-31.
- Wear, M. A., A. Yamashita, K. Kim, Y. Maeda and J. A. Cooper (2003). "How capping protein binds the barbed end of the actin filament." Curr Biol **13**(17): 1531-7.
- Weeds, A. and S. Maciver (1993). "F-actin capping proteins." Curr Opin Cell Biol **5**(1): 63-9.
- Wen, Z., L. Han, J. R. Bamburg, S. Shim, G. L. Ming, et al. (2007). "BMP gradients steer nerve growth cones by a balancing act of LIM kinase and Slingshot phosphatase on ADF/cofilin." J Cell Biol **178**(1): 107-19.
- White, C., J. Yang, M. J. Monteiro and J. K. Foskett (2006). "CIB1, a ubiquitously expressed Ca²⁺-binding protein ligand of the InsP₃ receptor Ca²⁺ release channel." J Biol Chem **281**(30): 20825-33.
- Wong, R., L. Fabian, A. Forer and J. A. Brill (2007). "Phospholipase C and myosin light chain kinase inhibition define a common step in actin regulation during cytokinesis." BMC Cell Biol **8**: 15.
- Wriggers, W., J. X. Tang, T. Azuma, P. W. Marks and P. A. Janmey (1998). "Cofilin and gelsolin segment-1: molecular dynamics simulation and biochemical analysis predict a similar actin binding mode." J Mol Biol **282**(5): 921-32.
- Wu, X. and M. R. Lieber (1997). "Interaction between DNA-dependent protein kinase and a novel protein, KIP." Mutat Res **385**(1): 13-20.
- Yamaguchi, H., M. Lorenz, S. Kempiak, C. Sarmiento, S. Coniglio, et al. (2005). "Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin." J Cell Biol **168**(3): 441-52.
- Yamamoto, M., K. Nagata-Ohashi, Y. Ohta, K. Ohashi and K. Mizuno (2006). "Identification of multiple actin-binding sites in cofilin-phosphatase Slingshot-1L." FEBS Lett **580**(7): 1789-94.
- Yamniuk, A. P., J. L. Gifford, S. Linse and H. J. Vogel (2008). "Effects of metal-binding loop mutations on ligand binding to calcium- and integrin-binding protein 1. Evolution of the EF-hand?" Biochemistry **47**(6): 1696-707.
- Yamniuk, A. P., H. Ishida and H. J. Vogel (2006). "The interaction between calcium- and integrin-binding protein 1 and the alphaIIb integrin cytoplasmic domain involves a novel C-terminal displacement mechanism." J Biol Chem **281**(36): 26455-64.
- Yamniuk, A. P., L. T. Nguyen, T. T. Hoang and H. J. Vogel (2004). "Metal ion binding properties and conformational states of calcium- and integrin-binding protein." Biochemistry **43**(9): 2558-68.
- Yamniuk, A. P., D. M. Silver, K. L. Anderson, S. R. Martin and H. J. Vogel (2007). "Domain stability and metal-induced folding of calcium- and integrin-binding protein 1." Biochemistry **46**(24): 7088-98.
- Yamniuk, A. P. and H. J. Vogel (2005). "Calcium- and magnesium-dependent interactions between calcium- and integrin-binding protein and the integrin alphaIIb cytoplasmic domain." Protein Sci **14**(6): 1429-37.

- Yang, N., O. Higuchi, K. Ohashi, K. Nagata, A. Wada, et al. (1998). "Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization." Nature **393**(6687): 809-12.
- Yang, T. and B. W. Poovaiah (2003). "Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants." Trends Plant Sci **8**(10): 505-12.
- Yang, X., K. Yu, Y. Hao, D. M. Li, R. Stewart, et al. (2004). "LATS1 tumour suppressor affects cytokinesis by inhibiting LIMK1." Nat Cell Biol **6**(7): 609-17.
- Yonezawa, N., E. Nishida, K. Iida, I. Yahara and H. Sakai (1990). "Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides." J Biol Chem **265**(15): 8382-6.
- Yu, H., P. Braun, M. A. Yildirim, I. Lemmens, K. Venkatesan, et al. (2008). "High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network." Science **322**(5898): 104-10.
- Yu, Y. Y., Y. Chen, G. Dai, J. Chen, X. M. Sun, et al. (2004). "The association of calmodulin with central spindle regulates the initiation of cytokinesis in HeLa cells." Int J Biochem Cell Biol **36**(8): 1562-72.
- Yuan, W., T. M. Leisner, A. W. McFadden, S. Clark, S. Hiller, et al. (2006). "CIB1 is essential for mouse spermatogenesis." Mol Cell Biol **26**(22): 8507-14.
- Yuan, W., T. M. Leisner, A. W. McFadden, Z. Wang, M. K. Larson, et al. (2006). "CIB1 is an endogenous inhibitor of agonist-induced integrin α 5 β 3 activation." J Cell Biol **172**(2): 169-75.
- Zayed, M. A., W. Yuan, T. M. Leisner, D. Chalothorn, A. W. McFadden, et al. (2007). "CIB1 regulates endothelial cells and ischemia-induced pathological and adaptive angiogenesis." Circ Res **101**(11): 1185-93.
- Zhan, Q., J. R. Bamburg and J. A. Badwey (2003). "Products of phosphoinositide specific phospholipase C can trigger dephosphorylation of cofilin in chemoattractant stimulated neutrophils." Cell Motil Cytoskeleton **54**(1): 1-15.
- Zhou, L., S. J. Martinez, M. Haber, E. V. Jones, D. Bouvier, et al. (2007). "EphA4 signaling regulates phospholipase C γ 1 activation, cofilin membrane association, and dendritic spine morphology." J Neurosci **27**(19): 5127-38.
- Zhu, J., S. M. Stabler, J. B. Ames, I. Baskakov and M. J. Monteiro (2004). "Calcium binding sequences in calmyrin regulates interaction with presenilin-2." Exp Cell Res **300**(2): 440-54.
- Zoudilova, M., P. Kumar, L. Ge, P. Wang, G. M. Bokoch, et al. (2007). "Beta-arrestin-dependent regulation of the cofilin pathway downstream of protease-activated receptor-2." J Biol Chem **282**(28): 20634-46.
- Zozulya, S. and L. Stryer (1992). "Calcium-myristoyl protein switch." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11569-73.

IX Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Axel Hoffmann
Geburtsdatum/-ort: 23/05/1976 in Lingen (Ems)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

HOCHSCHULSTUDIUM UND PROMOTION

10/1997 - 01/2000 **Studium** der Biologie an der Universität Osnabrück
Abschluss: Diplom-Vorprüfung

04/2000 - 08/2004 **Studium** der Biologie an der Universität Freiburg im Breisgau
Abschluss: Diplom-Hauptprüfung
Fächer: Molekulare Immunologie (Hauptfach)
Genetik und Molekularbiologie (Nebenfach)
Pflanzenbiotechnologie (Nebenfach)
Virologie (nichtbiologisches Nebenfach)

08/2003 - 08/2004 Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pflanzenbiotechnologie,
Institut für Biologie II der Universität Freiburg
Titel der Diplomarbeit:
Transiente Synthese heterologer Proteine im Laubmoos
Physcomitrella patens (Hedw.) B.S.G.
Abschluss: Diplom-Biologe (Endnote: 1,2)

04/2005 - 08/2008 **Wissenschaftlicher Angestellter** am Universitätsklinikum Düsseldorf,
Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
Titel der Promotionsarbeit:
Charakterisierung des Kalzium- und Integrin-bindenden Proteins
CIB1 als Regulator von Chronophin

Seit 08/2008 **Wissenschaftlicher Angestellter** am Rudolf-Virchow-Zentrum,
DFG Forschungszentrum für experimentelle Biomedizin, Würzburg
Nachwuchsgruppe Gohla
Weiterführung der Dissertation

PUBLIKATIONEN

Koprivova, A., Stemmer, C., Altmann, F., Hoffmann, A., Gorr, G., Kopriva, S., Reski, R. und Decker, E. L. (2004). Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. ***Plant Biotechnol. J.***

KONGRESSBEITRÄGE

Fedorchenko O., Hoffmann A., Jeanclos E., Odersky A., Nürnberg B., Gohla A., The calcium- and integrin-binding protein 1 (CIB1) is a novel regulator of Chronophin. International Summer School on Molecular Imaging, EMBL, Heidelberg, 04. - 08. September 2006 (Poster).

Hoffmann A., Fedorchenko O., Jeanclos E., Odersky A., Nürnberg B., Gohla A., The calcium- and integrin-binding protein 1 (CIB1) is a novel regulator of Chronophin. EuroPhosphatases 2007 "Protein Phosphatases in Health and Disease", EMBO Conference/FEBS Workshop, Aveiro, Portugal, 24. - 28. Juli 2007 (Poster).

Hoffmann A., Fedorchenko O., Jeanclos E., Odersky A., Duraphe P., Nürnberg B., Gohla A., Role of the calcium- and integrin-binding protein CIB1 as an essential activator of the HAD phosphatase Chronophin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 377 (Suppl.1), 11. - 13. März 2008 (Vortrag).

Fedorchenko O., Odersky A., Klink B., Hoffmann A., Knobbe C., Reifenberger G., Nürnberg B., Gohla A., Role of cofilin phosphatase Chronophin in glioblastoma pathogenesis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 377 (Suppl.1), 11. - 13. März 2008 (Vortrag).

Gohla A., Hoffmann A., Jeanclos E., Fedorchenko O., Odersky A., Nürnberg B., Role of CIB1 as a regulator of Chronophin phosphatase activity. 10th Biennial FASEB Summer Research Conference Protein Phosphatases, Snowmass Village, Colorado, USA, 13. - 18. Juli 2008 (Vortrag).

X Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Antje Gohla für die Bereitstellung des interessanten Themas, die durchweg intensive Betreuung und die immerwährende Diskussionsbereitschaft zu allen Themen meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg danke ich für seine Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Elisabeth Jeanclos, Prashant Duraphe, Katja Pexa, Olga Felda und Oleg Fedorchenko für ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken. Frau Andrea Odersky danke ich für die hervorragende technische Unterstützung.

Auch bei allen nicht namentlich genannten Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit während und teilweise auch nach der Arbeit sowie die ständige Bereitschaft, sich in meine Problemstellungen einzudenken, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zudem meiner Familie, die mir immer zur Seite gestanden hat und von der ich in all meinen Vorhaben tatkräftig unterstützt wurde sowie Barbara für anregende Diskussionen und moralische Unterstützung.

XI Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Würzburg, Juli 2009

A handwritten signature in black ink that reads "Axel Hoffmann". The script is cursive and fluid.

Axel Hoffmann