
**Biochemische und biophysikalische
Charakterisierung der Regulation
und Aktinpolymerisation des
humanen Formins FHOD1**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie an der Universität Dortmund

vorgelegt von

André Schönichen

aus Jaderberg

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Mai 2003 bis Juni 2006 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody unter der Leitung von Dr. Matthias Geyer angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1	Das Aktinzytoskelett.....	3
2.1.1	G-Aktin-bindende Proteine.....	6
2.1.2	F-Aktin-verschließende Proteine.....	7
2.1.3	Aktinfilament-quervernetzende Proteine.....	8
2.1.4	Der Arp2/3-Komplex und WASP.....	8
2.1.5	Aktinnukleierung durch Spire.....	11
2.1.6	Rho-GTPasen und die Regulation des Zytoskeletts.....	11
2.1.7	Formine.....	15
2.1.8	Struktur der FH2-Domäne und vermuteter Mechanismus der Aktinnukleierung durch FH2-Domänen.....	16
2.1.9	Diaphanous-verwandte Formine.....	18
2.1.10	Zelluläre Funktionen der Formine.....	19
2.2	FHOD1.....	21
2.3	Zielsetzung.....	23
3.	Material und Methoden	24
3.1	Materialien.....	24
3.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	24
3.1.2	Chromatographiesäulen und Chromatographiematerialien.....	24
3.1.3	Fluoreszenzfarbstoffe.....	25
3.1.4	Nukleotide.....	25
3.1.5	Reagenziensätze.....	25
3.1.6	DNA-Konstrukte.....	25
3.1.7	Enzyme, Proteine und Antikörper.....	25
3.1.8	Geräte.....	26
3.1.9	Materialien für die eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie.....	27
3.1.10	Mikroorganismen und Zelllinien.....	28
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	29
3.2.1	Gerichtete Mutagenese.....	29
3.2.2	Agarosegelelektrophorese.....	30
3.2.3	Restriktionsverdau.....	30
3.2.4	Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen.....	30
3.2.5	Ligation.....	31

3.2.6	Transformation	31
3.2.7	Isolierung der Plasmid-DNA	31
3.2.8	DNA-Sequenzierung	32
3.2.9	Glyzerindauerkulturen	32
3.3	Proteinchemische Methoden	33
3.3.1	Proteinexpression und Zellernte	33
3.3.2	Zellaufschluss	33
3.3.3	Nickelaffinitätschromatographie	33
3.3.4	Glutathionaffinitätschromatographie	34
3.3.5	Präparative Gelfiltration	34
3.3.6	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
3.3.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
3.3.8	Konzentrierung der Proteine	37
3.3.9	Klonierung und Reinigung der FHOD1-Konstrukte	37
3.3.10	Nukleotidaustausch bei GTPasen	39
3.3.11	Baculovirusexpression von nativem FHOD1-Vollängenprotein	39
3.3.12	Reinigung von nativem FHOD1-Vollängenprotein	40
3.3.13	GST-Pull-down-Experimente	40
3.3.14	Westernblot	41
3.4	Zellbiologische Methoden	42
3.4.1	Kultivierung von NIH3T3-Zellen	42
3.4.2	Transfektion und Immunfluoreszenzmikroskopie	42
3.4.3	Untersuchung der Transkriptionsaktivierung vom SRE	42
3.5	Biophysikalische Methoden	43
3.5.1	Isothermale Titrationskalorimetrie	43
3.5.2	NMR-Spektroskopie	45
3.5.3	Massenspektrometrie	46
3.5.4	Analytische Größenausschlusschromatographie	47
3.5.5	Aktinpolymerisation	48
4.	Ergebnisse	49
4.1	Darstellung der FHOD1-Proteinkonstrukte und der Rho-GTPasen	49
4.2	Expression und Reinigung von nativem FHOD1-Vollängenprotein	52
4.3	Untersuchungen der Interaktion zwischen der autoregulatorischen DAD und ihrer FH3-Erkennungsdomäne in FHOD1	54
4.3.1	Identifizierung der FH3-Domäne und der minimalen Diaphanous-autoregulatorischen Domäne von FHOD1	56
4.3.2	Bestimmung der autoregulatorischen Motive in der DAD von FHOD1 in Säugetierzellen	57

4.3.3	Untersuchung der DAD-Konsensusmotive von FHOD1 in vitro.....	61
4.3.4	Molekulare Dispersion des FH3:DAD-Komplexes	64
4.3.5	Kartierung der FH3-bindenden Region innerhalb der DAD mittels NMR-Spektroskopie	66
4.4	Untersuchungen zur Interaktion von FHOD1 mit der GTPase Rac1	69
4.5	Einfluss von FHOD1 auf die Aktinpolymerisation	73
5.	Biophysikalische und strukturelle Charakterisierung der CyclinT1-bindenden Domäne von Hexim1	76
5.1	Regulation der Transkription durch P-TEFb und Hexim1	76
5.2	Ergebnisse	78
5.2.1	Darstellung der CyclinT1 und Hexim1-Fragmente.....	78
5.2.2	Die CyclinT1-bindende Domäne von Hexim1 besitzt eine parallele zweigeteilte <i>coiled-coil</i> -Struktur mit einer vorausgehenden Helix.....	79
5.2.3	Bestimmung der CyclinT1-Bindungsoberfläche in der Hexim1-TBD durch NMR-Titrationsexperimente	86
5.2.4	Charakterisierung der Interaktion von Hexim1 und CyclinT1 mit isothermaler Titrationskalorimetrie	88
5.2.5	Molekulare Dispersion des Hexim1:CyclinT1-Komplexes	90
5.2.6	Untersuchung der Stöchiometrie des Hexim1:CyclinT1-Komplexes mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	91
5.2.7	Untersuchung der Hexim1-Interaktionsstelle auf CyclinT1	92
6.	Diskussion	94
6.1	Biochemische Charakterisierung von FHOD1	94
6.1.1	Einfluss der DAD-Konsensusmotive auf den Mechanismus der Regulation in FHOD1.....	94
6.1.2	Analyse der Bindung von Rac1 an FHOD1	97
6.1.3	Einfluss von FHOD1 auf die Aktinpolymerisation	99
6.2	Diskussion zur strukturellen Untersuchung der Hexim1-TBD und der Interaktion von Hexim1-TBD und CyclinT1	102
7.	Anhang.....	104
8.	Literaturverzeichnis	107

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (10^{-10} m)
ABD	Aktin-bindende Domäne (<i>actin binding domain</i>)
ADF	Aktindepolymerisationsfaktor (<i>actin depolymerizing factor</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
Arp	Aktin-verwandtes Protein (<i>actin related protein</i>)
ARPC	Arp-Komplex (<i>actin related protein complex</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bni1p	An der Knospungseinschnürung beteiligtes Protein 1 (<i>bud neck involved protein 1</i>)
Brca1	Brustkrebs-assoziiertes Gen1 (<i>breast cancer-associated gene 1</i>)
Brd4	Bromodomänenprotein 4
CD21	Protein der Differenzierungsgruppe 21 (<i>cluster of differentiation protein 21</i>)
Cdc42	Zellteilungszyklusprotein 42 (<i>cell division cycle protein 42</i>)
Cdk9	Zyclin-abhängige Kinase 9 (<i>cyclin dependent kinase 9</i>)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (<i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
C-Terminus	Carboxyterminus der Proteinprimärsequenz
Da	Dalton
DAAM	<i>dishevelled-associated activator of morphogenesis</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DRB	5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazolribosid
Drf	Diaphanous-verwandtes Formin (<i>diaphanous related formin</i>)
DSIF	DRB-Sensitivitäts-induzierender Faktor (<i>DRB sensitivity inducing factor</i>)
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetra-acetic acid</i>)
ERK	Durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase (<i>extracellular signal regulated kinase</i>)
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FBS	fötale Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FH	Forminhomologie
FHOD	Forminhomologie-2-domäne enthaltenes Protein (<i>formin homology 2 domain containing protein</i>)
FPLC	schnelle Flüssigchromatographie für Proteine (<i>fast protein liquid chromatography</i>)
g	Gramm (als Einheit), Erdbeschleunigung (als Größe)
GDP	Guanosindiphosphat

GppNHp	Guanylyl 5'-imidodiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
Hexim1	HMBA-induzierbares Protein 1 (<i>HMBA inducible protein 1</i>)
HMBA	Hexamethylen-Bisacrylamid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSQC	Heteronukleare Einquantenkohärenz (<i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
IAEDANS	Iod-acetylaminoethylaminnaphtalen-1-sulfonsäure
IPTG	Isopropyl-1-Thio-D-Galactopyranosid
IRAP	Aminopeptidase, die auf Insulin antwortet (<i>insulin responsive aminopeptidase</i>)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LIM	Akronym für die Genprodukte Lin-11, Isl-1 und Mec-3
LMW	Marker für Moleküle mit kleinem Molekulargewicht (<i>low molecular weight marker</i>)
LPA	Lysophosphatidsäure (<i>lysophosphatidic acid</i>)
mDia1	Diaphanous aus Säugetieren (<i>mammalian Diaphanous 1</i>)
MAL	Megakaryoblastische Leukämie (<i>megakaryoblastic leukemia</i>)
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein (<i>mitogen activated protein</i>)
MHC	schwere Myosinkette (<i>myosin heavy chain</i>)
ml	Milliliter
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
M	molar
μM	mikromolar
MLC	leichte Myosinkette (<i>myosin light chain</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
nM	nanomolar
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (<i>nuclear Overhauser effect</i>)
N-Terminus	Aminoterminus der Proteinprimärsequenz
N-WASP	neurales WASP (<i>neural WASP</i>)
NELF	negativer Elongationsfaktor b (<i>negative elongation factor b</i>)
NOE	Nuklearer Overhauser Effekt
NOESY	Kern-Overhauser-Effektspektroskopie (<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)
NTA	Nickel-Nitrilo-tri-essigsäure
P-TEFb	positiver Elongationsfaktor b (<i>positive elongation factor b</i>)

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	p21-aktivierte Kinase A (<i>p21 activated kinase A</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS mit Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Proteindatenbank (<i>protein data bank</i>)
PDGF	Wachstumsfaktor, gewonnen aus Blutplättchen (<i>platelet derived growth factor</i>)
PGKI	cGMP abhängige Proteinkinase I (<i>cGMP dependent protein kinase I</i>)
PI	Phosphoinositol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	tausendstel Teilchen (<i>parts per million</i>)
Rac	Ras verwandtes C3-Botulinumtoxinsubstrat (<i>ras related C3 botulinum toxin substrate</i>)
r.m.s	Wurzel des mittleren Abstandsquadrats (<i>root mean square</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROCK	Rho-assoziierte Coiled-Coil-Kinase (<i>rho associated coiled coil kinase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
s	Sekunden
SCAR	Unterdrücker des cAMP-Rezeptors (<i>suppressor of cAMP receptor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfat</i>)
SH	SRC-Homologiedomäne (<i>SRC homology domain</i>)
SMART	Internetwerkzeug zur Analyse der Domänenarchitektur eines Proteins
snRNA	kleine nukleare RNA (<i>small nuclear RNA</i>)
SRC	Steroidrezeptor-Koaktivator (<i>steroid receptor co-activator</i>)
SRE	Element, das auf Serum reagiert (<i>serum response element</i>)
SRF	Faktor, der auf Serum reagiert (<i>serum response factor</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCEP	Tris-(2-Carboxyethyl)-Phosphinhydrochlorid
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoro acetic acid</i>)
TMR	Tetramethylrhodamin
TOCSY	Totale Korrelationsspektroskopie (<i>total correlation spectroscopy</i>)
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Enzymeinheit (1 Unit ist definiert als die Menge an Enzym, die nötig ist, um 1 µmol Substrat pro Minute umzusetzen)
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WAVE	WASP-Familie-Verprolin-Homologieprotein
WH	WASP-Homologiedomäne
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

1. Zusammenfassung

Formine nehmen eine bedeutende Rolle bei dem Auf- und Abbau des Aktinzytoskelettes ein. Dabei binden sie über ihre Formin-Homologie 2- (FH2-) Domäne direkt an Aktin und katalysieren die Aktinfilamentbildung am stumpfen Ende. Diaphanous-autoregulierende Formine sind Effektoren der Rho-GTPasen und werden so durch äußere Signale zur Nukleierung der Aktinpolymerisation aktiviert. Ein Mitglied dieser Proteinfamilie ist das humane FHOD1-Protein, dessen genaue Funktion und Aufgabe bei der Formierung des Aktinzytoskeletts noch weitgehend unerforscht ist. Zum Verständnis der molekularen Eigenschaften dieses ubiquitär exprimierten Formins sind die autoregulatorischen Motive und der Mechanismus der Aufhebung des autoinhibierten Zustandes sowie der Mechanismus der Nukleierung der Aktinpolymerisation von großem Interesse.

Diese Studie fokussierte auf die Charakterisierung der biochemischen Aspekte bei FHOD1. Für die Analyse *in vitro* gelang es zunächst, verschiedene Fragmente von FHOD1 rekombinant aus *E.coli* herzustellen. Mit Hilfe eines GST-Pulldown-Experiments und Westernblot-Analysen mit fünf unterschiedlich langen C-terminalen FHOD1-Fragmenten wurde zunächst gefunden, dass die C-terminalen 61 Aminosäuren (1104-1164) für die Interaktion mit der N-terminalen FH3-Domäne (1-377) und damit der Autoinhibition ausreichend sind. In einem nächsten Schritt wurden die drei DAD-Konsensusmotive mutiert und der Effekt *in vivo* durch Betrachten des Phänotyps und der Transkriptionstransaktivierung mittels eines Luziferase-Experiments analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass das erste hydrophobe Konsensusmotiv, das sich direkt C-terminal von der FH2-Domäne an Position 1053 befindet, auf die Autoinhibition keinen Einfluss hat. Vielmehr zeigte die Mutation des zweiten hydrophoben (Position 1108) sowie des basischen Motivs (Position 1126) innerhalb der letzten 61 Aminosäuren die Bildung von Aktinstressfasern. Besonders deutlich war dieses Ergebnis bei gleichzeitiger Mutation beider Motive. Die Stimulation der Transkription vom SRE hingegen war weniger deutlich, was auf einen möglichen schrittweisen Aktivierungsmechanismus hindeutet. Bei der Untersuchung der Bindung an FHOD1-(1-377) und DAD-Fragmenten mit der Wildtypsequenz und den Mutationen mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) kam heraus, dass die letzten 61 Aminosäuren mit einer Dissoziationskonstanten von 1,4 μM bindet und sowohl das hydrophobe als auch das basische Motiv allein noch den FHOD1-N-Terminus (1-377) im unteren mikromolaren Bereich bindet. Nur eine Doppelmutante mit der Mutation beider Motive zeigte keine Interaktion mit dem N-Terminus.

Mittels analytischer Gelfiltration wurde die molekulare Dispersion der FHOD1-FH3-Domäne (1-377) und des Komplexes aus der FH3-Domäne mit dem DAD-Fragment (1104-1164) untersucht. Ein erstes Ergebnis war hier, dass die FH3-Domäne in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt, das sich durch reduzierende Bedingungen der monomere Anteil erhöhen lässt, so dass vermutet wird, dass die Dimerisierung über Disulfidbrückenbildung erfolgt. Ferner vergrößert die Interaktion mit der DAD das Volumen der FH3-DAD-Domäne nur geringfügig. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die DAD als unstrukturiertes Peptid auf der FH3-Domäne bindet, bzw. in eine konkave Bindungsoberfläche hineinfaltet.

Untersuchungen mit zweidimensionaler, heteronuklearer NMR-Spektroskopie zeigten schließlich, dass die DAD ein zum größten Teil unstrukturiertes Polypeptid ist, mit einem geringen α -helikalen Anteil. Durch Titration der FH3-Domäne zu der ^{15}N -markierten DAD konnte die Bindungsregion weiter eingegrenzt werden, da bei Bindung nicht alle Resonanzsignale verschwanden. Diese Studie zeigte, dass sich die interagierende Region der DAD von Position 1106 bis 1144 erstreckt und damit das hydrophobe sowie das basische Konsensusmotiv enthält.

Zur Untersuchung der Aktivierung von FHOD1 durch eine kleine GTPase *in vitro* wurde die Bindung von Rac1 in der Triphosphatform mit den FHOD1-Fragmenten (1-377) oder (411-573) zunächst mittels isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht. Dabei konnte für keines dieser Fragmente eine eindeutige Interaktion gemessen werden. Eine weitere Untersuchung durch analytischer Gelfiltration bei der C-terminal verkürztes Rac1 (1-184) sowohl in der Di- als auch in der Triphosphatform verwendet wurde, ergab, dass es nicht an das FHOD1-Fragment (411-573) bindet, jedoch mit dem N-Terminus (1-377) Oligomere bildet, was auf eine potentielle Interaktion hindeutet.

In einem Aktinpolymerisationsexperiment wurde rekombinant aus *E.coli* gereinigte FH2-Domäne (614-1096) sowie aus dem eukaryotischen Baculovirusexpressionssystem gereinigtes natives FHOD1-Vollängenprotein untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass die FH2-Domäne und das Vollängenprotein die Aktinpolymerisation nicht nukleieren, sondern vielmehr inhibieren und sich ähnlich wie *capping*-Proteine verhalten. Damit wurde gezeigt, dass das FHOD1-Fragment (614-1096) und autoinhibiertes FHOD1 Aktin binden können. In letzteren Fall konnte auch bei Zugabe der drei GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 bzw. eines DAD-Peptids keine Aufhebung der Polymerisationsinhibition erreicht werden. Dieser Befund deutet auf die Notwendigkeit eines weiteren Kofaktors zur Nukleierung der Aktinpolymerisation hin.

Ein zweites Projekt beschäftigte sich mit dem Transkriptioninhibitor Hexim1, der die Transkriptionselongation durch den P-TEFb-Komplex (bestehend aus der Kinase Cdk9 und dem Zyklinprotein CyclinT1) hemmt. Es konnte hier die C-terminale CyclinT1-bindende Domäne von Hexim1 (255-359) rekombinant dargestellt und uniform heteronuklear mit stabilen Isotopen markiert werden. In Kooperation mit Dr. Sonja Dames vom Biozentrum wurde die Struktur dieser Domäne aufgeklärt, die eine dimere zweigeteilte *coiled-coil*-Struktur besitzt. Dabei ist das C-terminale zweite *coiled-coil*-Segment 319-348 ein nahezu ideales, stabiles *coiled-coil*, während das erste Segment (284-313) Abweichungen von der idealen Konsensussequenz eines parallelen *coiled-coils* aufweist und flexibler ist. Die beiden Segmente sind durch einen sieben Aminosäure-langen *Linker* unterbrochen. N-terminal des ersten *coiled-coil*-Segments befindet sich eine weitere Helix (276-281), die durch drei Aminosäuren mit dem ersten *coiled-coil*-Segment verbunden ist. Durch NMR-Titrationsexperimente von ^{15}N -markiertem Hexim1 mit unmarkiertem CyclinT1 (1-292)-Molekül konnte die Bindungsregion für CyclinT1 bestimmt werden. Diese befindet sich auf dem ersten *coiled-coil*-Segment sowie auf der vorausgehenden Helix und stimmt gut mit dem Bereich höchster Konservierung überein. ITC-Bindungsstudien, analytische Gelfiltration und Fluoreszenzexperimente mit verschiedenen Hexim1-Fragmenten und CyclinT1 (1-272) zeigten, dass ein CyclinT1 (1-272) ein Hexim1-Dimer bindet.

2. Einleitung

Bei der Betrachtung verschiedener tierischer Zellen fällt auf, dass sie sich in Abhängigkeit ihrer Funktion stark in der Form unterscheiden. Rote Blutkörperchen besitzen beispielsweise eine kompakte, abgeflachte Form, damit sie durch kleinste Blutkapillaren gelangen. Nervenzellen hingegen sind untereinander kompliziert verzweigt und weisen zahlreiche Dendriten und ein bis zu mehrere Meter langes Axon auf. Viele Zellen können zudem dynamisch auf Veränderungen ihrer Umgebung reagieren und die Beweglichkeit, Wanderung, Adhäsion, Polarität oder interzellulären Kontakte modifizieren. Diese Eigenschaften werden durch das Zytoskelett ermöglicht, das aus drei miteinander verbundenen Netzwerken besteht, den Aktinmikrofilamenten, Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten. Alle drei bilden das Zellgerüst und können jederzeit je nach äußeren Signalen auf- und abgebaut werden.

Der Auf- und Abbau des Aktinmikrofilamentes wird in Zellen durch Arp2/3-Komplexe und der erst kürzlich entdeckten Familie der Forminproteine katalysiert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der biochemischen Charakterisierung des humanen Forminhomologie-2-domäne enthaltenen Proteins 1, FHOD1 (*formin homology domain 2 containing protein 1*), einem Mitglied der Unterklasse der Diaphanous-verwandten Formine (*Diaphanous related formins*, Drfs). Im Folgenden wird zunächst auf das Aktinzytoskelett, dessen Regulation und die Mechanismen des Aktinfilamentauf- und abbaus in der Zelle sowie die Familie der Formine eingegangen.

2.1 Das Aktinzytoskelett

Aktin wurde erstmals in einem Kaninchenmuskelgewebeextrakt entdeckt und daraus isoliert (Straub, 1942). Die Komponenten des Aktinzytoskeletts sind evolutionär gesehen früh entstanden und in jeder eukaryotischen Zelle Hauptbestandteil, im Muskel ist der Anteil an Aktin und Myosin sogar größer als 60% des Gesamtproteingehalts. Aktin existiert in zwei Zuständen, in einer globulären und einer filamentösen Form. Das globuläre Aktinmonomer (G-Aktin) ist ein Polypeptid mit 375 Aminosäureresten, es hat ein Molekulargewicht von 42 kDa und weist eine kompakte Struktur mit den Maßen $5,5 \times 5,5 \times 3,5 \text{ nm}^3$ auf (siehe Abbildung 1).

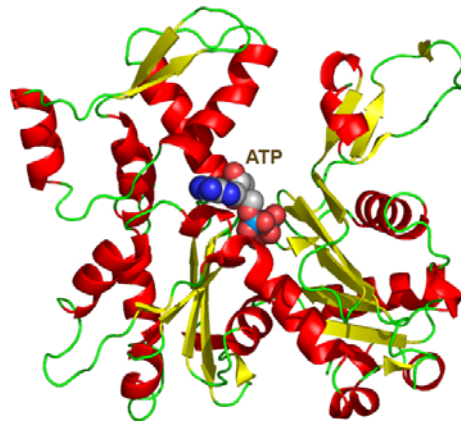


Abbildung 1: Atomare Struktur von Aktin: Das Bändermodell zeigt die Faltung des Polypeptids und die Bindungsstelle des Mg-ATP. ATP ist in einer Spalte zwischen zwei Lappen des Proteins verborgen, wo ATP großflächige Kontakte ausübt. Das stumpfe Ende des Aktinproteins befindet sich in dieser Darstellung unten, die ATP-Bindungsstelle ist vom spitzen Ende her zugänglich. PDB-Datei: 1ATN (Kabsch and Holmes, 1990)

Aktin besitzt zwei Domänen ähnlicher Faltung, die über viele Spezies hochkonserviert sind und durch ein Adeninukleotid stabilisiert werden, das zwischen ihnen liegt (Kabsch et al., 1990). Dabei bindet Aktin Adenosindiphosphat (ADP) oder Adenosintriphosphat (ATP) und ein zweiwertiges Kation (Mejean et al., 1988; Straub and Feuer, 1950).

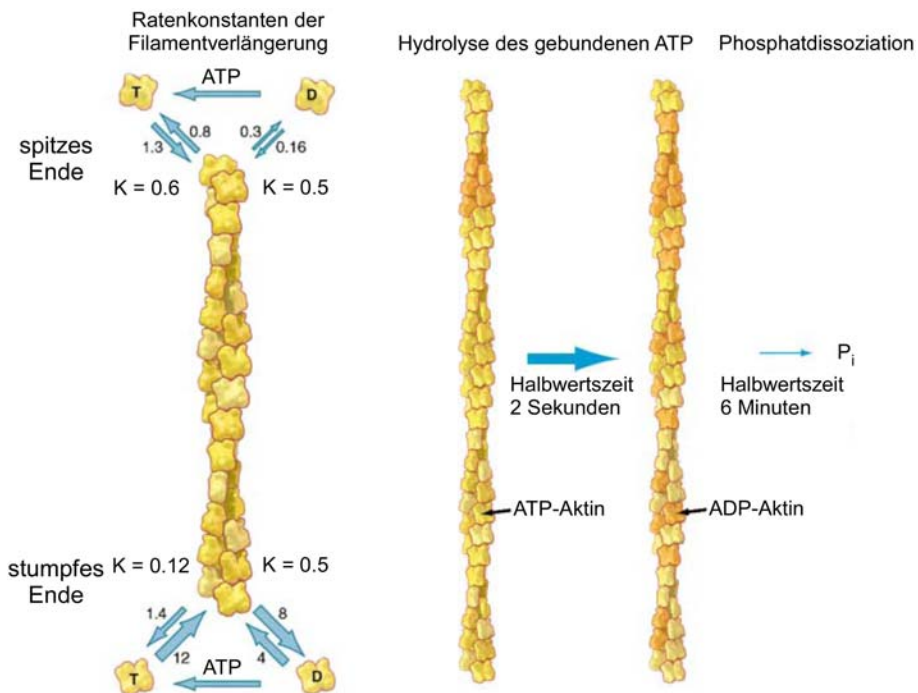


Abbildung 2: Aktinfilamentverlängerung, ATP-Hydrolyse und Phosphatdissoziation. Die Ratenkonstanten der Assoziation haben die Einheit $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, die Dissoziationsratenkonstanten besitzen die Einheit s^{-1} . Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K mit der Einheit μM ergibt sich aus dem Verhältnis der Ratenkonstante der Dissoziation zu der der Assoziation. Die Gleichgewichtskonstanten für ATP-Aktin unterscheiden sich an den beiden Filamentenden, was zu konstanten Filamentlänge führt, da die neu angefügten Aktinmonomere durch das Filament bis zum spitzen Ende wandern, wo sie sich wieder ablösen. Die Hydrolyse des ATPs ist schnell, wohingegen die Dissoziation des Phosphats langsam vonstatten geht. (Pollard and Borisy, 2003).

Aktin hat eine höhere Affinität zu ATP als zu ADP, so dass unpolymerisiertes Aktin bei einer höheren Konzentration an ATP immer mit ATP gesättigt ist (Engel et al., 1977; Gershman et al., 1994; Selden et al., 1986). Unter diesen physiologischen Bedingungen lagern sich die G-Aktinmonomere zusammen (Laki et al., 1950), so dass polare Aktinfilamente entstehen, lineare unverzweigte Polymere mit einem Durchmesser von 5-7 nm. Die Enden dieser Polymere werden traditionell als spitzes und stumpfes Ende unterschieden, da elektronenmikroskopische Aufnahmen eine pfeilförmige Struktur zeigen, wenn Aktin im Komplex mit dem Motorprotein Myosin vorliegt (Holmes et al., 1982; Ishikawa et al., 1969). Das spitze Ende wird auch als Minus-Ende, das stumpfe Ende als Plus-Ende bezeichnet, da sie jeweils langsamer bzw. schneller wachsen (Pollard and Mooseker, 1981). Die Ursache liegt in einer geringeren Affinität für Mg-ATP-Aktinmonomere am spitzen Ende ($K_d = 0.6 \mu\text{M}$) als am stumpfen Ende ($K_d = 0.1 \mu\text{M}$), während die kritische Konzentration für Mg-ADP-Aktin an beiden Enden gleich ist ($0.5 \mu\text{M}$) (Pollard, 1986). Nach Aufnahme eines G-Aktinmonomers in F-Aktin hydrolysiert das gebundene ATP irreversibel zu ADP und Phosphat und letzteres dissoziiert langsam, was in einem Filament mit einem Kernbereich mit fest gebundenem ADP resultiert (siehe Abbildung 2).

An den Enden dagegen wird das Nukleotid ständig gegen ATP aus dem Medium ausgetauscht. Da die Phosphat-Konzentration lokal sehr hoch ist, bleibt es an einigen Untereinheiten des F-Aktins gebunden, so dass diese ADP und anorganisches Phosphat gebunden haben. Dies ist für die Affinität regulatorischer Proteine von F-Aktin wichtig (Pollard et al., 2000).

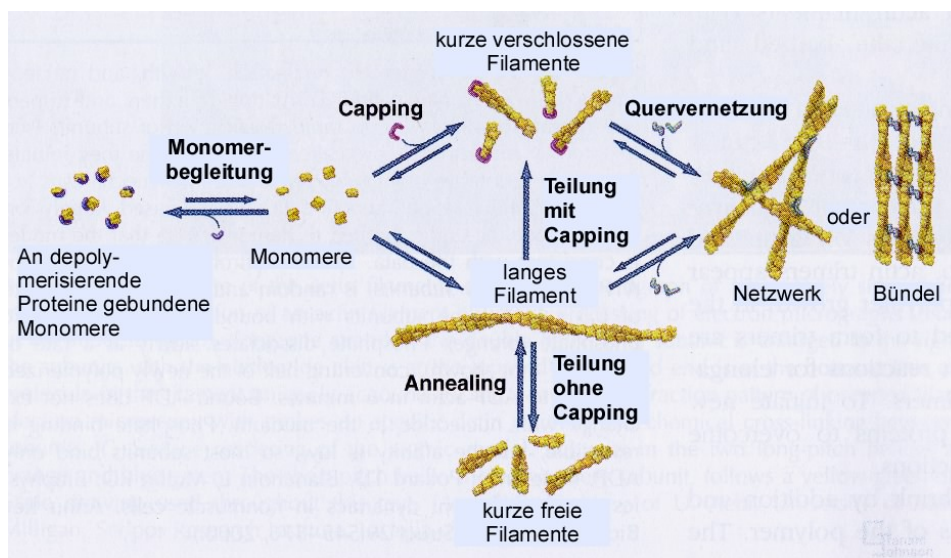


Abbildung 3: Verschiedene Zustände des Aktinfilaments und Familien Aktin-bindender Proteine. Monomer-bindende Proteine bevorzugen entweder ATP-Aktin (Profilin and β -Thymosin) oder ADP-Aktin (ADF/cofilin). *capping*-Proteine binden entweder an das stumpfe (*capping*-Protein, Gelsolin) oder spitze Ende (Tropomodulin, Arp2/3-Komplex) von Aktinfilamenten. Einige Filament-teilende Proteine verschließen die Enden (Gelsolin, Fragmin), während andere dies nicht tun (ADF/cofilin). Quervernetzende Proteine können Netzwerke oder Bündel formieren. Nach Pollard und Earnshaw, Cell Biology, Saunders 2002.

Obwohl die ATP-G-Aktin-Konzentration in Nichtmuskelzellen weit oberhalb (100 μM) der Dissoziationskonstanten ist, liegt Aktin in Zellen in globulärer Form vor (Bray and Thomas, 1975; Rosenblatt et al., 1995). Dies deutet darauf hin, dass die freie G-Aktinkonzentration durch G-Aktin-bindende Proteine verändert wird, um die Polymerisation von F-Aktin zu organisieren. Die Zahl der Aktin-bindenden Proteine ist groß und kann grob in Familien unterteilt werden, die Monomere binden, Filamente teilen, Filamentenden verschließen (*capping*-Proteine), Filamente quervernetzen, Filamente stabilisieren oder sich an Filamenten bewegen (siehe Abbildung 3). Im Folgenden werden die verschiedenen Familien der Aktinzytoskelett-regulierenden Proteine vorgestellt.

2.1.1 G-Aktin-bindende Proteine

Aktinmonomer-bindende Proteine arbeiten zusammen, um die Gruppe der freien Aktinmonomere und den Nukleotidaustausch zu kontrollieren. Zu nennen sind hier vor allem β -Thymosine, die ADF/cofilin Familie und Profiline. β -Thymosin ist ein 5 kDa Peptid, das vorwiegend ATP-G-Aktin bindet und sowohl den Nukleotidaustausch als auch Aktinpolymerisation hemmt (Nachmias, 1993; Safer et al., 1990a). Bei ADF/cofilinen handelt es sich um Aktindepolymerisationsfaktoren, die ADP-G-Aktine stärker binden, den Nukleotidaustausch inhibieren und ADP-F-Aktin destabilisieren (Moon and Drubin, 1995).

Profiline sind kleine zytosolische Proteine mit einem Molekulargewicht von 15 kDa (Nystrom et al., 1979). Es wurden drei Profiline identifiziert, Profilin I, II und III, wobei Profilin I und II zu 65% identisch sind, während Profilin III mit 37% und 42% Identität zu Profilin I bzw. II weniger ähnlich ist (Witke, 2004). Profiline können mit G-Aktinen 1:1-Komplexe bilden und diese so dem Polymerisationsgleichgewicht entziehen (Carlsson et al., 1977), was zur Depolymerisation führt. Dieser Effekt ist jedoch gering, da nicht ausreichend Profilin in Zellen vorhanden ist und diese Aufgabe vermutlich das reichlich vorhandene β -Thymosin hat (Safer et al., 1990b). Vielmehr fördert Profilin die Bildung von Aktinfilamenten durch zwei Mechanismen: Zum einen unterstützt es den Nukleotidaustausch, in dem es die Affinität für das Nukleotid 1000-fach verringert. Wegen des Überschusses an ATP werden die ADP-Aktinmonomere mit ATP beladen (Goldschmidt-Clermont et al., 1991; Goldschmidt-Clermont et al., 1992). Die Komplexstruktur von Profilin-Aktin zeigt, dass Profilin an das schneller wachsende stumpfe Ende gebunden ist und damit die Nukleotidbindungstasche zugänglich ist (Schutt et al., 1993), während der Austausch in Komplexen mit anderen Aktin-bindenden Proteinen verhindert wird. Der zweite Mechanismus kann ebenfalls mit der Komplexstruktur erklärt werden und beruht auf der Verringerung der kritischen Konzentration an ATP-Aktin (Pantaloni and Carlier, 1993). Da das spitze Ende frei zugänglich ist, kann sich der Komplex mit dem stumpfen Ende des Filaments verbinden. Filamente können so auf zwei Wegen entstehen: Durch direkte Assoziation von ATP-Aktin oder durch ATP-Aktin-Profilin-Anlagerung und anschließender Dissoziation von Profilin. Bei geringer Profilinkonzentration wird F-Aktin abgebaut, bei hoher Konzentration an Profilin findet Polymerisation am stumpfen Ende statt (Pring et al., 1992;

Tilney et al., 1983). Überdies interagiert Profilin mit Signaltransduktionswegen. Es wurde gezeigt, dass es das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) bindet, aber Aktin und PIP₂ nicht gleichzeitig binden können (Lassing and Lindberg, 1985). Profilin ist dafür bekannt, an Prolinreiche Peptidsequenzen zu binden (Tanaka and Shibata, 1985), wie sie z.B. im Vasodilatatorstimulierten Phosphoprotein (VASP) (Kang et al., 1997), im Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP) (Lu and Pollard, 2001) oder in Formin-homologie- (FH1-) Domänen von Forminen (siehe Kapitel 2.1.7) vorkommen (Frazier and Field, 1997; Wasserman, 1998).

2.1.2 F-Aktin-verschließende Proteine

Diese so genannten *capping*-Proteine binden entweder an das stumpfe oder an das spitze Ende bestehender Aktinfilamente und blockieren eine Anlagerung von weiteren Aktinuntereinheiten an diesen Enden. Am spitzen Ende versperren Proteine wie DNase 1 (Podolski and Steck, 1988), Tropomodulin (Weber et al., 1994) und der Arp2/3 Komplex (Mullins et al., 1998), auf den später näher eingegangen werden soll, eine Filamentverlängerung.

Bei den am stumpfen Ende bindenden *capping*-Proteine werden zwei Klassen unterschieden: Klasse I-Proteine verschließen Filamentenden und spalten es, während Klasse II-Proteine Filamente nicht spalten können. In Tabelle I sind Vertreter beider Klassen aufgelistet:

Tabelle I: Liste der *capping*-Proteine am stumpfen Aktinfilamentende (Weeds and Maciver, 1993)

Protein	MW / kDa	Filament-fragmentierung	Hauptvorkommen
Klasse I			
Gelsolin	83	+	in den meisten Geweben, Blutplasma
Villin	92	+	Microvilli des Darms
Severin	40	+	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Fragmin	42	+	<i>Physarum polycephalum</i>
Adservin	74	+	Nebennierenmark
Scinderin	80	+	chromaffine Zellen
Klasse II			
CapZ	35 + 32	-	<i>Dictyostelium discoideum</i> Muskel, Hefe
AginAktin	70	-	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Radixin	69	-	Leber (<i>adherens junction</i>)
Insertin	39	-	glatter Muskel

2.1.3 Aktinfilament-quervernetzende Proteine

Proteine, die Aktinfilamente vernetzen, besitzen homologe Aktin-bindende Domänen (ABD). Die Quervernetzung erfordert mindestens zwei Aktin-bindende Stellen. Diese können auf einem Polypeptid liegen, durch Dimerisierung von Untereinheiten mit jeweils einer Domäne entstehen oder von einer zweiten Aktin-bindenden Stelle innerhalb des Proteins herrühren. Dabei werden drei Klassen von F-Aktin-quervernetzenden Proteinen unterschieden (Drenckhahn et al., 1991): Die Klasse I-quervernetzende Proteine sind Tandemproteine mit zwei aufeinander folgenden ABDs, wie dies bei Fimbrin der Fall ist. Zur Klasse II gehören Aktinin und Spectrin, die durch eine N-terminale ABD, eine variable, α -helikale Zwischendomäne, eine C-terminale Calmodulin-ähnliche Calcium-bindende Domäne sowie antiparallele Dimerisierung gekennzeichnet ist. Klasse III-Proteine kennzeichnen sich durch eine N-terminale ABD, die durch Wiederholungen von β -Faltblättern von einer C-terminalen Dimerisierungs- bzw. Membranverankerungsdomäne getrennt ist (Matsudaira, 1991).

Der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt bei der Filamentpolymerisation ist die Nukleierung (Keimbildung). Derzeit sind drei Aktinnukleatoren bekannt, die sich mechanistisch unterscheiden: Der Arp2/3-Komplex, Spire und Formin-homologieproteine (Mullins et al., 1997; Pruyne et al., 2002b; Quinlan et al., 2005; Sagot et al., 2002b; Welch et al., 1997).

2.1.4 Der Arp2/3-Komplex und WASP

Erstmals wurde der Arp2/3-Komplex aus *Acanthamoeba* isoliert. Er besteht aus sieben eng miteinander verbundenen Untereinheiten, den Aktin-verwandten Proteinen 2 und 3 (Arp2/3), einem 40 kDa Protein, das ein WD-40 β -Propellerprotein ist (ARPC1), und vier weiteren Untereinheiten (ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5) (Machesky et al., 1994). Der Arp2/3-Komplex führt Verzweigungen in das Aktinnetzwerk ein, indem es an das spitze Ende eines neuen Aktinfilamentes bindet, dieses in einem 70°-Winkel an ein vorhandenes Filament verankert und dabei am Verzweigungspunkt bleibt (Blanchoin et al., 2000; Kelleher et al., 1995; Mullins et al., 1998). Somit ist es ein Faktor, der eine Aktin-Nukleierung in Richtung des stumpfen Endes bewirkt. Die kleine Rho-GTPase Cdc42 (siehe Kapitel 2.1.6) ist in der Lage Arp2/3 zu aktivieren (Ma et al., 1998). Dies geschieht über das Adapterprotein WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein) und die verwandten Proteine WAVE (Wiskott-Aldrich-Verprolin-Homologieprotein) und Scar (*Suppressor of cAMP receptor*) oder dem Gehirnhomologen N-WASP (Machesky et al., 1999; Machesky and Insall, 1998). WASP-Familienproteine sind Multidomänenproteine mit einer Länge von etwa 500 Aminosäuren, die eine gemeinsame Domänenorganisation haben (siehe Abbildung 4).



Abbildung 4: Schema der molekularen Domänenorganisation bei WASP-Familieproteinen. Schwarz: WH1-Domäne: WASP-Homologiedomäne 1, blau: GBD: GTPase-bindene Domäne, gelb: Polyprolinregion, grün: V: Verprolin-domäne (auch WH2-Domäne), C: zentrale Domäne, rot: A: saure Domäne, N, C: N- bzw. C-Terminus.

Besonders für WASP sind vor allem drei Regionen am C-Terminus: die V- (Verprolin) oder WH2- (WASP-Homologie 2-Domäne), die zentrale C- (*central*) Domäne, sowie die saure A- (*acidic*) Domäne, die in der VCA-Domäne zusammengefasst sind (Higgs et al., 1999). Diese ist notwendig und hinreichend für eine Arp2/3-abhängige Aktinnukleierung *in vitro*. Dabei binden die V-Regionen Aktinmonomere (Miki and Takenawa, 1998), die A-Region Arp2/3-Komplexe (Machesky and Insall, 1998). Dies trifft auch auf die C-Region zu, die entscheidende Strukturänderungen am Arp2/3-Komplex induziert und die Aktinnukleierung initiiert (Panchal et al., 2003). Dabei nimmt die VCA-Domäne erst bei Bindung von Aktinmonomeren oder Arp2/3 Struktur an und liegt sonst unstrukturiert vor (Marchand et al., 2001; Panchal et al., 2003). Durch intramolekulare Bindung der C-Domäne an die GTPase-Bindungsdomäne ist WASP/N-WASP autoinhibiert. Eine Interaktion mit aktiven, d.h. GTP-beladenem Cdc42 und PIP₂ oder Polyprolin-bindenden Proteinen mit SH3-Domänen hebt diese Autoinhibition auf (Higgs and Pollard, 2000; Kim et al., 2000; Rohatgi et al., 2000). Die Polyprolin-domäne befindet sich N-terminal neben der VCA-Domäne. Ein sekundärer Aktivator für Aktinnukleierung sind Aktinfilamente (Higgs et al., 1999), so dass die Polymerisation autokatalytisch ist (Blanchoin et al., 2000).

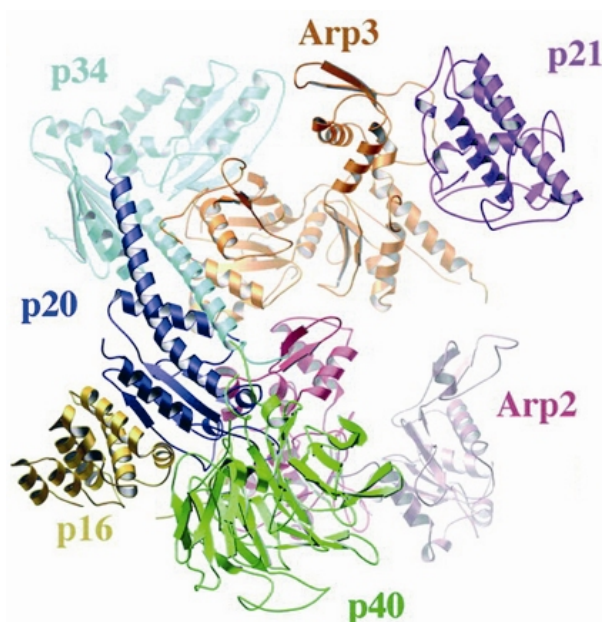


Abbildung 5: Bändermodell der Kristallstruktur des bovinen Arp2/3-Komplexes. In der inaktiven Struktur aus dem Kristall sind die beiden Aktin-verwandten Proteine, Arp2 und Arp3, zu weit entfernt voneinander, um neue Filamente zu nukleieren. Es ist zu erkennen, dass ARPC2 (p34) und ARPC4 (p20) sich im Zentrum des Komplexes befinden, und ARPC1 (p40), ARPC3 (p16) und ARPC5 (p21) sich in der Peripherie des Komplexes befinden. (Robinson et al., 2001).

Die in Abbildung 5 dargestellte Kristallstruktur des inaktiven Arp2/3-Komplexes zeigt, dass die p34 ARPC2- und p20 ARPC4-Untereinheiten den Kern des Komplexes bilden, an denen die p40- β -Propeller ARPC1 und die zwei α -helikalen p16 ARPC3 und p21 ARPC5-Untereinheiten und Arp2 und Arp3 verankert sind (Robinson et al., 2001). Der Komplex ist hier in seiner inaktiven Form kristallisiert worden, in der beide Arps zu weit vom Aktinfilament entfernt sind. Bindet WASP an Arp2/3, ändert sich die Struktur und der Komplex mit dem Aktinfilament wird stabilisiert (Marchand et al., 2001) und die Nukleierung eines neuen Aktinzweiges kann beginnen.

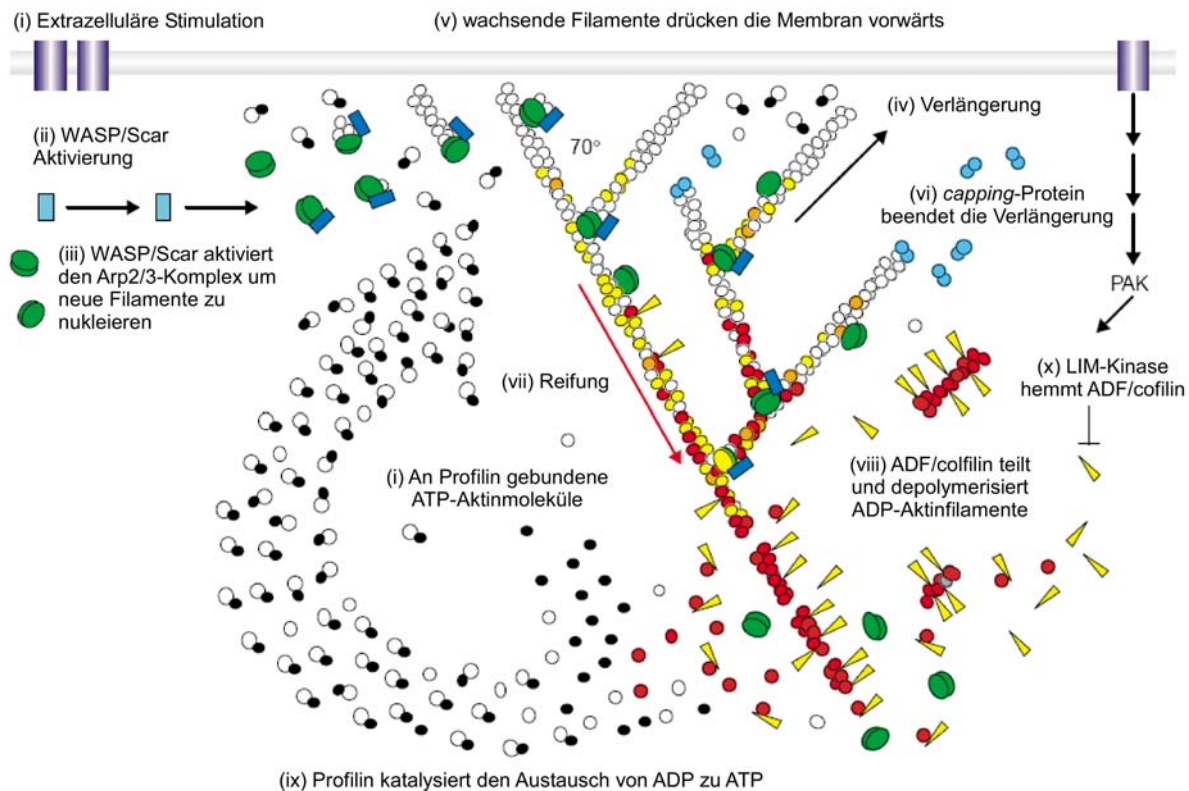


Abbildung 6: Verzweigte Nukleierung des Aktinfilaments durch den Arp2/3-Komplex und Recycling der Aktinuntereinheiten in den G-Aktinpool. (i) Extrazelluläre Signale aktivieren Rezeptoren. (ii) Der dazugehörige Signaltransduktionsweg lässt aktive Rho-GTPasen und PIP_2 entstehen, die WASP/Scar aktivieren. (iii) WASP/Scar verankert Arp2/3 und Aktinmonomere an bereits existierende Filamente und bildet eine Verzweigung. (iv) Die neue Verzweigung wächst schnell und (v) drückt so die Membran nach vorne. (vi) Nach ein bis zwei Sekunden wird dieses Wachstum durch das *Capping*-Protein gestoppt. (vii) Reifung des Filaments durch Hydrolyse des an den Aktinuntereinheiten gebundenen ATPs (weiße Untereinheiten werden gelb), gefolgt von der Dissoziation des γ -Phosphats (rote Untereinheiten). (viii) ADF/cofilin fördert die Phosphatdissoziation, teilt ADP-Aktinfilamente und begünstigt die Depolymerisation von ADP-Aktin am Filamentende. (ix) Profilin katalysiert den Austausch von ADP nach ATP (Untereinheiten werden weiß) und führt sie zurück in den Pool von an Profilin gebundenem ATP-Aktin, um das stumpfe Ende zu verlängern. (x) Rho-GTPasen aktivieren auch PAK und die LIM-Kinase, die ADF/cofilin phosphoryliert, was zu einer Verlangsamung des Umsatzes führt. (Pollard and Beltzner, 2002)

Mittels des Arp2/3-Nukleierungsmechanismus kann die Membran an der Vorderkante sich bewegender Zellen vorwärts gedrückt werden. *capping*-Proteine limitieren das Wachstum auf eine bestimmte Länge, so dass die Filamente zum einen stabil genug sind, zum anderen unkontrolliertes Wachstum der Filamente verhindert wird (Cooper and Schafer, 2000). Um ein kontinuierliches

Wachstum der Filamente zu gewährleisten, müssen anderswo Filamente abgebaut werden, was durch ADF/cofilin bewerkstelligt wird (Carlier et al., 1997). Damit werden ständig Aktinmonomere nachgeliefert, die an Profilin binden und Filamente am stumpfen Ende verlängern können.

2.1.5 Aktinnukleierung durch Spire

Eine weitere Klasse der Aktinnukleatoren ist ein Protein namens Spire (engl.: Turm, Spitze), das erst kürzlich als Aktinpolymerisation-stimulierendes Protein identifiziert wurde (Quinlan et al., 2005). Das *spire*-Gen wurde zuerst zusammen mit dem *cappuccino*-Gen als Gen identifiziert, das die Oozytenpolarität beeinflusst (Manseau and Schubach, 1989). Spire besitzt viele Wiederholungen des Aktin-bindenden WH2-Motivs (Verprolin-Motivs), wie sie auch bei Arp2/3 oder β -Thymosin vorkommen (Wellington et al., 1999). Wie Arp2/3 verschließt Spire das spitze Ende von Aktinfilamenten. Erste Studien führten zu einem Modell, bei dem zunächst die C-terminale WH2-Domäne ein Aktinmonomer bindet und anschließend drei weitere Aktinmonomere an drei weitere gleichmäßig WH2-Domänen binden, so dass eine einzelsträngige Aktinkette entsteht. Mittels Elektronenmikroskopie konnten Strukturen mit der Größe eines einzelsträngigen Tetramers bestätigt werden (Quinlan et al., 2005). Diese könnten als Vorlage für schnelle Aktinpolymerisation dienen, während die C-terminal WH2-Domäne das Spitze Ende verschließt (Baum and Kunda, 2005).

2.1.6 Rho-GTPasen und die Regulation des Zytoskeletts

Die Familie der Rho-Proteine gehört zur Ras- (Ratten-Sarcoma-Onkogen) Superfamilie der GTP-bindenden Proteine und ist in Eukaryoten hoch konserviert (mehr als 40% Sequenzidentität). Es wurden bisher mindestens 20 Mitglieder identifiziert, von denen Rho (Ras-Homologieprotein), Cdc42 (*cell division cycle*) und Rac (Ras-verwandtes C3-Botulinumtoxinsubstrat) die prominentesten und am besten untersuchten sind. Rho wurde als erstes isoliert (Madaule and Axel, 1985) und seine drei Isoformen, RhoA, -B und -C, sind zu 85% identisch, mit den größten Unterschieden am C-Terminus. Die beiden Homologen von Cdc42 sind auf alternatives Splicen zurückzuführen und weisen ebenso verschiedene C-Termini auf (Shinjo et al., 1990). Rac1 und Rac2 sind zu 92% identisch, allerdings besitzt nur Rac1 am C-Terminus eine polybasische Sequenz (Didsbury et al., 1989; Didsbury et al., 1990). Die meisten Rho-GTPasen sind durch Prenylierung und Carboxymethylierung eines konservierten Cysteins vier Aminosäurereste entfernt vom C-Terminus, gefolgt von der Abspaltung der letzten drei Aminosäuren, modifiziert (Adamson et al., 1992a; Marshall, 1993). Rho, Rac und Cdc42 Proteine sind alle mit einer Geranylgeranylgruppe prenyliert, RhoB kann auch farnesyliert werden (Adamson et al., 1992a). Diese Lipidierungen sind für die Interaktion mit Membranen essentiell: So befindet sich RhoB vorwiegend in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten, (Adamson et al., 1992b) während RhoA/B im Zytoplasma und an der Plasmamembran lokalisiert ist

(Adamson et al., 1992a). Ferner kann RhoA am Rest 188 phosphoryliert werden, was ebenfalls die Aktivität reguliert (Lang et al., 1996).

Rho-Proteine durchlaufen einen Zyklus, in dem sie eine aktive, GTP-gebundene Konformation, und eine inaktive, GDP-gebundene Konformation einnehmen (Bourne et al., 1991; Hall, 1990). Dabei interagieren sie mit einer Reihe von Proteinen, die diesen Zyklus kontrollieren. In vitro findet zwar ein Nukleotidaustausch und eine langsame Hydrolyse des GTP statt, in vivo wird diese Reaktionen durch Guaninnukleotidaustauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs) und GTPase-aktivierende Proteine (*GTPase activating protein*, GAPs) katalysiert, sowie durch Guaninnukleotiddissoziationsinhibitoren (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*, GDI) reguliert (Fukumoto et al., 1990). Die Kristallstrukturen von RhoA mit GDP (Wei et al., 1997a) und Rac1 mit einem GTP-Analogon (Hirshberg et al., 1997) zeigen eine kompakte Struktur mit großer Ähnlichkeit zu Ras. Das Mg-Ion ist gegenüber Ras in Rho-GTPasen jedoch anders koordiniert. Außerdem besitzen Rho-GTPasen eine zusätzliche 13 Aminosäure-lange *insert*-Domäne mit einem acht Aminosäure-langen, α -helikalen Bereich zwischen den Aminosäureresten 123 und 135 (nach Ras-Nummerierung). Die Eigenschaft, zwei verschiedene Konformationen und damit Zustände einnehmen zu können, macht die GTPase zu einem molekularen Schalter (*switch*). Im aktiven Zustand interagieren die Rho-GTPasen mit ihren Effektoren. Charakteristisch für Ras-Proteine sind vier Regionen im Protein, die Phosphatbindungsstelle (*P-loop*) sowie die flexiblen *switch 1*- und *switch 2*-Regionen (Valencia et al., 1991; Vetter and Wittinghofer, 2001). Durch Mutation bestimmter konservierter Aminosäuren kann die intrinsische und GAP-stimulierte GTPase-Aktivität oder Nukleotidbindungsfähigkeit verändert werden. Solche Mutationen können im Falle von Ras zu Krebs führen, weshalb Ras zu den Proto-Oncogenen zählt (Barbacid, 1987). Bei konstitutiv aktiven Proteinen ist entweder die GTPase-Aktivität verringert oder sie kann nicht mehr von GAPs aktiviert werden, so dass sie vorwiegend in GTP-gebundener Form vorliegen, oder sie besitzen eine höhere Nukleotidaustauschrate (Barbacid, 1987; Bourne et al., 1991). Die G12V- und Q61L-Mutanten (nach Ras-Nummerierung) sind die am häufigsten verwendeten, aktivierten Formen der Rho-Proteine (Farnsworth et al., 1991), während die S17T-Mutante dominant negativ ist, da sie durch verminderte Mg-Koordination die Nukleotidaffinität stark reduziert (Farnsworth and Feig, 1991). Die Interaktion mit Effektorprotein findet bei Aktivierung über eine Region statt, die als „Effektorloop“ oder *switch 1* bezeichnet wird und die sich in Ras über Aminosäure 30-41 erstreckt (Wei et al., 1997b).

Rho-GTPasen sind maßgeblich an der Organisation des Zytoskelettes beteiligt, was durch die Generierung bestimmter Phänotypen in Fibroblasten nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 7).

(i) Eine Aktivierung von Rho durch Wachstumsfaktoren wie Lysophosphatidsäure (LPA) bewirkt die Bildung von Stressfasern (Allen et al., 1997a; Cross et al., 1996; Hall, 1998a), die aus Bündeln von Aktinfilamenten bestehen, die mit Myosinfilamenten und anderen Proteinen assoziiert sind und sich kontraktile verhalten (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Rho ist sowohl ein essentielles Protein in Muskelzellen (Hirata et al., 1992) als auch bei der Wundheilung, die auf der Aktin-basierten Kontraktion beruht (Brock et al., 1996). Dies geschieht durch das Zusammenwirken zweier Effektoren, dem Forminprotein mDia (*mammalian Diaphanous*) und der Rho-Kinase ROCK (Rho-assoziierte *coiled-coil*-Kinase) (Maekawa et al., 1999; Nakano et al., 1999). mDia katalysiert dabei die Aktin-Polymerisation direkt (siehe Kapitel 2.1.9).

(ii) Eine durch PDGF (*platelet derived growth factor*) hervorgerufene Rac-Aktivierung lässt eine durch Aktinnukleierung basierende bewegliche Kante in Zellen, die Lamellipodien, entstehen (Allen et al., 1997b; Hall, 1998b). Rac wird durch Tyrosinkinase und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert, die Phosphoinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) abhängig sind (Bourne et al., 1991; Rickert et al., 2000; Royal et al., 2000). Über die Interaktion mit IRSp53, das wiederum über seine SH3-Domäne mit WAVE wechselwirkt, aktiviert Rac den Arp2/3-Komplex (Miki et al., 2000). Auch Cdc42 bindet IRSp53 und kann so für die Rac-abhängige Lamellipodienverlängerung verantwortlich sein (Govind et al., 2001; Hall, 1998b). Rac bewirkt zusätzlich ein *Uncapping* der Aktinfilamente an der Plasmamembran. Über Stimulation der PIP₅-Kinase (Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase) und Bildung von PIP₂ kann Rac die Freisetzung von *capping*-Proteinen am stumpfen Ende der Aktinfilamente bewirken, da PIP₂ an diese bindet (Carpenter et al., 1999; Tolia and Carpenter, 2000). Rac beeinflusst ferner die Aktindepolymerisation durch Aktivierung der LIM-Kinase über den Rac/Cdc42-Partner PAK (p21-aktivierte Kinase), was zur Inaktivierung von ADF/cofilin führt (siehe Kapitel 2.1.1 und Abbildung 7), das Aktin abbaut (Edwards et al., 1999; Stanyon and Bernard, 1999). Andererseits trägt ADF/cofilin durch den Abbau alter Aktinfilamente und Freisetzung von Aktinmonomeren oder Spaltung von Aktinfilamenten und Erhöhung der Anzahl an freien Enden auch zur Lamellipodienverlängerung und Zellbewegung bei (Aizawa et al., 1996; Chan et al., 2000; Zebda et al., 2000). Es ist ebenfalls bekannt, dass Myosine bei der Verlängerung von Lamellipodien beteiligt sind und Rac über die Aktivierung von PAK die Phosphorylierung der schweren Kette von Myosin II (MHC) (van Leeuwen et al., 1999) und der leichten Kette von Myosin (MLC) beeinflusst (Daniels and Bokoch, 1999; Kiosses et al., 1999). Darüber hinaus wurde gefunden, dass Rac1 mit dem in dieser Studie näher charakterisierten Diaphanous-verwandten FHOD1 (siehe Kapitel 2.2) interagiert (Westendorf, 2001a), so dass auch Formine an der Entstehung von Lamellipodien oder Zellbewegung beteiligt sein könnten.

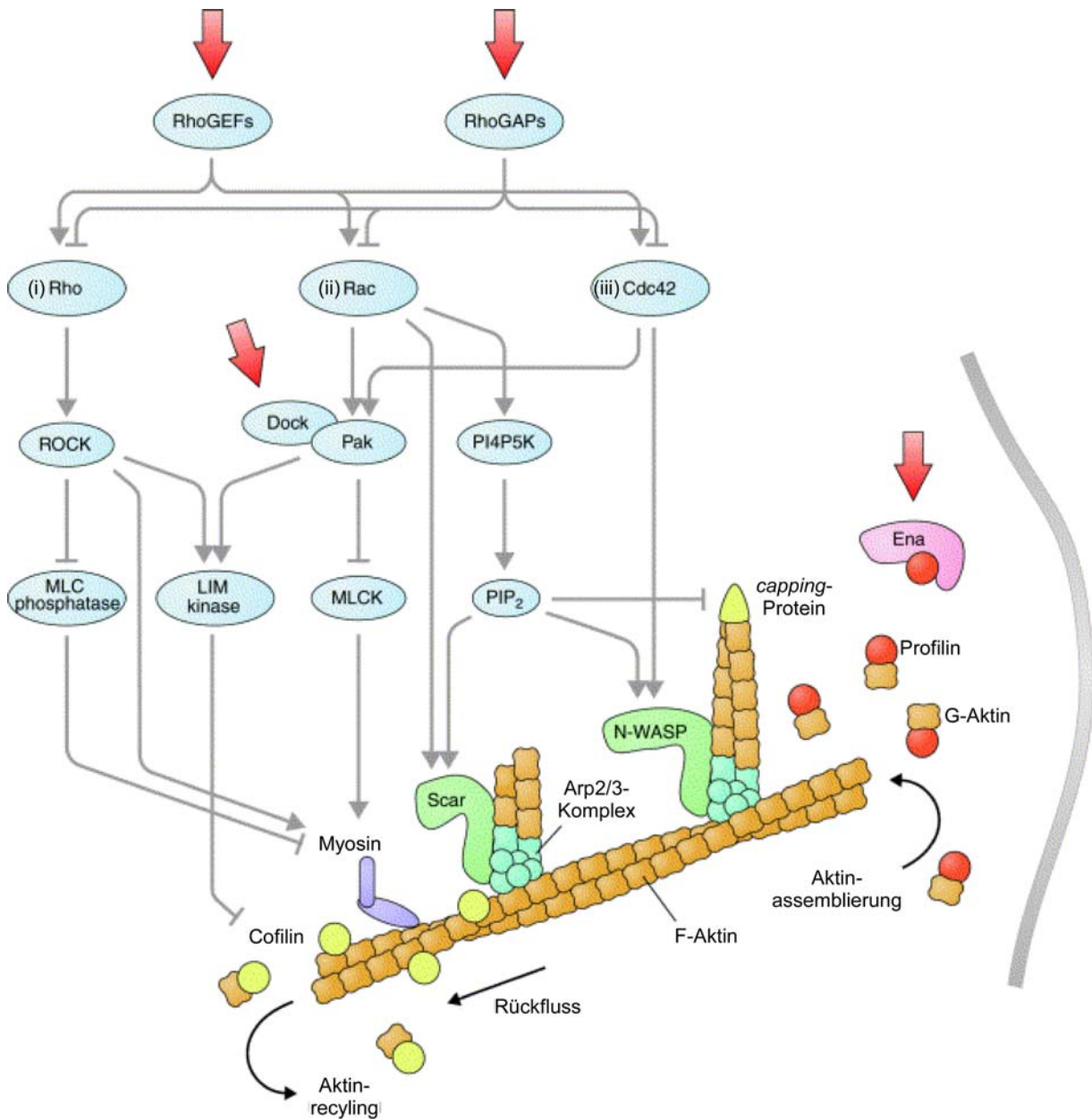


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege, die Rho-GTPasen mit dem Zytoskelett verknüpfen. Die Transduktionskaskaden wurden vorwiegend in Studien zur Fibroblastenbeweglichkeit gefunden. Der Mechanismus, wie Ena/VASP (siehe Kapitel 2.1.10) die Beweglichkeit negativ regulieren, ist unbekannt. Rho-GTPase-Signalwege regulieren die Aktindynamik an verschiedenen Stellen, wie Filamentnukleierung (Arp2/3, Formine), Filamentverlängerung (*capping*-Protein) und Aktinrecycling (ADF/cofilin). Die roten Pfeile kennzeichnen Punkte, an denen eine Regulation durch extrazelluläre Signale wahrscheinlich ist. (Dickson, 2001)

(iii) Die Bradykinin-vermittelte Cdc42-Aktivierung stimuliert die Bildung von Mikrospeikes oder Filopodien (Allen et al., 1997b). Letztere dienen z.B. als Sensoren für das extrazelluläre Milieu zur Richtungssuche des Wachstumskegels des Axons bei Nervenzellen (Kater and Rehder, 1995). Die Rolle von Cdc42 ist, die Aktinpolymerisation über WASP/N-WASP und schließlich Arp2/3 (siehe Kapitel 2.1.4) zu stimulieren und so vermutlich zur Filopodienverlängerung beizutragen. Cdc42 ist vorwiegend im Golgikomplex lokalisiert (Erickson et al., 1996), obwohl es sich auch an der

Plasmamembran und anderen vesikulären Strukturen befindet (Michaelson et al., 2001), so dass auch eine Beteiligung bei der Regulation am Vesikeltransport denkbar ist (Wu et al., 2000).

2.1.7 Formine

Der Begriff „Formin“ rührt von einer Deformation der Gliedmaßen bei Mäusen her, die durch eine transgene Einbringung in den Gliedmaßendefinitivitätslocus hervorgerufen wurde (Mass et al., 1990; Woychik et al., 1990) (Es hat sich jedoch unlängst herausgestellt, dass für diesen Phänotyp tatsächlich das benachbarte *Gremlin*-Gen verantwortlich ist (Zuniga et al., 2004).) Formine sind eine große Familie von ubiquitären, hochkonservierten Multidomänenproteinen und haben eine Größe von 100 bis 200 kDa. Sie besitzen z.T. sehr unterschiedliche Eigenschaften und sind an einer Vielzahl von Aktin-basierten Prozessen beteiligt, wie der Bildung von Aktinkabeln in Hefe, Stressfasern in Säugetierzellen, dem Aufbau des kontraktilen Ringes während der Zytokinese und der Bildung von Filopodien (siehe Übersichtsartikel von (Faix and Grosse, 2006). Ihnen gemeinsam ist eine hochkonservierte, zumeist C-terminale FH2-Domäne mit einer Länge von 400 Aminosäuren, der sich N-terminal die Prolin-reiche FH1-Domäne variabler Länge anschließt (Castrillon and Wasserman, 1994). Die FH2-Domäne bindet mit nanomolarer Affinität an das stumpfe Ende von Aktinfilamenten (Pring et al., 2003).

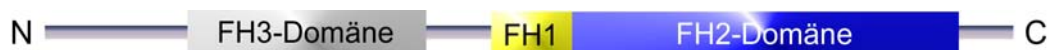


Abbildung 8: Schema der Domänenorganisation bei Forminen. Grau: Region der schwach definierten FH3-Domäne, gelb: Prolin-reiche FH1-Domäne, blau: FH2-Domäne, die Aktinpolymerisation nukleiert, N, C: N- bzw. C-Terminus.

Für die Nukleierung der Aktinpolymerisation sind die FH2-Kerndomäne sowie die zwischen FH1 und FH2-Domäne liegende Region notwendig und ausreichend (Kovar et al., 2003; Pruyne et al., 2002a; Sagot et al., 2002a). Im Zentrum der FH2-Domäne befindet sich das konservierte G-N-X-M-N-Motiv (Wasserman, 1998), wobei X für jede Aminosäure steht. Die FH1-Domäne bindet an SH3- und WW-Domänen sowie mit niedriger mikromolarer Affinität an Profilin, so dass es möglich ist, dass Profilin Aktinmonomere in die Nähe der FH2-Domäne am wachsenden stumpfen Ende bringt und die Funktion eines Rekrutierungsproteins hat (Chang et al., 1997). Profilin kann die Elongationsrate von FH1-FH2-Domänen in vitro stark erhöhen, aber nicht für jedes Formin ist die Aktinnukleierung Profilin-abhängig (Kovar and Pollard, 2004; Romero et al., 2004).

Die Nukleierung neuer Aktinfilamente durch Formine geschieht durch Stabilisierung eines Aktindimers (Pring et al., 2003). Bei der Elongation des Filaments bleibt das Formin am stumpfen Ende gebunden. (Moseley et al., 2004; Pruyne et al., 2002c). Da gezeigt wurde, dass FH2-Domänen von Forminen in der Lage sind, *capping*-Proteine und Gelsolin zu hemmen oder gar zu verdrängen (Harris and Higgs, 2004; Schirenbeck et al., 2005b; Zigmond et al., 2003) und im Gegensatz zu

capping-Proteinen die Addition von Aktinmonomeren begünstigen - mit Ausnahme von Cdc12 (Kovar et al., 2003) - werden Formine auch als „*leaky cappers*“ bezeichnet (Zigmond et al., 2003). Mit Immunoelektronenmikroskopie konnte aufgedeckt werden, dass die FH2-Domäne stabil am stumpfen Aktinfilamentende gebunden bleibt, während ständig Aktinmonomere zwischen FH2-Domäne und stumpfen Ende eingefügt werden (Higashida et al., 2004; Kovar and Pollard, 2004; Pruyne et al., 2002a). Dieses Modell wird durch die unlängst gelösten Kristallstrukturen der FH2-Domäne und anderer diskreter Domänen unterstützt, die neue Einsichten in den Mechanismus des Formin-vermittelten Aktinaufbaus liefern.

2.1.8 Struktur der FH2-Domäne und vermuteter Mechanismus der Aktinnukleierung durch FH2-Domänen

Die erste dreidimensionale Struktur einer nukleierenden FH2-Domäne des Hefeformins Bni1p wurde 2004 gelöst und offenbart ein flexibles, miteinander verbundenes Dimer, der aus zwei verlängerten Aktin-bindenden Motiven besteht.

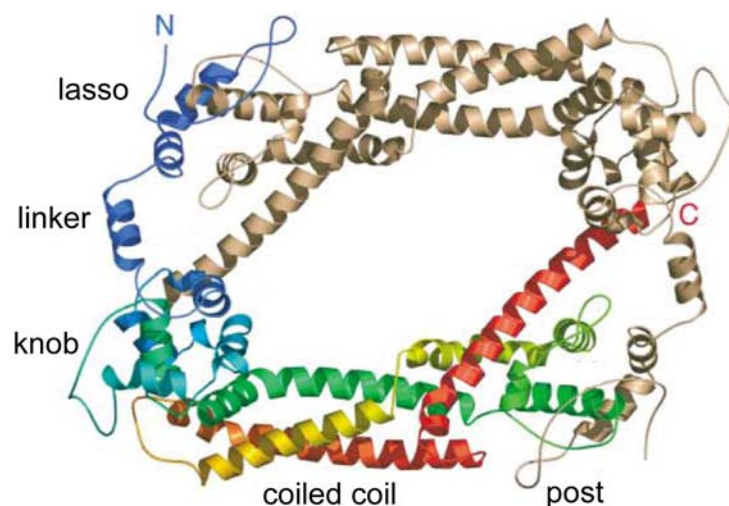


Abbildung 9: Gesamtaufbau des Bni1p-FH2-Dimers in der Bänderdarstellung. Ein Molekül ist in den sichtbaren Spektralfarben eingefärbt (blau: N-Terminus, rot: C-Terminus), das andere bräunlich. Die fünf Subdomänen, *lasso*, *linker*, *knob*, *coiled coil* und *post* sind gekennzeichnet. Das Dimer hat eine kreisförmige Struktur mit den Maßen $10,5 \times 8 \text{ nm}^2$, die beiden Monomere haben eine Kopf-zu-Schwanz-Orientierung. Es ist deutlich zu erkennen, dass die *lasso*- die *post*-Subdomäne umschließt. (Xu et al., 2004)

Zwei FH2-Monomere sind an zwei Stellen verknüpft, so dass sich von oben betrachtet eine *Doughnut*-förmige, kreisförmige Struktur ergibt (Otomo et al., 2005a; Xu et al., 2004). Die FH2-Domäne kann in fünf Subdomänen unterteilt werden, die – vom N-Terminus zum C-Terminus – als *lasso* (Lasso), *linker* (Verknüpfers), *knob* (Knopf), *coiled coil* und *post* (Pfosten) bezeichnet wurden (Xu et al., 2004). Die beiden Monomere besitzen eine Kopf-zu-Schwanz-Orientierung, d.h. der N-

Terminus eines Monomers liegt beim C-Terminus des anderen Monomers. Dabei wird die Dimerisierung durch die außergewöhnliche *lasso*-Struktur vermittelt, die eine Vorstülpung der *post*-Domäne der anderen Untereinheit umschließt, die das hoch konservierte zentrale G-N-X-M-N-Motiv enthält und so die Bildung eines flexibel miteinander verbundenen Dimers ermöglicht. Der innere Bereich des FH2-Dimer ist hydrophob, die *linker*-Region jeder Untereinheit macht die Struktur zu einem flexiblen, miteinander verbundenen Dimer. Von der Seite betrachtet hat das FH2-Dimer eine Sessel-förmige Struktur, wobei die beiden *knob*-Subdomänen deutlich aus der Ebene herausragen (siehe Abbildung 10 A). Zusammen mit Aktinnukleierungsexperimenten (siehe Kapitel 3.5.5), in denen der Einfluss verschiedener FH2-Konstrukte auf die Aktinpolymerisation untersucht wurde, wurde ein Modell der Aktinnukleierung abgeleitet, in dem die FH2-Domäne auf dem Ende eines verlängernden Aktinfilaments prozessiv „Treppen steigen“ könnte (siehe Abbildung 10).

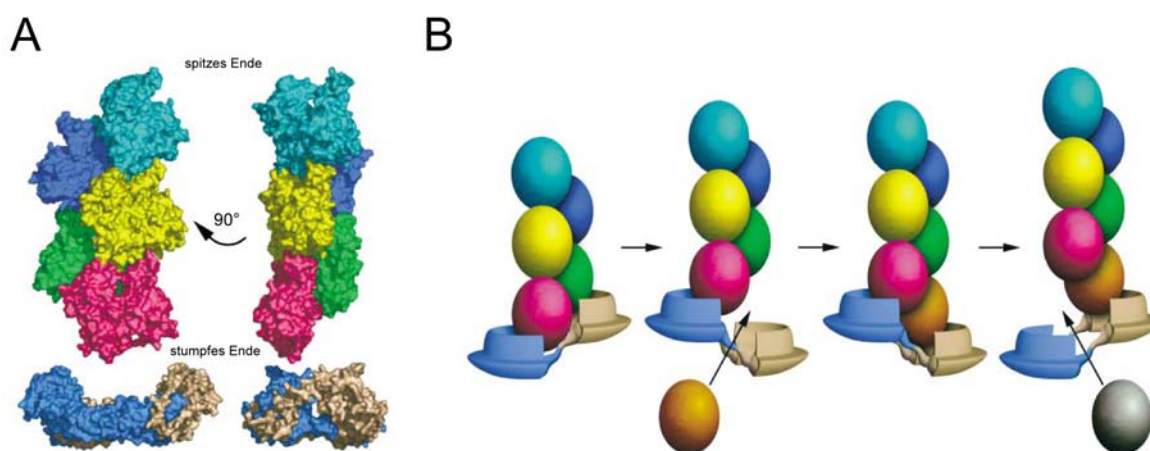


Abbildung 10: Modell der miteinander verbundenen FH2-Dimerstruktur mit Aktinfilamentstruktur und Schema des „Treppentieg“-Mechanismus der Aktinnukleierung. A: Zwei senkrechte Ansichten des FH2-Dimers von der Seite betrachtet unterhalb eines fünf-Untereinheiten-langen Aktinfilaments. Dabei ist ein FH2-Monomer blau, das andere bräunlich gefärbt und so orientiert, dass die konservierte Oberseite dem stumpfen Filamentende gegenüberliegt. B: Schematische Veranschaulichung, wie das FH2-Dimer am Aktinfilament „Treppen steigen“ könnte. Die Aktinuntereinheiten werden durch die farbigen Ovale repräsentiert und das FH2-Dimer ist wie in A gefärbt. Abwechselnde Dissoziation, Verlagerung und erneutes Binden einer Hälfte des FH2-Dimers könnte eine Verlängerung durch Hinzufügen von Aktinmonomeren am stumpfen Filamentende ermöglichen. (Xu et al., 2004)

Nach dem oben beschriebenen Nukleierungsmodell müsste das gesamte Forminmolekül um das helikale Aktinfilament eine beträchtliche Drehbewegung machen. Mittels Einzelmolekülbildgebung von Substrat-gebundenem oder Arp2/3-Komplex-assoziiertem Filament konnte nachgewiesen werden, dass sich die Aktinfilamente bei Verlängerung nicht drehen (Kovar and Pollard, 2004). Vielmehr muss das Forminprotein bei der Filamentelongation immer wieder kurzzeitig vom Filament dissoziieren und neu assoziieren, so dass es auf dem Ende „gleitet“ (Shemesh et al., 2005). Die Kristallstruktur einer monomeren FH2-Domäne aus dem murinen mDia1 ließ erkennen, dass die für die Dimerisierung verantwortlichen Motive für die Aktinnukleierung essentiell sind (Shimada et al., 2004). Als Monomer findet keine Nukleierung statt, da es eine weitere Assemblierung von Aktinmonomeren verhindert und sich wie ein *capping*-Protein verhält. Als Dimer ist die FH2-Domäne

hingegen ein Aktinnukleator und die Struktur stimmt nahezu mit der FH2-Struktur von Bni1p überein (Shimada et al., 2004). Dies lässt auf einen über viele Speziesgrenzen konservierten molekularen Mechanismus schließen. Die Komplexstruktur von Tetramethylrhodamin (TMR)-Aktin, einem Aktinderivat, das keine Filamente bilden kann (Dominguez and Graceffa, 2003), und der Bni1p-FH2-Domäne lässt erkennen, dass die Aktinuntereinheiten so binden, dass jedes FH2-Monomer zwei Aktinmoleküle bindet und das spitze Ende frei lässt (Otomo et al., 2005b). Dabei nehmen diese eine Konformation ein, die der im Aktinfilament entspricht, so dass die FH2-Domäne als Filamentkern dienen kann. Nach neueren Modellen könnte das FH2-Dimer abwechselnd eine offene und geschlossene Konformation einnehmen, um das Einfügen eines neuen Aktinmonomers zu erlauben bzw. zu verhindern (Vavylonis et al., 2006).

2.1.9 Diaphanous-verwandte Formine

Viele Formine sind Effektoren von Rho-GTPasen. Diese werden unter dem Namen Diaphanous-verwandte Formine (*Diaphanous related formins*, DRFs) zusammengefasst, da sie zum *Drosophila*-Protein DIAPHANOUS homolog sind (Wasserman, 1998). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie autoinhibitorische Eigenschaften besitzen und durch eine aktive Rho-GTPase spezifisch aktiviert werden.

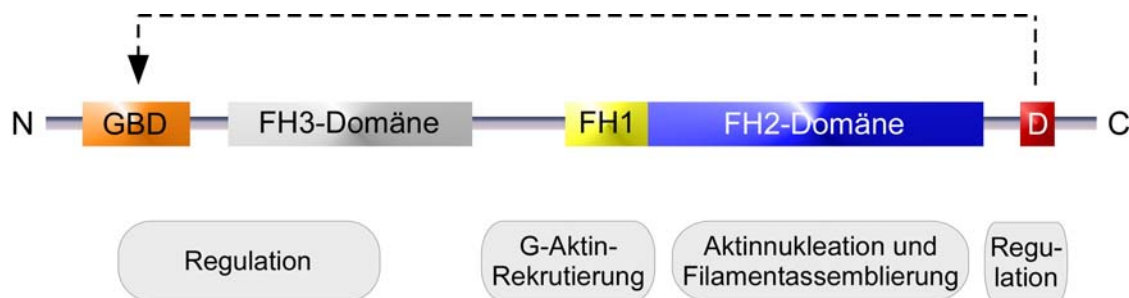


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Domänenorganisation der Diaphanous-verwandten Formine. GBD: GTPase-bindende Domäne, FH1 / FH2 / FH3: Forminhomologie 1-/ 2-/ 3-Domäne, D: DAD, Diaphanous-autoregulatorische Domäne. Die schwach definierte FH3-Domäne basiert auf Sequenzähnlichkeiten zu anderen DRFs und hat schwer zu identifizierende Domänengrenzen. Durch Assoziation der DAD mit der FH3-Domäne werden Formine autoinhibiert. (Faix and Grosse, 2006).

Die Autoinhibierung in DRFs wird durch einen kleinen Bereich am C-Terminus der Proteine, der so genannten Diaphanous-autoregulierenden Domäne (DAD), und der N-terminalen regulatorischen Domäne vermittelt (Wasserman, 1998; Watanabe et al., 1997). Die DAD umfasst einen sehr kleinen Bereich von Aminosäuren, während die regulatorische Domäne am N-Terminus sehr viel größer ist und eine GTPase-bindene Domäne (GBD), eine Diaphanous-inhibierende Domäne (DID) sowie eine Dimerisierungsdomäne (DD) einschließt (Alberts, 2001; Li and Higgs, 2005; Rose et al., 2005). Die DID und DD werden auch als FH3-Domäne bezeichnet, die strukturell schwach definiert und bei einigen Forminen an der subzellularen Lokalisation beteiligt ist (Kato et al., 2001; Kitayama and

Uyedat, 2003; Peterson et al., 1998). Innerhalb der DAD befindet sich ein regulatorisches, hydrophobes Motiv mit der Sequenz M-D-X-L-L, das über verschiedene Speziesgrenzen hinweg hoch konserviert ist (Alberts, 2001). Es befindet sich am C-Terminus eine ebenfalls konservierte, basische Region, deren Bedeutung zu Beginn dieser Studie unbekannt war.

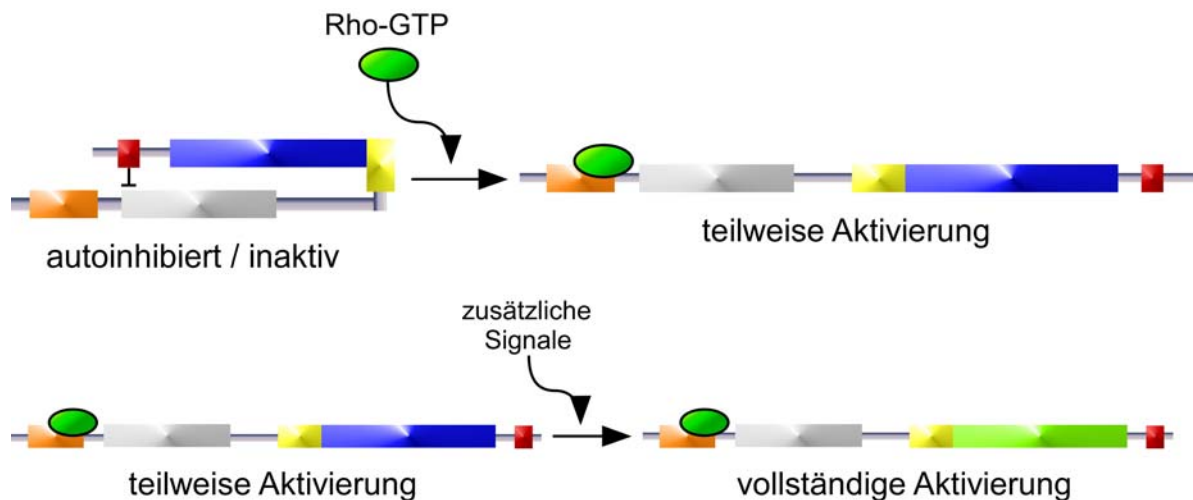


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Modells der Autoinhibition der DRFs, die durch die Interaktion der DAD mit der FH3 entsteht. Diese wird durch Assoziation einer GTP-gebundenen Rho-GTPase teilweise aufgehoben, so dass am N-Terminus eine Konformationsumwandlung stattfindet, die zur Freisetzung der DAD und zur Öffnung des Moleküls und partiellen Aktivierung führt. Noch unbekannte Signale, wie z.B. Phosphorylierung, sind für eine vollständige Aktivierung unerlässlich.

In ruhenden Zellen ist die DAD an den N-Terminus gebunden und nimmt somit eine geschlossene Konformation ein, was eine Aktinnukleierung verhindert. Bindet eine aktivierte Rho-GTPase an die GBD, wird die Autoinhibition aufgehoben (Alberts, 2001; Li and Higgs, 2003; Watanabe et al., 1999a). Der N-terminale Bereich von mDia1 besitzt eine *Armadillo-repeat*-Struktur, ist vollständig helikal und ist ein stabiles Dimer (Rose et al., 2005). Die Rho-GTPasen interagieren über ihre *switch 1* und *switch 2*-Domänen mit der GBD und der DID (Otomo et al., 2005a; Rose et al., 2005). Die DAD wird bei Bindung von Rho an mDia1 nicht verdrängt. Vielmehr führt die Bindung der GTPase zu einer Umstrukturierung der benachbarten DID und zur Freisetzung der DAD (Lammers et al., 2005). Durch GTP-gebundenes RhoA wird mDia nicht vollständig aktiviert, so dass weitere Faktoren für die Aktivierung unabhängig von RhoA notwendig sein könnten (Li and Higgs, 2005).

2.1.10 Zelluläre Funktionen der Formine

Zellbiologische Untersuchungen zeigen, dass Formine am Aufbau des Aktomyosinrings beteiligt sind, der am Ende der Zytokinese für die Abschnürung bei teilenden Zellen verantwortlich ist. So werden die Aktinfilamente am Aktomyosinring vor allem am stumpfen Ende aufgebaut, eine Deletion des Arp2/3-Komplexes hat keinen Einfluss auf die Bildung des Rings (außer in sich teilenden Hefezellen) und Aktin liegt in der Teilungsfurche vorwiegend als gerade Bündel vor (Castrillon and

Wasserman, 1994; Evangelista et al., 2002; Maupin and Pollard, 1986; Noguchi and Mabuchi, 2001).

Zusammen mit dem Vasodilator-stimulierten Phosphoprotein (VASP) sind Formine an der Bildung von Filopodien beteiligt (Schirenbeck et al., 2005a), die vermutlich aus Lamellipodien hervorgehen, die zusammen mit dem Arp2/3-Komplex gebildet werden. Formine wie mDia1 befinden sich dabei an der Spitze von Filopodien.

Eine weitere Aufgabe erfüllen Formine bei der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion und der Zell-Substrat-Adhäsion sowie der Zellbewegung. Es konnte nachgewiesen werden, dass mDia und RhoA für die Ausbildung fokaler Adhäsionen notwendig sind. Zudem formt Formin-1 die Plasmamembran durch die Bindung von α -Catenin und sind in der Lage es an adhärenente Kontaktstellen zu bringen (Kobielak et al., 2004). Bei der Bewegung von Zellen müssen ständig Aktinfilamente aufgebaut werden und DRFs wie FHOD1 spielen dabei eine essentielle Rolle (Koka et al., 2003). Allerdings ist unklar, über welchen Weg dies geschieht: Über direkte Aktinpolymerisation, der Stabilisation von Mikrotubuli oder über die Stimulation des SRF (*serum response factor*) oder MAL (*megakaryoblastic leukemia*) (Goulimari et al., 2005).

Bei der Endozytose ist eine Interaktion von endosomalen Organellen mit dem Zytoskelett unerlässlich. Eine Beteiligung von Forminen an der Endozytose wurde am Beispiel einer *splice*-Variante von hDia2 untersucht, die zusätzliche Aminosäuren besitzt, um es an frühe Endosomen zu führen (Gasman, 2003), ist aber auch für andere DRFs belegt (Tominaga et al., 2000).

Die Zellpolarisation ist ein bei der Zellteilung straff regulierter Vorgang. Studien in knospender und teilender Hefe demonstrierten, dass Formine wie das DRF Bni1p zusammen mit Profilin das Zytoskelett umarrangieren und die Zelle damit polarisieren (Evangelista et al., 1997) und auch andere Formine sind in der Lage, Aktinpolymerisation in Wachstumszonen zu nukleieren. Die planare Zellpolarität (PCP, *planar cell polarity*) ist ein Prozess, bei der die Integrität und Ausrichtung von Zellen innerhalb der epithelialen Ebene reguliert wird und ein Signalweg bei der Morphogenese ist. Das DRF DAAM1 (*dishevelled-associated activator of morphogenesis*) wurde als Interaktionspartner dieses Signalwegs identifiziert und kontrolliert die Gastrulation bei *Xenopus laevis* (Habas et al., 2001).

Wie oben kurz erwähnt, können Formine auch die Transkription beeinflussen, da der Transkriptionskoaktivator MAL Aktin bindet (Miralles et al., 2003). Nach Bindung an SRF wird die Transkription von Genen angeschaltet, die mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen und es umbauen (Treisman, 1987). Das an G-Aktin gebundene MAL dissoziiert, sobald durch mDia1 Aktin polymerisiert wird, worauf es in den Zellkern gelangt und die Transkription am SRE aktiviert. Zu den SRE-Aktivatoren gehört auch FHOD1, das über Rac1 die Transkription stimuliert (Gasteier et al., 2003).

Schließlich wurde gefunden, dass DRFs zusätzlich zur Aktinpolymerisation auch die Mikrotubuli des Zytoskeletts beeinflusst. Sie helfen, stabile Microtubuli zu bilden, d.h. Mikrotubuli mit einer längeren Lebenszeit (Gasteier et al., 2005; Gundersen et al., 2004). Dabei bindet mDia1 an die Spitzen von Mikrotubuli und hilft so bei ihrer Orientierung (Wen et al., 2004). Jedoch ist auch die FH2-Domäne an der Bildung von stabilen Mikrotubuli beteiligt, so dass dieser Vorgang auch Aktin-abhängig ist und Formine die Vernetzung der Aktin- und Mikrotubulizytoskelette vermitteln.

Die zellulären Funktionen der verschiedenen Formine – allein 15 sind in Säugetieren bekannt – unterscheiden sich z.T. stark, so dass sie spezielle Aufgaben übernehmen, jedoch auch überlappende Eigenschaften besitzen. Diese hängen vorwiegend von den Interaktionspartnern, die sie besitzen, bzw. von den Faktoren ab, die sie aktivieren, und weniger vom Mechanismus der Aktinnukleierung.

2.2 FHOD1

Das humane Forminprotein FHOD1 (Forminhomologiedomäne-2-enthaltene Protein 1) ist ein Mitglied der DRFs. Es wurde zuerst in einer Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung als Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors AML-1B (*acute myelogenous leukemia protein – 1B*) identifiziert (Westendorf et al., 1998; Westendorf et al., 1999a). Der offene Leserahmen hat eine Größe von 3945 Basepaaren und liegt auf dem Chromosom 16q22 des Menschen (Westendorf et al., 1999b). FHOD1 wird ubiquitär, einschließlich hämatopoietischer Zellen, exprimiert, jedoch in Milzzellen in sehr großen Mengen, weshalb es ursprünglich den Namen FHOS (*Formin homolog overexpressed in spleen*) trug. Als sich herausstellte, dass FHOD1 eine echte FH1- und FH2-Domäne besitzt, wurde es nach den Richtlinien der Nomenklatur für humane Gene in die Formin-Proteinfamilie aufgenommen und der Name geändert (Koka et al., 2003). Das humane Protein hat eine Größe von 1164 Aminosäureresten und ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt.

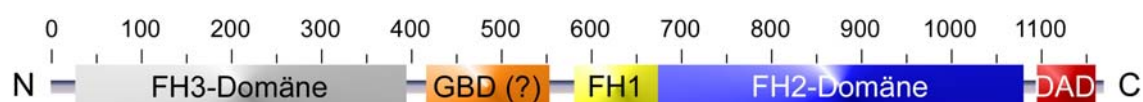


Abbildung 13: Schematische Darstellung des molekularen Domänenaufbaus von FHOD1. Angenommene Anordnung der Domänen: N-terminal befindet sich die FH3-Domäne und die GBD, zentral schließt sich die Prolinreiche FH1-Domäne an, der die FH2-Domäne direkt folgt. Am C-Terminus besitzt FHOD1 die DAD. N/C: N- bzw. C-Terminus der Proteinprimärsequenz

FHOD1 besitzt einen für Formine typischen Aufbau mit einer zentralen FH1-Domäne, an die sich C-terminal die FH2-Domäne anschließt. Wie auch bei anderen DRFs befindet sich ganz am C-Terminus die DAD, die eine Region am N-Terminus binden kann und dadurch das Protein eine

autoinhibierte Konformation einnimmt. Die für die Aktivierung wichtige GBD ist durch Sequenzvergleich bei FHOD1 nicht zu identifizieren, wie es für andere DRFs der Fall ist (Burbelo et al., 1995; Peng et al., 2003). Es wurde jedoch herausgefunden, dass Rac1 unabhängig vom Nukleotidzustand mit seiner C-terminalen polybasischen Region die Transkription vom SRE aktiviert (Westendorf, 2001a). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die FHOD1-induzierte Genexpression des SRE von der Aktivierung der ERK MAP-Kinase (*extracellular signal regulated kinase mitogen activated protein kinase*) erfordert (Boehm et al., 2005). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Src (*steroid receptor co-factor*) die Induktion der Genexpression durch FHOD1 aufhebt, jedoch die Stressfaserbildung unbeeinflusst bleibt. Zudem wird durch Src die Genexpression moduliert (Koka et al., 2005). Bei Deletion des C-Terminus von FHOD1 wird die Autoinhibition aufgehoben. Dadurch ist FHOD1 konstitutiv aktiv und induziert in Zellen Stressfasern (Gasteier et al., 2003; Westendorf, 2001b). Die Bewegung von Zellen, die durch die Interaktion von Integrin mit Aktin-Myosin vermittelt wird, kann durch FHOD1 unabhängig von Integrin stimuliert werden (Koka et al., 2003). FHOD1 kann Mikrotubuli entlang von Stressfasern ausrichten und trägt so zur Verlängerung von Zellen bei (Gasteier et al., 2005). Dabei hängen beide Prozesse, die Zellbewegung und die Zellverlängerung, von der Rho-Effektorkinase ROCK1 und von der intakten FH1/FH2-Domäne ab (Gasteier et al., 2003; Gasteier et al., 2005).

Weiterhin wurde gezeigt, dass FHOD1 über die FH1-Domäne Profilin IIa bindet, so dass es möglich ist, dass Profilin als Rekrutierungsprotein für Aktin dient (Tojo et al., 2003). In diesem Zusammenhang wurde auch gefunden, dass IRAP (*insulin responsive aminopeptidase*) mit FHOD1 interagiert. IRAP ist an Vesikel gebunden und wandert als Zellantwort auf Insulin an die Plasmamembran. Somit ist eine Beteiligung von FHOD1 am Vesikeltransport wahrscheinlich (Tojo et al., 2003). In einer Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung konnte FHOD1 als Interaktionspartner von PGKI (*cyclic GMP dependent protein kinase I*) identifiziert werden und durch weitere Experimente wurde herausgefunden, dass es in vasculären glatten Muskelzellen Substrat dieser Kinase ist. Diese phosphoryliert das Serin an Position 1131 in FHOD1, cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*) macht diese Interaktion wieder rückgängig (Wang et al., 2004). Im übrigen bindet FHOD1 den C-Terminus des multifunktionalen Rezeptors CD21 und könnte hier die Organisation des Zytoskeletts mit der intrazellularen Signalübertragung verknüpfen (Gill et al., 2004). Unter den bekannten Bindungspartnern von FHOD1 ist auch eine Isoform von WISH-1/DIP1 (*WASP interacting SH3 domain protein 1/diaphanous interacting protein 1*), WISH-B, das an die FH1-Domäne sowie den äußersten N-Terminus bindet und die Stressfaserbildung stört, jedoch nicht die Genexpression vom SRE (Westendorf and Koka, 2004). Im Herzen, der Niere und im Gehirn wird ein gerade identifiziertes Homolog, FHOD2, exprimiert, das möglicherweise für die Vernetzung des Nestin-Intermediärfilaments mit dem Aktinzytoskelett verantwortlich ist (Kanaya et al., 2005).

2.3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen zwei humane Proteine mit biochemischen und biophysikalischen Methoden sowohl funktionell als auch strukturell analysiert und charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um das bereits erwähnte Forminprotein FHOD1 sowie den später beschriebenen Transkriptionsinhibitor Hexim1 (siehe 5.1).

Ein erstes Ziel dieser Studie fokussiert auf den autoregulatorischen Mechanismus des humanen Multidomänenproteins FHOD1. So soll zunächst *in vitro* die Bindung der C-terminalen Diaphanous-autoregulatorischen Domäne DAD an die N-terminale Bindungsstelle charakterisiert werden. Dazu sollen verschiedene Fragmente des FHOD1-Proteins rekombinant hergestellt und die Interaktion der einzelnen Domänen mit biochemischen und biophysikalischen Methoden analysiert werden.

Durch Mutation der Konsensusmotive der DAD sollen die Konsensusmotive bestimmt werden. Die Wichtigkeit der mutierten Regionen soll ebenfalls mittels biochemischer und biophysikalischer Methoden beleuchtet werden. Daneben sollten diese Konstrukte auch *in vivo* getestet und so der Einfluss auf den Phänotyp von eukaryotischen Zellen dargestellt werden.

Zur Charakterisierung der Aktivierung des Forminproteins soll die Interaktion mit der Rho-GTPase Rac1 *in vitro* gezeigt und analysiert werden. Insbesondere der Einfluss des gebundenen Nukleotids in der GTPase und die Lokalisation der Bindungsstelle auf FHOD1 sind hier von Interesse.

Die katalytische Einheit von FHOD1, die FH2-Domäne, soll rekombinant in *E.coli* hergestellt und in einem Aktinpolymerisationsexperiment untersucht werden. Zur Analyse der Funktion und Regulation von FHOD1 soll dieses Protein schließlich in seiner nativen Form rekombinant als Volllängenprotein in einem Baculoexpressionssystem hergestellt und desgleichen die Stimulation der Aktinpolymerisation untersucht werden. In diesem Zusammenhang soll zudem der Einfluss der Rho-GTPasen und der DAD sowie weiterer Kofaktoren näher beschrieben werden.

In einem zweiten Projekt soll unabhängig von den oben genannten Arbeiten die Bindung der C-terminalen CyclinT-bindenden Domäne des Inhibitors für die Transkriptionselongation Hexim1 an das Zyklinprotein CyclinT1 mit biophysikalischen Methoden untersucht werden. Mittels NMR-Spektroskopie soll in Zusammenarbeit mit Dr. Sonja Dames, Universität Basel, die Struktur der TBD gelöst werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen geliefert:

Aldrich (Steinheim)

Boehringer Mannheim (Mannheim)

Fluka (Neu-Ulm)

Baker (Deventer, Niederlande)

Merck (Darmstadt)

GE Healthcare (Freiburg)

Qiagen (Hilden)

Roth (Karlsruhe)

Serva (Heidelberg)

Sigma (München)

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

PVDF-Membran (GE Healthcare, Freiburg)

Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare, Freiburg)

Dialyseschläuche (Roth, Karlsruhe)

Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, Plymouth, U.K.)

Ultrafiltrationseinheiten (Millipore Amicon, Witten)

NMR Röhrchen (Wilmad, Buena, USA und Shigemi Co., LTD Tokyo Japan)

3.1.2 Chromatographiesäulen und Chromatographiematerialien

Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden)

GSH 4 Fast Flow (GE Healthcare, Freiburg)

Hi Load Superdex 75 16/60 prep grade (GE Healthcare, Freiburg)

Hi Load Superdex 200 16/60 prep grade (GE Healthcare, Freiburg)

Superdex 75 10/300 (GE Healthcare, Freiburg)

Superdex 200 10/300 (GE Healthcare, Freiburg)

PD 10 Entsalzungssäulen (GE Healthcare, Freiburg)

Biosep-SEC-S2000 (Phenomenex, Aschaffenburg)

Prontosil 120-5-C18-AQ 5,0 µm HPLC-Säule (Bischoff Chromatographie, Leonberg)

3.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

1,5-IAEDans (Molecular Probes, Eugene, OR)

3.1.4 Nukleotide

Guanylyl 5'-imidodiphosphat, GppNHp (Jena Biosciences, Jena)

3.1.5 Reagenziensätze

QIAprep Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)

QIAprep Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

QIAprep Plasmid Midiprep Kit (Qiagen, Hilden)

ECL-Western-Blot-Detection-Kit (Ge Healthcare, Freiburg)

Actin Polymerization Biochem Kit (Cytoskeleton, Denver, USA)

3.1.6 DNA-Konstrukte

Marker

DNA LMW-Marker (Invitrogen, Karlsruhe)

40000, 10000, 8144, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517/506 Bp

Oligonukleotide

Primer (MWG Biotech, München)

Vektoren

pProEx-HTa/b (Invitrogen, Karlsruhe)

pGEX-4T1 Tev-Site modifiziert (GE Healthcare, Freiburg)

pGEX-2T Tev-Site modifiziert (GE Healthcare, Freiburg)

pEF-HA (Dr. Geyer, MPI Dortmund)

pFastBac HTb (Invitrogen, Karlsruhe)

3.1.7 Enzyme, Proteine und Antikörper

Enzyme

Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Schwalbach)

DNase I (New England Biolabs, Schwalbach)

Expand high Fidelity PCR System Polymerase (Roche, Mannheim)

T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach)

TEV-Protease (MPI-Dortmund)

Thrombin (Sigma, München)

Peptide

DAD-Peptid mit einer Länge von 30 Aminosäuren und der Sequenz (MW: 3357,8 Da):

S D E I M D L L V Q S V T K S S P R A L A A R E R K R K R S R G

Synthesiert am MPI-Dortmund von Sascha Gentz

Antikörper

polyklonaler Kaninchen- α -His-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

HA-probe (F-7) mouse monoclonal IgG2a (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

Marker

Proteinstandard für SDS-Page (GE Healthcare, Freiburg)

97000 Da (Phosphorylase b), 66000 Da (Albumin), 45000 Da (Ovalbumin), 30000 Da (Carbonic Anhydrase), 20100 Da (Trypsin Inhibitor), 14400 Da (Lactalbumin)

Standard für die Größenausschlusschromatographie

Proteinstandard für analytische Gelfiltration (Bio-Rad, München)

670000 Da (Thyroglobulin), 158000 Da (Bovine gamma-Globulin), 44000 Da (Chicken Ovalalbumin), 17000 Da (Equine Myoglobin), 1350 Da (Vitamin B12)

3.1.8 Geräte

Autoklav: Varioklav (H+P Labortechnik, Oberschleissheim)

Brutschrank: Heraeus CO₂ Auto zero (Heraeus, Hanau)

ESI-Massenspektrometer Agilent 1100 (Hewlett Packard, Texas, USA)

Fluoreszenzspektrometer: FluoroMax-3 Spectrofluorometer (SPEX Instruments, Edison, U.K.)

FPLC (*fast protein liquid chromatography*): Äkta prime (GE Healthcare, Freiburg)

Gefriergerät: Heraeus Herafreeze (Heraeus, Hanau)

Heizschüttler: eppendorf Thermomixer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)

HPLC (*high performance liquid chromatography*): Waters 616/626 System mit 2487 Dual λ Absorbance Detector, 717plus Autosampler und Inline Degasser AF (Waters, Milford, USA)

konfokales Mikroskop LSM (Zeiss, Göttingen)

Kühlzentrifuge: eppendorf 5810 R (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)

Microfluidizer: M-110S (Microfluidics Corp., Newton, U.K.)

Mikrokalorimeter: VP-ITC (Microcal, Northampton, U.K.)

Mikroskop: Axiolab (Carl Zeiss, Jena)

NMR-Spektrometer: Varian Inova 600 Spektrometer (NMR) (Varian Inc., USA)

PAGE-Gelkammer: Bio-Rad Mini-Protean III (Bio-Rad, München)

PCR-Maschine PCR-Express (Hybaid, Heidelberg)

Photometer: eppendorf Biophotometer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)

Plattenfluoreszenzspektrometer: Tecan Safire (Tecan, Zürich, Schweiz)

Schüttler (Brunswick, Nürtingen)

Semi-Dry Trans-Blot Apparatur (Biometra, Göttingen)

Sterilbank: Heraeus (Heraeus, Hanau)

Ultraschallbad: Sonorex Super RK 103H (Bandelin electronic, Berlin)
 Ultraschallgerät: Branson Sonifier W-250 (Branson, Danbury, USA)
 Ultrazentrifuge: Beckman TL Ultracentrifuge (Beckman, Fullerton, USA)
 Vortexer: Vortex Genie² (Bender & Hobein, Bruchsal)
 Voyager-DE pro MALDI Massenspektrometer (Perseptive Biosystems, Weiterstadt)
 Waage: Satorius BP110S (Satorius, Göttingen)
 Zentrifuge: Beckman Coulter Avanti J-20 XP (Beckman, Fullerton, USA)
 Zentrifuge: eppendorf 5415 D (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)

3.1.9 Materialien für die eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie

Medien und Zusätze für das Baculoexpressionssystem:

fötales Rinderserum, FBS South American (CE) (Sigma, München)
 Medium für Insektenzellen: TC 100 Insect Medium with Glutamine without NaHCO₃ (Pan-Biotech, Aidenbach)
 Detergenz: Pluronic F-68, 10% (Pan-Biotech, Aidenbach)

Medien und Zusätze für NIH3T3-Zellen:

Fötales Kälberserum, FCS (Sigma, München)
 Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (GibcoBRL, Egenstein)
 Medien und Zusätze für die prokaryotische Zellkultur:

LB-Medium: 10 g Pepton(140)-Hydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1000 ml, pH 7.2

Minimalmedium zur heteronuklearen Markierung von Proteinen:

je Liter 0,5 g NaCl, 1,3 ml Spurenelementlösung, 1 g Zitronensäuremonohydrat, 36 mg Eisencitrat, 4,02 g KH₂PO₄, 5,96 g K₂HPO₄, 1 ml Zink-EDTA Lösung, 2 ml MgSO₄ 1 g ¹⁵NH₄Cl, 25 ml 20% Glukoselösung oder 2 bis 3 g ¹³C-Glukose

Spurenelementlösung: 2,5 g/l Borsäure, 2,0 g/l CoCl₂ · 6 H₂O, 1,1 g/l CuCl₂ · 2 H₂O, 9,8 g/l MnCl₂ · 2 H₂O, 2,9 g/l Na₂MoO₄ · 2 H₂O

Zink-EDTA Lösung: 5 mg/ml EDTA, 8.4 mg/ml Zn(Ac)₂

Antibiotika

Ampicillin (Serva, Heidelberg)
 Penicilin (GibcoBRL, Egenstein)
 Streptomycin (GibcoBRL, Egenstein)

Isotopen-markierte Zusätze vor die Herstellung heteronuklear markierter Proben für die NMR

¹⁵N Ammoniumchlorid (Euriso-top, Saarbrücken)

¹³C-Glukose (Euriso-top, Saarbrücken)

3.1.10 Mikroorganismen und Zelllinien

Prokaryotische Zelllinien

E.coli-Stamm BL21 (DE3) (Novagen, Darmstadt) (Studier and Moffatt, 1986)

Genotyp: F- ompT hsdSB (r_B m_B) gal dcm rne 131 (DE3)

E.coli-Stamm TG1 (Zymo Research CA) (Carter et al., 1985)

Genotyp: lac-pro, thi-1, supE, hsd Δ 5, [F' tra Δ 36, proAB+, lacIQ, lacZ.M15]

E.coli-Stamm DH10-Bac (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)₈₀lacZ Δ M15 Δ lacX74 racA1 endA1
araD139 D(ara, leu)7697 galU galK rpsI nupG/bMON14272/pMON7124

Eukaryotische Zelllinien

Sf9-Zellen: Zellen aus dem Eierstockgewebe der Puppe der Raupe *Spodoptera frugiperda*, die mit Baculoviren infiziert werden können und so zur Expression auch großer eukaryotischer Proteine mit den entsprechenden eukaryotischen posttranslationalen Modifikation geeignet sind (Smith et al., 1985; Vaughn et al., 1977).

NIH3T3: murine embryonale Fibroblastenzelllinie, adhären.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Gerichtete Mutagenese

Punktmutationen wurden mittels der Megaprimermethode in das Plasmid eingeführt. Dazu werden in zwei getrennten Ansätzen zwei lange Oligonukleotide (Megaprimers) mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) generiert und amplifiziert. Dabei wird im ersten Ansatz die DNA bis zur Punktmutation hergestellt, im zweiten Ansatz wird der Bereich ab der Punktmutation bis zum Ende der DNA-Matrix synthetisiert. Die gewünschte Mutation ist im *reverse*-Primer des ersten Ansatzes und im *forward*-Primer des zweiten Ansatzes enthalten. Es folgt eine zweite PCR, bei der die DNA der beiden Ansätze zusammen mit dem *forward*-Primer des ersten Ansatzes und dem *reverse*-Primer des zweiten Ansatzes vervielfältigt wird. Durch Hybridisierung der beiden Megaprimers über den Bereich der Punktmutation wird die DNA komplementiert und kann amplifiziert werden.

Tabelle II: Pipettierschema für die PCR zur Darstellung von Punktmutanten mittels der Megaprimermethode

	Konzentration	Volumen / μl
Matrizen-DNA	$\sim 200 \text{ ng}/\mu\text{l}$	1
dNTP	2,5 mM	4
Primer	10 pmol/ μl	1
Primer	10 pmol/ μl	1
<i>expand high fidelity</i> Polymerase	5000 U/ml	0,5
Polymerasepuffer	10x	5
ddH ₂ O		38

Tabelle III: Zyklusparameter für die Megaprimers-PCR. Die Hybridisierungstemperatur T_{Hyb} errechnet sich aus folgender Formel: $T_{\text{Hyb}} = 4^{\circ}\text{C} \times (\text{Anzahl G} + \text{C}) + 2^{\circ}\text{C} (\text{Anzahl A} + \text{T}) - 5^{\circ}\text{C}$.

	Temperatur	Zeit / s
Denaturierung	96	120
25x Denaturierung	94	15
25x Hybridisierung	T_{Hyb}	30
25x Extension	72	45-60
abschließende Extension	72	420

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse und Präparation werden doppelsträngige DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe durch Agarosegelelektrophorese getrennt. Dabei wandert die negativ geladene DNA im elektrischen Feld zur Anode. Große DNA-Fragmente benötigen länger als kleinere Fragmente.

Für die Gelelektrophorese wurde ein Gel mit 1-2%igem Agaroseanteil hergestellt und nach Auftragen der DNA und des LMW-Markers (Invitrogen) eine konstante Spannung von 110 V angelegt. Die Proben wurden mit 6x-Probenpuffer versetzt. Der TBE-Laufpuffer sowie das Gel enthielten 0.01% Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert und so die DNA im UV-Licht sichtbar macht.

TBE-Puffer	89 mM Tris pH 8,9 89 mM Borsäure 0,9 mM EDTA
------------	--

6x-Probenpuffer	10% Ficoll 0,025% Bromphenolblau 0,025% Xylencyanol in TBE-Puffer
-----------------	--

3.2.3 Restriktionsverdau

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit dem Vektor müssen beide mit entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt werden, um eine spezifische Insertion zu gewährleisten. Dabei erkennen die Enzyme individuelle DNA-Sequenzen doppelsträngiger DNA und spalten diese an der spezifischen Stelle. Der Restriktionsverdau kann zur Analyse der hergestellten DNA dienen oder bei der Generierung neuer Plasmide verwendet werden.

Zur Durchführung eines Restriktionsverdaus werden die vom Hersteller der Restriktionsenzyme (New England Biolabs) angegebenen Pufferbedingungen eingestellt. Der Ansatz wird mindestens zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2.4 Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung eines Qiagen Gelextraktionskits nach Angaben des Herstellers.

3.2.5 Ligation

Nach Verdau und Isolierung der DNA-Fragmente werden diese in einen Vektor überführt. Dies wird von dem Enzym Ligase (New England Biolabs) bewerkstelligt, das das freie 3'-Hydroxy- mit dem 5'-Phosphatende verknüpft.

Tabelle IV: Pipettierschema für einen Ligationsansatz.

	Volumen / μl
verdauter Vektor	1
verdautes DNA-Fragment	8
10x-Ligationspuffer	2
T4-DNA-Ligase	1
ddH ₂ O	5

3.2.6 Transformation

Zur Vermehrung von Plasmiden oder zur Expression von Proteinen müssen die hergestellten Plasmide in die *E.coli*-Bakterien transformiert werden. Dies erfolgte mit der Hitzeschockmethode, bei der kompetente Bakterien eingesetzt werden, deren Membran durch Behandlung mit DMSO durchlässig ist. Durch einen Hitzeschock bei 42°C wird die DNA nach Inkubation auf Eis aufgenommen.

Zur Transformation wurde eine Suspension kompetenter Bakterien auf Eis langsam aufgetaut und mit dem Ligationsansatz bzw. dem hergestellten Plasmid 30 bis 45 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 Sekunden bei 42°C. Die Bakterien wurden für zwei Minuten auf Eis gestellt, anschließend mit LB-Medium versetzt und 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Die Suspension wurde auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C stehen gelassen.

3.2.7 Isolierung der Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde je nach benötigter Menge mittels Mini- und Midiprepkits der Firma Qiagen aus Bakterien gereinigt. Dabei wurden die entsprechenden Herstellerprotokolle verwendet. Die Reinigung beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und anschließender Fällung der Proteine mit Kalium-Dodecylsulfat sowie Trennung durch Ionenaustauschchromatographie. Die DNA wurde schließlich in H₂O oder TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

TE-Puffer: 10 mM Tris, pH 8,0
 1 mM EDTA

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde mit der Kettenabbruchmethode durch Zyklussequenzierung in Gegenwart von Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden durchgeführt (Sanger et al., 1977). Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente werden kapillargelelektrophoretisch getrennt und die Fluoreszenz detektiert. Aus dem erhaltenen Chromatogramm lässt sich die Sequenz ablesen, da jedes Didesoxynukleotid eine andere Fluoreszenzmarkierung besitzt.

Zur Sequenzierungs-PCR wurde ein Big-Dye Terminator-Mix verwendet, der die AmpliTaq-DNA-Polymerase und die vier Fluoreszenz-markierten ddNTPs enthält:

Tabelle V: Reaktionsansatz für die DNA-Sequenzierung

	Volumen / μl
Terminator-Mix	4
Sequenzierungspuffer	2
Miniprep-DNA	1
Sequenzierungsprimer	1
ddH ₂ O	10

Die PCR hatte folgende Parameter:

Tabelle VI: Parameter für die Sequenzierungs-PCR

	Temperatur	Zeit / s
25x Denaturierung	96°C	10
25x Hybridisierung	55°C	5
25x Extension	60°C	240

Anschließend wurden die Reaktionsprodukte mit Ethanol gefällt und das Pellet nach einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol getrocknet. Die Kapillargelelektrophorese und Aufnahme des Chromatogramms erfolgte in der zentralen Einrichtung für Biotechnologie am MPI-Dortmund.

3.2.9 Glyzerindauerkulturen

Zur Lagerung transformierter Bakterien wird die Bakterienkultur bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 wachsen gelassen und 800 μl Bakteriensuspension mit 1200 μl 50% Glycerin vermischt. Nach dem Schockfrieren in flüssigem Stickstoff können die Kulturen bei -80°C gelagert werden.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Proteinexpression und Zellernte

Zur Proteinexpression wurden typischerweise BL21 (DE3)-Zellen verwendet, die zunächst über Nacht in einer Vorkultur mit Antibiotikum wachsen gelassen wurden. Damit wurde die Hauptkultur beliebiger Größe mit einer $OD_{600} = 0,05-0,1$ inokuliert und bei 37°C geschüttelt. Je nach gewünschter Expressionstemperatur wurde die Temperatur bei $OD_{600} = 0,3-0,4$ heruntergeregelt und die Zellen induziert, wenn eine $OD_{600} = 0,6-0,8$ erreicht wurde. Die Induktion erfolgte je nach zu exprimierendem Protein mit IPTG (Isopropyl-1-Thio-D-Galactopyranosid) einer Konzentration von $0,1-0,5$ mM. Bei einer Expressionstemperatur von 37°C wurden die Zellen nach vier Stunden durch Zentrifugieren geerntet, bei niedrigeren Temperaturen lag die Expressionsdauer bei sechs bis 14 Stunden. Nach der ersten Zentrifugation bei $5000 \times g$ für 20 Minuten bei 4°C wurde das Bakterienpellet in PBS resuspendiert und nochmals bei $5000 \times g$ 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Bakterien konnten sofort aufgeschlossen werden oder wurden bei -80°C gelagert.

PBS 130 mM NaCl
 10 mM NaP_i , pH 7,2

3.3.2 Zellaufschluss

Die Bakterien wurden entweder mittels eines Mikrofluidizers oder durch Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die Bakterien in Lysepuffer resuspendiert, der je nach zu reinigendem Protein eine individuelle Zusammensetzung hatte. Im Falle der Verwendung eines Mikrofluidizers wurde die Bakteriensuspension mehrmals in eine enge Kapillare gegeben und durch Hochdruck (800 bar) die Zellmembranen zerstört. Bei der Anwendung eines Ultraschallgerätes wurden die Bakterien im Aufschlusspuffer mit Unterbrechungen auf Eis insgesamt etwa fünf Minuten Ultraschall ausgesetzt, wodurch ebenfalls die Membran zertrümmert wird. Zur Kontrolle des vollständigen Aufschlusses konnte die Suspension unter dem Mikroskop begutachtet werden. Anschließend wurde das Lysat bei $15000 \times g$ für 45 Minuten bei 4°C zentrifugiert und die unlöslichen Bestandteile von der zytosolischen Fraktion getrennt.

3.3.3 Nickelaffinitätschromatographie

Die Nickelaffinitätschromatographie wurde zur Reinigung der Proteine mit Hexahistidinaffinitätsanker verwendet. Dabei kam das Ni-NTA- (Nickel-Nitrilo-tri-essigsäure) Säulenmaterial der Firma Qiagen zum Einsatz. An das NTA-Material sind Ni^{2+} -Ionen so komplexiert, dass noch zwei weitere Ligandenbindungsstellen frei zugänglich sind. Die Histidine am Hexahistidininfusionsprotein binden spezifisch an diese Bindungsstellen im nanomolaren Bereich, während andere Proteine nicht binden

und unspezifische Bindungen durch Waschen gelöst werden können. Das Protein wird mittels Imidazol eluiert, das mit dem Hexahistidinanker um die Bindungsstellen am Nickel konkurriert.

Die zytosolische Fraktion nach dem Zellaufschluss wurde auf eine äquilibrierte Nickelsäule gegeben und anschließend solange gewaschen, bis die keine Absorption mehr detektiert wurde. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, enthielt der Laufpuffer 20 mM Imidazol. Anschließend wurde das gewünschte Protein mit 200-400 mM Imidazol eluiert und fraktioniert. Die Fraktionen wurden auf Reinheit geprüft und Protein-haltige Fraktionen vereint. Das Imidazol wurde bei der Dialyse oder Gelfiltration entfernt.

3.3.4 Glutathionaffinitätschromatographie

Proteine mit GST- (Glutathion-S-Transferase) Affinitätsanker wurden mit GSH- (Glutathion) Säulen gereingt. Glutathion ist das natürliche Substrat der Glutathion-S-Transferase und bindet hochaffin an GST. Es wurde Säulenmaterial der Firma GE Healthcare verwendet.

Die lösliche Fraktion nach dem Zellausschluss werden über das Säulenmaterial mit gekoppeltem GSH gegeben, wobei die GST-Affinitätsankerfusionsproteine an das GSH binden und die übrigen Proteine durch Hochsalzlösung (1 M NaCl) entfernt werden. Durch GSH-haltigen Puffer (20 mM GSH) wird das GST-Fusionsprotein eluiert.

3.3.5 Präparative Gelfiltration

Anders als bei der Affinitätschromatographie werden die Proteine bei der Gelfiltration (oder Größenausschlusschromatographie) nicht durch Bindung an die Matrix, sondern aufgrund ihrer Größe und Form getrennt. Die Matrix besteht hier aus porösen Kugeln, deren Poren eine definierte Größe besitzen. Diese limitieren die Permeation großer Moleküle in die Kugeln, so dass sie einen kürzeren Weg durch die Matrix haben als Moleküle, die kleiner als die Poren sind. So eluieren große Moleküle früher.

Die Größenausschlusschromatographie diente hier zur weiteren Reinigung von Proteinen, die nach der Affinitätschromatographie noch Verunreinigungen aufwiesen, jedoch auch zum Pufferwechsel. Dabei war die Trennung umso besser, je kleiner das Volumen an Proteinlösung war, das auf die Säule gegeben wurde (0,5-1,5 ml). Es wurden je nach Größe der zu trennenden Moleküle Superdex 75 16/60 bzw. Superdex 200 16/60 Gelfiltrationssäulen (GE Healthcare) verwendet. Die Flussrate betrug hier maximal 1,5 ml/min. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert und die Fraktionen mit dem gewünschten Protein vereint.

3.3.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Reinheit und Integrität von Proteinen erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese. Dabei wurden diskontinuierliche Gele verwendet, die aus einem Trenn- und Sammelgel bestehen. Die Gele setzten sich aus dem Tris-HCl/Tris-Glyzin-Puffersystem nach Laemmli zusammen (Laemmli, 1970). Die Trennung der Proteine erfolgte nach ihrer Größe. Das Molekulargewicht konnte durch Vergleich der Banden des Molekulargewichtsstandards abgeschätzt werden. Die Gele wurden nach folgender Anleitung hergestellt (siehe Tabelle VII).

Tabelle VII: Pipettierschema zur Herstellung der SDS-Gele.

	Trenngel 15%	Trenngel 18%	Sammelgel 6%
ddH ₂ O	2,4 ml	1,1 ml	1.35 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	3,9 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	0,625 ml
30% (w/v) Acrylamid	5 ml	9 ml	0,025 ml
10% SDS	0,1 ml	157 µl	0,025 ml
TEMED	5 µl	4,7 µl	1,25 µl
APS	50 µl	157 µl	12,5 µl

Nach Polymerisation konnten auf das Gel Proteinproben in Probenpuffer aufgetragen werden und die Proteine im elektrischen Feld getrennt werden. Die Spannung betrug dabei 200 V. Anschließend wurde das Gel mit Färbelösung gefärbt und wieder entfärbt, wobei der Farbstoff nur an den Proteinen gebunden bleibt.

Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
10x Laufpuffer	250 mM Tris-HCl pH 8,3 2 M Glyzin 1% (w/v) SDS

Probenpuffer	62,5 mM Tris/HCl 25% (v/v) Glycerin 2% SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau 10% (w/v) β -Mercaptoethanol
Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie R250 5% (v/v) Essigsäure 10% (v/v) Ethanol
Entfärbelösung	5% (w/v) Essigsäure 10% Ethanol

3.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976a) sowie über die UV-Absorption A_{280} bestimmt.

Die erste Methode beruht darauf, dass der Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau an die Seitenketten der Aminosäuren Arginin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin bindet und dadurch die anionische Form des Farbstoffs stabilisiert wird. Gegenüber der ungebundenen, kationischen Form wird das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verschoben. In dieser Arbeit wurde das Bradford-Reagenz der Firma BioRad verwendet und die Bestimmung nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration über die UV-Absorption wird die Eigenschaft aromatischer Aminosäuren ausgenutzt, bei 280 nm zu absorbieren. Dazu müssen die Proteine mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid vollständig denaturiert werden. Zur Berechnung der Konzentration dient folgende Formel:

$$C = \frac{Absorption \cdot 100}{\epsilon} \cdot MW$$

Formel 1: Berechnung der Proteinkonzentration über Messung der UV-Absorption. C: Konzentration in g l^{-1} , ϵ : Extinktionskoeffizient in $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, MW: Molekulargewicht in g mol^{-1} .

Der Extinktionskoeffizient wurde durch Eingabe der Proteinsequenz in das Onlineprogramm Protparam (<https://us.expasy.org>) berechnet.

3.3.8 Konzentrierung der Proteine

Zur Erhöhung der Proteinkonzentration wurden die Proteinlösungen mit Ultrafiltrationseinheiten der Firma Amicon konzentriert, deren Membranen Poren mit einer definierten Größe besitzen. Durch Zentrifugation bei maximal 3500 x g wird durch die Fliehkraft die Proteinlösung durch die Membran gedrückt. Moleküle mit geringerer Größe als die Poren der Membran passieren sie leichter, während größere Moleküle an der Membran hängen bleiben. So reichern sich durch Volumenabnahme die Proteine an. Die Proteinlösung wird so lange zentrifugiert, bis die gewünschte Konzentration erreicht ist.

3.3.9 Klonierung und Reinigung der FHOD1-Konstrukte

Die FHOD1-Konstrukte wurden meist sowohl in pGEX-Vektoren zur Proteinexpression als GST-Fusionsprotein als auch in pProEx-Vektoren zur Proteinexpression als Hexahistidinfusionsprotein kloniert. Je nach Expressionsverhalten, Stabilität, Reinheit und Löslichkeit wurde entschieden, welcher Affinitätsanker für die Proteinexpression besser geeignet war und die Expressionsbedingungen optimiert.

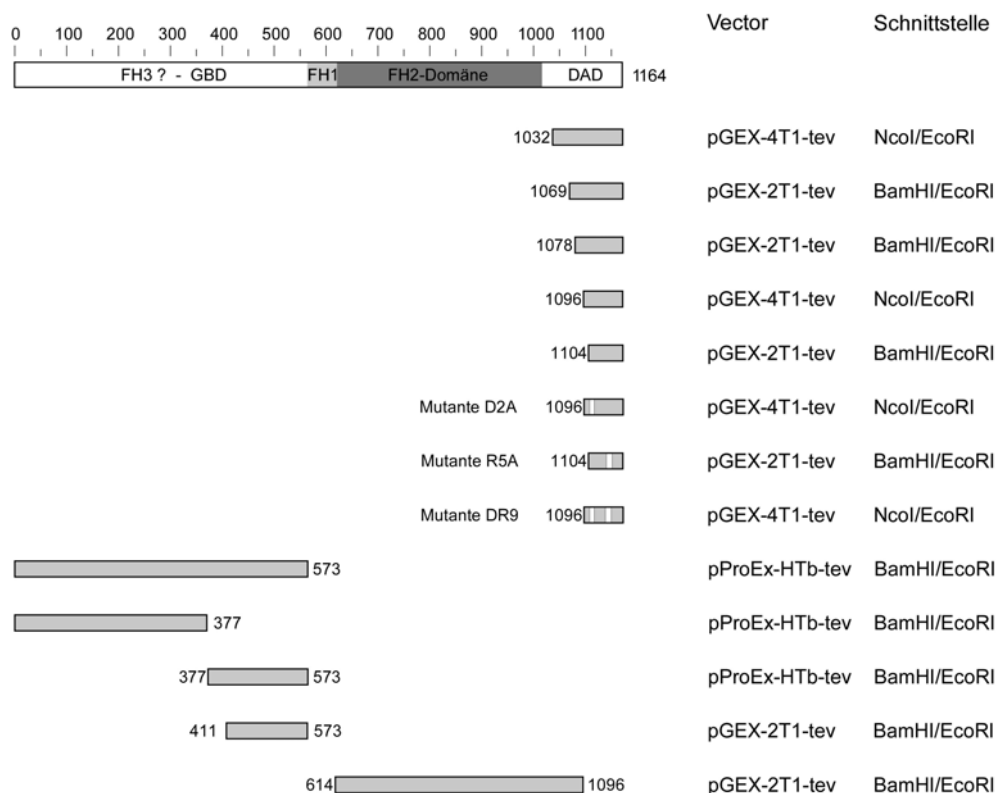


Abbildung 14: Schematische Darstellung der in dieser Studie hergestellten FHOD1-Konstrukte. Gezeigt sind die Konstrukte, bei denen die Expression und Reinigung erfolgreich war. Die Zahlen im Schema geben die Grenzen der Konstrukte in der Proteinprimärsequenz an, rechts sind die Vektoren mit den benutzten Restriktionsschnittstellen angegeben.

In Abbildung 14 sind die für die Proteinexpression verwendeten Konstrukte und dargestellt sowie die ausgewählten Vektoren. Alle FHOD1-Konstrukte wurden auf Grundlage der DNA-Sequenz von humanem *fhod1* (GenBank-Zulassungscode: AF113615) hergestellt. Die C-terminalen FHOD1-DAD-Konstrukte (1032-, 1096-, 1078-, 1096-, 1104-1164, sowie die DAD-Mutanten D2A, R5A und DR9) wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert und gereinigt. Dazu wurden die Plasmide in BL21(DE3)-Zellen transformiert und bei einer Expressionstemperatur von 30°C nach Induktion mit 0,3 mM IPTG bei $OD_{600} = 0,6-0,8$ fünf Stunden exprimiert. Die Bakterien wurden in Lysepuffer (20 mM Tris/HCl), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und im Mikrofluidizer aufgeschlossen. Zum besseren Aufschluss wurde anschließend 3% CHAPS zugesetzt. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile und dem Auftragen auf die mit Lysepuffer äquilibrierte GSH-Säule wurden die Proteine mit Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen und anschließend mit 10 mM GSH eluiert. Sollte der GST-Affinitätsanker entfernt werden, wurde das Protein mit der TEV-Protease über Nacht bei 4°C verdaut. GSH und der GST-Affinitätsanker wurden mittels einer Superdex 75-Säule und einer zweiten GSH-Säule entfernt. Uniform ^{15}N -markierte und/oder ^{15}N - ^{13}C -markierte DAD wurde in Minimalmedium mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ und ^{13}C -Glukose als einzige Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle über Nacht exprimiert und wie oben beschrieben gereinigt (siehe Kapitel 3.1.9).

Das FHOD1-FH2-Konstrukt (614-1096) wurde ebenfalls als GST-Fusionsprotein exprimiert und wie oben beschrieben exprimiert. Allerdings wurde hier ein anderer Reinigungspuffer verwendet, da das Protein auch als GST-Fusionsprotein einen isoeletrischen Punkt im alkalischen Bereich hatte. Es wurde als Lysepuffer 50 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, 1 mM DTE, pH 6,5 verwendet. Der Waschpuffer enthielt 1 M NaCl und der Elutionspuffer 20 mM GSH. Zur Abtrennung von Verunreinigungen wurde das Protein über eine Superdex 200-Säule gereinigt.

Bei den N-terminalen FHOD1-Fragmenten wurden die Proteine FHOD1 (1-573, 1-377 und 377-573) als Hexahistidinfusionsproteine exprimiert, das Fragment (411-573) als GST-Fusionsprotein, das wie die FHOD1-DAD-Konstrukte gereinigt wurde. Zur Reinigung der Hexahistidinfusionsproteine wurden die Bakterien in Lysepuffer (20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol) aufgenommen und mit dem Mikrofluidizer aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden abgetrennt und die Lösung auf die mit Lysepuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule gegeben. Es wurde solange gewaschen, bis keine Absorption mehr zu detektieren war und anschließend mit 250 mM Imidazol eluiert. Das Imidazol wurde durch Dialyse oder Gelfiltration entfernt. Der Hexahistidinanker wurde bei Bedarf durch Verdau mit der TEV-Protease über Nacht in Gegenwart von EDTA abgespalten.

Bei jeder Reinigung wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE auf Reinheit untersucht und die Fraktionen vereint, die das gewünschte Protein enthielten. Anschließend wurde das Protein konzentriert, die Konzentration bestimmt und nach dem Schockfrieren bei -80°C gelagert.

Die Plasmide der in dieser Studie verwendeten Rho-GTPasen Rac1(1-184), RhoA (1-181) sowie Cdc42 (1-178) waren freundliche Überlassungen von Dr. Reza Ahmadian, MPI Dortmund. Das

Plasmid mit dem Rac1-Volllängenprotein wurde freundlicherweise von Dr. Oliver Fackler, Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Anstelle einer TEV-Schnittstelle besitzen die hergestellten Rho-GTPasen-Fusionsproteine eine Thrombin-Schnittstelle. Die Expression und Reinigung erfolgte wie oben für GST-Fusionsproteine beschrieben, jedoch musste in jedem Puffer 1 mM MgCl₂ zugegen sein.

3.3.10 Nukleotidaustausch bei GTPasen

Zur Darstellung aktiver Rho-GTPasen wurde das im inaktiven Zustand gebundene GDP gegen das nicht hydrolysierbare GTP-Analog GppNHp ausgetauscht. Ist dieses an der GTPase gebunden, nimmt diese die aktive Konformation stabil an. Zum Nukleotidaustausch wurden die Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 mit doppeltem molarem Überschuss an GppNHp in Gegenwart von 200 µM Ammoniumsulfat, 0,1 µM Zinkchlorid und 1 U alkalischer Phosphatase pro Milligramm GTPase über Nacht bei 4°C inkubiert. Dabei wird GDP zu Guanosin hydrolysiert, das von der GTPase dissoziiert. Das GppNHp im Puffer hat eine hohe Affinität zur GTPase, womit der Nukleotidaustausch vollzogen ist. Überschüssige Nukleotide wurden durch Gelfiltration mittels einer PD-10-Säule (GE Healthcare) entfernt. Der Austausch des Nukleotids wurde mittels einer C₁₈-HPLC-Säule (Bischoff Chromatographie) kontrolliert.

3.3.11 Baculovirusexpression von nativem FHOD1-Volllängenprotein

Das Baculoexpressionssystem ermöglicht im Gegensatz zum *E.coli*-Expressionssystem auch die Expression großer eukaryotischer Proteine. Weitere Vorteile sind die eukaryotischer Codonnutzung, die Möglichkeit posttranslationale Veränderungen am Protein durchzuführen, wie z.B. Phosphorylierungen, Glykosylierungen, etc., sowie eine Erhöhung der Löslichkeit des Proteins durch korrekte Faltung, die durch Faltungshelferenzyme herbeigeführt wird.

Es wurden zur Expression Sf9-Zellen verwendet, die aus Ovarienzellen der Raupe *Spodoptera frugiperde* isoliert wurden. Die Zellen werden in TC100-Medium mit 10% hitzedeaktiviertem fötalem Kälberserum und 1% Pluronic F-68 entweder adhärent in einer Petrischale oder als Suspensionskultur in Erlenmeyerkolben oder Fernbachkolben bei einer Temperatur von 27°C kultiviert. Die Flüssigkulturen wurden bei 60 rpm zur besseren Sauerstoffversorgung der Zellen geschüttelt. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 10⁶ Zellen/ml ausgesät und alle zwei Tage subkultiviert. Dazu wurden die Zellen mit einer Neubauerkammer gezählt und wieder auf eine Zelldichte von 10⁶ Zellen/ml verdünnt.

Für die Proteinexpression mit Baculovirus ist es zunächst notwendig, das *fhod1*-Gen zur Rekombination in ein Bacmid in *E.coli* DH10Bac-Zellen zu transformieren. Nach Überprüfung der Rekombination wird die Bacmid-DNA isoliert. Diese DNA wird in die Insektenzellen transfiziert und

die Zellen zwei Tage wachsen gelassen, wobei die Viren amplifiziert werden. Die Virusstammlösung wurde durch Klärung hergestellt und dunkel bei 4°C gelagert.

Die Expression von nativem FHOD1-Vollängenprotein wurde bei einer Zelldichte von 2,0 bzw. 2,5 x 10⁶ Zellen/ml in einem Volumen von 3 l Kompletmedium durchgeführt. Vor der Expression wurde das Medium vollständig gewechselt. Dazu wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 3500 rpm und 20°C zehn Minuten pelletiert und das Pellet in frischem Kompletmedium aufgenommen. Die Zellen wurden mit einer MOI (engl.: *multiplicity of infection*) von 5 infiziert und bei 27°C und 60 rpm vier Tage schütteln gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 2000 rpm geerntet, in kaltem 1x PBS-Puffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Das Pellet konnte bei -20°C gelagert werden.

3.3.12 Reinigung von nativem FHOD1-Vollängenprotein

Das S9-Zellpellet wurde durch Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen in Aufschlusspuffer (50 mM Hepes, 200 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, 5% Glycerin, 1 mM PMSF, pH 8,5) resuspendiert und unter Verwendung der Arbeitsspitze im Eiswasserbad mit Ultraschall behandelt. Die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde unter dem Mikroskop überprüft. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile bei 8000 rpm für 20 Minuten pelletiert und der Überstand sterilfiltriert. Diese Lösung wurde auf eine mit Laufpuffer (200 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, 5% Glycerin, 20 mM Imidazol, pH 8,5) äquilibrierte Ni-NTA-Säule gegeben und mit 80 Säulenvolumen des Laufpuffers gewaschen. Das Protein wurde durch 250 mM Imidazol eluiert und fraktioniert. Nach Kontrolle der Reinheit wurden die Fraktionen mit FHOD1-Vollängenprotein vereint und konzentriert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) injiziert, die zuvor mit 50 mM Hepes, 200 mM KCl, 2% Glycerin, 1 mM DTE, pH 8,0 äquilibriert wurde. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese auf Anwesenheit und Reinheit des FHOD1-Vollängenproteins untersucht und die saubersten Fraktionen vereint. Zusätzlich waren noch andere Banden zugegen, die ebenfalls vereint wurden (siehe Kapitel 4.2)

3.3.13 GST-Pull-down-Experimente

GST-Pull-down-Experimente sind Bindungsuntersuchungen, bei denen ein Bindungspartner als GST-Fusionsprotein an GST-Beads immobilisiert ist und durch Inkubation mit Proteinlösungen Bindungspartner gefunden werden können.

Zur Immobilisierung des GST-Fusionsproteins wurde dies in 500 ml LB-Medium exprimiert und die Zellen nach Ernte und Resuspendierung in PBS mit 1 mM PMSF mittels Ultraschall aufgeschlossen. Es wurde 0,5% Tween zugegeben und die unlöslichen Bestandteile bei 10000 x g zehn Minuten bei

4°C pelletiert. Zur löslichen Fraktion wurden zuvor äquilibrierte GST-Beads gegeben und zwei Stunden bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden die Beads durch zweimalige Zentrifugation und Resuspendierung mit PBS mit 0,5% Tween gewaschen. Die so hergestellten GST-Protein-Beads wurden gelelektrophoretisch untersucht.

Zur Durchführung eines GST-Pull-down-Experiments wurden typischerweise 2 µg GST-Protein-Beads eingesetzt und in einem Volumen von 500 µl 0,5-1 nmol des zweiten Proteins zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Beads drei- bis fünfmal gewaschen, in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und/oder Western Blot analysiert.

3.3.14 Westernblot

Das Western Blot-Verfahren ist eine sensitive Methode zum spezifischen Nachweis von Proteinen. Dazu werden die Proteine nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf eine Protein-bindende Membran übertragen und mit Protein-spezifischen Antikörpern und einem sekundären Antikörper behandelt, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist. Letztere ist in der Lage, einen Farbstoff umzusetzen, dessen Chemilumineszenz auf Fotofilm detektiert werden kann.

Zunächst wurden das SDS-Gel, Whatmanpapier sowie eine PVDF- (Polyvinyliden-difluorid) Membran 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Zwischen zwei Whatman-Papierblättern wurden die Proteine 30 Minuten im elektrischen Feld auf die PVDF-Membran transferiert. Dabei betrug die Spannung 144 V. Die Membran wird dann dreimal für 20 Minuten in PBST gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 5% Magermilchpulver in PBST geblockt, um die Membran mit unspezifisch bindenden Proteinen abzusättigen. Nach drei weiteren Waschschritten wird die Membran mit dem ersten Antikörper eine Stunde inkubiert, der spezifisch gegen das zu identifizierende Protein gerichtet ist. In dieser Studie wurde ein polyklonaler Kaninchen- α -His-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:2000 in PBST mit 5% Magermilchpulver verwendet. Überschüssiger Antikörper wurde in drei Waschschritten in PBST mit 5% Magermilchpulver wieder entfernt und der Blot eine Stunde mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Dazu wurde der Peroxidase-gekoppelte α -Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:4000 in 10 ml 5%iger Magermilchlösung eingesetzt. Wieder wird überschüssiger Antikörper durch Waschen entfernt. Die Proteinbanden wurden unter Verwendung des ECL-Western-Blot-Detection-Kit (GE Healthcare) und eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) sichtbar gemacht.

PBST	130 mM NaCl
	7 mM Na ₂ HPO ₄
	3 mM NaH ₂ PO ₄
	0,05% Tween

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung von NIH3T3-Zellen

Adhärente NIH3T3-Zellen wurden in DMEM mit fötalem Kälberserum, Glutamin und Antibiotika wachsen gelassen. Die Zellen wurden bei 37°C mit 5% CO₂ gehalten. Zum Passagieren wurden die Zellen in PBS gewaschen, mit Trypsin behandelt und in frischem Medium weiter kultiviert. Die Zellen sollen nicht öfter als 20-mal passagiert werden.

3.4.2 Transfektion und Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Deckgläsern ausplattiert, über Nacht inkubiert und anschließend unter Verwendung von Metafectene (Biotex) mit 1 µg Plasmid-DNA transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 3% Paraformaldehyd 15 Minuten bei RT fixiert und mit PBS mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Dann wurden die Zellen durch PBS mit 1% BSA (*bovine serum albumin*) geblockt. Die FHOD1-Proteine besitzen einen HA- (Hämagglutinin) Anker, der durch Markierung mit dem monoklonalen Maus-Antikörper F-7 (Santa Cruz) und angemessenen Mengen des zweiten mit Alexa 488 Fluoreszenz-konjugierten Antikörpers sichtbar gemacht wurde. F-Aktin wurde mit TMR- (Tetramethylrhodamin) konjugiertem Phalloidin (Sigma) gefärbt. Die Zellen wurden mit Histogel (Linaris) befestigt und indirekt Fluoreszenzbilder mit einem Olympus IX70-Mikroskop aufgenommen, die mit Bildbearbeitungssoftware weiterverarbeitet wurden.

3.4.3 Untersuchung der Transkriptionsaktivierung vom SRE

Zur Quantifizierung der Transkriptionsaktivierung des SREs durch FHOD1 wurden 2×10^4 NIH3T3-Zellen mit 1,3 µg FHOD1-Expressionsplasmid, zur Normalisierung der Transkriptionseffizienz 0,2 µg pTK-*Renilla* mit dem Gen für die *Renilla*-Luziferase sowie 0,5 µg des 5xSRE-Luziferase-Reporterplasmids transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion des FHOD1-Expressionsvektors wurde das Medium gewechselt, um die Zellen bei 0,1% FCS aushungern zu lassen. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion geerntet. Die Luziferase-Aktivität wurde mittels eines dualen Luziferase-Reporter-Ansatz (Promega) mit einem Luminoscan Ascent Luminometer (Thermo Labsystems) untersucht. Die Luziferaseeinheiten wurden nach den Werten der *Renilla*-Luziferase-Kontrolle normalisiert. Die FHOD1-wt-Werte wurden willkürlich auf 1 gesetzt und die übrigen Werte als x-fache Aktivierung der Transaktivierung berechnet.

3.5 Biophysikalische Methoden

3.5.1 Isothermale Titrationskalorimetrie

Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC, *isothermal titration calorimetry*) ist eine sehr sensitive Methode, um die thermodynamische Parameter einer Interaktion zweier Moleküle zu messen (Wiseman et al., 1989). Binden zwei Moleküle aneinander, so wird Energie umgesetzt, was sich in den meisten Fällen in einer Wärmeabgabe bzw. -aufnahme äußert, die gemessen werden kann. Das Messprinzip besteht darin, dass eine Messzelle und eine Referenzzelle durch einen elektrischen Regelkreis thermisch gleich bleibend gehalten werden und bei einer Wärmetönung für die Messzelle entsprechend weniger oder mehr Strom nötig ist, die Temperatur relativ zur Referenzzelle konstant zu halten. Die beiden Zellen sind dabei von einem isolierenden Mantel umgeben, um den Austausch von Wärme mit der Umgebung zu verhindern.

Bei einem kalorimetrischen Experiment dieser Studie wurde ein Ligand mit einer Injektionsspritze schrittweise in die Messzelle titriert, das mit einer Lösung des Bindungspartners befüllt war. Die Wärmeänderungen, die bei einer Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein entstehen, werden detektiert und das Integral der Wärmetönung gegen das molare Verhältnis Ligand (Injektant) / Protein (Messzelle) aufgetragen. Eine Titration folgt dabei einem sigmoidalen Kurvenverlauf, aus dem die thermodynamischen Parameter für eine Bindung ΔG , ΔH , ΔS sowie die Stöchiometrie und die Dissoziationskonstante K_d bestimmt werden können.

Die freie Enthalpie ΔG lässt sich durch die Gibbs-Funktion beschreiben:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Formel 2: Gibbs-Funktion. ΔG : freie Enthalpie, ΔH : Enthalpie, ΔS : Entropie, T: Temperatur

Dabei können die Enthalpie ΔH und die Entropie ΔS einen unterschiedlich starken Einfluss auf die freie Enthalpie ΔG haben. Die Wärmeänderungen werden durch die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Protein, Ligand und Lösungsmittel verursacht. Dazu zählen Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen, ionische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte zwischen Ligand und Protein, aber auch durch strukturelle Änderungen der Solvathülle von Protein oder Ligand (Fisher and Singh, 1995).

Die Faktoren, die die Größe von ΔS bestimmen, sind dagegen vielfältigerer Art: Durch das Auflösen der Hydrathülle um die Bindungsstelle herum erhöht sich beispielsweise die Entropie. Durch Komplexbildung werden dem System freie Partikel entzogen und deren Freiheitsgrade verringert. So werden Aminosäureseitenketten und/oder ganze Domänen in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt, was sich in einer negativen Entropieänderung äußern kann (Jelesarov and Bosshard, 1999). Diese Effekte werden deshalb auch als Solvatisierungsentropie bzw. Konformationseuropie bezeichnet.

Die Messungen von ITC-Experimenten dieser Studie fanden an einem VP-ITC-Gerät (Microcal) statt. Das Volumen der Messzelle betrug 1,485 ml, das der Spritze 250 µl. Die Lösung in der Spritze wurde in Schritten von 8 µl in die Zelle injiziert, daraus ergaben sich etwa 32 Injektionen. Die Zeit zwischen den Injektionen betrug vier Minuten. Diese Zeit ist in den meisten Fällen ausreichend für eine Rückkehr des Signals zur Basislinie. Als Messtemperatur wurden 15°C bzw. 25°C gewählt. Vor jeder Messung müssen die Proteinlösungen sterilfiltriert und entgast werden. Beide Bindungspartner müssen in demselben Puffer gelöst sein, um eine von verschiedenen Puffern verursachte Wärmetönung zu verhindern. Dies kann durch Dialyse oder Gelfiltration erfolgen. Kontrollmessungen sind zudem notwendig, um Verdünnungseffekte des injizierten Liganden nachzuprüfen und gegebenenfalls zu korrigieren. Zur Auswertung der Messungen wurde das Programm VP-ITC Origin 7.0 verwendet.

Die Herleitung der verwendeten Gleichung für die Kurvenanpassung ist im Folgenden dargestellt:

Die Assoziationsgleichgewichtskonstante K für die Bindung des Liganden L an das Protein P kann beschrieben werden als

$$K = \frac{\nu}{(1-\nu) \cdot [L]}$$

Formel 3: K : Assoziationsgleichgewichtskonstante in M^{-1} , ν : Bindungsgrad (Anteil der mit Liganden besetzten Bindungsstellen), $[L]$: Konzentration des freien Liganden in M

Die Massenbilanz für den Liganden lautet

$$[L]_0 = [L] + n \cdot \nu \cdot [P]_0$$

Formel 4: $[L]_0$: Gesamtkonzentration des Liganden in M , $[L]$: freie Ligandenkonzentration in M , $[P]_0$: Gesamtkonzentration des Proteins in M , n : Anzahl der Bindungsstellen, ν : Bindungsgrad (Anzahl der mit dem Liganden besetzten Bindungsstellen)

Kombination der beiden Gleichungen liefert:

$$\nu^2 - \nu \cdot \left(1 + \frac{[L]_0}{n \cdot [P]_0} + \frac{1}{n \cdot K \cdot [E]_0} \right) + \frac{[L]_0}{n \cdot [E]_0} = 0$$

Formel 5

Die gemessene Wärme Q bei einem bestimmten Bindungsgrad ν ergibt sich zu

$$Q = n \cdot \nu \cdot [P]_0 \cdot \Delta H \cdot V_0$$

Formel 6: Q: Wärmemenge in J, ΔH : Bindungsenthalpie in J mol⁻¹, V_0 : Messvolumen der Zelle

Durch Auflösen von Formel 5 nach dem Bindungsgrad ν und Einsetzen in Formel 6 wird erhalten:

$$Q = \frac{n \cdot [P]_0 \cdot \Delta H^0 \cdot V^0}{2} \cdot \left(1 + \frac{[L]_0}{n \cdot [P]_0} + \frac{1}{n \cdot [P]_0} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_0}{n \cdot [P]_0} + \frac{1}{n \cdot K \cdot [P]_0} \right)^2 - \frac{4 \cdot [L]_0}{n \cdot [P]_0}} \right)$$

Formel 7: Wärmemenge in J, P_0 : Gesamtkonzentration des Proteins in M, L_0 : Gesamtkonzentration des Liganden in M, V^0 : Messvolumen in der Zelle in l, ΔH : molare Enthalpie der Ligandenbindung in J mol⁻¹, n: Anzahl der Bindungsstellen des Proteins, K: Assoziationsgleichgewichtskonstante in M⁻¹

3.5.2 NMR-Spektroskopie

Bei der Magnetresonanzspektroskopie oder NMR- (*nuclear magnetic resonance*) Spektroskopie handelt es sich um eine Methode, die die Ermittlung von strukturellen Informationen von Molekülen ermöglicht. In dieser Studie wurde die NMR-Spektroskopie verwendet, um die Faltung und Struktur von Proteinen sowie Änderungen der Konformationen von Proteinen durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zu ermitteln. Dazu mussten die Proteine uniform mit den heteronuklearen Atomen ¹⁵N und ¹³C markiert werden, da die ¹H Signale bei Proteinen zu stark überlappen. Diese Isotope besitzen einen Kernspin oder Eigendrehimpuls, der einen magnetischen Dipol oder magnetisches Moment verursacht. Im klassischen Modell wird dieser Spin als Rotation eines Atomkerns um seine Achse beschrieben. Die Frequenz dieser Bewegung wird als Lamorfrequenz oder Resonanzfrequenz bezeichnet.

Jeder Kern hat dabei seine eigene charakteristische Resonanzfrequenz, die vom gyromagnetischen Verhältnis und der Stärke des angelegten magnetischen Feldes abhängt. Das gyromagnetische Verhältnis ist der Proportionalitätsfaktor des Spin/Drehmoment-Verhältnisses:

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{J} = \gamma \cdot \hbar \cdot \sqrt{I(I+1)}$$

Formel 8: $\vec{\mu}$: Drehmoment, \vec{J} : Drehimpuls, γ : gyromagnetisches Verhältnis, \hbar : Plancksches Wirkungsquantum, I : Quantenzahl des Kernspins

Das magnetische Moment koppelt dabei an ein äußeres Magnetfeld und richtet sich parallel (energetisch niedrig) oder antiparallel (energetisch hoch) dazu aus. Zwischen diesen Zuständen können durch einen Radiowellenpuls Übergänge (Ausrichtung in xy-Richtung, Quermagnetisierung) angeregt werden. Die Relaxation zurück in den Grundzustand wird schließlich gemessen. Außer vom Kern hängen die Resonanzfrequenzen auch von der chemischen Umgebung ab. So haben die

räumliche Verteilung der Elektronen und die Art der chemischen Bindung in der unmittelbaren Nähe zum Kern Einfluss auf die Resonanzfrequenz, was als chemische Verschiebung bezeichnet wird (Proctor and Yu, 1950). Um die Spektren verschiedener NMR-Spektrometer mit verschiedenen Feldstärken vergleichen zu können, wird diese chemische Verschiebung relativ zu einem Referenzsignal (z. B. Tetramethylsilan) in ppm (*parts per million*) angegeben.

Mittels der heteronuklearen NMR-Spektroskopie lassen sich die Resonanzsignale eines Proteins den einzelnen Aminosäuren zuordnen (engl.: *assignment*, Zuordnung). Dazu werden verschiedene NMR-Experimente mit speziellen Pulsfolgen mit ^{15}N - und/oder ^{13}C -markierten Proteinen durchgeführt. In der FHOD1-Studie wurden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC- (*heteronuclear single quantum coherence*) Spektren für die Bestimmung der Faltung und der Identifizierung der Bindungsregion der DAD zur FH3-Domäne gemessen (siehe Kapitel 4.3.5). Dabei wird nicht der ^{15}N -Atomkern, sondern das ^1H -Proton angeregt, da es ein erheblich größeres gyromagnetisches Verhältnis besitzt und seine Magnetisierung über die kovalente Bindung auf den ^{15}N -Kern übertragen kann. Im entstandenen zweidimensionalen Spektrum ist also die Protonenfrequenz mit der Stickstofffrequenz verknüpft. Die Signale dieses Spektrums setzen sich zum größten Teil aus den Signalen der Protonen des Amidrückgrats und zusätzlich aus den Resonanzen der Seitenketten von Asparagin, Glutamin, Histidin und Tryptophan zusammen.

Die NMR-Experimente wurden mit homonuklearer FHOD1-DAD oder heteronuklearer ^{15}N -markierter FHOD1-DAD (siehe Kapitel 4.3.5) an einem Varian Inova 600-Spektrometer durchgeführt. Die Proteine waren in Phosphatpuffer (20 mM KPi , pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP) mit einer Proteinkonzentration von 0,6 mM gelöst und wurden in SHIGEMI-Röhrchen bei 25°C gemessen. Die homonuklearen zweidimensionalen Experimente und $^1\text{N}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente wurden nach der Varian-NMR-Pulsfolge mit typischerweise 2048 x 512 Datenpunkten aufgenommen. Nach Überführung der Spektren ins Brukerformat wurden die Spektren mit dem Programm XWINNMR prozessiert und mit dem Programm Aurelia ausgewertet. Die *assignment*-Strategie basierte auf der Identifizierung der individuellen Spinsysteme von homonuklearen TOCSY-Experimenten durch Verfolgung des sequentiellen Pfades mit homonuklearer zweidimensionaler und ^{15}N -separierter dreidimensionalen NOESY-Spektren wie beschrieben (Geyer et al., 1999).

3.5.3 Massenspektrometrie

Mittels Matrix-unterstützter Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) oder Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) kann die Masse eines Proteins bestimmt werden. Die beiden Methoden unterscheiden sich in ihrem Ionisationsprinzip. Beim ESI-Verfahren werden die Proben weitaus schonender als beim MALDI-MS ionisiert.

MALDI-TOF-MS: Die Ionisation der Probe erfolgte hier über eine Matrix, in die das Protein eingebettet wurde. Dazu wurden die Proteinlösung und die Matrixlösung auf einer Metallplatte 1:1

gemischt und durch Verdunsten des Lösungsmittels kokristallisiert. Ein Laserimpuls (1-10 ms, 337 nm N₂-Laser oder 255 nm Nd:YAG-Laser), der von der Matrix absorbiert wird, führt zur Desorption und Ionisation des Gemisches. Die Proteinionen werden nun im elektrischen Feld unter Hochvakuum beschleunigt und nach Flugzeit-Analyse (TOF = *time of flight*) das m/z-Verhältnis kalkuliert. Als Matrix wurde hier Sinapinische Säure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure) in Acetonitril/Wasser und 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) verwendet. Die MALDI-Spektren wurden mit der Voyager Software ausgewertet.

ESI-MS: Das ESI-MS-Verfahren ist gegenüber der MALDI-MS sensitiver aber empfindlicher gegenüber Proteinlösungen mit Salzen. Die Probe wurden daher vor der Messung über eine im Gerät eingebaute C₄-Säule entsalzt und dann direkt über das Einsprühen der Probe in eine Kammer mit hohem elektrischen Potenzial ionisiert. Die dabei entstandene Dispersion wird aufgeladen, so dass viele kleine geladen Tröpfchen gebildet werden. Nach Verdunsten des Lösungsmittels entstehen in der Gasphase protonierte Proteine. In einer Ionenfalle werden die Proteinfragmente analysiert. Zur Auswertung diente das Programm MagTran.

3.5.4 Analytische Größenausschlusschromatographie

Bei der analytischen Größenausschlusschromatographie werden genau wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben die Proteine nach ihren Stokeschen Radien getrennt. Der Unterschied liegt in dem kleineren Maßstab der Säule, so dass wesentlich weniger Probenmenge benötigt wird. Die Säulen hatten ein Volumen von etwa 30 ml im Gegensatz zu präparativen Säulen, die weit über 120 ml Säulenvolumen besitzen. Zur Injektion der Proben sowie zur Detektion und Analyse wurde ein Computer-gesteuertes HPLC-System verwendet, das über zwei-Kanal-Absorptionsdetektoren verfügte. Durch Injektion eines Gelfiltrationsstandards (BioRad) konnte das Elutionsvolumen des zu analysierenden Proteins mit den Werten des Standards korreliert und die Masse eines globulär gefalteten Proteins berechnet werden. Dazu wurden die Elutionsvolumen der Proteine des Standards sowie Ausschlussvolumen und Totalvolumen gemessen und diese der K_{AV} -Wert für die Säule ermittelt:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0}$$

Formel 9: Berechnung des K_{AV} -Wertes, V_e : Elutionsvolumen, V_0 : Ausschlussvolumen, V_T : Totalvolumen

Bei Auftragung der K_{AV} -Werte gegen den Logarithmus der Molekularmasse ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Durch Anpassung einer Ausgleichsgeraden und Berechnung der Geradengleichung lässt sich nun die Masse eines unbekanntes, globulären Proteins aus seinem Laufverhalten kalkulieren.

3.5.5 Aktinpolymerisation

Der Aktinpolymerisationsansatz basiert auf der Fluoreszenzverstärkung von Pyren-konjugiertem G-Aktin, die bei der Polymerisation zu F-Aktin auftritt. Die Verstärkung der Fluoreszenz kann benutzt werden, um die Polymerisation über die Zeit zu beobachten. Es können Zell- oder Gewebeeextrakte sowie gereinigte Proteine zum Reaktionsansatz zugegeben und der Effekt auf die Aktinpolymerisation beobachtet werden.

In dieser Arbeit wurde der Aktinpolymerisationsansatz der Firma Cytoskeleton verwendet und die Lösungen nach Vorschrift des Herstellers hergestellt. 5% der Aktinmoleküle sind hier Pyren-markiert, dessen Fluoreszenzemission bei 405 nm detektiert werden kann, wenn es bei 365 nm angeregt wird. Um eine mögliche F-Aktin-Nukleierungsaktivität zu untersuchen, wurden endogene Nukleierungszentren, die beim Einfrieren und Auftauen der Komponenten des Reaktionsansatzes entstehen, durch Ultrazentrifugation bei 100000 x g für eine Stunde bei 4°C pelletiert. Der Überstand bestand so ausschließlich aus G-Aktin-Lösung. Zur Untersuchung der FHOD1-FH2-Domäne sowie nativem FHOD1-Volllängenprotein wurden immer zwei Reaktionen zur gleichen Zeit in einem Plattenfluoreszenzspektrometer (Tecan) beobachtet. In Tabelle VIII ist dargestellt, wie sich der Reaktionsansatz zusammensetzte.

Tabelle VIII: Pipettierschema des Aktinpolymerisationsansatzes. Das Gesamtvolumen betrug immer 100 µl, das Volumen der Proteinlösung wurde bei jedem Experiment auf exakt 30 µl eingestellt.

	Stammlösung	Volumen / µl	Endkonzentration
Pyren-Aktin-Lösung	10 µM	40	4 µM
FHOD1-Protein	xx µM	x	yy µM
Proteinpuffer	-	30 - x	-
G-Aktinpuffer	-	10	-
10x Polymerisationspuffer	-	20	-
Endvolumen		100	

G-Aktinpuffer	0,2 mM CaCl ₂ 5 mM Tris/HCl, pH 8,0 0,2 mM ATP
Pyren-Aktin-Lösung	10 µM 5% Pyren-Aktin in G-Aktinpuffer
10x Polymerisationspuffer	500 mM KCl 20 mM MgCl ₂ 10 mM ATP

4. Ergebnisse

4.1 Darstellung der FHOD1-Proteinkonstrukte und der Rho-GTPasen

Für die ersten Studien zur Analyse der autoinhibitorischen Funktion der C-terminalen DAD mit ihrer vermuteten Erkennungsdomäne am N-terminus von FHOD1 wurden die im Folgenden beschriebenen Fragmente hergestellt. Die Klonierung, Expression und Reinigung der FHOD1-Konstrukte mit Standardmethoden wurde im Methodenteil beschrieben. Es soll hier kurz auf den Reinheitsgrad der für die verschiedenen Experimente verwendeten Proteine bzw. Peptide eingegangen werden. In Abbildung 15 sind die für diese Studie hergestellten FHOD1-Fragmente schematisch dargestellt. Die FHOD1-DAD Konstrukte konnten als GST-Fusionsproteine exprimiert und gereinigt werden, während die N-terminalen FHOD1 einen N-terminalen Hexahistidinanker besaßen.

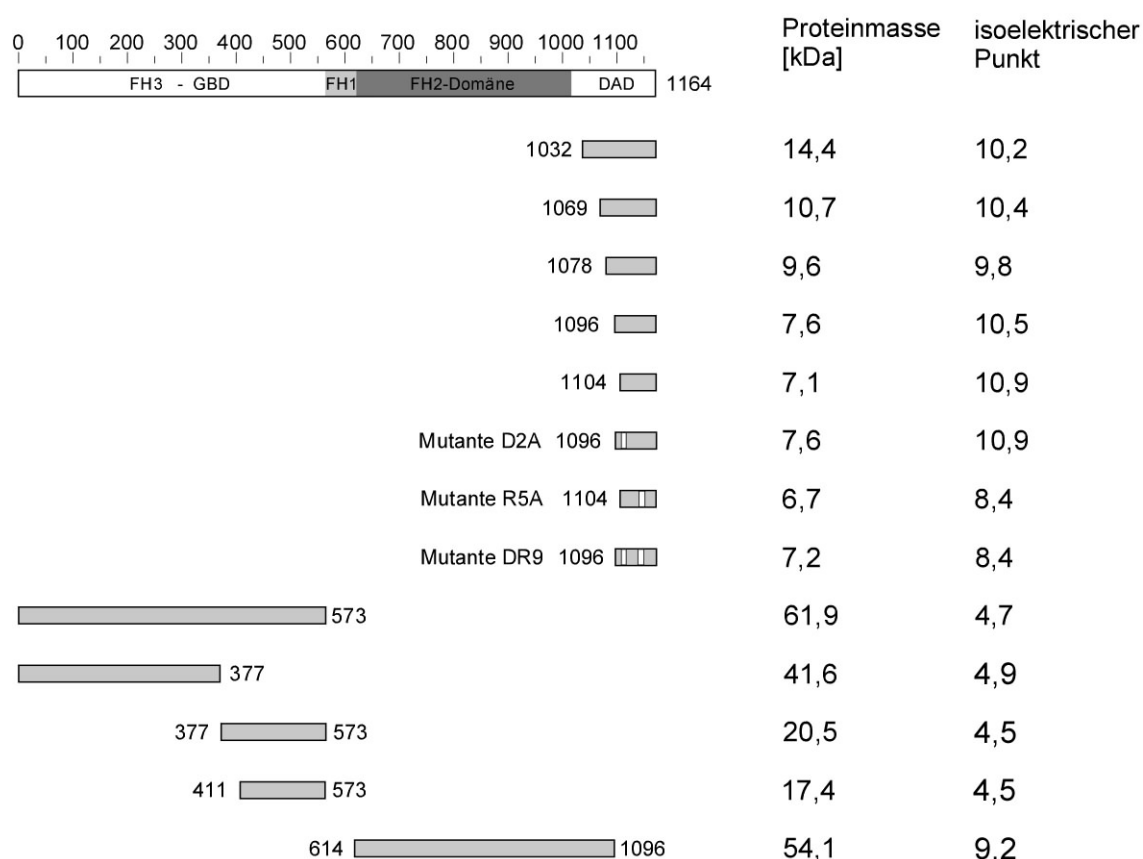


Abbildung 15: Schema der für diese Studie hergestellten FHOD1-Konstrukte. Rechts sind die Proteingrößen ohne Affinitätsanker mit *Linker*-Sequenz zur TEV-Proteaseschnittstelle in kDa angegeben. Daneben ist der theoretische isoelektrische Punkt dieser Fragmente angegeben. Zahlen geben die Fragmentgrenzen in der Proteinprimärsequenz an.

Für die *Pull-down*-Experimente, die in Kapitel 4.3.1 beschrieben sind, wurde der GST-Affinitätsanker der DAD-Fragmente sowie der Hexahistidinanker des N-terminalen Fragments nicht abgespalten. Abbildung 16 A und B zeigen den Reinheitsgrad dieser Proteine. Der Reinheitsgrad der N-terminalen FHOD1-Konstrukte (1-573, 1-377 und 377-573) wurde im SDS-Gel abgeschätzt und beträgt etwa 95%. Hingegen waren die GST-DAD-Fusionsproteine (1032-, 1069-, 1078-, 1096- und 1104-1164) mit GST und Abbaufragmenten verunreinigt. Für die *Pull-down*-Experimente war die Reinheit jedoch ausreichend, da als Negativkontrolle reines GST eingesetzt wurde. Von den GST-DAD-Fusionsproteinen konnten pro Liter Bakterienkultur 10 mg, von His-FHOD1 (1-573, 1-377 und 377-573) 1 mg, 10 mg bzw. 7 mg hergestellt werden.

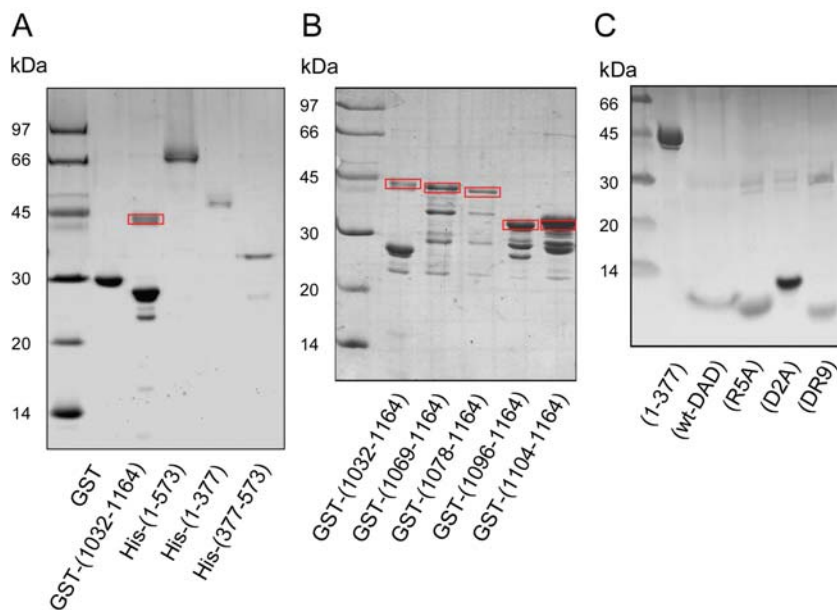


Abbildung 16: Darstellung des Reinheitsgrads der FHOD1-Konstrukte zur Charakterisierung der Interaktion zwischen der DAD und der N-terminalen DAD-Erkennungsdomäne. Es wurden zwischen 2 und 5 µg Protein je Spur aufgetragen. A und B: 15%ige SDS-Polyacrylamidgelle nach Coomassie-Färbung mit Proteinen, die für GST-*Pull-down*-Experimente verwendet wurden. A: Bis auf GST und GST-DAD (1032-1164) besaßen alle Konstrukte einen N-terminalen Hexahistidinanker. Die Reinheit lag bei 90-95%, bei dem GST-DAD-Konstrukt (1032-1164) lag zusätzlich ein Großteil reines GST vor. B: Die Reinheit der fünf N-terminal verkürzten GST-DAD-Fragmente lag nur bei höchstens 50%, da immer ein Großteil reines GST zugegen war, die Banden zu den Proteinen korrekter Masse sind durch rote Kästchen markiert. C: 18%iges SDS-Polyacrylamidgel mit Proteinen, die für die Analyse durch isothermale Titrationskalorimetrie verwendet wurden. Bei allen Proteinen wurde der Hexahistidinanker (1-377) oder der GST-Affinitätsanker enzymatisch gespalten und abgetrennt. Die Reinheit der Proteine lag bei bis zu 95%.

Für die kalorimetrischen Untersuchungen und analytische Gelfiltration ist es notwendig, Proteine mit einem sehr hohen Reinheitsgrad einzusetzen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten und die Messung von Artefakten auszuschließen. Es wurden die wildtyp DAD und drei Mutanten der DAD hergestellt, sowie ein N-terminales FHOD1-Konstrukt (1-377). Bei der ersten Mutante D2A wurde das zweite hydrophobe autoregulatorische Motiv an Position 1108 M-D-L-L-V zu A-A-L-A-A mutiert (siehe Abbildung 23). Der basische Bereich R-E-R-K-R-S-R an Position 1126 wurde zu A-E-A-A-A-S-A geändert. Diese Mutante trägt den Namen R5A. Schließlich wurde die Mutation der beiden Mutanten kombiniert und so die Doppelmutante DR9 generiert. Nach Expression und Reinigung

wurde bei dem DAD-Konstrukt (1104-1164) und den Mutanten (R5A, D2A und DR9) der GST-Affinitätsanker enzymatisch gespalten und davon getrennt (siehe Kapitel 3.3.9). Ebenso wurde der Hexahistidinanker des FHOD1-N-Terminus abgetrennt. Die Qualität dieser Proteine ist in Abbildung 16C zu sehen. Die Reinheit lag bei bis zu 95%. Vom FHOD1 N-Terminus konnten etwa 10 mg, von der DAD und den DAD-Mutanten 2 mg pro Liter Bakterienkultur gewonnen werden. Interessant ist das Laufverhalten der verschiedenen DAD-Mutanten. Verglichen mit dem Wildtyp (1104-1064) läuft die Mutante R5A deutlich niedriger, da es nicht mehr so viele positive Ladungen besitzt, während die längere Mutante D2A, die auf dem Konstrukt (1096-1164) basiert, höher im Gel läuft, da diese einen höheren isoelektrischen Punkt besitzt (siehe Abbildung 15). Die Doppelmutante DR9 hat ein ähnliches Laufverhalten wie die Mutante R5A.

Für die Untersuchung der Interaktion mit der GTPase Rac1 (siehe Kapitel 4.4) wurden die FHOD1-Fragmente FHOD1 (1-377) und (411-573) rekombinant hergestellt und die Affinitätsanker durch Proteolyse mit der TEV-Protease entfernt. Rac1 wurde für kalorimetrische Untersuchungen als Vollängenprotein gereinigt. Der GST-Affinitätsanker wurde hier nicht entfernt, da das Protein mit C-Terminus präzipitiert, GST stabilisiert das Protein in Lösung. Da Rac1 nach der Reinigung nur GDP gebunden hat, wurde dieses gegen nicht hydrolysierbares GppNHp ausgetauscht (siehe Kapitel 3.3.10), um sowohl inaktives als auch aktives Rac1 für die Messungen einzusetzen und Unterschiede in der Affinität zu detektieren. Für Untersuchungen mittels analytischer Gelfiltration wurde auch Rac1 (1-184) ohne C-Terminus verwendet und der GST-Affinitätsanker durch Verdau mit Thrombin entfernt. Auch hier wurde ein Teil von Rac1 mit GppNHp beladen. Abbildung 17 zeigt die hohe Reinheit der Proteine, die bei 98% lag. Die Ausbeuten lagen für Rac1 (1-184) bei 20 mg, für GST-Rac1 volle Länge bei 40 mg und für FHOD1 (411-573) bei 5 mg pro Liter Bakterienkultur.

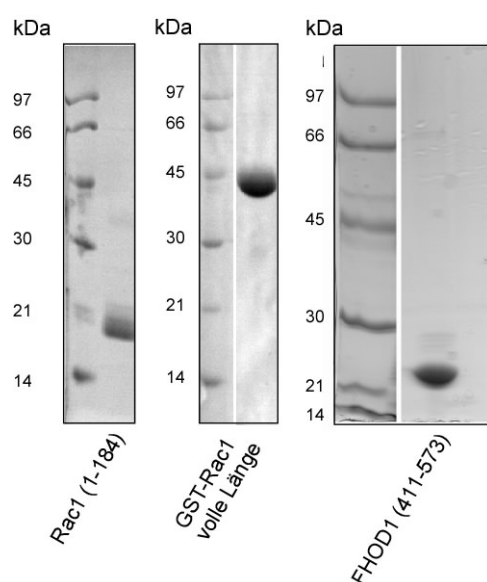


Abbildung 17: Illustration der Reinheit der für die Analyse FHOD1 und seinem möglichen Interaktionspartner Rac1 eingesetzten Proteine. Es wurden 5 μ g Protein auf 15%ige SDS-Gele aufgetragen. Rac1 mit C-Terminus (Mitte) wurde mit GST-Affinitätsanker bei den Experimenten verwendet, da es ohne ihn instabil war. FHOD1 lief für seine Größe (17,4 kDa) bei hohem Molekulargewicht (23 kDa).

Schließlich wurde im Rahmen dieser Studie die FH2-Domäne von FHOD1 untersucht. Dazu wurden sechs Konstrukte als Hexahistidin und GST-Fusionsprotein kloniert und exprimiert. Lediglich das Konstrukt 614-1196 war als GST-Fusionsprotein löslich und konnte in geringen Ausbeuten von 20 µg pro Liter Bakterienkultur gewonnen werden, was für enzymatische Untersuchungen jedoch ausreichend ist. Der GST-Affinitätsanker wurde nicht gespalten, da bekannt ist, dass es die FH2-Domäne stabilisiert (Moseley et al., 2006). Die Reinheit lag dabei etwa bei 80%.

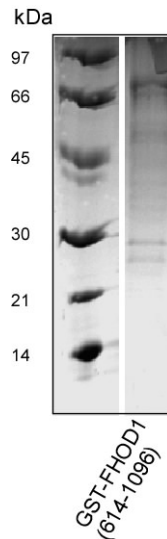


Abbildung 18: Darstellung der Reinheit von GST-FHOD1-R5. Es wurden 2 µg Protein auf ein 12%iges SDS-Gel geladen. Das Gel zeigt Abbaubanden im Bereich von 50 kDa sowie Verunreinigungen mit GST.

4.2 Expression und Reinigung von nativem FHOD1-Vollängenprotein

Im Rahmen dieser Studie sollte zur Charakterisierung der Aktinnukleation und der Identifizierung weiterer Bindungspartner von FHOD1 natives Vollängenprotein FHOD1 hergestellt werden. Die rekombinant mit *E.coli* hergestellten Fragmente ermöglichen zwar eine biochemische Charakterisierung des Proteins, jedoch können diese Fragmente im Kontext des Vollängenprotein ein anderes Verhalten zeigen, da sie dann eine andere Konformation aufweisen. Die Expression des nativen Vollängenproteins FHOD1 wurde rekombinant mit dem Baculovirusexpressionssystem durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.11). Dies ermöglicht eine bessere Expression großer eukaryotischer Proteine, da es viele Faktoren für die Prozessierung und posttranslationalen Veränderungen enthält und bezüglich der Proteingröße nicht limitiert ist. Zudem besitzt es tRNAs für seltene Codons im eukaryotischen Genom, so dass die Proteinsynthese nicht abgebrochen wird, sowie Faltungshelferenzyme, die für die korrekte Faltung des Proteins sorgen.

Natives FHOD1 wurde in dieser Studie aus drei Litern Insektenzellenkultur hergestellt, die nach Infektion mit dem Virus vier Tage inkubiert wurde. Das exprimierte Protein besitzt N-terminal einen

Hexahistidinaffinitätsanker und konnte über eine Ni-NTA-Säule gereinigt werden (siehe Kapitel 3.3.12). Allerdings waren danach noch Verunreinigungen bzw. Abbaubanden zu sehen. Eine anschließende präparative Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex S200 (16/60)-Gelfiltrationssäule lieferte ein Elutionsprofil mit drei *peaks*, deren Fraktionen jeweils vereinigt wurden und deren Reinheitsgrad mittels SDS-PAGE untersucht wurde.

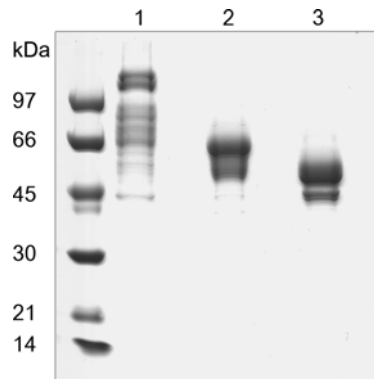


Abbildung 19: Reinheitsgrad der drei gesammelten *peaks* der Größenausschlusschromatographie. 1, 2, 3: *peak* 1, 2 und 3. In Spur 1 ist bei 130 kDa die Bande des Volllängenproteins zu sehen, die Probe weist Verunreinigungen oder Abbaubanden auf. In Spur 2 und 3 sind Banden bei 66 bzw. 50 kDa zu sehen, die zu stabilen Abbauprodukten von FHOD1 gehören könnten.

Abbildung 19 zeigt den Reinheitsgrad der drei gesammelten und vereinigten *peaks*. In Spur 1 (*peak* 1) sind Banden bei einer Größe von etwa 130 kDa zu erkennen, die dem Volllängenprotein FHOD1 zuzuordnen sind, jedoch enthält die Probe weiterhin Verunreinigungen bzw. Abbaubanden. In den Spuren 2 und 3 sind starke Banden bei 66 bzw. 50 kDa zu sehen, die beide relativ geringen Abbau aufwiesen. Dabei könnte es sich um stabile Abbaufragmente von FHOD1 handeln. Die Ausbeuten betragen bei *peak* 1 etwa 3 mg, bei *peak* 2 1,5 mg und bei *peak* 3 ca. 5 mg. Die dargestellten Proteine wurden mit einem Aktinpolymerisationsexperiment untersucht (siehe Kapitel 4.5).

4.3 Untersuchungen der Interaktion zwischen der autoregulatorischen DAD und ihrer FH3-Erkennungsdomäne in FHOD1

FHOD1 gehört zu den Diaphanous-verwandten Forminen, die durch autoinhibitorische Eigenschaften gekennzeichnet sind. Vermittelt wird diese autoinhibitorische Interaktion von der C-terminalen DAD und der N-terminalen Region, die mit der DAD interagiert. Es gibt jedoch Hinweise, dass sich der Mechanismus der Autoinhibition bzw. Aktivierung von dem anderer Mitglieder der DRF-Proteine unterscheidet. Zunächst ist die Identität der N-Termini von mDia1 und FHOD1 mit 16.7% zwischen den ersten 570 Aminosäureresten zu gering, um eine ähnliche Domänenstruktur ableiten zu können, zum anderen ist beschrieben worden, dass die GTPase bindende Domäne bei FHOD1 zwischen FH1- und FH3-Domäne innerhalb der Aminosäurereste 422 und 717 (Westendorf, 2001a), während sie sich bei mDia1 N-terminal von der FH3-Domäne (75-260) befindet (Li and Higgs, 2003; Li and Higgs, 2005; Watanabe et al., 1999b).

Dia-Formine werden durch GTP-gebundenes Rho aktiviert, von FHOD1 jedoch wurde berichtet, dass es mit dem C-Terminus von Rac1 und somit unabhängig vom Nukleotidzustand interagiert (Westendorf et al., 1999b). GTP-gebundenes Rac1 erzeugt ferner in mit FHOD1 transfizierten Zellen nicht den Phänotypen, den man mit dominant aktiven FHOD1 sieht (Gasteier et al., 2003). Am C-Terminus befinden sich bei den Dia-Proteinen zwei konservierte Bereiche: Das hydrophobe DAD-Konsensusmotiv M-D-X-L-L und die positiv geladene Region mit mindestens sieben basischen Aminosäuren (siehe Kapitel 2.2 und Abbildung 20B). Auch hier gibt es bei FHOD-Proteinen Abweichungen bezüglich der Länge der DAD und der Anzahl der möglichen Konsensusmotive. Wie in Abbildung 20D zu sehen ist, ergeben sich zwei Möglichkeiten, die DADs der Dia-Familie und FHOD-Familie auszurichten, da FHOD1 zwei mögliche DAD-Konsensusmotive an den Positionen 1053 bzw. 1108 und einen basischen Bereich an Position 1126 besitzt (siehe Abbildung 20C).

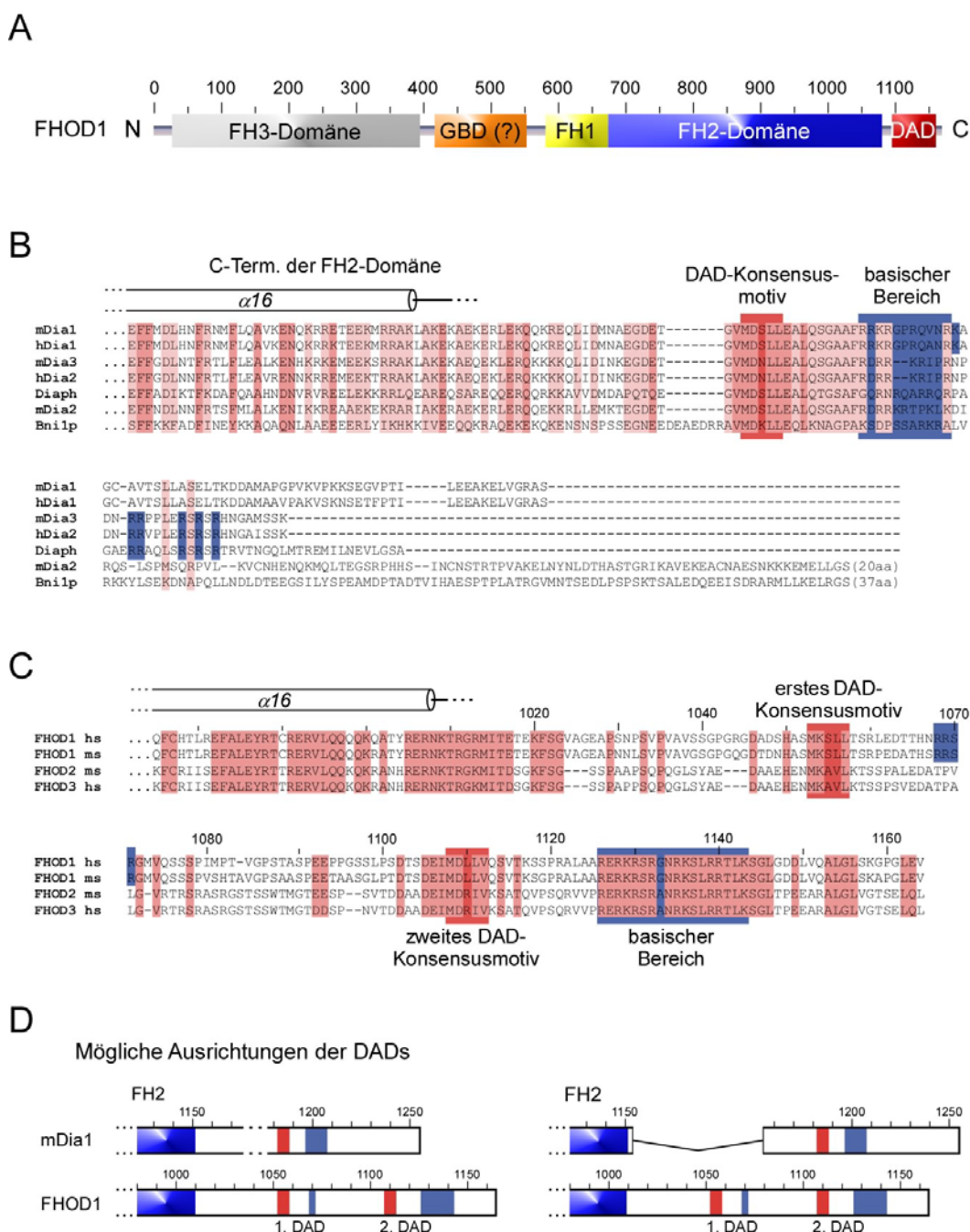


Abbildung 20: Schema der molekularen Domänenorganisation von FHOD1 und der Vergleich der DAD von Dia-Forminen und FHOD-Proteinen. A: vermutete Domänenanordnung des humanen FHOD1-Proteins mit der N-terminalen FH3-Domäne, der GTPase bindenden Domäne (GBD), der Prolin-reichen FH1-Domäne und der zentralen FH2-Domäne, die Aktinnukleation vermittelt, und der C-terminalen DAD. B und C: Vergleich der C-terminalen DAD-Sequenzen der Diaphanous-verwandten Formine. Während die Dia-Formine eine DAD-Konsensussequenz (M-D-X-L-L) sowie einen basischen Bereich besitzen, hat die FHOD-Familie zwei mögliche Konsensusmotive an den Positionen 1053 (M-K-X-L-L) und 1108 (M-D-L-L-V) sowie einen basischen Bereich mit zehn positiv geladenen Aminosäureresten. Die C-terminale Helix der FH2-Domäne aus den bekannten Kristallstrukturen von mDia1 und Bni1 (Otomo et al., 2005c; Shimada et al., 2004; Xu et al., 2004) ist oberhalb der Sequenzen eingezeichnet. D: Mögliche Anpassungen der DAD-Sequenzen der mDia- und FHOD-Familie. Die Sequenzvergleiche ermöglichen es, den Dia-DAD-Konsensusbereich am ersten (links) oder zweiten (rechts) FHOD1-DAD-Motiv auszurichten. Im zweiten Fall läge im Bereich zwischen der potentiellen C-terminalen Helix der FH2-Domäne und der DAD eine 70 Aminosäuren umfassende Subdomäne unbekannter Funktion.

4.3.1 Identifizierung der FH3-Domäne und der minimalen Diaphanous-autoregulatorischen Domäne von FHOD1

Die Identifizierung der Diaphanous-verwandten autoregulatorischen Domäne (DAD) und seiner interagierenden Domäne wurden in dieser Studie mit biochemischen Methoden *in vitro* durchgeführt. Dazu wurde die mit der DAD interagierende Domäne anfangs mit GST-Pull-down-Experimenten bestimmt. Aus Sekundärstrukturvorhersagen und der Sequenzhomologie zu mDia1 und Bni1 geht hervor, dass die FH2-Domäne in FHOD1 ungefähr bis Position 1010 reicht. Als erstes DAD-Konstrukt wurde ein Fragment, beginnend bei Position 1032 bis zum C-Terminus, als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert.

Zur Identifizierung der DAD-Erkennungsregion in FHOD1 wurden basierend auf Sekundärstrukturvorhersagen drei Hexahistidinfusionsproteine vom N-Terminus hergestellt. Die Fragmente (1-573, 1-377 und 377-573) wurden in *E. coli* exprimiert und über Affinitätschromatographie gereinigt. Das GST-DAD-Fragment (1032-1164) wurde an GST-Beads gebunden und die Bindung mit einem der drei Konstrukte mittels Westernblot und α -His-Antikörper untersucht. Dabei wurden mit GST-DAD (1032-1164) die Fragmente (1-573) und (1-377) präzipitiert, jedoch nicht das Fragment (377-573) (siehe Abbildung 21). Dieses Ergebnis zeigt, dass die DAD-Erkennungsdomäne sich innerhalb der Region von 1-377 befindet und nicht in der Region der vermuteten GBD (377-573) liegt. Als Negativkontrolle wurde GST-Protein allein eingesetzt, das keines der drei Konstrukte bindet.

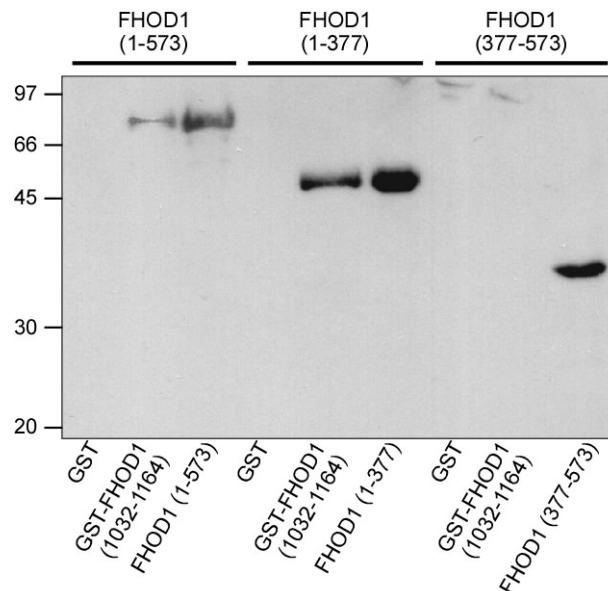


Abbildung 21: Die N-terminalen 377 Aminosäuren interagieren mit der C-terminalen DAD. Westernblot des GST-Pull-down-Experiments mit GST-DAD (1032-1164) und drei N-terminalen Fragmenten (1-573, 1-377 und 377-573). Das *staining* erfolgte gegen einen N-terminalen Hexahistidinanker, der vom α -His-Antikörper erkannt wurde. Die DAD band die Fragmente (1-573) und (1-377), nicht aber die angenommene GBD (377-573). GST als Kontrolle präzipitierte keines der drei Fragmente.

In einem weiteren Experiment sollte der funktionale Bereich der DAD weiter eingegrenzt werden. Dazu wurden fünf verschiedene DAD-Fragmente mit unterschiedlichen N-Termini als GST-Fusionsproteine hergestellt und die Bindung an das FH3-Konstrukt 1-377 untersucht, da dieses im GST-Pull-down-Experiment eine deutlichere Bande zeigte als die anderen Fragmente (Abbildung 21). Die N-terminalen Grenzen waren hier die Positionen 1032, 1069, 1078, 1096 und 1104 (Abbildung 15). Abbildung 22 zeigt, dass jedes dieser Fragmente in gleichem Maße in der Lage war, den N-Terminus von FHOD1 zu binden. Daraus lässt sich schließen, dass ein DAD-Fragment für die Interaktion mit dem FHOD1-N-terminus ausreichend ist, das maximal die C-terminalen 60 Aminosäuren umfasst.

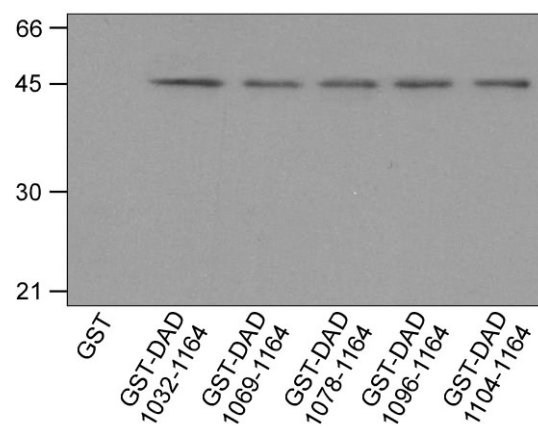


Abbildung 22: Die C-terminalen 60 Aminosäuren in FHOD1 sind für die Interaktion mit der DAD-Erkennungsdomäne ausreichend. Westernblot des GST-Pull-down-Experiments mit fünf N-terminalen Verkürzungen der DAD und der N-terminalen FHOD1-Domäne. Das kleinste DAD-Fragment (1104-1164) war ausreichend für die Präzipitation des N-Terminus (1-377) von FHOD1. GST interagiert hingegen nicht mit dem N-Terminus.

Durch diese beiden Kartierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die N-terminalen 377 Aminosäuren mit den C-terminalen 60 Aminosäuren von FHOD1 interagieren. Dies kann sowohl intramolekular (cis) als auch intermolekular (trans) erfolgen, so dass FHOD1 als Monomer bzw. Dimer vorliegt. Dabei können die beiden hydrophoben DAD-Konsensusmotive sich gegenseitig unterstützen. Letzteres wurde mit den folgenden Experimenten *in vivo* untersucht.

4.3.2 Bestimmung der autoregulatorischen Motive in der DAD von FHOD1 in Säugetierzellen

Die hier gezeigten *in vivo*-Studien wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Oliver Fackler, Abteilung Virologie am Hygiene-Institut der Universität Heidelberg, von Michael Alexander durchgeführt. C-Terminal verkürzte FHOD1-Konstrukte sind konstitutiv aktiv und induzieren Stressfasern sowie die Expression vom SRE (Gasteier et al., 2003; Westendorf, 2001b). In diesem Experiment wurde dieser Effekt ausgenutzt und NIH3T3-Zellen mit FHOD1-Konstrukten transfiziert,

bei denen die DAD-Konsensusmotive mutiert wurden. Der Vergleich mit wildtyp FHOD1 und C-terminal verkürztem FHOD1 lässt Aussagen über die Bedeutung der drei Motive zu. Zunächst wurden Mutanten der zwei möglichen hydrophoben autoregulatorischen Motive hergestellt: M-K-S-L-L an Position 1053 wurde zu A-A-S-A-A und M-D-L-L-V an Position 1108 zu A-A-L-A-A mutiert, diese Mutanten werden D1A bzw. D2A genannt (siehe Abbildung 23). Der basische Bereich R-E-R-K-R-S-R an Position 1126 wurde zu A-E-A-A-S-A geändert und heißt R5A. Schließlich wurde die Mutation des zweiten DAD-Konsensusmotivs mit der Mutation des basischen Bereichs kombiniert und so die Doppelmutante DR9 generiert.

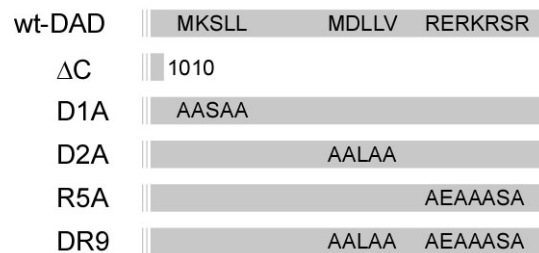


Abbildung 23: Schema der für die in vivo-Studien durchgeführten FHOD1-Mutationen. Neben wildtyp FHOD1 und der FHOD1-ΔC-Mutante, in der die letzten 154 Aminosäuren deletiert sind, wurden die beiden hydrophoben DAD-Konsensusmotive (D1A und D2A) sowie der basische Bereich (R5A) mutiert. Die D2A und R5A-Mutante wurden kombiniert (DR9).

Die Transfektion dieser Konstrukte in NIH3T3-Zellen mittels eines Expressionsplasmids für Säugetierzellen ergab für alle Mutanten ein mit dem wildtyp Protein vergleichbares Expressionsniveau und Proteine mit der erwarteten Größe, jedoch neigten die Mutanten stärker zum Abbau oder waren stärker verunreinigt (siehe Abbildung 24).

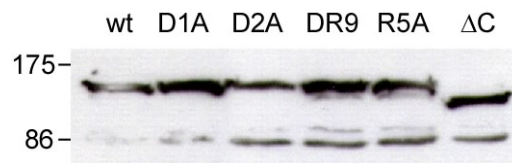


Abbildung 24: Westernblotanalyse zur Expression der FHOD1-Varianten in NIH3T3-Zellen. Nach SDS-PAGE und *Blotting* wurden die Proteine mit einem α-HA-Antikörper detektiert. Es ist zu sehen, dass alle Konstrukte ähnlich stark exprimierten und die erwarteten Größen haben. Mutanten zeigten eine stärkere Degradation als der Wildtyp.

Wildtyp FHOD1-Protein diente hier als Negativkontrolle, da es autoinhibiert vorliegt und keinen Phänotyp mit Stressfasern induziert. Als Positivkontrolle wurde das FHOD1-Konstrukt 1-1010 (FHOD1-ΔC) verwendet, das konstitutiv aktiv ist und Stressfasern sowie Expression vom SRE induziert (Gasteier et al., 2003; Westendorf, 2001b)

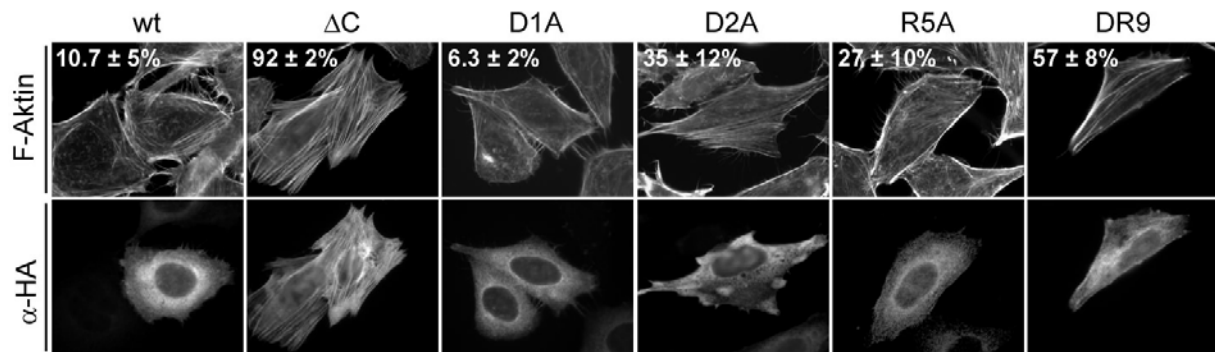


Abbildung 25: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Phänotypen der untersuchten FHOD1-Mutanten zur Analyse der Lokalisation und Effekte auf die Aktinstressfaserbildung von FHOD1-Varianten. NIH3T3-Zellen wurden mit den angegebenen FHOD1-Konstrukten transfiziert. Nach Fixierung wurden die Zellen spezifisch auf Aktin und HA-FHOD1 gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Zahlen (mit Standardabweichung) geben den Anteil der Zellen an, die in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dicke Stressfasern besaßen. Dabei wurden immer mindestens 100 Zellen analysiert. Da D2A keine dicken Stressfasern zeigte, wurden hier Zellen mit dünnen Stressfasern berücksichtigt. Die Mutante D1A hatte wie die wildtyp FHOD1 keinen Einfluss auf Stressfaserformation, DR2, R5A und vor allem DR9 waren hingegen in der Lage Stressfasern zu induzieren. Die ΔC -Deletionsmutante zeigte als Positivkontrolle den typischen FHOD-Phänotyp mit dicken Stressfasern.

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, zeigten sich nach Transfektion von wildtyp FHOD1 keine charakteristischen Veränderungen bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Das FHOD1- ΔC -Konstrukt hingegen induziert eine starke Stressfaserbildung, während es mit diesen kolokalisiert. Der Phänotyp der eingesetzten Mutanten lässt folgendes erkennen: D1A hat wie das wildtyp Protein keinen Einfluss auf Stressfaserbildung. Die Mutanten D2A, R5A und DR9 dagegen zeigen unterschiedliche Ausprägungen von Aktinstressfasern. Am stärksten ist dieser Effekt bei der Doppelmutante DR9 ausgebildet, die in $57 \pm 8\%$ der Zellen dicke Stressfaserbündel erzeugt, was gegenüber der Deletionsmutante FHOD1- ΔC ($92 \pm 2\%$) jedoch immer noch ein deutlich geringerer Wert ist. Bei den Mutanten D2A und R5A war die Formation von Stressfasern noch weniger auffällig ($27 \pm 10\%$ bzw. $35 \pm 12\%$) und die Stressfaserbündel erschienen zudem dünner. Eine weitere Beobachtung war, dass DR9 nicht wie die ΔC -Mutante an den Aktinbündeln lokalisiert ist.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Untersuchung der verschiedenen FHOD1-Konstrukte auf die Fähigkeit, die Transkription vom SRE zu aktivieren (siehe Abbildung 26). Während sich die Mutanten D1A und R5A nahezu wie wildtyp FHOD1 verhielten und keine Aktivität zeigten, konnten FHOD1- ΔC die Aktivierung verfünffachen und DR9 erreichte nahezu diesen Wert. Die Mutante D2A dagegen aktivierte die Transkription deutlich weniger.

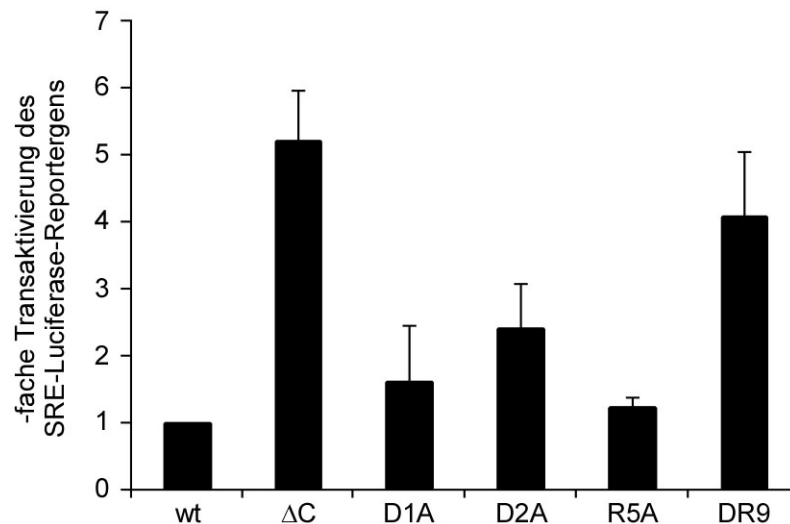
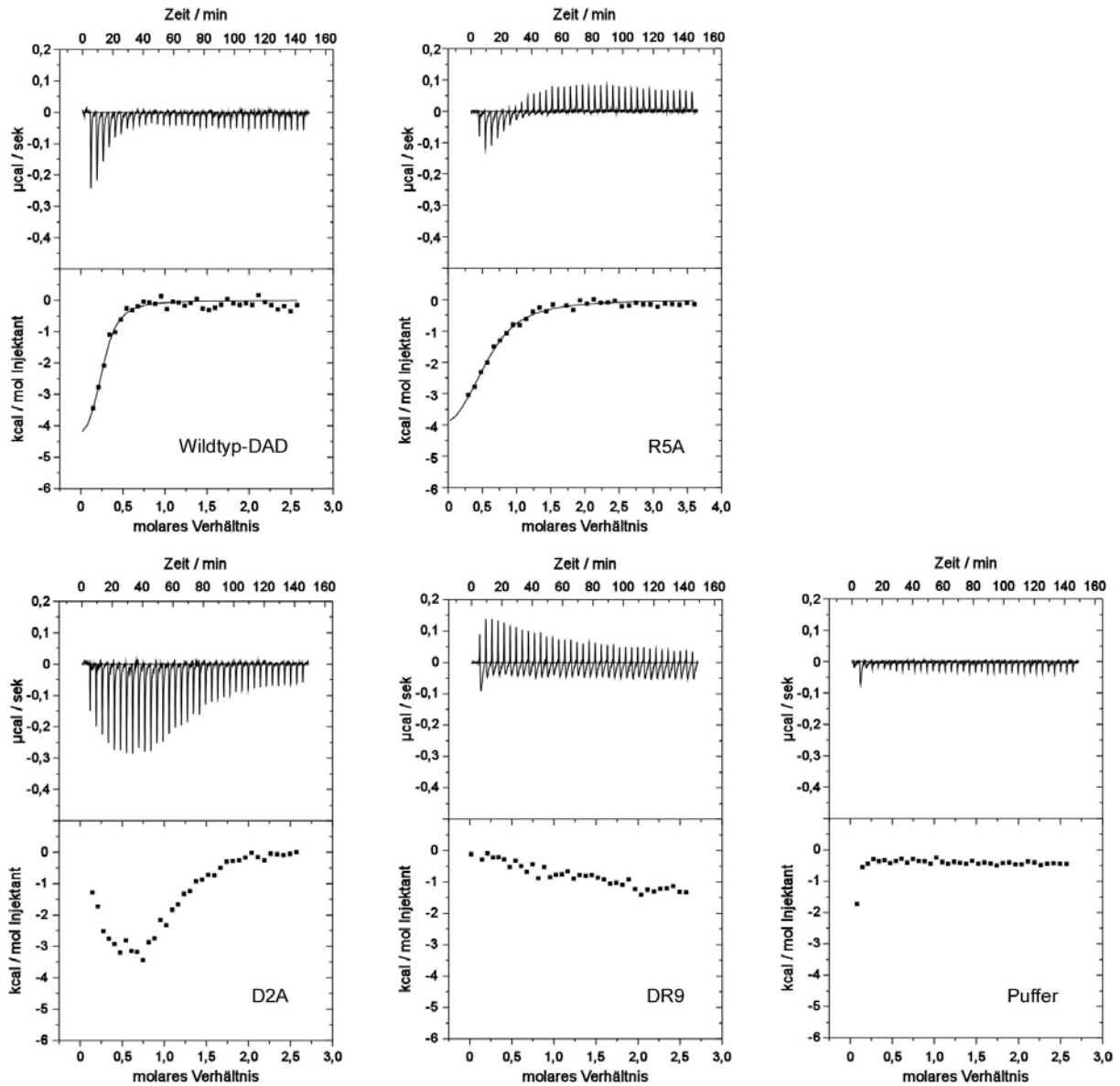


Abbildung 26: Ergebnisse der SRE-Luciferase-Reportergen-Untersuchung. Dargestellt ist jeweils der Faktor der Aktivierung des Luciferase-Reportergens in NIH3T3-Zellen, die die angegebenen FHOD1-Konstrukte exprimierten. Dabei wurde die Luciferase-Aktivität bei FHOD1-wt willkürlich auf den Wert 1 gesetzt. Gezeigt sind die Durchschnittszahlen von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit den angezeigten Standardabweichungen. Die Mutanten D1A und R5A waren wie wt-FHOD1 inaktiv, D2A zeigte eine nur schwache Aktivierung, während DR9 fast die gleiche Transaktivierung wie FHOD1-ΔC erreichte.

Die bestimmenden Motive für die Autoregulation von FHOD1 sind damit das zweite hydrophobe M-D-L-L-V-Motiv und der positiv geladene, basische Bereich.

4.3.3 Untersuchung der DAD-Konsensusmotive von FHOD1 in vitro

Wie oben dargestellt, enthalten die C-terminalen 60 Aminosäuren von FHOD1 zum einen das hydrophobe Konsensusmotiv M-D-X-L-V sowie auch einen konservierten basischen Bereich. Um herauszufinden, wie groß die Beiträge dieser Motive für die Interaktion mit der FH3-Domäne sind, wurde die Interaktion mit isothermaler Titrationskalorimetrie quantitativ untersucht (siehe Kapite 3.5.1). Zu diesem Zweck wurden die DAD-Peptide rekombinant hergestellt und der Affinitätsanker entfernt. Es wurden dieselben Mutanten wie in der in vivo-Studie verwendet, jedoch nicht die D1A-Variante, da diese keinen Einfluss auf die Stressfaserbildung und SRE-Aktivierung hatte (siehe Kapitel 4.3.2). Die verwendeten Proteine wurden auf ihre Reinheit überprüft (siehe Abbildung 16 B). Die DAD-Konstrukte (1104-1164) wurden bei einer Konzentration von 35 μM in die Probenzelle gegeben und bei 25°C thermostatisiert (außer bei der Mutante R5A, dessen Konzentration 25 μM in der Messzelle betrug). Die Titration der zehnfach höher konzentrierten FH3-Domäne (1-377) zeigte eine exotherme Interaktion mit einer Dissoziationskonstante von $K_d = 1,4 \mu\text{M}$ (Abbildung 27 oben rechts). Dieser Wert ergab sich aus der Änderung der freien Enthalpie von 8,0 kcal mol⁻¹, der sich aus der Enthalpieänderung ΔH von -4,9 kcal mol⁻¹ und der temperaturabhängigen Änderung der Entropie ($T\Delta S$) von 3,1 kcal mol⁻¹ zusammensetzt (Abbildung 27 Tabelle unten). Das gleiche Experiment mit der in der basischen Region mutierten DAD (R5A) zeigte zunächst einen exothermen Verlauf und im weiteren Verlauf einen endothermen Charakter. Der endotherme Beitrag könnte durch die hydrophoben Interaktionen herrühren, da hier nur noch das hydrophobe Konsensusmotiv vorhanden ist. Es ergab sich hier eine leicht reduzierte Affinität ($K_d = 3,7 \mu\text{M}$) (Abbildung 27 Mitte oben). Die Daten der Messung entsprechen nahezu den Werten, die auch für die wildtyp DAD-Bindung gemessen wurden (Abbildung 27 Tabelle rechts oben), was darauf hindeutet, dass der basische Bereich nicht für die Bindung essentiell ist. Die Mutation des hydrophoben Bereichs (D2A) lieferte allerdings eine Titrationskurve, die keine Anpassung einer Auswertungskurve nach demselben Modell mit nur einer Bindungsstelle zuließ (Abbildung 27 links unten). Jedoch zeigten die Injektionen einen Verlauf einer Bindung, der für eine Bindung im mittleren mikromolaren Bereich charakteristisch ist. So scheinen auch die polaren, basischen Aminosäuren Kontakte mit der DAD-Erkennungsdomäne einzugehen. Die Titrationskurve des Experiments mit DR9 zeigte schließlich keine Bindung an die FH3-Domäne, da die Affinität zu gering war für ITC-Messungen (Abbildung 27 Mitte unten). Die hier beobachteten endothermen Signale könnten durch Wechselwirkungen noch vorhandener hydrophober Aminosäurereste verursacht sein. In dem Kontrollexperiment, bei dem die FH3-Domäne aus der Spritze in den ITC-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,2, 100 NaCl, 1 mM TCEP) injiziert wurde, war eine nur sehr geringe Enthalpieänderung festzustellen (Abbildung 27 rechts unten).



Mutante	$k_D / \mu\text{M}$	$\Delta H / \text{kcal mol}^{-1}$	$T\Delta S / \text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta G / \text{kcal mol}^{-1}$	N
wt-DAD	1,4	-4,9	3,1	-8,0	0,25
R5A	3,7	-4,9	2,5	-7,4	0,56
D2A	Nicht auswertbar				
DR9	Keine Bindung				

Abbildung 27: ITC-Messungen und Bindungsaffinitäten der Interaktion der DAD und Mutanten der DAD mit der FH3-Domäne. Es sind die ITC-Spektren für jede Messung der DAD-Peptide (1104-1164) mit der FH3-Domäne (1-377) sowie die Pufferkontrollmessung und die Integration der Injektionen gezeigt. Unten sind die ermittelten Daten und daraus berechneten Dissoziationskonstanten K_d aufgelistet. Die wildtyp DAD wechselwirkte exotherm mit seiner Erkennungsdomäne mit einer niedrigen mikromolaren K_d von 1,4 μM (oben links). Die R5A-Variante ohne basischen Bereich hatte eine leicht niedrigere Affinität (3,7 μM). Das Spektrum der D2A-Mutante ohne hydrophobe DAD-Konsensussequenz zeigte eine Bindung in der gleichen Größenordnung, jedoch war eine Kurvenanpassung nicht mit den gleichen Auswerteparametern möglich. Die Doppelmutante DR9 zeigte keine Interaktion mit der FH3-Domäne. Die Kontrollmessung, bei der die FH3-Domäne in reinen Puffer injiziert wurde, zeigte eine vernachlässigbare Wärmetönung.

Isothermale Titrationskalorimetrie eignet sich neben der Bestimmung der Dissoziationskonstanten und thermodynamischen Parameter ΔH und ΔG auch zur Determination der Stöchiometrie der Interaktion. Die in diesem Experiment ermittelten Stöchiometrien N für die DAD und die Mutante R5A zur FH3-Domäne (siehe Abbildung 27 unten) sind jedoch aus zwei Gründen wenig aussagekräftig: Zum einen war die Konzentrationsbestimmung der DAD-Peptide mit der Methode nach Bradford problematisch (Bradford, 1976b). Da diese Methode auf eine Färbereaktion der basischen Aminosäuren beruht und genau diese bei den verschiedenen Peptiden mutiert wurden, war sie nur bedingt geeignet für die Konzentrationsbestimmung. Gleiches galt auch für die Abschätzung der Konzentration im Coomassie-gefärbten SDS-Gel, da das Prinzip der Färbung ähnlich dem des Bradford-Reagenzes ist (siehe auch Abbildung 16C). Eine Bestimmung der Konzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm war nicht möglich, da die Peptide keine Aromaten unter den Aminosäureresten besaßen. Andererseits waren die kurzen Peptide nicht sehr stabil (siehe auch Kapitel 4.3.5) und neigten bei hohen Konzentrationen zur Aggregation, so dass nicht alle der in Lösung befindlichen Moleküle aktiv waren. Dies würde selbst bei korrekter Konzentrationsbestimmung zu einem scheinbar geringeren Wert für die Anzahl der Bindungsplätze führen. Dagegen lassen diese Beobachtungen die Kurvenverläufe und ermittelten Stöchiometrien besser verstehen. Im Übrigen hat jedoch eine fehlerhafte Konzentrationsbestimmung einen nur geringen Einfluss auf die Größenordnung der Dissoziationskonstanten.

Die Resultate der ITC-Messungen wurden bestätigt durch ein GST-*Pull-down*-Experiment, bei dem GST-DAD (1104-1164) sowie GST-R5A, GST-D2A und GST-DR9 auf die Fähigkeit getestet wurden, die FH3-Domäne zu binden.

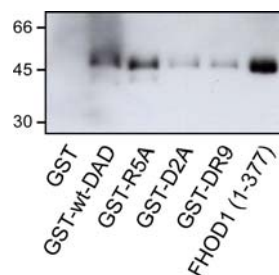


Abbildung 28: Vergleich der Affinitäten durch *in vitro*-Präzipitation der FH3-Domäne durch DAD-Proteine und seiner Mutationen. Das Bild zeigt einen Westernblot GST-*Pull-down*-Experiment und nach Detektion mit α -His-Antikörper mit GST-DAD und GST-R5A, -D2A und DR9 und His-FHOD1 (1-377). Die R5A-Mutante zeigte eine ähnlich starke Bande wie der Wildtyp, während D2A und DR9 schwächere Banden erkennen lassen.

In Abbildung 28 ist zu sehen, dass die wildtyp DAD und die Mutante R5A in gleichem Maße die FH3-Domäne banden, während eine Mutation des hydrophoben Bereichs (D2A) und die Doppelmutation (DR9) zu einer schwächeren Bande führten. GST interagierte als Negativkontrolle nicht mit dem N-Terminus von FHOD1.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das M-D-L-L-V-Motiv in der Diaphanous-autoregulierenden Domäne für die Interaktion mit der FH3-Domäne bestimmend ist und der basische Bereich diese Bindung unterstützt.

4.3.4 Molekulare Dispersion des FH3:DAD-Komplexes

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen der DAD und der FH3-Domäne in FHOD1 wurden die Moleküle mittels Größenausschlusschromatographie untersucht. Dazu wurden verschiedene analytische Gelfiltrationsexperimente mit verschiedenen Säulen durchgeführt, die unterschiedliche Eigenschaften bezüglich des Elutionsprofils zeigten. Es stellte sich heraus, dass die Biosep-SEC-S2000-Säule (Phenomenex) mit einem Ausschlussvolumen von 300 kDa sich am besten zur Analyse der beiden Moleküle eignete. Bei jedem Experiment wurde die Absorption bei A_{280} beobachtet. In Abbildung 29 sind fünf typische Chromatogramme dargestellt. Um zu überprüfen, welche Moleküle sich hinter den Elutionsprofilen verbergen, wurden während der Gelfiltration 1 ml- oder 0,5 ml-Fraktionen gesammelt und diese anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

Bei Verwendung des Standardpuffers (50 mM Hepes, pH 7,2, 100 mM NaCl und 1 mM DTE) eluieren etwa 60% der FH3-Domäne (1-377) als Dimer oder Trimer (Elutions bei 12,97 ml), während Monomere nahezu bei der berechneten Masse von 41,5 kDa als definierter *Peak* eluieren (siehe Abbildung 29). Unspezifische Aggregation, die zu einem Laufverhalten im Ausschlussvolumen führen würde, konnte nicht beobachtet werden. Die DAD (1104-1164) zeigte bei der Elution nur eine geringe Absorption, da diese Domäne keine aromatischen Aminosäurereste besitzt und nur in der *Linker*-Sequenz zur TEV-Protease-Schnittstelle ein Histidin besitzt. Die Analyse des SDS-Gels nach Silberfärbung zeigt trotzdem, dass die DAD bei etwa 20 ml eluiert. Bei Zugabe der DAD zur FH3-Domäne eluieren die Monomere ein wenig früher, bei 14,47 ml, was auf eine leichte Vergrößerung des Moleküls hindeutet. Ein weiterer Effekt ist, dass der Anteil der oligomeren Fraktion (Elutionsprofil bei 12,92 ml) des Proteins in Gegenwart der DAD geringer ist. Die Komplexbildung konnte ebenfalls durch die Analyse in der SDS-PAGE bestätigt werden, da sich das DAD-Peptid zusammen mit der FH3-Erkennungsdomäne in den 14 ml-Fraktionen befand, wie die schwache Bande unterhalb der 14 kDa-Markerbande erkennen lässt.

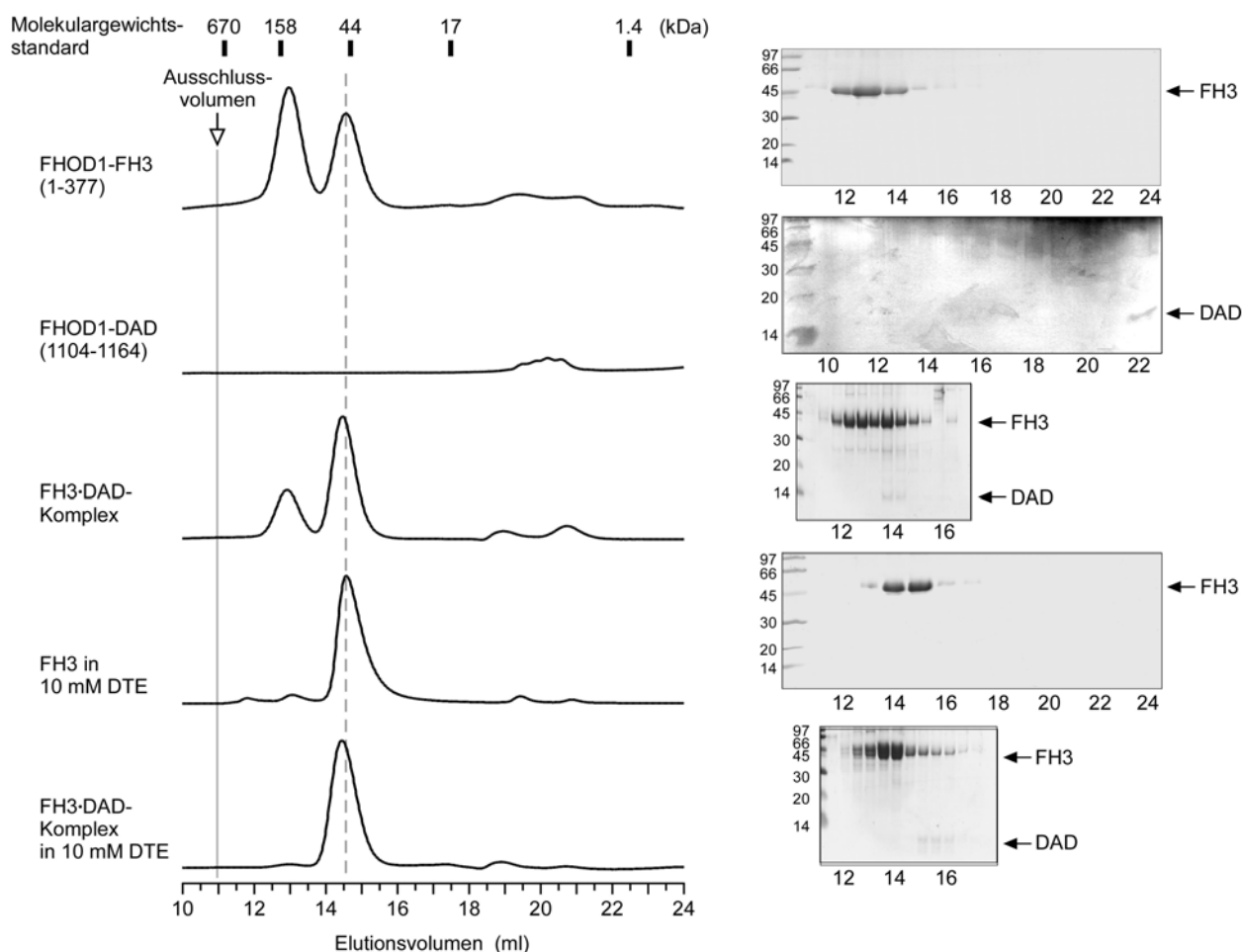


Abbildung 29: Molekulare Dispersion des FH3:DAD-Komplexes. Die Proteine wurden in einem Puffer mit 50 mM HEPES, pH 7,2, 100 mM NaCl und 1 mM Dithioerythritol eluiert. Der Durchfluss wurde in 1 oder 0,5 ml-Fractionen gesammelt und durch 17%ige SDS-PAGE analysiert (siehe rechts). Oberste Reihe: Die Größenausschlusschromatographie der FH3-Domäne (1-377) alleine zeigte eine Monomer-Oligomer-Verteilung. Zweite Reihe: Das DAD-Peptid (1104-1164) eluierte spät von der Säule und zeigte aufgrund fehlender aromatischer Aminosäuren kaum Absorption. Die Elution wurde im SDS-Gel mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Dritte Reihe: Die Zugabe der DAD zur FH3-Domäne resultierte in verringerter Oligomerisierung und einer kleinen Verschiebung des Peaks, was auf die Komplexbildung hindeutet. Vierte und fünfte Reihe: Zugabe von 10 mM Dithioerythritol vor Injektion auf die Säule führte zur Monomerisierung der FH3-Domäne. Die kleine Verschiebung zu früheren Elutionszeiten bei den FH3:DAD-Proben (siehe gestrichelte Linie) wies auf eine geringe Molekulargewichtsvergrößerung und damit eine Komplexbildung hin. Die SDS-PAGE-Analyse der eluierten Fraktionen rechts stellt die Unversehrtheit der Proteine sicher und die Komplexbildung an.

Zwei weitere Experimente zeigten, dass die Oligomerisierung der FH3-Domäne durch Reduktionsmittel aufgehoben werden kann. Zugabe von 10 mM DTE 30 min vor Injektion auf die Säule führte zu Elutionsprofilen mit nur einem Peak, der dem FH3-Monomer bzw. FH3:DAD-Komplex mit einem FH3-Monomer zugeordnet werden kann. Dies lässt darauf schließen, dass die Oligomerisierung allein von der Bildung von Cystein-Disulfid-Bindungen auf der Moleküloberfläche herrührt.

Die nur geringe Verschiebung des Elutionsprofils von 14,56 ml zu 14,42 ml bei dem FH3:DAD-Komplex deutet darauf hin, dass sich die Ausmaße des FH3-DAD-Komplexes gegenüber der FH3

allein kaum geändert haben. Der Komplex ist nur unwesentlich größer geworden, was zu der Annahme führt, dass die DAD bei Bindung eine Konformation einnimmt, bei der sie ausgestreckt auf der globular gefalteten FH3-Domäne liegt.

4.3.5 Kartierung der FH3-bindenden Region innerhalb der DAD mittels NMR-Spektroskopie

Die Bindungsfläche der DAD zur FH3-Domäne wurde schließlich mittels NMR-Spektroskopie weiter eingrenzt (siehe Kapitel 3.5.2). Durch ein ^1H -NMR-Experiment wurde zunächst die Löslichkeit und Stabilität der FH3-Domäne untersucht. Das Protein war bei einer Konzentration von 0,7 mM gut löslich und zeigte keine Neigung zur unspezifischen Aggregation. Aus den chemischen Verschiebungen der NH- und C_αH -Resonanzen konnte abgeleitet werden, dass das Protein überwiegend aus helikalen Sekundärstrukturelementen aufgebaut ist (Abbildung 52 im Anhang). Das DAD-Peptid (1104-1164) aus rekombinanter Herstellung konnte bis 0,6 mM konzentriert werden, war jedoch weniger stabil und wurde innerhalb von zwei Tagen bei 25°C teilweise abgebaut.

Nach der uniformen Markierung des 61 Aminosäure-langen Peptids mit stabilen ^{15}N -Isotopen (siehe Kapitel 3.3.9) wurden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente durchgeführt. In dem Spektrum ist zu erkennen, dass das Protein intrinsisch unstrukturiert ist, da die $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Resonanzsignale nur wenig verteilt sind und sich an Positionen befinden, wie sie auch bei unstrukturierten Fragmenten (*random coil*) vorkommen (siehe Abbildung 30 A, blaues Spektrum). So befinden sich im Bereich von 8,0-8,5 ppm der Protonenresonanzfrequenz viele Signalüberlappungen, dh. das Spektrum weist eine geringe Dispersion auf. Andererseits deuten einige Hochfeld-verschobene Signale der ^1H -Resonanzen (7,7-8,0 ppm) auf einen möglichen α -helikalen Anteil hin, wie z. B. an den verschiedenen Resonanzsignalen der Valine V1112, V1115 und V1151 zu sehen ist. Auch die Resonanzen der Serine S1114, S1118, S1119, S1131, S1144 besitzen alle unterschiedliche Positionen. Die Zuordnung der Signale wurde mittels Korrelationsspinsystemen (TOCSY) und sequentiellem NOE-Pfad in Zusammenarbeit mit Fanny Cuesta, MPI Dortmund, erreicht (siehe Abbildung 30 B). Dabei stellte sich heraus, dass die Resonanzen der Reste innerhalb des hydrophoben DAD-Konsensusmotivs Hochfeld-verschoben waren und zudem stärker sequentielle $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\text{N}}$ NOE-Korrelationen zeigten. Diese Beobachtungen weisen auf eine α -helikale Konformation dieser Region hin.

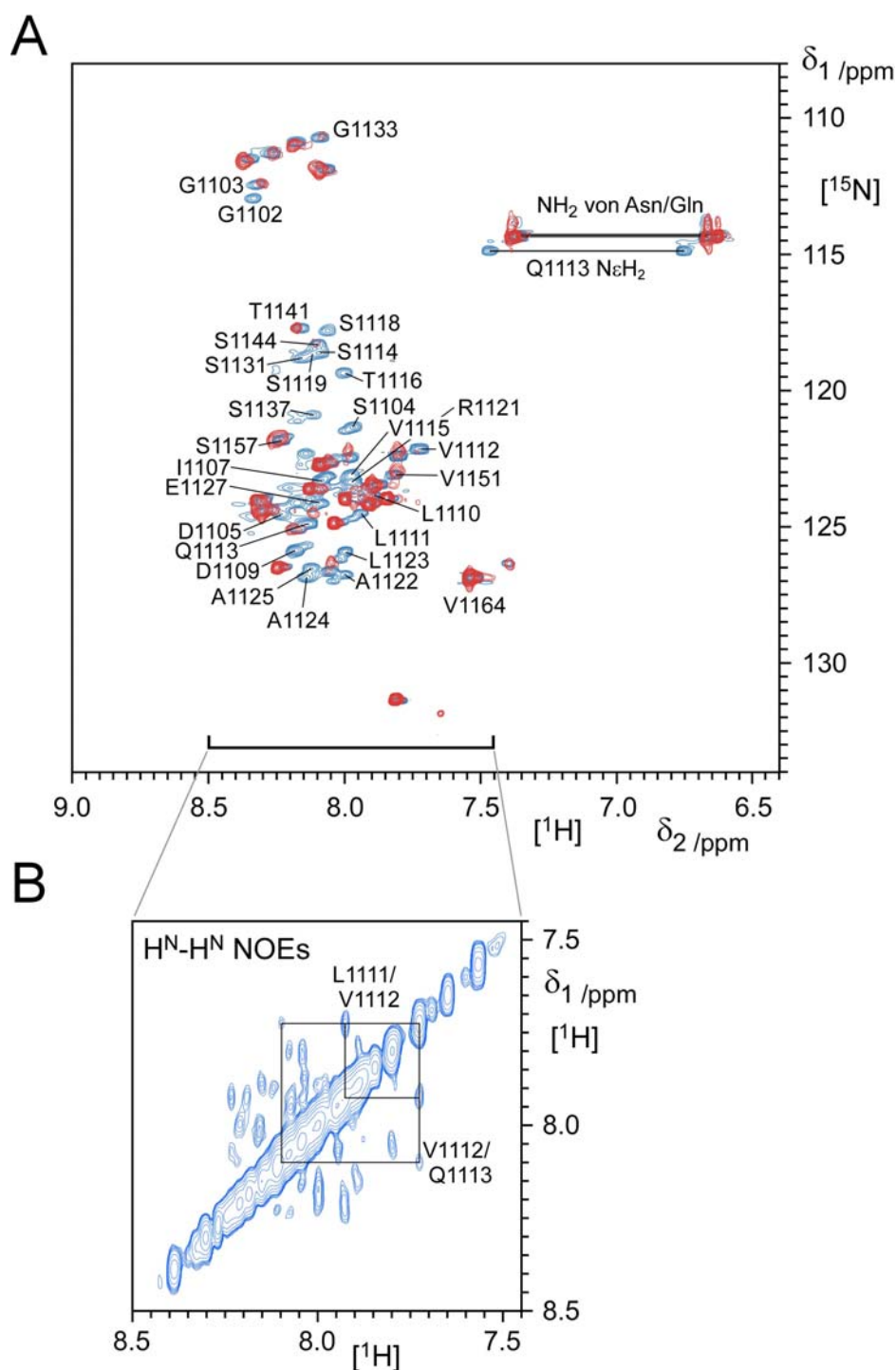


Abbildung 30: NMR-Untersuchungen der DAD-FH3-Domänen-Interaktion. A: Überlagerung von $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ^{15}N -markierter FHOD1-DAD (1104-1164) allein (blau) und im Komplex mit der FH3-Erkennungsdomäne (rot). Das Spektrum der DAD zeigte zunächst ein größtenteils unstrukturiertes Protein, bei Komplexierung mit der FH3-Erkennungsdomäne verschwand die Hälfte der Signale. Dies könnte auf eine Induktion einer gefalteten Berührungsfläche der interagierenden Aminosäurereste hindeuten, wohingegen die nicht bindenden Reste weiterhin flexibel und unstrukturiert vorlagen. Die Reste, die bei der Bindung verschwinden oder verschieben, sind durch Nummerierung gekennzeichnet. Die Spektren wurden in 20 mM KPi, pH 7,2, 50 mM NaCl und 1 mM TCEP bei 25°C aufgenommen. B: H^N-H^N-Region eines zweidimensionalen NOESY-Spektrums der DAD. Die chemischen Verschiebungen und die verstärkten NOE-Korrelationen deuten auf eine helikale Konformation des hydrophoben DAD-Konsensusmotivs hin, wie dies für V1112 ausgearbeitet ist.

In einem weiteren Experiment wurde die FH3-Domäne in drei Schritten mit molaren Verhältnissen von 0,3, 0,6 und 1,1 (FH3 zu DAD) aus der 0,7 mM Stammlösung zu der ^{15}N -markierten DAD gegeben. Um eine Verdünnung der DAD zu umgehen, wurde die Probe wieder auf dasselbe Volumen gebracht und HSQC-Spektren aufgenommen (siehe Abbildung 30 A, rotes Spektrum). Im Verlauf dieser Titration wurde die DAD vollständig gesättigt und es verschwanden mehr als die Hälfte der 67 DAD-Resonanzsignale durch die Bindung an die 42 kDa große FH3-Domäne. Etwa 30 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Rückgratsignale blieben zurück, was zu der Annahme führt, dass die direkt mit der FH3-Domäne interagierenden Aminosäurereste der DAD die Diffusions- und Rotationseigenschaften der FH3-Domäne annahmen, während die übrigen, nicht für die Bindung verantwortlichen Reste zum Großteil beweglich blieben, da sich ihre Resonanzsignale nicht veränderten. Überdies fiel auf, dass alle außer einem der Glycin-Signale bei der Komplexbildung unverändert blieben und die meisten Resonanzsignale von Serinen und Threoninen verschwanden. Da sich nur ein Glycin und fast alle Serine und Threonine im Zentrum des Peptids befinden, war die Kartierung der Bindungsdomäne auf einen Bereich von D1105 bis S1144 möglich. Dieser Bereich enthält sowohl das hydrophobe als auch positiv geladene, basische DAD-Konsensusmotiv.

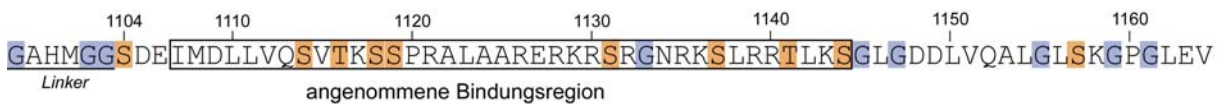


Abbildung 31: Hervorhebung der Glycin-, Serin- und Threoninreste in der Proteinsequenz der DAD. Das Verschwinden der Serin- bzw. Threoninresonanzsignale oder das gleichzeitige Verbleiben der Glycinresonanzsignale im HSQC-Spektrum ergibt eine grobe Kartierung der Bindungsregion der DAD zur FH3-Domäne auf eine zentrale Region mit einer Länge von etwa 40 Aminosäureresten.

Zusammen mit den Daten aus den GST-Pull-down-Experimenten, der Untersuchungen in vivo sowie den Ergebnissen der isothermalen Titrationskalorimetrie lässt sich sagen, dass der für die Autoregulation verantwortliche Bereich der FHOD1-DAD ungefähr 40 Aminosäuren von etwa Aminosäure I1107 bis S1144 umfasst und das hydrophobe zweite DAD-Konsensusmotiv bei Position 1108 und dem basischen Bereich bei Position 1126 enthält.

4.4 Untersuchungen zur Interaktion von FHOD1 mit der GTPase Rac1

FHOD1 ist in der Literatur als Effektor der GTPase Rac1 beschrieben worden (Gasteier et al., 2003; Westendorf, 2001a). Rac1 spielt eine wichtige Rolle beim Umbau des Aktinzytoskeletts (siehe Kapitel 2.1.6). Ein Vergleich mit mDia1 zeigt – ähnlich wie bei der Autoregulation – bemerkenswerte Unterschiede bei dem Mechanismus der Interaktion mit der kleinen GTPase. Im Falle von mDia1 hebt RhoA den autoinhibierten Zustand nur auf, wenn es GTP gebunden hat und bindet seinerseits an eine Region am N-Terminus von mDia1 (75-260), die zwar nicht mit der DAD-Erkennungsdomäne überlappt, sich jedoch in unmittelbarer Nähe dazu befindet (Lammers et al., 2005; Otomo et al., 2005a; Rose et al., 2005). FHOD1 wird von Rac1 auch aktiviert, wenn dieses nicht in seiner Triphosphatform vorliegt und ist somit Nukleotid-unabhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion über den C-Terminus von Rac1 stattfindet (Westendorf, 2001a). Ferner liegt die Rac1-bindende Region nicht innerhalb der N-terminalen FH3-Domäne, an die die DAD bindet (siehe 4.3.1). Rac1 soll C-terminal davon im zentralen Bereich von FHOD1 (469-717) binden (Westendorf, 2001b). Ein FHOD1-Fragment (616-1164) bindet nicht an Rac1 (Madrid et al., 2005). Diese Daten wurden größtenteils aus *in vivo*-Experimenten ermittelt. In dem hier beschriebenen Experiment sollte die Interaktion mit rekombinant hergestellten Proteinen überprüft werden. Dazu wurden kalorimetrische Experimente sowie analytische Gelfiltration für die Analyse genutzt.

Zur Untersuchung der Interaktion der Rac1-bindenden Domäne und Bestimmung der Dissoziationskonstanten *in vitro* wurde GST-Rac1:GppNHp (volle Länge) in der Messzelle bei einer Konzentration von 0.05 mM auf 25°C thermostatisiert und FHOD1 (1-377) mit einer Konzentration von 0,4 mM schrittweise in die Zelle injiziert. Der Reinheitsgrad der verwendeten Proteine ist in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt. In Abbildung 32 oben links ist die Messung und das Integral der Injektionen dargestellt. Ein Vergleich mit der Kontrollmessung von Injektionen von FHOD1 (1-377) in den ITC-Puffer (50 mM Hepes, pH 7,2, 100 NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM TCEP) zeigt einen nahezu identischen Verlauf, somit kann keine Bindung von GST-Rac1:GppNHp mit FHOD1 (1-377) detektiert werden. Die ITC-Spektren des gleichen Experiments mit der *in vivo* bestimmten Rac1-bindenden Domäne (411-573) zeigten einen stark endothermen Verlauf, jedoch blieben die Injektionspeaks während der gesamten Messung auf etwa gleichem Niveau, so dass sich kein für eine Bindung typischer sigmoidaler Kurvenverlauf ergab (Abbildung 32, unten Mitte) und eine Integration nicht möglich war. Eine mögliche Fehlerquelle könnte darin liegen, dass die Konzentration von GST-Rac1:GppNHp möglicherweise zu hoch war und somit nicht alle zur Verfügung stehenden Bindungsplätze gesättigt wurden. Diese Annahme wurde jedoch nicht bestätigt, da ein Experiment mit halber Rac1-Konzentration eine ähnliche Messung lieferte (Daten nicht gezeigt). Auch das Spektrum mit Rac1:GDP weist den gleichen Verlauf auf. Die

Kontrollmessung, bei der FHOD1 (411-573) in den ITC-Puffer injiziert wurde, erklärt z.T. die erhaltenen Messkurven, da diese einen noch stärkeren endothermen Charakter hatte als die Messungen mit Rac1 und FHOD1 (411-573). Es ist möglich, dass dieser Effekt eine Bindungskurve überlagert. Eine Subtraktion der Puffermessung von den Messkurven mit Rac1 lieferte jedoch keinen typischen Kurvenverlauf einer Interaktion.

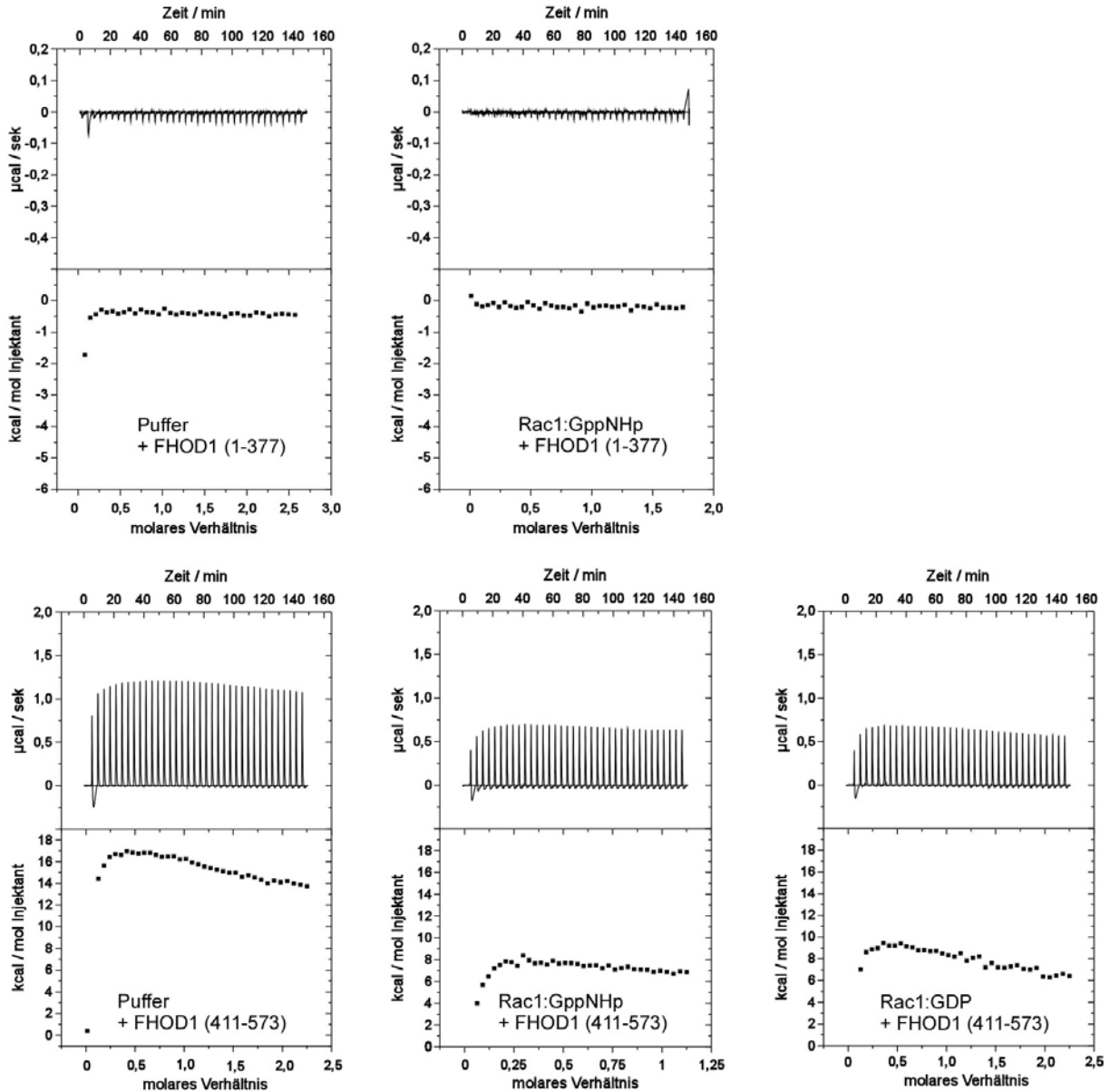


Abbildung 32: ITC-Spektren der Messungen von Rac1 mit der FHOD1-FH3-Domäne (oben) und der angenommenen GBD (unten). Es sind die ITC-Spektren für jede Messung der FHOD1-Fragmente mit GST-Rac1:GDP bzw. GppNHp sowie die Pufferkontrollmessungen und die Integration der Injektionen gezeigt. Die FH3-Domäne zeigte hier keine Wechselwirkung mit aktiviertem Volllänge-Rac1, die Spektren mit der angenommenen GBD wiesen einen insbesondere im Falle der Pufferkontrollmessung stark endothermen Verlauf ohne einen sigmoidalen Kurvenverlauf auf, die Messungen mit Rac1 waren daher nicht aussagekräftig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels isothermaler Titrationskalorimetrie eine Interaktion der in vivo-bestimmten, vermuteten GBD von Position (411-573) nicht bestätigt werden konnte. Auch bindet Rac1 in diesem Experiment nicht an die FH3-Domäne.

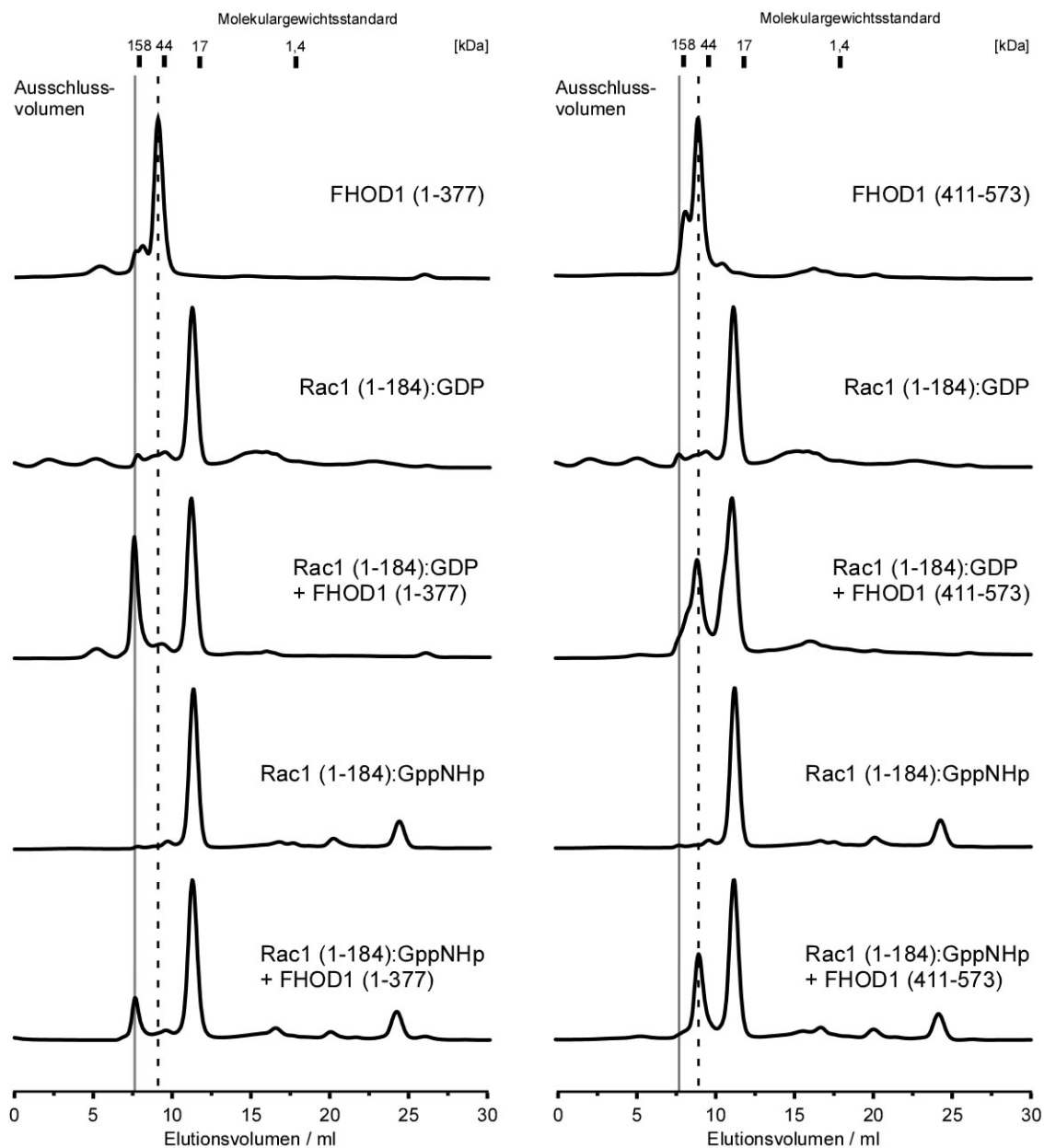


Abbildung 33: Molekulare Dispersion der FH3-Domäne und der angenommenen GBD von FHOD1 und Rac1 auf einer Gelfiltrationssäule Superdex S75 10/300. Die Proteine wurden alle im gleichen molaren Verhältnis auf die Säule injiziert. In der obersten Reihe ist das Chromatogramm der FH3-Domäne (links) und der GBD (rechts) zu sehen, die zweite und vierte Reihe zeigt das Laufverhalten von Rac1(1-184):GDP bzw. Rac1(1-184):GppNHp. Die dritte und unterste Reihe zeigen die Chromatogramme nach Zugabe von Rac1 im angegebenen Zustand zu den FHOD1-Fragmenten. Es ist eine deutliche Verschiebung des FH3-Peaks ins Ausschlussvolumen zu erkennen, die Elutionszeit der GBD hingegen änderte sich nicht.

Neben der kalorimetrischen Analyse wurde auch Größenausschlusschromatographie genutzt, um die hergestellten FHOD1-Fragmente und Rac1 zu beschreiben. Dabei konnte in einem Fall eine bemerkenswerte Beobachtung gemacht werden. Es wurden oben genannte FHOD1-Fragmente auf eine mit 20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTE äquilibrierte Gelfiltrationssäule Superdex S75 10/300 injiziert. Dabei zeigte sich zunächst, dass die FH3-Domäne bei dem erwarteten Molekulargewicht von 45 kDa eluiert (9,1 ml) und ein Teil als Dimer/Trimer vorliegt (Abbildung 33, oberste Reihe links). Das FHOD1-Fragment (411-53) mit einer berechneten Masse von 17,4 kDa eluiert wie ein Protein mit einer Masse von 44 kDa (9,0 ml), was zum einen ein Indiz für ein Dimer, zum anderen für eine weniger kompakte, sondern eher stabförmige Form des Proteins sein könnte (Abbildung 33, oberste Reihe rechts). Aus Sekundärstrukturvorhersagen geht hervor, dass in diesem Bereich eine *coiled-coil*-Struktur vorliegen können, was zu den gemessenen Daten passen würde (Lupas, 1996; Wallar and Alberts, 2003). Für dieses Experiment wurde Rac1 (1-184) in seiner aktivierten GppNHp- bzw. inaktivierten GDP-Form eingesetzt, das jeweils bei seiner erwarteten Masse von 21 kDa eluiert (Abbildung 33, zweite und vierte Reihe).

Anschließend wurde zu den FHOD1-Fragmenten ein molares Äquivalent Rac1 mit dem jeweiligen Aktivierungszustand gegeben und auf die Säule injiziert. Während bei dem FHOD1-Fragment (411-573) keine Änderung der Elutionszeiten zu beobachten ist (Abbildung 33 rechte Spalte, gestrichelte Linie), verschwand der *Peak* der FH3-Domäne (9,1 ml) und ein neuer *Peak* im Ausschlussvolumen erschien (7,6 ml) (Abbildung 33 linke Spalte, gestrichelte und graue Linie). Bei Zugabe von Rac1 findet eine Oligomerisierung statt.

Dieses Ergebnis ist aus verschiedenen Gründen ungewöhnlich. Erstens scheint die FH3-Domäne und nicht die bisher bestimmte GBD mit Rac1 zu interagieren. Zweitens findet diese Interaktion unabhängig vom Nukleotidzustand statt, da dieser Effekt sowohl bei Rac1:GDP als auch Rac1:GppNHp auftritt. Schließlich ist auch der C-Terminus von Rac1 für die Interaktion nicht notwendig, da hier verkürztes Rac1 (1-184) eingesetzt wurde. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass diese hier gemessene Interaktion nicht spezifisch ist, sondern eher einer Aggregation zuzuschreiben ist. Ähnliche Experimente mit GST-Rac1 (volle Länge) lieferten keine einheitlichen Ergebnisse mittels Gelfiltration. Die Tatsache, dass FHOD1 (411-573) Rac1 nicht bindet, kann auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass der C-Terminus von Rac1 fehlte. Andererseits ist es möglich, dass sich am N-Terminus eine weitere GBD befinden könnte, mit der Rac1 unspezifisch wechselwirkt.

4.5 Einfluss von FHOD1 auf die Aktinpolymerisation

Die oben gezeigten Untersuchungen und Ergebnisse bezogen sich auf den Mechanismus der Regulation von FHOD1. Ein weiteres, funktionales Element der Formine ist darüberhinaus die FH2-Domäne, die für die Stimulierung der Aktinpolymerisation verantwortlich ist (Kovar et al., 2003; Pruyne et al., 2002a; Sagot et al., 2002a). So konnte für die FH2-Domänen von mDia1 und der Hefeformine Bni1p und Cdc12 gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, die Aktinpolymerisation anzuregen. Im Rahmen dieser Studie wurde die FH2-Domäne von FHOD1 sowie das aus der Expression mittels Baculovirus hergestellte, native FHOD1-Volllängenprotein hinsichtlich der Fähigkeit, Aktinpolymerisation zu nukleieren, untersucht. Dabei wurde zunächst die GST-FHOD1-FH2-Domäne (614-1096) im Aktinpolymerisationsexperiment eingesetzt (siehe Kapitel 3.5.5).

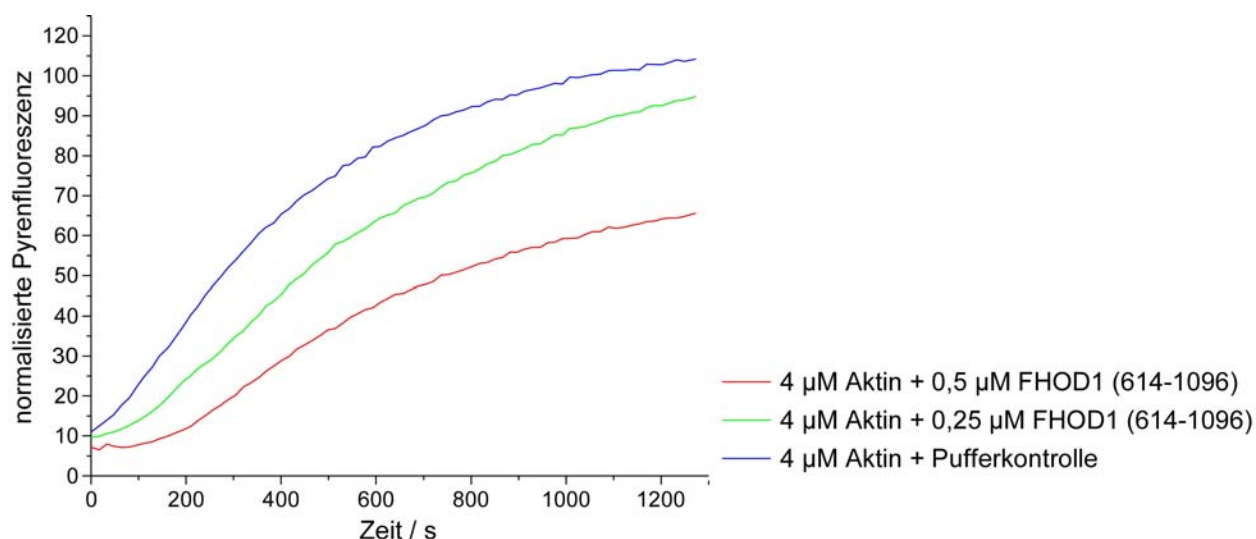


Abbildung 34: Inhibition der Aktinpolymerisation durch die FHOD1-FH2-Domäne (614-1096). Die Aktinpolymerisation wird durch den sauren Puffer (blaue Kurve) induziert. Verschiedene Konzentrationen der GST-FHOD1-FH2-Domäne hemmen die Nukleierung der Polymerisation (rote und grüne Kurve).

In Abbildung 34 ist zunächst zu erkennen, dass Aktin bei einer Konzentration von 4 μM durch den Puffer (20 mM Bis-Tris, 100 mM KCl, 1 mM DTE, pH 6,5) polymerisiert wird (blaue Kurve). Diese Beobachtung rührt von dem niedrigen pH-Wert her, der zu einer erhöhten Polymerisationsrate von Aktin führt. Die Aktinpolymerisation wird in Anwesenheit von GST-FHOD1-FH2 (614-1096) signifikant verlangsamt (rote Kurve). Möglicherweise bindet die FH2-Domäne an Aktinfilamente, ohne diese zu nukleieren. Die Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes (vgl. rote und grüne Kurve) deutet auf eine aktive GST-FHOD1-FH2-Domäne (614-1096) hin. Diese wirkt jedoch nicht stimulierend auf die Aktinpolymerisation, sondern verhält sich eher wie ein *capping*-Protein.

Als nächstes wurde das aus dem Baculoexpressionssystem hergestellte, native FHOD1-Volllängenprotein in dieser Aktinpolymerisationsuntersuchung eingesetzt. Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse dieses Experiments. Die Negativkontrolle war hier wieder 4 μM Aktin und der Puffer, in dem sich FHOD1 befindet (50 mM Hepes, 100 mM KCl, 1 mM DTE, pH 8), als Positivkontrolle wurde 4 μM Aktin in Gegenwart von 100 nM Diaphanous-FH2-Domäne (Dia-FH2) verwendet (freundliche Überlassung von Sebastian Hannemann, Arbeitsgruppe Oliver Fackler, Abteilung Virologie, Universität Heidelberg). Dia-FH2 zeigte eine deutliche Nukleierung der Aktinpolymerisation (margentafarbene Kurve), während Aktin allein nur langsam polymerisiert (schwarze Kurve). Bei Zugabe von 1 μM FHOD1-Volllängenprotein wurde diese Polymerisationsrate drastisch verringert. Diese Beobachtung war überraschend, da erwartet wurde, dass FHOD1 als Mitglied der Diaphanous-verwandten Formine autoreguliert ist und in Abwesenheit seiner aktivierenden GTPase inaktiv ist. In diesem Zustand sollte FHOD1 keine Auswirkung auf die Aktinpolymerisation haben, eine Verringerung der Aktinpolymerisationsrate eines nativen Formins wurde bislang nicht gezeigt.

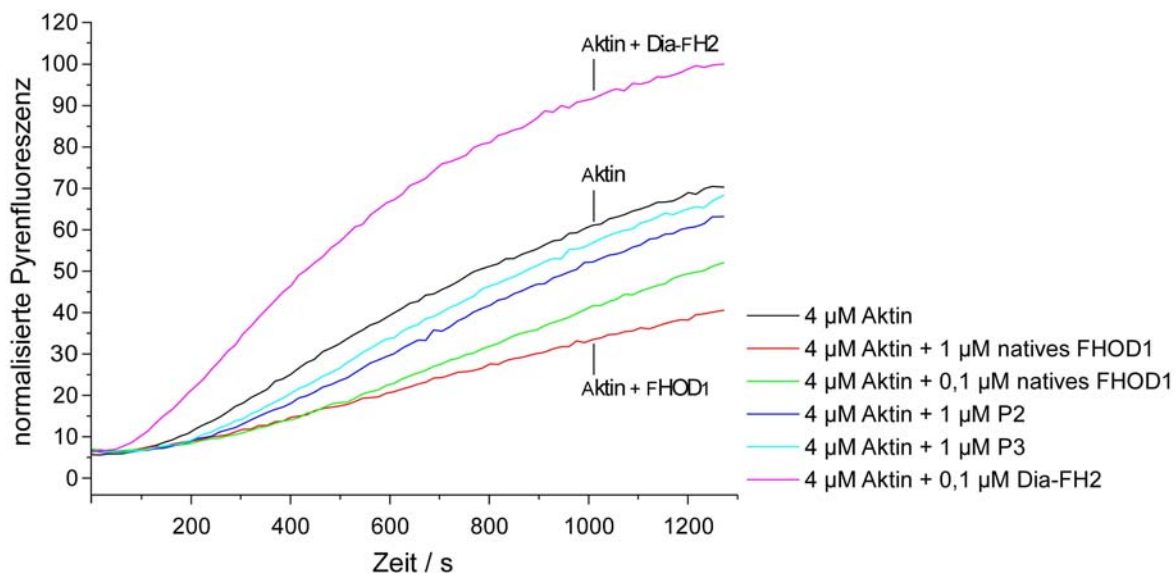


Abbildung 35: Inhibition der Aktinpolymerisation durch natives FHOD1-Volllängenprotein. FHOD1 inhibiert die Aktinpolymerisation konzentrationsabhängig (rote und grüne Kurve). Die Dia-FH2-Domäne (margentafarbene Kurve) nukleiert die Aktinpolymerisation gegenüber der intrinsischen Aktinpolymerisation (schwarze Kurve). Die beiden bei der Reinigung isolierten mutmaßlichen Abbauprodukte von FHOD1 hatten keinen Einfluss auf die Polymerisationsgeschwindigkeit (blaue und hellblaue Kurven).

FHOD1-Volllängenprotein zeigte wie GST-FHOD1 (614-1096) eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Reduktion der Polymerisationsrate (vgl. grüne und rote Kurve), so dass es ebenfalls Eigenschaften eines *capping*-Proteins besitzt. In diesem Experiment wurden auch die mutmaßlichen Abbaubanden, die bei der Reinigung isoliert wurden, auf Nukleierung der Aktinpolymerisation getestet (siehe Kapitel 4.2). Wie anhand der beiden Kurven zu erkennen ist (blaue und hellblaue Kurve), haben die Proteine jedoch keinen Einfluss auf die Polymerisationsrate. Bei den Proteinen

handelt es sich demnach wahrscheinlich um Verunreinigungen und weniger um Fragmente von FHOD1.

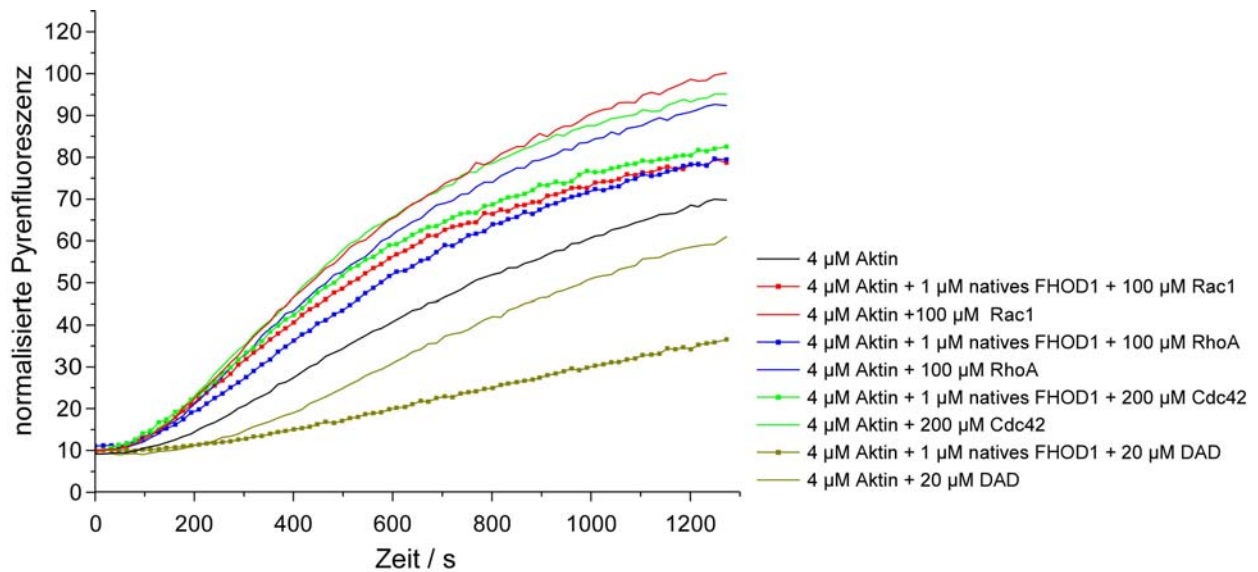


Abbildung 36: Rho-GTPasen und die DAD sind für eine Aktivierung der Nukleierung der Aktinpolymerisation durch FHOD1 nicht hinreichend. Die Aktinpolymerisation wird durch den Mg-Ionen-haltigen Puffer der GTPasen beschleunigt (rote, blaue und grüne Kurven). Dieser Effekt wird durch die Gegenwart von FHOD1 verringert, das die Aktinpolymerisation hemmt (rote, blaue und grüne gepunktete Kurven). Ein DAD-Peptid mit den DAD-Konsensusmotiven induziert die Aktinpolymerisation ebenfalls nicht (olivfarbene Kurven).

Anschließend wurde untersucht, ob die Rho-GTPasen Rac1, RhoA oder Cdc42 in der Lage sind, FHOD1-Vollängenprotein zu aktivieren und die Aktinpolymerisation zu induzieren. Dazu wurden die GTPasen als GST-Fusionsproteine verwendet und das gebundene Nukleotid gegen das GTP-Analogon GppNHp ausgetauscht (siehe Kapitel 3.3.10). Rac1 lag als Vollängenprotein vor, RhoA und Cdc42 waren C-terminal verkürzt (RhoA: 1-181; Cdc42: 1-178). Eingesetzt wurden die Rho-GTPasen in 100-fachen bzw. 200-fachen Überschuss zu FHOD1. Da die GTPasen nur stabil sind, wenn Mg-Ionen zugegen sind, befanden sie sich in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTE, pH 7,4. Mg-Ionen führen jedoch zu einer schnelleren Polymerisation von Aktin. Daher ist die Polymerisationsrate bei allen Kontrollen der GTPasen am Höchsten (siehe Abbildung 36). Interessanterweise wurde auch hier bei Anwesenheit von FHOD1 die Polymerisation inhibiert (vgl. rote, blaue bzw. grüne Kurve mit den gepunkteten Kurven gleicher Farbe), keine der Rho-GTPasen war hier in der Lage, eine Nukleation durch FHOD1 zu induzieren. Schließlich wurde versucht, die Nukleation der Aktinpolymerisation durch Zugabe der autoregulatorischen Domäne DAD zu induzieren. Dazu wurde ein synthetisch hergestelltes Peptid, das das hydrophobe DAD-Konsensusmotiv und den basischen Bereich umfasst (siehe Abbildung 20 und Kapitel 3.1.7), in 20-fachen Überschuss zu FHOD1 gegeben. Dies sollte die autoinhibierte, geschlossene Konformation öffnen und so die Nukleation ermöglichen. Wie die olivfarbenen Kurven in Abbildung 37 zeigen, wird auch hier die Aktinpolymerisation gehemmt, das Peptid allein hat keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Polymerisation

5. Biophysikalische und strukturelle Charakterisierung der CyclinT1-bindenden Domäne von Hexim1

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine zweite Studie durchgeführt, die sich thematisch vom Hauptthema dieser Arbeit abgrenzt, sich jedoch methodisch ergänzt. Dabei wurde die Interaktion des humanen Transkriptionsregulators Hexim1 mit dem Zyklinprotein CyclinT1 strukturell und biophysikalisch untersucht. Die Arbeiten erfolgten z.T. in Zusammenarbeit mit Dr. Sonja Dames und Prof. Dr. Stefan Grzesieck am Biozentrum der Universität Basel. Im Folgenden soll zunächst kurz in das Thema eingeführt werden, sowie die Ergebnisse dargestellt und diskutiert werden.

5.1 Regulation der Transkription durch P-TEFb und Hexim1

Die Verlängerung von RNA-Transkripten durch die RNA-Polymerase II (Pol II) ist ein hoch regulierter Prozess, bei dem sowohl die vollständigen RNA-Transkripte entstehen als auch die Prozessierung der pre-mRNA kontrolliert wird (Sims, III et al., 2004). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Faktoren identifiziert, die auf den Elongationszustand einwirken. Ein Schlüsselement für den Wechsel von abgebrochener zu produktiver Verlängerung reifer mRNA-Moleküle ist der positive Transkriptionsverlängerungsfaktor b (P-TEFb, *positive transcription elongation factor b*) (Price, 2000). Nach Initiierung der Transkription ist diese zunächst durch den DRB-Sensitivitäts-induzierenden Faktor (DSIF, *DRB sensitivity inducing factor*) sowie den negativen Elongationsfaktor (NELF, *negative elongation factor*) blockiert und eine Freisetzung erfordert die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) von RNA Pol II sowie einer Untereinheit von DSIF durch P-TEFb (Yamaguchi et al., 1999). Den Kern des P-TEFb-Komplexes bildet dabei ein Heterodimer aus der Zyklin-abhängigen Kinase 9 (Cdk9, *cyclin dependent kinase 9*) und einem Zyklinprotein CyclinT1, T2 oder K. Dabei wird die Phosphorylierung der CTD der RNA Pol II von der Aktivität der Kinase Cdk9 in P-TEFb bestimmt. Im Gegensatz zu anderen Zyklinen unterliegt die Genexpression von CyclinT1 keiner starken Regulation.

Neuere Untersuchungen ergaben, dass die Aktivität von P-TEFb stark reguliert wird, da etwa die Hälfte der Molekülkomplexe im Kern inaktiv ist. Der inaktive Komplex enthält Cdk9, CyclinT1 oder T2, die kleine nukleare (sn, *small nuclear*) RNA 7SK und das regulatorische Protein Hexim1 (Michels et al., 2003; Michels et al., 2004a; Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001; Yik et al., 2003b; Yik et al., 2004). Die 7SK-snRNA hat vermutlich die Rolle eines molekularen Gerüsts, das die Wechselwirkung von Hexim1 mit P-TEFb vermittelt. Hexim1 interagiert direkt mit der konservierten Cyclin-Box-Domäne von CyclinT1 und hemmt dadurch die Kinaseaktivität von Cdk9. Bei Bindung

des Bromodomänen-Protein Brd4 an P-TEFb nimmt dieser einen aktiven Zustand an und die Verlängerung der Transkription wird induziert (Jang 2005, Yang 2005). Dabei koppelt Brd4 wahrscheinlich aktives P-TEFb und RNA Pol II an acetylierte Reste der Histone H3 und H4 und an den Mediator Komplex.

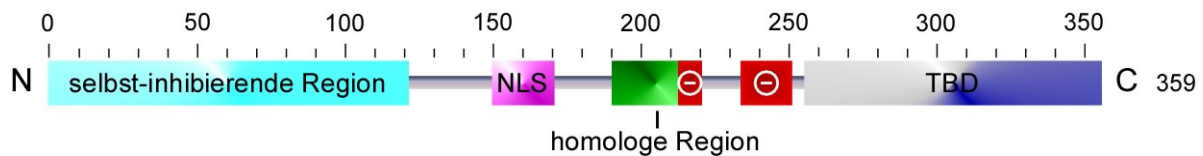


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Domänenorganisation in humanem Hexim1. Am N-Terminus befindet sich eine vermutete selbstinhibierende Region, zentral liegen ein Kernlokalisierungssignal und eine homologe Region, die einen von zwei negativ geladenen Bereichen enthält. Am C-Terminus liegt die CyclinT-bindende Domäne. NLS: Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*), TBD: CyclinT-bindende Domäne.

Entdeckt wurde Hexim1 zunächst in glatten Muskelzellen, da seine Expression nach Exposition mit Hexamethylen-Bisacetamid (HMBA) induziert wurde (Kusuhara et al., 1999; Ouchida et al., 2003). Die Primärsequenz von humanem Hexim1 hat eine Länge von 359 Aminosäuren, die funktionell grob in vier Regionen unterteilt werden kann. Am N-Terminus (1-149) wird eine selbst-inhibierende Domäne vermutet, im zentralen Bereich (150-177) befindet sich ein Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localization signal*), das auch an die 7SK snRNA bindet. C-terminal davon ist ein Region sehr hoher Homologie (185-220) mit einem negativ geladenen Bereich, der bei der Inhibition von P-TEFb beteiligt sein könnte, am C-Terminus befindet sich die CyclinT-bindende Domäne (TBD, *T1/T2 binding domain*), die zudem die Dimerisierung von Hexim1-Molekülen vermittelt (Barboric et al., 2005; Dulac et al., 2005; Li et al., 2005; Michels et al., 2003; Michels et al., 2004b; Schulte et al., 2005; Yik et al., 2003a). Aus Sekundärstrukturvorhersagen geht hervor, dass die ersten drei Bereiche wahrscheinlich flexibler Natur sind, die TBD jedoch eine stabile Domäne mit vermuteter *coiled-coil*-Struktur ist. Das kürzlich identifizierte Homolog Hexim2 ist in der Lage, Heterodimere mit Hexim1 zu bilden und P-TEFb in Abhängigkeit der 7SK snRNA zu hemmen (Byers et al., 2005; Dulac et al., 2005; Yik et al., 2005).

Hexim1 besitzt in seiner Eigenschaft als Regulator der Transkriptionselongation noch andere Phänotypen: So wurde es als Inhibitor von Brustzellwachstum identifiziert (Wittmann 2003, 2005). Das Expressionsniveau von Hexim1 liegt in normalem Brustzellgewebe deutlich über dem in Gewebe von Brusttumoren. Zudem geht aus serologischen Untersuchungen hervor, dass viele Tumorantigene auf Chromosom 17q codiert sind, darunter auch Hexim1 und Hexim2 sowie in direkter Nachbarschaft das Gen für das Brustkrebsantigen Brca1 (*breast cancer-associated gene 1*) (Stone 2003). Eine Fehlregulation von P-TEFb führt zu Herzmuskelzellhypertrophie (Sano et al., 2002), die mit einem erhöhten RNA- und Proteingehalt in den betroffenen Zellen somit einer Vergrößerung der Zelle verbunden ist. Ferner ist der Hexim1-Proteingehalt während der Differenzierung von Neuroblastomazellen erhöht und eine ektopische Expression von Hexim1 führt

zu verringertem Zellwachstum und treibt neuronale Differenzierung voran (Turano 2005). Die Wichtigkeit der Regulation der Transkriptionselongation und die Bedeutung von Hexim1 in diesem Prozess werden angesichts dieser Befunde nachdrücklich deutlich.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Darstellung der CyclinT1 und Hexim1-Fragmente

Die Strukturaufklärung erfolgte an dem Hexim1-TBD-Fragment (255-359) mittels NMR-Spektroskopie, das zu diesem Zweck als uniform ^{15}N -markiertes Protein, ^{15}N - ^{13}C -markiertes Protein sowie 10% ^{13}C -markiertes Protein hergestellt wurde (Neri et al., 1989). Bei allen Proteinen wurde der N-terminale Hexahistidinanker proteolytisch durch die TEV-Protease gespalten und getrennt. Exemplarisch ist in Abbildung 38 der Reinheitsgrad von ^{15}N -markiertem Hexim1 (255-359) dargestellt. Für die weitere Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie wurden drei Fragmente der Hexim1-TBD als uniform ^{15}N -markierte Fragmente der Hexim1-TBD mit den Grenzen (242-359), (255-359) und (255-316) gereinigt. Für die NMR-Titrationsexperimente (siehe 5.2.3) zur Untersuchung der Interaktionsstelle auf der Hexim1-TBD wurde das CyclinT1-Fragment (1-292) eingesetzt, das als GST-Fusionsprotein gereinigt und der GST-Affinitätsanker mittels Thrombin gespalten und getrennt wurde. Der Reinheitsgrad dieser Proteine ist in Abbildung 38 veranschaulicht.

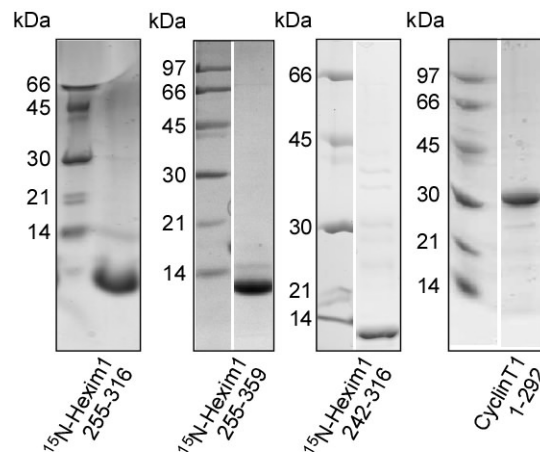


Abbildung 38: Dokumentation des Reinheitsgrads der für die NMR-spektroskopische Analyse und die Bindungsexperimente gereinigten Hexim1 und CyclinT1-Fragmente. Es wurden jeweils 3 bis 5 μg Protein auf 17 bzw. 15%ige SDS-Gele aufgetragen. Der Reinheitsgrad betrug etwa 95%. ^{15}N -Hexim1 (255-316) und ^{15}N -Hexim1 (255-359) waren mit ungeschnittenem Protein mit Hexahistidinanker leicht verunreinigt.

Für die biophysikalische Charakterisierung der Interaktion von CyclinT1 und Hexim1 wurden vier Proteine in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Dabei wurde von CyclinT1 nur ein N-terminales

Fragment verwendet, die so genannte Cyclin-Box (1-272), die stabil und gut löslich war. Dieses wurde zunächst als GST-Fusionsprotein exprimiert und der GST-Affinitätsanker enzymatisch mit Thrombin gespalten und getrennt, so dass es eine Reinheit von 99% besaß (Abbildung 39 rechts). Aus einem Liter Bakterienkultur konnten so 3 mg CyclinT1 gereinigt werden. Gleiches gilt auch für das Hexim1-Volllängenprotein, dessen Reinheit bei über 95% lag. Die C-terminalen Fragmente von Hexim1 (255-316) und (255-359) konnten in *E. coli* als Hexahistidin-fusionsprotein in großen Ausbeuten von 30 mg bzw. 60 mg pro Liter Bakterienkultur mit hoher Löslichkeit exprimiert und gereinigt werden. Nach Verdau des Hexahistidinankers waren die Proteine jedoch zu einem geringen Teil mit nicht-geschnittenem Protein verunreinigt (Abbildung 39 links).

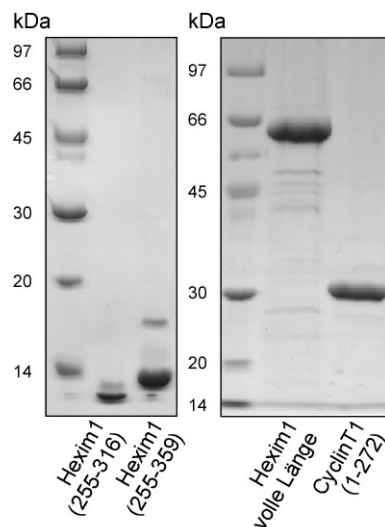


Abbildung 39: Darstellung des Reinheitsgrads der für die Untersuchung der Interaktion von Hexim1 und CyclinT1 verwendeten Proteine. Es wurden jeweils 5 µg Protein auf ein 17%iges (links) bzw. 15%iges SDS-Gel (rechts) aufgetragen. Die Hexim1-Fragmente (255-316) und (255-359) waren verunreinigt mit ungeschnittenem Protein, so dass sich 3 kDa über dem geschnittenen Protein jeweils eine schwache Bande vom Protein mit Hexahistidinanker befindet. Das Hexim1-Volllängenprotein lief deutlich höher als erwartet bei etwa 64 kDa und wies wenig Abbau oder Verunreinigungen auf. Das CyclinT1 (1-272)-Fragment hatte eine Reinheit von 99%.

5.2.2 Die CyclinT1-bindende Domäne von Hexim1 besitzt eine parallele zweigeteilte *coiled-coil*-Struktur mit einer vorausgehenden Helix

Die dreidimensionale Struktur der CyclinT1-bindenden Domäne von humanem Hexim1 in Lösung wurde mittels heteronuklearer NMR-Spektroskopie von Dr. Sonja A. Dames am Biozentrum Basel, Universität Basel, Abteilung Strukturelle Biologie, bestimmt. Nach Überprüfung der Ausbeuten und Stabilität dreier Hexim1-Fragmente, die bei den Positionen 242, 255 und 266 begannen und bis zur C-terminalen Position 359 reichten, wurde für die Strukturbestimmung das Fragment Hexim1 (255-359) verwendet, das sich am besten exprimieren und reinigen ließ. Dieses Fragment wird im Folgenden TBD genannt. Zur Messung der NMR-Spektren wurde das Protein uniform mit stabilen ^{15}N - bzw. ^{13}C -Isotopen markiert. Mit multidimensionalen NMR-Experimenten konnten die ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen der Aminosäurereste 255-359 zugeordnet werden. Die

Aminosäurezusammensetzung der TBD ist sehr ungewöhnlich: Die TBD enthält 18 Leuzine, jedoch nur ein Isoleuzin und Valin sowie 40% geladene Reste, davon sind 18 Glutaminsäuren, sieben Asparagine, zwölf Arginine und fünf Lysine. In Abbildung 40 ist das $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der Hexim1-TBD zu sehen. Die Signale sind über einen großen Bereich der ^1H -Frequenz von 6,7 bis 9,2 ppm verteilt und weisen trotz vieler gleicher Aminosäuren nur geringe Signalüberlappung auf im Vergleich z.B. zum Spektrum der Diaphanous autoregulatorischen Domäne DAD (Abbildung 30). Die Signale im Bereich von 7,2 bis 8,5 ppm zeigen, dass ein gefaltetes Protein mit α -helikaler Struktur vorliegt. Die Struktur wurde auf Basis von nahezu 3000 Einschränkungen (engl.: *restrains*) bestimmt und in einer *watershell* verfeinert. Dabei waren die *r.m.s*-Abweichungen für die 20 Strukturen mit den niedrigsten Energien kleiner als 0,5 Å für gefaltete Segmente (Tabelle IX im Anhang).

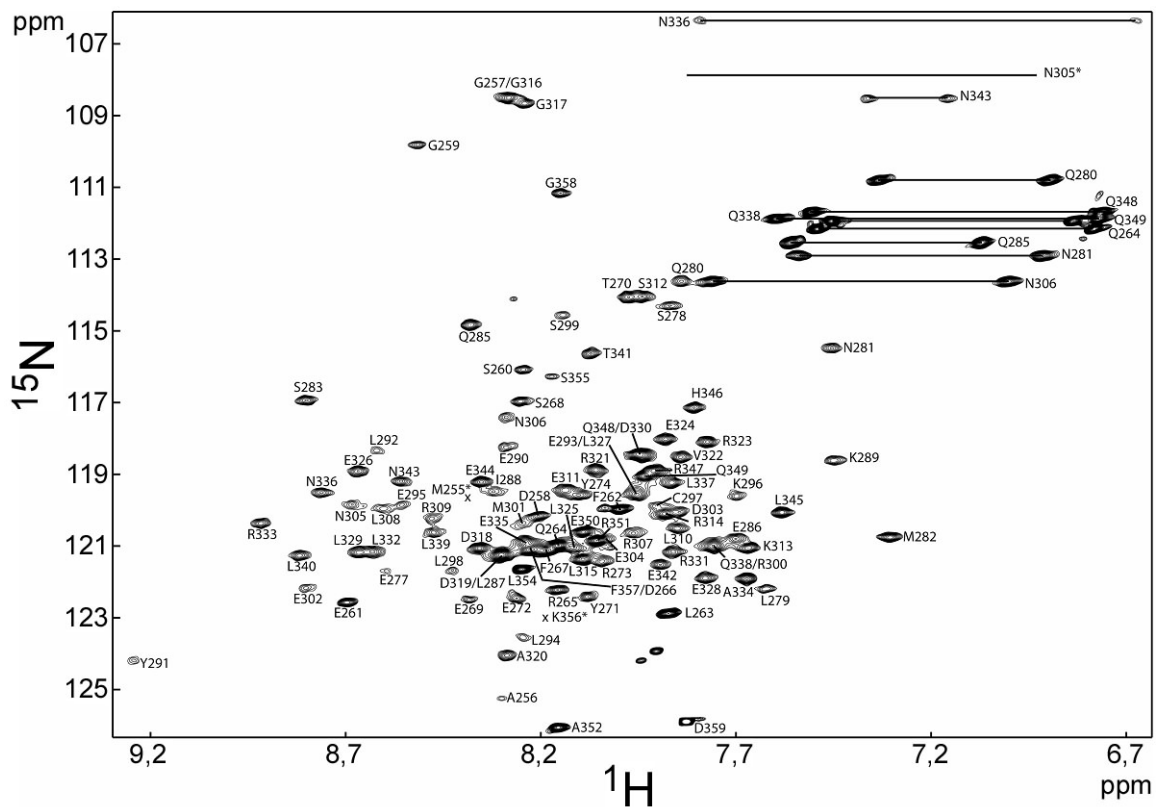


Abbildung 40: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der CyclinT-bindenden Domäne von Hexim1 (255-359) bei 308 K. Die zugeordneten Signale sind mit dem Einbuchstabencode für Aminosäuren und der Position in der Primärsequenz von Hexim1 benannt (Dames et al., 2006).

Die Struktur der Hexim1-TBD ist ein paralleles, zweigeteiltes, homodimeres *coiled-coil*, das einen gewundenen Zylinder mit einer Länge von etwa 95 Å und einem Durchmesser von etwa 20 Å der linksdrehenden Superhelix bildet (siehe Abbildung 42 A). N-terminal von der *coiled-coil*-Region befindet sich eine kurze α -Helix (α_1), die von Position T276 bis N281 reicht. Diese koppelt an das erste *coiled-coil*-Segment der jeweils gegenüberliegenden Helix α_2' . Die kanonische α -helikale

Die Struktur von Position 284-348 ist typisch für *coiled-coil*-Domänen, jedoch gibt es in diesem Bereich Abweichungen von der kennzeichnenden Konsensussequenz, wie in der Darstellung eines helikalen Rades zu sehen ist (siehe Abbildung 42 D). Im ersten *coiled-coil*-Segment ($\alpha 2/\alpha 2'$) ist eine a-Position mit Leuzin und eine mit Asparagin besetzt, was häufig in dimeren *coiled-coils* beobachtet wurde (Woolfson, 2005). Jedoch ist keine der vier Seitenketten der a-Position β -verzweigt (Ile, Val, Thr), wie dies für eine feste Packung eines parallelen *coiled-coil*-Dimers gewöhnlich der Fall ist (siehe Abbildung 42 C)(Lupas and Gruber, 2005). Dagegen stimmen die meisten Reste mit denen der Konsensussequenz ($\alpha 3/\alpha 3'$) in der zweiten *coiled-coil*-Helix überein. Die Positionen a und d sind in den ersten drei Wiederholungen mit Valin und Leuzin bzw. Asparagin besetzt. Die letzte Heptad-Wiederholung enthält allerdings an der d-Position einen Histidinrest, was normalerweise nicht vorkommt und den Endpunkt des dimeren *coiled-coil* angibt.

An e- und g-Positionen sind typischerweise geladene Reste zu finden, insbesondere Glutaminsäuren und Lysine, die die Spezifität der Paarung durch elektrostatische Wechselwirkungen bewirken. Entgegengesetzte Ladungen zwischen der Position g eines Heptads und Position e' des folgenden Heptads des jeweils gegenüberliegenden Stranges (bezeichnet als $i \rightarrow i'+5$) festigen die Interaktion des Homodimers, gleiche Ladungen schwächen sie. Im ersten *coiled-coil*-Segment sind drei der vier Reste an den Positionen e bzw. g geladen, jedoch haben die Aminosäurereste E290 und E295 einen destabilisierenden Einfluss, nur die Paarung E304 und R309 verstärkt die Bindung (siehe Abbildung 42 D). Ähnlich wie bei den Positionen a und d zeigen die Aminosäurereste der Positionen e und g' des zweiten *coiled-coil*-Segments elektrostatische Wechselwirkungen. Hier werden drei ionischen Wechselwirkungen zwischen R321 und E326, E328 und R333 sowie E342 und R347 vermittelt. Dadurch entsteht eine abwechselnde Polarität, die die strikte Regelmäßigkeit in der Faltung der homodimeren Struktur unterstützen könnte.

Die Heptad-Wiederholungen der zwei *coiled-coil*-Segmente $\alpha 2/\alpha 2'$ und $\alpha 3/\alpha 3'$ sind von einer zehn Aminosäuren-langen Sequenz unterbrochen. Dabei lassen sich die ersten vier Reste SKRL (312-315) an den abcd-Konsensus anpassen und der Beginn des zweiten Segments DAR (319-321) an edf-Konsensus, so dass durch den dazwischen liegenden Bereich GGD (316-318) drei Aminosäuren zusätzlich vorhanden sind. Diese Einfügung wird als *stammer* (engl.: Stammler) bezeichnet und bewirkt eine Überdrillung des *supercoils* (Brown 1996). Die kleinen Glyzinreste erhöhen zusätzlich die Flexibilität zwischen den *coiled-coil*-Segmenten, was auch mit den aufgenommenen ^{15}N -Relaxationsdaten beobachtet werden konnte. Die Drehung zwischen den beiden Superhelices wird auch deutlich durch die relativ hohen Rückgrat-*r.m.s.(d)*-Werte von etwa 3,3 Å innerhalb der strukturierten Region gegenüber einem Wert von etwa 0,4 Å für jedes einzelne *coiled-coil*-Segment (siehe Abbildung 42 B und Tabelle IX im Anhang).

Die Analyse der Heptad-Wiederholungen lässt sich auch auf den Bereich zwischen den Helices $\alpha 1$ und $\alpha 2$ anwenden. Die Anzahl der eingefügten Aminosäuren beträgt hier vier, was einem so genannten *stutter* (engl.: Stotterer) entspricht. Die Sequenz TESL (276-279) passt zum abcd-Konsensus, jedoch erlauben die Reste QNMS (280-283) keine kanonische Heptad-Wiederholung. Dieser *stutter* hat ein Unterwinden des *supercoils* zur Folge und unterbricht die Parallelität der beiden Helices am N-Terminus. Vielmehr werden durch die Seitenketten T276 und L279 und in geringerem Ausmaß Q280 der Helix $\alpha 1$ feste hydrophobe Interaktionen mit I288, Y291 und L292 der entgegenkommenden Helix $\alpha 2'$ und L287 in Helix $\alpha 2$ auf derselben Kette gebildet (siehe Abbildung 43). Somit scheint der Anfang der *coiled-coil*-Struktur in der TBD von einem genau definierten Helix-Schleifen-Bereich begrenzt und von den vorausgehenden ungefähr 20 flexiblen N-terminalen Resten getrennt zu werden.

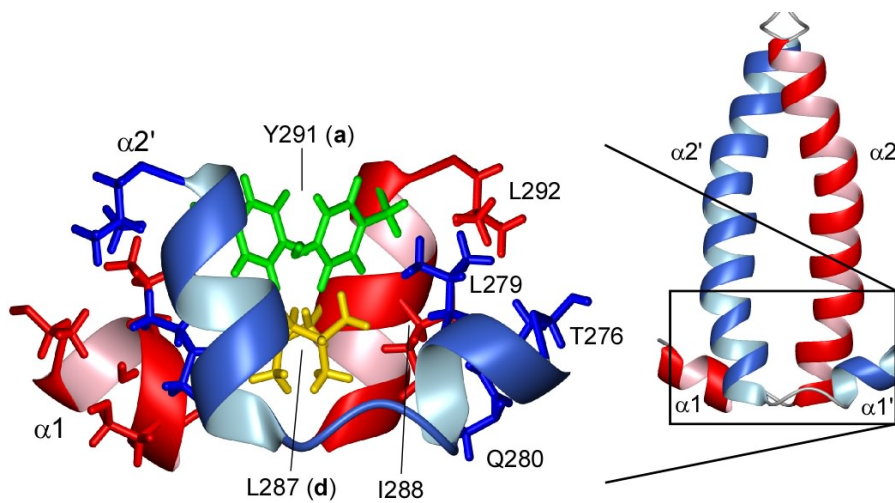


Abbildung 43: Wechselwirkung zwischen der Helix $\alpha 1$ und dem ersten *coiled-coil*-Segment $\alpha 2$. Vergrößerte Darstellung der Struktur der vorausgehenden Helix $\alpha 1$ und dem folgenden *coiled-coil*-Segment $\alpha 2$. Die Aminosäurereste T276, L279 und Q280 auf Helix $\alpha 1$ interagieren mit den hydrophoben Resten I288 und L292 der e- bzw. b-Positionen der Heptad-Wiederholung. Die Reste I288 sowie Y291 im *coiled-coil*-Segment sind gekennzeichnet.

Die Stabilität der dimeren TBD-Bindungsfläche und der dazwischen liegenden Sequenzen wird durch Analyse der Rückgratdynamik der TBD deutlicher. Für die N-terminalen 15 Reste sowie die C-terminalen zehn Reste können große Amplituden in der Rückgratbewegung aufgrund hoher Werte für die T_2 - und T_1 -Relaxationzeiten und verringerter $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -heteronuklearer NOE-Werte beobachtet werden (Abbildung 44). Hingegen erscheinen die beiden *coiled-coil*-Segmente starr, insbesondere im Bereich der a- und d-Positionen. Der dazwischen liegende *stammer* (316-318) zeigt eine eher erhöhte Dynamik des Amidrückgrats.

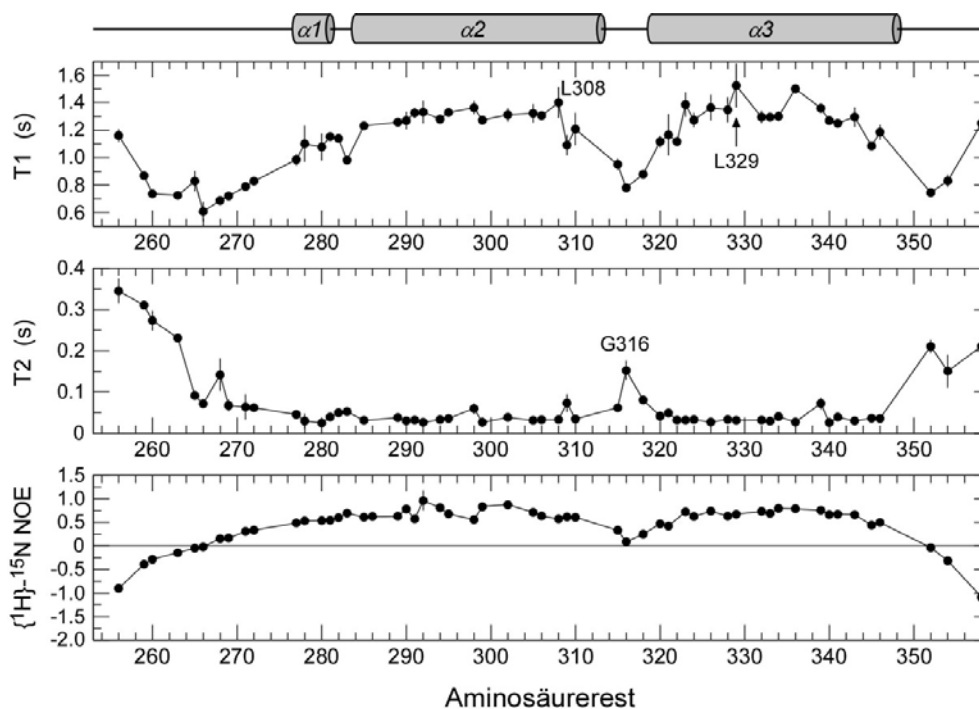


Abbildung 44: Rückgratdynamik der Hexim-TBD. Die T_1 - (oben) und T_2 -Relaxationszeiten (Mitte) sowie die $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -heteronuklearen NOE-Werte (unten) sind für jeden Aminosäurerest gezeigt. Sekundärstrukturelemente sind über den Diagrammen eingezeichnet. Die N-terminalen 15 und C-terminalen 10 Reste, wie die *linker*-Region (bei Aminosäure G316) zwischen den zwei *coiled-coil*-Segmenten sind Regionen mit erhöhter Flexibilität. Am solidesten in Bezug auf die T_1 -Relaxationszeiten in der Hexim1-TBD-Struktur sehen die hydrophoben Reste L298, L308, L329 und N336 der kanonischen Heptad-Wiederholung aus. Insgesamt besitzt das zweite *coiled-coil*-Segment gegenüber dem ersten *coiled-coil*-Segment starrere Eigenschaften.

Die Darstellung der Oberfläche des Hexim1-TBD-Dimers mit ihren elektrostatischen Eigenschaften zeigt die Polarität der hoch geladenen Domäne mit 50 negativ und 34 positiv geladenen Resten (Abbildung 42 C). Am N-Terminus des ersten *coiled-coil*-Segments befindet sich eine große negativ geladene Fläche, da dort die Aminosäurereste E286', E290', E293', E295 und E302 an den Positionen c', g' und e beider Ketten bzw. auf der Rückseite zusammentreffen. Umschlossen wird dieser Bereich von den positiv geladenen Resten R273, K289', K296', R300', R307, R309, K313 und R314 an den f'-, c- und e-Positionen der Helices α_1 , α_2' und α_2 . Der flexible N-Terminus der TBD ist überwiegend negativ geladen, die zweite *coiled-coil-superhelix* hingegen zeigt kein bestimmtes Ladungsmuster. Diese Ladungsverteilung deutet auf eine elektrostatische Interaktion bei der Erkennung von Bindungspartnern hin.

5.2.3 Bestimmung der CyclinT1-Bindungsfläche in der Hexim1-TBD durch NMR-Titrationsexperimente

Als Nächstes wurde mittels heteronuklearen NMR-Titrationsexperimenten untersucht, welche Aminosäurereste der Hexim1-TBD an der Bindung von CyclinT1 beteiligt sind. Dazu wurde zu einer Lösung uniform ^{15}N -markierter Hexim1-TBD ansteigende Mengen unmarkierten CyclinT1-Proteins (1-292) gegeben und zweidimensionale $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren aufgenommen. Bei Bindung des CyclinT1 (1-292)-Moleküls wurden die Signale von ungebundener Hexim1-TBD immer schwächer, was darauf hinweist, dass das freie Protein sich auf der NMR-Zeitskala im Austausch mit CyclinT1 befindet. Es erschienen jedoch keine neuen Signale, die zu der TBD im Komplex mit CyclinT1 gehören könnten, was wahrscheinlich aufgrund unspezifischer Aggregation des 60 kDa Proteinkomplexes verhindert wurde. Zur quantitativen Abschätzung des Titrationsexperiments wurden die TBD-Resonanzsignale integriert und das Verhältnis der Intensitäten von freier zu gebundener TBD ($\text{TBD}_{\text{frei}}/\text{TBD}_{\text{gebunden}}$) für zwei Datensätze mit den molaren Verhältnissen von CyclinT1 zu TBD von 0,2 bzw. 0,5 gebildet (Abbildung 45).

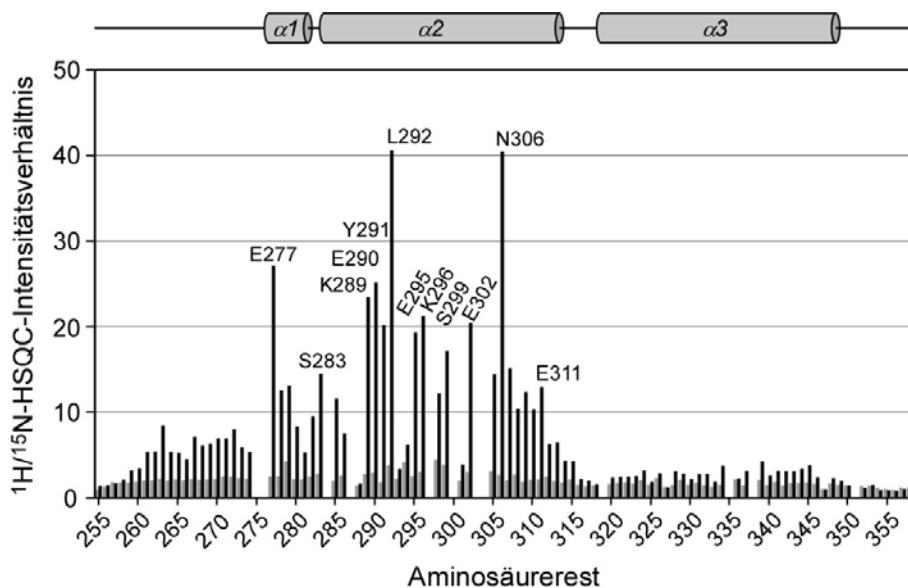


Abbildung 45: Kartierung der Bindungsfläche der Hexim1-TBD zur CyclinT1 mit NMR-Titrationsexperimenten. Dargestellt ist die Änderung der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Signalintensität bei Titration von unmarkiertem CyclinT1 (1-292) zu uniform ^{15}N -markierter Hexim1-TBD (255-359). CyclinT1 wurde in zwei Schritten mit molaren Verhältnissen von 0,2 (grau) und 0,5 (schwarz) zur TBD gegeben. Dabei ist das dargestellte Intensitätsverhältnis umso stärker, je größer der Verlust der Signalintensität ist.

Einige Signalintensitäten konnten wegen Überlappung von Resonanzsignalen nicht eindeutig integriert werden und sind daher im Diagramm nicht gezeigt. Die größten Änderungen hinsichtlich der Intensität wurden innerhalb des Bereichs des ersten *coiled-coil*-Segments für die Reste vom Beginn der ersten bis zur zweiten Heptad-Wiederholung (KEYL, 289-292) beobachtet. Außerdem

änderten sich die Intensitäten für das Amidrückgrat der Reste E295, K296, S299, E302, N306 und E311, die sich alle im ersten *coiled-coil*-Segment der TBD (284-313) befinden. Die CyclinT1-Erkennungsdomäne wird demnach von dieser *coiled-coil*-Struktur gebildet. Zwei weitere Signale mit größerer Intensitätsänderung gehören zu den Resten E277 sowie S283, die in der dem *coiled-coil* vorausgehenden Helix α_1 und der Verbindungsschleife zur *coiled-coil*-Region lokalisiert sind.

Die Ergebnisse dieser Titration wurden anschließend auf der Oberfläche der Hexim1-TBD veranschaulicht (Abbildung 46). Von den zwölf am meisten betroffenen Aminosäureresten befinden sich drei an der Position b der Heptad-Wiederholung (L292, S299, N306), vier weitere Reste E295, E302, K289 und K296 an den benachbarten Positionen e und f. Zudem änderte sich die Konformation einer Aminosäure (Y291) aus der intermolekularen Bindungsfläche des Dimers, was zu der Hypothese passt, dass große hydrophile Aminosäuren an dieser Position die Bindungsfläche schwächen. Um diese Kartierung mittels NMR-Titrationsexperimenten mit möglichen wichtigen Bindungsstellen auf der TBD in Verbindung zu bringen, wurde eine Abschätzung der Sequenzkonservierung auf Grundlage von 18 Hexim-Proteinen aus verschiedenen Organismen durchgeführt. Bei Darstellung dieser Sequenzkonservierung auf der Oberfläche der Hexim1-TBD-Struktur fällt auf, dass die Reste auf dem ersten *coiled-coil*-Segment stärker konserviert sind als die des zweiten *coiled-coil*-Segments. Aminosäurereste an a- und d-Positionen sind jedoch ausnahmslos gut konserviert (siehe Abbildung 41 und Abbildung 46 B). Von den Aminosäureresten der vorausgehenden α_1 -Helix sowie den Resten L292 bis E302 auf der Helix α_2 wird ein durchgehender Bereich hoher Sequenzkonservierung gebildet. Diese Region stimmt gut mit den Resten überein, die mittels der NMR-Titrationsexperimente bestimmt wurden.

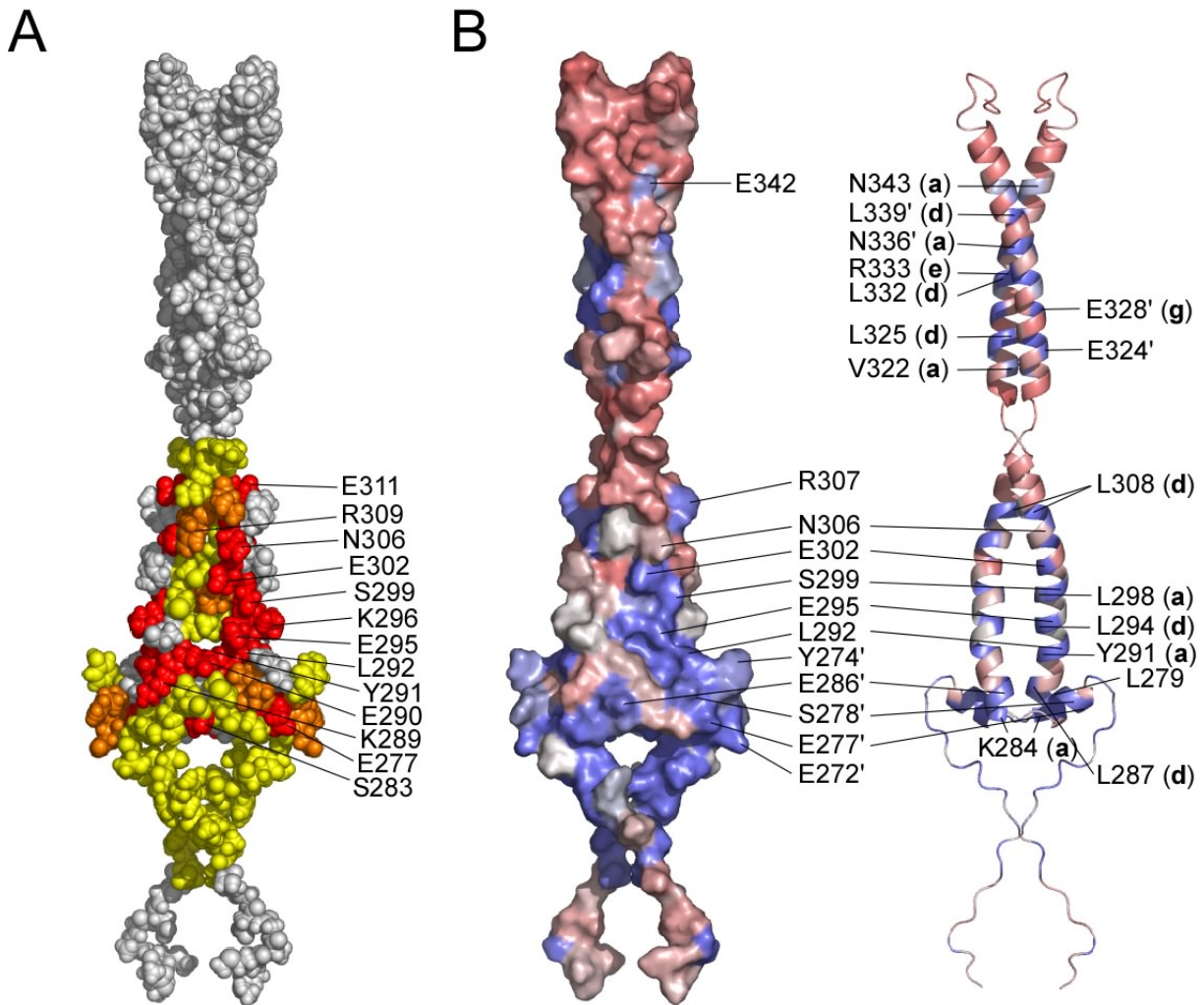
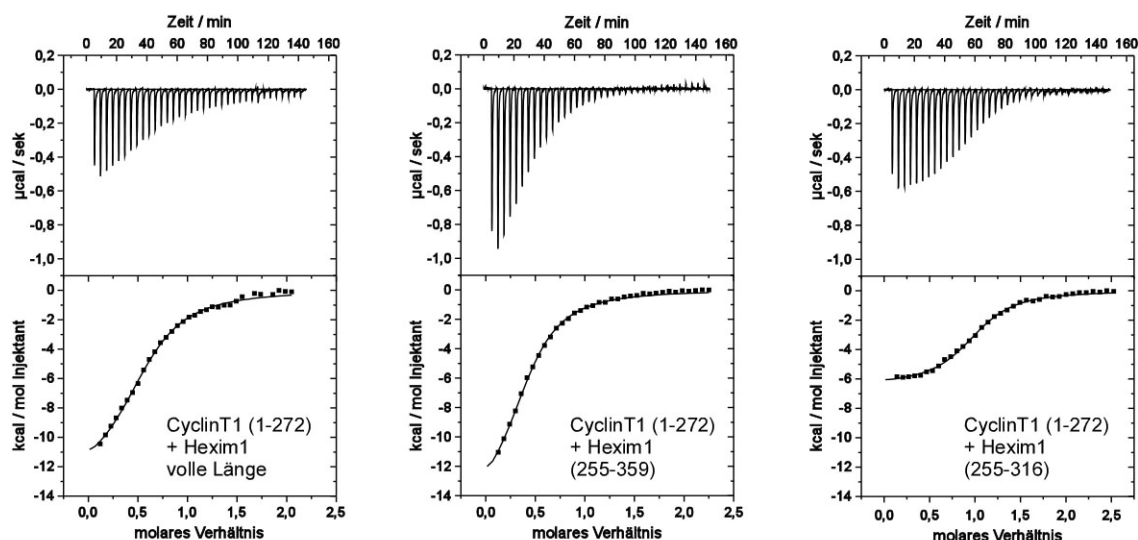


Abbildung 46: Darstellung der mittels NMR bestimmten für die Interaktion mit CyclinT1 entscheidenden Aminosäurereste und Sequenzkonservierung auf der Oberfläche der Hexim1-TBD. A: Benennung der CyclinT1-bindenden Region auf der Oberfläche der Hexim1-Struktur, die mittels NMR-Spektroskopie identifiziert wurden. Die Farbcodierung entspricht einem Intensitätsverhältnis von geringen Änderungen (Intensitätsverhältnis 5 bis 10, gelb), über mittlere Änderungen (>10 bis 15, orange) bis großen Änderungen (>15, rot). B: Oberflächen- und Bänderdarstellung der Sequenzkonservierung der Hexim1-TBDs. Die Sequenzidentitäten auf Grundlage des Vergleichs von 18 *hexim*-Genen sind gefärbt nach dem Grad der Konservierung von blau (variabel) zu grau (durchschnittlich) zu rot (konserviert).

5.2.4 Charakterisierung der Interaktion von Hexim1 und CyclinT1 mit isothermaler Titrationskalorimetrie

Zur Quantifizierung der Bindung von Hexim1 und CyclinT1 wurde diese kalorimetrisch untersucht. Dazu wurden das Hexim1-Volllängenprotein, die Hexim1-TBD (255-359) und ein kurzes Fragment (255-316) zur Eingrenzung und Charakterisierung der bindenden Region eingesetzt. Letzteres Fragment wurde ausgehend von den NMR-Titrationsexperimenten gewählt, um zu untersuchen, ob das erste *coiled-coil*-Segment für die Interaktion mit CyclinT1 ausreichend ist. Die erhaltenen ITC-Messungen und deren Integrale sowie den bestimmten Daten sind in Abbildung 47 dargestellt.



Hexim1-Fragment	$k_D / \mu\text{M}$	$\Delta H / \text{kcal mol}^{-1}$	$T\Delta S / \text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta G / \text{kcal mol}^{-1}$	N
volle Länge	2,3	-13,1	-5,6	-7,5	0,57
(255-359)	4,7	-15,2	-8,2	-7,0	0,42
(255-316)	2,3	-6,4	1,0	-7,4	1

Abbildung 47: Die Stöchiometrie der Interaktion zwischen Hexim1 und CyclinT1 hängt von der Länge des Hexim1-Fragments ab. Es sind die Injektionen für jede Messung und dessen Integrationen sowie die daraus ermittelten thermodynamischen Daten gezeigt. Während das Volllängenprotein Hexim1 und die Hexim1-TBD (255-359) ähnliche Kurvenverläufe zeigten und in einem molaren Verhältnis von 2:1 zu CyclinT1 (1-272) interagierten, wies das kurze Hexim1 (255-316) ein anderes Verhalten auf und reagierte mit CyclinT1 (1-272) in einer 1:1-Stöchiometrie. Die gemessenen Werte für die freie Enthalpie ΔG unterschieden sich zwischen den Konstrukten nur geringfügig und die Dissoziationskonstanten lagen im unteren mikromolaren Bereich.

Bei jeder Messung befand sich CyclinT1 in der Messzelle und hatte im Falle der Messungen der Hexim1-TBD und Hexim1 (255-316) eine Konzentration von 0,043 mM, bei Hexim1 (volle Länge) eine Konzentration von 0,02 mM. Die Hexim1-Konstrukte in der Injektionsspritze hatten jeweils eine zehnfach höhere Konzentration und wurde nach Themostatisierung auf 15°C schrittweise in die Messzelle titriert. Die Integration der Spektren von Hexim1 (volle Länge) und (255-359) wiesen einen ähnlichen Verlauf auf. Die Interaktionen führten zu ähnlichen Wärmeabgaben von $\Delta H = -13,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ bzw. $\Delta H = -15,2 \text{ kcal mol}^{-1}$. Die Änderung der Entropie $T\Delta S$ war in beiden Fällen stark negativ, d.h. das System wurde geordneter. Dies ist z.B. dann der Fall, wenn zwei Teilchen zu einem reagieren. Die Stöchiometrie der Reaktion hatte einen Wert von $N = 0,5$, was angesichts der Dimereigenschaften von Hexim1 ein überraschender Wert war. Das molare Verhältnis N ist streng definiert und gibt an, in welchem Verhältnis die Moleküle aus der Spritze mit Molekülen in der Zelle interagieren. In diesem Fall reagieren demnach 0,5 Hexim1-Moleküle mit je einem Molekül CyclinT1, anders ausgedrückt ein Hexim1-Dimer interagiert mit einem CyclinT1-Molekül. Die Messung mit einem C-terminal verkürzten Hexim1-Fragment, Hexim1 (255-316), zeigte deutlich die Form einer Bindungskurve, jedoch einen völlig veränderten Verlauf als bei den zuvor beschriebenen Konstrukte und lieferte andere Daten. Insbesondere betrug die Enthalpie nunmehr etwa die Hälfte der oben angegebenen Werte ($\Delta H = -6,4 \text{ kcal mol}^{-1}$). Der größte Unterschied war, dass der

Stöchiometriefaktor den Wert $N = 1$ angenommen hatte. Zum anderen wechselte gegenüber den ersten beiden Messungen das Vorzeichen des Entropiebeitrags $T\Delta S$, der bei dieser Messung positiv war und einen relativ geringen Betrag von $T\Delta S = 1,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ hatte. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Teilchenzahl bei der Reaktion nahezu konstant blieb. Wahrscheinlich liegt Hexim1 (255-316) in der Spritze des ITCs als Dimer vor und könnte bei Injektion in die Zelle dissoziieren und als Monomer an CyclinT1 (1-272) binden oder bei Bindung an CyclinT1 dissoziieren. Eine Erklärung dafür könnte die Abwesenheit des C-terminalen *coiled-coil*-Segments sein, die die dimeren Eigenschaften von Hexim1 vermittelt. Zudem ist möglich, dass Hexim1 (255-316) weniger sterische Hinderungen aufweist und einen 2:2-Komplex mit CyclinT1 (1-272) eingeht.

5.2.5 Molekulare Dispersion des Hexim1:CyclinT1-Komplexes

Zur weiteren Analyse der Stöchiometrie wurde der Hexim1-TBD:CyclinT1-Komplex mittels Größenausschlusschromatographie untersucht. Dazu wurden äquimolare Mengen von CyclinT1 (1-272) und Hexim1-TBD (255-359) bzw. Hexim1 (255-316) auf eine mit 20 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM TCEP äquilibrierte Biosep S2000-Gelfiltrationssäule mit einem Ausschlussvolumen von 300 kDa injiziert (Abbildung 48). CyclinT1 (1-272) mit einem Molekulargewicht von 31,5 kDa eluierte bei 16,52 ml, wohingegen die dimere Hexim1-TBD (255-359) mit 25 kDa als scheinbar größeres Molekül bei 14,48 ml eluierte. Dieses Verhalten wurde schon in früheren Experimenten beobachtet (Schulte et al., 2005) und spiegelt die elliptische Form der hier bestimmten *coiled-coil*-Struktur der Hexim1-TBD wieder. Bei Auftragen des vorgeformten Komplexes von CyclinT1 und Hexim1-TBD verschob sich das Elutionsprofil der TBD hin zu kleineren Volumina, was eine Vergrößerung der Ausmaße der TBD durch gebundenes CyclinT1 (1-272) anzeigt. Ferner verblieb im Elutionsprofil ein verbreiteter *peak* von CyclinT1 (1-272). Dies könnte darauf hindeuten, dass bei der Bindung von Hexim1-TBD und CyclinT1 (1-272) letzteres aufgrund der 1:2-Stöchiometrie im Überschuss vorlag und somit nicht gebunden werden konnte.

Das gleiche Experiment wurde mit dem kurzen Hexim1 (255-316) wiederholt (Abbildung 48 B). Auch hier konnte ein für das Molekulargewicht von 7,7 kDa geringes Elutionsvolumen von 16,35 ml beobachtet werden, was bei elliptischen *coiled-coil*-Strukturen erwartet wird. Bei Injektion des Hexim1 (255-316):CyclinT1 (1-272)-Komplexes ist wieder eine eher geringe Verschiebung zu einer apparenten Masse von 32 kDa zu beobachten. Hier zeigt sich deutlich, dass kein 2:2-Komplex, sondern ein 1:1-Heterodimer zwischen Hexim1 (255-316) und CyclinT1 (1-272) gebildet wurde.

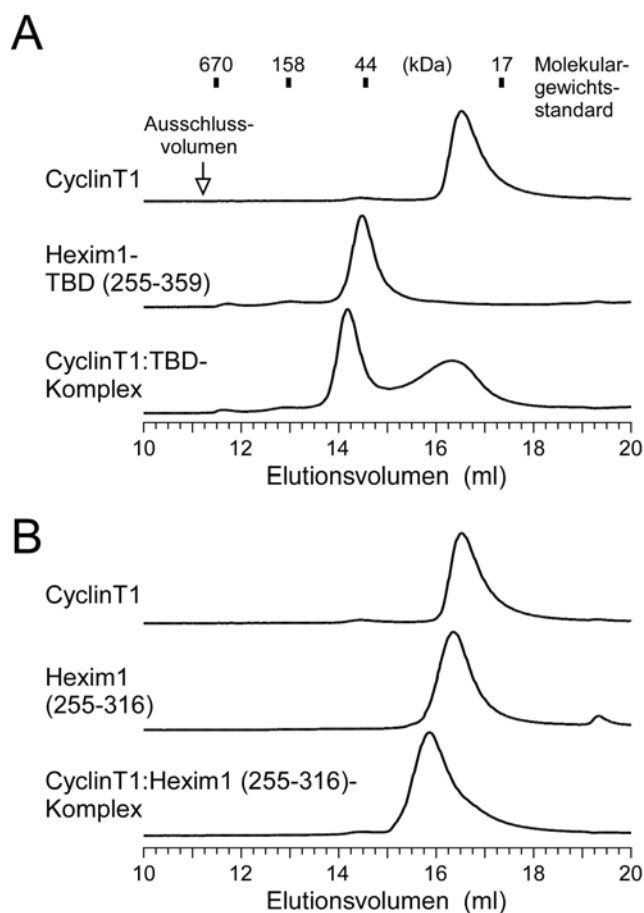


Abbildung 48: Analytische Größenausschlusschromatographie der Komplexbildung zwischen CyclinT1 (1-272) und Hexim1-TBD (obere Reihen) bzw. Hexim1 (255-316) (untere Reihen). Die stabförmige Struktur der TBD-Moleküle bedingte eine frühe Retentionszeit (jeweils mittlere Reihen). A: Komplexbildung bei äquimolaren Verhältnissen führte im Falle von Hexim1-TBD zu überschüssigem CyclinT1 im Elutionsprofil, was einer 1:2 Stöchiometrie entspricht. B: Beim Elutionsprofil des kurzen Hexim1 (255-316) kam es nicht zu einer starken Verschiebung zu größeren Molekulargewichten, so dass hier ein 1:1-Komplex vorlag.

5.2.6 Untersuchung der Stöchiometrie des Hexim1:CyclinT1-Komplexes mittels Fluoreszenzspektroskopie

Als zusätzliche Methode zur Bestimmung der Bindungsstöchiometrie der Interaktion zwischen Hexim1-TBD und CyclinT1 wurde ein weiteres, auf Fluoreszenz basierendes Experiment durchgeführt. Dabei wurde eine Hexim1-TBD-Mutante (G257C, C297S) verwendet, die am Lösungsmittel-exponierten C257 mit IAEDANS (Iod-acetylaminooethylaminonaphthalen-1-sulfonsäure) fluoreszenzmarkiert wurde (Schulte et al., 2005) und derart in der Nähe der CyclinT1-bindenden Region ein Dansyl enthält, dessen Fluoreszenzverhalten sich bei Bindung an CyclinT1 ändert. Dieses Molekül wurde in einer Fluoreszenzküvette in einer Konzentration von 7,2 μM vorgelegt und anschließend CyclinT1 sukzessiv zugegeben, bis dieses im Überschuss vorlag. CyclinT1 (1-272) hatte eine Konzentration von 0,1 mM. Dansyl wurde bei 350 nm zur Fluoreszenzemission bei 494 nm angeregt. Sind alle Bindungsplätze belegt, ändert sich die Fluoreszenz nicht mehr und man kann

bei einer Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Konzentration von CyclinT1 an der Abszisse ablesen, bei welcher CyclinT1-Konzentration die Sättigung eintritt. In Abbildung 49 ist zu erkennen, dass bei einer CyclinT1-Konzentration von etwa 3,5 μM ein Plateau erreicht wurde. Dies entsprach etwa der Hälfte der vorgelegten (monomeren) Hexim1-TBD-Konzentration. Auch dieses Experiment bestätigte somit die 2:1-Stöchiometrie des Hexim1-TBD-CyclinT1 (1-272)-Komplexes.

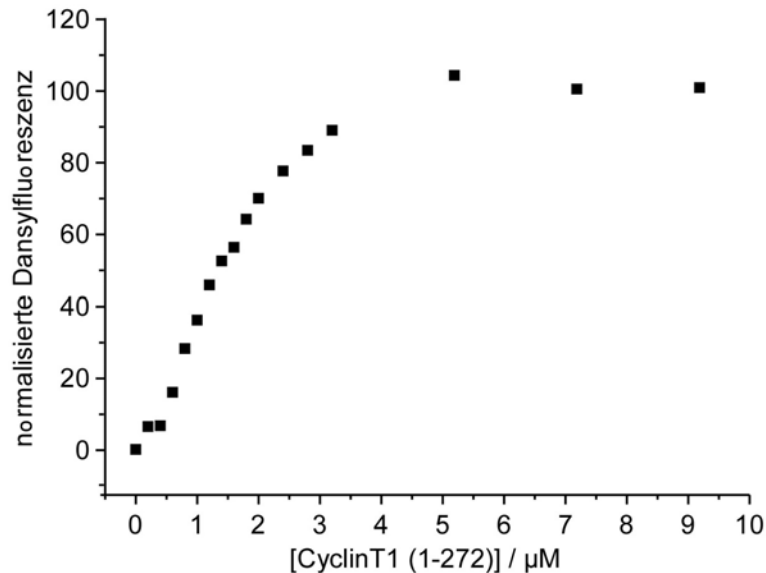


Abbildung 49: Hexim1-TBD bindet CyclinT1 in einer 2:1-Stöchiometrie. Dansyl-markierte Hexim1-TBD (G257S, C297S) wurde bei einer Konzentration von 7,2 μM zur Fluoreszenz angeregt und die Bindung von CyclinT1 (1-272) durch sukzessive Zugabe beobachtet. Es ist zu erkennen, dass bei einer CyclinT1-Konzentration von etwa 3,5 μM die Fluoreszenzintensität nicht mehr steigt und ein Plateau erreicht wird. Dies zeigt eine 2:1-Stöchiometrie des Hexim1-TBD-CyclinT1 (1-272)-Komplexes an.

Aus den Daten der ITC-Experimente, der Größenausschlusschromatographie und der Untersuchung mit Fluoreszenz-markiertem Protein ist zu schließen, dass ein Hexim1-Dimer ein CyclinT1-Molekül bindet.

5.2.7 Untersuchung der Hexim1-Interaktionsstelle auf CyclinT1

Zur Identifizierung der Bindungsstelle von Hexim1 auf dem CyclinT1-Molekül wurde versucht, das Protein mit stabilen ^{15}N -Isotopen heteronuklear zu markieren. Dabei stellte sich heraus, dass die Ausbeuten in Minimalmedium gering waren und das Protein zudem zur Aggregation neigte, so dass es für NMR-Untersuchungen nicht verwendet werden konnte. Deshalb war ein anderer Ansatz zur Untersuchung dieser Interaktion, von CyclinT1 ein Fragment herzustellen (235-272), das laut Sekundärstrukturvorhersagen helikal ist und mutmaßlich die C-terminale Helix der Cyclin-Box bildet. Um die Bindung an Hexim1 zu untersuchen und eventuell mit den oben beschriebenen Daten zu vergleichen, wurde ein ITC-Experiment durchgeführt. Dabei wurde es mit GST-Affinitätsanker in der

Messzelle bei 15°C thermostatisiert und Hexim1-TBD bzw. Hexim1-Volllängenprotein schrittweise injiziert. Die Konzentrationen betragen bei Hexim1-TBD in der Spritze 0,5 mM, im Falle vom Volllängenprotein 0,1 mM, in der Messzelle waren die Konzentrationen entsprechend zehnfach niedriger. In Abbildung 50 sind die Ergebnisse dieser Messungen zu sehen. Dabei wird deutlich, dass das Fragment CyclinT1 (235-272) nicht mit den beiden Hexim1-Proteinen interagiert.

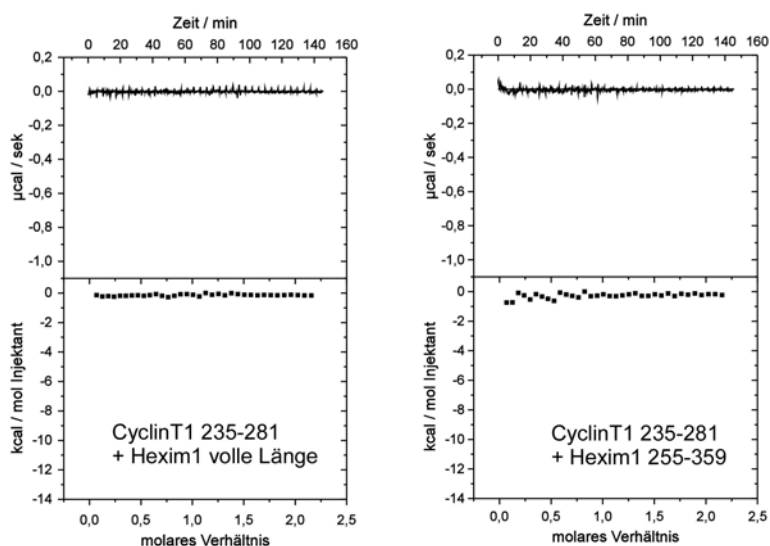


Abbildung 50: Die mutmaßliche C-terminale Helix der Cyclin-Box ist für die Bindung an Hexim1-TBD und Hexim1-Volllängenprotein nicht ausreichend. Gezeigt sind die Injektionen von Hexim1-TBD und dem Volllängenprotein zu GST-CyclinT1 (235-272). Aus den Injektionen und den Integralen wird deutlich, dass hier keine Bindung stattgefunden hat, da keine Wärme abgegeben oder angenommen wurde.

Ein Grund für dieses Resultat könnte sein, dass die Helix bei dem hier verwendeten GST-Fusionsprotein nicht zugänglich ist, da es an GST-Protein bindet und nicht frei in der Lösung rotiert. Ferner ist es möglich, dass das Peptid aufgrund fehlender stabilisierender Wechselwirkungen, die es im Gesamtprotein hätte, hier keine helikale Struktur annimmt. Dadurch könnten für die CyclinT1-Hexim1-Interaktionen wichtige Oberflächenformen verloren gehen und die Bindung verhindert werden. Eine weitere Ursache für ein nicht gefaltetes Protein kann auch eine für die Eingrenzung der Interaktionsstelle ungeeignete Fragmentlänge sein. So können zu viele Aminosäuren z.B. zur Unlöslichkeit führen, zu wenige Reste die Ausbildung der Sekundärstruktur verhindern.

Schließlich aber ist nicht auszuschließen, dass keine Bindung zwischen diesen beiden Fragmenten besteht, weil das Fragment nur ein Bestandteil der Bindungsfläche im nativen CyclinT1-Molekül ist und auch andere Bereiche von CyclinT1 für die Interaktion notwendig sind.

6. Diskussion

6.1 Biochemische Charakterisierung von FHOD1

6.1.1 Einfluss der DAD-Konsensusmotive auf den Mechanismus der Regulation in FHOD1

In dieser Studie wurde zunächst der autoregulatorische Mechanismus von FHOD1 untersucht. FHOD1 besitzt am C-Terminus eine Diaphanous-autoregulatorische Domäne (DAD), die mit dem N-Terminus interagiert. Das Protein nimmt dabei eine autoinhibierte Konformation ein (siehe Kapitel 2.1.9). Ein erstes Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass die 60 C-terminalen Aminosäuren von FHOD1 die DAD bilden, die intrinsisch ungefaltet ist und die N-terminalen 377 Reste bindet, die die FH3-Domäne bilden. Diese Ergebnisse überraschen in zweierlei Hinsicht: Zunächst unterscheiden sich die DAD-Erkennungsdomäne und die angenommene GTPase-bindenden Domäne (GBD) von FHOD1 in ihrer Domänenarchitektur von anderen Diaphanous-verwandten Forminen (Westendorf, 2001a). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Aktivierung anderer Diaphanous-verwandter Formine (DRFs) über die Bindung der aktivierenden GTPase an eine Bindungsstelle in der Nähe der DAD-Erkennungsdomäne erfolgt. Dadurch werden konformationelle Änderungen induziert, die die DAD-FH3-Interaktion destabilisieren. Die DAD und GTPase binden nicht gleichzeitig, sondern kompetitiv. Die Verdrängung der DAD durch Rho-GTPase macht die FH1-FH2-Domäne für die Nukleierung der Aktinpolymerisation zugänglich (Lammers et al., 2005; Nezami et al., 2006; Otomo et al., 2005a; Rose et al., 2005). Überraschend in zweiter Hinsicht war, dass die FHOD1-DAD kleiner ist als aufgrund der Sequenzvergleiche erwartet wurde. So ist das erste mutmaßliche, hydrophobe DAD-Konsensusmotiv für die Autoregulation nicht erforderlich (siehe Kapitel 4.3.2 und 4.3.3). Dies bedeutet entweder, dass die FH2-Domäne in FHOD1 länger ist als in anderen DRFs ist oder dass sich in FHOD1 zwischen der FH2-Domäne und der DAD (Aminosäurereste 1011-1096) noch eine Subdomäne mit bisher unbekannter Funktion befindet.

Während die Sequenzhomologie zwischen den FH1- bzw. FH2-Domänen verschiedener Forminproteine unterschiedlicher Spezies groß ist, beschränkt sich die Sequenzhomologie der DADs auf ein hydrophobes M-D-X-L-L-Motiv und einen basischen Bereich mit einer Länge von mindestens fünf Aminosäureresten. FHOD1 besitzt zwei hydrophobe Konsensusmotive und einen basischen Bereich. In dieser Studie wurde zunächst die Bedeutung dieser Motive durch in vitro-Bindungsexperimente und in vivo-Transfektionen untersucht. Eine Beteiligung des ersten hydrophoben Motivs für die Autoregulation des Proteins ist eindeutig ausgeschlossen, da es keinen Einfluss auf die Bindung an die N-terminale Erkennungsdomäne hatte und die Mutation dieses Motivs zu Alaninen im Volllängenprotein nicht zur Aktivierung von FHOD1 in Zellen führte (siehe

Kapitel 4.3.2). Dagegen erhöhte sich die Stressfaserbildung und Aktivierung der Transkription von SRE stark, wenn das zweite hydrophobe Motiv M-D-X-L-V an Position 1108 zu Alaninen mutiert wurde. Zu diesem Phänotyp trägt zu einem geringeren Anteil auch der basische Bereich in FHOD1 bei. Die Bestimmung der Bindungskonstanten zwischen dem DAD-Fragment sowie dessen Mutanten und der N-terminalen Erkennungsdomäne mittels isothermaler Titrationskalorimetrie ergab Werte, die zu den in den biologischen Experimenten gemachten Beobachtungen passen (siehe Kapitel 4.3.3). Die gemessene Dissoziationskonstante der wt-DAD/FH3-Bindung in FHOD1 liegt im unteren mikromolaren Bereich und hat damit die gleiche Größenordnung wie die Dissoziationskonstante einer 45 Aminosäurereste-langen DAD zur FH3-Domäne in mDia1 (Rose et al., 2005). Dagegen scheint die Interaktion bei mDia1 gegenüber FHOD1 anderer Natur zu sein. Eine Mutation der hydrophoben Aminosäuren der DAD-Konsensussequenz hat keinen Einfluss auf die Bindungsaffinitäten zwischen mDia1-DAD und ihrer N-terminalen Erkennungsdomäne, während die Mutation polarer Reste diese stark ändern (Lammers et al., 2005). Im Falle von FHOD1 konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl das hydrophobe Konsensusmotiv als auch ionische Wechselwirkungen für die Autoinhibition notwendig sind (Schonichen et al., 2006). Dieser Befund wurde jüngst durch ähnliche Mutationsexperimente in Falle von mDia bestätigt (Wallar et al., 2006).

Eine nächste Untersuchung sollte mehr Aufschluss über die Sekundärstruktur der DAD geben. Die NMR-Experimente an der heteronuklear markierten DAD zeigten, dass ein 61 Aminosäurereste-langes C-terminales FHOD1-Fragment intrinsisch unstrukturiert ist und nicht als gefaltete Domäne vorliegt, sondern nur geringe helikale Anteile besitzt (siehe Kapitel 4.3.5). Die Kartierung der bindenden Region mittels NMR-Titrationsexperimenten, bei denen die unmarkierte FH3-Domäne sukzessiv zu ¹⁵N-markierter DAD gegeben wurde und HSQC-Spektren gemessen wurden, deutet darauf hin, dass sich der an der Bindung beteiligte Bereich zwischen den Aminosäuren 1106 und 1144 befindet. Diese Region enthält sowohl das hydrophobe als auch das basische DAD-Motiv. Aminosäurereste, die sich sehr weit am C-Terminus befinden, blieben bei Bindung der N-terminalen DAD-Erkennungsdomäne flexibel und unbeeinflusst. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass es sich bei den DAD-Erkennungsmotiven eher um Signalsequenzen als um ein strukturelles Gerüst der Autoregulation handelt. Auch die Ergebnisse aus der Größenausschlusschromatographie stützen diese Hypothese. So zeigte der FH3:DAD-Komplex ein nur leicht vergrößertes Molekülvolumen gegenüber der FH3-Domäne allein (siehe Kapitel 4.3.4). Die FH3:DAD-Bindung könnte dabei der Interaktion zwischen β -Catenin und dem Bindemotiv von E-Cadherin ähneln, bei der ein langes unstrukturiertes Fragment von E-Cadherin sich über die ausgedehnten Armadillo-Wiederholungen von β -Catenin ausgestreckt liegt (Huber and Weis, 2001). Erst kürzlich wurde die Komplexstruktur des FH3:DAD-Komplexes von mDia1 gelöst. Hier interagiert die DAD als kleine Helix mit Aminosäureresten der Armadillo-Wiederholungen der N-terminalen DAD-Erkennungsdomäne von mDia1 (Lammers et al., 2005). Daneben könnte auch denkbar sein, dass die DAD von FHOD1 erst bei Bindung an seine Erkennungsdomäne Struktur annimmt und eine entsprechende Wechselwirkung zeigt.

Die Untersuchungen der FHOD1-Varianten *in vivo* lieferten verschiedene neue Erkenntnisse hinsichtlich der Bildung der Stressfasern durch aktives DRF. So konnte gezeigt werden, dass die Stressfaserbildung und die Stimulation der Transkription von SRE von den gleichen Motiven der DAD beeinflusst werden. Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen früherer Studien überein (Copeland et al., 2004; Copeland and Treisman, 2002; Sotiropoulos et al., 1999; Tominaga et al., 2000). Dabei konnte die FHOD1-R5A-Mutante mit dem mutierten basischen Bereich zwar Stressfasern induzieren, war aber bei der Stimulation der Transkription vom SRE inaktiv. Ein Grund für dieses Ergebnis könnte sein, dass erst eine gewisse Menge Aktin polymerisiert werden muss, um die Aktivität des SRE sicher zu induzieren. Für mDia1 wurde ein Zusammenhang zwischen der Stressfaserformierung und der SRE-Aktivierung durch Steuerung der G-Aktin-Konzentration und damit der Freisetzung des SRF-Koaktivators MAL gezeigt (siehe 2.1.10). Ob die FHOD1-induzierte Aktivierung der SRE-Transkription dem gleichen Mechanismus unterliegt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Ein bedeutendes Ergebnis dieser Studie ist, dass nicht nur verkürztes FHOD1 Stressfasern induzieren kann (Gasteier et al., 2003; Kanaya et al., 2005; Koka et al., 2003; Takeya and Sumimoto, 2003), sondern auch Varianten des Volllängenproteins FHOD1/2 (Schonichen et al., 2006). Dies unterlegt die physiologische Bedeutung der Stressfaserbildung durch FHOD1. Dabei unterschied sich die Morphologie der Stressfasern zwischen den FHOD1-Varianten (siehe 4.3.2). Die alleinige Mutation der hydrophoben Konsensussequenz D2A in FHOD1 führte zu dünnen Stressfasern. Im Gegensatz dazu zeigte die Doppelmutante DR9, in der zudem der basische Bereich mutiert ist, einen Phänotypen mit dicken Stressfasern. Möglicherweise wird durch diese Mutanten die Autoinhibition schrittweise aufgehoben, was zu FHOD1-Varianten mit unterschiedlichen Eigenschaften führt. Es fiel zudem auf, dass die DR9-Variante dicke Stressfasern induziert, ohne jedoch mit ihnen assoziiert zu sein. Dieser Befund steht im Widerspruch mit früheren Annahmen, dass die dicken Stressfasern durch FHOD1- Δ C entstehen, weil es die Filamente stabil bindet (Madrid et al., 2005). Vielmehr könnte die Fähigkeit zur Formierung dicker Aktinbündel durch FHOD1-DR9 ein Hinweis auf einen unbekanntem Mechanismus der Aktinpolymerisation und/oder eine unterschiedliche Regulation von FHOD1 gegenüber anderen DRFs sein (siehe Abbildung 51).

Ausblick

Die Studien zum autoregulatorischen Mechanismus in FHOD1 führten zur Identifizierung der C-terminalen DAD-Konsensusmotive in FHOD1. Dabei ist jedoch noch unklar, wo die DAD-Erkennungsregion auf dem N-terminalen FHOD1-Fragment (1-377) ist. Sequenzvergleiche mit mDia1, dessen N-terminale Struktur und DAD-Bindungsstelle bereits bekannt ist (Lammers et al., 2005; Nezami et al., 2006), zeigten keine hohe Homologie, so dass sich daraus nicht unmittelbar die an der Bindung beteiligten Aminosäuren ableiten lassen. Diese können jedoch durch Punktmutationen auf der FH3-Domäne *in vivo* und/oder *in vitro* gefunden werden. Besonders hilfreich wäre in diesem Zusammenhang die Aufklärung der Struktur der N-terminalen Domäne von

FHOD1, da dann die Aminosäuren bekannt wären, die Oberflächen-exponiert sind und so gezielter Aminosäuren für Mutationsstudien ausgewählt werden könnten. Ein nächster Schritt wäre, die Struktur des FH3:DAD-Komplexes zu kristallisieren und dessen Struktur zu aufzuklären. So würden denn auch konformationelle Unterschiede zwischen der freien FH3-Domäne bzw. der DAD und der gebundenen Form deutlich, die zur Klärung des autoregulatorischen Mechanismus beitragen können.

6.1.2 Analyse der Bindung von Rac1 an FHOD1

Die nächste Untersuchung dieser Studie fokussierte auf die Interaktion der Rho-GTPase Rac1 mit FHOD1. In früheren Studien wurde gezeigt, dass sich die Rac1-bindende Region zwischen Aminosäurerest 470 bis 570 in FHOD1 befindet (Madrid et al., 2005; Westendorf, 2001a). Dabei wurde gefunden, dass der C-Terminus von Rac1 für die Wechselwirkung verantwortlich ist und nicht der Effektorloop. Damit ist diese Interaktion unabhängig von dem an Rac1 gebundenen Nukleotid (siehe Kapitel 2.2). Diese Beobachtung weicht jedoch vom Mechanismus der Regulation in anderen DRFs, wie z.B. mDia1, deutlich ab, bei dem die Autoinhibition von RhoA nur im Triphosphat-gebundenen Zustand der GTPase aufgehoben wird (Alberts, 2001; Li and Higgs, 2003; Watanabe et al., 1999a). Da Rho-GTPasen als molekulare Schalter fungieren, erscheint ein solcher Aktivierungsmechanismus biologisch einleuchtender.

Die hier gemachten Ergebnisse können die oben beschriebenen Befunde nicht bestätigen. Die Daten aus den ITC-Messungen zeigten weder eine Bindung des GppNHp-gebundenen GST-Volllängenproteins Rac1 an die FHOD1-FH3-Domäne (1-377) noch an die vermutete GBD (411-573). Im Gegensatz dazu war mit analytischer Gelfiltration eine Oligomerisierung von Rac1 (1-181):GppNHp und der FH3-Domäne von FHOD1 zu sehen, nicht jedoch mit dem Fragment (411-573) (siehe Kapitel 4.4). Diese Ergebnisse sind ungewöhnlich: Zum einen müsste diese Interaktion mit beiden Methoden zu sehen sein, zum anderen war nur ein Effekt zwischen Rac1 ohne den oben beschriebenen C-Terminus und der FH3-Domäne, die nicht die GBD enthalten sollte, zu beobachten.

Wie die Ergebnisse aus der analytischen Gelfiltration mit der FH3-Domäne und der DAD und bei der Analyse der GTPase-Interaktion zeigten (siehe Kapitel 4.3.4 und 4.4), wird das Monomer-Dimer-Gleichgewicht der FH3-Domäne vor allem durch Zugabe von DTE beeinflusst, und wird somit vermutlich durch Oberflächen-exponierte Cysteine vermittelt. Bei der ITC-Messung befanden sich die Proteine in einem Puffer, der TCEP und nicht reaktiviertes DTE als Reduktionsmittel enthielt, um eine Überlagerung der Messung durch eine DTE-verursachte Wärmetönung zu verhindern. Möglicherweise konnte mittels ITC keine Bindung gemessen werden, da FHOD1 (1-377) über Cysteine dimerisiert und eine potentielle Bindungsstelle für Rac1 nicht zugänglich war. Bei der analytischen Gelfiltration war hingegen genügend DTE zugegen und FHOD1 lag eindeutig als Monomer vor. Andererseits konnte hier gezeigt werden, dass im Falle einer Bindung von Rac1 an das

FHOD1-Fragment (411-573) diese nur über den C-Terminus stattfinden kann, da verkürztes Rac1 hier nicht bindet. Entsprechende Experimente mit GST-Vollängenprotein Rac1 zeigten allerdings nicht eindeutige Ergebnisse.

Es ist zudem denkbar, dass für die Bindung von Rac1 an FHOD1 weitere Kofaktoren notwendig sind. So ist gezeigt worden, dass für die von FHOD1 induzierte Stressfaserbildung die Kinase ROCK erforderlich ist (Gasteier et al., 2003). Eine ähnliche Rolle könnte auch der C-Terminus von FHOD1 spielen. Eine FHOD1 Δ C-Deletionsmutante (1-1010) ist nicht in der Lage, Rac1 (oder eine andere Rho-GTPase) zu binden (Evangelista et al., 1997; Gasteier et al., 2003; Tominaga et al., 2000; Watanabe et al., 1999c). Es ist möglich, dass eine aktive Rho-GTPase nur den autoinhibierten Zustand eines DRFs erkennt, d.h. nur mit der GBD interagiert, wenn die DAD an der FH3-Domäne gebunden ist. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde jedoch nur die FH3-Domäne bzw. das FHOD1-Fragment (411-573) eingesetzt. Im Kontext eines Vollängenproteins im autoinhibierten Zustand könnten diese Fragmente eine andere Konformation einnehmen, die eine spezifische Erkennung durch eine GTPase erst ermöglicht. Dem entspricht, dass die FH3-Domäne von mDia1 eine andere Konformation besitzt, wenn sie mit der mDia1-DAD im Komplex vorliegt. Durch Zugabe von RhoA:GppNHp konnte die DAD verdrängt werden und diese Verdrängung mittels ITC und Fluoreszenzpolarisation gemessen werden (Lammers et al., 2005; Rose et al., 2005). Auch der Bereich zwischen der FHOD1-FH2-Domäne und der hier identifizierten autoregulatorischen Motive könnte für die Erkennung der GTPase wichtig sein (siehe Abbildung 51 A). Eine Klärung der FHOD1/Rac1-Interaktion ist demnach unter Verwendung unterschiedlicher Methoden und FHOD1-Fragmente bzw. FHOD1-Vollängenprotein möglich.

Ausblick

Weiterhin ist unklar, durch welches molekulare Signal die Autoinhibition aufgehoben wird. Diese Studie konnte mit verschiedenen Methoden den Mechanismus der Aktivierung von FHOD1 nicht aufklären. In diesem Zusammenhang könnte die zwischen der FH2-Domäne und der DAD liegende Subdomäne eine große Rolle spielen (Aminosäurereste 1011-1096). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die Rho-GTPasen das DRF nur im autoinhibierten Zustand erkennen (Evangelista et al., 1997; Gasteier et al., 2003; Tominaga et al., 2000; Watanabe et al., 1999d). Die in dieser Studie durchgeführten in vitro-Experimente (ITC) der FH3-Domäne und der Rho-GTPasen sollten demnach in Gegenwart eines DAD-Peptids oder gar der DAD mit der Subdomäne unbekannter Funktion wiederholt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Durchführung eines GST-Pull-down-Experiments mit den drei GST-Rho-GTPasen und dem nativen FHOD1-Vollängenprotein, da dies autoinhibiert vorliegen sollte und eine Konformation besitzen sollte, die von den Stimulatoren erkannt werden kann. Nach Identifizierung der GTPase würde die Aufklärung der Struktur des FH3:Rho-GTPase-Komplexes mehr Einblicke in den Regulationsmechanismus liefern und gegebenenfalls Unterschiede zu anderen DRFs deutlich machen.

6.1.3 Einfluss von FHOD1 auf die Aktinpolymerisation

Frühere Arbeiten zur Untersuchung des Mechanismus der Nukleierung der Aktinpolymerisation von FHOD1 wurden *in vivo* durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie wurde erstmals die FHOD1-FH2-Domäne (614-1096) sowie natives Volllängenprotein FHOD1 *in vitro* auf Aktinnukleierung hin getestet. Dabei zeigte die FH2-Domäne von FHOD1 zunächst einen inhibitorischen Effekt auf die Aktinpolymerisation (siehe Kapitel 4.5). Diese Beobachtung kann zwei Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass das hier verwendete Fragment von FHOD1 (614-1096) nicht die vollständige FH2-Domäne beinhaltet. So besaß auch ein mDia-FH2-Konstrukt (701-1038) die Eigenschaften eines *capping*-Proteins, da diesem Fragment die für die Dimerisierung notwendige N-terminale *lasso*-Subdomäne fehlte (Shimada et al., 2004) und so nur als Monomer an Aktin band. Die Aktinpolymerisation wird jedoch nur beschleunigt, wenn die FH2-Domäne die Form eines flexibel verbundenen Dimers hat (siehe Kapitel 2.1.8) (Xu et al., 2004). Das hier verwendete Fragment FHOD1 (614-1096) enthält nach Sekundärstrukturvorhersagen und Sequenzvergleichen mit anderen DRFs jedoch die vollständige FH2-Domäne (siehe Abbildung 20), so dass diese in der Lage sein sollte, eine Aktinpolymerisation zu stimulieren. Daher hat die Inhibition wahrscheinlich eine andere Ursache: Die Aktinnukleierung der FH2-Domäne von FHOD1 kann sich mechanistisch von der der mDia1-FH2-Domänen unterscheiden. Es ist bekannt, dass die FH1-FH2-Domäne des Hefeproteins Cdc12p zur Stimulation der Aktinnukleierung Profilin benötigt (Kovar et al., 2003; Kovar et al., 2005; Kovar and Pollard, 2004). Ein Hinweis auf einen solchen Mechanismus ist, dass FHOD1 direkt mit Profilin IIa wechselwirkt (Tojo et al., 2003). Ferner wurde gezeigt, dass zur Ausbildung von Stressfasern die Anwesenheit der Prolin-reichen FH1-Domäne notwendig ist, an die Profilin bindet (Gasteier et al., 2003; Gasteier et al., 2005; Takeya and Sumimoto, 2003). Das FHOD1-Fragment (533-1053) war in der Lage, Stressfasern zu induzieren, das Fragment (613-1053) konnte dies nicht, was ein deutlicher Hinweis auf eine Profilin-abhängige Stimulation der Aktinpolymerisation ist.

Die Messungen mit dem Volllängenprotein FHOD1 aus der Baculoexpression zeigten ebenso wie die rekombinant aus *E.coli* gereinigte FHOD1-FH2-Domäne (614-1096) ein *capping*-Protein-ähnliches Verhalten. Da dieses Protein ohne Aktivierung einer Rho-GTPase vermutlich im autoinhibierten Zustand vorlag, war dieser Befund überraschend. Erwartet wurde weder eine Stimulation noch eine Inhibition der Aktinnukleierung, also ein vollständig inaktives Protein. Hier wurde erstmals *in vitro* gezeigt, dass ein DRF-Volllängenprotein an Aktin bindet und die Nukleation inhibiert. Alle bisher gemachten *in vitro*-Aktinpolymerisationsstudien wurden mit isolierten FH2-Domänen bzw. FH1-FH2-Domänen und nicht im Volllängenkontext durchgeführt (Higgs, 2005; Kovar et al., 2003; Kovar et al., 2005; Kovar, 2006; Kovar and Pollard, 2004; Li and Higgs, 2003; Otomo et al., 2005a; Schirenbeck et al., 2005b; Seth et al., 2006; Shimada et al., 2004; Xu et al., 2004).

Die Ergebnisse zur Aktivierung des autoinhibierten FHOD1-Volllängenproteins durch die Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 bzw. des DAD-Peptids zeigten schließlich keine Stimulation der

Aktinpolymerisation. Vielmehr inhibiert FHOD1 auch hier die Polymerisation in gleichem Maße wie das FHOD1-Fragment (614-1096) oder autoinhibiertes FHOD1. So kann auch hier *in vitro* nicht bestätigt werden, ob FHOD1 ein Effektor von Rac1 oder einer anderen Rho-GTPase ist. Dass FHOD1 auch durch die eigene DAD nicht aktiviert wird, weist weiterhin darauf hin, dass ein weiterer Kofaktor zur Stimulation notwendig ist. So könnte eine Phosphorylierung von FHOD1 nötig sein, um das Protein zu aktivieren (Wang et al., 2004). Da hier FHOD1 aus eukaryotischen Zellen gereinigt wurde, kann allerdings davon ausgegangen werden, dass das FHOD1 phosphoryliert war. Es reichen demnach sowohl die Phosphorylierung als auch eine Rho-GTPase im Triphosphat-Zustand nicht zur Stimulation der Aktinpolymerisation aus. Wie oben schon diskutiert, ist Profilin IIa wahrscheinlich für die Aktinnukleation essentiell (siehe Abbildung 51 C), das wie im Falle von Cdc12p die Aktinpolymerisation zusätzlich steuern könnte (Kovar et al., 2003; Kovar et al., 2005; Kovar and Pollard, 2004). Ferner ist zudem möglich, dass die hier untersuchten GTPasen für die Aufhebung der Autoinhibition nicht regulieren, sondern eine andere GTPase. Wie in Kapitel 6.1.2 erwähnt, spricht der Befund, dass Rac1 unabhängig vom Nukleotidzustand an FHOD1 bindet, aus biologischer Sicht nicht dafür, dass es eine Aktivierung von FHOD1 steuert.

Ausblick

Diese Studie zeigte, dass die FH2-Domäne von FHOD1 (614-1096) an Aktin bindet und eine Nukleation verhindert. Ein gleiches Verhalten ist auch für das aus eukaryotischer Expression gereinigte native FHOD1-Vollängenprotein zu sehen, das mit keiner der hier eingesetzten Rho-GTPasen allein aktiviert werden konnte. Da bekannt ist, dass FHOD1 mit Profilin IIa wechselwirkt und die FH1-FH2-Domäne von FHOD1 (533-1053) *in vivo* Aktinstressfasern induziert, die FH2-Domäne von FHOD1 (613-1053) jedoch nicht (Gasteier et al., 2003; Gasteier et al., 2005; Takeya and Sumimoto, 2003), ist das nächste Experiment, die Aktinnukleierung in Gegenwart von Profilin IIa zu untersuchen. Möglicherweise führt dies auch zur Identifizierung der GTPase von FHOD1, da zur Aktivierung weiterhin eine GTPase nötig sein wird. Es wäre schließlich von Interesse, wie sich eine Profilin-abhängige Aktinnukleierung von einer Profilin-unabhängigen mechanistisch unterscheidet. Die Aufklärung der Struktur der FHOD1-FH1-FH2-Domäne würde hier die meisten Informationen liefern und Unterschiede deutlich machen. Aufgrund des hohen Prolinanteils am N-Terminus der FH1-FH2-Domäne von FHOD1 wäre durch rekombinante Expression dieser Domäne im Baculoexpressionssystem zweckmäßig.

6.2 Diskussion zur strukturellen Untersuchung der Hexim1-TBD und der Interaktion von Hexim1-TBD und CyclinT1

In dieser Studie wurde gezeigt, dass die C-terminale Region von Hexim1 (255-359) eine zweigeteilte, dimere *coiled-coil*-Struktur bildet, deren erstes Segment mit der CyclinT1-Untereinheit des P-TEFb-Komplexes interagiert. Dabei weicht die Aminosäurezusammensetzung dieses ersten *coiled-coil*-Segments deutlich von der eines idealen *coiled-coils* ab (siehe Kapitel 5.2.2). Statt der typischen Valin- oder Leuzinreste befinden sich an den a-Positionen der Heptad-Wiederholungen geladene, sperrige Aminosäurereste (K284, Y291) sowie hydrophobe Reste an den Positionen e und b (I288, L292). Zudem tragen gleichgeladene Reste an den Positionen g und e eher zu einem negativ geladenen Bereich bei (E290, E295), als eine gegenseitige Anziehung zwischen den Dimerketten zu bewirken. Dagegen stimmt die Zusammensetzung nahezu uneingeschränkt mit dem bevorzugten kanonischen Konsensus überein, so dass die beiden Ketten hier stabil assoziiert sind. Diese verschiedenen Merkmale der beiden *coiled-coil*-Segmente bilden Ausgangspunkte für ihre funktionellen Unterschiede.

NMR-Titrationsexperimente und Sequenzanalysen offenbarten eine konservierte, große, saure CyclinT1-Bindungsregion auf dem ersten *coiled-coil*-Segment der TBD (siehe Kapitel 5.2.3). Dazu passt, dass sich an der C-terminalen Region der Cyclin-Box-Wiederholungen von CyclinT1 positiv geladene Reste befinden. Mutationsexperimente zeigten, dass diese die Wechselwirkung mit Hexim1 stärken (Daten nicht gezeigt). Das vollständig symmetrische Hexim1-TBD-*coiled-coil*-Dimer bindet interessanterweise ein CyclinT1-Molekül, abweichend von früheren Ergebnissen aus Elektromobilitätsuntersuchungen, wo es zwei CyclinT1-Moleküle binden sollte (Li et al., 2005). Die hier bestimmte 2:1-Stöchiometrie des Hexim1:CyclinT1-Komplexes (siehe Kapitel 5.2.4) kann ein Ergebnis einer sterischen Hinderung der möglichen zweiten Bindungsstelle sein, die aufgrund der großen Cyclin-Box-Domäne entstehen könnte. Es ist jedoch weiter denkbar, dass diese Stöchiometrie ein Resultat der Einführung einer molekularen Unsymmetrie ist, bei der eine dritte heterologe Helix mit dem *coiled-coil*-Dimer interagiert. Es ist möglich, dass die C-terminale Helix der Cyclin-Box das nicht ideale erste *coiled-coil*-Segment der Hexim1-TBD vervollständigt und ein dreisträngiges Helixbündel bildet. Unterstützt wird diese Hypothese von der Beobachtung aus ITC-Experimenten, bei denen das Fragment Hexim1 (255-316), das nur das erste *coiled-coil*-Segment enthält, bei Bindung von CyclinT1 seine dimeren Eigenschaften verliert, jedoch eine ähnliche Affinität behält. Ferner zeigt die ¹⁵N-Rückgratdynamik, dass die Region um die α 1-Helix sowie der Anfang der α 2-Helix etwas flexibler als das folgende *coiled-coil*-Segment ist. Eine Bindung des kurzen CyclinT1-Fragments (235-281), das die C-terminale Helix der Cyclin-Box repräsentieren sollte, konnte hier allerdings nicht für die Hexim1-TBD bzw. das Hexim1-Vollängenprotein nachgewiesen werden. Weitere Experimente mit einem längeren CyclinT1-Fragment können möglicherweise mehr Aufschluss über die Interaktion und damit den Mechanismus geben.

Frühere Bindungsexperimente zeigten, dass C-terminal verkürztes Hexim1 ohne das zweite *coiled-coil*-Segment noch CyclinT1 bindet und die Transkriptionaktivität des P-TEFb-Komplexes hemmt (Michels et al., 2003; Schulte et al., 2005), was die hier gefundenen Ergebnisse untermauert. Dagegen ist die Inhibition der P-TEFb-Aktivität in Gegenwart der 7SK-RNA deutlich reduziert, wenn bei dem Volllängenprotein Hexim1 die d-Positionen der Heptad-Wiederholung, L287R und L294R, mutiert sind (Li et al., 2005). Die Aminosäurereste sind nicht Lösungsmittel-exponiert, diese Mutationen beeinflussen vielmehr die Dimerisierungswechselwirkungen des *coiled-coils*. Dies lässt erkennen, dass die Vollständigkeit des ersten *coiled-coil*-Segmentes für die P-TEFb-Erkennung notwendig ist. Eine erst kürzlich aufgestellte Vermutung besagt ferner, dass die Interaktion zwischen Hexim1 und CyclinT1 kooperativ an zwei individuellen Bindungsstellen an den 5' und 3' Haarnadelschleifen der 7SK-RNA erfolgt (Egloff et al., 2006). Da angenommen wird, dass nur eine 7SK-RNA im inaktiven P-TEFb:Hexim1:7SK-Komplex existiert, unterstützt dies die hier gemachten Beobachtungen.

Ausblick

Damit der P-TEFb-Komplex inhibiert wird, muss die Phosphorylierungsaktivität von Cdk9 blockiert werden. Es wurde gezeigt, dass zur P-TEFb in Zellen nur bei Anwesenheit der TBD in Hexim1 gehemmt wird (Schulte et al., 2005). Eine N-terminale Verkürzung von Hexim1 führt hingegen zur Inaktivierung des P-TEFb-Komplexes unabhängig von der 7SK-RNA (Li et al., 2005; Michels et al., 2004b). Ein Vergleich mit der Inhibierung von Cdk2:CyclinA durch p27^{Cip2} (Pavletich, 1999) lässt vermuten, dass Tyrosine an Positionen 203 oder 271 in Hexim1 die ATP-Bindungsstelle von Cdk9 besetzen könnten (Li et al., 2005; Michels et al., 2004b). Es gibt zudem Hinweise, dass Hexim1 nahe der TRM-Region der C-terminalen Helices der Cyclin-Box von CyclinT1 bindet. Dann müsste der Abstand von der CyclinT1-Bindungsstelle zu einem möglichen katalytisch-repressiven Motiv sehr groß sein, da die Nukleotid-Bindungsstelle räumlich weit von der C-terminalen Helix der Cyclin-Box entfernt ist. p27^{Cip2} inhibiert Cdk2 durch Bindung und anschließende Entfaltung einer verlängerten Region von etwa 70 Aminosäurereste, die die Cdk2:CyclinA-Oberfläche bedecken (Lacy et al., 2004; Russo et al., 1996). Dies würde im Falle der P-TEFb-Inaktivierung durch Hexim1 etwa mehr als 20 zusätzliche Aminosäurereste erfordern, die zwischen der CyclinT1-Bindungsstelle und der Tyrosine zur Hemmung der Kinase liegen müssten. Dieses Modell würde mit Ergebnissen aus dieser Studie übereinstimmen, dass der Bereich von 242 bis 276 N-terminal zur ersten Helix flexibel ist (siehe Kapitel 5.2.2). Andererseits könnte Hexim1 den P-TEFb-Komplex auch allosterisch hemmen, indem es das CyclinT1:Cdk9-Heterodimer bindet und sich dadurch die Form der katalytischen Spalte ändert. Ferner ist denkbar, dass Hexim1 die für Funktion und Spezifität bestimmende C-terminale Helix der Cyclin-Box verdrängen könnte. Zur Klärung des Mechanismus der Inhibition des P-TEFb-Komplexes sind jedoch weitere Experimente sowie die Aufklärung der Struktur des ternären Komplexes von Cdk9, CyclinT1 und Hexim1 notwendig.

7. Anhang

Tabelle IX: Tabelle der *refinement*-Statistiken für die in dieser Studie gelöste Hexim1-TBD-Struktur

experimentelle Einschränkungen pro Monomer	
Abstandseinschränkungen	Alle (zugeordnete + mehrdeutige)
Gesamt	2592 (2366 + 226)
Intramonomer	2061 (1879 + 182)
Intermonomer	387 (360 + 27)
Intra/intermonomer	144 (127 + 17)
Wasserstoffbrückeneinschränkungen	102
Torsionswinkeleinschränkung	67 (ϕ), 64 (ψ), 32 (χ_1)
übrige dipolare Kopplungseinschränkungen	40 ($^1D_{N-H}$), 40 ($^1D_{C\alpha-H\alpha}$)
Strukturelle Statistik	
R.m. s. Abweichungen von experimentellen Einschränkungen	0,0162 \pm 0,0005
Abstandseinschränkungen (Å)	0,0328 \pm 0,053
Dihedraler Winkel (°)	0,668 \pm 0,044
übrige Dipolare Kopplungen (Hz)	
R.m.s. Abweichungen von der idealisierten Geometrie	
Bindungen	0,0098 \pm 0,0002
Winkel	1,723 \pm 0,016
unpassend	0,191 \pm 0,050
Gesamtenergie (kcal mol ⁻¹)	-8182 \pm 200
Überprüfungsstatistik für die Reste 276-348 (%)	
Reste in bevorzugten Regionen	96,3
Reste in zusätzlich erlaubten Regionen	3,3
Reste in freigegebenen erlaubten Regionen	0,4
Reste in nicht erlaubten Regionen	0
Durchschnitts-r.m.s.-Abweichungen zur mittleren Struktur (Å)	
a-Helices 1 & 2 = 276-281 (Rückgrat/schwer)	0,382 / 0,939
a-Helix 2 = 284-313 (Rückgrat/schwer)	0,319 / 0,952
a-Helix 3 = 319-348 (Rückgrat/schwer)	0,445 / 1,104
Reste 276-348 (Rückgrat/schwer)	3,293 / 3,883

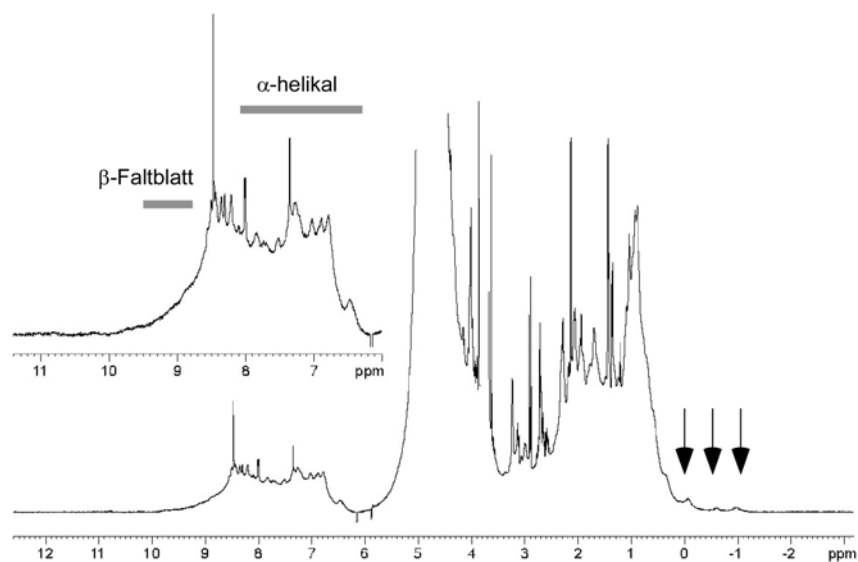


Abbildung 52: Protonenspektrum der N-terminalen FHOD1-FH3 Domäne (1-377). Das Spektrum weist eine hohe Dispersion der Resonanzsignale auf. So weisen vor allem die Signale im NH-Bereich auf eine α -helikale Faltung mit Anteilen eines β -Faltblatts hin. Trotz seiner Größe von 41 kDa weisen die Hochfeld-verschobenen Signale im Bereich unterhalb von 0 ppm auf ein globuläreres, monomeres Protein hin. Diese Signale (siehe Pfeile) rühren vermutlich von Methylgruppen innerhalb des Molekülkerns hin.

Tabelle X: Kalkulierte Molekularmassen der verwendeten Proteine. Alle Molekularmassen wurden mit Hilfe des Onlineprogramms Protparam (<http://us.expasy.org/>) berechnet.

Konstrukt	berechnete Masse / Da	gemessene Masse / Da	Methode
FHOD1-Studie			
FHOD1 (1032-1164)	14405,1	13611,4	MALDI-MS
FHOD1 (1069-1164)	10569,1	10752,3	MALDI-MS
FHOD1 (1078-1164)	9649,9	9675,8	MALDI-MS
FHOD1 (1096-1164)	7679,1	7630,3	MALDI-MS
FHOD1 (1104-1164)	7129,1	7118,1	MALDI-MS
¹⁵ N-FHOD1 (1104-1164)	7230,1	7240,7	MALDI-MS
FHOD1 (1096-1164) D2A	7555,5	7440,7	MALDI-MS
FHOD1 (1104-1164) R5A	7362,3	7327,2	MALDI-MS
FHOD1 (1104-1164) DR9	7188,0	7043,1	MALDI-MS
His-(1-573)	64881,1	64795,5	MALDI-MS
FHOD1 (1-377)	41580,2	41667,5	MALDI-MS
His FHOD1 -(1-377)	44549,4	44540,7	MALDI-MS
FHOD1 (411-573)	17658,6	17656,7	MALDI-MS
His-FHOD1 (377-573)	23242,7	23117,7	MALDI-MS
GST-FHOD1 (614-1096)	82912,2	82777,1	ESI-MS
His-FHOD1 (1-1164)	129587,7	kein Ergebnis	ESI-MS
Hexim1-Studie			
Hexim1 (255-259)	12791,1	12827,4	MALDI-MS
¹⁵ N-Hexim1 (255-259)	12956,1	12828,9	MALDI-MS
¹⁵ N/ ¹³ C-Hexim1 (255-259)	13498,1	13351,8	MALDI-MS
Hexim1 (255-316)	7647,4	7650,4	MALDI-MS
¹⁵ N-Hexim1 (255-316)	7742,4	7668,4	MALDI-MS
CyclinT1 (1-272)	31789,4	31670,7	MALDI-MS

8. Literaturverzeichnis

- Adamson,P., Marshall,C.J., Hall,A., and Tilbrook,P.A., 1992a. Post-translational modifications of p21rho proteins. *J. Biol. Chem.*, 267:20033-20038 pp.
- Adamson,P., Paterson,H.F., and Hall,A., 1992b. Intracellular localization of the P21rho proteins. *J. Cell Biol.*, 119:617-627 pp.
- Aizawa,H., Sutoh,K., and Yahara,I., 1996. Overexpression of cofilin stimulates bundling of actin filaments, membrane ruffling, and cell movement in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.*, 132:335-344 pp.
- Alberts,A.S., 2001. Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *Journal of Biological Chemistry*, 276:2824-2830 pp.
- Allen,W.E., Jones,G.E., Pollard,J.W., and Ridley,A.J., 1997a. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *Journal of Cell Science*, 110:707-720 pp.
- Allen,W.E., Jones,G.E., Pollard,J.W., and Ridley,A.J., 1997b. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *Journal of Cell Science*, 110:707-720 pp.
- Barbacid,M., 1987. ras genes. *Annu. Rev. Biochem.*, 56:779-827 pp.
- Barboric,M., Kohoutek,J., Price,J.P., Blazek,D., Price,D.H., and Peterlin,B.M., 2005. Interplay between 7SK snRNA and oppositely charged regions in HEXIM1 direct the inhibition of P-TEFb. *Embo Journal*, 24:4291-4303 pp.
- Baum,B. and Kunda,P., 2005. Actin nucleation: Spire - Actin nucleator in a class of its own. *Current Biology*, 15:R305-R308 pp.
- Blanchoin,L., Amann,K.J., Higgs,H.N., Marchand,J.B., Kaiser,D.A., and Pollard,T.D., 2000. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature*, 404:1007-1011 pp.
- Boehm,M.B., Milius,T.J., Zhou,Y., Westendorf,J.J., and Koka,S., 2005. The mammalian formin FHOD1 interacts with the ERK MAP kinase pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335:1090-1094 pp.
- Bourne,H.R., Sanders,D.A., and McCormick,F., 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349:117-127 pp.
- Bradford,M.M., 1976a. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254 pp.
- Bradford,M.M., 1976b. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254 pp.
- Bray,D. and Thomas,C., 1975. The actin content of fibroblasts. *Biochem. J.*, 147:221-228 pp.
- Brock,J., Midwinter,K., Lewis,J., and Martin,P., 1996. Healing of incisional wounds in the embryonic chick wing bud: characterization of the actin purse-string and demonstration of a requirement for Rho activation. *J. Cell Biol.*, 135:1097-1107 pp.
- Burbelo,P.D., Drechsel,D., and Hall,A., 1995. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.*, 270:29071-29074 pp.
- Byers,S.A., Price,J.P., Cooper,J.J., Li,Q.T., and Price,D.H., 2005. HEXIM2, a HEXIM1-related protein, regulates positive transcription elongation factor b through association with 7SK. *Journal of Biological Chemistry*, 280:16360-16367 pp.
- Carlier,M.F., Laurent,V., Santolini,J., Melki,R., Didry,D., Xia,G.X., Hong,Y., Chua,N.H., and Pantaloni,D., 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: Implication in actin-based motility. *Journal of Cell Biology*, 136:1307-1322 pp.
- Carlsson,L., Nystrom,L.E., Sundkvist,I., Markey,F., and Lindberg,U., 1977. Actin Polymerizability Is Influenced by Profilin, A Low-Molecular Weight Protein in Non-Muscle Cells. *Journal of Molecular Biology*, 115:465-483 pp.
- Carpenter,C.L., Toliás,K.F., Van Vugt,A., and Hartwig,J., 1999. Lipid kinases are novel effectors of the GTPase Rac1. *Adv. Enzyme Regul.*, 39:299-312 pp.
- Carter,P., Bedouelle,H., and Winter,G., 1985. Improved Oligonucleotide Site-Directed Mutagenesis Using M13 Vectors. *Nucleic Acids Research*, 13:4431-4443 pp.
- Castrillon,D.H. and Wasserman,S.A., 1994. Diaphanous Is Required for Cytokinesis in *Drosophila* and Shares Domains of Similarity with the Products of the Limb Deformity Gene. *Development*, 120:3367-3377 pp.
- Chan,A.Y., Bailly,M., Zebda,N., Segall,J.E., and Condeelis,J.S., 2000. Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J. Cell Biol.*, 148:531-542 pp.

- Chang, F., Drubin, D., and Nurse, P., 1997. cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J. Cell Biol.*, 137:169-182 pp.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and Burridge, K., 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.*, 133:1403-1415 pp.
- Cooper, J.A. and Schafer, D.A., 2000. Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Current Opinion in Cell Biology*, 12:97-103 pp.
- Copeland, J.W., Copeland, S.J., and Treisman, R., 2004. Homo-oligomerization is essential for F-actin assembly by the formin family FH2 domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279:50250-50256 pp.
- Copeland, J.W. and Treisman, R., 2002. The diaphanous-related formin mDia1 controls serum response factor activity through its effects on actin polymerization. *Molecular Biology of the Cell*, 13:4088-4099 pp.
- Cross, M.J., Roberts, S., Ridley, A.J., Hodgkin, M.N., Stewart, A., ClaessonWelsh, L., and Wakelam, M.J.O., 1996. Stimulation of actin stress fibre formation mediated by activation of phospholipase D. *Current Biology*, 6:588-597 pp.
- Dames, S.A., Schonichen, A., Grzesiek, S., and Geyer, M., 2006. NMR assignment of the Cyclin T-binding domain of human Hexim1. *J. Biomol. NMR*.
- Daniels, R.H. and Bokoch, G.M., 1999. p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem. Sci.*, 24:350-355 pp.
- Dickson, B.J., 2001. Rho GTPases in growth cone guidance. *Current Opinion in Neurobiology*, 11:103-110 pp.
- Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T., and Snyderman, R., 1989. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.*, 264:16378-16382 pp.
- Didsbury, J.R., Uhing, R.J., and Snyderman, R., 1990. Isoprenylation of the low molecular mass GTP-binding proteins rac 1 and rac 2: possible role in membrane localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171:804-812 pp.
- Dominguez, R. and Graceffa, P., 2003. Solution properties of TMR-actin: when biochemical and crystal data agree. *Biophys. J.*, 85:2073-2074 pp.
- Drenckhahn, D., Engel, K., Hofer, D., Merte, C., Tilney, L., and Tilney, M., 1991. 3 Different Actin Filament Assemblies Occur in Every Hair Cell - Each Contains A Specific Actin Cross-Linking Protein. *Journal of Cell Biology*, 112:641-651 pp.
- Dulac, C., Michels, A.A., Fraldi, A., Bonnet, F., Van Nguyen, T., Napolitano, G., Lania, L., and Bensaude, O., 2005. Transcription-dependent association of multiple positive transcription elongation factor units to a HEXIM multimer. *Journal of Biological Chemistry*, 280:30619-30629 pp.
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., and Gill, G.N., 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biology*, 1:253-259 pp.
- Egloff, S., Van Herreweghe, E., and Kiss, T., 2006. Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: Two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding. *Molecular and Cellular Biology*, 26:630-642 pp.
- Engel, J., Fasold, H., Hulla, F.W., Waechter, F., and Wegner, A., 1977. Polymerization Reaction of Muscle Actin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 18:3-13 pp.
- Erickson, J.W., Zhang, C., Kahn, R.A., Evans, T., and Cerione, R.A., 1996. Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.*, 271:26850-26854 pp.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M.S., Chow, C.J., Adames, N., Pringle, J.R., Peter, M., and Boone, C., 1997. Bni1p, a yeast formin linking Cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*, 276:118-122 pp.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D.C., Boone, C., and Bretscher, A., 2002. Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nature Cell Biology*, 4:32-41 pp.
- Faix, J. and Grosse, R., 2006. Staying in shape with formins. *Dev. Cell*, 10:693-706 pp.
- Farnsworth, C.L. and Feig, L.A., 1991. Dominant inhibitory mutations in the Mg(2+)-binding site of RasH prevent its activation by GTP. *Mol. Cell Biol.*, 11:4822-4829 pp.
- Farnsworth, C.L., Marshall, M.S., Gibbs, J.B., Stacey, D.W., and Feig, L.A., 1991. Preferential inhibition of the oncogenic form of RasH by mutations in the GAP binding/"effector" domain. *Cell*, 64:625-633 pp.
- Fisher, H.F. and Singh, N., 1995. Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Methods Enzymol.*, 259:194-221 pp.
- Frazier, J.A. and Field, C.M., 1997. Actin cytoskeleton: Are FH proteins local organizers? *Current Biology*, 7:R414-R417 pp.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A., and Takai, Y., 1990. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene*, 5:1321-1328 pp.

- Gasman,S., 2003. RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase (vol 5, pg 195, 2003). *Nature Cell Biology*, 5:680 pp.
- Gasteier,J.E., Madrid,R., Krautkramer,E., Schroder,S., Muranyi,W., Benichou,S., and Fackler,O.T., 2003. Activation of the Rac-binding partner FHOD1 induces actin stress fibers via a ROCK-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 278:38902-38912 pp.
- Gasteier,J.E., Schroeder,S., Muranyi,W., Madrid,R., Benichou,S., and Fackler,O.T., 2005. FHOD1 coordinates actin filament and microtubule alignment to mediate cell elongation. *Experimental Cell Research*, 306:192-202 pp.
- Gershman,L.C., Selden,L.A., Kinoshian,H.J., and Estes,J.E., 1994. Actin-bound nucleotide/divalent cation interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 358:35-49 pp.
- Geyer,M., Munte,C.E., Schorr,J., Kellner,R., and Kalbitzer,H.R., 1999. Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. *J. Mol. Biol.*, 289:123-138 pp.
- Gill,M.B., Roecklein-Canfield,J., Sage,D.R., Zambela-Soediono,M., Longtine,N., Uknis,M., and Fingerroth,J.D., 2004. EBV attachment stimulates FHOS/FHOD1 redistribution and co-aggregation with CD21: formin interactions with the cytoplasmic domain of human CD21. *Journal of Cell Science*, 117:2709-2720 pp.
- Goldschmidt-Clermont,P.J., Furman,M.I., Wachsstock,D., Safer,D., Nachmias,V.T., and Pollard,T.D., 1992. The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell*, 3:1015-1024 pp.
- Goldschmidt-Clermont,P.J., Machesky,L.M., Doberstein,S.K., and Pollard,T.D., 1991. Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin. *J. Cell Biol.*, 113:1081-1089 pp.
- Goulimari,P., Kitzing,T.M., Knieling,H., Brandt,D.T., Offermanns,S., and Grosse,R., 2005. G alpha(12/13) is essential for directed cell migration and localized Rho-Dia1 function. *Journal of Biological Chemistry*, 280:42242-42251 pp.
- Govind,S., Kozma,R., Monfries,C., Lim,L., and Ahmed,S., 2001. Cdc42Hs facilitates cytoskeletal reorganization and neurite outgrowth by localizing the 58-kD insulin receptor substrate to filamentous actin. *J. Cell Biol.*, 152:579-594 pp.
- Gundersen,G.G., Gomes,E.R., and Wen,Y., 2004. Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16:106-112 pp.
- Habas,R., Kato,Y., and He,X., 2001. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel formin homology protein Daam1. *Cell*, 107:843-854 pp.
- Hall,A., 1990. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science*, 249:635-640 pp.
- Hall,A., 1998b. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279:509-514 pp.
- Harris,E.S. and Higgs,H.N., 2004. Actin cytoskeleton: Formins lead the way. *Current Biology*, 14:R520-R522 pp.
- Higashida,C., Miyoshi,T., Fujita,A., OcegüeraYanez,F., Monypenny,J., Andou,Y., Narumiya,S., and Watanabe,N., 2004. Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science*, 303:2007-2010 pp.
- Higgs,H.N., 2005. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends in Biochemical Sciences*, 30:342-353 pp.
- Higgs,H.N., Blanchoin,L., and Pollard,T.D., 1999. Influence of the c terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry*, 38:15212-15222 pp.
- Higgs,H.N. and Pollard,T.D., 2000. Activation by Cdc42 and PIP2 of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *Journal of Cell Biology*, 150:1311-1320 pp.
- Hirata,K., Kikuchi,A., Sasaki,T., Kuroda,S., Kaibuchi,K., Matsuura,Y., Seki,H., Saida,K., and Takai,Y., 1992. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J. Biol. Chem.*, 267:8719-8722 pp.
- Hirshberg,M., Stockley,R.W., Dodson,G., and Webb,M.R., 1997. The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue. *Nat. Struct. Biol.*, 4:147-152 pp.
- Holmes,K.C., Goody,R.S., and Amos,L.A., 1982. The Structure of S1-Decorated Actin-Filaments Calculated from X-Ray-Diffraction Data with Phases Derived from Electron-Micrographs. *Ultramicroscopy*, 9:37-& pp.
- Huber,A.H. and Weis,W.I., 2001. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*, 105:391-402 pp.
- Ishikawa,H., Bischoff,R., and Holtzer,H., 1969. Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. *J. Cell Biol.*, 43:312-328 pp.
- Jelesarov,I. and Bosshard,H.R., 1999. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.*, 12:3-18 pp.

- Kabsch,W. and Holmes,K.C., 1990. The Structure of the Actin-Dnase-I Complex at 3.0 A Resolution and the Derived Structure of F-Actin. *Biophysical Journal*, 57:A397 pp.
- Kabsch,W., Mannherz,H.G., Suck,D., Pai,E.F., and Holmes,K.C., 1990. Atomic-Structure of the Actin - Dnase-I Complex. *Nature*, 347:37-44 pp.
- Kanaya,H., Takeya,R., Takeuchi,K., Watanabe,N., Jing,N., and Sumimoto,H., 2005. Fhos2, a novel formin-related actin-organizing protein, probably associates with the nestin intermediate filament. *Genes to Cells*, 10:665-678 pp.
- Kang,F., Laine,R.O., Bubb,M.R., Southwick,F.S., and Purich,D.L., 1997. Profilin interacts with the Gly-Pro-Pro-Pro-Pro sequences of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): implications for actin-based *Listeria* motility. *Biochemistry*, 36:8384-8392 pp.
- Kater,S.B. and Rehder,V., 1995. The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5:68-74 pp.
- Kato,T., Watanabe,N., Morishima,Y., Fujita,A., Ishizaki,T., and Narumiya,S., 2001. Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells. *Journal of Cell Science*, 114:775-784 pp.
- Kelleher,J.F., Atkinson,S.J., and Pollard,T.D., 1995. Sequences, Structural Models, and Cellular-Localization of the Actin-Related Proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *Journal of Cell Biology*, 131:385-397 pp.
- Kim,A.S., Kakalis,L.T., Abdul-Manan,N., Liu,G.A., and Rosen,M.K., 2000. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*, 404:151-158 pp.
- Kiosses,W.B., Daniels,R.H., Otey,C., Bokoch,G.M., and Schwartz,M.A., 1999. A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J. Cell Biol.*, 147:831-844 pp.
- Kitayama,C. and Uyedat,T.Q.R., 2003. ForC, a novel type of formin family protein lacking an FH1 domain, is involved in multicellular development in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Cell Science*, 116:711-723 pp.
- Kobielak,A., Pasolli,H.A., and Fuchs,E., 2004. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nature Cell Biology*, 6:21-U2 pp.
- Koka,S., Minick,G.T., Zhou,Y., Westendorf,J.J., and Boehm,M.B., 2005. Src regulates the activity of the mammalian formin protein FHOD1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336:1285-1291 pp.
- Koka,S., Neudauer,C.L., Li,X.D., Lewis,R.E., McCarthy,J.B., and Westendorf,J.J., 2003. The formin-homology-domain-containing protein FHOD1 enhances cell migration. *Journal of Cell Science*, 116:1745-1755 pp.
- Kovar,D.R., 2006. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Current Opinion in Cell Biology*, 18:11-17 pp.
- Kovar,D.R., Kuhn,J.R., Tichy,A.L., and Pollard,T.D., 2003. The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *Journal of Cell Biology*, 161:875-887 pp.
- Kovar,D.R. and Pollard,T.D., 2004. Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:14725-14730 pp.
- Kovar,D.R., Wu,J.Q., and Pollard,T.D., 2005. Profilin-mediated competition between capping protein and formin Cdc12p during cytokinesis in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 16:2313-2324 pp.
- Kusuhara,M., Nagasaki,K., Kimura,K., Maass,N., Manabe,T., Ishikawa,S., Aikawa,M., Miyazaki,K., and Yamaguchi,K., 1999. Cloning of hexamethylene-bis-acetamide-inducible transcript, HEXIM1, in human vascular smooth muscle cells. *Biomedical Research-Tokyo*, 20:273-279 pp.
- Lacy,E.R., Filippov,I., Lewis,W.S., Otieno,S., Xiao,L., Weiss,S., Hengst,L., and Kriwacki,R.W., 2004. p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11:358-364 pp.
- Laemmli,U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227:680-& pp.
- Laki,K., Bowen,W.J., and Clark,A., 1950. The Polymerization of Proteins - Adenosine Triphosphate and the Polymerization of Actin. *Journal of General Physiology*, 33:437-443 pp.
- Lammers,M., Rose,R., Scrima,A., and Wittinghofer,A., 2005. The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by Rho center dot GTP. *Embo Journal*, 24:4176-4187 pp.
- Lang,P., Gesbert,F., Delespine-Carmagnat,M., Stancou,R., Pouchelet,M., and Bertoglio,J., 1996. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.*, 15:510-519 pp.
- Lassing,I. and Lindberg,U., 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*, 314:472-474 pp.

- Li,F. and Higgs,H.N., 2003. The mouse formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Current Biology*, 13:1335-1340 pp.
- Li,F. and Higgs,H.N., 2005. Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDia1. *Journal of Biological Chemistry*, 280:6986-6992 pp.
- Li,Q.T., Price,J.P., Byers,S.A., Cheng,D.M., Peng,J.M., and Price,D.H., 2005. Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186. *Journal of Biological Chemistry*, 280:28819-28826 pp.
- Lu,J. and Pollard,T.D., 2001. Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 12:1161-1175 pp.
- Lupas,A., 1996. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.*, 266:513-525 pp.
- Lupas,A.N. and Gruber,M., 2005. The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv. Protein Chem.*, 70:37-78 pp.
- Ma,L., Rohatgi,R., and Kirschner,M.W., 1998. The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:15362-15367 pp.
- Machesky,L.M., Atkinson,S.J., Ampe,C., Vandekerckhove,J., and Pollard,T.D., 1994. Purification of A Cortical Complex Containing 2 Unconventional Actins from *Acanthamoeba* by Affinity-Chromatography on Profilin-Agarose. *Journal of Cell Biology*, 127:107-115 pp.
- Machesky,L.M. and Insall,R.H., 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Current Biology*, 8:1347-1356 pp.
- Machesky,L.M., Mullins,R.D., Higgs,H.N., Kaiser,D.A., Blanchoin,L., May,R.C., Hall,M.E., and Pollard,T.D., 1999. Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:3739-3744 pp.
- Madaule,P. and Axel,R., 1985. A Novel Ras-Related Gene Family. *Cell*, 41:31-40 pp.
- Madrid,R., Gasteier,J.E., Bouchet,J., Schroder,S., Geyer,M., Benichou,S., and Fackler,O.T., 2005. Oligomerization of the diaphanous-related formin FHOD1 requires a coiled-coil motif critical for its cytoskeletal and transcriptional activities. *Febs Letters*, 579:441-448 pp.
- Maekawa,M., Ishizaki,T., Boku,S., Watanabe,N., Fujita,A., Iwamatsu,A., Obinata,T., Ohashi,K., Mizuno,K., and Narumiya,S., 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, 285:895-898 pp.
- Manseau,L.J. and Schupbach,T., 1989. cappuccino and spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.*, 3:1437-1452 pp.
- Marchand,J.B., Kaiser,D.A., Pollard,T.D., and Higgs,H.N., 2001. Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nature Cell Biology*, 3:76-82 pp.
- Marshall,C.J., 1993. Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science*, 259:1865-1866 pp.
- Mass,R.L., Zeller,R., Woychik,R.P., Vogt,T.F., and Leder,P., 1990. Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant limb deformity alleles. *Nature*, 346:853-855 pp.
- Matsudaira,P., 1991. Modular organization of actin crosslinking proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 16:87-92 pp.
- Maupin,P. and Pollard,T.D., 1986. Arrangement of Actin-Filaments and Myosin-Like Filaments in the Contractile Ring and of Actin-Like Filaments in the Mitotic Spindle of Dividing HeLa-Cells. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*, 94:92-103 pp.
- Mejean,C., Hue,H.K., Pons,F., Roustan,C., and Benyamin,Y., 1988. Cation Binding-Sites on Actin - A Structural Relationship Between Antigenic Epitopes and Cation-Exchange. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152:368-375 pp.
- Michaelson,D., Silletti,J., Murphy,G., D'Eustachio,P., Rush,M., and Philips,M.R., 2001. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J. Cell Biol.*, 152:111-126 pp.
- Michels,A.A., Fraldi,A., Li,Q., Adamson,T.E., Bonnet,F., Nguyen,V.T., Sedore,S.C., Price,J.P., Price,D.H., Lania,L., and Bensaude,O., 2004a. Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *EMBO J.*, 23:2608-2619 pp.
- Michels,A.A., Nguyen,V.T., Fraldi,A., Labas,V., Edwards,M., Bonnet,F., Lania,L., and Bensaude,O., 2003. MAQ1 and 7SK RNA interact with CDK9/cyclin T complexes in a transcription-dependent manner. *Mol. Cell Biol.*, 23:4859-4869 pp.

- Miki,H. and Takenawa,T., 1998. Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243:73-78 pp.
- Miki,H., Yamaguchi,H., Suetsugu,S., and Takenawa,T., 2000. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*, 408:732-735 pp.
- Miralles,F., Posern,G., Zaromytidou,A.I., and Treisman,R., 2003. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, 113:329-342 pp.
- Moon,A. and Drubin,D.G., 1995. The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics. *Mol. Biol. Cell*, 6:1423-1431 pp.
- Moseley,J.B., Maiti,S., and Goode,B.L., 2006. Formin proteins: Purification and measurement of effects on actin assembly. *Methods in Enzymology*, Vol 406, Regulators and Effectors of Small Gtpases: Rho Family, 406:215-234 pp.
- Moseley,J.B., Sagot,I., Manning,A.L., Xu,Y.W., Eck,J., Pellman,D., and Goode,B.L., 2004. A conserved mechanism for Bni1-and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Molecular Biology of the Cell*, 15:896-907 pp.
- Mullins,R.D., Heuser,J.A., and Pollard,T.D., 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:6181-6186 pp.
- Mullins,R.D., Stafford,W.F., and Pollard,T.D., 1997. Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J. Cell Biol.*, 136:331-343 pp.
- Nachmias,V.T., 1993. Small actin-binding proteins: the beta-thymosin family. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5:56-62 pp.
- Nakano,K., Takaishi,K., Kodama,A., Mammoto,A., Shiozaki,H., Monden,M., and Takai,Y., 1999. Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell*, 10:2481-2491 pp.
- Neri,D., Szyperki,T., Otting,G., Senn,H., and Wuthrich,K., 1989. Stereospecific Nuclear Magnetic-Resonance Assignments of the Methyl-Groups of Valine and Leucine in the Dna-Binding Domain of the 434-Repressor by Biosynthetically Directed Fractional C-13 Labeling. *Biochemistry*, 28:7510-7516 pp.
- Nezami,A.G., Poy,F., and Eck,M.J., 2006. Structure of the autoinhibitory switch in formin mDia1. *Structure*, 14:257-263 pp.
- Nguyen,V.T., Kiss,T., Michels,A.A., and Bensaude,O., 2001. 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature*, 414:322-325 pp.
- Noguchi,T. and Mabuchi,I., 2001. Reorganization of actin cytoskeleton at the growing end of the cleavage furrow of *Xenopus* egg during cytokinesis. *J. Cell Sci.*, 114:401-412 pp.
- Nystrom,L.E., Lindberg,U., Kendrickjones,J., and Jakes,R., 1979. Amino-Acid Sequence of Profilin from Calf Spleen. *Febs Letters*, 101:161-165 pp.
- Otomo,T., Otomo,C., Tomchick,D.R., Machius,M., and Rosen,M.K., 2005a. Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1. *Molecular Cell*, 18:273-281 pp.
- Otomo,T., Tomchick,D.R., Otomo,C., Panchal,S.C., Machius,M., and Rosen,M.K., 2005b. Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature*, 433:488-494 pp.
- Otomo,T., Tomchick,D.R., Otomo,C., Panchal,S.C., Machius,M., and Rosen,M.K., 2005c. The structural basis of formin function and regulation. *Clinical Cancer Research*, 11:9178S-9179S pp.
- Ouchida,R., Kusuhara,M., Shimizu,N., Hisada,T., Makino,Y., Morimoto,C., Handa,H., Ohsuzu,F., and Tanaka,H., 2003. Suppression of NF-kappa B-dependent gene expression by a hexamethylene bisacetamide-inducible protein HEXIM1 in human vascular smooth muscle cells. *Genes to Cells*, 8:95-107 pp.
- Panchal,S.C., Kaiser,D.A., Torres,E., Pollard,T.D., and Rosen,M.K., 2003. A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex. *Nature Structural Biology*, 10:591-598 pp.
- Pantaloni,D. and Carlier,M.F., 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell*, 75:1007-1014 pp.
- Pavletich,N.P., 1999. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.*, 287:821-828 pp.
- Peng,J., Wallar,B.J., Flanders,A., Swiatek,P.J., and Alberts,A.S., 2003. Disruption of the diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Current Biology*, 13:534-545 pp.
- Peterson,J.A., Visentin,G.P., Newman,P.J., and Aster,R.H., 1998. A recombinant soluble form of the integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) assumes an active, ligand-binding conformation and is recognized by GPIIb-IIIa-specific monoclonal, allo-, auto-, and drug-dependent platelet antibodies. *Blood*, 92:2053-2063 pp.

- Podolski, J.L. and Steck, T.L., 1988. Association of deoxyribonuclease I with the pointed ends of actin filaments in human red blood cell membrane skeletons. *J. Biol. Chem.*, 263:638-645 pp.
- Pollard, T.D., 1986. Rate Constants for the Reactions of Atp-Actin and Adp-Actin with the Ends of Actin-Filaments. *Journal of Cell Biology*, 103:A264 pp.
- Pollard, T.D. and Beltzner, C.C., 2002. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Current Opinion in Structural Biology*, 12:768-774 pp.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D., 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29:545-576 pp.
- Pollard, T.D. and Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments (vol 112, pg 453, 2002). *Cell*, 113:549 pp.
- Pollard, T.D. and Mooseker, M.S., 1981. Direct Measurement of Actin Polymerization Rate Constants by Electron-Microscopy of Actin-Filaments Nucleated by Isolated Microvillus Cores. *Journal of Cell Biology*, 88:654-659 pp.
- Price, D.H., 2000. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.*, 20:2629-2634 pp.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C.S., and Zigmond, S.H., 2003. Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry*, 42:486-496 pp.
- Pring, M., Weber, A., and Bubb, M.R., 1992. Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry*, 31:1827-1836 pp.
- Proctor, W.G. and Yu, F.C., 1950. The Dependence of A Nuclear Magnetic Resonance Frequency Upon Chemical Compound. *Physical Review*, 77:717 pp.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C., 2002a. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*, 297:612-615 pp.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C.S., Bi, E.F., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C., 2002c. Role of formins in actin assembly: Nucleation and barbed-end association. *Science*, 297:612-615 pp.
- Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E., and Mullins, R.D., 2005. Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature*, 433:382-388 pp.
- Rickert, P., Weiner, O.D., Wang, F., Bourne, H.R., and Servant, G., 2000. Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol.*, 10:466-473 pp.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S., and Pollard, T.D., 2001. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*, 294:1679-1684 pp.
- Rohatgi, R., Ho, H.Y., and Kirschner, M.W., 2000. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Cell Biol.*, 150:1299-1310 pp.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M.F., 2004. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*, 119:419-429 pp.
- Rose, R., Weyand, M., Lammers, M., Ishizaki, T., Ahmadian, M.R., and Wittinghofer, A., 2005. Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature*, 435:513-518 pp.
- Rosenblatt, J., Peluso, P., and Mitchison, T.J., 1995. The bulk of unpolymerized actin in *Xenopus* egg extracts is ATP-bound. *Mol. Biol. Cell*, 6:227-236 pp.
- Royal, I., Lamarche-Vane, N., Lamorte, L., Kaibuchi, K., and Park, M., 2000. Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol. Biol. Cell*, 11:1709-1725 pp.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P., 1996. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.*, 3:696-700 pp.
- Safer, D., Golla, R., and Nachmias, V.T., 1990a. Isolation of A 5-Kilodalton Actin-Sequestering Peptide from Human Blood-Platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87:2536-2540 pp.
- Safer, D., Golla, R., and Nachmias, V.T., 1990b. Isolation of A 5-Kilodalton Actin-Sequestering Peptide from Human Blood-Platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87:2536-2540 pp.
- Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L., and Pellman, D., 2002b. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.*, 4:626-631 pp.
- Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L., and Pellman, D., 2002a. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.*, 4:626-631 pp.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., 1977. Dna Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74:5463-5467 pp.

- Sano, M., Abdellatif, M., Oh, H., Xie, M., Bagella, L., Giordano, A., Michael, L.H., DeMayo, F.J., and Schneider, M.D., 2002. Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor- β) in cardiac muscle-cell hypertrophy. *Nat. Med.*, 8:1310-1317 pp.
- Schirenbeck, A., Arasada, R., Bretschneider, T., Schleicher, M., and Faix, J., 2005a. Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Biochemical Society Transactions*, 33:1256-1259 pp.
- Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M., and Faix, J., 2005b. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nature Cell Biology*, 7:619-U24 pp.
- Schonichen, A., Alexander, M., Gasteier, J.E., Cuesta, F.E., Fackler, O.T., and Geyer, M., 2006. Biochemical characterization of the diaphanous autoregulatory interaction in the formin homology protein FHOD1. *Journal of Biological Chemistry*, 281:5084-5093 pp.
- Schulte, A., Czudnochowski, N., Barboric, M., Schonichen, A., Blazek, D., Peterlin, B.M., and Geyer, M., 2005. Identification of a cyclin T-binding domain in Hexim1 and biochemical analysis of its binding competition with HIV-1 Tat. *Journal of Biological Chemistry*, 280:24968-24977 pp.
- Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C., and Lindberg, U., 1993. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature*, 365:810-816 pp.
- Selden, L.A., Gershman, L.C., and Estes, J.E., 1986. A Kinetic Comparison Between Mg-Actin and Ca-Actin. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 7:215-224 pp.
- Seth, A., Otomo, C., and Rosen, M.K., 2006. Autoinhibition regulates cellular localization and actin assembly activity of the diaphanous-related formins FRL $\{\alpha\}$ and mDia1. *J. Cell Biol.*, 174:701-713 pp.
- Shemesh, T., Otomo, T., Rosen, M.K., Bershadsky, A.D., and Kozlov, M.M., 2005. A novel mechanism of actin filament processive capping by formin: solution of the rotation paradox. *Journal of Cell Biology*, 170:889-893 pp.
- Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I.R., Kuhlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M.A., and Wittinghofer, A., 2004. The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Molecular Cell*, 13:511-522 pp.
- Shinjo, K., Koland, J.G., Hart, M.J., Narasimhan, V., Johnson, D.I., Evans, T., and Cerione, R.A., 1990. Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87:9853-9857 pp.
- Sims, R.J., III, Belotserkovskaya, R., and Reinberg, D., 2004. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev.*, 18:2437-2468 pp.
- Smith, G.E., Ju, G., Ericson, B.L., Moschera, J., Lahm, H.W., Chizzonite, R., and Summers, M.D., 1985. Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82:8404-8408 pp.
- Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J., and Treisman, R., 1999. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell*, 98:159-169 pp.
- Stanyon, C.A. and Bernard, O., 1999. LIM-kinase1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31:389-394 pp.
- Straub, F.B. and Feuer, G., 1950. Adenosinetriphosphate the Functional Group of Actin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 4:455-470 pp.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A., 1986. Use of Bacteriophage-T7 Rna-Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *Journal of Molecular Biology*, 189:113-130 pp.
- Takeya, R. and Sumimoto, H., 2003. Fhos, a mammalian formin, directly binds to F-actin via a region N-terminal to the FH1 domain and forms a homotypic complex via the FH2 domain to promote actin fiber formation. *Journal of Cell Science*, 116:4567-4575 pp.
- Tanaka, M. and Shibata, H., 1985. Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur. J. Biochem.*, 151:291-297 pp.
- Tilney, L.G., Bonder, E.M., Coluccio, L.M., and Mooseker, M.S., 1983. Actin from Thyone sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin. *J. Cell Biol.*, 97:112-124 pp.
- Tojo, H., Kaieda, I., Hattori, H., Katayama, N., Yoshimura, K., Kakimoto, S., Fujisawa, Y., Presman, E., Brooks, C.C., and Pilch, P.F., 2003. The formin family protein, formin homolog overexpressed in spleen, interacts with the insulin-responsive aminopeptidase and profilin IIa. *Molecular Endocrinology*, 17:1216-1229 pp.
- Tolias, K. and Carpenter, C.L., 2000. In vitro interaction of phosphoinositide-4-phosphate 5-kinases with Rac. *Methods Enzymol.*, 325:190-200 pp.
- Tominaga, T., Sahai, E., Chardin, P., McCormick, F., Courtneidge, S.A., and Alberts, A.S., 2000. Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. *Molecular Cell*, 5:13-25 pp.

- Treisman,R., 1987. Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *EMBO J.*, 6:2711-2717 pp.
- Valencia,A., Chardin,P., Wittinghofer,A., and Sander,C., 1991. The Ras Protein Family - Evolutionary Tree and Role of Conserved Amino-Acids. *Biochemistry*, 30:4637-4648 pp.
- van Leeuwen,F.N., van Delft,S., Kain,H.E., van der Kammen,R.A., and Collard,J.G., 1999. Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat. Cell Biol.*, 1:242-248 pp.
- Vaughn,J.L., Goodwin,R.H., Tompkins,G.J., and Mccawley,P., 1977. Establishment of 2 Cell Lines from Insect Spodoptera-Frugiperda (Lepidoptera-Noctuidae). *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association*, 13:213-217 pp.
- Vavylonis,D., Kovar,D.R., O'Shaughnessy,B., and Pollard,T.D., 2006. Model of formin-associated actin filament elongation. *Molecular Cell*, 21:455-466 pp.
- Vetter,I.R. and Wittinghofer,A., 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294:1299-1304 pp.
- Waller,B.J. and Alberts,A.S., 2003. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 13:435-446 pp.
- Waller,B.J., Stropich,B.N., Schoenherr,J.A., Holman,H.A., Kitchen,S.M., and Alberts,A.S., 2006. The basic region of the diaphanous-autoregulatory domain (DAD) is required for autoregulatory interactions with the diaphanous-related formin inhibitory domain. *Journal of Biological Chemistry*, 281:4300-4307 pp.
- Wang,Y.P., El Zaru,M.R., Surks,H.K., and Mendelsohn,M.E., 2004. Formin homology domain protein (FHOD1) is a cyclic GMP-dependent protein kinase I-binding protein and substrate in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279:24420-24426 pp.
- Wasserman,S., 1998. FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends in Cell Biology*, 8:111-115 pp.
- Watanabe,N., Kato,T., Fujita,A., Ishizaki,T., and Narumiya,S., 1999d. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.*, 1:136-143 pp.
- Watanabe,N., Madaule,P., Reid,T., Ishizaki,T., Watanabe,G., Kakizuka,A., Saito,Y., Nakao,K., Jockusch,B.M., and Narumiya,S., 1997. p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo Journal*, 16:3044-3056 pp.
- Weber,A., Pennise,C.R., Babcock,G.G., and Fowler,V.M., 1994. Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments. *J. Cell Biol.*, 127:1627-1635 pp.
- Weeds,A. and Maciver,S., 1993. F-actin capping proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5:63-69 pp.
- Wei,Y., Zhang,Y., Derewenda,U., Liu,X., Minor,W., Nakamoto,R.K., Somlyo,A.V., Somlyo,A.P., and Derewenda,Z.S., 1997a. Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat. Struct. Biol.*, 4:699-703 pp.
- Wei,Y.Y., Zhang,Y., Derewenda,U., Liu,X.P., Minor,W., Nakamoto,R.K., Somlyo,A.V., Somlyo,A.P., and Derewenda,Z.S., 1997b. Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nature Structural Biology*, 4:699-703 pp.
- Welch,M.D., Iwamatsu,A., and Mitchison,T.J., 1997. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 385:265-269 pp.
- Wellington,A., Emmons,S., James,B., Calley,J., Grover,M., Tolia,P., and Manseau,L., 1999. Spire contains actin binding domains and is related to ascidian posterior end mark-5. *Development*, 126:5267-5274 pp.
- Wen,Y., Eng,C.H., Schmoranzler,J., Cabrera-Poch,N., Morris,E.J.S., Chen,M., Waller,B.J., Alberts,A.S., and Gunderson,G.G., 2004. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nature Cell Biology*, 6:820-8U1 pp.
- Westendorf,J.J., 2001b. The formin/diaphanous-related protein, FHOS, interacts with Rac1 and activates transcription from the serum response element. *J. Biol. Chem.*, 276:46453-46459 pp.
- Westendorf,J.J. and Koka,S., 2004. Identification of FHOD1-binding proteins and mechanisms of FHOD1-regulated actin dynamics. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92:29-41 pp.
- Westendorf,J.J., Mernaugh,R., and Hiebert,S.W., 1999b. Identification and characterization of a protein containing formin homology (FH1/FH2) domains. *Gene*, 232:173-182 pp.
- Westendorf,J.J., Yamamoto,C.M., Lenny,N., Downing,J.R., Selsted,M.E., and Hiebert,S.W., 1998. The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol. Cell Biol.*, 18:322-333 pp.
- Wiseman,T., Williston,S., Brandts,J.F., and Lin,L.N., 1989. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.*, 179:131-137 pp.
- Witke,W., 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends in Cell Biology*, 14:461-469 pp.

- Woolfson,D.N., 2005. The design of coiled-coil structures and assemblies. *Adv. Protein Chem.*, 70:79-112 pp.
- Woychik,R.P., Maas,R.L., Zeller,R., Vogt,T.F., and Leder,P., 1990. 'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene. *Nature*, 346:850-853 pp.
- Wu,W.J., Erickson,J.W., Lin,R., and Cerione,R.A., 2000. The gamma-subunit of the coatomer complex binds Cdc42 to mediate transformation. *Nature*, 405:800-804 pp.
- Xu,Y.W., Moseley,J.B., Sagot,I., Poy,F., Pellman,D., Goode,B.L., and Eck,M.J., 2004. Crystal structures of a formin homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell*, 116:711-723 pp.
- Yamaguchi,Y., Takagi,T., Wada,T., Yano,K., Furuya,A., Sugimoto,S., Hasegawa,J., and Handa,H., 1999. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*, 97:41-51 pp.
- Yang,Z., Zhu,Q., Luo,K., and Zhou,Q., 2001. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature*, 414:317-322 pp.
- Yik,J.H., Chen,R., Nishimura,R., Jennings,J.L., Link,A.J., and Zhou,Q., 2003a. Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol. Cell*, 12:971-982 pp.
- Yik,J.H.N., Chen,R.C., Nishimura,R., Jennings,J.L., Link,A.J., and Zhou,Q., 2003b. Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Molecular Cell*, 12:971-982 pp.
- Yik,J.H.N., Chen,R.C., Pezda,A.C., Samford,C.S., and Zhou,Q., 2004. A human immunodeficiency virus type 1 tat-like arginine-rich RNA-binding domain is essential for HEXIM1 to inhibit RNA polymerase II transcription through 7SK snRNA-Mediated inactivation of P-TEFb. *Molecular and Cellular Biology*, 24:5094-5105 pp.
- Yik,J.H.N., Chen,R.C., Pezda,A.C., and Zhou,Q., 2005. Compensatory contributions of HEXIM1 and HEXIM2 in maintaining the balance of active and inactive positive transcription elongation factor b complexes for control of transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 280:16368-16376 pp.
- Zebda,N., Bernard,O., Bailly,M., Welti,S., Lawrence,D.S., and Condeelis,J.S., 2000. Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. *J. Cell Biol.*, 151:1119-1128 pp.
- Zigmond,S.H., Evangelista,M., Boone,C., Yang,C.S., Dar,A.C., Sicheri,F., Forkey,J., and Pring,M., 2003. Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Current Biology*, 13:1820-1823 pp.
- Zuniga,A., Michos,O., Spitz,F., Haramis,A.P., Panman,L., Galli,A., Vintersten,K., Klasen,C., Mansfield,W., Kuc,S., Duboule,D., Dono,R., and Zeller,R., 2004. Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. *Genes Dev.*, 18:1553-1564 pp.

Danksagung

Ich danke...

Dr. Matthias Geyer (MPI-Dortmund) für die interessanten Projekte, die fortwährende Unterstützung und Motivation,

Prof. Dr. Martin Engelhard (MPI-Dortmund) für die Übernahme des Erstgutachtens,

Prof. Dr. Roger S. Goody für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung,

Prof. Dr. Winter (Universität Dortmund) für die Übernahme des Zweitgutachtens,

Dr. Oliver Fackler (Universität Heidelberg) für die freundschaftliche und produktive Kooperation,

Sebastian Hannemann (Universität Heidelberg) für die Unterstützung bei der Durchführung der Aktinpolymerisationsexperimente,

Sabine Wohlgemut (MPI-Dortmund) für die Hilfe bei der Baculoexpression,

meiner Arbeitsgruppe

Antje, Bernhard, Diana, Fanny, Friederike, Holger, Karin, Karl-Heinz, Michael, Nadine, Santiago und Sebastian für die fantastische Atmosphäre und die schöne Zeit,

sowie *last but not least*

Aymelt, Janina, Nathalie, Sandra, Thomas, Tim und Yoann für Ratschläge und immer gute Stimmung.

Eidesstattliche Erklärung

Die selbständige und eigenhändige Anfertigung dieser Dissertation versichere ich an Eides statt.

Datum / Unterschrift