

**Kompetition zwischen MRTF und WH2-Domänen von Aktin-  
Nukleatoren bei der Genregulation**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Franziska Kluge

geb. am 02.11.1988 in Friedrichroda

1. Gutachter: Prof. Dr. Guido Posern
  2. Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Schwarz
  3. Gutachter: PD Dr. Michael M. Kessels
- Verteidigungsdatum: 16.05.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Das Aktinzytoskelett .....	1
1.1.1. Das Strukturprotein Aktin .....	1
1.1.2. Die Regulation der Aktindynamik.....	4
1.1.2.1. Regulatorische Aktinbindeproteine .....	4
1.1.2.2. Das WH2-Bindemotiv .....	5
1.1.2.3. Aktinnukleation .....	6
1.1.2.3.1. Der Arp2/3-Komplex und nukleationsfördernde Faktoren.....	6
1.1.2.3.2. Formine .....	9
1.1.2.3.3. WH2-Domänen-Nukleatoren .....	10
1.1.3. Zelluläre Funktionen von Aktin .....	12
1.2. Der Aktin-MRTF-SRF-Signalweg .....	13
1.2.1. Der <i>Serum Response Factor</i> (SRF) .....	13
1.2.2. Myocardin und <i>Myocardin-Related Transcription Factors</i> (MRTFs) .....	15
1.2.3. Die Regulation des Aktin-MRTF-SRF-Signalwegs .....	17
1.3. Zielstellung dieser Arbeit .....	21
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1. Materialien.....	22
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien .....	22
2.1.2. Proteaseinhibitoren .....	24
2.1.3. Geräte .....	24
2.1.4. Bakterienzellstämme und Zelllinie.....	25
2.1.5. Plasmide .....	25
2.1.5.1. Käuflich erworbene und existierende Plasmide .....	25
2.1.5.2. Generierte Plasmide.....	26
2.1.6. Primer .....	29
2.1.6.1. Klonierungsprimer.....	29
2.1.6.2. Primer für DNA-Sequenzierungen .....	33

2.1.6.3. Primer für die qPCR .....	33
2.1.7. Antikörper .....	33
2.1.7.1. Primäre Antikörper.....	33
2.1.7.2. Sekundäre Antikörper.....	34
2.1.8. Software.....	35
2.2. Methoden.....	35
2.2.1. Mikrobiologische Methoden .....	35
2.2.1.1. Transformation von chemisch-kompetenten Bakterienzellen .....	35
2.2.1.2. Rekombinante Genexpression .....	36
2.2.2. Nukleinsäuretechniken .....	36
2.2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR) .....	36
2.2.2.2. Agarosegel-Elektrophorese .....	37
2.2.2.3. DNA-Extraktion .....	37
2.2.2.4. Restriktionsverdau .....	37
2.2.2.5. Ligation .....	37
2.2.2.6. Plasmidisolation .....	38
2.2.2.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
2.2.2.8. DNA-Sequenzierung .....	38
2.2.2.9. <i>Single Oligonucleotide Mutagenesis and Cloning Approach</i> (SOMA) .....	38
2.2.2.10. RNA-Isolation .....	39
2.2.2.11. Synthese von cDNA durch reverse Transkription.....	39
2.2.2.12. Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) .....	39
2.2.3. Säugerzellkulturtechniken .....	40
2.2.3.1. Kultivierung und Lagerung von Säugerzellen.....	40
2.2.3.2. Transfektion von DNA in Säugerzellen .....	40
2.2.4. Proteinreinigung .....	41
2.2.4.1. Reinigung von GST und GST-V/VCA-Fusionsproteinen.....	41
2.2.4.2. Reinigung der GST-3C Protease und (GST-)MRTF-A(2-261).....	41
2.2.5. Proteinbiochemische Methoden .....	42
2.2.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	42

2.2.5.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	43
2.2.5.3. Coomassie-Färbung.....	43
2.2.5.4. Western Blot und Immundetektion.....	43
2.2.5.5. Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP).....	44
2.2.5.6. GST <i>pulldown</i> .....	45
2.2.5.6.1. GST <i>pulldown</i> von endogenem Aktin .....	45
2.2.5.6.2. GST <i>pulldown</i> von biotinyliertem Skelettmuskelaktin.....	46
2.2.6. Immunfluoreszenzfärbung.....	46
2.2.7. Luziferase-Reporterassay .....	47
2.2.8. G-Aktin/F-Aktin-Fraktionierung.....	48
2.2.9. Statistik.....	48
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
3.1. Untersuchungen zur Wirkung von WH2-Domänen auf die MRTF-SRF-vermittelte Genexpression.....	50
3.1.1. MRTF-SRF-Aktivierung durch isolierte V/VCA-Domänen aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2.....	50
3.1.2. Analyse von nukleär-lokalisierten V/VCA-Domänen aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 auf die MRTF-SRF-Aktivität.....	53
3.1.3. Induktion der MRTF-SRF-abhängigen Genexpression durch isolierte JMY- V/VVCA-Domänen.....	55
3.2. Untersuchungen zur WH2-vermittelten nukleären Translokation von endogenem MRTF-A.....	57
3.3. Kompetitionsanalysen von MRTF-A und WH2-Domänen um die Bindung an Aktin.....	62
3.3.1. Dissoziation immunpräzipitierter Komplexe von Flag-Aktin-WT und MRTF-A durch rekombinante GST-V/VCA-Fusionsproteine.....	62
3.3.2. Konkurrenz zwischen der rekombinanten RPEL-Domäne von MRTF-A und WH2-Fusionsproteinen um die Bindung an monomeres Aktin .....	67
3.3.2.1. Einfluss der rekombinanten RPEL-Domäne von MRTF-A auf die Präzipitation von endogenem G-Aktin durch GST-V/VCA-Fusionen .....	68
3.3.2.2. Direkte Konkurrenz von MRTF-A(2-261) mit WH2:Aktin-Komplexen.....	69
3.4. Untersuchungen zum Ausschluss einer WH2-vermittelten Aktinpolymerisation als Grundlage für die Aktivierung des MRTF-SRF-Signalweges.....	71

3.4.1. Kein Einfluss der N-terminalen GFP-Fusion auf die WH2-induzierte MRTF-SRF-Aktivität .....	71
3.4.2. Analyse des Aktinzytoskeletts nach Expression von isolierten WH2-Fusionsproteinen ....	73
3.4.3. Untersuchung des zellulären G-/F-Aktin-Gehalts in Anwesenheit von GFP-V/VCA-Domänen aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 .....	75
3.4.4. Analyse des Aktinzytoskeletts in JMY-V/VVVCA-exprimierenden Zellen.....	77
3.4.5. Polymerisationsunabhängige Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Transkription durch WH2-Fusionsproteine.....	78
3.4.6. Konkurrenz von WH2-Domänen mit immunpräzipitierten Komplexen aus MRTF-A und unpolymerisierendem Aktin-R62D .....	80
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1. Direkte Konkurrenz von WH2-Domänen und MRTF-A um die Bindung von G-Aktin .....	83
4.2. Die Lokalisation der MRTF-SRF-Aktivierung durch WH2-Domänen .....	89
4.3. Die direkte Modulation des Aktin-MRTF-SRF-Signalweges durch WH2-Domänen-Proteine – ein Modellsystem.....	92
4.4. WH2-Domänen-Proteine – physiologisch relevante Regulatoren einer MRTF-SRF-vermittelten Transkription?.....	98
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>100</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>101</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>114</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>117</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>125</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>126</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>127</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>128</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Aktinzytoskelett

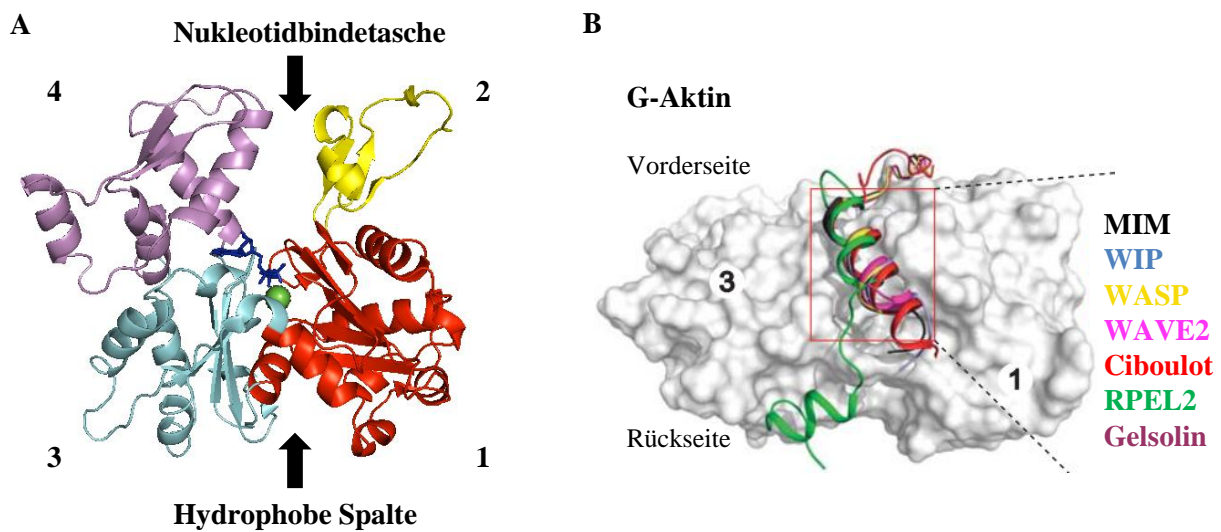
### 1.1.1. Das Strukturprotein Aktin

Das Zytoskelett ist von entscheidender Bedeutung für die Funktion und den Erhalt einer Zelle. Neben Mikrotubuli und Intermediärfilamenten sind die aus dem Strukturprotein Aktin aufgebauten Mikrofilamente Grundbausteine des Zytoskeletts in Eukaryoten. Diese sind ubiquitär in der Zelle verteilt und bilden den Zell-Kortex, kontraktile Fasern wie Stressfibrillen sowie Zellfortsätze wie Lamellipodien und Filopodien.

Aktin besteht aus 375 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 42 kDa. Es ist eines der am häufigsten vorkommenden zellulären Proteine in Eukaryoten und zwischen den einzelnen Spezies hoch konserviert (Dominguez & Holmes, 2011). So weisen die sechs in Säugetieren bekannten Isoformen eine Sequenzhomologie von mindestens 93% auf (Perrin & Ervasti, 2010). Anhand ihres Expressionsmusters unterscheidet man dabei zwischen den drei  $\alpha$ -Isoformen in Glatt-, Herz- und Skelettmuskelzellen, der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoform in Nicht-Muskelzellen sowie der  $\gamma$ -Isoform in Glattmuskelzellen (Vandekerckhove & Weber, 1978). Aktin tritt entweder in Form des globulären Aktin-Monomers (G-Aktin) oder in Form von filamentösem Aktin (F-Aktin) auf, das durch Polymerisation von G-Aktin gebildet wird. Kabsch *et al.* ermittelten 1990 erstmals die Kristallstruktur von monomerem Aktin im Komplex mit DNase I. G-Aktin ist aus vier Subdomänen aufgebaut, welche aus zwei Hauptdomänen gebildet werden (Abb. 1A). Dabei untergliedert sich die kleine, im Filament außenliegende Domäne in die Subdomänen 1 und 2 und die große, im Filament innenliegende Domäne in die Subdomänen 3 und 4. In der Spalte zwischen Subdomäne 2 und 4 befindet sich die Binde-tasche für ATP bzw. ADP sowie ein assoziiertes divalentes Kation ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), wobei die Art des gebundenen Nukleotids die Stabilität und Struktur der Aktinuntereinheit im Filament beeinflusst (Abb. 1A; Kabsch *et al.*, 1990; Otterbein *et al.*, 2001). Die hydrophobe Spalte zwischen Subdomäne 1 und 3 ist zudem Interaktionsfläche für eine Vielzahl von Aktinbinde-proteinen (Abb. 1B).

F-Aktin hat einen Durchmesser von 5-9 nm und ist aus Aktinmonomeren aufgebaut, die über nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sind. Das Aktinfilament hat eine linksdrehende helikale Struktur, welche aufgrund des großen Rotationswinkels der Monomere auch als doppelsträngige, rechtsdrehende Helix erscheint (Holmes *et al.*, 1990). Da alle Monomere die gleiche Orientierung aufweisen, entsteht ein polares Filament, dessen Enden

als Plus- (oder *barbed end*) und Minus-Ende (oder *pointed end*) bezeichnet werden. Die Subdomänen 2 und 4 sind dabei zum Minus-Ende hin ausgerichtet (Lee & Dominguez, 2010).



**Abbildung 1: Kristallstrukturen von monomerem Aktin.**

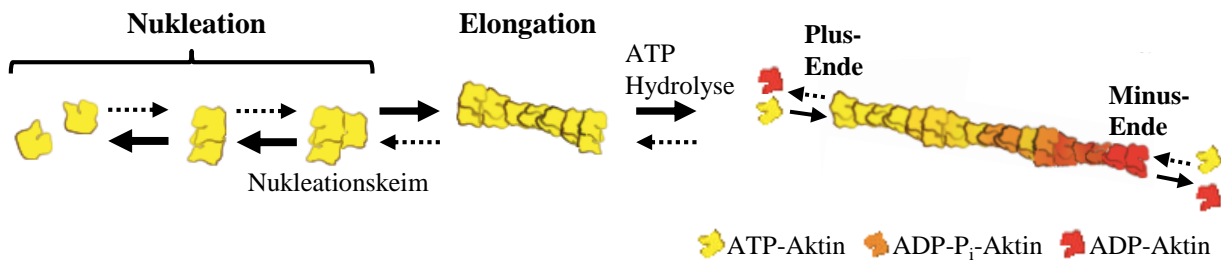
A: Dargestellt ist die Struktur von G-Aktin mit gebundenem ATP (*sticks*, blau) und einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion (Kugel, grün). Die Subdomänen wurden farblich gekennzeichnet: Subdomäne 1 (rot), Subdomäne 2 (gelb), Subdomäne 3 (türkis) und Subdomäne 4 (violett). Die Nukleotidbindetasche sowie die hydrophobe Spalte, über die viele Aktinbindeproteine mit Aktin interagieren, wurden durch Pfeile ( $\rightarrow$ ) markiert. PDB-Code: 1ATN, nach Kabsch *et al.* (1990). B: Der Komplex aus G-Aktin (Oberflächendarstellung) mit dem zweiten RPEL (Arg-Pro-X-X-X-Glu-Leu)-Aktinbindemotiv (RPEL2) von MRTF-A (*myocardin-related transcription factor A*) mit Überlagerung des Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP)-Homologie 2 (WH2)-Motivs der Aktinbindeproteine MIM (*missing in metastasis*, schwarz), WIP (*WASP-interacting protein*, blau), WASP (gelb), WAVE2 (*WASP family Verprolin-homologous protein 2*, pink) und Ciboulot (rot) sowie Gelsolin (violett). Dargestellt ist die untere Ansicht von G-Aktin mit der hydrophoben Spalte zwischen Subdomäne 1 und 3. Abbildung modifiziert nach Mouilleron *et al.* (2008).

Grundvoraussetzung für die Neubildung eines Aktinpolymers ist die Entstehung eines Nukleationskeimes. Dabei lagern sich Aktinmonomere zu -dimeren und schließlich zu -trimeren zusammen. Dieser Prozess wird Nukleation genannt und ist aufgrund der Instabilität der Aktinoligomere der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die *de novo* Synthese F-Aktins (Pollard *et al.*, 2000; Sept & McCammon, 2001). Ausgehend von diesem, aus drei Aktinmonomeren bestehenden Nukleationskeim erfolgt anschließend die schnelle Elongation des Filaments (Abb. 2). Die Polymerisation erfolgt *in vitro* solange, bis die Konzentration von freiem G-Aktin einen kritischen Wert (kritische Konzentration) erreicht und sich ein Gleichgewicht zwischen anlagernden und abfallenden Aktineinheiten einstellt. Monomerkonzentrationen ober- oder unterhalb der kritischen Konzentration führen somit zur Elongation oder Depolymerisation an den Filamentenden (Korn *et al.*, 1987).

Aktin hat eine intrinsische ATPase-Aktivität. Nach Anlagerung der Aktinmonomere an das Filament erfolgt die irreversible Spaltung des gebundenen ATPs zu ADP und Phosphat (Carlier *et al.*, 1988) mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden (Blanchoin & Pollard, 2002). Die Dissoziation des Phosphats ist dagegen ein langsamer Prozess, sodass der Phos-



phatrest zunächst an den ADP-Aktin-Untereinheiten gebunden verbleibt (Abb. 2; Pollard *et al.*, 2000). ATP-Aktin und ADP-P<sub>i</sub>-Aktin weisen identische Eigenschaften auf (Pollard & Borisy, 2003). Die Freisetzung des anorganischen Phosphats führt zu einer Konformationsänderung und einer damit verbundenen Destabilisierung der Aktinuntereinheiten im Filament und fördert somit deren Dissoziation (Carrier, 1991; Otterbein *et al.*, 2001). Der Austausch von ADP zu ATP erfolgt schließlich an monomerem Aktin und nicht im Polymer (Pollard *et al.*, 1992).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der spontanen Aktinpolymerisation *in vitro*.**

Ausgangspunkt für die *de novo* Synthese F-Aktins ist die Zusammenlagerung von Aktinmonomeren zu einem Nukleationskeim (Nukleation). Diese wachsen durch Anlagerung weiterer Monomere (Elongation) zum Aktinfilament. Während der Polymerisation erfolgt die Hydrolyse des gebundenen ATPs. Bedingt durch die unterschiedlichen Assoziationsraten bindet ATP-Aktin vermehrt an das Plus-Ende, wohingegen das Minus-Ende langsamer wächst. Im Gleichgewicht erfolgt die Anlagerung ATP-gebundener Monomere an das Plus-Ende und die Dissoziation von ADP-gebundenen Monomeren am Minus-Ende („Tretmühleneffekt“). Abbildung modifiziert nach Blanchoin *et al.* (2014).

Obwohl die Bindung des Nukleotids für den Polymerisationsprozess nicht notwendig ist, beeinflusst die ATP-Hydrolyse dennoch die Assoziation und Depolymerisation von Aktin im Filament (De La Cruz *et al.*, 2000a). ATP- und ADP-geladenes Aktin kann an beiden Filamentenden binden, weist jedoch abhängig von dem gebundenen Nukleotid unterschiedliche Affinitäten auf. Mg-ATP-Aktin hat am Plus-Ende eine höhere Assoziationsrate als Mg-ADP-Aktin, welches im Vergleich schneller von diesem Ende dissoziiert (Pollard, 1986). Zudem wurde gezeigt, dass die Assoziation und Dissoziation des ATP-gebundenen Aktins auch am Minus-Ende begünstigt sind, aber deutlich langsamer verlaufen. Die kritische Konzentration ( $c_k$ ), welche sich aus dem Quotienten von Dissoziations- zu Assoziationsrate ergibt, ist somit für Mg-ATP-Aktin am Plus-Ende ( $c_k = 0,12 \mu\text{M}$ ) niedriger als am Minus-Ende ( $c_k = 0,6 \mu\text{M}$ ) (Pollard, 1986). Im Gleichgewicht liegt die freie Konzentration ATP-gebundener Monomere zwischen diesen kritischen Konzentrationen. Diese lagern sich hauptsächlich am Plus-Ende an, wohingegen die gleiche Menge ADP-Aktin-Monomere vom Minus-Ende dissoziieren, sodass die Filamentlänge konstant bleibt. Es entsteht eine gerichtete Wanderung der Monomere im Filament, weshalb dieser Prozess als „(Aktin-)Tretmühleneffekt“ bezeichnet wird (Abb. 2; Wegner, 1976; Bonder *et al.*, 1983; Pollard & Borisy, 2003).

## 1.1.2. Die Regulation der Aktindynamik

### 1.1.2.1. Regulatorische Aktinbindeproteine

Einige Zelltypen enthalten bis zu 500  $\mu\text{M}$  Aktin (Dominguez, 2009). Dieses liegt aufgrund der hohen zellulären Konzentration von  $\text{Mg}^{2+}$  sowie der im Vergleich zu ADP verstärkten Affinität zu ATP (Kinosian *et al.*, 1993; Pollard *et al.*, 2000) als Mg-ATP-Aktin vor und würde unter diesen Bedingungen spontan polymerisieren. *In vivo* werden daher alle Schritte der Aktinpolymerisation/-depolymerisation durch zahlreiche Aktinbindeproteine reguliert. Diese untergliedern sich in über 60 verschiedene Klassen (Pollard *et al.*, 2000).

Eine der wichtigsten Vertreter sind Profilin und Thymosin  $\beta_4$ , welche Aktinmonomere binden und den Erhalt von unpolymerisiertem Aktin kontrollieren. Thymosin  $\beta_4$  interagiert über eine erweiterte Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP)-Homologie 2 (WH2)-Domäne sowohl mit dem Plus- als auch mit dem Minus-Ende von G-Aktin (Irobi *et al.*, 2004). Dadurch wird der Austausch des gebundenen Nukleotids und die Polymerisation von Aktin verhindert (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1992; De La Cruz *et al.*, 2000b). Dagegen fördert Profilin den Nukleotidaustausch und hemmt dessen Hydrolyse, sodass die Konzentration von ATP-gebundenem Aktin in der Zelle erhöht wird (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1991). Außerdem verhindert Profilin die Aktinnukleation, fördert aber das Wachstum des Filaments am Plus-Ende (Pollard & Borisy, 2003). Durch Konkurrenz dieser beiden Faktoren wird die Menge von freien, polymerisationskompetenten Monomeren und somit die Bildung von F-Aktin reguliert. Mitglieder der *Actin-depolymerizing factor*/Cofilin-Familie erhöhen den Umsatz von F- zu G-Aktin. Diese fördern die Dissoziation von ADP-Aktin am Minus-Ende des Filaments und stellen den Pool von verfügbaren Monomeren wieder her (Carlier *et al.*, 1997).

Die Bildung neuer Aktinfilamente (Aktinnukleation) wird in der Zelle durch den Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*)-Komplex, Formine sowie WH2-Domänen-Nukleatoren reguliert und ist in Kapitel 1.1.2.3 genauer beschrieben. Die Länge und Dynamik eines Filaments wird zudem durch die an die Filamentenden bindenden „*capping*“-Proteine (z.B. CapZ (Plus-Ende), Tropomodulin (Minus-Ende)), durch Aktinelongationsfaktoren (z.B. Formine, Ena/VASP (*enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein*)), aber auch durch filamenttrennende „*severing*“-Proteine (z.B. Gelsolin) bestimmt. Mit Hilfe quervernetzender Proteine entstehen Filamentbündel (z.B.  $\alpha$ -Actinin) und dreidimensionale Netzwerke (z.B. Filamin), welche Grundlage für die Ausbildung verschiedener Zytoskelettstrukturen sind (Lee & Dominguez, 2010).

### 1.1.2.2. Das WH2-Bindemotiv

Die WH2-Domäne ist ein weit verbreitetes Aktinbindemotiv und in etwa 80 verschiedenen Proteinen enthalten. Dazu gehören die Arp2/3-Aktivatoren der WASP-Familie wie WASP (Derry *et al.*, 1994), das neuronale WASP (N-WASP; Miki *et al.*, 1996), WAVE1-3 (*WASP family Verprolin-homologous protein* 1-3; Miki *et al.*, 1998b; Suetsugu *et al.*, 1999), JMY (*Junction-mediating and regulatory protein*; Zuchero *et al.*, 2009), WH2-Domänen-Nukleatoren wie Spire (Quinlan *et al.*, 2005), Cordon-Bleu (Cobl; Ahuja *et al.*, 2007) und Leiomodin (Lmod; Chereau *et al.*, 2008), Formine wie INF2 (*inverted formin 2*; Chhabra & Higgs, 2006), aber auch zytoskelettverankernde Proteine wie MIM (*missing in metastasis*; Mattila *et al.*, 2003). WH2-Domänen weisen keine spezifische Position auf und können sich N- oder C-terminal, aber auch innerhalb eines Proteins befinden. Bisher konnten bis zu vier WH2-Motive in einem Protein identifiziert werden.  $\beta$ -Thymosine und WH2-Domänen bilden eine gemeinsame Strukturfamilie. Die Faltung der  $\beta$ -Thymosine ähnelt dabei einer isolierten WH2-Domäne (Paunola *et al.*, 2002; Dominguez, 2007).

Die Länge des WH2-Motivs variiert, wobei zwischen kurzen (ca. 17 Aminosäuren, z.B. in WASP/WAVE) und langen Domänen (ca. 27 Aminosäuren, z.B. in MIM) unterschieden wird. WH2-Motive weisen eine niedrige Sequenzhomologie auf und werden oft von prolinreichen Sequenzen flankiert, die u.a. die Interaktion mit Profilin ermöglichen (Chereau *et al.*, 2005).

Der N-terminale Teil der WH2-Domäne bildet eine amphiphile  $\alpha$ -Helix, welche in der hydrophoben Spalte zwischen Subdomäne 1 und 3 eines Aktinmonomers bindet (Abb. 1B; Hertzog *et al.*, 2004; Chereau *et al.*, 2005; Ducka *et al.*, 2010). Daran anschließend folgt eine variable C-terminale Region, welche das LKKT/V-Aktinbindemotiv enthält und sich über die Oberfläche von G-Aktin erstreckt. Dieses Motiv ist zwischen den einzelnen WH2-Proteinen größtenteils konserviert. Leucin bindet in einer hydrophoben Vertiefung auf der Vorderseite des Monomers, während die nachfolgenden positiv geladenen Aminosäuren (meist Lysin oder Arginin) elektrostatische Wechselwirkungen mit G-Aktin eingehen (Dominguez, 2007). An der letzten Position findet sich oft Threonin oder Valin.

Lange WH2-Domänen und  $\beta$ -Thymosine weisen eine anschließende C-terminale Verlängerung auf (Chereau *et al.*, 2005; Dominguez, 2007). Diese bildet im Fall der  $\beta$ -Thymosine eine weitere  $\alpha$ -Helix, welche sich über das Minus-Ende erstreckt und somit die Anlagerung des Monomers an das Filament blockiert (Irobi *et al.*, 2004). Im ungebundenen Zustand liegen WH2-Domänen intrinsisch ungefaltete vor, wohingegen die Interaktion mit Aktin zur Faltung der Domäne führt (Czisch *et al.*, 1993; Safer *et al.*, 1997). Studien haben außerdem gezeigt,

dass WH2-Domänen bevorzugt mit ATP-gebundenem Aktin interagieren (Mattila *et al.*, 2003; Chereau *et al.*, 2005).

WH2-Domänen sind an vielen verschiedenen Prozessen der Aktindynamik beteiligt. Dazu gehören u.a. die Nukleation und Elongation von Aktinfilamenten sowie die Aufrechterhaltung des G-Aktin-Pools durch eine inhibierte Aktinpolymerisation. Darüber hinaus wurde *in vitro* für einige WH2-Proteine wie Cobl, Spire oder INF2 eine zusätzliche filamenttrennende, *cap-ping* und/oder monomersequestrierende Aktivität nachgewiesen (Chhabra & Higgs, 2006; Bosch *et al.*, 2007; Husson *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012).

### 1.1.2.3. Aktinnukleation

Der erste Schritt der Aktinnukleation, d.h. die Bildung eines Nukleationskeims für die Entstehung eines neuen Filaments, wird durch verschiedene Aktin-Nukleatoren unterstützt. Diese lassen sich in drei Proteingruppen untergliedern: der Arp2/3-Komplex zusammen mit nukleationsfördernden Faktoren (*nucleation promoting factors*, NPFs), Formine sowie WH2-Domänen-Nukleatoren (Campellone & Welch, 2010).

#### 1.1.2.3.1. Der Arp2/3-Komplex und nukleationsfördernde Faktoren

Der Arp2/3-Komplex ist der erste identifizierte Aktin-Nukleator und ist zwischen den verschiedenen eukaryotischen Spezies konserviert (Welch *et al.*, 1997). Der Komplex wurde erstmals 1994 als Profilin-Interaktionspartner isoliert und besteht aus sieben Proteinen, den Aktin-verwandten Proteinen (*actin-related protein*, Arp) -2 und -3 sowie den fünf Arp-complex-Untereinheiten (ARPC1-5; Machesky *et al.*, 1994; Goley & Welch, 2006). Studien haben gezeigt, dass der Arp2/3-Komplex an bereits bestehende Filamente bindet und dort die Bildung eines neuen Filaments induziert, wobei diese Verzweigung einen charakteristischen Winkel von 70° aufweist. Der Komplex verbleibt am Minus-Ende, sodass das Wachstum des Filaments am Plus-Ende erfolgt (Mullins *et al.*, 1998; Blanchoin *et al.*, 2000). Alle Komponenten des Arp2/3-Komplexes interagieren mit dem existierenden Filament, während Arp2 und Arp3 dabei auch das erste Dimer des neuen Filaments bilden (Rouiller *et al.*, 2008).

Die Nukleationsaktivität des Arp2/3-Komplexes wird durch NPFs (I und II) erhöht. Zu den Typ I NPFs gehören neben den (N-)WASP/WAVE-Proteinen (Yarar *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999; Machesky *et al.*, 1999) auch die später identifizierten Mitglieder WASH (WASP and Scar Homolog; Linardopoulou *et al.*, 2007), WHAMM (WASP homolog associated with actin, membranes, and microtubules; Campellone *et al.*, 2008) und JMY (Zuchero *et al.*, 2009). Allen gemeinsam ist eine C-terminale VCA-Region, die bis zu drei WH2- (oder Verprolin-Homologie-, V) Domänen sowie eine zentrale/verbindende (*central/connecting*, C) und

saure (*acidic*, A) Region aufweist. Während monomeres Aktin über die WH2-Domänen rekrutiert wird (Miki & Takenawa, 1998), erfolgt die Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex über die anschließende CA-Region (Machesky & Insall, 1998; Rohatgi *et al.*, 1999). Die C-Region, welche strukturelle Ähnlichkeit mit WH2-Domänen aufweist (Chereau *et al.*, 2005), kann zudem an Aktin binden (Kelly *et al.*, 2006). Für eine effiziente Stimulation der Arp2/3-vermittelten Aktinnukleation durch NPFs ist die vollständige VCA-Domäne notwendig (Rohatgi *et al.*, 1999; Marchand *et al.*, 2001). Diese induziert eine Konformationsänderung der Arp2/3-Komplexuntereinheiten, sodass Arp2, -3 und WH2-gebundenes Aktin den Nukleationskeim für das neuentstehende Filament bilden (Panchal *et al.*, 2003; Rodal *et al.*, 2005). Die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch NPFs wird kontrovers diskutiert. Während Gaucher *et al.* (2012) die Bindung einer einzelnen VCA-Region an den Arp2/3-Komplex beobachteten, weisen verschiedene Studien auf eine Assoziation des Komplexes mit zwei NPFs während des Aktivierungsprozesses hin (Ti *et al.*, 2011; Padrick *et al.*, 2011; Boczkowska *et al.*, 2014). Typ II NPFs enthalten keine VCA-Domäne, sondern binden und aktivieren den Arp2/3-Komplex über eine saure Region sowie F-Aktinbindestellen (Weaver *et al.*, 2001; Goley & Welch, 2006). Ein bekannter Vertreter von Typ II NPFs ist Cortactin. Cortactin hat eine geringe NPF-Aktivität, stabilisiert jedoch die Arp2/3-induzierten Filamentverzweigungen und stimuliert die N-WASP-vermittelte Arp2/3-Nukleation (Weaver *et al.*, 2001, 2002; Martinez-Quiles *et al.*, 2004).

Die am besten charakterisierten Mitglieder der Typ I NPFs sind WASP und dessen Homolog N-WASP sowie die drei WAVE-Isoformen. Während N-WASP und WAVE2 ubiquitär exprimiert sind, treten WAVE1 und -3 hauptsächlich im Nervensystem und WASP ausschließlich im hämatopoetischen System auf (Miki *et al.*, 1998a; Suetsugu *et al.*, 1999). An deren C-Terminus befindet sich die Arp2/3-aktivierende VCA-Domäne. Dabei enthält N-WASP zwei aufeinanderfolgende WH2-Domänen und weist *in vitro* im Vergleich zu den anderen VCA-Regionen die stärkste Induktion der Arp2/3-vermittelten Aktinnukleation auf (Yamaguchi *et al.*, 2000). Abgesehen von der VCA-Region unterscheidet sich der N-terminale Aufbau der WASP und WAVE-Proteine deutlich voneinander. Daraus resultieren verschiedene Regulationsmechanismen, welche die Aktivität dieser Faktoren in der Zelle kontrollieren. WASP und N-WASP liegen im inaktiven Zustand autoinhibiert vor. Verschiedene Arbeiten belegen, dass die C-terminale VCA-Region mit der N-terminalen GTPase-Bindedomäne (GBD) interagiert (Miki *et al.*, 1998a; Rohatgi *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000), wodurch die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes nicht möglich ist. Die Autoinhibition wird durch Interaktion der aktivierten RhoGTPase Cdc42 mit der GBD aufgehoben (Miki *et al.*, 1998a; Kim *et al.*,

2000), wobei die kooperative Assoziation von Phosphatidylinositol-(4, 5)-bisphosphat (PI(4, 5)P<sub>2</sub>) an die N-terminal angrenzende basische Region diesen Effekt begünstigt (Rohatgi *et al.*, 1999, 2000). Außerdem binden Src Homologie 3 (SH3)-Domänen-enthaltende Proteine wie Grb2 (*growth-factor receptor-bound protein-2*; Carlier *et al.*, 2000) oder Abi1 (*Abelson-interactor-1*; Innocenti *et al.*, 2005) an die zentralliegende prolinreiche Domäne und führen so zur Aktivierung der WASP-Proteine. Des Weiteren wird die Funktion von N-WASP und WASP durch Mitglieder der WIP (*WASP-interacting protein*)-Familie reguliert (Moreau *et al.*, 2000; Martinez-Quiles *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2002). Martinez-Quiles *et al.* (2001) postulierten, dass WIP die intramolekulare Faltung der WASP-Proteine stabilisiert und deren Aktivität somit inhibiert. WAVE-Proteine dagegen sind nicht durch intramolekulare Faltung inhibiert, sondern liegen in Form eines inaktiven, pentameren Komplexes, dem *WAVE-Regulatory-Complex*, vor. Dieser Komplex wurde erstmals 2002 durch Eden *et al.* isoliert und besteht neben WAVE aus Nap1 (*Nck-associated protein 1*), HSPC300 (*hematopoietic stem/progenitor cell protein 300*), Sra1 (*specifically Rac-associated 1*) und Abi-1/2 (Eden *et al.*, 2002; Gautreau *et al.*, 2004). Der Komplex kann über verschiedene Stimuli wie Interaktion mit der aktivierten RhoGTPase Rac1 und Phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-trisphosphat (PI(3, 4, 5)P<sub>3</sub>) sowie Phosphorylierung der Komplexuntereinheiten aktiviert werden (Eden *et al.*, 2002; Oikawa *et al.*, 2004; Lebensohn & Kirschner, 2009). Anhand der Kristallstruktur des WAVE-Komplexes wurde gezeigt, dass die VCA-Region von WAVE durch Bindung an Sra-1 inaktiviert ist (Chen *et al.*, 2010). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die Komplexuntereinheiten nach Aktivierung nicht wie von Eden *et al.* (2002) postuliert, teilweise dissoziieren, sondern aneinander gebunden verbleiben (Innocenti *et al.*, 2004; Steffen *et al.*, 2004). Die VCA-Region von WAVE wird dabei vermutlich durch eine Konformationsänderung innerhalb des Komplexes freigelegt (Chen *et al.*, 2010). WAVE wird zusammen mit dem Arp2/3-Komplex hauptsächlich für den Aufbau von Lamellipodien benötigt und spielt somit für die Zellmotilität eine Rolle (Suetsugu *et al.*, 2003; Steffen *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2008). Dagegen sind WASP-Proteine in eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Endozytose und Transport von Vesikeln (Benesch *et al.*, 2002, 2005; Innocenti *et al.*, 2005), Phagozytose (Lorenzi *et al.*, 2000; Dart *et al.*, 2012) oder Bildung von Podosomen (Linder *et al.*, 1999; Mizutani *et al.*, 2002; Isaac *et al.*, 2010) und Invadopodien (Yamaguchi *et al.*, 2005; Gligorijevic *et al.*, 2012) beteiligt.

JMY stellt einen besonderen Aktin-Nukleator dar. JMY wurde zunächst als p300-Kofaktor während der p53-vermittelten Stressantwort beschrieben (Shikama *et al.*, 1999). 10 Jahre später zeigten Zuchero *et al.* (2009), dass JMY drei WH2-Domänen sowie eine anschließende

CA-Region besitzt. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass JMY *in vitro* einerseits zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes führt, andererseits aber auch eine Arp2/3-unabhängige Aktinnukleation induziert und somit Eigenschaften eines Typ 1 NPFs und eines WH2-Domänen-Nukleators (1.1.2.3.3) wie Cobl oder Spire kombiniert. Die Lokalisation und Aktivität von JMY wird wiederum durch Aktin kontrolliert. Die Bindung von Aktin an die WH2-Region blockiert das darin integrierte nukleäre Lokalisationssignal und inhibiert somit den Importin- $\alpha/\beta$ -abhängigen Kernimport des Proteins, wohingegen der Komplex während der DNA-Schadensantwort dissoziiert und die nukleäre Translokation von JMY erfolgt (Zuchero *et al.*, 2012). Neben seiner Bedeutung als p300-Kofaktor ist JMY an der Zellmigration (Zuchero *et al.*, 2009; Coutts *et al.*, 2011), der Oogenese und Embryogenese (Sun *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014, 2015), dem Vesikeltransport (Schlüter *et al.*, 2014), der Bildung von Autophagosomen (Coutts & La Thangue, 2015) beteiligt und hat während der Neuritogenese eine inhibitorische Funktion auf die Ausbildung von Neuriten (Firat-Karalar *et al.*, 2011).

#### 1.1.2.3.2. Formine

Formine sind konservierte Multidomänenproteine, welche sowohl an der Nukleation als auch an der Elongation eines neuen Filaments beteiligt sind. Bisher wurden 15 verschiedene humane Formine identifiziert, die sich anhand ihrer C-terminalen Formin-Homologie 2 (FH2)-Domäne in sieben Untergruppen untergliedern (Higgs & Peterson, 2005). Zu den bekanntesten Vertretern gehören die Dia (*Diaphanous*)-Proteine 1-3, FMN (*Formin*)-Proteine -1/-2, die FHOD (*Formin homology domain*)-Proteine -1/-3 sowie INF1/-2. Für die *de novo* Synthese F-Aktins erfolgt die Dimerisierung der FH2-Domänen (Xu *et al.*, 2004), welche eine ringförmige Struktur bilden und Aktindimere stabilisieren (Pring *et al.*, 2003). Die FH2-Domänen wandern sukzessiv an die Plus-Enden der zugefügten Aktinuntereinheiten und verhindern somit die Anlagerung von *capping*-Proteinen (Pruyne *et al.*, 2002; Zigmond *et al.*, 2003; Kovar & Pollard, 2004). Zudem werden durch die benachbarten FH1-Domänen Profilin-Aktin Komplexe rekrutiert, die in das wachsende Filament eingebaut werden (Kovar *et al.*, 2006). Formine generieren somit unverzweigte Aktinpolymere und bilden u.a. Stressfasern oder Filopodien. Zudem sind sie an aktinunabhängigen Prozessen beteiligt, indem sie die Organisation und Stabilität von Mikrotubulis kontrollieren (Breitsprecher & Goode, 2013). Die Funktion der Formine wird in der Zelle durch verschiedene Mechanismen reguliert. *Diaphanous*-verwandte Proteine, zu denen z.B. Dia und FHOD gehören, liegen autoinhibiert vor und werden u.a. durch RhoGTPasen aktiviert (Lammers *et al.*, 2005; Breitsprecher & Goode, 2013). Der C-Terminus von FMN1/-2 dagegen enthält eine Binde-

stelle für den WH2-Domänen-Nukleator Spire1/-2, sodass beide während des Nukleations- und Elongationsprozesses miteinander kooperieren (Quinlan *et al.*, 2007; Pechlivanis *et al.*, 2009).

#### 1.1.2.3.3. WH2-Domänen-Nukleatoren

Die dritte Klasse umfasst die WH2-Domänen-Nukleatoren. Dazu zählen u.a. Lmod (Chereau *et al.*, 2008), Spire (Quinlan *et al.*, 2005), Cobl (Ahuja *et al.*, 2007) und verschiedene bakterielle WH2-Nukleatoren (Jewett *et al.*, 2006; Tam *et al.*, 2007; Liverman *et al.*, 2007). Allen gemeinsam ist die Arp2/3-unabhängige Bildung von unverzweigten Aktinfilamenten.

Leiomodine (Lmod1-3) werden hauptsächlich in Muskelzellen exprimiert und weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu dem Minus-Enden-*capping*-Protein Tropomodulin auf (Conley *et al.*, 2001). Der bekannteste Vertreter ist Lmod2, welches an der Organisation von Sarkomeren beteiligt ist (Chereau *et al.*, 2008). Lmod2 besitzt wie Tropomodulin zwei Aktinbindestellen sowie eine zusätzliche C-terminale WH2-Domäne, die zwischen den einzelnen Leiomodin-Isoformen konserviert sind. Durch Anlagerung von drei Aktinuntereinheiten wird somit die Bildung eines Nukleationskeims für die Entstehung eines neuen Filaments begünstigt (Chereau *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2015).

Der Aktin-Nukleator Cobl ist in Vertebraten konserviert (Carroll *et al.*, 2003) und wird hauptsächlich im Gehirn, aber auch in anderen Geweben wie Lunge, Milz und Hoden exprimiert (Ahuja *et al.*, 2007). Cobl spielt vor allem für die Morphogenese des Nervensystems eine große Rolle. Dabei ist Cobl an der Bildung und/oder Verzweigung von Dendriten in primären, hippocampalen Neuronen (Ahuja *et al.*, 2007; Schwintzer *et al.*, 2011) und zerebralen Purkinje-Zellen (Haag *et al.*, 2012) beteiligt. Zudem übernimmt Cobl weitere Funktionen beim Aufbau von Mikrovilli (Grega-Larson *et al.*, 2015, 2016) und während der Zilliogenese im Zebrafisch (Ravanelli & Klingensmith, 2011; Schüler *et al.*, 2013).

Cobl besitzt drei WH2-Motive in der C-terminalen Domäne, welche durch eine kurze und eine lange Linkerregion voneinander separiert sind. Diese werden für den Nukleationsprozess benötigt und induzieren *in vitro* die Entstehung unverzweigter Aktinpolymere (Ahuja *et al.*, 2007). In dem beschriebenen Nukleationsmodell binden die ersten beiden WH2-Domänen mit hoher Affinität an G-Aktin und generieren ein lineares Aktindimer. Durch die anschließende lange Linkerregion umwindet die dritte WH2-Domäne das Dimer, sodass nach Anlagerung eines weiteren Monomers ein sich überkreuzender Nukleationskeim gebildet wird (Ahuja *et al.*, 2007). In einer weiterführenden Studie wurde jedoch gezeigt, dass die Grundvoraussetzung eine basische Region ist, welche sich N-terminal vor den WH2-Motiven befindet und



die bereits in Verbindung mit der angrenzenden WH2-Domäne zur Nukleation führt. Zudem wurde nachgewiesen, dass Cobl das Wachstum am Plus-Ende begünstigt, aber auch die Spaltung von Aktinfilamenten induziert und ADP-Aktin bevorzugt bindet (Husson *et al.*, 2011). Somit ist Cobl in verschiedene Prozesse der Aktindynamik involviert. Die zellulären Funktionen von Cobl werden durch dessen Assoziation mit Kofaktoren wie Mitgliedern der Syndapin-Familie (Schwintzer *et al.*, 2011; Schüler *et al.*, 2013; Grega-Larson *et al.*, 2015) oder dem F-Aktinbindeprotein 1 (Haag *et al.*, 2012) kontrolliert.

Spire wurde erstmals 1989 als wichtiger Faktor während der Entwicklung von Oozyten und der Embryogenese in *Drosophila (D.) melanogaster* beschrieben (Manseau & Schüpbach, 1989). Auch die in Säugetieren identifizierten Spire-Isoformen, Spire1 und -2, sind in die Oogenese involviert (Pfender *et al.*, 2011). *Spire1* ist hauptsächlich in neuronalen Zellen wie z.B. den zerebralen Purkinje-Zellen exprimiert (Schumacher *et al.*, 2004), während die Expression von *Spire2* nicht nur im Gehirn, sondern auch im Verdauungstrakt, Niere und Hoden nachzuweisen ist (Pleiser *et al.*, 2010).

Spire enthält vier N-terminale WH2-Domänen. Diese initiieren *in vitro* die Nukleation von neuen Aktinfilamenten, wobei die zwei C-terminalen WH2-Domänen entscheidend für diesen Prozess sind (Quinlan *et al.*, 2005). Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten Quinlan *et al.* (2005), dass Spire vier Aktinmonomere entlang der Achse eines Protofilaments bindet, welches durch Anlagerung weiterer Monomere an die zweite Filamentachse weiter polymerisieren könnte. Dieses Modell wird jedoch kontrovers diskutiert (Bosch *et al.*, 2007; Renault *et al.*, 2008; Ducka *et al.*, 2010). Spire weist zudem filamenttrennende, monomersequestrierende und *capping*-Eigenschaften auf (Bosch *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012). Spire und das Formin Cappuccino aus *D. melanogaster*, sowie deren Homologe Spire1 und Formin2 kooperieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* miteinander (Quinlan *et al.*, 2007). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Interaktion spezieübergreifend konserviert ist und zur Bildung eines Komplexes aus einem Formindimer und zwei Spiremonomeren führt. Die Bindung von Cappuccino an Spire fördert die Spire-abhängige Aktinnukleation *in vitro*, wohingegen die Nukleationsaktivität von Cappuccino gehemmt wird (Quinlan *et al.*, 2007). Anhand dieser Daten wurde ein Modell entwickelt, in dem die Formin-abhängige Dimerisierung von Spire zur Bildung eines helikalen Aktinligomers aus acht Monomeren führt, welches anschließend durch Cappuccino zum Filament verlängert wird (Quinlan & Kerkhoff, 2008; Dietrich *et al.*, 2013). Auch *in vivo* ist die Interaktion der beiden Aktin-Nukleatoren von entscheidender Bedeutung. Die Kooperation von Spire und Cappuccino bzw. Formin2 spielt z.B. für die Generierung eines Aktinnetzwerkes während der Oogenese

(Dahlgaard *et al.*, 2007; Pfender *et al.*, 2011; Quinlan, 2013) oder für den zellulären Vesikeltransport (Schuh, 2011; Pylypenko *et al.*, 2016) eine Rolle.

### 1.1.3. Zelluläre Funktionen von Aktin

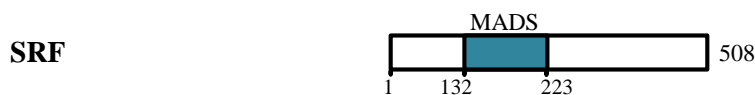
Das Aktinzytoskelett ist für eine Vielzahl zellulärer Prozesse von essentieller Bedeutung. Dabei bestimmen Mikrofilamente zusammen mit Myosin oder anderen assoziierten Aktinbindeproteinen (1.1.2.1) nicht nur die Zellform und -polarität, sondern sind gleichermaßen entscheidend für die Zellmigration, Zytokinese, Endozytose, den Transport von Vesikeln oder die Zelladhäsion (Blanchoin *et al.*, 2014). Zudem ist die Aufrechterhaltung des sensiblen Gleichgewichts zwischen monomerem und filamentösem Aktin wichtig für den Erhalt einer Zelle. So ist eine Behandlung mit Substanzen, welche dieses Gleichgewicht stören, oftmals toxisch (Qualmann & Kessels, 2009). Veränderungen der zellulären Aktindynamik sind zudem mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. Dazu gehören neben der Tumorentwicklung und -metastasierung auch Krankheiten, welche die Muskulatur (z.B. Skelettmuskelpathie), das Nerven- (z.B. Alzheimer), Immun- (z.B. Wiskott-Aldrich Syndrom) oder das vasculäre System (z.B. Entstehung von Mikrothrombosen) betreffen (Cleuren & Boonstra, 2012).

Aktin ist nicht nur wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts, sondern zudem in nukleäre Prozesse involviert. Dabei liegt Aktin sowohl in monomerer, aber auch in filamentöser Form im Zellkern vor (Belin *et al.*, 2013; Baarlink *et al.*, 2013). Aktin reguliert verschiedene Stufen der Gentranskription. Studien belegen, dass Aktin mit allen RNA Polymerasen (I-III) interagiert und für deren Funktion essentiell ist (Philimonenko *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit der Transkriptionskontrolle ist die Assoziation mit Chromatin-remodeling-Komplexen wie z.B. dem BAF (*brahma/brhma-related gene 1-associated factor*)-Komplex, wobei Aktin die Aktivität des Komplexes und somit die Aktivierung der Transkription reguliert (Zhao *et al.*, 1998). Außerdem bildet Aktin mit der wachsenden pre-mRNA (*messenger RNA*), der RNA Polymerase II und dem heterogenen nukleären Ribonukleoprotein U einen Komplex und begünstigt durch Rekrutierung von Histonacetyltransferasen den Fortlauf der Transkription (Kukalev *et al.*, 2005; Obrdlik *et al.*, 2008). Darüber hinaus kontrolliert Aktin die Lokalisation und Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. die der Myocardin-verwandten Transkriptionsfaktoren (*myocardin-related transcription factor*, MRTF), welche wichtige Ko-Aktivatoren des *serum response factors* (SRF) darstellen. Diese Interaktion ist entscheidend für die Regulation des Aktin-MRTF-SRF-Signalweges, welcher im folgenden Kapitel (1.2) beschrieben wird.

## 1.2. Der Aktin-MRTF-SRF-Signalweg

### 1.2.1. Der Serum Response Factor (SRF)

Der *serum response factor* (SRF) ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor und zwischen den verschiedenen Spezies konserviert. SRF wurde erstmals 1986 von R. Treisman als serum-responsives, nukleäres Protein beschrieben und zwei Jahre später durch Norman *et al.* (1988) kloniert. SRF besteht aus 508 Aminosäuren und hat ein apparentes Molekulargewicht von circa 67 kDa (Abb. 3). SRF ist einer der ersten identifizierten Vertreter der MADS (*MCMI*, *Agamous*, *Deficiens*, *SRF*)-Box-enthaltenden Proteinfamilie, wobei über diese Domäne sowohl die DNA-Bindung, Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie eine Dimerisierung der Proteine vermittelt wird (Shore & Sharrocks, 1995). Daran angrenzend befindet sich eine Transaktivierungsdomäne, die die Assoziation mit verschiedenen SRF-interagierenden Proteinen reguliert (Miano, 2003) oder möglicherweise die Expression verschiedener Zielgene konstitutiv induziert (Esnault *et al.*, 2014). Über die MADS-Domäne bindet SRF als Homodimer an CC(A/T)<sub>6</sub>GG-enthaltende DNA-Sequenzen, die sogenannte CArG-Box (Norman *et al.*, 1988; Minty & Kedes, 1986; Pellegrini *et al.*, 1995).



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau von SRF.**

Dargestellt ist die Struktur von murinem SRF mit Kennzeichnung der MADS (*MCMI*, *Agamous*, *Deficiens*, *SRF*)-Box an Aminosäureposition 132-223. Abbildung modifiziert nach Posern und Treisman (2006).

SRF-assoziierte Gene konnten mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitationen und der anschließenden Sequenzierung der SRF-gebundenen DNA, die sogenannte ChIP-seq (*Chromatin immunoprecipitation-sequencing*)-Methode, identifiziert werden. In Kombination mit einer Genexpressionsanalyse durch *RNA-sequencing* wurde gezeigt, dass SRF die Transkription von 960 induzierbaren Zielgenen in serumstimulierten Fibroblasten kontrolliert, die u.a. für extrazelluläre Matrixproteine, Zytoskelettproteine, Transkriptionsfaktoren oder Regulatoren des Tag/Nacht-Rhythmus kodieren (Esnault *et al.*, 2014).

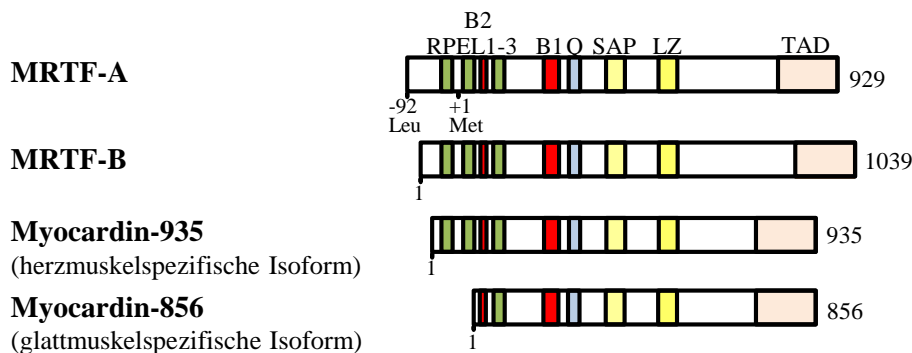
Die Aktivität von SRF wird durch verschiedene Kofaktoren wie z.B. den *ternary complex factors* (TCFs) oder MRTFs/ Myocardin (1.2.2) reguliert. TCFs gehören zur Familie der ETS-Domänen-enthaltenden Proteine und werden durch den Ras-ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)-abhängigen Signalweg aktiviert. Durch extrazelluläre Stimulation erfolgt die Ras-vermittelte Induktion von MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasen wie ERK, die TCFs phosphorylieren (Posern & Treisman, 2006). Diese binden zusammen mit SRF an die Pro-

motorsequenzen verschiedener Zielgene, welche außer der CArG-Box oftmals ETS-Motive oder andere TCF-Bindestellen enthalten (Esnault *et al.*, 2014; Gualdrini *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu TCFs ist die Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Transkription abhängig von RhoGTPasen und wird in den nachfolgenden Kapiteln ausführlich beschrieben. Anhand von Mutations- und Kompetitionsassays wurde gezeigt, dass TCFs und Myocardin/MRTFs SRF aufgrund einer überlappenden Interaktionsoberfläche nicht gleichzeitig binden können (Miralles *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Zaromytidou *et al.*, 2006). Beide Kofaktor-Familien kontrollieren verschiedene Zielengruppen, die nur partiell übereinstimmen, und können sich gegenseitig negativ regulieren (Descot *et al.*, 2009; Esnault *et al.*, 2014; Gualdrini *et al.*, 2016).

SRF ist ein wichtiger Regulator der zellulären Aktindynamik und steuert eine große Anzahl verschiedener biologischer Prozesse. Anhand von SRF-*knock-out*-Mäusen wurde gezeigt, dass SRF ein entscheidender Faktor während der Embryogenese ist. Die Mausembryonen starben bereits während der Gastrulation, spätestens bis zum embryonalen Entwicklungstag (E)12,5 aufgrund einer defekten Mesodermentwicklung (Arsenian *et al.*, 1998). SRF ist auch in einzelnen Zell-/Organsystemen von entscheidender Bedeutung. SRF-defiziente embryonale Stammzellen weisen durch eine verringerte Bildung und/oder fehlerhafte Lokalisation von F-Aktin und diverser Fokaladhäsionsproteine (z.B. Talin, Vinculin) einen veränderten Aufbau des Zytoskeletts auf, sodass wesentliche zelluläre Prozesse wie Zellmotilität, -adhäsion oder -spreizung gestört sind (Schratt *et al.*, 2002). Außerdem spielt SRF beispielsweise bei der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle. Nach konditionellem *knock-out* von SRF in neuronalem Gewebe wurde eine deutliche Expressionsabnahme von Aktin und Gelsolin sowie eine verstärkte Inaktivierung von Cofilin beobachtet, sodass die Funktion wichtiger Regulatoren des Zytoskeletts gestört ist (Alberti *et al.*, 2005). SRF<sup>-/-</sup>-Neuronen weisen daher Defekte in der Zellmigration, der -polarisation, der Bildung von Filopodien und dem Auswuchs von Neuriten auf (Alberti *et al.*, 2005; Knöll *et al.*, 2006; Stern *et al.*, 2009). Ein ähnlicher Phänotyp kann auch durch Überexpression eines dominant-negativen MRTF-A-Proteins (Knöll *et al.*, 2006) oder einer nicht-polymerisierenden Aktinmutante beobachtet werden (Stern *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist SRF an der Kardiogenese (Niu *et al.*, 2005) oder an der Entwicklung und Funktion des Endotheliums (Weinl *et al.*, 2013), der Epidermis (Luxenburg *et al.*, 2011) oder dem Glattmuskelgewebe des Magen-Darm-Traktes (Park *et al.*, 2015) beteiligt.

### 1.2.2. Myocardin und *Myocardin-Related Transcription Factors* (MRTFs)

Myocardin ist das erste identifizierte Mitglied dieser SRF-Kofaktoren und ein starker Aktivator der SRF-vermittelten Genexpression (Wang *et al.*, 2001). Myocardin ist dabei ausschließlich im Herz- und Glattmuskelgewebe, jedoch nicht in Skelettmuskelzellen, exprimiert. Durch alternatives Spleißen entstehen zwei Myocardin-Isoformen, wobei Myocardin-856 glattmuskelspezifisch und Myocardin-935 herzmuskelspezifisch ist (Creemers *et al.*, 2006). Die Aktivierung von SRF konnte zudem durch weitere Transkriptions-Kofaktoren, MRTF-A und dessen Homolog MRTF-B, beobachtet werden, welche strukturelle Ähnlichkeit zu Myocardin besitzen (Wang *et al.*, 2002). Diese konnten in vielen verschiedenen Zelltypen detektiert werden, unterschieden sich jedoch partiell in ihren gewebetypischen Expressionsstärken. Bereits zeitgleich mit der Entdeckung von Myocardin wurde humanes MRTF-A (Synonyme: megakaryozytische akute Leukämie (MAL), megakaryoblastische Leukämie-1 (MKL-1)) bei der Untersuchung von Patientenmaterial von Säuglingen und Kleinkindern mit akuter megakaryoblastischer Leukämie beschrieben (Ma *et al.*, 2001; Mercher *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). MRTF-A ist dabei Teil eines onkogenen Fusionsproteins, welches durch eine chromosomale Translokation (t(1;22)) generiert wird.



**Abbildung 4: Schematische Struktur von MRTF-A und -B sowie der Myocardin-Isoformen.**

Dargestellt sind die funktionellen Domänen der murinen Proteinvarianten. Der Translationsstart von MRTF-A erfolgt bereits ausgehend von Leucin -92. RPEL, Arg-Pro-X-X-X-Glu-Leu-Aktinbindemotiv; B1/2, basische Region 1/2; Q, glutaminreiche Region; SAP, SAF-A/B, Azinus, PIAS-homologe Domäne; LZ, Leucin zipper-Motiv; TAD, Transaktivierungsdomäne. Abbildung modifiziert nach Posern und Treisman (2006).

Die Domänenstruktur von Myocardin und MRTFs ist nahezu identisch (Abb. 4). Alle enthalten in der N-terminalen Domäne bis zu drei konservierte Arginin-Prolin-X-X-X-Glutaminsäure-Leucin-(RPEL)-Motive sowie zwei basische Regionen (B1, B2), welche für den Kernimport notwendig sind (Miralles *et al.*, 2003). Daran anschließend folgt eine glutaminreiche Region (Q), ein SAP-(SAF-A/B, Azinus, PIAS)-Motiv, ein Leucin-„Reißverschluss“ (Leucin zipper, LZ) sowie eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD). MRTF-A und -B weisen eine Sequenzhomologie von 42% auf (Wang *et al.*, 2002). Die N-terminalen

RPEL-Motive sind Aktinbindeelemente (Guettler *et al.*, 2008), welche analog zu WH2-Domänen (1.1.2.2) zwischen Subdomäne 1 und 3 eines Aktinmonomers binden (Abb. 1B; Mouilleron *et al.*, 2008). Im Vergleich zu MRTFs weist die RPEL-Region von Myocardin Sequenzunterschiede und eine daraus resultierende schwächere Bindung an Aktin auf, sodass Myocardin nukleär und konstitutiv aktiv vorliegt (Wang *et al.*, 2001; Miralles *et al.*, 2003; Guettler *et al.*, 2008). Guettler *et al.* (2008) konnten anhand von *domain swapping*-Analysen zeigen, dass bereits der Austausch der ersten beiden RPEL-Motive von MRTF-A in Myocardin zu dessen Regulation durch Aktin führt. Zwischen den drei RPEL-Motiven befinden sich zwei kurze Linkersequenzen (22 Aminosäuren), welche ebenfalls mit Aktin interagieren (Mouilleron *et al.*, 2011). Die Autoren zeigten, dass MRTF-A somit bis zu fünf Aktinmonomere binden kann. Eine weitere Komplexform mit drei gebundenen G-Aktinen (trivalenter Aktin:MRTF-A-Komplex) resultiert aus einer schwächeren Interaktion der zweiten Linkerregion und dem dritten RPEL-Motivs mit Aktin (Mouilleron *et al.*, 2011). Die Assoziation mit SRF erfolgt über eine kurze, konservierte Aminosäureregion in dem basischen B1-Motiv und wird durch die angrenzende glutaminreiche Domäne verstärkt (Miralles *et al.*, 2003; Zaromytidou *et al.*, 2006). Zudem war die simultane Bindung der B1-Region an die umliegende DNA für eine effiziente Komplexbildung notwendig (Zaromytidou *et al.*, 2006). Myocardin und MRTFs besitzen eine konservierte SAP-Domäne, deren genaue Funktion *in vivo* jedoch kontrovers diskutiert wird. Im Allgemeinen haben SAP-Domänen-enthaltende Proteine eine Funktion für die DNA-Bindung und -Reparatur, die RNA-Prozessierung und während der Apoptose (Aravind & Koonin, 2000). Wang *et al.* (2001) zeigten, dass eine Aminosäuresubstitution oder -deletion in der SAP-Domäne von Myocardin die Expression des *atrial natriuretic factor*-Reportergens inhibierte, während die Aktivierung des Transgelin-Reporters nicht beeinflusst wurde. Dagegen hatte eine fehlende SAP-Region in MRTF-A keine Auswirkungen auf die Bindung und Aktivierung von SRF (Miralles *et al.*, 2003; Cen *et al.*, 2003). Myocardin und MRTFs binden mit Hilfe des LZ-Motivs als Homo- bzw. Heterodimere an SRF und stimulieren die Aktivierung der Transkription durch die C-terminale TAD (Wang *et al.*, 2001, 2002; Miralles *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2004).

Die partiell übereinstimmenden Expressionsmuster und das verbreitete Vorkommen der beiden MRTF-Proteine implizieren eine mögliche funktionelle Redundanz zwischen Myocardin, MRTF-A und MRTF-B. So war die RNA-Interferenz-vermittelte Reduktion beider MRTF-Varianten notwendig, um die Aktivierung eines SRF-Reporters in serumstimulierten HeLa-Zellen zu verhindern (Cen *et al.*, 2003). Untersuchungen in *knock-out*-Mäusen zeigen, dass Myocardin/MRTFs den Funktionsverlust von einem dieser SRF-Kofaktoren nicht voll-

ständig ausgleichen können. Der Myocardin-*knock-out* in Mäusen resultiert in einer Entwicklungsstörung des vaskulären Glattmuskelgewebes, die aufgrund eines Differenzierungsstopps zum frühen Tod (bis E10,5) der Mausembryonen führt (Li *et al.*, 2003). Dagegen konnten keine Auswirkungen auf die Morphogenese des Herzmuskelgewebes beobachtet werden, sodass die Autoren eine mögliche Funktionsübernahme durch MRTFs postulierten. Die Deletion von MRTF-B in Mäusen ist letal (Oh *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). In beiden Studien konnte eine fehlerhafte Entwicklung des kardio-vaskulären Systems sowie ein Differenzierungsdefekt vaskulärer Glattmuskelzellen beobachtet werden. Embryonale *MRTF-B*<sup>-/-</sup>-Stammzellen weisen zudem ein stark verändertes Zytoskelett sowie eine verringerte Zelladhäsion auf, die auf einer MRTF-B-spezifischen Störung der TGF (*transforming growth factor*)-β2-Signalkaskade beruhen (Li *et al.*, 2012). *MRTF-A*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen dieselbe Lebensdauer wie Wildtyp-Mäuse und können Nachkommen zeugen (Li *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den anderen Autoren beobachteten Sun *et al.* (2006), dass 35% der Embryonen aufgrund von nekrotischen, myokardialen Zellen bis zum E10,5 starben. Beide Untersuchungen beschrieben jedoch, dass *MRTF-A*<sup>-/-</sup>-Weibchen die Nachkommen nicht ausreichend ernähren können, sodass diese frühzeitig sterben. Die Autoren zeigten, dass der Grund dafür eine unzureichende Genexpression kontraktiler Muskelproteine war, welche in einer Fehlfunktion und der Apoptose der myoepithelialen Brustdrüsenzellen resultierte. In MCF10A-Zellen, einem humanen Modell für die Morphogenese des Brustepitheliums, wurde beobachtet, dass sowohl die Überexpression, aber auch die Deletion von MRTF-A zu einer gestörten Azinientwicklung führt (Seifert & Posern, 2017). Die Autoren zeigten zudem, dass die Einführung von MRTF-B in MRTF-A-deletierten-Zellen diesen Phänotyp nur partiell aufheben konnte, sodass eine vollständige funktionelle Redundanz dieser Kofaktoren während der Brustazinimorphogenese nicht gegeben ist. Des Weiteren wurde aufgrund einer fehlregulierten Apoptose, Proliferation und einer beginnenden epithelial-mesenchymalen-Transition durch erhöhte Mengen von MRTF-A eine onkogene Funktion des Proteins postuliert (Seifert & Posern, 2017). MRTFs haben zudem eine Funktion für den Aufbau und die Struktur des Zytoskeletts (Somogyi & Rørth, 2004; Morita *et al.*, 2007), für die Neovaskularisation (Hinkel *et al.*, 2014) sowie für die Entwicklung verschiedener Gewebearten wie z.B. Skelettmuskel- (Cenik *et al.*, 2016) oder Nervengewebe (Mokalled *et al.*, 2010).

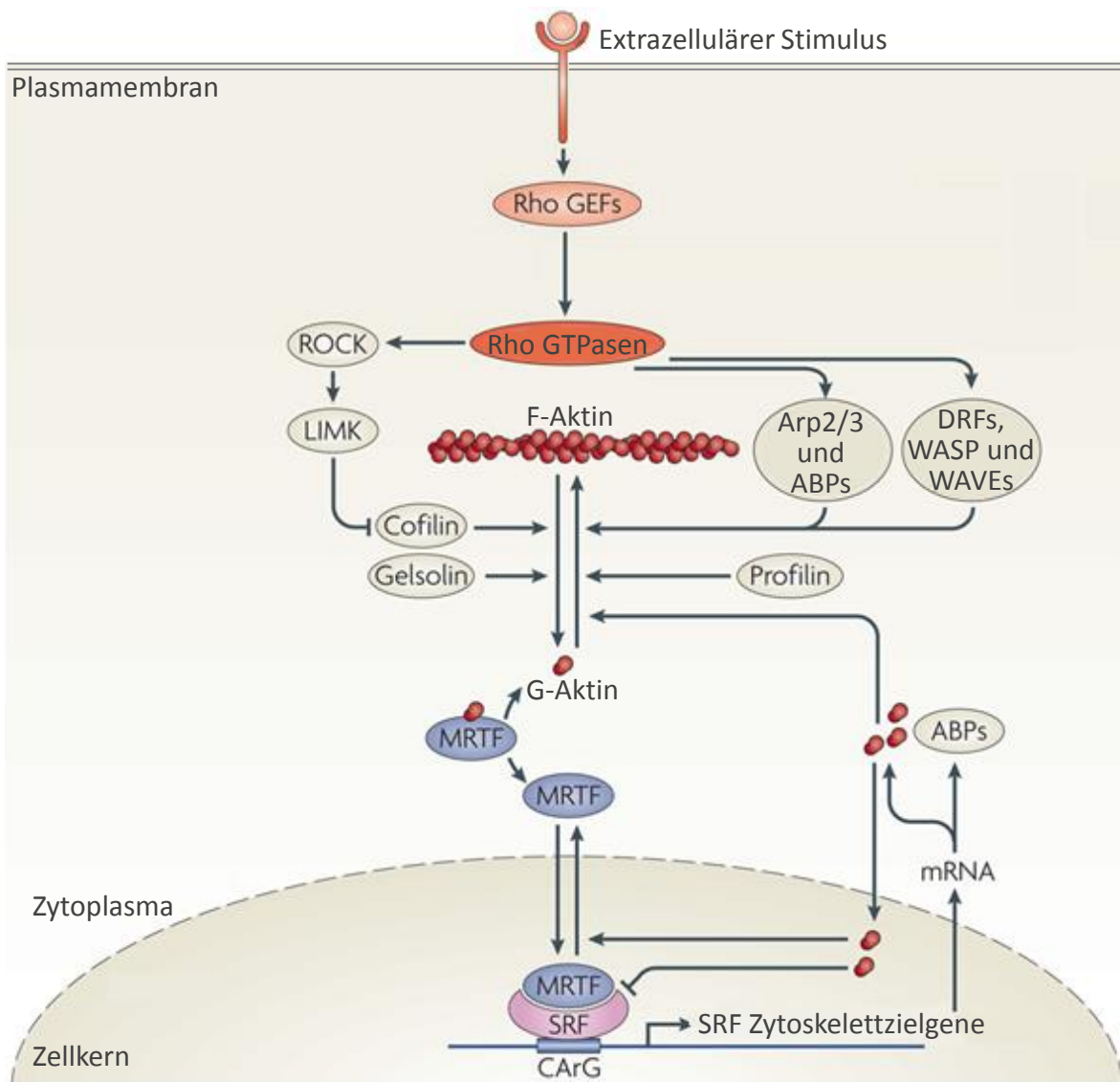
### 1.2.3. Die Regulation des Aktin-MRTF-SRF-Signalwegs

Die Aktivierung der SRF-vermittelten Genexpression erfolgt hauptsächlich über die Assoziation mit Kofaktoren. 1994 beschrieben Hill *et al.* erstmals eine mögliche TCF-unabhängige

Regulation von SRF. Die Autoren beobachteten, dass ein SRF-Reporter trotz mutierter TCF-Bindestelle durch Serumstimulation aktiviert werden konnte. Ein Jahr später wurde von derselben Arbeitsgruppe gezeigt, dass SRF durch aktivierte Proteinvarianten der drei verschiedenen RhoGTPasen stimuliert wird (Hill *et al.*, 1995). Außerdem spielt die zelluläre Aktindynamik eine essentielle Rolle für die Regulation der SRF-Aktivität. Studien von Sotiropoulos *et al.* (1999) sowie Posern *et al.* (2002) zeigten anhand von zytoskelettverändernden Toxinen wie Latrunculin B und Jasplakinolid, Aktin-Nukleatoren oder punktmutiertem Aktin, dass die Induktion der SRF-vermittelten Transkription durch RhoGTPasen abhängig von Aktin ist. So stimulierten Aktin-Nukleatoren, polymerisationsfördernde Aktin-punktmutanten oder das F-Aktin-stabilisierende Toxin Jasplakinolid einen SRF-abhängigen Reporter, während Aktin, nicht-polymerisierende Aktinmutanten oder polymerisationshemmendes Latrunculin B eine gegenteilige Wirkung auf die SRF-Aktivität hatten. Miralles *et al.* (2003) wiesen erstmalig nach, dass Aktin die Aktivität des SRF-Kofaktors MRTF-A reguliert (Abb. 5).

Sowohl die Translokation von MRTF-A in den Zellkern als auch die MRTF-abhängige SRF-Aktivierung werden durch direkte Interaktion der N-terminalen RPEL-Domäne mit Aktin verhindert (Miralles *et al.*, 2003; Posern *et al.*, 2004). MRTFs enthalten im zweiten RPEL-Motiv und in der angrenzenden Linkerregion zwei basische Bereiche, die gemeinsam als nukleäres Lokalisationssignal (NLS) für den Importin- $\alpha/\beta$ -Transportrezeptor fungieren und durch Aktinbindung blockiert werden (Pawłowski *et al.*, 2010). Die Interaktion mit Aktin resultiert in einer Konformationsänderung dieses Kernlokalisierungssignals, wobei die Bindung von fünf Monomeren für eine vollständige Inhibierung des Importin- $\alpha/\beta$ -abhängigen Kernimports von MRTF notwendig ist (Mouilleron *et al.*, 2011; Hirano & Matsuura, 2011). Dagegen können 3:1-Komplexe von Aktin und MRTF-A aufgrund des teilweise freigelegten NLS in den Zellkern translozieren. Auch nukleäres MRTF wird durch Aktin reguliert. Die Assoziation von MRTF-A und Aktin im Zellkern führt unter unstimulierten Bedingungen nicht nur zu einem schnellen, Crm1 (*chromosomal maintenance 1*)-abhängigen Export von MRTF-A, sondern verhindert auch dessen Fähigkeit, SRF zu aktivieren (Vartiainen *et al.*, 2007). Punktmutationen in den Linkerregionen der RPEL-Domäne, welche deren Aktinbindung verhinderten, verringerten zwar den nukleären Export von MRTF-A, konnten aber den inhibitorischen Effekt von Aktin auf die MRTF-SRF-Aktivität nur partiell aufheben (Mouilleron *et al.*, 2011). Für eine effiziente Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Transkription ist daher vermutlich die vollständige Dissoziation nukleärer MRTF:Aktin-Komplexe notwendig (Vartiainen *et al.*, 2007; Mouilleron *et al.*, 2011).





**Abbildung 5: Der Aktin-MRTF-SRF-Signalweg.**

Ein extrazellulärer Stimulus aktiviert durch Rho GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) verschiedene RhoGTPasen. Diese führen über zahlreiche Zytoskelettmodulatoren zum Aufbau und zur Stabilisierung von Aktinfilamenten. Dazu gehören neben der ROCK (*Rho-associated coiled-coil containing kinase*)-LIMK (*LIM domain kinase*)-Proteinkaskade auch Aktin-Nukleatoren wie der Arp2/3-Komplex, DRFs (*Diaphanous-related formins*), Proteine der WASP/WAVE-Familie sowie weitere Aktinbindeproteine (ABPs). Monomeres Aktin bindet den SRF-Kofaktor MRTF sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Die Stimulation des RhoGTPase-abhängigen Signalweges führt durch eine Verringerung freier Aktinmonomere zum Zerfall der Komplexe. Nach Kernimport bindet das freigesetzte MRTF als Homo-/Heterodimer an dimeres SRF und aktiviert die MRTF-SRF-vermittelte Transkription verschiedener Zielgene. Abbildung modifiziert nach Olson und Nordheim (2010).

Extrazelluläre Signale führen zur Stimulation des Aktin-MRTF-SRF-Signalweges durch Aktivierung von RhoGTPasen (Abb. 5). Diese aktivieren daraufhin verschiedene Zytoskelettregulatoren, die die zelluläre Aktindynamik beeinflussen. Aktin-Nukleatoren wie WASP-Proteine oder mDia1, ein *Diaphanous*-verwandtes Formin, induzieren die Bildung von F-Aktin sowie die SRF-abhängige Transkription (Sotiropoulos *et al.*, 1999; Copeland & Treisman, 2002). Die Stimulation von ROCK (*Rho-associated coiled-coil containing kinase*) durch RhoA dagegen aktiviert LIM-Domänen-Kinasen (LIMK). Diese inhibieren das aktindepoly-

merisierende Protein Cofilin durch Phosphorylierung und führen somit über die Stabilisierung der Aktinfilamente zur Induktion von SRF, wobei dieser Prozess durch mDia unterstützt wird (Sotiropoulos *et al.*, 1999; Geneste *et al.*, 2002).

Die Veränderung der G-Aktin-Menge durch dessen verstärkten Einbau in Aktinfilamente resultiert im Zerfall inhibitorischer G-Aktin:MRTF-Komplexe, woraufhin MRTF in den Kern transportiert werden kann. Zudem ist der Export des Proteins reduziert. Anschließend bindet das freigesetzte MRTF als Homo- oder Heterodimer an SRF und stimuliert die MRTF-SRF-abhängige Genexpression (Miralles *et al.*, 2003; Vartiainen *et al.*, 2007).

Durch den Aktin-MRTF-SRF-Signalweg wird die Transkription von fast 700 Zielgenen kontrolliert. Diese kodieren für Proteine, die u.a. in die Zelladhäsion, Zellmotilität, Transkription oder Aktindynamik involviert sind und somit auch eine wichtige autoregulatorische Funktion für den Signalweg selbst darstellen (Abb. 5; Descot *et al.*, 2009; Esnault *et al.*, 2014).

Bisherige Studien lassen einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Transkription und einer abfallenden Menge von Aktinmonomeren durch verstärkte Aktinpolymerisation vermuten. So führt die Überexpression verschiedener polymerisationsfördernder Proteine wie WASP, N-WASP, VASP oder mDia zur Induktion von SRF (Sotiropoulos *et al.*, 1999; Geneste *et al.*, 2002; Copeland & Treisman, 2002). Die Verwendung polymerisationshemmender Aktin-bindender Toxine ergab jedoch differenziertere Ergebnisse. Während Latrunculin B G-Aktin:MRTF-A-Komplexe stabilisiert, führen Swinholid A und Cytochalasin D zur Dissoziation der reprimierenden Komplexe und zur Induktion der MRTF-SRF-abhängigen Transkription (Miralles *et al.*, 2003; Posern *et al.*, 2004; Vartiainen *et al.*, 2007). Des Weiteren konnte eine MRTF-SRF-Aktivierung nach Überexpression von Profilin (Sotiropoulos *et al.*, 1999; Miralles *et al.*, 2003; Posern *et al.*, 2004) oder dem WH2-Protein Thymosin  $\beta$ 4 beobachtet werden (Morita & Hayashi, 2013; Hinkel *et al.*, 2014). Unpublizierte Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wiesen nach, dass Thymosin  $\beta$ 4 die SRF-vermittelte Transkription ohne einen weiteren externen Stimulus induziert (G. Posern, persönliche Mitteilung). Parallel zu der vorliegenden Arbeit zeigten Morita und Hayashi (2013) anhand von Ko-Immünpräzipitationsexperimenten, dass Thymosin  $\beta$ 4 die Bildung inhibitorischer Aktin:MRTF-A-Komplexe verhindert. Die Interaktion von MRTF-A und WH2-enthaltender Proteine erfolgt über dieselbe Oberfläche eines Aktinmonomers (Abb. 1B; Moulleron *et al.*, 2008). Trotz entgegengesetzter Anordnung der Aktinbindeelemente (RPEL bzw. WH2) ist eine gleichzeitige Bindung dieser Faktoren nahezu auszuschließen. Diese Daten lieferten erste Hinweise auf eine mögliche regulatorische Funktion von WH2-enthaltenden Aktinbindeproteinen auf die Dissoziation inhibitorischer G-Aktin:MRTF-Komplexe.

### 1.3. Zielstellung dieser Arbeit

Das Transkriptionsfaktormodul MRTF-SRF kontrolliert die Expression zahlreicher Gene, die in verschiedene biologische Prozesse eingebunden sind. Eine Dysfunktion dieser Faktoren resultiert in einem Fehlverhalten der Zelle, welches pathologische oder entwicklungsbiologische Konsequenzen hat. Die Aktivität von MRTF-SRF wird durch Interaktion von MRTF-A und monomerem Aktin inhibiert. Trotz zahlreicher Studien konnte die genaue Regulation der Komplexdissoziation von G-Aktin und MRTF-A bisher nicht erklärt werden. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob WH2-Domänen eine kompetitive Funktion auf die Ausbildung des G-Aktin:MRTF-A-Komplexes besitzen und somit die Aktivierung der MRTF-SRF-abhängigen Transkription kontrollieren. Als Modellsystem wurde die murine Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 ausgewählt, welche bereits in zahlreichen Studien für die Analyse des Aktin-MRTF-SRF-Signalweges Anwendung fand. In dieser Arbeit wurden die WH2-Domänen aus verschiedenen Aktin-Nukleatoren (N-WASP, WAVE2, Cobl, Spire2 und JMY) für die Bearbeitung folgender Fragestellungen verwendet:

- 1) Können isolierte WH2-Domänen die MRTF-SRF-vermittelte Genexpression aktivieren?
- 2) Beeinflussen isolierte WH2-Domänen die subzelluläre Lokalisation von MRTF-A?
- 3) Besteht eine direkte Konkurrenz zwischen WH2-Domänen und MRTF-A um die Bindung eines Aktinmonomers?
- 4) Kann eine Freisetzung von MRTF-A auch durch ausschließlich kernlokalisierte WH2-Domänen stimuliert werden?
- 5) Besitzen isolierte WH2-Domänen eine polymerisationsunabhängige Funktion während der MRTF-SRF-Aktivierung?

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über einen möglichen Regulationsmechanismus der G-Aktin:MRTF-A-Komplexdissoziation zu erhalten und somit den entscheidenden Schritt des Aktin-MRTF-SRF-Signalweges näher zu charakterisieren.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

In diesem Teilabschnitt wurden Reagenzien und Geräte aufgelistet, welche nicht in den zugehörigen Methoden (2.2) erwähnt wurden.

#### 2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Alle nicht aufgeführten Laborchemikalien und weitere Reagenzien stammten von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Thermo Fisher Scientific (Schwerte). Die Herstellung der Puffer und Lösungen erfolgte mit Millipore-Wasser.

Tabelle 1: Verwendete Laborchemikalien und Reagenzien.

<u>Chemikalien und Reagenzien</u>	<u>Hersteller</u>
<i>Laborchemikalien</i>	
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Agar-Agar, bakteriologisch	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Agarose Standard	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Ampicillin (Natriumsalz)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Antipain	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Aprotinin	Roche (Mannheim)
Bromphenolblau (Natriumsalz)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Coomassie Brilliantblau G250	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Essigsäure (96%)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Ethanol (absolut, $\geq 99,8\%$ )	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethidiumbromidlösung	Promega GmbH (Mannheim)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
L-Glutathion (reduziert)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycerol (86%)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Leupeptin	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Luria-Bertani (LB)-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)

<b><u>Chemikalien und Reagenzien</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Pefabloc	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pepstatin A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Proteaseinhibitorcocktail (cOmplete, EDTA-frei, Tabletten)	Roche (Mannheim)
Salzsäure (HCl, 37%)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
N, N, N', N'-Tetramethylethan-1, 2-diamin (TEMED)	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Tween20	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
<b><i>Reagenzien für molekularbiologische Methoden</i></b>	
<i>Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix (je 10 mM)</i>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
<i>Q5 Reaction Buffer (5x)</i>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
T4 DNA Ligase <i>buffer</i> (10x)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
Taq DNA Ligase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
ThermoPol <i>Reaction buffer</i> (10x)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
<b><i>Reagenzien für die Kultivierung und Manipulation von Säugerzellen</i></b>	
Antibiotikum-Antimykotikum (100x)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM, 1x)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
L-Glutamin (100x, 200 mM)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
0,5% Trypsin-EDTA (10x)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
<b><i>Reagenzien für proteinbiochemische Methoden</i></b>	
Alexa Fluor 680 Streptavidin Konjugat (Katalognr.: S32358)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Immobilon-FL <i>Transfer Membranes</i>	Merck KGaA (Darmstadt)
Spectra/Por2 Membran MWCO 12-14000 Da	Spectrum Laboratories, Inc. (Frankfurt)
<b><i>Reagenzien für die Immunfluoreszenzfärbung</i></b>	
DAPI (Katalognr.: D9542)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Alexa Fluor 546 Phalloidin (Katalognr.: A22283)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

### 2.1.2. Proteaseinhibitoren

Zelluläre Proteasen wurden durch Zugabe der in Tabelle 2 aufgeführten Proteaseinhibitoren zu den jeweiligen Pufferlösungen inaktiviert. Dabei wurde entweder ein vorgefertigter Proteaseinhibitormix (cOmplete, EDTA-frei) oder ein selbst hergestellter Proteaseinhibitormix verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Proteaseinhibitoren.

<u>Proteaseinhibitoren</u>	<u>Endkonzentration</u>
Proteaseinhibitorcocktail (cOmplete, EDTA-frei, Tabletten)	1 Tablette auf 50 ml Pufferlösung
<i>Proteaseinhibitormix bestehend aus:</i>	
Antipain (5 mg/ml)	5 µg/ml
Aprotinin (10 mg/ml)	10 µg/ml
Leupeptin (5 mg/ml)	0,5 µg/ml
Pefabloc (100 mg/ml)	200 µg/ml
Pepstatin A (0,7 mg/ml)	0,7 µg/ml

### 2.1.3. Geräte

Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte.

<u>Verwendung</u>	<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Elektrophorese	Power Supply EV261	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
	Mini-PROTEAN <i>Tetra Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
	Mini Trans-Blot <i>Electrophoretic Transfer Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Inkubatoren	New Brunswick Scientific Inkubationsschüttler I26	Eppendorf AG (Hamburg)
	Heracell 150i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Mikroskope	Axio Observer.Z1 Mikroskop mit Apotome	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
	Axio Imager.M1 Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
	EVOS XL Core Mikroskop (Zellkultur)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Zellaufschluss	Ultraschallprozessor UP200S	Hielscher Ultrasonics GmbH (Teltow)
Zentrifugen	Optima TL 100 Ultrazentrifuge mit TLA-100.2 Rotor	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
	SORVALL RC-6 <i>Superspeed</i> -Zentrifuge mit SS-34 Festwinkelrotor	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
	Kühlbare Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg)
	Allegra X-15R Zentrifuge	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)

## 2.1.4. Bakterienzellstämme und Zelllinie

Die in Tabelle 4 aufgeführten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellstämme wurden für die Isolation von Plasmid-DNA (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) und für die rekombinante Genexpression von GST-Fusionsproteinen (*E. coli* BL21 (DE3) Rosetta) verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Bakterienzellstämme.

<u>Bakterienzellstamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Quelle</u>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) <i>phoA</i> <i>supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam <sup>R</sup> )	Merck KGaA (Darmstadt)

Die murine Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 (Tab. 5) wurde für alle aufgeführten Experimente in Säugerzellen verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Zelllinie.

<u>Zelllinie</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Quelle</u>
NIH 3T3	Immortalisierte embryonale Maus-fibroblasten	G. Posern (Todaro & Green, 1963)

## 2.1.5. Plasmide

### 2.1.5.1. Käuflich erworbene und existierende Plasmide

Die in Tabelle 6 aufgeführten Plasmide wurden als Basisvektoren für Klonierungen sowie für die Expression der angegebenen Fusionsproteine und Luziferasereporter in Bakterien- und Säugerzellen verwendet.

Tabelle 6: Verwendete käuflich erworbene/existierende Plasmide.

<u>Plasmidname</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Herkunft</u>
pGEX-6P-1	Expressionsvektor, Generierung von N-terminalen GST-Fusionsproteinen in Bakterien	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
pEGFP-C2	Expressionsvektor, Generierung von N-terminalen eGFP-Fusionsproteinen in Säugerzellen	Takara Bio Europe S.A.S. (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
pAcGFP1-C2	Expressionsvektor, Generierung von N-terminalen AcGFP1-Fusionsproteinen in Säugerzellen	Takara Bio Europe S.A.S. (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
pEF plink	Modifizierter Expressionsvektor, Generierung von ungetaggten Proteinen in Säugerzellen, auf pUC12-Vektor basierend, mit EF1 $\alpha$ <i>Enhancer</i> /Promoter	G. Posern (Sotiropoulos <i>et al.</i> , 1999)

<b>Plasmidname</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
pEF-Flag-Aktin-WT	Humanes Gesamtlängen- $\beta$ -Aktin, Wildtyp, mit N-terminalem Flag-Tag	G. Posern (Posern <i>et al.</i> , 2002)
pEF-Flag-Aktin-R62D	Unpolymerisierende Mutante von humanem Gesamtlängen- $\beta$ -Aktin, mit N-terminalem Flag-Tag	G. Posern (Posern <i>et al.</i> , 2002)
pEF-Thymosin $\beta$ 4	Murines Gesamtlängen-Thymosin $\beta$ 4, ohne Tag	G. Posern (Weissbach & Schikora <i>et al.</i> , 2016)
pEF-MRTF-A-f.1.-HA	Murines Gesamtlängen-MRTF-A, mit C-terminalem HA-Tag	G. Posern (Miralles <i>et al.</i> , 2003)
pET41a(+)-3C $\Delta$ -MRTF-A(2-261)	RPEL-Domäne von murinem MRTF-A (AS 2-261), mit N-terminaler GST-Fusion und 3C-Protease-Schnittstelle	G. Posern (Posern <i>et al.</i> , 2004)
pET41a(+)-3C	3C Protease, mit N-terminaler GST-Fusion	N. Q. McDonald
pEF-myc-JMY	Murines Gesamtlängen-JMY, mit N-terminalem myc-Tag	J. Weißbach
pEGFP-C1-N-WASP	Murines Gesamtlängen-N-WASP, mit N-terminaler eGFP-Fusion	T. Stradal
pEGFP-C1-WAVE2	Murines Gesamtlängen-WAVE2, mit N-terminaler eGFP-Fusion	T. Stradal
pGEX-5X-1-Cobl-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 1209-1276) aus murinem Cobl, mit N-terminaler GST-Fusion	M. M. Kessels (Ahuja <i>et al.</i> , 2007)
pEGFP-C2-Cobl-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 1209-1276) aus murinem Cobl, mit N-terminaler eGFP-Fusion	M. M. Kessels (Ahuja <i>et al.</i> , 2007)
pCMV-Tag2B-Flag-GFP-Spire2-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 266-311) aus murinem Spire2, mit N-terminaler Flag-eGFP-Fusion	M. M. Kessels (Ahuja <i>et al.</i> , 2007)
pGEX-5X-1-Spire2-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 266-311) aus murinem Spire2, mit N-terminaler GST-Fusion	M. M. Kessels
p3D.A.-Luc	SRF-Luziferase-Reporterplasmid, pGL3-basierter Vektor mit dreifacher aus dem c-fos Promoter hergeleiteten SRF-Bindestelle und einer Aktin (Typ 5) TATA Box aus <i>Xenopus laevis</i> , spezifische Rho-Aktin-SRF-abhängige Expression der <i>Firefly</i> Luziferase	G. Posern (Geneste <i>et al.</i> , 2002; Posern <i>et al.</i> , 2002)
pRL-TK	<i>Renilla</i> Luziferase-Kontrollplasmid, <i>Renilla reniformis</i> Luziferaseexpression unter Kontrolle des Herpes Simplex Virus-Thymidinkinasepromoters	Promega GmbH (Mannheim)

### 2.1.5.2. Generierte Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Plasmide (Tab. 7) wurden für die Expression von WH2-Fusionsproteinen in Bakterien- und Säugerzellen verwendet und nach Yamaguchi *et al.* (2000), Cherau *et al.* (2005), Ahuja *et al.* (2007), Zuchero *et al.* (2009) sowie Weissbach & Schikora *et al.* (2016) konzipiert. Der Sequenzvergleich mit der NCBI-Datenbank wurde mit folgenden Zugangsnummern durchgeführt: N-WASP (Maus, AJ318416.1), WAVE2 (Maus,



AY135643.1), JMY (Maus, NM\_021310.3), Cobl (Maus, NM\_172496.3) und Spire2 (Maus, NM\_172287.2).

Tabelle 7: In dieser Arbeit generierte Plasmide.

<b>Plasmidname</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Vektor</b>
pGEX-6P-1 ohne MCS	Punktmutation der <i>Bam</i> HI Schnittstelle (GGA TCC → TGA TCC) zur Einführung eines vorzeitigen Stoppcodons	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-N-WASP-VV(AB)	Isolierte WH2-Domänen (AB, AS 388-458) aus murinem N-WASP, mit N-terminaler GST-Fusion	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-N-WASP-VV(AB)CA	C-terminale Domäne aus murinem N-WASP bestehend aus WH2-Domänen und CA-Region (AS 388-501), mit N-terminaler GST-Fusion	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-WAVE2-V	Isolierte WH2-Domäne (AS 417-463) aus murinem WAVE2, mit N-terminaler GST-Fusion	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-WAVE2-VCA	C-terminale Domäne aus murinem WAVE2 bestehend aus WH2-Domäne und CA-Region (AS 417-497), mit N-terminaler GST-Fusion	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-JMY-V(A)	Erste WH2-Domäne (A, AS 846-882) aus murinem JMY, durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler GST-Fusion	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-JMY-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 877-912) aus murinem JMY, durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler GST-Fusion	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-JMY-V(C)	Dritte WH2-Domäne (C, AS 908-944) aus murinem JMY, durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler GST-Fusion	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-JMY-VV(AB)	Erste und zweite WH2-Domäne (AB, AS 846-912) aus murinem JMY, durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler GST-Fusion	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-JMY-VV(BC)	Zweite und dritte WH2-Domäne (BC, AS 877-944) aus murinem JMY, durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler GST-Fusion	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-JMY-VVV(ABC)	Isolierte WH2-Region aus murinem JMY bestehend aus drei WH2-Domänen (ABC, AS 846-944), durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler GST-Fusion	pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-JMY-VVV(ABC)CA	C-terminale Domäne aus murinem JMY bestehend aus drei WH2-Domänen und CA-Region (AS 846-983), durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler GST-Fusion	pGEX-6P-1
pEGFP-C2-N-WASP-VV(AB)	Isolierte WH2-Domänen (AB, AS 388-458) aus murinem N-WASP, mit N-terminaler eGFP-Fusion	pEGFP-C2
pEGFP-C2-N-WASP-NLS-VV(AB)	Isolierte WH2-Domänen (AB, AS 388-458) aus murinem N-WASP, mit N-terminaler eGFP-Fusion und nukleärem Lokalisationssignal	pEGFP-C2

<b>Plasmidname</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Vektor</b>
pEGFP-C2-N-WASP-VV(AB)CA	C-terminale Domäne aus murinem N-WASP bestehend aus WH2-Domänen und CA-Region (AS 388-501), mit N-terminaler eGFP-Fusion	pEGFP-C2
pEGFP-C2-N-WASP-NLS-VV(AB)CA	C-terminale Domäne aus murinem N-WASP bestehend aus WH2-Domänen und CA-Region (AS 388-501), mit N-terminaler eGFP-Fusion und nukleärem Lokalisations-signal	pEGFP-C2
pEGFP-C2-WAVE2-V	Isolierte WH2-Domäne (AS 417-463) aus murinem WAVE2, mit N-terminaler eGFP-Fusion	pEGFP-C2
pEGFP-C2-WAVE2-NLS-V	Isolierte WH2-Domäne (AS 417-463) aus murinem WAVE2, mit N-terminaler eGFP-Fusion und nukleärem Lokalisationssignal	pEGFP-C2
pEGFP-C2-WAVE2-VCA	C-terminale Domäne aus murinem WAVE2 bestehend aus WH2-Domäne und CA-Region (AS 417-497), mit N-terminaler eGFP-Fusion	pEGFP-C2
pEGFP-C2-WAVE2-NLS-VCA	C-terminale Domäne aus murinem WAVE2 bestehend aus WH2-Domäne und CA-Region (AS 417-497), mit N-terminaler eGFP-Fusion und nukleärem Lokalisationssignal	pEGFP-C2
pEGFP-C2-Cobl-NLS-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 1209-1276) aus murinem Cobl, mit N-terminaler eGFP-Fusion und nukleärem Lokalisationssignal	pEGFP-C2
pCMV-Tag2B-Flag-GFP-Spire2-NLS-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 266-311) aus murinem Spire2, mit N-terminaler Flag-eGFP-Fusion und nukleärem Lokalisationssignal	pCMV-Tag2B-Flag-GFP
pEGFP-C2-JMY-V(A)	Erste WH2-Domäne (A, AS 846-882) aus murinem JMY, durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler eGFP-Fusion	pEGFP-C2
pEGFP-C2-JMY-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 877-912) aus murinem JMY, durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler eGFP-Fusion	pEGFP-C2
pEGFP-C2-JMY-V(C)	Dritte WH2-Domäne (C, AS 908-944) aus murinem JMY, durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler eGFP-Fusion	pEGFP-C2
pEGFP-C2-JMY-VV(AB)	Erste und zweite WH2-Domäne (AB, AS 846-912) aus murinem JMY, durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler eGFP-Fusion	pEGFP-C2
pEGFP-C2-JMY-VV(BC)	Zweite und dritte WH2-Domäne (BC, AS 877-944) aus murinem JMY, durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler eGFP-Fusion	pEGFP-C2
pEGFP-C2-JMY-VVV(ABC)	Isolierte WH2-Region aus murinem JMY bestehend aus drei WH2-Domänen (ABC, AS 846-944), durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler eGFP-Fusion	pEGFP-C2
pEGFP-C2-JMY-VVV(ABC)CA	C-terminale Domäne aus murinem JMY bestehend aus drei WH2-Domänen und CA-Region (AS 846-983), durch zusätzlichen 5xGlycin-Serin-Linker separiert von N-terminaler eGFP-Fusion	pEGFP-C2

<b>Plasmidname</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Vektor</b>
pAcGFP1-C2-N-WASP-VV(AB)	Isolierte WH2-Domänen (AB, AS 388-458) aus murinem N-WASP, mit N-terminaler AcGFP1-Fusion	pAcGFP1-C2
pAcGFP1-C2-N-WASP-NLS-VV(AB)	Isolierte WH2-Domänen (AB, AS 388-458) aus murinem N-WASP, mit N-terminaler AcGFP1-Fusion und nukleärem Lokalisationssignal	pAcGFP1-C2
pAcGFP1-C2-N-WASP-VV(AB)CA	C-terminale Domäne aus murinem N-WASP bestehend aus WH2-Domänen und CA-Region (AS 388-501), mit N-terminaler AcGFP1-Fusion	pAcGFP1-C2
pAcGFP1-C2-N-WASP-NLS-VV(AB)CA	C-terminale Domäne aus murinem N-WASP bestehend aus WH2-Domänen und CA-Region (AS 388-501), mit N-terminaler AcGFP1-Fusion und nukleärem Lokalisationssignal	pAcGFP1-C2
pAcGFP1-C2-WAVE2-V	Isolierte WH2-Domäne (AS 417-463) aus murinem WAVE2, mit N-terminaler AcGFP1-Fusion	pAcGFP1-C2
pAcGFP1-C2-WAVE2-NLS-V	Isolierte WH2-Domäne (AS 417-463) aus murinem WAVE2, mit N-terminaler AcGFP1-Fusion und nukleärem Lokalisationssignal	pAcGFP1-C2
pAcGFP1-C2-WAVE2-VCA	C-terminale Domäne aus murinem WAVE2 bestehend aus WH2-Domäne und CA-Region (AS 417-497), mit N-terminaler AcGFP1-Fusion	pAcGFP1-C2
pAcGFP1-C2-WAVE2-NLS-VCA	C-terminale Domäne aus murinem WAVE2 bestehend aus WH2-Domäne und CA-Region (AS 417-497), mit N-terminaler AcGFP1-Fusion und nukleärem Lokalisationssignal	pAcGFP1-C2
pAcGFP1-C2-Cobl-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 1209-1276) aus murinem Cobl, mit N-terminaler AcGFP1-Fusion	pAcGFP1-C2
pAcGFP1-C2-Cobl-NLS-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 1209-1276) aus murinem Cobl, mit N-terminaler AcGFP1-Fusion und nukleärem Lokalisationssignal	pAcGFP1-C2
pAcGFP1-C2-Spire2-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 266-311) aus murinem Spire2, mit N-terminaler AcGFP1-Fusion	pAcGFP1-C2
pAcGFP1-C2-Spire2-NLS-V(B)	Zweite WH2-Domäne (B, AS 266-311) aus murinem Spire2, mit N-terminaler AcGFP1-Fusion und nukleärem Lokalisationssignal	pAcGFP1-C2

## 2.1.6. Primer

Die in Tabelle 8 bis Tabelle 10 aufgeführten Oligonukleotide wurden durch die Firma *Eurofins Genomics* (Ebersberg) hergestellt.

### 2.1.6.1. Klonierungsprimer

Die in Tabelle 8 aufgeführten Oligonukleotidprimer wurden für die Klonierung der in dieser Arbeit generierten Plasmide verwendet. Die zugehörigen Sequenzen der Restriktionsenzyme wurden unterstrichen.

Tabelle 8: Verwendete Primer für Klonierungen.

<u>Plasmid</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' → 3')</u>	<u>Enzym</u>
pGEX-6P-1 ohne MCS	StoppMCS.pGEX	GTTCTGTTCCAGGGGCCCTGTGATCCC CGGAATCCCCGGGTCTGA	-
pGEX-6P-1- N-WASP- VV(AB)	NWASP.V.FW.EcoRI	CGCGGAATTCCTTCTGATGGTGACCAT CAA	<i>EcoRI</i>
	NWASP.V.RevNot	ATATGCGGCCGCTTATGCGGGTGTGTTGGT GGTGTGGA	<i>NotI</i>
pGEX-6P-1- N-WASP- VV(AB)CA	NWASP.V.FW.EcoRI	CGCGGAATTCCTTCTGATGGTGACCAT CAA	<i>EcoRI</i>
	NWASP.VCA.RevNot	ATATGCGGCCGCTCAGTCTTCCCCTCA TCATCATC	<i>NotI</i>
pGEX-6P-1- WAVE2-V	WAVE2.V.FW.EcoRI	CGCGGAATTCACCACCTTCTGAGGC CACC	<i>EcoRI</i>
	WAVE2.V.RevNot	ATATGCGGCCGCTTACACATCAGCTTC TCTTGCTC	<i>NotI</i>
pGEX-6P-1- WAVE2-VCA	WAVE2.V.FW.EcoRI	CGCGGAATTCACCACCTTCTGAGGC CACC	<i>EcoRI</i>
	WAVE2.VCA.RevNot	ATATGCGGCCGCTTAATCCGACCAGTC GTCTTCATC	<i>NotI</i>
pGEX-6P-1- JMY-V(A)	J.A.EcoRI.FW	ATATGAATTCGGTAGCGGTAGCGGTAG CGGTAGCGGTAGCATCCCAAAGTCGGC CAGTGCCCCC	<i>EcoRI</i>
	J.A.NotI.Rev	ATATGCGGCCGCTCACACTCTCCTCCTC TGCAGCCCTTCCAC	<i>NotI</i>
pGEX-6P-1- JMY-V(B)	J.B.EcoRI.FW	ATATGAATTCGGTAGCGGTAGCGGTAG CGGTAGCGGTAGCCTGCAGAGGAGGAG AGTGAGTTCA	<i>EcoRI</i>
	J.B.NotI.Rev	ATATGCGGCCGCTCAAGGAAAAGGAGG CAGAGTCCGCTGTTC	<i>NotI</i>
pGEX-6P-1- JMY-V(C)	J.C.EcoRI.FW	ATATGAATTCGGTAGCGGTAGCGGTAG CGGTAGCGGTAGCCTGCCTCCTTTTCTC GATGAAGAT	<i>EcoRI</i>
	J.C.NotI.Rev	ATATGCGGCCGCTCAAAGTGTGAAGGA TTCTCTCAAACTTC	<i>NotI</i>
pGEX-6P-1- JMY-VV(AB)	J.A.EcoRI.FW	ATATGAATTCGGTAGCGGTAGCGGTAG CGGTAGCGGTAGCATCCCAAAGTCGGC CAGTGCCCCC	<i>EcoRI</i>
	J.B.NotI.Rev	ATATGCGGCCGCTCAAGGAAAAGGAGG CAGAGTCCGCTGTTC	<i>NotI</i>
pGEX-6P-1- JMY-VV(BC)	J.B.EcoRI.FW	ATATGAATTCGGTAGCGGTAGCGGTAG CGGTAGCGGTAGCCTGCAGAGGAGGAG AGTGAGTTCA	<i>EcoRI</i>
	J.C.NotI.Rev	ATATGCGGCCGCTCAAAGTGTGAAGGA TTCTCTCAAACTTC	<i>NotI</i>

<b>Plasmid</b>	<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Enzym</b>
pGEX-6P-1-JMY-VVV(ABC)	J.A.EcoRI.FW	ATATGAATTCGGTAGCGGTAGCGGTAGCGGTAGCGGTAGCATCCCAAAGTCGGCCAGTGCCCCC	<i>EcoRI</i>
	J.C.NotI.Rev	ATATGCGGCCGCTCAAAGTGTGAAGGATTCTCTCAA AACTTC	<i>NotI</i>
pGEX-6P-1-JMY-VVV(ABC)CA	J.A.EcoRI.FW	ATATGAATTCGGTAGCGGTAGCGGTAGCGGTAGCGGTAGCATCCCAAAGTCGGCCAGTGCCCCC	<i>EcoRI</i>
	J.VCA.NotI.Rev	ATATGCGGCCGCCTAGTTCTCCAGTCTGTGCACGGCAA	<i>NotI</i>
pEGFP-C2-N-WASP-VV(AB)	V.WASP.FW.Xho	CGCGCTCGAGCCCTTCTGATGGTGACCATCAA	<i>XhoI</i>
	V.WASP.RevSal	CGCGGTTCGACTTATGCGGGTGTGGTG GTGTGGA	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-N-WASP-NLS-VV(AB)	NLSV_VCAWASP.FW	ATATCTCGAGCCCGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTGCCTTCTGATGGTGAC	<i>XhoI</i>
	V.WASP.RevSal	CGCGGTTCGACTTATGCGGGTGTGGTG GTGTGGA	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-N-WASP-VV(AB)CA	V.WASP.FW.Xho	CGCGCTCGAGCCCTTCTGATGGTGACCATCAA	<i>XhoI</i>
	VCA.WASP.RevSal	CGCGGTTCGACTCAGTCTTCCC ACTCATCATCATC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-N-WASP-NLS-VV(AB)CA	NLSV_VCAWASP.FW	ATATCTCGAGCCCGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTGCCTTCTGATGGTGAC	<i>XhoI</i>
	VCA.WASP.RevSal	CGCGGTTCGACTCAGTCTTCCC ACTCATCATCATC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-WAVE2-V	V.WAVE.FW.Xho	ATATCTCGAGCCCACCACCTTCTGAGGCCACC	<i>XhoI</i>
	V.WAVE.RevSal	CGCGGTTCGACTTACACATCACGCTTCTCTTGCTC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-WAVE2-NLS-V	NLSV_VCAWAVE.FW	ATATCTCGAGCCCGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTGCCACCACCTTCTGAG	<i>XhoI</i>
	V.WAVE.RevSal	CGCGGTTCGACTTACACATCACGCTTCTCTTGCTC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-WAVE2-VCA	V.WAVE.FW.Xho	ATATCTCGAGCCCACCACCTTCTGAGGCCACC	<i>XhoI</i>
	VCA.WAVE.RevSal	CGCGGTTCGACTTAATCCGACCAGTCGCTTCATC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-WAVE2-NLS-VCA	NLSV_VCAWAVE.FW	ATATCTCGAGCCCGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTGCCACCACCTTCTGAG	<i>XhoI</i>
	VCA.WAVE.RevSal	CGCGGTTCGACTTAATCCGACCAGTCGCTTCATC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-Cobl-NLS-V(B)	NLS.Cobl_FW	ATATGAATTCCTCCGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTGGCAGA ACTGACGTCA	<i>EcoRI</i>
	NLS-Cobl_Rev	CGCGGTTCGACAAGGCCAAGGTCTTCTTGCTG	<i>SalI</i>

<b>Plasmid</b>	<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Enzym</b>
pCMV-Tag2B-Flag-GFP-Spire2-NLS-V(B)	NLS.Spire_FW	ATATGAATTCCCCTAAGAAAAAGCG GAAGGTGCAGGAGAAGGAGTTC	<i>EcoRI</i>
	NLS.Spire_Rev	CGCGCTCGAGTCACTTCTTCACCCTGGG AGGGAT	<i>XhoI</i>
pEGFP-C2-JMY-V(A)	J.A.Xho.FW	ATATCTCGAGCGGTAGCGGTAGCGGTA GCGGTAGCGGTAGCATCCCAAAGTCGG CCAGTGCCCCC	<i>XhoI</i>
	J.A.SalI.Rev	CGCGGTTCGACTTACACTCTCCTCCTCTG CAGCCCTTCCAC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-JMY-V(B)	J.B.Xho.FW	ATATCTCGAGCGGTAGCGGTAGCGGTA GCGGTAGCGGTAGCCTGCAGAGGAGGA GAGTGAGTTCA	<i>XhoI</i>
	J.B.SalI.Rev	CGCGGTTCGACTTAAGGAAAAGGAGGCA GAGTCCGCTGTTC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-JMY-V(C)	J.C.Xho.FW	ATATCTCGAGCGGTAGCGGTAGCGGTA GCGGTAGCGGTAGCCTGCCTCCTTTTCC TGATGAAGAT	<i>XhoI</i>
	J.C.SalI.Rev	CGCGGTTCGACTTAAAGTGTGAAGGATT CTCTCAAACTTC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-JMY-VV(AB)	J.A.Xho.FW	ATATCTCGAGCGGTAGCGGTAGCGGTA GCGGTAGCGGTAGCATCCCAAAGTCGG CCAGTGCCCCC	<i>XhoI</i>
	J.B.SalI.Rev	CGCGGTTCGACTTAAGGAAAAGGAGGCA GAGTCCGCTGTTC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-JMY-VV(BC)	J.B.Xho.FW	ATATCTCGAGCGGTAGCGGTAGCGGTA GCGGTAGCGGTAGCCTGCAGAGGAGGA GAGTGAGTTCA	<i>XhoI</i>
	J.C.SalI.Rev	CGCGGTTCGACTTAAAGTGTGAAGGATT CTCTCAAACTTC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-JMY-VVV(ABC)	J.A.Xho.FW	ATATCTCGAGCGGTAGCGGTAGCGGTA GCGGTAGCGGTAGCATCCCAAAGTCGG CCAGTGCCCCC	<i>XhoI</i>
	J.C.SalI.Rev	CGCGGTTCGACTTAAAGTGTGAAGGATT CTCTCAAACTTC	<i>SalI</i>
pEGFP-C2-JMY-VVV(ABC)C A	J.A.Xho.FW	ATATCTCGAGCGGTAGCGGTAGCGGTA GCGGTAGCGGTAGCATCCCAAAGTCGG CCAGTGCCCCC	<i>XhoI</i>
	J.VCA.SalI.Rev	CGCGGTTCGACCTAGTTCTCCCAGTCTGT GCACGGCAA	<i>SalI</i>
pAcGFP1-C2-Spire2-V(B)	WH2Spire.Hind.F	CGCGAAGCTTCCAGGAGAAGGAGTTCA ACCCA	<i>HindIII</i>
	WH2Spire.Sal.R	CGCGGTTCGACTCACTTCTTCACCCTGGG AGGGAT	<i>SalI</i>
pAcGFP1-C2-Spire2-NLS-V(B)	NLSWH2Spire.F	ATATAAGCTTCCCGCCTAAGAAAAAGC GGAAGGTGCAGGAGAAGGAGTTC	<i>HindIII</i>
	WH2Spire.Sal.R	CGCGGTTCGACTCACTTCTTCACCCTGGG AGGGAT	<i>SalI</i>

### 2.1.6.2. Primer für DNA-Sequenzierungen

Die Sequenzierung (2.2.2.8) der generierten Plasmid-DNA erfolgte mit den in Tabelle 9 dargestellten Primern.

Tabelle 9: Verwendete Primer für die DNA-Sequenzierung.

<u>Vektor</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' → 3')</u>	<u>Herkunft</u>
pEGFP-C2	DS.pEGFP.C2.seq	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	D. Shaposhnikov (#62)
	Insertspezifisch	Insertspezifischer Rückwärtsprimer	s. Tabelle 8
pGEX-6P-1	pGEX 5' SeqPrimer	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
	pGEX 3' SeqPrimer	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	
pAcGFP1-C2	pEGFPN1for	GTCGTAACAACCTCCGCC	Eurofins Genomics (Ebersberg)
	pEGFPC1rev	CATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGG	

### 2.1.6.3. Primer für die qPCR

Für die mittels qPCR durchgeführte Analyse der relativen Genexpression wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Oligonukleotide verwendet.

Tabelle 10: Verwendete Primer für die qPCR.

<u>Amplikon</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' → 3')</u>	<u>Herkunft</u>
ALAS1 (Maus)	ALAS mus for	CTCCTCGAACCCTGTCCAC	F. Pohl (#70)
	ALAS mus rev	GCCATCTGGGACTCGTCAG	F. Pohl (#71)
HPRT (Maus)	ADM1.HPRT.for	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	F. Pohl (#67)
	ADM1.HPRT.rev	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG	F. Pohl (#66)
Acta2 (Maus)	ADM1.SMA2.FW	GGGAGTAATGGTTGGAATGG	A. Descot (#105)
	ADM1.SMA2.Rev	CAGTGTCGGATGCTCTTCAG	A. Descot (#106)

## 2.1.7. Antikörper

### 2.1.7.1. Primäre Antikörper

Die in Tabelle 11 aufgeführten primären Antikörper wurden für die Immundetektion von Proteinen mittels Western Blot-Analyse (WB, 2.2.5.4) oder Immunfluoreszenzfärbung (IF, 2.2.6) verwendet.

Tabelle 11: Verwendete primäre Antikörper.

<u>Primäre Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Katalognummer</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-β-Aktin	Maus, Monoklonal, Klon AC-15	WB: 1:1000	A5441	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-Flag	Kaninchen, Polyklonal	WB: 1:2000	F7425	Sigma-Aldrich (Steinheim)

<u>Primäre Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Katalognummer</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-GFP	Kaninchen, Polyklonal	WB: 1:1000	G1544	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-GST	Kaninchen, Polyklonal	WB: 1:1000-1:2000	G7781	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-HA	Kaninchen, Polyklonal	WB: 1:1000	H6908	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-MRTF	Kaninchenantiserum, Polyklonal	IF: 1:1000	-	Hausgemacht (Descot <i>et al.</i> , 2009)
Anti-MRTF-A (C-19)	Ziege, Polyklonal	IF: 1:100	sc-21558	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg)
Anti-MRTF-A	Maus, Monoklonal, Klon 1A11	WB: 1:500-1:1000	-	Hausgemacht (Busche <i>et al.</i> , 2010)
Anti- $\alpha$ -Tubulin	Maus, Monoklonal, Klon DM1A	WB: 1:1000-1:2000	T9026	Sigma-Aldrich (Steinheim)

### 2.1.7.2. Sekundäre Antikörper

Für die Durchführung der Western Blot-Analyse (WB, 2.2.5.4) oder Immunfluoreszenzfärbung (IF, 2.2.6) wurden die in Tabelle 12 aufgelisteten sekundären Antikörper verwendet.

Tabelle 12: Verwendete sekundäre Antikörper.

<u>Sekundäre Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Katalognummer</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-Ziege IgG (H+L)-Cy3-Konjugat	Esel, Polyklonal	IF: 1:200	705-165-147	Dianova GmbH (Hamburg)
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-Alexa Fluor 546 Konjugat	Ziege, Polyklonal	IF: 1:200	A-11010	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Anti-Maus IgG (H+L)-IRDye 800CW-Konjugat	Ziege, Polyklonal	WB: 1:15.000	926-32210	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-IRDye 800CW-Konjugat	Ziege, Polyklonal	WB: 1:15.000	926-32211	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)
Anti-Maus IgG (H+L)-IRDye 680RD-Konjugat	Ziege, Polyklonal	WB: 1:15.000	926-68070	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-IRDye 680RD-Konjugat	Ziege, Polyklonal	WB: 1:15.000	926-68071	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)



## 2.1.8. Software

Die in Tabelle 13 aufgeführte Software wurde für die Aufnahme und Auswertung von Daten verwendet.

Tabelle 13: Verwendete Software.

<u>Software</u>	<u>Herkunft</u>
Adobe Photoshop CS6 <i>Extended</i> , Version 13.0.1	Adobe Systems GmbH (München)
AxioVision Rel. 4.8.1	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
GloMax Software, Version 1.9.2	Promega GmbH (Mannheim)
Image Studio Software für Odyssey CLx, Version 3.1	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)
Light Cycler 480 Software, Version 1.5.0 SP4	Roche (Mannheim)
Microsoft Office 2010 (Word, Powerpoint, Excel)	Microsoft Deutschland GmbH (München)
NanoDrop 2000c, Version 1.6.198	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
SnapGene, Version 2.8.3	GSL Biotech LLC (Chicago, IL, USA)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Mikrobiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Bakterienzellstämme (Tab. 4) wurden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Alle benötigten Medien wurden vor der Verwendung bei 121 °C autoklaviert. Die Selektion erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika in einer Endkonzentration von 100 µg/ml (Ampicillin), 34 µg/ml (Chloramphenicol) und 30 µg/ml (Kanamycin).

Luria-Bertani (LB)-Medium: 1% (w/v) NaCl; 1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; Antibiotikum

LB-Agarplatten: 1,5% (w/v) Agar-Agar in LB-Medium; Antibiotikum

#### 2.2.1.1. Transformation von chemisch-kompetenten Bakterienzellen

Ein Aliquot (50 µl) chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde zunächst auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA oder dem Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mit Hilfe eines Hitzeschocks für 45 s bei 42 °C. Nach Abkühlung des Reaktionsansatzes für 2 min auf Eis wurde 500 µl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1-1,5 h bei 600 rpm und 37 °C schüttelnd inkubiert. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C durch Zugabe der jeweiligen Antibiotika selektiert.

### 2.2.1.2. Rekombinante Genexpression

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde nach Transformation der entsprechenden Plasmid-DNA in *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta-Zellen (2.2.1.1) eine 5 ml Vorkultur mit einer Einzelkolonie beimpft und für 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Eine 500 ml Hauptkultur wurde im Anschluss mit der Vorkultur versetzt und bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,6-0,8 bei 180 rpm und 37 °C kultiviert. Die Induktion der rekombinanten Genexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,1-1 mM. Für die Expression von GST-MRTF-A(2-261), GST-3C sowie der GST-JMY-V/VVVCA-Fusionsproteine wurde die Inkubationstemperatur auf 25 °C gesenkt. Die Zellernte erfolgte nach 4 Stunden durch Zentrifugation für 15 min bei 3200 x g und 4 °C. Für die Expression der GST-3C Protease wurde eine Induktionsdauer von 24 h gewählt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellpellets bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2. Nukleinsäuretechniken

Alle hier aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden für die Analyse, Modifikation und Klonierung von Nukleinsäuren wurden in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

#### 2.2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifikation von DNA-Sequenzen, welche in mehrfachen Zyklen durch Denaturierung der DNA, Hybridisierung (*annealing*) der Primer sowie anschließender DNA Polymerase-abhängiger Primerverlängerung (*extension*) generiert werden (Mullis *et al.*, 1986). Die PCR wurde in 50 µl Ansätzen entsprechend den Herstellerangaben mit Hilfe der Q5 *High-Fidelity* DNA Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler T3000 (Biometra GmbH, Göttingen) unter Verwendung des in Tabelle 14 dargestellten PCR-Programms.

Tabelle 14: PCR-Programm für die DNA-Amplifikation mit Hilfe der Q5 *High-Fidelity* DNA Polymerase.

<u>Zyklus</u>	<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>
1	Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
35	Denaturierung	98 °C	10 s
	Primerhybridisierung ( <i>annealing</i> )	variabel	20 s
	Verlängerung ( <i>extension</i> )	72 °C	variabel
1	Finale Verlängerung ( <i>extension</i> )	72 °C	2 min
	Ende	4 °C	∞

Die *annealing*-Temperatur und die Dauer der *extension* wurden an die eingesetzten Klonierungsprimer (Tab. 8) sowie an die Länge der zu generierenden DNA-Sequenzen angepasst. Die Größe und Reinheit der PCR-Produkte wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft (2.2.2.2).

### 2.2.2.2. Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde für die Auftrennung, Identifizierung und Isolierung von DNA-Fragmenten verwendet. Für die Herstellung der Agarosegele wurde 1% (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst und Ethidiumbromid nach Abkühlung der Lösung in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA *Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) versetzt, auf das auspolymerisierte Gel aufgetragen und in 1x TBE-Puffer bei 90-120 V für 30-60 min elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard dienten der *GeneRuler* 100 bp und 1 kb DNA *ladder* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Die Aufnahme der Gele erfolgte unter UV-Licht an einem GEL *Stick Touch* Geldokumentationsgerät (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

TBE-Puffer (1x): 90 mM Tris/HCl pH 8,0; 3 mM EDTA; 90 mM Borsäure

### 2.2.2.3. DNA-Extraktion

Aufgetrennte DNA-Fragmente korrekter Größe wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *MinElute Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert. Die DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.2.2.4. Restriktionsverdau

Die Restriktion von PCR-Produkten und Plasmid-DNA wurde mit den spezifischen Restriktionsenzymen (siehe auch Tab. 8, New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wie bereits beschrieben mittels Agarosegel-Elektrophorese (2.2.2.2) und DNA-Extraktion (2.2.2.3) gereinigt.

### 2.2.2.5. Ligation

Die Ligation geschnittener DNA-Fragmente (2.2.2.4) wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl bestehend aus 1 µl T4 DNA Ligase *buffer*, 0,5 µl T4 DNA Ligase, 2 µl PCR-Produkt, 6 µl Vektor und 0,5 µl ddH<sub>2</sub>O durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden bei Raumtemperatur für 4 h oder bei 16 °C über Nacht inkubiert und nachfolgend in chemisch-kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert (2.2.1.1).

### 2.2.2.6. Plasmidisolation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen erfolgte mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Für die Präparation wurde eine 5 ml Übernachtkultur eingesetzt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in 30  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Für Transfektionen und den Erhalt der Plasmide wurden höhere Mengen DNA mit dem *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll generiert. Die Plasmid-DNA wurde in 200  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.2.2.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem NanoDrop 2000c Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorption von 1 bei dieser Wellenlänge einer doppelsträngigen DNA-Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l bzw. einer RNA-Konzentration von 40 ng/ $\mu$ l.

### 2.2.2.8. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Firma *Eurofins Genomics* (Ebersberg) durchgeführt. Für die Analyse wurden 100 ng DNA und die in Tabelle 9 aufgeführten Sequenzierungsprimer eingesetzt. Die Sequenzauswertung erfolgte mit Hilfe des Programms *SnapGene*.

### 2.2.2.9. Single Oligonucleotide Mutagenesis and Cloning Approach (SOMA)

Mit Hilfe des *Single Oligonucleotide Mutagenesis and Cloning Approach* (SOMA) können Punktmutationen, aber auch größere Insertionen oder Deletionen durch den Einsatz eines einzelnen Mutageneseprimers in Plasmid-DNA eingebracht werden (Pfirrmann *et al.*, 2013). Der in Tabelle 8 aufgeführte Mutageneseprimer wurde durch die Firma *Eurofins Genomics* am 5'-Ende phosphoryliert. Abweichend zu dem von Pfirrmann *et al.* (2013) beschriebenen Verfahren wurde die PCR mit einer Q5 *High-Fidelity* DNA Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.) und 0,2  $\mu$ M phosphoryliertem Mutageneseprimer durchgeführt. Das angepasste PCR-Programm ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: PCR-Programm für die Mutagenese von Plasmid-DNA mittels SOMA.

<u>Zyklus</u>	<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>
1	Denaturierung	98 °C	1 min
30	Denaturierung	98 °C	1 min
	Primerhybridisierung ( <i>annealing</i> )	55 °C	1 min
	Verlängerung ( <i>extension</i> ) und Ligation	72 °C	4 min
	Ende	4 °C	$\infty$

Nach *DpnI*-Verdau der methylierten *template*-DNA für 4 h bei 37 °C erfolgte die Reinigung des PCR-Ansatzes mit Hilfe des *MinElute PCR Purification Kits* (Qiagen, Hilden). Die DNA wurde in 10 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert und in chemisch-kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert (2.2.1.1).

#### 2.2.2.10. RNA-Isolation

GFP-V/VCA-Fusionsproteine wurden in NIH 3T3 unter Serumentzug exprimiert. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Isolation der Gesamt-Zell-RNA entsprechend der Herstellerangaben mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen, Hilden). Durch Zugabe von 0,01 V TCEP während der Lyse wurden zellulärer RNasen inaktiviert. Die RNA wurde in 40 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt (2.2.2.7).

#### 2.2.2.11. Synthese von cDNA durch reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde das *Verso cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet. Die eingesetzte RNA (500 ng) wurde bei 70 °C für 5 min denaturiert, auf Eis inkubiert und die reverse Transkription nach Herstellerprotokoll mit *random hexamers* durchgeführt. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 45 °C für 1 h mit nachfolgender Inaktivierung bei 95 °C für 2 min.

#### 2.2.2.12. Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) wurde mit dem *DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1,5 µl der 1:5 verdünnten cDNA (2.2.2.11), 5 µl des *2xDyNAmo ColorFlash SYBR Green Master mix* sowie 0,5 µM genspezifischem Primermix (Tab. 10). Für die Reaktion wurde ein *LightCycler 480 Instrument II* (Roche, Mannheim) und das in Tabelle 16 dargestellte PCR-Programm verwendet.

Tabelle 16: Verwendetes Programm für die qPCR.

<u>Zyklus</u>	<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>
1	Initiale Denaturierung	95 °C	7 min
45	Denaturierung	95 °C	10 s
	Primerhybridisierung ( <i>annealing</i> ) und Verlängerung ( <i>extension</i> )	60 °C	30 s

Die Aufnahme der Schmelzkurve erfolgte durch einen stufenweisen Temperaturanstieg von 65-95 °C mit einer Geschwindigkeit von 0,11 °C/s. Die Berechnung der relativen Genexpression wurde mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode nach Livak und Schmittgen (2001) durchgeführt.

## 2.2.3. Säugerzellkulturtechniken

### 2.2.3.1. Kultivierung und Lagerung von Säugerzellen

Die murine Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 wurde in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm<sup>2</sup> in 15 ml Wachstumsmedium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 1,5 ml 1x Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturflasche abgelöst. Die proteolytische Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von 8,5 ml Wachstumsmedium abgestoppt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit 100 µl verdünnter Zellsuspension in 10 ml CASYton Messpuffer mit Hilfe eines CASY *Cell Counter+Analyser Systems* (Model TT, Roche, Mannheim). Die verwendeten Zellzahlen in Abhängigkeit von den verschiedenen Zellkulturschalen/-platten sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Eingesäte Zellzahlen in Abhängigkeit von den verwendeten Zellkulturgefäßen.

<u>Zellzahl</u>	<u>Zellkulturgefäß</u>	<u>Wachstumsmedium</u>
7 x 10 <sup>4</sup>	12well-Platte	1 ml
3 x 10 <sup>5</sup>	6well-Platte	2 ml
1 x 10 <sup>6</sup>	10 cm-Schale	10 ml

Für den Erhalt der Zelllinie wurden Kryoröhrchen mit in Einfriermedium aufgenommenen Zellen (1 x 10<sup>6</sup>) befüllt und diese langsam in isopropanolhaltigen Einfrierbehältern bei -80 °C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -150 °C.

Wachstumsmedium: Glukosehaltiges (4,5 g/l) DMEM; 10% (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin; 1% (v/v) Antibiotikum-Antimykotikum

Medium für Serum-entzug: Glukosehaltiges (4,5 g/l) DMEM; 0,5% (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin; 1% (v/v) Antibiotikum-Antimykotikum

Einfriermedium: 90% (v/v) FCS; 10% (v/v) DMSO

PBS (1x): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4

### 2.2.3.2. Transfektion von DNA in Säugerzellen

Für die Einbringung von Plasmid-DNA in NIH 3T3-Zellen wurde das *X-tremeGENE 9 DNA* Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim) verwendet. Die Transfektion der DNA erfolgte entsprechend der Herstellerangaben 24 h nach Einsäen der Zellen. Das Transfektionsreagenz wurde mit der DNA in einem Verhältnis von 3:1 in 1x Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde den Experimentvorlagen entsprechend zu Wachstums- oder unstimulierten Bedingungen gewechselt. Nach Zugabe der DNA-Transfektionsreagenz-Komplexe erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37 °C für 16-24 h.

## 2.2.4. Proteinreinigung

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Arbeiten, Zentrifugations- und Inkubationsschritte auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt, um einen Proteinabbau zu vermeiden. Die Zugabe von DTT und den Proteaseinhibitoren erfolgte erst direkt vor Verwendung der Reinigungspuffer. Die Proteinreinigungen wurden in Anlehnung an die Dissertation von G. Posern (1999) sowie den Herstellerangaben für pGEX-basierte Fusionsproteine durchgeführt.

### 2.2.4.1. Reinigung von GST und GST-V/VCA-Fusionsproteinen

Die Zellpellets (2.2.1.2) wurden zunächst auf Eis aufgetaut und in je 25 ml WH2-Lysepuffer resuspendiert. Nach Sonifikation der Zellen (10 min, 85% Amplitude, Zyklus 1) erfolgte die Solubilisierung der Proteine durch Zugabe von 1% (v/v) Triton X-100 für 30 min bei Raumtemperatur. Unlösliche Zellbestandteile wurden mittels Zentrifugation (10800 x g, 30 min) abgetrennt und verworfen. Der lösliche Überstand wurde im Anschluss mit in 1x PBS äquilibrierten Glutathion Sepharose 4B *beads* (1 ml, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) für 2 h rollend inkubiert und das Gemisch auf Gravitationssäulen (Poly-Prep *Chromatography Columns*, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) aufgetragen. Durch Waschen der Matrix mit 10 ml 1x PBS (mit 1% (v/v) Triton X-100) sowie 20 ml GTB Puffer erfolgte die Abtrennung unspezifisch gebundener Proteine. Die GST-Fusionsproteine wurden in einem Gesamtvolumen von 1,75 ml Elutionspuffer I stufenweise eluiert. Um das im Elutionspuffer I enthaltene Glutathion zu entfernen, wurde das Eluat dreimal für je mindestens 6 Stunden gegen den Lagerungspuffer dialysiert. Abweichend dazu erfolgte die stufenweise Elution und Dialyse von GST-Cobl-V(B) und GST-Spire2-V(B) nach Qualmann *et al.* (1999) in Elutionspuffer II und 1x PBS. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.2.5.1) wurde die Proteinlösung mit 8% (v/v) Glycerol versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

WH2-Lysepuffer: 1 mM DTT; Proteaseinhibitoren in 1x PBS

GTB Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM EDTA; 0,1% (v/v) Tween20

Elutionspuffer I: 150 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% (v/v) Tween20; 98 mM Glutathion

Elutionspuffer II: 50 mM Tris pH 8; 20 mM Glutathion; 120 mM NaCl

Lagerungspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM DTT

PBS (1x): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4

### 2.2.4.2. Reinigung der GST-3C Protease und (GST-)MRTF-A(2-261)

Die Resuspension der Zellpellets (2.2.1.2) erfolgte in 15 ml TPE Puffer. Für die Reinigung der GST-3C Protease wurde TPE Puffer verwendet, welcher keine Proteaseinhibitoren und

Glycerol enthielt. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (8 min, 85% Amplitude, Zyklus 1) aufgeschlossen und die unlösliche Fraktion durch Zentrifugation bei 38800 x g für 30 min sedimentiert. Die Kopplung der GST-Proteine an die in 1x PBS äquilibrierten Glutathion Sepharose 4B *beads* (1 ml, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) erfolgte für 2 h bei 4 °C. Nach Auftragen der Proteinlösung auf die Gravitationssäulen (Poly-Prep *Chromatography Columns*, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurden Fremdproteine durch mehrfaches Waschen in TPE- (1x) und GTB Puffer (3x) entfernt. Die GST-3C Protease wurde in 1 ml Elutionspuffer I stufenweise eluiert und mehrfach gegen den Lagerungspuffer (3x, je 6 h) dialysiert. Die Abspaltung des GST zur Generierung von MRTF-A(2-261) erfolgte nach Äquilibration der Matrix in 3C-Puffer durch Zugabe von 14 µg GST-3C Protease. Das Proteingemisch wurde über Nacht in 1 ml 3C-Puffer rollend inkubiert. Der Durchfluss wurde gesammelt, die Proteinkonzentration nach Bradford (2.2.5.1) bestimmt und die Proteinlösung in 8% (v/v) Glycerol bei -80 °C gelagert.

TPE Puffer:	1% (v/v) Triton X-100; 100 mM EDTA; 5% (v/v) Glycerol; 1 mM DTT; Proteaseinhibitoren in 1x PBS
GTB Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM EDTA; 0,1% (v/v) Tween20
3C-Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM β-Mercaptoethanol
Elutionspuffer I:	150 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% (v/v) Tween20; 98 mM Glutathion
Lagerungspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM DTT
PBS (1x):	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4

## 2.2.5. Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der gereinigten Fusionsproteine (2.2.4) wurde nach der Bradford-Methode bestimmt. Diese Methode basiert auf der spezifischen Absorptionsänderung des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G-250, welcher nach Bindung an Proteine ein Maximum bei 595 nm aufweist (Bradford, 1976). Die enthaltene Proteinmenge in der Lösung wurde durch photometrische Messung der Absorptionzunahme bei 595 nm bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem NanoDrop 2000c Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) mit 800 µl 1x Bradford (in H<sub>2</sub>O verdünnt) und 200 µl Proteinlösung bzw. dem korrespondierenden Puffer. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Standardkurve berechnet.

Bradford-Lösung (4x):	0,05% (w/v) Coomassie Brillantblau G250; 42,5% (v/v) Phosphorsäure; 23% (v/v) Ethanol
-----------------------	---



### 2.2.5.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proteinproben wurden in 3x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Für die Elektrophorese wurden 10-14% Trenngelle hergestellt und diese mit einem 5% Sammelgel überschichtet. Nach Auftrag der Proteinproben erfolgte deren Auftrennung mit einer Spannung von 100-150 V. Als Größenstandard wurde der *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet. Der Nachweis von Proteinen erfolgte anschließend durch die Coomassie-Färbemethode (2.2.5.3) oder durch Immundetektion mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens (2.2.5.4).

Laemmli-Probenpuffer (3x):	0,05% (w/v) Bromphenolblau; 10 mM EDTA pH 8; 3% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerol; 2% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
Trenngel (10-14%):	10-14% Acrylamid/Bis-Lösung; 377 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED
Sammelgel (5%):	5% Acrylamid/Bis-Lösung; 127 mM Tris/HCl pH 6,8; 4,5% (v/v) Glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED
Laufpuffer (1x):	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS

### 2.2.5.3. Coomassie-Färbung

Die Anfärbung von Proteinen in SDS-PA-Gelen erfolgte in Anlehnung an Weber und Osborn (1969) sowie Sambrook *et al.* (1989) mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G-250. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Gele wurden zunächst für 4-5 h in Coomassie-Färbelösung unter stetigem Schwenken gefärbt und nachfolgend über Nacht in Entfärbelösung inkubiert. Bis zur Aufnahme der Gele erfolgte die Lagerung in ddH<sub>2</sub>O.

Coomassie-Lösung:	0,25% (w/v) Coomassie Brilliantblau G250; 45% (v/v) Methanol; 45% (v/v) H <sub>2</sub> O; 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	45% (v/v) Methanol; 45% (v/v) H <sub>2</sub> O; 10% (v/v) Essigsäure

### 2.2.5.4. Western Blot und Immundetektion

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (2.2.5.2) wurden unter Verwendung des Nassblot-Verfahrens nach Harlow und Lane (1988) auf PVDF-Membranen übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert und zusammen mit den Trenngelen in 1x Transferpuffer äquilibriert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 1-1,5 h. Nach einmaligem Waschen in 1x TBS-T (5 min) wurden unspezifische Proteinbindungsstellen durch Inkubation der Blotmembran in Blockierungslösung (1 h, Raumtemperatur) abgesättigt. Die

primären Antikörper (Tab. 11) wurden in Blockierungslösung verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4 °C unter konstanter Rotation inkubiert. Überschüssiger primärer Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in 1x TBS-T (je 6 min) entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Blotmembran mit den in Blockierungslösung verdünnten fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern (Tab. 12) im Dunkeln für 1 h bei Raumtemperatur. Für die Detektion von biotinyliertem Aktin (2.2.5.6.2) wurde abweichend dazu eine 3% (w/v) BSA-Lösung (in 1x TBS-T) als Blockierungsreagenz eingesetzt. Die Blotmembranen wurden nachfolgend mit Alexa Fluor 680-konjugiertem Streptavidin (1:5000 in 1% (w/v) BSA in 1x TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden 3x mit 1x TBS-T (je 10 min) gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion und Quantifizierung der Fluoreszenzsignale mit Hilfe eines *Odyssey CLx Infrarot Imaging Systems* (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg) und der dazugehörigen *Image Studio Software*.

Transferpuffer (1x): 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,05% (w/v) SDS

TBS-T (1x): 20 mM Tris/HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween20

Blockierungslösung: 5% (w/v) Milchpulver in 1x TBS-T

#### 2.2.5.5. Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP)

NIH 3T3-Zellen wurden mit 2,5-5 µg der Flag-Aktinexpressionsplasmide (Wildtyp oder Aktin-R62D) sowie 2,5 µg pEF-MRTF-A-f.l.-HA in einer Gesamtmenge von 5 µg cDNA wie in 2.2.3.2 beschrieben transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C erfolgte ein Wechsel zu unstimulierten Bedingungen für weitere 24 h. Die Zellen wurden in 1 ml *Magnetic beads*-Lysepuffer auf Eis lysiert und nach Abschaben bei 20800 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Pro Ansatz wurden 500 µl des angegebenen Lysates mit 4,8 µg gereinigtem GST bzw. GST-V/VCA-Fusionsprotein sowie 500 µl *Magnetic beads*-Lysepuffer versetzt. Abweichend dazu wurden GST-JMY-V/VVVCA-Fusionsproteine sowie die zugehörige GST-Kontrolle in *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta-Zellen exprimiert (2.2.1.2), die Zellpellets in 15 ml *Magnetic beads*-Lysepuffer auf Eis lysiert und mittels Ultraschall (3 min, 85% Amplitude, Zyklus 0,5) aufgeschlossen. Die Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile erfolgte durch Zentrifugation bei 10800 x g und 4 °C für 30 min. Die Menge an löslichen GST-Proteinen wurde mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens (2.2.5.4) näherungsweise bestimmt. Pro Ansatz wurden 6 µg intaktes GST-Fusionsprotein mit 500 µl Aktin-MRTF-A-Lysat aus NIH 3T3-Zellen vermischt und die Reaktion mit löslichem Extrakt untransformierter *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta-Zellen auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Ein Aliquot des Ausgangsmaterials wurde entnommen und für die spätere Analyse mittels SDS-PAGE (2.2.5.2) aufbereitet. Die Inkubation der Ansätze mit den in 1x TBS aufbereiteten ANTI-FLAG M2

*Magnetic beads* (25 µl *slurry* pro Ansatz, Sigma-Aldrich, Steinheim) erfolgte auf einem Rotationsrad für 2 h bei 4 °C. Nach viermaligem Waschen der *Magnetic beads* mit 1x TBS (je 1 ml, 4 °C) wurden spezifisch gebundene Proteine in 25 µl 3x Laemmli-Probenpuffer eluiert.

*Magnetic beads*-Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% (v/v) Triton X-100; Proteaseinhibitoren  
 TBS (1x): 20 mM Tris/HCl pH 7,6; 150 mM NaCl  
 Laemmli-Probenpuffer (3x): 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 10 mM EDTA pH 8; 3% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerol; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol

### 2.2.5.6. GST pulldown

Der GST *pulldown* von endogenem und biotinyliertem Aktin mit GST-V/VCA-Fusionsproteinen wurde in Anlehnung an Posern *et al.* (2004) durchgeführt. Alle Arbeits-, Zentrifugations- und Inkubationsschritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4 °C. DTT, ATP und die Proteaseinhibitoren wurden unmittelbar vor Verwendung der Puffer frisch hinzugefügt. Gereinigtes MRTF-A(2-261) (2.2.4.2) wurde bereits am Vortag auf Glutathion Sepharose 4B *beads* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) gegeben, um verbliebenes GST-MRTF-A(2-261) abzutrennen. Die Zentrifugation der Glutathion Sepharose 4B *beads* erfolgte bei 500 x g für 3 min.

#### 2.2.5.6.1. GST pulldown von endogenem Aktin

Pro Ansatz wurden 50 µl Glutathion Sepharose 4B *beads slurry* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) in je 1 ml 1x PBS gewaschen (3x) und in Immobilisierungspuffer (1 ml) äquilibriert. Die Immobilisierung von 4,2 µg der GST-V/VCA-Fusionsproteine erfolgte in 500 µl Immobilisierungspuffer für mindestens 2 h bei konstanter Rotation. Zur Extraktion von endogenem Aktin wurden NIH 3T3-Zellen (10 cm-Schalen) zweimal mit 1x PBS gewaschen, in je 500 µl GST *pulldown*-Puffer lysiert und nach Abschaben bei 400000 x g zentrifugiert. Je 200 µl des G-Aktin enthaltenden Überstandes wurden mit gereinigtem MRTF-A(2-261) für 1 h in GST *pulldown*-Puffer rotierend vorinkubiert. Nach zweimaligem Waschen und Äquilibrierung der GST-V/VCA-gekoppelten Glutathion Sepharose 4B *beads* mit Immobilisierungs- und GST *pulldown*-Puffer (je 1 ml) erfolgte die Zugabe des G-Aktin-MRTF-A(2-261)-Gemisches für 1 h unter konstanter Rotation. Für die Analyse wurde MRTF-A(2-261) in einem molaren Mengenverhältnis von 0,2:1 MRTF-A(2-261):GST-V/VCA bzw. 0,4:1 für GST-N-WASP-Konstrukte sowie 1:1 eingesetzt. Die Glutathion Sepharose 4B *beads* wurden 4x in *Pulldown* Puffer (je 1 ml) gewaschen und in 30 µl 3x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen.

PBS (1x):	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Immobilisierungspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,5% (w/v) BSA; 0,5 mM DTT Proteaseinhibitoren
GST <i>pulldown</i> -Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8; 50 mM NaCl; 0,2 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM DTT; Proteaseinhibitoren
Laemmli-Probenpuffer (3x):	0,05% (w/v) Bromphenolblau; 10 mM EDTA pH 8; 3% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerol; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol

#### 2.2.5.6.2. GST pulldown von biotinyliertem Skelettmuskelaktin

Biotinyliertes Skelettmuskelaktin (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA) wurde nach Herstellerangaben in 2 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und in *General actin buffer* (Cytoskeleton) verdünnt. Die Abtrennung unlöslicher Proteinaggregate erfolgte durch Zentrifugation bei 20800 x g für 5 min. Die Glutathion Sepharose 4B *beads* (50 µl *slurry*, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) wurden dreimal in 1x PBS (je 1 ml) gewaschen und in Biotin *pulldown*-Puffer (1 ml) äquilibriert. Nach Zugabe von 0,5 µg biotinyliertem Aktin, 1 µg intaktem GST-Protein (GST, -Spire2-V(B), -WAVE2-V) sowie 0-10 µg gereinigtem MRTF-A(2-261) erfolgte die Inkubation des Gemisches in 500 µl Biotin *pulldown*-Puffer für 2 h unter konstanter Rotation. Anschließend wurde eine Probe der ungebundenen Proteine (Durchfluss) entnommen, dreimal mit Biotin *pulldown*-Puffer (je 1 ml) gewaschen und gebundene Proteine durch Zugabe von 30 µl 3x Laemmli-Probenpuffer eluiert.

<i>General actin buffer</i> :	5 mM Tris/HCl pH 8; 0,2 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM ATP; 0,5 mM DTT
PBS (1x):	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Biotin <i>pulldown</i> -Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8; 0,2 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM DTT; 100 mM NaCl; 5% (v/v) Glycerol; 0,5% (v/v) Triton X-100; 0,2 mM ATP; 0,1% (w/v) BSA; Proteaseinhibitoren
Laemmli-Probenpuffer (3x):	0,05% (w/v) Bromphenolblau; 10 mM EDTA pH 8; 3% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerol; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol

## 2.2.6. Immunfluoreszenzfärbung

7 x 10<sup>4</sup> Zellen wurden in 12well-Platten auf unbeschichteten Deckgläschen ausgesät und wie in 2.2.3.2 beschrieben mit den GFP-V/VCA-Fusionsproteinen unter Serumentzug transfiziert. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurde in Anlehnung an Harlow und Lane (1988) durchgeführt. Die Stimulation von GFP-Kontrollzellen erfolgte mit 15% (v/v) FCS für 1 h (Serum-

stimulation). Die Zellen wurden in 3,7%iger Formaldehydlösung für 15 min fixiert und in Permeabilisierungslösung für 10 min extrahiert. Nach 30 minütiger Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit FCS- und BSA-haltiger Blockierungslösung erfolgte die Inkubation der Zellen mit den in Blockierungslösung verdünnten primären anti-MRTF-Antikörpern (Tab. 11) bei Raumtemperatur für 1 h. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS wurden die Zellen mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (Tab. 12) für 1-2 h in Blockierungslösung inkubiert. Die Anfärbung von F-Aktin erfolgte mit Alexa Fluor 546-konjugiertem Phalloidin (1:100 (v/v), in Blockierungslösung) für 1 h bei Raumtemperatur. Für die Färbung der DNA wurde zusätzlich DAPI in einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml eingesetzt. Die Zellen wurden erneut drei Mal mit 1x PBS gewaschen und Salze durch Extraktion in ddH<sub>2</sub>O entfernt. Nach kurzzeitiger Inkubation in 96%igem Ethanol erfolgte die Fixierung der Deckgläschen auf den Objektträgern mit Hilfe des *ProLong Gold antifade*-Reagenzes (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) und Nagellack.

Formaldehydlösung:	3,7% (w/v) PFA in 1x PBS
Permeabilisierungslösung:	0,2% (v/v) Triton X-100 in 1x PBS
Blockierungslösung:	10% (v/v) FCS; 1% (w/v) BSA; 0,05% (v/v) Triton X-100 in 1x PBS
PBS (1x):	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4

### 2.2.7. Luziferase-Reportergenassay

Die Bestimmung der MRTF-SRF-Aktivität wurde mit Hilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assay Systems* (Promega GmbH, Mannheim) durchgeführt. Das pGL3-basierte SRF-Reporterplasmid (p3D.A.-Luc) wies dabei eine spezifische Expression der *Firefly* Luziferase in Abhängigkeit des Rho-Aktin-MRTF-SRF-Signalweges auf (Geneste *et al.*, 2002; Posern *et al.*, 2002). Als interne Kontrolle wurde das SRF-unabhängige *Renilla*-Luziferaseplasmid pRL-TK verwendet. Die Besonderheit des Systems ist die voneinander unabhängige, aufeinanderfolgende Messung der Luminiszenz beider Luziferasen im selben Proteinlysate (Hawkins *et al.*, 2003). Für die Messung der Luziferase-Aktivität wurden NIH 3T3-Zellen wie in 2.2.3.2 beschrieben mit 250 ng der GFP-Fusionsplasmide, 50 ng p3D.A.-Luc, 5 ng pRL-TK sowie 195 ng Leervektor (pEF plink) unter Serumentzug transfiziert. Vor der Zellernte erfolgte die Behandlung mit 0,5-1 µM Latrunculin B (LatB, Endkonzentration, 7,5 h, Merck KGaA, Darmstadt) sowie die Stimulation von GFP-Kontrollzellen mit 15% (v/v) FCS (Serumstimulation, 7 h). Die Zellen wurden in 200 µl 1x *Passive Lysis buffer* für 5 min auf Eis lysiert und nach Abschaben bei 20800 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. 20 µl des Überstandes

wurden in lichtundurchlässigen 96well-Mikrotiterplatten mit Hilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assay System Kits* mit jeweils 50 µl LAR II-Puffer und substrathaltiger-Stop&Glo-Lösung in einem GloMax 96 Mikroplatten Luminometer (Promega GmbH, Mannheim) gemessen. Für die Auswertung erfolgte die Normalisierung der gemessenen *Firefly* Luziferase Luminiszenz auf die *Renilla* Luziferase Aktivität. 30 µl des Proteinlysats wurden mittels SDS-PAGE (2.2.5.2) und anschließender Western Blot-Analyse (2.2.5.4) auf Expression der GFP-Fusionsproteine überprüft.

### 2.2.8. G-Aktin/F-Aktin-Fraktionierung

Die Fraktionierung von zellulärem G-Aktin und F-Aktin erfolgte nach Posern *et al.* (2002). Transfizierte NIH 3T3-Zellen wurden zunächst 24 h unter unstimulierten Bedingungen inkubiert und nachfolgend mit 30% (v/v) FCS sowie LatB (Merck KGaA, Darmstadt) in einer Endkonzentration von 1 µM für 1,5 h behandelt. Die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und für 10 min in Aktin-Lysepuffer auf Eis inkubiert. Die Trennung von löslichem G-Aktin und unlöslichem F-Aktin erfolgte mittels Ultrazentrifugation bei 100000 x g und 4 °C für 1,5 h. Der G-Aktin-enthaltende Überstand wurde in Eppendorfgefäße überführt und mit 3x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die F-Aktin-Fraktion wurde in Aktin-Lysepuffer aufgenommen und nach Zugabe von 3x Laemmli-Probenpuffer durch Sonifikation (2 min, 60% Amplitude, Zyklus 1) aufgeschlossen. Für die nachfolgende Analyse mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (2.2.5.2) wurden die Proben bei 95 °C für 5 min denaturiert und gleiche Volumina der Fraktionen (30 µl) auf 12% SDS-PA-Gele aufgetragen.

PBS (1x):	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Aktin-Lysepuffer:	20 mM HEPES pH 7,7; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5% (v/v) Triton X-100; Proteaseinhibitoren
Laemmli-Probenpuffer (3x):	0,05% (w/v) Bromphenolblau; 10 mM EDTA pH 8; 3% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerol; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol

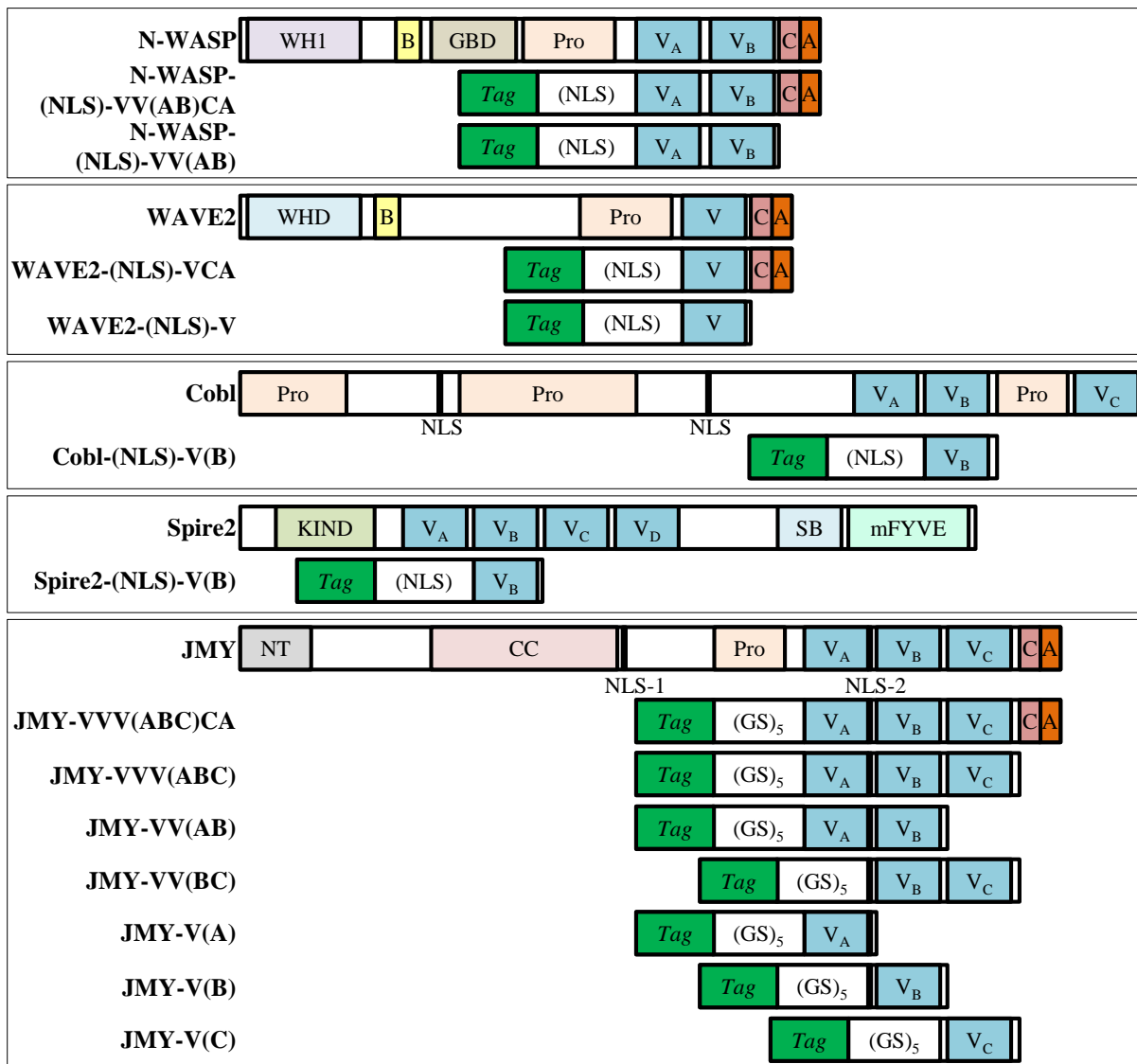
### 2.2.9. Statistik

Für die Auswertung der Daten wurden Mittelwerte sowie deren zugehörige Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) aus mindestens 3 voneinander unabhängigen, biologischen Replikaten berechnet. Die Ermittlung der statistischen Signifikanz zwischen den Datensätzen erfolgte mit Hilfe des Ein- oder ungepaarten Zweistichproben t-Tests. Als Signifikanzgrenzen wurden dabei \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$  festgesetzt.

### 3. Ergebnisse

Der detaillierte Mechanismus der Dissoziation inhibitorischer G-Aktin:MRTF-Komplexe konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Frühere Studien zeigten, dass die Aktivierung des MRTF-SRF-Signalweges mit Veränderungen der zellulären Zytoskelettdynamik korreliert (Sotiropoulos *et al.*, 1999; Miralles *et al.*, 2003). Regulatoren des Aktinzytoskeletts besitzen häufig WASP-Homologie 2/Verprolin-Homologie (WH2/V)-Domänen. Da sowohl WH2-Proteine als auch MRTF-A über dieselbe hydrophobe Oberfläche der Subdomänen 1 und 3 mit Aktin interagieren (Mouilleron *et al.*, 2008), ist eine simultane Bindung beider Faktoren unwahrscheinlich. Somit wäre eine Konkurrenz beider Faktoren um die Bindung an Aktin möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Rolle isolierter WH2-Domänen während der G-Aktin:MRTF-Komplexdissoziation und der anschließenden MRTF-SRF-Aktivierung untersucht. Die verwendeten Proteindomänen wurden aus den Aktinbindeproteinen N-WASP, WAVE2, Cobl, Spire2 und JMY isoliert und sind in Abbildung 6 dargestellt.

Die Expression der Proteinfragmente erfolgte als eGFP- (Bezeichnung: GFP-) oder AcGFP1- (GFP aus *Aequorea coerulea*, Bezeichnung: AcGFP-) Fusionen in NIH 3T3-Säugerzellen sowie als GST-Fusionen in Bakterienzellen. Für N-WASP, WAVE2 und JMY wurde sowohl die Funktion isolierter WH2-Domänen (Bezeichnung: WH2/V) als auch deren Einfluss in Anwesenheit der *central/connecting and acidic region* (CA-Region), welche für die Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex notwendig ist, untersucht (Bezeichnung: VCA). Zudem wurden in dieser Arbeit nukleär-lokalisierte WH2-Varianten (Bezeichnung: NLS-V/VCA) der Aktinbindeproteine N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 generiert. Die Analyse der WH2-Gesamtlängenproteine war Bestandteil der Dissertation von Julia Weißbach und wurde zusammen mit den Daten dieser Arbeit partiell in Weissbach & Schikora *et al.* (2016) veröffentlicht.



**Abbildung 6: Schematische Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten V/VCA-Domänen.**

Dargestellt sind die für die Generierung verwendeten Gesamtlängenproteine sowie die isolierten V/VCA-Varianten (modifiziert nach Stradal *et al.* (2004), Qualmann und Kessels (2009), Zuchero *et al.* (2012) und Weissbach & Schikora *et al.* (2016)). *WH1*, WASP-Homologie 1 Domäne; *B*, basische Region; *GBD*, GTPase Bindedomäne; *Pro*, Prolin-reiche Domäne; *V*, Verprolin-Homologie Domäne; *C*, *central/connecting region*; *A*, *acidic region*; *Tag*, Proteinanker (eGFP, GST, AcGFP1); *NLS*, nukleäres Lokalisationssignal; *WHD*, WAVE-Homologie Domäne; *KIND*, *kinase non-catalytic C-lobe domain*; *SB*, Spire-Box; *mFYVE*, modifizierte FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1) Zinkfingerdomäne; *NT*, N-Terminal; *CC*, *Coiled-Coil*; *(GS)<sub>5</sub>*, Glycin-Serin-Linker (5x).

### 3.1. Untersuchungen zur Wirkung von WH2-Domänen auf die MRTF-SRF-vermittelte Genexpression

#### 3.1.1. MRTF-SRF-Aktivierung durch isolierte V/VCA-Domänen aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2

Bereits in verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Überexpression von WH2-Proteinen wie Thymosin  $\beta$ 4 (Morita & Hayashi, 2013; Hinkel *et al.*, 2014) sowie WASP oder N-WASP (Sotiropoulos *et al.*, 1999) zu einer Aktivierung von SRF führt. Um den Einfluss isolierter

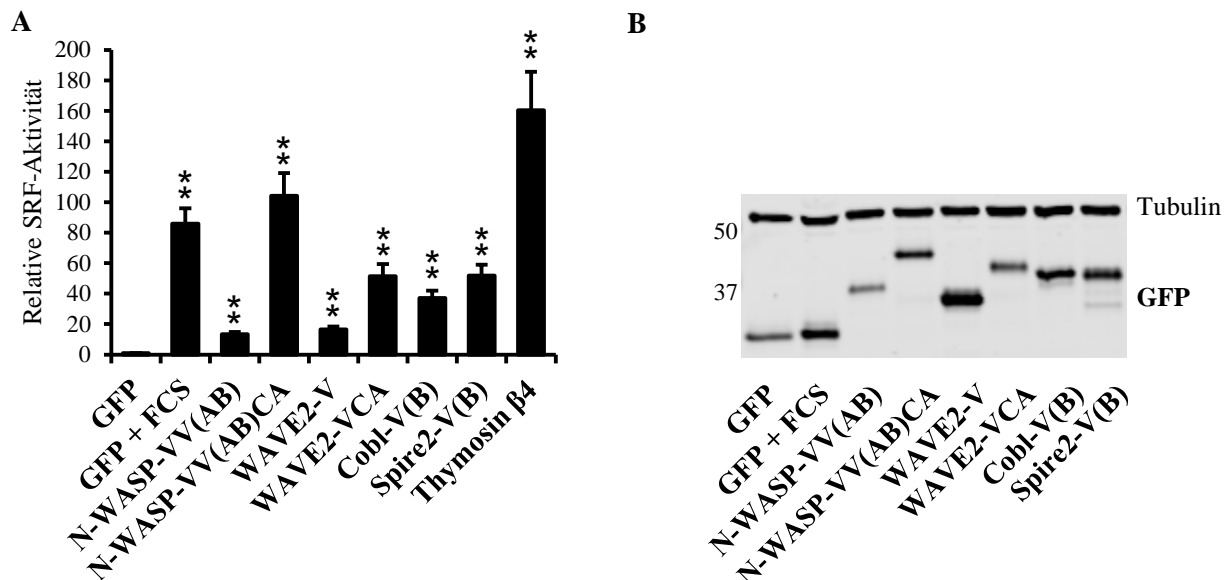


WH2-Domänen auf die MRTF-SRF-Aktivität zu untersuchen, wurden Luziferase-Reporter-genassays durchgeführt. Dabei wurde ein SRF-Reporterplasmid (p3D.A.-Luc) verwendet, das drei aus dem c-fos Promoter hergeleitete SRF-Bindestellen besitzt und eine spezifische Rho-Aktin-SRF-abhängige Expression der *Firefly* Luziferase aufweist (Geneste *et al.*, 2002; Posern *et al.*, 2002). Zur Normalisierung wurde ein SRF-unabhängiges *Renilla* Luziferase-Plasmid (pRL-TK) eingesetzt, dessen Luziferaseexpression durch einen Thymidinkinasepromoter kontrolliert wird.

Die GFP-V/VCA-Fusionsproteine sowie die GFP-Negativkontrolle (Transfektion des GFP-Leervektors, Bezeichnung: GFP) wurden zunächst in NIH 3T3-Zellen unter unstimulierten Bedingungen (Serumentzug) exprimiert. Das zugehörige Zellkulturmedium enthält dabei nur 0,5% (v/v) FCS anstelle von 10% (v/v) FCS des Wachstumsmediums. Anschließend wurde die SRF-Aktivität mittels Luziferase-Reporter-genassays bestimmt (Abb. 7A). Als Positivkontrolle konnte nach Serumstimulation von GFP-Kontrollzellen (GFP + FCS, 15% (v/v) FCS) eine etwa 90x Induktion des SRF-Reporters nachgewiesen werden (Abb. 7A). In Übereinstimmung mit kürzlich publizierten Studien sowie unveröffentlichten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde auch für das als weitere Positivkontrolle verwendete WH2-Protein Thymosin  $\beta$ 4 eine deutliche Aktivierung des SRF-Reporters detektiert (Abb. 7A; G. Posern, persönliche Mitteilung; Morita & Hayashi, 2013; Hinkel *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurde nach Expression isolierter WH2-Domänen ein signifikanter Anstieg der SRF-Aktivität im Vergleich zur GFP-Kontrolle beobachtet (Abb. 7A). Dabei konnte in Abhängigkeit der verwendeten WH2-Fusionsproteine eine unterschiedliche Induzierbarkeit des SRF-Reporters nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 7A gezeigt, wurde für N-WASP-VV(AB) und WAVE2-V eine bis zu 16x Reporteraktivierung detektiert, wohingegen die Anwesenheit der CA-Region zu einem deutlichen Anstieg der SRF-Aktivität auf 100x für N-WASP-VV(AB)CA sowie auf 50x für WAVE2-VCA führte. Im Vergleich zu den beobachteten Effekten der WH2-Domänen von N-WASP und WAVE2 wurde nach Überexpression der zweiten WH2-Domäne von Cobl (Cobl-V(B)) sowie Spire2 (Spire2-V(B)) eine starke Aktivierung des SRF-Reporters nachgewiesen (Abb. 7A).

Die Expression und korrekte Größe der GFP-V/VCA-Fusionsproteine wurde außerdem durch Analyse der Proteinlysate mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens überprüft (Abb. 7B). Durch Normierung der SRF-Aktivität auf die relative Proteinexpression konnte gezeigt werden, dass die verwendeten V/VCA-Proteine den SRF-Reporter in unterschiedlichem Maße induzieren (Daten nicht gezeigt). Die beobachteten Effekte der V/VCA-Proteine wurden daher vermutlich nicht durch deren unterschiedliches Expressionsmuster verursacht. Mit Hilfe eines

Sequenzvergleiches wurde zudem nachgewiesen, dass die Aminosäuresequenz zwischen den verwendeten WH2-Domänen in nur geringem Maße konserviert ist (Anhang 1). Daher ist anzunehmen, dass die beobachtete MRTF-SRF-Aktivierung vermutlich durch die Identität und den daraus resultierenden unterschiedlichen Affinitäten der verschiedenen WH2-Domänen bedingt wurde.



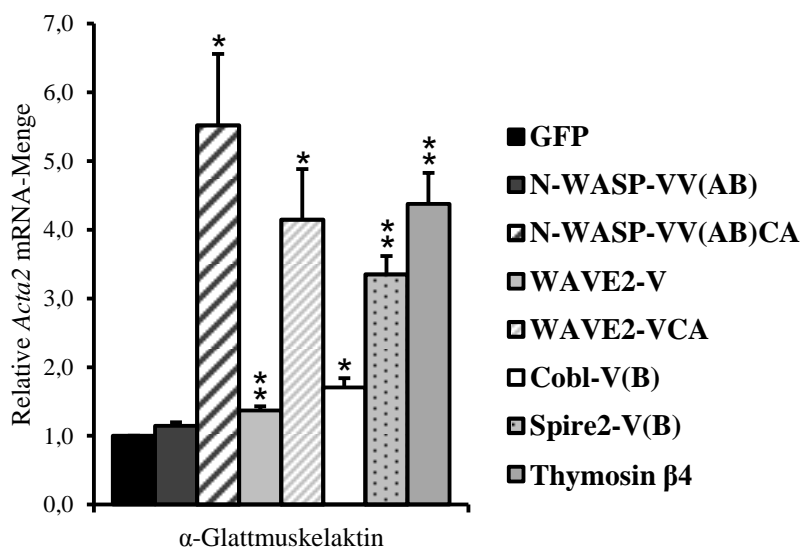
**Abbildung 7: Aktivierung eines MRTF-abhängigen SRF-Reporters durch isolierte GFP-V/VCA-Fusionsproteine aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2.**

A: Die dargestellten GFP-WH2-Varianten und Thymosin  $\beta$ 4 wurden zusammen mit dem *Firefly* Luziferase-Reporterplasmid (p3D.A.-Luc) sowie dem *Renilla* Luziferase-Kontrollplasmid (pRL-TK) in NIH 3T3-Zellen unter Serumentzug transfiziert. Nach Serumstimulation der GFP-Kontrolle (GFP + FCS) erfolgte die Messung der Luziferase-Luminiszenzen. Die relative SRF-Aktivität wurde durch Normalisierung der *Firefly*- auf die *Renilla* Luziferase Aktivität bestimmt. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM (n = 5) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die GFP-Kontrolle (GFP = 1) mit \*\* p  $\leq$  0,01. B: Die Lysate aus (A) wurden mittels Western Blot-Verfahren auf die Expression der GFP-Proteine überprüft. Die Detektion erfolgte mit einem anti-GFP-Antikörper sowie Tubulin als Ladekontrolle. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Um die Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Genexpression durch WH2-Domänen zu überprüfen, wurde die endogene mRNA-Menge des MRTF-SRF-Zielgens  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (*Acta2*) mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) bestimmt. Wie in Abbildung 8 gezeigt, hatte die Expression von N-WASP-VV(AB) nahezu keinen Einfluss auf die *Acta2*-Transkription, wohingegen Spire2-V(B) mit einer über 3x Erhöhung der *Acta2* mRNA den stärksten Effekt aufwies. Die Expression der VCA-Domänen von N-WASP und WAVE2 führte im Vergleich zu den zugehörigen isolierten GFP-V-Fusionsproteinen zu einer deutlichen Steigerung der *Acta2* mRNA-Menge. Dabei konnte für WAVE2-VCA eine 4x und für N-WASP-VV(AB)CA eine 5,5x Induktion der *Acta2*-Transkription in Bezug auf die GFP-Kontrolle beobachtet werden (Abb. 8). Eine ähnliche *Acta2* mRNA-Expression wurde auch für die Positivkontrolle Thymosin  $\beta$ 4 detektiert.

Die im Vergleich zu den Ergebnissen des Luziferase-Reporterassays (Abb. 7A) deutlich niedrigere MRTF-SRF-Aktivierung könnte durch die geringe Effizienz der transienten Transfektionsmethode begründet werden. Durch Ko-Transfektion des SRF-Reporters und der V/VCA-Fusionen könnten bereits schwache Induktionen detektiert werden, die auf endogener Ebene durch die gleichzeitige Messung untransfizierter Zellen unterhalb der Detektionsgrenze liegen und somit nicht erfasst werden würden.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe von Luziferase-Reporterassays und qPCR-Experimenten für alle WH2-Fusionsproteine eine Induktion der MRTF-SRF-abhängigen Genexpression nachgewiesen werden. Die Daten implizieren zudem, dass isolierte WH2-Domänen die Aktivierung von MRTF-SRF unabhängig von der zellulären Aktindynamik stimulieren können, da sie selbst keine nukleierende Funktion besitzen.



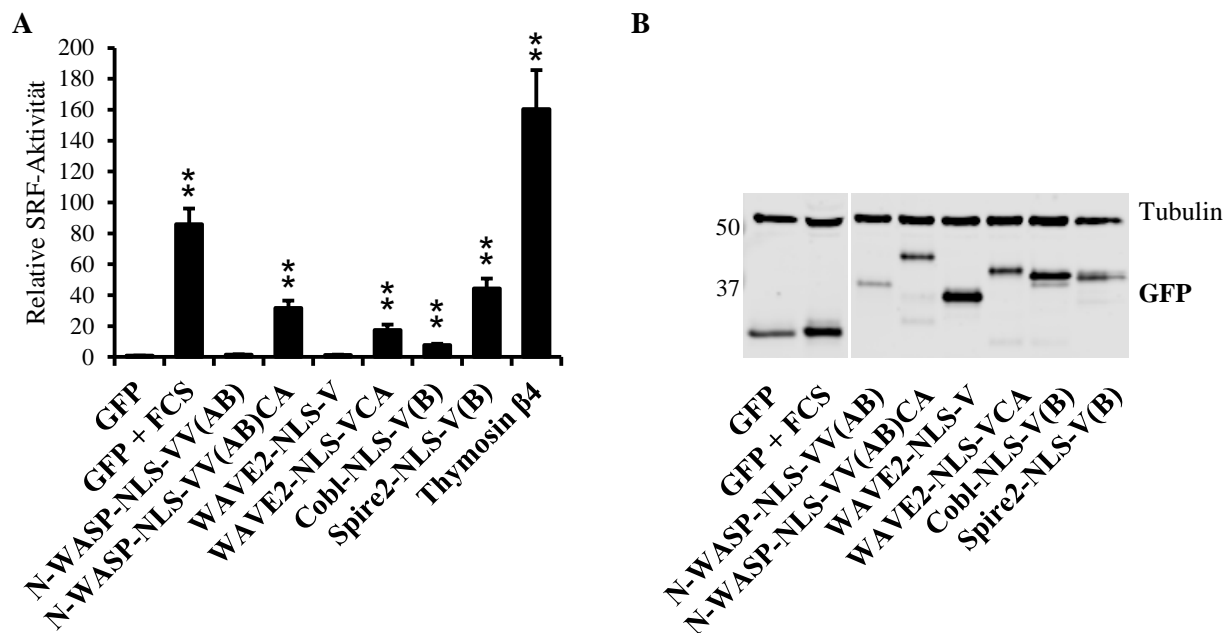
**Abbildung 8: Induktion der MRTF-SRF-abhängigen Transkription von  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (*Acta2*) durch V/VCA-Domänen.**

Die relative  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (*Acta2*)-Expression wurde nach RNA-Isolation aus GFP-V/VCA- und Thymosin  $\beta$ 4-transfizierten NIH 3T3-Zellen mittels qPCR bestimmt. Die Daten wurden auf die Referenzgene *ALAS1* und *HPRT* normalisiert. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM ( $n = 4$ ) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die GFP-Kontrolle (GFP = 1) mit \*  $p \leq 0,05$  und \*\*  $p \leq 0,01$ .

### 3.1.2. Analyse von nukleär-lokalisierten V/VCA-Domänen aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 auf die MRTF-SRF-Aktivität

Die Bildung inhibitorischer G-Aktin:MRTF-Komplexe kann im Zytoplasma und im Nukleus nachgewiesen werden (Vartiainen *et al.*, 2007). Daher wurde eine mögliche Induktion der MRTF-SRF-vermittelten Genexpression nach Kernlokalisierung der bereits beschriebenen WH2-Domänen aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 durch Luziferase-Reporter-

assays untersucht (Abb. 6 und Abb. 9A). Die Proteinexpression der GFP-NLS-V/VCA-Fusionsproteine wurde mittels Western Blot-Analyse kontrolliert (Abb. 9B).



**Abbildung 9: Aktivierung eines MRTF-SRF-Reporters nach Expression nukleär-lokalisierter WH2-Varianten.**

A: NIH 3T3-Zellen wurden mit den GFP-NLS-V/VCA-Fusionsproteinen, dem SRF-Reporterplasmid p3D.A.-Luc und dem *Renilla* Luziferase-Kontrollplasmid (pRL-TK) ko-transfiziert. Die Stimulation von GFP-Kontrollzellen (GFP + FCS) erfolgte mit 15% (v/v) FCS für 7 h. Die gemessene *Firefly* Luziferase Luminiszenz wurde zur Bestimmung der relativen SRF-Aktivität auf die *Renilla* Luziferase Luminiszenz normalisiert. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM (n = 5) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die GFP-Kontrolle (GFP = 1) mit \*\*  $p \leq 0,01$ . Die Messung der Fusionsproteine erfolgte simultan mit den in Abbildung 7 dargestellten V/VCA-Varianten ohne NLS. B: Dargestellt ist der Western Blot zur Kontrolle der Proteinexpression der in (A) gemessenen Lysate. Die Analyse der GFP-Kontrollen und der NLS-V/VCA-Varianten wurde zusammen mit den in Abbildung 7 verwendeten GFP-V/VCA-Fusionsproteinen auf demselben Immunoblot durchgeführt. Die dargestellten Proteine wurden mit einem anti-GFP-Antikörper detektiert und der gleichmäßige Probenauftrag mit Hilfe eines anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpers nachgewiesen. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Wie in Abbildung 9A gezeigt, konnte keine Reporteraktivierung durch die isolierten NLS-V-Domänen von N-WASP und WAVE2 im Vergleich zur GFP-Negativkontrolle beobachtet werden, während sowohl Cobl-NLS-V(B) als auch Spire2-NLS-V(B) einen signifikanten Anstieg der SRF-Aktivität aufwiesen. In Anwesenheit der CA-Region wurde auch für N-WASP-NLS-VV(AB)CA und WAVE2-NLS-VCA eine signifikante Induktion des SRF-Reporters detektiert. Durch simultane Messung der GFP-V/VCA-Fusionsproteine mit und ohne nukleärem Lokalisationssignal (NLS) konnte zudem gezeigt werden, dass die V/VCA-Domänen ohne NLS eine deutlich höhere SRF-Aktivierung im Vergleich zu nukleär-lokalisierter WH2-Domänen aufwiesen (vgl. Abb. 7A und Abb. 9A).

In Anlehnung an die beobachtete schwächere Aktivierung des SRF-Reporters wurde keine signifikante Steigerung der endogenen *Acta2*-Transkription nach Überexpression der NLS-V/VCA-Fusionsproteine nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

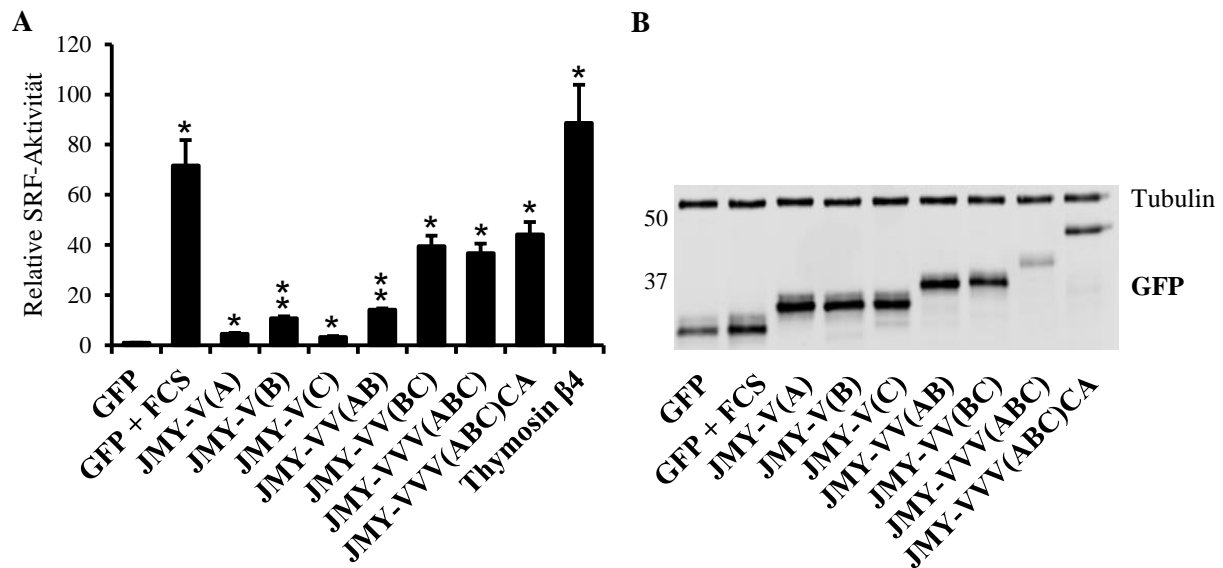
Anhand dieser Daten wurde gezeigt, dass die Kernlokalisation der WH2-Proteine zu einem verringerten Einfluss auf die MRTF-SRF-Induktion führte. Daher erfolgt die Aktivierung von MRTF durch isolierte V/VCA-Regionen wahrscheinlich überwiegend im Zytoplasma.

### **3.1.3. Induktion der MRTF-SRF-abhängigen Genexpression durch isolierte JMY-V/VVVCA-Domänen**

Kürzliche Studien von J. Weißbach zeigten, dass Proteinvarianten des Aktin-Nukleators JMY mit Punktmutation oder Deletionen in der C-terminalen CA-Region eine stärkere MRTF-SRF-Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp-Protein aufwiesen (J. Weißbach, persönliche Mitteilung). Dabei wird vermutet, dass durch die eingeführten Veränderungen eine Auf-faltung des Proteins und eine damit verbundene Exposition der C-terminalen WH2-Domänen verursacht werden. Wie bereits beschrieben, führt die Überexpression isolierter WH2-Domänen zu einer Stimulation der MRTF-SRF-vermittelten Transkription. Daher sollte untersucht werden, ob auch isolierte JMY-V/VVVCA-Fusionsproteine eine MRTF-SRF-Aktivierung induzieren.

Für die Analyse wurden einzelne WH2-Domänen (JMY-V(A), -V(B), -V(C)), Kombinationen aus zwei WH2- (JMY-VV(AB), -VV(BC)) oder drei WH2-Domänen (JMY-VVV(ABC)) sowie der komplette C-Terminus von JMY (JMY-VVV(ABC)CA) verwendet (Abb. 6). In Übereinstimmung mit den bisherigen Beobachtungen induzierten sowohl einzelne als auch mehrfache WH2-Varianten von JMY einen SRF-Reporter bereits unter unstimulierten Bedingungen und wiesen dabei ein unterschiedliches Aktivierungspotential auf (Abb. 10A). Ein deutlicher Anstieg der SRF-Aktivität um das 40x wurde nach Kombination der zweiten und dritten WH2-Domäne (JMY-VV(BC)) beobachtet (Abb. 10A). Die Überexpression von drei WH2-Domänen sowie dem C-terminalen Fragment (JMY-VVV(ABC)CA) führte zu einer vergleichbaren Aktivierung des SRF-Reporters.

Die GFP-V/VVVCA-Fusionsproteine wiesen ein erwartetes, apparentes Molekulargewicht zwischen 32-44 kDa auf (Abb. 10B). Wie bereits für verschiedene isolierte WH2-Regionen gezeigt, war die beobachtete SRF-Aktivierung durch isolierte V/VVVCA-Varianten aus JMY unabhängig von den jeweiligen Expressionsmustern und wurde vermutlich eher durch inhärente Unterschiede der gering konservierten WH2-Domänen bedingt (Anhang 1, Daten nicht gezeigt).

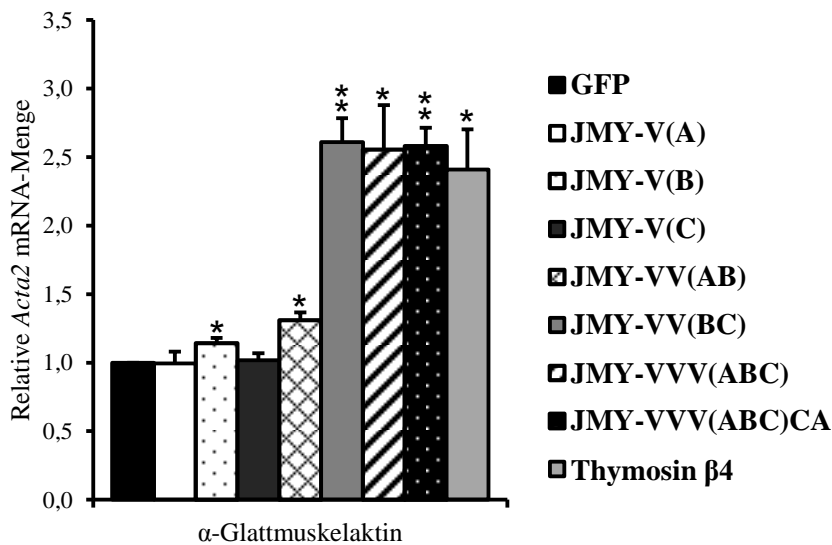


**Abbildung 10: Induktion der MRTF-SRF-abhängigen *Firefly* Luziferase-Expression durch JMY-V/VVVCA-Varianten.**

A: Die relative SRF-Aktivität wurde nach Transfektion der dargestellten WH2-Proteine sowie den Reporterkonstrukten p3D.A.-Luc und pRL-TK in unstimulierten NIH 3T3-Zellen bestimmt. GFP-Kontrollzellen (GFP + FCS) wurden zudem mit 15% (v/v) FCS für 7 h stimuliert. Nach Messung der Luziferase-Luminiszenzen erfolgte die Bestimmung der relativen SRF-Aktivität durch Normalisierung der *Firefly*- auf die *Renilla* Luziferase Aktivität. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM (n = 3) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die GFP-Kontrolle (GFP = 1) mit \*  $p \leq 0,05$  und \*\*  $p \leq 0,01$ . B: Die Expression der JMY-V/VVVCA-Varianten wurde durch Western Blot-Analyse der in (A) verwendeten Proteinlysate kontrolliert. Dargestellt sind die mit einem anti-GFP-Antikörper detektierten Proteine sowie das als Ladekontrolle verwendete Tubulin. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Des Weiteren wurde der Einfluss isolierter JMY-V/VVVCA-Konstrukte auf die Transkription von  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (*Acta2*) überprüft (Abb. 11). Dabei korrelierte die beobachtete *Acta2* mRNA-Induktion durch die einzelnen WH2-Domänen mit deren Fähigkeit, den SRF-Reporter zu aktivieren (vgl. mit Abb. 10A). Wie in Abbildung 11 gezeigt, wurde ein geringer Anstieg der *Acta2* mRNA-Menge nach Überexpression von JMY-V(B) sowie JMY-VV(AB) detektiert, wohingegen die einzelnen WH2-Domänen JMY-V(A) oder -V(C) keinen Effekt auf die *Acta2*-Expression aufwiesen. Dagegen konnte nach Transfektion der letzten beiden WH2-Domänen (JMY-VV(BC)) sowie aller drei WH2-Domänen eine über 2,5x Induktion der *Acta2*-Transkription beobachtet werden. In Anwesenheit der Arp2/3-aktivierenden CA-Region wurde eine vergleichbare *Acta2* mRNA-Expression detektiert (Abb. 11).

In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen konnte eine MRTF-SRF-Induktion somit auch für isolierte V/VVVCA-Varianten von JMY nachgewiesen werden. Die Daten implizieren zudem, dass die Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Genexpression durch JMY hauptsächlich durch dessen WH2-Domänen und nicht durch Arp2/3-Interaktion vermittelt wird.



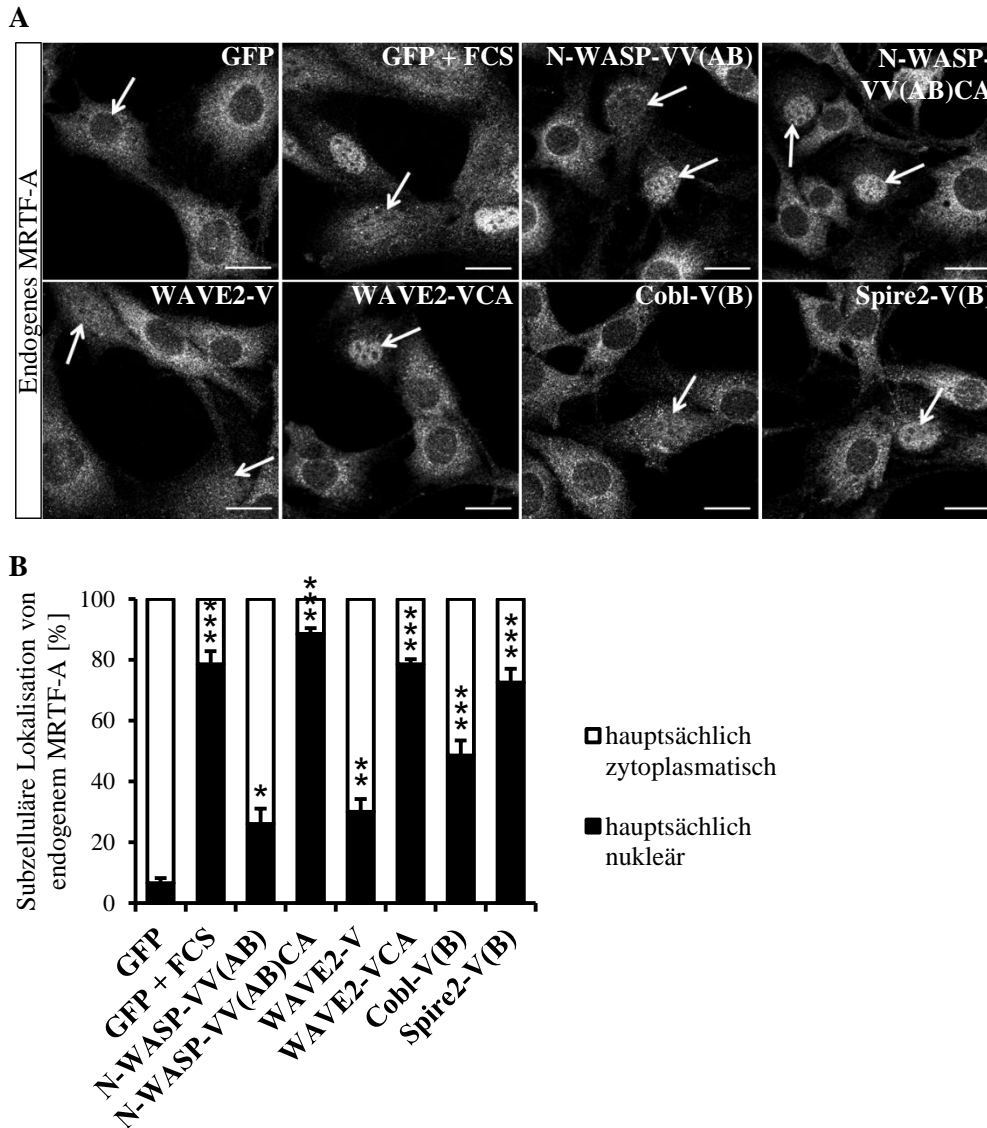
**Abbildung 11: Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Genexpression von  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (*Acta2*) durch GFP-JMY-V/VVVCA-Domänen.**

Die dargestellten GFP-WH2-Varianten und Thymosin  $\beta$ 4 wurden unter Serumentzug in NIH 3T3-Zellen transfiziert und die Transkription von endogenem  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (*Acta2*) nach RNA-Isolation mit Hilfe der qPCR bestimmt. Für die Normalisierung wurden die Referenzgene *ALAS1* und *HPRT* verwendet. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM ( $n = 4$ ) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die GFP-Kontrolle (GFP = 1) mit \*  $p \leq 0,05$  und \*\*  $p \leq 0,01$ .

### 3.2. Untersuchungen zur WH2-vermittelten nukleären Translokation von endogenem MRTF-A

Für die Induktion der MRTF-SRF-vermittelten Transkription ist eine nukleäre Akkumulation von MRTF-A neben der Dissoziation inhibitorischer G-Aktin:MRTF-A-Komplexe zwingende Voraussetzung. Daher wurde der Einfluss verschiedener WH2-Domänen auf die Translokation von endogenem MRTF-A in den Zellkern untersucht.

Nach Transfektion der GFP-V/VCA-Fusionsproteine unter Serumentzug wurde die subzelluläre Lokalisation von MRTF-A durch Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. In unstimulierten GFP-Kontrollzellen konnte MRTF-A hauptsächlich im Zytoplasma nachgewiesen werden, wohingegen die Stimulation des Signalweges mit Serum (GFP + FCS) zu einer nukleären Akkumulation von MRTF-A führte (Abb. 12A-Abb. 14A, Anhang 2-Anhang 4). Wie in Abbildung 12A gezeigt, wurde nach Überexpression der isolierten WH2-Domänen von N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 eine Translokation von endogenem MRTF-A in den Zellkern detektiert (siehe auch Anhang 2). Diese konnte auch für die C-terminalen Fragmente N-WASP-VV(AB)CA und WAVE2-VCA nachgewiesen werden.



**Abbildung 12: Nukleäre Translokation von endogenem MRTF-A durch isolierte V/VCA-Domänen aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2.**

A: Die aufgeführten GFP-V/VCA-Fusionsproteine wurden unter Serumentzug in NIH 3T3-Zellen exprimiert. Als Kontrolle diente die Serumstimulation von GFP-transfizierten Zellen (GFP + FCS). Die subzelluläre Lokalisation von endogenem MRTF-A wurde durch einen MRTF-spezifischen Antikörper mit Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt. Für die dargestellten mikroskopischen Aufnahmen wurde ein 63x Öl-Objektiv verwendet. Die GFP-exprimierenden Zellen wurden durch Pfeile ( $\rightarrow$ ) gekennzeichnet. Die zugehörigen Aufnahmen der detektierten GFP-Proteine sowie der mit DAPI angefärbten DNA sind in Anhang 2 aufgeführt. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ . B: Dargestellt ist die Quantifizierung von (A). Die subzelluläre Lokalisation (hauptsächlich zytoplasmatisch (weiß) oder hauptsächlich nukleär (schwarz)) von MRTF-A wurde in 50 GFP-positiven Zellen der jeweils verwendeten Proteine pro durchgeführter Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM ( $n = 4$ ) sowie die statistische Signifikanz des ungepaarten Zweistichproben t-Tests in Bezug auf die unstimulierte GFP-Kontrolle mit \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

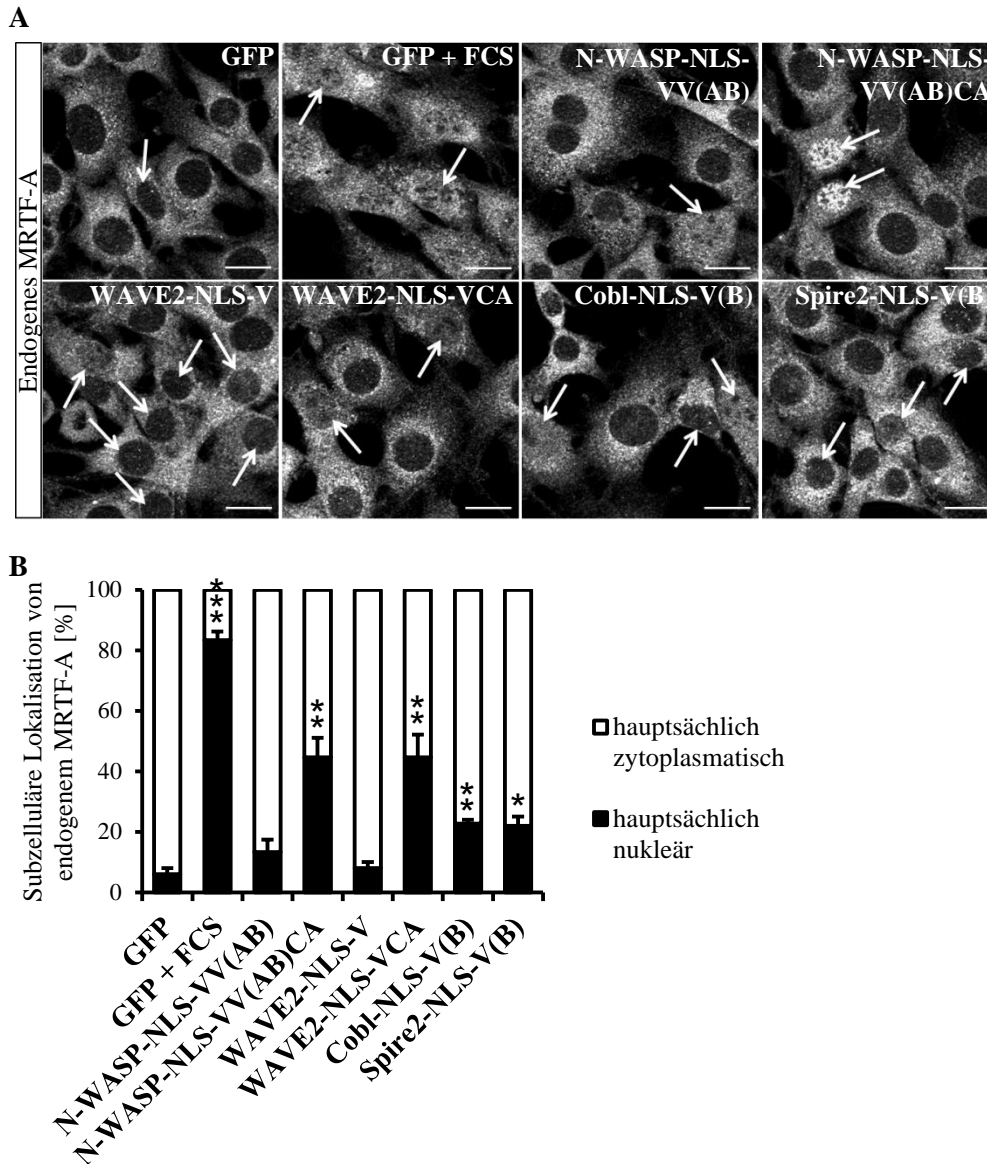
Die subzelluläre Lokalisation von MRTF-A wurde außerdem durch Auszählung der GFP-positiven Zellen analysiert, welche MRTF-A entweder hauptsächlich im Zytoplasma oder hauptsächlich im Kern aufwies. Die quantitative Auswertung ergab, dass die Überexpression der WH2-Domänen von N-WASP in einem Viertel der Zellen zu einer nukleären Akkumulation von MRTF-A führte, wohingegen eine deutlich stärkere Kernlokalisierung von



MRTF-A in Cobl-V(B)- oder Spire2-V(B)-exprimierenden Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 12B). Eine mit einer durch Serumstimulation induzierte, vergleichbare Translokation von MRTF-A in den Zellkern wurde in Anwesenheit der CA-Region für die WH2-Domänen von N-WASP und WAVE2 detektiert (Abb. 12B).

Die generierten GFP-NLS-V/VCA-Fusionsproteine konnten nahezu ausschließlich im Zellkern detektiert werden (Anhang 3). In seltenen Fällen wurde eine zusätzlich im Zytoplasma auftretende Lokalisation der GFP-Proteine beobachtet (Daten nicht gezeigt). In Bezug zu den bisherigen Ergebnissen konnte nukleäres MRTF-A auch nach Transfektion von kernlokalisierten WH2-Domänen von N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 nachgewiesen werden (Abb. 13A). Im Vergleich zu GFP-Kontrollzellen wurde ein signifikanter Anstieg von nukleärem MRTF-A dabei nur in Cobl-NLS-V(B)- und Spire2-NLS-V(B)-exprimierenden Zellen detektiert (Abb. 13B). Eine Translokation von MRTF-A in den Zellkern wurde auch unter Verwendung der NLS-VCA-Fragmente von N-WASP und WAVE2 beobachtet, welche im Vergleich zu den zugehörigen isolierten WH2-Domänen eine stärkere nukleäre Akkumulation von MRTF-A in ca. 45% der Zellen aufwiesen (Abb. 13).

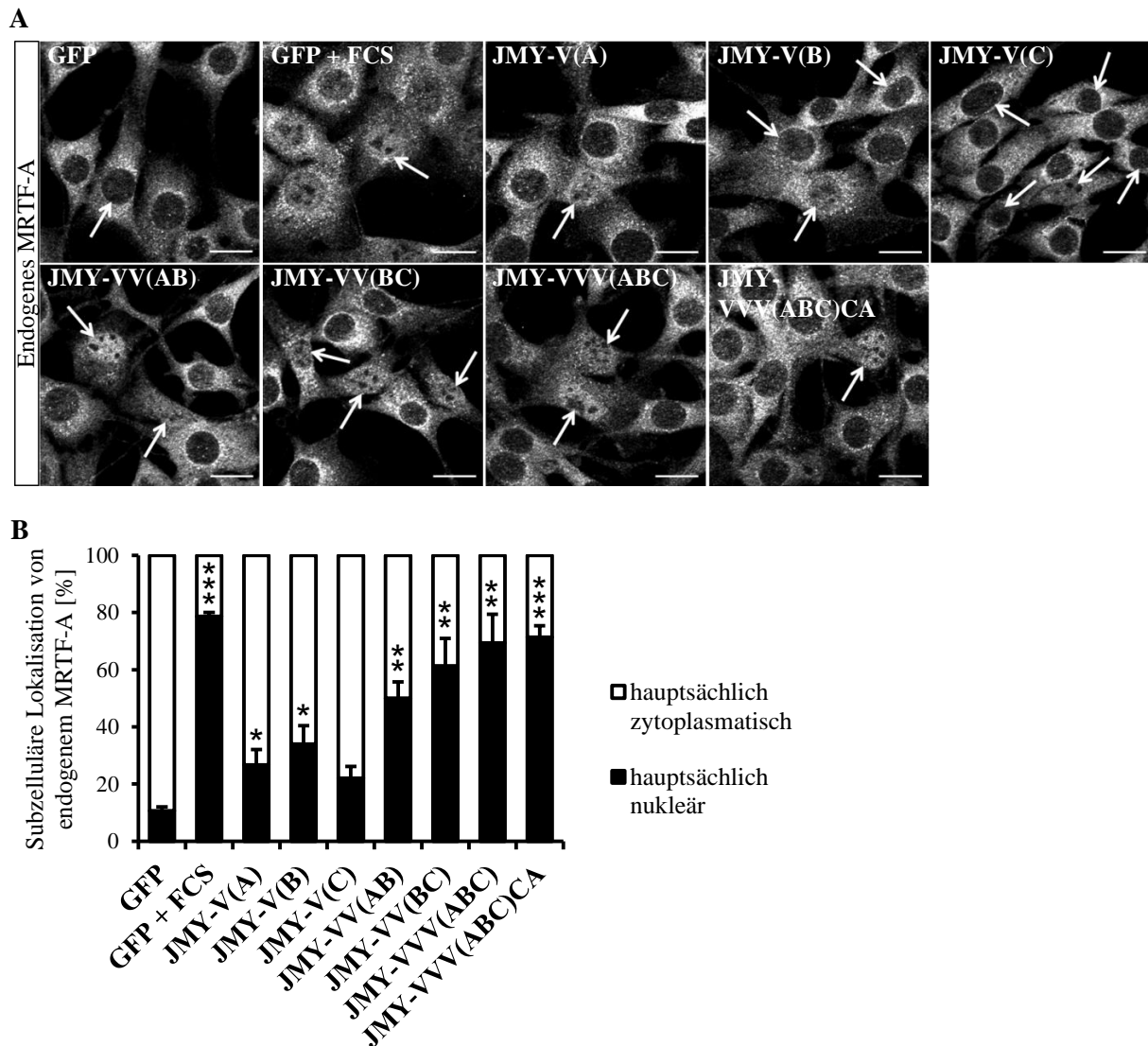
In Übereinstimmung mit den Daten der SRF-Aktivitätsassays war jedoch nach Fusion mit einem Kernlokalisierungssignal und einer damit verbundenen forcierten Kernlokalisation ein deutlich geringerer Einfluss der GFP-V/VCA-Proteine auf die nukleäre Translokation von MRTF-A nachweisbar (vgl. Abb. 12 und Abb. 13). Die genaue Abtrennung zwischen der Wirkung von WH2-Domänen im Zytoplasma und im Zellkern ist mit den generierten GFP-Fusionsproteinen ohne nukleäres Lokalisationssignal nicht möglich. Proteine mit einem Molekulargewicht bis ca. 40 kDa können durch passive Diffusion in den Zellkern gelangen (Terry *et al.*, 2007). Aufgrund ihrer geringen Größe lagen die GFP-V/VCA-Fusionen somit ubiquitär in der Zellen verteilt vor (Anhang 2, siehe auch Anhang 5).



**Abbildung 13: Subzelluläre Lokalisation von endogenem MRTF-A nach Expression von GFP-NLS-V/VCA-Fusionsproteinen.**

A: Nach Transfektion der nukleär-lokalisierenden WH2-Varianten von N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 in NIH 3T3-Zellen erfolgte die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von endogenem MRTF-A durch einen MRTF-spezifischen Antikörper mittels Immunfluoreszenzfärbungen. Vergleichend dazu wurden unstimulierte (GFP) und stimulierte (GFP + FCS) GFP-Kontrollzellen untersucht. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem 63x Öl-Objektiv aufgenommen. Die Kennzeichnung der GFP-positiven Zellen erfolgte durch Pfeile ( $\rightarrow$ ). Im Anhang 3 sind die zugehörigen mikroskopischen Aufnahmen nach Detektion von GFP sowie der DNA (DAPI) aufgeführt. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ . B: Die subzelluläre Lokalisation von MRTF-A (A) wurde in jeweils 50 GFP-positiven Zellen pro verwendetem Fusionsprotein und durchgeführter Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Die Einteilung erfolgte in hauptsächlich zytoplasmatisches (weiß) oder hauptsächlich nukleäres (schwarz) endogenes MRTF-A. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM ( $n = 3$ ) sowie die statistische Signifikanz des ungepaarten Zweistichproben t-Tests in Bezug auf die unstimulierte GFP-Kontrolle mit \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Die bisherigen Daten zeigen, dass überexprimierte GFP-V-Fusionsproteine zu einer nukleären Akkumulation von MRTF-A führen konnten. Auch isolierte WH2-Domänen von JMY induzierten eine Translokation von endogenem MRTF-A in den Zellkern, welche mit dem bereits für die WH2-Domänen von N-WASP oder WAVE2 beschriebenen Anstieg von nukleärem MRTF-A vergleichbar war (vgl. Abb. 12B und Abb. 14).



**Abbildung 14: Nukleäre Akkumulation von endogenem MRTF-A nach Überexpression von GFP-JMY-V/VVCA-Fusionsproteinen.**

A: Die dargestellten JMY-WH2-Varianten wurden unter unstimulierten Bedingungen in NIH 3T3-Zellen transfiziert. Nach Serumstimulation von GFP-Kontrollzellen (GFP + FCS) wurde die subzelluläre Lokalisation von MRTF-A durch einen MRTF-spezifischen Antikörper anhand von Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde ein 63x Öl-Objektiv verwendet und die GFP-positiven Zellen durch Pfeile ( $\rightarrow$ ) gekennzeichnet. Eine vollständige Übersicht der dieser Abbildung zugrundeliegenden Aufnahmen ist im Anhang 4 aufgeführt. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ . B: Dargestellt ist die Quantifizierung der subzellulären Lokalisation (hauptsächlich zytoplasmatisch (weiß) oder hauptsächlich nukleär (schwarz)) von MRTF-A (A) nach Überexpression der angegebenen Fusionsproteine. 50 GFP-positive Zellen wurden pro verwendetem Konstrukt und durchgeführter Immunfluoreszenzanalyse analysiert. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM ( $n = 3$ ) sowie die statistische Signifikanz des ungepaarten Zweistichproben t-Tests in Bezug auf die unstimulierte GFP-Kontrolle mit \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Die nach Überexpression von JMY-V/VVCA-Fusionsproteinen beobachtete nukleäre Akkumulation von endogenem MRTF-A korrelierte mit deren differierenden Aktivierungspotential des Luziferase-Reportergenassays (vgl. Abb. 10A und Abb. 14, Anhang 4). Dabei wurde der geringste Effekt für JMY-V(C) und der stärkste Effekt für JMY-V(B) detektiert (Abb. 14B). Nach Überexpression von JMY-Varianten, welche aus mindestens zwei WH2-Domänen bestanden, konnte ein deutlicher Anstieg der Kernlokalisation von MRTF-A be-

obachtet werden (Abb. 14). Die quantitative Auswertung ergab, dass bereits 50% der JMY-VV(AB)-exprimierenden Zellen nukleäres MRTF-A aufwiesen, wohingegen die Anwesenheit aller drei WH2-Domänen in etwa 70% der Zellen zu einer Akkumulation von MRTF-A im Zellkern führte (Abb. 14B). Dieser Effekt konnte durch die Anwesenheit der CA-Region nicht wesentlich gesteigert werden, weshalb die Wirkung von JMY auf die Lokalisation von MRTF-A vermutlich hauptsächlich auf dem Aktivierungspotential der WH2-Domänen beruht.

Zusammenfassend konnte eine nukleäre Translokation von endogenem MRTF-A nach Überexpression verschiedener WH2-Fusionen bereits unter unstimulierten Bedingungen detektiert werden. Die Kernlokalisierung ausgewählter V/VCA-Proteine resultierte in einem schwächeren Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von MRTF-A. Diese wird vermutlich eher durch zytoplasmatische WH2-Regionen vermittelt. Aufgrund der fehlenden polymerisationsfördernden Aktivität der isolierten WH2-Domänen ist anzunehmen, dass deren Wirkung auf die Akkumulation von MRTF-A in den Zellkern nicht durch eine verstärkte Filamentbildung bedingt wird.

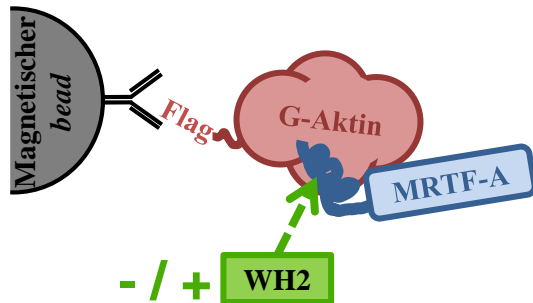
### **3.3. Kompetitionsanalysen von MRTF-A und WH2-Domänen um die Bindung an Aktin**

#### **3.3.1. Dissoziation immunpräzipitierter Komplexe von Flag-Aktin-WT und MRTF-A durch rekombinante GST-V/VCA-Fusionsproteine**

Die direkte Interaktion von MRTF-A und monomeren G-Aktin wird über die N-terminale RPEL-Domäne von MRTF-A vermittelt und kann sowohl in Zellen als auch in einer zellfreien Umgebung mittels gereinigter Proteine nachgewiesen werden (Miralles *et al.*, 2003; Posern *et al.*, 2004). Die entstehenden Komplexe weisen bis zu fünf, an ein MRTF-A-Protein gebundene Aktinmonomere auf (Mouilleron *et al.*, 2011). Die hydrophobe Oberfläche Aktins zwischen Subdomäne 1 und 3 ist dabei nicht nur Bindungsstelle der RPEL-Motive von MRTF-A, sondern wird gleichermaßen für die Interaktion mit WH2-Domänen von Aktinbindeproteinen benötigt (Abb. 1B; Mouilleron *et al.*, 2008).

Eine daraus resultierende mögliche Konkurrenz beider Faktoren um die Bindung an Aktin, welche die Grundlage für die beobachtete MRTF-SRF-Aktivierung sein könnte, wurde mit Hilfe von Ko-Immünpräzipitations-(Ko-IP)-experimenten näher untersucht. Dafür wurde Flag-getaggetes Aktin zusammen mit MRTF-A in NIH 3T3-Zellen unter Serumentzug ko-exprimiert. Nach der Zellyse erfolgte die Präzipitation der Flag-Aktin:MRTF-A-Komplexe

mit Hilfe von magnetischen anti-Flag M2 *beads* unter Zugabe bakteriell exprimierter GST-V/VCA-Fusionsproteine (Abb. 15). Der Einfluss der WH2-Domänen auf die Komplexdissoziation wurde im Anschluss mittels Western Blot-Verfahren untersucht.



**Abbildung 15: Schematische Übersicht der durchgeführten Ko-Immünpräzipitationsexperimente.**

Die Präzipitation zellulärer Flag-Aktin:MRTF-A-Komplexe wurde unter Zugabe von gereinigten WH2-Varianten aus N-WASP, WAVE2, Cobl, Spire2 und JMY untersucht. Die Menge der Aktin-gebundenen Proteine wurde anschließend anhand von Western Blots detektiert. Abbildung modifiziert nach Weissbach & Schikora *et al.* (2016).

Wie in Abbildung 16 dargestellt, wurde die Wirkung der V/VCA-Regionen von N-WASP (A) und WAVE2 (B) sowie die der zweiten WH2-Domäne von Cobl (C) und Spire2 (D) auf die Menge von Flag-Aktin-Wildtyp (WT)-gebundenem Gesamtlängen-MRTF-A (MRTF-A-f.l.-HA) untersucht. Neben den präzipitierten Proteinproben (IP: Flag-Aktin) wurde zudem das Ausgangsmaterial (Input) als Kontrolle auf das Gel aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch die entsprechenden *Tag*- bzw. proteinspezifischen Antikörper. Als Negativkontrolle wurde die Menge von Aktin-WT-gebundenem MRTF-A-f.l.-HA in An- und Abwesenheit von gereinigtem GST untersucht. Wie in Abbildung 16A-D gezeigt, hatte gereinigtes GST keinen Einfluss auf die präzipitierten Aktin-WT:MRTF-A-Komplexe (vgl. Spur 1 und 2). Nach Zugabe der WH2-Domänen von N-WASP (GST-N-WASP-VV(AB)) wurde eine deutliche Reduktion von gebundenem MRTF-A-f.l.-HA beobachtet, wohingegen die zugehörige VCA-Region einen schwächeren Effekt aufwies (Abb. 16A). Die Quantifizierung der Bandenintensitäten von MRTF-A ergab, dass die isolierten WH2-Domänen von N-WASP sowie GST-N-WASP-VV(AB)CA die Menge der präzipitierten Komplexe von Aktin-WT und MRTF-A im Vergleich zur GST-Kontrolle um 60% und 30% reduzierten (Abb. 16E).

Durch die Zugabe von GST-WAVE2-V wurde die Bindung von MRTF-A-f.l.-HA an Flag-Aktin-WT um 20% verringert (Abb. 16B, E). Im Vergleich dazu konnte in Anwesenheit der CA-Region (GST-WAVE2-VCA) eine weitere Reduktion von präzipitiertem MRTF-A-f.l.-HA detektiert werden (Abb. 16B). In Bezug auf die GST-Kontrolle wurde eine Verringerung der Aktin-WT:MRTF-A-Komplexe um 35% beobachtet (Abb. 16E).

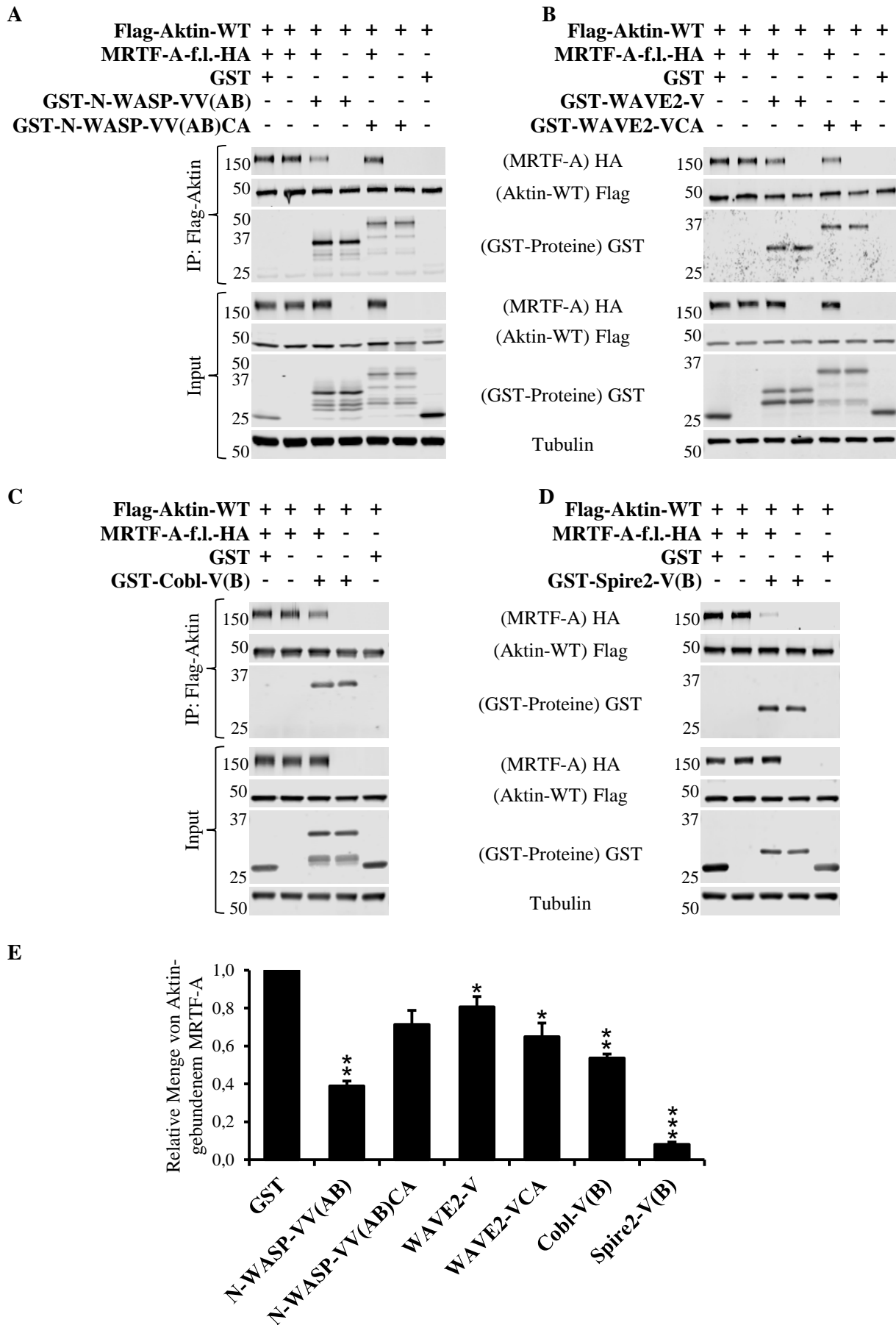


Abbildung 16: Reduktion inhibitorischer Flag-Aktin-WT:MRTF-A-Komplexe durch die Zugabe von GST-V/VCA-Fusionsproteinen.

A-D: Nach Ko-Transfektion von Flag-Aktin-WT und MRTF-A-f.l.-HA in NIH 3T3-Zellen erfolgte ein 24-stündiger Serumentzug. Anschließend wurden Flag-Aktin-WT:MRTF-A-Komplexe durch magnetische anti-Flag M2 *beads* in Anwesenheit der rekombinanten GST-V/VCA-Varianten aus N-WASP (A), WAVE2 (B), Cobl (C) und Spire2 (D) präzipitiert. Als Kontrolle wurde gereinigtes GST eingesetzt. Dargestellt sind die korrespondierenden Western Blots der Immunpräzipitation (IP: Flag-Aktin) und des Ausgangsmaterials (Input). Die Proteine wurden mit Hilfe von anti-HA-, anti-Flag-, anti-GST- und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern detektiert. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. E: Dargestellt ist die Quantifizierung von Aktin-WT-gebundenem MRTF-A in Anwesenheit der GST-Fusionsproteine. Die Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung der präzipitierten und eingesetzten Menge von MRTF-A, welche im Verhältnis zum präzipitierten Flag-Aktin bestimmt wurde. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM ( $n \geq 3$ ) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die GST-Kontrolle (GST = 1) mit \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

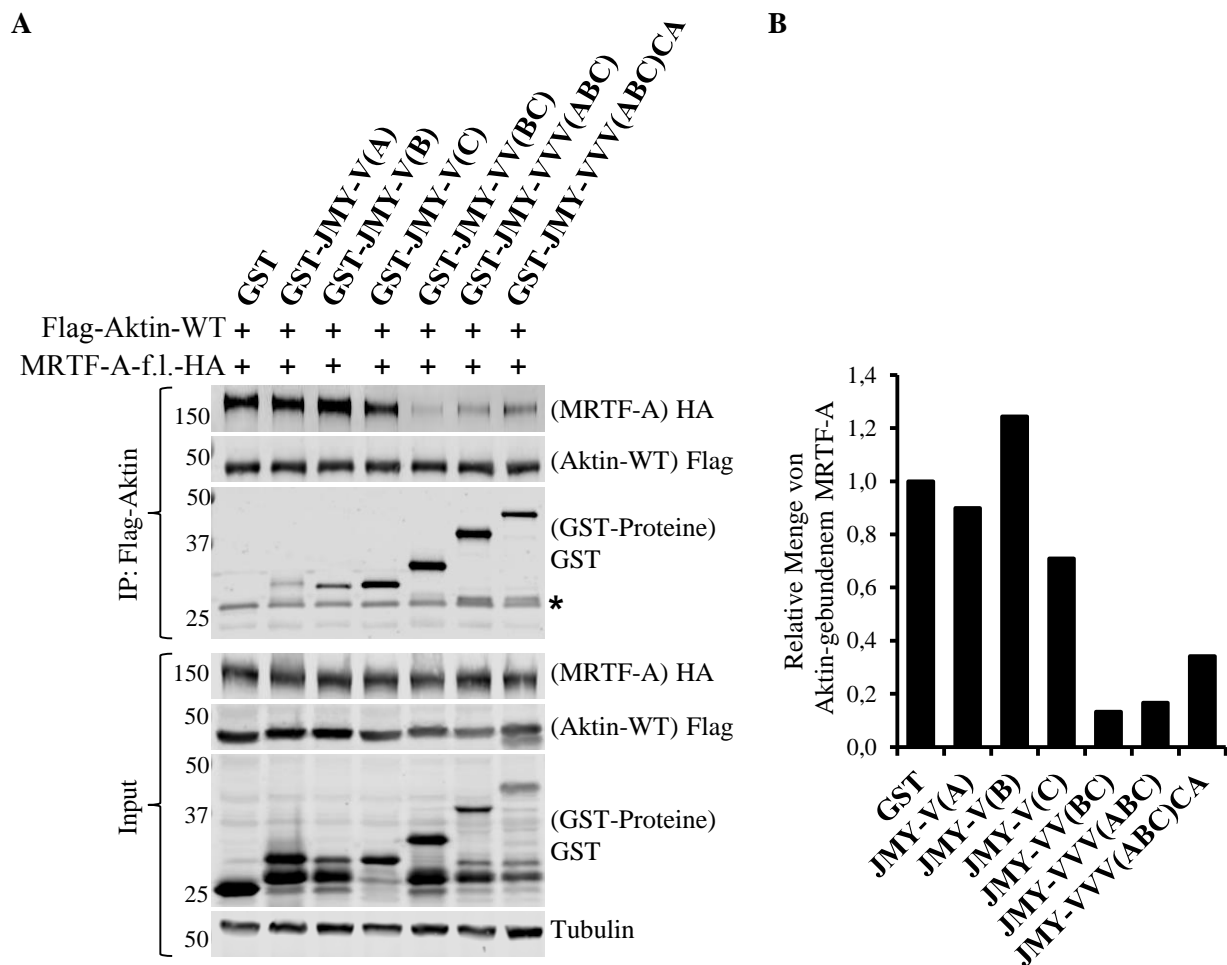
Wie in Abbildung 16C und D gezeigt, konnte unter Verwendung der zweiten WH2-Domäne von Cobl (C) sowie von Spire2 (D) eine starke Reduktion von präzipitiertem MRTF-A-f.l.-HA im Vergleich zur GST-Kontrolle detektiert werden. Die Quantifizierung ergab eine Verringerung der Aktin-WT:MRTF-A-Komplexe um ca. 50% für GST-Cobl-V(B), wohingegen die Zugabe von GST-Spire2-V(B) die Menge von Aktin-WT-gebundenem MRTF-A-f.l.-HA um über 90% reduzierte (Abb. 16E).

Wie in Abbildung 16E gezeigt wird, wiesen die verwendeten GST-V/VCA-Fusionsproteine ein unterschiedliches Potential auf, die Menge der präzipitierten Aktin-WT:MRTF-A-Komplexe zu reduzieren. Dabei hatte die Zugabe der WH2-Domäne von WAVE2 den geringsten und die Zugabe der zweiten WH2-Domäne von Spire2 den stärksten Effekt. Die starke Variation zwischen den einzelnen WH2-Domänen könnte darauf hinweisen, dass deren Funktion in Bezug auf die Komplexdissoziation durch die Aminosäuresequenz und den daraus resultierenden Bindungseigenschaften bestimmt wird (Anhang 1).

Außerdem wurde der Einfluss isolierter JMY-V/VVVCA-Fusionen auf die Dissoziation von Aktin-WT:MRTF-A-Komplexen untersucht (Abb. 17). Da eine Reinigung aufgrund der starken Degradation nicht möglich war, erfolgte die Zugabe der GST-Protein-enthaltenden Zellextrakte nach deren Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) Rosetta-Zellen. GST-JMY-VV(AB) konnte jedoch wegen unzureichender Expression der intakten Gesamtlängen-WH2-Domänen nicht eingesetzt werden. Für die Analyse wurden die präzipitierten Proteinproben (IP: Flag-Aktin) und das Ausgangsmaterial (Input) auf das Gel aufgetragen. Als Kontrolle wurde GST-Lysat eingesetzt.

Wie in Abbildung 17A dargestellt, konnte nach Zugabe der isolierten WH2-Domänen von JMY keine Veränderung der gebundenen MRTF-A-f.l.-HA-Menge detektiert werden. Dagegen wurde für JMY-Varianten, welche mindestens zwei WH2-Domänen besaßen, eine deutliche Reduktion der präzipitierten Aktin-WT:MRTF-A-Komplexe nachgewiesen. Dieser Effekt konnte auch in Anwesenheit der CA-Region beobachtet werden (Abb. 17A). Außerdem wurde unter Berücksichtigung des eingesetzten Ausgangsmaterials gezeigt, dass die

einzelnen, isolierten WH2-Domänen mit unterschiedlicher Affinität an Flag-Aktin-WT binden (Abb. 17A). Die Quantifizierung ergab, dass die Menge von Aktin-WT-gebundenem MRTF-A-f.l.-HA im Vergleich zur GST-Kontrolle durch Zugabe von GST-JMY-VV(BC), -VVV(ABC) und -VVV(ABC)CA um etwa 65-90% reduziert wurde, wohingegen isolierte WH2-Domänen keinen Einfluss hatten (Abb. 17B). Diese Ergebnisse konnten auch in einem weiteren Ko-Immunpräzitationsexperiment mit geringfügig veränderten Bedingungen reproduziert werden.



**Abbildung 17: Dissoziation inhibitorischer Flag-Aktin-WT:MRTF-A-Komplexe nach Zugabe aus JMY isolierter GST-WH2-Varianten.**

A: NIH 3T3-Zellen wurden zunächst mit Flag-Aktin-WT und MRTF-A-f.l.-HA transfiziert und 24 h unter unstimulierten Bedingungen inkubiert. Nach Zellyse erfolgte die Zugabe der angegebenen GST/-JMY-V/VVVCA-enthaltenden *E. coli* Rosetta-Lysate und die Präzipitation der Proteine durch magnetische anti-Flag M2 *beads*. Die Western Blots zeigen die mit den dargestellten *Tag*- bzw. proteinspezifischen Antikörpern detektierten Proteine der Immunpräzipitation (IP: Flag-Aktin) und des Ausgangsmaterials (Input). Die mit einem Stern (\*) markierte Proteinbande konnte auf eine unspezifische Reaktion des GST-Antikörpers mit endogenen *E. coli*-Proteinen zurückgeführt werden. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. B: Dargestellt ist die Quantifizierung von (A). Durch Flag-Aktin-WT gebundenes MRTF-A wurde unter Berücksichtigung der präzipitierten und eingesetzten Menge von MRTF-A sowie der Menge des präzipitierten Flag-Aktins berechnet. Dargestellt ist die Bindung von MRTF-A an Flag-Aktin-WT in Anwesenheit der dargestellten GST-JMY-V/VVVCA-Fusionsproteine in Bezug auf die auf 1 gesetzte GST-Kontrolle (n = 1).

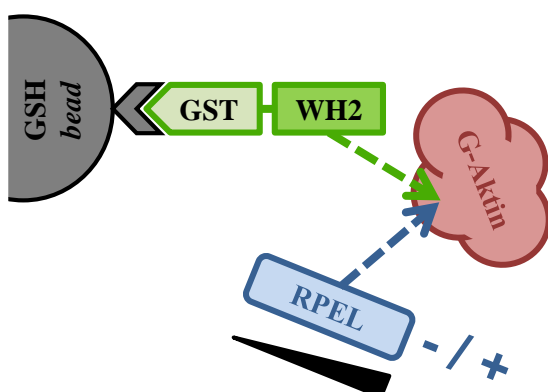


Anhand dieser Daten wurde gezeigt, dass auch JMY-Fusionsproteine, welche aus mindestens zwei WH2-Domänen bestehen, eine Dissoziation von Aktin-WT:MRTF-A-Komplexen induzieren. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein schwaches Kompetitions-potential der isolierten WH2-Varianten (JMY-V(A, B oder C)) als Grundlage für die beobachtete geringfügige MRTF-SRF-Aktivierung durch die experimentellen Bedingungen wie z.B. den stark schwankenden Mengen der eingesetzten WH2-Regionen nicht erfasst wurde. Für den Nachweis einer möglichen G-Aktin:MRTF-A-Komplexdissoziation durch die isolierten JMY-V-Varianten sollte die exakte Konzentrationsbestimmung der WH2-Domänen unter Verwendung gereinigter Proteine oder isolierter Peptide erfolgen.

### 3.3.2. Konkurrenz zwischen der rekombinanten RPEL-Domäne von MRTF-A und WH2-Fusionsproteinen um die Bindung an monomeres Aktin

Bisher konnte gezeigt werden, dass isolierte GST-V/VCA-Fusionsproteine zu einer Dissoziation von Aktin:MRTF-A-Komplexen führen (3.3.1). Da die zwischen Subdomäne 1 und 3 liegende hydrophobe Oberfläche von G-Aktin Bindestelle für WH2-Domänen aber auch für die RPEL-Motive von MRTF-A ist (Mouilleron *et al.*, 2008), sollte die Wirkung der isolierten RPEL-Domäne von MRTF-A auf die WH2-Aktin-Interaktion untersucht werden.

Wie in Abbildung 18 schematisch dargestellt, wurden gereinigte GST-V/VCA-Fusionen an GSH-beads immobilisiert und die Bindung von monomerem Aktin unter Zugabe ansteigender Mengen der MRTF-A-RPEL-Domäne analysiert.

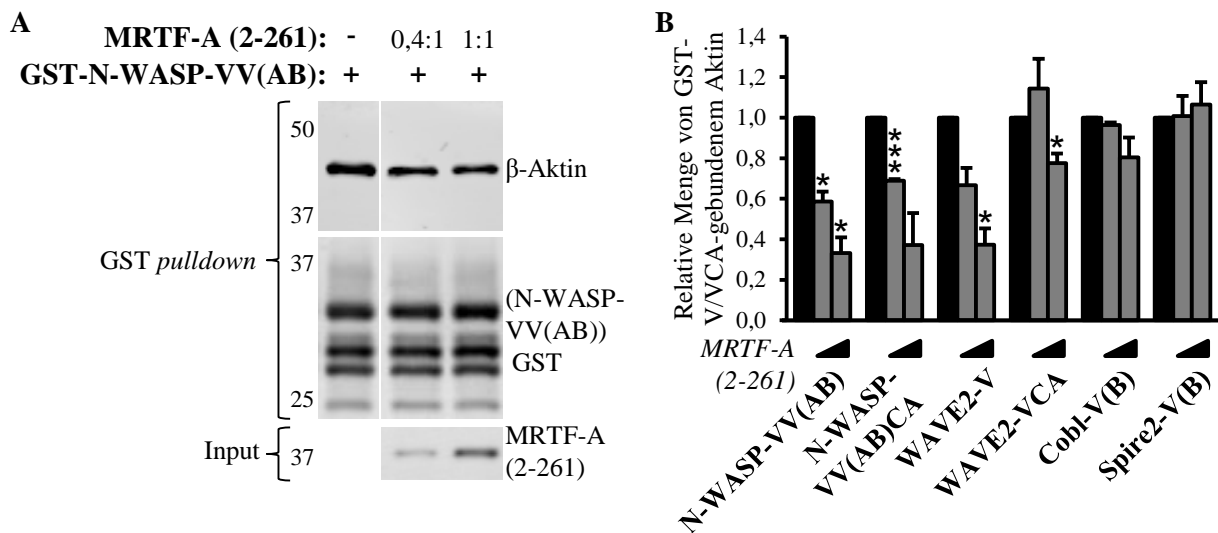


**Abbildung 18: Schematische Darstellung der durchgeführten GST pull-down-Experimente.**

Nach Zugabe der rekombinanten RPEL-Domäne von MRTF-A wurde die Bindung von Aktin an immobilisierte GST-V/VCA-Varianten aus N-WASP, WAVE2, Cobl oder Spire2 mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens analysiert. Monomeres G-Aktin wurde dabei entweder aus Zellen extrahiert oder in biotinylierter Form zugegeben. Abbildung modifiziert nach Weissbach & Schikora *et al.* (2016).

### 3.3.2.1. Einfluss der rekombinanten RPEL-Domäne von MRTF-A auf die Präzipitation von endogenem G-Aktin durch GST-V/VCA-Fusionen

Exemplarisch sind in Abbildung 19A die Ergebnisse eines GST *pulldowns* dargestellt, in dem die Präzipitation von endogenem  $\beta$ -Aktin durch GST-N-WASP-VV(AB) in Anwesenheit der rekombinanten RPEL-Domäne von MRTF-A (MRTF-A(2-261)) untersucht wurde. Anhand von Kristallisationsstudien konnte gezeigt werden, dass MRTF-A aufgrund von drei RPEL-Motiven und den dazwischenliegenden Linkerregionen bis zu fünf Aktinbindestellen aufweist (Mouilleron *et al.*, 2011), wohingegen eine WH2-Domäne nur ein Aktinmonomer binden kann. Daher wurden molare Mengenverhältnisse von 0,4:1 und 1:1 von MRTF-A(2-261) zu GST-N-WASP-VV(AB) verwendet. Die präzipitierten Proteinproben (GST *pulldown*) sowie das eingesetzte MRTF-A(2-261) (Input) wurden auf das Gel aufgetragen und die Proteine anhand der entsprechenden *Tag*- bzw. proteinspezifischen Antikörper detektiert.



**Abbildung 19: Differenzielle Konkurrenz von MRTF-A(2-261) mit präzipitierten GST-V/VCA:Aktin-Komplexen.**

A: Aus NIH 3T3-Zellen extrahiertes, monomeres G-Aktin wurde mit der RPEL-Domäne von MRTF-A (MRTF-A(2-261)) inkubiert. Anschließend erfolgte die Präzipitation von  $\beta$ -Aktin durch die an GSH *beads* immobilisierten WH2-Domänen von N-WASP. MRTF-A(2-261) wurde in einem molaren Mengenverhältnis von 0,4:1 und 1:1 in Bezug zu GST-N-WASP-VV(AB) eingesetzt. Dargestellt sind die Western Blots der präzipitierten Proteinproben (GST *pulldown*) und dem eingesetzten Ausgangsmaterial (Input) von MRTF-A(2-261). Die Analyse der N-WASP-VV(AB)-gebundenen Menge von  $\beta$ -Aktin wurde auf demselben Immunoblot durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe von anti- $\beta$ -Aktin-, anti-GST- und anti-MRTF-A(2-261)-Antikörpern. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. B: Die Menge von GST-V/VCA-gebundenem  $\beta$ -Aktin wurde unter Zugabe ansteigender molare Mengen von MRTF-A(2-261) bestimmt. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM ( $n = 3$ ) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die auf 1 gesetzte Kontrolle ohne MRTF-A(2-261)-Zugabe mit \*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Wie in Abbildung 19A zu erkennen ist, wurde eine deutliche Reduktion von WH2-gebundenem G-Aktin bereits nach Zugabe der rekombinanten RPEL-Domäne in einem molaren Verhältnis von 0,4:1 (MRTF-A(2-261):GST-N-WASP-VV(AB)) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Eine weitere Verringerung des präzipitierten  $\beta$ -Aktins konnte unter Verwendung äquimolarer Mengen (1:1) der WH2-Domänen von N-WASP und MRTF-A(2-261) detektiert

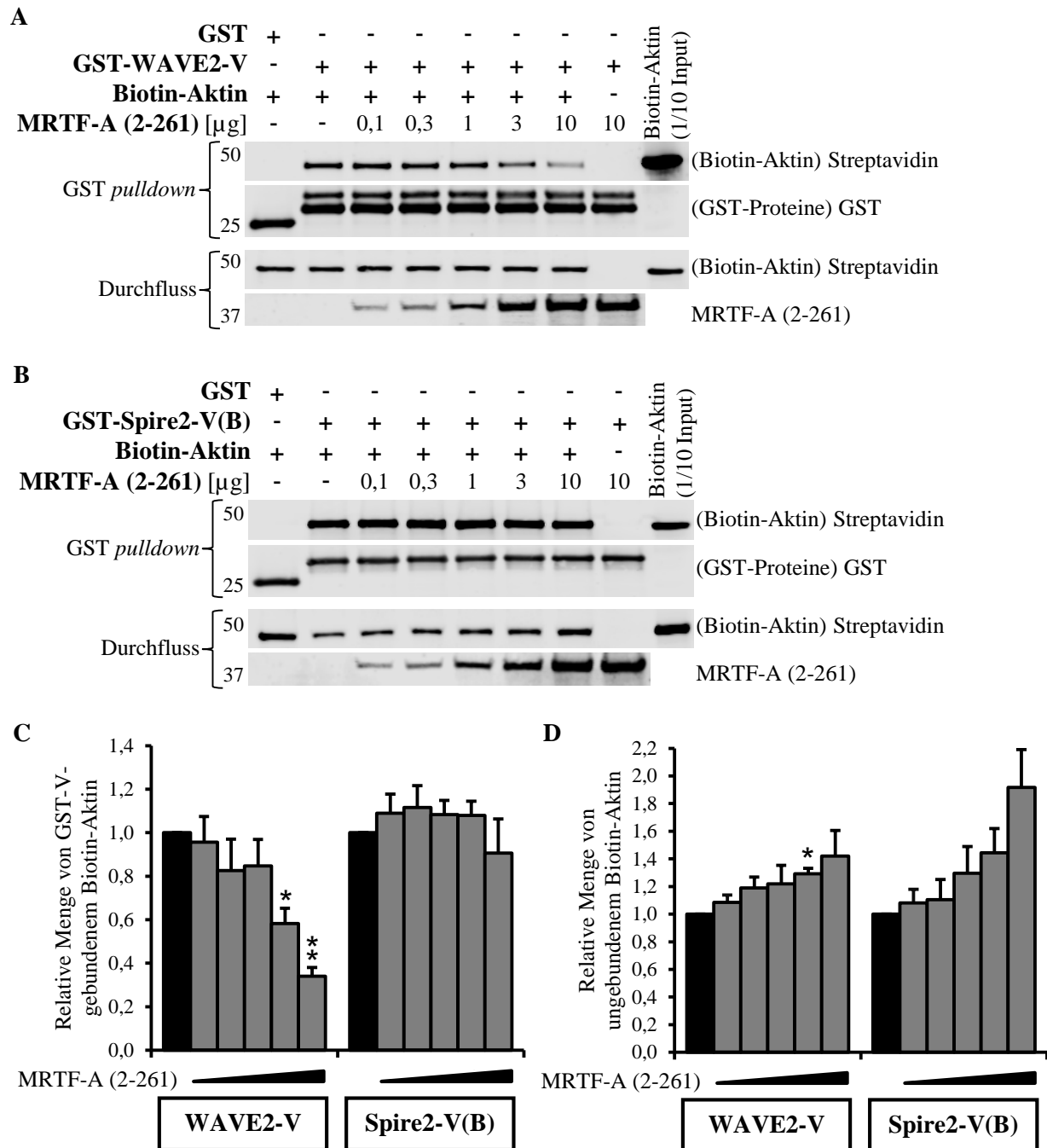
werden (Abb. 19A). Die Quantifizierung ergab, dass ansteigende molare Mengen der rekombinanten RPEL-Domäne zu einer Verringerung des GST-N-WASP-VV(AB)-gebundenen Aktins um ca. 40% (0,4:1) und 70% (1:1) im Vergleich zur Kontrolle ohne MRTF-A(2-261) führten (Abb. 19B). Ein ähnlicher Effekt konnte unter Verwendung der zugehörigen VCA-Region nachgewiesen werden.

Wie in Abbildung 19B gezeigt, wurde auch für GST-WAVE2-V eine dosisabhängige Reduktion des präzipitierten G-Aktins um 30-60% nach Zugabe von MRTF-A(2-261) detektiert. Dagegen wurde in Anwesenheit der CA-Region ein schwächeres Kompetitionspotential der RPEL-Domäne um die Aktinbindung beobachtet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zugabe ansteigender molarer Mengen von MRTF-A(2-261) keine signifikante Wirkung auf die Präzipitation von endogenem  $\beta$ -Aktin durch die WH2-Domänen von Cobl oder Spire2 hatte (Abb. 19B). Diese Daten könnten darauf hinweisen, dass das Kompetitionspotential der verwendeten WH2-Fusionsproteine und MRTF-A(2-261) aus deren unterschiedlichen Affinitäten zu Aktin resultiert.

### 3.3.2.2. Direkte Konkurrenz von MRTF-A(2-261) mit WH2:Aktin-Komplexen

Um einen möglichen Einfluss zellulärer Faktoren auf die Konkurrenz zwischen MRTF-A und WH2-Domänen um die Aktinbindung auszuschließen, wurden GST *pulldown*-Experimente mit gereinigten Proteinen durchgeführt. Da sich WH2-Domänen in ihrer Wirkung auf Aktin:MRTF-A-Komplexe stark unterschieden, wurde GST-WAVE2-V als schwacher Aktivator sowie GST-Spire2-V(B) als starker Aktivator für die Analyse eingesetzt. Als Kontrolle wurde gereinigtes GST verwendet. Unter Zugabe von 0-10  $\mu$ g MRTF-A(2-261) wurde die Bindung von biotinyliertem Aktin an die GST-V-Fusionsproteine mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens bestimmt (Abb. 20, GST *pulldown*). Zur Detektion ungebundener Proteine wurden zudem Proben des Durchflusses aufgetragen.

Wie in Abbildung 20A dargestellt, konnte biotinyliertes Skelettmuskelaktin durch die WH2-Domäne von WAVE2, aber nicht durch die GST-Kontrolle präzipitiert werden. Im Vergleich zu der eingesetzten Menge von Biotin-Aktin wurde jedoch nur ein geringer Teil durch GST-WAVE2-V gebunden. Die Zugabe von 0,1-10  $\mu$ g der rekombinanten RPEL-Domäne von MRTF-A führte zu einer deutlichen Reduktion des präzipitierten Biotin-Aktins (Abb. 20A). Dabei verringerte sich die Anzahl der GST-WAVE2-V:Aktin-Komplexe um bis zu 70%, wohingegen die Menge an ungebundenem biotinyliertem Aktin anstieg (Abb. 20C, D).



**Abbildung 20: Konkurrenz von MRTF-A(2-261) mit den GST-WH2-Domänen aus WAVE2 und Spire2 um die Bindung an biotinyliertes Skelettmuskellaktin.**

A, B: Dargestellt sind die Western Blot-Resultate des GST pulldowns von Biotin-Aktin durch die GST-V-Fusionen von WAVE2 (A) und Spire2 (B) unter Zugabe von 0-10 µg der rekombinanten RPEL-Domäne von MRTF-A (MRTF-A(2-261)). Gereinigtes GST wurde als Negativkontrolle verwendet. Zudem wurde eine Probe des eingesetzten Biotin-Aktins (50 ng) aufgetragen. Die Western Blots zeigen die präzipitierten (GST pulldown) und ungebundenen Proteine (Durchfluss). Die Detektion von Biotin-Aktin erfolgte mit Hilfe eines Alexa Fluor 680-konjugiertem Streptavidins, wohingegen die GST-Proteine und die rekombinante RPEL-Domäne durch einen anti-GST- und anti-MRTF-A(2-261)-Antikörper nachgewiesen wurden. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. C, D: Die relative Menge von WH2-präzipitierten (C) und ungebundenen (D) biotinylierten Aktin wurde in An- und Abwesenheit von MRTF-A(2-261) bestimmt. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM (n = 3) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die auf 1 gesetzte Kontrolle ohne MRTF-A(2-261)-Zugabe mit \* p ≤ 0,05 und \*\* p ≤ 0,01.

Nach Immobilisierung der WH2-Domäne (B) von Spire2 konnte nahezu 1/10 der eingesetzten Menge von Biotin-Aktin präzipitiert werden (Abb. 20B). Im Vergleich zu der WH2-Domäne

von WAVE2 wies GST-Spire2-V(B) somit bereits in Abwesenheit von MRTF-A(2-261) eine deutlich höhere Affinität zu Aktin auf (Abb. 20A, B). Nach Zugabe ansteigender Mengen von MRTF-A(2-261) konnte eine dosisabhängige Zunahme des ungebundenen Biotin-Aktins beobachtet werden, wohingegen die Menge an präzipitierten Aktin nahezu unverändert blieb (Abb. 20B, C, D). Möglicherweise konnten die geringfügigen Unterschiede in der Menge des gebundenen biotinylierten Skelettmuskelaktins durch die hohe Affinität dieser WH2-Domäne zu Aktin und der zu geringen Sensitivität des Assays nicht detektiert werden.

Anhand dieser Daten konnte eine direkte Konkurrenz der rekombinanten RPEL-Domäne von MRTF-A und den isolierten WH2-Domänen von WAVE2 und Spire2 um die Bindung an monomeres Aktin gezeigt werden.

Zusammenfassend wurde in Ko-Immünpräzipitations- (3.3.1) und GST *pulldown*-Experimenten (3.3.2) nachgewiesen, dass MRTF-A und aus unterschiedlichen Aktinbindeproteinen isolierte WH2-Regionen um die Interaktion mit G-Aktin konkurrieren. Durch Zugabe der rekombinanten GST-V/VCA-Fusionsproteine nach Zelllyse bzw. unter ausschließlicher Verwendung gereinigter Komponenten kann eine Aktinnukleation durch die WH2-Domänen als zugrundeliegender Mechanismus der Komplexdissoziation ausgeschlossen werden.

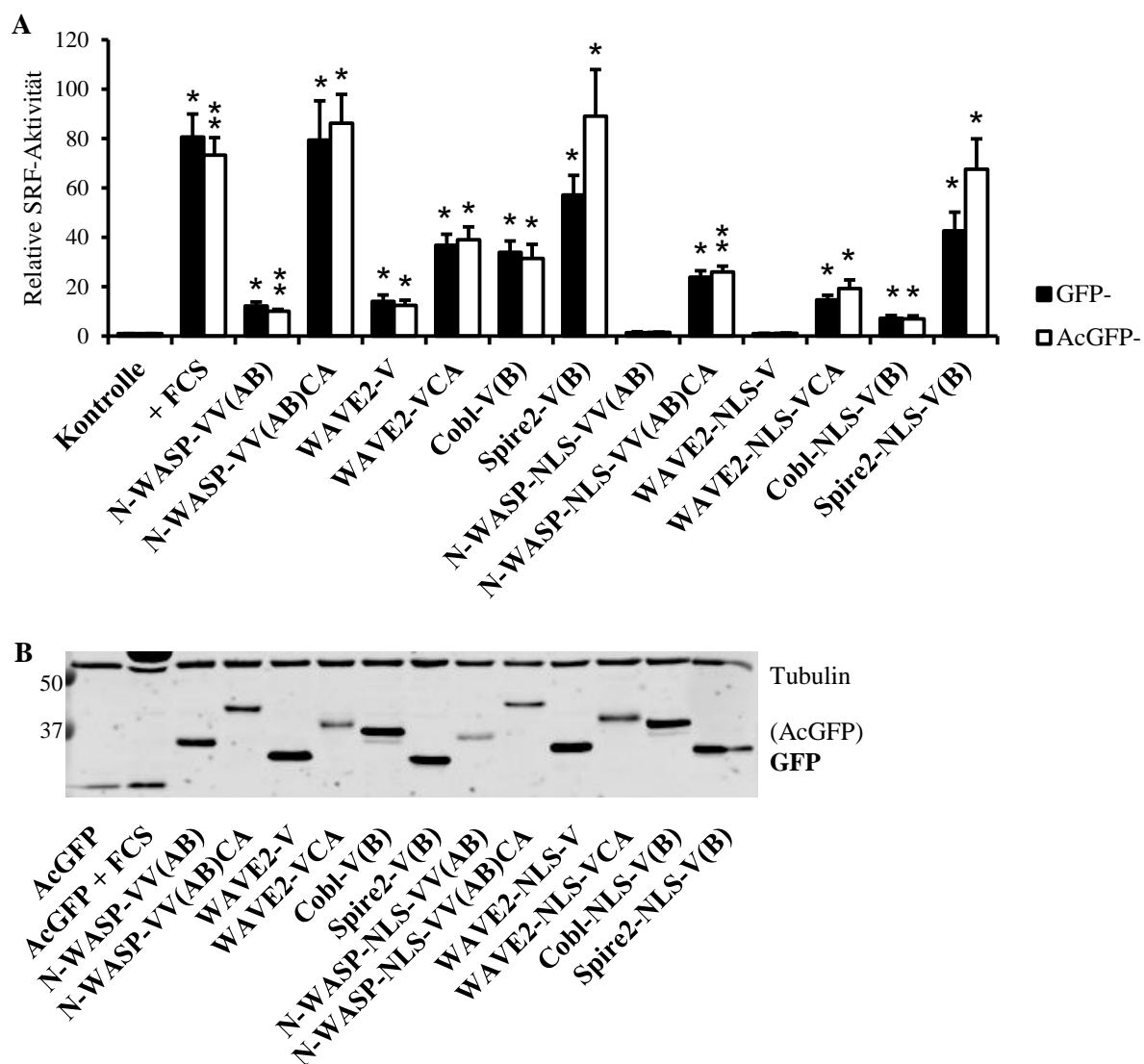
### **3.4. Untersuchungen zum Ausschluss einer WH2-vermittelten Aktinpolymerisation als Grundlage für die Aktivierung des MRTF-SRF-Signalweges**

In bisherigen Studien wurde gezeigt, dass die Aktivierung des MRTF-SRF-Signalweges mit der Modulation der zellulären Aktindynamik korreliert (Sotiropoulos *et al.*, 1999; Miralles *et al.*, 2003). Dabei spielen die WH2-Regionen der verwendeten Aktin-Nukleatoren eine große Rolle in der Gestaltung des Aktinzytoskeletts. Deshalb sollte untersucht werden, ob eine durch die GFP-V/VCA-Fusionsproteine induzierte Polymerisation von monomeren G- zu filamentösen Aktin (F-Aktin) Grundlage für die beobachtete MRTF-SRF-Aktivität war.

#### **3.4.1. Kein Einfluss der N-terminalen GFP-Fusion auf die WH2-induzierte MRTF-SRF-Aktivität**

Es ist bereits bekannt, dass eGFP und andere GFP-Varianten unter bestimmten Bedingungen wie z.B. einer hohen Proteinkonzentration zur Ausbildung von Dimeren neigen (Zacharias *et al.*, 2002; Snapp *et al.*, 2003). Anhand von Gelfiltrations- und Dichtegradientenzentrifugationsexperimenten wurde jedoch gezeigt, dass aus *Aequorea coerulea* isoliertes GFP

eine monomere Struktur aufweist (Produktdatenblatt pAcGFP1, Takara Bio Europe S.A.S.). Durch eine Dimerisierung des N-terminalen eGFPs wäre die Bildung von WH2-basierten Nukleationskeimen möglich, die zu einer aktivierten Aktinpolymerisation und einer damit verbundenen MRTF-SRF-Induktion führen könnten. Deshalb wurde zusätzlich das pAcGFP1-C2-Vektorssystem verwendet, da die entstehenden AcGFP-V/VCA-Fusionsproteine als Monomere vorliegen (Abb. 6). Im Anschluss sollte die Wirkung der WH2-Domänen mit N-terminaler GFP- und AcGFP-Fusion auf die MRTF-SRF-Aktivität untersucht werden.



**Abbildung 21: Vergleichbare Aktivierung des MRTF-abhängigen SRF-Reporters nach Expression von GFP- und AcGFP-V/VCA-Fusionsproteinen.**

A: NIH 3T3-Zellen wurden mit den dargestellten V/VCA-Varianten sowie den Reporterplasmiden p3D.A.-Luc und pRL-TK unter Serumentzug transfiziert. Die Stimulation der Kontrollzellen (+ FCS) erfolgte mit 15% (v/v) FCS für 7 h. Zur Bestimmung der relativen SRF-Aktivität wurde die gemessene *Firefly*- auf die *Renilla* Luziferase Aktivität normalisiert. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM ( $n = 3$ ) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die jeweilige GFP- oder AcGFP-Leervektorkontrolle (GFP/AcGFP = 1) mit \*  $p \leq 0,05$  und \*\*  $p \leq 0,01$ . Die Analyse mit Hilfe eines ungepaarten Zweistichproben t-Tests ergab keine statistische Signifikanz im Vergleich zwischen den GFP- und den zugehörigen AcGFP-Fusionsproteinen (Daten nicht gezeigt). B: Dargestellt ist der Western Blot der in (A) gemessenen Lysate zur Kontrolle der AcGFP-V/VCA-Expression, welche mit Hilfe eines anti-GFP-Antikörpers detektiert wurden. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Die AcGFP- und GFP-Fusionen wurden in NIH 3T3-Zellen exprimiert und die Aktivierung des SRF-Reporters anhand von Luziferase-Reporterassays bestimmt (Abb. 21A). Außerdem wurde die Expression und korrekte Größe der AcGFP-Varianten mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens überprüft (Abb. 21B).

Wie in Abbildung 21A dargestellt, konnte für alle V/VCA-Proteine eine signifikante Induktion der MRTF-SRF-Aktivität in Bezug zur unstimulierten Kontrolle detektiert werden. Dabei wiesen die AcGFP- und GFP-Fusionsproteine eine vergleichbare Aktivierung des SRF-Reporters auf. Zwischen den verwendeten AcGFP- und GFP-V/VCA-Varianten wurde nach statistischer Analyse kein signifikanter Unterschied detektiert (Daten nicht gezeigt).

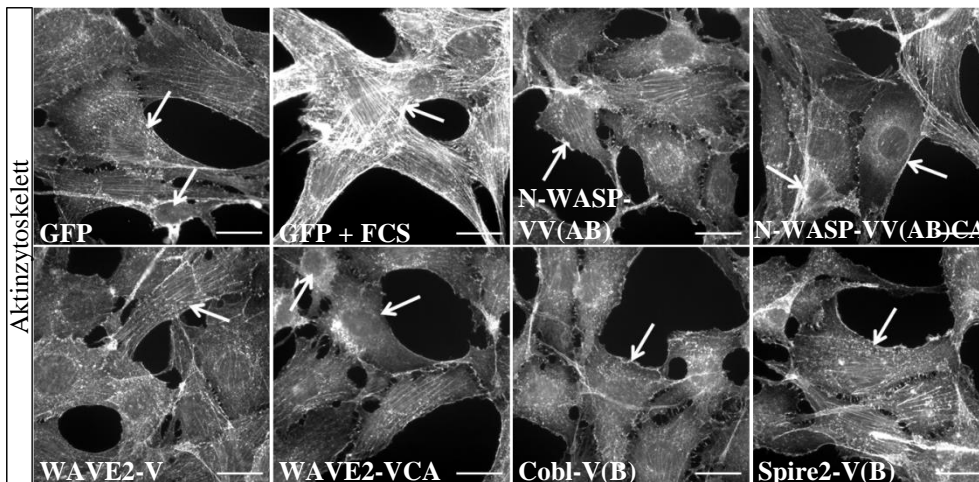
Daher konnte ein Einfluss der N-terminalen GFP-Fusion auf die beobachtete MRTF-SRF-Induktion ausgeschlossen werden. Somit wird die Aktivierung der MRTF-SRF-abhängigen Genexpression über die WH2-Domänen selbst und nicht über die Entstehung von Nukleationskeimen und einer damit verbundenen Filamentneubildung vermittelt.

### **3.4.2. Analyse des Aktinzytoskeletts nach Expression von isolierten WH2-Fusionsproteinen**

Eine Möglichkeit, eine Veränderung in der Bildung von Aktinfilamenten (Stressfasern) nachzuweisen, ist die spezifische Anfärbung von F-Aktin mit dem fluoreszenzmarkierten Phallotoxin Phalloidin.

Die GFP-V/VCA-Fusionsproteine mit und ohne nukleärem Lokalisationssignal (NLS) wurden in NIH 3T3-Zellen unter Serumentzug exprimiert und das Aktinzytoskelett mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen durch den F-Aktin-Marker Phalloidin analysiert (Abb. 22, Abb. 23, Anhang 5, Anhang 6). Dabei wurden für die mikroskopischen Aufnahmen gleiche Belichtungszeiten verwendet.

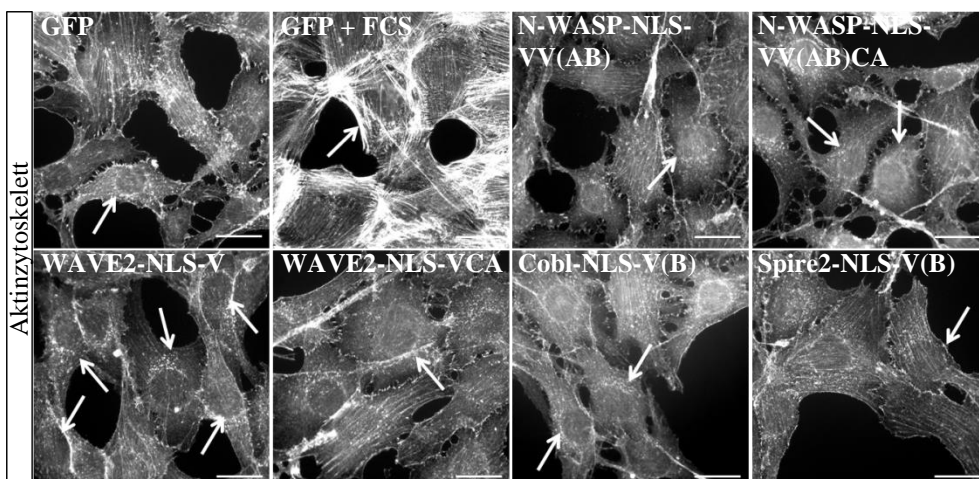
Während die unstimulierte GFP-Kontrolle ein diffuses Phalloidinsignal mit einer geringen Anzahl von Aktinfilamenten aufwies, konnte nach Serumstimulation (GFP + FCS) eine deutliche Zunahme von Stressfasern beobachtet werden (Abb. 22, Abb. 23). Zellen, welche die isolierten WH2-Domänen aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 exprimierten, wiesen im Vergleich zu den untransfizierten Nachbarzellen keine verstärkte Bildung von Aktinfilamenten auf (Abb. 22). Auch in Anwesenheit der CA-Region von N-WASP und WAVE2, welche für die Interaktion und Aktivierung der Arp2/3-vermittelten Aktinnukleation benötigt werden, konnte keine Zunahme von Stressfasern beobachtet werden (Abb. 22).



**Abbildung 22: Keine erhöhte Bildung von Aktinfilamenten nach Expression der isolierten GFP-V/VCA-Fusionsproteine aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2.**

Die dargestellten WH2-Varianten wurden unter Serumtzug in NIH 3T3-Zellen transfiziert. Die Darstellung des Aktinzytoskeletts erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin. Im Vergleich wurden unstimulierte und stimulierte (GFP + FCS) GFP-Kontrollzellen untersucht. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden unter gleichen Bedingungen mit einem 63x Öl-Objektiv aufgenommen. Die GFP-positiven Zellen wurden durch Pfeile (→) markiert. Die zugehörigen Aufnahmen von detektiertem GFP, Phalloidin und DAPI sind in Anhang 5 dargestellt. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ .

In bisherigen Studien konnte die Existenz filamentöser Aktinstrukturen im Zellkern nachgewiesen werden (Baarlink *et al.*, 2013; Kokai *et al.*, 2014). Dagegen führte die Expression der GFP-NLS-V-Fusionsproteine zu keiner Veränderung des Aktinzytoskeletts im Vergleich zu den benachbarten, untransfizierten Kontrollzellen (Abb. 23). Auch für N-WASP-NLS-VV(AB)CA und WAVE2-NLS-VCA konnte keine verstärkte Bildung von Aktinfilamenten nachgewiesen werden (Abb. 23).



**Abbildung 23: Unverändertes Aktinzytoskelett nach Überexpression von NLS-WH2-Varianten.**

Nach Transfektion der aufgeführten NLS-V/VCA-Fusionsproteine aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 in unstimulierte NIH 3T3-Zellen erfolgte die Anfärbung von F-Aktin durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin mittels Immunfluoreszenzfärbungen. GFP-Kontrollzellen (GFP + FCS) wurden mit 15% (v/v) FCS für 1 h stimuliert. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde ein 63x Öl-Objektiv verwendet und die GFP-exprimierenden Zellen mit Pfeilen (→) gekennzeichnet. Eine Übersicht der für diese Abbildung verwendeten Aufnahmen ist in Anhang 6 dargestellt. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ .



Zusammenfassend wurde nach Expression von GFP-V/VCA-Fusionsproteinen mit und ohne nukleärem Lokalisationssignal (NLS) keine Zunahme von filamentösen Aktin beobachtet. Diese Daten deuten darauf hin, dass die verwendeten WH2-Varianten keine Bildung von Aktinpolymeren induzieren und die MRTF-SRF-Aktivität somit direkt beeinflussen könnten.

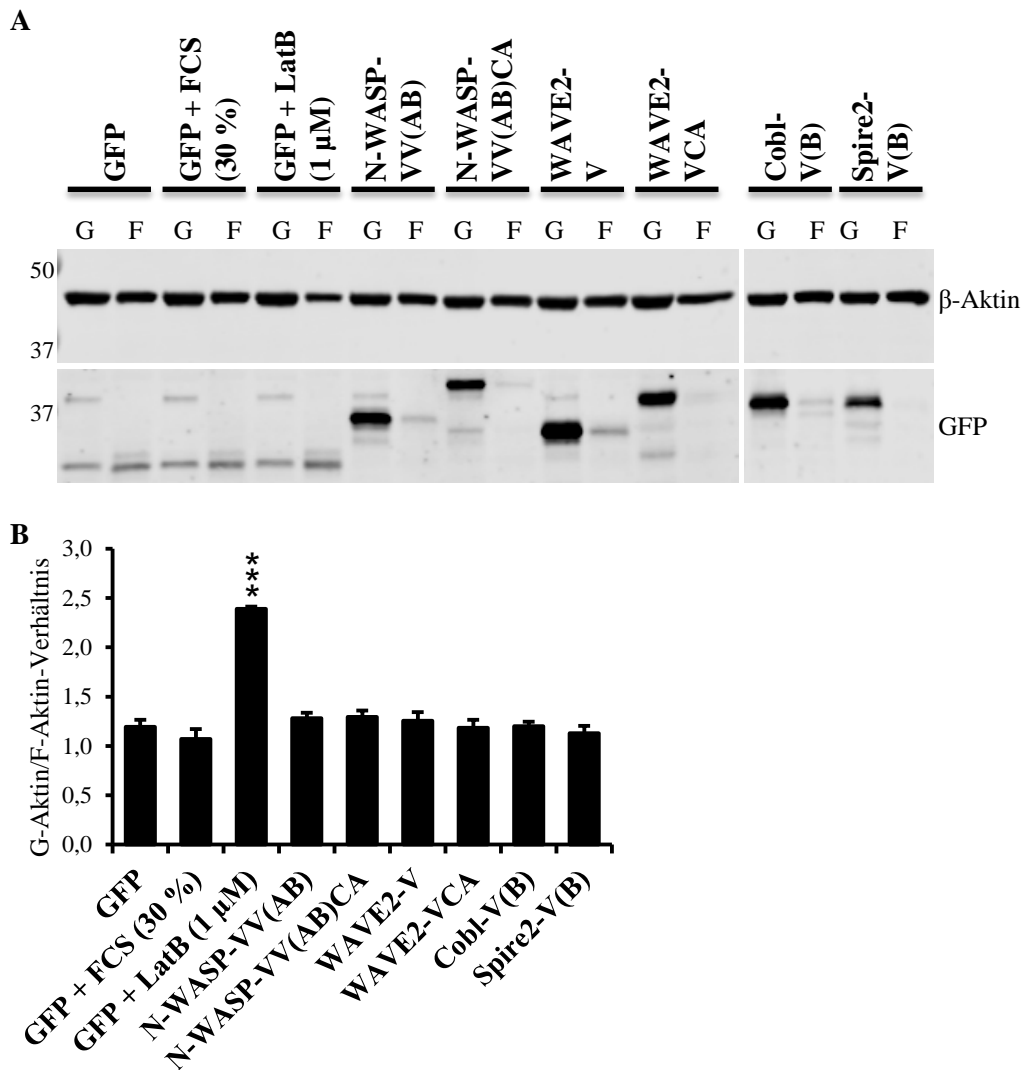
### **3.4.3. Untersuchung des zellulären G-/F-Aktin-Gehalts in Anwesenheit von GFP-V/VCA-Domänen aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2**

Aktin-Nukleatoren können über ihre V/VCA-Regionen die Entstehung eines neuen Filaments induzieren, welche in der Abnahme von Aktinmonomeren resultiert. Ein damit einhergehender Zerfall der inhibitorischen Komplexe von G-Aktin und MRTF-A könnte Ursache für die beobachtete Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Transkription durch WH2-Fusionsproteine sein. Aufgrund der Wirkung WH2-enthaltender NPFs wie WASP oder N-WASP wurde bereits ein direkter Zusammenhang zwischen einer abfallenden Aktinmonomerkonzentration durch verstärkte Filamentbildung und der Induktion von SRF postuliert (Sotiropoulos *et al.*, 1999). Daher wurde eine durch Aktinpolymerisation vermittelte Reduktion des G-Aktin-Pools und dem damit verbundenen Anstieg von filamentösen Aktin nach Überexpression der GFP-V/VCA-Fusionsproteine mit Hilfe einer G-Aktin-/F-Aktin-Fraktionierung untersucht. Bei diesem Verfahren wird zelluläres Aktin nach Extraktion mit Triton X-100 und anschließender Ultrazentrifugation in die lösliche G-Aktin-Fraktion und die F-Aktin-enthaltende Pelletfraktion separiert (Posern *et al.*, 2002).

Für die Analyse wurden die WH2-Varianten von N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 eingesetzt. Nach Expression der GFP-V/VCA-Fusionsproteine in NIH 3T3-Zellen wurde der relative Gehalt von monomerem zu filamentösem Aktin mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens bestimmt (Abb. 24). Außerdem erfolgte die Behandlung der GFP-Kontrollzellen mit Serum (GFP + FCS) sowie dem Zytoskelettinhibitor Latrunculin B (LatB, GFP + LatB), um Veränderungen der F-Aktin- (FCS) oder G-Aktin (LatB)-Fraktion nachzuweisen. Nach Serumstimulation konnte eine geringfügige Reduktion des Verhältnisses von zellulärem G- zu F-Aktin beobachtet werden, während die Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch Latrunculin B zu einem Anstieg des G-Aktin-Pools führte (Abb. 24). Außerdem wurde gezeigt, dass die Expression isolierter WH2-Domänen sowie der VCA-Fusionsproteine von N-WASP und WAVE2 keine signifikante Änderung des G-Aktin-/F-Aktin-Gehalts im Vergleich zur unstimulierten GFP-Kontrolle verursachte (Abb. 24).

Zusammenfassend konnte kein Anstieg der zellulären F-Aktin-Fraktion durch überexprimierte GFP-V/VCA-Regionen detektiert werden. Aufgrund der hohen Menge von zellulärem Aktin

sowie der Effizienz einer transienten Transfektion kann ein geringer Einfluss der WH2-Proteine jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dennoch ist anzunehmen, dass die Wirkung der verwendeten V/VCA-Fusionsproteine auf MRTF-SRF nicht hauptsächlich auf einer verstärkten Bildung von filamentösen Aktin basiert.

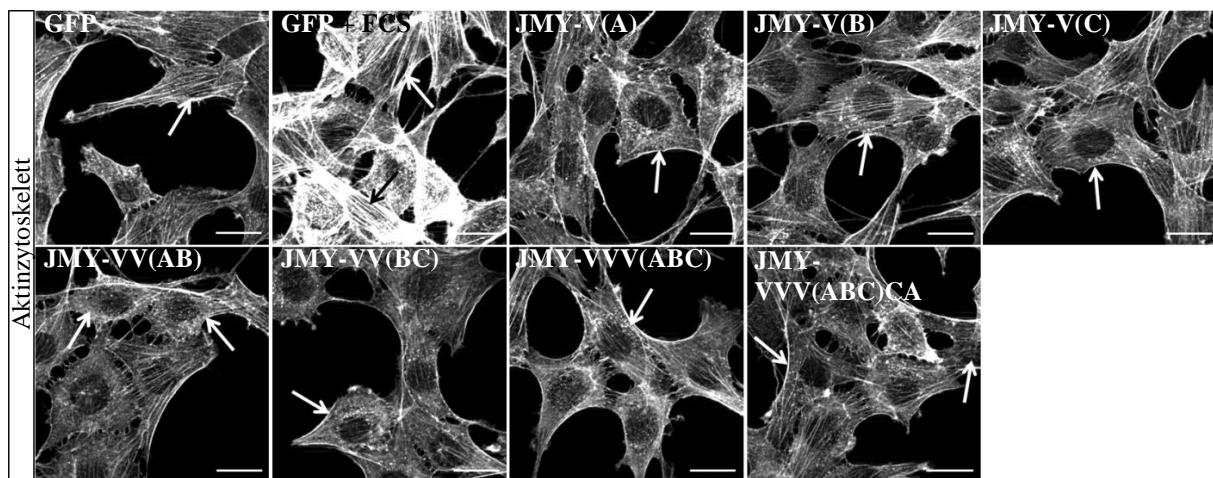


**Abbildung 24: Fraktionierung von zellulären G- und F-Aktin nach Überexpression von GFP-V/VCA-Fusionsproteinen aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2.**

A: NIH 3T3-Zellen wurden mit den dargestellten GFP-Varianten transfiziert und anschließend 24 h unter Serumentzug inkubiert. GFP-Kontrollzellen wurden mit 30% (v/v) FCS (GFP + FCS) oder mit 1 μM Latrunculin B (GFP + LatB) behandelt. Nach Zellextraktion erfolgte die Trennung der G- und F-Aktin-enthaltenden Fraktion mittels Ultrazentrifugation. Für die Analyse wurden gleiche Volumina der Fraktionen aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines β-Aktin- bzw. GFP-spezifischen Antikörpers. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. B: Das relative Verhältnis von G-Aktin- zu F-Aktin in GFP-V/VCA-exprimierenden Zellen wurde durch Quantifizierung der Western Blots bestimmt. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM (n = 3) sowie die statistische Signifikanz des ungepaarten Zweistichproben t-Tests in Bezug auf die unstimulierte GFP-Kontrolle mit \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 3.4.4. Analyse des Aktinzytoskeletts in JMY-V/VVVCA-exprimierenden Zellen

Wie bereits beschrieben, wurde nach Überexpression der isolierten WH2-Varianten aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 keine Zunahme von F-Aktin im Vergleich zu den umliegenden, untransfizierten Kontrollzellen beobachtet (Abb. 22). Zuchero *et al.* (2009) wiesen jedoch auf eine Beteiligung von JMY und dessen WH2-Domänen bei der Bildung filamentöser Aktinstrukturen hin. Daher wurde eine mögliche verstärkte Ausbildung von Stressfasern durch isolierte JMY-V/VVVCA-Fusionsproteine untersucht (Abb. 25, Anhang 7).



**Abbildung 25: Keine Veränderung des Aktinzytoskeletts in JMY-V/VVVCA-transfizierten NIH 3T3-Zellen.**

Die GFP-Fusionsproteine wurden unter Serumentzug in NIH 3T3-Zellen exprimiert. Nach Stimulation von GFP-Kontrollzellen (GFP + FCS) wurden Aktinfilamente mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin durch Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 63x Öl-Objektiv unter gleichen Bedingungen. Durch Pfeile (→) wurden GFP-positive Zellen gekennzeichnet. Die zugrundeliegenden Aufnahmen der detektierten GFP-Proteine und der mit DAPI angefärbten DNA sind in Anhang 7 aufgeführt. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ .

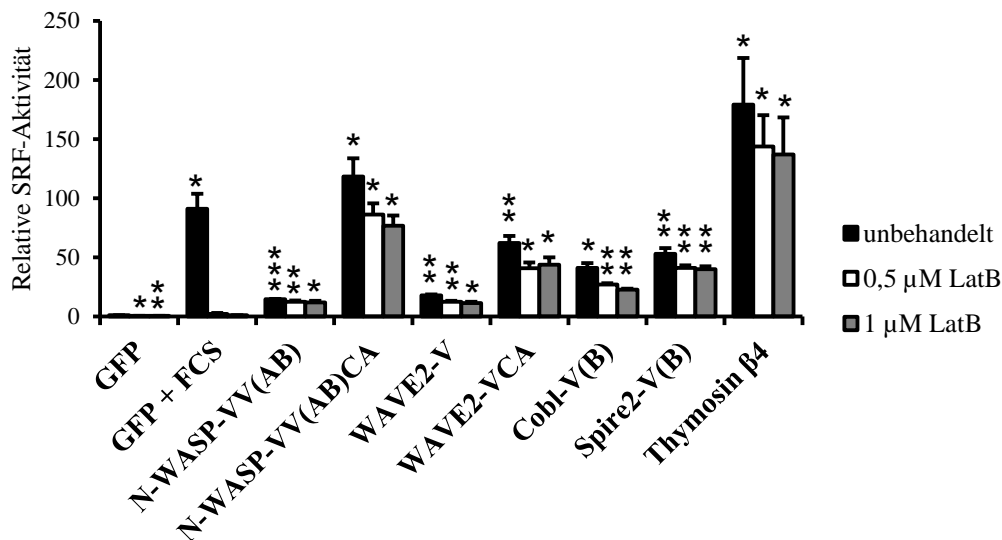
Im Gegensatz zu der bereits beobachteten massiven Zunahme F-Aktin-positiver Stressfasern nach Serumstimulation konnte keine durch einzelne WH2-Domänen (V(A, B oder C)) vermittelte Veränderung des Aktinzytoskeletts nachgewiesen werden (Abb. 25). Auch in Anwesenheit mehrerer WH2-Domänen sowie dem C-terminalen JMY-VVV(ABC)CA-Fragment wurde keine erhöhte Bildung von Stressfasern beobachtet.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnte daher gezeigt werden, dass auch isolierte JMY-V/VVVCA-Fusionsproteine keinen erkennbaren Anstieg von filamentösem Aktin unter unstimulierten Bedingungen verursachen. Diese Daten implizieren, dass sowohl einzelne als auch mehrfache isolierte WH2-Regionen von JMY die MRTF-SRF-Aktivität nicht indirekt über eine verstärkte Aktinpolymerisation stimulieren.

### 3.4.5. Polymerisationsunabhängige Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Transkription durch WH2-Fusionsproteine

Wie anhand der bisherigen Daten gezeigt werden konnte, führte die Expression von GFP-V/VCA-Fusionsproteinen aus N-WASP, WAVE2, Cobl, Spire2 und JMY zu keiner sichtbaren Veränderung des Aktinzytoskeletts. Eine Validierung der Ergebnisse erfolgte durch Messung der SRF-Aktivität unter Verwendung des Zytoskeletthinhibitors Latrunculin B (LatB). In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Latrunculin B zu einer Hemmung der G-Aktin:MRTF-A-Komplexdissoziation sowie einer damit verbundenen SRF-Aktivierung führt (Sotiropoulos *et al.*, 1999; Miralles *et al.*, 2003). Zudem wurde nach Latrunculin B-Behandlung ein Anstieg des zellulären G-Aktin-Pools beobachtet, welcher auf der Depolymerisation von F-Aktin beruht (Abb. 24). Daher wurde der Einfluss der isolierten WH2-Varianten auf die SRF-Aktivität nach Inhibition der Aktinpolymerisation untersucht.

Die GFP-V/VCA-Fusionsproteine aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 wurden in NIH 3T3-Zellen exprimiert und die Induktion des SRF-Reporters unter Verwendung ansteigender Konzentrationen (0,5-1  $\mu$ M LatB) von Latrunculin B durch Luziferase-Reporterassays bestimmt (Abb. 26). In Übereinstimmung mit vorherigen Daten konnte die SRF-Aktivierung in serumstimulierten GFP-Kontrollzellen (GFP + FCS) durch Latrunculin B-Behandlung inhibiert werden (Abb. 26; Sotiropoulos *et al.*, 1999). Dagegen wurde in Thymosin  $\beta$ 4-transfizierten Zellen keine dosisabhängige Reduktion des SRF-Reporters nach Latrunculin B-Zugabe detektiert. Wie in Abbildung 26 gezeigt, führte die Expression der WH2-Domänen von N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 auch unter depolymerisierenden Bedingungen zu einem signifikanten Anstieg der SRF-Aktivität. Darüber hinaus konnte in Anwesenheit der Arp2/3-interagierenden CA-Region sowohl für N-WASP-VV(AB)CA als auch für WAVE2-VCA eine deutliche Induktion des SRF-Reporters im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen detektiert werden (Abb. 26). Auch für die simultan gemessenen isolierten GFP-NLS-V-Fusionen von Cobl und Spire2 sowie die nukleär-lokalisierten VCA-Regionen von N-WASP und WAVE2 wurde trotz depolymerisierender Bedingungen ein Anstieg der SRF-Aktivität beobachtet (Anhang 8).

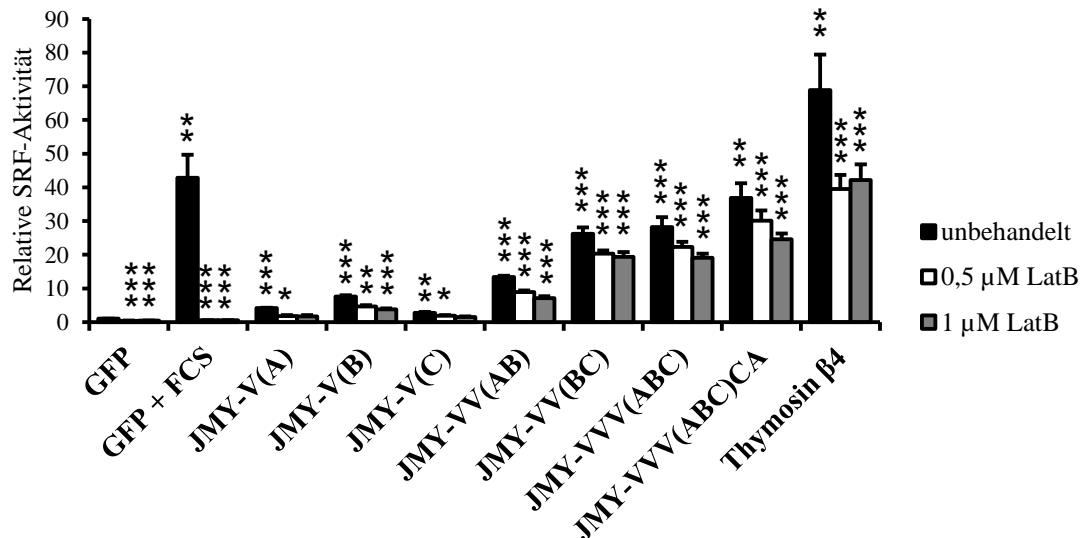


**Abbildung 26: Nukleationsunabhängige Induktion der MRTF-SRF-Aktivität durch isolierte GFP-V/VCA-Varianten aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2.**

Die dargestellten GFP-V/VCA-Regionen und Thymosin  $\beta$ 4 wurden mit dem SRF-Reporterplasmid (p3D.A.-Luc) und dem *Renilla* Luziferase-Kontrollplasmid (pRL-TK) in NIH 3T3-Zellen unter Serumentzug ko-transfiziert. Anschließend wurde die relative SRF-Aktivität nach Zugabe von 0,5-1  $\mu$ M Latrunculin B (LatB) in GFP-V/VCA- und serumstimulierten GFP-Kontrollzellen (GFP + FCS) bestimmt. Dafür erfolgte die Normalisierung der gemessenen *Firefly*- auf die *Renilla* Luziferase Lumineszenz. Die Daten der simultan gemessenen nukleär-lokaliserten WH2-Varianten sind im Anhang 8 aufgeführt. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM (n = 3) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die unbehandelte GFP-Kontrolle (GFP = 1) mit \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Wie bereits für die isolierten GFP-V/VCA-Varianten von N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 beschrieben, wurde der Einfluss überexprimierter WH2-Varianten von JMY unter depolymerisierenden Bedingungen mittels Luziferase-Reporterassays überprüft (Abb. 27). In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen wurde der SRF-Reporter in der unstimulierten und stimulierten GFP-Negativkontrolle durch Latrunculin B-Zugabe gehemmt, wohingegen isolierte WH2-Domänen eine schwache SRF-Aktivität sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Latrunculin B induzierten (Abb. 27). Fusionsproteine, welche mindestens zwei WH2-Domänen besaßen, wiesen eine signifikante Aktivierung des SRF-Reporters unter Zugabe ansteigender Konzentrationen von Latrunculin B auf. Zudem konnte eine starke Induktion der SRF-Aktivität nach Überexpression eines C-terminalen JMY-Fragments (JMY-VVV(ABC)CA) trotz Latrunculin B-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen detektiert werden (Abb. 27).

Zusammenfassend wurde eine Stimulation des MRTF-SRF-abhängigen Reporters durch überexprimierte WH2-Regionen aus verschiedenen Aktinbindeproteinen auch unter depolymerisierenden Bedingungen nachgewiesen. Daher ist anzunehmen, dass der Hauptteil der beobachteten WH2-abhängigen MRTF-SRF-Induktion unabhängig von der zellulären F-Aktin-Dynamik ist.



**Abbildung 27: Polymerisationsunabhängige MRTF-SRF-Aktivierung durch JMY-V/VVVCA-Fusionsproteine.**

NIH 3T3-Zellen wurden mit den aus JMY isolierten GFP-V/VVVCA-Regionen oder Thymosin  $\beta$ 4 sowie den Reporterplasmiden p3D.A.-Luc und pRL-TK unter unstimulierten Bedingungen ko-transfiziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit ansteigenden Mengen Latrunculin B (0,5-1  $\mu$ M LatB) für 7,5 h. GFP-Kontrollzellen (GFP + FCS) wurden zusätzlich mit 15% (v/v) FCS für 7 h stimuliert. Die relative SRF-Aktivität wurde durch Normalisierung der gemessenen *Firefly*- auf die *Renilla* Luziferase Aktivität bestimmt. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM (n = 5) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die unbehandelte GFP-Kontrolle (GFP = 1) mit \* p  $\leq$  0,05, \*\* p  $\leq$  0,01 und \*\*\* p  $\leq$  0,001.

### 3.4.6. Konkurrenz von WH2-Domänen mit immunpräzipitierten Komplexen aus MRTF-A und unpolymerisierendem Aktin-R62D

Das durch Mutation von Arginin (R) zu Aspartat (D) an Position 62 nicht-polymerisierende  $\beta$ -Aktin R62D führt aufgrund des fehlenden Einbaus in das Aktinpolymer zu einer Erhöhung des zellulären G-Aktin-Pools (Posern *et al.*, 2002). Zudem wurde nachgewiesen, dass Aktin-R62D und MRTF-A direkt miteinander interagieren und somit die SRF-vermittelte Transkription reduzieren (Posern *et al.*, 2002; Miralles *et al.*, 2003). Parallel zu dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen von J. Weißbach zeigten, dass eine Serumstimulation trotz der nicht-polymerisierenden Eigenschaften dieser Aktinmutante zu einer Dissoziation der Aktin-R62D:MRTF-A-Komplexe führt (Weißbach & Schikora *et al.*, 2016). Da eine zugrundeliegende Aktinpolymerisation unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden kann, sollte eine Beteiligung von WH2-Proteinen in diesem Prozess untersucht werden. Mit Hilfe von Ko-IP-Experimenten und anschließender Western Blot-Analyse wurde der Einfluss rekombinanter GST-V/VCA-Fusionsproteinen auf die Dissoziation der Aktin-R62D:MRTF-A-Komplexe untersucht (Abb. 15, Abb. 28).

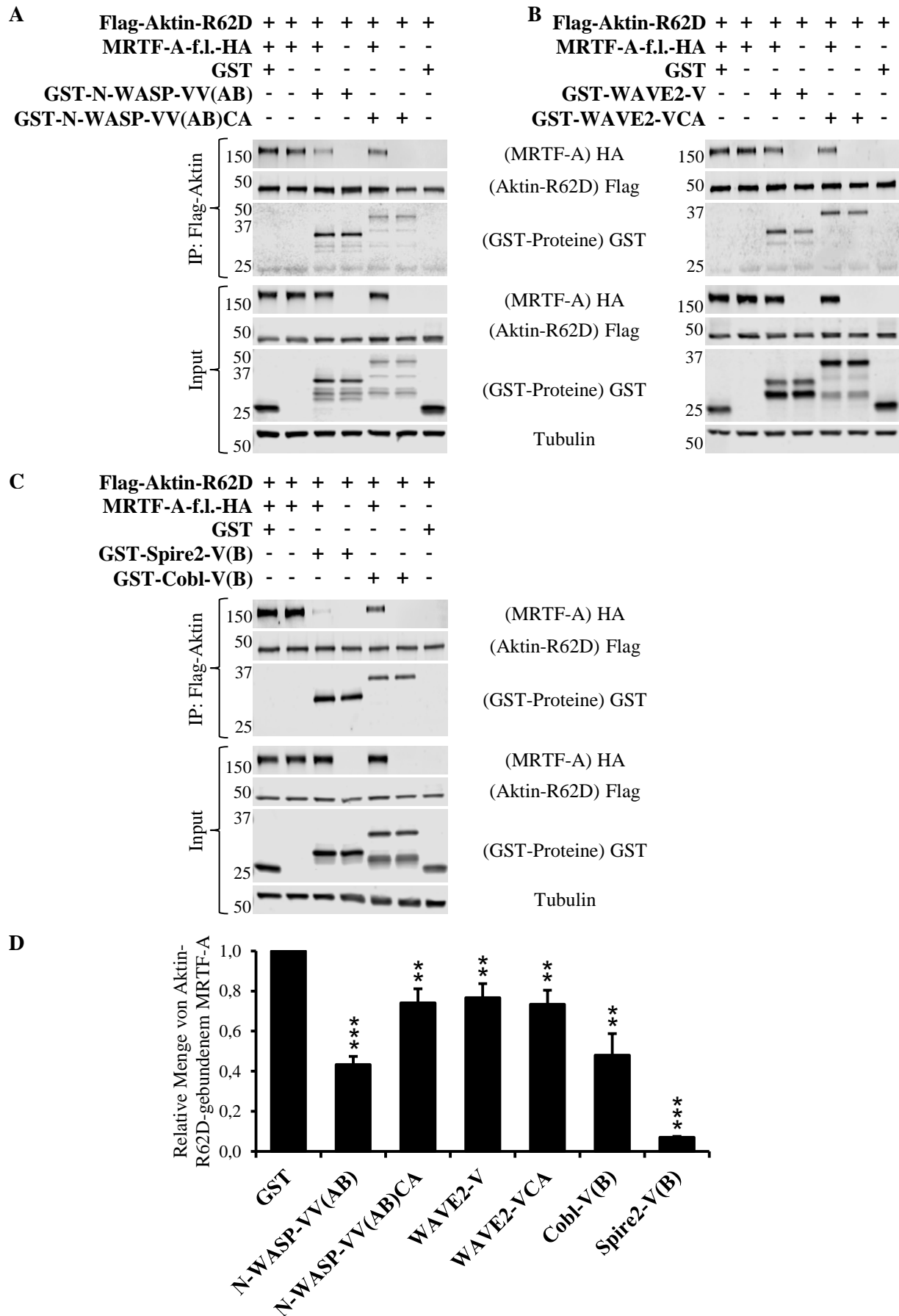


Abbildung 28: Dissoziation immunpräzipitierter Flag-Aktin-R62D:MRTF-A-Komplexe durch rekombinante GST-V/VCA-Fusionsproteine.

A-C: Flag-Aktin-R62D sowie MRTF-A-f.l.-HA wurden in NIH 3T3-Zellen unter unstimulierten Bedingungen inkubiert und nach Zelllyse durch magnetische anti-Flag M2 *beads* präzipitiert. Währenddessen erfolgte die Zugabe von gereinigten GST-V/VCA-Fusionsproteinen aus N-WASP (A), WAVE2 (B) sowie Cobl und Spire2 (C). Als Kontrolle wurde rekombinantes GST verwendet. Die Proteine wurden anhand von anti-HA-, anti-Flag-, anti-GST- und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern nachgewiesen. Die Western Blots zeigen die detektierten Proteinbanden der Immunpräzipitation (IP: Flag-Aktin) sowie des Ausgangsmaterials (Input). Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. D: Dargestellt ist die Quantifizierung der präzipitierten Aktin-R62D:MRTF-A-Komplexe nach Zugabe der verschiedenen V/VCA-Regionen. Für die Berechnung wurde die Menge des gebundenen und eingesetzten MRTF-A im Verhältnis zum präzipitierten Flag-Aktin-R62D berücksichtigt. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM ( $n \geq 6$ ) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die GST-Kontrolle (GST = 1) mit \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Wie in Abbildung 28 gezeigt, wurden für die Kompetitionsstudien die GST-V/VCA-Regionen von N-WASP (A) und WAVE2 (B) sowie die isolierten WH2-Domänen von Cobl und Spire2 (C) eingesetzt. Die präzipitierten Proteinproben (IP: Flag-Aktin) und das Ausgangsmaterial (Input) wurden auf das Gel aufgetragen und die Proteine mit den *Tag*- bzw. proteinspezifischen Antikörpern detektiert. Als Negativkontrolle wurde gereinigtes GST eingesetzt, das die Menge der gebundenen Aktin-R62D:MRTF-A-Komplexe nicht signifikant beeinflusste (Abb. 28A-C, vgl. Spur 1 und 2). Die isolierten WH2-Domänen von N-WASP sowie GST-N-WASP-VV(AB)CA führten zu einer starken Verringerung von präzipitierten MRTF-A-f.l.-HA (Abb. 28A). Im Vergleich zur GST-Kontrolle konnten nach Zugabe von GST-N-WASP-VV(AB) und -N-WASP-VV(AB)CA lediglich 40%-70% der Aktin-R62D:MRTF-A-Komplexe detektiert werden (Abb. 28D).

Außerdem wurde der Einfluss von GST-WAVE2-V und -WAVE2-VCA auf die Menge der Aktin-R62D:MRTF-A-Komplexe untersucht (Abb. 28B). Nach Zugabe der isolierten WH2-Domäne sowie dem zugehörigen VCA-Fragment konnte eine vergleichbare Reduktion von gebundenem MRTF-A-f.l.-HA um bis zu 30% detektiert werden (Abb. 28B, D).

Die Interaktion von MRTF-A-f.l.-HA und Aktin-R62D wurde nach Zugabe der isolierten WH2-Domänen von Cobl und Spire2 deutlich reduziert (Abb. 28C). Dabei wurde eine Abnahme der präzipitierten Aktin-R62D:MRTF-A-Komplexe im Vergleich zur GST-Negativkontrolle um 50% für Cobl-V(B) und um über 90% für Spire2-V(B) beobachtet (Abb. 28D).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die untersuchten GST-V/VCA-Regionen die Bindung von MRTF-A-f.l.-HA an Aktin-R62D in unterschiedlichem Maße beeinflussen. Dabei wies WAVE2-V den schwächsten und Spire2-V(B) den stärksten Effekt auf. Darüber hinaus wurden sowohl für Aktin-WT als auch für die nicht-polymerisierende Aktinmutante Aktin-R62D vergleichbare Resultate in Bezug auf das Kompetitionspotential der WH2-Fusionen beobachtet (vgl. Abb. 16E und Abb. 28D). Anhand dieser Daten konnte eine direkte Wirkung der verwendeten V/VCA-Regionen auf die Dissoziation inhibitorischer G-Aktin:MRTF-A-Komplexe gezeigt werden, welche unabhängig von einer verstärkten Aktinpolymerisation ist.



## 4. Diskussion

### 4.1. Direkte Konkurrenz von WH2-Domänen und MRTF-A um die Bindung von G-Aktin

MRTFs liegen unter unstimulierten Bedingungen im Komplex mit monomerem Aktin inaktiviert vor und werden während der Rho-vermittelten Umgestaltung des Zytoskeletts freigesetzt (Miralles *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde die postulierte Konkurrenz von WH2-Domänen und MRTF um die Aktinbindung als zugrundeliegender Mechanismus für die Dissoziation und Aktivierung von MRTFs untersucht. Dabei lag der Fokus auf der Regulation von MRTF-A, welches im Vergleich zu MRTF-B eine verstärkte Expression in NIH 3T3-Zellen aufweist (Seifert & Posern, 2017).

In dieser Arbeit wurden isolierte WH2-Domänen aus verschiedenen Aktinbindeproteinen verwendet (Abb. 6). Diese sind für die Assoziation mit Aktin notwendig und binden u.a. zwischen der ersten und dritten Subdomäne eines Aktinmonomers (Abb. 1B; Chereau *et al.*, 2005). Für die Analyse wurden einerseits ausgewählte WH2-Domänen von Spire2 und Cobl verwendet, deren starke Aktinbindung bereits bekannt ist (M.M. Kessels, persönliche Mitteilung; Ahuja *et al.*, 2007). Zudem wurden WH2-Varianten von N-WASP, WAVE2 und JMY untersucht. Diese sind aufgrund ihrer spezifischen zellulären Regulation (siehe auch 1.1.2.3.1) durch Autoinhibition (Kim *et al.*, 2000; Rohatgi *et al.*, 2000), der Interaktion mit Aktin (Zuchero *et al.*, 2012) oder als Teil eines regulatorischen Proteinkomplexes (Gautreau *et al.*, 2004) von besonderem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass WH2-Domänen und MRTF-A direkt um die Interaktion mit monomerem Aktin konkurrieren. So wurde anhand von Ko-IP-Experimenten nachgewiesen, dass isolierte WH2-Varianten von N-WASP, WAVE2, Cobl, Spire2 und JMY die Bindung von MRTF-A an G-Aktin reduzieren (Abb. 16, Abb. 17). Ähnliche Ergebnisse konnten zeitgleich mit dieser Arbeit für Thymosin  $\beta$ 4 beobachtet werden (Morita & Hayashi, 2013). Das Konkurrenzpotential der verwendeten WH2-Domänen variierte dabei deutlich. Wie in Abbildung 16E gezeigt, wurde eine starke Dissoziation der G-Aktin:MRTF-A-Komplexe von 90% für die zweite WH2-Domäne von Spire2 nachgewiesen, während GST-WAVE2-V einen wesentlich schwächeren Effekt hatte. Ursache dafür sind voraussichtlich die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der WH2-Domänen zu Aktin.

Dieses differierende Konkurrenzpotential wurde auch in den durchgeführten GST *pull-down*-Experimenten beobachtet. Dabei führte die Zugabe der rekombinanten RPEL-Domäne von

MRTF-A zu einer dosisabhängigen Reduktion von N-WASP- oder WAVE2-V/VCA-gebundenem Aktin, während die Menge des präzipitierten Aktins der WH2-Domänen von Cobl und Spire2 nicht beeinflusst wurde (Abb. 19B). In weiterführenden Experimenten wurde auch eine Konkurrenz von MRTF-A(2-261) mit Spire2-V(B) nachgewiesen (Abb. 20B, D). Unter den dabei verwendeten, zellfreien Bedingungen konnte zudem eine Aktinnukleation durch WH2-Domänen sowie der Einfluss weiterer zellulärer Faktoren ausgeschlossen werden (Abb. 20). MRTF-A und isolierte WH2-Domänen konkurrieren daher direkt um die Assoziation mit Aktinmonomeren.

In dieser Arbeit wurde somit beobachtet, dass die Zugabe von WH2-Domänen zur Dissoziation der Aktin:MRTF-A-Komplexe führt, während die zugegebene MRTF-A-RPEL-Domäne eine Reduktion von Aktin:WH2-Komplexen induzierte. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass WH2-Domänen und die RPEL-Region von MRTF-A nicht nur dieselbe Interaktionsfläche eines Aktinmonomers teilen (Abb. 1B; Mouilleron *et al.*, 2008), sondern zudem eine ähnliche Affinität zu G-Aktin aufweisen. Diese liegt für die einzelnen MRTF-A-RPEL-Motive im mikromolaren Bereich und wird im Fall der vollständigen RPEL-Domäne deutlich verstärkt (Posern *et al.*, 2004; Mouilleron *et al.*, 2008; Guettler *et al.*, 2008). Für verschiedene isolierte WH2-Domänen wurden ähnliche Affinitäten im nanomolaren bzw. niedrigem mikromolaren Bereich bestimmt (Mattila *et al.*, 2003; Chereau *et al.*, 2005; Ahuja *et al.*, 2007; Gaucher *et al.*, 2012; Rasson *et al.*, 2015). Die hier beobachtete gegenseitige Konkurrenz zwischen MRTF-A und den unterschiedlichen WH2-Regionen resultiert daher vermutlich aus deren vergleichbaren Bindungsaffinitäten zu Aktin.

Ein störender Einfluss des N-terminalen GST auf die durchgeführten Ko-IP-Experimente ist unwahrscheinlich. Zwar führt die Fusion von GST an die VCA-Regionen von WAVE1, WASP und N-WASP zur Ausbildung von Homodimeren, die in einer erhöhten nukleationsfördernden Aktivität der Proteinvarianten resultiert (Higgs & Pollard, 2000; Padrick *et al.*, 2008). Die in den Abschnitten 3.3.1 und 3.4.6 beschriebenen Versuche zeigten jedoch eine nahezu identische Reduktion der inhibitorischen Komplexe von MRTF-A mit Aktin-WT bzw. der nicht-polymerisierenden Aktinmutante Aktin-R62D durch Zugabe der WH2-Domänen von N-WASP, WAVE2, Cobl oder Spire2 (vgl. Abb. 16E und Abb. 28D). Eine verstärkte Bildung von F-Aktin als Grundlage für die hier beobachtete Dissoziation der G-Aktin:MRTF-A-Komplexe konnte somit ausgeschlossen werden.

Studien der eigenen Arbeitsgruppe beschäftigten sich bereits mit der Fragestellung, welche Proteine in serumstimulierten Fibroblasten verstärkt an Aktin binden und somit die Frei-

setzung von MRTFs induzieren (Dissertation Shaposhnikov, 2013). Nach Isotopenmarkierung neusynthetisierter, zellulärer Proteine mit schweren oder leichten Aminosäuren mit Hilfe der SILAC (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*)-Methode erfolgte die Präzipitation Flag-Aktin-gebundener Proteine aus den unstimulierten oder stimulierten NIH 3T3-Zellen, gefolgt von der massenspektrometrischen Proteomanalyse (Dissertation Shaposhnikov, 2013). Dabei lag der Arp2/3-Komplex nach Serumstimulation verstärkt an Aktin gebunden vor, während zeitgleich G-Aktin:MRTF-Komplexe abnahmen. Ein verändertes Verhalten der nukleationsfördernden WH2-Domänen-Proteine WAVE2 oder N-WASP, aber auch anderen Nukleatoren wie Forminen konnte nicht detektiert werden. Die demnach mögliche kompetitive Funktion des Arp2/3-Komplexes auf die Ausbildung der G-Aktin:MRTF-Komplexe widerspricht jedoch den Ergebnissen dieser Arbeit. So konnte ein Einfluss weiterer zellulärer Faktoren und eine Aktinnukleation z.B. unter ausschließlicher Verwendung gereinigter Komponenten als zugrundeliegender Mechanismus der Komplexdissoziation ausgeschlossen werden (Abb. 20). Zudem wurde die MRTF-SRF-Aktivierung durch WH2-Domänen auch unter depolymerisierenden Bedingungen beobachtet (Abb. 26, Abb. 27, siehe auch 4.3) und konnte, wie von J. Weißbach gezeigt, trotz eines Arp2/3-Inhibitors oder -siRNA durch die WH2-Proteine N-WASP und WAVE2 induziert werden (Weissbach & Schikora *et al.*, 2016). Somit kann die Freisetzung von MRTF-A aus den reprimierenden G-Aktin:MRTF-Komplexen nicht ausschließlich Arp2/3-vermittelt erfolgen.

Klasse I NPFs, zu denen N-WASP und WAVE2 gehören, sind zusammen mit dem Arp2/3-Komplex für die Bildung von verzweigten Aktinstrukturen notwendig (1.1.2.3.1). Nach initiiertem Verzweigen verbleibt der Arp2/3-Komplex am Mutter- und Tochterfilament, wohingegen NPFs dissoziieren (Egile *et al.*, 2005). Damit zusammenhängend wurde bereits vermutet, dass WH2-Domänen-NPFs aufgrund der Kürze ihrer Interaktion mit Flag-Aktin in der bereits beschriebenen massenspektrometrischen Proteomanalyse nicht erfasst wurden (Dissertation Shaposhnikov, 2013). Auch in den durchgeführten Ko-IP-Experimenten dieser Arbeit konnte eine korrespondierende Zunahme der aktin-gebundenen WH2-Proteine nicht beobachtet werden (Abb. 16, Abb. 28). Eine Detektion der ansteigenden WH2:Aktin-Komplexe könnte jedoch aufgrund einer Sättigung des immunpräzipitierten Flag-Aktins durch die hohe Zugabe der GST-Proteine sowie eine zu geringe Sensitivität des Assays nicht möglich sein. In GST *pull-down*-Experimenten wurde tatsächlich eine Korrelation zwischen dem Abfall des Aktin:WH2-(WAVE2)-Komplexes und einer Zunahme des ungebundenen Aktins, das teilweise in Form eines Aktin:MRTF-A-Komplexes vorliegen sollte, beobachtet (vgl. Abb. 20C

und D). Daher ist es denkbar, dass auch nach Serumstimulation ein transienter Anstieg von WH2-gebundenem Aktin erfolgt, der auf der Konkurrenz und Freisetzung von MRTF beruht.

Die verwendeten WH2-Varianten wiesen eine unterschiedliche Affinität zu Aktin auf. In zellfreien GST *pulldown*-Experimenten konnte beispielsweise im Vergleich zu GST-Spire2-V(B) nur ein geringer Teil des eingesetzten Aktins durch GST-WAVE2-V präzipitiert werden (vgl. Abb. 20A und -B). Die Aminosäuresequenz variiert zwischen den individuellen WH2-Domänen (Anhang 1; Dominguez, 2007). Die Affinität und Funktion des Bindemotivs wird dabei hauptsächlich durch die hydrophoben Seitenketten der  $\alpha$ -Helix, aber auch durch elektrostatische Wechselwirkungen mit G-Aktin bestimmt (Chereau *et al.*, 2005; Didry *et al.*, 2012). So besteht eine im Vergleich zu der korrespondierenden WIP-Region verstärkte Aktinbindung der WH2-Domäne von WAVE2, die auf der Bildung von Salzbrücken über das konservierte LRRV-Motiv beruht (Chereau *et al.*, 2005). Bisher wurde nur die Affinität der zweiten WH2-Domäne des Spire-Proteins aus *D. melanogaster* zu Aktin publiziert ( $K_D = 0,09 \mu\text{M}$ ; Rasson *et al.*, 2015). Diese spiegelt jedoch nicht die hier beobachtete starke Konkurrenz zwischen Spire2-V(B) und MRTF-A wider. Die WH2-Region von Spire aus *D. melanogaster* und dem Maushomolog Spire2 ist konserviert und weist nur geringfügige Abweichungen in der Aminosäuresequenz der zweiten WH2-Domäne auf (Quinlan *et al.*, 2005). Die in dieser Arbeit verwendete Spire2-V(B)-Variante enthielt jedoch zusätzlich die umliegenden Linkersequenzen. Zwar beeinträchtigt deren jeweilige Substitution nicht die Nukleationsfähigkeit des *D. melanogaster*-spezifischen Spire-Proteins (Quinlan *et al.*, 2005). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass diese zu einer verstärkten Affinität zu Aktin beitragen.

Es ist bereits bekannt, dass Sequenzen innerhalb und außerhalb der WH2-Region einen wesentlichen Einfluss auf die Affinität und Funktion des Proteins besitzen. Durch Mutations- und *domain swapping*-Analysen mit einem aktiven Cobl-Fragment wurde gezeigt, dass die Reihenfolge der WH2-Motive und die Aminosäuresequenz der ersten WH2-Domäne entscheidend für die *severing*- und Nukleationsfähigkeit von Cobl sind (Jiao *et al.*, 2014). Dagegen wurde die Affinität zu Aktin hauptsächlich über die Länge und Sequenz der WH2-Motive bestimmt. Auch die Linkerregionen selbst tragen zur Funktion der WH2-Proteine bei. Die Substitution des zweiten Linkers von JMY oder des dritten Linkers von Spire reduzierte die WH2-vermittelte Nukleation. Dagegen konnte nach Einführung der Linkerregionen von JMY oder Spire eine nukleierende Funktion der WH2-Region von N-WASP detektiert werden (Zuchero *et al.*, 2009). Aufgrund ihrer niedrigen Sequenzhomologie und um eine räumliche Behinderung durch GST/GFP zu vermeiden, enthielten die hier verwendeten WH2-Domänen

daher neben dem WH2-Motiv auch umliegende Sequenzelemente, die z.T. durch einen zusätzlichen Glycin-Serin-Linker erweitert wurden (JMY-WH2). Somit sollte ein möglicher Affinitäts- und/oder Funktionsverlust vermieden werden.

Die gereinigte VV(AB)CA-Region von N-WASP wies sowohl in den durchgeführten Ko-IP- als auch in den GST *pulldown*-Experimenten ein schwaches Kompetitionspotential auf (Abb. 16E, Abb. 19B). Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die zentrale Region (C) die Affinität der WH2-Domänen aus humanem N-WASP nicht beeinflusste, während diese im Kontext der vollständigen VCA-Domäne durch das saure Motiv (A) verringert wurde (Gaucher *et al.*, 2012). Diese Daten könnten den in dieser Arbeit beobachteten geringen Effekt der gereinigten VCA-Domäne von N-WASP erklären. Demnach ist anzunehmen, dass diese Aktin mit verringerter Affinität als die zugehörige WH2-Region bindet und somit ein schwächeres Kompetitionspotential hat. Dagegen verstärken im Zellmodell möglicherweise zusätzliche Faktoren die Assoziation mit Aktin, welche die Konkurrenz mit MRTF-A begünstigen würden. Diese könnte in Folge in der hohen SRF-Aktivierung durch die überexprimierte GFP-VCA-Domäne von N-WASP resultieren (siehe z.B. Abb. 7A). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine partielle Degradation oder eine Fehlfaltung zu der verringerten Aktivität des gereinigten Fusionsproteins führte.

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Zugabe der isolierten WH2-Domänen von N-WASP in einer starken Reduktion von Flag-Aktin-gebundenem MRTF-A resultierte. Dagegen wurde im GST *pulldown*-Assay ein deutlich schwächeres Kompetitionspotential von GST-N-WASP-VV(AB) gegenüber der rekombinanten RPEL-Domäne von MRTF-A gezeigt (vgl. Abb. 16E und Abb. 19B). Gaucher *et al.* (2012) beobachteten in Bezug auf die WH2-Region von N-WASP, dass sich Aktin mit hoher Affinität zunächst an ein WH2-Motiv anlagert, während die Bindung eines zweiten Monomers deutlich langsamer verläuft. Liegt Aktin im Überschuss vor, werden zwei Aktinmonomere gebunden, während im entgegengesetzten Fall die Bildung eines 1:1-Komplexes dominiert (Gaucher *et al.*, 2012). Diese Daten könnten den scheinbaren Widerspruch zwischen den beschriebenen Ergebnissen der Ko-IP- und GST *pulldown*-Experimente erklären. Dabei könnte aufgrund der begrenzten Menge von Flag-Aktin die Bildung eines hochaffinen 1:1 (Aktin:WH2)-Komplexes überwiegen, während im GST *pulldown*-Assay endogenes Aktin überwog und das immobilisierte GST-N-WASP-VV(AB) limitierend war. Im Vergleich zu der isolierten RPEL-Domäne wäre jedoch auch eine geringere Affinität von Gesamtlängen-MRTF-A zu Aktin möglich. Diese könnte in Folge in einem schwächeren Kompetitionspotential gegenüber den isolierten WH2-Domänen von N-WASP resultieren.

Auch JMY-WH2-Domänen unterschieden sich in ihrer Fähigkeit, Flag-Aktin zu binden (Abb. 17A). Obwohl diese in einem deutlichen Überschuss eingesetzt wurden, konnte in Anwesenheit von MRTF-A nur ein geringer Teil der einzelnen WH2-Domänen durch Aktin gebunden werden. Dagegen wiesen JMY-Varianten, die mindestens zwei WH2-Domänen besaßen, eine deutlich bessere Aktinbindung und ein starkes Kompetitionspotential gegenüber gebundenem MRTF-A auf (Abb. 17B). Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für den Aktin-Nukleator Spire beschrieben. Rasson *et al.* (2015) zeigten, dass bereits die Anwesenheit einer zweiten WH2-Domäne die Affinität für die Anlagerung eines weiteren G-Aktins um das 20fache verstärkte. Auch für die RPEL-Region von MRTF-A wird eine kooperative Bindung von Aktin postuliert (Guettler *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Ko-IP-Experimente implizieren eine kooperative Funktion der WH2-Domänen von JMY während der Bindung von Aktinmonomeren. Die daraus resultierende erhöhte Affinität könnte das verstärkte Kompetitionspotential mehrfacher JMY-WH2-Motive gegenüber MRTF-A erklären.

Die Affinität der WH2-Motive zu Aktin wird hauptsächlich durch die Aminosäuresequenz ihrer  $\alpha$ -Helix am N-Terminus bestimmt und wird zusätzlich durch umliegende Sequenzelemente beeinflusst. Aufgrund der Degradationsanfälligkeit der GST-Fusionsproteine erfolgte eine Bestimmung der jeweiligen Affinitäten zu Aktin bisher nicht. Trotz der beschriebenen Limitierungen im Hinblick auf die schwierige Eingrenzung des WH2-Aktinbindemotivs sowie dem beobachteten Proteinabbau könnten anhand der Ergebnisse der Ko-IP- und GST *pulldown*-Experimente für die gereinigten WH2-Domänen folgende Bindungsaffinitäten abgeleitet werden:

$$K_D(\text{Spire2-V(B)}) < K_D(\text{Cobl-V(B)}) < K_D(\text{N-WASP-VV(AB)}) \leq K_D(\text{WAVE2-V})$$

Dabei hat die zweite WH2-Domäne von Spire2 die höchste Bindungsaffinität zu Aktin und somit den niedrigsten  $K_D$ -Wert. Dagegen wiesen die WH2-Domänen von N-WASP und WAVE2 eine geringere Affinität auf. Für N-WASP-VV(AB) ist diese Einordnung wegen der widersprüchlichen Resultate der Ko-IP- und GST *pulldown*-Experimente nur bedingt möglich. Aufgrund der hier beobachteten gegenseitigen Konkurrenz ist aber anzunehmen, dass N-WASP-VV(AB), WAVE2-V und MRTF-A eine vergleichbare Affinität zu Aktin aufweisen.

Guettler *et al.* (2008) bestimmten die Bindungsaffinitäten Fluoreszeinisothiozyanat-gekoppelter RPEL-Motive zu Aktin durch Fluoreszenzanisotropiestudien. Unter Verwendung gekoppelter und ungekoppelter Peptide könnten wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Ausbildung und Dissoziation der MRTF:Aktin- bzw. WH2:Aktin-Komplexe erhalten werden.

Unter Zugabe ungekoppelter WH2-Peptide sollte sich die Bindung des fluoreszenzmarkierten RPEL-Motivs zu Aktin verringern, während die Zugabe des ungekoppelten RPEL-Motivs die Bildung des WH2:Aktin-Komplexes inhibieren sollte. Somit könnte bestimmt werden, wie sich die Affinität des jeweiligen Komplexes nach Zugabe des Kompetitorpeptides ändert. Dieses Verfahren wird bereits in Wettbewerbsstudien erfolgreich eingesetzt (Reindl *et al.*, 2009). Aufgrund der Länge der in dieser Arbeit verwendeten WH2-Domänen müsste jedoch eine stärkere Eingrenzung erfolgen.

## 4.2. Die Lokalisation der MRTF-SRF-Aktivierung durch WH2-Domänen

Die Stimulus-vermittelte Dissoziation inhibitorischer G-Aktin:MRTF-A-Komplexe resultiert in der nukleären Translokation von MRTF-A (Abb. 5). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass überexprimierte WH2-Fusionsproteine bereits unter Serumentzug eine Freisetzung und eine damit verbundene Akkumulation von MRTF-A in den Zellkern induzieren können (Abb. 12-Abb. 14). Dasselbe Phänomen wurde auch in anderen Studien nach Überexpression von WAVE2 und N-WASP beobachtet (Miralles *et al.*, 2003; Weissbach & Schikora *et al.*, 2016). Dennoch ist bereits bekannt, dass eine nukleäre Translokation von MRTF-A nicht zwingend mit einer Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Genexpression verbunden ist. So kann MRTF-A in verschiedenen Zelltypen wie primären hippocampalen und kortikalen Neuronen (Kalita *et al.*, 2006), Glattmuskel- (Du *et al.*, 2004) und Brustkarzinomzellen (Medjkane *et al.*, 2009) im Zellkern nachgewiesen werden. Die SRF-Aktivierung durch MRTF wird jedoch auch im Nukleus durch Aktin reguliert (Posern *et al.*, 2002; Vartiainen *et al.*, 2007). Die Ergebnisse im Abschnitt 3.1 zeigten aber, dass ein MRTF-abhängiger SRF-Luziferasereporter nach Überexpression verschiedener WH2-Fusionsproteine induziert wird. Dabei wurde zudem eine Korrelation zwischen der detektierten SRF-Aktivität und der nukleären Translokation von MRTF-A durch die WH2-Varianten beobachtet (vgl. z.B. Abb. 7A mit Abb. 12B). Somit resultiert die WH2-vermittelte Kernakkumulation von MRTF-A auch in einer Aktivierung der MRTF-SRF-abhängigen Transkription und wird nicht durch nukleäres Aktin inhibiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Transkription von endogenem  $\alpha$ -Glattmuskelaktin durch verschiedene V/VCA-Proteine unter Serumentzug aktiviert wird (Abb. 8, Abb. 11). Bereits in der Vergangenheit konnten mit Hilfe einer Transkriptomanalyse G-Aktin-abhängige MRTF-SRF-Zielgene wie SRF, Integrin  $\alpha 5$ , Vinculin oder verschiedene Aktinisoformen identifiziert und validiert werden (Descot *et al.*, 2009). Eine starke Induktion wurde

dabei für  $\alpha$ -Glattmuskelaktin nachgewiesen. Somit besitzen WH2-Domänen eine funktionelle Rolle während der Freisetzung von MRTF und der Stimulierung der MRTF-SRF-vermittelten Genexpression. Diese könnte einen wichtigen Regulationsmechanismus der zellulären Homöostase darstellen. So postulierten Salvany *et al.* (2014), dass die Hauptfunktion der MRTF-SRF-abhängigen Transkription die Kontrolle der Aktinexpression ist, die über das invasive Verhalten einer Zelle entscheidet. WH2-Domänen-Nukleatoren wären somit nicht nur Teil der zellulären Aktinpolymerisationsmaschinerie, sondern würden gleichzeitig durch Konkurrenz mit MRTF-A einen wichtigen Schritt innerhalb der Aktinbiosynthese kontrollieren.

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Überexpression isolierter WH2-Varianten zur nukleären Akkumulation von endogenem MRTF-A und zur Induktion der MRTF-SRF-vermittelten Genexpression führte (Abschnitte 3.1 und 3.2). Einige der hier verwendeten WH2-Domänen-Proteine können auch Funktionen im Zellkern übernehmen. JMY ist zusammen mit p300 und Strap (*serine/threonine-kinase-receptor-associated protein*) für eine Aktivierung von p53 unter zellulären Stressbedingungen wichtig (Shikama *et al.*, 1999; Demonacos *et al.*, 2001). Spire-Proteine (-1/-2) generieren in Verbindung mit Formin2 nach Behandlung mit dem genotoxischen Reagenz Methylmethansulfonat nukleäre Aktinfilamente, welche für den DNA-Reparatur-Prozess notwendig sind (Belin *et al.*, 2015). Auch N-WASP kann sowohl im Zytoplasma als auch im Kern detektiert werden (Miki *et al.*, 1996). In den durchgeführten Analysen wurde nur nach Überexpression der isolierten kernlokalisierten WH2-Domänen von Cobl und Spire2 eine signifikante, nukleäre Akkumulation von MRTF-A beobachtet (Abb. 13). Diese resultierte auch in einer Induktion des SRF-Reporters (Abb. 9A). Insgesamt wiesen die NLS-WH2-Fusionsproteine von N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2 ein geringes Potential der MRTF-SRF-Aktivierung auf. Daher erfolgt die postulierte kompetitive Funktion von WH2-Proteinen auf die Dissoziation der G-Aktin:MRTF-A-Komplexe vermutlich hauptsächlich im Zytoplasma.

Für die NLS-VCA-Regionen von WAVE2 und N-WASP wurde im Gegensatz zu den zugehörigen WH2-Domänen ein Anstieg von kernlokalisiertem MRTF-A und eine Aktivierung von SRF detektiert (Abb. 9A, Abb. 13). Es ist bereits bekannt, dass isolierte VCA-Regionen den Arp2/3-Komplex binden und aktivieren (Yamaguchi *et al.*, 2000). Verschiedene Studien postulieren, dass N-WASP gemeinsam mit dem Arp2/3-Komplex die nukleäre Aktinpolymerisation kontrolliert und somit eine wichtige Funktion für den Transkriptionsprozess der RNA-Polymerase II besitzt (Wu *et al.*, 2006; Yoo *et al.*, 2007). Die Ursache für die hier beobachtete nukleäre Akkumulation von MRTF-A und die SRF-Aktivierung durch die NLS-VCA-



Regionen von N-WASP und WAVE2 könnte somit eine stimulierte Aktinpolymerisation sein. In diesem Zusammenhang wurde in verschiedenen Studien bereits eine direkte Verbindung zwischen der MRTF-SRF-Aktivierung und der Bildung von Aktinfilamenten im Zellkern nachgewiesen. Formine der mDia-Familie sind für die Polymerisation nukleären Aktins während der Serumstimulation oder der Integrinaktivierung bei der Zellspreizung notwendig, die wiederum in einer nukleären Translokation von MRTF-A und der SRF-Aktivierung resultiert (Baarlink *et al.*, 2013; Plessner *et al.*, 2015). Dennoch ist die SRF-Stimulation durch Serum nicht vollständig mDia-abhängig (Baarlink *et al.*, 2013). Eine weitere Studie zeigte, dass MRTF-A im Zellkern an das filamentassoziiierende Protein Filamin A bindet. Dieser Komplex interagiert mit nukleärem F-Aktin, das vermutlich durch mDia generiert wird, und wird bei stimulierter Aktinpolymerisation für die Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Genexpression rekrutiert (Kircher *et al.*, 2015). Übereinstimmend mit den Daten dieser Arbeit erfolgte die F-Aktinbildung im Zellkern jedoch nicht durch die kernlokalisierte isolierte VCA-Region von N-WASP, sondern wird vermutlich ausschließlich durch Formine der mDia-Familie vermittelt (Abb. 23; Baarlink *et al.*, 2013). Zwar wurde in den hier durchgeführten Luziferasereporterassays nach Latrunculin B-Behandlung eine Reduktion der SRF-Reporteraktivität um ein Drittel (N-WASP-NLS-VV(AB)CA) bzw. um die Hälfte (WAVE2-NLS-VCA) beobachtet (Anhang 8). Dennoch wiesen diese Fusionsproteine eine deutliche Induktion von SRF im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen auf. Daher wäre eine funktionelle Rolle von WH2-Domänen-Proteinen auf die Dissoziation des G-Aktin:MRTF-A-Komplex im Zellkern möglich. Diese wäre zudem größtenteils polymerisationsunabhängig. Aufgrund des schwachen Kompetitionspotentials der kernlokalisierten WH2-Varianten wird nukleäres MRTF jedoch vermutlich hauptsächlich durch Formine freigesetzt.

JMY enthält in der WH2-Region ein Kernlokalisierungssignal, das durch Assoziation mit Aktin maskiert ist (Abb. 6; Zuchero *et al.*, 2012). Die Autoren postulierten, dass die prolinreiche Domäne, welche vor der ersten WH2-Domäne von JMY angrenzt, für die Aktinbindung und der damit verbundenen Regulation des Proteins notwendig ist. Die isolierte WH2-Region verhielt sich dabei wie eine JMY-Mutante, deren Interaktion mit Aktin durch eingeführte Punktmutationen nicht möglich ist, und war überwiegend kernlokalisiert (Zuchero *et al.*, 2012). Dagegen wurde in dieser Arbeit anhand von Ko-IP-Experimenten gezeigt, dass sowohl einzelne als auch mehrfache WH2-Domänen von JMY an Flag-Aktin binden konnten (Abb. 17A). Dennoch waren die GFP-Fusionsproteine ubiquitär in der Zelle verteilt und wiesen keine eindeutige Lokalisation auf (Anhang 4, Anhang 7). Dieses Verhalten wurde auf die geringe Größe und einer damit verbundenen passiven Diffusion in den Zellkern zurückgeführt (Terry

*et al.*, 2007). Möglicherweise ist die WH2-Region dennoch nicht ausreichend durch endogenes Aktin gesättigt, da eine partielle Aktinbindung an die dritte WH2-Domäne den Importin- $\alpha/\beta$ -vermittelten Kernimport des Proteins nicht verhindert (Zuchero *et al.*, 2012). Die Wahl eines größeren Fusionspartners könnte die passive Diffusion der WH2-Varianten von JMY in den Zellkern verhindern. Die Pyruvatkinase ist beispielsweise ein zytoplasmatisches Protein, das nur in Verbindung mit einem nukleären Lokalisationssignal in den Kern gelangen kann (Kalderon *et al.*, 1984). Ein Fusionsprotein der isolierten RPEL-Domäne (Molekulargewicht < 40 kDa) aus MRTF-A mit der Pyruvatkinase oder mit einem zweifachen GFP wies dieselbe Aktin-kontrollierte Translokation zwischen Zytoplasma und Zellkern wie das Gesamtlängenprotein auf (Guettler *et al.*, 2008). Die Analyse einer ähnlichen Fusion mit den JMY-WH2-Motiven könnte somit Aufschlüsse über deren Regulation durch Aktin liefern.

Ausschließlich kernlokalisierte WH2-Domänen von JMY wurden bisher nicht generiert. Es ist aber bekannt, dass auch die WH2-Region von nukleärem JMY G-Aktin binden kann und eine darüber vermittelte Aktinpolymerisation die Aktivierung der p53-abhängigen Transkription durch JMY stimuliert (Coutts *et al.*, 2009). Somit wäre auch eine kompetitive Funktion von JMY auf die Ausbildung und Dissoziation nukleärer G-Aktin:MRTF-A-Komplexe möglich.

### **4.3. Die direkte Modulation des Aktin-MRTF-SRF-Signalweges durch WH2-Domänen-Proteine – ein Modellsystem**

Vor Beginn dieser Arbeit wurde aufgrund der Wirkung von RhoGTPasen und Aktin-Nukleatoren angenommen, dass die Reduktion der Aktinmonomerkonzentration durch z.B. dessen Einbau in Aktinfilamente zu der verringerten Assoziation mit MRTF führt und somit die MRTF-SRF-vermittelte Transkription aktiviert (Sotiropoulos *et al.*, 1999; Miralles *et al.*, 2003; Vartiainen *et al.*, 2007). In serumstimulierten Fibroblasten ist tatsächlich ein leichter Anstieg von filamentösem Aktin und eine damit verbundene reduzierte G-Aktin-Fraktion nachweisbar (Posern *et al.*, 2004). Dennoch liegt eine hohe Menge von Aktin weiterhin in monomerer Form vor. In Anlehnung an diese Studie konnte eine minimale Verschiebung des Verhältnisses von G- zu F-Aktin nach Serumstimulation, aber nicht durch überexprimierte WH2-Varianten, beobachtet werden (Abb. 24). *In vitro* wurde zwar eine Aktinpolymerisation durch mehrfache WH2-Domänen wie JMY-VV(BC) sowie isolierte VCA-Regionen von WAVE2, N-WASP und JMY in Verbindung mit dem Arp2/3-Komplex nachgewiesen (Yamaguchi *et al.*, 2000; Zuchero *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte für überexprimierte GFP-V/VCA-Regionen aus N-WASP, WAVE2, JMY, Cobl oder Spire2 dagegen keine modulierende Funktion auf das Aktinzytoskelett beobachtet werden (Abb. 22, Abb. 25). Darüber

hinaus konnte die WH2-vermittelte Aktivierung von SRF trotz depolymerisierender Bedingungen nicht vollständig inhibiert werden (Abb. 26, Abb. 27). Demnach ist eine erhöhte Bildung zellulären F-Aktins für die Wirkung der verwendeten WH2-Varianten auf die MRTF-SRF-abhängige Genexpression nicht zwingend notwendig. Auch weitere Studien beobachteten eine polymerisationsunabhängige MRTF-SRF-Stimulation. N-WASP- und WAVE2-Proteine induzierten z.B. einen SRF-Reporter unabhängig von ihrer Fähigkeit der Arp2/3-Komplexaktivierung (Weissbach & Schikora *et al.*, 2016). Zudem wurde eine MRTF-SRF-Aktivierung durch RhoA-Mutanten, welche keine Aktinpolymerisation stimulieren können (Sahai *et al.*, 1998), aber auch durch Thymosin  $\beta$ 4 (Morita & Hayashi, 2013; Hinkel *et al.*, 2014) und Profilin (Sotiropoulos *et al.*, 1999) nachgewiesen. Außerdem dissoziiert endogenes MRTF-A nach Serumzugabe von nicht-polymerisierendem Aktin-R62D (Weissbach & Schikora *et al.*, 2016). Zusammenfassend sind diese Daten konsistent mit einem Modell, in dem die Aktivierung von MRTF-A direkt durch WH2-Domänen-Proteine vermittelt werden kann und unabhängig von deren polymerisationsfördernden Funktion verläuft (siehe auch Abb. 29).

Die Ausbildung und Dissoziation von G-Aktin:MRTF-A-Komplexen sowie die MRTF-SRF-Aktivität können durch posttranslationale Modifikationen moduliert werden. MRTF-A enthält zahlreiche induzierbare Phosphorylierungsstellen, deren Phosphorylierung zu einer effizienten Aktivierung der SRF-vermittelten Genexpression durch MRTF-A in Cytochalasin D-behandelten oder serumstimulierten Fibroblasten führt (Panayiotou *et al.*, 2016). Mühlich *et al.* (2008) postulierten, dass die ERK1/2-abhängige Serinphosphorylierung an Position 454 (S549 des murinen Gesamtlängenproteins) nach Serumstimulation wichtig für die Kontrolle von MRTF-A durch Aktin ist. Diese resultiert in einer verstärkten Aktinbindung und im Kernexport des Proteins, wohingegen deren Mutation auch unter unstimulierten Bedingungen zur Akkumulation von MRTF-A im Zellkern führt (Muehlich *et al.*, 2008). Die isolierte RPEL-Region von MRTF-A wird jedoch trotz des fehlenden Serinrestes weiterhin durch Aktin kontrolliert und dissoziiert unter serumstimulierten Bedingungen von Flag-Aktin (Guettler *et al.*, 2008; Weissbach & Schikora *et al.*, 2016). Daher muss ein weiterer Kontrollmechanismus existieren, der den Zerfall des G-Aktin:MRTF-A-Komplexes unter diesen Umständen reguliert.

Studien der eigenen Arbeitsgruppe weisen auf eine Regulation der G-Aktin:MRTF-A-Komplexdissoziation durch einen transaktivierenden Faktor hin, der die Interaktion von G-Aktin und MRTF-A nach Serumzugabe verhindert (Weissbach & Schikora *et al.*, 2016). Dieser Faktor könnte ein WH2-Domänen-Protein sein, dessen Aktivität durch Serumstimulation induziert wird. Wie in dieser Arbeit gezeigt, resultierte die Inkubation mit isolierten WH2-

Varianten aus unterschiedlichen Aktinbindeproteinen bereits unter unstimulierten Bedingungen im Zerfall des Aktin-R62D:MRTF-A-Komplexes (Abb. 28). Das Kompetitions-potential korrelierte mit der Freisetzung von MRTF-A aus der Assoziation mit Aktin-WT (vgl. Abb. 16E und Abb. 28D). Die GST *pulldown*- und Ko-IP-Experimente zeigten zudem, dass isolierte WH2-Domänen nicht über eine Gleichgewichtsverschiebung durch Reduktion freiverfügbarer Monomere auf den Aktin:MRTF-A-Komplex wirken, sondern direkt mit MRTF-A um die Bindung von Aktin kompetitieren (z.B. Abb. 16, Abb. 19). Dennoch kann die Wirkung weiterer posttranslationaler Modifikationen nicht ausgeschlossen werden. Die Serumstimulation resultiert beispielsweise in der Phosphorylierung von MRTF-A am Serinrest 98 der RPEL-Region durch ERK, welche den G-Aktin:MRTF-A-Komplex destabilisiert und zur nukleären Translokation von MRTF-A führt (Panayiotou *et al.*, 2016). Voraussetzung dafür ist jedoch die ERK-unabhängige Freisetzung dieser Phosphorylierungsstelle durch (partielle) Dissoziation von Aktinmonomeren (Panayiotou *et al.*, 2016). Daher ist die Beteiligung von WH2-Domänen-Proteinen an diesem Prozess nicht ausgeschlossen.

Eine regulierende posttranslationale Modifikation kann jedoch auch an Aktin selbst erfolgen. Die Flavoprotein-Monooxygenase MICAL (*molecules interacting with CasL*)-2 katalysiert eine Methioninoxidation an Position 44 von Aktin, die in einer Depolymerisation nukleärer Filamente und einer abnehmenden Kernlokalisation der Aktinmonomere resultiert (Lundquist *et al.*, 2014). Die Autoren beobachteten, dass MICAL-2 die MRTF-SRF-Aktivität nach Serumzugabe stimuliert und RhoA-unabhängig ist. Als zugrundeliegender Mechanismus werden u.a. veränderte Bindungsaffinitäten von modifiziertem G-Aktin zu MRTF-A vermutet (Lundquist *et al.*, 2014).

Die hier für die Isolation der WH2-Domänen verwendeten Aktinbindeproteine zeigen ein differenzielles Expressionsmuster. Dabei sind Cobl und Spire-Proteine hauptsächlich in neuronalem Gewebe nachweisbar, während N-WASP, WAVE2 und JMY ubiquitär vorkommen (Ahuja *et al.*, 2007; Pleiser *et al.*, 2010; *Human Protein Atlas*). SRF und MRTFs sind dagegen weit verbreitete Transkriptionsregulatoren. Somit wäre die Regulation der MRTF-SRF-abhängigen Transkription durch Cobl und Spire nur in ausgewählten Zelltypen möglich, während N-WASP, WAVE2 und JMY generelle Kompetitoren für MRTFs darstellen könnten.

Die Bildung bzw. der Zerfall des G-Aktin:MRTF-A-Komplexes wird durch einen transaktivierenden Faktor moduliert (Weissbach & Schikora *et al.*, 2016). Die Aktivität dieses Faktors, einem putativen WH2-Domänen-Protein, müsste selbst durch einen spezifischen Mechanismus wie intramolekulare Faltung oder posttranslationale Modifikation kontrolliert werden, um die Signal-vermittelte Regulation des Aktin-MRTF-SRF-Signalwegs zu ermöglichen.

Von den in dieser Arbeit getesteten isolierten WH2-Domänen hatte die zweite WH2-Domäne von Spire2 die stärkste kompetitive Funktion auf die Ausbildung von G-Aktin:MRTF-A-Komplexen (Abb. 16D und E). Diese führte auch im Zellmodell zu einer nukleären Akkumulation von MRTF-A (Abb. 12). Dagegen konnte die rekombinante RPEL-Domäne die Menge der WH2(Spire2):Aktin-Komplexe kaum reduzieren (Abb. 20B-D). In der Literatur wird zudem eine Regulation von Spire2 durch intramolekulare Autoinhibition diskutiert. Dabei bindet die KIND-Region von monomerem Spire2 an dessen C-Terminus, wobei diese Interaktion durch Membranbindung des Proteins gelöst wird (Abb. 6; Tittel *et al.*, 2015). Die massenspektrometrische Proteomanalyse zeigte jedoch, dass Spire1 ähnlich wie MRTFs nach Serumstimulation von Aktin dissoziierte (Dissertation Shaposhnikov, 2013). Daher ist eine Kompetition zwischen Spire-Proteinen und MRTF-A *in vivo* eher unwahrscheinlich.

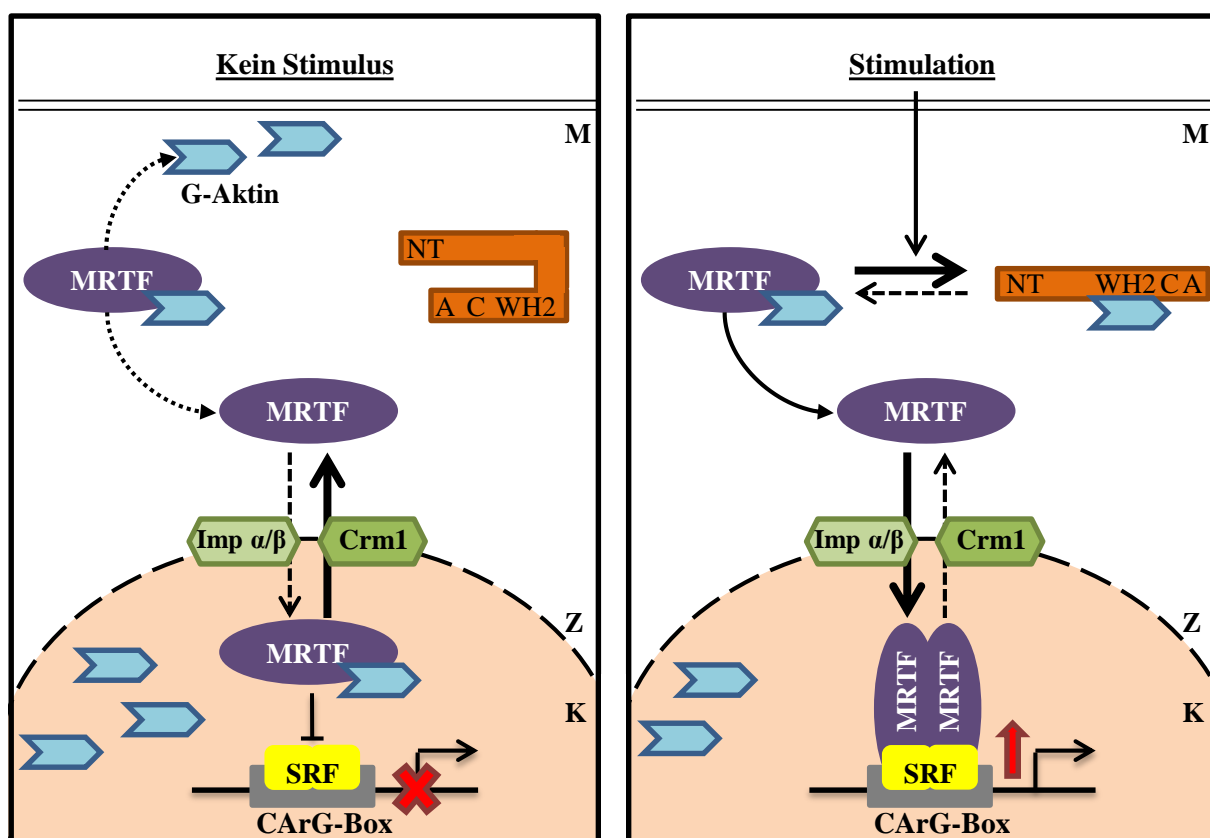
Cobl-V(B) hatte neben Spire2 einen starken Effekt auf die Komplexdissoziation von G-Aktin und MRTF-A, welche in der Freisetzung von MRTF-A und der Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Genexpression resultierte (Abb. 7A, Abb. 16C und E). *In vivo* könnte eine Signal-induzierte Kompetition von MRTF-A und Cobl tatsächlich möglich sein. So wird die Aktivität von Cobl in neuronalen Zellen durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin vermittelt (Hou *et al.*, 2015). Die Autoren wiesen nach, dass  $\text{Ca}^{2+}$  die Assoziation von Aktin an die beiden letzten WH2-Domänen verstärkt, wohingegen die Anlagerung von G-Aktin an Cobl-V(A) aufgrund der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Interaktion mit Calmodulin nicht möglich ist. Durch den EGTA-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug konnte dieser suppressive Effekt aufgehoben werden, während sich die Aktinbindung an die weiteren WH2-Domänen dadurch nicht veränderte (Hou *et al.*, 2015). Zudem ist auch für MRTF eine Calcium-abhängige Regulation bekannt. In neuronalen Zellen erfolgt eine Induktion von SRF und MRTF-A durch ansteigende Mengen von  $\text{Ca}^{2+}$  (Misra *et al.*, 1994; Kalita *et al.*, 2006). Neben einer ausschließlich nukleären Akkumulation in z.B. hippocampalen Neuronen (Kalita *et al.*, 2006; Stern *et al.*, 2009) wurde eine Stimulus-abhängige Translokation von MRTF-A zwischen Zytoplasma und Zellkern beschrieben (Wickramasinghe *et al.*, 2008). Cobl wurde in einigen Zelltypen wie hippocampalen oder kortikalen Neuronen auch im Nukleus nachgewiesen (Dissertation Grimm, 2011). Übereinstimmend mit den Daten dieser Arbeit wäre die postulierte Kompetition nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zunächst unabhängig von einer Cobl-induzierten Aktinnukleation, da das dafür notwendige erste WH2-Motiv durch Calmodulin-Interaktion blockiert ist (Abb. 22, Abb. 26; Hou *et al.*, 2015). Aufgrund der überlappenden Lokalisation beider Faktoren wäre somit eine  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte, polymerisationsunabhängige Regulation von MRTF-A durch Cobl möglich.

Die Wirkung isolierter WH2-Domänen von N-WASP und WAVE2 auf die Kernlokalisierung von endogenem MRTF-A sowie die SRF-abhängige Transkription war eher gering (Abb. 7A, Abb. 12). Diese Beobachtung spiegelte sich auch in der schwachen Konkurrenz mit Gesamtlängen-MRTF-A bzw. der rekombinanten RPEL-Domäne von MRTF-A wider (Abb. 16A, B und E, Abb. 19). Die zugehörigen VCA-Regionen hatten einen deutlich stärkeren, polymerisationsunabhängigen Effekt auf die MRTF-SRF-vermittelte Genexpression (Abb. 7A, Abb. 8, Abb. 26). Studien zeigten, dass auch Gesamtlängen-N-WASP und -WAVE2 sowohl die Kernlokalisation verschiedener MRTF-A-Varianten als auch die Aktivierung von MRTF-SRF induzieren (Sotiropoulos *et al.*, 1999; Miralles *et al.*, 2003; Weissbach & Schikora *et al.*, 2016). Gegensätzlich zu N-WASP stellte WAVE2 den stärkeren Konkurrenten dar, wobei dessen Wirkung durch das Fehlen seiner Arp2/3-interagierenden Bindestellen kaum beeinflusst wurde (Weissbach & Schikora *et al.*, 2016). Im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit war die Reduktion der aktin gebundenen MRTF-A-Menge zwischen WAVE2-VCA und Gesamtlängen-WAVE2 nahezu identisch (vgl. Abb. 16B, E und Abb. 5A, C in Weissbach & Schikora *et al.*, 2016). Dabei ist WAVE2 im Vergleich zu N-WASP nicht im Zellkern lokalisiert. Daher könnte WAVE2 nur die Dissoziation zytoplasmatischer G-Aktin:MRTF-A-Komplexe regulieren. Es ist zudem bereits bekannt, dass N-WASP durch intramolekulare Autoinhibition (Rohatgi *et al.*, 2000) und WAVES in Form des suppressiven WAVE-Komplexes (Gautreau *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010) kontrolliert werden. Deren Induktion erfolgt nach extrazellulärer Stimulation durch aktivierte RhoGTPasen (1.1.2.3.1; Miki *et al.*, 1998a; Eden *et al.*, 2002). Daher könnte eine Signal-vermittelte Regulation des Aktin-MRTF-SRF-Signalwegs durch N-WASP oder WAVE-Proteine auch eine physiologisch relevante Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass isolierte WH2-Domänen von JMY eine nukleäre Translokation von MRTF-A und die Expression eines SRF-abhängigen Luziferasereporters induzieren können. Für die effiziente Stimulation und die Dissoziation der G-Aktin:MRTF-A-Komplexe waren die letzten beiden WH2-Regionen, JMY-VV(BC), notwendig, während die zusätzliche Anwesenheit des ersten WH2- oder dem Arp2/3-interagierenden CA-Motiv diesen Effekt nicht wesentlich verstärkte (Abb. 10A, Abb. 14, Abb. 17). Die in *in vitro*-Studien für JMY-VV(BC) beschriebene Aktinnukleation beeinflusste die SRF-Aktivierung kaum (Abb. 27; Zuchero *et al.*, 2009). Übereinstimmend mit der hier beobachteten Arp2/3-unabhängigen Induktion der MRTF-SRF-vermittelten Transkription durch JMY war der Arp2/3-Komplex für dessen Stimulation der p53-abhängigen Genexpression nicht notwendig (Abb. 10A, Abb. 11; Coutts *et al.*, 2009). Zudem ist eine Signal-induzierte Regulation von JMY möglich. Ob-

wohl Gesamtlängen-JMY im Vergleich zu N-WASP und WAVE2 eine deutlich schwächere Stimulation der MRTF-SRF-Aktivität aufweist, wird diese durch Deletionen oder eine Punktmutation in der C-terminalen CA-Region um ein Vielfaches erhöht (J. Weißbach, persönliche Mitteilung). Damit übereinstimmend postulierten Firat-Karalar *et al.* (2011), dass dessen Funktion als Aktin-Nukleator durch posttranslationale Modifikation oder Autoinhibition kontrolliert wird. Die Auffaltung des Proteins könnte somit aufgrund der Exposition der WH2-Region zu einer regulierten Konkurrenz mit MRTF-A um die Aktinbindung sowie zur SRF-Aktivierung führen.

Die Daten dieser Arbeit lassen sich in folgendem Modell zusammenfassen (Abb. 29):



**Abbildung 29: Putative Regulation des Aktin-MRTF-SRF-Signalweges durch WH2-Domänen-Proteine.**

*Links:* In unstimulierten Zellen ist MRTF an Aktin gebunden, wodurch dessen Importin  $\alpha/\beta$ -abhängiger Kernimport blockiert ist. Auch nukleäres MRTF liegt in einem inhibitorischen Komplex mit G-Aktin vor. In Folge ist der Crm1-abhängige Export von MRTF erhöht und die Stimulation der MRTF-SRF-abhängigen Genexpression nicht möglich. Die Aktivität des WH2-Domänen-Proteins ist durch intramolekulare Faltung oder einen ähnlichen Regulationsmechanismus inhibiert. *Rechts:* Durch einen extrazellulären Stimulus wird die Auffaltung des putativen WH2-Domänen-Proteins induziert. Dieses kompetitiert über die exponierte WH2-Domäne aktiv mit MRTF um die Assoziation mit monomerem Aktin. Freigesetztes MRTF wird daraufhin in den Zellkern importiert und stimuliert die MRTF-SRF-vermittelte Transkription. NT, N-Terminus; Imp  $\alpha/\beta$ , Importin  $\alpha/\beta$ ; M, Plasmamembran; Z, Zytoplasma; K, Zellkern.

Unter unstimulierten Bedingungen liegt zytoplasmatisches und nukleäres MRTF-A im Komplex mit Aktin inhibiert vor (Abb. 29). Die Funktion des transaktivierenden Faktors, einem putativen WH2-Domänen-Protein, ist durch intramolekulare Faltung, posttranslationale Modi-

fikationen oder einem ähnlichen Regulationsmechanismus inhibiert (links). Durch extrazelluläre Stimulation erfolgt die Aktivierung und Auffaltung des WH2-Domänen-Proteins, sodass die WH2-Region zugänglich ist. Diese kompetitiert mit den RPEL-Motiven von MRTF-A um die Bindung an Aktin und führt in Folge zur Komplexdissoziation. Freigesetztes MRTF-A akkumuliert im Zellkern und stimuliert die MRTF-SRF-abhängige Genexpression (rechts). Derselbe Mechanismus könnte auch im Zellkern stattfinden.

#### **4.4. WH2-Domänen-Proteine – physiologisch relevante Regulatoren einer MRTF-SRF-vermittelten Transkription?**

MRTFs haben eine wichtige Funktion für verschiedene Prozesse wie Zelladhäsion oder die Kontrolle der Zytoskelettdynamik und spielen eine globale Rolle bei der Entwicklung diverser Gewebetypen. Die fehlerhafte Regulation dieser SRF-Kofaktoren resultiert in der Entstehung pathologischer Prozesse wie dem Wachstum und der Metastasierung unterschiedlicher Krebsarten (Medjkane *et al.*, 2009; Muehlich *et al.*, 2012; Hampl *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2016). Daher ist die strenge Regulation der MRTF-Aktivität für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase notwendig.

In dieser Arbeit wurden isolierte WH2-Domänen aus fünf verschiedenen Aktinbindeproteinen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Dissoziation inhibitorischer G-Aktin:MRTF-A-Komplexe zu initiieren und so die MRTF-SRF-abhängige Genexpression zu kontrollieren. Aufgrund der Vielzahl potentieller WH2-Domänen-enthaltender Kompetitoren konnte bisher keine physiologische Relevanz für das postulierte Wettbewerbsmodell (Abb. 29) gezeigt werden. Die Beteiligung eines transaktivierenden Faktors sowie die Stimulation des Signalweges durch überexprimiertes N-WASP, WAVE2 und JMY (J. Weißbach, persönliche Mitteilung; Weissbach & Schikora *et al.*, 2016) liefern jedoch erste Hinweise auf die mögliche Regulation von MRTF-SRF durch endogene WH2-Domänen-Proteine.

Ein potentieller Kandidat ist JMY, dessen Aktivität durch einen spezifischen Regulationsmechanismus inhibiert zu sein scheint. Interessanterweise wird die Induktion von MRTF-SRF durch JMY direkt über die WH2-Region vermittelt, während das Arp2/3-interagierende CA-Motiv nicht notwendig ist (Abb. 10A, Abb. 11). Weitere Studien sollten sich damit beschäftigen, wie die Aktivität von JMY kontrolliert wird, welche Proteindomänen dafür nötig sind und ob weitere Faktoren involviert sind. Damit könnte die putative, Stimulus-abhängige Funktion von JMY auf den Aktin-MRTF-SRF-Signalweg näher charakterisiert werden.



In einer vorherigen Studie wurde die mögliche Funktion des Arp2/3-Komplexes als Kompetitionspartner für G-Aktin:MRTF-Komplexe identifiziert (Dissertation Shaposhnikov, 2013). Eine Arp2/3-vermittelte Aktinnukleation als dissozierender Mechanismus konnte durch die Daten dieser Arbeit jedoch ausgeschlossen werden. Für die Durchführung einer weiteren massenspektrometrischen Proteomanalyse sollte das nicht-polymerisierende Aktin-R62D verwendet werden. Diese Analyse könnte zur Identifikation potentieller WH2-Domänen-Proteine führen, die nach Serumstimulation verstärkt an diese monomere Aktinmutante binden, wohingegen MRTF-A dissoziiert (Weissbach & Schikora *et al.*, 2016).

Auch das WASP-interagierende Protein (WIP) enthält eine N-terminale WH2-Region. Eine kürzliche Studie wies eine Reduktion der Kernakkumulation von MRTF-A sowie der Induktion von SRF in WIP-*knock-out*-Zellen nach, wobei dieser Phänotyp auf dessen Aktinbindedomäne beruht (Ramesh *et al.*, 2014). Die Überexpression von WIP führt zu einem Anstieg der SRF-Aktivität (S. Lentze, persönliche Mitteilung). WIP wäre somit ein weiteres Kandidatenprotein, das die MRTF-SRF-vermittelte Transkription entweder direkt über die N-terminale WH2-Region oder indirekt über die Wirkung auf N-WASP regulieren könnte.

Die zweite WH2-Domäne von Cobl hatte eine starke kompetitive Wirkung, welche in der Dissoziation der G-Aktin:MRTF-A-Komplexe resultierte (Abb. 16C und E, Abb. 28C und D). Die ähnliche subzelluläre Lokalisation sowie die Kontrolle von Cobl und MRTF-A durch  $Ca^{2+}$ -Level könnte auf eine mögliche Regulation des Aktin-MRTF-SRF-Signalwegs durch Cobl in Neuronen hindeuten (4.3). Diese sollte zukünftig anhand von Ko-IP-Experimenten und SRF-Luziferasegenassays in An- und Abwesenheit von  $Ca^{2+}$  getestet werden.

Die Identifikation eines endogenen WH2-Domänen-Proteins als putativen Kompetitor für MRTFs würde einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung des Aktin-MRTF-SRF-Signalwegs darstellen. Es sind jedoch eine Vielzahl von WH2-Domänen-Proteinen bekannt. Diese unterscheiden sich sowohl in ihrem gewebespezifischen Expressionsmuster als auch in der Art ihrer Aktivierung. Somit ist es möglich, dass MRTF-SRF abhängig von der jeweiligen Zellart durch verschiedene WH2-Domänen-Proteine reguliert werden können. Zukünftig wäre es notwendig, die physiologische Relevanz putativer WH2-Domänen-enthaltender Kompetitoren für MRTF in verschiedenen Zelltypen zu überprüfen und die zugehörigen Signalwege zu identifizieren. Durch die mechanistische Aufklärung der G-Aktin:MRTF-Komplexdissoziation wäre zudem die Entwicklung von pharmakologischen Substanzen möglich, die im Rahmen einer pathologischen Dysfunktion wie Tumorwachstum und -metastasierung eingreifen könnten.

## 5. Zusammenfassung

Aktin hat eine bedeutende Funktion als Strukturkomponente des Zytoskeletts. Die Polymerisation von monomerem G-Aktin zu Aktinfilamenten wird dabei von nukleationsfördernden Proteinen mit aktinbindenden WH2-Domänen unterstützt. Aktin kontrolliert zudem die Transkription zahlreicher Zielgene durch Regulation von MRTFs, einer wichtigen Familie von SRF-Kofaktoren. Die Stimulation der SRF-abhängigen Transkription wird durch die Bildung eines inhibitorischen Komplexes von G-Aktin und MRTFs verhindert. Die Freisetzung der MRTFs aus diesen Komplexen ist der entscheidende Schritt für die Aktivierung des Aktin-MRTF-SRF-Signalweges. Der dissoziierende Mechanismus der G-Aktin:MRTF-Komplexe ist unklar. Bisherige Modelle postulierten eine zugrundeliegende Reduktion der Aktinmonomere durch stimulierte Filamentbildung. In dieser Arbeit sollte dagegen eine direkte Konkurrenz zwischen isolierten WH2-Domänen und MRTF-A um die Interaktion mit G-Aktin als putativer Mechanismus untersucht werden, da WH2-Domänen-enthaltende Proteine Aktin über dieselbe Oberfläche wie MRTFs binden. Durch Ko-Immunpräzipitations- und GST *pull-down*-Experimente wurde sowohl im Zellmodell als auch in einer zellfreien Umgebung gezeigt, dass verschiedene WH2-Domänen direkt mit MRTF-A um die Assoziation mit Aktin konkurrieren. Die verwendeten WH2-Fusionsproteine unterschieden sich in ihrer kompetitiven Funktion auf die Ausbildung und Dissoziation der G-Aktin:MRTF-A-Komplexe, möglicherweise bedingt durch unterschiedliche Affinitäten zu Aktin. Die Freisetzung von MRTF-A durch überexprimierte GFP-WH2-Konstrukte resultierte in dessen nukleärer Akkumulation und der Aktivierung der MRTF-SRF-vermittelten Genexpression und korrelierte größtenteils mit dem beobachteten Kompetitionspotential. Die forcierte Kernlokalisierung reduzierte die Wirkung der WH2-Domänen auf die nukleäre Translokation von MRTF-A und auf die Stimulation der MRTF-SRF-Aktivität. Die Konkurrenz zwischen WH2-Proteinen und MRTF-A erfolgt daher vermutlich primär im Zytoplasma. Durch Färbung der Aktinfilamente sowie Verwendung des Zytoskeletthinhibitors Latrunculin B wurde gezeigt, dass die postulierte Funktion der WH2-Domänen auf die Komplexdissoziation von G-Aktin und MRTF-A hauptsächlich unabhängig von einer aktivierten Aktinpolymerisation verläuft. Darüber hinaus konnte die Interaktion von MRTF-A mit nicht-polymerisierendem Aktin-R62D durch Zugabe von GST-WH2-Fusionsproteinen reduziert werden. Diese Arbeit zeigt, dass WH2-Domänen-Proteine die Dissoziation von G-Aktin und MRTF-A induzieren und somit die MRTF-SRF-vermittelte Genexpression stimulieren können. Zukünftige Studien müssen durch Identifizierung eines endogenen WH2-enthaltenden Kompetitionspartners zeigen, in welchen Zellarten oder Signalwegen die beobachtete WH2-abhängige MRTF-SRF-Aktivierung eine physiologisch relevante Funktion hat.

**Literaturverzeichnis**

- Ahuja R, Pinyol R, Reichenbach N, Custer L, Klingensmith J, Kessels MM & Qualmann B (2007) Cordon-Bleu Is an Actin Nucleation Factor and Controls Neuronal Morphology. *Cell* **131**: 337–350
- Alberti S, Krause SM, Kretz O, Philippar U, Lemberger T, Casanova E, Wiebel FF, Schwarz H, Frotscher M, Schütz G & Nordheim A (2005) Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 6148–6153
- Aravind L & Koonin EV (2000) SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 112–114
- Arsenian S, Weinhold B, Oelgeschläger M, Rütther U & Nordheim A (1998) Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J.* **17**: 6289–6299
- Baarlink C, Wang H & Grosse R (2013) Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL. *Science*. **340**: 864–867
- Belin BJ, Cimini BA, Blackburn EH & Mullins RD (2013) Visualization of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei. *Mol. Biol. Cell* **24**: 982–994
- Belin BJ, Lee T & Mullins RD (2015) DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin-2 and Spire-1/2 that promotes efficient DNA repair. *Elife* **4**: e07735
- Benesch S, Lommel S, Steffen A, Stradal TEB, Scaplehorn N, Way M, Wehland J & Rottner K (2002) Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate (PIP2)-induced Vesicle Movement Depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J. Biol. Chem.* **277**: 37771–37776
- Benesch S, Polo S, Lai FPL, Anderson KI, Stradal TEB, Wehland J & Rottner K (2005) N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J. Cell Sci.* **118**: 3103–3115
- Blanchoin L, Amann KJ, Higgs HN, Marchand J-B, Kaiser DA & Pollard TD (2000) Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**: 1007–1011
- Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C & Plastino J (2014) Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* **94**: 235–263
- Blanchoin L & Pollard TD (2002) Hydrolysis of ATP by Polymerized Actin Depends on the Bound Divalent Cation but Not Profilin. *Biochemistry* **41**: 597–602
- Boczkowska M, Rebowski G, Kast DJ & Dominguez R (2014) Structural analysis of the transitional state of Arp2/3 complex activation by two actin-WCAs. *Nat. Commun.* **5**: 1–25
- Bonder EM, Fishkind DJ & Mooseker MS (1983) Direct Measurement of Critical Concentrations and Assembly Rate Constants at the Two Ends of an Actin Filament. *Cell* **34**: 491–501
- Bosch M, Le KHD, Bugyi B, Correia JJ, Renault L & Carlier M-F (2007) Analysis of the Function of Spire in Actin Assembly and Its Synergy with Formin and Profilin. *Mol. Cell* **28**: 555–568
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254
- Breitsprecher D & Goode BL (2013) Formins at a glance. *J. Cell Sci.* **126**: 1–7
- Busche S, Kremmer E & Posern G (2010) E-cadherin regulates MAL-SRF-mediated transcription in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **123**: 2803–2809
- Campellone KG, Webb NJ, Znameroski EA & Welch MD (2008) WHAMM Is an Arp2/3 Complex Activator That Binds Microtubules and Functions in ER to Golgi Transport. *Cell* **134**: 148–161
- Campellone KG & Welch MD (2010) A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**: 237–251
- Carlier M-F (1991) Actin: Protein Structure and Filament Dynamics. *J. Biol. Chem.* **266**: 1–4
- Carlier M-F, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia G-X, Hong Y, Chua N-H & Pantaloni D (1997) Actin Depolymerizing Factor (ADF/Cofilin) Enhances the Rate of Filament Turnover: Implication in Actin-based Motility. *J. Cell Biol.* **136**: 1307–1322

- Carlier M-F, Nioche P, Broutin-L'Hermite I, Boujemaa R, Le Clainche C, Egile C, Garbay C, Ducruix A, Sansonetti P & Pantaloni D (2000) GRB2 Links Signaling to Actin Assembly by Enhancing Interaction of Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASp) with Actin-related Protein (ARP2/3) Complex. *J. Biol. Chem.* **275**: 21946–21952
- Carlier M-F, Pantaloni D, Evans JA, Lambooy PK, Korn ED & Webb MR (1988) The hydrolysis of ATP that accompanies actin polymerization is essentially irreversible. *FEBS Lett.* **235**: 211–214
- Carroll EA, Gerrelli D, Gasca S, Berg E, Beier DR, Copp AJ & Klingensmith J (2003) *Cordon-bleu* is a conserved gene involved in neural tube formation. *Dev. Biol.* **262**: 16–31
- Cen B, Selvaraj A, Burgess RC, Hitzler JK, Ma Z, Morris SW & Prywes R (2003) Megakaryoblastic Leukemia 1, a Potent Transcriptional Coactivator for Serum Response Factor (SRF), is Required for Serum Induction of SRF Target Genes. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 6597–6608
- Cenik BK, Liu N, Chen B, Bezprozvannaya S, Olson EN & Bassel-Duby R (2016) Myocardin-related transcription factors are required for skeletal muscle development. *Development* **143**: 2853–2861
- Chen CK, Sawaya MR, Phillips ML, Reisler E & Quinlan ME (2012) Multiple Forms of Spire-Actin Complexes and their Functional Consequences. *J. Biol. Chem.* **287**: 10684–10692
- Chen X, Ni F, Kondrashkina E, Ma J & Wang Q (2015) Mechanisms of leiomodins 2-mediated regulation of actin filament in muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 12687–12692
- Chen Z, Borek D, Padrick SB, Gomez TS, Metlagel Z, Ismail AM, Umetani J, Billadeau DD, Otwinowski Z & Rosen MK (2010) Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* **468**: 533–538
- Chereau D, Boczkowska M, Skwarek-Maruszewska A, Fujiwara I, Hayes DB, Rebowski G, Lappalainen P, Pollard TD & Dominguez R (2008) Leiomodins are Actin Filament Nucleators in Muscle Cells. *Science*. **320**: 239–243
- Chereau D, Kerff F, Graceffa P, Grabarek Z, Langsetmo K & Dominguez R (2005) Actin-bound structures of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and the implications for filament assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 16644–16649
- Chhabra ES & Higgs HN (2006) INF2 Is a WASP Homology 2 Motif-containing Formin That Severs Actin Filaments and Accelerates Both Polymerization and Depolymerization. *J. Biol. Chem.* **281**: 26754–26767
- Cleuren YT & Boonstra J (2012) Actin: Structure, Function and Disease. In *Actin: Structure, Function and Disease*, Consuelas VA & Minas DJ (eds) pp 61–96. Nova Science Publishers, Inc
- Conley CA, Fritz-Six KL, Almenar-Queralt A & Fowler VM (2001) Leiomodins: Larger Members of the Tropomodulin (Tmod) Gene Family. *Genomics* **73**: 127–139
- Copeland JW & Treisman R (2002) The Diaphanous-related Formin mDia1 Controls Serum Response Factor Activity through its Effects on Actin Polymerization. *Mol Biol Cell* **13**: 4088–4099
- Coutts AS, Pires IM, Weston L, Buffa FM, Milani M, Li J-L, Harris AL, Hammond EM & La Thangue NB (2011) Hypoxia-driven cell motility reflects the interplay between JMY and HIF-1 $\alpha$ . *Oncogene* **30**: 4835–4842
- Coutts AS & La Thangue NB (2015) Actin nucleation by WH2 domains at the autophagosome. *Nat. Commun.* **6**: 1–9
- Coutts AS, Weston L & La Thangue NB (2009) A transcription co-factor integrates cell adhesion and motility with the p53 response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 19872–19877
- Creemers EE, Sutherland LB, Oh J, Barbosa AC & Olson EN (2006) Coactivation of MEF2 by the SAP Domain Proteins Myocardin and MASTR. *Mol. Cell* **23**: 83–96
- Czisch M, Schleicher M, Hörger S, Voelter W & Holak TA (1993) Conformation of thymosin  $\beta$ 4 in water determined by NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **218**: 335–344
- Dahlggaard K, Raposo AASF, Niccoli T & St Johnston D (2007) Capu and Spire Assemble a Cytoplasmic Actin Mesh that Maintains Microtubule Organization in the *Drosophila* Oocyte. *Dev. Cell* **13**: 539–553
- Dart AE, Donnelly SK, Holden DW, Way M & Caron E (2012) Nck and Cdc42 co-operate to recruit N-WASP to promote Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis. *J. Cell Sci.* **125**: 2825–2830
- Demonacos C, Krstic-Demonacos M & La Thangue NB (2001) A TPR Motif Cofactor Contributes to p300 Activity in the p53 Response. *Mol. Cell* **8**: 71–84

- Derry JMJ, Ochs HD & Francke U (1994) Isolation of a Novel Gene Mutated in Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell* **78**: 635–644
- Descot A, Hoffmann R, Shaposhnikov D, Reschke M, Ullrich A & Posern G (2009) Negative Regulation of the EGFR-MAPK Cascade by Actin-MAL-mediated Mig6/Errfi-1 Induction. *Mol. Cell* **35**: 291–304
- Didry D, Cantrelle F-X, Husson C, Roblin P, Moorthy AME, Perez J, Le Clainche C, Hertzog M, Guittet E, Carlier M-F, van Heijenoort C & Renault L (2012) How a single residue in individual  $\beta$ -thymosin/WH2 domains controls their functions in actin assembly. *EMBO J.* **31**: 1000–1013
- Dietrich S, Weiß S, Pleiser S & Kerkhoff E (2013) Structural and functional insights into the Spir/formin actin nucleator complex. *Biol. Chem.* **394**: 1649–1660
- Dominguez R (2007) The  $\beta$ -Thymosin/WH2 Fold: Multifunctionality and Structure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1112**: 86–94
- Dominguez R (2009) Actin filament nucleation and elongation factors – structure- function relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **44**: 351–366
- Dominguez R & Holmes KC (2011) Actin Structure and Function. *Annu Rev Biophys* **40**: 169–186
- Du KL, Chen M, Li J, Lepore JJ, Mericko P & Parmacek MS (2004) Megakaryoblastic Leukemia Factor-1 Transduces Cytoskeletal Signals and Induces Smooth Muscle Cell Differentiation from Undifferentiated Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 17578–17586
- Ducka AM, Joel P, Popowicz GM, Trybus KM, Schleicher M, Noegel AA, Huber R, Holak TA & Sitar T (2010) Structures of actin-bound Wiskott-Aldrich syndrome protein homology 2 (WH2) domains of Spire and the implication for filament nucleation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 11757–11762
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M & Kirschner MW (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**: 790–793
- Egile C, Rouiller I, Xu X-P, Volkmann N, Li R & Hanein D (2005) Mechanism of Filament Nucleation and Branch Stability Revealed by the Structure of the Arp2/3 Complex at Actin Branch Junctions. *PLoS Biol.* **3**: 1902–1909
- Esnault C, Stewart A, Gualdrini F, East P, Horswell S, Matthews N & Treisman R (2014) Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts. *Genes Dev.* **28**: 943–958
- Firat-Karalar EN, Hsiue PP & Welch MD (2011) The actin nucleation factor JMY is a negative regulator of neuritegenesis. *Mol. Biol. Cell* **22**: 4563–4574
- Gaucher J-F, Maugé C, Didry D, Guichard B, Renault L & Carlier M-F (2012) Interactions of Isolated C-terminal Fragments of Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) with Actin and Arp2/3 Complex. *J. Biol. Chem.* **287**: 34646–34659
- Gautreau A, Ho HH, Li J, Steen H, Gygi SP & Kirschner MW (2004) Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 4379–4383
- Geneste O, Copeland JW & Treisman R (2002) LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *J. Cell Biol.* **157**: 831–838
- Gligorijevic B, Wyckoff J, Yamaguchi H, Wang Y, Roussos ET & Condeelis J (2012) N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *J. Cell Sci.* **125**: 724–734
- Goldschmidt-Clermont PJ, Furman MI, Wachsstock D, Safer D, Nachmias VT & Pollard TD (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
- Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Doberstein SK & Pollard TD (1991) Mechanism of the Interaction of Human Platelet Profilin with Actin. *J. Cell Biol.* **113**: 1081–1089
- Goley ED & Welch MD (2006) The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 713–726
- Grega-Larson NE, Crawley SW, Erwin AL & Tyska MJ (2015) Cordon bleu promotes the assembly of brush border microvilli. *Mol. Biol. Cell* **26**: 3803–3815
- Grega-Larson NE, Crawley SW & Tyska MJ (2016) Impact of Cordon-Bleu Expression on Actin Cytoskeleton Architecture and Dynamics. *Cytoskeleton* **73**: 670–679

- Grimm J (2011) Der Aktinnukleator Cobl: Lokalisationsstudie und funktionelle Analysen. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena. S. 63-65, 103
- Gualdrini F, Esnault C, Horswell S, Stewart A, Matthews N & Treisman R (2016) SRF Co-factors Control the Balance between Cell Proliferation and Contractility. *Mol. Cell* **64**: 1048–1061
- Guettler S, Vartiainen MK, Miralles F, Larijani B & Treisman R (2008) RPEL Motifs Link the Serum Response Factor Cofactor MAL but Not Myocardin to Rho Signaling via Actin Binding. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 732–742
- Haag N, Schwintzer L, Ahuja R, Koch N, Grimm J, Heuer H, Qualmann B & Kessels MM (2012) The Actin Nucleator Cobl is Crucial for Purkinje Cell Development and Works in Close Conjunction with the F-actin Binding Protein Abp1. *J. Neurosci.* **32**: 17842–17856
- Hampl V, Martin C, Aigner A, Hoebel S, Singer S, Frank N, Sarikas A, Ebert O, Prywes R, Gudermann T & Muehlich S (2013) Depletion of the transcriptional coactivators megakaryoblastic leukaemia 1 and 2 abolishes hepatocellular carcinoma xenograft growth by inducing oncogene-induced senescence. *EMBO Mol. Med.* **5**: 1367–1382
- Harlow E & Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Hawkins E, Beck M, Butler B & Wood K (2003) A More Dynamic DLR™ Assay. *Promega Notes* **85**: 31–33
- Hertzog M, van Heijenoort C, Didry D, Gaudier M, Coutant J, Gigant B, Didelot G, Pr eat T, Knossow M, Guittet E & Carlier M-F (2004) The  $\beta$ -Thymosin/WH2 Domain: Structural Basis for the Switch from Inhibition to Promotion of Actin Assembly. *Cell* **117**: 611–623
- Higgs HN & Peterson KJ (2005) Phylogenetic Analysis of the Formin Homology 2 Domain. *Mol. Biol. Cell* **16**: 1–13
- Higgs HN & Pollard TD (2000) Activation by Cdc42 and PIP<sub>2</sub> of Wiskott-Aldrich Syndrome protein (WASp) Stimulates Actin Nucleation by Arp2/3 Complex. *J. Cell Biol.* **150**: 1311–1320
- Hill CS, Wynne J & Treisman R (1994) Serum-regulated transcription by Serum Response Factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain. *EMBO J.* **13**: 5421–5432
- Hill CS, Wynne J & Treisman R (1995) The Rho Family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs Regulate Transcriptional Activation by SRF. *Cell* **81**: 1159–1170
- Hinkel R, Trenkwalder T, Petersen B, Husada W, Gesenhues F, Lee S, Hannappel E, Bock-Marquette I, Theisen D, Leitner L, Boekstegers P, Cierniewski C, M uller OJ, le Noble F, Adams RH, Weinl C, Nordheim A, Reichart B, Weber C, Olson E, Posern G, Deindl E, Niemann H & Kupatt C (2014) MRTF-A controls vessel growth and maturation by increasing the expression of CCN1 and CCN2. *Nat. Commun.* **5**: 1–10
- Hirano H & Matsuura Y (2011) Sensing actin dynamics: Structural basis for G-actin-sensitive nuclear import of MAL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**: 373–378
- Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, Kysela K, Goodrich JA, Lessard JL, Hope TJ, Hozak P & de Lanerolle P (2004) Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* **6**: 1094–1101
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W & Kabsch W (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**: 44–49
- Hou W, Izadi M, Nemitz S, Haag N, Kessels MM & Qualmann B (2015) The Actin Nucleator Cobl Is Controlled by Calcium and Calmodulin. *PLoS Biol.* **13**: e1002233
- Hu P, Wu S & Hernandez N (2004) A role for  $\beta$ -actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* **18**: 3010–3015
- Husson C, Renault L, Didry D, Pantaloni D & Carlier M-F (2011) Cordon-Bleu Uses WH2 Domains as Multifunctional Dynamizers of Actin Filament Assembly. *Mol. Cell* **43**: 464–477
- Innocenti M, Gerboth S, Rottner K, Lai FPL, Hertzog M, Stradal TEB, Frittoli E, Didry D, Polo S, Disanza A, Benesch S, Di Fiore PP, Carlier M-F & Scita G (2005) Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nat. Cell Biol.* **7**: 969–976
- Innocenti M, Zucconi A, Disanza A, Frittoli E, Areces LB, Steffen A, Stradal TEB, Di Fiore PP, Carlier M-F & Scita G (2004) Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat. Cell Biol.* **6**: 319–327

- Irobi E, Aguda AH, Larsson M, Guerin C, Yin HL, Burtnick LD, Blanchoin L & Robinson RC (2004) Structural basis of actin sequestration by thymosin- $\beta$ 4: implications for WH2 proteins. *EMBO J.* **23**: 3599–3608
- Isaac BM, Ishihara D, Nusblat LM, Gevrey J-C, Dovas A, Condeelis J & Cox D (2010) N-WASP has the ability to compensate for the loss of WASP in macrophage podosome formation and chemotaxis. *Exp. Cell Res.* **316**: 3406–3416
- Jewett TJ, Fischer ER, Mead DJ & Hackstadt T (2006) Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 15599–15604
- Jiao Y, Walker M, Trinick J, Pernier J, Montaville P & Carlier M-F (2014) Mutagenetic and Electron Microscopy Analysis of Actin Filament Severing by Cordon-Bleu, a WH2 Domain Protein. *Cytoskeleton* **71**: 170–183
- Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF & Holmes KC (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**: 37–44
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD & Smith AE (1984) A Short Amino Acid Sequence Able to Specify Nuclear Location. *Cell* **39**: 499–509
- Kalita K, Kharebava G, Zheng J-J & Hetman M (2006) Role of Megakaryoblastic Acute Leukemia-1 in ERK1/2-Dependent Stimulation of Serum Response Factor-Driven Transcription by BDNF or Increased Synaptic activity. *J. Neurosci.* **26**: 10020–10032
- Kato M, Miki H, Kurita S, Endo T, Nakagawa H, Miyamoto S & Takenawa T (2002) WICH, a Novel Verprolin Homology Domain-Containing Protein That Functions Cooperatively with N-WASP in Actin-Microspike Formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**: 41–47
- Kelly AE, Kranitz H, Dötsch V & Mullins RD (2006) Actin Binding to the Central Domain of WASP/Scar Proteins Plays a Critical Role in the Activation of the Arp2/3 Complex. *J. Biol. Chem.* **281**: 10589–10597
- Kim AS, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu GA & Rosen MK (2000) Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* **404**: 151–158
- Kinosian HJ, Selden LA, Estes JE & Gershman LC (1993) Nucleotide Binding to Actin. Cation dependence of nucleotide dissociation and exchange rates. *J. Biol. Chem.* **268**: 8683–8691
- Kircher P, Hermanns C, Nossek M, Drexler MK, Grosse R, Fischer M, Sarikas A, Penkava J, Lewis T, Prywes R, Gudermann T & Muehlich S (2015) Filamin A interacts with the coactivator MKL1 to promote the activity of the transcription factor SRF and cell migration. *Sci. Signal.* **8**: ra112
- Knöll B, Kretz O, Fiedler C, Alberti S, Schütz G, Frotscher M & Nordheim A (2006) Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* **9**: 195–204
- Kokai E, Beck H, Weissbach J, Arnold F, Sinske D, Seibert U, Gaiselmann G, Schmidt V, Walther P, Münch J, Posern G & Knöll B (2014) Analysis of nuclear actin by overexpression of wild-type and actin mutant proteins. *Histochem. Cell Biol.* **141**: 123–135
- Korn ED, Carlier M-F & Pantaloni D (1987) Actin Polymerization and ATP Hydrolysis. *Science.* **238**: 638–644
- Kovar DR, Harris ES, Mahaffy R, Higgs HN & Pollard TD (2006) Control of the Assembly of ATP- and ADP-Actin by Formins and Profilin. *Cell* **124**: 423–435
- Kovar DR & Pollard TD (2004) Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 14725–14730
- Kukalev A, Nord Y, Palmberg C, Bergman T & Percipalle P (2005) Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 238–244
- De La Cruz EM, Mandinova A, Steinmetz MO, Stoffler D, Aebi U & Pollard TD (2000a) Polymerization and Structure of Nucleotide-free Actin Filaments. *J. Mol. Biol.* **295**: 517–526
- De La Cruz EM, Ostap EM, Brundage RA, Reddy KS, Sweeney HL & Safer D (2000b) Thymosin- $\beta$ 4 Changes the Conformation and Dynamics of Actin Monomers. *Biophys. J.* **78**: 2516–2527
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Lai FPL, Szczodrak M, Block J, Faix J, Breitsprecher D, Mannherz HG, Stradal TEB, Dunn GA, Small JV & Rottner K (2008) Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J.* **27**: 982–992

- Lammers M, Rose R, Scrima A & Wittinghofer A (2005) The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by Rho•GTP. *EMBO J.* **24**: 4176–4187
- Lebensohn AM & Kirschner MW (2009) Activation of the WAVE Complex by Coincident Signals Controls Actin Assembly. *Mol. Cell* **36**: 512–524
- Lee SH & Dominguez R (2010) Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Cells. *Mol. Cells* **29**: 311–325
- Li J, Bowens N, Cheng L, Zhu X, Chen M, Hannenhalli S, Cappola TP & Parmacek MS (2012) Myocardin-like protein 2 regulates TGF $\beta$  signaling in embryonic stem cells and the developing vasculature. *Development* **139**: 3531–3542
- Li J, Zhu X, Chen M, Cheng L, Zhou D, Lu MM, Du K, Epstein JA & Parmacek MS (2005) Myocardin-related transcription factor B is required in cardiac neural crest for smooth muscle differentiation and cardiovascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 8916–8921
- Li S, Chang S, Qi X, Richardson JA & Olson EN (2006) Requirement of a Myocardin-Related Transcription Factor for Development of Mammary Myoepithelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 5797–5808
- Li S, Wang D-Z, Wang Z, Richardson JA & Olson EN (2003) The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 9366–9370
- Lin Z, Xu Y-N, Namgoong S & Kim N-H (2014) JMY Functions as Actin Nucleation-Promoting Factor and Mediator for p53-Mediated DNA Damage in Porcine Oocytes. *PLoS One* **9**: e109385
- Lin ZL, Cui X-S, Namgoong S & Kim N-H (2015) Junction-mediating and regulatory protein (JMY) is essential for early porcine embryonic development. *J. Reprod. Dev.* **61**: 361–367
- Linardopoulou EV, Parghi SS, Friedman C, Osborn GE, Parkhurst SM & Trask BJ (2007) Human Subtelomeric WASH Genes Encode a New Subclass of the WASP Family. *PLoS Genet.* **3**: 2477–2485
- Linder S, Nelson D, Weiss M & Aepfelbacher M (1999) Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 9648–9653
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402–408
- Liverman ADB, Cheng H-C, Trosky JE, Leung DW, Yarbrough ML, Burdette DL, Rosen MK & Orth K (2007) Arp2/3-independent assembly of actin by *Vibrio* type III effector VopL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 17117–17122
- Lorenzi R, Brickell PM, Katz DR, Kinnon C & Thrasher AJ (2000) Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood* **95**: 2943–2946
- Lundquist MR, Storaska AJ, Liu T-C, Larsen SD, Evans T, Neubig RR & Jaffrey SR (2014) Redox Modification of Nuclear Actin by MICAL-2 Regulates SRF Signaling. *Cell* **156**: 563–576
- Luxenburg C, Pasolli HA, Williams SE & Fuchs E (2011) Developmental roles for Srf, cortical cytoskeleton and cell shape in epidermal spindle orientation. *Nat. Cell Biol.* **13**: 203–214
- Ma Z, Morris SW, Valentine V, Li M, Herbrick J-A, Cui X, Bouman D, Li Y, Mehta PK, Nizetic D, Kaneko Y, Chan GCF, Chan LC, Squire J, Scherer SW & Hitzler JK (2001) Fusion of two novel genes, *RBM15* and *MKL1*, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **28**: 220–221
- Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J & Pollard TD (1994) Purification of a Cortical Complex Containing Two Unconventional Actins from *Acanthamoeba* by Affinity-Chromatography on Profilin-Agarose. *J. Cell Biol.* **127**: 107–115
- Machesky LM & Insall RH (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* **8**: 1347–1356
- Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, Hall ME & Pollard TD (1999) Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 3739–3744
- Manseau LJ & Schüpbach T (1989) *cappucino* and *spire*: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* **3**: 1437–1452
- Marchand J-B, Kaiser DA, Pollard TD & Higgs HN (2001) Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **3**: 76–82



- Martinez-Quiles N, Ho H-YH, Kirschner MW, Ramesh N & Geha RS (2004) Erk/Src Phosphorylation of Cortactin Acts as a Switch On-Switch Off Mechanism That Controls Its Ability To Activate N-WASP. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 5269–5280
- Martinez-Quiles N, Rohatgi R, Antón IM, Medina M, Saville SP, Miki H, Yamaguchi H, Takenawa T, Hartwig JH, Geha RS & Ramesh N (2001) WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat. Cell Biol.* **3**: 484–491
- Mattila PK, Salminen M, Yamashiro T & Lappalainen P (2003) Mouse MIM, a Tissue-specific Regulator of Cytoskeletal Dynamics, Interacts with ATP-Actin Monomers through Its C-terminal WH2 domain. *J. Biol. Chem.* **278**: 8452–8459
- Medjkane S, Perez-Sanchez C, Gaggioli C, Sahai E & Treisman R (2009) Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nat. Cell Biol.* **11**: 257–268
- Mercher T, Coniat MB-L, Monni R, Mauchauffé M, Nguyen Khac F, Gressin L, Mugneret F, Leblanc T, Dastugue N, Berger R & Bernard OA (2001) Involvement of a human gene related to the *Drosophila* *spen* gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 5776–5779
- Miano JM (2003) Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**: 577–593
- Miki H, Miura K & Takenawa T (1996) N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP<sub>2</sub>-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**: 5326–5335
- Miki H, Sasaki T, Takai Y & Takenawa T (1998a) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* **391**: 93–96
- Miki H, Suetsugu S & Takenawa T (1998b) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* **17**: 6932–6941
- Miki H & 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
- Minty A & Kedes L (1986) Upstream Regions of the Human Cardiac Actin Gene That Modulate Its Transcription in Muscle Cells: Presence of an Evolutionarily Conserved Repeated Motif. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2125–2136
- Miralles F, Posern G, Zaromytidou A-I & Treisman R (2003) Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of its Coactivator MAL. *Cell* **113**: 329–342
- Misra RP, Bonni A, Miranti CK, Rivera VM, Sheng M & Greenberg ME (1994) L-type Voltage-sensitive Calcium Channel Activation Stimulates Gene Expression by a Serum Response Factor-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* **269**: 25483–25493
- Mizutani K, Miki H, He H, Maruta H & Takenawa T (2002) Essential Role of Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein in Podosome Formation and Degradation of Extracellular Matrix in src-transformed Fibroblasts. *Cancer Res.* **62**: 669–674
- Mokalled MH, Johnson A, Kim Y, Oh J & Olson EN (2010) Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development. *Development* **137**: 2365–2374
- Moreau V, Frischknecht F, Reckmann I, Vincentelli R, Rabut G, Stewart D & Way M (2000) A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat. Cell Biol.* **2**: 441–448
- Morita T & Hayashi K (2013) G-actin sequestering protein thymosin- $\beta$ 4 regulates the activity of myocardin-related transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **437**: 331–335
- Morita T, Mayanagi T & Sobue K (2007) Reorganization of the actin cytoskeleton via transcriptional regulation of cytoskeletal/focal adhesion genes by myocardin-related transcription factors (MRTFs/MAL/MKLs). *Exp. Cell Res.* **313**: 3432–3445
- Mouilleron S, Guettler S, Langer CA, Treisman R & McDonald NQ (2008) Molecular basis for G-actin binding to RPEL motifs from the serum response factor coactivator MAL. *EMBO J.* **27**: 3198–3208

- Mouilleron S, Langer CA, Guettler S, McDonald NQ & Treisman R (2011) Structure of a Pentavalent G-actin\*MRTF-A Complex Reveals How G-actin Controls Nucleocytoplasmic Shuttling of a Transcriptional Coactivator. *Sci. Signal.* **4**: ra40
- Muehlich S, Hampl V, Khalid S, Singer S, Frank N, Breuhahn K, Gudermann T & Prywes R (2012) The transcriptional coactivators megakaryoblastic leukemia 1/2 mediate the effects of loss of the tumor suppressor deleted in liver cancer 1. *Oncogene* **31**: 3913–3923
- Muehlich S, Wang R, Lee S-M, Lewis TC, Dai C & Prywes R (2008) Serum-Induced Phosphorylation of the Serum Response Factor Coactivator MKL1 by the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway Inhibits Its Nuclear Localization. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 6302–6313
- Mullins RD, Heuser JA & Pollard TD (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 6181–6186
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263–273
- Niu Z, Yu W, Zhang SX, Barron M, Belaguli NS, Schneider MD, Parmacek M, Nordheim A & Schwartz RJ (2005) Conditional Mutagenesis of the Murine Serum Response Factor Gene Blocks Cardiogenesis and the Transcription of Downstream Gene Targets. *J. Biol. Chem.* **280**: 32531–32538
- Norman C, Runswick M, Pollock R & Treisman R (1988) Isolation and Properties of cDNA Clones Encoding SRF, a Transcription Factor That Binds to the *c-fos* Serum Response Element. *Cell* **55**: 989–1003
- Obrdlik A, Kukalev A, Louvet E, Farrants A-KÖ, Caputo L & Percipalle P (2008) The Histone Acetyltransferase PCAF Associates with Actin and hnRNP U for RNA Polymerase II Transcription. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 6342–6357
- Oh J, Richardson JA & Olson EN (2005) Requirement of myocardin-related transcription factor-B for remodeling of branchial arch arteries and smooth muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 15122–15127
- Oikawa T, Yamaguchi H, Itoh T, Kato M, Ijuin T, Yamazaki D, Suetsugu S & Takenawa T (2004) PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat. Cell Biol.* **6**: 420–426
- Olson EN & Nordheim A (2010) Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**: 353–365
- Otterbein LR, Graceffa P & Dominguez R (2001) The Crystal Structure of Uncomplexed Actin in the ADP State. *Science.* **293**: 708–711
- Padrick SB, Cheng H-C, Ismail AM, Panchal SC, Doolittle LK, Kim S, Skehan BM, Umetani J, Brautigam CA, Leong JM & Rosen MK (2008) Hierarchical Regulation of WASP/WAVE Proteins. *Mol. Cell* **32**: 426–438
- Padrick SB, Doolittle LK, Brautigam CA, King DS & Rosen MK (2011) Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: E472–E479
- Panayiotou R, Miralles F, Pawlowski R, Diring J, Flynn HR, Skehel M & Treisman R (2016) Phosphorylation acts positively and negatively to regulate MRTF-A subcellular localisation and activity. *Elife* **5**: e15460
- Panchal SC, Kaiser DA, Torres E, Pollard TD & Rosen MK (2003) A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex. *Nat Struct Biol* **10**: 591–598
- Park C, Lee MY, Park PJ, Ha SE, Berent RM, Fuchs R, Miano JM, Becker LS, Sanders KM & Ro S (2015) Serum Response Factor Is Essential for Prenatal Gastrointestinal Smooth Muscle Development and Maintenance of Differentiated Phenotype. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **21**: 589–602
- Paunola E, Mattila PK & Lappalainen P (2002) WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett.* **513**: 92–97
- Pawlowski R, Rajakylä EK, Vartiainen MK & Treisman R (2010) An actin-regulated importin  $\alpha/\beta$ -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *EMBO J.* **29**: 3448–3458
- Pechlivanis M, Samol A & Kerkhoff E (2009) Identification of a Short Spir Interaction Sequence at the C-terminal End of Formin Subgroup Proteins. *J. Biol. Chem.* **284**: 25324–25333

- Pellegrini L, Tan S & Richmond TJ (1995) Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature* **376**: 490–498
- Perrin BJ & Ervasti JM (2010) The Actin Gene Family: Function Follows Isoform. *Cytoskeleton* **67**: 630–634
- Pfender S, Kuznetsov V, Pleiser S, Kerkhoff E & Schuh M (2011) Spire-Type Actin Nucleators Cooperate with Formin-2 to Drive Asymmetric Oocyte Division. *Curr. Biol.* **21**: 955–960
- Pfirschmann T, Lokapally A, Andréasson C, Ljungdahl P & Hollemann T (2013) SOMA: A Single Oligonucleotide Mutagenesis and Cloning Approach. *PLoS One* **8**: e64870
- Philimonenko VV, Zhao J, Iben S, Dingová H, Kyselá K, Kahle M, Zentgraf H, Hofmann WA, de Lanerolle P, Hozák P & Grummt I (2004) Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* **6**: 1165–1172
- Pleiser S, Rock R, Wellmann J, Gessler M & Kerkhoff E (2010) Expression patterns of the mouse Spire-2 actin nucleator. *Gene Expr. Patterns* **10**: 345–350
- Plessner M, Melak M, Chinchilla P, Baarlink C & Grosse R (2015) Nuclear F-actin Formation and Reorganization upon Cell Spreading. *J. Biol. Chem.* **290**: 11209–11216
- Pollard TD (1986) Rate Constants for the Reactions of ATP- and ADP-Actin with the Ends of Actin Filaments. *J. Cell Biol.* **103**: 2747–2754
- Pollard TD, Blanchoin L & Mullins RD (2000) Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics In Nonmuscle Cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**: 545–576
- Pollard TD & Borisy GG (2003) Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* **112**: 453–465
- Pollard TD, Goldberg I & Schwarz WH (1992) Nucleotide Exchange, Structure, and Mechanical Properties of Filaments Assembled from ATP-actin and ADP-actin. *J. Biol. Chem.* **267**: 20339–20345
- Posern G (1999) Hochselektive Interaktionen der SH3(1)-Domäne von Crk-Adapterproteinen und ihre Rolle bei der Regulation kleiner GTPasen. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg. S. 71-72, 80, 82
- Posern G, Miralles F, Guettler S & Treisman R (2004) Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *EMBO J.* **23**: 3973–3983
- Posern G, Sotiropoulos A & Treisman R (2002) Mutant Actins Demonstrate a Role for Unpolymerized Actin in Control of Transcription by Serum Response Factor. *Mol. Biol. Cell* **13**: 4167–4178
- Posern G & Treisman R (2006) Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol.* **16**: 588–596
- Pring M, Evangelista M, Boone C, Yang C & Zigmond SH (2003) Mechanism of Formin-Induced Nucleation of Actin Filaments. *Biochemistry* **42**: 486–496
- Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmond S, Bretscher A & Boone C (2002) Role of Formins in Actin Assembly: Nucleation and Barbed-End Association. *Science*. **297**: 612–615
- Pylypenko O, Welz T, Tittel J, Kollmar M, Chardon F, Malherbe G, Weiss S, Michel CIL, Samol-Wolf A, Grasskamp AT, Hume A, Goud B, Baron B, England P, Titus MA, Schwille P, Weidemann T, Houdusse A & Kerkhoff E (2016) Coordinated recruitment of Spire actin nucleators and myosin V motors to Rab11 vesicle membranes. *Elife* **5**: e17523
- Qualmann B & Kessels MM (2009) New players in actin polymerization - WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol.* **19**: 276–285
- Qualmann B, Roos J, DiGregorio PJ & Kelly RB (1999) Syndapin I, a Synaptic Dynamin-binding Protein that Associates with the Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein. *Mol. Biol. Cell* **10**: 501–513
- Quinlan ME (2013) Direct interaction between two actin nucleators is required in *Drosophila* oogenesis. *Development* **140**: 4417–4425
- Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E & Mullins RD (2005) *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature* **433**: 382–388
- Quinlan ME, Hilgert S, Bedrossian A, Mullins RD & Kerkhoff E (2007) Regulatory interactions between two actin nucleators, Spire and Cappuccino. *J. Cell Biol.* **179**: 117–128

- Quinlan ME & Kerkhoff E (2008) Actin nucleation: bacteria get in-Spired. *Nat. Cell Biol.* **10**: 13–15
- Ramesh N, Massaad MJ, Kumar L, Koduru S, Sasahara Y, Anton I, Bhasin M, Libermann T & Geha R (2014) Binding of the WASP/N-WASP-Interacting Protein WIP to Actin Regulates Focal Adhesion Assembly and Adhesion. *Mol. Cell. Biol.* **34**: 2600–2610
- Rasson AS, Bois JS, Pham DSL, Yoo H & Quinlan ME (2015) Filament Assembly by Spire: Key Residues and Concerted Actin Binding. *J. Mol. Biol.* **427**: 824–839
- Ravanelli AM & Klingensmith J (2011) The actin nucleator Cordon-bleu is required for development of motile cilia in zebrafish. *Dev. Biol.* **350**: 101–111
- Reindl W, Gräber M, Strebhardt K & Berg T (2009) Development of high-throughput assays based on fluorescence polarization for inhibitors of the polo-box domains of polo-like kinases 2 and 3. *Anal. Biochem.* **395**: 189–194
- Renault L, Bugyi B & Carlier M-F (2008) Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends Cell Biol.* **18**: 494–504
- Rodal AA, Sokolova O, Robins DB, Daugherty KM, Hippenmeyer S, Riezman H, Grigorieff N & Goode BL (2005) Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 26–31
- Rohatgi R, Ho HH & Kirschner MW (2000) Mechanism of N-WASP Activation by CDC42 and Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* **150**: 1299–1309
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T & Kirschner MW (1999) The Interaction between N-WASP and the Arp2/3 Complex Links Cdc42-Dependent Signals to Actin Assembly. *Cell* **97**: 221–231
- Rouiller I, Xu X-P, Amann KJ, Egile C, Nickell S, Nicastro D, Li R, Pollard TD, Volkman N & Hanein D (2008) The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* **180**: 887–895
- Safer D, Sosnick TR & Elzinga M (1997) Thymosin  $\beta$ 4 Binds Actin in an Extended Conformation and Contacts both the Barbed and Pointed ends. *Biochemistry* **36**: 5806–5816
- Sahai E, Alberts AS & Treisman R (1998) RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation. *EMBO J.* **17**: 1350–1361
- Salvany L, Muller J, Guccione E & Rørth P (2014) The core and conserved role of MAL is homeostatic regulation of actin levels. *Genes Dev.* **28**: 1048–1053
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schlüter K, Waschbüsch D, Anft M, Hügging D, Kind S, Hänisch J, Lakisic G, Gautreau A, Barnekow A & Stradal TEB (2014) JMY is involved in anterograde vesicle trafficking from the *trans*-Golgi network. *Eur. J. Cell Biol.* **93**: 194–204
- Schratt G, Philippar U, Berger J, Schwarz H, Heidenreich O & Nordheim A (2002) Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* **156**: 737–750
- Schuh M (2011) An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. *Nat. Cell Biol.* **13**: 1431–1436
- Schüler S, Hauptmann J, Perner B, Kessels MM, Englert C & Qualmann B (2013) Ciliated sensory hair cell formation and function require the F-BAR protein syndapin I and the WH2 domain-based actin nucleator Cobl. *J. Cell Sci.* **126**: 196–208
- Schumacher N, Borawski JM, Leberfinger CB, Gessler M & Kerkhoff E (2004) Overlapping expression pattern of the actin organizers Spir-1 and formin-2 in the developing mouse nervous system and the adult brain. *Gene Expr. Patterns* **4**: 249–255
- Schwintzer L, Koch N, Ahuja R, Grimm J, Kessels MM & Qualmann B (2011) The functions of the actin nucleator Cobl in cellular morphogenesis critically depend on syndapin I. *EMBO J.* **30**: 3147–3159
- Seifert A & Posern G (2017) Tightly controlled MRTF-A activity regulates epithelial differentiation during formation of mammary acini. *Breast Cancer Res.* **19**: 68
- Sept D & McCammon JA (2001) Thermodynamics and Kinetics of Actin Filament Nucleation. *Biophys. J.* **81**: 667–674

- Shaposhnikov D (2013) The role of myocardin-related transcription factors in proliferation and cell cycle regulation of fibroblast cells. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. S. 69-73, 89
- Shikama N, Lee C-W, France S, Delavaine L, Lyon J, Krstic-Demonacos M & La Thangue NB (1999) A Novel Cofactor for p300 that Regulates the p53 Response. *Mol. Cell* **4**: 365–376
- Shore P & Sharrocks AD (1995) The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* **229**: 1–13
- Snapp EL, Hegde RS, Francolini M, Lombardo F, Colombo S, Pedrazzini E, Borgese N & Lippincott-Schwartz J (2003) Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J. Cell Biol.* **163**: 257–269
- Somogyi K & Rørth P (2004) Evidence for Tension-Based Regulation of *Drosophila* MAL and SRF during Invasive Cell Migration. *Dev. Cell* **7**: 85–93
- Song Z, Liu Z, Sun J, Sun F-L, Li C-Z, Sun J-Z & Xu L-Y (2016) The MRTF-A/B function as oncogenes in pancreatic cancer. *Oncol. Rep.* **35**: 127–138
- Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J & Treisman R (1999) Signal-Regulated Activation of Serum Response Factor Is Mediated by Changes in Actin Dynamics. *Cell* **98**: 159–169
- Steffen A, Rottner K, Ehinger J, Innocenti M, Scita G, Wehland J & Stradal TEB (2004) Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* **23**: 749–759
- Stern S, Debre E, Stritt C, Berger J, Posern G & Knöll B (2009) A Nuclear Actin Function Regulates Neuronal Motility by Serum Response Factor-Dependent Gene Transcription. *J. Neurosci.* **29**: 4512–4518
- Stradal TEB, Rottner K, Disanza A, Confalonieri S, Innocenti M & Scita G (2004) Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* **14**: 303–311
- Suetsugu S, Miki H & Takenawa T (1999) Identification of Two Human WAVE/SCAR Homologues as General Actin Regulatory Molecules Which Associate with the Arp2/3 Complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**: 296–302
- Suetsugu S, Yamazaki D, Kurisu S & Takenawa T (2003) Differential Roles of WAVE1 and WAVE2 in Dorsal and Peripheral Ruffle Formation for Fibroblast Cell Migration. *Dev. Cell* **5**: 595–609
- Sun S-C, Sun Q-Y & Kim N-H (2011) JMY is required for asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* **17**: 296–304
- Sun Y, Boyd K, Xu W, Ma J, Jackson CW, Fu A, Shillingford JM, Robinson GW, Hennighausen L, Hitzler JK, Ma Z & Morris SW (2006) Acute Myeloid Leukemia-Associated *Mkl1* (*Mrtf-a*) Is a Key Regulator of Mammary Gland Function. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 5809–5826
- Tam VC, Serruto D, Dziejman M, Briehner W & Mekalanos JJ (2007) A Type III Secretion System in *Vibrio cholerae* Translocates a Formin/Spire Hybrid-like Actin Nucleator to Promote Intestinal Colonization. *Cell Host Microbe* **1**: 95–107
- Terry LJ, Shows EB & Wentz SR (2007) Crossing the Nuclear Envelope: Hierarchical Regulation of Nucleocytoplasmic Transport. *Science.* **318**: 1412–1416
- Ti S-C, Jurgenson CT, Nolen BJ & Pollard TD (2011) Structural and biochemical characterization of two binding sites for nucleation-promoting factor WASp-VCA on Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: E463–E471
- Tittel J, Welz T, Czogalla A, Dietrich S, Samol-Wolf A, Schulte M, Schwille P, Weidemann T & Kerkhoff E (2015) Membrane Targeting of the Spir-Formin Actin Nucleator Complex Requires a Sequential Handshake of Polar Interactions. *J. Biol. Chem.* **290**: 6428–6444
- Todaró GJ & Green H (1963) Quantitative Studies Of The Growth Of Mouse Embryo Cells In Culture And Their Development Into Established Lines. *J. Cell Biol.* **17**: 299–313
- Treisman R (1986) Identification of a Protein-Binding Site That Mediates Transcriptional Response of the *c-fos* Gene to Serum Factors. *Cell* **46**: 567–574
- Vandekerckhove J & Weber K (1978) At Least Six Different Actins are Expressed in a Higher Mammal: An Analysis Based on the Amino Acid Sequence of the Amino-terminal Tryptic Peptide. *J. Mol. Biol.* **126**: 783–802
- Vartiainen MK, Guettler S, Larijani B & Treisman R (2007) Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL. *Science.* **316**: 1749–1752

- Wang D-Z, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, Krieg PA & Olson EN (2001) Activation of Cardiac Gene Expression by Myocardin, a Transcriptional Cofactor for Serum Response Factor. *Cell* **105**: 851–862
- Wang D-Z, Li S, Hockemeyer D, Sutherland L, Wang Z, Schratt G, Richardson JA, Nordheim A & Olson EN (2002) Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 14855–14860
- Wang Q-C, Liu J, Wang F, Duan X, Dai X-X, Wang T, Liu H-L, Cui X-S, Sun S-C & Kim N-H (2013) Role of Nucleation-Promoting Factors in Mouse Early Embryo Development. *Microsc. Microanal.* **19**: 559–564
- Wang Z, Wang D-Z, Hockemeyer D, McAnally J, Nordheim A & Olson EN (2004) Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* **428**: 185–189
- Weaver AM, Heuser JE, Karginov AV, Lee W, Parsons JT & Cooper JA (2002) Interaction of Cortactin and N-WASP with Arp2/3 Complex. *Curr. Biol.* **12**: 1270–1278
- Weaver AM, Karginov AV, Kinley AW, Weed SA, Li Y, Parsons JT & Cooper JA (2001) Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr. Biol.* **11**: 370–374
- Weber K & Osborn M (1969) The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406–4412
- Wegner A (1976) Head to Tail Polymerization of Actin. *J. Mol. Biol.* **108**: 139–150
- Weinl C, Riehle H, Park D, Stritt C, Beck S, Huber G, Wolburg H, Olson EN, Seeliger MW, Adams RH & Nordheim A (2013) Endothelial SRF/MRTF ablation causes vascular disease phenotypes in murine retinæ. *J. Clin. Invest.* **123**: 2193–2206
- Weißbach J (unpubliziert) The role of WH2-containing proteins in regulating actin-MRTF-SRF-mediated transcription. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Weissbach J, Schikora F, Weber A, Kessels M & Posern G (2016) Myocardin-Related Transcription Factor A Activation by Competition with WH2 Domain Proteins for Actin Binding. *Mol. Cell. Biol.* **36**: 1526–1539
- Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A & Mitchison TJ (1997) The Human Arp2/3 Complex Is Composed of Evolutionarily Conserved Subunits and Is Localized to Cellular Regions of Dynamic Actin Filament Assembly. *J. Cell Biol.* **138**: 375–384
- Wickramasinghe SR, Alvania RS, Ramanan N, Wood JN, Mandai K & Ginty DD (2008) Serum Response Factor Mediates NGF-Dependent Target Innervation by Embryonic DRG Sensory Neurons. *Neuron* **58**: 532–545
- Wu X, Yoo Y, Okuhama NN, Tucker PW, Liu G & Guan J-L (2006) Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners. *Nat. Cell Biol.* **8**: 756–763
- Xu Y, Moseley JB, Sagot I, Poy F, Pellman D, Goode BL & Eck MJ (2004) Crystal Structures of a Formin Homology-2 Domain Reveal a Tethered Dimer Architecture. *Cell* **116**: 711–723
- Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M, Segall J, Eddy R, Miki H, Takenawa T & Condeelis J (2005) Molecular mechanisms of invadopodium formation: The role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J. Cell Biol.* **168**: 441–452
- Yamaguchi H, Miki H, Suetsugu S, Ma L, Kirschner MW & Takenawa T (2000) Two tandem verprolin homology domains are necessary for a strong activation of Arp2/3 complex-induced actin polymerization and induction of microspike formation by N-WASP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 12631–12636
- Yarar D, Wayne T, Abo A & Welch MD (1999) The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* **9**: 555–558
- Yoo Y, Wu X & Guan J-L (2007) A Novel Role of the Actin-nucleating Arp2/3 Complex in the Regulation of RNA Polymerase II-dependent Transcription. *J. Biol. Chem.* **282**: 7616–7623
- Zacharias DA, Violin JD, Newton AC & Tsien RY (2002) Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science*. **296**: 913–916
- Zaromytidou A-I, Miralles F & Treisman R (2006) MAL and Ternary Complex Factor Use Different Mechanisms To Contact a Common Surface on the Serum Response Factor DNA-Binding Domain. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 4134–4148

- Zhao K, Wang W, Rando OJ, Xue Y, Swiderek K, Kuo A & Crabtree GR (1998) Rapid and Phosphoinositol-Dependent Binding of the SWI/SNF-like BAF Complex to Chromatin after T Lymphocyte Receptor Signaling. *Cell* **95**: 625–636
- Zigmond SH, Evangelista M, Boone C, Yang C, Dar AC, Sicheri F, Forkey J & Pring M (2003) Formin Leaky Cap Allows Elongation in the Presence of Tight Capping Proteins. *Curr. Biol.* **13**: 1820–1823
- Zuchero JB, Belin B & Mullins RD (2012) Actin binding to WH2 domains regulates nuclear import of the multi-functional actin regulator JMY. *Mol. Biol. Cell* **23**: 853–863
- Zuchero JB, Coutts AS, Quinlan ME, La Thangue NB & Mullins RD (2009) p53-cofactor JMY is a Multi-functional Actin Nucleation Factor. *Nat. Cell Biol.* **11**: 451–459

Verwendete Internetquellen:

*Human Protein Atlas* (Expression von N-WASP, WAVE2, JMY): <https://www.proteinatlas.org> (Zugriff: 12.10.2017)

Produktdatenblatt pAcGFP1:

[http://www.clontech.com/DE/Products/Fluorescent\\_Proteins\\_and\\_Reporters/Fluorescent\\_Proteins\\_by\\_Name/xxclt\\_displayImage.jsp?imgCntId=20649&sitex=10024:22372:US](http://www.clontech.com/DE/Products/Fluorescent_Proteins_and_Reporters/Fluorescent_Proteins_by_Name/xxclt_displayImage.jsp?imgCntId=20649&sitex=10024:22372:US) (Zugriff: 09.12.2017)

Sequenzvergleich der WH2-Domänen (Clustal Omega): <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Zugriff: 17.11.2016)

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Abi1</b>	<i>Abelson-interactor-1</i>
<b>AcGFP1</b>	<i>Aequorea coerulescens</i> GFP
<b>Acta2</b>	$\alpha$ -Glattmuskelaktin
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>ALAS1</b>	5'-Aminolävulinatsynthase 1
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>Arp</b>	<i>actin-related protein</i>
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BAF</b>	<i>brahma/brahma-related gene 1-associated factor</i>
<b>B1/B2</b>	basische Region 1/2 von MRTF
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>C-Terminus</b>	Carboxy-Terminus von Proteinen
<b>ca.</b>	circa
<b>CA-Region</b>	<i>central/connecting and acidic region</i>
<b>CarG</b>	CC(A/T) <sub>6</sub> GG-enthaltende SRF-DNA-Bindestelle
<b>Cdc42</b>	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i>
<b>ChIP-seq</b>	<i>Chromatin immunoprecipitation-sequencing</i>
<b>c<sub>K</sub></b>	kritische Konzentration
<b>Cobl</b>	Cordon-Bleu
<b>Crm1</b>	<i>chromosomal maintenance 1</i>
<b>DAPI</b>	4', 6-Diamidin-2-Phenylindol
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppeltdestilliertes H <sub>2</sub> O
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>D. melanogaster</b>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E</b>	Embryonaler Entwicklungstag
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>eGFP</b>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<b>Ena/VASP</b>	<i>enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
<b>ERK</b>	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>et al.</b>	<i>et alii</i>
<b>ETS</b>	<i>erythroblast transformation specific</i>
<b>F-Aktin</b>	Filamentöses Aktin
<b>FCS</b>	<i>Fetal Calf Serum</i>
<b>FH2-Domäne</b>	Formin-Homologie 2-Domäne
<b>FHOD</b>	<i>Formin homology domain protein</i>
<b>f.l.</b>	<i>full-length</i>
<b>FMN</b>	Formin
<b>G-Aktin</b>	Globuläres Aktin
<b>GBD</b>	GTPase-Bindedomäne
<b>Grb2</b>	<i>growth-factor receptor-bound protein-2</i>
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunden
<b>HA</b>	Hemagglutinin
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HEPES</b>	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
<b>HPRT</b>	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase



<b>HSPC300</b>	<i>hematopoietic stem/progenitor cell protein 300</i>
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz
<b>INF</b>	<i>inverted formin</i>
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>K<sub>D</sub></b>	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
<b>KIND</b>	<i>kinase non-catalytic C-lobe domain</i>
<b>Ko-IP</b>	Ko-Immünpräzipitation
<b>JMY</b>	<i>Junction-mediating and regulatory protein</i>
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>l</b>	Liter
<b>LatB</b>	Latrunculin B
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LIM</b>	<i>Lin11, Isl1, Mec3</i>
<b>Lmod</b>	Leiomodien
<b>LZ</b>	Leucin zipper
<b>mDia</b>	<i>mammalian Diaphanous</i>
<b>MADS</b>	<i>MCM1, Agamous, Deficiens, SRF</i>
<b>MAP</b>	<i>mitogen activated protein</i>
<b>MICAL</b>	<i>molecules interacting with CasL</i>
<b>MIM</b>	<i>missing in metastasis</i>
<b>min</b>	Minuten
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>MRTF</b>	<i>myocardin-related transcription factor</i>
<b>NAP-1</b>	<i>Nck-associated protein 1</i>
<b>NLS</b>	nukleäres Lokalisationssignal
<b>NPF</b>	<i>nucleation promoting factor</i>
<b>N-WASP</b>	Neuronales WASP
<b>N-Terminus</b>	Amino-Terminus von Proteinen
<b>OD<sub>600 nm</sub></b>	Optische Dichte bei 600 nm
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PDB</b>	Proteindatenbank
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>qPCR</b>	Quantitative Echtzeit-PCR
<b>Rac1</b>	<i>Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1</i>
<b>ROCK</b>	<i>Rho-associated coiled-coil containing kinase</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
<b>RPEL</b>	Arginin-Prolin-X-X-X-Glutaminsäure-Leucin (Aktinbindemotiv)
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>s</b>	Sekunden
<b>SAP</b>	<i>SAF-A/B, Azinus, PIAS</i>
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SEM</b>	<i>standard error of the mean</i>
<b>SH3-Domäne</b>	Src Homologie 3 Domäne
<b>SILAC</b>	<i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
<b>SOMA</b>	<i>Single Oligonucleotide Mutagenesis and Cloning Approach</i>
<b>Sra1</b>	<i>specifically Rac-associated 1</i>
<b>SRF</b>	<i>serum response factor</i>
<b>Strap</b>	<i>serine/threonine-kinase-receptor-associated protein</i>
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TAD</b>	Transaktivierungsdomäne
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i>
<b>TCEP</b>	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid
<b>TCF</b>	<i>ternary complex factor</i>
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethylethan-1, 2-diamin
<b>TGF</b>	<i>transforming growth factor</i>
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen

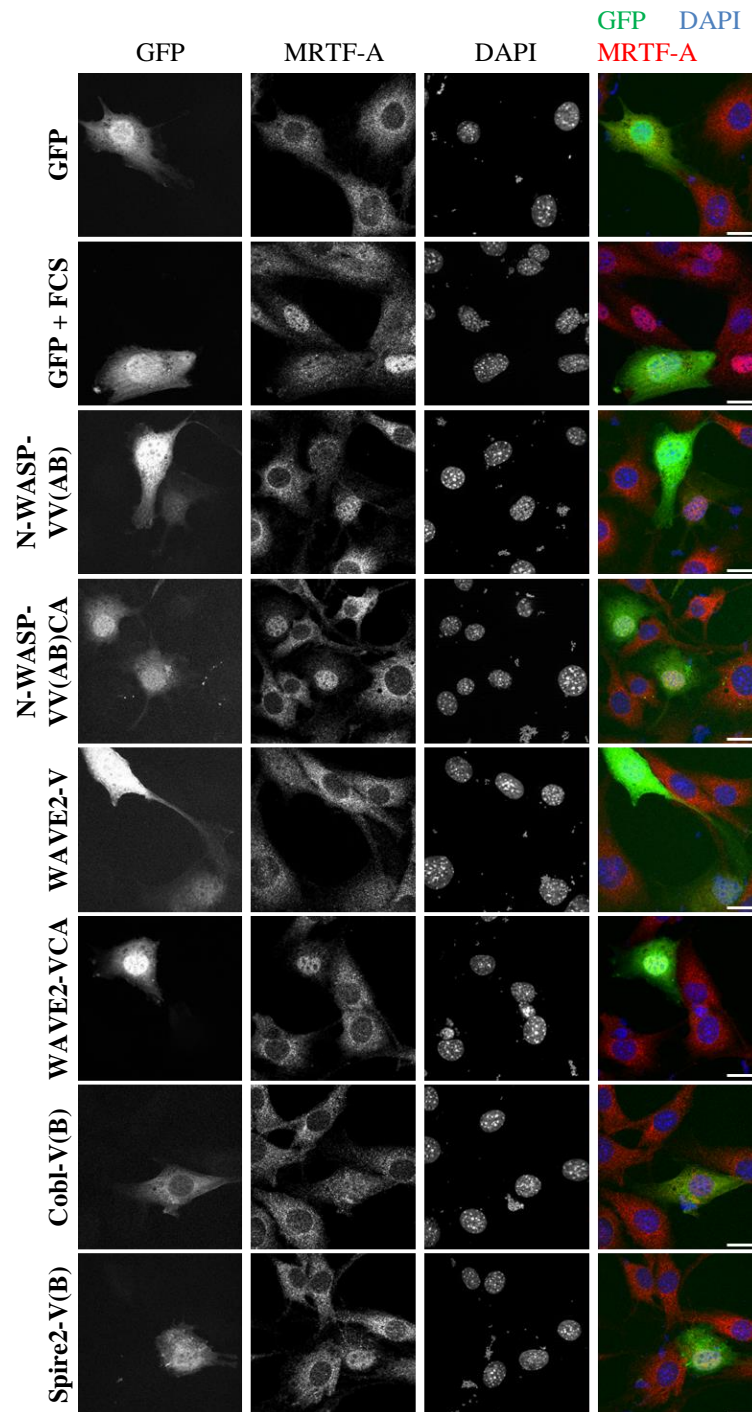
<i>w/v</i>	Masse ( <i>weight</i> ) pro Volumen
<b>WASH</b>	<i>WASP and Scar Homolog</i>
<b>WASP</b>	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
<b>WAVE</b>	<i>WASP family Verprolin-homologous protein</i>
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WH2/V-Domäne</b>	WASP-Homologie 2/Verprolin-Homologie-Domäne
<b>WHAMM</b>	<i>WASP homolog associated with actin, membranes, and microtubules</i>
<b>WIP</b>	<i>WASP-interacting protein</i>
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>x g</b>	x-fache Erdbeschleunigung
<b>z.B.</b>	Zum Beispiel

**Anhang**

<b>WH2 Domäne</b>	<b>Position</b>	<b>Alignment</b>
N-WASP-V (A)	400-418	GNKAALLLDQIREGA---QLKKV
N-WASP-V (B)	428-446	SGRDALLDQIRQGI---QLKSV
WAVE2-V	434-452	DARSDLLSAIRQGF---QLRRV
Cobl-V (B)	1226-1245	--RSALLAAIRGHSGTLSLRKV
Spire2-V (B)	280-299	TPFEMLMQDIRARN--YKLRKV
JMY-V (A)	854-873	--AAHLFDSSQLVSARKKLRKT
JMY-V (B)	884-903	SPMDEVLASLKRGS--FHLKKV
JMY-V (C)	915-933	DDSNNILAQIRKGV---KLKKV
		:: : * : .

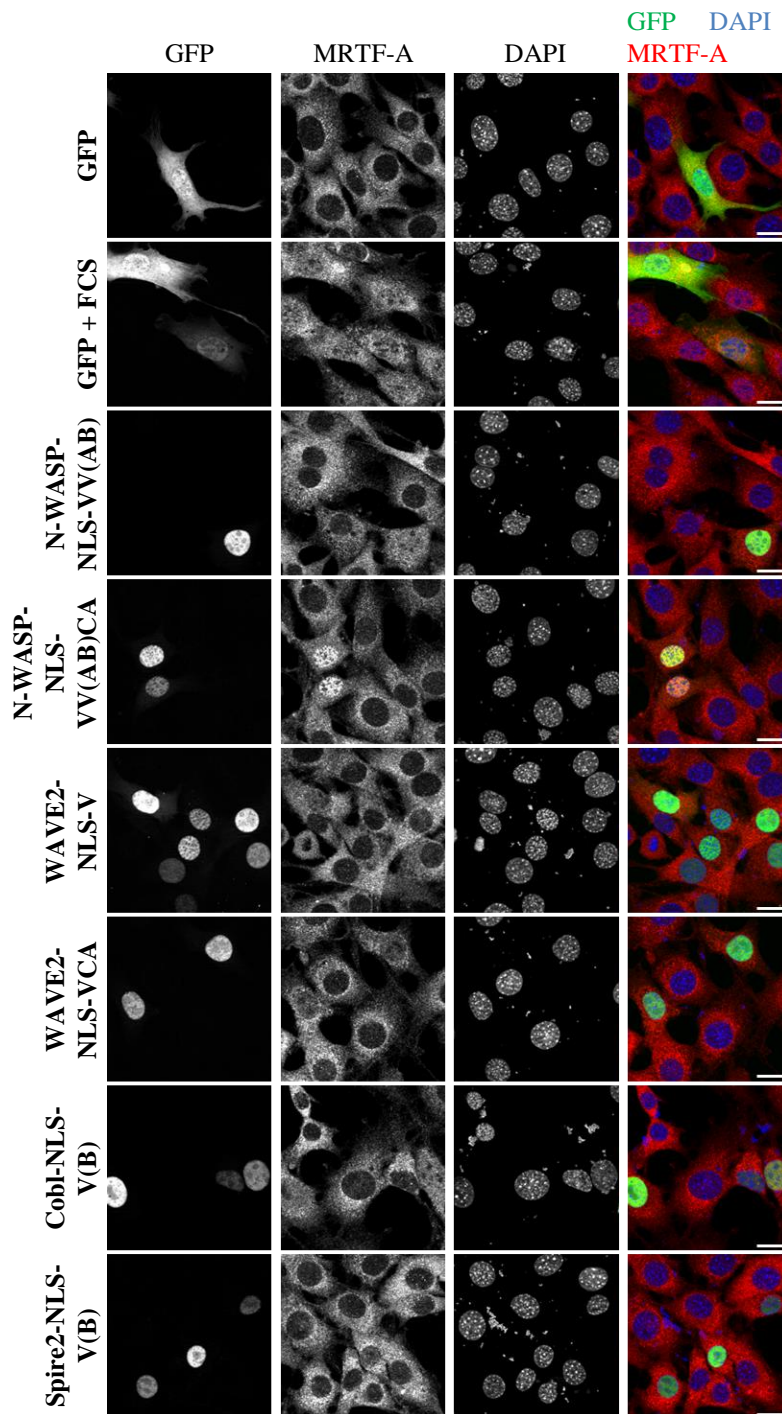
**Anhang 1: Sequenzvergleich der in dieser Arbeit verwendeten WH2-Domänen.**

Die Identifikation und Eingrenzung der WH2-Domänen erfolgte nach Chereau *et al.* (2005) und Zuchero *et al.* (2009). Der Vergleich sowie die Analyse der verschiedenen WH2-Sequenzen wurde mit dem Programm Clustal Omega (1.2.3) vorgenommen. Dabei erfolgte die Kennzeichnung vollständig konservierter Aminosäuren mit (\*), wohingegen konservierte Aminosäuren mit starker Ähnlichkeit ihrer Eigenschaften mit (:) und konservierte Aminosäuren mit schwacher Ähnlichkeit ihrer Eigenschaften mit (.) markiert wurden. Dargestellt sind die Positionen der WH2-Domänen sowie die farbliche Kodierung der konservierten Aminosäuren anhand der Eigenschaften ihrer Seitenketten in: *Blau*: Hydrophile, basische Seitenkette (K, R), *Rot*: Hydrophobe Seitenkette (V, L, I, F, M) und *Grün*: Hydrophile, ungeladene Seitenkette (Q, T).



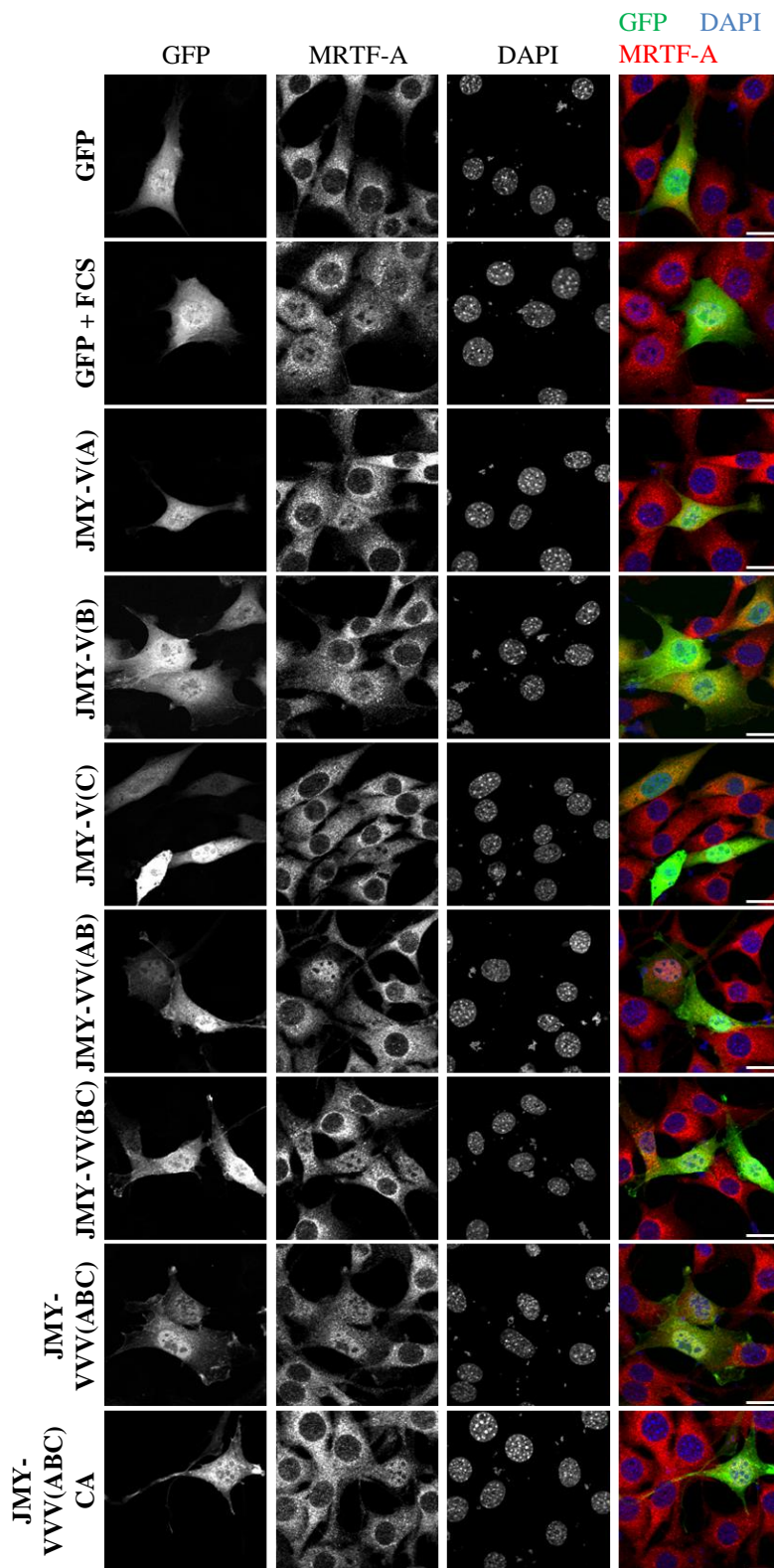
**Anhang 2: Nukleäre Translokation von endogenem MRTF-A durch die isolierten GFP-V/VCA-Proteine aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2.**

Die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte wie in Abbildung 12 beschrieben. Dargestellt sind die einzelnen mikroskopischen Aufnahmen der GFP-Proteine, MRTF-A und der mit DAPI angefärbten DNA sowie deren Überlagerung. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ .



**Anhang 3: Subzelluläre Lokalisation von endogenem MRTF-A in GFP-NLS-V/VCA-exprimierenden Zellen.**

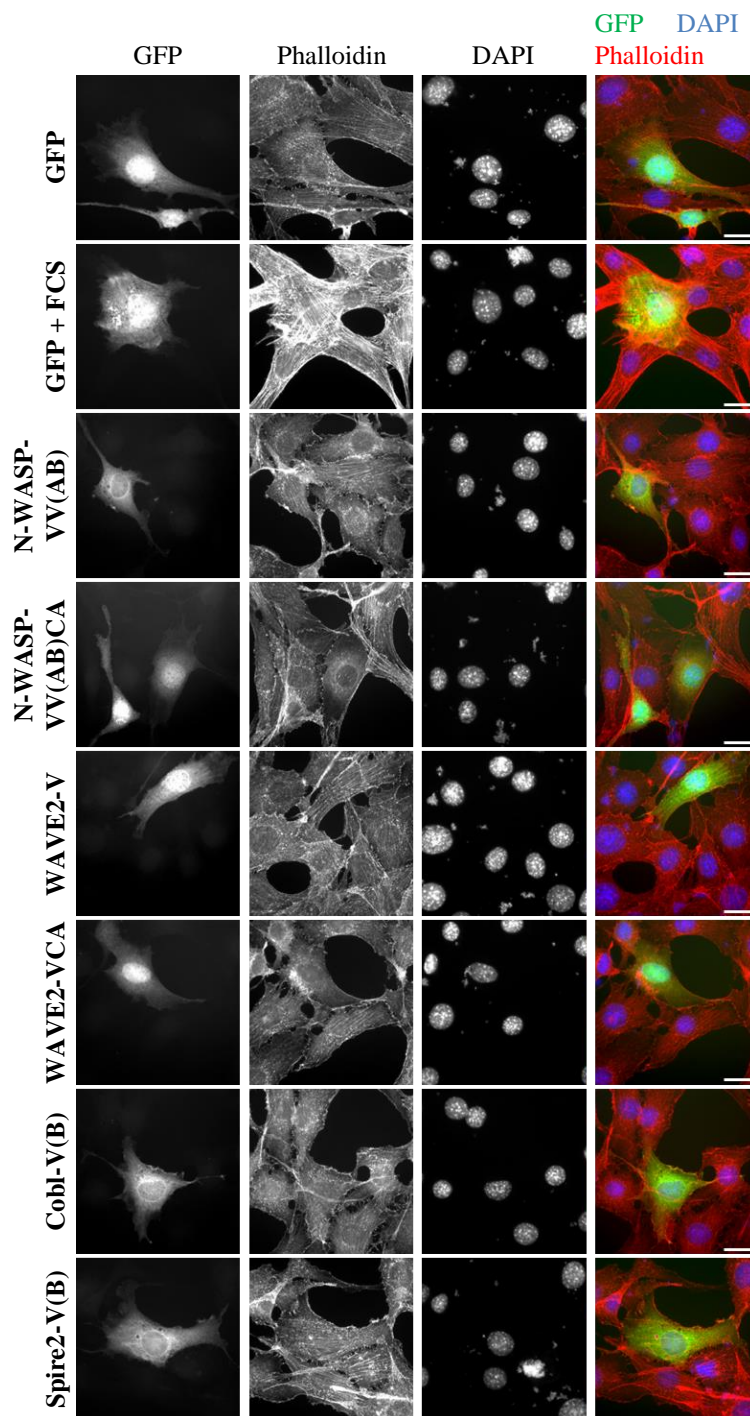
Die Anfertigung der Immunfluoreszenzfärbung wurde bereits in Abbildung 13 beschrieben. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die detektierten GFP-Proteine, MRTF-A und die DAPI-Färbung der DNA. Außerdem ist die Überlagerung der Aufnahmen dargestellt. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ .



**Anhang 4: Nukleäre Akkumulation von endogenem MRTF-A in GFP-JMY-V/VVCA-transfizierten Zellen.**

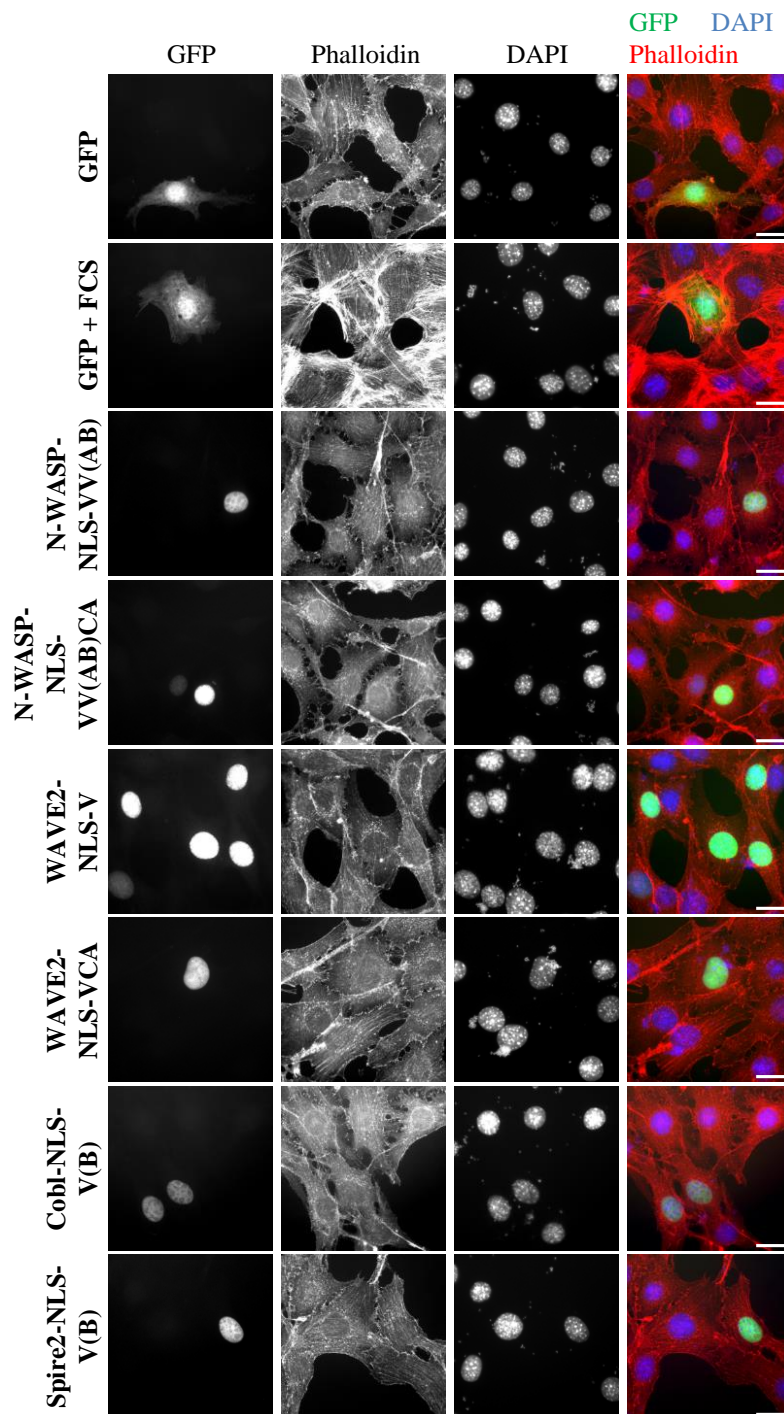
Wie bereits in Abbildung 14 beschrieben, erfolgte die Detektion von MRTF-A mit einem MRTF-spezifischen Antikörper durch Immunfluoreszenzfärbungen. Dargestellt sind zudem die mikroskopischen Aufnahmen der GFP-Fusionsproteine, die DAPI-Färbung der DNA und die Überlagerung der zusammengehörigen Aufnahmen. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ .





**Anhang 5: Verstärkte Bildung von Aktinfilamenten nach Serumstimulation, aber nicht in GFP-V/VCA-exprimierenden Zellen.**

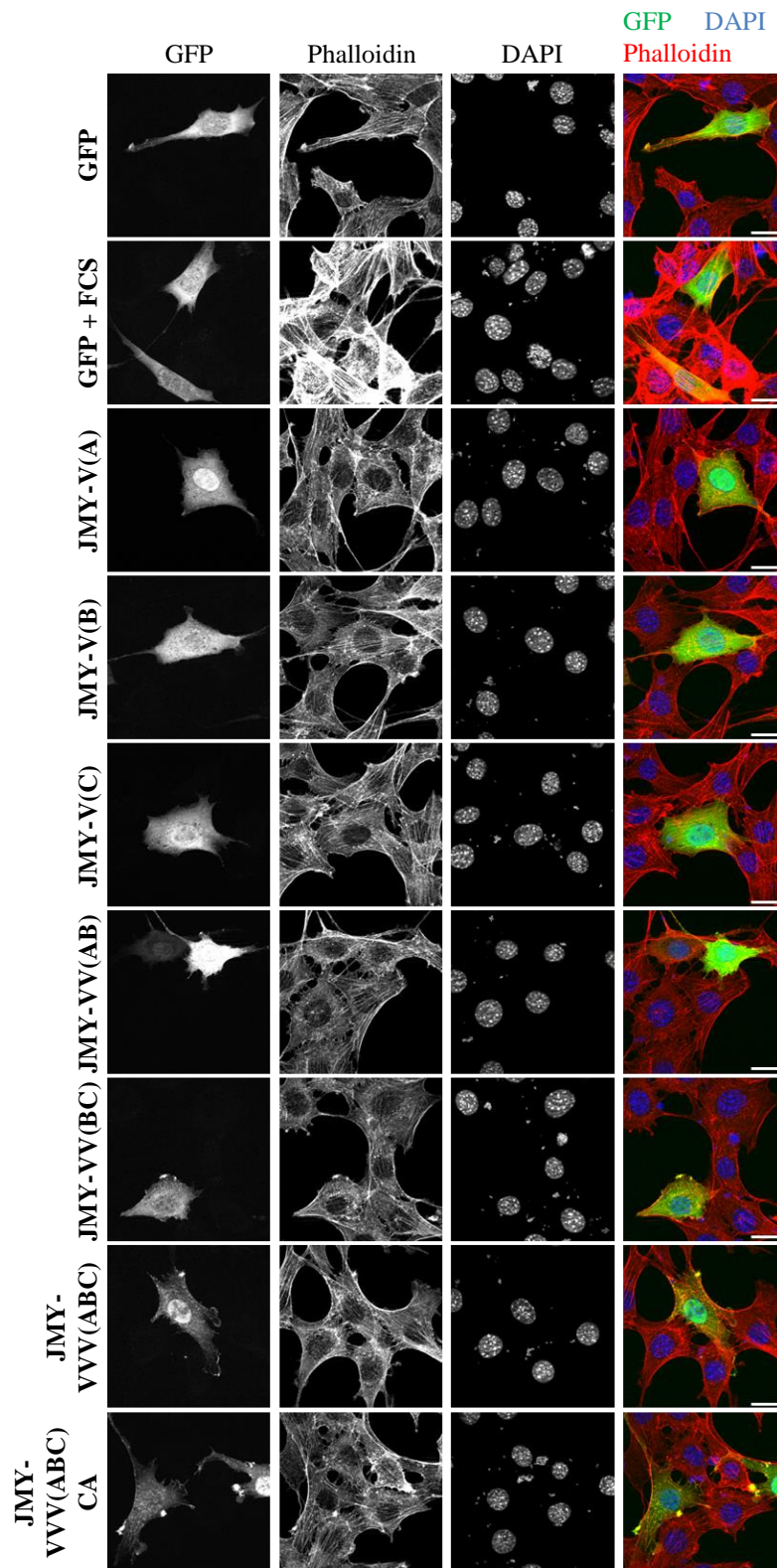
Die Anfärbung des Aktinzytoskeletts erfolgte wie in Abbildung 22 beschrieben. Gezeigt werden die mikroskopischen Aufnahmen der GFP-Fusionen, des Phalloidin-markierten F-Aktins, die DAPI-Färbung der DNA sowie deren Überlagerung. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ .



**Anhang 6: Keine induzierte Filamentbildung nach Überexpression von NLS-WH2-Varianten aus N-WASP, WAVE2, Cobl und Spire2.**

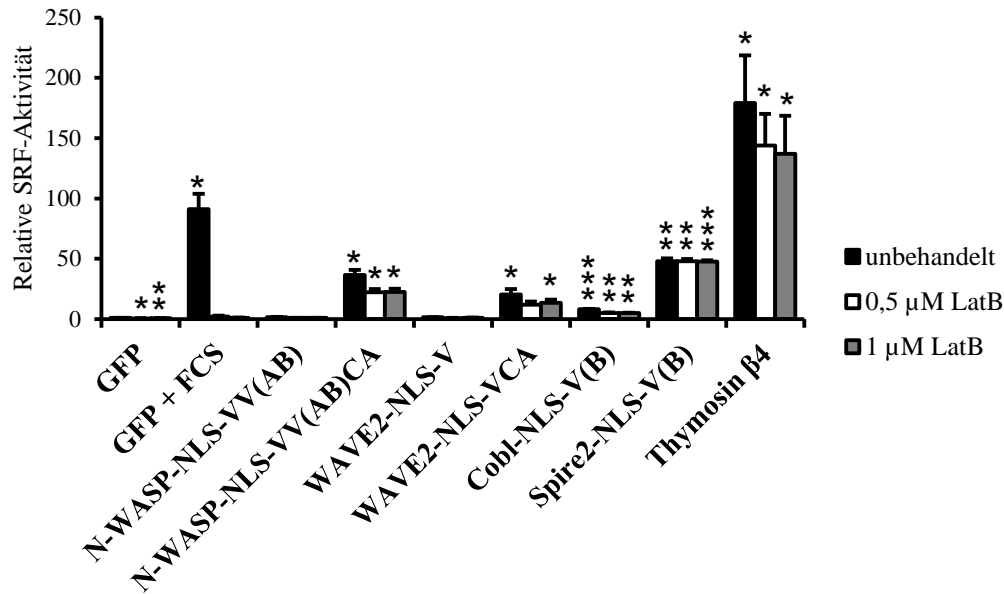
Die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte wie in Abbildung 23 beschrieben. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die detektierten GFP-Proteine, das mit Phalloidin angefärbte Aktinzytoskelett sowie die DAPI gefärbte DNA. Außerdem ist die Überlagerung der einzelnen Aufnahmen dargestellt. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ .





**Anhang 7: Keine veränderte Bildung von Aktinfilamenten nach Überexpression von JMY-V/VVCA-Proteinen.**

Die Anfertigung der Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung des Aktinzytoskeletts wurde bereits in Abbildung 25 beschrieben. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen werden das Phalloidin-positive F-Aktin, die GFP-Fusionsproteine und die DAPI-Färbung der DNA gezeigt. Außerdem wurde eine Überlagerung zusammengehöriger Aufnahmen durchgeführt. Der angegebene *scale bar* entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{m}$ .



**Anhang 8: Aktivierung eines MRTF-abhängigen SRF-Reporters durch nukleär-lokalisierte WH2-Varianten trotz induzierter Depolymerisation des Aktinzytoskeletts.**

Nach Transfektion der GFP-NLS-V/VCA-Fusionsproteine und den Reporterplasmiden p3D.A.-Luc und pRL-TK erfolgte die Behandlung der NIH 3T3-Zellen mit 0,5-1 μM Latrunculin B (LatB) für 7,5 h. Vergleichend dazu wurde der Einfluss von Latrunculin B auf unstimulierte (GFP) und stimulierte (GFP + FCS) GFP-Kontrollzellen untersucht. Die Bestimmung der relativen SRF-Aktivität erfolgte nach Messung der Luziferase-Luminiszenzen mit anschließender Normalisierung der *Firefly*- auf die *Renilla* Luziferase Luminiszenz. Die Daten der zugehörigen, simultan gemessenen GFP-V/VCA-Fusionsproteine sind in Abbildung 26 gezeigt. Dargestellt sind Fehlerbalken des SEM (n = 3) sowie die statistische Signifikanz des Einstichproben t-Tests in Bezug auf die unbehandelte GFP-Kontrolle (GFP = 1) mit \* p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01 und \*\*\* p ≤ 0,001.

## Lebenslauf

### ***Persönliche Daten:***

Name: Franziska Kluge, geb. Schikora  
 Akademischer Grad: M. Sc. (Biochemie)  
 Geburtsdatum/ -ort: 02.11.1988 in Friedrichroda  
 Geschlecht: weiblich  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Korrespondenzanschrift: Magdeburger Str. 7, 06112 Halle (Saale)

### ***Hochschulausbildung:***

seit 01/2017 Mutterschutz/Elternzeit und Fertigstellung der Dissertation  
 09/2012-12/2016 Promotion (Biochemie) in der AG von Prof. Dr. G. Posern am Institut für Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 08/2012 **Abschluss: Master of Science (Biochemie)**  
 Masterarbeit in der AG von Prof. Dr. E. Schwarz am Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Thema: „Expression, Reinigung und proteinbiochemische Charakterisierung von Disulfid-enthaltenden Varianten des nukleären Poly(A)-Bindeproteins (PABPN1)“  
 10/2010-08/2012 Masterstudium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 07/2010 **Abschluss: Bachelor of Science (Biochemie)**  
 Bachelorarbeit in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie von Prof. Dr. L. Wessjohann am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale)  
Thema: „Biotransformation von Triterpensäuren (Betulinsäure) durch *Sepedonium spec.*“  
 10/2007-07/2010 Bachelorstudium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### ***Schulbildung:***

07/2007 **Abschluss: allgemeine Hochschulreife (Abitur)**  
 1999-2007 Friedrich-Schiller-Gymnasium, Leipzig  
 1995-1999 Hans-und-Hilde-Coppi-Grundschule, Leipzig

### ***Praktische Erfahrungen:***

01/09/2010-24/09/2010 Praktikum bei Bayer Bitterfeld GmbH, Deutschland

---

(Ort, Datum)

---

(Franziska Kluge)

## **Publikationsliste**

Weissbach J\*, **Schikora F\***, Weber A, Kessels M & Posern G (2016) Myocardin-Related Transcription Factor A Activation by Competition with WH2 Domain Proteins for Actin Binding. *Mol. Cell. Bio.* **36**: 1526-1539

\* bedeutet gleichberechtigte Erstautorenschaft

Eisenach PA, **Schikora F** & Posern G (2014) Inhibition of Arginyltransferase 1 Induces Transcriptional Activity of Myocardin-related Transcription Factor A (MRTF-A) and Promotes Directional Migration. *J. Biol. Chem.* **289**: 35376-35387

### ***In Vorbereitung:***

**Kluge F\***, Weissbach J\*, Weber A & Posern G. The C-Terminal Domain of JMY Prevents its Potential for MRTF-A Activation.

\* bedeutet gleichberechtigte Erstautorenschaft

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich abschließend bei allen Personen herzlich bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuerst danke ich Herrn Prof. Dr. Guido Posern für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Außerdem möchte ich mich für die stetige Gesprächsbereitschaft, die Anregungen und Ratschläge sowie die gute Betreuung während der gesamten Zeit sehr bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Elisabeth Schwarz und Herrn PD Dr. Michael M. Kessels für ihre Bereitschaft, mich und meine Forschung im Rahmen des *Thesis Advisory Committees* zu begleiten. Ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, aber auch die vielseitigen Ideen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meiner „WH2-Kollegin“ Julia Weißbach danke ich für die enge Zusammenarbeit, aber vor allem für die schöne Zeit während unserer Kongressreisen nach Regensburg. Bei Anja Weber möchte ich mich für ihre stets hilfsbereite Unterstützung bei technischen Fragen und die gute Zusammenarbeit im Labor sehr bedanken. Astrid Veß danke ich für ihre Geduld mit mir und ihr offenes Ohr, das bereits in den frühen Morgenstunden aufmerksam zuhörte. Ein herzlicher Dank gilt auch Sara Werner und Ingo Holstein für ihren moralischen Beistand und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Außerdem danke ich allen weiteren derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Posern wie Stefanie Beinicke, Ulrich Blache, Anja Ehrenpfordt, Victoria Menger, Janine Obendorf, Falk Pohl, Anja Seifert, Dmitry Shaposhnikov, Anurag Singh, Robert Torka und Jens Wulfänger für das gute Arbeitsklima, ihre vielen Ratschläge aber vor allem für die tolle Zeit auch außerhalb des Laboralltags. Danke für viele schöne Erlebnisse!

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für den Beistand während der letzten Jahre. Bei meinen Eltern möchte ich mich bedanken, dass sie mir diesen Abschluss ermöglicht und mich in allen Situationen unterstützt haben. Insbesondere für das liebevolle Babysitting während der letzten Schreibphase danke ich meinen Eltern und Schwiegereltern von Herzen. Auch bei meiner Frau, Stefanie Kluge, möchte ich mich für ihre Liebe, Geduld und Motivation, ihren Beistand in schwierigen Lebenslagen und das Ertragen meiner Launen bedanken. Danke, dass du immer für mich da bist!

Außerdem möchte ich mich bei der DFG (SPP1464) für die Finanzierung dieses Projektes bedanken.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und ausschließlich die aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus den verwendeten Quellen wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen wurden unter Angabe des Literaturzitats als solche gekennzeichnet. Des Weiteren versichere ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmalig um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und diese weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Stelle bereits vorgelegt habe.

---

(Ort, Datum)

---

(Franziska Kluge)