

***Dictyostelium discoideum* als Expressionssystem für die
transmembrane Myosin-Chitinsynthase Ar-CS1 aus *Atrina rigida*
(Mollusca, Bivalvia) – einem Modellorganismus der
Biomineralisation – und Charakterisierung der Myosindomäne**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG

vorgelegt von
Veronika Schönitzer
aus München

Februar 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 09.02.2009

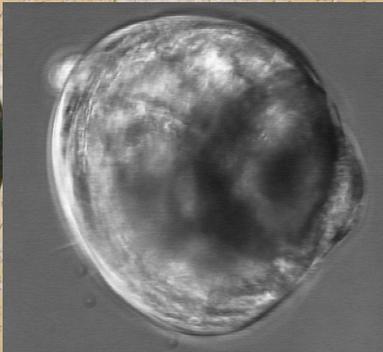
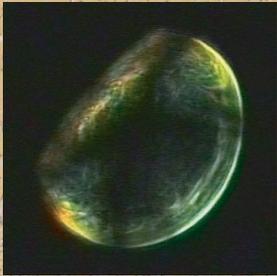
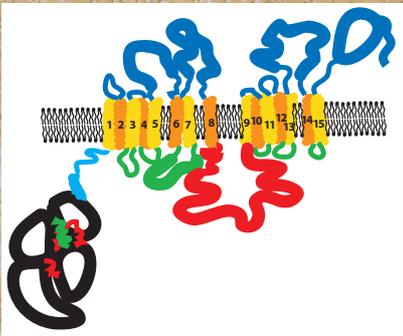
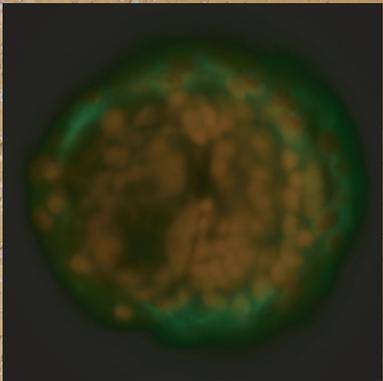
Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. Ingrid Weiss

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. Herbert Tschochner

1. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Sumper

2. Gutachter: PD Dr. Ingrid Weiss

3. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sterner



Dictyostelium discoideum als Expressionssystem für die transmembrane Myosin-Chitinsynthase Ar-CS1 aus *Atrina rigida* (Mollusca, Bivalvia) - einem Modellorganismus der Biomineralisation - und Charakterisierung der Myosindomäne

1. Einleitung	1
1.1. Biomineralisation von Molluskenschalen	1
1.2. Die funktionelle Rolle von Chitin bei der Schalenbildung	4
1.3. Gegenüberstellung der Chitinsynthesen aus Pilzen, Insekten und Mollusken	5
1.4. Mechanotransduktion als Kontrollmechanismus in der Biomineralisation?	8
1.5. Zielsetzung	9
2. Material und Methoden	12
2.1. Material	12
2.1.1. Bezugsquellen von Substanzen, Chemikalien, Enzymen und sonstigen Materialien	12
2.1.2. Antikörper	15
2.1.3. Puffer und Lösungen	15
2.1.4. Medien	21
2.1.4.1. Medien für <i>E. coli</i> -Kulturen	21
2.1.4.2. Medien für <i>D. discoideum</i> -Kulturen	22
2.1.5. Organismen	23
2.1.5.1. Bakterien	23
2.1.5.2. <i>Dictyostelium discoideum</i>	23
2.1.5.3. Zelllinien mit Myosindomänen der Ar-CS1 und mit Ar-CS1	24
2.1.6. Oligonukleotide	24
2.1.6.1. Oligonukleotide aus der Myosindomäne der Ar-CS1	24
2.1.6.2. Oligonukleotide aus der Ar-CS1	26
2.1.6.3. sonstige Oligonukleotide	26
2.1.7. Plasmide und Vektoren	27
2.1.8. Systeme zur DNA-Aufreinigung und Standards	29
2.1.9. Geräte	29
2.1.10. Software	31
2.2. Methoden	31
2.2.1. Zellbiologische Methoden	31
2.2.1.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
2.2.1.2. Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	32
2.2.1.3. Konservierung von <i>D. discoideum</i>	33
2.2.1.3.1. DMSO-Kulturen von vegetativen <i>D. discoideum</i> -Zellen	33
2.2.1.3.2. Konservierung <i>D. discoideum</i> -Sporen	33
2.2.1.4. Optionale Lagerung von <i>D. discoideum</i> -Zellen nach der Zellernte	34
2.2.1.5. Fixierungen von <i>D. discoideum</i> -Zellen	34
2.2.1.5.1. Fixierung mit Formaldehyd/ Methanol	34

2.2.1.5.2. Fixierung mit 4% Paraformaldehyd in 1× PBS auf Polysine®-Objektträger	34
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	35
2.2.2.1. Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab aus <i>E. coli</i>	35
2.2.2.2. Isolierung von Plasmiden im präparative Maßstab aus <i>E. coli</i>	35
2.2.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
2.2.2.4. Präparative und analytische Restriktionsspaltung von DNA	35
2.2.2.4.1. Präparativer Restriktionsverdau von DNA	36
2.2.2.4.2. Analytischer Restriktionsverdau von DNA	36
2.2.2.5. Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	36
2.2.2.6. Polymerasekettenreaktionen	36
2.2.2.6.1. PCR nach Standardprotokoll	37
2.2.2.6.2. Kolonie-PCR mit <i>E. coli</i>	38
2.2.2.6.3. Kolonie-PCR mit <i>D. discoideum</i>	38
2.2.2.7. Reinigung von DNA aus Agarosegelen	39
2.2.2.8. Klonierung	39
2.2.2.8.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
2.2.2.8.2. Klonierung von PCR-Fragmenten ohne 3'-A-Überhang	39
2.2.2.8.2.1. Vorbereitung des Vektors	40
2.2.2.8.2.2. Kinase-Behandlung des PCR-Fragments	40
2.2.2.8.2.3. Ligation des kinasierten PCR-Fragments in pBS II SK (-) (Sma I/CIAP)	40
2.2.2.8.3. Ligation von DNA-Fragmenten mit kompatiblen, überstehenden Enden	40
2.2.2.8.4. Transformation in <i>E. coli</i> -Zellen	41
2.2.2.8.5. Sequenzierung und Sequenzanalyse	41
2.2.2.9. Transformation mit Calciumphosphatfällung in <i>D. discoideum</i>	42
2.2.2.10. Elektroporation mit <i>D. discoideum</i>	42
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	43
2.2.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	43
2.2.3.2. Präzipitation von Proteinen mit Trichloressigsäure	43
2.2.3.3. Methanol/Chloroform-Präzipitation von Proteinen	43
2.2.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.2.3.5. Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	45
2.2.3.6. Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	45
2.2.3.7. Westernblot	46

2.2.3.8. Trypsinspaltung im SDS-Polyacrylamidgel zur Probenvorbereitung für MALDI	47
2.2.4. Nachweis von Proteinen in <i>D. discoideum</i> mittels Immunfluoreszenz	47
2.2.5. Färbung von Chitin mit Calcofluor White an <i>D. discoideum</i> -Zellen	48
2.2.6. Färbung von Chitin mit GFP-getagtem Chitinbindeprotein an <i>D. discoideum</i> -Zellen	48
2.2.7. Mikroskopische Methoden	49
2.2.7.1. Konfokalmikroskopie	49
2.2.7.2. Fluoreszenzmikroskopie	50
2.2.7.3. Rasterkraftmikroskopie („Atomic Force Microscopy“)	50
2.2.8. Expression und Reinigung der rekombinanten Myosindomänen der Ar-CS1	51
2.2.8.1. Kultivierung von den Zelllinien mit Myosindomänen der Ar-CS1	51
2.2.8.2. Aufreinigung von rekombinanten Myosindomänen der Ar-CS1 im analytischen Maßstab	51
2.2.8.3. Aufreinigung von rekombinanten Myosindomänen der Ar-CS1 im präparativen Maßstab	52
2.2.8.4. Ni-NTA-Affinitätschromatographie	53
2.2.9. Charakterisierung der Zelllinien mit Ar-CS1-YFP	54
2.2.9.1. Präparation von Membranfraktionen aus <i>D. discoideum</i> -Zellen mit Ar-CS1-YFP	54
2.2.9.2. Radioaktiver Chitinsynthese-Aktivitätstest	55
2.2.9.3. Immobilisierung von Membranfraktionen aus Zelllinien mit Ar-CS1-YFP an Silikatkugeln	55
2.2.9.4. Aufreinigung von Chitinfragmenten aus Kulturüberständen von Zelllinien mit Ar-CS1-YFP	56
2.2.9.5. Zuckernalytik mittels Gaschromatographie (GC und GC-MS)	57
2.2.9.6. Nachweis von Chitinfragmenten aus <i>D. discoideum</i> - Kulturüberständen mittels Chitinbindeprotein	58
3. Ergebnisse	59
3.1. Charakterisierung der Chitinsynthese von <i>Atrina rigida</i> (Ar-CS1)	59
3.1.1. Phylogenetische Analyse der Chitinsynthese von <i>Atrina rigida</i>	59
3.1.2. Phylogenetische Analyse der Myosindomäne der Ar-CS1	61
3.2. Klonierung der Myosindomäne der Ar-CS1 und Klonierung der Ar-CS1	62
3.2.1. Klonierung der Myosindomäne mit und ohne Region niedriger Komplexität in pBluescript II SK (-) und in Expressionsvektoren pQE-70 sowie pDXA-Vektoren	62

3.2.2. Ortsspezifische Mutagenese der Regulationsstelle in der Myosindomäne der Ar-CS1	66
3.2.3. Klonierung der Ar-CS1 in pDXA-mcs-YFP	67
3.3. Zelllinien mit Varianten der Myosindomänen der Ar-CS1	70
3.3.1. Generierung und Selektion von <i>D. discoideum</i> -Zelllinien für die Expression der Myosindomäne der Ar-CS1	70
3.3.2. Untersuchung der Kolokalisation der Myosindomäne der Ar-CS1 mit Aktin innerhalb der <i>D. discoideum</i> -Zellen	75
3.3.3. Aufreinigung der Myosindomänen der Ar-CS1 aus <i>D. discoideum</i> -Zellen	77
3.3.3.1. Aufreinigung der Myosindomäne der Ar-CS1 im kleineren Maßstab	77
3.3.3.2. Aufreinigung von Myosindomänen der Ar-CS1 aus der Cytoskelettfraktion im präparativen Maßstab	80
3.3.3.3. Aufreinigung der Myosindomäne der Ar-CS1 aus der löslichen Fraktion im präparativen Maßstab	83
3.3.3.4. Vergleich der Eigenschaften der Myosindomänenvarianten der Ar-CS1 aus der löslichen Fraktion und der Cytoskelettfraktion	88
3.3.4. MALDI-Analyse der Bande auf Höhe der zu erwartenden Größe der Myosindomäne der Ar-CS1	91
3.4. Zelllinien mit der Chitinsynthase Ar-CS1-YFP	92
3.4.1. Herstellung und Handhabung der Zelllinien mit Ar-CS1-YFP	93
3.4.2. Expression und Verteilung der Ar-CS1-YFP in <i>D. discoideum</i> -Zellen	93
3.4.3. Untersuchung der Membranfraktionen der Zelllinien mit Ar-CS1-YFP	97
3.4.3.1. Membranpräparation von Zelllinien mit Ar-CS1-YFP	97
3.4.3.2. Bindung von Membranfraktionen an Silikatkugeln	99
3.4.3.3. Radioaktiver Aktivitätstest mit Membranfraktionen	101
3.4.4. Untersuchung der <i>in vivo</i> -Chitinsynthese	102
3.4.5. Abbildung der <i>D. discoideum</i> -Zellen mittels Rasterkraftmikroskopie	106
4. Diskussion	111
4.1. Evolutionäre Beziehung von Ar-CS1 zu den bekannten Chitinsynthase	111
4.2. Zelllinien mit Varianten der Myosindomänen der Ar-CS1	112
4.2.1. Heterologe Expression Myosindomäne der Ar-CS1 in <i>D. discoideum</i>	112
4.2.2. Etablierung des Reinigungsprotokolls für die Myosindomänen der Ar-CS1 aus <i>D. discoideum</i> -Zellen	113
4.2.3. Vergleich der verschiedenen Varianten der Myosindomäne der Ar-CS1	118
4.2.4. Eigenschaften der Myosindomäne der Ar-CS1 und Rückschlüsse auf ihre Rolle bei der Biomineralisation	119
4.3. <i>D. discoideum</i> als Modellsystem für die Charakterisierung der Ar-CS1	121

4.3.1. Herstellung der Zelllinien Ax3ArCS1-YFP und dcsArCS1-YFP und Verteilung der Ar-CS1 innerhalb der Zelllinien	121
4.3.2. Untersuchung von Membranfraktionen der Ar-CS1-YFP	123
4.3.3. Untersuchung von Aktivität der Ar-CS1-YFP <i>in vivo</i>	125
4.3.4. Untersuchung der Membranstuktur der Zelllinien mit Ar-CS1-YFP	126
4.3.5. <i>D. discoideum</i> als Modellsystem für die Untersuchung der Ar-CS1 auf molekularer Ebene	127
5. Zusammenfassung	129
6. Anhang	131
6.1. Multiples Alignment der Ar-CS1, Mg-CS1 und PfCHS1	131
6.2. Expression der Myosindomäne der Ar-CS1 in <i>E. coli</i>	132
6.2. Reinigung der Myosindomäne der Ar-CS1 aus <i>D. discoideum</i>	132
6.2.1. Verschiedene Bedingungen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie	132
6.2.2. Einfluss von Detergenzien auf die Ausbeute bei der Aufreinigung von Myosindomänen der Ar-CS1	135
6.3. Werte der Quantifizierung der extrahierten Myosindomänen bei verschiedenen Bedingungen	138
6.4. Messwerte des Radioaktivitätstest zur Untersuchung der Aktivität der Ar-CS1-YFP	138
6.5. Chitinsynthese in Ar-CS1-YFP Zelllinien in Gegenwart von Latrunculin A	139
6.6. Aufreinigung von Chitin aus dem Kulturüberstand mittels Fällung	140
6.6.1. Analyse der aus dem Kulturmedium aufgereinigten Polysaccharide mit CBGFP	140
6.6.2. Analyse der Polysaccharide aus dem Kulturmedium mit GC-MS	141
7. Literaturverzeichnis	144

1.1. Biomineralisation von Molluskenschalen

Der Begriff Biomineralisation bezeichnet die Vorgänge, bei denen verschiedene Organismen Mineralien bilden. Die entstehenden, komplexen Biomineralien faszinieren durch ihre Schönheit und Vielfalt. Im Unterschied zur abiotischen Mineralisation wird bei der Biomineralisation die Mineralbildung durch den Organismus kontrolliert. Wie die Bildung der hierarchisch mineralisierten Strukturen reguliert wird, ist jedoch immer noch ein Rätsel (Lowenstam und Weiner, 1989; Mann, 2002; Simkiss und Wilbur, 1989).

Bei den Mollusken beginnt die Bildung der Schale schon in den frühen Entwicklungsstadien und setzt sich während des gesamten Lebenszykluses fort (Wilt et al., 2003).

Es gibt sechs verschiedene Calciumcarbonatmineralien mit prinzipiell gleicher Zusammensetzung aber verschiedener Kristallstruktur. Die adulte Molluskenschale besteht aus den thermodynamisch stabilsten Formen Calcit oder Aragonit. Aragonit ist im Gegensatz zu Calcit härter. In vielen Arten kommen beide polymorphen Formen vor. Diese sind dann jedoch räumlich getrennt in verschiedenen Bereichen der Schale (Mann, 2002). Die larvale Schale besteht aus Aragonit. Beim Wachstum der larvalen Schale wird amorphes Calciumcarbonat (ACC) am Rand und an der Innenseite der Schale eingelagert und kristallisiert dann partiell zu Aragonit (Weiss et al., 2002). Indirekte Hinweise deuten an, dass diese Strategie der Transformation einer amorphen, instabilen Phase in eine kristalline, stabile Phase auch bei der Schalenbildung von adulten Mollusken Anwendung findet (Nudelman et al., 2008; Wilt, 2005).

Der mineralisierte Teil der Molluskenschale ist außen durch eine dünne, organische Schicht, das Periostracum, geschützt. Daran angelagert ist eine prismatische Schicht aus Calcitkristallen. Die Calcitprismen sind gewöhnlich mehrere hundert μm lang und in eine organische Matrix eingelagert. Innen liegt die Perlmuttertschicht aus dicken Stapeln plättchenförmiger Aragonitkristalle. Die polygonalen Aragonitplättchen haben einen Durchmesser von 5-15 μm und sind in 0,5 μm dicken, parallelen Lamellen angeordnet. Die Lamellen wiederum sind durch eine organische Matrix getrennt (Bøggild, 1930, Nakahara und Bevelander, 1971; Watabe, 1965, Weiner und Addadi, 1997).

Die organische Matrix ist eine komplexe Ansammlung von Makromolekülen. Sie dient als Gerüst und wird teilweise während der Schalenbildung in die Mineralien eingeschlossen. Die Materialeigenschaften der biogenen Mineralien werden dadurch beeinflusst (Weiner et al., 2006).

In vitro-Versuche haben gezeigt, dass β -Chitin und Seidenfasern, zusammen mit verschiedenen Matrixmolekülen aus unterschiedlichen Schalenschichten, kontrollieren können, welche kristalline Calciumcarbonatform entsteht. Stammen die sauren Makromoleküle aus einer Schalenschicht, die Calcit enthält, wird Calcit gebildet. Saure

Makromoleküle aus einer Schalenschicht, die Aragonit enthält, führen dagegen zur Bildung von Aragonit. Um die Bildung von Calcit oder von Aragonit *in vitro* zu induzieren, müssen sowohl β -Chitin als auch die Seidenfasern zugegeben werden. Mit α -Chitin können keine Calciumcarbonatkristalle gebildet werden (Falini et al., 1996; Falini und Fermani, 2004).

Basierend auf diesen Beobachtungen und auf Untersuchungen der entkalkten, organischen Matrix aus der Perlmuttertschicht mit einem Cryo-TEM wurde das zur Zeit geltende Modell für die Struktur und die Funktion der organischen Matrix von Levi-Kalishman et al. (2001) aufgestellt. Schichten aus β -Chitin-Fibrillen bilden das Grundgerüst. Der Raum zwischen den Chitinschichten wird mit einem Gel aus seidenähnlichen Proteinen gefüllt. In dem Gel sind Aspartat-reiche Glykoproteine eingeschlossen. Andere Aspartat-reiche Glykoproteine sind an das Chitin angelagert.

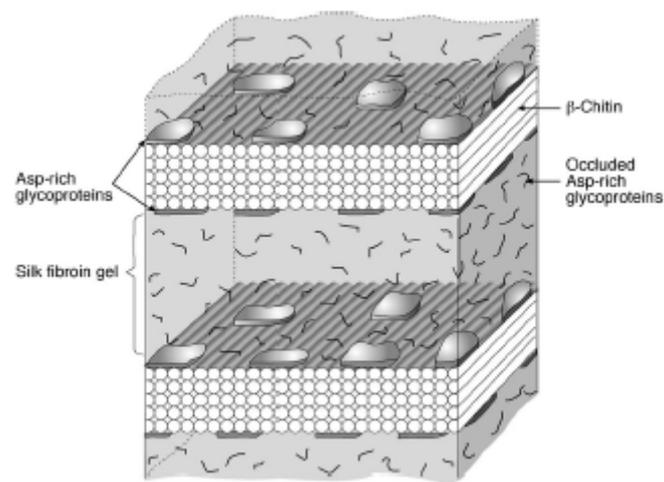


Fig. 1.1.: Schematische Darstellung der Struktur der demineralisierten, organischen Matrix aus der Perlmuttertschicht (Abb. aus Levi-Kalishman et al., 2001).

In den letzten Jahren wurden weitere Indizien für dieses Modell entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass die Seidenfasern in einem gelartigen, ungeordneten und stark hydrierten Zustand vorliegen, bevor das Mineral gebildet wird. Außerdem können die seidenähnlichen Proteine eine unspezifische Kristallisation hemmen. Wahrscheinlich wird bei der Bildung der Mineralien das Wasser aus dem Gel entfernt und die in dem Gel enthaltenden Seidenproteine werden von den entstehenden Mineralien beiseite gedrückt. In der mineralisierten Schale sind sie dann zwischen den Chitinfasern und der Mineralphase lokalisiert (Addadi et al., 2006; Nudelman, et al. 2008). Manche Aspartat-reichen Glykoproteine dienen als Nukleationsstellen. In der Matrix von *Nautilus pompilius* (Mollusca, Cephalopoda) sind an dieser Nukleationsstelle in einem zentralen Punkt Proteine, die reich an Carboxygruppen sind. Um diese bilden an Sulfatgruppen reiche Glykoproteine einen Ring. Die Carboxylate im Zentrum induzieren die orientierte Nukleation des Kristalls, die Sulfate wechselwirken mit Calciumionen und reichern sie an der Oberfläche an (Nudelman et

al., 2006, Weiner et al. 2006). Bezares et al. (2008) konnten diese Verteilung der Makromoleküle auch in der organischen Matrix von *Haliothis rufescens* (Mollusca, Gastropoda) nachweisen.

In der prismatischen Schicht aus *Atrina rigida* (Mollusca, Bivalvia) besteht die Matrix, die die einzelnen Calcitprismen umgibt, hauptsächlich aus Glycin-reichen Proteinen. Die Matrix innerhalb der Prismen hingegen besteht aus einem Netzwerk aus Chitinfasern (Nudelman et al., 2007).

Direkt verantwortlich für die Schalenbildung ist das Mantelgewebe. Es liegt unterhalb der Schale und umhüllt den Organismus. Der Mantel haftet am Schalenrand. Die Epithelzellen der äußeren Mantelfalte sekretieren zuerst Periostracum. Dann werden von weiteren spezialisierten Zellen des äußeren Mantelepithels die prismatische Schicht und die Perlmuttertschicht gebildet (Kobayashi, 1969, Wilt et al., 2003).

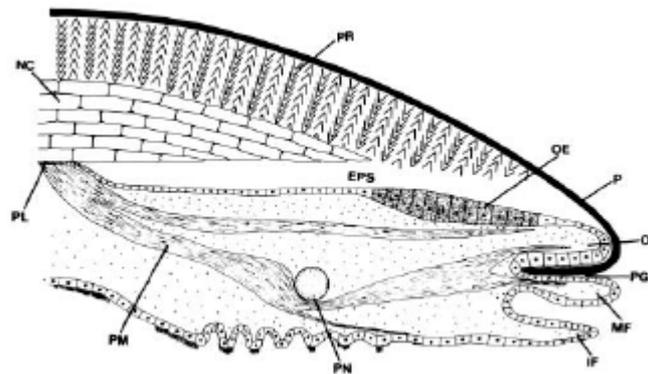


Fig. 1.2.: Schematische Darstellung eines Schnitts durch den Schalenrand und den Mantel bei Bivalvia (Abb. aus Wilt et al., 2003)

EPS: extrapallialer Raum; MF: mittlere Falte des Mantels; NC: Perlmuttertschicht; OE: äußeres Mantelepithel; OF: äußere Mantelfalte; P: Periostracum; PG: periostracale Grube; PL: palliale Linie; PM: pallialer Muskel; PN: pallialer Nerv; PR: prismatische Schicht.

Die verschiedenen Proteine und Glykoproteine, die Bestandteil der Schale oder für den Mineralisationsprozess nötig sind, müssen aus den Mantelepithelzellen sekretiert werden. Jede Mantelzone für die Bildung einer der strukturellen Schichten der Schale hat ihr eigenes Expressionsprofil an Proteinen, die für die Schalenbildung und für die Farbgebung des Periostracums verantwortlich sind (Jackson et al., 2006; Jackson et al., 2007). Um die Prozesse bei der Schalenbildung zu steuern, sind zusätzlich verschiedene Enzyme in den Mantelepithelzellen notwendig. Transmembrane Kanäle, Transporter und Ionenpumpen können die Diffusion von benötigten Ionen und von Biomolekülen kontrollieren und begrenzen. Die Synthese von Bestandteilen der organischen Matrix wie Chitin wird von Enzymen in den Zellen katalysiert. Außerdem sind verschiedene Signaltransduktoren für eine Abstimmung der Prozesse in der Zelle und der Bildung der Schale außerhalb der Zelle

notwendig (Marin et al., 2008; Weiss und Marin, 2008). Die Proteine in den Mantelepithelzellen wurden noch nicht untersucht.

1.2. Die funktionelle Rolle von Chitin bei der Schalenbildung

Chitin ist ein lineares Polysaccharid aus $\beta(1-4)$ verknüpften N-Acetylglucosaminen (GlcNAc). Die einzelnen Polymere lagern sich spontan zu Filamenten zusammen. Es gibt drei polymorphe Formen des Chitins: α -Chitin, β -Chitin und γ -Chitin. Im Exoskelett der Crustaceae kommt α -Chitin vor, in den Molluskenschalen kommt β -Chitin vor. In allen Formen wechselwirken parallele Polysaccharidketten über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxyresten, um Fibrillen zu bilden. Diese Fibrillen wechselwirken untereinander über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidgruppen, die senkrecht zu der Faser und zur Stapelachse stehen. Bei β -Chitin sind die Ketten in jeder Fibrille parallel, in α -Chitin sind sie antiparallel. Bei γ -Chitin alternieren zwei parallele Stränge mit einem antiparallelen Strang. Die chemischen und die physikalischen Eigenschaften von Chitin werden von dem Grad der Deacetylierung, von dem Grad der Polymerisation und von kovalenten oder nicht kovalenten Proteinmodifikationen beeinflusst (Falini u. Fermani, 2004; Kurita, 2006; Muzzarelli und Peter, 1997).

In der Perlmuttschicht sind die kristallographischen Achsen von β -Chitin und von dem Aragonitkristall aufeinander ausgerichtet (Weiner und Traub, 1980; Weiner et al., 1983). Chitin scheint das strukturelle Grundgerüst zu bilden und die Orientierung der Kristalle zu diktieren. Die entstehenden Kristalle wachsen vermutlich aus kolloidalen Mineralpartikeln zuerst vertikal entlang der c-Achse des Aragonits, bis sie auf die nächste organische Matrix treffen. Anschließend wachsen sie lateral, bis sie dort an die angrenzende Matrix stoßen. Dabei werden saure Proteine eingebaut (Addadi et al., 2006).

Auch beim Wachstum der prismatischen Schicht spielt Chitin vermutlich eine entscheidende Rolle. Wahrscheinlich wachsen die Prismen schichtweise. Dabei wird auf eine schon bestehende Mineralschicht zunächst ein Netzwerk aus Chitin abgelagert. Auf dieses werden Partikel aus ACC, das durch Aspartat-reiche Proteine stabilisiert wird, aufgelagert. Die Kristallisation zu Calcit findet auf Grund von epitaxialer Nukleation statt (Nudelman et al., 2007).

In der organischen Matrix von Schalen larvaler *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia) kommen auch chitinähnliche Strukturen vor. Die Menge und Verteilung des Chitins ändern sich abhängig vom larvalen Stadium (Weiss und Schönitzer, 2006). In meiner Diplomarbeit (2005) konnte die Expression der Chitinsynthase, dem Enzym, das die Bildung von Chitin katalysiert, in den larvalen Mantelepithelzellen, die auch für die Sekretion der Schale verantwortlich sind, nachgewiesen werden. In *in vivo*-Studien wurde der Einfluss des

kompetitiven Chitinsynthaseinhibitors Nikkomycin Z auf die Bildung der larvalen Schale von *Mytilus galloprovincialis* untersucht. Die Behandlung der Larven beeinflusst die Schalenbildung auf verschiedenen hierarchischen Ebenen: es treten verschiedene Missbildungen der Schale an den Wachstumsfronten wie den Schalenrändern und den Gelenken und Änderungen in der Kristallisation und Ultrastruktur auf. Chitin scheint das Schalenmaterial nicht nur mechanisch zu festigen, sondern beeinflusst auch die Funktionalität und Stabilität der Schalen (Schönitzer und Weiss, 2007, Weiss et al., 2006).

Das Vorkommen von Chitin in der prismatischen und der Perlmuttertschicht der adulten Schale, sowie in der larvalen Schale gibt entscheidende Hinweise darauf, dass Chitin die Ausbildung der verschiedenen Strukturen der mineralisierten Schichten beeinflusst. Die *in-vivo*-Studien mit dem Chitinsynthaseinhibitor lassen eine enge Verbindung zwischen der Regulation der Mineralisierung und der Chitinsynthese bei Mollusken vermuten.

In anderen Invertebraten wie in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und in *Tribolium castaneum* wurde gezeigt, dass die Chitinsynthese mit der Regulation der Entwicklung des Organismus in Beziehung steht (Arakane et al., 2008, Moussian et al., 2005, Zhang et al., 2005).

1.3. Gegenüberstellung der Chitinsynthesen aus Pilzen, Insekten und Mollusken

Die Bildung von Chitin wird von Chitinsynthasen katalysiert. Die katalytische Domäne ist hochkonserviert. Sie enthält zwei einzigartige Motive: EDR und **QRRRW**. Diese Enzyme wurden in Pilzen, Insekten, Nematoden und Mollusken entdeckt. Am besten untersucht sind sie in Pilzen und Insekten. Über den katalytischen Mechanismus und die Regulation der Aktivität ist nur wenig bekannt.

Die intrazelluläre Bildung und die Ablagerung von Chitin in Strukturen im extrazellulären Raum bestehen aus einer komplexen Reihe von biochemischen und physikalischen Ereignissen (Cohen, 2001). Ein Chitinstrang wird aus dem aktivierten UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc), welches über mehrere Reaktionen aus Trehalose synthetisiert wird, gebildet (Glaser und Brown, 1957). Divalente Kationen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} sind als Cofaktoren notwendig. Der exakte katalytische Mechanismus ist weitgehend unbekannt. Konservierte saure Reste in den Zuckerdonor- und Zuckerakzeptorbindestellen, die unter physiologischen Bedingungen negativ geladen sind, können als Base in einer nucleophilen Substitutionsreaktion, bei der eine glykosidische Bindung entsteht, dienen (Merzendorfer, 2006). Das intrazellulär gebildete Chitin wird über unbekannte Mechanismen in den extrazellulären Raum sekretiert.

Ruiz-Herrera und Bartnicki-Garcia gelang es 1974, *in vitro* die Synthese von Chitinmikrofibrillen in membranhaltigen Rohextrakten aus der Hefe *Mucor rouxii*

nachzuweisen (Ruiz-Herrera und Bartnicki-Garcia, 1974). Mit elektronenmikroskopischen Studien wurden in der aufgereinigten Fraktion mit höchster Chitinsyntheseaktivität Mikrovesikel, die so genannten Chitosomen, entdeckt. Die Chitosomen weisen *in vitro* Chitinsyntheseaktivität auf. Unter dem Elektronenmikroskop können auch in Schnitten ganzer Zellen Chitosomen identifiziert werden (Bracker et al., 1976; Ruiz-Herrera et al., 1977). Die Chitosomen zeichnen sich durch ihre einzigartige Größe, Membrandicke und niedrige Dichte aus. Ihr Durchmesser beträgt zwischen 40-70 nm und die Membranen sind 6,5-7 nm dick. Chitosomen können reversibel in 16 S-Untereinheiten dissoziieren. Diese Untereinheiten sind die kleinsten molekularen Größen, die Chitinsyntheseaktivität aufweisen. Die chitosomalen Chitinsynthasen in zellfreien Extrakten sind zymogen (Bartnicki-Gracia, 2006). In Pilzen wird *in vivo* das Chitin vermutlich in den Chitosomen polymerisiert, die Chitosomen fusionieren mit der Plasmamembran und das Chitin gelangt direkt in den extrazellulären Raum. Chitin kann nach diesem Modell gelagert und bei Bedarf schnell ausgeschüttet werden.

Tellam et al. (2000) identifizierten die erste cDNA-Sequenz einer Insektenchitinsynthase. Mit 15-18 Transmembrandomänen ist die Insektenchitinsynthase komplexer als die Pilzchitinsynthase mit meist nur 3 Transmembrandomänen (Tellam et al., 2000, Merzendorfer, 2006). Bei den Insekten werden die Chitinsynthasen vermutlich erst in Chitosomen vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert. Dort werden sie durch proteolytische Enzyme aktiviert. Mehrere Chitinsynthaseenzyme bilden ein Cluster, eine so genannte Chitinsyntheseeinheit. Da das aktive Zentrum vermutlich zur cytoplasmatischen Seite gerichtet ist, muss das Chitin über die Plasmamembran transportiert werden. Chitin könnte während seiner Synthese über eine Pore, die von transmembranen Domänen der Chitinsynthase gebildet wird, aus der Zelle gelangen. Ein Transport über andere Transmembranproteine wäre auch denkbar. Zwischen den Chitinpolymeren, die von benachbarten Chitinsyntheseeinheiten gebildet werden, bilden sich spontan Wasserstoffbrückenbindungen aus. Dadurch entstehen kristalline Mikrofibrillen, die mit anderen Zuckern, Proteinen, Glykoproteinen oder Proteoglykanen assoziieren können. *In vivo* wurden bisher keine Chitosomen bei Insekten nachgewiesen. Immunohistochemische Studien zeigten, dass die Insektenchitinsynthase in den apikalen Spitzen der Microvilli der epidermalen Zellen lokalisiert ist (Kramer u. Koga, 1986, Cohen, 2001, Merzendorfer u. Zimoch, 2003, Merzendorfer, 2006).

Die Chitinsynthasen werden sowohl auf Ebene der Transkription als auch durch posttranslationale Modifikation reguliert. In *S. cerevisiae* ist das Netzwerk der Wechselwirkungen der Gene, die bei der Chitinsynthese beteiligt sind, äußerst komplex (Lesage et al., 2005). Bei Insekten spielt das Steroidhormon Ecdysteron bei der Expression der Chitinsynthasen eine Rolle (Merzendorfer, 2006). Die Chitinsynthasen aus Pilzen und

aus Insekten werden direkt durch Proteasen oder über eine proteolytische Signalkaskade aktiviert (Merzendorfer, 2006).

Die erste Molluskenchitinsynthase aus *Atrina rigida* (Mollusca, Bivalvia), die Ar-CS1 (Accession No. [DQ081727](#)), wurde aus einer cDNA-Bank aus Mantelepithelzellen sequenziert (Weiss et al., 2006). Bisher sind zwei weitere Chitinsynthasesequenzen aus Mollusken bekannt: Mg-CS1 aus *Mytilus galloprovincialis* (Weiss et al., 2006; Gesamtsequenz: Accession No. EF535882) und PfCHS1 aus *Pinctada fucata* (Suzuki et al., 2007; Accession No.: AB290881). Die Molluskenchitinsynthasen sind die ersten bekannten Chitinsynthasen sowohl mit einer komplexen Topologie mit 15 Transmembrandomänen als auch mit einer N-terminalen Myosindomäne (Weiss et al., 2006, Suzuki et al. 2007). Bei den Pilzen gibt es Chitinsynthasen, die eine myosinmotor-ähnliche Domäne (MMD) enthalten. Bei Insekten sind bisher keine Chitinsynthasen mit einer Myosindomäne bekannt.

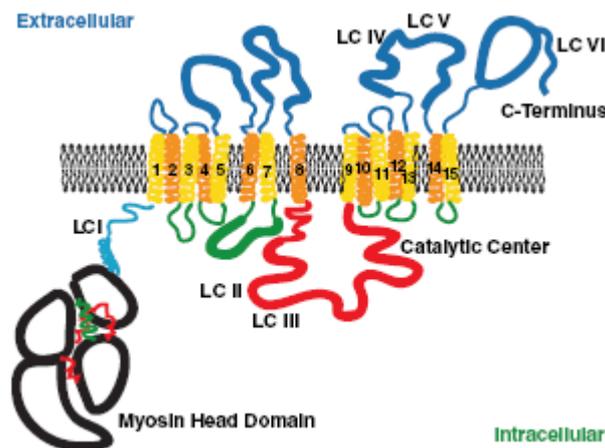


Fig. 1.3.: Vorläufiges Modell der Ar-CS1, das basierend auf der Aminosäuresequenz erstellt wurde (Abb. aus Weiss et al., 2006).

Myosine sind bekannte Motorproteine, die chemische Energie aus der Hydrolyse von ATP in mechanische Kraft, die entlang von Aktinfilamenten gerichtet ist, umwandeln. Die schweren Ketten der Myosine bestehen im Allgemeinen aus drei Domänen: die N-terminale Myosinkopf- oder Myosinmotordomäne, die Gelenkregion und die Myosinschwanzdomäne. Die Myosinkopfdomäne ist für die Aktinbindung und die ATP-Hydrolyse verantwortlich. An die Gelenkregion binden die regulatorischen leichten Ketten wie beispielsweise Calmodulin. Die Myosinschwanzdomänen sind sehr verschieden und sind für die Bindung an eine Fracht und/oder für die Dimerbildung der Myosine verantwortlich. Die Myosinfamilie ist sehr groß und die einzelnen Myosine sind sehr unterschiedlich in den mechanochemischen und in den funktionellen Eigenschaften (Mermall et al., 1998, Goodson und Dawson, 2006, Mooseker und Foth, 2008). Die Myosindomäne der Molluskenchitinsynthasen enthält die konservierten

Regionen einer Myosinkopfdomäne: die ATP-Bindestelle, die switch I- und die switch II-Regionen, die Converter-Subdomäne, Relay-Loop und die SH1-Helix.

1.4. Mechanotransduktion als Kontrollmechanismus in der Biomineralisation?

Biomineralien sind kolloidale Suspensionen, die selbst aggregieren. Die Aggregation könnte durch Kräfte beeinflusst werden. Die Prozesse innerhalb der Mantelepithelzellen, die die Schale bilden, und das Wachstum der Molluskenschale müssen aufeinander abgestimmt werden. Bei dieser Rückkopplungsregulation könnten Kräfte über das Cytoskelett eine regulatorische Rolle spielen. Die Myosindomäne der Molluskenchitinsynthase könnte dabei als Mechanoumwandler wirken.

Bei den pathogenen Pilzen *Ustilago maydis* und *Colletotrichum graminicola* wurde eine ungewöhnliche regulatorische Funktion der Myosindomänen der Chitinsynthasen Um-Mcs1 bzw. CgCHSV nachgewiesen. Die Pilze benötigen die Myosin-Chitinsynthasen, um in die tieferen Schichten des Wirtsgewebes eindringen zu können (Weber et al., 2006; Werner et al., 2007). Anscheinend müssen für eine erfolgreiche Infektion über das Cytoskelett Kräfte angelegt werden, während neue Zellwand abgelagert wird.

Da die Topologie der Chitinsynthasen und der Cellulosesynthasen ähnlich ist und auch die Struktur und Funktion von Chitin und von Cellulose ähnlich sind (Merzendorfer, 2006), liegt es nahe, bei der Chitinbildung und bei der Cellulosebildung ähnliche Konzepte zu vermuten. In vaskulären Pflanzen, Farnen, Algen und Moosen bilden Cellulosesynthasen Rosetten aus sechs ringförmig angeordneten Untereinheiten (Brown und Saxena, 2000). Ohne die Komplexe findet keine Kristallisation zu Mikrofibrillen statt (Arioli et al., 1998).

Cellulosemikrofibrillen werden in wachsenden Zellen in parallelen Bereichen quer zur Wachstumsrichtung abgelagert. Paradez et al. (2006) konnten die lang bestehende so genannte Alignment-Hypothese, dass sich die Cellulosesynthasekomplexe (CSC) innerhalb der Plasmamembran entlang von Bahnen, die durch Microtubuli festgelegt werden, bewegen, bestätigen. Die CSC sind entweder mit den Microtubuli verbunden oder die Microtubuli bilden Schranken, die den CSC keine laterale Bewegung erlauben. Da die CSC sich zumindest zeitweise auch ohne Microtubuli in linearer Richtung bewegen können, treiben sie sich selbst vermutlich durch Kräfte an, die bei der Polymerisation und der Kristallisation der β -1,4-Glucane zu Mikrofibrillen entstehen. Es sind also keine Motorproteine beteiligt (Emons et al., 2007). Ohne Cellulosesynthese wird die Orientierung der Microtubuli geändert. Der genaue Mechanismus der Beziehung zwischen Microtubuli und Cellulosesynthase ist noch nicht aufgeklärt (Paradez et al. 2008). Die Microtubuli beeinflussen die Zellform und die Morphogenese des wachsenden Apex eines Arabidopsisstecklings. Das Microtubulicytoskelett selbst wird durch mechanischen Stress

reguliert: die Microtubuli orientieren sich nach den in einem Modell vorhergesagten Richtungen des maximalen Drucks, der von dem wachsenden Organ selbst ausgelöst wird (Hamant et al. 2008).

Die Kontrolle der Bildung der Molluskenschale wird wahrscheinlich sowohl intrazellulär als auch extrazellulär komplexer sein als die Kontrolle des Zellwandaufbaus bei Pflanzen.

Die Myosindomäne der Molluskenchitinsynthese deutet darauf hin, dass die Chitinsynthese mit dem Aktincytoskelett direkt interagiert. Der größte Effekt der Zugspannung des Cytoskeletts ist ein Gleichgewicht der Kräfte aufzubauen und zu erhalten (Chicurel et al., 1998). Ähnlich wie die Zellen über die fokalen Adhäsionskomplexe die ECM (extrazelluläre Matrix) und das Cytoskelett verbinden und ein Kräftegleichgewicht herstellen und halten, könnten die Mantelepithelzellen der Mollusken auch über die Chitinsynthese wirken (Weiss et al., 2006).

1.5. Zielsetzung

Bei der Bildung der Molluskenschale könnten Kräfte auf verschiedenen Ebenen wirken.

Während der Schalenbildung ändert sich ständig der physikalische und physiko-chemische Zustand im extrazellulären Raum: das hydrathaltige Gel in der organischen Matrix wird verdrängt und durch ACC, das zu Aragonit kristallisiert, ersetzt. Dabei entstehen Drücke an den Kontaktflächen zwischen den Mantelepithelzellen und der entstehenden Schale. Die auftretenden Kräfte könnten von der Chitinsynthese detektiert werden und über die Myosindomäne, die mit dem Cytoskelett interagiert, intrazelluläre Signalwege auslösen. Gleichzeitig kann über die Chitinsynthese, die das Chitingerüst für die mineralisierende Schale synthetisiert, auch extrazellulär die Chitinablagerung und die Mineralisation reguliert werden.

Die Kraftentfaltung der Myosindomäne könnte während der Ablagerung des Chitins über Scherkräfte die Mineralisierung beeinflussen. Die Anwendung von Scherung auf kolloidale Suspensionen kann zur Bildung von kristallinen Strukturen führen. Der Kristallisationsprozess und die Qualität des wachsenden Kristalls ist abhängig von der Scherungsrate. Außerdem hängt die Orientierung der Kristallkeime von der Richtung der Scherung ab (Evans und Wennerström, 1999). Über die Rate der Kraftschläge der Myosindomäne könnte die Kristallisation von Chitin und damit möglicherweise auch indirekt von ACC reguliert werden. Von der Richtung der Kraft der Myosindomänen könnte die Orientierung des Chitins abhängen.

Die Myosindomäne könnte für die Lokalisation der Chitinsynthese, für den Transport in die Plasmamembran, für die Aktivierung der Chitinsyntheseaktivität und für eine regulierte Anordnung von Chitinsynthesekomplexen ähnlich den Rosetten der Cellulosesynthese in der

Membran eine Rolle spielen (Weiss et al., 2006). Chitin beginnt in etwa zehn verknüpften N-Acetylglucosamineinheiten zu kristallisieren. Eine konzentrierte Synthese von einzelnen Chitinpolymeren würde sich auf die Gesamtstruktur des Chitins auswirken.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen auf molekularer Ebene die Myosindomäne der Ar-CS1 charakterisiert werden, um Informationen über ihre möglichen Funktionen zu erhalten. Zu Beginn dieser Arbeit war die Sequenz der Ar-CS1 bekannt. Für die Klonierung der Myosindomäne der Ar-CS1 standen 21 DNA-Fragmente zu Verfügung. Die Übergangsregion zur transmembranen Chitinsynthesedomäne, die Region niedriger Komplexität weist einen relativ hohen Anteil an unter physiologischem pH-Wert geladenen Aminosäuren auf. Um eine mögliche ionische Auswirkung dieser Region zu untersuchen, sollte die Myosindomäne der Ar-CS1 mit und ohne dieser Region kloniert werden. Durch gezielte Mutagenese sollte eine mutmaßliche Regulationsstelle untersucht werden. *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*) wurde als Expressionssystem für die Myosindomäne der Ar-CS1 gewählt. Nach Geeves et. al (2005) konnten bisher keine funktionellen rekombinanten Myosindomänen in Bakterien exprimiert werden und aktive Myosindomänen können in für biochemische und strukturelle Studien ausreichender Menge nur aus *D. discoideum* und dem Baculovirus System aufgereinigt werden. *D. discoideum* ist ein anerkanntes Modellsystem für die Untersuchung von molekularen Wechselwirkungen bei der Zelldifferenzierung, Signaltransduktion, Phagozytose, Cytokinese und Zellbewegung (Eichinger et al., 1999; Geeves et al., 2005). Sie haben im Vergleich zu den anderen üblichen Expressionssystemen den Vorteil, dass sie keine feste Zellwand haben und in ihrem Verhalten und in ihrer Erscheinungsform Zellen höherer Eukaryonten ähneln. So werden Proteine auch ähnlich wie bei höheren Eukaryonten posttranslational modifiziert (Arya et al., 2008). Allerdings sind sie reich an proteolytischen Proteinen und Histidin-haltigen Proteinen. Dies kann bei der Proteinaufreinigung zu Problemen führen (Manstein und Hunt, 1995). Es sollte ein Aufreinigungsprotokoll etabliert werden, mit dem die Myosindomäne der Ar-CS1 und die mutierten Varianten in für Charakterisierungsversuche ausreichenden Mengen gewonnen werden können.

Ein weiteres Ziel war es ein Modellsystem für die Untersuchung der Rolle der Ar-CS1 bei der Schalenbildung der Mollusken zu entwickeln. Dieses Modell soll es ermöglichen die Prozesse der Mineralisation ausgehend von der Chitinbildung zu untersuchen. Das bisher bestehende Modell für die Bildung der verschiedenen Schalenschichten beruht auf Untersuchungen der fertigen, entkalkten Matrix (s. Fig. 1.1.). Als Modellsystem sollen *D. discoideum*-Zellen dienen, die Ar-CS1 heterolog exprimieren. *D. discoideum* scheint hierfür ein geeignetes Expressionssystem zu sein, da bisher noch keine Chitinsynthase aus *D. discoideum* bekannt ist und schon erfolgreich rekombinante Membranproteine in *D. discoideum* exprimiert wurden. Bisher konnten der menschliche Muskarinrezeptor M2 (Voith

und Dingermann, 1995), der GLUT 1 Glucosetransporter aus Ratte (Cohen et al., 1996) und Aquaporin aus Arabidopsis (Chaumont et al., 1997) funktionell in *D. discoideum* exprimiert werden. Die Untereinheiten der Na,K-ATPase wurden wenig oder gar nicht in die Plasmamembran eingebaut (Zhou und Fambrough, 1999). Bisher wurde noch kein so komplexes Membranprotein wie die Ar-CS1 heterolog exprimiert. Die erhaltenen Zelllinien sollten auf ihre Tauglichkeit als Modellsystem hin geprüft werden. Dazu sollten die Verteilung der Molluskenchitinsynthese in der Zelle, ihr Einfluss auf die Membranstruktur und ihre Aktivität untersucht werden.

2.1. Material

2.1.1. Bezugsquellen von Substanzen, Chemikalien, Enzymen und sonstigen Materialien

Stoffbezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Acrylamid-Bis (37,5:1) (30%)	Serva, Heidelberg
N-Acetylglucosamin	Sigma-Taufkirchen
Agarose NEEO-Qualität	Roth, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Roth, Karlsruhe
BamH I /Puffer K	Amersham Biosciences, Freiburg
BamH I /Bam H I-Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot
BSA (Albumin FraktionV, Protease-frei)	Roth, Karlsruhe
Bacto™ Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto™ Hefe-Extrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto™ Pepton	Difco, Detroit, USA
Bacto™ Trypton	Difco, Detroit, USA
Benzamidin	Fluka, Steinheim
β-Betain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bgl I /Bgl I-Puffer	Amersham Biosciences, Freiburg
Bgl II /NEB 3	New England BioLabs, Schwalbach
Bis-Tris	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Blasticidin S Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
BrCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz)	Roth, Karlsruhe
Brillant Blau R 250 (Coomassie)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	Fermentas, St.Leon-Rot
Chloroform	Roth, Karlsruhe
L-1-Chloro-3-Tosylamido-7-Amino-2-Heptanon·HCl (TLCK)	Serva, Heidelberg
Chitin	Roth, Karlsruhe
DABCO	Roth, Karlsruhe
DMSO (für Molekularbiologie)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase	Roche Diagnostics, Mannheim

DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EcoR I / Puffer H	Amersham Biosciences, Freiburg
EcoR V / Puffer H	Amersham Biosciences, Freiburg
EGTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	BioRad, München
Ethylenglykol	Roth, Karlsruhe
Geneticindisulfat (G418 Sulfat)	Roth, Karlsruhe
Gene Pulser® Küvette (0,4cm)	Bio-Rad, München
Gene Ruler, DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GlyGly	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hepes	Roth, Karlsruhe
Hinc II/ Puffer M	Amersham Biosciences, Freiburg
Hind III/ Puffer R	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
ImmersoI™ 518F	Zeiss, Oberkochen
Immobilon-P Transfer Membran (PVDF)	Millipore, Eschborn
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kpn I / Puffer L	Amersham Biosciences, Freiburg
Latrunculin A	CALBIOCHEM, Darmstadt
Leupeptin	Serva, Heidelberg
Lysozym, from chicken egg white	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MES Hydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MLCT-Microlever Probes	Veeco Instruments, Mannheim
Multi-Flex 0,5-200µl Spitzen	Roth, Karlsruhe
NBT	Roth, Karlsruhe
Nco I/ NEB 4	New England BioLabs, Schwalbach
dNTPs	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Neubauer-Improved (Zählkammer)	Paul-Marienfeld GmbH&Co-KG, Lauda-Königshofen
Nikkomycin Z	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Nonidet-P40	Fluka, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Plano GmbH, Wetzlar
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Roth, Karlsruhe
Pefabloc® SC	Fluka, Taufkirchen
1,10-Phenanthrolin	Serva, Heidelberg
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	NEB GmbH, Frankfurt/Main
Polysine®-Objektträger	Roth, Karlsruhe

Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Proteose-Pepton	Fluka, Taufkirchen
Protran® Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Roti®-Quant	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Sac I / Sac I-Puffer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
SAWADY Pwo-DNA-Polymerase	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Scintillations-Gefäß (20ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Scintillations-Cocktail (Ready-Safe™)	Beckmann Coulter, Krefeld
SDS Pellets	Roth, Karlsruhe
µ-Slide 18 well ibiTreat (Gewebekultur behandelt)	ibidi GmbH, Martinsried
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Silikatkugeln	Machery-Nagel, Düren freundliches Geschenk von Dr. S. Kaufmann
Sph I/NEBuffer 2	New England BioLabs, Schwalbach aus eigener Herstellung
TaqPolymerase	Promega GmbH, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tetracyclin	Roth, Karlsruhe
TEMED	Falcon, Heidelberg
Titerplatte (24 well)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tosyl-L-Phenylalanin-Chlormethylketon (TPCK)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X-100	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin (sequencing grade)	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin Inhibitor (STI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
UDP-N-Acetylglucosamin	Amersham Biosciences, Freiburg
UDP- ¹⁴ C-N-Acetylglucosamin	Millipore, Eschborn
Ultrafree®-MC (zentrifugierbare Filtereinheiten; 0,22µm)	Whatman, Dassel
Whatman GF/C (24mm)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Xho I/ Puffer R	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe

Zellkulturschalen (ø 6 cm),

BD Falcon, Heidelberg

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2.1.2. Antikörper

Antikörper	Wirt	Besonderheiten	Firma	Bestellnr.
Actin, pan Ab-5	Maus	monoklonaler Antikörper	Dianova GmbH, Hamburg	DLN-07273
Anti-(His) ₆ -Tag	Maus	monoklonaler Antikörper	Dianova GmbH, Hamburg	DIA 900
AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L)	Ziege	Cy TM 3-konjugiert	Dianova GmbH, Hamburg	115-165- 146
AffiniPure goat anti-mouse IgG(H+L)	Ziege	alkalische Phosphatase- konjugiert	Dianova GmbH, Hamburg	115-055- 062
GFP Epitope Tag	Kaninchen	Immunisierendes Peptid (AA 26-39 von <i>Aequorea victoria</i> WT-GFP) konserviert in GFP, eCFP, eYFP, eGFP, YFP	Dianova GmbH, Hamburg	PA1-980A
Alexa Fluor® 488 goat anti- rabbit IgG(H+L)	Ziege	Alexa Fluor® 488- konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe	A11008
Kaninchen IgG, F _c	Ziege	alkalische Phosphatase- konjugiert	Chemicon, Hampshire, United Kingdom	AP156A

2.1.3. Puffer und Lösungen

AP-Puffer:

2,42 g Tris/HCl
 1,17 g NaCl
 ad ca. 150 ml
 pH auf 9,8 voreinstellen
 2,03 g MgCl₂ x 6 H₂O separat in ca. 30 ml lösen
 beide Lösungen vereinigen
 pH auf 9,5 einstellen
 ad 200 ml auffüllen

ATP / MgCl₂ (50 ml, =10×) (Chitinsynthaseaktivitätstest):

1,7 mM ATP

100 mM MgCl₂
ad 50 ml mit H₂O
Lösung sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren

Blotpuffer (PVDF):
50 mM Borat, pH 9
10% MeOH

Blotpuffer:
25 mM Tris, pH 8,3
192 mM Glycin
0,1% SDS
20% MeOH

Bonner's Lösung:
0,60 g NaCl
0,75 g KCl
0,30 g CaCl₂
ad 1 l
autoklavieren

BrCIP-Lösung:
50mg/ml BrCIP in DMF (wasserfrei)

1,25 M CaCl₂ (Transformation von *D. discoideum*-Zellen mit CaPhosphatfällung):
1,84 g CaCl₂
ad 10 ml
sterilfiltrieren
bei RT lagern

Coomassie-Färbelösung:
2,5 g Coomassie R-250 (0,25%)
450 ml Methanol
90 ml Essigsäure
ad 1 l mit H₂O

DD-EP (Elektroporationspuffer):
10 mM KH₂PO₄, pH 6,4
50 mM Sucrose

DNA-Probenpuffer (6×):
0,08% Bromphenolblau
0,08% Xylencyanol
30% Glycerin

Elektrodenpuffer für SDS-PAGE:
11,5 g Tris
72,05 g Glycin
5 g SDS
ad 4 l mit H₂O

Entfärbelösung für mit Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgele:
Schnell-Entfärber: 500 ml MeOH
200 ml HAc
ad 2 l mit H₂O

Langsam-Entfärber: 500 ml MeOH
750 ml HAc
ad 8,75 l mit H₂O

Entwickler für Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen:
6 g Na₂CO₃
50 µl Formaldehyd (37%)
200 µl Natriumthiosulfat (0,2 g/l)
ad 100 ml mit H₂O

Extraktionspuffer:
50 mM Hepes, pH 8
30 mM KAc
15 mM MgAc

Fixierungspuffer (4% Paraformaldehyd in 1× PBS):
4 g Paraformaldehyd auf 100 ml mit 1× PBS auffüllen
auf Magnetrührer bei 80°C lösen bis Lösung klar ist

Fixierlösung für Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen:
50 ml MeOH
12 ml HAc
50 µl Formaldehyd (37%)
ad 100 ml mit H₂O

GlcNAc (9 ml, =10×) (Chitinsynthaseaktivitätstest):
170 mM GlcNAc
17 mM UDP-GlcNAc
ad 9 ml mit H₂O

18% Glycerin (Transformation von *D. discoideum*-Zellen mit CaPhosphatfällung)
frisch ansetzen!:
1,44 ml autoklaviertes 50% Glycerin
0,56 ml H₂O
2,00 ml 2× HBS

GlyGly-Puffer für Ni-NTA-Säule:
20 mM GlyGly, pH 9,0
350 mM NaCl
10 mM KCl

Waschpuffer: GlyGly-Puffer + 10 mM Imidazol

Elutionspuffer 1: GlyGly-Puffer + 200 mM Imidazol

Elutionspuffer 2: GlyGly-Puffer + 500 mM Imidazol

Harnstoffpuffer für Ni-NTA-Säule:
Basispuffer: 100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris/HCl
8 M Urea

Lyse-Puffer B:
= Basis-Puffer, pH 8,0 (mit NaOH einstellen)

Waschpuffer C:

= Basis-Puffer, pH 6,3 (mit HCl einstellen)

Elutionspuffer D:

= Basis-Puffer, pH 5,9 (mit HCl einstellen)

Elutionspuffer E:

= Basis-Puffer, pH 4,5 (mit HCl einstellen)

Lagerung kurzfristig bei 4-20°C, jedoch vor Gebrauch ggf. pH-Wert einstellen!

2× HBS:

4,0 g NaCl
0,18 g KCl
0,05 g Na₂HPO₄
2,5 g HEPES
0,5 g Glucose
ad 250 ml
pH auf 7,1 einstellen
steril filtrieren
bei -20°C lagern

HKM-Puffer:

50 mM Hepes, pH 7,3
30 mM KAc
10 mM MgSO₄

Imprägnierlösung für Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen:

100 mg AgNO₃
75 µl Formaldehyd (37%)
ad 100 ml mit H₂O

0,5 M KH₂PO₄/NaOH, pH 6,5 (50 ml, =10×) (Chitinsynthaseaktivitätstest)

3,4 g KH₂PO₄ (1 M =136,09 g/l) in ca. 30 ml H₂O lösen,
mit 10 M NaOH auf pH 6,5,
mit H₂O ad 50 ml
Lösung mit 0,22 µm-Filtern sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren

Hepes/KI-Puffer

50 mM Hepes, pH 8,0
500 mM NaCl
0,6 M KI
6 mM Na-Thiosulfat

für Ni-NTA-Säule:

Waschpuffer:

Hepes/KI-Puffer + 10 mM Imidazol

Elutionspuffer 1:

Hepes/KI-Puffer + 200 mM Imidazol

Elutionspuffer 2:

Hepes/KI-Puffer + 500 mM Imidazol

2× Laemmli

130 mM Tris/HCl, pH 6,8
6,6% SDS
10% β-Mercaptoethanol
20% Glycerin

0,1% Bromphenolblau

Lysepuffer LyB (Kolonie-PCR mit *D. discoideum*-Zellen):

10 mM Tris/HCl, pH 8,3
50 mM KCl
2,5 mM MgCl₂
0,45% Nonidet-P40
0,45% Tween® 20

Lysepuffer für analytisches Extraktionsverhalten von *D. discoideum*-Zellen:

50 mM Tris/HCl, pH 8,3
2,5 mM EDTA
1 mM DTT
5 mM Benzamidin
pH auf 8,1 einstellen

Lysepuffer für Aufreinigung von Myosin aus *D. discoideum*-Zellen

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
2 mM EDTA
0,2 mM EGTA

MES-Puffer:

20 mM MES
0,2 mM CaCl₂
2,0 mM MgCl₂
pH auf 6,8 einstellen
ad 1l

Mg²⁺-ATP-Stammlösung:

0,5 M ATP
0,5 M MgSO₄

15 mM Na/K-PO₄ Puffer, pH 6,5:

15 mM Na₂HPO₄ - Lösung gegen eine
15 mM KH₂PO₄ - Lösung titrieren bis pH 6,5 erreicht ist

NBT-Lösung:

75 mg/ml NBT in 70% DMF

Ni-NTA-Puffer nach Manstein und Hunt (1995):

Basispuffer: 50 mM HEPES, pH 7,3
300 mM KAc
10 mM MgSO₄
frisch zugeben: 5 mM Benzamidin
7 mM β-Mercaptoethanol

Waschpuffer:

Basispuffer + 10 mM Imidazol

Elutionspuffer 1:

Basispuffer + 200 mM Imidazol

Elutionspuffer 2:

Basispuffer + 500 mM Imidazol

Niedrig-Salz-Puffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,3
30 mM KAc

3 mM Benzamidin

Hoch-Salz-Puffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,3
300 mM KAc
3 mM Benzamidin

Imidazolpuffer:

500 mM Imidazol, pH 7,3
3 mM Benzamidin

10× OPA:

100 mM Tris-Ac, pH 7,5
100 mM MgAc
500 mM KAc

10× PBS:

1,37 M NaCl
26,8 mM KCl
0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
14,7 mM KH_2PO_4

PBT:

1× PBS
0,1% (v/v) Tween® 20

5× PCR-Puffer I:

50 mM Tris/HCl, pH 8,8
50 mM NaCl
2,5 mM MgCl_2
2 mM DTT

10× PCR-Puffer II:

200 mM Tris/HCl, pH 8,8
100 mM KCl
100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
20 mM MgSO_4
1% TritonX-100
1 mg/ml BSA

Ponceau S:

0,2% Ponceau-Rot
lösen in 1% HAc
Lagerung bei RT

2× SDS-Probenpuffer:

100 mM Tris/HCl, pH 6,8
3% SDS
30% Glycerin
10% β -Mercaptoethanol
0,1% Bromphenolblau

TE (Tris/EDTA):

10 mM Tris/HCl, pH 8,0
2 mM EDTA

Tfb I:

30 mM KAc
50 mM MnCl₂
100 mM KCl
15 % (v/v) Glycerin
mit 2 M HCl auf pH 5,8 einstellen

Tfb II:

10 mM MOPS/NaOH
75 mM CaCl₂
10 mM KCl
15% (v/v) Glycerin

TM-Puffer:

100 mM Tris/HCl, pH 7,5
40 mM MgAc

TNK-Puffer:

0,2 M NaCl
0,2 M KCl
10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
0,1% NaN₃

Trypsin-Lösung:

10 mg/ml in 0,5 M KH₂PO₄/NaOH, pH 6.5 (1×)

Trypsin-Inhibitor-Lösung:

15 mg/ml in 0,5 M KH₂PO₄/NaOH, pH 6.5 (1×)

2.1.4. Medien**2.1.4.1. Medien für *E.coli*-Kulturen**

AXI-Medium:

0,8% Bacto-Trypton
0,5% Bacto-Hefeextrakt
0,5% NaCl
ad 1 l

mit NaOH auf pH 7,0
autoklavieren

50 µg/ml Ampicillin
40 µg/ml X-Gal in DMF
9 µg/ml IPTG steril zugeben

LB-Medium:

1% NaCl
0,5% Bacto-Hefeextrakt
1% Bacto-Trypton
mit NaOH ad pH 7,2-7,5

LB_{Amp}:

LB steril ad 50 µg/ml Ampicillin

Plattenmedium:

jeweiliges Medium mit 1,6% Agar

SOC:

2% Bacto-Trypton
0,5% Bacto-Hefeextrakt
0,05% NaCl
0.02% KCl

mit NaOH ad pH 7,0
autoklavieren

10 mM MgCl₂
20 mM Glucose steril zugeben

2.1.4.2. Medien für *D. discoideum*-Kulturen

Bis-Tris HL5:

2,1 g Bis-Tris
10 g Proteose-Pepton
5 g Bacto-Hefeextrakt
10 g D-Glucose
ad 1 l

pH auf 7,1 einstellen
autoklavieren

pH ändert sich auf etwa 6,85; neu einstellen
steril filtrieren
bei RT lagern

Einfriermedium:

eiskaltes HL5-Medium
10% (v/v) DMSO

HL5-Medium:

10 g Proteose-Pepton
5 g Bacto-Hefeextrakt
10 g D-Glucose
1,15 g KH₂PO₄
0,4 g Na₂HPO₄ (0,5 g Na₂HPO₄·2 H₂O)
ad 1 l
pH 6,6

HL5c-Medium:

5 g Proteose-Pepton
5 g Bacto-Pepton
5 g Bacto-Hefeextrakt
10 g D-Glucose
1,2 g KH₂PO₄
0,35 g Na₂HPO₄ (0,44 g Na₂HPO₄·2 H₂O)
ad 1 l
pH 6,5

MES-Agarplatten:

zu MES-Puffer (s. 2.1.3.) 20 g/l Bacto-Agar geben

SM-Medium:

10 g D-Glucose

10 g Bacto-Pepton
10 g Bacto-Hefeextrakt
1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1,9 g KH_2PO_4
1 g K_2HPO_4 (1,3 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
ad 1l
pH 6,4 mit KOH einstellen

SM-Platten:

zu SM-Medium 20 g Bacto-Agar zugeben

SM/5 Platten:

2 g D-Glucose
2 g Bacto-Pepton
2 g Bacto-Hefeextrakt
0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1,9 g KH_2PO_4
1 g K_2HPO_4
ad 1l
pH 6,4 mit KOH einstellen
20 g Bacto-Agar zugeben

2.1.5. Organismen**2.1.5.1. Bakterien**

E. coli XL-1 blue MRF'

Genotyp: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$ [F' *proAB lacIqZ* Δ M15 Tn10 (Tetr)]

E. coli M15 [pREP]

Genotyp: basierend auf *E. coli* K12*lac; mtl;* (pRep4 Kanr)

Klebsiella aerogenes

Genotyp: neoR

(Columbia University, New York)

2.1.5.2. Dictyostelium discoideum

Ax3-orf+

Beschreibung: enthält Ddp2ORF-Gen, das die Replikation von Plasmiden mit *ori* ermöglicht

Genotyp: *axeA1, axeB1, axeC1, pyr5-6*-[pRG24], [Ddp2-ORF-pyr5-6], *ura+*

(Prof. Dr. D. Manstein, Hannover)

dcsA-

Beschreibung: *dcsA* REMI Mutante; keine Cellulose-Biosynthese

Genotyp: *axeA1*, *axeB1*, *axeC1*, *dcsA*-[pBSR1], *bsR*
(Columbia University, NewYork)

2.1.5.3. Zelllinien mit Myosindomänen der Ar-CS1 und mit Ar-CS1

Bezeichnung	Beschreibung	Expimierender <i>D. discoideum</i> -Stamm
MMD-H81	His-getaggte MMD der Ar-CS1 mit LC-Region	Ax3-orf+
MMD-Y36	YFP-getaggte MMD der Ar-CS1 mit LC-Region	Ax3-orf+
3H-MA-LC	His-getaggte MMD der Ar-CS1 ohne LC-Region	Ax3-orf+
YFP-MA-LC	YFP-getaggte MMD der Ar-CS1 ohne LC-Region	Ax3-orf+
3H-MA-S	His-getaggte MMD der Ar-CS1 mit LC-Region und mit Substitution E323S	Ax3-orf+
YFP-MA-S	YFP-getaggte MMD der Ar-CS1 mit LC-Region und mit Substitution E323S	Ax3-orf+
3H-MA-A	His-getaggte MMD der Ar-CS1 mit mit LC-Region und mit Substitution E323A	Ax3-orf+
YFP-MA-A	YFP-getaggte MMD der Ar-CS1 mit mit LC-Region und mit Substitution E323A	Ax3-orf+
Ax3ArCS1-YFP	YFP-getaggte Ar-CS1	Ax3-orf+
dcsArCS1-YFP	YFP-getaggte Ar-CS1	dcsA-

2.1.6. Oligonukleotide

Bei den folgenden Auflistungen stehen die Bezeichnungen “for” bzw. “rev” für vorwärts bzw. für rückwärts bezüglich der 5'-3'- Orientierung der DNA. T_M bezeichnet die primerspezifische Annealingtemperatur.

Die Oligonukleotide wurden von MWG Biotech, Ebersberg in HPSF-Qualität bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit H_2O_{bidest} auf 100 pmol/ μ l gelöst.

2.1.6.1. Oligonukleotide aus der Myosindomäne der Ar-CS1

Die Oligonukleotide wurden von MWG Biotech mittels MALDI-TOF verifiziert.

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	T _M /°C	Beschreibung
Vr_MA_195_for	GCATGCGACCAGACGATTTAAGCG	64,4	Quelle: pCHS-NP-6.4/32; enthält SphI-Schnittstelle u. Startcodon; für Klonierung in pQE70
Vr_MA_357_rev	GGAGCCTTTTGTGTACG	52,8	Quelle: pCHS-NP-6.4/32
Vr_MA_355_for	CACGTACACAAAAGGCTCC	56,7	Quelle: pCHS-NP-5.5./45
Vr_MA_1053_rev	GAGTAGCTTGGCTACAGC	56,0	Quelle: pCHS-NP-5.5./45
Vr_MA_1053_for	GCTGTAGCCAAGCTACTC	56,0	Quelle: pCHS-NP-4.3/2
Vr_MA_1300_rev	CTGACATGTCCAACAGGC	56,0	Quelle: pCHS-NP-4.3/2
Vr_MA_1300_for	GCCTGTTGGACATGTCAG	56,0	Quelle: pCHS-NP-3.6./54
Vr_MA_1681_rev	GTTTCCCTCCAGGAATCCATCTG	62,4	Quelle: pCHS-NP-3.6./54
Vr_MA_1681_for	GGATTCCTGGAGGGAAACCGAGATAGC	68,0	Quelle: pCHS3-5002
Vr_MA_2112_rev	CATTACACAACAACCTGACGTCTGACCAAATC	65,5	Quelle: pCHS3-5002
Vr_MA_2112_for	GACGTCAGTTGTTGTGTAATGGACTTATG	63,9	Quelle: pCHS-NP50
Vr_MA_2404_rev	GGATCCTTCTTCTTCTGCCTTTTCGTC	64,8	Quelle: pCHS-NP50; enthält BamH I-Schnittstelle; für Klonierung in pQE70
Vr_MA_pET_for	CGGAATTCGATGAAACCAGACGATTTAAG	63,9	enthält EcoR I-Schnittstelle; für Klonierung in pET20-b
Vr_MA_pET_rev	CCGCTCGAGTTCTTCTTCTGCCTTTTCG	68,0	enthält Xho I-Schnittstelle; für Klonierung in pET20b
Vr_MA_pDXA_for	GGTACCATGAAACCAGACGATTTAAG	61,6	enthält Kpn I-Schnittstelle; für Klonierung in pDXA-Vektoren
Vr_MA_pDXA_rev	CTCGAGTTTCTTCTTCTGCCTTTTCG	63,0	enthält Xho I-Schnittstelle; für Klonierung in pDXA-Vektoren
Vr_MMDAt_Sacl_for	CTTGAGCTCGGATCTCGTGG	61,4	enthält Sac I-Schnittstelle; für Klonierung der Myosindomäne ohne LC-Region
Vr_MMDAt_pDXA_rev	CTCGAGTGTCTTCTAACATGTCTTTTTG	62,2	enthält Xho I-Schnittstelle; für Klonierung der Myosindomäne ohne LC-Region
MDAt_E323A_for	CAATTAAGGGG CA AAAATACAGTCTTGG	62,4	Oligonukleotid für ortsspezifische Mutagenese

			(Austausch von E323 gegen A)
MDAt_E323A_rev	CTGTATTTTTGCCCCCTTAATTGTGTTAACG	62,9	Oligonukleotid für ortsspezifische Mutagenese (Austausch von E323 gegen A)
MDAt_E323S_for	CAATTAAAGGGTCAAAAATACAGTCTTGG	61,0	Oligonukleotid für ortsspezifische Mutagenese (Austausch von E323 gegen D)
MDAt_E323S_rev	CTGTATTTTTGACCCTTAATTGTGTTAACG	61,6	Oligonukleotid für ortsspezifische Mutagenese (Austausch von E323 gegen D)

2.1.6.2. Oligonukleotide aus der Ar-CS1

Die Oligonukleotide wurden von MWG Biotech mittels MALDI-TOF verifiziert.

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	T _M /°C
CHSAt_XS_rev	CGAGCTCGAGTATGCATATCAATCTTAATACTTTG	66,0
CHSAt_Bam_for	CTGATGATAACAGGATCCTAC	55,9

2.1.6.3. sonstige Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	T _M /°C
Vr_pDXA_YFP_rev	CGTGCTGCTTCATGTGGTC	58,8
Vr_pDXA_3H_rev	GTTGGGGAGAACAAGGATAC	57,3
Vr_MA_544_rev	CCATTGCTTCGGTGAACACTAC	57,3
Vr_ChSAt_for	GACCACCGTGATATGCCTC	58,8
NP2_46_for	GTGTATTGTCCTGCTTGACG	59,8
NP3_224_rev	CTCGCCACTCTATTCCCTC	58,8
NP6_251_rev	GGGGAGCCTTTTGTGTACG	58,8
NP6_282_rev	ATCGGTATGCATTATCGGCAG	57,9
CHS11_T3_2380	CGTCGCAATCATCATTACAAC	55,9
CHS51_2047_for	GAAAACCGAGCGGATTGAAG	57,3
CHS51_1558_for	GTCTCCAACGGGAACAATCTC	58,8
CHS51_2320_rev	CGTCTACAATCGGAATGCGG	59,4
CHS51_T3_2131	CAAGTTGGAAGATCAAAGATC	56,5
CHS_1546_rev	GTTGGAGACATCGAGGCAGTG	61,8
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	53,2
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	53,2

pQE for	GTATCACGAGGCCCTTTTCGTCT	62,1
pQE rev	CATTACTGGATCTATCAACAGGAG	59,3

2.1.7. Plasmide und Vektoren

Plasmid	Insert	Insert- größe
pCHS-NP-6.4/32	Chitinsynthase-Fragment mit MMD aus <i>Atrina rigida</i>	375 bp
pCHS-NP-5.5./45	Chitinsynthase-Fragment mit MMD aus <i>Atrina rigida</i>	843 bp
pCHS-NP-4.3/2	Chitinsynthase-Fragment mit MMD aus <i>Atrina rigida</i>	564 bp
pCHS-NP-3.6./54	Chitinsynthase-Fragment mit MMD aus <i>Atrina rigida</i>	485 bp
pCHS3-5002	Chitinsynthase-Fragment mit MMD aus <i>Atrina rigida</i>	439 bp
pCHS-NP50	Chitinsynthase-Fragment mit MMD aus <i>Atrina rigida</i>	375 bp
pCHS-up1/1.1	Chitinsynthase-cDNA-Fragment aus <i>Atrina rigida</i> - Genbank	5024 bp
pCHS-up1/5.1	Chitinsynthase-cDNA-Fragment aus <i>Atrina rigida</i> - Genbank	5596 bp
pVr_MMDAt_2 pVr_MMDAt_3	MMD der Ar-CS1 mit Schnittstellen für Klonierung in pQE-70; Insert in pBluescript II SK (-)	2264 bp
pVr_MMDAt_5	MMD der Ar-CS1 in pQE-70	2256 bp
pVr_MDAtdi_5	MMD der Ar-CS1 mit Schnittstellen für Klonierung in pDXA-Vektoren; Insert in pBluescript II SK (-)	2269 bp
pVr_MDAtdi_Y36	MMD der Ar-CS1 in pDXA-mcs-YFP	2256 bp
pVr_MDAtdi_H81	MMD der Ar-CS1 in pDXA-3H	2256 bp
pBS_MDAtdi_A2 pBS_MDAtdi_A4	MMD der Ar-CS1 mit Substitution E323A und mit Schnittstellen für Klonierung in pDXA-Vektoren; Insert in pBluescript II SK (-)	2269 bp
pBS_MDAtdi_S39 pBS_MDAtdi_S40	MMD der Ar-CS1 mit Substitution E323S und mit Schnittstellen für Klonierung in pDXA-Vektoren; Insert in pBluescript II SK (-)	2269 bp
pDXA-3H_MDAtdi_A3	MMD der Ar-CS1 mit Substitution E323A in pDXA- 3H	2256 bp
pDXA-YFP_MDAtdi_A44	MMD der Ar-CS1 mit Substitution E323A in pDXA- mcs-YFP	2256 bp
pDXA-3H_MDAtdi_S29	MMD der Ar-CS1 mit Substitution E323S in pDXA- 3H	2256 bp
pDXA-YFP_MDAtdi_S78	MMD der Ar-CS1 mit Substitution E323S in pDXA-	2256 bp

	mcs-YFP	
pLC-Y_4 pLC-Y_10	MMD der Ar-CS1 ohne LC-Region mit Schnittstellen für Klonierung in Vr_MDAtdi_H81 und Vr_MDAtdi_Y36; Insert in pBluescript II SK (-)	659 bp
pDXA_MA-LC_H/23	MMD der Ar-CS1 ohne LC-Region in pDXA-3H	2197 bp
pDXA_MA-LC_Y/59	MMD der Ar-CS1 ohne LC-Region in pDXA-mcs-YFP	2197 bp
pCHSAtd-BS/5	Chitinsynthasefragment aus <i>Atrina rigida</i> in pBluescript II SK (-)	1639 bp
pCHSAtd-HX/4	Chitinsynthasefragment aus <i>Atrina rigida</i> in pBluescript II SK (-)	4653 bp
Vr_ChSAtd_2	Chitinsynthasefragment aus <i>Atrina rigida</i> in pDXA-mcs-YFP	4653 bp
Vr_ChSAtdi_7	Ar-CS1 in pDXA-mcs-YFP	6859 bp

Vektor	Größe	Charakterisierung	Referenz
pBluescript II SK (-)	2961 bp	Klonierungsvektor Blau-Weiss-Screening durch <i>lacZ</i> -Gen Ampicillin-Resistenz durch <i>bla</i> (ApR)-Gen	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
pQE-70	3426 bp	Expressionsvektor (<i>E. coli</i>) C-terminaler 6x His-tag Ampicillin-Resistenz	Qiagen [®] , Hilden
pET-20b(+)	3716 bp	Expressionsvektor (<i>E. coli</i>) C-terminaler His-tag N-terminale Signalsequenz (<i>pelB</i>) für mögliche periplasmatische Lokalisation	Novagen, Nottingham, UK
pDXA-FLAG	6146 bp	Expressionsvektor (<i>D. discoideum</i>) N-terminaler FLAG-tag Ampicillin-Resistenz (Amp ^r) und Neomycin- bzw. G418-Resistenz (Neo ^r) extrachromosomal; Replikationsorigin von high copy Plasmid Ddp2; konstitutiver actin 15 Promotor <i>E. coli</i> Replikationsorigin	http://dictybase.org/ (Columbia University, NewYork)
pDXA-3H	6105 bp	Expressionsvektor (<i>D. discoideum</i>) C-terminaler 6x His-tag	http://dictybase.org/

		Eigenschaften wie pDXA-FLAG	(Columbia University, NewYork)
pDXA-mcs-YFP	6833 bp	Expressionsvektor (<i>D. discoideum</i>) C-terminaler YFP-tag Eigenschaften wie pDXA-FLAG	http://dictybase.org/ (Columbia University, NewYork)

2.1.8. Systeme zur DNA-Aufreinigung und Standards

System zur DNA-Aufreinigung	Hersteller/ Firma
NucleoSpin®	Macherey-Nagel, Düren
Plasmid Midi Kit	Quiagen, Hilden
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Quiagen, Hilden

DNA-Standard	Hersteller
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 50bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Protein-Standard	Hersteller
SDS-6H2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Precision Plus Protein™ Standard (all blue)	BioRad, München

2.1.9. Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose UV imaging system Gel Max	Intas, Göttingen
Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Axiovert 200 M	Zeiss, Oberkochen
Avanti J-20 XP (Rotor: JLA-8.1000)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Avanti J-20 (Rotor: JLA-8.1000)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Brutschrank B6200(I)	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Christ® alpha 1-4 mit Anlagensteuerung LDC-1m	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Digitalkamera ORCA-ER (C4742-95)	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee
FireWire Farbkamera DFK 31F03	The Imaging Source Europe GmbH, Bremen
GC CP-3380	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
GC/MS: Finigan MAT Magnum™ x/ varian GC	Axel Semrau GmbH, Sprockhövel
GeneQuant II	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Homogenisator, POTTER-ELVEHJEM	Kontes Glass Co., Vineland, N.J., USA
Inkubationsschüttler HT Infors	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Leo 1530 FESEM	Zeiss, Oberkochen
LSM 510 Meta	Zeiss, Oberkochen
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Microprocessor pH-Meter pH 535 MultiCal	WTW GmbH & Co. KG, Weilheim
MicroPulser	BioRad, München
Multi-Purpose Scintillation counter LS 65000	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Mode 583 Gel Dryer	BioRad, München
NanoWizard AFM	JPK Instrumente, Berlin
Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Rotanta 460 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Rotina 48 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Sonifier cell disruptor B 15	Branson, Danbury, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Trockenschrank ST 5060	Heraeus, Hanau
UNIVAPO 150 H (Ultra Rotor: Sorvall TFT 50.38)	Uniequip, Martinsried
UV-Leuchttisch	Desaga Sarstedt Gruppe, Nürnbrecht
UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 3300 pro	Amersham Biosciences, Freiburg

2.1.10. Software

Software	Anwendung
Adobe Illustrator 9,0	Bildbearbeitung
Adobe Photoshop 7,0	Bildbearbeitung
AxioVS 4.1.1.0 (Zeiss, Oberkochen)	Bildaufnahme am LSM 510 meta
Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)	Sequenzanalyse
BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)	Sequenzanalyse
Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)	Sequenzanalyse
Carl Zeiss AxioVision LR Rel. 4.3	Bildbearbeitung
ClustalW (http://align.genome.jp/)	Sequenzanalyse
Gwyddion 2.10	Bearbeitung von AFM-Bildern
HCImage Version 1.02.060107	Bildaufnahme am Axiovert 200
JPK Image Processing, Version 3.2.19	Bearbeitung von AFM-Bildern
LSM 510, Version 3.2 SP2	Bildaufnahme am LSM 510 meta
LSM Image Browser, Release 3.5	Bildbearbeitung
MWG (https://ecom.mwgdna.com)	Bestimmung von T_M
NanoWizard® IP Image Processing Software	Bildaufnahme am AFM
pDRAW32 (http://www.acaclone.com/)	Sequenzanalyse
VecScreen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html)	Sequenzanalyse
Vector NTI 10.3.1. (http://www.invitrogen.com)	Sequenzanalyse

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung von *E. coli*

Nach einer Transformation oder zum Vereinzeln von Glycerinkulturen wurden die *E. coli* auf LB-Platten kultiviert. Zur Selektion transformierter Bakterien enthielten die Platten das entsprechende Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin). Die Platten wurden nach dem Ausplattieren oder Ausstreichen der Bakterien über Kopf für mindestens 12 h bei 37 °C inkubiert. Platten mit *E. coli*-Kulturen konnten bei 4 °C mehrere Wochen gelagert werden. Für Flüssigkulturen wurde in 5 ml LB-Medium (s. 2.1.4.1.) eine Einzelkolonie von einer Platte angeimpft und etwa 12 h bei 190 rpm und 37 °C geschüttelt. Mit 5 ml einer solchen Vorkultur

wurden größere Kulturen wie 100 ml LB-Medium angeimpft und wie beschrieben geschüttelt. Bei Ampicillin-resistenten Stämmen wurde zu dem Medium 100 µg/ml Ampicillin gegeben. Die Ermittlung der Zelldichten beim Bakterienwachstum erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm.

Zur Konservierung einzelner Transformanten wurden **Glycerin-Kulturen** angelegt: mit einer Einzelkolonie wurden 3 ml LB_{Amp}-Medium angeimpft und ÜN kultiviert. Dann wurden 828 µl der Suspension entnommen und mit 172 µl sterilem 87%igem Glycerin in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gründlich gemischt. Anschließend wurde die Kultur in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurde mit der Impföse ein Aliquot entnommen und auf LB-Platten ausgestrichen.

2.2.1.2. Kultivierung von *D. discoideum*

Die axenischen *D. discoideum*-Stämme wurden entweder in Schüttelkultur in HL5c-Medium oder in Petrischalen in HL5-Medium (s. 2.1.4.2.) kultiviert. Für die Selektion und das Wachstum von transformierten Zellen wurde dem Medium 10 bis 40 µg/ml G418 bzw. bei dem dcsA- Stamm 5 µg/ml Blasticidin S zugegeben.

In Schüttelkulturen wurden Ax3-orf+ Zellen bei einer Dichte von $1 \cdot 10^4$ bis höchstens $8 \cdot 10^6$ Zellen/ml angezogen. Bei transformierten Zellen sowie bei dcsA- Zellen sollte die Zelldichte zwischen $5 \cdot 10^5$ bis $8 \cdot 10^6$ Zellen/ml liegen. Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Kulturen wurden bei 180 rpm und bei einer Temperatur von 21°C geschüttelt.

In Petrischalen (ø 6 cm) wurden die Zellen in 8 ml bis 10 ml Medium bei einer Temperatur von 21°C gezogen. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit HL5- oder mit HL5c-Medium abgespült und gegebenenfalls in eine neue Petrischale angeimpft. In Petrischalen sollte bei Ax3-orf+ Zellen die Zelldichte zwischen $1 \cdot 10^4$ und $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml und bei transformierten Zellen zwischen $5 \cdot 10^5$ bis $8 \cdot 10^6$ Zellen/ml liegen. Nach dem Abwaschen der Zellen von der Petrischale wurde die Zelldichte der Zellsuspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Der dcsA- Stamm wurde zeitweise auf SM-Agarplatten zusammen mit *Klebsiella aerogenes* (ø 9,2 cm) kultiviert. Dazu wurden $8 \cdot 10^4$ Zellen mit 200 µl einer ÜN-Kultur von *Klebsiella aerogenes* in SM-Medium vermischt. Anschließend wurde die Suspension auf einer SM-Agarplatte mit einem Drigalski-Spatel vorsichtig verteilt. Nachdem die Platten unter der Sterilbank getrocknet waren, wurden sie bei 21°C über Kopf inkubiert. Nach ca. zwei Tagen zeigten sich die *D. discoideum*-Kolonien als Plaques auf dem Bakterienrasen.

Am Rand dieser Plaques befinden sich die vegetativen Zellen, die mit Hilfe einer Plastikimpföse in 1 ml HL5-Medium in einer 24well-Titerplatte überführt wurden. Dem Medium wurde 300-500 µg/ml Dihydrostreptomycin-Sulfat und 300-500 µg/ml Penicillin

zugefügt. Die Zellen wurden bei 21°C gezogen. Nach ein paar Tagen konnten die *D. discoideum*-Zellen die Bakterien verbrauchen und axenisch werden. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen wie oben beschrieben in einer Petrischale kultiviert. Nach weiteren zwei Tagen konnten die Zellen nach Bedarf auch in Flüssigkultur gezogen werden.

2.2.1.3. Konservierung von *D. discoideum*

Die Zellen wurden als Amöben in DMSO-Kulturen oder als Sporen konserviert.

2.2.1.3.1. DMSO-Kulturen von vegetativen *D. discoideum*-Zellen

Zur Konservierung von *D. discoideum*-Zellen wurden axenisch gewachsene Zellen geerntet (1000 × g; 4°C; 5 min; Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen) und anschließend zweimal mit je 50 ml Bonner's Lösung (s. 2.1.3.) gewaschen. Nachdem die Zelldichte mit eiskaltem Einfriermedium (HL5c und 10% DMSO) auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt wurde, wurde die Zellsuspension in 1 ml Aliquots in auf Eis vorgekühlte Einfrierröhrchen aufgeteilt. Die Zellen wurden 10 min auf Eis kaltgestellt, anschließend 2 bis 4 Stunden bei -20°C inkubiert und dann bei -80°C gelagert. Optional wurden die DMSO-Kulturen nach 12 Stunden in flüssigem N₂ gelagert.

Um eingefrorene Zellen wieder anzuziehen, wurden sie auf Eis aufgetaut. Nachdem sie zweimal mit eiskaltem HL5-Medium gewaschen wurden (3 min bei 100 × g), wurden sie dann in eine Petrischale mit HL5-Medium überführt. Bei Transformanten wurde 20 µg/ml G418 zugegeben. Um restliches DMSO zu entfernen, wurde am nächsten Tag das Medium gewechselt.

2.2.1.3.2. Konservierung von *D. discoideum*-Sporen

Axenisch gewachsene *D. discoideum*-Zellen, deren Zelldichte nicht größer als $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml sein sollte, wurden geerntet (1000 × g; 4°C; 5 min; Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen) und dann zweimal mit 50 ml kaltem MES-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde mit MES-Puffer (s. 2.1.3.) resuspendiert und die Zelldichte wurde auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 500 µl auf einer MES-Agarplatte (Durchmesser: 9,2 cm) mit einem Drigalski-Spatel vorsichtig verteilt und unter der Sterilbank für 10 bis 30 min getrocknet, bis sie nicht mehr nass aber noch glänzend waren. Die Agarplatten wurden auf dem Kopf bei 21°C inkubiert. Es entwickelten sich innerhalb von 24 bis 48 h Sporen. Die Sporen wurden von nicht zu alten Platten mit einem sterilen Spatel abgekratzt und in 1 ml 10% Glycerin resuspendiert. In 100 µl-Aliquots wurde die Suspension

in Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und diese wurden in fl. N₂ schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zum Animpfen der Sporen wurde ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut und in eine Petrischale mit HL5-Medium überführt.

2.2.1.4. Optionale Lagerung von *D. discoideum*-Zellen nach der Zellernte

Zellkulturen konnten optional gelagert werden, wobei sie vor der Zellyse eingefroren wurden. Nach der Zellernte (1000 × g; 4°C; 10 min; JLA-8.1000-Rotor, Beckman) wurden die Zellen in 6 ml Lysepuffer (s. 2.1.3.) mit 40 µg/ml TLCK, 20 µg/ml TPCK, 200 µM PefablocSC, 200 µM 1,10-Phenanthrolin, 5 mM Benzamidin, 7 mM β-Mercaptoethanol sowie 0,04% NaN₃ resuspendiert. Die Zellen wurden eingefroren, indem sie tröpfchenweise in fl. N₂ pipettiert wurden. Die entstandenen Kügelchen wurden in BD Falcon™ konischen Gefäßen (50 ml) bei -80°C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen bis zu etwa -10°C erwärmt und anschließend vorsichtig mit einem Glasstab gerührt, um vollständiges Auftauen zu erreichen. Während des Auftauens wurden die Zellen schon lysiert.

2.2.1.5. Fixierungen von *D. discoideum*-Zellen

2.2.1.5.1. Fixierung mit Formaldehyd/ Methanol

Diese Fixierung ist besonders geeignet, um mittels Immunfluoreszenz Aktin und Myosin nachzuweisen.

In je eine Probenkammer von einem µ-Slide 18 well (ibidi) wurden jeweils 20 µl Zellsuspension gegeben. Nachdem etwa 15 min gewartet wurde, bis sich die Zellen an die Oberfläche des µ-Slides angeheftet haben, wurden die Zellen zweimal kurz in 15 mM Na/K-PO₄-Puffer (s. 2.1.3.), der in Petrischalen vorgelegt wurde, gewaschen. Das µ-Slide wurde abgetrocknet und anschließend in eiskaltem 2 % Formaldehyd in Methanol bei -20°C für mindestens 15 min fixiert. Danach wurden die fixierten Zellen dreimal 5 min in 1× PBS/ 0,05% Tween® 20 gewaschen.

2.2.1.5.2. Fixierung mit 4% Paraformaldehyd in 1× PBS auf Polysine®-Objektträger

Die Proben für die Analyse mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) (s. 2.2.7.3.) wurden mit Paraformaldehyd fixiert, um die Membranstrukturen der Zellen möglichst nicht zu verändern. Auf einen beschichteten Polysine®-Objektträger (s. 2.1.1.) wurde 1 ml Kultur mit einer Zelldichte von 5·10⁵ Zellen/ml gegeben. Nach 30 min wurde das Medium abgesaugt und die

Zellen wurden mit 1 ml 1× PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml 4% Paraformaldehyd in 1× PBS für mindestens 30 min bei RT fixiert. Die Objektträger wurden ÜN bei 4°C in Fixierlösung gelagert.

Um ein Ausbleichen der YFP-Fusionsproteine zu verhindern, wurden die Proben im Dunkeln fixiert und bis zum Mikroskopieren dunkel gelagert.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab aus *E. coli*

Von einer Platte wurde eine Einzelkolonie eines *E. coli*-Klons, der das gewünschte Plasmid enthielt, in 5 ml LB_{Amp}-Medium angeimpft und ÜN bei 37°C geschüttelt (s. 2.2.1.1.). Die ÜN-Kulturen wurden durch Abzentrifugieren in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Plasmide wurden dann mit NucleoSpin® nach Angaben des Herstellers isoliert und in 50 µl AE eluiert. Die isolierten Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

Die Konzentration der Plasmide wurde photometrisch bestimmt (s. 2.2.2.3.).

2.2.2.2. Isolierung von Plasmiden im präparativen Maßstab aus *E. coli*

Mit einer Einzelkolonie der transformierten *E. coli* wurden 100 ml LB_{Amp}-Medium angeimpft und ÜN bei 37°C geschüttelt (s. 2.2.1.1.). Nach Angaben des Herstellers wurden die Plasmide mit Hilfe eines Plasmid Midi Kits von Qiagen isoliert und in 50 µl-100 µl AE aufgenommen. Die isolierten Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

Die Konzentration der Plasmide wurde photometrisch bestimmt (s. 2.2.2.3.).

2.2.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA wurde mit einem Photometer (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) bestimmt. Für doppelsträngige DNA entspricht 1 OD_{260nm} einer Konzentration von 50 ng/µl. Die Reinheit der präparierten DNA konnte über das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} bestimmt werden. Ist das Verhältnis größer als 1,8, handelte es sich um für die weitere Verwendung ausreichend reine DNA.

2.2.2.4. Präparative und analytische Restriktionsspaltung von DNA

Präparative Restriktionsverdauungen wurden zum Zuschnitt der Plasmide und PCR-Fragmente für den Einsatz in Ligationen durchgeführt. Mit Hilfe der Restriktionsanalyse wurden korrekte Transformanten identifiziert.

2.2.2.4.1. Präparativer Restriktionsverdau von DNA

Für den präparativen Restriktionsverdau wurden 1 µg-3 µg Plasmid und 20-25 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 25-100 µl eingesetzt. Zum Teil wurden auch Verdaue mit zwei Restriktionsenzymen angesetzt. Dazu mussten die Schnittstellen mehr als 10 Nukleotide auseinander liegen und die Enzyme mussten unter denselben Bedingungen aktiv sein. Hinsichtlich der Pufferbedingungen und der Reaktionstemperatur wurde nach den Angaben des Herstellers der Verdau eine Stunde inkubiert. Für weitere enzymatische Reaktionen unter anderen Pufferbedingungen wurde die DNA mit Hilfe des PCR Purification Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers oder aus Agarosegelen (s. 2.2.2.7.) gereinigt.

2.2.2.4.2. Analytischer Restriktionsverdau von DNA

Für den analytischen Restriktionsverdau wurden 200 ng bis 500 ng Plasmid sowie 2-15 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 10 µl eingesetzt. Bei den Pufferbedingungen und der Reaktionstemperatur wurden die Angaben des Herstellers berücksichtigt. Die Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, dass nur bei einer positiven Klonierung Fragmente richtiger Größe entstanden.

2.2.2.5. Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von PCR-Produkten und Plasmiden nach Restriktionsanalyse erfolgte für analytische und präparative Zwecke in horizontalen Agarosegelen. Die Gele bestanden je nach Fragmentgröße aus 0,8% bis 2% Agarose in 1× TAE-Puffer mit Ethidiumbromid (s. 2.1.3.). Die DNA-Proben wurden auf 1× DNA-Probenpuffer (s. 2.1.3) gebracht und wurden auf das Gel geladen. Als Laufpuffer wurde 1× TAE-Puffer mit Ethidiumbromid verwendet. Der Lauf erfolgte bei 90-150 mA bis zur gewünschten Auftrennung.

Unter UV-Licht (254 nm und 366 nm für analytische Zwecke bzw. nur 366 nm für präparative Zwecke) konnten die Banden detektiert werden. Zur Abschätzung der Fragmentlänge wurde auf eine Spur des Gels auch ein DNA-Standard (s. 2.1.8.) aufgetragen.

2.2.2.6. Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerasenkettenreaktion (PCR) werden spezifisch DNA-Sequenzen ausgehend von kleinsten Mengen an Vorlagemolekülen (Matrizen) amplifiziert.

Die PCR wurde für analytische und für präparative Zwecke verwendet.

2.2.2.6.1. PCR nach Standardprotokoll

Die Ansätze wurden auf Eis in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert.

Bei 50 µl-Ansätzen diente als Matrize 10-25 ng Plasmid. Es wurden je 0,5 µl sense- und antisense-Primer eingesetzt. Zudem wurden 0,75 µl 10 mM dNTP-Mix zugegeben. Von der Taq-Polymerase reichten 0,75 µl aus. Von der Pwo-Polymerase bzw. der Phusion™ HF DNA Polymerase wurden 0,5 µl eingesetzt. Die PCR-Puffer (5× PCR-Puffer I, 10× PCR-Puffer II, 10× Reaktionspuffer (Pwo) bzw. 5× HF-Puffer (Phusion)) (s. 2.1.3.) wurden so zugegeben, dass sie im gesamten Ansatz einfach konzentriert waren. 200 µl-Ansätze wurden im Thermocycler in 50 µl-Aliquots inkubiert.

Um die Qualität der Reagenzien zu überprüfen, wurde ein Ansatz ohne template-DNA mitgeführt.

Die Amplifizierung erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Programm:

HOT-Start: 75°C

1x:	94°C	2 min	Denaturierung
10x:	94°C	20 sec	Denaturierung
	T _M	15 sec	Primer-Annealing
	72°C	45 sec-2,75 min	Elongation
15x-20x:	94°C	20 sec	Denaturierung
	T _M	15 sec	Primer-Annealing
	72°C	45 sec-2,75 min (+2 sec/Zyklus)	Elongation
1x:	72°C	7 min	Elongation

Hold: 8°C

Bei der Verwendung der Phusion™ HF DNA Polymerase wurde alternativ folgendes Programm gewählt:

HOT-Start: 75°C

1x:	98°C	1 min	Denaturierung
10x:	98°C	12 sec	Denaturierung
	T _M	15 sec	Primer-Annealing
	72°C	1-1,5 min	Elongation
15x:	98°C	12 sec	Denaturierung
	T _M	15 sec	Primer-Annealing
	72°C	1 min-1,5 min (+2 sec/Zyklus)	Elongation
1x:	72°C	7 min	Elongation

Hold: 8°C

Die Annealingtemperatur T_M wurde abhängig von dem eingesetzten Primerpaar gewählt. Sie sollte zwischen 50°C und 60°C liegen, um eine ausreichende Stringenz zu gewährleisten. War die optimale Annealingtemperatur nicht bekannt, wurde eine PCR mit Gradienten gefahren. Der Ansatz wurde dann auf verschiedene Annealingtemperaturen im Thermocycler aufgeteilt.

Die Elongationszeit wurde abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA gewählt. Die Taq-Polymerase kann in einer Minute etwa 1000 bp polymerisieren. Die Pwo-DNA-Polymerase benötigt 45 Sekunden und die Phusion™ HF DNA Polymerase benötigt 15-30 Sekunden für die Polymerisation von 1000 bp.

Je mehr Zyklen durchlaufen wurden, desto besser war die Ausbeute. Für präparative Zwecke sollte ein Maximum von 25 Zyklen nicht überschritten werden.

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden 10 µl PCR-Ansatz mit 2 µl 6× DNA-Probenpuffer versetzt und auf einem 0,8%- oder 2%-Agarosegel untersucht (s. 2.2.2.5.).

2.2.2.6.2. Kolonie-PCR mit *E. coli*

Die Kolonie-PCR diente zum Auffinden positiver Transformanten, die Vektoren mit dem gewünschten Insert enthielten. Dazu wurde ein Teil einer Kolonie steril gepickt und in 25 µl H₂O, das in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt wurde, resuspendiert. Die Zellen wurden durch 5 min langes Aufkochen bei 94°C lysiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde 25 µl 2× Prämix bestehend aus 10 µl 5× PCR-Puffer bzw. 5 µl 10× PCR-Puffer, 0,5-0,7 µl 10 mM dNTPs, je 0,25-0,5 µl sense- und antisense-Primer und 1 µl Taq Polymerase zu den Lysaten gegeben. Optional wurde dem Ansatz zusätzlich β-Betain hinzugefügt, wobei eine Endkonzentration von 1 M eingestellt wurde. Die Amplifizierung erfolgte nach dem Standardprogramm.

Zur Analyse wurden 10 µl PCR-Ansatz mit 2 µl 6× DNA-Probenpuffer elektrophoretisch auf einem 2%-Agarosegel aufgetrennt (s. 2.2.2.5.).

2.2.2.6.3. Kolonie-PCR mit *D. discoideum*

Das Protokoll wurde nach Charette und Cosson (2004) etabliert.

Zellen wurden mit 10 µl HL5-Medium aus 24well-Titerplatten pipettiert. Zu den 10 µl Zellsuspension wurden 40 µl Lysepuffer (LyB) (s. 2.1.3.) und ProteinaseK (10 µg ad 25 µl LyB) gemischt. Der Ansatz wurde 4 min bei RT inkubiert. Um die ProteinaseK zu inaktivieren, wurde anschließend 1 min bei 95°C inkubiert.

Es wurde 1 µl Zellysat in eine Standard-PCR eingesetzt (s. 2.2.2.6.1.). 10 µl des Ansatzes wurden auf einem Agarosegel analysiert (s. 2.2.2.5.).

2.2.2.7. Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Aus präparativen Gelen wurde das gewünschte Fragment unter dem langwelligen UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Bildung von Pyrimidindimeren ist unter dem energiearmen UV-Licht weniger wahrscheinlich als unter dem energiereichen UV-Licht (254 nm). Das PCR-Produkt wurde dann mit Hilfe des QIAEX[®] II Gel Extraction Kits nach Vorschrift des Herstellers aus dem Gel extrahiert. Die DNA wurde im Elutionspuffer des Kits gelöst.

2.2.2.8. Klonierung

2.2.2.8.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von Plasmiden wurden nach der Calciumchlorid-Methode chemisch kompetent gemachte Bakterien verwendet.

XL-1 Blue Zellen wurden von der Glycerinkultur auf LB_{Tet}-Platten ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Es wurden 5x in je 4 ml LB-Medium Vorkulturen in 14 ml Rundbodenröhrchen (Falcon) angeimpft und ÜN bei 37°C/ 190 rpm geschüttelt. Mit je 750 µl Vorkultur wurden 3x 50 ml LB-Medium angeimpft. Bei OD_{578nm} = 0,6 wurden die Zellen geerntet und in sterile BD Falcon[™] konische Gefäße (50 ml), die auf Eis gestellt wurden, überführt.

Die Bakterien wurden 10 min bei 4000 rpm und bei 4°C zentrifugiert (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen). Der Überstand wurde gut abdekantiert und das BD Falcon[™] konische Gefäß wurde noch 1 min umgekehrt auf Papier abgetupft. Jedes Pellet wurde in 15 ml eisgekühltem Tfb I pro 50 ml Kultur durch Vortexen resuspendiert. Die Zellen wurden mind. 10 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 2000 rpm (= 700 × g) und bei 4°C zentrifugiert. Zu jedem Pellet wurden 2 ml eisgekühltes Tfb II pro 50 ml Kultur zugegeben. Die Zellen wurden durch sanftes Schwenken in Eiswasser resuspendiert. Dies dauerte ca. 10-20 min.

Je 200 µl Zellen wurden in Cryo-Tubes, die in flüssigem N₂ vorgekühlt wurden, aliquotiert und sofort in flüssigem N₂ schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

2.2.2.8.2. Klonierung von PCR-Fragmenten ohne 3'-A-Überhang

Wurde die PCR mit einer Polymerase mit proofreading-Aktivität durchgeführt, musste das zu klonierende PCR-Fragment vor der Ligation in den linearisierten und am 5'-Ende dephosphorylierten Vektor pBluescript II SK (-) mit Kinase behandelt werden. Die Phosphatgruppen am 5'-Ende des Vektors wurden entfernt, um eine Religation des Vektors zu verhindern.

2.2.2.8.2.1. Vorbereitung des Vektors

4 µg des mittels Nucleospin-Kit aufgereinigten Plasmids pBluescript II SK (-) wurden wie in 2.2.2.4.1. beschrieben mit 35 U des Restriktionsenzym Sma I ÜN bei 30°C geschnitten. Durch Inkubation bei 65°C für 25 min wurde das Enzym inaktiviert. Nachdem der Ansatz bei RT und dann auf Eis abgekühlt wurde, wurden 2,5 U Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Der Vektor wurde auf einem 1%-Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des QIAEX® II Gel Extraction Kits aus dem Gel extrahiert (s. 2.2.2.7.). Zur Mengenabschätzung wurde 1 µl des Eluats auf einem 1%-Agarosegel analysiert.

2.2.2.8.2.2. Kinase-Behandlung des PCR-Fragments

Von dem mittels QIAEX® II Gel Extraction Kit aufgereinigten PCR-Fragment sollte maximal die 10× Stoffmenge im Vergleich zur Stoffmenge des Vektors eingesetzt werden. Das gegebenenfalls in der nicht erhitzten UNIVAPO 150 H eingeeengte PCR-Fragment wurde in einem 10 µl-Ansatz mit 1 µl 10× T₄-PNK-Puffer, 1 µl 10 mM ATP und 1 µl T₄-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl) gemischt und für 30-40 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 20 min bei 65°C inaktiviert. Der Ansatz wurde dann bei RT abgekühlt.

2.2.2.8.2.3. Ligation des kinasierten PCR-Fragments in pBS II SK (-) (SmaI/CIAP)

In den Ligationsansatz wurde das gesamte mit Kinase behandelte PCR-Fragment, 0,5 µl des pBluescript II SK (-) (SmaI/CIAP)-Vektorfragments, wahlweise 0,2 µl 10 mM ATP sowie 1 µl T₄-DNA-Ligase (5U/µl) eingesetzt. Die Ligation erfolgte für 3-4 Stunden bei RT.

2.2.2.8.3. Ligation von DNA-Fragmenten mit kompatibeln, überstehenden Enden

Für die Umklonierung des Inserts aus dem pBluescript II SK (-) in die Expressionsvektoren (s. 2.1.7.), bei der Klonierung der Myosindomäne ohne Region niedriger Komplexität sowie bei der Klonierung der Chitinsynthase wurde das Insert mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen aus dem pBluescript II SK (-) geschnitten. Der Expressionsvektor wurde mit denselben Restriktionsenzymen linearisiert. Die mittels QIAEX®II Gel Extraction Kit aufgereinigten Inserts und Vektoren wurden in den 10 µl-Ligationsansatz zusammen mit 1 µl 10× OPA, 1µl 10 mM ATP sowie 0,5 µl T₄-DNA-Ligase eingesetzt. Die Ligation erfolgte ÜN bei 12°C.

2.2.2.8.4. Transformation in *E. coli*-Zellen

Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nachdem 50 µl kompetente Zellen zum Ligationsansatz gegeben wurden, wurde der Ansatz 30 min im Eisbad inkubiert und dabei immer wieder angeschnippt. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 sec wurden die Zellen auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden steril mit 500 µl SOC-Medium versetzt und 45 min bei 37°C inkubiert. 20 µl, 180 µl und der Rest der Bakterien wurden jeweils auf einer AXI-Platte oder jeweils einer LB_{Amp}-Platte steril ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 37°C inkubiert.

Zur Selektion der positiven Transformanten besitzt der pBluescript II SK(-) -Vektor sowie die pDXA-Vektoren ein Ampicillin-Resistenzgen.

Außerdem besitzt der pBluescript II SK(-) -Vektor an der Insertionsstelle, der multiple cloning site, den 5'-terminalen Teil des *lacZ*-Gens, das für das N-terminale Fragment der β-Galactosidase codiert. Bei erfolgreicher Transformation des Inserts in den Vektor wird dieser Sequenzabschnitt unterbrochen, so dass rekombinante Klone durch Blau-Weiß-Screening identifiziert werden können. Positive Transformanten bilden weiße Kolonien.

Es wurden in der Regel bis zu acht weiße und zwei blaue Klone als Kontrolle gepickt. Bei der Transformation von pDXA-Vektoren wurden meist 20 Klone gepickt. Ein Teil wurde für Kolonie-PCR verwendet (s. 2.2.2.6.2.), um positive Transformanten zu verifizieren. Der Rest der Kolonien wurde auf einer AXI-Platte oder einer LB_{Amp}-Platte ausgestrichen, die bei 37°C inkubiert wurde. Nach ca. 6 Stunden wurden für die Plasmidisolierung mit jedem Klon 2x 3 ml LB_{Amp} in Rundbodenröhrchen (Falcon) angeimpft und ÜN bei 37°C/ 190 rpm geschüttelt.

Nach der Aufreinigung der Plasmide (s. 2.2.2.1.) wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (s. 2.2.2.3.).

2.2.2.8.5. Sequenzierung und Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung der Plasmide wurde MWG, Ebersberg, beauftragt. Es wurden 1 µg Plasmid in der Univapo 150H eingetrocknet und eingeschickt. Nach Bedarf wurden 15 µl eigene Sequenzierprimer (2 pmol/µl), deren Länge zwischen 18-28 Basenpaare sein sollten und deren Schmelztemperatur zwischen 52 bis 62°C liegen sollte, für die Sequenzierung verwendet.

Im Normalfall wurden ca. 700 bp in hervorragender Qualität sequenziert.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit VecScreen, BioEdit, pDRAW32, Blast (blastx) und VectorNTI (s. 2.1.10.) analysiert.

2.2.2.9. Transformation mit Calciumphosphatfällung in *D. discoideum*

Die *D. discoideum*-Zellen sollten drei bis vier Tage in Petrischalen (\varnothing 6 cm) gewachsen sein. Am Tag vor der Transformation wurde das HL5-Medium gegen 12,5 ml Bis-Tris HL5 (s. 2.1.4.2.) ausgetauscht. Am Tag der Transformation wurde das Medium erneut durch frisches 10 ml Bis-Tris HL5 ersetzt, um Phosphat weiter zu reduzieren. Mit Calciumphosphat wurde 10 μg bis 20 μg der DNA ($c \sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) gefällt, indem sie mit 0,24 ml sterilem H_2O , 0,3 ml $2\times$ HBS (s. 2.1.3.) sowie 60 μl 1,25 M CaCl_2 gemischt wurde. Anschließend wurde bei den Zellen das Medium abgesaugt und die DNA-Lösung tropfend auf den Zellen verteilt. Nach 30 minütiger Inkubation wurden 10 ml Bis-Tris HL5 zugegeben. Die Zellen wurden 4-8 Stunden stengelassen. Dann wurde das Medium abgenommen und vorsichtig 4 ml 18% Glycerin in $1\times$ HBS zugegeben, wobei man das Glycerin an der Seite der Schale abfließen ließ. Nach exakt 5 min wurde die Glycerinlösung abgenommen und 10 ml HL5-Medium zugegeben. Die Zellen wurden ÜN inkubiert. Erst dann wurde für die Selektion 10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 zugegeben. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium durch frisches HL5-Medium mit 10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 ersetzt. Dabei wurde die Petrischale vor dem Absaugen des alten Mediums geschwenkt, um tote und nicht stark adhärenente Zellen abzuschwemmen. Nach etwa 5 bis 7 Tagen konnten Kolonien auf dem Boden der Petrischale beobachtet werden. Es konnte aber auch bis zu vier Wochen dauern, bis man Kolonien sehen konnte. Frühestens nach einer Woche, da es sich sonst mit hoher Wahrscheinlichkeit um falsch positive Transformanten handelte, konnten diese gepickt werden und in je 1 ml HL5 mit 10-20 μg G418 in einer 24well-Titerplatte überführt werden. Wenn die Zellen konfluent waren, konnten positive Transformanten mittels Kolonie-PCR (s. 2.2.2.6.3.), mittels Immunfluoreszenz (s. 2.2.4.) oder mittels einer Proteinaufreinigung im analytischen Maßstab (s. 2.2.8.2.) verifiziert werden. Diese wurden dann wiederum in 8 ml HL5 in Petrischalen überführt und wenn die Zelldichte ausreichend war, dann wiederum in Schüttelkulturen kultiviert (s. 2.2.1.2.). In Schüttelkultur sollte die Zelldichte zwischen $5 \cdot 10^5$ - $8 \cdot 10^6$ Zellen/ml liegen.

2.2.2.10. Elektroporation mit *D. discoideum*

Mindestens 30 ml einer Schüttelkultur mit einer Zelldichte von ca. $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden durch Zentrifugation bei $1000 \times g$ für 10 min (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen) geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit je 50 ml kaltem DD-EP (s. 2.1.3.) gewaschen. Dann wurde das Zellpellet in DD-EP resuspendiert, wobei auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt wurde. 0,8 ml dieser Zellsuspension wurden mit 15 μg - 30 μg Plasmid ($c \sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Die Zellen wurden dann in vorgekühlte 0,4 cm-Elektroporationsküvette überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Küvette wurde angeschnipst, um abgesetzte Zellen aufzuwirbeln. Nachdem die Küvette außen abgetrocknet

wurde, wurde sofort mit dem Programm „dic“ (1 kV; 2 Pulse; 1 msec (5 sec Pulsintervall)) elektroporiert. Anschließend wurde die Küvette sofort auf Eis gestellt. Nach 5-10 min wurden 150 µl, 250 µl bzw. 400 µl der Zellsuspension in jeweils eine Petrischale (ø 6 cm) mit 8 ml-10 ml HL5-Medium überführt. Nach 12-24 h wurde das Medium gegen frisches HL5-Medium mit 10-20 µg/ml G418 ausgetauscht. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium gewechselt, wobei vor dem Abnehmen des alten Mediums die Petrischale geschwenkt wurde. Positive Transformanten wurden wie in 2.2.2.9. beschrieben gepickt, verifiziert und kultiviert.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Das Bradford-Testreagenz „5× Roti®-Quant“ wurde in Wasser auf einfache Konzentration verdünnt. In einer Plastik-Halbmikroküvette wurden 20 µl Probe mit 980 µl 1× Roti®-Quant gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Mischen wurde die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer bestimmt. Als Standardreihe wurden 0 bis 10 µg BSA in gleicher Weise vermessen und mit den gemessenen Werten wurde eine Eichkurve erstellt. Durch Interpolation aus der Eichkurve wurden die Proteinkonzentrationen der unbekanntenen Proben bestimmt.

2.2.3.2. Präzipitation von Proteinen mit Trichloressigsäure

Um verdünnte Proteinlösungen vor der SDS-PAGE aufzukonzentrieren und/oder um bei der SDS-PAGE störende Salze aus den Proteinproben zu entfernen, wurden die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurde die Proteinlösung mit gleichem Volumen 3 M TCA versetzt und gemischt. Die Fällung wurde vervollständigt, indem die Proben mindestens 30 min auf Eis inkubiert wurden. Dann wurde 30 min bei 4°C und 20.800 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig und möglichst vollständig abgenommen. Um etwaigen, restlichen Überstand entfernen zu können, wurde nochmals kurz anzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in geeignetem Volumen 1× SDS – Probenpuffer resuspendiert. Lag der pH-Wert der Probe im sauren Bereich, konnte die Lösung durch Zugabe von Ammoniakdampf neutralisiert werden, wobei das Bromphenolblau von gelb nach blau umschlug. Die Proben konnten nun wie in 2.2.3.4. beschrieben mittels SDS-PAGE analysiert werden.

2.2.3.3. Methanol/Chloroform-Präzipitation von Proteinen

Diese Fällungsmethode ist besonders geeignet zur Entfernung von Lipiden aus Rohextrakten für nachfolgenden Auftrag des Extrakts auf SDS-Polyacrylamidgele.

Zu 150 µl Probe wurden 600 µl Methanol (p.A.) gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden 150 µl Chloroform (p.A.) zugegeben und wiederum durch Vortexen gemischt. Dann wurden 450 µl H₂O zugegeben und in gleicher Weise gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis, wurde 5 min bei 20.800 × g und bei 4°C zentrifugiert. Es entstanden drei Phasen. Die obere Phase wurde verworfen, wobei die Interphase, die die Proteine enthält, nicht mit abgenommen werden durfte. Zur unteren Phase und zur Interphase wurden 450 µl Methanol (p.A.) gegeben und durch Vortexen vermischt. Nachdem die Probe 5 min auf Eis inkubiert wurde, wurde wiederum 5 min bei 20.800 × g und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in der Speedvac (UNIVAPO 150 H) für 10 min getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in geeignetem Volumen 1× Laemmli (s. 2.1.3.) aufgenommen und wie in 2.2.3.4. beschrieben mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurden SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Es fanden so genannte Minigele mit einer Größe von ca. insgesamt 7,5 cm x 8,5 cm Verwendung. Nach Bedarf wurden Trenngele mit 5%-, 6%-, 8%- oder 12%-Acrylamidgehalt verwendet. Das Sammelgel hatte immer einen Acrylamidgehalt von 5%.

Zusammensetzung des Trenngels:

	5%	6%	8%	12%
Tris, pH 8.8	3.050 ml			
H ₂ O	2.564 ml	2.320 ml	1.840 ml	0.860 ml
SDS	80 µl			
TEMED	165 µl		180 µl	
AA	1.216 ml	1.460 ml	1.940 ml	2.920 ml
PER	220 µl			

Zusammensetzung des Sammelgels:

Tris, pH 6.8	330 µl
H ₂ O	1.535 ml
SDS	28 µl
TEMED	60 µl
AA	430 µl
PER	110 µl

Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit 2× SDS-Probenpuffer oder mit 2× Laemmli (s. 2.1.3.) versetzt und anschließend 5 min bei 95°C hitzedenaturiert. Proben mit Membranproteinen wurden zum Teil auch für 15 min bei 37°C inkubiert, da auf diese Weise eine bessere Auftrennung erzielt wurde. Nachdem die Proben abgekühlt und 1 min bei

16000 × g zentrifugiert wurden, wurden sie auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA. Zur Abschätzung der Molekulargewichte der Proteinbanden im Gel wurde als Standard ein Gemisch von Proteinen bekannter Größe mitaufgetragen (s. 2.1.8.).

Die Proteinbanden wurden mittels Coomassiefärbung (s. 2.2.3.5.) oder Silberfärbung (2.2.3.6.) sichtbar gemacht.

2.2.3.5. Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Proteinbanden in Polyacrylamidgelen wurden mit dem Farbstoff Coomassie Blau R-250 sichtbar gemacht, wobei die Nachweisgrenze bei ca. 50 ng pro Bande liegt. Bei der Färbung bindet der Farbstoff an die Proteine, aber lagert sich auch in die Gelmatrix ein. Beim Inkubieren mit Entfärbelösung wird der Farbstoff aus dem Gel wieder herausgewaschen, bleibt aber an den Proteinen gebunden.

Nach dem Gellauf wurde das unbehandelte SDS-Polyacrylamidgel 10-15 min in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Anschließend wurde das Gel kurz in Wasser und dann in Entfärbelösung geschwenkt. Nach Bedarf wurde der Entfärber erneuert. Die Entfärbung dauerte insgesamt mehrere Stunden, bis der Hintergrund weitgehend farblos war und die Proteinbanden eindeutig erkennbar waren. Nach dem Waschen in Wasser wurde das Gel in feuchtem Zustand eingescannt. Dann wurde es mit der Geltrockenapparatur (Model 583, Gel Dryer; BioRad) für 25 min bei 80°C im Vakuum getrocknet. In dieser Form wurde das Gel aufbewahrt.

2.2.3.6. Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung ist im Vergleich zur Coomassiefärbung sensitiver; die Nachweisgrenze liegt bei ca. 1 ng pro Bande.

Das Verfahren ähnelt dem Entwickeln von Photographien. Bei der Färbung bildet das Ag⁺-Ion Komplexe mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Mit alkalischem Formaldehyd werden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert, das die Proteine braun bis schwarz färbt. Die Färbung wird durch drastische Veränderung des pH-Wertes gestoppt.

Für die Färbung wurden Fixierer, Färbelösung, Entwickler und Stopp-Reagenz immer frisch hergestellt. SDS-Polyacrylamidgele wurden entweder direkt nach der elektrophoretischen Auftrennung oder nach der Färbung mit Coomassie (s. 2.2.3.5.) silbergefärbt.

Zunächst wurde das Gel mindestens eine Stunde in Fixierer (s. 2.1.3.) geschüttelt. Dann wurde es für 10 min in 50% Ethanol und für weitere 10 min in 30% Ethanol entwässert. Nachdem es eine Minute in 0,2 g/l Natriumthiosulfat in H₂O behandelt wurde und

anschließend 3x 20 sec mit Millipore-H₂O gewaschen wurde, wurde es 20 min mit Färbelösung (s. 2.1.3.) imprägniert. Überschüssiges Silber wurde durch zweimaliges Schwenken in Millipore-H₂O abgewaschen. Anschließend wurde das Gel unter Beobachtung in Entwickler geschwenkt und sobald die Intensität der Banden ausreichend war, wurde die Reaktion mit 5% Essigsäure gestoppt. Nach fünfminütigem Schütteln, wurde das Gel 2x für 10 min gewaschen. Anschließend konnte das Gel wie in 2.2.3.5. beschrieben gescannt und getrocknet werden.

2.2.3.7. Westernblot

Bei dem Westernblot werden Proteinproben, die zuvor durch eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden (s. 2.2.3.4.), elektrophoretisch auf eine Membran transferiert. Der Nachweis der Proteine erfolgt dann durch Immundetektion.

Es wurde eine Semi-Dry-Blot-Apparatur verwendet. Direkt nach der SDS-PAGE wurde das so genannte Blotsandwich luftblasenfrei aufgebaut: auf die Anode der Apparatur wurden von unten nach oben drei in Elektrodenpuffer getränkte Whatmanpapiere, die Membran, das Gel und nochmals drei in Puffer getränkte Whatmanpapiere gelegt. PVDF-Membranen wurden zuvor in Methanol geschwenkt und anschließend 10 min in Elektrodenpuffer äquilibriert. Nitrocellulose-Membranen wurden kurz in H₂O und dann 10 min in Elektrodenpuffer geschwenkt. Es wurde 80 min bis 4 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA-2 mA/cm² geblottet. Nach Beendigung des Proteintransfers auf die Membran wurde nach Bedarf die Membran 5-10 min mit 0,2% PonceauS in 1% Essigsäure gefärbt und dann solange mit H₂O entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Standardbanden wurden dann mit Kugelschreiber markiert.

Für die Immundetektion wurden zunächst die freien unspezifischen Bindestellen auf der Membran für mindestens 15 min mit 10% Milchpulver in PBT (s. 2.1.3.) blockiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 15 sec mit PBT gewaschen. Der primäre Antikörper wurde 1:1000 in 2,5 ml PBT verdünnt. Die Membran wurde in ein 50 ml-Falcon, in das der primäre Antikörper (s. 2.1.2.) vorgelegt wurde, gelegt und ÜN bei RT in der Rotierscheibe gedreht. Nachdem die Membran 3 x 15 sec und anschließend zweimal 10 min mit PBT gewaschen wurde, wurde die Membran 1 h mit sekundärem AP-konjugierten Antikörper (1:5000) (s. 2.1.2.) in 10 ml PBT inkubiert. Die Membran wurde nochmals 3 x 15 sec und dann zweimal 10 min mit PBT gewaschen. Vor der Detektion wurde die Membran 1 min in TNK-Puffer (s. 2.1.3.) sowie 10 min in AP-Puffer (s. 2.1.3.) geschwenkt. Auf die Membran, die auf eine in Parafilm eingewickelte Glasplatte gelegt wurde, wurden 2,5 µl NBT und 15 µl BrCIP in 5 ml AP-Puffer verteilt. Die Farbreaktion erfolgte im Dunkeln und wurde mit H₂O gestoppt. Die Membran wurde dann bei RT getrocknet.

Die Proteinmengen auf der Membran wurden unter Verwendung von Adobe Photoshop 7,0 (s. 2.1.10.) densitometrisch quantifiziert.

2.2.3.8. Trypsinspaltung im SDS-Polyacrylamidgel zur Probenvorbereitung für MALDI

Nach der Auftrennung der Proteine mit SDS-PAGE (s. 2.2.3.4.) und Färbung des Gels mit Coomassie (s. 2.2.3.5.) wurde das Gel mit 7% Essigsäure entfärbt. Dann wurde das Gel ca. 1 h gewässert und weiter ÜN in H₂O geschüttelt. Die gewünschten Proteinbanden wurden mit einem Skalpell herausgeschnitten, das Volumen der ausgeschnittenen Gelstücke abgeschätzt und die Bande in kleine Stücke mit einer Kantenlänge von etwa 1 mm zerkleinert. Die kleingeschnittenen Banden wurden in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nacheinander jeweils 30 min mit 50 mM NH₄HCO₃, 50 mM NH₄HCO₃ / 25% Acetonitril, 25% Acetonitril sowie 50% Acetonitril extrahiert. Die Gelstückchen waren nun auf einen Bruchteil ihres ursprünglichen Volumens geschrumpft. Dann wurden die Gelstückchen etwa eine Stunde lyophilisiert. Sie durften beim Schütteln nicht mehr aneinander kleben bleiben. Anschließend wurde zu den Gelstückchen 50 mM NH₄HCO₃ mit Trypsin (sequencing grade) zugegeben. Das Puffervolumen entsprach dem 1,5 fachen Gelvolumen und der Puffer wurde in zwei Portionen zugegeben, wobei die erste Portion Puffer die gesamte Trypsinmenge enthielt (2 µg/ 100 µl Gelvolumen). Nach jeder Zugabe wurde vorsichtig, aber gründlich geschüttelt, um ein gleichmäßiges Benetzen und Vollsaugen der Gelstückchen zu gewährleisten. Nachdem der Puffer mit dem Trypsin zugegeben wurde, wurde vor der zweiten Pufferzugabe 5 min gewartet. Betrug das Gelvolumen weniger als 10 µl, wurde der Puffer in einer Portion zugegeben. Der Trypsinverdau erfolgte ÜN bei 37°C. Die Gelstücke wurden zweimal mit 100 mM NH₄HCO₃ und dann einmal mit 100 mM NH₄HCO₃ / Acetonitril (1:1) jeweils 1-2 Stunden extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und lyophilisiert. Der trockene Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und nochmals lyophilisiert, um NH₄HCO₃ - Reste zu entfernen. Die Proben wurden in 5-10 µl 0,05% TFA gelöst.

Die MALDI-Analysen wurden vom Labor Prof. R. Deutzmann durchgeführt.

2.2.4. Nachweis von Proteinen in *D. discoideum* mittels Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden wie in 2.2.1.5.1. beschrieben fixiert und gewaschen. Nach dem Abgießen der Waschlösung wurde das µ-Slide (ibidi) umgedreht auf ein Papiertuch gelegt, um die Lösung aus den Kammern vollständig zu entfernen. Das µ-Slide wurde dann in eine mit H₂O befeuchteten Papiertüchern ausgelegte Petrischale gelegt. Zu den Zellen wurde 5 mg/ml BSA in 1× PBS zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in der geschlossenen Petrischale für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde wie oben beschrieben die BSA-

Lösung vollständig aus den Kammern entfernt. Zu den Zellen wurde jeweils 20 µl Primärantikörper, der 1:100 in 0,1% BSA/PBS verdünnt wurde und vor Gebrauch 15 min bei 4°C rotiert wurde, gegeben. In der mit H₂O-Dampf gesättigten Petrischale wurde das µ-Slide für mindestens 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde dreimal jeweils 5 min lang mit 0,05% Tween® 20 in 1× PBS bei RT gewaschen. Nachdem die Waschlösung wie oben beschrieben aus den Kammern entfernt wurde, wurde je 20 µl Sekundärantikörper, der 1:50 in 0,1% BSA/PBS verdünnt wurde und 15 min bei 4°C rotiert wurde, zu den Zellen pipettiert. Nachdem mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert wurde, wurde dreimal bei RT für 5 min mit 0,05% Tween® 20 in 1× PBS gewaschen. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern, wurde die Waschlösung durch 2% DABCO in 80% Glycerin in 1× PBS ersetzt. Die Proben wurden bis zur Detektion der Fluoreszenzsignale (s. 2.2.7.1.) im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.2.5. Färbung von Chitin mit Calcofluor White an *D. discoideum*-Zellen

Die Zellen wurden wie in 2.2.1.5.1. oder wie in 2.2.1.5.2. beschrieben in µ-Slides (ibidi) fixiert. Nach dem Abwaschen der Fixierlösung mit 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) wurde zu den Zellen 0,01% Calcofluor White in 500 mM Tris/HCl (pH 8,8), das zuvor mit 0,22 µm-Filtern filtriert wurde, gegeben. Die Färbung erfolgte für 10 min bei RT im Dunklen. Nachdem die Färbelösung vollständig entfernt wurde, indem das µ-Slide umgekehrt auf ein frisches Papiertuch gelegt wurde, wurde dreimal für 5 min bei RT mit 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) gewaschen. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte im ultravioletten Bereich (s. 2.2.7.2.).

2.2.6. Färbung von Chitin mit GFP-getagtem Chitinbindeprotein an *D. discoideum*-Zellen

Nachdem die Zellen wie in 2.2.1.5.1. oder wie in 2.2.1.5.2. beschrieben in einem µ-Slide fixiert wurden, wurde zu den mit 1× PBS oder mit 0,05% Tween® 20 in 1× PBS gewaschenen Zellen 5 mg/ml BSA in 1× PBS gegeben. Das µ-Slide wurde in eine Petrischale, die mit feuchten Papiertüchern ausgelegt wurde, gegeben und die Zellen wurden mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die BSA-Lösung vollständig entfernt und es wurde jeweils 20 µl GFP-getagtes Chitinbindeprotein (Weiss und Schönitzer, 2006), das 1:50 in 1× PBS verdünnt wurde, zugegeben. Danach wurden die Zellen für mindestens eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend dreimal für 5 min mit 1× PBS gewaschen. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie (s. 2.2.7.1.).

2.2.7. Mikroskopische Methoden

2.2.7.1. Konfokalmikroskopie

Die Fluoreszenzsignale der Immunfluoreszenzpräparate (s. 2.2.4.) sowie der Tests mit GFP-Chitinbindepotein (s. 2.2.6.) wurden in einem Konfokalmikroskop LSM 510 Meta (s. 2.1.9.) detektiert.

GFP und Alexa Fluor® 488 wurden durch einen Argonlaser der Wellenlänge 488 nm angeregt. YFP und Cy3 wurden durch einen HeNe-Laser der Wellenlänge 514 nm angeregt. Die einzelnen Farbstoffe emittieren Fluoreszenzsignale bei 509 nm (GFP), bei 519 nm (Alexa Fluor® 488), bei 527 nm (YFP) bzw. bei 570 nm (Cy3).

Die selektive Detektion des emittierten Lichts wird durch eine Reihe von Strahlteilern und Filtern ermöglicht. Bei gleichzeitiger Detektion von den Farbstoffen Cy3 und Alexa Fluor® 488 emittierten Licht sendet der Strahlteiler HFT 488/543 das Anregungslicht der Wellenlängen 488 nm und 543 nm zur Probe. Der Bandpassfilter BP 505-530 lässt das emittierte Licht der Wellenlängen 505-530nm passieren, das in einem separaten Kanal detektiert wird. Es handelt sich um Fluoreszenzsignale von Alexa Fluor® 488. Ein zweiter Kanal sammelt Licht, das den Filter LP 560 passiert. Der Filter LP 560 lässt Licht mit größerer Wellenlänge als 560 nm passieren. In diesem Kanal wird die Emission des Cy3 gemessen. Der beschriebene Strahlengang sowie alle weiteren verwendeten Strahlengänge sind in Fig. 2.1. dargestellt.

Beim Konfokalmikroskop wird im Gegensatz zum Fluoreszenzmikroskop zu jedem Zeitpunkt nur ein Lichtfleck auf einen Punkt der Probe in einer Ebene fokussiert. Der Laserstrahl wird durch eine Lochblende auf das Objekt geschickt. Der Detektor, der das Fluoreszenzsignal misst, steht zur Beleuchtungsblende konfokal, d. h. er ist dort angebracht, wo der Brennpunkt der von dem beleuchteten Punkt des Objekts emittierten Strahlen ist. Ein zweidimensionales Bild wird erzeugt, indem jeder Punkt in der Fokusebene abgerastert wird und die ermittelten Daten gesammelt werden. Es können außerdem die Fluoreszenzsignale mehrerer Tiefen desselben Objekts gemessen werden. Man spricht von einem Z-Stapel, aus dem sich räumliche Informationen erschließen lassen.

Die Signalverstärkung am Detektor in den beiden Kanälen wurde bei der Negativkontrolle, dem Wildtyp, so eingestellt, dass keine Autofluoreszenz detektiert wurde. Diese Einstellung wurde während des Experiments konstant gehalten.

Für den z-Stapel wurden die Einstellungen so gewählt, dass sich die einzelnen optischen Schnitte überschneiden.

Als Objektive wurden ein Plan APOchromat 100x/1.4 Oil DIC verwendet, ein Plan Neofluar 40x/1.3 Oil Ph3 sowie ein LD-Achroplan 40/0.6 corr Ph2 verwendet.

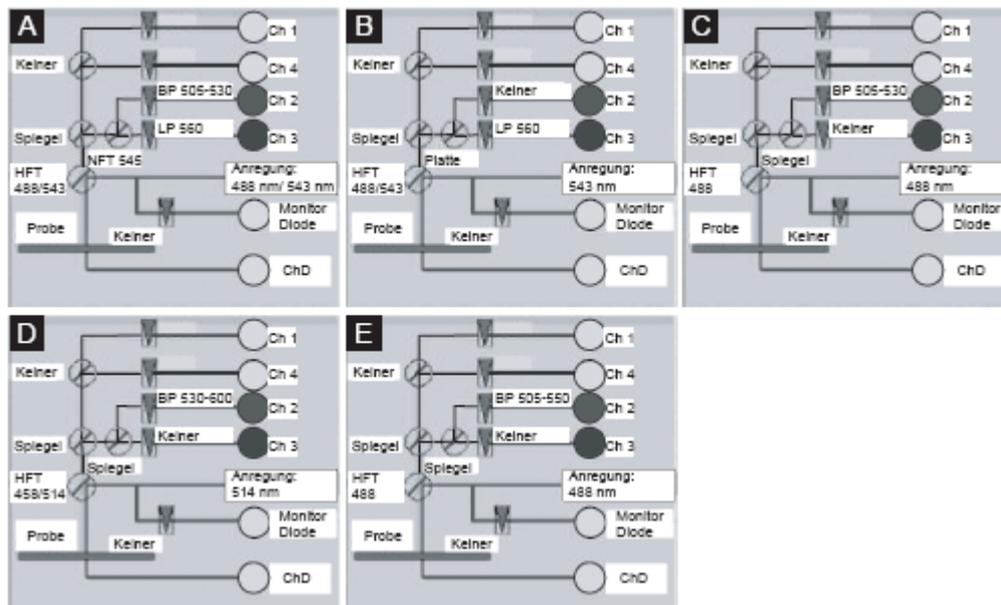


Fig 2.1.: Am Konfokalmikroskop LSM 510 Meta eingestellte Strahlengänge

A: Strahlengang bei Immunfluoreszenz mit Färbung von Aktin und Ar-CS1-YFP bzw. YFP-getaggtter Myosindomäne; B: Strahlengang bei Immunfluoreszenz mit Färbung von His-getaggtten Myosindomänen; C: Strahlengang bei Immunfluoreszenz mit Färbung von Ar-CS1-YFP; D: Detektion der Fluoreszenz von YFP-getaggtter Myosindomäne bzw. Ar-CS1-YFP; E: Detektion der Fluoreszenz von GFP-getaggttem Chitinbindeprotein

2.2.7.2. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Messung der Fluoreszenz von Calcofluor White wurde am LSM 510 meta mit der Hg-Lampe angeregt und über den Dapi-Filter detektiert. Bei der Bildaufnahme wurde die Software AxioVS 4.1.1.0 (s. 2.1.10.) verwendet.

2.2.7.3. Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy)

Das Rasterkraftmikroskop (AFM) kann sehr kleine Kräfte messen, die entstehen, wenn Atome oder Moleküle sehr nahe zusammen kommen. Ein kritischer Teil des mechanischen Geräts ist der so genannte cantilever, eine flache Feder. Diese Feder ist an einem Ende befestigt. Am anderen Ende befindet sich eine feine Spitze, mit der die Oberfläche einer Probe durch Piezo-Stellelemente zeilenweise abgetastet wird. Das Instrument misst die Verbiegung der Feder beim Scannen der Probenoberfläche. Dabei wird aus der Information über die Bewegung der Spitze eine topographische Karte der Probenoberfläche erstellt. Um Bilder zu erzeugen, muss die Verbiegung der Feder gemessen werden und in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Dazu wird ein Laserstrahl an der Rückseite der Feder in eine segmentierte Photodiode reflektiert. Die Verkippung des Lichtstrahls und damit der Verbiegungswinkel der Feder wird von den Differenzen der Photoströme der einzelnen Segmente wiedergegeben. Im Kontaktmodus, der bei den Messungen verwendet wurde,

wird die Auslenkung der Feder und damit die Auflagekraft der Spitze auf die Probe über eine rückgekoppelte Regelschleife konstant gehalten. Bei Bewegungen parallel zur Objekttoberfläche muss nachgeregelt werden. Dies geschieht über den Piezo-Kristall in z-Richtung. Die Messung der Höhenänderung z ergibt zusammen mit der lateralen Position der Spitze (x - und y - Koordinaten) das topographische Bild der Probe.

Die Rasterkraftmikroskopie ist geeignet, um Zellen unter physiologischen Bedingungen mit hoher Auflösung abzubilden. Die *D. discoideum*-Zellen wurden für die Abbildung mit dem AFM fixiert (s. 2.2.1.5.2.).

Für die AFM-Messungen wurde ein NanoWizard AFM (JPK Instrumente, Berlin, Deutschland) in Kombination mit einem speziell angepassten schwingungsdämpfenden Mikroskopisch eines inversen optischen Mikroskops (Axiovert 200, Carl Zeiss) verwendet. Der verwendete Piezokristall hatte eine maximale horizontale Scanfläche von $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ und eine vertikale Grenze von $15 \mu\text{m}$. Das Axiovert 200 wurde verwendet, um Zellen auszuwählen und die abbildende Spitze auszurichten. Es wurden die Objektive 40x/LD Plan-Neofluar und 63x/LD Achroplan verwendet. Zum Teil wurden auch fluoreszierende Zellen mit der YFP-getaggten Chitinsynthase ausgewählt, wobei das emittierte Licht über einen YFP-Filter detektiert wurde (ORCA-ER). Es wurden als cantilever die MLCT-Microlever Probes (Veeco Instruments, Mannheim, Deutschland) aus Siliconnitrid mit einer Kraftkonstante von 20 nN/m verwendet. Die Kraftkonstante wurde jeweils individuell bestimmt mit Hilfe der thermalen Geräuschmethode (Butt und Jaschke, 1995). Die AFM-Bilder wurden im Kontaktmodus in Flüssigkeit aufgenommen. Die fixierten Zellen wurden mit $512 \times 512 \text{ Pixel}^2$ und $1024 \times 1024 \text{ Pixel}^2$ bei einer Linienrate von $0,2\text{-}0,3 \text{ Hz}$ abgebildet.

2.2.8. Expression und Reinigung der rekombinanten Myosindomänen der Ar-CS1

2.2.8.1. Kultivierung von den Zelllinien mit Myosindomänen der Ar-CS1

Es wurden Sporen von jeweils zwei gut exprimierenden Transformanten von jeder Variante der Myosindomäne der Ar-CS1 wie in 2.2.1.3.2. beschrieben angelegt. Die Sporen waren keimfähig. Für jede Aufreinigung wurde ein neues Aliquot Sporen angeimpft. Die Zelllinien wurden dann wie in 2.2.1.2. beschrieben kultiviert.

2.2.8.2. Aufreinigung von rekombinanten Myosindomänen der Ar-CS1 im analytischen Maßstab

Manstein und Hunt (1995) entwickelten ein analytisches Extraktionsverfahren von rekombinanten Myosinformen in *D. discoideum*-Zellen, um das Expressionsniveau von

mehreren Transformanten vergleichen zu können sowie um die Extraktionsbedingungen optimieren zu können.

Pro Ansatz wurden $2\text{-}5\cdot 10^7$ Zellen aus einer Schüttelkultur mit einer Zelldichte von etwa $3\cdot 10^6$ Zellen/ml eingesetzt. Die Kulturen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei $1000 \times g$ (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen) geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit 15 ml MES-Puffer (s. 2.1.3.) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml MES-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 2 min bei $2000 \times g$ pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit Lysepuffer (s. 2.1.3.) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 600 μl Lysepuffer mit 5 U/ml alkalische Phosphatase, 40 $\mu\text{g/ml}$ TLCK und 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin resuspendiert. Es wurden nun 600 μl desselben Puffers mit 1% (w/v) Triton X-100 zugegeben. Die Zellyse wurde innerhalb einer Stunde auf Eis oder innerhalb von 10 min bei RT vervollständigt. Dann wurde die unlösliche Fraktion durch Zentrifugation für 30 min bei $10000 \times g$ und bei 4°C gesammelt. Das Pellet wurde mit 500 μl Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurden Myosine und rekombinante Myosinfragmente extrahiert, indem das Pellet mit Hilfe einer Mikropipette in 50 μl Lysepuffer mit 10 mM Mg^{2+} -ATP resuspendiert wurde. Nachdem 20 min bei $10.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert wurde, wurden 40 μl vom Überstand (Extrakt) entfernt und mit 40 μl 2 \times Laemmli gemischt. Die Analyse der Proben erfolgte wie in 2.2.3.4. beschrieben.

2.2.8.3. Aufreinigung von rekombinanten Myosindomänen der Ar-CS1 im präparativen Maßstab

Es wurden 1 l bis zu 8 l einer Schüttelkultur von einer Zelllinie mit einer Zelldichte zwischen $5\cdot 10^6$ und $1\cdot 10^7$ Zellen/ml geerntet. Dabei wurde mit $1000 \times g$ für 10 min mit dem Rotor JLA-8.1000 (Beckman) bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer (s. 2.1.3.) resuspendiert, wobei $5\cdot 10^9$ Zellen in 48 ml Puffer aufgenommen wurden. Zu dem Lysepuffer wurden aufgrund der hohen Proteasekonzentration innerhalb der Zellen verschiedene Proteaseinhibitoren gegeben: 40 $\mu\text{g/ml}$ TLCK, 20 $\mu\text{g/ml}$ TPCK, 200 μM PefablocSC, 200 μM 1,10-Phenanthrolin sowie 5 mM Benzamidin. Außerdem wurden 7 mM β -Mercaptoethanol und 0,04% NaN_3 zugesetzt. Für die Zellyse wurde die Zellsuspension auf 0,5% Triton X-100 gebracht und für eine Stunde auf Eis gerührt. Alternativ wurde die Zellsuspension 5 min auf Eis homogenisiert und anschließend dreimal 5 sec bei Stufe 6 und bei 50% Einschaltdauer im Eisbad mit einem Ultraschallhomogenisator kontinuierlich beschallt. Zwischen jedem Puls wurde die Zellsuspension 5 sec im Eisbad gekühlt. Anschließend wurde 1 Stunde bei 42.000 rpm mit dem Sorvall TFT50.38 Ultra Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die weitere Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (s. 2.2.8.4.) aufbewahrt. Aus dem Pellet wurden die Myosinfraktionen mit verschiedenen

Bedingungen extrahiert. Das Pellet (ca. 5 g) wurde in HKM-Puffer (10 ml-15 ml) (s. 2.1.3.) mit 7 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM Benzamidin sowie 40 μ g/ml PefablocSC mittels Homogenisieren resuspendiert und eine Stunde bei 42.000 rpm mit dem TFT50.38-Rotor zentrifugiert. Dann wurde das Pellet erneut in HKM-Puffer homogenisiert und die Suspension wurde in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 1 ml aliquotiert. Anschließend wurde eine Stunde bei 4°C und 14.000 \times g zentrifugiert. Zur Extraktion wurden die Pellets (ca. 0,4 g) mit je 500 μ l unterschiedlichem Extraktionspuffer (s. Tabelle) mit 7 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM Benzamidin sowie 40 μ g/ml PefablocSC homogenisiert. Die Extrakte wurden 20 min bei RT inkubiert und anschließend nochmals zentrifugiert.

Probe	Extraktionsbedingungen
1	HKM-Puffer + 10 mM ATP + 10 mM MgSO ₄ (vor ATP-Zugabe 1 Stunde bei 37°C inkubieren)
2	HKM-Puffer + 0,5 M NaCl + 10 mM ATP 10 mM MgSO ₄
3	HKM-Puffer + 50 U alkalische Phosphatase + 10 mM ATP + 10 mM MgSO ₄ (vor ATP-Zugabe 1 Stunde bei 37°C inkubieren)
4	HKM-Puffer + 50% Glykol + 10 mM ATP + 10 mM MgSO ₄
5	HKM-Puffer + 30% DMSO + 10 mM ATP+ 10 mM MgSO ₄
6	8 M Harnstoffpuffer + 10 mM ATP + 10 mM MgSO ₄
7	Hepes/KI-Puffer + 10 mM ATP + 10 mM MgSO ₄
8	HKM-Puffer + 0,5 M KCl + 10 mM ATP + 10 mM MgSO ₄
9	HKM-Puffer
10	HKM-Puffer + 0,5 M NaCl
11	HKM-Puffer + 0,5 M KCl

Für eine Analyse mittels Westernblot (s. 2.2.3.7.) wurden Proben entnommen, wobei 40 mg Pellet in 120 μ l 2 \times Laemmli resuspendiert wurde und zu je 60 μ l Überstand 60 μ l 2 \times Laemmli gegeben wurde.

2.2.8.4. Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Fusionsproteine mit einem His-tag können mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die rekombinanten Myosindomänen der Ar-CS1 wurden sowohl aus der Fraktion der nicht aktinbindenden Myosindomänen als auch aus der Fraktion der aktin gebundenen Myosindomänen (s. 2.2.8.3.) mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zuvor wurde die Fraktion gegen den entsprechenden Säulenpuffer dialysiert. Es

wurde in 16 mm-Dialyseschläuchen (MWCO=12.000-14.000; Servapor) einmal ÜN und zweimal 3-4 Stunden bei 4°C dialysiert.

Die Probe wurde anschließend auf 5 mM Imidazol gebracht und es wurden 100 µl 50% in Säulenpuffer äquilibrierte Ni-NTA-Agarose zugegeben. Das Gemisch wurde ÜN bei 4°C mittels einer Rotierscheibe invertiert. Dann wurde die Ni-NTA-Agarose bei 500 rpm und bei 4°C 1-5 min (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen) abzentrifugiert. Der Überstand, der dem Säulendurchfluss entspricht, wurde möglichst vollständig abgenommen. Das Säulenmaterial wurde dann in 1-2 ml Überstand aufgenommen und in Säulchen (MoBiCols; MoBiTec) überführt. Danach wurde achtmal mit jeweils 400 µl Waschpuffer (s. 2.1.3.) gewaschen. Anschließend wurde viermal mit je 100 µl Elutionspuffer 1 (s. 2.1.3.) und viermal mit je 100 µl Elutionspuffer 2 (s. 2.1.3.) eluiert. Falls nötig konnte der Säulenlauf beschleunigt werden, indem die Säulchen 30-60 sec bei 22 × g zentrifugiert wurden. Der Säulendurchlauf, die Waschfraktionen und die Eluate wurden getrennt gesammelt und bis zur Verwendung auf Eis bei 4°C oder in flüssigem N₂ schockgefroren bei -80°C gelagert.

2.2.9. Charakterisierung der Zelllinien mit Ar-CS1-YFP

2.2.9.1. Präparation von Membranfraktionen aus *D. discoideum*-Zellen mit Ar-CS1-YFP

Das Protokoll wurde nach Green und Newell (1974) und nach Kaufmann et al. (2007) etabliert.

Für eine Präparation von Membranfraktionen wurden 1 -2 l Kulturen von Wildtypzellen und von Zelllinien mit Ar-CS1-YFP mit einer Zelldichte von 4-6·10⁶ Zellen/ml eingesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 × g und bei 4°C mit dem JLA-8.1000-Rotor (Beckman) geerntet. Anschließend wurde jedes Zellpellet in 50 ml 1× PBS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden bei 1000 × g und bei 4°C abzentrifugiert (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen). Jedes Zellpellet wurde nach dem Naßgewicht in TM-Puffer mit Proteaseinhibitoren (Complete; Roche) aufgenommen, wobei zu 5 g Pellet 6 ml Puffer gegeben wurde. Um die Zellen aufzuschließen, wurden die Zellsuspensionen in flüssigem N₂ schockgefroren und ÜN bei 4°C auf Eis aufgetaut. Dann wurde jeweils mit einem Homogenisator sechsmal geplümpert. Die Zellwände wurden durch Zentrifugation bei 1000 × g für 10 min bei 4°C abgetrennt. Die Überstände wurden anschließend 1 Stunde bei 54.000 × g (30.000 rpm mit 75Ti-Rotor) und bei 4°C zentrifugiert.

Mittels SDS-PAGE (s. 2.2.3.4.) wurden die Pellets und die Überstände von beiden Zentrifugationsschritten analysiert. Zur Probenvorbereitung wurden die Überstände auf 1% SDS gebracht und die Pellets wurden in 125 mM Tris (pH 7) mit 1% SDS resuspendiert (100 mg Pellet in 100 µl Puffer). Nachdem die Proben 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurden, wurden sie 5 min bei 16.000 × g zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils mit 2× Laemmli

versetzt. Bevor die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen wurden, wurden sie eine Stunde bei 37°C inkubiert.

2.2.9.2. Radioaktiver Chitinsynthase-Aktivitätstest

Der Chitinsynthase-Aktivitätstest wurde mit kleineren Änderungen wie bei Kaufmann et al. (2007) beschrieben durchgeführt.

Für den Test wurden von den wie in 2.2.9.1. beschrieben hergestellten Membranfraktionen 50 mg 1000 × g-Pellet mit 50 µl TM-Puffer (s. 2.1.3.), 50 mg 54.000 × g-Pellet mit 50 µl TM-Puffer sowie 100 µl 54.000 × g Überstand eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit 100 µg BSA und als Positivkontrolle ein Ansatz mit 10 µl 54.000 × g Pellet einer Membranfraktion aus *Saccharomyces cerevisiae* (Kaufmann et al. 2007) in gleicher Weise behandelt.

Zu jeweils 100 µl Probenvolumen wurde 1 µl Trypsin-Lösung gegeben und die Ansätze wurden für 20-30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl Reaktionsmix mit UDP-¹⁴C-GlcNAc zugegeben und 3,5 h bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl 0,4% SDS gestoppt und ÜN bei RT inkubiert. Um die Filtrierbarkeit der Proben zu erhöhen, wurden die Proben dann auf 0,5% Triton X-100 gebracht und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde jede Probe durch einen Whatman GF/C Glasfaser-Filter, der für mindestens 15 min in einer 1% GlcNAc-Lösung blockiert wurde, filtriert. Dann wurden sie jeweils dreimal mit 10 ml 70% EtOH gewaschen. Optional wurde zuvor einmal mit 1 ml H₂O gewaschen. Danach wurden die Filter jeweils im Deckel eines Szintillationsfläschchens für 15-30 min bei 70°C getrocknet. Die Filter wurden jeweils zusammen mit 6,5 ml Szintillator-Cocktail in ein Fläschchen gegeben und die Radioaktivität wurde dann in einem Szintillationszähler LS-6500 (Beckman Coulter) gemessen.

2.2.9.3. Immobilisierung von Membranfraktionen aus Zelllinien mit Ar-CS1-YFP an Silicatkugeln

Die Membranfraktionen (s. 2.2.9.1.) wurden auf unmodifizierte Silicatkugeln wie bei Kaufmann et al. (2007) beschrieben immobilisiert. Dabei wurden so genannte „solid beads“, „NUCLEOSIL“ und „NUCLEOPREP“ verwendet. Die „solid beads“ sind glatte Kugeln ohne Poren und haben eine Größe zwischen ca. 5 µm und 100 µm. Bei Nucleosil und Nucleoprep handelt es sich um poröse Kugeln mit definiertem Kugeldurchmesser (s. Tabelle).

Kugeln	Porengröße [Å]	Partikelgröße [µm]
Solid beads	glatt	5-100

NUCLEOSIL	4000	5
NUCLEOSIL	4000	10
NUCLEOPREP	4000	30
NUCLEOPREP	1000	30

Für die Bindung der Membranen an die Silikatkugeln wurden 300 mg Pellet aus der 54.000 × g-Zentrifugation (s. 2.2.9.1.) mit 350 µl TM-Puffer gemischt und mit 25 µl 4 M NaCl versetzt. Die Suspension wurde 1 min bei 1000 × g zentrifugiert. Der Überstand (ca. 600 µl) wurde zu 10 mg Kugeln gegeben. Nachdem 3 h bei RT mittels einer Rotierscheibe invertiert wurde, wurden die Kugeln 30 sec bei 1000 × g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Die Kugeln wurden dreimal mit jeweils 300 µl TM-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie für die Analyse mittels SDS-PAGE (s. 2.2.3.4.) in 75 µl 2× Laemmli für 2 h bei 37°C inkubiert. Für das Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel wurden auch 100 µl des Überstandes wie in 2.2.9.1. beschrieben vorbereitet.

2.2.9.4. Aufreinigung von Chitinfragmenten aus Kulturüberständen von Zelllinien mit Ar-CS1-YFP

Die Chitinfragmente aus den Kulturüberständen von Ax3-orf+ Zellen sowie Ax3ArCS1 Zellen wurden wie bei Rosan und Hammond (1974) für die Reinigung extrazellulärer Polysaccharide beschrieben isoliert.

Nachdem eine 1 l-Kultur bei 1000 × g für 10 min mit dem JLA-8.1000-Rotor (Beckman) bei 4°C abzentrifugiert wurde, wurden vom Überstand 300 ml abgenommen und nochmals bei 1000 × g und bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Dann wurden vom Überstand 250 ml in 2 l-Erlenmeyerkolben überführt. Unter Rühren wurde zu dem Medium jeweils 750 ml Aceton (p.A.) gegeben. Es wurde weitere 3-4 Stunden bei 4°C gerührt. Nach 5 Tagen bei 4°C wurde der Überstand der Acetonfällung vorsichtig abdekantiert und der Rückstand, nachdem das zurückgebliebene Aceton verblasen wurde, in 25 ml H₂O gelöst. Die Lösung wurde zur Ausfällung von Proteinverunreinigungen auf 10% TCA gebracht und bei 4°C inkubiert. Nach 12 h wurde der Überstand der TCA-Fällung wiederum soweit möglich vorsichtig abdekantiert. Die im Erlenmeyerkolben zurückgebliebene TCA-gefällte Suspension wurde bei 20.000 × g und bei 4°C für 1 Stunde zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde vorsichtig abdekantiert. Die vereinigten Überstände wurden mit einem Volumen Aceton (p.A.) versetzt. Nach 12 Stunden bei 4°C wurde die Aceton-gefällte Suspension 1 Stunde bei 4°C und bei 4000 rpm (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml H₂O gelöst und dann bei 4°C gegen H₂O dialysiert (Dialyseschlauch: MWCO=500). Es wurde

zweimal 3-4 Stunden und einmal ÜN dialysiert. Anschließend wurden die Polysaccharidhaltigen Proben lyophilisiert.

2.2.9.5. Zuckanalytik mittels Gaschromatographie (GC und GC-MS)

5 mg-10 mg lyophilisierte Probe (s. 2.2.9.4.) wurden zusammen mit 25 µg myo-Inosit als internem Standard in einer Glasampulle 22 Stunden in ca. 0,5 ml 6 N HCl bei 110°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Glasampulle wurde mit H₂O gespült, das mit dem Hydrolysat in dem Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt wurde. Unlösliche Bestandteile wurden bei 16.000 × g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit je 200 µl H₂O gewaschen. Mittels einer heißen Speedvac mit Kältefalle wurden die Salzsäure und das H₂O abgezogen. Der trockene Rückstand wurde einmal mit 200 µl H₂O gewaschen. Anschließend wurde er in 100 µl H₂O aufgenommen und der pH-Wert wurde mit 4 N NaOH auf mindestens 10 eingestellt. In einem Zentrifugenglas wurde die Lösung auf 1 M NaBH₄ gebracht und 30 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann mit 5 M Essigsäure neutralisiert. Danach wurde er ÜN lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 200 µl gesättigter NaHCO₃-Lösung aufgenommen und dreimal nach Zugabe von je 10 µl Essigsäureanhydrid 5 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde vollständig auf eine mit 1,5 ml Kationaustauscher (Dowex AG 50 X8-/H+-Form) gepackte Säule, die zuvor dreimal mit 2 ml H₂O gewaschen wurde, aufgetragen. Das Zentrifugenglas wurde zweimal mit 2 ml H₂O gewaschen. Diese Waschlösungen wurden auch auf die entsprechende Säule aufgetragen. Das Eluat wurde mit dem Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der entstandene weiße Belag wurde dreimal mit 1-2 ml MeOH gewaschen. Anschließend wurden 100 µl absolutes Pyridin und 100 µl Essigsäureanhydrid zugegeben. Der Ansatz wurde mit N₂ überschichtet und dann 30 min bei 100°C inkubiert. Nachdem der Ansatz abgekühlt war, wurde er in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit N₂ verblasen, bis die Probe auf ca. 5 µl eingengt war. Dann wurden 100 µl Essigsäureethylester zugegeben.

Mittels GC sowie GC-MS wurde 1 µl Probe analysiert.

Bedingungen für GC:

Säule: SP-2340; gepackte Glassäule (1,8 m x 2 mm)

Trägergas: Reinststickstoff, 30 ml/min

Injektor: 220 °C

Detektor: 300 °C, Flammenionisationsdetektor (FID)

Temperaturprogramm: 1 min 210 °C

mit einer Aufheizrate von 10°C/min auf 270 °C

3 min 270°C

Bedingungen für GC-MS:

Säule: DB-1701 (Länge: 30 m; Innendurchmesser: 0,25 mm)

Trägergas: Heliumgas, 30 ml/min

Injektor: 250 °C

Temperaturprogramm: 5 min 200°C

mit einer Aufheizrate von 2°C/min auf 220°C

5 min auf 220°C

mit einer Aufheizrate von 4°C/min auf 240°C

mit einer Aufheizrate von 2°C/min auf 260°C

5 min auf 260°C

2.2.9.6. Nachweis von Chitinfragmenten aus *D. discoideum*-Kulturüberständen mittels GFP getagtem Chitinbindeprotein

Für diesen Test wurden *D. discoideum*-Zelllinien in 24 well-Titerplatten in je 1 ml HL5-Medium kultiviert. Für jede Zelllinie wurden drei verschiedene Ansätze angefertigt. Zu den Zelllinien mit Ar-CS1-YFP wurden jeweils 20 µg/ml G418 sowie 5 mM UDP-GlcNAc zugegeben. Zu jedem Kulturansatz wurde in eine Kammer 100 µM Nikkomycin Z, ein kompetitiver Chitinsynthaseinhibitor, sowie in eine Kammer Latrunculin A, das die Polymerisation von Aktinfilamenten inhibiert, zugegeben. Nach drei Tagen wurde ein Chitinnachweis mit GFP-getagtem Chitinbindeprotein wie in 2.2.6. beschrieben durchgeführt. Die restlichen Zellen wurden vom Kulturüberstand durch Zentrifugation bei 1000 × g für 1 min abgetrennt. Der abgenommene Überstand wurde nochmals zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Zellen abzutrennen. Anschließend wurde der Kulturüberstand in zentrifugierbare Filtereinheiten (Ultrafree-MC; 22 µm; Millipore), die für 10 min mit 0,1% BSA/ 1× PBS blockiert wurden, überführt. Es wurde 4 min bei 12.000 × g zentrifugiert. Die Filter, in denen faserartige Chitinpolymere zurückbleiben sollten, wurden dreimal mit je 500 µl 1× PBS gewaschen, wobei 1 min bei 3000 × g zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Filterrückstand mit 100 µl 5 mg/ml BSA in 1× PBS für 30 min bei RT blockiert. Nachdem 1 min bei 3000 × g zentrifugiert wurde, wurde für 2,5 h mit GFP-getagtem Chitinbindeprotein, das 1:100 in 1× PBS verdünnt wurde, inkubiert. Es wurde wiederum 1 min bei 3000 × g zentrifugiert, wobei jeder Durchlauf in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt wurde und anschließend lyophilisiert wurde. Der Filterrückstand wurde wie oben beschrieben dreimal mit je 100 µl 1× PBS gewaschen. Die Probe wurde aus dem Filter mit 100 µl 1× PBS herausgewaschen und anschließend lyophilisiert.

Die lyophilisierten Proben wurden in 30 µl 2× Laemmli resuspendiert und mittels Westernblot (s. 2.2.3.7.) analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Chitinsynthase von *Atrina rigida* (Ar-CS1)

Zu Beginn dieser Arbeit war die Chitinsynthase von *Atrina rigida* (Ar-CS1; Accession No. DQ081727) die einzige bekannte Chitinsynthase mit einer Myosindomäne in Invertebraten. Die Sequenz zeigt nur geringe Ähnlichkeiten mit anderen Chitinsynthasen. Die Chitinsynthesedomäne ist zur Insektenchitinsynthase homolog, zeigt aber keine allgemeine Homologie zu den bekannten Chitinsynthasen mit N-terminaler Myosindomäne. Die N-terminale Myosindomäne ist signifikant ähnlich zu Myosinkopfdomänen (Weiss et al., 2006). Inzwischen sind zwei weitere Chitinsynthasen mit Myosindomänen aus Mollusken in der Datenbank zugänglich: Mg-CS1 von *Mytilus galloprovincialis* (Accession No.: ABQ08059) und PfCHS1 von *Pinctada fucata* (Accession No.: AB290881).

3.1.1. Phylogenetische Analyse der Chitinsynthase von *Atrina rigida*

Das clustalw-Computerprogramm sowie das Programm BOXSHADE (s. 2.1.10.) wurden verwendet, um die Aminosäuresequenzen der drei Chitinsynthasen aus Mollusken Ar-CS1, Mg-CS1 und PfCHS1 zu vergleichen (s. 6.1.). Die Sequenzen zeigen die größte Ähnlichkeit innerhalb der Myosindomäne sowie innerhalb der Transmembrandomänen und der katalytischen Domäne der Chitinsynthase. Insgesamt hat die Ar-CS1 zu 78% identische Aminosäuren mit der Pf-CHS1 und zu 72% identische Aminosäuren mit der Mg-CS1.

Um die evolutionäre Entwicklung der Chitinsynthasen aus Mollusken zu untersuchen, wurden ausgewählte Chitinsynthasen phylogenetisch analysiert. Das multiple Alignment, das als Grundlage für die phylogenetische Analyse dient, wurde mit dem Programm clustalw (s. 2.1.10.) erstellt. Der Stammbaum (s. Fig. 3.1.) wurde nach dem Neighbor joining (NJ) Algorithmus berechnet. Dabei wurden die gesamten Aminosäuresequenzen der Chitinsynthasen miteinander verglichen. Die Chitinsynthasen der Pilze, Nematoden, Insekten und Mollusken bilden jeweils eine eigene Gruppe. Die Position jeder Gruppe ist konsistent mit ihrer evolutionären Stellung. Die Chitinsynthasen der Pilze sind in zwei Gruppen untergliedert: die Chitinsynthasen mit N-terminaler Myosindomäne und die Chitinsynthasen ohne Myosindomäne. Die Chitinsynthasen der Mollusken sind phylogenetisch von den bekannten Chitinsynthasen mit Myosindomäne aus Pilzen, die der Klasse V bzw. Klasse VI zugeordnet sind (Takeshita et al., 2006), getrennt.

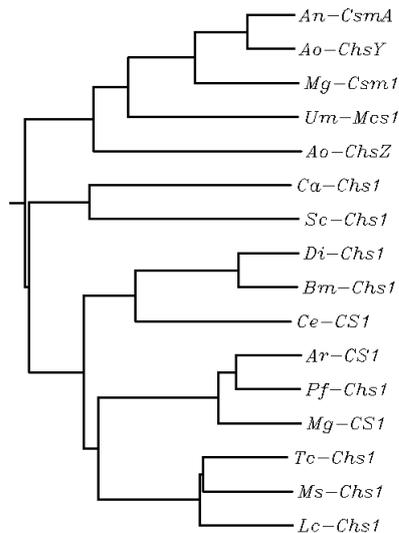


Fig. 3.1.: Phylogenetischer Stammbaum von Chitinsynthasen mit und ohne Myosindomäne

Der phylogenetische Stammbaum wurde mittels clustalw und mit dem Neighbour Joining (NJ) Algorithmus erstellt.

Die Chitinsynthasen der Pilze, der Nematoden, der Mollusken und der Insekten bilden jeweils eine eigene Gruppe. Die Chitinsynthasen der Pilze sind in zwei Gruppen unterteilt: die Chitinsynthasen mit Myosindomäne (An-CsmA aus *Aspergillus nidulans* (Acc. No.: AB000125), Ao-ChsY und Ao-ChsZ aus *Aspergillus oryzae* (Acc. No.: AB081656 und AB081655), Mg-Csm1 aus *Magnaporthe grisea* (Acc. No.: AB018251) sowie Um-Csm1 aus *Ustilago maydis* (Acc. No.: XP_759351) und die Chitinsynthasen ohne Myosindomäne (Ca-Chs1 aus *Candida albicans* (Acc. No.: CAA21947) und Sc-Chs1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Acc. No.: AAA34491). Von den Chitinsynthasen der Insekten wurden die Tc-Chs1 aus *Tribolium castaneum* (Acc. No.: NM_001039402), Ms-Chs1 aus *Manduca sexta* (Accession No.: AY062175) und Lc-Chs1 aus *Lucilia cuprina* (Accession No.: AF221067) ausgewählt. Stellvertretend für die Nematoden sind Di-Chs1 aus *Dirofilaria immitis* (Acc. No.: AF288618), Bm-Chs1 aus *Brugia malayi* (Acc. No.: AF288618) sowie Ce-CS1 aus *Caenorhabditis elegans* (Acc. No.: AAX62732).

Um einen Hinweis zu erhalten, ob das Gen für die Molluskenchitinsynthase aus der Fusion von für die Myosindomäne und für die Chitinsynthasedomäne codierenden Genen im Laufe der Evolution entstanden ist, wurde die Übergangssequenz der Mg-CS1 anhand genomischer DNA analysiert. Nach der Sequenzähnlichkeitssuche mit Blast (s. 2.1.10.) enthält die Übergangssequenz zwischen N-terminaler Myosindomäne und C-terminaler Chitinsynthase eine Region niedriger Komplexität („low-complexity region“). Innerhalb dieser Region befinden sich drei Introns (s. Fig. 3.2.). Die gesamte Chitinsynthasesequenz ist also im selben Gen codiert.

```

CTGAAGTGGTACGGAGACAGATGCTATGCAACGGATTAATGGAAATAGCA
GAACTAAGACGATATGGTTATCCAGTGAGAGTTAAGTTTGAAGACTTTGC
TGCAAGGTATATGTTTTGTTCAATCGTCTCTTTGTTTTATAAACTTTATT
TCTAGTTGTTGTAAGTAAAAAGATATCATGTAAAGAACTTTCATTATTT
ATATAGCCAGCGATATGATATGAACCTATTTTGCAAATTTTCATAACAA
AATATATATCTCAATATTTGTAATATTTTATCCCTCACTTTTCTTTTTGG
ATTTATCTCAGGACTTAAAGTATTCAAATTTGTATATTTTGAAATCGGTA
TCGTACATAAAATTAACATTGCACATTTCTGATTTTATGTTAAGGTATGCC
ATGTTATGTGATTCATCAGATGAAATGTACGGAGATTTTGGAAAGATGTGT
GGATATACTAAAGGCAGCGCACATTGAAGGAGCACAGTTCGGCAAATCAA
AGGTATCAAATCAATCTGTATATACCGAATAAAAATTTCTGAAAAATGATG
TACATTAAAAAAATTATGATAATAAAGAGCGGAATCAGAGATTTAAACC
ATGTTGGTTACAGTGAATGCAACATTGAACCTTTAAAATTTACCATCCTC
ATTTTTAAATGACAAAATAGAAATTGAAAAATGTTTTAAACCGAGTAAAC
TAGTTCACATTAAGAATGACAATTGTTTTGCATAAGCTTTTATTCTGCT
CTTTTTGTAGATCTTCATGAAAAGCTGGGAGAAAGATCTTCTTGAAGAAA
CACTCAGTCGAAAAGGTATGTGACATCTTGTATTTGTTCTATTTACGTAT
GATTTTTTTTATTCTACATAAACATCAATGCAGAAACGTTGATAAAAGAC
CCAATACATAAGACAAACCATTCCATTATTCTTTTTTTATAAACTAAAGT
CAAAATCATAAAGATCATAACACAATAATTACCGTTTCATAAAAGACATC
AATCCTAGTTTTATCTTGACCACGCCAGTATGTATTGACATTATGTTTGG
TGTTTCAGTGACACGGTACGAACAAGCTTTTTTTGTTTACATACATCTACAT
AACAAGAAATTTTTTATCATGAATCACACAGCTATATATTTTTGCATA
TATCAATAAATTAATAAATAATTACAATTCTTTCAGATTGCAGAACAAGAG
CAGAAGAGACAAGAAGAAATAGCAAAACAAGAAGAACAAGAGAATGGA
AGCACTCAGAAGACAGTCTTTAGAGTCTATTATTTCTGCAAAGACAACCTG
ATAG

```

Fig. 3.2.: Teilsequenz von Mg-CS1 auf genomischer DNA

Die Sequenz beinhaltet eine Region niedriger Komplexität und markiert die Region zwischen der Myosindomäne und der Chitinsynthesedomäne. Die Introns wurden durch die Erkennungssequenzen **AGGTAT** an ihrem 5'-Ende und **(T)AG(G)** an ihrem 3'-Ende identifiziert. Die Exons wurden grau unterlegt.

3.1.2. Phylogenetische Analyse der Myosindomäne der Ar-CS1

Die Myosindomänen der Ar-CS1 und der Pf-Chs1 sind zu 75% identisch, die Myosindomänen der Ar-CS1 und der Mg-CS1 nur zu 68%. Die Myosindomäne der Ar-CS1 zeigt zudem signifikante Ähnlichkeit zu einer unkonventionellen Myosindomäne ScunM aus dem Mantelgewebe der *Mizuhopecten yessoensis* (39% identische Aminosäuren; Expect = $2e^{-140}$) (Hasegawa und Araki, 2002). Auch die mRNA der Mg-CS1 ist im Gewebe nahe der Schale, vermutlich dem Mantelgewebe, lokalisiert (Weiss et al., 2006). Außerdem ist die Myosindomäne der Ar-CS1 ähnlich zu Myosindomänen der Klasse III, beispielsweise Myo3B aus *Mus musculus* (37% identische Aminosäurenreste, Expect = $3e^{-136}$) und Myo3A aus *Danio rerio* (37% identische Aminosäurenreste; Expect = $1e^{-134}$).

Mittels eines phylogenetischen Stammbaums wurde die evolutionäre Beziehung der Myosindomänen der verschiedenen Chitinsynthesen aus Mollusken und aus Pilzen sowie der oben genannten Myosine, die Sequenzähnlichkeiten mit der Myosindomäne aus Ar-CS1 aufweisen, untersucht (s. Fig. 3.3.). Die Myosindomänen der Chitinsynthesen aus Pilzen

wurden in die Klasse XVII gruppiert. Als Chimäre einer Chitinsynthase hat die Myosindomäne der Ar-CS1 zwar eine ähnliche Organisation wie die Myosindomänen der Klasse XVII. Trotzdem sind die Myosindomänen der Molluskenchitinsynthasen in eine eigene Klasse einzureihen (Odronitz und Kollmar, 2007). Phylogenetisch ist die Myosindomäne der Ar-CS1 zu den Myosinen der Klasse III näher verwandt als zu den Myosindomänen der Klasse XVII. Den größten Verwandtschaftsgrad weisen die Myosindomänen der Molluskenchitinsynthasen zu dem Muschelmyosin ScunM auf.

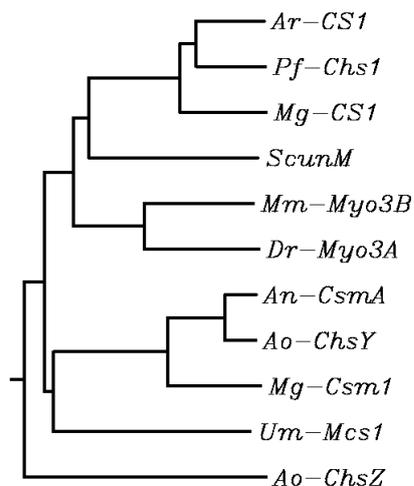


Fig. 3.3.: Phylogenetischer Stammbaum von ausgewählten Myosindomänen

Der NJ Stammbaum wurde mit der NJ Methode mit dem Programm clustalw erstellt.

Für die Erstellung des Stammbaums wurden die Myosindomänen aus den Chitinsynthasen der Mollusken sowie aus den Pilzen herangezogen. Zudem wurden die Sequenzen von drei Myosindomänen einbezogen, die hohe Ähnlichkeit zur Myosindomäne der Ar-CS1 aufweisen. (Acc. No. von An-CsmA, Ao-ChsY, Mg-Csm1, Um-Mcs1 und Ao-ChsZ: s. Fig. 3.1.; Acc. No. von ScunM: AB057425; Acc. No. von Mm-Myo3B: NM_177376; Acc. No. von Dr-Myo3A: NP_991142).

3.2. Klonierung der Myosindomäne der Ar-CS1 und Klonierung der Ar-CS1

3.2.1. Klonierung der Myosindomäne mit und ohne Region niedriger Komplexität in pBluescript II SK (-) und in Expressionsvektoren pQE-70 sowie pDXA-Vektoren

Ziel dieses Projektes war es, die Myosindomäne der Mollusken-Chitinsynthase in löslicher Form, also ohne die transmembrane Chitinsynthasedomäne, in ein geeignetes Expressionssystem zu klonieren. Aufgrund der Sequenzierung der Ar-CS1 waren 21 verschiedene Plasmide mit Teilfragmenten der Myosindomäne vorhanden (s. 2.1.7.). Diese Fragmente überlappen sich teilweise und unterscheiden sich in einzelnen Nukleotiden. Um ein größeres DNA-Fragment zu erhalten und um die Nukleotidaustausche nochmals zu

überprüfen, wurden PCRs auf DNA aus einer λ ZAP II-Phagen-Genbank der *Atrina rigida* durchgeführt. Diese Strategie wurde verworfen, nachdem trotz verschiedener Variationen der PCR-Bedingungen wie verschiedenen Oligonukleotiden, Matrizenkonzentrationen und annealing-Temperaturen in einer Touch-Down-PCR kein Fragment amplifiziert werden konnte.

Deshalb wurden die vorhandenen DNA-Fragmente miteinander verglichen und die Nukleotidaustausche auf Mutationen hin überprüft. An 19 Stellen käme es aufgrund des Nukleotidaustauschs zu einer Punktmutation. Bei diesen Stellen wurde immer das Nukleotid ausgewählt, das am häufigsten vorkommt. Nur an Position 1353 ist statistisch nicht eindeutig, welches Nukleotid das richtige ist. Aufgrund des Sequenzierungschromatogramms wurde das Cytosin und damit Leucin ausgewählt (s. Fig.3.4.).

Für die Klonierung der gesamten Myosindomäne wurden die Plasmide pCHS-NP6.4/32, pCHS-NP5.5/45, pCHS-NP4.3/2, pCHS-NP3.6/54, pCHS3_500/2 und pCHS-NP50, die zu keinen Aminosäuresubstitutionen führen, ausgewählt. Die Myosindomäne, deren Leserahmen von Nukleotid 168 bis Nukleotid 2423 reicht, wurde in mehreren PCR-Schritten zusammengefügt. Die ausgewählten Fragmente jedes Plasmids wurden mit überlappenden Primern amplifiziert. In einer zweiten Runde wurden über PCR jeweils die erhaltenen Fragmente von pCHS-NP6.4/32 und pCHS-NP5.5/45, von pCHS-NP4.3/2 und pCHS-NP3.6/54 sowie von pCHS3_500/2 und pCHS-NP50 zusammengefügt. Dabei fungierten in jedem Ansatz als Primer die Überlappungssequenzen der beiden Fragmente sowie die zugegebenen Oligonukleotide am 5'-Ende des 5'-Fragments sowie am 3'-Ende des 3'-Fragments. In einer dritten Runde wurden entsprechend zwei DNA-Fragmente aus der zweiten Runde zusammengefügt: das Fragment aus pCHS-NP4.3/2 und pCHS-NP3.6/54 wurde an das Fragment aus pCHS3_500/2 und pCHS-NP50 gefügt. Das aus dieser PCR resultierende DNA-Fragment wurde an das DNA-Fragment aus pCHS-NP6.4/32 und pCHS-NP5.5/45 mittels analoger PCR gefügt. In das erhaltene Fragment wurden über Oligonukleotide am 5'-Ende eine Sph I-Schnittstelle und das Startcodon im Leseraster und am 3'-Ende eine BamH I-Schnittstelle eingeführt. Es wurde in pBluescript II SK (-) kloniert und mittels Sequenzierung überprüft.

Als Expressionsvektoren wurden Vektoren gewählt, die einen C-terminalen Affinitätstag codieren. Für eine optimale Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden pQE-70 sowie pDXA-3H mit C-terminalem His-Tag gewählt. Außerdem wurde der Vektor pDXA-mcs-YFP gewählt, da die Myosindomäne mit einem YFP-tag für Experimente im Fluoreszenzmikroskop wie den *in vitro* motility assay direkt einsetzbar ist.

Zunächst sollte die Myosindomäne rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. Dazu wurde die Myosindomäne in den Expressionsvektor pQE-70 über die eingeführten Schnittstellen Sph I und BamH I kloniert. Für die Klonierung in die Expressionsvektoren pDXA-3H sowie pDXA-

mcs-YFP von *D. discoideum* wurden mittels PCR mit den Oligonukleotiden Vr_MA_pDXA_for und Vr_MA_pDXA_rev am 5'-Ende bzw. am 3'-Ende die Schnittstellen Kpn I bzw. Xho I eingeführt. Die Ligation wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Die Expression der rekombinanten Proteine kann bei *D. discoideum* um das 4-5 fache gesteigert werden, wenn die ersten 5-17 Codons nach der statistischen Codonhäufigkeit optimiert sind (Vervoort et al., 2000). Bei den rekombinanten Myosindomänen der Ar-CS1 und bei der rekombinanten Ar-CS1-YFP sind die ersten sieben Codons bereits die in *D. discoideum* statistisch bevorzugten. Daher wurde keine weitere Optimierung der Codons vorgenommen.

Um untersuchen zu können, ob die Myosindomäne der Ar-CS1 über die Region niedriger Komplexität aggregiert, wurde die Myosindomäne auch ohne diese Region kloniert. Dazu wurde mit den Oligonukleotiden Vr_MMDAt_SacI_for und Vr_MMDAt_pDXA_rev ein Fragment der Myosindomäne von bp 1545 bis bp 2197 amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment enthielt am 5'-Ende die Sac I-Schnittstelle und am 3'-Ende wurde die Xho I-Schnittstelle der mutiple cloning site der pDXA-Vektoren eingeführt. Es wurde in den pBluescript II SK (-) zwischenkloniert und mittels Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das Fragment über die Schnittstellen von Sac I und Xho I in Vr_MDAtdi_H81 und in Vr_MDAtdi_Y36, aus denen zuvor mit denselben Restriktionsenzymen das entsprechende Fragment sowie die Region niedriger Komplexität herausgeschnitten wurden, ligiert. Die Ligationstellen wurden zur Überprüfung sequenziert.

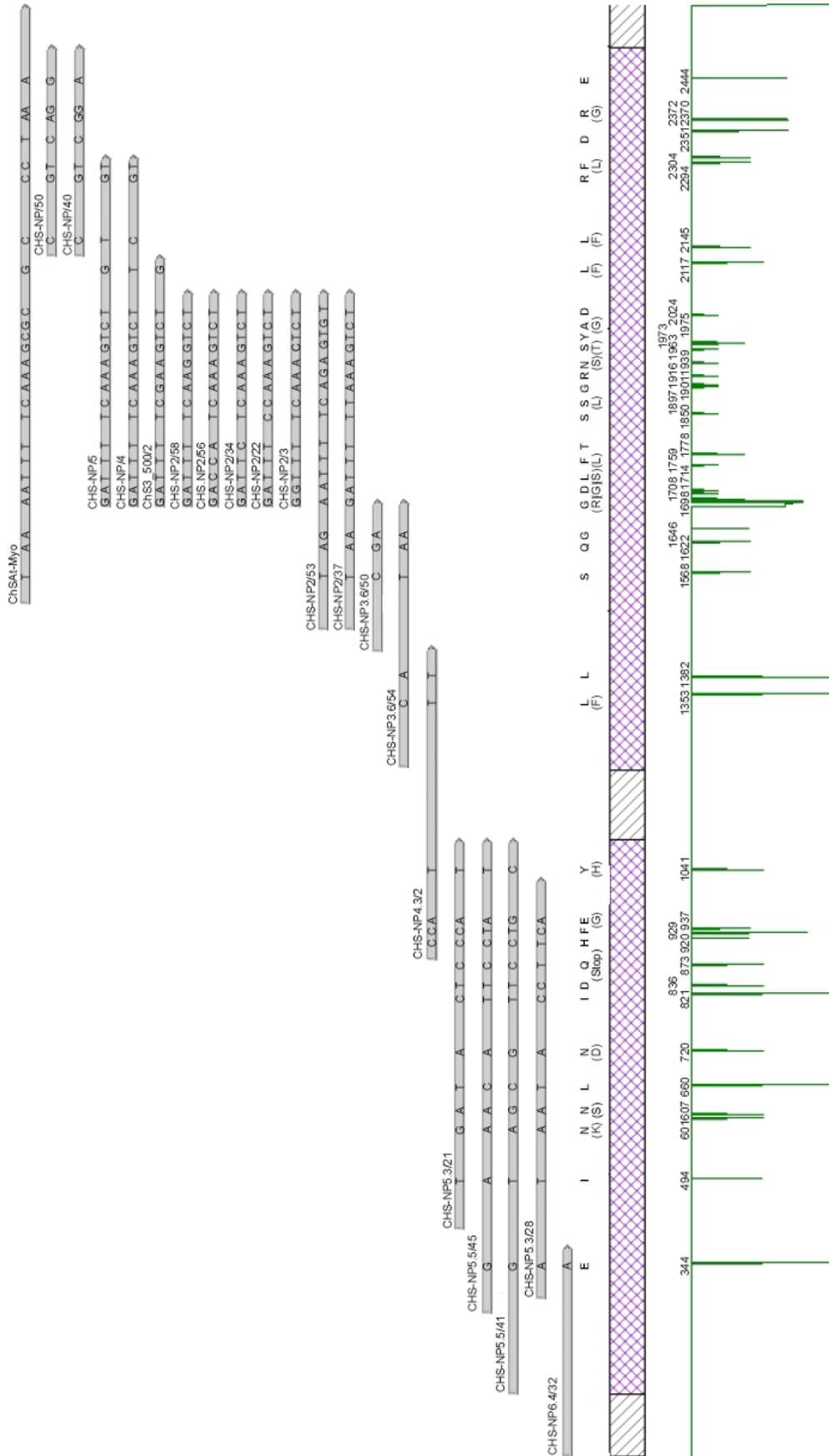


Fig. 3.4.: DNA-Fragmente aus der Sequenzierung der Ar-CS1. Die Fragmente, die teilweise überlappen, wurden miteinander verglichen und auf die 21 DNA-Fragmente bezogen. Die Positionen von Nucleotidaustauschen sind durch Linien markiert. Die Länge der Linien entspricht dem prozentualen Anteil der Mutationen hin untersucht. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die gesamte Sequenz. Der Leseramen der Myosindomäne der Ar-CS1 einschließlich der Region niedriger Komplexität reicht von Nucleotid 168 bis Nucleotid 2423. Die Nucleotide an Stellen mit möglicher Substitution sind jeweils innerhalb der Fragmente eingezeichnet. Die entsprechende Aminosäure ist angegeben. Bei möglicher Punktmutation stehen die abweichenden Aminosäuren in Klammern.

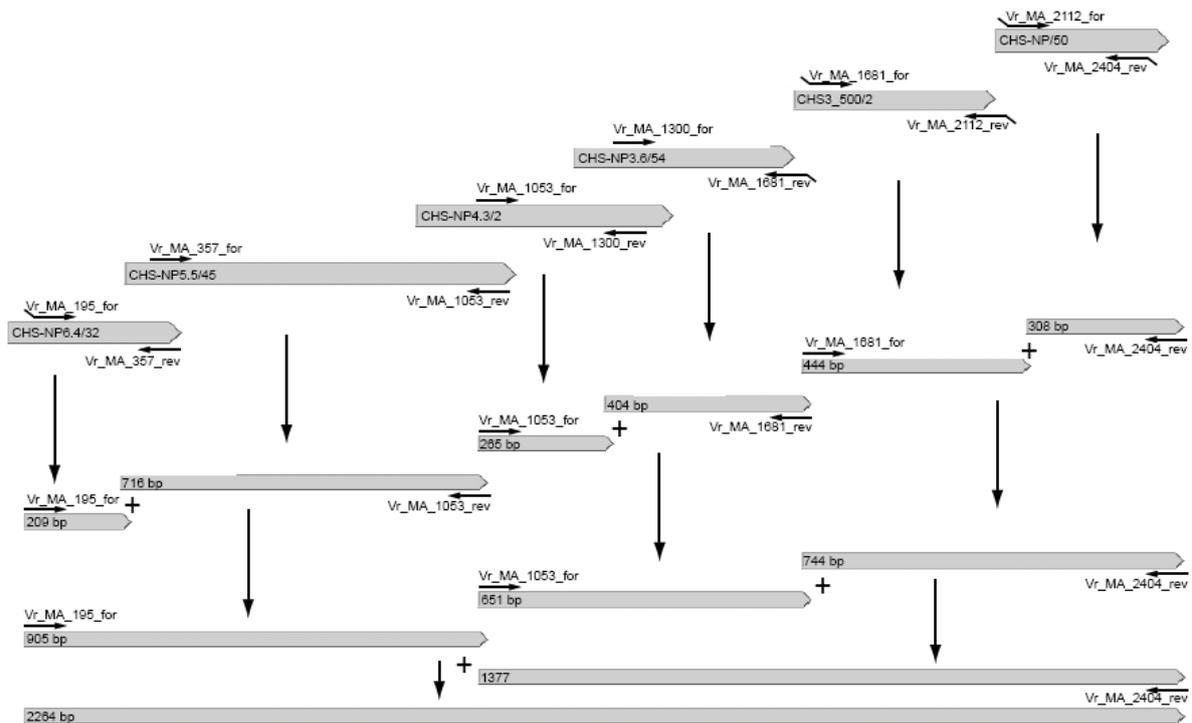


Fig. 3.5.: Klonierungsstrategie der Myosindomäne der Ar-CS1

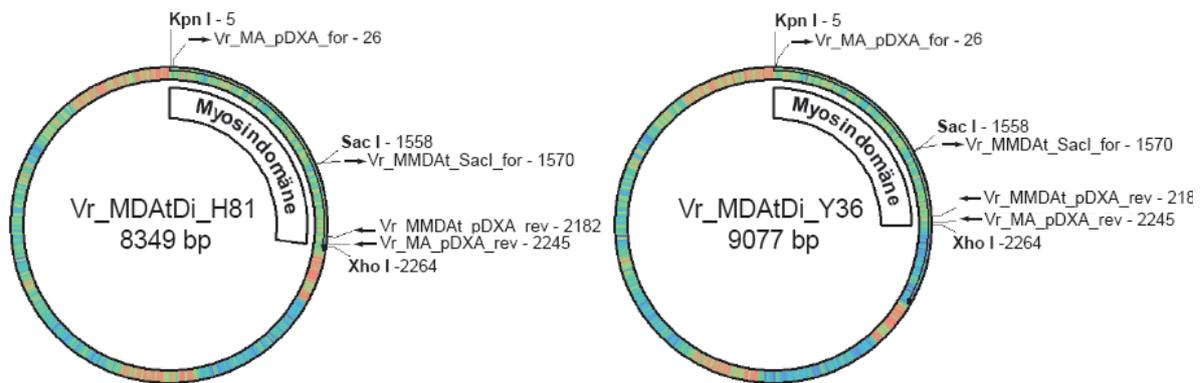


Fig. 3.6.: Vektorkarten von Vr_MDAtdi_H81 und Vr_MDAtdi_Y36

3.2.2. Ortsspezifische Mutagenese der Regulationsstelle in der Myosindomäne der Ar-CS1

In Myosindomänen gibt es zur Regulation der Aktivität eine Phosphorylierungsstelle, die über die so genannte TEDS-Regel erkannt werden kann (Bement und Mooseker, 1995). Die Erkennungssequenz lautet DALAK und an Position -16 ist an der Regulationsstelle Serin, Threonin, Aspartat bzw. Glutamat zu finden. Es ist nicht bekannt, ob Aspartat und Glutamat die negative Ladung des Phosphats nachahmen oder selbst phosphoryliert werden können. In den Myosindomänen der Ar-CS1, Mg-CS1 sowie der Pf-ChS1 ist eine solche Regulationsstelle zu finden:

Ar-CS1 314 ISNVNTIKGEKIQSWKSLREANDSRDALAK
Pf-CHS1 314 ISNVSNIKGEKIQSWKSLREANDSRDALAK
Mg-CS1 314 ISNVNYIKGERIQSWKNFRDANNSRDALAK

Um die Regulationsstelle näher untersuchen zu können, wurde das Glutamat (GAG) an Position 323 durch Serin (TCA) sowie durch Alanin (GCA) ausgetauscht. In einer ersten PCR wurde die Myosindomäne jeweils in zwei Fragmenten mit den Oligonukleotiden Vr_MA_pDXA_for und MDA_t_E323A_rev bzw. MDA_t_E323S_rev sowie mit MDA_t_E323A_for bzw. MDA_t_E323S_for und Vr_MA_pDXA_rev amplifiziert. Dabei sind die Oligonukleotide, die die jeweilige Punktmutation einführen, komplementär zueinander, so dass die beiden in der ersten PCR erhaltenen Fragmente in einer zweiten PCR mit den Oligonukleotiden Vr_MA_pDXA_for und Vr_MA_pDXA_rev jeweils verknüpft werden konnten. Die beiden Fragmente wurden in pBluescript II SK (-) zwischenkloniert und mittels Sequenzierung überprüft. Anschließend wurden die Myosindomänen mit den Punktmutationen über die Kpn I-Schnittstelle und die Xho I-Schnittstellen in pDXA-3H sowie in pDXA-mcs-YFP kloniert. Mittels Sequenzierung wurde die Ligation über die Restriktionsschnittstellen nochmals überprüft.

3.2.3. Klonierung der Ar-CS1 in pDXA-mcs-YFP

Ziel dieses Projektes war es, die Chitinsynthase Ar-CS1 als komplettes, transmembranes Protein mit intrazellulärer Myosindomäne heterolog in *D. discoideum* zu exprimieren. Ausgangsplasmide für die Klonierung waren pCHS-up1/1.1, pCHS-up1/5.1 und Vr_MDA_tDi_Y36. Das 3'-Ende der Ar-CS1 (bp 5236 – 6871 bp) wurde mittels PCR auf dem Plasmid pCHS-up1/1.1 mit den Oligonukleotiden CHSA_t_Bam_for und CHSA_t_XS_rev amplifiziert. Mit den Oligonukleotiden wurden am 5'-Ende die Schnittstelle BamH I und am 3'-Ende die Schnittstellen Xho I und Sac I eingeführt. Das Fragment wurde in pBluescript II SK (-) ligiert, wobei das resultierende Plasmid als pCHSA_t-BS/5 bezeichnet wurde. Das Insert wurde zur Kontrolle sequenziert. Das 5'-Ende der Chitinsynthasedomäne einschließlich eines Teils der Myosindomäne (2219 bp - 5236 bp) wurde aus dem Plasmid pCHS-up 1/5.1 herausgeschnitten. Bei einem sofortigen Verdau mit BamH I und Hind III hätte das gewünschte Fragment nicht von den anderen entstehenden Fragmenten getrennt werden können. Deshalb wurde zunächst mit den Restriktionsenzymen BamH I und Sca I geschnitten und das gereinigte Fragment (3,7 kbp) wurde anschließend nochmals mit Hind III geschnitten. Über die eingeführten Schnittstellen konnte das Fragment in das zuvor mit denselben Restriktionsenzymen linearisierte Plasmid pCHSA_t-BS/5 eingeführt werden. Das

erhaltene Plasmid pCHSA_t-HX/4 wurde zur Überprüfung der Ligation über die Schnittstellen sequenziert. Um die Chitinsynthesesequenz zu vervollständigen und die Sequenz in den Expressionsvektor pDXA-mcs-YFP zu ligieren, wurde die Chitinsynthesesequenz aus dem Plasmid pCHSA_t-HX/4 in zwei Schritten in den Expressionsvektor mit der Myosindomäne Vr_MDA_tDi_Y36 (s. 3.2.1) kloniert. Im ersten Schritt wurden die beiden Plasmide mit Xho I und Hind III geschnitten. Dabei entstand bei dem Plasmid Vr_MDA_tDi_Y36 ein 6,8 kbp-Fragment mit einer Hind III- und einer Xho I-Schnittstelle und ein 2,2 kbp-Fragment mit Hind III Schnittstellen. Aus pCHSA_t-HX/4 wurde die Chitinsynthesesequenz herausgeschnitten, die über die Xho I- und Hind III-Schnittstellen mit dem 6,8 kbp-Fragment ligiert wurde, wobei das Plasmid Vr_CHSA_t_2 entstand. Dieses wurde nach Überprüfung mit dem Restriktionsenzym Hind III linearisiert und mit dem 2,2 kbp-Fragment aus Vr_MDA_tDi_Y36 ligiert. Mittels Sequenzierung wurde in dem neu entstandenen Plasmid Vr_CHSA_tDi_7 (13,7 kb) die richtige Orientierung der kompletten Ar-CS1 (6,9 kb) verifiziert. Vr_CHSA_tDi_7 stellt somit das erste auf dem Vektor pDXA-mcs-YFP basierende heterologe Expressionssystem für die transmembrane Myosin-Chitinsynthase der Mollusken dar.

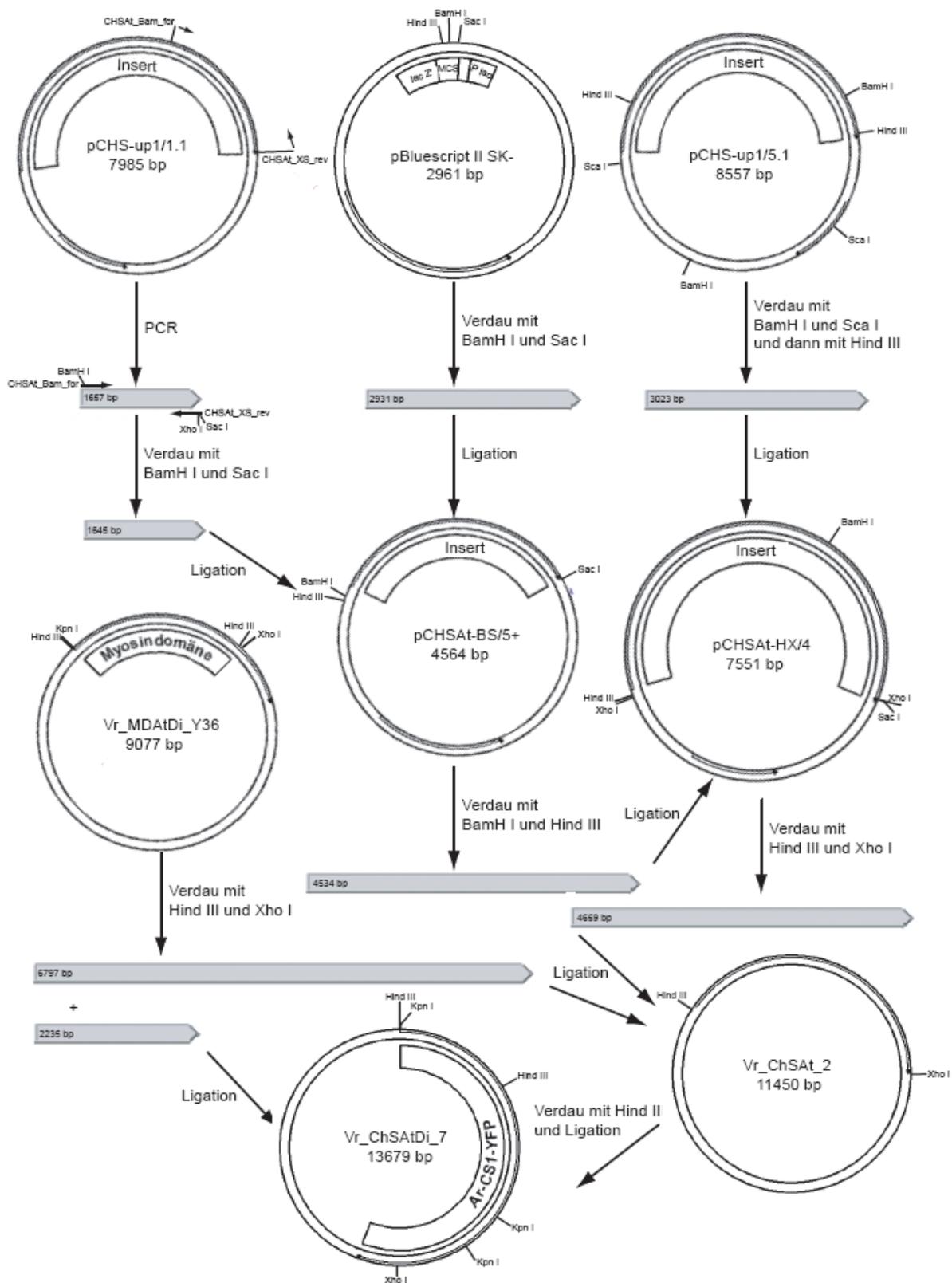


Fig. 3.7.: Klonierungsstrategie für das Plasmid Vr_ChSATdi_7 zur Expression der vollständigen Ar-CS1-YFP

3.3. Zelllinien mit Varianten der Myosindomänen der Ar-CS1

3.3.1. Generierung und Selektion von *D. discoideum*-Zelllinien für die Expression der Myosindomäne der Ar-CS1

D. discoideum wurde als Expressionssystem neu im Labor eingeführt. Dabei konnte bei der Etablierung der Zellkultur und der molekularbiologischen Methoden auf veröffentlichte Protokolle zurückgegriffen werden (<http://dictybase.org/>; Sussman, 1987).

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene axenisch wachsende Stämme, Ax3-orf+ und dcsA-, verwendet. Der Ax3-orf+ Stamm trägt integrierte Kopien, des Ddp2 ORF Gens, das als *trans*-wirkender Faktor die extrachromosomale Replikation von Plasmiden ermöglicht, die einen *cis*-wirkenden *ori*, wie den Ddp2 *ori*, tragen (Leiting et al., 1990, Manstein et al., 1995). Der dcsA- Stamm kann aufgrund einer Nullmutation in dem Cellulosesynthasegen *dcsA* keine Cellulose synthetisieren (Blanton et al., 2000).

Als Transformationstechniken wurden die Transformationen mit „particle gun“ (Wetterauer et al.; 2000), mit kationischen Polymeren, mit Ca²⁺-Phosphat-gefällter DNA (Nellen et al., 1984) und mit Elektroporation (Howard et al., 1988; Knecht und Pang, 1995) getestet. Nur die beiden zuletzt aufgeführten Methoden waren erfolgreich. Die Elektroporation wurde als Standardmethode gewählt, da ihre Effizienz am höchsten war. Bei der chemischen Transformation (s. 2.2.2.9.) waren in der Regel 50-100 Kolonien zu sehen, bei der Elektroporation (s. 2.2.2.10.) wurden etwa 200-300 Kolonien erhalten.

Es wurden acht verschiedene Zelllinien hergestellt: MMD-H81 und MMD-Y36 (Myosindomäne der Ar-CS1 mit Region niedriger Komplexität), 3H-MA-LC und YFP-MA-LC (Myosindomäne der Ar-CS1 ohne Region niedriger Komplexität), 3H-MA-S und YFP-MA-S (Myosindomäne der Ar-CS1 mit ortsspezifischer Mutation E323S) sowie 3H-MA-A und YFP-MA-A (Myosindomäne der Ar-CS1 mit ortsspezifischer Mutation E323A) (s. 2.1.5.3.).

Nach der Transformation wurde zu den Zellen in Petrischalen erst nach etwa 12 Stunden 10-20 µg/ml G418 zur Selektion zugegeben. Nicht adhärente, z.B. tote Zellen, konnten durch Schwenken der Petrischale vor dem Mediumwechsel entfernt werden (s. 2.2.2.9.). Nach etwa einer Woche waren Kolonien zu sehen. Alternative Methoden, Einzelkolonien zu erhalten, sind die Kultivierung der Transformanten in Gegenwart von mit Hitze getöteten Bakterien, das Ausplattieren der Transformanten in Soft Agarose mit G418 bzw. auf SM-Platten zusammen mit *Klebsiella aerogenes*. Diese Protokolle wurden erfolglos getestet.

Bei *D. discoideum* ist entscheidend, bei einer Transformation erhaltenene Einzelkolonien bezüglich der Expression der rekombinanten Proteine zu überprüfen, da das Expressionsniveau unterschiedlich sein kann. Es wurden mehrere Auswahlverfahren durchgeführt.

Meistens wurden pro Transformation 48 Kolonien vereinzelt (s. 2.2.2.9.). Von diesen wurden etwa 24 Klone getestet, sobald die Zellkulturen eine ausreichende Zelldichte erreicht hatten. Mittels Kolonie-PCR (s. 2.2.2.6.3.) wurde eine Vorauswahl der Klone getroffen. Eine Aussage über das Expressionsniveau liefert diese Methode jedoch nicht. Mehr als 70% der getesteten Klone lieferten in einer Kolonie-PCR ein Produkt erwarteter Größe.

Zur Abschätzung des Expressionsniveaus wurde bei den Klonen mit YFP-getaggten Myosindomänen der Ar-CS1 direkt die Fluoreszenz des YFP-Tags mit dem konfokalen Mikroskop detektiert (s. 2.2.7.1.). Das Verhalten der Zellen wurde durch die rekombinanten Myosindomänen der Ar-CS1 nicht beeinflusst. Sie konnten sich durch Ausbildung von Filopodien fortbewegen (s. Fig. 3.8. A und B). Bei ein bis drei Klonen von 24 Klonen fluoreszierten über 90% der Zellen (s. Fig. 3.8. C und D). Innerhalb einer solchen gut exprimierenden Zelllinie war bei den einzelnen Zellen das Fluoreszenzsignal unterschiedlich intensiv. Bei einzelnen Zelllinien kam es auch zum Verlust der Expression. Die Zelllinien konnten stabil gehalten werden, solange die Zelldichte zwischen $5 \cdot 10^5$ und $8 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt wurde.

Die Expression von Zelllinien mit His-getaggten Myosindomänen der Ar-CS1 wurde mittels Immunfluoreszenz (s. 2.2.4.) überprüft. Als primärer Antikörper wurde der anti-(His)₆-tag (dianova; DIA 900) und als sekundärer Antikörper der Cy3TM-konjugierte anti-Maus-Antikörper (dianova; 115-165-146) verwendet (s. 2.1.2.). Die Fluoreszenzsignale wurden mit dem konfokalen Mikroskop detektiert. Als Negativkontrolle wurden Ax3orf+ Zellen mit beiden Antikörpern und Ax3orf+ Zellen sowie Zellen der zu testenden Zelllinie nur mit sekundärem Antikörper behandelt. Am konfokalen Mikroskop wurde bei diesen Proben der „detector gain“ so reguliert, dass kein Fluoreszenzsignal detektiert wurde.

Bei den stabilen Zelllinien mit His-getaggten Myosindomänen der Ar-CS1 fluoreszieren über 90% der Zellen. Das über die gesamte Zelle verteilte Fluoreszenzsignal ist nicht bei allen Zellen gleich intensiv. Die Varianten der Ar-CS1-Myosindomäne unterscheiden sich nicht signifikant bezüglich der Proteinverteilung in der Zelle. Die Myosindomänen der Ar-CS1 scheinen jedoch nicht immer homogen gelöst vorzuliegen, sondern können mikroskopisch sichtbare Aggregate bilden. Bei der Zelllinie 3H-MA-LC sind diese Aggregate besonders ausgeprägt. An manchen Stellen innerhalb der Zelle liegen die Myosindomänen der Ar-CS1 bzw. deren Aggregate dicht konzentriert vor. Dieses Verhalten war bei der Zelllinie 3H-MA-LC seltener zu beobachten (s. Fig. 3.9.).

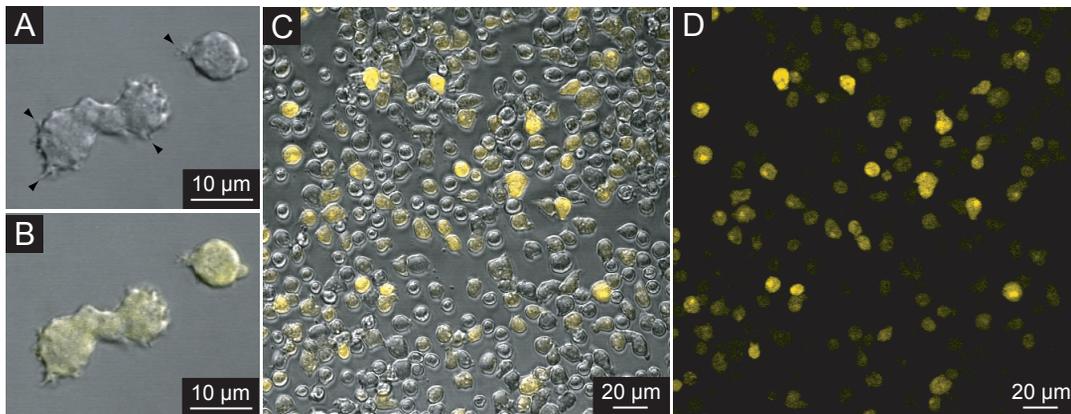


Fig. 3.8.: Auswahl klonaler Zelllinien mit YFP-getaggtten Myosindomänen der Ar-CS1 mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Bilder der lebenden Zellen wurden mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen. **(A)** Die drei abgebildeten Zellen der Zelllinie MMD-Y36 bilden Filopodien (Pfeilspitzen) aus. **(B)** Hier sind die Zellen in der Überlagerung des DIC- und des Fluoreszenzkanals gezeigt. Das Fluoreszenzsignal des YFP-Tags ist gelb dargestellt. In dieser Überlagerung des DIC- und des Fluoreszenzkanals ist die Zelllinie YFP-MA-A gezeigt. Bei über 90% der Zellen wird ein Fluoreszenzsignal unterschiedlicher Intensität detektiert. In Bild **(C)** ist nur der Fluoreszenzkanal dargestellt.

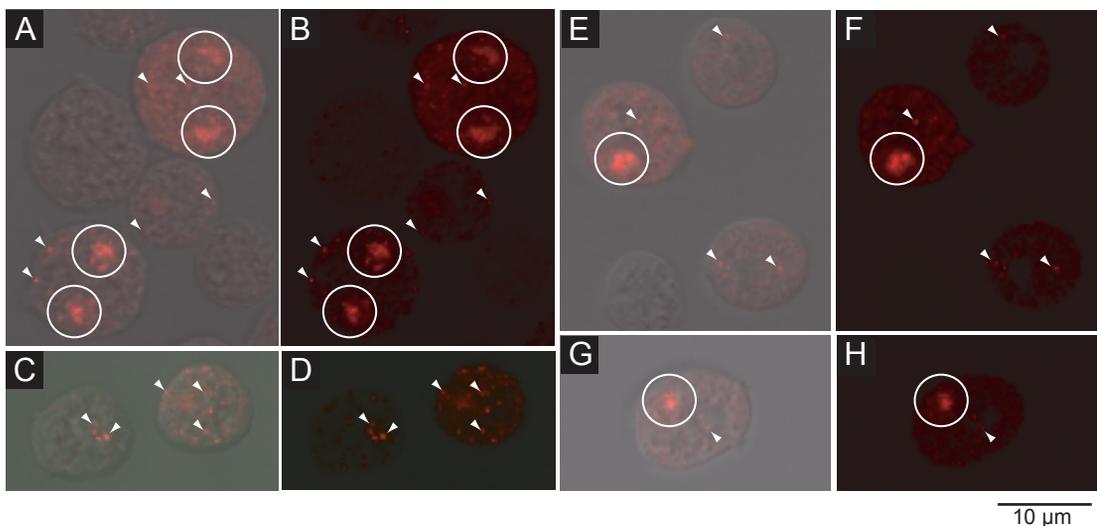


Fig. 3.9.: Auswahl klonaler Zelllinien mit His-getaggtten Myosindomänen mittels Immunfluoreszenz
Die Einstellungen wurden so gewählt, dass bei den Negativkontrollen kein Fluoreszenzsignal detektiert wurde. Das Fluoreszenzsignal ist rot dargestellt. In den Bildern **(A)/(B)** sind Zellen der Zelllinie MMD-H81, in **(C)/(D)** Zellen der Zelllinie 3H-MA-LC, in **(E)/(F)** Zellen der Zelllinie 3H-MA-S und in **(G)/(H)** Zellen der Zelllinie 3H-MA-A dargestellt. Die verschiedenen Zelllinien unterscheiden sich nicht signifikant in der Verteilung des Fluoreszenzsignals. Die Varianten der Myosindomänen der Ar-CS1 liegen zum Teil in mikroskopisch sichtbaren Aggregaten (Pfeilspitzen) delokalisiert bzw. über die ganze Zelle verteilt vor. Zusätzlich sind stellenweise dichtere Ansammlungen des heterolog exprimierten Proteins zu beobachten (Kreise).

Mittels dem von Manstein und Hunt (1995) entwickelten analytischen Extraktionsverfahren (s. 2.2.8.2.) wurde das Expressionsniveau der Myosindomänen der Ar-CS1 in *D. discoideum* abgeschätzt. Zudem konnten Aussagen über das Verhalten der Myosindomänen der Ar-CS1 in der Zelle getroffen werden. Für den Test wurden $4\text{-}5\cdot 10^7$ Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren lysiert und dann abzentrifugiert. In diesem Überstand befindet sich das Myosin, das nicht gut an das Aktinpellet bindet. Das Pellet mit den Cytoskelettproteinen wurde mit Lysepuffer mit ATP und Mg^{2+} -Ionen behandelt und erneut abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation, der im folgenden Mg^{2+} -ATP-Extrakt genannt wird, enthält Myosin, das von den Aktinfilamenten abgelöst wurde. Im Pellet zurückgebliebenes Myosin bindet entweder sehr stark an Aktin, assoziiert mit Membranen oder liegt aggregiert vor. Der erste Überstand nach Abtrennung der Cytoskelettfraktion, die Extrakte sowie das Pellet nach Extraktion wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Wie in Fig. 3.10. A exemplarisch dargestellt, war sowohl mittels Coomassiefärbung als auch mittels Silberfärbung keine eindeutige Expression der Myosindomänen der Ar-CS1 nachweisbar. Die Bandenmuster der untersuchten 24 MMD-Y36- und 26 MMD-H81-Zelllinien unterschieden sich nicht signifikant von dem Bandenmuster des Ax3-orf+ Wildtyps. Die Banden bei 220 kDa, die der Größe von Myosin aus *D. discoideum* entsprechen, sind sowohl in den Volllysaten nach der Abtrennung der Cytoskelettfraktion als auch in den Mg^{2+} -ATP-Extrakten zu sehen. Mit dem analytischen Extraktionsverfahren konnten Myosine also prinzipiell nachgewiesen werden.

Mittels Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen den His-Tag bzw. den YFP-Tag konnten die Myosindomänen der Ar-CS1 in allen Fraktionen des Testverfahrens nachgewiesen werden (s. Fig. 3.10. B und C). Die Banden waren in Höhe der erwarteten Größen (MMD-H81: 90 kDa; MMD-Y36: 115 kDa). Die Proben des analytischen Extraktionsverfahrens mit Ax3-orf+ Zellen zeigten im Westernblot keine Banden.

Die Proteinmengen auf dem Westernblot wurden abgeschätzt (s. 2.2.3.7.) und auf die Gesamtmenge hochgerechnet.

	Überstand (1,2 ml)	Extrakt (40 μ l)	Pellet (40 μ l)
MMD-Y36	6600 ng	40 ng	140 ng
MMD-H81 (1D1)	2600 ng	10 ng	130 ng
MMD-H81 (2D1)	4000 ng	130 ng	145 ng

95% der Myosindomänen der Ar-CS1 befanden sich im Volllysate nach dem Abzentrifugieren der Cytoskelettfraktion. Von den in der Cytoskelettfraktion verbliebenen 5% der Myosindomänen der Ar-CS1 konnten 10-50% wieder aus dem Pellet abgelöst werden.

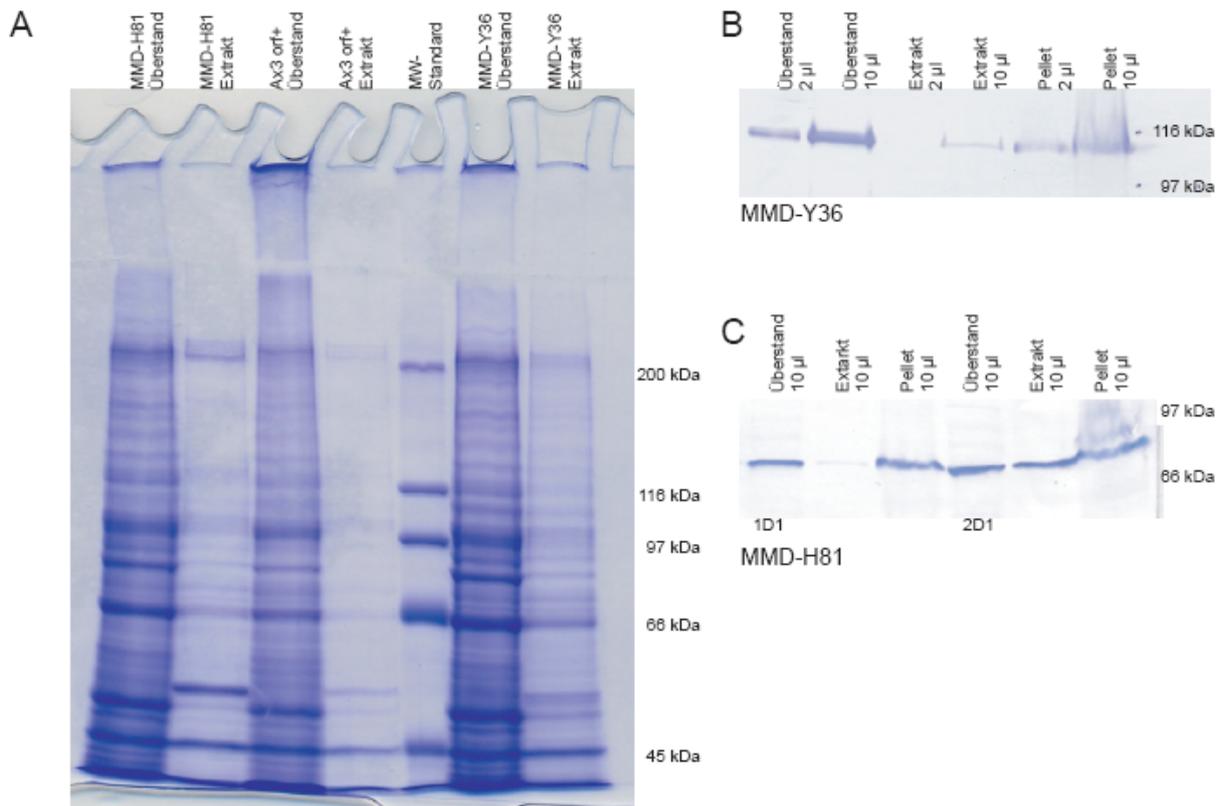


Fig. 3.10.: Proteinverteilung nach Elektrophorese von Volllysaten nach Abtrennung der Cytoskelettfractionen (Überstand) und von Mg^{2+} -ATP-Extrakten der Cytoskelettfractionen auf 7%-Polyacrylamidgelen

(A) Die Zelllinien MMD-H81 und MMD-Y36 sowie Ax3-orf+ Zellen wurden mit dem analytischen Extraktionsverfahren untersucht. Auf dem mit Coomassie gefärbten Gel wurde jeweils 10 µl Probe analysiert. MMD-H81 (90 kDa) und von MMD-YFP (115 kDa) sind nicht nachweisbar. Bei den Banden bei 220 kDa handelt es sich um Myosin aus *D. discoideum* und bei 45 kDa um Aktin. **(B)** Westernblot mit anti-GFP-tag gegen MMD-Y36. Es wurden jeweils 2 µl bzw. 10 µl Probe analysiert. **(C)** Westernblot mit anti-(His)₆-tag gegen MMD-H81. Hier wurden zwei verschiedene Zelllinien 1D1 und 2D1 analysiert. Es wurden jeweils 10 µl Probe aufgetragen.

Klone jeder Zelllinie wurden nach den beschriebenen Testverfahren überprüft. Von jeweils zwei Klonen mit sehr gutem Expressionsniveau wurden Sporen hergestellt (s. 2.2.1.3.2.).

Die Sporen jeder Zelllinie waren keimfähig. Zudem waren die aus Sporen erhaltenen Amöben erneut zur Expression der rekombinanten Myosindomänen befähigt. Die stabilen Zelllinien wurden laufend frisch aus Sporen angezogen. In Schüttelkultur betrug die Verdopplungszeit der Zelllinien mit Myosindomäne der Ar-CS1 zwischen 18-26 Stunden, bei Ax3orf+ Zellen zwischen 8-12 Stunden.

3.3.2. Untersuchung der Kolokalisation der Myosindomäne der Ar-CS1 mit Aktin innerhalb der *D. discoideum*-Zellen

Mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Immunfluoreszenz-basierten Methodik für die Selektion von Zelllinien (s. 2.2.4.) wurde untersucht, ob die Myosindomänen der Ar-CS1 in den *D. discoideum*-Zellen mit den Aktinfilamenten wechselwirken.

Die fixierten *D. discoideum*-Zellen wurden mit einem anti-GFP-Tag-Antikörper aus Kaninchen (Dianova, PA1-980A), der ein Epitop des YFP-Tags erkennt, und mit einem anti-Aktin-Antikörper aus Maus (Dianova; DLN-07273) behandelt. Als sekundäre Antikörper wurden der Alexa Fluor® 488 anti-Kaninchen-Antikörper (Invitrogen, A11008) und der Cy3™-konjugierte anti-Maus-Antikörper (Dianova, 115-165-146) verwendet. Ax3 orf + Zellen und die transformierten Zelllinien wurden zur Kontrolle nur mit den sekundären Antikörpern gefärbt. Mit diesen Proben wurden bei der Messung am konfokalen Mikroskop (s. 2.2.7.1.) die „detector gains“ beider Fluoreszenzkanäle so eingestellt, dass kein Fluoreszenzsignal detektiert wurde. Als weitere Kontrolle wurden Ax3orf+ Zellen mit den vier oben genannten Antikörpern behandelt. Mit dieser Probe wurden am konfokalen Mikroskop die „detector gains“ so reguliert, dass das Fluoreszenzsignal des Farbstoffes Cy3 ausschließlich im „Cy3-Kanal“ detektiert wurde.

Die YFP-getaggten Myosindomänen der Ar-CS1 und die His-getaggten Myosindomänen unterscheiden sich nicht in der Proteinverteilung (vgl. Fig. 3.9. und 3.11.). Die Myosindomänen der Ar-CS1 bilden mikroskopisch sichtbare Aggregate, die über die gesamte Zelle verteilt sind. An einzelnen Stellen sammeln sich die Myosindomänen dicht konzentriert an. Aktin ist in der gesamten Zelle verteilt. Die Aktinfilamente liegen vorwiegend am Zellrand, dem Zellcortex, vor. Am Zellcortex ist keine Myosindomäne der Ar-CS1 nachweisbar. Innerhalb der Zelle sind die aggregiert erscheinenden Myosindomänen der Ar-CS1 mit Aktin kolokalisiert. An den Stellen, an denen die Myosindomäne der Ar-CS1 etwas höher konzentriert vorliegt, ist eine Kolokalisation mit Aktin nicht auszuschließen. An einigen dieser Stellen lag jedoch definitiv kein Aktin vor (s. Fig. 3.11.). Die verschiedenen Zelllinien MMD-Y36, YFP-MA-LC, YFP-MA-A und YFP-MA-S unterscheiden sich nicht signifikant in der Proteinverteilung des Aktins und der Myosindomänen der Ar-CS1.

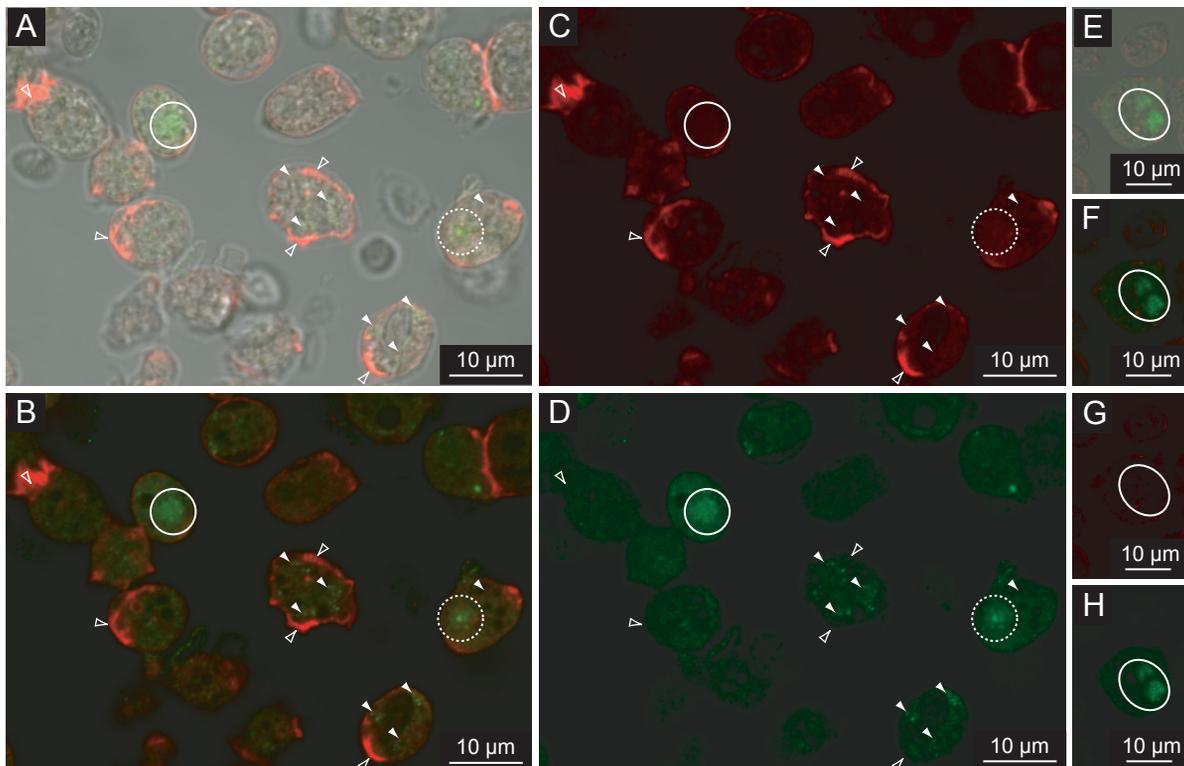


Fig 3.11.: Untersuchung der Proteinverteilung von YFP-getaggten Myosindomänen der Ar-CS1 und Aktin in den *D. discoideum*-Zellen

Zellen der Zelllinie MMD-Y36 **(A)-(D)** und der Zelllinie 3H-MA-LC **(E)-(H)** wurden mittels Immunfluoreszenz untersucht. Das rotgefärbte Signal des Cy3-Kanals repräsentiert Aktin und das grüngefärbte Signal des AlexaFluor 488-Kanals repräsentiert YFP-getaggtete Myosindomänen der Ar-CS1. Die überlagerten Bilder aus dem DIC-Kanal und den beiden Fluoreszenzkanälen **(A)/(E)**, die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle **(B)/(F)**, der Kanal, bei dem Fluoreszenz von Cy3 detektiert wurde **(C)/(G)** und der Kanal, bei dem das Signal von Alexa Fluor® 488 detektiert wurde **(D)/(H)** sind gezeigt.

Die Myosindomänen der Ar-CS1 sind über die gesamten Zellen verteilt. Aggregiert erscheinende Myosindomänen der Ar-CS1 sind mit Aktin kolokalisiert (Pfeilspitzen). An den Zellrändern, an denen Aktinfilamente mit der Membran wechselwirken, sind keine Myosindomänen der Ar-CS1 nachweisbar (offene Pfeilspitzen). An einigen Stellen liegen die Myosindomänen der Ar-CS1 dicht konzentriert vor. An diesen Stellen wurde in einigen Fällen Aktin nachgewiesen (vgl. Kreis mit gestrichelter Linie), in anderen Fällen jedoch nicht (vgl. Kreis mit durchgezogener Linie).

3.3.3. Aufreinigung der Myosindomänen der Ar-CS1 aus *D. discoideum*-Zellen

Bei dem analytischen Extraktionsverfahren (s. 3.3.1.) befanden sich 95% der Myosindomänen der Ar-CS1 in der löslichen Fraktion, dem Volllysat nach der Abzentrifugation der Cytoskelettfraktion. Generell wird Myosin als funktionell betrachtet, wenn es sich mit ATP und Mg^{2+} -Ionen von der Cytoskelettfraktion extrahieren lässt. Myosindomänen der Ar-CS1 aus der Cytoskelettfraktion ließen sich unter den für *D. discoideum*-Myosin etablierten Extraktionsbedingungen nur zu 10%-50% ablösen.

Um die Gesamtausbeute an Myosindomäne der Ar-CS1 zu steigern, wurde bei der Etablierung der Aufreinigung versucht, die heterolog exprimierte Myosindomäne sowohl aus der löslichen Fraktion als auch aus der Cytoskelettfraktion zu isolieren. In der schematischen Darstellung für die Aufreinigung im präparativen Maßstab (s. Fig. 3.12.) entspricht die lösliche Fraktion dem Überstand aus der Ultrazentrifugation (UZ-ÜS) und die Cytoskelettfraktion dem Pellet aus der Ultrazentrifugation (UZ-Pellet). Bei der Etablierung der Aufreinigung wurden ausgehend von dem Protokoll nach Manstein und Hunt (1995) einzelne Bedingungen zur Optimierung variiert. Das Aufreinigungsprotokoll wurde mit der Zelllinie MMD-H81 erstellt.

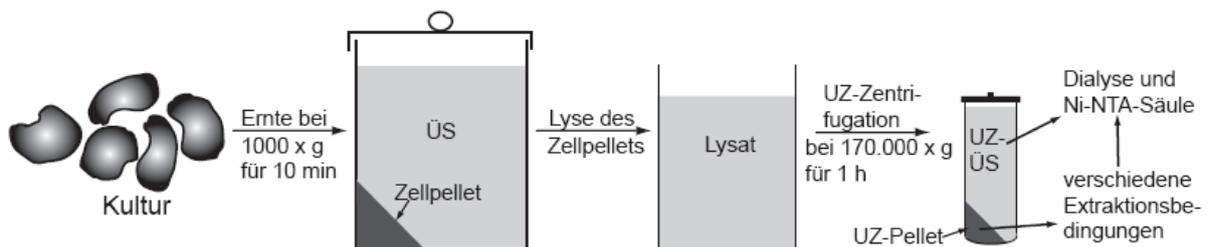


Fig. 3.12.: Schematische Darstellung der Aufreinigung von rekombinanten Myosindomänen aus *D. discoideum*-Zellen im präparativen Maßstab

3.3.3.1. Aufreinigung der Myosindomäne der Ar-CS1 im kleineren Maßstab

Die Aufreinigungen der Myosindomänen der Ar-CS1 aus der löslichen Fraktion und aus den Extrakten der Cytoskelettfraktion mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden miteinander verglichen. 100 ml-Kulturen von zwei verschiedenen Zelllinien MMD-H81 wurden entsprechend dem analytischen Extraktionsverfahren (s. 2.2.8.2.) gereinigt. Die Cytoskelettfraktion wurde mit dem Lysepuffer gewaschen. Die Myosindomänen der Ar-CS1 wurden mit ATP und Mg^{2+} -Ionen in Lysepuffer von der Cytoskelettfraktion extrahiert. Die Fraktionen wurden mittels Westernblot (s. 2.2.3.7.) analysiert (s. Fig. 3.13.). Die Myosindomäne der Ar-CS1 ist in allen Fraktionen nachweisbar. Die auf dem Westernblot aufgetragenen Proteinmengen wurden abgeschätzt (s. 2.2.3.7.) und auf die Gesamtmenge an Myosindomäne der Ar-CS1 aus einer 100 ml- Kultur hochgerechnet:

Kultur	Überstand des Lysats	Überstand vom Waschen	Extrakt	Pellet
2D1	36,0 µg	9,0 µg	0,9 µg	1,2 µg
2C4	41,0 µg	10,2 µg	0,9 µg	1,3 µg

76,5% der MMD-H81 befindet sich in der löslichen Fraktion und 19% der MMD-H81 im Überstand des Waschschriffs. Aus der Cytoskelettfraktion konnten 2% der MMD-H81 mit ATP abgelöst werden.

Vor der Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden die lösliche Fraktion bzw. der Mg^{2+} -ATP-Extrakt gegen 50 mM Tris, pH 7,3, 30 mM KAc, 7 mM β -Mercaptoethanol und 5 mM Benzamidin dialysiert. EDTA und DTT in den Proben sollten auf die für Ni-NTA-Agarose zulässigen Grenzen reduziert werden und die Erhöhung des Salzgehalts sollte für stringenteren Bedingungen während der Bindung an die Ni-NTA-Affinitätsmatrix sorgen. Nach dem Probenauftrag wurde schrittweise mit Niedrig-Salz-Puffer, Hoch-Salz-Puffer, und Niedrig-Salz-Imidazol-Puffer (50 mM) gewaschen und danach mit 10%, 50% und 100% Imidazolpuffer eluiert. Der Proteingehalt in den Eluaten war unter der Nachweisgrenze einer herkömmlichen SDS-PAGE. Die Westernblotanalyse zeigte, dass in dem sechsten Eluat MMD-H81 enthalten war. Nach Bradford wurde ein Proteingehalt von 12,4 µg Protein in diesem Eluat bestimmt. Nach Abschätzung über den Westernblot (s. 2.2.3.7.) waren davon 0,05 µg MMD-H81. Dies entspricht 0,04 % der Gesamtmenge an Protein in dieser Eluatfraktion.

Demzufolge war eine Optimierung der Chromatographiebedingungen zwingend erforderlich. Durch die Zugabe von 5 mM bzw. 20 mM Imidazol in den Bindepuffer bzw. in den Waschpuffer sowie durch erhöhten Salzgehalt (300 mM KAc) in den Puffern sollte die Stringenz der Binde- und der Waschbedingungen erhöht werden. Es wurden die Ni-NTA-Puffer nach Manstein und Hunt (1995) (s. 2.1.3.) verwendet. Eluiert wurde schrittweise mit 50 mM, 100 mM, 200 mM sowie 500 mM Imidazol.

Fig. 3.14. A zeigt die Analyse der Aufreinigung der löslichen Fraktion mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Auf das 7% SDS-Polyacrylamidgel wurden 50 µl Fraktionen, die mit TCA gefällt wurden, aufgetragen. In den Waschfraktionen sind Proteinbanden zu sehen. In den Eluaten sind nicht nur Banden im Größenbereich der Myosindomänen der Ar-CS1 zu sehen. Mittels Westernblot wurde MMD-H81 im Durchlauf und in mehreren Eluaten detektiert.

Bei weiteren Chromatographie-Experimenten wurde schrittweise mit 200 mM und mit 500 mM Imidazol eluiert. In Fig. 3.14. B ist die Analyse von 25 µl mit TCA gefällten Fraktionen mittels Westernblot dargestellt. Aus der relativen Bandenintensität ergeben sich unter Berücksichtigung der Fraktionsvolumina folgende Mengen an MMD-H81:

Fraktion	Durchlauf (18 ml)	Eluat 5 (1 ml)	Eluat 6 (1 ml)	Eluat 7 (1 ml)
Menge an MMD-H81	39,4 µg	1,9 µg	2,1 µg	0,6 µg

Im Durchlauf befinden sich etwa 90% des MMD-H81. Die Myosindomänen der Ar-CS1 aus der löslichen Fraktion binden unter den gewählten Bedingungen nur zu einem geringen Anteil an die Ni-NTA-Agarose.

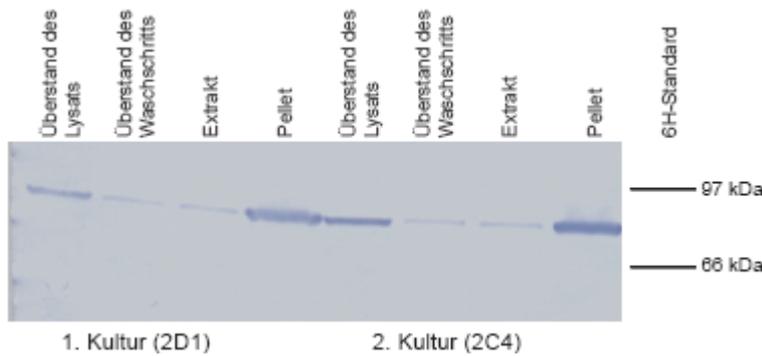


Fig. 3.13.: Aufreinigung aus zwei Zelllinien MMD-H81 nach dem analytischen Extraktionsverfahren Auf ein 7% SDS-Polyacrylamidgel wurden 0,13% von den löslichen Fraktionen, 0,33% von den Überständen des Waschschriffs, 4,17% von den Extrakten und 8,33% von den Pellets aufgetragen. Die Analyse mittels Westernblot erfolgte wie in 2.2.3.7. beschrieben.

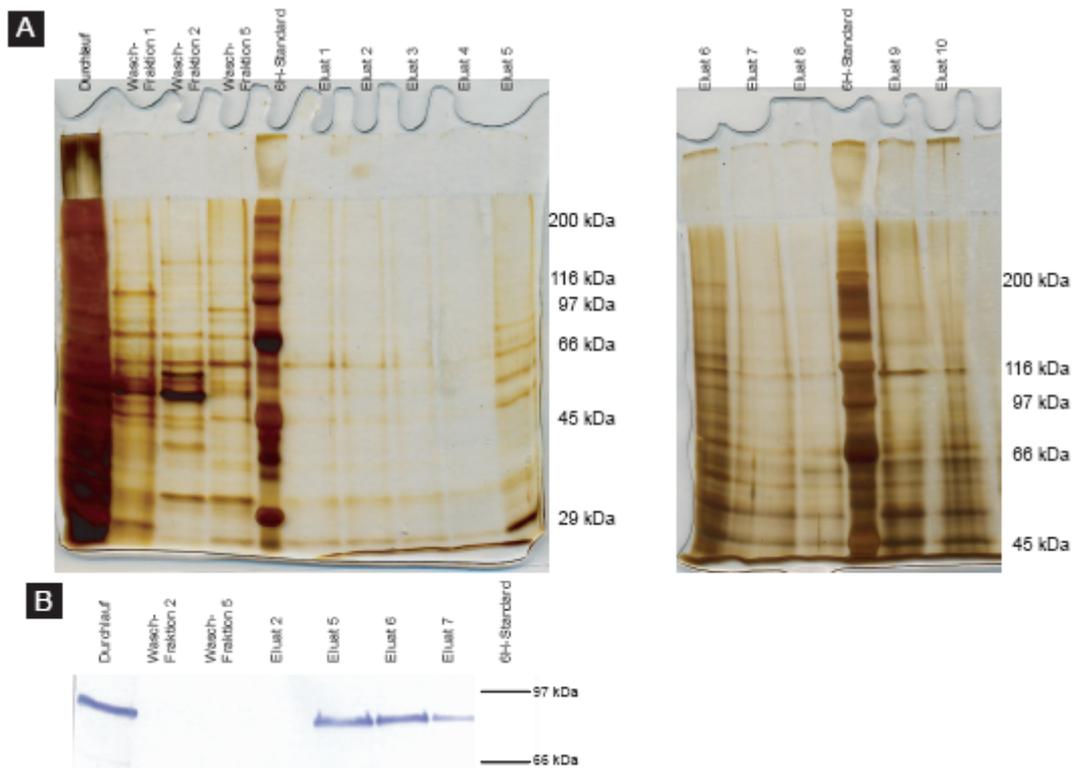


Fig. 3.14.: Aufreinigung von MMD-H81 aus der löslichen Fraktion mittels Ni-NTA-Chromatographie

(A) Auf dem 7% SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 50 µl der Fraktionen aufgetragen. Mittels Silberfärbung konnten in allen Fraktionen Proteine nachgewiesen werden. In den Eluaten sind Banden in Größe der MMD-H81 von 90 kDa jedoch nur äußerst schwach zu sehen.

(B) Mittels Westernblot wurden 25 µl der Fraktionen analysiert. Nach Abschätzung der aufgetragenen Proteinmengen sind unter Berücksichtigung der Gesamtvolumina im Durchlauf etwa 90% der MMD-H81.

3.3.3.2. Aufreinigung von Myosindomänen der Ar-CS1 aus der Cytoskelettfraktion im präparativen Maßstab

Nach Manstein und Hunt (1995) können Myosindomänen aus *D. discoideum* funktionell aus der Cytoskelettfraktion isoliert werden. Dazu wird die Cytoskelettfraktion in HKM-Puffer (s. 2.1.3.) mit 7 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM Benzamidin und 40 µg/ml Pefabloc SC homogenisiert. Zu der Suspension wird ATP auf eine Endkonzentration von 10 mM zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert, bevor für 1 Stunde bei $20.800 \times g$ zentrifugiert wird. Bis zu 5% der gesamten Myosindomänen aus Ar-CS1 konnten mit diesem Protokoll abgelöst werden. Um die Ausbeute zu verbessern, wurden verschiedene Extraktionsbedingungen getestet, die in folgender Tabelle zusammengefasst sind.

Extraktionsbedingung	Wirkung
HKM-Puffer + 0,5 M NaCl + 10 mM ATP + Zentrifugation bei $15.000 \times g$	gering
HKM-Puffer + 0,5 M KCl + 10 mM ATP + Zentrifugation bei $15.000 \times g$	gering
HKM-Puffer + 0,6 M KCl + 10 mM ATP + Zentrifugation bei $15.000 \times g$	gering
Größeres Puffervolumen (2 ml Puffer auf 0,3 g Pellet)	gering
Variation der ATP-Konzentration (10mM, 15 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM)	gering
HKM-Puffer + 0,5 M KCl + 50 mM ATP	gering
HKM-Puffer + 0,5 M KCl + 100 mM ATP	gering
HKM-Puffer + alkalische Phosphatase (25 U -50 U) + 10 mM ATP	gering
HKM-Puffer + 15 mM ATP + 10 mM CaCl_2	gering
HKM-Puffer + 0,5 M KCl + 10 mM CaCl_2 + 15 mM ATP	gering
HKM-Puffer + 0,5 M KCl + 2 mM EDTA + 15 mM ATP	gering
50 mM Phosphatpuffer (pH 7,5)	gering
HKM-Puffer + Calmodulin (10 µM, 100 µM) + 0,1 M CaCl_2 + 15 mM ATP	gering
HKM-Puffer + DMSO (5%, 15%, 30%) + 15 mM ATP	gering
HKM-Puffer + Glykol (30%, 40%, 50%) + 15 mM ATP	gering
HKM-Puffer bei verschiedenen pH-Werten (6,4; 8,5; 9,5) + 15 mM ATP	gering

Harnstoffpuffer (c = 1 M, 2 M, 2,5 M, 3 M, 3,5 M, 4 M, 6 M, 8 M) + 15 mM ATP	je höher c, desto besser
Guanidin-Hydrochlorid-Puffer (2 M, 6 M) + 15 mM ATP	gut bei 6 M
Hepes/KI-Puffer mit 0,6 M KI+ 15 mM ATP	gut
HKM-Puffer + Cytochalasin D (2 µg/ml, 5µg/ml) + 15 mM ATP	gering
HKM-Puffer + 10 µl DNase I + 15 mM ATP	gering
HKM-Puffer + 30% DMSO + 0,5 M NaCl + 15 mM ATP	gering
HKM-Puffer + 30% DMSO + 0,5 M NaCl + 0,5 µg/ml Cytochalasin D + 15 mM ATP	gering
HKM-Puffer + 50% Glykol + 0,5 M NaCl + 15 mM ATP	gering
HKM-Puffer + 50% Glykol + 0,5 M NaCl + 0,5 µg/ml Cytochalasin D + 15 mM ATP	gering
Harnstoffpuffer (2 M) + 20 µl DNase I + 15 mM ATP	gering
Harnstoffpuffer (4 M) + 10 µl DNase I + 15 mM ATP	gering
Einfluss der Reaktionsdauer (2 h bzw. 12 h) mit Harnstoffpuffer (2 M, 4 M) bzw. mit Hepes/KI-Puffer mit 0,6 M KI + 15 mM ATP	2 h besser als 12 h

Mit Cytochalasin D wurde 15 min bzw. 1 h inkubiert, bevor ATP zugegeben wurde.

Die Ablösung der Myosindomäne der Ar-CS1 konnte nur mit Harnstoff, Guanidin-Hydrochlorid und Kaliumiodid signifikant verbessert werden.

Je höher die Harnstoffkonzentration war, desto mehr Myosindomäne der Ar-CS1 konnte abgelöst werden. Selbst bei der Extraktion mit 8 M Harnstoff, der höchsten Konzentration, konnten die Myosindomänen der Ar-CS1 jedoch nicht vollständig aus der Cytoskelettfraktion abgelöst werden. Es wurde außerdem ermittelt, bei welcher Harnstoffkonzentration die Myosindomänen gut extrahiert werden können ohne denaturiert zu werden. Nach dem Waschen mit Extraktionspuffer wurden 0,55 g Pellet für die verschiedenen Bedingungen aufgeteilt. Die Cytoskelettfraktion wurde zwei Mal in gleicher Weise mit je 1 ml 2 M - 4 M Harnstoffpuffer behandelt. Erst bei der zweiten Extraktion wurde die Myosindomäne der Ar-CS1 abgelöst. In Fig. 3.15. ist die Westernblotanalyse dieser Extraktion gezeigt. Mit 4 M Harnstoff wurde das beste Ergebnis erzielt. Trotzdem wurde in der Cytoskelettfraktion noch Myosindomäne detektiert.

Um die Extraktion mit 4 M Harnstoffpuffer zu steigern, wurden verschiedene Bedingungen kombiniert. Der Einfluss des Verhältnisses zwischen dem Gewicht der Cytoskelettfraktion und Extraktionspuffervolumen wurde überprüft. Dazu wurden 0,1 g bzw. 0,44 g Cytoskelettfraktion mit je 1 ml 4 M Harnstoffpuffer behandelt. Zudem wurden 0,44 g Cytoskelettfraktion mit 1 ml Harnstoffpuffer, dem 5 µg/ml Cytochalasin, 10 µl DNase I bzw. 0,5 M NaCl zugesetzt wurden, behandelt. Die Westernblotanalyse (s. Fig. 3.16.) zeigte, dass

bei der zweiten Extraktion prinzipiell die Myosindomäne der Ar-CS1 abgelöst werden konnte. Bei der Extraktion aus 0,1 g Cytoskelettfraktion konnte kein MMD-H81 detektiert werden. Die Zugabe von DNase I konnte die Ablösung der MMD-H81 erhöhen.

Der Einfluss der Reaktionsdauer von 2 M Harnstoffpuffer, 4 M Harnstoffpuffer bzw. Hepes/KI-Puffer mit 0,6 M KI (s. 2.1.3.) wurde ebenfalls getestet. Die Cytoskelettfraktion wurde vor der ATP-Zugabe mit jedem Puffer einmal 2 h und einmal 12 h auf Eis inkubiert. Die Westernblotanalyse ergab, dass nach zwei Stunden in allen Extrakten MMD-H81, nach 12 Stunden am meisten MMD-H81 mit KI gelöst worden war (s. Fig. 3.17.).

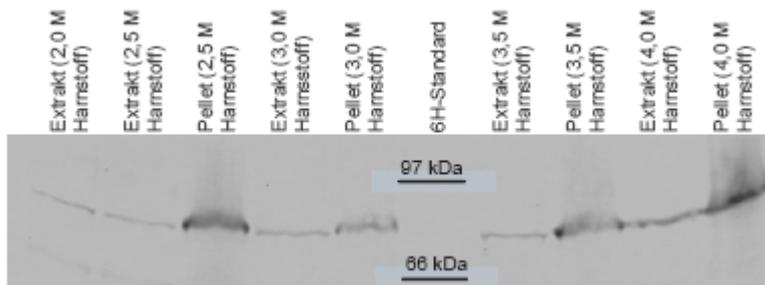


Fig 3.15.: Ermittlung der Harnstoffkonzentration, bei der MMD-H81 gut extrahiert, aber nicht denaturiert wird

Für die Westernblotanalyse wurde ein 7% SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Gezeigt ist die zweite Extraktion mit 2,0 M bis 4,0 M Harnstoff. Mittels Westernblot (s. 2.2.3.7.) wurden jeweils 1% Extrakt und 3% Pellet analysiert. Je höher die Harnstoffkonzentration ist, desto intensiver sind die Banden. Unter diesen Bedingungen wurde die Myosindomäne der Ar-CS1 selbst bei 4 M Harnstoff noch nicht vollständig abgelöst.

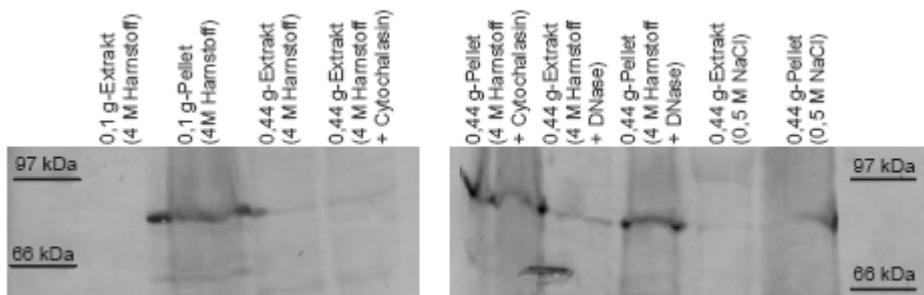


Fig 3.16.: Westernblotanalyse der Harnstoffextraktion von MMD-H81 aus der Cytoskelettfraktion in Kombination mit verschiedenen Bedingungen

Zur Analyse mittels Westernblot (s. 2.2.3.7.) wurden je 1% Extrakt und 4% Pellet auf ein 7% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt sind die zweiten Extrakte. 0,1 g bzw. 0,44 g Cytoskelettfraktion wurden mit je 1 ml 4 M Harnstoffpuffer behandelt. Dem 4 M Harnstoffpuffer wurden bei der Extraktion aus 0,44 g Cytoskelettfraktion 5 µg/ml Cytochalasin D, 10 µl DNase I bzw. 0,5 M NaCl zugesetzt. Die Intensität der Bande bei der Extraktion mit Harnstoffpuffer und mit DNase I ist am stärksten.

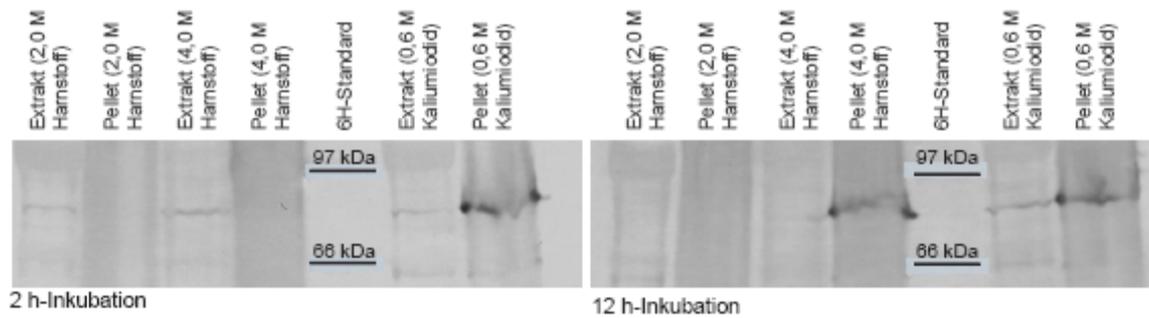


Fig. 3.17.: Einfluss der Inkubationszeit auf die Extraktion

Auf 7%-SDS Polyacrylamidgele wurden jeweils 1% Extrakt und 2% Pellet für die Westernblotanalyse aufgetragen. Vor der Zugabe von 15 mM ATP wurde die Cytoskelettfraktion mit 2 M Harnstoff, 4 M Harnstoff bzw. 0,6 M KI für 2 h bzw. 12 h inkubiert. Nach 2 Stunden konnte unabhängig von den gewählten Bedingungen MMD-H81 extrahiert werden. Nach 12 Stunden war die Extraktion von MMD-H81 nur mit Hapes/KI-Puffer erfolgreich.

3.3.3.3. Aufreinigung der Myosindomäne der Ar-CS1 aus der löslichen Fraktion im präparativen Maßstab

Wie bereits gezeigt, war bei einer Aufreinigung nach Manstein und Hunt (1995) über 95% der Myosindomänen der Ar-CS1 in der löslichen Fraktion. Um die Ausbeute zu erhöhen, sollte der Kulturmaßstab vergrößert werden und die selektive Anreicherung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie verbessert werden.

Im größeren Kulturmaßstab (1 l - 8 l) wurden die Zellen durch Zentrifugation (Rotor JLA-8.1000, Beckman, 1000 × g, 4°C) geerntet und nach Manstein und Hunt (1995) mit 1× PBS gewaschen. Es wurde beobachtet, dass beim Waschen die Zellen schon durch das Resuspendieren und durch die Zentrifugation in dem Waschpuffer lysiert wurden. Bei der Analyse des Waschpuffers mittels Westernblot zeigte sich, dass bei dem Waschschrift MMD-H81 in beträchtlichen Mengen verloren ging.

Fig 3.18. zeigt die Analyse der löslichen Fraktion, die unter verschiedenen Bedingungen zentrifugiert wurden.

Zellen einer 8 l Kultur wurden wie 2.2.8.3. beschrieben lysiert. Die Lysate wurden bei 50.000 × g für 45 min zentrifugiert. Der Überstand war noch trüb und wurde nochmals bei 200.000 × g für 1 h zentrifugiert. Bei beiden Zentrifugationen entstand ein unteres, durchsichtiges und ein oberes rötliches Pellet. Das Pellet der ersten Zentrifugation betrug ca. 4 g, das Pellet der Ultrazentrifugation betrug ca. 0,7 g. Das Pellet der milderen Zentrifugation wurde zweimal mit Extraktionspuffer behandelt. In Fig 3.18. A ist die Westernblotanalyse dargestellt. Die Myosindomäne der Ar-CS1 aus dem Überstand der 50.000 × g Zentrifugation wurde mit 200.000 × g vollständig abzentrifugiert. Sowohl das obere als auch das untere Pellet beider Zentrifugationen enthalten MMD-H81.

Um die Löslichkeit der Myosindomäne der Ar-CS1 zu überprüfen, wurde eine Waschfraktion der Zelllinie MMD-H81 aufgeteilt und bei verschiedenen Geschwindigkeiten zentrifugiert: 10 min bei $1000 \times g$, 20 min bei $20.000 \times g$, 105 min bei $45.000 \times g$ und 90 min bei $170.000 \times g$. Die Westernblotanalyse (Fig. 3.18. B) zeigte, dass der Überstand der höchsten Zentrifugation am meisten MMD-H81 enthielt. Nur lösliche Proteine sind nach der Ultrazentrifugation im Überstand. Die unterschiedlichen Mengen der MMD-H81 in den Überständen der verschiedenen Zentrifugationen lässt vermuten, dass die Zellen bei den Zentrifugationen unterschiedlich stark lysiert werden.

Es wurde überprüft, ob Triton X-100 für die Zelllyse notwendig ist. Von einer 1 l - Kultur wurden die Zellen ($4,20 \cdot 10^6$ Zellen/ml) mit 40,4 ml $1 \times$ PBS durch kräftiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Zellen einer weiteren 1l -Kultur wurden wie in 2.2.8.3. beschrieben in 40,4 ml Lysepuffer (s. 2.1.3.) und mit Ultraschall und Triton X-100 lysiert. Die Zellsuspensionen wurden jeweils 10 min bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Die Überstände wurden 1 h bei $20000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet aus der Lyse mit $1 \times$ PBS war rötlich und von weicher Konsistenz, das andere war wie ein festes, farbloses Gel. Die Überstände dieser Zentrifugation wurden 1 h bei $170.000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet aus der Lyse mit $1 \times$ PBS war unten ein farbloses Gel und oben rötlich, das Pellet aus der Lyse mit Triton X-100 war rötlich. In Fig. 3.19. ist die Analyse der Fraktionen dieser Aufreinigung mittels SDS-PAGE und mittels Westernblot gezeigt. Das 8%-SDS-Polyacrylamidgel wurde silbergefärbt (s. Fig. 3.19. A). Bei der Lyse mit Triton X-100 ist der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen größer als bei der Lyse durch Resuspendieren in $1 \times$ PBS. Die differentielle Zentrifugation brachte keinen Reinigungseffekt. Die Westernblotanalyse (s. Fig. 3.19. B) beweist, dass in einer Lyse mit Triton X-100 eine höhere Ausbeute des MMD-H81 aus der löslichen Fraktion erzielt wird. In allen Überständen und in allen Pellets wurde im Westernblot auch Aktin detektiert (s. Fig. 3.19. C).

Es stellte sich die Frage, ob durch diese Vorreinigungsschritte auch die Bindung an Ni-NTA-Agarose beeinflusst wird. Der pH-Wert der löslichen Fraktion aus der Lyse durch kräftiges Resuspendieren betrug 7,78, der pH-Wert der löslichen Fraktion aus der Lyse mit Triton X-100 betrug 8,08. Durch beide pH-Werte sollte die Bindung der MMD-H81 an Ni-NTA-Agarose nicht beeinträchtigt werden. Die Überstände wurden im so genannten Batch-Verfahren 24 h mit Ni-NTA-Agarose inkubiert, anschließend in einer Säule mit Hoch-Salz-Puffer gewaschen und stufenweise mit 200 mM Imidazol und mit 500 mM Imidazol im gleichen Puffer eluiert. In allen Eluaten befinden sich verhältnismäßig wenig Proteine unterschiedlicher Größe. Die Westernblotanalyse (s. Fig. 3.20.) zeigte, dass sich die MMD-H81-Variante der Myosindomäne der Ar-CS1 ausschließlich im Durchlauf und in den Waschfraktionen befindet. In der SDS-PAGE sind bei 45 kDa die intensivsten Banden, die in der Westernblotanalyse als Aktin erkannt wurden. Die Wechselwirkung des His-Tags der

Myosindomäne der Ar-CS1 mit Ni-NTA-Agarose unter diesen Bedingungen entsprach absolut nicht den Erwartungen.

Um dieses Verhalten der MMD-H81-Variante in der löslichen Fraktion zu untersuchen, sollten verschiedene Bedingungen für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie getestet werden. Als Basispuffer wurden 8 M Harnstoffpuffer, Gly-Gly-Puffer (pH 9) bzw. Hepes/KI-Puffer mit 0,6 M KI (s. 2.1.3.) verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten die vereinigten Säulendurchläufe von Aufreinigungen, bei der die Zellen durch kräftiges Resuspendieren in $1\times$ PBS (mechanische Lyse) sowie mit Detergenz (Triton X-100) lysiert wurden. Jedes Aliquot wurde gegen den jeweiligen Basispuffer (s. 2.1.3.) für insgesamt 7,5 h dialysiert. Die Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde wie in 2.2.8.4. beschrieben durchgeführt. Die Analyse der Säulenfraktionen mittels Westernblot (s. Fig. 3.21.) zeigte, dass MMD-H81 unter diesen Testbedingungen gereinigt werden konnte, sich jedoch immer noch variable Anteile von MMD-H81 im Durchlauf oder der ersten Waschfraktion befanden. Jedoch wurde nicht untersucht, ob sich nach der Elution noch MMD-H81 in der Säulenmatrix befand. Bei der Verwendung des GlyGly-Puffers wurde MMD-H81 mit 200 mM Imidazol eluiert. Bei der Aufreinigung mit Harnstoff ließ sich MMD-H81 bevorzugt bei einem pH-Wert von 4,5 eluieren. Bei der Chromatographie mit Hepes/KI-Puffer war die Gesamtausbeute an MMD-H81 in den Eluaten am größten. MMD-H81 wurde bereits mit 200 mM Imidazol, aber auch mit 500 mM Imidazol eluiert. In den Eluaten enthaltene Verunreinigungen machen zwar einen zusätzlichen Reinigungsschritt erforderlich, prinzipiell entspricht aber eine Aufreinigung mit Hepes/KI den Erwartungen für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie eines His-getaggen Proteins.

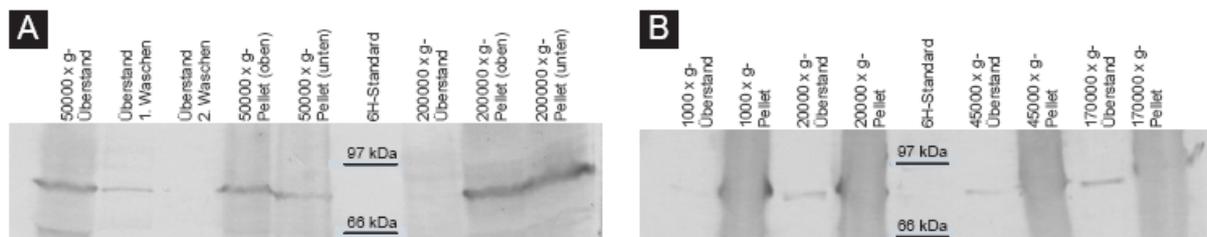


Fig. 3.18.: Einfluss von Zentrifugalgeschwindigkeiten auf die Ausbeute der Myosindomäne der Ar-CS1
(A) Für die Westernblotanalyse wurden auf das 7% Polyacrylamidgel 10 μ l Überstand und 7 mg Pellet aufgetragen. Das Volllysat wurde bei $50.000 \times g$ für 45 min zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde nochmals bei $200.000 \times g$ für 1 h zentrifugiert. Das Pellet der milderen Zentrifugation wurde zweimal mit Extraktionspuffer gewaschen. Sowohl das obere als auch das untere Pellet beider Zentrifugationen enthalten MMD-H81. Im Überstand der Ultrazentrifugation ist kein MMD-H81 nachweisbar. **(B)** Hier wurde ein Zelllysat aufgeteilt und bei verschiedenen Geschwindigkeiten zentrifugiert. Von jeder Zentrifugation wurden 10 μ l Überstand und 8 mg Pellet mittels Westernblot

analysiert. Bei der Ultrazentrifugation ($170.000 \times g$; 1h 30 min) wurde am meisten MMD-H81 im Überstand detektiert.

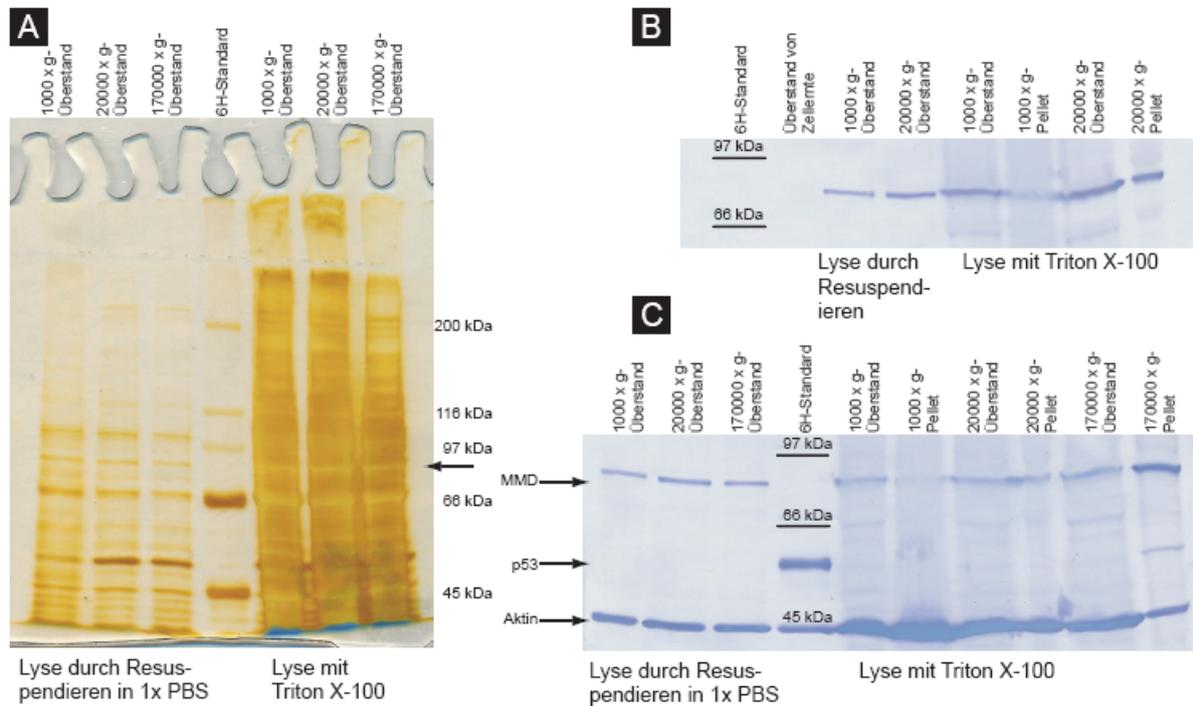


Fig. 3.19.: Einfluss von Lysemethoden auf die Ausbeute an Myosindomänen der Ar-CS1

Zellen der Linie MMD-H81 einer 1 I-Kultur wurde durch kräftiges Resuspendieren in $1 \times$ PBS lysiert. Zellen einer weiteren 1 I-Kultur wurden mit Triton X-100 lysiert. Die Zelllysate wurden nacheinander bei verschiedenen Geschwindigkeiten zentrifugiert. **(A)** Es wurden jeweils 0,05% Überstand auf einem 8% Polyacrylamidgel, das silbergefärbt (s. 2.2.3.6.) wurde, analysiert. Der Proteingehalt ist bei den Überständen aus der Lyse mit Triton X-100 größer als bei den Überständen aus der Lyse durch kräftiges Resuspendieren. Die Differentialzentrifugation bringt keinen Reinigungseffekt. Der Pfeil markiert die Bande auf der für MMD-H81 erwartenden Höhe **(B)** Bei der Westernblotanalyse wurden $15 \mu\text{l}$ Überstand und 7 mg Pellet aufgetragen. Die Ausbeute an MMD-H81 ist bei der Lyse mit Triton X-100 besser. **(C)** Bei dem Aktinnachweis in denselben Proben mittels Westernblot konnte Aktin auch in den Überständen detektiert werden.

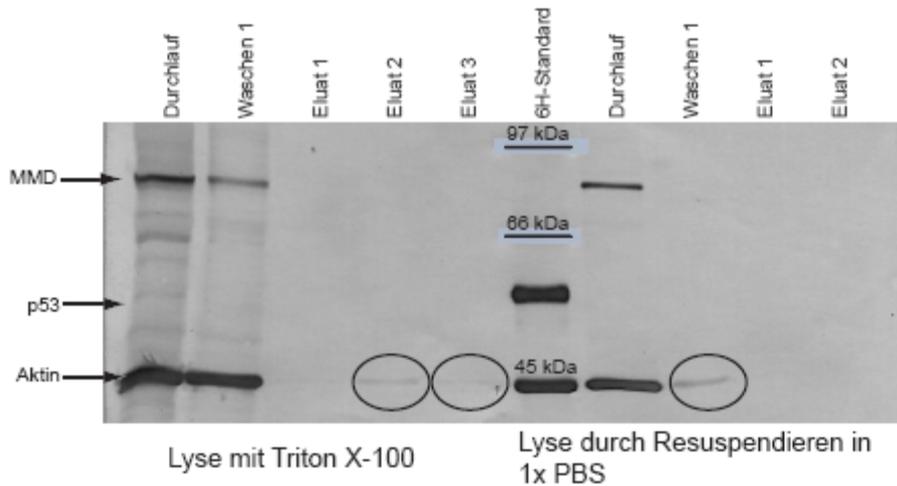


Fig. 3.20.: Vergleich der Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit den löslichen Fraktionen der MMD-H81 aus zwei Lysemethoden

Die löslichen Fraktionen von mit Triton X-100 bzw. von durch kräftiges Resuspendieren lysierten Zellen der Linie MMD-H81 wurden mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt. Mittels Westernblot wurden jeweils 0,02% des Durchlaufs, 2,5% der ersten Waschfraktion sowie 10% der Eluate analysiert. Dabei wurde gleichzeitig MMD-H81 und Aktin nachgewiesen. MMD-H81 wurde im Durchlauf beider Chromatographien und in der ersten Waschfraktion der Chromatographie der löslichen Fraktion der mit Triton X-100 lysierten Zellen detektiert. Aktin ist im Durchlauf, in der ersten Waschfraktion sowie zum Teil in den Eluaten nachweisbar. Schwache Banden sind mit einem Kreis markiert. Die lösliche Fraktion der durch kräftiges Resuspendieren lysierten Zellen hatte einen niedrigeren Proteingehalt.

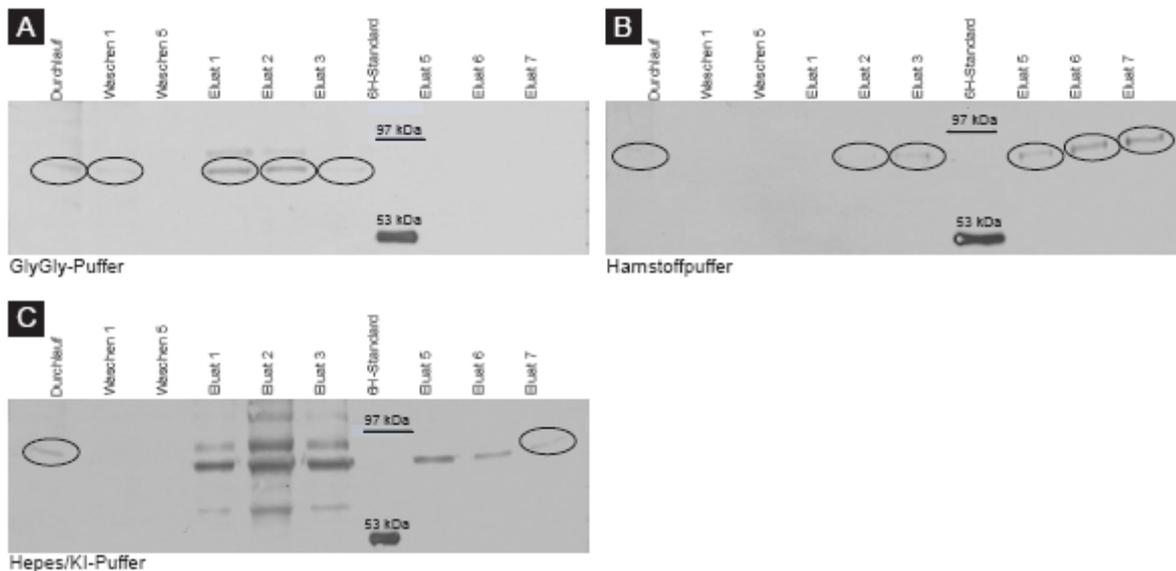


Fig. 3.21.: Vergleich unterschiedlicher Pufferbedingungen bei der Ni-NTA-Affinitätschromatographie
Auf 8%-SDS-Polyacrylamidgele wurden jeweils 0,03% Durchlauf, 7,5% der Waschfraktionen sowie 15% der Eluate aufgetragen und auf Nitrocellulosemembranen geblottet (s. 2.2.3.7.). Zusammen mit dem 6H-Standard wurde als Positivkontrolle 6-His-p53 aufgetragen. Die relativ schwachen Banden vom MMD-H81 wurden mit Kreisen markiert. (A) Bei der Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde als

Basispuffer ein GlyGly-Puffer (pH 9,0) verwendet. Banden in Höhe der erwartenden Größe von MMD-H81 finden sich im Durchlauf, in der Waschfraktion 1 und in den Eluaten 1-3. **(B)** Hier wurde als Basispuffer ein 8 M Harnstoffpuffer verwendet. Banden in Höhe der erwartenden Größe von MMD-H81 sind im Durchlauf und in den Eluaten 2-3 sowie 5-7. **(C)** Hier wurde als Basispuffer ein Hepes-Puffer mit 0,6 M KI verwendet. Banden in Höhe der erwartenden Größe von MMD-H81 finden sich im Durchlauf und in allen Eluaten. Hier wurde die größte Ausbeute erzielt.

3.3.3.4. Vergleich der Eigenschaften der Myosindomänenvarianten der Ar-CS1 aus der löslichen Fraktion und der Cytoskelettfraction

Zellen der Zelllinien MMD-H81, 3H-MA-LC, 3H-MA-A und 3H-MA-S (s. 2.1.5.3.) wurden wie in 2.2.8.3. beschrieben lysiert und zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation wurden die Myosindomänen der Ar-CS1 aus 0,4 g Cytoskelettfraction mit 1 ml Extraktionspuffer (s. 2.1.3.) mit 15 mM ATP abgelöst. Es wurde 1 h bei $16.000 \times g$ zentrifugiert.

Die Fraktionen wurden mittels Westernblot analysiert. Wie in Fig. 3.22. gezeigt, exprimieren die Zelllinien die jeweilige Myosindomäne der Ar-CS1 in etwa gleichen Mengen. MMD-H81 und 3H-MA-A befinden sich kaum in der löslichen Fraktion. Alle Varianten konnten aus der Cytoskelettfraction abgelöst werden. Dabei wurde die höchste Ausbeute bei 3H-MA-A und bei 3H-MA-LC erzielt.

Die Proteinmengen auf dem Westernblot wurden quantifiziert (s. 2.2.3.7.) und auf die Gesamtmenge hochgerechnet:

Myosin-domäne	Kultur (100 ml)	Lösliche Fraktion	Extrakt	Pellet	Σ Mengen des Proteins
MMD-H81	173 μg	4 μg (55 ml)	0,44 μg (3 ml)	0,52 μg (1,6 g)	4,96 μg (2,9%)
3H-MA-LC	147 μg	13 μg (50 ml)	0,50 μg (3 ml)	0,79 μg (1,29 g)	14,29 μg (9,7%)
3H-MA-A	200 μg	6 μg (55 ml)	0,54 μg (3 ml)	0,51 μg (1,5 g)	7,05 μg (3,5%)
3H-MA-S	167 μg	10 μg (52 ml)	0,42 μg (3 ml)	0,62 μg (1,47 g)	11,04 (6,6%)

In Klammern sind die gesamten Volumina bzw. Mengen der löslichen Fraktionen, Extrakte und Pellets angegeben.

Die Summe der Mengen der Myosindomänen der Ar-CS1 aus der löslichen Fraktion, dem Extrakt und dem Pellet wurde berechnet und mit der Menge aus der 100 ml-Kultur verglichen. Nach der Zellyse und der Anreicherung durch die Ultrazentrifugation sind weniger als 10% des rekombinanten Myosindomäne-Proteins aus der Kultur in den einzelnen Fraktionen nachweisbar.

Es wurde gezeigt, dass die Ausbeute bei der Aufreinigung der MMD-H81 am größten ist, wenn die Zellen ohne Detergenz lysiert werden (s. 6.3.2.). Zellen der Zelllinien MMD-H81,

3H-MA-LC, 3H-MA-A und 3H-MA-S wurden deshalb ohne Detergenz lysiert. Aus der angereicherten Cytoskelettfraktion wurden die Myosindomänen mit 15 mM ATP abgelöst. Bei der Zelllinie 3H-MA-LC konnte nach der Extraktion im Pellet keine Myosindomäne nachgewiesen werden. Die löslichen Fraktionen wurden gegen Hepes/KI-Puffer mit 0,4 M KI (s. 2.1.3.) dialysiert und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (s. 2.2.8.4.) gereinigt. Als Basispuffer wurde der Hepes/KI-Puffer verwendet. In Fig. 3.23. sind die Westernblotanalysen dargestellt. Jede Variante der Myosindomänen der Ar-CS1 konnte im Durchlauf sowie in den Eluatn mit 200 mM Imidazol nachgewiesen werden. Bei der Myosindomäne 3H-MA-A war im Dialysat die größte Ausgangsmenge vorhanden, was die relativ hohe Ausbeute nach der Affinitäts-Chromatographie erklärt. Auch im Säulenmaterial konnte 3H-MA-A nachgewiesen werden.

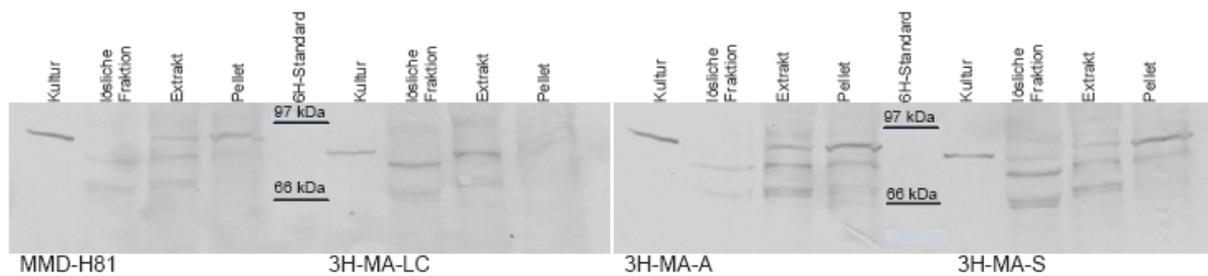


Fig. 3. 22.: Vergleich der Varianten der Myosindomänen der Ar-CS1

100 ml-Kulturen der Zelllinien MMD-H81, 3H-MA-LC, 3H-MA-A und 3H-MA-S wurden lysiert und zentrifugiert. Aus der Cytoskelettfraktion wurden die Myosindomänen mit ATP extrahiert. Mittels Westernblot wurden jeweils 0,015% Kultur, 0,03% lösliche Fraktionen und 0,5% Extrakte sowie 0,7% Pellet aufgetragen. Jede Variante der Myosindomäne der Ar-CS1 wird exprimiert. 3H-MA-S ist vorwiegend in der löslichen Fraktion. 3H-MA-LC und 3H-MA-A konnten am besten extrahiert werden.

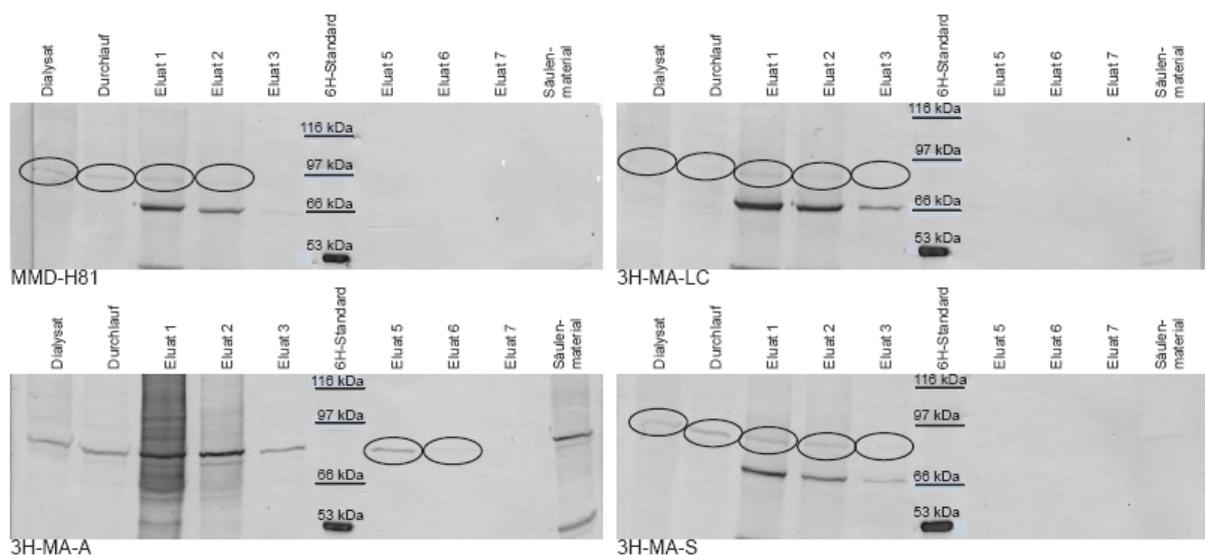


Fig. 3.23.: Vergleich der Ni-NTA-Chromatographie mit MMD-H81, 3H-MA-LC, 3H-MA-A und 3H-MA-S

Auf 8%-Gelen wurden 0,03% Dialysat, 0,03% Durchlauf, 15% Eluate und 20% der Säulenmatrix aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Jede Variante der Myosindomäne der Ar-CS1 konnte über Ni-NTA-Chromatographie gereinigt werden. Schwache Banden wurden mit Kreisen markiert.

Die Varianten der Myosindomänen der Ar-CS1 wurden mit ausgewählten Bedingungen in ihrem Extraktionsverhalten miteinander verglichen. Dabei wurde die Cytoskelettfraction zweimal mit HKM-Puffer (s. 2.1.3.) gewaschen. Danach wurden jeweils 145 mg - 500 mg Pellet mit 0,3 ml - 1,5 ml Extraktionspuffer homogenisiert. Nach ATP-Zugabe wurde die Extraktion 20 min bei RT inkubiert. Die verschiedenen Extraktionsbedingungen sind in 2.2.8.3. aufgelistet.

Das Experiment wurde zweimal in gleicher Weise durchgeführt. Die Extrakte wurden mittels Westernblot analysiert. Die aufgetragenen Mengen wurden quantifiziert (s.2.2.3.7.). Die Werte aus beiden Experimenten wurden gemittelt (s. 6.3.3.).

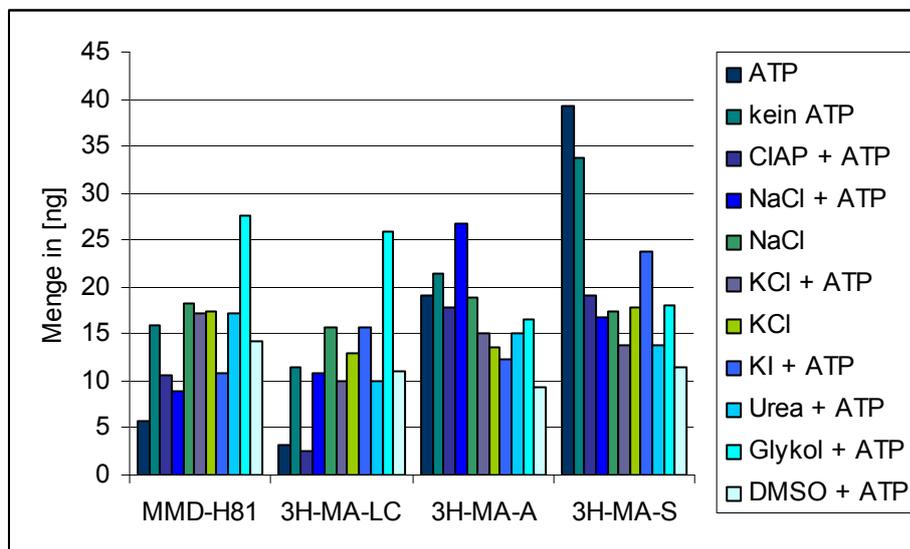


Fig. 3.24.: Bei verschiedenen Bedingungen extrahierte Mengen der Varianten der Myosindomänen der Ar-CS1

MMD-H81 und 3H-MA-LC lösen sich schlechter von der Cytoskelettfraction, wenn ATP zugegeben wurden. Die Zugabe von NaCl, KCl, KI, Harnstoff bzw. DMSO zu dem Extraktionspuffer hat keinen Einfluss im Vergleich zu der Behandlung mit Extraktionspuffer ohne Zusätze. Mit Glykol und ATP konnte am meisten MMD-H81 bzw. 3H-MA-LC extrahiert werden.

Die Ablösung von 3H-MA-A aus der Cytoskelettfraction wird durch die Zugabe von ATP nicht wesentlich beeinflusst. Die beste Extraktion wurde mit Puffer mit NaCl und ATP erzielt. Mit DMSO konnte am wenigsten 3H-MA-A extrahiert werden.

3H-MA-S konnte durch Zugabe von ATP besser aus der Cytoskelettfraction gelöst werden. Die alkalische Phosphatase (CIAP) verschlechtert die Ausbeute der Extraktion. Die Zugabe

von NaCl, KCl, KI, Harnstoff, Glykol bzw. DMSO verschlechtern die Extraktion im Vergleich zur Behandlung mit Extraktionspuffer.

3.3.4. MALDI-Analyse der Bande auf Höhe der zu erwartenden Größe der Myosindomäne der Ar-CS1

Bei den Westernblotanalysen wurde eine Bande, die in Höhe der erwarteten Größe von ca. 90 kDa lief, durch den Antikörper anti-(His)₆-tag (s. 2.1.2.) erkannt. Zum Teil wurde auch eine Bande bei 66 kDa bei den Westernblotanalysen gefärbt. Dieses Protein wurde manchmal über Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit größeren Ausbeuten gereinigt als das 90 kDa große Protein. Mittels MALDI sollte verifiziert werden, ob es sich bei dem Protein in Höhe von 90 kDa um die Myosindomäne der Ar-CS1 handelte. Außerdem sollte untersucht werden, ob das 66 kDa-Protein eine trunkierte Form der rekombinanten Myosindomäne darstellt.

Für die MALDI-Analysen wurden Eluate aus einer Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit dem 50 mM Hepes-Puffer (pH 8,0) mit 0,5 M NaCl und 0,6 M KI als Laufpuffer verwendet. Auf dem 8%-SDS-Polyacrylamidgel liefen in Höhe von etwa 90 kDa zwei Banden, die beide analysiert wurden. Zudem wurde die Bande bei 66 kDa analysiert (s. Fig. 3.25.). Die Proteine wurden im Gel mit Trypsin wie in 2.2.3.8. beschrieben verdaut. Die MALDI-Analyse wurde im Labor von Prof. R. Deutzmann durchgeführt.

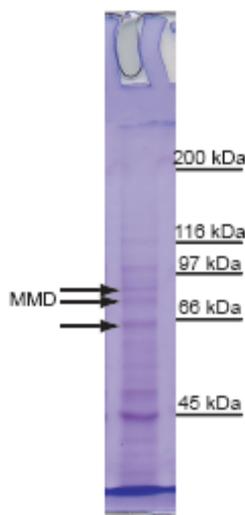


Fig. 3.25.: 8%-SDS-Polyacrylamid mit Proben für MALDI-Analyse

Die mit einem Pfeil markierten Banden wurden mittels MALDI analysiert. Die mit MMD beschriftete Bande konnte als rekombinante Myosindomäne der Ar-CS1 identifiziert werden.

Bei der Bande auf Höhe von 90 kDa handelte es sich um das rekombinant hergestellte Protein, die Myosindomäne der Ar-CS1. Die beiden anderen Proteine konnten als besonders

Histidin-haltige Proteine aus *Dictyostelium discoideum* (gi/ 66815707; gi/ 66828255) identifiziert werden.

In der unten aufgeführten Tabelle ist die Kombination von Peptiden, die beim im Gel-Verdau der Bande bei ca. 90 kDA entstanden und die mit der Sequenz der Myosindomäne der Ar-CS1 korrelieren, aufgelistet. Bei CM handelt es sich um die berechnete Peptidmasse und bei OM um die beobachtete Peptidmasse. Unter M stehen die Modifikationen: Oxidation von Methionin (O) sowie Propionamidmodifikation von Cystein (P).

CM	OM	Sequenz	M
764,4063	765,4216	VCFGIR	P
875,4613	876,4984	RDGYPIR	
953,4388	954,4877	YVAQMGNR	O
1095,5712	1096,6176	IKFEDFAAR	
1157,6556	1158,7081	LSQAQPLFVR	
1365,6313	1366,6898	YHGEYENLVSR	
1440,6844	1441,7452	NLSGESSGSTLYAR	
1560,7473	1561,8026	APHLFWTADNAYR	

In der Aminosäuresequenz der Myosindomäne der Ar-CS1 wurden die Peptide markiert:

MKPDDLSDLEVLDENTIVQALRTRFNKEKFYTYIGDILVAVNPCKPLNLF
DLKYHGEYENLVSR^{TQ}KAPHLFWTADNAYRSLCETGRNQCILVSGESGAG
KTESTKYM^IQHLMKISPSDDSLLDKIVQINPLLEAFGNAATFMKNSSR
FGKFIELHYSEYQ^{LL}GAKID^{DD}YLEKSRVVHRSNGEKNFHVYALFAGM
SRERLLYYFLEDPDCHRIMREDDVQ^{RG}VFQDAE^{EY}QHYKSMFSDLT^VIMS
HIGFSDEHIQVIFLILAAIHLANIVFMPIDSTDGVSVADEYPLHAVAKL
LGIEDEVELTEALISNVNTIKGEKIQSWKSLREANDSRDALAKDLYSRLF
GWIVGQINRNIWGKRQNK^NKMTRGSSIGLLDMSGFENFKVNGFDQLLINI
SNEKLQ^{QY}FMDYIFPRERREYELEGIEWRDIVYHCNDEVLEVL^FKRPDGV
LSLLDEESHFPQSN^{SS}LVQKLNKYCHDSTR^{YVAQMGNRVCFGIR}H^YAEQ
VTYNADGFLEGNRDSLSSDLVGC^{LL}NSNNEFIKDLFTASMSPTGTISDFA
SKCASR^{PL}PSVWPSTINPEKLRVSLSGKASIRIKK^SFRNLSGESSGST
LYARSSPTVTKHFKRSLSDLMTKLSQAQPLFVRCVKPNLHLSSGKFDSDL
VRRQLLCNGLMEIAELRRDGYPIRIKFEDFAAR^YKDICDFGNTNSDDL^GK
CLDILKTERIEGFKVGRSKI^FLKDYQKDMLEDTLREALRQKELERRRKA
EE

3.4. Zelllinien mit der Chitinsynthase Ar-CS1-YFP

Die YFP-getaggte Chitinsynthase aus *Atrina rigida* Ar-CS1 wurde heterolog in *D. discoideum*-Zellen exprimiert. Die Proteinverteilung wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht. Mittels der Bindung von Fraktionen aus einer Membranpräparation an Silicatkugeln sollte untersucht werden, ob das Enzym in die Membran eingebaut wurde. Die Aktivität der Ar-CS1-YFP wurde mit einem radioaktiven Test geprüft. Außerdem wurden Tests, um die Bildung von Chitin *in vivo* nachzuweisen, entwickelt. Mittels

Rasterkraftmikroskopie wurde untersucht, ob sich die Membranstruktur der *Dictyostelium*-Zellen durch die Expression der Ar-CS1-YFP verändert.

3.4.1. Herstellung und Handhabung der Zelllinien mit Ar-CS1-YFP

Die YFP-getaggte Ar-CS1 wurde in zwei verschiedenen *D. discoideum*-Stämmen, Ax3-orf+ und dcsA-, heterolog exprimiert.

Eine Transformation des Stammes Ax3-orf+ war nur unter Einsatz der doppelten Plasmidmenge wie normalerweise bei einer Elektroporation üblich erfolgreich. Die ersten Klone zeigten sich nach ca. einer Woche in der Petrischale. Insgesamt wurden etwa 50-100 Klone erhalten. Positive Klone wurden mittels Immunfluoreszenz (s. 2.2.4.) identifiziert. Die Verdopplungszeit der erhaltenen Zelllinie Ax3ArCS1-YFP in Schüttelkultur lag zwischen 16 h bis 24 h. Die Sporen der Zelllinie waren keimfähig. Die aus den Sporen erhaltenen Amöben konnten aber Ar-CS1-YFP nicht exprimieren. Deshalb wurden die Ax3ArCS1-YFP-Zelllinien regelmäßig frisch hergestellt.

Um mutmaßlich gebildetes Chitin, das die Zellen beim Wachstum behindern könnte, abzubauen, wurde die Zelllinie Ax3ArCS1-YFP teilweise in Gegenwart von Lysozym kultiviert. Mit verschiedenen Konzentrationen an Lysozym wurde getestet, wie das Wachstum der Zelllinie beeinflusst wird. Eine Konzentration von 0,05 mg/ml Lysozym im Medium griff die Zelloberfläche der Zellen stark an. In Gegenwart von 0,01 mg/ml Lysozym veränderte sich die Zelloberfläche nicht mikroskopisch sichtbar. Deshalb wurde diese Konzentration eingesetzt.

Bei der Transformation der dcsA-, die dcsA REMI Mutanten sind, wurden positive Klone nur mit der chemischen Transformation erhalten. Dabei wurde doppelt soviel Plasmid wie üblich eingesetzt. Nicht jede Transformation führte zu Klonen. Von 13 Transformationen führten vier zu 12-24 Kolonien. Die ersten Klone waren einmal nach einer Woche und dreimal nach zwei Wochen zu sehen. Nach über einem Monat konnten von zwei Platten nochmals 12 Klone gepickt werden. Positive Klone wurden mittels Immunfluoreszenz (s. 2.2.4.) identifiziert. Die erhaltene Zelllinie dcsArCS1-YFP war nicht zur Sporulation fähig.

3.4.2. Expression und Verteilung der Ar-CS1-YFP in *D. discoideum*-Zellen

Die Fluoreszenzsignale des YFP-Tags der Ar-CS1-YFP in den *D. discoideum*-Zellen konnten nicht direkt detektiert werden, weil die Signale zu schwach waren. Mittels Immunfluoreszenz wurden die Signale verstärkt, und somit konnte die Verteilung der Ar-CS1-YFP untersucht werden (s. 2.2.4.). Nach einer Fixierung mit 2% Formaldehyd in MeOH (s. 2.2.1.5.1.) wurden Ax3-orf+ bzw. dcsA- Zellen und die entsprechenden Ar-CS1-YFP exprimierenden Zelllinien

mit einem anti-GFP-tag-Antikörper aus Kaninchen (Dianova, PA1-980A) und mit einem anti-Aktin-Antikörper aus Maus (Dianova; DLN-07273) sowie mit den entsprechenden sekundären Antikörpern, Alexa Fluor® 488 anti-Kaninchen-Antikörper (Invitrogen, A11008) und der Cy3™-konjugierte anti-Maus-Antikörper (Dianova, 115-165-146), behandelt. Ax3-orf+ bzw. dcsA- Zellen und die entsprechenden transformierten Zelllinien wurden als Kontrolle für unspezifische Bindung auch nur mit den sekundären Fluoreszenz-Antikörpern behandelt. Mit diesen Proben wurden die Grundeinstellung der „detector gains“ beider Fluoreszenzkanäle am konfokalen Mikroskop (s. 2.2.7.1.) vorgenommen, so dass kein Fluoreszenzsignal detektiert wurde. Als weitere Kontrolle wurden nicht transformierte Ax3-orf+ bzw. dcsA- Zellen mit den vier oben genannten Antikörpern behandelt. Mit dieser Probe wurden am konfokalen Mikroskop die „detector gains“ so reguliert, dass das dem Aktin entsprechende Fluoreszenzsignal von dem Farbstoff Cy3 ausschließlich im „Cy3-Kanal“ detektiert wurde.

Die Intensität der Fluoreszenzsignale des Alexa Fluor® 488 anti-Kaninchen-Antikörper war bei den Immunfluoreszenzen der Ar-CS1-YFP schwächer als bei den Immunfluoreszenzen der YFP-getaggten Myosindomänen (s. 3.3.2.). Um das Signal zu verstärken, wurden bei der Bildbearbeitung mit der Software Adobe Photoshop (s. 2.1.10.) bei allen Bildern Helligkeit und Kontrast auf 75 erhöht. Bei den Negativkontrollen wurde mit denselben Änderungen kein Signal nachgewiesen. Wurde die Immunfluoreszenz mit Zelllinien aus Schüttelkulturen durchgeführt, war das Fluoreszenzsignal des Alexa Fluor® 488 anti-Kaninchen-Antikörper schwächer als bei frisch hergestellten Zelllinien aus der Titerplatte.

Innerhalb einer Zelllinie Ax3ArCS1-YFP waren immer alle Zellen positiv (vgl. Fig. 3.26.).

Es sind zwei verschiedene Muster aufgetreten: Ar-CS1-YFP war entweder unstrukturiert (s. Fig. 3.26. A/B) oder globulär strukturiert verteilt (s. Fig. 3.26. C/D). Alle Zellen einer Linie wiesen dasselbe Muster auf. Innerhalb einer Zelle mit unstrukturiertem Muster ist Ar-CS1-YFP über die gesamte Zelle verteilt. An vereinzelt Stellen liegt Ar-CS1-YFP dichter konzentriert vor (s. Fig. 3.26. A/B; offene Pfeilspitzen). In den Zellen gibt es einige nicht-fluoreszierende Bereiche (s. Fig. 3.26. A/B; geschlossene Pfeilspitzen). Dort könnten Zellorganellen lokalisiert sein. Das globulär strukturierte Muster ist ebenso innerhalb der gesamten Zellen zu erkennen. Bei den globulären Strukturen könnte es sich um Chitosomen oder um aggregiertes, denaturiertes Protein handeln. Ar-CS1-YFP ist auch in den Filopodien lokalisiert (Fig. 3.26. C/D; Pfeilspitzen). Um eine mögliche Kollokalisierung der Ar-CS1-YFP mit dem Aktincytoskelett zu untersuchen, wurde auch Aktin immunogefärbt (s. Fig. 3.26. (E)-(J)). Die Chitinsynthese ist in das Cytoskelett eingelagert (vgl. Kreise). Teilweise wird eine Überlagerung beider Fluoreszenzsignale durch eine Gelbfärbung deutlich. An diesen Stellen ist Ar-CS1-YFP mit Aktin kollokalisiert. Der Zellcortex ist durch das Aktin am Zellrand zu erkennen. In einigen Zellen ist dort auch Ar-CS1-YFP lokalisiert (offene Pfeilspitzen). Die

Kultivierung der Zellen in Gegenwart von 0.01 mg/ml Lysozym beeinflusst die Verteilung der Ar-CS1-YFP nicht (vgl. Fig. 3.26. (I)/(J)).

Fig. 3.27. zeigt die Verteilung der Ar-CS1-YFP in den dcsArCS1-YFP. Das Fluoreszenzsignal des Alexa Fluor® 488 war zum Teil intensiver als bei den Ax3ArCS1-YFP. Die Verteilung der Ar-CS1-YFP unterschied sich bei den beiden Zelllinien nicht. Es konnte das unstrukturierte (Fig. 3.27. A/B) und das globulär strukturierte Muster (Fig. 3.27. C/D) nachgewiesen werden. Im Cortex, direkt am Zellrand oder in den Filopodien konnte teilweise Ar-CS1-YFP detektiert werden (Fig. 3.27. E-G). Ar-CS1-YFP ist mit Aktin kolokalisiert (Fig. 3.27. H/I) oder in das Cytoskelett eingelagert (Fig. 3.27. J/K).

Die Zellen wurden vor der Immunfluoreszenz mit 2% Formaldehyd in MeOH fixiert. Durch die Dehydration der Zellen auf Grund des Alkohols sind die Membranen beschädigt worden. Deshalb wurde die Immunfluoreszenz mit Zellen, die mit 4% Paraformaldehyd in PBS schonender fixiert wurden, durchgeführt. Es konnte kein Aktin detektiert werden, weil die Zellen für die Antikörper nicht mehr durchlässig waren. Ar-CS1-YFP war kaum nachweisbar. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass es prinzipiell möglich ist, die YFP getaggte Myosin-Chitinsynthase der Mollusken trotz ihrer enormen Größe (290 kDa) vollständig in *D. discoideum* zu exprimieren. Die beobachteten unterschiedlichen Verteilungsmuster des Fluoreszenzsignals sind jeweils innerhalb einer Zelllinie konstant. Offen bleibt jedoch die Frage nach der Funktionalität, die in erster Linie davon abhängt, ob der Einbau der komplexen Glykosyltransferase in die Membran richtig funktioniert.

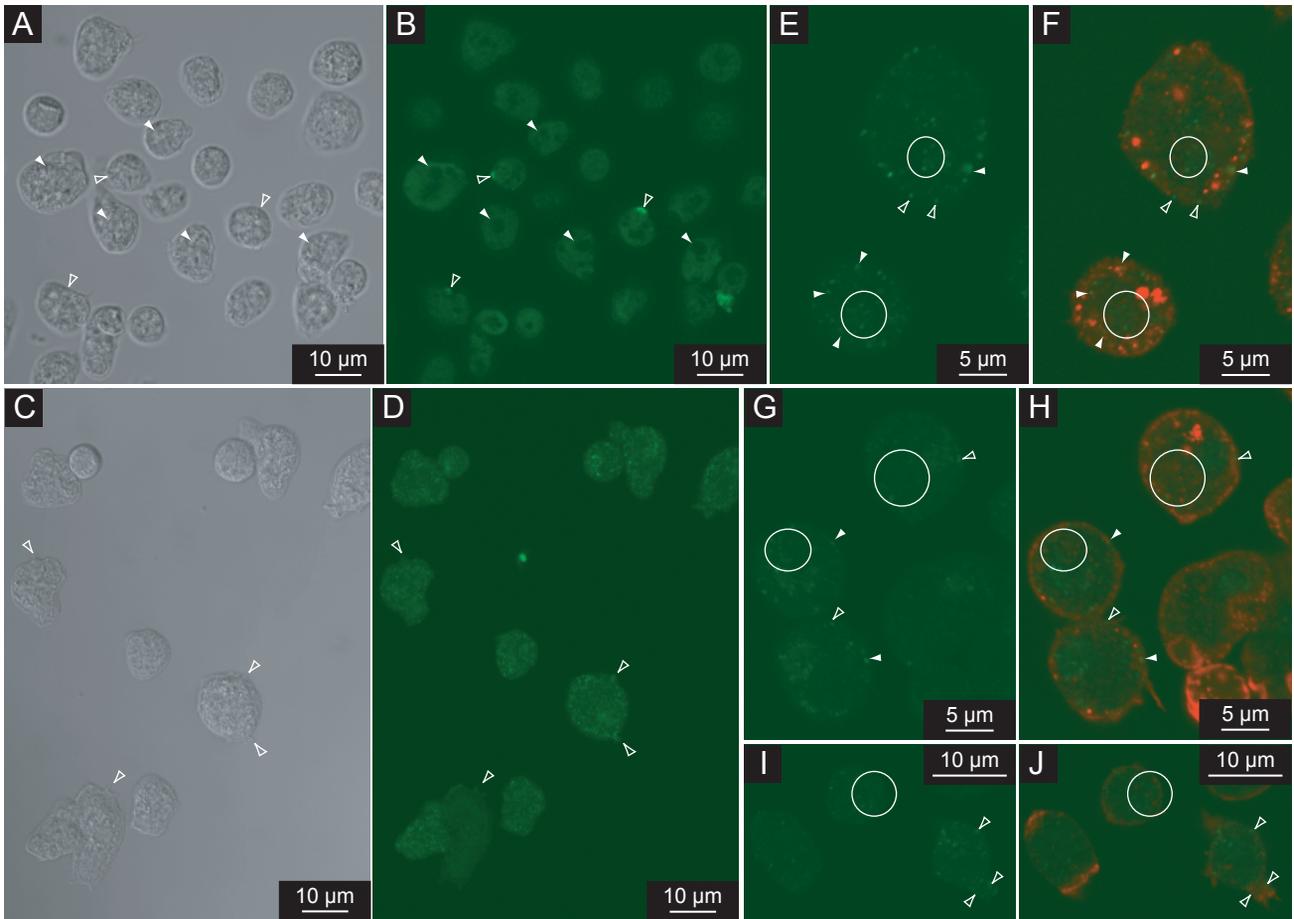


Fig. 3.26.: Verteilung der Ar-CS1-YFP in der Zelllinie Ax3ArCS1-YFP

Das Verteilungsmuster der Ar-CS1-YFP wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht. Das grün gefärbte Fluoreszenzsignal des Alexa Fluor® 488 repräsentiert Ar-CS1-YFP und das rot gefärbte Signal von Cy3 repräsentiert Aktin. **(A)-(D)** Hier wurde Ar-CS1-YFP immunogefärbt **(A)/(B)** Bei den gezeigten Zellen ist Ar-CS1-YFP unstrukturiert verteilt. Offene Pfeilspitzen markieren Stellen am Zellrand mit höherer Signalintensität; geschlossene Pfeilspitzen Stellen ohne Signal in den Zellen. **(C)/(D)** Hier ist Ar-CS1-YFP globulär strukturiert verteilt. Ar-CS1-YFP ist in Filopodien lokalisiert (Pfeilspitzen). **(E)-(J)** Ar-CS1-YFP und Aktin wurden immunogefärbt. Gezeigt sind die Bilder aus dem "Alexa Fluor® 488-Kanal" sowie die jeweiligen Überlagerungen beider Fluoreszenzkanäle. Ar-CS1-YFP ist in das Aktincytoskelett eingelagert (Kreise) sowie mit Aktin kolokalisiert (geschlossene Pfeilspitzen). Im Cortex ist auch Ar-CS1-YFP lokalisiert (offene Pfeilspitzen). Die Zellen in **(I)/(J)** wurden in Gegenwart von 0,01 mg/ml Lysozym kultiviert.

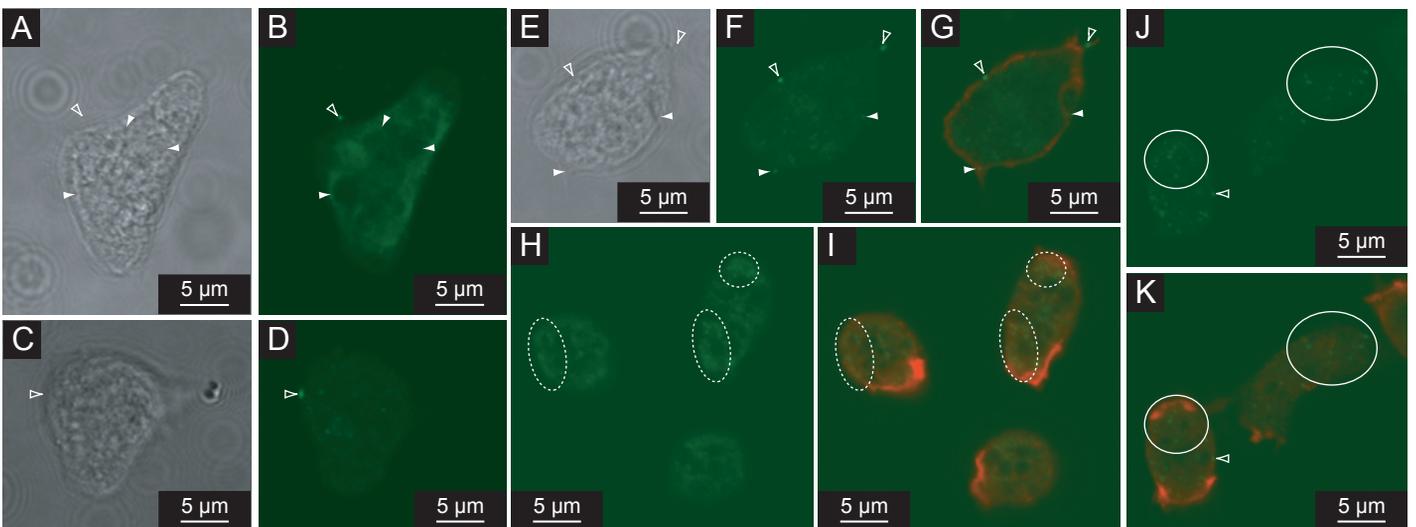


Fig. 3.27.: Verteilung der Ar-CS1-YFP in der Zelllinie dcsArCS1-YFP

Fig. 3.27.: Verteilung der Ar-CS1-YFP in der Zelllinie dcsArCS1-YFP

Das Verteilungsmuster der Ar-CS1-YFP wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht. Das grün gefärbte Fluoreszenzsignal des Alexa Fluor® 488 repräsentiert Ar-CS1-YFP und das rot gefärbte Signal von Cy3 repräsentiert Aktin. **(A)-(D)** Ar-CS1-YFP wurde immunogefärbt. **(E)-(K)** Ar-CS1-YFP und Aktin wurden immunogefärbt. **(A)/(B)** Ar-CS1-YFP ist unstrukturiert verteilt. Geschlossene Pfeilspitzen kennzeichnen Stellen innerhalb der Zellen ohne Ar-CS1-YFP. An einer Stelle ist in einem Filopodium Ar-CS1-YFP (offene Pfeilspitze). **(C)/(D)** Ar-CS1-YFP ist globulär strukturiert verteilt. Die Pfeilspitze markiert eine Stelle am Zellrand mit einem intensiveren Fluoreszenzsignal. **(E)-(G)** Ar-CS1-YFP ist im Cortex mit Aktin kolokalisiert (geschlossene Pfeilspitzen). Ar-CS-YFP ist am Zellrand bzw. in einem Filopodium lokalisiert (offene Pfeilspitzen). **(H)/(I)** Ar-CS1-YFP ist in das Aktincytoskelett eingelagert. Die leichte Gelbfärbung repräsentiert eine Kolokalisation von Ar-CS1-YFP und Aktin (gestrichelte Kreise). **(J)/(K)** Ar-CS1-YFP ist innerhalb der Zellen in das Cytoskelett eingelagert (Kreise) und zum Teil am Zellrand lokalisiert (offene Pfeilspitze).

3.4.3. Untersuchung der Membranfraktionen der Zelllinien mit Ar-CS1-YFP

Um den Einbau der Ar-CS1-YFP in die Plasmamembran der *D. discoideum*-Zellen zu untersuchen, wurden Membranfraktionen der Zelllinien Ax3ArCS1-YFP und der dcsArCS1-YFP präpariert (s. 3.4.3.1.). Die Membranfraktionen wurden für die Bindung an Silikatkugeln (s. 3.4.3.2.) und für einen Aktivitätstest (s. 3.4.3.3.) eingesetzt.

3.4.3.1. Membranpräparation von Zelllinien mit Ar-CS1-YFP

Die Membranpräparationen wurden wie in 2.2.9.1. beschrieben durchgeführt. Im Pellet der 1000 × g-Zentrifugation sollten sich Zellwände und nicht lysierte Zellen befinden. Der Überstand wurden nochmals bei 54.000 × g zentrifugiert. Der Überstand der 54.000 × g-Zentrifugation sollte Vesikel enthalten. Das bei der 54.000 × g-Zentrifugation entstandene Membran-enhaltende Pellet bildete zwei Phasen aus: ein farbloses Gel und eine obere rötliche Fraktion.

Mittels SDS-PAGE wurden die Pelletfraktionen und die Überstände der beiden Zentrifugationen untersucht. Als Negativkontrolle wurden in gleicher Weise behandelte Fraktionen von Ax3-orf+ bzw. von dcsA- aufgetragen.

Die Proben wurden zunächst mit SDS-Probenpuffer (s. 2.1.3.) versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Auf den Gelspuren waren wegen des starken Hintergrundes von Lipiden und Zuckern keine definierten Proteinbanden zu sehen. Deshalb wurden verschiedene Probenpräparationen getestet. Die Proben wurden in 2× Laemmli (s. 2.1.3.), der mehr SDS als der SDS-Probenpuffer enthält, aufgenommen. Dann wurden sie vor dem Aufkochen in 2× Laemmli auf 0,5% Triton X-100 gebracht. Außerdem wurden die Pellets in 125 mM Tris (pH7) mit 1% SDS, in 125 mM Tris (pH7) mit 1% SDS und mit 2,5% β-Mercaptoethanol bzw.

in 8 M Harnstoffpuffer aufgenommen. Die Überstände wurden auf 1% SDS, auf 1% SDS mit 0,25% β -Mercaptoethanol bzw. auf 0,8 M Harnstoff gebracht. Diese Proben wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert und dann 5 min lang bei $16.100 \times g$ zentrifugiert. Die Überstände dieser Zentrifugation wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Polyacrylamidgel mit 2 \times Laemmli versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die besten Ergebnisse wurden mit den mit SDS behandelten Proben erzielt. Anstatt die Proben in 2 \times Laemmli mit 95°C aufzukochen, wurde auch getestet, sie 15 min bei 37°C zu inkubieren.

In Fig 3.28. A-C sind die Analysen von Membranfraktionen einer Präparation mit Ax3ArCS1-YFP dargestellt. Die Bande der Ar-CS1-YFP ist in der Höhe von 290 kDa zu erwarten. Bei der Kontrollpräparation mit Ax3-orf+ wurde auch ein *D. discoideum*-Protein in der Größe von Ar-CS1-YFP nachgewiesen. Nur in der Spur, in der das obere $54.000 \times g$ -Pellet von Ax3-orf+ aufgetrennt wurde, ist keine Proteinbande von 290 kDa zu sehen. Alle Membranfraktionen der Ax3ArCS1-YFP einschließlich dem $54.000 \times g$ -Pellet zeigen eine Bande bei 290 kDa. Alle Fraktionen aus dcsArCS1-YFP enthalten ebenfalls Proteine von 290 kDa. Nur in dem oberen rötlichen und dem unteren gelartigen $54.000 \times g$ -Pellet von dcsA- konnten keine Proteine von 290 kDa detektiert werden. Bei den dcsArCS1-YFP-Zelllinien sind jedoch auch in diesen Pellets Banden in Größe der Ar-CS1-YFP zu sehen (s. Fig. 3.28. D/E). Die Analyse der unteren Pellets weist hier Doppelbanden auf.

Die Nachweisgrenze der Banden in Höhe von 290 kDa liegt im Bereich der Silberfärbung (ca. 1 ng pro Bande).

Mittels Westernblot sollte Ar-CS1-YFP über den YFP-Tag spezifisch nachgewiesen werden. Zunächst wurde nach Protokoll auf PVDF-Membranen für 1h 20 min geblottet. Da keine Bande spezifisch detektiert werden konnte, wurden die Blotbedingungen variiert. Die Probenvorbereitung wurde wie oben beschrieben geändert. Da Ar-CS1-YFP ein relativ großes Protein ist, wurde die Zeit für den Transfer des Proteins auf die Membran auf 4 Stunden verlängert. Um die Auflösung und Solubilität des hydrophoben Membranproteins zu erhöhen, wurde dem Blotpuffer 0,1% SDS (s. 2.1.3.) zugefügt. Bei Nitrocellulosemembranen sollte die Bindung trotz Detergenz besser sein als bei PVDF-Membranen. Daher wurde für 4 Stunden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Da eventuell die Proteinmenge auf den Membranen unter der Nachweisgrenze des Antikörpers liegt, wurden die Proben für eine Aufkonzentrierung mit MeOH/HCCl₃ (s. 2.2.3.3.) gefällt. Die Proben bildeten jedoch auf dem Gel einen undefinierten Hintergrund.

Da bei der Immunfluoreszenz mit Zelllinien aus Schüttelkulturen wenig Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte (s. 3.4.2.), wurden im Folgenden größere Kulturmengen mit in Petrischale kultivierten Zellen hergestellt, die vermutlich Ar-CS1-YFP reproduzierbarer exprimieren. $2,1 \cdot 10^8$ Zellen wurden geerntet und in 1,2 ml Lysepuffer resuspendiert und mit 0,5% Triton X-100 lysiert. Die Lysate wurden 45 min bei $14.000 \times g$ zentrifugiert. Überstände

und Pellets wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Intensität der Banden bei 290 kDa konnte nicht verstärkt werden.

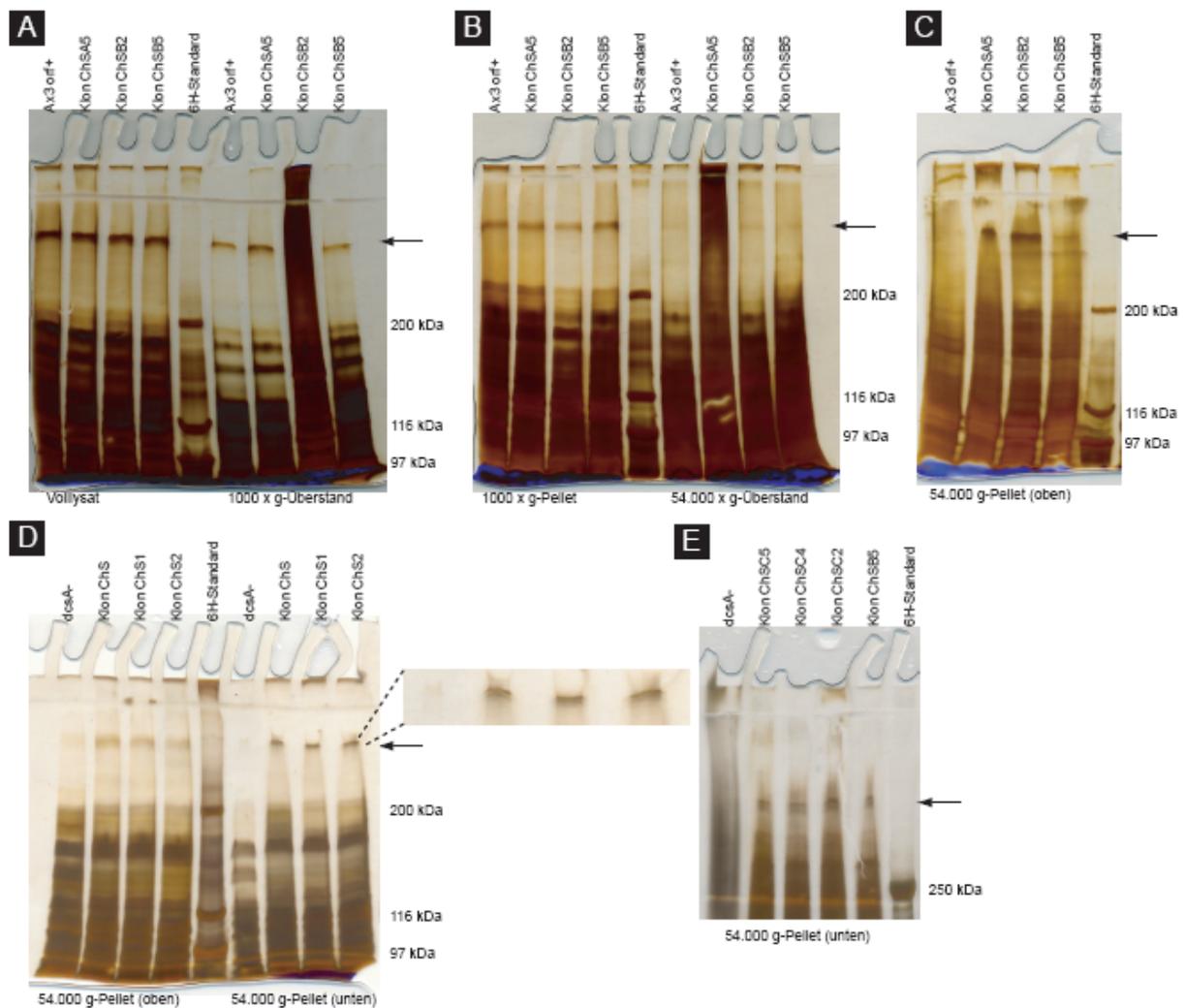


Fig. 3.28.: Analyse der Fraktionen der Membranpräparationen von Zelllinien mit Ar-CS1-YFP

Die 5% SDS-Polyacrylamidgele wurden nach dem Gellauf silbergefärbt. **(A)-(C)** Jede Fraktion von einer Membranpräparation mit Ax3-orf+ und mit Ax3ARCS1-YFP wurde analysiert. Pfeile markieren die von Ar-CS1-YFP zu erwartenden Höhe von etwa 290 kDa. Nur in der Spur mit dem oberen 54.000 × g Pellet von Ax3-orf+ ist keine Bande dieser Höhe zu sehen. **(D)/(E)** Hier wurden die 54.000 × g-Pellets einer Membranpräparation von dcsA- und dcsArCS1-YFP untersucht. Die Proteine auf dem Gel in **(E)** wurden länger elektrophoretisch getrennt. Bei den dcsA- konnte kein Protein von 290 kDa nachgewiesen werden. In den Spuren mit den unteren Pellets der Zelllinien ist eine Doppelbande zu sehen (vgl. Vergrößerung in **(D)** und Bild **(E)**).

3.4.3.2. Bindung von Membranfraktionen an Silikatkugeln

Eine Immobilisierung der Membranfraktionen aus dem 1000 × g Überstand und aus dem Pellet der 54.000 × g-Zentrifugation an Silikatkugeln sollte zu einer Anreicherung von Membranfragmenten führen. Die Proteinzusammensetzung der an glatten und porösen

Kugeln immobilisierten Membranen wurde mittels SDS-PAGE und mittels Westernblot auf die transmembrane Ar-CS1-YFP hin untersucht.

Es wurden verschiedene Silikatkugeln (s. 2.2.9.3.) getestet, weil nicht bekannt war, an welche Kugeln die Membranen am besten binden können. Die Membranproteine an den Kugeln wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Fig. 3.29). An den glatten, so genannten „solid beads“ sind insgesamt weniger Proteine nachweisbar. Der Proteingehalt an den porösen Nucleoprep und an den porösen Nucleosil ist etwa gleich. Bei den an die Kugeln gebundenen Proteinen konnte ein Protein in Größe der Ar-CS1-YFP (290 kDa) nachgewiesen werden. Dieses Protein wurde jedoch auch bei der Ax3-orf+ bzw. dcsA-Kontrolle nachgewiesen. Die Intensität der Banden zu vergleichen ist problematisch, da auch die Banden der anderen Proteine nicht gleiche Intensität aufweisen. In Fig. 3.29. A sind die an „solid beads“ und an „NUCLEOSIL 4000/10“ gebundenen Proteine aus den 1000 × g-Überständen von Präparationen der Ax3ArCS1-YFP aufgetrennt zu sehen. Nur bei zwei Zelllinien konnte die Bindung von einem 290 kDa großen Protein an die „solid beads“ nachgewiesen werden. Allerdings war der Proteingehalt an den Kugeln hier allgemein größer. Auf „NUCLEOSIL 4000/10“ war bei jeder Zelllinie und bei den Ax3orf+ ein Protein von 290 kDa zu finden. Die Membranfraktionen aus den 54.000 g x -Pellets wurden mit den „solid beads“ inkubiert. Eine Analyse zeigte bei allen bei allen Fraktionen ein 290 kDa großes Protein (s. Fig. 3.29. B). Die Ax3ArCS1-YFP ChS1A3, ChS1A5, ChS13 und ChS15 wurden in Gegenwart von Lysozym kultiviert. Sie unterscheiden sich bezüglich der Proteinzusammensetzung nicht von den anderen Ax3ArCS1-YFP. In Fig. 3.29. C wurden die an „solid beads“ gebundenen Membranproteine aus 54.000 × g-Pellets von dcsArCS1-YFP analysiert. Nur in der Spur mit den Membranproteinen aus dcsA- ist keine Bande bei 290 kDa zu sehen. Allerdings ist in dieser Probe der Proteingehalt allgemein geringer.

Die Proben, die auf dem in Fig. 3.29. A abgebildeten SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, wurden auch mittels Westernblot analysiert. Bei den Proben der Ax3ArCS1-YFP sind sehr schwache Banden in Höhe von 290 kDa zu sehen.

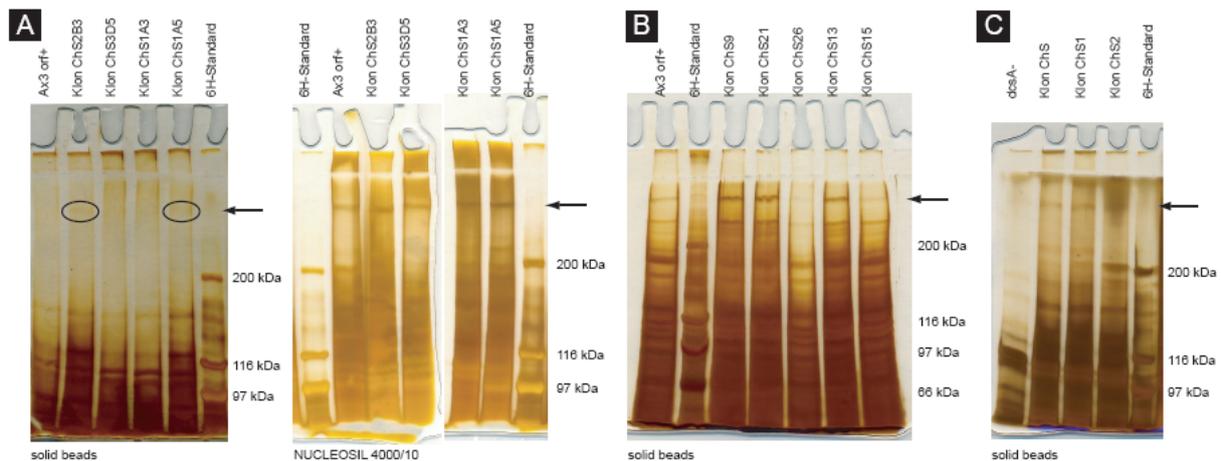


Fig. 3. 29.: Analyse der an Silikatkugeln gebundenen Proteine

Die 5% SDS-Polyacrylamidgels wurden silbergefärbt. **(A)** Die 1000 × g Überstände einer Membranfraktion von Ax3ArCS1-YFP und von Ax3-orf+ wurden mit „solid beads“ sowie mit „NUCLEOSIL 4000/10“ inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden analysiert. Bei den „solid beads“ sind nur bei zwei Zelllinien Banden in Höhe der Ar-CS1-YFP (Kreise). Bei den „NUCLEOSIL 4000/10“ sind Banden in dieser Höhe in allen Spuren. **(B)** Die an „solid beads“ gebundenen Proteine aus 54.000 × g-Pellets von Ax3 orf und ArCS1-YFP wurden analysiert. Die Bande in Höhe der Ar-CS1-YFP ist auch beim Ax3-orf+ zu sehen (Pfeil). **(C)** Hier wurden die an „solid beads“ gebundenen Proteine, die aus 54.000 × g-Pellets von dcsA- (1. Spur von links) und dcsArCS1-YFP stammen, aufgetrennt. Nur bei den Spuren der transformierten Zelllinien ist jeweils eine Bande in Höhe der Ar-CS1-YFP zu sehen. Bei dcsA- ist der Proteingehalt allgemein etwas geringer.

3.4.3.3. Radioaktiver Aktivitätstest mit Membranfraktionen

Mit Hilfe eines sensitiven, radioaktiven Tests (s. 2.2.9.2.) wurden die Aktivitäten der Ar-CS1-YFP in Membranfraktionen untersucht. Es wurden die Pellets der 1.000 × g-Zentrifugation und der 54.000 × g-Zentrifugation sowie die Überstände der 54.000 × g Zentrifugation aus Membranpräparationen (s. 3.4.3.1.) untersucht. Als Negativkontrolle wurde der Test mit den entsprechenden Fraktionen einer Membranpräparation von Ax3-orf+ und mit 100 µg BSA durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden 10 µl eines 54.000 × g-Pellets einer Membranpräparation aus *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen verwendet. Die Proben wurden kurz mit Trypsin behandelt, bevor die Polymerisationsmischung mit UDP-¹⁴C-GlcNAc zugegeben wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2% SDS gestoppt. Die Proben waren über die Filter mit einer Porengröße von ≥ 1,2 µm sehr schlecht abfiltrierbar. Um die Filtrierbarkeit zu erhöhen, wurden die Proben mit dem SDS ÜN inkubiert. Zum Teil wurde zusätzlich 0,5% Triton X-100 zugefügt.

Nur bei den Pellets der 54.000 × g -Zentrifugationen, die die Membranen enthalten sollten, wurde im Vergleich zu Ax3-orf+ bei den transformierten Zelllinien eine größere Radioaktivität gemessen. Es wurden drei Messreihen unabhängig voneinander durchgeführt. Die

Messwerte sind im Anhang (s. 6.4.) aufgelistet. Von den Werten wurde das Hintergrundsignal des Szintillationscocktails abgezogen. In Fig. 3.30. sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Messreihen grafisch dargestellt. Der deutliche Unterschied der gemessenen Radioaktivität zwischen den mit der Chitinsynthese Ar-CS1-YFP transformierten Zelllinien (167 ± 112 cpm bzw. 91 ± 48 cpm) und Ax3-orf+ (43 ± 34 cpm) deutet auf eine Aktivität der Ar-CS1-YFP hin. Die Zelllinie ChS 3C4 war in Gegenwart von 0,01 mg/ml Lysozym kultiviert worden. Die Membranfraktion dieser Zelllinie synthetisierte weniger radioaktives Polymer als die der Zelllinie ChS 2A4, die ohne Lysozym kultiviert worden war.

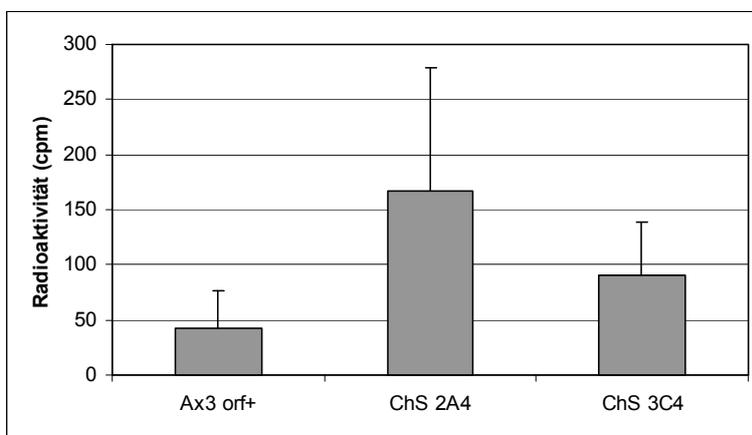


Fig. 3.30.: Quantitative Messung der Radioaktivität von ^{14}C -Chitinpolymeren

Der Test wurde mit pelletierten Membranfraktionen aus der $54.000 \times g$ Zentrifugation von Ax3-orf+ und Ax3ArCS1-YFP durchgeführt. Der deutliche Unterschied der gemessenen Radioaktivität in den Proben aus zwei verschiedenen Zelllinien ChS 2A4 und ChS 3C4 im Vergleich zur Probe aus Ax3-orf+ deutet auf eine Aktivität der Ar-CS1-YFP hin.

3.4.4. Untersuchung der *in vivo*-Chitinsynthese

Wenn Ar-CS1-YFP in den *D. discoideum*-Zellen Chitinfragmente *in vivo* synthetisiert, sollten diese Chitinfragmente sich an der Zelloberfläche oder auch im Kulturüberstand befinden. Um zellulär assoziierte Chitinfragmente nachzuweisen, wurden die Zellen mit Calcofluor White oder mit GFP-getaggttem Chitinbindeprotein (CBGFP) gefärbt. Zur Detektion von Chitinfragmenten im Medium wurden die Chitinfragmente durch Filtration aus dem Kulturüberstand angereichert und anschließend mit GFP-getaggttem Chitinbindeprotein behandelt.

Mit 2% Formaldehyd in MeOH fixierte Ax3-orf+ und Ax3ArCS1-YFP Zellen wurden mit Calcofluor White gefärbt (s. 2.2.5.). Bei Ax3ArCS1-YFP konnte im Vergleich zu der Fluoreszenz der Ax3-orf+ ein intensiveres Fluoreszenzsignal direkt im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Dieser Unterschied wurde von verschiedenen Personen bestätigt.

Jedoch mussten die Messungen und die Bildaufnahme am Mikroskop optimiert werden, um diesen Unterschied deutlich abbilden zu können. Nachdem die optimale Belichtungszeit von 40 ms ermittelt worden war, wurden alle Proben in gleicher Weise vermessen. Jede Probe wurde fokussiert und so schnell wie möglich aufgenommen. So wurde sichergestellt, dass alle Proben gleich behandelt wurden. Die Darstellung in Fig. 3.31. entspricht den Originaleinstellungen am Mikroskop. Wurden die Zelllinien in Gegenwart von Lysozym kultiviert, wurde auch ein stärkeres Fluoreszenzsignal beobachtet, als bei nicht-transformierten Ax3-orf+, die mit Lysozym behandelt wurden.

Um die Aktivität der Ar-CS1-YFP möglicherweise zu steigern, wurden Zelllinien Ax3ArCS1-YFP bzw. dcsArCS1-YFP und zur Kontrolle Ax3-orf+ bzw. dcsA- in 24 well-Titerplatten in je 1 ml Medium mit 5 mM UDP-GlcNAc kultiviert. Außerdem wurde jede Kultur auch einmal mit 100 μ M Nikkomycin Z, einem kompetitiven Chitinsynthaseinhibitor, behandelt. Nach drei Tagen wurde ein Teil der Zellen mit 2% Formaldehyd fixiert, mit BSA blockiert und mit CBGFP gefärbt (s. 2.2.6.). Von jeder Probe wurden im konfokalen Mikroskop ca. 100 Zellen auf Fluoreszenz hin kontrolliert. Es gab keinen erkennbaren Unterschied zwischen Ax3-orf+ und Ax3ArCS1-YFP. Bei den dcsArCS1-YFP, die nur mit UDP-GlcNAc behandelt worden waren, waren 2-3% der Zellen fluoreszierend (s. Fig. 3.32. C/D). Bei dem Kontrollansatz mit dcsA- (s. Fig. 3.32. A/B) und bei den mit Nikkomycin Z behandelten Proben wurden bei gleichen Einstellungen am konfokalen Mikroskop keine fluoreszierenden Zellen gefunden. Das Signal ist vorwiegend am Zellrand lokalisiert (s. Fig. 3.32. E-H).

Der Kulturüberstand wurde über zentrifugierbare Filtereinheiten mit einer Porengröße von 0,22 μ m filtriert, wobei größere Chitinfragmente im Filter zurückbleiben sollten. Um sicherzustellen, dass keine Zellen in die Filtereinheiten überführt werden, wurde der abgenommene Kulturüberstand mit 1000 \times g für eine Minute zentrifugiert. Material in den Filtern wurde mit BSA blockiert und mit CBGFP inkubiert. Mittels Westernblot wurde untersucht, ob ein Teil des CBGFP an Chitin gebunden im Filter zurückgeblieben ist. Als Negativkontrolle wurde jeweils dcsA- mitgeführt (s. 2.2.9.6.).

In Fig. 3.33. ist die Analyse von Chitinfragmenten aus dem Kulturüberstand einer dcsA- und einer dcsArCS1-YFP Kultur dargestellt. Zur Kontrolle wurde auf dem Westernblot jeweils auch das ungebundene CBGFP (U) aus dem Filtrat untersucht. In allen Ansätzen hat CBGFP an Material, das in den Filtern zurückgeblieben war, gebunden. Die Banden in den entsprechenden Spuren (B) unterscheiden sich jedoch in der Intensität. Densitometrisch wurden die Proteinmengen aus der Westernblotanalyse abgeschätzt (s.2.2.3.7.). Genormt wurde auf eine Menge von 2,5 μ g CBGFP, die als Positivkontrolle im Westernblot diente. Die Zelldichte der einzelnen Kulturen war zuvor bestimmt worden:

	Kultur mit UDP-GlcNAc	Kultur mit UDP-GlcNAc und Nikkomycin Z
CBGFP-Nachweis bei dcsA-	$1,33 \cdot 10^6$ Zellen/ml	$1,30 \cdot 10^6$ Zellen/ml
CBGFP- Nachweis bei ChSB5	$1,78 \cdot 10^6$ Zellen/ml	$1,83 \cdot 10^6$ Zellen/ml

Die abgeschätzten Mengen an CBGFP wurden auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml extrapoliert und in Fig. 3.34. graphisch dargestellt.

Im Vergleich zu den Proben der dcsA- Kultur wurde bei den Proben der dcsArCS1-YFP (ChSB5) mehr CBGFP nachgewiesen. Dies ist ein Hinweis auf die Bildung von Chitinfragmenten, die von den Zelllinien in den Kulturüberstand abgegeben wurden. Bei der Zelllinie ChSB5 beeinflusst die Zugabe von Nikkomycin Z die Synthese der Chitinfragmente nicht. Entgegen der Erwartung wurde auch Bindung von CBGFP an Material aus dem Kulturüberstand der in Gegenwart von UDP-GlcNAc kultivierten dcsA- Zellen beobachtet. Hier wurde jedoch weniger gebundenes CBGFP nachgewiesen als bei den Proben der transformierten Zelllinie. Allerdings wurde in der Probe der dcsA-, die mit Nikkomycin Z behandelt wurden, etwa die doppelte Menge an CBGFP wie in der Probe der nicht mit Nikkomycin Z behandelten dcsA- detektiert. Nicht bei allen Testansätzen konnte in den Filtern zurückgebliebenes CBGFP nachgewiesen werden.

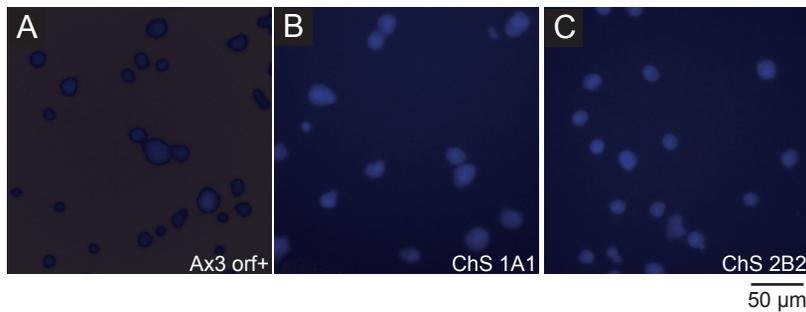


Fig. 3.31.: Färbung von Ax3-orf+ und Ax3ArCS1-YFP mit Calcofluor White
(A) Ax3-orf+ **(B)/(C)** Ax3ArCS1-YFP. Fixierte Zellen wurden mit Calcofluor White gefärbt. Bei Ax3ArCS1-YFP ist das bei gleicher Belichtungszeit gemessene Fluoreszenzsignal stärker als bei Ax3-orf+.

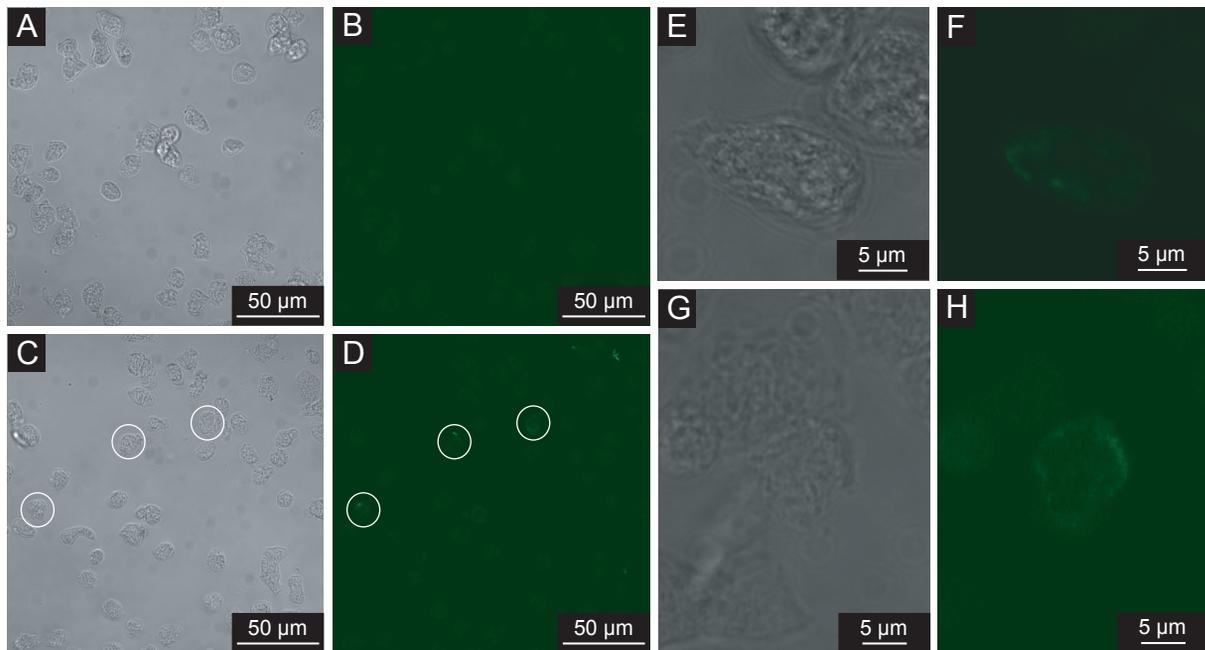


Fig.: 3.32.: Färbung von dcsA- und dcsArCS1-YFP mit GFP-getagtem Chitinbindeprotein (CBGFP)
 Das Fluoreszenzsignal des CBGFP ist grün dargestellt. **(A)/(B)** Im gesamten dcsA- Präparat war keine stärker fluoreszierende Zelle als in diesem Bildausschnitt zu sehen. **(C)/(D)** Bei dcsArCS1-YFP zeigten drei Zellen (Kreise) deutlich intensivere Fluoreszenz. **(F)-(H)** Zwei Zellen der Linie dcsArCS1-YFP sind vergrößert dargestellt. Das Signal des CBGFP wurde vorwiegend am Zellrand detektiert.

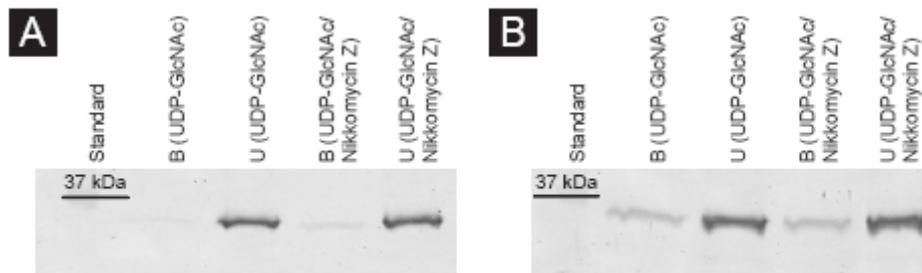


Fig. 3.33.: Nachweis von Chitinfragmenten im Medium

dcsA- (**A**) sowie die *dcsArCS1-YFP* (ChSB5) (**B**) wurden in Gegenwart von 5 mM UDP-GlcNAc sowie von 5 mM UDP-GlcNAc und 100 μ M NikkomycinZ kultiviert. Durch Filtration aus dem Kulturüberstand abgetrennte Chitinfragmente wurden mit CBGFP gefärbt. Auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel wurden gebundenes CBGFP (B) und das nicht gebundene (U) aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Bei der Zelllinie ChSB5 wurde mehr gebundenes CBGFP detektiert. Dies deutet auf eine Synthese von Chitinfragmenten hin.

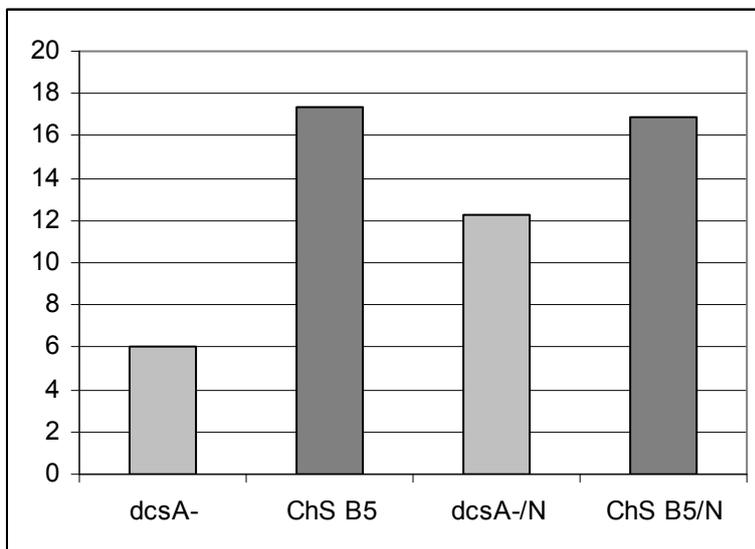


Fig. 3.34. Abschätzung der Mengen von an Material aus dem Kulturüberstand gebundenem CBGFP
dcsA- und *dcsArCS1-YFP* (ChS B5) wurden ohne sowie mit Nikkomycin Z (N) kultiviert. Die Mengen an gebundenem CBGFP auf dem Westernblot (s. Fig. 3.33.) wurden abgeschätzt und auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml extrapoliert.

3.4.5. Abbildung der *D. discoideum*-Zellen mittels Rasterkraftmikroskopie

Bei der Aufnahme von fixierten Zellen mit dem AFM kann man eine höhere Auflösung erreichen als bei der Aufnahme lebender Zellen. Zunächst wurden die *D. discoideum* mit 4% Paraformaldehyd in 1 \times PBS auf Objektträgern aus Glas fixiert. Da die *D. discoideum* bei der Messung von der abbildenden Feder verschoben wurden, wurden andere Fixierungsmethoden getestet. Dabei sollte die Zellmembran möglichst nicht durch Dehydration verändert werden. Die besten Ergebnisse wurden mit Zellen erzielt, die auf Polysine[®]-Objektträger (Roth, Karlsruhe) mit 4% Glutaraldehyd in 1 \times PBS oder mit 4%

Paraformaldehyd in 1× PBS fixiert wurden. Entscheidend war auch die Dauer der Fixierung. Wenn über mehrere Wochen fixiert wurde, wurde die Zellstruktur stark verändert. Um eine ausreichend gute Fixierung zu erzielen, musste 12 h fixiert werden. Die Objektträger mussten vor der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung der Zellen kräftig mit 1× PBS gewaschen werden, um nicht fixierte Zellen zu entfernen.

Die Abbildung der Zellen erfolgte in 1× PBS, um eine Dehydratation der Zellen zu verhindern.

Da die *D. discoideum* keine harte Zelloberflächen aufweisen und leicht durch die Feder verschoben wurden, wurden relativ weiche Federn mit folgenden Federkonstanten getestet: MLCT-Microlever Probes (20 nN/m) und MicroCantilever (6,3 pN/nm), die jeweils Abbildungsspitzen mit großem Krümmungsradius haben. Mit MLCT-Microlever Probes (Veeco Instruments, Mannheim) war es möglich, Aufnahmen mit möglichst geringer Kraft zu erzielen.

Folgende zwei Modi, der Kontaktmodus und der intermittierende Kontaktmodus, eignen sich für Zellen am besten. Bei dem Kontaktmodus bleibt die Feder in ständigem Kontakt mit der Probe. Mit diesem Modus können Cytoskelettstrukturen unter der Zelloberfläche und Zellen mit tiefen Rändern gut abgebildet werden. Allerdings können die Zellen leichter lateral in der Scanrichtung verschoben werden. Während der Messung muss ständig überprüft werden, dass die Einstellungen optimal bleiben und sich die angelegte Kraft nicht aufgrund der Deflektionsdrift vergrößert. Bei dem intermittierenden Kontaktmodus oszilliert die Feder und berührt die Probe am niedrigsten Punkt der Oszillation. Die laterale Kraft ist niedriger als im Kontaktmodus, da die Feder nicht andauernd die Probe berührt. Der intermittierende Kontaktmodus wurde ausprobiert, weil mit diesem Modus die Zellen eventuell nicht verschoben werden. Dies blieb erfolglos. Für die Abbildungen wurde also der Kontaktmodus verwendet, der ohnehin weniger anfällig gegen Komplikationen auf Grund der adhäsiven Zelloberfläche der *D. discoideum* ist. Bei der Abbildung wurde der Setpoint so eingestellt, dass er gerade ausreichend war, um in Kontakt mit der Probe zu bleiben. Dazu wurde er solange heruntergeregelt, bis sich die Feder von der Probe ablöste, um ihn dann wieder knapp zu erhöhen, so dass die angelegte Kraft möglichst niedrig war. Während der Aufnahme wurde der Setpoint ständig so herunterreguliert, dass die angelegte Kraft nicht aufgrund der Deflektionsdrift zunimmt. Es wurde eine niedrige Scanrate von 0,2 Hz eingestellt, um die vergleichsweise hohen Zellen mit guter Auflösung abbilden zu können.

Trotz dieser Optimierung der Einstellungen wurden Artefakte abgebildet. Werden beispielsweise weiche und adhäsive Bereiche mit der Abbildungsspitze bewegt, entstehen Artefakte. Die Bereiche sind leicht zu erkennen, weil an diesen die Höhengsignle in den Bildern der Hin- und Rückbewegung der Feder in engegesetzte Richtungen zeigen. Bei dcsA- Zellen, die keine Cellulose synthetisieren können, traten diese Artefakte weniger häufig auf.

Zellen mit Ar-CS1-YFP wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewählt. Mit Glutaraldehyd fixierte Zellen autofluoreszierten. Um ein Ausbleichen des YFP zu verhindern, wurden die Zellen im Dunkeln mit 4% Paraformaldehyd in 1× PBS fixiert und mikroskopiert. Obwohl mit Immunfluoreszenz im konfokalen Mikroskop gezeigt worden war, dass alle Zellen einer Zelllinie Ar-CS1-YFP exprimieren, konnten bei diesem Versuchsaufbau nur wenige fluoreszierende Zellen gefunden werden. Wurden diese Zellen mit dem AFM abgebildet, wurden sie durch die Abbildungsspitze der Feder verschoben.

In Fig. 3.35. sind zwei dcsA-Zellen und in Fig. 3.36. zwei dcsArCS1-YFP-Zellen abgebildet. Die Bilder wurden mit 1024 x 1024 Pixel² aufgenommen. Im Bild des Fehlersignals sind Strukturen besser zu erkennen. In **(A)** ist jeweils das Höhenbild und in **(B)** das Fehlersignal dargestellt. Die *D. discoideum* waren bis zu 7 µm hoch. Die Zellen waren zum Teil so hoch, dass die Feder mit den hohen Strukturen interagiert, bevor die Abbildungsspitze der Feder die Zelloberfläche berührte. Dies führte zu Artefakten, die in Fig. 3.35. **(A)** und **(B)** mit Pfeilspitzen markiert sind. Durch adhäsive Stellen verursachte Artefakte sind mit Ellipsen gekennzeichnet. Es gibt einzelne auswertbare Bereiche. Diese sind vergrößert dargestellt. Die Zelloberflächen der dcsA- und der dcsArCS1-YFP sind uneben. Die Vertiefungen sind unregelmäßig. Bei dem dcsA- erscheint im Vergleich zu den dcsArCS1-YFP die Feinstruktur glatt. In den Profilen sind Unebenheiten im unregelmäßigen Abstand zu sehen. Die Feinstruktur der Zelloberfläche der dcsArCS1-YFP erscheint über große Bereiche homogen körnig (Fig. 3.36. **(C)-(F)**). Diese Körner sind in Fasern angeordnet. In Fig. 3.36. **(E)** ist gezeigt, dass die Fasern über einen größeren Bereich einheitlich in eine Richtung zeigen (Ellipse). Der Abstand der Körner ist weniger als 250 nm. Damit ist der Abstand kleiner als bei den Erhöhungen der dcsA-.

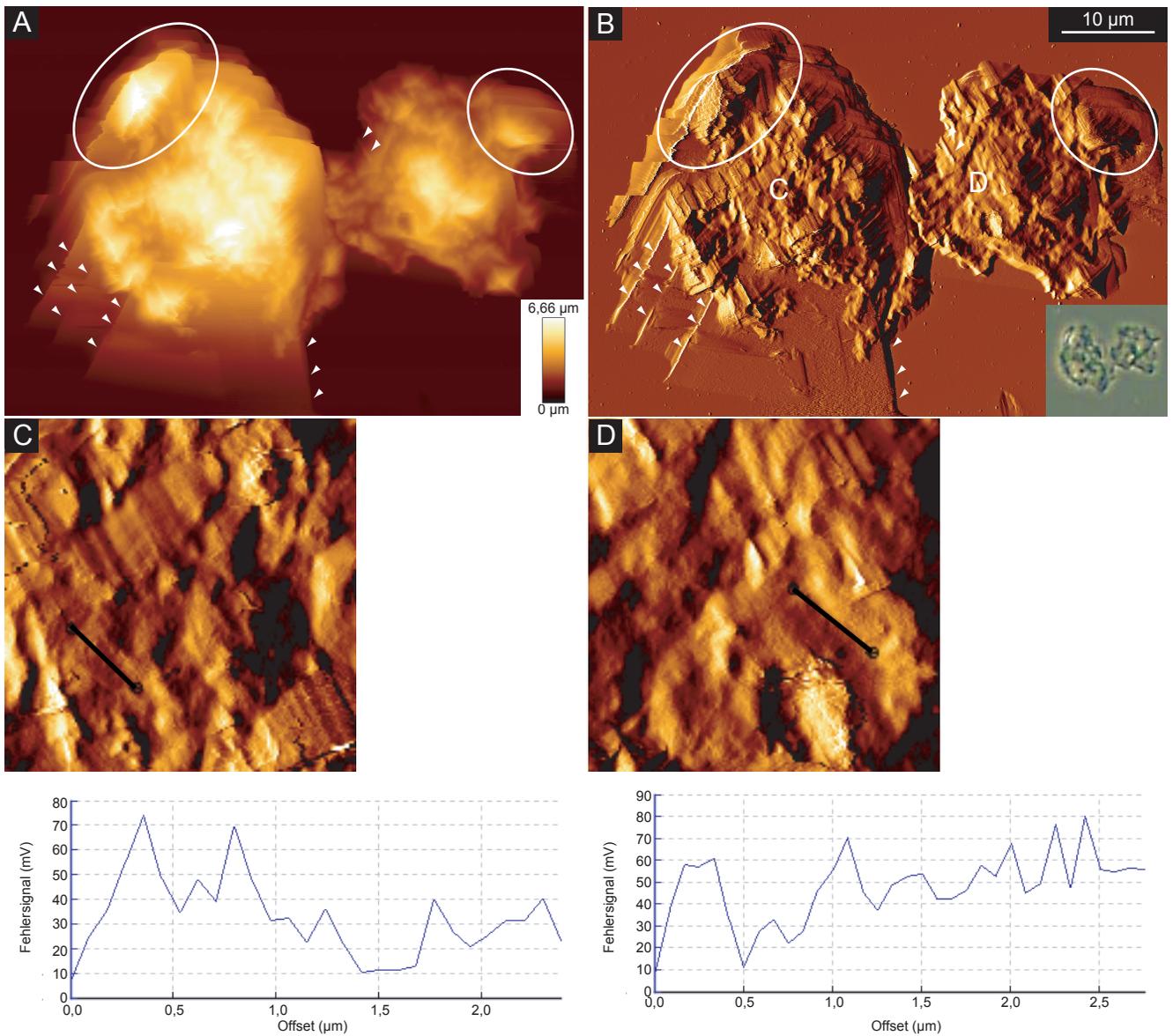


Fig. 3.35.: Untersuchung der Oberfläche von *dcsA*- mittels Rasterkraftmikroskopie
(A) ist das Höhenbild und **(B)** das Bild des Fehlersignals. Die durch Pfeilspitzen und Ellipsen gekennzeichneten Stellen sind Artefakte. Auswertbare Stellen des Bilds des Fehlersignals **(B)** sind vergrößert in **(C)** und **(D)** dargestellt. Die Oberfläche ist uneben. Das Profil **(E)** entlang der in **(C)** markierten Linie zeigt Erhöhungen in unregelmäßigen Abstand in der Feinstruktur. Ein ähnliches Profil **(F)** zeigt sich an einer anderen Stelle **(D)**.

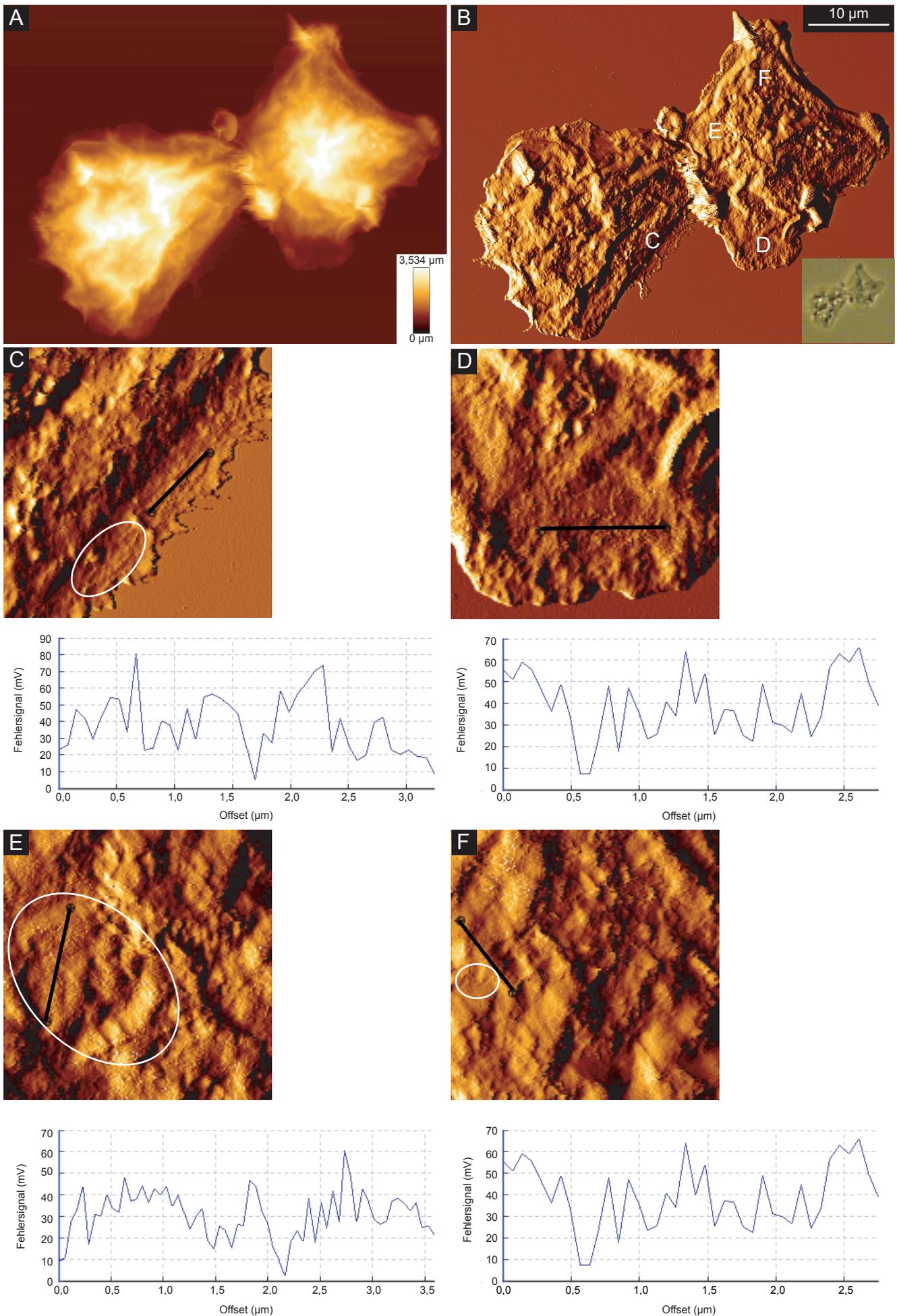


Fig. 3.36. Untersuchung der Oberfläche von dcsArCS1-YFP Zellen mittels Rasterkraftmikroskopie
(A) ist das Höhenbild und **(B)** das Bild des Fehlersignals. Verschiedene Stellen des Bilds des Fehlersignals sind vergrößert dargestellt **(C)-(F)**. Die Oberfläche ist uneben. Die Feinstruktur erscheint homogen körnig. Diese Körner sind in Fasern angeordnet (Ellipsen). Die Profile entlang der in den Bildern markierten Linien zeigen, dass der Abstand zwischen den Körnern weniger als 250 nm beträgt.

4. Diskussion

4.1. Evolutionäre Beziehung von Ar-CS1 zu den bekannten Chitinsynthesen

Die Chitinsynthase aus *Atrina rigida* sowie die Chitinsynthesen aus *Mytilus galloprovincialis* und *Pinctada fucata* sind die ersten bekannten Chitinsynthesen aus Invertebraten, die eine Myosinmotordomäne enthalten. Insgesamt hat die Ar-CS1 zu 78% identische Aminosäuren mit der Pf-CHS1 und zu 72% identische Aminosäuren mit der Mg-CS1.

Die phylogenetische Studie kann die Einzigartigkeit der Molluskenchitinsynthesen auf Grund der Myosindomäne in Kombination mit einer komplexen Transmembranstruktur herausstellen.

Die Molluskenchitinsynthesen bilden eine eigene Gruppe. Auch die Myosindomänen der Molluskenchitinsynthesen sind phylogenetisch von den bisher bekannten Myosindomänen getrennt. Introns innerhalb der Übergangssequenz zwischen Myosindomäne und Chitinsynthesedomäne deuten darauf hin, dass die Molluskenchitinsynthase im Laufe der Evolution mit der Myosindomäne fusioniert sind. Suzuki et al. (2007) haben für den phylogenetischen Stammbaum nur einen Sequenzbereich in der katalytischen Domäne herangezogen und einen ähnlichen Baum erhalten. Die komplexe Chitinsynthesedomäne der Mollusken unterscheidet sich von den Chitinsynthesedomänen der Insekten, der Nematoden und der Pilze durch eine mutmaßliche coiled-coil Struktur in der katalytischen Domäne.

Die Chitinsynthesen der Tiere haben sich während dem Kambrium von den Chitinsynthesen der Pilze divergiert (Ruiz-Herrera et al., 2002). Zu diesem Zeitpunkt entwickelten sich auch die ersten Mollusken mit Schale (Lowenstam und Weiner, 1989).

Diese Analyse lässt vermuten, dass die Molluskenchitinsynthesen eine entscheidende Rolle bei der Evolution komplexer mineralisierter Strukturen wie Perlmutter gespielt haben. Daher ist anzunehmen, dass sie sich in ihren biochemischen Eigenschaften von den bisher untersuchten Chitinsynthesen unterscheiden. Um sie näher charakterisieren zu können und damit ihre Rolle bei der Schalenbildung weiter untersuchen zu können, ist ein Modellsystem notwendig, das in dieser Arbeit etabliert wurde.

In Hinblick auf den möglichen Einfluss der Chitinsynthase auf die Schalenbildung der Muscheln strukturelle und biochemische Untersuchungen der Myosindomäne der Ar-CS1 interessant. Daher wurde in dieser Arbeit ein Protokoll zur Aufreinigung rekombinanter Myosindomänen der Ar-CS1 erstellt.

4.2. Zelllinien mit Varianten der Myosindomänen der Ar-CS1

4.2.1. Heterologe Expression der Myosindomäne der Ar-CS1 in *D. discoideum*

Es wurden verschiedene Varianten der Myosindomäne der Ar-CS1 in *D. discoideum* ausgewählt und kloniert, um beispielsweise den Einfluß verschiedener C-Termini auf die heterologe Expression untersuchen zu können. Von besonderem Interesse war hier die C-terminale Region niedriger Komplexität, die eine relativ hohe Anzahl von bei physiologischem pH geladenen Aminosäuren aufweist. Um Auswirkungen einer möglichen ionischen Komplexbildung der Myosindomänen über diese Region untersuchen zu können, wurde die Myosindomäne der Ar-CS1 auch ohne diese Region kloniert (s. 3.2.1.). Zudem sollte der Einfluss der durch die TEDS-Regel identifizierten Regulationsstelle E323 auf die Aktivität der Myosindomäne untersucht werden. Dazu wurde das Glutamat ortsspezifisch gegen ein phosphorylierbares Serin bzw. gegen das neutrale Alanin ausgetauscht (s. 3.2.2.). An alle Varianten der Myosindomäne der Ar-CS1 wurde ein Affinitäts-Tag angefügt. *In vivo* ist am C-Terminus der Myosindomäne die Chitinsynthesedomäne fusioniert. Deshalb wurde angenommen, dass ein C-terminaler Tag die Tertiärstruktur und die biologische Aktivität der Myosindomäne der Ar-CS1 möglicherweise weniger beeinflusst als ein N-terminaler Tag. Die Varianten wurden jeweils mit zwei verschiedenen Tags fusioniert: mit einem His-Tag, der eine Reinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht, und mit einem YFP-Tag, der eine direkte Beobachtung des Fusionsproteins im Fluoreszenzmikroskop erlaubt.

Ausgangsmaterial für die Klonierung waren 21 DNA-Fragmente, die sich in einzelnen Nukleotiden unterscheiden. An Position 1353 konnte nicht aufgrund der Häufigkeit ein Nukleotid ausgewählt werden. Nach dem Sequenzierungchromatogramm wurde die Entscheidung für Cytosin und damit für Leucin getroffen (s. 3.2.1.). In der Zwischenzeit sind auch die Sequenzen der Molluskenchitinsynthasen Mg-CS1 und Pf-Chs1 bekannt. In den beiden anderen Molluskenchitinsynthasen kommt an derselben Stelle die andere mögliche Aminosäure, das Phenylalanin, vor (vgl. 6.1.). Die Frage nach der daraus resultierenden möglichen veränderten Funktionalität durch diesen Aminosäureaustausch bleibt derzeit noch offen.

Es konnten stabile Zelllinien, die die verschiedenen Varianten der Myosindomänen der Ar-CS1 heterolog exprimieren, hergestellt werden. Dabei war es entscheidend, dass über verschiedene Verfahren gut exprimierende Klone ausgewählt wurden (s. 3.3.1.). Die stabilen Zelllinien wurden durch die rekombinante Myosindomäne der Ar-CS1 in ihrem Verhalten prinzipiell nicht beeinflusst. Die Wachstumsraten waren etwas langsamer als bei den Ax3-orf+ Zellen. Die vegetativen Zellen waren adhären und konnten sich fortbewegen. Sie waren zur Sporulation fähig. Die Sporen wiederum waren keimfähig. Die aus den Sporen erhaltenen Amöben waren erneut zur Expression der Myosindomäne der Ar-CS1 im Stande.

Das Expressionsniveau der Myosindomänen der Ar-CS1 wurde mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Zelllinien mit YFP-getaggtten Myosindomänen der Ar-CS1 wurden direkt, die His-getaggtten Myosindomänen der Ar-CS1 wurden mittels Immunfluoreszenz überprüft (s. 3.3.1.). Innerhalb der Zelllinien exprimieren nicht alle Zellen Myosindomänen der Ar-CS1. Diese signifikante Heterogenität wurde schon für andere Proteine, die auch unter dem Aktin15 Promotor exprimiert wurden, gezeigt (Schwarz et al., 2000).

Die Verteilung der Myosindomänen der Ar-CS1 ist innerhalb der verschiedenen Zelllinien gleich. Die rekombinanten Myosindomänen sind im Cytoplasma verteilt. Da sie keine Funktion innerhalb der *D. discoideum*-Zellen ausüben, ist dies auch zu erwarten. Die Myosindomänen der Ar-CS1 sind nicht am Zellrand lokalisiert. Allerdings benötigen die *D. discoideum*-Zellen am Zellrand für die Fortbewegung am vorderen Rand Myosin I und am hinteren Rand Myosin II (Fukui et al., 1989). Die Myosindomänen der Ar-CS1 bilden mikroskopisch sichtbare Aggregate aus und liegen zuweilen an Stellen innerhalb der Zelle dicht konzentriert vor. Die Kolo-kalisation von YFP-getaggtten Myosindomänen mit Aktin wurde untersucht (s.3.3.2.). Die Aggregate sind zum Teil in ein aus Aktin gebildetem Netzwerk eingelagert. Eine Wechselwirkung mit Aktin ist nicht auszuschließen. Dies könnte mit anderen Methoden wie mit der auf konfokaler Technik basierenden STED-Mikroskopie (Stimulated Emission Depletion) (Meyer et al., 2008) oder mittels FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) (Iwai und Uyeda, 2008) besser untersucht werden. Mit isolierten Myosindomänen der Ar-CS1 könnte beispielsweise auch ein Cosedimentationstest durchgeführt werden.

4.2.2. Etablierung des Reinigungsprotokolls für die Myosindomänen der Ar-CS1 aus *D. discoideum*-Zellen

Ziel dieses Projektes war es, ein heterologes Expressionssystem zu etablieren, das es erlaubt, die Myosindomäne der Ar-CS1 funktionell und mit möglichst hohem Reinheitsgrad herzustellen. Für die geplanten Charakterisierungen werden mindestens 10 mg Protein benötigt. Mittels Westernblotanalysen wurde densitometrisch abgeschätzt, dass in 100 ml Kultur bei einer Zelldichte von bis zu $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml der verschiedenen Zelllinien insgesamt etwa 120-200 μ g Myosindomäne der Ar-CS1 exprimiert wird. Umgerechnet auf eine 4 l Kultur, die einem Nasszellgewicht von 10 g entspricht, sind das 4,8 mg - 8 mg Myosindomänen der Ar-CS1. Laut Literatur können aus 10 g *D. discoideum*-Zellen etwa 2,5 mg rekombinantes *D. discoideum*- Myosin (Manstein und Hunt, 1995), 0,1 mg rekombinantes *Chara corallina*-Myosin (Ito et al., 2003) und 0,2 mg *Arabidopsis* Myosin IX (Hachikubo et al., 2007) isoliert werden. Demnach sollten die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Zelllinien sehr gute Ausbeuten an Myosindomäne der Ar-CS1 liefern können.

Chara corallina-Myosin und *Arabidopsis*-Myosin sind bisher die einzigen Myosine aus anderen Spezies, die in *D. discoideum*-Zellen rekombinant hergestellt wurden. Diese Myosine wurden wie bei Manstein und Hunt (1995) beschrieben aufgereinigt. Die Myosindomänen der beiden bereits länger bekannten Myosin-Chitinsynthasen CsmA (Accession No. AB000125) und CsmB (Accession No. AB230981) aus *Aspergillus nidulans* wurden bisher nicht heterolog hergestellt, sondern lediglich im kleinen Maßstab *in vitro* translatiert (Takeshita, 2006). Die Myosindomäne der Ar-CS1 ist phylogenetisch am nächsten verwandt zu den Myosindomänen der Klasse III (s. 3.1.2.). Soweit bekannt wurden noch keine Myosindomänen der Klasse III rekombinant in *D. discoideum* exprimiert.

Myosine sind eine sehr große und diverse Familie und nicht alle Myosin-Aktin-Systeme zeigen gleiches Verhalten bei der Fortbewegung von Myosin *in vivo* (Oosawa, 2008). Da sich die Myosine in ihren Eigenschaften stark unterscheiden, ist kein standardisiertes Verfahren zur Reinigung generell auf alle Myosine übertragbar (Pollard, 1982).

Zudem ist nicht bekannt, ob die Myosindomäne der Ar-CS1 sehr fest an Aktin bindet oder ob sie Polymerisation von Aktin induzieren kann. Es könnte aber auch zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Myosindomänen untereinander, mit Aktin oder mit anderen Proteinen aus *D. discoideum* kommen. Die Bedingungen für die Aufreinigung der Myosindomäne der Ar-CS1 müssen deshalb individuell optimiert werden. In dieser Arbeit wurde zunächst die Aufreinigung der Myosindomänen der Ar-CS1 wie bei Manstein und Hunt (1995) beschrieben durchgeführt.

In den analytischen Extraktionsverfahren wurde beobachtet, dass sich etwa 80% der Ar-CS1-Myosin-Variante MMD-H81 im Volllysat nach dem Abtrennen der Cytoskelettfraktion in der so genannten löslichen Fraktion befinden. Etwa 20% des MMD-H81 findet man im Überstand der Waschfraktion. In der Cytoskelettfraktion verbleiben nur etwa 3% der Gesamtmenge des MMD-H81. Von dem MMD-H81 aus der Cytoskelettfraktion konnten etwa 2% unter den bei Manstein und Hunt (1995) beschriebenen Bedingungen abgelöst werden (s. 3.3.3.1.).

Bei Aufreinigungen von Myosindomänen werden generell die aus der Cytoskelettfraktion extrahierten Myosindomänen als funktionell betrachtet. Daher sollten die Myosindomänen der Ar-CS1 aus der Cytoskelettfraktion gereinigt werden. Da sich hier ohnehin nur ein sehr geringer Anteil an rekombinantem Myosin befindet, sollten zumindest die Extraktionsbedingungen weitestgehend optimiert werden (s. 3.3.3.2.). Dabei wurde versucht durch Erhöhung des NaCl- bzw. KCl-Gehalts im Extraktionspuffer, mögliche elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Myosindomänen der Ar-CS1 mit Aktin, untereinander oder mit anderen Proteinen zu reduzieren. 0,5 M KCl erniedrigt die Assoziationsraten von Aktin-Myosin-Komplexen um das 10-fache (Marston, 1982).

Des Weiteren sollte die Prozessivität der Myosindomäne beeinflusst werden. Es wurde die ATP-Konzentration variiert, um die Sättigung aller Myosindomänen mit ATP zu gewährleisten. Da die Myosindomäne durch eine Phosphorylierungsstelle reguliert werden könnte, wurde auch der Einfluss von alkalischer Phosphatase untersucht. Bei Myosin V führt eine von Ca^{2+} -Ionen abhängige Konformationsänderung zur Aktivierung (Taylor, 2007). Daher wurde zum Extraktionspuffer neben 15 mM ATP auch 10 mM CaCl_2 zugegeben. Myosine können verschiedene ATPase-Aktivitäten besitzen. Unter den normalen Bedingungen wurde die Mg^{2+} -ATPase aktiviert. Ca^{2+} -ATPasen werden durch 10 mM CaCl_2 sowie 0,5 M KCl aktiviert, K^+ /EDTA-ATPasen benötigen dagegen 2 mM EDTA sowie 0,5 M KCl (Côté et al., 1985). Außerdem wurde der 50 mM HEPES-Puffer gegen einen 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) ausgetauscht, da dieser das Hydrolysegleichgewicht von ATP beeinflussen könnte. Myosine können über Calmodulin reguliert werden. Diese Regulationsstelle findet man zwar normalerweise in der Gelenkregion und nicht in der Myosinkopfdomäne, aber es wurde dennoch versucht, die Extraktion durch Zugabe von Calmodulin zusammen mit CaCl_2 zu beeinflussen.

Myosin dissoziiert bei Bindung von ATP von Aktinfilamenten ab und bindet wieder fest nach der Hydrolyse von ATP. Durch Zugabe von DMSO bzw. von Ethylenglykol sollte die ATPase-Aktivität von der Myosindomäne reversibel gehemmt werden (Mariano et al., 2001) und damit nicht mehr an Aktinfilamente binden. 50% Glykol erniedrigt die Assoziationsrate von Aktin-Myosin-Komplexen (Marston, 1982).

Es existieren hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Myosin und Aktin sowie zwischen Aktinfilamenten. Diese Wechselwirkungen sollten über die Variation des pH-Werts beeinflussbar sein (Borejdo, 1984). Bei alkalischen pH-Werten größer als 10 verlieren Myosine ATPase-Aktivität (Stracher, 1961). Auch Harnstoff bzw. Guanidin-Hydrochlorid können Veränderungen hydrophober Wechselwirkungen hervorrufen. Nur bei hohen Harnstoffkonzentrationen bzw. Guanidin-Hydrochloridkonzentrationen konnte schon bei der ersten Extraktion ein Teil der Myosindomäne der Ar-CS1 aus dem Cytoskelett-Pellet gelöst werden. Bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen konnten erst bei einer erneuten Extraktion Erfolge verbucht werden, wobei mit steigender Harnstoffkonzentration mehr Myosindomäne gelöst wurde. Bei diesen Versuchen ist zu beachten, dass F-Aktin in Gegenwart von Harnstoff depolymerisiert, aber bei gleichzeitiger Zugabe von ATP während des Depolymerisationsprozesses repolymerisieren kann (Szent-Györgyi und Joseph, 1951). Dabei ist zu beachten, dass ab 2 – 4 M Harnstoff eine Denaturierung der Myosindomäne nicht auszuschließen ist (Rajagopalan et al., 1961; Stracher, 1961; Takashina und Kasuya, 1967).

Da sich bei einer starken Assoziation des Ar-CS1-Myosins mit Aktin eine Aufreinigung sehr schwierig gestaltet, wurden weitere Bedingungen getestet, die Aktin depolymerisieren, aber

im Gegensatz zum Harnstoff nicht die Aktivität der Myosindomäne beeinflussen sollten. Bei einer Konzentration von 0,6 M KI depolymerisiert F-Aktin in gleicher Weise reversibel wie durch Harnstoff induziert (Szent-Györgyi, 1951). Die Wirkung von Cytochalasin D (Schliwa, 1982), das ein bekannter Inhibitor der F-Aktin-Polymerisation ist und auch Mikrofilamente zerstört, wurde überprüft. G-Aktin oder G-Aktin-Protein-Komplexe wie beispielsweise G-Aktin-Myosin-Komplexe binden an DNase I, wodurch die Polymerisation von Aktin verhindert wird. Zudem wird die Affinität von Myosin zu Aktin um das 4- bis 5-fache reduziert (Harris et al., 1982; Lheureux et al., 1993). Alle diese Bedingungen wurden einzeln und in Kombination getestet, und zusätzlich der Einfluss der Reaktionsdauer bei Harnstoff und KI untersucht.

Mit Harnstoff und mit KI konnten die besten Ausbeuten erzielt werden. Beide Bedingungen wirken sich auf die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen G-Aktin und zwischen Myosindomänen der Ar-CS1 und anderen Proteinen aus. Demnach depolymerisieren sie Aktinfilamente und können eventuell damit eine Ablösung der Myosindomänen durch ATP unterstützen. Zudem können sie die Myosindomänen von Aktin direkt lösen. Die Bedingungen, die sich auf die Prozessivität bzw. die ATPase-Aktivität der Myosindomäne auswirken sollten, zeigten keine besondere Wirkung. Die Zugabe von NaCl und KCl haben geringen Einfluss auf die Extraktion. Diese minimieren elektrostatische Wechselwirkungen zwischen möglichen Aggregaten der Myosindomänen der Ar-CS1 oder auch zwischen Aktin und der Myosindomäne.

Aus diesen Beobachtungen läßt sich jedoch noch nicht ableiten, ob die in der Cytoskelettfraktion befindliche Myosindomäne der Ar-CS1 spezifisch an Aktin gebunden vorliegt oder in Aggregaten, die sich im Netzwerk der Cytoskelettfraktion verfangen haben und deshalb nicht notwendigerweise funktionell sein müssen. Aus der Cytoskelettfraktion extrahierte Myosindomänen der Ar-CS1 konnten jedenfalls bislang nicht in signifikanter Menge über Ni-NTA-Chromatographie gereinigt werden. Es gelang jedoch, die Variante MMD-H81 aus der löslichen Fraktion zu isolieren, die dem Überstand nach der Ultrazentrifugation entspricht. Hier findet man ebenfalls Aktin (Nachmias, 1974). Die Myosindomäne liegt hier also entweder gelöst, in kolloidalen Komplexen oder an kleine, kolloidal gelöste Aktinfilamente gebunden vor, und könnte also ebenfalls funktionell sein.

Aufgrund folgender Beobachtung wurde auf das Waschen des Zellpellets nach der Ernte verzichtet: Wurden die Waschfraktionen bei verschiedenen Umdrehungszahlen zentrifugiert, wurde mit steigender Drehzahl mehr MMD-H81 im Überstand detektiert. Im Überstand einer Zentrifugation mit $200.000 \times g$ wurde am meisten MMD-H81 nachgewiesen. Bei einer derartigen Belastung der Zellen erscheint eine starke Lyse sehr plausibel. In den beobachteten Fällen waren unter bestimmten osmotischen Bedingungen im Waschpuffer offensichtlich auch geringere Zentrifugalkräfte ausreichend, um die Zellen zu lysieren.

Um nachzuweisen, ob die Myosindomänen Komplexe bilden, wurden die löslichen Fraktionen bei verschiedenen Geschwindigkeiten zentrifugiert. Bei einer $170.000 \times g$ -Ultrazentrifugation wurde MMD-H81 nicht abzentrifugiert. Es bildet also keine großen Komplexe. Eine differentielle Zentrifugation zeigte keinen Anreicherungseffekt und stellte somit keinen geeigneten Vorreinigungsschritt dar.

Die Myosindomäne der Ar-CS1 wurde rekombinant als Fusionsprotein mit einer His-Tag-Sequenz konzipiert, um es über Ni-NTA-Affinitätschromatographie reinigen zu können. Unter den von Manstein und Hunt (1995) beschriebenen nativen Bedingungen wurde MMD-H81 jedoch vorwiegend im Säulendurchlauf nachgewiesen. Auch mit 8 M Harnstoffpuffern konnte keine optimale Bindung erreicht werden, obwohl vermutet worden war, dass der His-Tag auf Grund einer ungünstigen Tertiär- oder Quartärstruktur des MMD-H81 für die Bindung an Ni-NTA-Agarose nicht zugänglich sein könnte. Mit gewissem Erfolg wurde ein GlyGly-Puffer mit einem pH-Wert von 9 getestet. Unter diesen pH-Bedingungen sollte eine Komplexbildung über die Region niedriger Komplexität, die den His-Tag möglicherweise unzugänglich macht, verhindert werden. Die beste Reinigung über Ni-NTA-Chromatographie wurde jedoch mit einem HEPES-Puffer pH 8 mit 0,6 M KI, der auch die Extraktion der MMD-H81 aus der Cytoskelettfraktion ermöglicht, erzielt. Da KI depolymerisierend auf Aktinfilamente wirkt, ist anzunehmen, dass kürzere Aktinfilamente bei der Bindung an Ni-NTA-Agarose stören. Es hat sich herausgestellt, dass für die Bindung an Ni-NTA-Agarose das Zelllysate gegen den HEPES/KI-Puffer dialysiert werden muss, da sich der HEPES/KI-Puffer nicht für die Zellyse eignet. Zur vollständigen Depolymerisation des Aktins und der Ablösung der MMD-H81 ist eine längere Reaktionsdauer notwendig.

Zusammengefasst hat sich für die Aufreinigung der Ar-CS1-Myosinvariante MMD-H81 folgendes Protokoll bewährt: Die Zellen werden nach der Ernte in Lysepuffer nach Manstein und Hunt (1995) resuspendiert und ohne Detergenz durch Plümpern und mit Ultraschall lysiert. Anschließend werden sie für 1h bei $170.000 \times g$ abzentrifugiert. Nach der Dialyse gegen HEPES/KI-Puffer mit 0,4 M KI bzw. 0,6 M KI kann dann die Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit dem HEPES/KI-Puffer als Laufpuffer erfolgen. Eluiert wird mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen. Mittels MALDI wurde nachgewiesen, dass es sich bei dem 90 kDa-Protein im Eluat um die Myosindomäne der Ar-CS1 handelt (s. 3.3.4.).

Es konnten allerdings nicht für Charakterierungsversuche ausreichende Mengen gewonnen werden. Die Wechselwirkung des MMD-H81 mit Ni-NTA-Agarose war einerseits gering und das Zielprotein war in allen Eluaten verteilt. Andererseits befand sich auch immer noch MMD-H81 im Säulenmaterial. Es sind verschiedene Zustände denkbar, in denen die Myosindomäne in der löslichen Cytoskelettfraktion vorliegen könnte. Es kann Aggregate bilden, es kann nicht funktionell mit einer falschen Tertiärstruktur gefaltet sein oder es kann fest an kurze Aktinfilamente gebunden vorliegen. Da die besten Ausbeuten in Gegenwart

von Kaliumiodid, das Aktinfilamente depolymerisiert und Myosindomänen von Aktin löst, erzielt wurden, ist anzunehmen, dass die Myosindomäne der Ar-CS1 sehr stark an Aktin bindet.

KI wurde bereits in früheren Arbeiten zur Reinigung von Myosin eingesetzt, um eine vollständige Trennung von den Aktinkomponenten zu erzielen (Nachmias, 1974, Pollard et al., 1974), auch in Kombination mit ATP und $MgCl_2$ bei *D. discoideum* (Aguado-Velasco et al., 1993).

Mittels MALDI-Analysen wurde ein 66 kDa-Protein, das mit MMD-H81 co-chromatographierte, als ein His-haltiges Protein aus *D. discoideum* identifiziert (s. 3.3.4.). Obwohl für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *D. discoideum* häufig ein His-Tag verwendet wird, ist es bekannt, dass viele *D. discoideum*-Proteine reich an Histidinen sind, die mit den His-getaggten Myosindomänen der Ar-CS1 um die Bindungsstellen an Ni-NTA-Agarose konkurrieren. Um zukünftig bessere Ausbeuten an rekombinanter Myosindomäne zu erzielen, erscheint es lohnenswert, ein anderes Tag wie beispielsweise FLAG-Tag an Stelle des His-Tag einzufügen. Ebenso wäre ein Wechsel des Expressionssystems zu überdenken. Aus *D. discoideum* konnten bisher nur zwei heterolog exprimierte Myosin-Varianten gereinigt werden, wohingegen sich das Baculovirussystem schon erfolgreich bei mehreren Myosinen und trunkierten Formen verschiedener Arten bewährt zu haben scheint. Jedoch konnten auch mit diesem System nicht alle Myosinformen erfolgreich produziert und gereinigt werden (Geeves et al., 2005). Über die Eigenschaften der Myosindomäne der Ar-CS1 ist bisher noch nichts bekannt. Bei der Etablierung des Protokolls musste daher immer von verschiedenen Szenarien ausgegangen werden. Ist die Myosindomäne in der Cytoskelettfraktion und in der löslichen Fraktion funktionell? Wie fest bindet sie an die Aktinfilamente? Induziert sie die Polymerisation von Aktin und erschwert daher die Aufreinigung über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie? Bildet die Myosindomäne Aggregate über ihre Region niedriger Komplexität? Trotz dieser Schwierigkeiten konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Aufreinigungsprotokoll als erster Grundstein etabliert werden.

4.2.3. Vergleich der verschiedenen Varianten der Myosindomänen der Ar-CS1

Die Myosindomäne der Ar-CS1 wurde auch ohne die Region niedriger Komplexität kloniert. Zudem wurde die Regulationsstelle, an der ein Glutamat codiert ist, ortsspezifisch mutiert, um den Einfluss der Regulation auf die Aktivität untersuchen zu können. Einmal wurde das Glutamat gegen ein Alanin ausgetauscht, das in der Zelle nicht modifiziert wird und die Tertiärstruktur nicht wesentlich beeinflussen sollte. Zum anderen wurde das Glutamat gegen die phosphorylierbare Aminosäure Serin ausgetauscht.

Die vier Varianten der Myosindomäne der Ar-CS1 wurden in ihrem Verhalten miteinander verglichen. Das etablierte Aufreinigungsprotokoll wurde mit den vier Varianten durchgeführt (s. 3.3.3.4.). Jede Variante liegt überwiegend in der löslichen Fraktion vor. Über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie lässt sich am besten die Variante 3H-MA-A aufreinigen, bei der die ATPase-Aktivität nicht durch eine Phosphorylierung der Regulationsstelle aktiviert werden kann.

Zudem wurden die Varianten in ihrem Extraktionsverhalten aus der Cytoskelettfraction verglichen (s. 3.3.3.4.). Durch zwei Waschschrirte wurde sichergestellt, dass nicht aktiv bindende Myosindomänen möglichst vollständig entfernt wurden. Die Extraktion von MMD-H81 und von 3H-MA-LC wurde durch ATP-Zugabe verschlechtert, wohingegen mit Glykol und ATP am meisten MMD-H81 bzw. 3H-MA-LC extrahiert werden konnte. Allgemein löst sich durch die Bindung von ATP Myosin von Aktin. Mit Glykol wird die ATPase-Aktivität gehemmt.

3H-MA-A sollte auf Grund der ortsspezifischen Mutation der Regulationsstelle eine geringere ATPase-Aktivität aufweisen. Bei dieser Variante wurde die Extraktion durch ATP nicht nennenswert beeinflusst.

3H-MA-S kann an der Regulationsstelle phosphoryliert vorliegen und damit erhöhte ATPase-Aktivität aufweisen. Entsprechend hat bei dieser Variante die alkalische Phosphatase CIAP die Ablösung vom Cytoskelett im Vergleich zu ATP-Standardbedingungen verschlechtert.

Die hier durchgeführten Tests stellen einen ersten Anhaltspunkt dar. Eine detailliertere Untersuchung unter Berücksichtigung einschlägiger statistischer Kriterien würde sehr viel weitreichendere Aussagen ermöglichen und wäre deshalb eine durchaus sinnvolle Weiterführung dieses Projektes in einem größeren zeitlichen Rahmen.

4.2.4. Eigenschaften der Myosindomäne der Ar-CS1 und Rückschlüsse auf ihre Rolle bei der Biomineralisation

Die Myosindomäne der Ar-CS1 ist am nächsten verwandt zu den unkonventionellen Myosinen der Klasse III. Motorproteine der Klasse Myosin III sind wichtig für die Phototransduktion und Hörprozesse und spielen als Transporter eine wichtige Rolle. Myosin IIIA hat ATPase- und Kinaseaktivität und kann *in vitro* Aktinfilamente bewegen. Das humane Myosin IIIA hat eine relativ langsame durch Aktin aktivierte ATPase-Aktivität. Die Affinität zu Aktin in Gegenwart von ATP ist relativ hoch. Hat das Myosin IIIA ADP gebunden, bleibt es relativ lang an Aktin gebunden (Dosé et al., 2007). Ohne die N-terminale Kinasedomäne und ohne die IQ Motive, die Calmodulin binden, ist die Affinität für Aktin extrem hoch (Kambara, 2006). Auf Grund der Beobachtungen, die im Laufe der Etablierung des

Aufreinigungsprotokolls gemacht wurden, ist anzunehmen, dass die Myosindomänen der Ar-CS1 wie die Myosine der Klasse III eine hohe Affinität für Aktin haben.

Für die Myosindomäne der Ar-CS1 sind zwei Funktionen *in vivo* denkbar. Zum einen kann die Myosindomäne für den Transport oder die Lokalisation der Chitinsynthasen verantwortlich sein. Damit kann sie die Bildung von Chitinsynthaseclustern in der Membran beeinflussen. Die Cluster könnten ähnlich den Cellulosesynthaseclustern in der Membran bewegt werden. Chitin beginnt in etwa zehn verknüpften N-Acetylglucosamineinheiten zu kristallisieren. Eine konzentrierte Synthese von einzelnen Chitinpolymeren würde sich auf die Gesamtstruktur des Chitins auswirken.

Üben die Myosindomänen Kräfte auf die Chitinsynthasen aus, könnten diese Kräfte wie bei der durch Scherung induzierten Kristallisation von Kolloiden die Chitinstruktur beeinflussen. Von der Richtung der Kraft der Myosindomänen könnte die Orientierung des Chitins abhängen. Über die Rate der Kraftschläge könnte die Kristallisation von Chitin und damit möglicherweise auch indirekt von amorphem Calciumcarbonat reguliert werden.

Um Informationen über ihre Funktion zu erhalten, muss die Myosindomäne der Chitinsynthase charakterisiert werden. Ihr Vorkommen innerhalb der Mantelepithelgewebe-Abschnitte muss beispielsweise mittels Immunfluoreszenz quantifiziert werden. Die ATPase-Aktivität und die Affinität zu Aktin können mit etablierten Aktincosedimentationstests und dem „in vitro motility assay“ bestimmt werden. Mittels Rasterkraftmikroskopie lässt sich sogar die Kraftentfaltung einer einzelnen Myosindomäne bestimmen. Alle diese Tests setzen jedoch ein etabliertes Aufreinigungsprotokoll für die Myosin-Domäne voraus.

Üblicherweise können einzelne Myosine Kräfte von 2 pN bis 5 pN generieren (Finer et al., 1994; Molloy et al., 1995; Bustamante et al., 2004). Lokal entwickeln lebende Zellen Kräfte im Bereich von 1 nN μm^{-2} bis 10 nN μm^{-2} aus. Diese Kräfte regulieren die Organisation und Assemblierung von multimolekularen Komplexen an Adhäsionsstellen oder sie entfalten Domänen von Integrinen, die Verbindungen zwischen dem Aktincytoskelett und der extrazellulären Matrix (ECM) darstellen. Durch eine Kraft von ca. 5 pN kann das Fibronectin entfaltet werden, wodurch es erst zur Polymerisation kommen kann. In der ECM wird Fibronectin zu Fibrillen angeordnet (Balaban et al., 2001; Geiger et al., 2001). Für eine vergleichbare Kraftausübung müssten also umgerechnet 2000 Myosindomänen der Ar-CS1 mit einer Kraft von 5 pN pro Molekül konzertiert zusammenarbeiten. Die Rosetten der Cellulosesynthase haben einen Durchmesser von ungefähr 25 nm. Angenommen die Chitinsynthasen bilden ähnliche Komplexe gleicher Größe, könnten pro 1 μm^2 2000 Komplexe mit je 36 Molekülen verteilt sein. Auch wenn die Chitinsynthasen sicherlich nicht dicht gedrängt in der Plasmamembran angeordnet sind, würden die Myosindomänen ein für die Regulation der Chitinsynthese ausreichend großes Kraftfeld aufbauen können. Es wäre sicherlich eine der spannendsten Weiterentwicklungen dieses Projektes, den Einfluss von

molekularen Kräften auf die Chitinstruktur im Zusammenhang mit der Biomineralisation der Mollusken genauer untersuchen zu können. Auch hierfür legt diese Arbeit mit der präparativen Isolierung der Myosindomäne der Ar-CS1 einen wichtigen Grundstein.

4.3. *D. discoideum* als Modellsystem für die Charakterisierung der Ar-CS1

Ziel dieser Studie war es ein zelluläres Modellsystem für die Studie der transmembranen Myosin-Chitinsynthase zu entwickeln. Obwohl *D. discoideum* als Expressionssystem für eukaryotische Proteine und auch für eukaryotische Membranproteine geeignet ist, wurde bisher noch kein derart großes und komplexes Membranprotein wie die Ar-CS1 in *D. discoideum* exprimiert. Seit 700 Millionen Jahren bilden die Schleimpilze, zu denen *Dictyostelium discoideum* gehört, einen eigenen Zweig im Stammbaum des Lebens. Die ersten Muscheln entwickelten sich 200 Millionen Jahre später im Kambrium. Dieser Unterschied in der Entstehungszeit macht es besonders deutlich, dass es eine Herausforderung darstellte, die Ar-CS1 heterolog zu exprimieren.

4.3.1. Herstellung der Zelllinien Ax3ArCS1-YFP und dcsArCS1-YFP und Verteilung der Ar-CS1 innerhalb der Zelllinien

Das Gen für Ar-CS1 wurde in Ax3-orf+ und in dcsA- transformiert (s. 3.4.1.). Um ausreichend Klone zu erhalten, musste doppelt soviel Plasmid als üblich eingesetzt werden. Bei den dcsA- konnten nur mit Hilfe der chemischen Transformation Klone erhalten werden. Zudem waren nicht alle Transformationen erfolgreich. Es war übersehen worden, dass im Gegensatz zu den Ax3-orf+ die dcsA- nicht das dDp2 ORF-Gen haben, dessen trans-wirkendes Produkt für die extrachromosomale Replikation und für den extrachromosomalen Erhalt notwendig ist. Verschiedene *Dictyostelium*-Zellen tragen verschiedene, nicht homologe Plasmide wie die dDp2-Plasmide (Hughes et al., 1988). Die verwendeten pDXA-Expressionsvektoren tragen den Ddp2-Replikationsorigin. Das dDp2 ORF-Gen wurde von den extrachromosomalen Vektoren getrennt. Bei einer Transformation müssen daher entweder die Ax3-orf+ mit integrierten Kopien des dDp2 ORF-Gens verwendet werden oder es müssen Plasmide mit Kopien des dDp2 ORF-Gens cotransformiert werden (Manstein et al., 1995). Durch Deletion und Zerstörung des Leserahmens des dDp2 ORF bei dDp2-Plamiden wurde herausgefunden, dass ohne das dDp2 ORF das Plasmid autonom repliziert wird. Nach mehr als 60 Generationen bleibt das Plasmid jedoch nicht länger extrachromosomal erhalten. Es wird dann verloren oder in das Chromosom eingebaut (Leiting, 1990). Vermutlich wurde bei den erhaltenen Zelllinien dcsArCS1-YFP das Gen für

die Chitinsynthese in das Chromosom integriert. Die Zelllinien wurden jedoch auch nie länger als 60 Generationen kultiviert.

Mittels Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass Ar-CS1-YFP sowohl in Ax3-orf+ als auch in dcsA- heterolog exprimiert wurde (s. 3.4.2.). Bei jeder Zelllinie waren alle Zellen positiv. Das detektierte Fluoreszenzsignal war schwächer als bei Immunfluoreszenzen mit denselben Antikörpern gegen die Myosindomänen der Ar-CS1. Bei dem großen Protein Ar-CS1-YFP von 290 kDA ist ein niedrigeres Expressionsniveau zu erwarten. Wenn die Zellen schon länger in Schüttelkulturen kultiviert wurden, war das Fluoreszenzsignal deutlich schwächer. Sporen der Ax3ArCS1-YFP waren keimfähig, aber bei den aus Sporen erhaltenen, vegetativen Zellen konnte keine Expression mehr nachgewiesen werden. Deshalb wurden regelmäßig frische Zelllinien hergestellt. dcsArCS1-YFP Zellen waren nicht zur Sporulation fähig.

Das Verteilungsmuster der Ar-CS1-YFP unterschied sich bei den beiden Zelllinien Ax3ArCS1-YFP und dcsArCS1-YFP nicht wesentlich. Ar-CS1-YFP war innerhalb der gesamten Zelle verteilt. Bei den einzelnen Zelllinien sind zwei verschiedene Muster aufgetreten. Ar-CS1-YFP war entweder unstrukturiert oder globulär strukturiert verteilt. Diese unterschiedliche Verteilung könnte durch verschiedene Kulturbedingungen wie beispielsweise variable Zelldichte verursacht werden.

Mit der Doppelfärbung von Ar-CS1-YFP und Aktin sollte untersucht werden, ob die Chitinsynthese über die Myosindomäne mit dem Aktincytoskelett interagiert. An einigen Stellen war in der Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder eine gelbliche Färbung, die auf eine Kolo-kalisation hindeutet, zu sehen. Häufig waren die globulären Strukturen, die Chitosomen sein könnten, eher in das Cytoskelett eingelagert. Im Cortex, direkt am Zellrand und in Filopodien ist Ar-CS1-YFP nachweisbar. Die verfügbaren Daten lassen keine Schlussfolgerung zu, zu welchem Anteil die Chitinsynthese tatsächlich in die Plasmamembran eingebaut worden sein könnte oder in Form von Chitosomen vorliegt. *D. discoideum*-Zellen sind nicht kugelförmig. Bei einigen untersuchten Querschnitten wurden auch Signale von nach oben gerichteten Filopodien detektiert.

Ar-CS1-YFP könnte über die Myosindomäne mit Aktin interagieren und deshalb lokal mit dem Cytoskelett in der Zelle assoziieren. Die Cytoskelettverteilung könnte in den Zelllinien verschieden sein und zu den oben beschriebenen Verteilungsmustern der Ar-CS1-YFP führen. Um dies herauszufinden, könnte man in weiterführenden Studien die Verteilung der Ar-CS1-YFP abhängig vom Zellzyklus untersuchen.

Bei der Fixierung der Zellen mit 2% Formaldehyd in MeOH wurden die Zellen dehydriert. Dadurch wurden die Zellmembranen beschädigt. Ein Nachweis für den Einbau der Ar-CS1-YFP in die Plasmamembran ist dadurch erschwert. Um die Zellmembran nicht zu beschädigen, wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Bei einer

Immunfluoreszenz konnte kein Aktin nachgewiesen werden. Die Zellen waren nicht mehr permeabel für die Antikörper. Die Chitinsynthase sollte aufgrund ihrer extrazellulären YFP-Domäne zugänglich für die Antikörper sein, war aber kaum nachweisbar. Da nur wenige Moleküle in die Membran eingebaut werden können, wäre auch ein geringes signifikantes Signal ein Hinweis darauf, dass Ar-CS1-YFP in die Plasmamembran eingebaut worden ist.

4.3.2. Untersuchung von Membranfraktionen der Ar-CS1-YFP

Um den Einbau der Ar-CS1-YFP in die Membranen der *D. discoideum* nachzuweisen, sollten die Membranen an Silikatkugeln gebunden werden und es sollte die Aktivität der Ar-CS1-YFP in den Membranfraktionen untersucht werden. Bei der Präparation (s. 3.4.3.1.) wurden die Zellen möglichst schonend lysiert, um die Membranen nicht zu zerstören. Nach Abtrennung lysierter Zellen und Zellwände wurde die Membranfraktion von einer mutmaßlich Chitosomen enthaltenden Fraktion getrennt. Als analytischer Kniff wurde ein zusätzlicher Detergenz-Schritt eingeführt, und ausgefallenes Material abzentrifugiert. Nur bei dieser speziellen Probenvorbereitung vor Zugabe von Laemmli-Puffer konnten Proteinbanden im SDS-Gel detektiert werden.

Proteine der zu erwartenden Größe der Ar-CS1-YFP sind in allen Membranfraktionen der Zelllinien nachweisbar. Allerdings bildet *D. discoideum* ein Protein gleicher Größe, das sich jedoch nicht in der Membranfraktion anzureichern scheint. In Ausnahmefällen war hier eine Doppelbande zu beobachten. Bisher gibt es keine Erklärung, weshalb vor allem die Banden des unteren 54.000 x g-Pellets zum Teil verjüngt erscheinen (s. Fig. 3.28.).

Mittels Westernblot sollte Ar-CS1-YFP in den Membranfraktionen nachgewiesen werden. Die Blotbedingungen wurden an die Bedingungen für hydrophobe Membranproteine angepasst. Die Analysen führten trotzdem zu keinem Ergebnis. Vermutlich waren die Mengen an Ar-CS1-YFP, die auf die Blotmembran übertragen wurden, unterhalb der Nachweisgrenze der Antikörper. Da keine Aufkonzentrierung der Proben möglich war, waren die Mengen auf dem Polyacrylamidgel auch nicht ausreichend für MALDI-Analysen.

Die Expressionsniveaus der Proteine sind in *D. discoideum* nicht immer gleich. So ist auch das etwa 290 kDa große *D. discoideum*-Protein in Ax3-orf+ und in dcsA- nicht immer nachweisbar. In den Membranpräparationen der transformierten Zelllinien wurde jedoch immer in der für Ar-CS1-YFP zu erwartenden Höhe eine Bande oder eine Doppelbande detektiert. Bei diesen Banden könnte es sich um Ar-CS1-YFP handeln. Aufgrund der Zentrifugationsbedingungen ist anzunehmen, dass Ar-CS1-YFP in die Membranen eingebaut wurde. Dies würde mit den Immunfluoreszenz-Nachweisen (s. 4.3.1.) übereinstimmen.

Um beweisen zu können, dass Ar-CS1-YFP in die Membranen der *D. discoideum* eingebaut wurde, sollten die Membranen an Silikatkugeln gebunden werden (s. 3.4.3.2.). Membranen

können an die Kugeln durch einfache Inkubation immobilisiert werden (Kaufmann und Tanaka, 2003). Die verschiedenen Kugeln, die getestet wurden, wurden mit Membranen und Vesikel enthaltenden Fraktionen inkubiert. Unabhängig von der Porosität der Kugeln wurden in den diversen, auf diese Weise angereicherten Membranfraktionen Banden in Höhe der Ar-CS1-YFP nachgewiesen, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass Ar-CS1-YFP in den Membranen lokalisiert ist, obwohl ein Membranprotein aus *D. discoideum* gleiche Größe aufweist. Die Proteinmengen auf den Kugeln reichten für eine MALDI-Analyse nicht aus. Im Westernblot ergaben sich sehr schwache Banden in Höhe von 290 kDa, die nicht bei Ax3-orf+ Kontroll-Ansätzen auftauchte. Eine Wiederholung dieses Experiments im größeren Maßstab könnte hier Klarheit schaffen.

Mit einem sensitiven, radioaktiven Test wurden die verschiedenen Membranfraktionen auf eine Enzymaktivität der Ar-CS1-YFP hin untersucht (s. 3.4.3.3.). Chitinsynthasen sind gewöhnlich zymogen. Deshalb wurde vor Zugabe des Polymerisationsmixes mit ^{14}C -UDP-GlcNAc ein proteolytischer Aktivierungsschritt durchgeführt. Ob Ar-CS1-YFP jedoch durch Trypsin aktiviert werden kann, ist bisher nicht bekannt. In drei unabhängig voneinander durchgeführten Tests konnte in der Membranfraktion von zwei verschiedenen Ax3ArCS1-YFP Zelllinien eine erhöhte Radioaktivität in Filtrerrückständen von $\geq 1,2 \mu\text{m}$ im Vergleich zur Kontrolle mit Ax3-orf+ Membranen gemessen werden. Durch eine längere Behandlung der Proben mit Detergenzien wurde die Filtrierbarkeit nur minimal verbessert. Die bei der Kontrolle mit Ax3-orf+ gemessene Radioaktivität berücksichtigt auch unspezifische Bindung der ^{14}C -UDP-GlcNAc-Monomere an Agglomerate, die nicht filtriert werden konnten, sowie den Einbau von ^{14}C -UDP-GlcNAc-Monomere in unlösliche Polysaccharide, die von anderen Glykosyltransferasen stammen. Diese unspezifische Bindung sowie der Einbau der radioaktiv markierten Zuckermonomere in andere Polysaccharide sollten in allen Proben gleich sein. Damit ist die größere, gemessene Radioaktivität in den Proben der Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle ein Indiz für eine Aktivität der Ar-CS1-YFP, obwohl die Standardabweichung relativ hoch ist. Aus Zeit- und Kostengründen konnten die für eine bessere Statistik erforderlichen Tests nicht durchgeführt werden. Die Streuung der Werte könnte an einer stark unterschiedlichen Konzentration von Chitinsynthasen in der Membran liegen. Die Immunfluoreszenzen hatten gezeigt, dass die Kulturen nicht immer gleiches Expressionsniveau der Ar-CS1-YFP aufweisen (s. 3.4.2.).

Die bei den Enzymtests der Ar-CS1-YFP Zelllinien gemessene Radioaktivität war im Vergleich zu Membranen aus *Saccharomyces cerevisiae* gering (s. 6.4.). Über die Regulation von Myosin-Chitinsynthasen wie der Ar-CS1 in den Mollusken ist derzeit noch überhaupt nichts bekannt. Die wahrscheinlich komplexen Signaltransduktionswege, die für die Aktivierung der Ar-CS1 nötig sind, sind in den *D. discoideum* mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht vorhanden. Ein weiterer wichtiger Faktor wäre die

Lipidzusammensetzung der Membranen, die sich bei Mollusken und *D. discoideum* sicher drastisch unterscheiden. Dies könnte sich auf die Struktur und damit auf die Aktivität der Ar-CS1-YFP auswirken.

4.3.3. Untersuchung der Aktivität der Ar-CS1-YFP *in vivo*

Die Chitinsynthese wurde anhand von transformierten Zellen untersucht (s. 3.3.4.). Um zu überprüfen, ob *in vivo* gebildete Chitinfragmente entweder an die Zellen gebunden vorliegen oder in die Umgebung ausgeschleust und abgegeben werden, wurden fixierte Ax3ArCS1-YFP und dcsArCS1-YFP mit Calcofluor White, einem etablierten Farbstoff für Chitin und Cellulose, bzw. mit einem spezifischen GFP-getaggten Chitinbindeprotein (Weiss und Schönitzer, 2006) gefärbt. Der Unterschied zur nicht-transformierten Kontrolle war nicht immer signifikant. Im Amöben-Stadium von *D. discoideum* sollte eigentlich keine Cellulose nachzuweisen sein (Grimson et al., 1996). Bei den Ax3ArCS1-YFP könnte auf Grund einer durch die Expression der Ar-CS1-YFP veränderten Membran- oder Zelloberflächenstruktur eine mögliche unspezifische Bindung von Calcofluor White verstärkt sein. Um eine Bindung an eventuell vorhandene Cellulose ausschließen zu können, wurden Experimente mit dcsA- durchgeführt. Um einer Substratlimitierung für die Synthese von Chitinfragmenten vorzubeugen, wurden dcsArCS1-YFP und dcsA- mit UDP-GlcNAc behandelt. Allerdings ist nicht bekannt, ob *D. discoideum* über Transporter für diese Zuckermonomere verfügt. Bei 2-3% der dcsArCS1-YFP konnte Fluoreszenz des GFP-Chitinbindeproteins am Zellrand detektiert werden. Vermutlich werden die Chitinfragmente doch an die Umgebung abgegeben, was plausibel erscheint, wenn Zellen über keine chitinbindenden Membranproteine verfügen oder keine Integration der Chitinfragmente in die extrazelluläre Matrix erfolgt. Möglicherweise wurden nur wenige Zellen genau in dem Moment fixiert, in dem sie massiv Chitinfragmente bildeten. Im Gegensatz zu dem Calcofluor White bindet das CBGFP kaum unspezifisch an die Zelloberfläche der *D. discoideum*. Wie in 4.3.3. erwähnt könnte die Aktivität der Ar-CS1-YFP aufgrund der unterschiedlichen Lipidzusammensetzung der *D. discoideum*-Membranen und der fehlenden Signaltransduktionswege gering sein. Da die hier für den Fluoreszenz-Nachweis verwendete Chitinbindedomäne der Chitinase A1 aus *Bacillus circulans* nicht an lösliche (GlcNAc)₆-Chitooligosaccharide bindet (Hashimoto et al., 2000), wurden hier also erste Indizien dafür geliefert, dass *D. discoideum* mit Hilfe von ArCS1-YFP in der Tat kristalline Chitinfasern bilden kann.

Makromolekulares Chitin sollte deshalb auf alle Fälle im Kulturüberstand von dcsArCS1-YFP nachweisbar sein. Dazu wurde ein neuartiger Filtrationstest mit anschließendem Westernblotnachweis entwickelt. Hauptproblem dieses Tests war, dass die zu testenden Kulturüberstände teils eine unspezifische Wechselwirkung mit CBGFP aufwiesen. Ungeklärt

blieb auch die Frage, weshalb bei einer mit Nikkomycin Z behandelten Fraktion aus *dcsA*-Kulturen die doppelte Menge an CBGFP detektiert wurde, was an in die Filter gelangten Zellen liegen könnte. In den Kulturüberständen aus der transformierten Zelllinie mit und ohne Behandlung mit Nikkomycin Z wurde mehr CBGFP nachgewiesen. Die Behandlung mit Nikkomycin Z zeigte hier keine inhibitorische Wirkung. Nikkomycin Z hemmt die Mg-CS1 aus der Muschel *Mytilus galloprovincialis* (Schönitzer und Weiss, 2007) und damit sehr wahrscheinlich auch die Ar-CS1. Nikkomycin Z sollte eigentlich als Analogon zu UDP-GlcNAc über entsprechende Transporter in *D. discoideum* aufgenommen werden. Es wurde die übliche Menge an Nikkomycin Z eingesetzt. Allerdings wurde die 50 x Menge an UDP-GlcNAc eingesetzt. Bei Einsatz von einem Überschuss an Nikkomycin Z könnte möglicherweise ein Effekt durch diesen Chitinsynthaseinhibitor nachweisbar sein.

4.3.4. Untersuchung der Membranstruktur der Zelllinien mit Ar-CS1-YFP

Mittels Rasterkraftmikroskopie können Strukturen auf der Zelloberfläche unter physiologischen Bedingungen dreidimensional dargestellt werden. Gemessen werden die Höhenunterschiede der Zellen, die in den Höhenbildern dargestellt sind. In den Bildern des Fehlersignals werden die Ränder innerhalb der Probe hervorgehoben.

D. discoideum wurde bereits *in vivo* mittels Rasterkraftmikroskopie im kraftkartierenden Modus auf lokale mechanische Eigenschaften hin untersucht (Haupt et al., 2007) und es wurden Zelladhäsionskräfte von lebenden *D. discoideum* auf molekularer Ebene gemessen (Benoit und Gaub, 2002). In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die Zelloberflächenstrukturen von *D. discoideum* untersucht. Mögliche Veränderungen der Membranstruktur durch die Expression der Ar-CS1-YFP sollten analysiert werden (s. 3.4.5.). Die Abbildung der *D. discoideum* mit dem AFM war schwierig. Die Zellen verhielten sich anders als die Mesenchymzellen und Osteoblasten, mit denen die Kollaborationspartner in diesem Projekt, Prof. Dr. H. Clausen-Schaumann und D. Padula bereits Erfahrung hatten. Die *D. discoideum* wurden trotz Fixierung auf beschichteten Polysine[®]-Objektträgern und der Messung mit möglichst geringer Kraft leicht verschoben.

Die Zelloberfläche der *D. discoideum* erwies sich als adhäsiv und weich. Dies führte bei der Bildaufnahme zu Artefakten. Die Zellen der Cellulose-defizienten Stämme *dcsA*- und *dcsArCS1-YFP* ließen sich besser abbilden als die Zelllinien *Ax3-orf+* und die *Ax3ArCS1-YFP*. Derzeit liegen keine Erkenntnisse vor, ob bei den *dcsA*- die Oberflächenbeschaffenheit durch die fehlende Cellulosesynthese bedingt weniger adhäsiv sein könnte.

Die Zelloberfläche der *D. discoideum* zeigt unregelmäßige Furchen. Im Vergleich zu der Feinstruktur der *dcsA*- erscheint die Feinstruktur der *dcsArCS1-YFP* in größeren Bereichen körnig. Diese Körner sind teilweise in Fasern mit einheitlicher Orientierung ausgerichtet. Es

wäre interessant zu untersuchen, ob diese körnige Struktur durch in der Membran lokalisierte Ar-CS1-YFP verursacht wird. Dann würde sich nämlich die Frage stellen, ob gebildete Chitinfragmente oder eine Wechselwirkung der Ar-CS1-YFP über die Myosindomäne mit dem Aktincytoskelett die Faserbildung induzieren oder verstärken können.

Zur Identifizierung von Zellen mit Ar-CS1-YFP wurden Fluoreszenzaufnahmen gemacht. Nur vereinzelte, fluoreszierende Zellen mit extrem hohem Expressionsniveau konnten in dem zur Verfügung stehenden nicht konfokalen Fluoreszenzmikroskop direkt detektiert werden. Diese Zellen wurden leichter von der Abbildungsspitze verschoben und es gelang deshalb nicht, eine solche Zelle mittels Rasterkraftmikroskopie zu untersuchen.

Da die Zelloberfläche weich war, konnten keine Bilder im Nanobereich aufgenommen werden, mit denen mögliche Komplexe der Chitinsynthese in der Membran nachgewiesen werden könnten. Um hochauflösende Bilder mit dem AFM aufnehmen zu können, müsste die Chitinsynthese aufgereinigt werden, in künstliche Lipidschichten eingebaut und auf Festkörper immobilisiert werden. Die *D. discoideum*-Zellen könnten beispielsweise auch cryo-fixiert und mittels Cryo-Tomographie dreidimensional abgebildet werden. Die Auflösung des Cryo-TEM liegt etwa bei 4-6 nm. Bisher wurde bereits die Verteilung eines Glykoproteins auf der Zelloberfläche von *D. discoideum*-Zellen mit dem SEM untersucht (Geltosky et al., 1980). Für die Abbildung mit dem SEM müssen Zellen dehydriert werden, mit dem Cryo-TEM nicht. Eine Komplexbildung der Ar-CS1-YFP sollte auf diese Weise nachweisbar sein. Bei der Cellulosesynthese haben die Komplexe einen Durchmesser von 25 nm. Für derartige strukturelle Untersuchungen wurde in dieser Arbeit somit ein wichtiges zelluläres Modellsystem geschaffen.

4.3.5. *D. discoideum* als Modellsystem für die Untersuchung der Ar-CS1 auf molekularer Ebene

In dieser Arbeit konnte ein zelluläres *in vivo* Modellsystem für die Untersuchung der Ar-CS1 auf molekularer Ebene etabliert werden. Es stellte sich heraus, dass sich die hoch-komplexe transmembrane Myosin-Chitinsynthese Ar-CS1-YFP durchaus in *D. discoideum* heterolog exprimieren lässt. Die Ar-CS1-YFP-Moleküle sind sowohl innerhalb der Zellen, vermutlich in Chitosomen, als auch in der Cytoplasmamembran lokalisiert. Ar-CS1-YFP verändert die Membranstruktur der *D. discoideum* und erste Experimente deuten sogar auf eine geringe enzymatische Aktivität hin. Gebildete Chitinfragmente werden offensichtlich bevorzugt in den Kulturüberstand abgegeben.

Mit diesem Modellsystem für die Myosin-Chitinsynthese der Mollusken wurde der erste Grundstein gelegt, um die weitere Funktionalität auf Ebene verschiedener Einzeldomänen des Proteins bis hin zur Komplexbildung in Membranen und insbesondere im Hinblick auf

ihre wesentliche Rolle in der Biomineralisation der Schalenbildung zu untersuchen. Basierend auf dem hier neu geschaffenen System sind beispielsweise Mutationen in der ArCS1 für Funktionsstudien sehr leicht einführbar. Darüberhinaus kann dieses System dazu beitragen, die Bedeutung der mechanischen Interaktion zwischen der Myosin-Chitinsynthese und dem Aktincytoskelett zu erforschen, was sich anbieten würde, mit biochemischen Inhibitoren aufzuklären. Derzeit stehen keine geeigneten Methoden zur Verfügung, um Biomineralisationsprozesse und deren zellbiologische Kontrolle *in vivo* direkt im schalenbildenden Organismus zu studieren. Auf dem Weg dorthin stellt dieses stark vereinfachte, aber dadurch besser zugängliche zelluläre Modell mit der Expression eines der wichtigsten Schlüsselenzyme für die Biomineralisation der Mollusken einen entscheidenden Schritt dar.

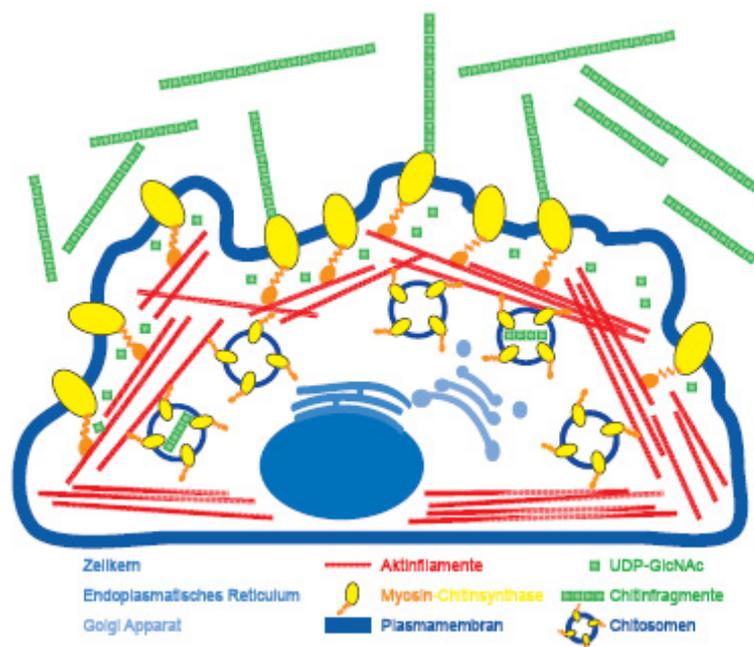


Fig. 4.1.: *Dictyostelium discoideum* als Modellsystem

5. Zusammenfassung

Bei der Schalenentwicklung von Mollusken spielt Chitin eine funktionelle Rolle. Die Chitinsynthese wird durch eine hochkonservierte Myosin-Chitinsynthase katalysiert. Bei der Schalenbildung entstehen physikalische Kräfte an der Fläche zwischen Mantelepithelzellen und der entstehenden Schale. Die Myosin-Chitinsynthase könnte diese Kräfte detektieren und zwischen entstehender Schale und Cytoskelett über Rückkopplungsregulationen ein Kräftegleichgewicht herstellen. Außerdem könnten die durch die Myosindomäne entstehenden kollektiven Scherkräfte die Kristallisation von Chitin und möglicherweise indirekt die Kristallisation von amorphem Calciumcarbonat beeinflussen.

Phylogenetische Studien mit bekannten Chitinsynthasen haben gezeigt, dass die Molluskenchitinsynthasen eine eigene Gruppe bilden. Auch die Myosindomänen der Molluskenchitinsynthasen sind phylogenetisch von den bisher bekannten Myosindomänen getrennt. Die Chitinsynthasen der Tiere haben sich während dem Kambrium, als sich auch die ersten Mollusken mit Schalen entwickelten, von den Chitinsynthasen der Pilze divergiert. Die Molluskenchitinsynthasen könnten eine entscheidende Rolle bei der Evolution komplexer mineralisierter Strukturen wie Perlmutter gespielt haben.

Mittels strukturellen und biochemischen Untersuchungen sollte die Funktionen der Myosindomäne der Ar-CS1 untersucht werden. Um Auswirkungen einer möglichen ionischen Komplexbildung über die Region niedriger Komplexität zu untersuchen, wurde die Myosindomäne mit und ohne diese Region kloniert. Zudem sollte durch ortsspezifische Mutation der Einfluss einer mutmaßlichen Regulationsstelle auf die Aktivität der Myosindomäne untersucht werden. *Dictyostelium discoideum* stellte sich als geeignetes Expressionssystem für die Myosindomänen der Ar-CS1 heraus. Immunfluoreszenzen zeigten, dass die verschiedenen Varianten der Myosindomänen der Ar-CS1 im Cytoplasma der *D. discoideum*-Zellen lokalisiert waren. Für Myosindomänen gibt es kein standardisiertes Aufreinigungsprotokoll. Myosindomänen aus der Cytoskelettfraction, die prinzipiell als funktionell betrachtet werden, konnten nur mit Harnstoff und KI, die auf hydrophobe Wechselwirkungen wirken, gelöst werden. Folgendes Protokoll hat sich zur Aufreinigung rekombinanter Myosindomänen der Ar-CS1 bewährt: ohne Detergenz lysierte Zellen werden mittels Ultrazentrifugation zentrifugiert. Der Überstand entspricht der löslichen Fraktion und wird gegen einen Hespuffer mit KI dialysiert. Anschließend kann die Ni-NTA-Chromatographie mit demselben Puffer als Laufpuffer erfolgen. Eluiert wurde mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen. Mittels MALDI wurde nachgewiesen, dass es sich bei dem 90 kD-Protein im Eluat um die Myosindomäne der Ar-CS1 handelt. Die Myosindomänen der Ar-CS1 konnten nicht in für Charakterisierungsversuchen ausreichenden Mengen isoliert werden. Diese Arbeit mit der präparativen Isolierung der

Myosindomänen legt den Grundstein für eine weitere Untersuchung der möglichen Regulationsstelle. Eine der spannendsten Weiterentwicklung dieses Projektes wäre den Einfluss der molekularen Kräfte auf die Chitinstruktur im Zusammenhang mit der Entwicklung der Molluskschale genauer zu untersuchen.

Außerdem wurde in dieser Arbeit ein Modellsystem für die Untersuchung der Rolle der Ar-CS1 bei der Schalenbildung der Mollusken entwickelt. Als Modellsystem dienen *D. discoideum*-Zellen. Bisher wurde noch kein so komplexes Membranprotein wie die Ar-CS1 heterolog exprimiert. Die Myosin-Chitinsynthase wurde in Ax3-orf+ und in dcsA-transformiert. Die erhaltenen Zelllinien Ax3ArCS1-YFP und dcsArCS1-YFP zeigten zwei verschiedene Verteilungsmuster: die Ar-CS1-YFP war entweder unstrukturiert oder globulär strukturiert verteilt. Die Ar-CS1-YFP ist vorwiegend im Cytoplasma und zu einem geringen Anteil im Cortex und in Filopodien lokalisiert. Eine Wechselwirkung mit dem Cytoskelett ist nicht auszuschließen. Analysen von Membranfraktionen der Zelllinien deuten an, dass sich Ar-CS1 in der Plasmamembran-enthaltenden Fraktion befindet. Ein sensitiver radioaktiver Chitinsynthaseaktivitätsassay und der Nachweis von Chitin mittels Calcofluor White bzw. mit einem GFP-getaggten Chitinbindeprotein an mit UDP-GlcNAc behandelten Zelllinien und in deren Kulturüberstand liefern den Hinweis, dass die Zelllinien Chitinfragmente synthetisieren können. Die Chitinfragmente bestehen vermutlich aus mehr als sechs GlcNAc-Monomeren und werden vor allem ins Medium abgegeben. Die Abbildung der Zellen mit Ar-CS1-YFP und der Wildtypzellen mittels Rasterkraftmikroskopie zeigte, dass die Zellen mit Ar-CS1-YFP im Vergleich zu den nicht transformierten Zellen eine körnige Feinstruktur der Membranoberfläche aufweisen.

Dieses Modell bildet die Basis für die Studie der Prozesse der Biomineralisation bei Mollusken ausgehend von der Chitinbildung. Das bisher bestehende Modell für die Vorgänge bei der Bildung der verschiedenen Schalenschichten beruht auf Untersuchungen der entkalkten Matrix.

6. Anhang

6.1. Multiples Alignment der Ar-CS1, Mg-CS1 und PfCHS1

Die Aminosäuresequenzen der Myosin-Chitinsynthasen aus Mollusken wurden verglichen.

			ATP		
Ar-CS1	1	MKPDDLS	LEVL	DENTIVQALR	
PfCHS1	1	MKPDDLS	LEVL	DENTIVQALR	
Mg-CS1	1	MKFDLS	LELD	TSIVQALR	
consensus	1	*****	*****	*****	
			ATP	switch I-Region	
Ar-CS1	91	ILVSGESGAGK	TESTK	YMIQHLMKISPSDD	
PfCHS1	91	ILVSGESGAGK	TESTK	YMIQHLMKISPSDD	
Mg-CS1	91	ILVSGESGAGK	TESTK	YMIQHLMKISPSDD	
consensus	91	*****	*****	*****	
Ar-CS1	181	VHRS	NGEKNPHV	FYALFAGMSRRRL	
PfCHS1	181	VHRS	NGEKNPHV	FYALFAGMSRRRL	
Mg-CS1	181	VHRS	NGEKNPHV	FYALFAGMSRRRL	
consensus	181	***	*****	*****	
Ar-CS1	271	HLANIVFMP	ITD	GVVADEYPLH	
PfCHS1	271	HLANIVFMP	ITD	GVVADEYPLH	
Mg-CS1	271	HLANIVFMP	ITD	GVVADEYPLH	
consensus	271	*****	*****	*****	
			switch II-Region	Relay-Loop	Relay-Loop
Ar-CS1	361	IWGR	QNNK	NMTRG	
PfCHS1	361	IWGR	QNNK	NMTRG	
Mg-CS1	361	IWAK	QNNK	NMTRG	
consensus	361	*****	*****	*****	
Ar-CS1	451	L	SLLD	RESHFPQS	
PfCHS1	451	L	SLLD	RESHFPQS	
Mg-CS1	451	L	SLLD	RESHFPQS	
consensus	451	*****	*****	*****	
Ar-CS1	541	SPTGTISDF	FASKCSR	PLPSPV	
PfCHS1	541	SPTGTISDF	FASKCSR	PLPSPV	
Mg-CS1	541	SPTGTISDF	FASKCSR	PLPSPV	
consensus	541	*****	*****	*****	
			SH1-Helix	Converter-Subdomain	Converter-
Ar-CS1	631	FVRC	KVFN	LHTSS	
PfCHS1	627	FVRC	KVFN	LHTSS	
Mg-CS1	628	FVRC	KVFN	LHTSS	
consensus	631	*****	*****	*****	
			Subdomain	Region niedriger Komplexität	
Ar-CS1	721	FL	NDYQ	LDML	
PfCHS1	717	FL	NDYQ	LDML	
Mg-CS1	718	FL	NDYQ	LDML	
consensus	721	*****	*****	*****	
Ar-CS1	807	---	RDL	ESTAD	
PfCHS1	802	NHKK	QTS	ESVDT	
Mg-CS1	808	NHKK	QTS	ESVDT	
consensus	811	*****	*****	*****	
			1. Transmembrandomäne	2. Transmembrandomäne	3. Transmembrandomäne
Ar-CS1	893	IL	CSIV	ASKMS	
PfCHS1	892	IL	CSIV	ASKMS	
Mg-CS1	892	IL	CSIV	ASKMS	
consensus	901	*****	*****	*****	
			4. Transmembrandomäne	5. Transmembrandomäne	
Ar-CS1	982	TD	DFRGL	IVIS	
PfCHS1	981	TD	DFRGL	IVIS	
Mg-CS1	988	TD	DFRGL	IVIS	
consensus	991	*****	*****	*****	
Ar-CS1	1072	WEL	PVSV	LILLS	
PfCHS1	1071	WEL	PVSV	LILLS	
Mg-CS1	1078	WEL	PVSV	LILLS	
consensus	1081	*****	*****	*****	
			6. Transmembrandomäne		
Ar-CS1	1162	A	EEVGV	AVSL	
PfCHS1	1161	A	EEVGV	AVSL	
Mg-CS1	1168	A	EEVGV	AVSL	
consensus	1171	*****	*****	*****	
			7. Transmembrandomäne	8. Transmembran-	
Ar-CS1	1252	L	WLSY	SITV	
PfCHS1	1251	L	WLSY	SITV	
Mg-CS1	1258	L	WLSY	SITV	
consensus	1261	*****	*****	*****	
Ar-CS1	1342	H	ETRO	ENTQ	
PfCHS1	1341	H	ETRO	ENTQ	
Mg-CS1	1347	H	ETRO	ENTQ	
consensus	1351	*****	*****	*****	
			Region niedriger Komplexität	Region niedriger Komplexität	
Ar-CS1	1432	E	KV	PTPY	
PfCHS1	1431	E	KV	PTPY	
Mg-CS1	1437	E	KV	PTPY	
consensus	1441	*****	*****	*****	
Ar-CS1	1519	P	LSL	FRMT	
PfCHS1	1518	P	LSL	FRMT	
Mg-CS1	1527	P	LSL	FRMT	
consensus	1531	*****	*****	*****	

			aktives Zentrum	
Ar-CS1	1609	CCPCGCFSLFRGSAVMDNDVLMKMYTTKPTFARRHYIQFQGEDRWLCTLMQQGHRIDYICAGADALTFAPETFNEFFNQRRWSPSTLANMM		
PfCHS1	1608	CCPCGCFSLFRGSAVMDNDVLMKMYTTKPTFARRHYIQFQGEDRWLCTLMQQGHRIDYICAGADALTFAPETFNEFFNQRRWSPSTLANMM		
Mg-CS1	1617	CCPCGCFSLFRGSAVMDNDVLMKMYTTKPTFARRHYIQFQGEDRWLCTLMQQGHRIDYICAGADALTFAPETFNEFFNQRRWSPSTLANMM		
consensus	1621	*****		
		9. Transmembrandomäne	10. Transmembrandomäne	
Ar-CS1	1699	DLSSWRDTRVINDNISRPVLYQFVLMASITLGPSTVILMITGSHVSVLGLHWIQSYLLSLLPVMVYLAICTMKSNDHQIFAAAVITAL		
PfCHS1	1698	DLSSWRDTRVINDNISRPVLYQFVLMASITLGPSTVILMITGSHVSVLGLHWIQSYLLSLLPVMVYLAICTMKSNDHQIFAAAVITAL		
Mg-CS1	1707	DLSSWRDTRVINDNISRPVLYQFVLMASITLGPSTVILMITGSHVSVLGLHWIQSYLLSLLPVMVYLAICTMKSNDHQIFAAAVITAL		
consensus	1711	*****		
		11. Transmembrandomäne	12. Transmembrandomäne	13. Transmembrandomäne
Ar-CS1	1789	YSVIMMIATVGTIISIVTENFGSPNVVFLSGLVIIIFVIAGILHPQEFFCLITGVLIYFMTVPSTFVLLTIVYLCNLNNSVWGTRETTPKLLT		
PfCHS1	1788	YSVIMMIATVGTIISIVTENFGSPNVVFLSGLVIIIFVIAGILHPQEFFCLITGVLIYFMTVPSTFVLLTIVYLCNLNNSVWGTRETTPKLLT		
Mg-CS1	1797	YSVIMMIATVGTIISIVTENFGSPNVVFLSGLVIIIFVIAGILHPQEFFCLITGVLIYFMTVPSTFVLLTIVYLCNLNNSVWGTRETTPKLLT		
consensus	1801	*****		
		Region niedriger Komplexität	Region niedriger Komplexität	
Ar-CS1	1879	KKEEELKLLQEEKKKKKESKSLPNRLGITSLISDARDLKNILCTARNNERN-MVSCAVQTEDTISPPERQLSRHSRRSEENERRQKKEPE		
PfCHS1	1878	KKEEELKMAEKKKKKESKSLNRLGITSLISDARDLKNILCTARNNERN-MVSCAVQTEDTISPPERQLSRHSRRSEENERRQKKEPE		
Mg-CS1	1887	KKEEELKMAEKKKKKESKSLNRLGITSLISDARDLKNILCTARNNERN-MVSCAVQTEDTISPPERQLSRHSRRSEENERRQKKEPE		
consensus	1891	*****		
		14. Transmembrandomäne		
Ar-CS1	1968	DVVPQGWEPDPPDPYWLQMDRLGNGVVRHLSRNRTPDFWFMFKKYLHPLEDEQQRKQIKEDLILKKNVVFIYCMINFLWTITLQLQS		
PfCHS1	1968	DVVPQGWEPDPPDPYWLQMDRLGNGVVRHLSRNRTPDFWFMFKKYLHPLEDEQQRKQIKEDLILKKNVVFIYCMINFLWTITLQLQS		
Mg-CS1	1976	DVVPQGWEPDPPDPYWLQMDRLGNGVVRHLSRNRTPDFWFMFKKYLHPLEDEQQRKQIKEDLILKKNVVFIYCMINFLWTITLQLQS		
consensus	1981	*****		
		15. Transmembrandomäne	Region niedriger Komplexität	
Ar-CS1	2058	MEDELKNFYIINKYEPLSLVPLSVAIAITLQFLSMFHRWGTFHLMSSTRIDWKKVHTEDFVRFVNEAQRQLRLEPEPDYDDLPP		
PfCHS1	2058	MEDELKNFYIINKYEPLSLVPLSVAIAITLQFLSMFHRWGTFHLMSSTRIDWKKVHTEDFVRFVNEAQRQLRLEPEPDYDDLPP		
Mg-CS1	2066	MEDELKNFYIINKYEPLSLVPLSVAIAITLQFLSMFHRWGTFHLMSSTRIDWKKVHTEDFVRFVNEAQRQLRLEPEPDYDDLPP		
consensus	2071	*****		
		Komplexität		
Ar-CS1	2148	DYDDDGFTSSIEFPSEQYDELPSLPASPGATCRKISRSKSHKERSKNFNKKNVPLQQIFENRLENIRKWKQGTLAFRPN--YRFDRT		
PfCHS1	2148	DYDDDGFTSSIEFPSEQYDELPSLPATPRSTFSSRSVRRYQ--TMRDHEWTDIPLLQQIFEDRLENIRKWKQGTLAFRPN--HDFDRT		
Mg-CS1	2156	DYDDDDTTTATTPSEQYDELPSLPATPRSTFSSRSVRRYQ--TMRDHEWTDIPLLQQIFEDRLENIRKWKQGTLAFRPN--HDFDRT		
consensus	2161	*****		
Ar-CS1	2235	ESHRFSEKKEHIMRQKMFKRSPRRINSKEDKNHSDDFLDHRDMPQSIKIDMH		
PfCHS1	2231	DSHRVSEKKEEMRQKMFKRSPRRIRSRDKSLEQNGQSTIIDMHKL-----		
Mg-CS1	2243	DDNRFSQKDDIMRQKMFKRSPRRINSKEDKNHSDDFLDHRDMPQSIKIDMH		
consensus	2251	*****		

6.2. Expression der Myosindomäne der Ar-CS1 in *E. coli*

Es wurde untersucht, ob die Myosindomäne der Ar-CS1 in *E. coli* (XL1-Blue und M15[pRep]) exprimiert werden kann. Die Myosindomäne wurde in hohen Mengen exprimiert, aber bildete so genannte „inclusion bodies“, aus denen sie mit den verschiedensten etablierten Methoden wie Reduktion der Wachstumstemperaturen, Zugabe von 6% EtOH bei IPTG-Zugabe sowie Zugabe von Tween® 20 bei der Aufreinigung nicht in Lösung gebracht werden konnte. Bei denaturierender Aufreinigung mit 8 M Harnstoff war die Bindung der Myosindomäne an die Ni-NTA-Matrix nicht optimal. Die Myosindomäne sollte zudem nicht unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden. McNally et al. (1991) beschreiben, dass manchmal in *E. coli* rekombinant exprimierte Myosine nach der Zellyse unlöslich sind und nur mit scharfen Denaturierungsmitteln gelöst werden können. Deshalb wurde als neues für Myosine prinzipiell geeignetes Expressionssystem *Dictyostelium discoideum* gewählt.

6.3. Reinigung der Myosindomäne der Ar-CS1 aus *D. discoideum*

6.3.1. Verschiedene Bedingungen bei der Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Um die Bindung der in *D. discoideum* rekombinant hergestellten Myosindomänen der Ar-CS1 an Ni-NTA-Agarose zu verbessern, wurden verschiedene Bedingungen bei der Chromatographie getestet.

Um den Effekt ionischer Wechselwirkungen zwischen MMD-H81 und anderen Proteinen auf das Chromatograpieverhalten zu untersuchen, wurde zu den Puffern 0,5 M NaCl sowie 10 mM MgSO₄ gegeben. Zudem wurde im Lysepuffer das EDTA auf die bei der Ni-NTA-Chromatographie zulässige Grenze von 1 mM reduziert. Falls die Myosindomänen der Ar-CS1 in der löslichen Fraktion an kurze Aktinfilamente, die nicht abzentrifugiert wurden, gebunden wären, sollte ATP die Loslösung von MMD-H81 unterstützen.

Zellen einer 4I-Kultur ($6,42 \cdot 10^6$ Zellen/ml) wurden in 150 ml 50 mM Hepes, pH 8, 10 mM MgSO₄, 500 mM NaCl, 7 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM Benzamidin, 0,02% NaN₃, 40 μ g/ml TLCK, 20 μ g/ml TPCK, 200 μ M PefablocSC, 200 μ M 1,10-Phenanthrolin resuspendiert und mit 1% Triton X-100 lysiert. Der Überstand wurde 2 h bei 20000 \times g zentrifugiert. Das resultierende Pellet war farblos. Der Überstand wurde nochmals für 1 h bei 170000 \times g zentrifugiert. 50 ml Überstand wurde mit 2,5 mM ATP sowie mit 200 μ l 50% Ni-NTA versetzt und ÜN inkubiert. Bei der Ni-NTA-Affinitätschromatographie diente der oben aufgeführte Lysepuffer als Basispuffer. Ansonsten wurde die Chromatographie wie in 2.2.8.4. beschrieben durchgeführt. Laut Westernblotanalyse hat MMD-H81 nicht an Ni-NTA-Agarose gebunden. Allerdings wurde auch wenig MMD-H81 im Durchlauf detektiert.

Eventuell wurde durch das ATP und das MgSO₄ die Polymerisation von vorhandenem G-Aktin zu F-Aktin induziert. Dies hätte dann die Bindung von Myosin an Ni-NTA-Agarose unterbunden. Zudem könnte MgSO₄ die Interaktion von MMD-H81 über die Carboxylatgruppen der Region niedriger Komplexität der MMD-H81 fördern. EDTA hingegen ist gegen die Proteasen in den *D. discoideum*-Zellen nötig. Außerdem könnte EDTA eine Aggregation über die Carboxylatgruppen der Region niedriger Komplexität verhindern.

Nachdem sich für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie der Hepes/KI-Puffer am geeignetsten erwies, wurde überprüft, ob die Zellen schon im Hepes/KI-Puffer lysiert werden können, so dass vor der Ni-NTA-Affinitätschromatographie nicht dialysiert werden muss. Anstelle von 0,6 M KI wurden zunächst nur 0,1 M KI zugesetzt. Unter dieser Bedingung konnte MMD-H81 nicht über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

Deshalb wurde untersucht, welche Rolle der Lysepuffer spielt. Es wurde der Lysepuffer nach Manstein und Hunt (1995) (s. 2.1.3.) mit (100 U auf 14 ml Puffer) oder ohne alkalischer Phosphatase bzw. Hepes/KI-Puffer mit 0,4 M KI oder mit 0,6 M KI verwendet. Die geernteten Zellen jeweils einer 100 ml-Kultur wurden wie in 2.2.8.3. beschrieben lysiert und zentrifugiert. Die Cytoskelettfractionen der Lysate in Lysepuffer wurden mit Extraktionspuffer (s. 2.1.3.) sowie mit 15 mM ATP behandelt (s. 2.2.8.3.). Die Mengen an MMD-H81 sind in den löslichen Fraktionen und in den Cytoskelettfractionen vergleichbar (vgl. Fig. 3.21.). Über die Bandenintensität wurden die auf den Westernblot aufgetragenen Mengen quantifiziert. Nach Abschätzung sind in 100 ml Kultur etwa 200 μ g MMD-H81. In der Tabelle sind die

abgeschätzten Mengen, die auf die gesamte Fraktion hochgerechnet wurden, angegeben. In Klammern steht die Ausbeute.

Bedingung	Lösliche Fraktion (14 ml)	Extrakt (0,4 ml)	Pellet (60 mg)
Hepes/KI-Puffer (mit 0,4 M KI)	9,0 µg (4,5%)	---	0,2 µg (0,1%)
Hepes/KI-Puffer (mit 0,6 M KI)	12,9 µg (6,5%)	---	0,1 µg (0,05%)
Lysepuffer mit Phosphatase	8,3 µg (4,2%)	0,1 µg (0,05%)	0,1 µg (0,05%)
Lysepuffer	11,5 µg (5,8%)	0,1 µg (0,05%)	0,1 µg (0,05%)

Für die Ni-NTA-Chromatographie mit den löslichen Fraktionen dieser Präparationen wurde als Basispuffer der Hoch-Salz-Puffer (s. 2.1.3.) bzw. der Hepes/KI-Puffer (s. 2.1.3.) verwendet. Bei keiner der gewählten Bedingungen konnte MMD-H81 in den Eluatens mittels Westernblot nachgewiesen werden.

Die sehr geringen Ausbeuten lassen sich durch Proteasen erklären. Auf Grund von Proteasen oder geringen Mengen an MMD-H81 war auch die Ni-NTA-Affinitätschromatographie nicht erfolgreich.

D. discoideum sind sehr reich an Proteasen. Deshalb werden zu den Puffern Proteaseinhibitoren zugesetzt. Offenbar waren diese nicht immer ausreichend. Ohne den Dialyseschritt konnten die Myosindomänen nicht über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

Die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Chromatographie sollte verbessert werden, indem vor dem Säulenlauf ein weiterer Reinigungsschritt durchgeführt wird.

Deshalb wurde getestet, ob sich die MMD-H81 mit Ammoniumsulfat fällen lassen. Dies war jedoch nicht erfolgreich.

Vor der Ni-NTA-Affinitätschromatographie sollte als weiterer Reinigungsschritt eine andere Affinitätschromatographie verwendet werden. Dazu wurde die Bindung an anti-(His)₆-tag in einem Tüpfeltest getestet. Antikörperlösung wurde auf Nitrocellulose-Membran aufgetragen und getrocknet. Nach Waschen mit 1× PBS wurden die Membranstückchen mit 10% Milchpulver in PBT 30 min blockiert. Die Membranen wurden dreimal mit PBT gewaschen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zusammen mit 2 ml löslicher Fraktion ÜN inkubiert. Die Membranen wurden 3x mit 1× PBS mit 0,1% BSA, 2x mit PBT mit 0,1% BSA sowie 3x mit 1× PBS mit 0,1% BSA gewaschen. Anschließend wurden die Proteine von der

Membran mit 0,2 M Glycin-HCl (pH 2.7) eluiert und mit 1 M K_2HPO_4 (pH 7.4) neutralisiert. Bei der Analyse mittels Westernblot konnte jedoch keine Bindung nachgewiesen werden.

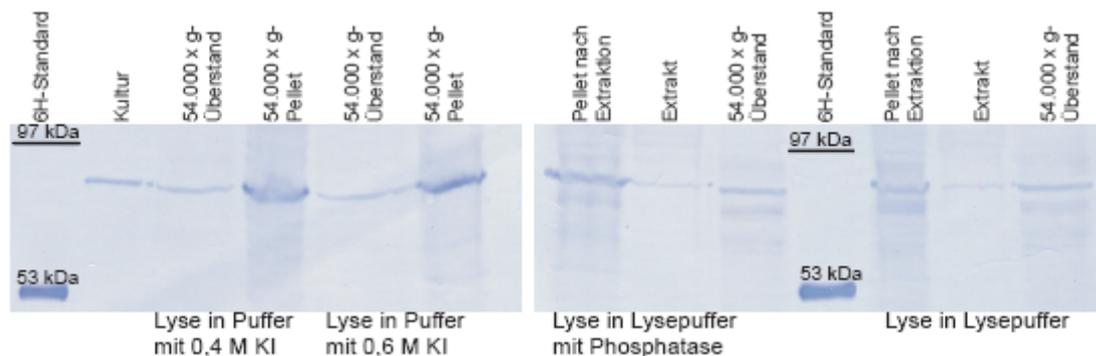


Fig. 6.1.: Einfluss von Lysepuffer auf die Ausbeute an MMD-H81

Zellpellet einer 100 ml-Kultur der Zelllinie MMD-H81 wurde in verschiedenen Puffern (Hepes-Puffer mit 0,4 M KI oder mit 0,6 M KI bzw. Lysepuffer nach Manstein und Hunt (s. 2.1.3.) ohne bzw. mit alkalischer Phosphatase) resuspendiert, lysiert und zentrifugiert. Die Extraktion der MMD-H81 aus den Pellets erfolgte mit ATP. Auf 8%-SDS-Polyacrylamidgele wurden je 0,1% Überstand (lösliche Fraktion), 4% Extrakt sowie je 17% Pellet aufgetragen. Es wurde wie in 2.2.3.7. beschrieben geblottet. Zu dem Standard wurde je 30 ng p53 gegeben. Die Ausbeuten bei den verschiedenen Pufferbedingungen sind vergleichbar.

6.3.2. Einfluss von Detergenzien auf die Ausbeute bei der Aufreinigung von Myosindomänen der Ar-CS1

Es besteht die Möglichkeit, dass Triton X-100, das zur Zellyse zugesetzt wird, Micellen bildet und in diesen Myosindomänen einschließt. Deshalb wurde Zellen der Linie MMD-H81 in Lysepuffer (s. 2.1.3.) resuspendiert und durch Homogenisieren lysiert. Die Suspension wurde aufgeteilt und mit 0,5 % Triton X-100, mit 1,0 % CHAPS bzw. mit 1,5 % N-Lauroylsarcosine für 30 min auf Eis gerührt bzw. ohne Detergenz mit Ultraschall behandelt. Nach der Zellyse wurde 1 h bei $170.000 \times g$ zentrifugiert. Bei der Lyse mit N-Lauroylsarcosine war nur ein farbloses, gelartiges Pellet entstanden; das obere rötliche Pellet fehlte. Die Pellets unterschieden sich in ihrem Gewicht: bei der Aufreinigung ohne Detergenz hatte das Pellet ein Gewicht von 0,528 g, bei der mit Triton X-100 0,254 g, bei der mit CHAPS 0,278 g und bei der mit N-Lauroylsarcosine 0,123 g. Die gesamten Pellets wurde jeweils mit Extraktionspuffer, 15 mM ATP, 5 mM Benzamidin und 200 μ M PefablocSC homogenisiert, wobei auf 0,1 g Pellet 250 μ l Puffer gegeben wurde. Nach 30 min auf Eis wurde 1 h bei $16.000 \times g$ zentrifugiert. Die löslichen Fraktionen wurden dreimal gegen Hepes/KI-Puffer mit 0,4 M KI (s. 2.1.3.) für insgesamt 20 h dialysiert. Bei der Ni-NTA-Chromatographie diente der Hepes/KI-Puffer als Basispuffer. In Fig. 6.2. ist die Westernblotanalyse der Reinigung dargestellt.

Nach Quantifizierung der Proteinmengen auf dem Westernblot befinden sich in den gesamten lösliche Fraktionen und Extrakten folgende Mengen an MMD-H81:

Behandlung	Lösliche Fraktion	Extrakt
ohne Detergenz	11,3 µg (12 ml)	1,1 µg (1,320 ml)
mit Triton X-100	9,8 µg (12 ml)	0,4 µg (0,635 ml)
mit CHAPS	11,1 µg (12 ml)	0,2 µg (0,695 ml)
mit N-Lauroylsarcosine	13,6 µg (12 ml)	0.2 µg (0,308 ml)

In Klammern sind die Gesamtvolumina angegeben.

In der 1I-Kultur, die aufgeteilt wurde, waren insgesamt nach Abschätzung 830 µg MMD-H81. Am meisten MMD-H81 ist in der löslichen Fraktion, bei der das Zelllysate mit N-Lauroylsarcosine behandelt wurde. Bei der Präparation, bei der das Zelllysate mit N-Lauroylsarcosine behandelt wurde, war kaum Cytoskelettfraction vorhanden, so dass beim Pellet kein MMD-H81 und im Extrakt am wenigsten MMD-H81 detektiert wurde. Erwartungsgemäß befand sich MMD-H81 also vorwiegend in der löslichen Fraktion. Am meisten MMD-H81 konnte aus der Cytoskelettfraction extrahiert werden, die zuvor nicht mit Detergenz behandelt worden war. Diese Präparation lieferte auch nach der Ni-NTA-Chromatographie die beste Ausbeute. Die Präparationen, die mit Triton X-100 bzw. mit N-Lauroylsarcosine behandelt wurden, konnten hingegen nicht über Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt werden (s. Fig. 6.2. B).

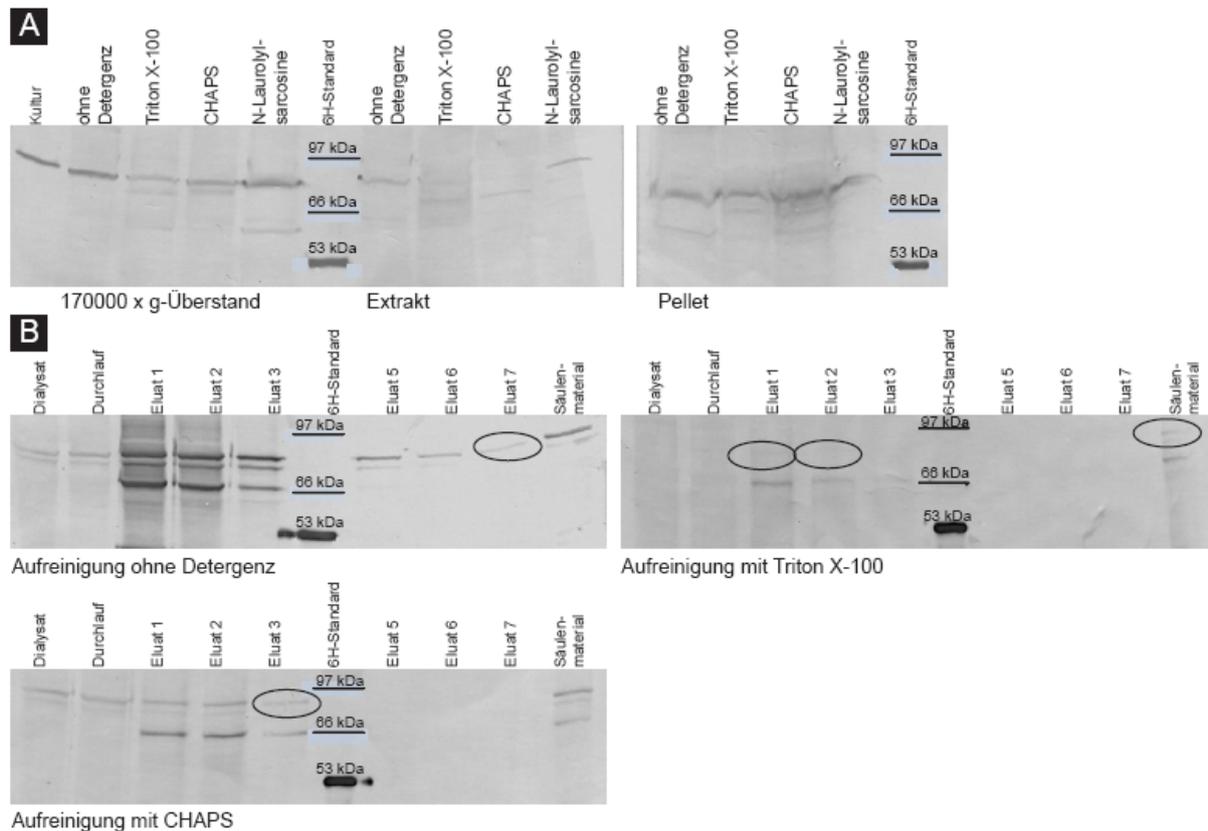


Fig. 6.2.: Einfluss von Detergenzien auf die Ausbeute

(A) Zellen der Linie MMD-H81 wurden einmal ohne Detergenz, einmal mit 0,5% Triton X-100, einmal mit 1,0% CHAPS und einmal mit 1,5% N-Lauroylsarcosine lysiert. Mittels Westernblot wurden je 15 μ l Überstände bzw. Extrakte und je 10 mg Pellet analysiert. Bei der Behandlung mit N-Lauroylsarcosine ist in den löslichen Fraktionen am meisten MMD-H81. Die größte Ausbeute wurde bei den Extrakten in der Probe ohne Detergenz erzielt. Kein MMD-H81 ist im Pellet der mit N-Lauroylsarcosine behandelten Probe nachweisbar. **(B)** Die löslichen Fraktionen wurden über Ni-NTA-Chromatographie gereinigt. Mittels Westernblot wurden je 15 μ l der Säulenfraktionen und 20% Säulenmaterials analysiert. Die schwachen Banden wurden mit Kreisen markiert. Bei der Präparation ohne Detergenz konnte die größte Ausbeute erzielt werden.

Die Myosindomänen aus der löslichen Fraktion konnten nicht optimal über Ni-NTA-Chromatographie gereinigt werden. Weitere Tests wurden deshalb mit aus dem Cytoskelettpellet gelöstem Proteinextrakt durchgeführt, was Rückschlüsse auf die Bindung des His-Tags an Ni-NTA-Agarose und somit die Proteinfaltung zulassen würde. Bei Verwendung des Hoch-Salz-Puffers (s. 2.1.3.) konnte in den Eluat nur ein 66 kDa-Protein nachgewiesen werden. Daher wurden die Durchläufe dieser Säulenläufe gegen 0,6 M Hepes/KI-Puffer (s. 2.1.3.) dialysiert und in demselben Puffer chromatographiert. Die Westernblotanalyse zeigte wieder nur ein 66 kDa-Protein.

Ein weiterer Extrakt wurde vergleichend gegen einen Hepes/KI-Puffer mit 0,6 M KI sowie gegen einen 8 M Harnstoffpuffer (s. 2.1.3.) dialysiert und chromatographiert. Auch hier befand sich die gewünschte Myosindomäne nicht im Eluat.

Auch die aus der Cytoskelettfraction extrahierten Myosindomänen der Ar-CS1, die prinzipiell als funktionell gelten, konnten nicht optimal über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

6.3. Werte der Quantifizierung der extrahierten Myosindomänen bei verschiedenen Bedingungen

Um das Extraktionsverhalten der verschiedenen rekombinant hergestellten Varianten der Myosindomäne der Ar-CS1 zu vergleichen, wurden sie mit ausgewählten Bedingungen aus der Cytoskelettfraction agelöst. Das Experiment wurde zwei Mal durchgeführt (s. 3.3.3.4.). Die auf Westernblot analysierten Proteinmengen wurden quantifiziert. Die Werte sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Probe	1 ATP	2 NaCl + ATP	3 alkalische Phosphatase + ATP	4 Glykol + ATP	5 DMSO + ATP	6 Harnstoff + ATP	7 KI + ATP	8 KCl + ATP	9 kein ATP	10 NaCl ohne ATP	11 KCl ohne ATP
MMD- H81	11,6 0	18,0 0	13,4 7,7	18,7 36,6	10,8 17,8	25,3 24,3	21,6 0	18,0 16,4	13,3 18,7	17,0 19,6	12,7 22,2
3H- MA-LC	6,3 0	6,6 15,0	5,1 0	14,8 11,1	11,4 10,8	14,6 32,0	10,1 21,4	9,0 10,8	9,3 13,4	11,5 19,8	11,0 14,7
3H- MA-A	17,3 20,7	31,4 22,2	21,0 14,7	18,2 14,7	11,4 7,2	26,6 14,7	24,7 0	17,9 12,3	14,0 28,8	18,1 19,5	13,1 14,1
3H- MA-S	11,6 66,9	15,4 18,0	12,5 25,5	20,0 16,2	11,9 10,8	32,3 34,2	18,1 29,4	14,7 12,9	13,6 54,0	10,0 24,9	11,5 24,3

6.4. Messwerte des Radioaktivitätstest zur Untersuchung der Aktivität der Ar-CS1-YFP

1. Aktivitätsassay		2. Aktivitätsassay		3. Aktivitätsassay	
	CPM		CPM		CPM
Szinti	37	Szinti	43	Szinti	24
100µg BSA		100µg BSA	75	100µg BSA	68
Hefe	5112	Hefe	3731	Hefe	4458
WT (1' x g P)	100	WT (1' x g P)	104	WT (1' x g P)	131
WT (54' x g P)	76	WT (20' x g P)	409	WT (54' x g P)	80
WT (54' x g ÜS)	39	WT (20000 g ÜS)	57	WT (54' x g ÜS)	76
ChS 2A4 -L (1' x g P)	81	WT (54' x g P)	54	ChS A5 -L (1' x g P)	131
ChS 2A4 -L (54' x g P)	360	WT (54' x g ÜS)	57	ChS A5 -L (54' x g P)	67
ChS 2A4 -L (54' x g ÜS)	78	ChS 2A4 -L (1' x g P)	55	ChS A5 -L (54' x g ÜS)	64
ChS 3C4 +L (1' x g P)	77	ChS 2A4 -L (20' x g P)	205	ChS C4 -L (1' x g P)	107
ChS 3C4 +L (54' x g P)	85	ChS 2A4 -L (20' x g ÜS)	45	ChS C4 -L (54' x g P)	74
ChS 3C4 +L (54' x g ÜS)	69	ChS 2A4 -L (54' x g P)	110	ChS C4 -L (54' x g ÜS)	67
Waschfraktion	213	ChS 2A4 -L (54' x g ÜS)	35	Waschfraktion	208
		ChS 3C4 +L (11' x g P)	43		
		ChS 3C4 +L (20' x g P)	129		
		ChS 3C4 +L (20' x g ÜS)	37		
		ChS 3C4 +L (54' x g P)	125		
		ChS 3C4 +L (54' x g ÜS)	64		
		Waschfraktion	174		

4. Aktivitätsassay		5. Aktivitätsassay		6. Aktivitätsassay	
	CPM		CPM		CPM
Szinti	56	Szinti	70	Szinti	104
100µg BSA	54	100µg BSA	72	100µg BSA	135
Hefe	5117	Hefe	3789	Hefe	330
WT (1' x g P)	77	WT (1' x g P)	116	WT (1' x g P)	264
WT (54' x g P)	134	WT (54' x g P)	271	WT (1' x g ÜS)	98
WT (54' x g ÜS)	41	WT (54' x g ÜS)	73	ChS 3D5 -L (1' x g P)	189
ChS 2A4 -L (1' x g P)	92	ChS 8 (1' x g P)	167	ChS 3D5 -L (1' x g ÜS)	152
ChS 2A4 -L (54' x g P)	168	ChS 8 (54' x g P)	283	ChS 2B3 -L (1' x g P)	264
ChS 2A4 -L (54' x g ÜS)	70	ChS 8 (54' x g ÜS)	53	ChS 3B3 -L (1' x g ÜS)	177
ChS 3C4 +L (1' x g P)	67	ChS 13 (1' x g P)	152	ChS 1A3 +L (1' x g P)	151
ChS 3C4 +L (54' x g P)	199	ChS 13 (54' x g P)	246	ChS 1A3 +L (1' x g ÜS)	76
ChS 3C4 +L (54' x g ÜS)	42	ChS 13 (54' x g ÜS)	50	ChS 2A5 +L (1' x g P)	230
Waschfraktion	218	ChS 22 (1' x g P)	188	ChS 1A5 +L (1' x g ÜS)	117
		ChS 22 (54' x g P)	178	Waschfraktion	240
		ChS 22 (54' x g ÜS)	61		
		Waschfraktion	214		

Auswertung der Aktivität in 54.000 x g-Pellets aus dem 1., 2. und 3. Test

WT	2A4	3C4	
	39	323	48
	11	67	82
	78	112	143
	43	167	91 Mittelwert
	34	112	48 Stabw.

6.5. Chitinsynthese in Ar-CS-YFP Zelllinien in Gegenwart von Latrunculin A

Die Zelllinien *dcsA*- und *dcsArCS1*-YFP wurden in 1 ml Kulturmaßstab mit 5 mM UDP-GlcNAc und 5 µM Latrunculin A, das zur Depolymerisation von Aktin führt, behandelt. Nach drei Tagen hatten sich die Zellen kaum vermehrt. Unter dem Mikroskop sahen die Zellen stark deformiert aus. Die Depolymerisation von Aktin beeinträchtigt wichtige Zellfunktionen wie beispielsweise die Zellbewegung oder den Transport von Vesikeln. Fixierte Zellen wurden mit CBGFP gefärbt (s. 2.2.6.). Aufgrund von unspezifischer, zumindest unerwartete Bindung des CBGFP an die deformierten Zellen war das gemessene Fluoreszenzsignal bei *dcsA*- und *dcsArCS1*-YFP gleich intensiv. Der Kulturüberstand wurde wie in 2.2.9.6. beschrieben mit CBGFP auf Chitinfragmente hin untersucht. Die Westernblotanalyse (s. Fig. 6.3.) ergab, dass bei den Proben des mit Latrunculin A behandelten *dcsA*- am meisten CBGFP im Filter zurückgeblieben war. Bei den Proben des *dcsArCS1*-YFP war die Menge an CBGFP aus dem Filter nur geringfügig weniger als bei den Proben der mit UDP-GlcNAc, jeweils mit und ohne Nikkomycin Z behandelten Zelllinie (vgl. 3.4.4.). Möglicherweise waren bei dem Test durch die Zentrifugation nicht alle deformierten Zellen aus dem Kulturüberstand entfernt worden und wurden in den Filter überführt. Eine Aussage darüber, ob CBGFP an diese Zellen gebunden hatte oder aus anderen Gründen nicht vollständig ins Filtrat gelangte, konnte nicht getroffen werden.

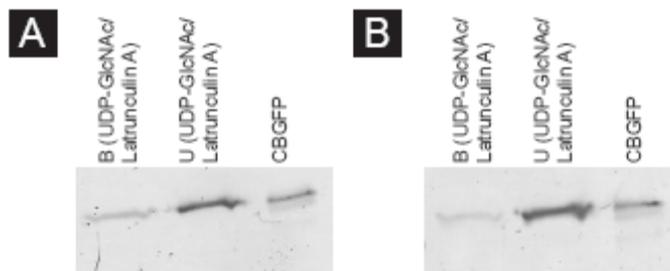


Fig. 6.3. CBGFP-Analyse des Kulturüberstandes von in Gegenwart von Latrunculin A kultivierten dcsArCS1-YFP Zellen

(A) dcsA- (B) dcsArCS1-YFP. Auf dem Westernblot wurde das an Material aus dem Kulturüberstand gebundene CBGFP (B) und das ungebundene CBGFP (U) analysiert. Als Positivkontrolle wurden 2,5 µg CBGFP aufgetragen.

6.6. Aufreinigung von Chitin aus dem Kulturüberstand mittels Fällung

Durch Fällung mit Aceton und TCA des Mediums einer Kultur können Polysaccharide aufgereinigt werden (Rosan und Hammond, 1974). Die Länge und der Acetylierungsgrad und damit die Eigenschaften bezüglich Löslichkeit in Aceton und Wasser des Chitins, das mutmaßlich von den Zelllinien mit Ar-CS1-YFP gebildet wurde, sind nicht bekannt. Daher ist nicht sicher, ob das Chitin mit dieser Methode aufzureinigen ist. Trotzdem wurde wie in 2.2.9.4. beschrieben versucht aus dem Kulturüberstand von vier verschiedenen Ax3ArCS1-YFP und zur Kontrolle aus Ax3-orf+ Zucker aufzureinigen. Zwei Zelllinien (ChS2B3 und ChS3D5) wurden ohne Lysozym und zwei Zelllinien (ChS1A3 und ChS1A5) wurden mit Lysozym kultiviert. Der gewonnene Rückstand wurde mit CBGFP und mittels GC-MS analysiert.

6.6.1. Analyse der aus dem Kulturmedium aufgereinigten Polysaccharide mit CBGFP

Wie bei Weiss und Schönitzer (2006) beschrieben wurden in einem Bindungstest jeweils 15 mg von den polysaccharidhaltigen Proben von Ax3-orf+ und den vier verschiedenen Zelllinien mit CBGFP behandelt. Als Referenz wurde das Experiment mit jeweils 5 mg Chitin (Roth), Chitosan (Roth), Cellulose, Agarose (Roth) und Stärke (AppliChem) durchgeführt. Pellet (P) und Überstand (ÜS) der Bindereaktion wurden quantitativ in 2× Laemmli aufgenommen und bei 95°C für 5 min inkubiert. Die Proben wurden mittels Westernblot analysiert (s. Fig 6.4.). CBGFP bindet nicht nur an die Polysaccharide aus dem Kulturüberstand der transformierten Zelllinien, sondern auch an die Polysaccharide aus dem Kulturüberstand der Ax3-orf+. Es ist kein Unterschied der Mengen an CBGFP in den verschiedenen Pellets oder Überständen zu erkennen. Nur bei einer Zelllinie (ChS1A3) wurde im Pellet kein CBGFP nachgewiesen. Da dieser Klon mit Lysozym kultiviert wurde,

könnte es sein, dass das Chitin vom Lysozym abgebaut wurde. Dann dürfte jedoch bei der ebenfalls mit Lysozym kultivierten Zelllinie ChS1A5 auch kein Chitin nachweisbar sein.

Die Bindungsspezifität des CBGFP wurde nochmals mit Agarose, Stärke, Cellulose, Chitin und Chitosan überprüft. Bei allen Substraten ist vermutlich aufgrund von unspezifischer Bindung im Pellet CBGFP detektierbar. Die Bindung an Chitin unterscheidet sich von den anderen Substraten, da das gesamte CBGFP an Chitin gebunden hat. Im Überstand kann kein ungebundenes CBGFP detektiert werden. Chitosan, deacetyliertes Chitin, wird hingegen vom CBGFP kaum erkannt.

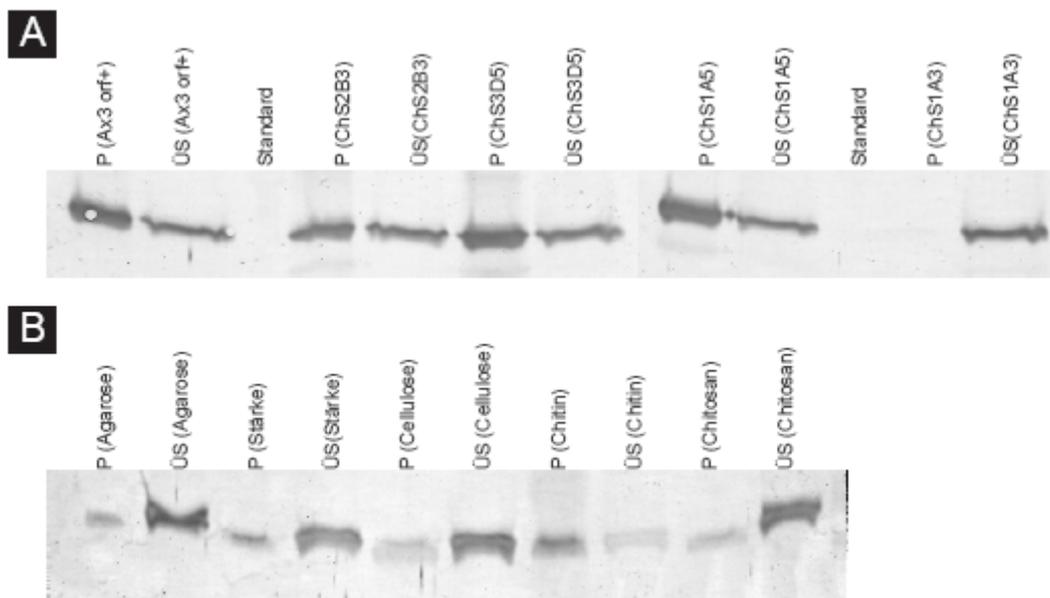


Fig. 6.4.: Analyse der Polysaccharide aus dem Kulturmedium mittels CBGFP-Bindungstest

Gefällte Polysaccharide aus dem Kulturüberstand von Ax3 orf + und Ax3ArCS1-YFP **(A)** und Referenzen **(B)** wurden mit CBGFP inkubiert. Die Proben wurden auf 12% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. **(A)** CBGFP bindet unspezifisch an Polysaccharide aus Ax3-orf+ (vgl. P (Ax3-orf+)). Nur bei der Zelllinie ChS21A3, die in Gegenwart von Lysozym kultiviert wurde, wurden keine Polysaccharide erkannt. **(B)** CBGFP bindet an alle Substanzen unspezifisch. Beim Chitin ist jedoch kaum CBGFP im Überstand.

6.6.2. Analyse der Polysaccharide aus dem Kulturmedium mit GC-MS

Die aus dem Kulturüberstand gewonnenen Polysaccharide sowie Chitin als Referenz wurden zur Analyse mittels GC/MS mit 6 N HCl bei 110°C hydrolysiert. Dabei wurden die entstandenen Zuckermonomere deacetyliert. Anschließend wurden die Zucker mit NaBH₄ reduziert. Um die Aminosucker in der Kationenaustausch-Chromatographie nicht zu verlieren, wurden sie vor dem Säulenauftrag wieder reacctyliert. Als Standard wurden auch 100 µg Glucosamin und 100 µg Galactosamin für GC/MS vorbereitet. (s. 2.2.9.5).

Nach dem Standard betragen die relativen Retentionszeiten für GlcNAc 1,54 und für GalNAc 1,61 (s. Fig. 6.5. A). Bei der Chitinanalyse ist ein Peak bei der relativen Retentionszeit von GlcNAc zu sehen (s. Fig. 6.5. B). Bei den Proben wurde nicht nur bei den Spektren der Zelllinien, sondern auch bei dem Spektrum von Ax3-orf+ GlcNAc nachgewiesen. Die relative Retentionszeit ist jeweils bei 1,55. Bei den Proben von Ax3-orf+, ChS1 und ChS2 wurde GalNAc mit einer Retentionszeit von 1,62 detektiert. Bei den Proben ChS3 und ChS4 war GalNAc nicht nachweisbar (s. Fig. 6.5. C-G). Diese beiden Zelllinien waren mit 0,01 mg/ml Lysozym im Medium kultiviert worden.

Nach Abschätzung scheint in allen Proben ungefähr dieselbe Menge an GlcNAc zu sein. Eine genauere Quantifizierung ist nicht sinnvoll, da die Probe aus dem Kulturüberstand von Ax3-orf+ mit einem Dialyseschlauch mit größerem MWCO dialysiert worden war. Außerdem ist die Hydrolyse mit HCl nicht quantitativ. Die Peaks scheinen hauptsächlich von GlcNAc oder von im Zuge der Aufreinigung acetyliertem Glucosamin aus *Dictyostelium* zu stammen. Yamada et al. (1974) untersuchten die extrazellulären Polysaccharide der *D. discoideum* und konnten unter anderem Glucosamin nachweisen.

Um Chitinfragmente aus dem Kulturüberstand der Zelllinien nachweisen zu können, müssten vor allem die Bedingungen bei Aufreinigung über die Aceton- und TCA-Fällung optimiert werden.

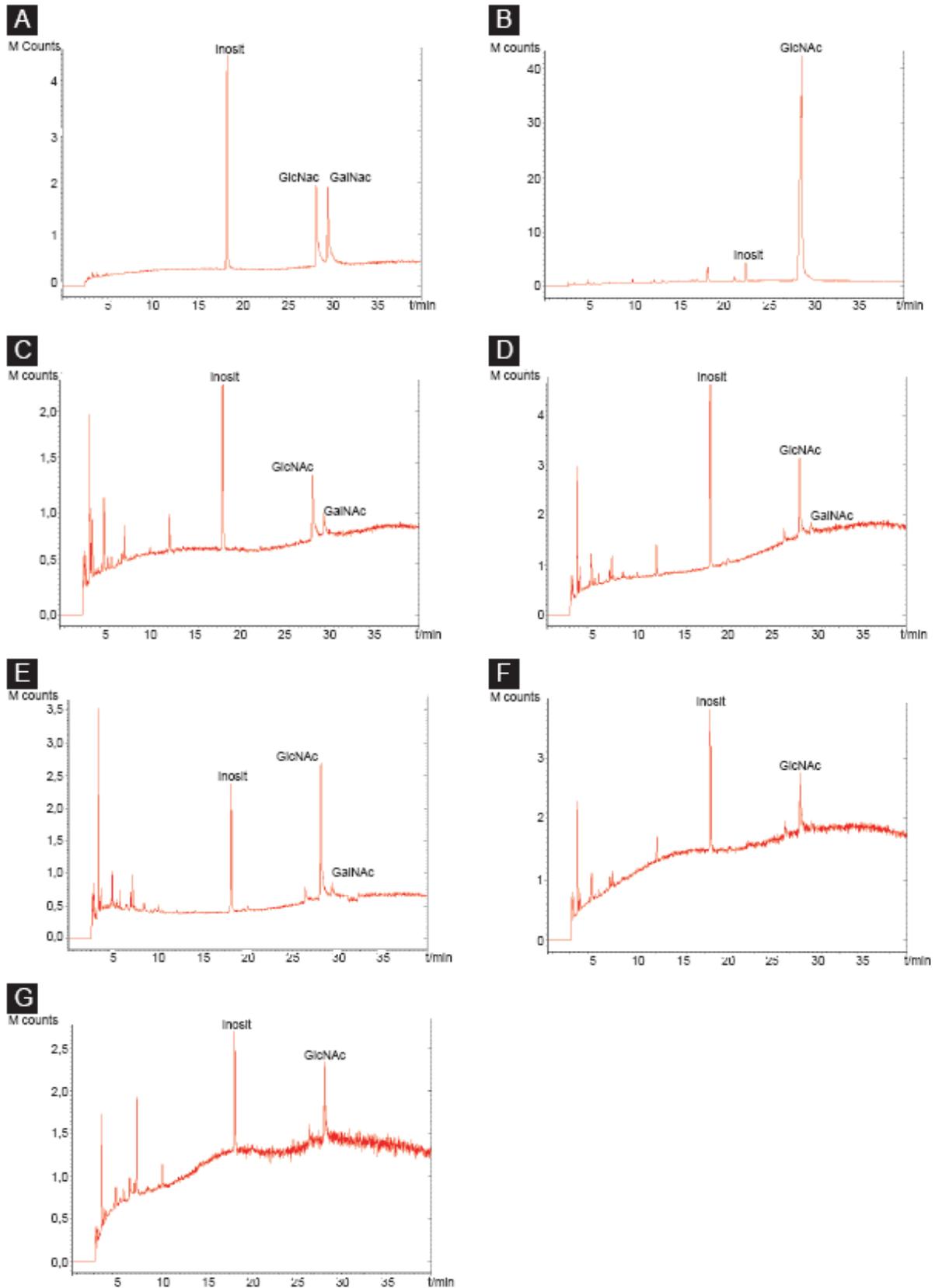


Fig. 6.5.: GC/MS-Spektren

(A) Standard mit Glucosamin und Galactosamin; **(B)** Chitin; **(C)** Ax3-orf+; **(D)** ChS1; **(E)** ChS2; **(F)** ChS3; **(G)** ChS4

7. Literaturverzeichnis

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry* 12, 980-987.
- Aguado-Velasco, M., Aguado-Velasco, C., Kuczmarski, E.R. (1993). Isolation of myosin from *Dictyostelium* cytoskeletons. *Protein Expr Purif.* 4, 328-332.
- Arakane, Y., Specht, C.A., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W. (2008). Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol.* 38, 959-962.
- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Höfte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J., Williamson, R.E. (1998). Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* 279, 717-720.
- Arya, R., Bhattacharya A., Saini K.S. (2008). *Dictyostelium discoideum* - a promising expression system for the production of eukaryotic proteins. *FASEB J.* 22, 4055-4066.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., Geiger, B. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol.* 3, 466-472.
- Bartnicki-Garcia, S. (2006). Chitosomes: past, present and future. *FEMS Yeast Res.* 6, 957-965.
- Bement, W.M., Mooseker, M.S. (1995). TEDS rule: a molecular rationale for differential regulation of myosins by phosphorylation of the heavy chain head. *Cell Motil Cytoskeleton.* 31, 87-92.
- Benoit, M., Gaub, H.E. (2002). Measuring cell adhesion forces with the atomic force microscope at the molecular level. *Cells Tissues Organs.* 172, 174-189.
- Bezares, J., Asaro, R.J., Hawley, M. (2008). Macromolecular structure of the organic framework of nacre in *Haliotis rufescens*: implications for growth and mechanical behaviour. *J. Struct. Biol.* 163, 61-75.
- Blanton, R.L., Fuller, D., Iranfar, N., Grimson, M.J., Loomis, W.F. (2000). The cellulose synthase gene of *Dictyostelium*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 2391-2396.
- Bøggild, O.B. (1930). The shell structure of the mollusks. *K. Dan Vidensk Selsk Skr Naturvidensk. Math. Afd.* 9, 233-326.
- Borejdo, J., Linder, S., Werber, M.M. (1984). Hydrophobic interaction chromatography of myosin fragments: potential use in purification. *Arch Biochem Biophys.* 231, 193-201.
- Bracker, C.E., Ruiz-Herrera, J., Bartnicki-Garcia, S. (1976). Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73, 4570-4574.
- Brown Jr, R.M., Saxena, I.M. (2000). Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiol Biochem.* 38, 57-67.
- Bustamante, C., Chemla, Y.R., Forde, N.R., Izhaky, D. (2004). Mechanical processes in biochemistry. *Annu Rev Biochem.* 73, 705-748.
- Butt, H-J., Jaschke, M. (1995). Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology* 6, 1-7.
- Charette, S.J., Cosson, P. (2004). Preparation of genomic DNA from *Dictyostelium discoideum* for PCR analysis. *Biotechniques* 36, 574-575.

- Chaumont, F., Loomis, W.F., Chrispeels, M.J. (1997). Expression of an *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin in *Dictyostelium* results in hypoosmotic sensitivity and developmental abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA*. *94*, 6202-6209.
- Chicurel, M.E., Chen, C.S., Ingber, D.E. (1998). Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol*. *10*, 232-239.
- Cohen, N.R., Knecht, D.A., Lodish, H.F. (1996). Functional expression of rat GLUT 1 glucose transporter in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J*. *315*, 971-975.
- Cohen, E. (2001). Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci*. *57*, 946-950.
- Côté, G.P., Albanesi, J.P., Ueno, T., Hammer, J.A., 3rd, Korn, E.D. (1985). Purification from *Dictyostelium discoideum* of a low-molecular-weight myosin that resembles myosin I from *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem*. *260*, 4543-4546.
- Dosé, A.C., Ananthanarayanan, S., Moore, J.E., Burnside, B., Yengo, C.M. (2007). Kinetic mechanism of human myosin IIIA. *J Biol Chem*. *282*, 216-231.
- Eichinger, L., Lee, S.S., Schleicher, M. (1999). *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech*. *47*, 124-134.
- Emons, A.M., Höfte, H., Mulder, B.M. (2007). Microtubules and cellulose microfibrils: how intimate is their relationship? *Trends Plant Sci*. *12*, 279-281.
- Evans, D.F., Wennerström, H. (1999). The colloidal domain: where physics, chemistry, biology, and technology meet (advances in interfacial engineering), Wiley-VCH, New York.
- Falini, G., Albeck, S., Weiner, S., Addadi, L. (1996). Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science* *271*, 67-69.
- Falini, G., Fermani, S. (2004). Chitin mineralization. *Tissue Eng*. *10*, 1-6.
- Finer, J.T., Simmons, R.M., Spudich, J.A. (1994). Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*. *368*, 113-119.
- Fukui, Y., Lynch, T.J., Brzeska, H., Korn, E.D. (1989). Myosin I is located at the leading edges of the locomoting *Dictyostelium* amoebae. *Nature*. *341*, 328-331.
- Geeves, M.A., Fedorov, R., Manstein, D.J. (2005). Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell Mol Life Sci*. *62*, 1462-1477.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K.M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*. *2*, 793-805.
- Geltosky, J.E., Birdwell, C.R., Weseman, J., Lerner, R.A. (1980). A glycoprotein involved in aggregation of *D. discoideum* is distributed on the cell surface in a nonrandom fashion favoring cell junctions. *Cell* *21*, 339-345.
- Glaser, L., Brown, D.H. (1957). The synthesis of chitin in cell-free extracts of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*. *228*, 729-742.
- Goodson, H.V., Dawson, S.C. (2006). Multiplying myosins. *Proc Natl Acad Sci USA*. *103*, 3498-3499.
- Green, A.A., Newell, P.C. (1974). The isolation and subfractionation of plasma membrane from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J*. *140*, 313-322.
- Grimson, M.J., Haigler, C.H., Blanton, R.L. (1996). Cellulose microfibrils, cell motility, and plasma membrane protein organization change in parallel during culmination in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci*. *109*, 3079-3087.
- Hachikubo, Y., Ito, K., Schiefelbein, J., Manstein, D.J., Yamamoto, K. (2007). Enzymatic activity and motility of recombinant *Arabidopsis* myosin XI, MYA1. *Plant Cell Physiol*. *48*, 886-891.

- Hamant, O., Heisler, M.G., Jönsson, H., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Bokov, P., Corson, F., Sahlin, P., Boudaoud, A., Meyerowitz, E.M., Couder, Y., Traas, J. (2008). Developmental patterning by mechanical signals in *Arabidopsis*. *Science*. 322, 1650-1655.
- Harris, H.E., Bamburg, J.R., Bernstein, B.W., Weeds, A.G. (1982). The depolymerization of actin by specific proteins from plasma and brain: a quantitative assay. *Anal Biochem*. 119, 102-114.
- Hasegawa, Y., Araki, T. (2002). Identification of a novel unconventional myosin from scallop mantle tissue. *J Biochem*. 131, 113-119.
- Hashimoto, M., Ikegami, T., Seino, S., Ohuchi, N., Fukada, H., Sugiyama, J., Shirakawa, M., Watanabe, T. (2000). Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *J Bacteriol*. 182, 3045-3054.
- Haupt, B.J., Osbourn, M., Spanhoff, R., de Keijzer, S., Müller-Taubenberger, A., Snaar-Jagalska, E., Schmidt, T. (2007). Asymmetric elastic properties of *Dictyostelium discoideum* in relation to chemotaxis. *Langmuir* 23, 9352-9357.
- Howard, P.K., Ahern, K.G., Firtel, R.A. (1988). Establishment of a transient expression system of *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res*. 16, 2613-2623.
- Hughes, J.E., Ashtorab, H., Welker, D.L. (1988). Nuclear plasmids in the *Dictyostelium* slime molds. *Dev Genet*. 9, 495-504.
- Hughes, J.E., Podgorski, G.J., Welker, D.L. (1992). Selection of *Dictyostelium discoideum* transformants and analysis of vector maintenance using live bacteria resistant to G418. *Plasmid* 28, 46-60.
- Ito, K., Kashiya, T., Shimada, K., Yamaguchi, A., Awata, J., Hachikubo, Y., Manstein, D.J., Yamamoto, K. (2003). Recombinant motor domain constructs of *Chara corallina* myosin display fast motility and high ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 312, 958-964.
- Iwai, S., Uyeda, T.Q.P. (2008). Visualizing of myosin- actin interaction with a genetically-encoded fluorescent strain sensor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105, 16882-16887.
- Jackson, D.J., McDougall, C., Green, K., Simpson, F., Wörheide, G., Degnan, B.M. (2006). A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biology* 4:40.
- Jackson, D.J., Wörheide, G., Degnan, B.M. (2007). Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. *BMC Biology* 7:160.
- Kambara, T., Komaba, S., Ikebe, M. (2006). Human myosin III is a motor having an extremely high affinity for actin. *J Biol Chem*. 281, 37291-37301.
- Kaufmann, S., Tanaka, M. (2003). Cell adhesion onto highly curved surfaces: one step immobilization of human erythrocyte membranes on silica beads. *Chemphyschem*. 4, 699-704.
- Kaufmann, S., Weiss, I.M., Tanaka, M. (2007). Quantitative in vitro biopolymerization to chitin in native chitosomal membranes supported by silica microparticles. *J Am Chem Soc*. 129, 10807-10813.
- Knecht, D., Pang, K.M. (1995). Electroporation of *Dictyostelium discoideum*. *Methods Mol Biol*. 47, 321-330.
- Kobayashi, I. (1969). Internal microstructure of the shell of Bivalve Molluscs. *Am Zool*. 9, 663-672.
- Kramer, K.J., Koga, D., (1986). Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem*. 16, 851-877.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol*. 8, 203-226.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leiting, B., Lindner, I.J., Noegel, A.A. (1990). The extrachromosomal replication of *Dictyostelium* plasmid Ddp2 requires a *cis*-acting element and a plasmid-encoded *trans*-acting factor. *Mol Cell Biol.* 10, 3727-3736.
- Lesage, G., Shapiro, J., Specht, C.A., Sdicu, A., Ménard, P., Hussein, S., Tong, A.H.Y., Boone, C., Bussey, H. (2005). An interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genetics* 6:8.
- Levi-Kalisman, Y., Falini, G., Addadi, L., and Weiner, S. (2001). Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using Cryo-TEM. *J Struct Biol.* 135, 8-17.
- Lheureux, K., Forné, T., Chaussepied, P. (1993). Interaction and polymerization of the G-actin-myosin head complex: effect of DNase I. *Biochemistry* 32, 10005-10014.
- Lowenstam, H.A., and Weiner, S. (1989). *On Biomineralization*. Oxford University Press, New York.
- Mann, S. (2002). *Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press, New York.
- Manstein, D.J., Hunt, D.M. (1995). Overexpression of myosin motor domains in *Dictyostelium*: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein. *J Muscle Res. Cell Motil.* 16, 325-332.
- Manstein, D.J., Schuster, H., Morandini, P., Hunt, D.M. (1995). Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene* 162, 129-134.
- Mariano, A.C., Alexandre, G.M.C., Silva, L.C., Romeiro, A., Cameron, L.C., Chen, Y., Chase, P.B., Sorenson, M.M. (2001). Dimethyl sulphoxide enhances the effects of P_i in myofibrils and inhibits the activity of rabbit skeletal muscle contractile proteins. *Biochem J.* 358, 627-636.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., Medakovic, D. (2008). Molluscan shell proteins: primary structure, origin and evolution. *Curr Top Dev Biol.* 80, 209-276.
- Marston, S.B. (1982). The rates of formation and dissociation of actin-myosin complexes. *Biochem J.* 203, 453-460.
- McNally, E., Sohn, R., Frankel, S., Leinwand, L. (1991). Expression of myosin and actin in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 196, 368-389.
- Mermall, V., Post, P.L., Mooseker, M.S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science.* 279, 527-533.
- Merzendorfer, H., Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol.* 206, 4393-4412.
- Merzendorfer, H. (2006). Insect chitin synthases: a review. *J Comp Physiol. B* 176, 1-15.
- Meyer, L., Wildanger, D., Medda, R., Punge, A., Rizzoli, S.O., Donnert, G., Hell, S.W. (2008). Dual-Color STED Microscopy at 30-nm Focal-Plane Resolution. *Small* 4, 1095-1100.
- Molloy, J.E., Burns, J.E., Kendrick-Jones, J., Tregear, R.T., White, D.C.S. (1995). Movement and force produced by a single myosin head. *Nature* 378, 209-212.
- Mooseker, M.S., Foth, B.J., (2008). The structural and functional diversity of the myosin family of actin-based molecular motors. In: *Myosins: a superfamily of molecular motors*. Caluccio, L.M. (ed.). (Berlin: Springer-Verlag).
- Moussian, B., Schwarz, H., Bartoszewski, S., and Nüsslein-Volhard, C. (2005). Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Morphology* 264, 117-130.

- Muzzarelli, R.A.A., Peter, M.G. (eds) (1997). Chitin Handbook. European Chitin Society, Atec, Grottammare.
- Nachmias, V.T. (1974). Properties of *Physarum* myosin purified by a potassium iodide procedure. *J. Cell Biol.* 62, 54-65.
- Nakahara, H., Bevelander, G. (1971). The formation and growth of the prismatic layer of *Pinctada radiata*. *Calcif Tissue Res.* 7, 31-45
- Nellen, W., Silan, C., Firtel, R.A. (1984). DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol Cell Biol.* 4, 2890-2898.
- Nudelman, F., Gotliv, B.A., Addadi, L., Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J. Struct. Biol.* 153, 176-187.
- Nudelman, F., Chen, H.H., Goldberg, H.A., Weiner, S., Addadi, L. (2007). Spiers Memorial Lecture. Lessons from biomineralization: comparing the growth strategies of mollusc shell prismatic and nacreous layers in *Atrina rigida*. *Faraday Discuss* 136, 9–25.
- Nudelman, F., Shimoni, E., Klein, E., Rousseau, M., Bourrat, X., Lopez, E., Addadi, L., Weiner, S. (2008). Forming nacreous layer of the shells of the bivalves *Atrina rigida* and *Pinctada margaritifera*: an environmental- and cryo-scanning electron microscopy study. *J. Struct. Biol.* 162, 290-300.
- Odrionitz, F., Kollmar, M. (2007). Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biology* 8:R196.
- Oosawa, F. (2008). The unit event of sliding of the chemo-mechanical enzyme composed of myosin and actin with regulatory proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 369, 144-148.
- Paradez, A.R., Somerville C.R., Ehrhardt, D.W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science.* 312, 1491-1495.
- Paradez, A.R., Persson, S., Ehrhardt, D.W., Somerville, C.R. (2008). Genetic evidence that cellulose synthase activity influences microtubule cortical array organization. *Plant Physiol.* 147, 1723-1734.
- Pollard, T.D. (1982). Myosin purification and characterization. *Methods Cell Biol.* 24, 333-371.
- Pollard, T.D., Thomas, S.M., Niederman, R. (1974). Human platelet myosin. I. Purification by a rapid method applicable to other nonmuscle cells. *Analytical Biochemistry.* 60, 258-266.
- Rajagopalan, K.V., Fridovich, I., Handler, P. (1961). Competitive inhibition of enzyme activity by urea. *J Biol Chem.* 236, 1059-1065.
- Rosan, B., Hammond, B.F. (1974). Extracellular polysaccharides of *Actinomyces viscosus*. *Infection and Immunity.* 10, 304-308.
- Ruiz-Herrera, J., Bartnicki-Garcia, S. (1974). Synthesis of cell wall microfibrils in vitro by a "soluble" chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *Science.* 186, 357-359.
- Ruiz-Herrera, J., Lopez-Romero, E., Bartnicki-Garcia, S. (1977). Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of *Mucor rouxii*. *J Biol Chem.* 252, 3338-3343.
- Ruiz-Herrera, J., Gonzalez-Prieto, J.M., and Ruiz-Medrano, R. (2002). Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res* 1, 247-256.
- Schönitzer, V., Weiss, I.M. (2007). The structure of mollusc larval shells formed in the presence of the chitin synthase inhibitor Nikkomycin Z. *BMC Structural Biology* 7:71.
- Schliwa, M. (1982). Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *J Cell Biol.* 92, 79-91.

- Schwarz, E.C., Neuhaus, E.M., Kistler, C., Henkel, A.W., Soldati, T. (2000). *Dictyostelium* myosin IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis. *J Cell Science*. 113, 621-633.
- Simkiss, K., Wilbur, K.M. (1989). *Biom mineralization, cell biology and mineral deposition*. Academic Press, New York.
- Stracher, A. (1961). Effect of pH and urea on the optical rotation, viscosity, and adenosinetriphosphatase activity of myosin A *J Biol Chem*. 236, 2467-2471.
- Sussman, M. (1987). Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions. *Methods Cell Biol*. 28, 9-29.
- Suzuki, M., Sakuda, S., Nagasawa, H. (2007). Identification of chitin in the prismatic layer of the shell and a chitin synthase gene from the japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71, 1735-1744.
- Szent-Györgyi, A.G., Joseph, R. (1951). The effect of urea on actin polymerization. *Arch Biochem*. 31, 90-95.
- Szent-Györgyi, A.G. (1951). The reversible depolymerization of actin by potassium iodide. *Arch Biochem*. 31, 97-103.
- Takashina, H., Kasuya, M. (1967). Inactivation of myosin A by low concentrations of urea. *Arch Biochem Biophys*. 118, 475-487.
- Takehita, N., Yamashita, S., Ohta, A., Horiuchi, H. (2006). *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol Microbiol*. 59, 1380-1394.
- Taylor, K.A. (2007). Regulation and recycling of myosin V. *Curr Opin Cell Biol*. 19, 67-74.
- Tellam, R.L., Vuocolo, T., Johnson, S.E., Jarmey, J., Pearson, R.D. (2000). Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur J Biochem*. 267, 6025-6042.
- Vervoort, E.B., van Ravestein, A., van Peij, N.N.M.E., Heikoop, J.C., van Haastert, P.J.M., Verheijden, G.F., Linskens, M.H.K. (2000). Optimizing heterologous expression in *Dictyostelium*: importance of 5' codon adaptation. *Nucleic Acids Res*. 28, 2069-2074.
- Voith, G., Dingermann, T. (1995). Expression of the human muscarinic receptor gene m2 in *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnology (NY)*. 13, 1225-1229.
- Watabe, N. (1965). Studies on shell formation. XI Crystal-matrix relationships in the inner layer of mollusk shells. *J. Ultrastuct. Res*. 12, 351-370.
- Weber, I., Assmann, D., Thines, E., and Steinberg, G. (2006). Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell*. 18, 225-242.
- Werner, S., Sugui, J.A., Steinberg, G., Deising, H.B. (2007). A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *MPMI* 20, 1555-1567.
- Weiner, S., and Traub, W. (1980). X-ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells. *FEBS letters*. 111, 311-316.
- Weiner, S., Talmon, Y., and Traub, W. (1983). Electron diffraction of mollusk shell organic matrices and their relationship to the mineral phase. *Int J Biol Macromol*. 5, 325-328.
- Weiner, S., Addadi, L. (1997). Design strategies in mineralized biological materials. *J Mater Chem*. 7, 689-702.

- Weiner, S., Nudelman, F., Sone, E., Zaslansky, P., Addadi, L. (2006). Mineralized biological materials: a perspective on interfaces and interphases designed over million of years. *Biointerphase 1*, 12-14.
- Weiss, I.M., Tuross, N., Addadi, L., Weiner, S. (2002). Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *J Ex. Zool.* 293, 478-491.
- Weiss, I.M., and Schönitzer, V. (2006). The distribution of chitin in larval shells of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *J Struct Biol.* 153, 264-277.
- Weiss, I.M., Schönitzer, V., Eichner, N., and Sumper, M. (2006). The chitin synthase involved in marine bivalve mollusk shell formation contains a myosin domain. *FEBS Lett.* 580, 1846-1852.
- Weiss, I.M., Marin, F. (2008). The role of enzymes in biomineralization processes. *Met Ions Life Sci.* 4, 71-126.
- Wetterauer, B., Salger, K., Demel, P., Koop, H. (2000). Efficient transformation of *Dictyostelium discoideum* with a particle flow gun. *Biochim Biophys Acta* 1499, 139-143.
- Wilt, F.H., Killian, C.E., Livingston, B.T. (2003). Development of calcareous skeletal elements in invertebrates. *Differentiation* 71, 237-250.
- Wilt, F.H. (2005). Development biology meets materials science: Morphogenesis of biomineralized structures. *180*, 15-25.
- Yamada, H., Yadomae, T., Miyazaki, T. (1974). Polysaccharides of the cellular slime mold I. Extracellular polysaccharides in growth phase of *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta.* 343, 371-381.
- Zhang, Y., Foster, J.M., Nelson, L.S., Ma, D., and Carlow, C.K. (2005). The chitin synthase genes *chs-1* and *chs-2* are essential for *C. elegans* development and responsible for chitin deposition in the eggshell and pharynx, respectively. *Dev Biol.* 285, 330-339.
- Zhou, X., Fambrough, D.M. (1999). Expression of the avian Na,K-ATPase subunits in *Dictyostelium dicoideum*. *J Membrane Biol.* 167, 19-24.

8. Abkürzungsverzeichnis

ACC	amorphes Calciumcarbonat
Acc. No.	Accession Number
AFM	Rasterkraftmikroskop
Ar-CS1	Chitinsynthese der <i>Atrina rigida</i>
Ar-CS1-YFP	YFP-getaggte Chitinsynthese der <i>Atrina rigida</i>
CBGFP	GFP-getaggttes Chitinbindeprotein
CSC	Cellulosesynthasekomplex
Fig.	Figur
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GFP	grünes Fluoreszenzprotein
ILC-Region	Region niedriger Komplexität
Mg-CS1	Chitinsynthese der <i>Mytilus galloprovincialis</i>
MMD	Myosinmotor-ähnliche Domäne
ORF	open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
PfCHS1	Chitinsynthese der <i>Pinctada fucata</i>
REMI	restriction enzyme mediated integration
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEM	Rasterelektronenmikroskop
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
ÜN	über Nacht
YFP	gelbes Fluoreszenzprotein

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie der Universität Regensburg am Lehrstuhl für Biochemie I unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Manfred Sumper angefertigt.

Herrn Prof. Dr. M. Sumper danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens, die Unterstützung des Themas sowie seine Anregungen und sein Interesse bei Fragestellungen und Problemlösungen. Mein Dank schließt die großzügige Überlassung des Arbeitsmaterials und die uneingeschränkte Möglichkeit der Verwendung der Geräte ein.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. I. Weiss für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung während jeder Phase der Arbeit auch noch unter den erschwerten Bedingungen von Saarbrücken aus. Ihre zahlreichen Anregungen und ihre stetige Bereitschaft zur Diskussion waren mir immer eine Hilfe. Motivierend war die Begeisterungsfähigkeit bei gelungenen Experimenten. Zudem danke ich ihr für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Sterner dafür bedanken, dass er sich freundlicherweise bereiterklärt hat, als dritter Prüfer zu fungieren.

Herrn Prof. Dr. H. Clausen-Schaumann und Frau D. Padula danke ich für die Kollaboration mit der Rasterkraftmikroskopie. Die Messungen haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Die Tage in München haben mir immer sehr viel Spaß gemacht.

Besonders möchte ich mich bei Herrn N. Eichner bedanken für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit und für seine Hilfe bei den *Dictyostelium*-Kulturen, bei der Klonierung, den radioaktiven Aktivitätstests und der Zuckernalytik.

Für die MALDI-Analysen danke ich Herrn Prof. Dr. R. Deutzmann.

Schließlich möchte ich mich noch ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. G. Tsiavaliaris für die Anregungen bezüglich der *Dictyostelium*-Kultur und der Aufreinigung der Myosindomäne bedanken.

Herrn Dr. S. Wenzl und allen nicht namentlich erwähnten Kollegen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Veröffentlichungen zu Teilen dieser Arbeit sind in Bearbeitung:

Schönitzer, V. und Weiss, I.M. (2009). Functional expression of the mollusc myosin-chitin synthase Ar-CS1 in *D. discoideum*: enzymatic characterization close to *in vivo* conditions of the matrix framework prior to the onset of biomineralization. In preparation

Schönitzer, V. und Weiss, I.M. (2009). A purification protocol for the myosin domain of the mollusc chitin synthase Ar-CS1 heterologously expressed in *D. discoideum*. In preparation

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens; andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Veronika Schönitzer

Regensburg, den 09.02.09

