

**Untersuchungen zur *in-vivo*-Funktion von Comitin,
einem aktinbindenden Membranprotein aus
*Dictyostelium discoideum***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Thomas Schreiner
aus Köln

Köln

2000

Meinen Eltern und meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. <i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus	1
1.2. Genetische Methoden zur Analyse von Zytoskelett-Proteinen	2
1.3. Das Zytoskelett	3
1.4. Aktinbindende Proteine in <i>D. discoideum</i>	4
1.5. Transportprozesse in der Zelle	6
1.6. Bedeutung des Zytoskeletts für Transportvorgänge	9
1.7. Comitín	10
1.8. Zielsetzung der Arbeit	11
2. Ergebnisse	13
2.1. Untersuchungen zur Comitínverteilung unter verschiedenen Bedingungen und Analyse der Comitín-defizienten Mutanten	13
2.1.1. Isolierung und Charakterisierung der Comitín-defizienten Mutanten	13
2.1.1.1. Western-Blot-Analyse der Comitín-defizienten Mutanten 1a1 und 3a1	14
2.1.1.2. Southern-Blot-Analyse der Comitín-defizienten Mutante 1a1	15
2.1.1.3. Northern-Blot-Analyse der Comitín-defizienten Mutante 1a1	17
2.1.2. Zellbiologische Untersuchungen der Comitín-defizienten Mutante	18
2.1.2.1. Wachstum unter optimalen und erschwerten Bedingungen	19
2.1.2.2. Zellkernmarkierung in AX2-Wildtyp- und 1a1-Mutantenzellen	22
2.1.2.3. Expression entwicklungsregulierter Gene	24
2.1.2.4. Lokalisation von Comitín	26
2.1.2.4.1. Lokalisation von Comitín in fixierten und lebenden <i>D. discoideum</i> -Zellen	26
2.1.2.5. Osmotischer Schock	29
2.1.2.5.1. Verteilung von Comitín bei hyperosmotischen Bedingungen	29
2.1.2.5.2. Einfluß des hyperosmotischen Schocks auf die Überlebensfähigkeit von <i>D. discoideum</i>	31
2.1.2.5.3. Immunfluoreszenzstudien an AX2-Zellen nach hypoosmotischem Schock	32
2.1.2.6. Phagozytose	34

2.1.2.6.1.	Lokalisation von F-Aktin während der Phagozytose in AX2- und 1a1-Zellen	35
2.1.2.6.1.1.	Beteiligung des GFP-Aktin-Proteins an der Phagozytose in 1a1 und AX2	36
2.1.2.6.2.	Biochemische Analyse der Comitín-Lokalisation	38
2.1.2.6.3.	Versuche zum Phagozytoseverhalten am Wildtyp AX2 und an den Comitín-defizienten Mutanten 1a1 und 3a1	39
2.2.	Bestimmung von Interaktionspartnern des Comitíns mit dem „Two-Hybrid“- System	44
2.2.1.	„Two-Hybrid“-cDNA-Bank-Durchmusterung	44
2.2.1.1.	Einfluß der Gal4BD/Comitín-Expression auf das Wachstum der Hefezellen	46
2.2.1.2.	Beschreibung der <i>D. discoideum</i> -Phagenbibliotheken und ihre Konvertierung in cDNA-Banken	47
2.2.1.3.	Sequentielle Transformation von Y190-Hefezellen mit Plasmid-DNA	47
2.2.1.4.	His ⁺ -Selektion der transformierten Hefezellen	48
2.2.1.5.	β -Galaktosidase-Test der His ⁺ -Hefekolonien	48
2.2.1.6.	Cycloheximidselektion	49
2.2.1.7.	Isolation des pACT2/Fragment-Hefepasmids und Transformation in <i>E. coli</i>	49
2.2.1.8.	Retransformation der pACT2-Derivate in Y190-Hefezellen	49
2.2.1.9.	Zusammenfassung der Ergebnisse der „Two-Hybrid“-Durchmusterung	50
2.2.1.10.	Sequenzinformation der potentiellen Bindungspartner	50
2.2.2.	Comitín als Bindungspartner	51
2.2.2.1.	Charakterisierung der Dimerisierungsdomäne von Comitín	51
2.2.3.	Der „Two-Hybrid“-Klon 116-1	54
2.2.3.1.	Charakterisierung der Bindungsstelle des Proteins P116-1 zu Comitín	59
2.2.3.2.	„Two-Hybrid“-Experiment zur Bestimmung der Bindungsdomäne des Comitíns für das Protein P116-1	60
2.2.3.3.	„Two-Hybrid“-Versuch zu einer möglichen Dimerisierungsfähigkeit des Proteins P116-1	61
2.2.3.4.	Northern- und Southern-Blot-Analyse für Klon 116-1	61
2.2.3.5.	Lokalisation des Proteins aus Klon 116-1 in <i>D. discoideum</i>	63
2.2.3.5.1.	Konstruktion des GFP-P116-1-Expressionsvektors	63
2.2.3.5.2.	Lokalisation des GFP-P116-1-Fusionsproteins in lebenden AX2-Zellen	64
2.2.3.5.3.	Immunfluoreszenzanalyse des GFP-P116-1-Fusionsproteins in fixierten AX2-Zellen	64
2.2.4.	Der „Two-Hybrid“-Klon 165-2	68
2.2.4.1.	Charakterisierung der Bindungsdomäne des L28-Proteins zu Comitín	70
2.2.4.2.	„Two-Hybrid“-Experiment mit dem ribosomalen Protein L28 aus Maus	71
2.2.4.3.	„Two-Hybrid“-Experiment zur Bestimmung der Bindungsdomäne des Comitíns für das L28-Protein	72
2.2.4.4.	Northern- und Southern-Blot-Analyse für Klon 165-2	72
2.2.4.5.	Lokalisation des Proteins aus Klon 165-2 in <i>D. discoideum</i>	73

2.2.4.5.1.	Konstruktion des GFP-L28-Expressionsvektors	73
2.2.4.5.2.	Lokalisation des GFP-L28-Fusionsproteins in fixierten AX2- und 1a1-Zellen	74
2.2.4.5.3.	Immunfluoreszenzstudien an fixierten ein GFP-L28-Fusionsprotein exprimierenden Wildtypzellen	75
2.2.4.5.4.	Lokalisation von GFP-L28 in aggregierenden AX2- und 1a1-Zellen	78
2.2.5.	Der „Two-Hybrid“-Klon 180-3	79
2.2.5.1.	Charakterisierung der Bindungsdomäne des L36-Proteins zu Comitín	81
2.2.5.2.	„Two-Hybrid“-Experiment mit dem ribosomalen Protein L36 aus Maus	83
2.2.5.3.	„Two-Hybrid“-Experiment zur Bestimmung der Bindungsdomäne des Comitíns für das L36-Protein	83
2.2.5.4.	Gen- und Transkriptcharakterisierung des Klons 180-3	84
2.2.5.5.	Konstruktion von GFP-L36-Expressionsvektoren	85
2.3.	Comitín-Homologe in anderen Organismen	87
3.	Diskussion	90
3.1.	Analyse der <i>in-vivo</i>-Funktion von Comitín	90
3.1.1.	Zellbiologische Untersuchungen der Comitín-defizienten Mutante	90
3.2.	Bestimmung von Comitín-Bindungspartnern mit dem „Two-Hybrid“-System	95
3.2.1.	„Two-Hybrid“-cDNA-Bank-Durchmusterung	96
3.2.2.	Charakterisierung der mit dem „Two-Hybrid“-System gefundenen potentiellen Bindungspartner von Comitín	99
3.3.	Bedeutung der Ergebnisse für die <i>in-vivo</i>-Funktion von Comitín	102
4.	Zusammenfassung und Ausblick	104
4.1.	Analyse der <i>in-vivo</i>-Funktion von Comitín anhand der Minusmutante 1a1	104
4.2.	„Two-Hybrid“-cDNA-Bank-Durchmusterung und Charakterisierung potentieller Bindungspartner von Comitín	105
4.3.	Zusammenfassung in deutscher Sprache	106
4.4.	Abstract in englischer Sprache	107

5. Material und Methoden	108
5.1. Material	108
5.1.1. Labormaterialien	108
5.1.2. Geräte	108
5.1.3. Kits	109
5.1.4. Enzyme, Substrate, Antikörper, Inhibitoren, Antibiotika, Chemikalien	109
5.1.5. Vektoren	112
5.1.6. Oligonukleotide	113
5.1.7. Puffer und andere Lösungen	114
5.1.8. Medien	115
5.1.8.1. Medien für <i>E. coli</i> -Kulturen	116
5.1.8.2. Medien für <i>D. discoideum</i> -Kulturen	116
5.1.8.3. Medien, Agarplatten und Stocklösungen für Hefekulturen	117
5.1.8.4. Medien für die Zellkultur	118
5.1.9. Bakterien-, <i>D. discoideum</i> - und Hefestämme sowie Kulturzellen	118
5.2. Methoden	119
5.2.1. Molekularbiologische Methoden	119
5.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im Mikromaßstab	119
5.2.1.1.1. Boiling Methode	119
5.2.1.1.2. Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel	120
5.2.1.2. Präparation chromosomaler DNA aus <i>D. discoideum</i>	120
5.2.1.3. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	121
5.2.1.4. Southern-Blot-Analyse	122
5.2.1.5. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>D. discoideum</i>	123
5.2.1.6. RNA-Agarose-Gelelektrophorese	123
5.2.1.7. Northern-Blot-Analyse	124
5.2.1.8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	124
5.2.1.9. Radioaktive Markierung von DNA-Proben mit dem Stratagene Prime [®] It II-Kit	125
5.2.1.10. Nachweis mit radioaktiv markierten Sonden	125
5.2.1.11. Verdau mit Restriktionsenzymen	126
5.2.1.12. Phosphatase-Behandlung	126
5.2.1.13. Überführung überstehender Enden in glatte Enden	126
5.2.1.14. DNA-Ligase-Reaktion	127
5.2.1.15. Polymerase-Kettenreaktion	128
5.2.1.16. Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	129
5.2.1.16.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation	129

5.2.1.16.2.	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroporation	129
5.2.1.17.	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen	129
5.2.2.	Proteinchemische und immunologische Methoden	129
5.2.2.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	129
5.2.2.2.	Western-Blot-Analyse	131
5.2.2.3.	Protein-Färbung	131
5.2.2.4.	Proteinbestimmung	132
5.2.2.5.	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose	132
5.2.2.6.	Isolierung von Phagosomen aus <i>D. discoideum</i>	132
5.2.3.	Kultur von <i>D. discoideum</i>	133
5.2.3.1.	Anzucht in Flüssigmedium	133
5.2.3.2.	Sporengewinnung und Konservierung	134
5.2.3.3.	Transformation von <i>D. discoideum</i>	134
5.2.3.4.	Indirekte Immunfluoreszenz	135
5.2.3.5.	Indirekte Immunfluoreszenz an <i>D. discoideum</i> -Zellen mit phagozytierten Hefen	136
5.2.3.6.	T6-Versuch mit GFP-Fusionsprotein exprimierenden AX2-Zellen	136
5.2.3.7.	Phagozytose von Fluoreszenz-markierten Hefen	136
5.2.3.8.	Hyperosmotischer Schock	137
5.2.3.9.	Hypoosmotischer Schock	138
5.2.4.	Kultur von PC12-Zellen	138
5.2.4.1.	Anzucht in Flüssigmedium	138
5.2.4.2.	Proteinchemische Untersuchungen an PC12-Zellen	138
5.2.4.2.1.	Zellaufschluß für Western-Blot-Analyse	138
5.2.4.2.2.	Zellfraktionierung	139
5.2.5.	Mikroskopie	139
5.2.6.	Methoden zum „Two-Hybrid“-System	140
5.2.6.1.	Isolation der pACT2/Fragment-Plasmid-DNA aus den Phagenbibliotheken	140
5.2.6.1.1.	Titerbestimmung der <i>D. discoideum</i> -Phagenbibliotheken	140
5.2.6.1.2.	Amplifikation der <i>D. discoideum</i> -Phagenbibliotheken	140
5.2.6.1.3.	Konvertierung der λ -Bibliotheken in Plasmid-cDNA-Banken und Isolation der pACT2/Fragment-Plasmid-DNA	141
5.2.6.2.	Transformation der Hefezellen mit Plasmid-DNA	141
5.2.6.2.1.	Modifizierte Lithiumacetat-Hefetransformationsmethode	141
5.2.6.2.2.	Transformation der Hefezellen nach dem Clontech-Protokoll	142
5.2.6.2.2.1.	Präparation von kompetenten Hefezellen	142
5.2.6.2.2.2.	Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA	143
5.2.6.2.2.3.	Ermittlung der Transformationseffizienz	144
5.2.6.3.	His ⁺ -Selektion der transformierten Hefezellen	144
5.2.6.4.	β -Galaktosidase-Test der His ⁺ -Hefekolonien	144
5.2.6.5.	Cycloheximidselektion	145
5.2.6.6.	Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen	145

5.2.6.7.	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA aus Hefezellen	146
5.2.6.8.	Anlegen von Hefedauerkulturen	146
5.2.6.9.	Sequenzanalyse der „Two-Hybrid“-Klone	146

6. Literaturverzeichnis	148
--------------------------------	------------

Abkürzungsverzeichnis

³² P	radioaktives Phosphoratom
A	Adenin
AA	Acrylamid
<i>A. victoria</i>	<i>Aequorea victoria</i>
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
A6P	Aktin-6-Promotor
A15P	Aktin-15-Promotor
AS	Aminosäure(n)
A8T	Aktin-8-Terminator
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CTP	Cytidintriphosphat
cAMP	cyclisches AMP
cDNA	copy DNA (revers von mRNA transkribierte DNA)
Da	Dalton
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether),N,N,N',N'-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
EST	„expressed sequence tag“
Fa.	Firma
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (engl. „green fluorescent protein“)
h	Stunde(n)
Hs	<i>Homo sapiens</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kB	Kilobase(n)
kDa	KiloDalton
<i>K. aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>

M	molar
Mm	<i>Mus musculus</i>
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
mRNA	Boten-RNA
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Upm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
T	Thymidin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
u. m.	und mehr
z. B.	zum Beispiel

Chemische Elemente und Verbindungen, physikalische Größen und Einheiten werden entsprechend den internationalen Richtlinien abgekürzt.

Laufe der Kulmination werden die Sporen vom wachsenden Stiel nach oben getragen. Die Stielzellen vakuolisieren, umgeben sich mit einer Celluloseschicht und sterben schließlich ab. Bei Berührung platzt der reife Sporenkopf auf und setzt Sporen frei, die unter günstigen Bedingungen auskeimen und einen neuen Lebenszyklus durchlaufen können (Abb. 1).

1.2. Genetische Methoden zur Analyse von Zytoskelett-Proteinen

D. discoideum-Mutanten erlauben *in-vivo*-Untersuchungen aktinbindender Proteine. Die Isolation und Charakterisierung von Mutanten wird durch das haploide Genom mit einer Größe von ungefähr 34.000 kB sowie durch die Entwicklung eines Transformationssystems, geeigneter Vektoren und Methoden zur Mutantenselektion erleichtert [Leiting und Noegel, 1988; Nellen *et al.*, 1984; Howard *et al.*, 1988]. Diese Mutanten können durch konventionelle Mutagenese oder moderne genetische Techniken erhalten werden. Für die konventionelle Mutagenese werden mutagene Substanzen eingesetzt, wie z. B. Nitrosoguanidin, die ungerichtete Punktmutationen im gesamten Genom verursachen. Die Genzerstörung (gene disruption) erlaubt dagegen eine zielgerichtete Ausschaltung eines Gens. Der Transformationsvektor enthält ein homologes Teilstück des Zielgens und eine Resistenzkassette. Nach Einführung des Vektors in *D. discoideum*, kommt es durch homologe Rekombination zur Mutation, wenn sich die genomische DNA öffnet und der vollständige Vektor in die DNA-Sequenz des Zielgens integriert wird. Nach der Genzerstörung ist die nicht mehr funktionsfähige DNA des Zielgens aber weiterhin vollständig im Genom vorhanden, was zu unerwünschten Rekombinationsereignissen führen könnte. Dieser Nachteil besteht bei der Genersatz-Methode (gene replacement) nicht, da hier ein Teil oder die gesamte genomische Sequenz durch ein Genersatzkonstrukt ausgetauscht wird. Dieses Konstrukt besteht aus einer Resistenzkassette, umgeben von zwei zum Zielgen homologen DNA-Regionen. Ein doppeltes Cross-over führt zu einem Ersatz der genomischen Sequenz durch die Resistenzkassette. Transformanten können bei Anwendung der konventionellen Mutagenese, der Genzerstörung und des Genersatzes durch einen Colony-Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Falls keine Antikörper vorhanden sind, bietet sich die „Knock-in“-Methode an, bei der ein DNA-Stück des 5'-Endes mit einem viralen Epitop im Leserahmen verknüpft wird. Homologe Rekombination erlaubt die Einführung des Vektors in das Genom. Nur wenn das Zielgen an der richtigen Stelle unterbrochen wird, wird das Gen des viralen Epitops unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert. Transformanten können dann durch einen Colony-Blot mit einem gegen das virale Epitop gerichteten Antikörper detektiert werden [Döring *et al.*, 1991]. Die Expression eines GFP-Fusionsproteins erlaubt die Untersuchung der *in-vivo*-Funktion durch Immunfluoreszenzmikroskopie in der Zelle. Der Transformationsvektor besteht aus einem Promotor, der DNA,

die für das gewünschte Protein bzw. Proteinteilstück kodiert, dem am 3'- oder 5'-Ende der DNA gebundenem GFP-Gen und einer Resistenzkassette, die die Transformantenselektion erleichtern soll. Der Vektor kann nach Transformation überall in das Genom integriert sein [Eichinger *et al.*, 1999].

1.3. Das Zytoskelett

Das Zytoskelett einer eukaryontischen Zelle besteht aus gerüstartig angeordneten filamentären Strukturen, die an der Zellform, der Zellbewegung, der Nahrungsaufnahme und der Zytokinese beteiligt sind. Dabei wird nach Durchmesser und Zusammensetzung der Filamente zwischen Mikrofilamenten (5-6 nm), Intermediärfilamenten (7-12 nm) und Mikrotubuli (25 nm) unterschieden.

Die Mikrofilamente bestehen aus globulärem Aktin, einem Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. Aktin kommt in allen eukaryontischen Zellen mit einem Anteil von bis zu 50% des Gesamtproteingehalts vor. *In-vitro* erfolgt eine Polymerisation von Aktin ab einer kritischen Konzentration von 0,1 μM nach Zugabe von mono- und divalenten Kationen wie K^+ und Mg^{2+} . Die Bindung der Ionen an globuläres Aktin (G-Aktin) führt zu einer Konformationsänderung, die die Bildung von Aktinfilamenten, F-Aktin, ermöglicht. Die Schrittmacherreaktion, Nukleation genannt, ist hierbei die Ausbildung von Aktintrimeren. Die Verlängerung des Nukleus erfolgt für beide Enden des entstehenden Filaments mit unterschiedlicher Geschwindigkeit [Gärtner *et al.*, 1989; Wegner und Isenberg, 1983].

Proteine, die sich unter Energieverbrauch infolge von ATP-Hydrolyse an den Aktinfilamenten entlangbewegen können, sind die Myosine. In Nichtmuskelzellen erlauben diese Motorproteine intrazelluläre Bewegungsvorgänge und sind somit wichtig für die Zellbewegung [Pollard und Korn, 1973]. Myosin-II ist in *D. discoideum* an Zellteilungsvorgängen beteiligt [De Lozanne und Spudich, 1987; Burrige und Bray, 1975].

Ein Intermediärfilamentsystem ist bisher nur in Eukaryonten, nicht aber in Protozoen gefunden worden [Franke, 1993]. Auch in *D. discoideum* konnten bislang keine Intermediärfilamente gefunden werden. Die Intermediärfilamente lassen sich im wesentlichen in drei Gruppen unterteilen: Zytokeratine, Vimentin und Vimentin-ähnliche Proteine, sowie Kern-Laminine. Die Mitglieder dieser drei Klassen besitzen gemeinsame Strukturmerkmale, wie die Ausbildung von gebundenen Protofilamenten. Diese Protofilamente sind Dimere, die sich aus α -helikalen Monomeren bilden. Mehrere Protofilamente ergeben schließlich das 10 nm dicke Intermediärfilament, das vermutlich zur mechanischen Stabilität der Zelle beiträgt.

Die röhrenförmigen Mikrotubuli sind die dicksten Filamente des Zytoskeletts. Sie werden aus heterodimeren Untereinheiten von α - und β -Tubulin aufgebaut. GTP und Mikrotubuli-assoziierte Proteine regulieren in einem dynamischen Prozeß den Auf- und Abbau dieser Filamente. Dieser Vorgang läuft mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten an den Enden ab. Ausgehend vom Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) durchziehen die Filamente die gesamte Zelle. Als Minus-Ende wird die dem MTOC zugewandte Seite bezeichnet. Die Richtung zur Zellmembran ist als Plus-Ende definiert. Somit ist das Mikrotubulsystem gerichtet. Mikrotubuli sind verantwortlich für den Aufbau des Spindelapparates während der Mitose [Mandelkow und Mandelkow, 1995], und sind an einer Vielzahl von Transportprozessen beteiligt.

1.4. Aktinbindende Proteine in *D. discoideum*

Wechselwirkungen zwischen Proteinen sind für alle Organismen von entscheidender Bedeutung. So tragen strukturelle Proteine durch Protein-Protein-Interaktionen zum Aufbau des Zytoskeletts bei und ermöglichen der Zelle, eine definierte Form anzunehmen. Die Reversibilität dieser Interaktionen erlauben die Umstrukturierung der Proteinkomplexe und -netzwerke als Reaktion auf Einflüsse auf die Zelle.

Auch das Aktin-Zytoskelett in *D. discoideum* ist durch eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen gekennzeichnet. Neben dem Einfluß von ionischen Komponenten auf den Auf- und Abbau des Mikrofilamentssystems wird das Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin von einer großen Anzahl aktinbindender Proteine reguliert [Pollard und Cooper 1986; Stossel, 1986]. Viele dieser Proteine wurden erstmalig in *D. discoideum* beschrieben. Diese aktinbindenden Proteine werden aufgrund ihrer *in-vitro*-Funktionen in mehrere Gruppen eingeteilt (Abb. 2).

G-Aktinbindende Proteine, wie Profilin [Carlsson *et al.*, 1977; Haugwitz *et al.*, 1991], Thymosin β 4 [Weeds und Way, 1991] oder CAP [Gottwald *et al.*, 1996] beeinflussen die Polymerisation von Aktin. CapZ [Casella *et al.*, 1986] aus Säugern oder Cap 32/34 [Hartmann *et al.*, 1989; Haus *et al.*, 1993] aus *D. discoideum* verlangsamen die Polymerisationsgeschwindigkeit, indem sie an das (+)-Ende von Aktinfilamenten binden, so daß nur noch das langsamer wachsende (-)-Ende zur Filamentverlängerung zur Verfügung steht. Einige Proteine, wie Gelsolin [Yin und Stossel, 1979] aus Säugerzellen und Severin aus *D. discoideum* [Brown *et al.*, 1982; Eichinger *et al.* 1991], haben die Fähigkeit Aktinfilamente zu depolymerisieren.

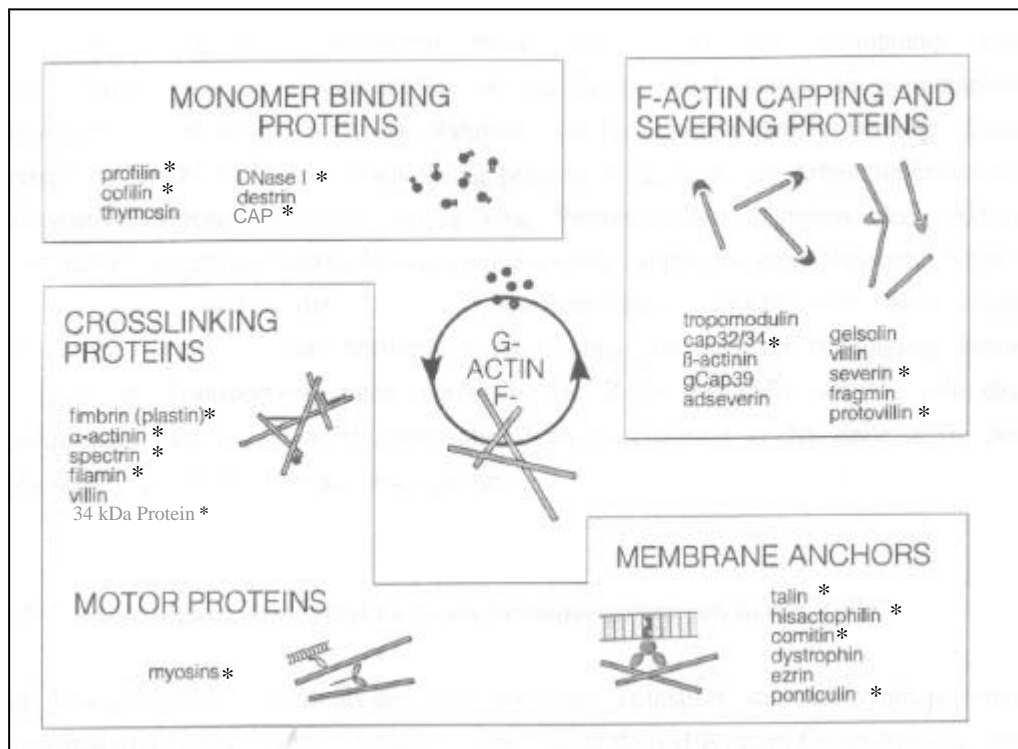


Abb. 2: Aktinbindende Proteine aus *D. discoideum* [nach Schleicher *et al.*, 1995]. Die mit einem Stern gekennzeichneten Proteine sind in *D. discoideum* beschrieben worden.

α -Aktinin [Witke *et al.*, 1993] und Filamin, früher 120 kDa-Gelationsfaktor genannt, [Condeelis *et al.*, 1984; Noegel *et al.*, 1989] gehören zu einer weiteren Gruppe von Proteinen, die Aktinfilamente quervernetzen oder bündeln können. Dazu besitzen sie zwei Aktinbindestellen, die entweder auf einer Polypeptidkette lokalisiert sind oder, wie im Falle von α -Aktinin und Filamin, durch Dimerisierung zweier Polypeptidketten mit je einer Aktinbindungsdomäne entstehen.

Die Klasse der membranassoziierten aktinbindenden Proteine umfaßt unter anderem Hisactophilin [Schleicher *et al.*, 1984], Ponticulin [Wuestehube und Luna, 1987] und Comitin [Stratford und Brown, 1985]. Ponticulin stellt in *D. discoideum* die Verbindung zu dem unter der Membran gelegenen Aktin-Kortex durch direkte Bindung an F-Aktin her. Dadurch werden Umlagerungen des Zytoskeletts unmittelbar auf die Zellmembran übertragen und beeinflussen folglich die Zellform. Das Protein Hisactophilin aus *D. discoideum* [Scheel *et al.*, 1989] ist am N-terminalen Ende mit einem Myristylrest versehen, der zwischen die Phospholipidreste der Plasmamembran eingelagert werden kann. Hisactophilin bindet pH-abhängig an Aktinfilamente, wodurch es an der Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist [Hanakam *et al.*, 1995]. Comitin wird nach den Ergebnissen von **O. Weiner *et al.*** (1993) eine Vermittlerrolle zwischen dem Aktin-Zytoskelett und den intrazellulären Membranen des Golgi-Apparates zugeschrieben. Außerdem wird vermutet, daß dieses Protein an Transportvorgängen innerhalb der Zelle beteiligt ist.

1.5. Transportprozesse in der Zelle

Die Biosynthese aller Lipide und eines Großteils der Proteine beginnt an der cytosolischen Seite der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Dieses Zellkompartiment kommt in allen eukaryontischen Zellen vor und besteht aus einem engmaschigen Netz aus verzweigten Röhren und abgeflachten Säckchen. Das Netzwerk erstreckt sich durch das gesamte Cytoplasma. Die ER-Membran wird in glattes und rauhes ER unterteilt: Als rauhes endoplasmatisches Retikulum werden die Oberflächenbereiche bezeichnet, an die Ribosomen binden, während ER-Membranen, die keine Ribosomen gebunden haben, glattes ER genannt werden. Die an der cytosolischen ER-Membran synthetisierten Proteine lassen sich in Transmembranproteine und lumenale Proteine einteilen. Die Transmembranproteine durchqueren nur teilweise die ER-Membran und werden in sie eingebettet. Sie besitzen ein spezielles hydrophobes Signalpeptid, das von einem Signalerkennungspartikel (SRP) erkannt und gebunden wird. Das SRP dirigiert dann das Protein an einen spezifischen Rezeptor in der ER-Membran und ermöglicht den Translokationsprozeß [Simon, 1993]. Dabei wird eine Schleife der Polypeptidkette durch eine hydrophile Translokationspore in das ER-Lumen gezogen. Dagegen werden lumenale Proteine vollständig durch die ER-Membran transportiert. Die Proteine werden im ER-Lumen gefaltet, können oligomerisieren und werden durch N-Glykosylierung modifiziert. Während ER-ständige Proteine durch ein ER-Retentionssignal in diesem Zellkompartiment zurückgehalten werden, werden alle anderen, richtig gefalteten Proteine in Transportvesikel verpackt. Die Transportvesikel schnüren sich vom Übergangs-ER ab und werden zum Golgi-Apparat weitergeleitet.

Der Golgi-Apparat befindet sich nahe am Zellkern im Cytoplasma. Er besteht aus parallel angeordneten, flachen, membranumhüllten Zisternen, die eine stapelförmige Struktur bilden. Die Anzahl der Zisternen schwankt zwischen 3 und 10 [Alberts *et al.*, 1989; Zhang und Staehelin, 1992]. Der Golgi-Apparat besitzt eine funktionelle Polarität, die eine Unterteilung in cis-, medial- und trans-Kompartimente erlaubt. Jedes dieser Kompartimente besteht aus mehreren hintereinander angeordneten Zisternen. Neben der funktionellen Polarität wird aufgrund der morphologischen Polarität des Golgi-Apparates zwischen einer cis- und einer trans-Seite unterschieden: Die dem Zellkern zugewandte Seite wird als cis-Seite (Bildungsseite) definiert und die dem Zellkern abgewandte Reifungsseite wird trans-Seite genannt. Beide Seiten sind an besondere Kompartimente gebunden, die aus einem membranösen Netzwerk untereinander verbundener Röhren und Zisternen bestehen. Diese Zellbereiche werden als cis-Golgi-Netz (CGN) und als trans-Golgi-Netz (TGN) bezeichnet

[Griffiths und Simons, 1986; Driouich *et al.*, 1993]. Die Transportvesikel des endoplasmatischen Retikulums verschmelzen mit dem cis-Golgi-Netzwerk. Dort werden im ER-Lumen ansässige Proteine, die ein ER-Rückhaltungssignal besitzen durch ein spezifisch gebundenes Rezeptorprotein erkannt und in besonderen Transportvesikeln ins ER zurückge-

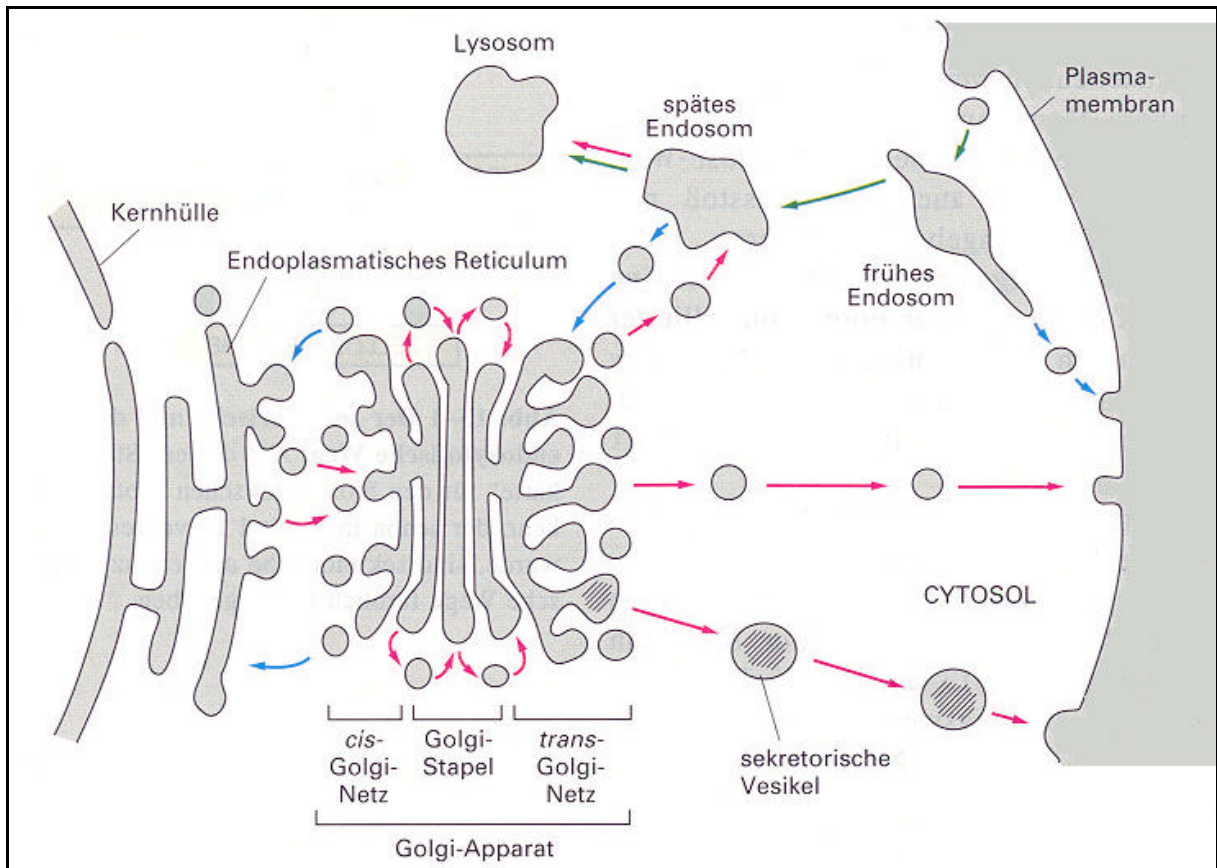


Abb. 3: Am intrazellulären Transport beteiligte Kompartimente einer Eukaryontenzelle [aus Alberts: „Molekularbiologie der Zelle“, 1997].

führt. Andere Proteine werden bei ihrer Passage vom cis-Golgi-Netzwerk über die Kompartimente des Golgi-Apparates zum trans-Golgi-Netzwerk modifiziert. Dabei werden im ER angehängte N-glykosidisch gebundene Zucker verändert, O-glykosidisch gebundene Zucker eingefügt und modifiziert. Zusätzlich werden Proteine proteolytisch prozessiert. Die jeweiligen Modifikationen erfolgen schrittweise in distinkten Zisternen. Die dazu benötigten Enzyme sind auf bestimmte Zisternen beschränkt [Pugsley, 1989]. So erfolgt z. B. die Tyrosin-Sulfatierung nur im trans-Kompartiment. Im TGN werden die modifizierten Proteine in Transportvesikel eingelagert und zu ihren jeweiligen Bestimmungsorten, wie Lysosomen oder sekretorische Vesikel und Plasmamembran gebracht [Griffiths und Simons, 1986].

Der Transport zwischen einzelnen intrazellulären Kompartimenten erfolgt also über Vesikel [Melancon *et al.*, 1991; Pryer *et al.*, 1992], die sich von einem Donorkompartiment

abschnüren und mit der Membran des Akzeptorkompartiments verschmelzen. Der Bestimmungsort dieser Vesikel wird zum einen durch die Beschaffenheit der Proteine auf der Oberfläche der Vesikelmembran und den zugehörigen Rezeptoren des Zielkompartiments festgelegt, zum anderen durch die Anlagerung verschiedener löslicher Komponenten wie kleiner GTP-bindender Proteine [Goud und McCaffrey, 1991; Zerial und Stenmark, 1993].

Bisher sind mehrere Typen von Transportvesikeln beschrieben worden. Die Clathrin-dekorierten Vesikel besitzen einen Durchmesser von 80-100 nm und befinden sich gehäuft am TGN und an der Plasmamembran. Sie sind am Transport lysosomaler Enzyme vom TGN zu den späten Endosomen, am regulierten Transport vom TGN zur Plasmamembran und an der Rezeptor-vermittelten Endocytose extrazellulärer Liganden beteiligt. Ihre Hülle besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, unter anderem aus dem namensgebenden Clathrin und Clathrin-assoziierten Adaptorkomplexen AP-1 und AP-2 [Pearse und Robinson, 1990].

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, daß viele endocytotische Transportvorgänge Clathrin-unabhängig verlaufen [Sandvig und van Deurs, 1990; Lamaze und Schmid, 1995]. Bei den meisten Zellen kommt es an der Plasmamembran zu Einstülpungen, den sogenannten Caveolen, die sich als Caveolin-bedeckte Vesikel von der Plasmamembran abschnüren [Rothberg *et al.*, 1992].

COPI-dekorierte Vesikel stellen einen weiteren Vesikeltyp dar. Die im Durchmesser 90 nm großen Vesikel besitzen eine Proteinhülle aus acht Untereinheiten, den sogenannten „coatomers“. Ein Protein dieser Gruppe ist das β -COP, das hohe Homologie zum Clathrin-assoziierten β -Adaptin aufweist [Duden *et al.*, 1991]. Die Anlagerung der Hüllenproteine geschieht unter Vermittlung eines GTP-regulierten Proteins, dem ADP-Ribosylierungsfaktor ARF [Donaldson und Klausner, 1994]. COPI-bedeckte Vesikel sind am Transport vom ER zum Golgi-Apparat, am Transport zwischen Golgi-Zisternen sowie am retrograden Transport von ER-Membranproteinen zum ER beteiligt [Letourneur *et al.*, 1994]. Die in *S. cerevisiae* zuerst beschriebenen COPII-dekorierten Vesikel vermitteln anterograde Transportvorgänge vom ER zum Golgi-Apparat [Barlowe *et al.*, 1994].

Neben dem vesikulären Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zu den Endosomen und Lysosomen bis hin zur Plasmamembran wird in den letzten Jahren zunehmend das Modell der „cisternen Reifung“ für den Transport supramolekularer Strukturen, wie Multiproteinkomplexe diskutiert. Diese sind zu groß, um in sekretorischen Vesikeln durch den Golgi-Apparat transportiert zu werden. Die vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Komplex kommenden supramolekularen Strukturen bilden dort ein neues cis-Kompartiment. Das nicht-sekretorische Material, wie Proteine mit ER-

Rückhaltesignalen oder SNAP-Rezeptoren, wird wieder in das endoplasmatische Retikulum zurückgeführt. Der Transport der supramolekularen Strukturen wird durch fortschreitende Umwandlung des neuen cis-Kompartiments über mediale Kompartimente in trans-Golgi-Zisternen durchgeführt. Dieser anterograde Transport der Zisternen ist mit einer Rückführung der Enzyme in das jeweilig vorhergehende Kompartiment gekoppelt, d. h. nach Umwandlung einer cis-Zisterne in ein mediales Kompartiment werden die Enzyme über Vesikel in eine neue cis-Zisterne zurückgeführt. Am trans-Golgi-Netzwerk werden die supramolekularen Strukturen durch Bildung sekretorischer Vesikel freigesetzt. Im trans-Golgi-Netzwerk verbleibende Proteine werden zum trans-Golgi-Kompartiment zurückgeführt, damit sie für eine Wiederholung dieses Vorgangs zur Verfügung zu stehen [Mironov *et al.*, 1997]. Das am besten charakterisierte Beispiel für das Modell der „cisternen Reifung“ ist der Transport von Multiproteinkomplexen in der Grünalge *Pleurochrysis scheffellii* [Becker *et al.*, 1995]. Auch in anderen Zelltypen ist ein solcher Transport supramolekularer Strukturen diskutiert bzw. beobachtet worden, so z. B. für Prokollagen Typ-1 in Fibroblasten [Bonfanti *et al.*, 1998; Leblond, 1989] und für das Apolipoprotein E in Leberzellen [Dahan *et al.*, 1994].

1.6. Bedeutung des Zytoskeletts für Transportvorgänge

Sowohl das Mikrotubulsystem als auch das Aktinfilamentsystem spielen beim intrazellulären Vesikeltransport eine entscheidende Rolle. Eine Beteiligung der Aktinfilamente an lokalen intrazellulären Transportvorgängen ist erstmals in Algen [Kachar *et al.*, 1985] und in Amöben [Adams und Pollard, 1986] beschrieben worden. Die Bewegung auf den Aktinfilamenten wird durch Motorproteine vermittelt, die zu der Klasse der sogenannten unkonventionellen Myosine gezählt werden [Novak und Titus, 1997]. So werden z. B. Vesikel, die aus isolierten *Acanthamoeba*-Membranen hergestellt werden, durch gereinigtes Myosin-I auf Aktinfilamenten bewegt. *In-vitro* läßt sich diese Bewegung von isolierten *Acanthamoeba*-Organellen durch Myosin-I-Antikörper hemmen [Adams und Pollard, 1986]. Johnston *et al.* beschrieben 1991 die Beteiligung von Myosin-I am Transport sekretorischer Vesikel über Aktinfilamente in *S. cerevisiae*. Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von Aktinfilamenten an endocytotischen Prozessen lieferte die Beobachtung, daß die F-Aktin-depolymerisierende Droge Cytochalasin D in Makrophagen die Phagozytose hemmt [Axline und Reaven, 1974].

Während das Aktinnetzwerk am langsamen und lokalen Vesikeltransport auf kleinem Raum beteiligt ist, scheint das Mikrotubulisystem für schnelle Transportvorgänge innerhalb der Zelle verantwortlich zu sein. Die Mikrotubuli sind an der Erhaltung und Lage der Morphologie von Zellorganellen maßgeblich beteiligt. Das endoplasmatische Retikulum und die frühen Endosomen in der Zellperipherie sind am schnell wachsenden Ende der Mikrotubuli angeordnet, während sich die Lysosomen, Endosomen und der Golgi-Apparat am langsam wachsenden Ende der Mikrotubuli in der Nähe des Zellkerns befinden [Cole und Lippincott-Schwartz, 1995]. Eine Vielzahl von Experimenten weist darauf hin, daß intrazelluläre Transportprozesse mit Hilfe der Mikrotubuli ablaufen. Der Transport von Vesikeln zwischen den Zellkompartimenten wird von den molekularen Motoren Dynein [Paschal *et al.*, 1987] und Kinesin [Vale *et al.*, 1985] in Richtung des langsam wachsenden Endes bzw. des schnell wachsenden Endes angetrieben. Außerdem unterliegen diese Transportvorgänge einer Vielzahl von Regulationsmechanismen. So scheint der Dynaktin-Komplex [Gill *et al.*, 1991] an der Bindung der Vesikel bzw. der Transportaktivierung beteiligt zu sein [Schroer und Sheetz, 1991].

Zusätzlich scheint es einen Übergang von Mikrotubuli-gestützten Transportvorgängen zu den durch das Aktinfilamentsystem vermittelten Transport zu geben. So konnten **Kusnetsov *et al.*** [1992] in lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß Vesikel, die auf Mikrotubuli transportiert werden, sich ablösen und auf Aktinfilamenten weiter transportiert werden. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, daß Mikrotubuli für den schnellen Transport über längere Strecken innerhalb der Zelle verantwortlich sind, während das Aktinnetzwerk dem lokalen Vesikeltransport auf kleinem Raum dient.

1.7. Comitín

Comitín, ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 24 kDa, ist erstmals 1985 von **C. A. Stratford** und **S. S. Brown** aus *D. discoideum* isoliert worden. Immunfluoreszenzuntersuchungen deuten darauf hin, daß Comitín an Vesikelmembranen und auf der cytoplasmatischen Seite des Golgi-Apparates lokalisiert ist [Weiner *et al.*, 1993]. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz wurde 1990 durch die Isolierung der cDNA aufgeklärt [Noegel *et al.*, 1990]. Die Sequenzanalysen ergaben, daß das sehr basische Comitín mit einem pI von 9,58 aus zwei Domänen besteht, einer 144 Aminosäuren großen N-terminalen Kerndomäne, die fünf Cysteinreste und fast die gesamte Ladung des Proteins trägt, und einer 41 Aminosäuren langen C-terminalen Domäne, die einen neutralen bis hydrophoben Ladungscharakter besitzt (Abb. 4).

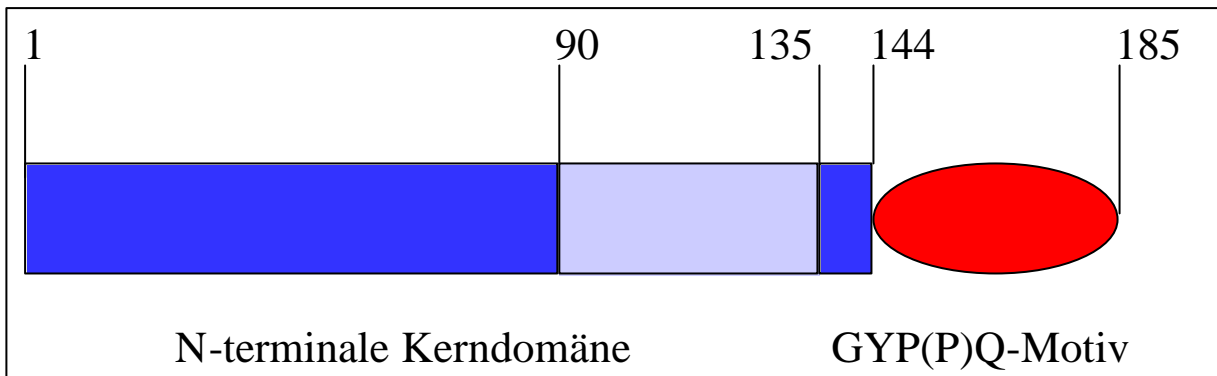


Abb. 4: Schematische Darstellung des Comitins-Proteins. Die Zahlen geben die jeweilige Aminosäureposition wieder. Der gestrichelte Bereich innerhalb der N-terminalen Kerndomäne stellt die bisher bekannte Dimerisierungs- und Aktinbindungsdomäne von Comitins dar.

Die N-terminale Kerndomäne enthält ein dreifach wiederholtes Aminosäuremotiv, das Sequenzhomologien zu Lektinen aufweist. Dieser Aminosäurebereich scheint für die Bindung des Comitins an Membranen verantwortlich zu sein. Es wird angenommen, daß die Bindung über Mannosereste erfolgt. *In-vitro*-Experimente zeigten, daß Comitins die Fähigkeit zur Ausbildung von Dimeren besitzt. Der für die Dimerisierung verantwortliche Bereich konnte auf die Aminosäuren 90 bis 135 eingegrenzt werden [Jung, 1996]. Comitins hat zudem die Fähigkeit, F-Aktin an der Subdomäne-1 des Aktins zu binden [Fulgenzi *et al.*, 1998]. Vorangegangene Untersuchungen legten die Aktinbindungsdomäne des Comitins auf den Aminosäurebereich 90 bis 135 fest. Dieses Proteinteilstück weist keine Homologien zu Aktinbindestellen anderer Proteine, wie z. B. der α -Aktinin-Familie auf [Jung, 1996].

Der 41 Aminosäuren große C-Terminus besteht aus sechs hintereinander angeordneten GYP(P)Q-Aminosäuremotiven. Dieser Proteinbereich besitzt Homologien zu *Oktopus*-Rhodopsin, Synaptophysin, Gliadin und Säuger-Lektinen. Alle diese Proteine sind funktionell verschieden, gemeinsam ist ihnen aber eine Tendenz zur Aggregation. Die Funktion des repetitiven GYP(P)Q-Motivs ist unbekannt.

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Die *in-vitro*-Eigenschaften von Comitins, wie seine Fähigkeit zur Bindung an Aktin und Mannose sind bereits intensiv untersucht worden. Dagegen bedürfen die *in-vivo*-Funktionen von Comitins weiterer Studien.

Dazu soll im Rahmen dieser Arbeit die Schaffung und zellbiologische Charakterisierung einer Comitins-defizienten Mutante dienen. Die Proteinverteilung in lebenden Zellen soll durch Expression eines GFP-Fusionsproteins aufgeklärt werden. Die Fusion von Proteinen mit GFP ist eine für die intrazelluläre Lokalisation in *D. discoideum* schon erfolgreich angewandte

Methode. Zur weiteren Aufklärung der *in-vivo*-Funktion von Comitin soll seine schon *in-vitro* gezeigte Fähigkeit zur Ausbildung von Dimeren mit Hilfe des Hefe-„Two-Hybrid“-Systems überprüft, analysiert und die Dimerisierungsdomänen weiter eingegrenzt werden. Das „Two-Hybrid“-System soll außerdem zur Identifizierung von Comitin-bindenden Proteinen herangezogen werden, um die Rolle von Comitin in intrazellulären Prozessen näher zu definieren. Mögliche Bindungspartner sollen auf ihre Bindungsdomäne zu Comitin und ihre intrazelluläre Lokalisation durch Expression von GFP-Fusionsproteinen untersucht werden.

2. Ergebnisse

2.1. Untersuchungen zur Comitinveteilung unter verschiedenen Bedingungen und Analyse der Comitindefizienten Mutanten

2.1.1. Isolierung und Charakterisierung der Comitindefizienten Mutanten

1997 wurde von **A. v. Krempelhuber** eine Comitinnegative Mutante isoliert, in der das endogene Gen durch die Insertion eines Resistenzgens permanent unterbrochen ist. Dazu verwendete er einen Transformationsvektor für ein "gene replacement" des Comitins-Gens. Das Comitins-Gen liegt auf einem 1,5 kB großen HindIII/EcoRV-Fragment (Abb. 5).

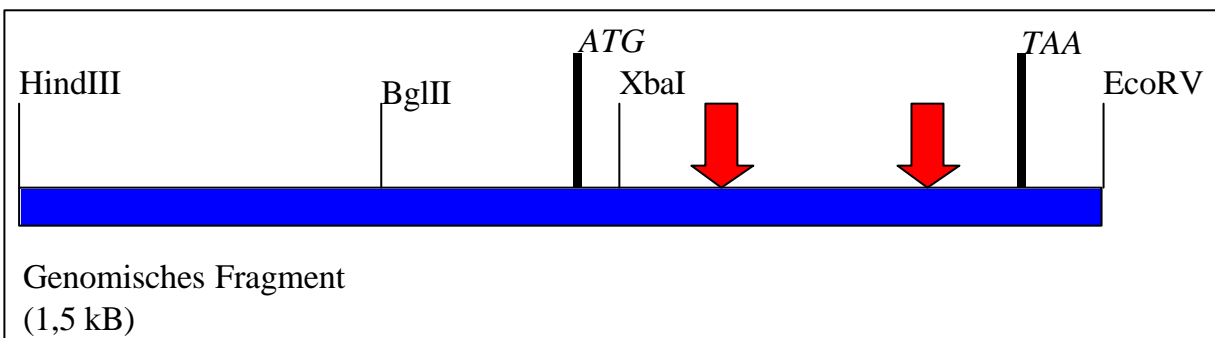


Abb. 5: Genkarte des genomischen HindIII/EcoRV-Fragments von Comitins. Die Genkarte zeigt eine Auswahl von Restriktionsenzymen, die Lage der kodierenden Sequenz innerhalb des genomischen Klon, Translations-Start- und Stopcodon ATG bzw. TAA und die Lokalisation der zwei Introns. Die Pfeile bezeichnen die Lage der Introns von 276 und 327 Basenpaar Länge.

Das HindIII/EcoRV-Fragment wurde in den Vektor pIC19 kloniert und in *E. coli* JM83 transformiert. Im Colony-Blot wurde der Klon p24#16 identifiziert, der das entsprechende DNA-Teilstück enthält. Aus diesem Klon p24#16 wurde ein ca. 400 bp großes BglII/XbaI-Fragment herausgeschnitten, das neben 5'-untranslatierter Region auch 42 Basenpaare des kodierenden Bereiches mit dem Startcodon ATG enthält. Dieser Genabschnitt wurde dann durch eine 1,4 kB große Resistenzkassette mit dem Gen für die Blasticidin-S-Deaminase aus *Bacillus cereus* [Kobayashi *et al.*, 1991] unter der Kontrolle des Aktin 15-Promotors und des Aktin 8-Terminators ersetzt (Abb. 6). Nach Einführung des Transformationsvektors p24#16bsr in Zellen des *D. discoideum*-Wildtyps AX2 konnten Transformanten mit Hilfe der Blasticidinresistenz selektiert werden. Sie wurden anschließend in einem Colony-Blot identifiziert und mittels Western-, Southern- und Northern-Blots analysiert. Zwei Comitindefiziente Klone, als 1a1 und 3a1 bezeichnet, wurden für die weitere Analyse ausgewählt [v. Krempelhuber, 1997].

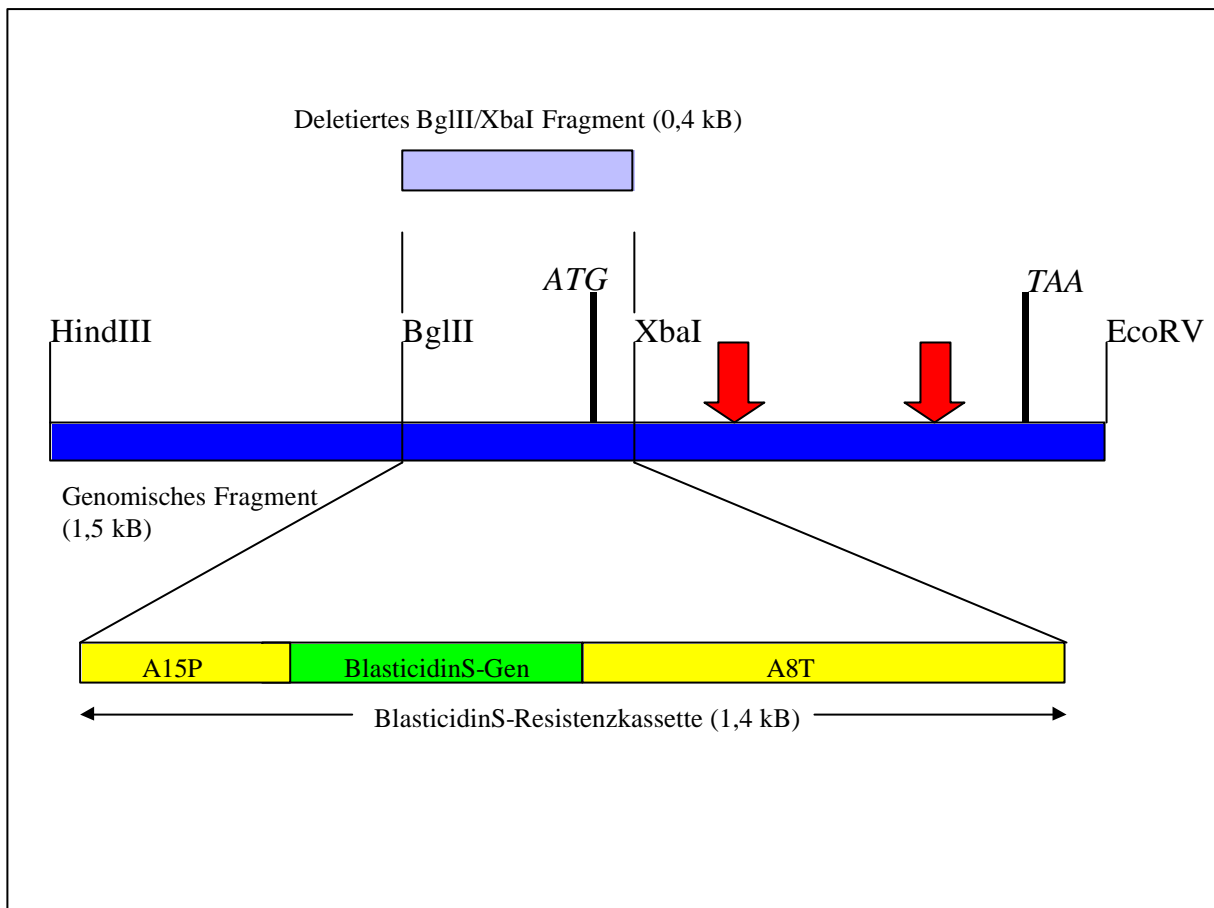


Abb. 6: Konstruktion des Transformationsvektors p24#16bsr. Schematische Darstellung des klonierten genomischen Comitín-Fragments, bei dem ein 0,4 kb großes Stück durch die BlastidinS-Resistenzkassette ersetzt wurde. BglIII und XbaI bezeichnen die Schnittstellen der Restriktionsenzyme, mit denen das DNA-Fragment ausgeschnitten wurde.

2.1.1.1. Western-Blot-Analyse der Comitín-defizienten Mutanten 1a1 und 3a1

Die Western-Blot-Analyse der Comitín-Minusmutanten 1a1 und 3a1 erfolgt mit dem monoklonalen anti-Comitín-Antikörper 190-68-1. Die Bindungsstelle dieses Antikörpers wurde auf die Aminosäuren 1 bis 57 der N-terminalen Kerndomäne eingegrenzt [Jung, 1996]. Derselbe Blot wird zusätzlich zur Quantifizierung der Gesamtzellhomogenatmenge mit dem anti-Aktin-Antikörper Act-1-7 inkubiert (Abb. 7).

Der Antikörper 190-68-1 erkennt im Wildtyp-Gesamtzellhomogenat bei 24 kDa Comitín. Dieses Protein fehlt in den Mutanten 1a1 und 3a1. Die drei Spuren der *D. discoideum*-Stämme AX2, 1a1 und 3a1 zeigen eine gleich starke Aktinbande bei 42 kDa. Dies zeigt, daß jede Spur mit derselben Zellhomogenatmenge beladen worden ist.

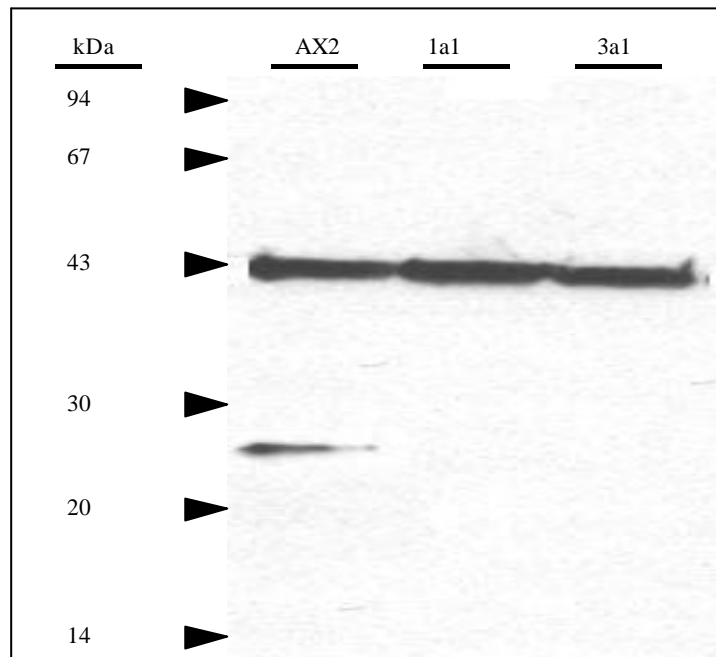


Abb. 7: Western-Blot-Analyse der Comitin-Minusmutanten. Zellhomogenate von jeweils 2×10^5 Zellen wurden in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Der Western-Blot ist mit dem anti-Comitin-Antikörper 190-68-1 und dem anti-Aktin-Antikörper Act-1-7 inkubiert worden. Als sekundärer Antikörper diente ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper. Nur bei AX2 ist das 24 kDa Protein Comitin nachweisbar.

2.1.1.2. Southern-Blot-Analyse der Comitin-defizienten Mutante 1a1

Um den Nachweis für das „gene replacement“-Ereignis zu führen, wurde DNA aus Zellkernen von AX2 und 1a1 isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und EcoRV geschnitten. Bei einem erfolgreich verlaufenen „gene replacement“-Ereignis ist eine Vergrößerung des genomischen Fragments von Comitin um 1 kB durch den Austausch des 0,4 kB großen BglIII/XbaI-Fragment gegen die 1,4 kB große BlastidicinS-Resistenzkassette in der Spur für die Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu erwarten. Ein Signal für die BlastidicinS-Resistenzkassette in gleicher Größe dürfte nur in der 1a1-Spur markiert werden. Der Austausch der BlastidicinS-Resistenzkassette gegen das BglIII/XbaI-Fragment würde zu einer Bande in der Wildtypspur, nicht aber in der Spur für die Comitin-Minusmutante führen, wenn mit dem BglIII/XbaI-Fragment hybridisiert werden würde. Der entsprechende Southern-Blot wurde deshalb mit dem 1,5 kB großen genomischen HindIII/EcoRV-Fragment (Abb. 6 und 8A), der BlastidicinS-Resistenzkassette (Abb. 6 und 8B) sowie dem deletierten 0,4 kB großen genomischen BglIII/XbaI-Fragment aus Klon p24#16 (Abb. 6 und 8C) hybridisiert.

Das 1,5 kB große HindIII/EcoRV-Fragment erkennt in Wildtyp-DNA bei 1,5 kB die Bande des genomischen Comitin-Fragments. Das entsprechende Signal liegt in der Spur von Klon 1a1 bei 2,4 kB, so daß die erwartete Vergrößerung des genomischen Fragments von Comitin um 1 kB durch den Austausch des 0,4 kB großen BglIII/XbaI-Fragment gegen die 1,4 kB

große BlasticidinS-Resistenzkassette bestätigt werden kann. Weitere Banden in der Wildtyp- und 1a1-Spur sind auf die 3'-terminale Domäne, die für das in *D. discoideum*-Proteinen öfters vorhandene GYP(P)Q-Motiv kodiert, zurückzuführen [Noegel *et al.*, 1990]. Hybridisierung mit der radioaktiv markierten cDNA der BlasticidinS-Resistenzkassette führt zu einer Bande bei 2,4 kB in der 1a1-Spur. Ein entsprechendes Signal findet sich nicht für den Wildtyp AX2. Somit bestätigt die Hybridisierung mit der cDNA der BlasticidinS-Resistenzkassette den Shift von 1 kB (Abb. 8B). In Abbildung 8C wird der Verlust des 0,4 kB großen BglIII/XbaI-Fragmentes in Klon 1a1 wiedergegeben. So zeigt nur die AX2-Spur eine 1,5 kB große Bande.

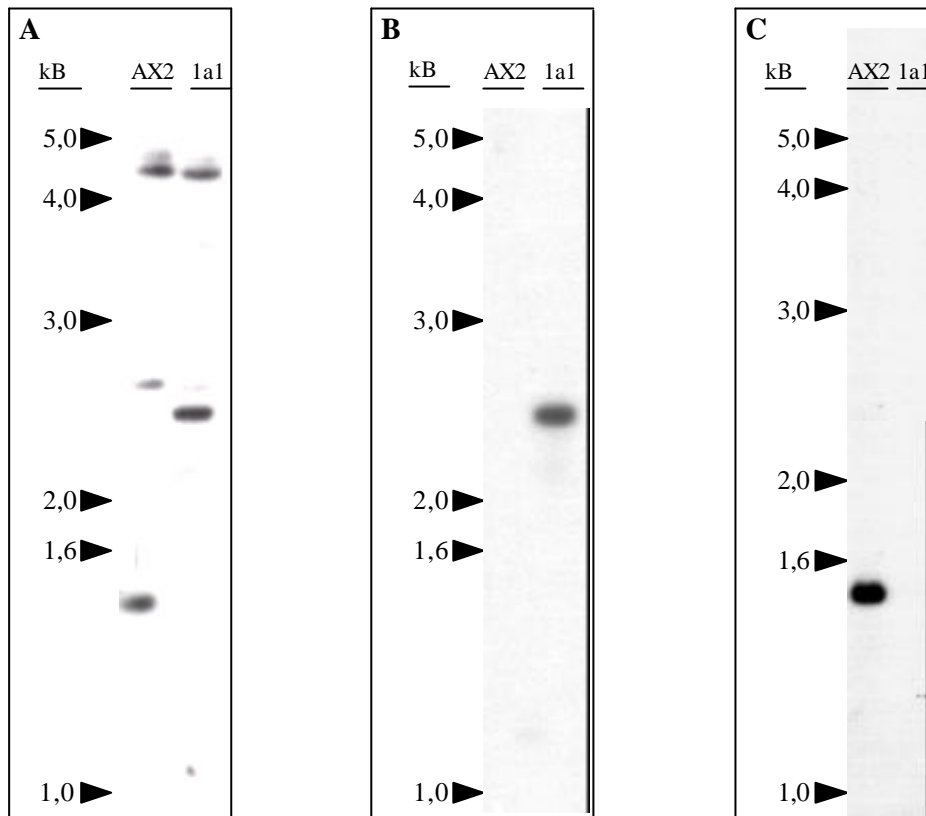


Abb. 8: Southern-Blot-Analyse der Comitin-Minusmutante 1a1. Genomische DNA aus AX2- und 1a1-Zellkernen wurde mit den Enzymen HindIII/EcoRV geschnitten, in einem 0,7%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembran übertragen. Folgende radioaktiv markierten Sonden wurden für die Untersuchungen verwendet: A: 1,5 kB großes genomisches Comitin-Fragment; B: BlasticidinS-Resistenzkassette; C: 0,4 kB großes BglIII/XbaI-Comitin-Fragment.

2.1.1.3. Northern-Blot-Analyse der Comitín-defizienten Mutante 1a1

Die Expression des Comitín-Gens wurde durch Northern-Blot-Analyse untersucht. Dafür wurde Gesamt-RNA aus *D. discoideum*-Zellen isoliert, die zu unterschiedlichen Zeiten des Entwicklungszyklus geerntet wurden. Die Gesamt-RNA wurde im Northern-Blot aufgetrennt und mit der radioaktiv markierten Comitín-cDNA der Kerndomäne hybridisiert. Der Wildtyp AX2 zeigt eine starke mRNA-Expression zu Beginn des Entwicklungszyklus. Nach vier Stunden nimmt die Expressionsstärke erheblich ab, so daß die Comitínbande kaum noch zu detektieren ist. Dies entspricht dem beschriebenen Expressionsmuster des Comitín-Gens (Abb. 9A) [Noegel *et al.*, 1990]. Zu keinem Zeitpunkt des Entwicklungszyklus ist eine Expression der Comitín-mRNA für die Mutante nachweisbar (Abb. 9B). Zur Kontrolle ist eine radioaktiv markierte Myosin-cDNA-Sonde verwendet worden, um zu zeigen, daß vergleichbare Mengen an RNA für AX2 und 1a1 aufgetragen worden sind (Abb. 9A und B).

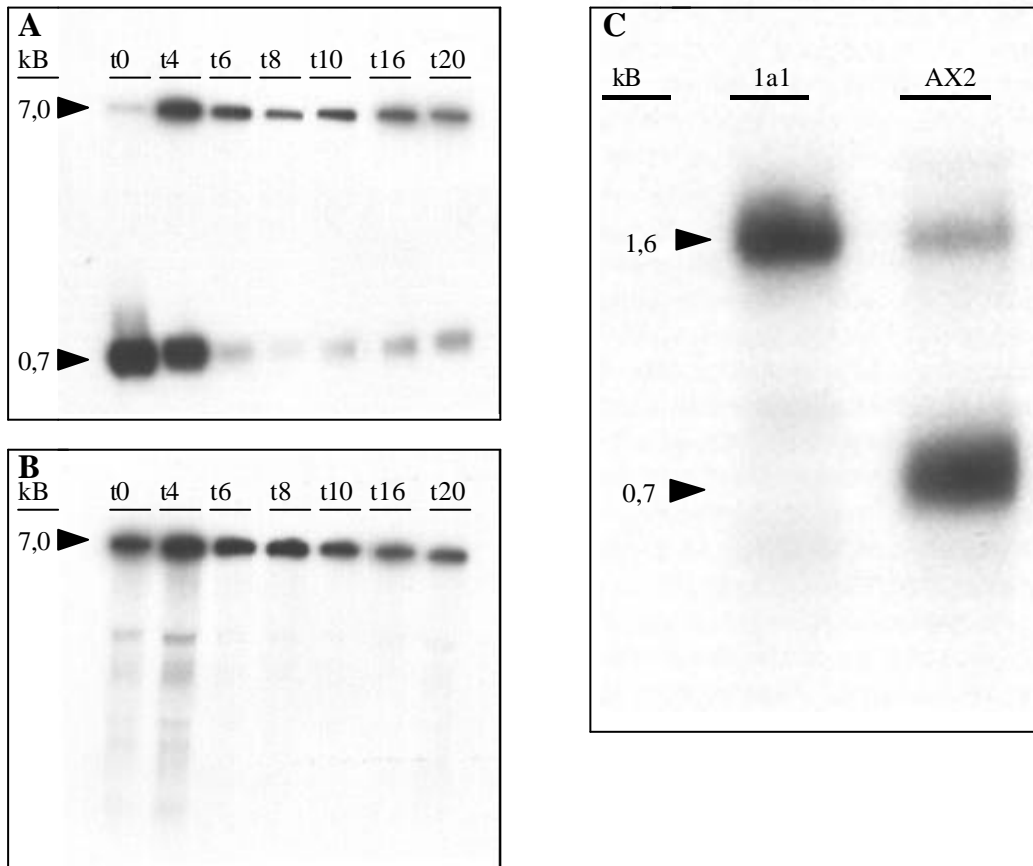


Abb. 9: Northern-Blot-Analyse der Comitín-negativen Mutante 1a1. Gesamt-RNA ist aus AX2- und 1a1-*D. discoideum*-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung isoliert, in einem 1,2%igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert worden. Der Zeitpunkt t0 steht für vegetative Zellen und t4 bis t8 für das Aggregationsstadium. Zur Zeit t16 war das „slug“-Stadium erreicht, bei t20 die Kulmination. A gibt den Northern-Blot von AX2-, B den von 1a1-Gesamt-RNA wieder. Zur Hybridisierung ist in A und B die radioaktiv markierte cDNA der Comitín-Kernregion und von Myosin verwendet worden. C zeigt Gesamt-RNA vegetativer Zellen (t0) von AX2 und 1a1. Als Sonde diente das 1,5 kB große genomische HindIII/EcoRV-Comitín-Fragment. Für 1a1 wurde eine höhere Menge an RNA geladen als für AX2.

Zusätzlich ist Gesamt-RNA vegetativer Zellen der Comitín-Minusmutante und des Wildtyps im Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert worden. Die Hybridisierung der Membran erfolgt hierbei mit dem radioaktiv markierten 1,5-kB großen genomischen HindIII/EcoRV-Comitín-Fragment (Abb. 9C). Die 0,7 kB große Bande zeigt die Expression der Comitín-mRNA im Wildtyp. In der 1a1-Mutante läßt sich diese mRNA nicht mehr nachweisen. Die bei 1,6 kB auftretende Bande wird dem Produkt des Annexin VII Gens zugeschrieben. Dieses Gen enthält am 5'-Terminus eine Sequenz, die dem im Comitín C-terminal gelegenen GYP(P)Q-Sequenzmotiv entspricht. Dadurch kommt es zu Kreuzreaktionen mit der Comitín-Sonde. Die Annexin VII-Bande gibt zudem wieder, daß mehr Gesamt-RNA der 1a1-Mutante als des Wildtyps AX2 geladen worden ist. Bei den nur schwach detektierten Banden oberhalb und unterhalb der 0,7 kB großen Markierung in der Spur der Comitín-defizienten Mutante könnte es sich um Kreuzreaktionen der Sonde mit zwei weiteren Vertretern der GYP(P)Q-Proteinfamilie handeln. Das Fehlen dieser zwei Banden in der Wildtypspur läßt sich mit der geringeren RNA-Menge erklären (Abb. 9C).

2.1.2. Zellbiologische Untersuchungen der Comitín-defizienten Mutante

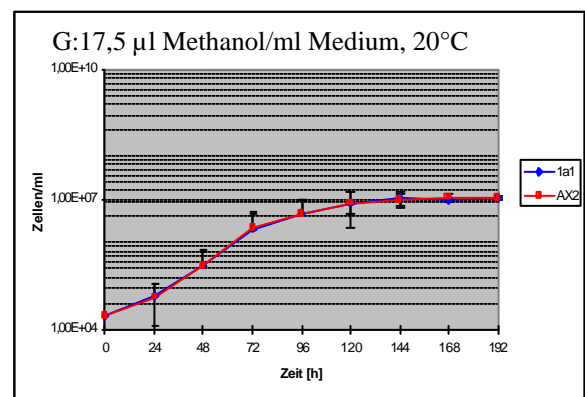
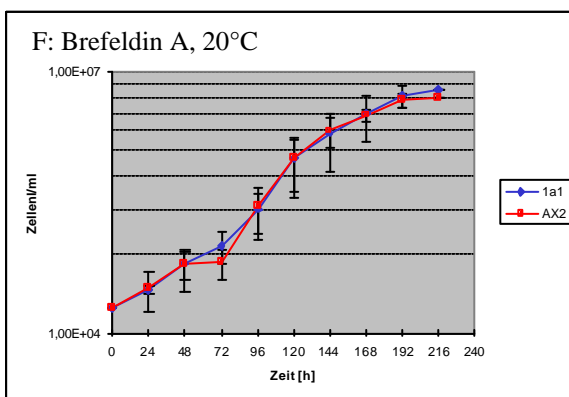
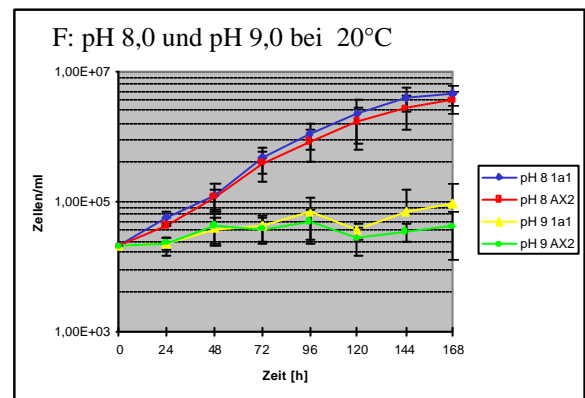
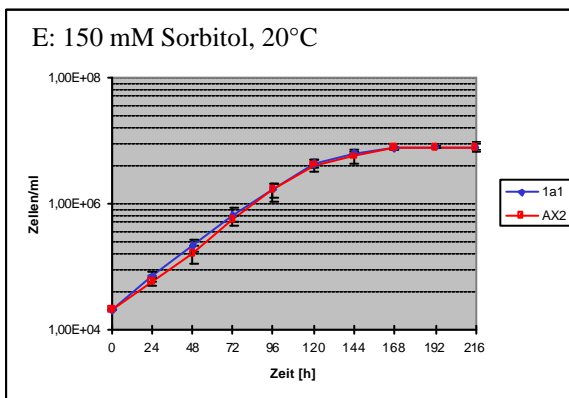
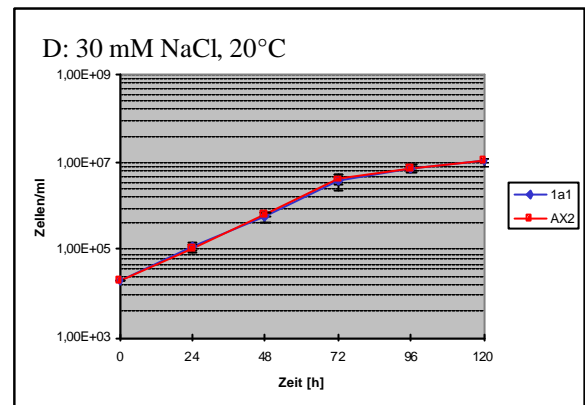
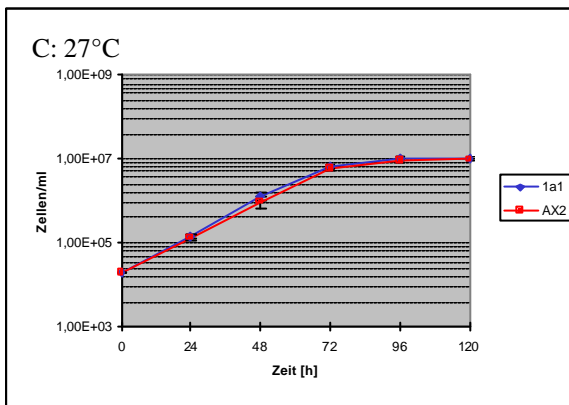
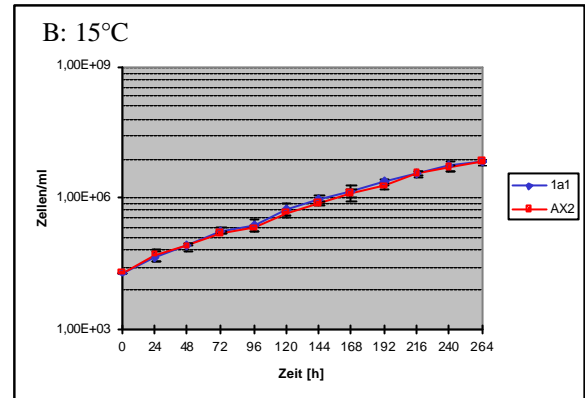
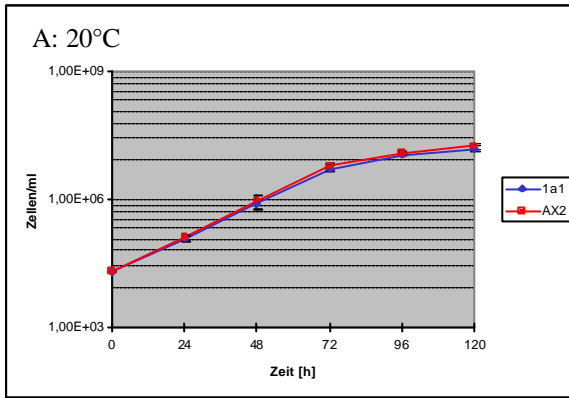
Das Aktin-Zytoskelett spielt eine zentrale Rolle bei einer Reihe von Zellfunktionen. Das Ausschalten eines aktinbindenden Proteins könnte folglich einzelne zelluläre Funktionen verändern oder einschränken. Dies konnte in *D. discoideum* exemplarisch an Myosin [Knecht *et al.*, 1987; De Lozanne und Spudich 1987] oder an Profilin I und II [Haugwitz *et al.*, 1994] gezeigt werden.

Nach den Arbeiten von **O. Weiner** [1993] und **E. Jung** [1996] wird eine Bindung des Comitíns an intrazelluläre Membranen sowie an das Aktin-Zytoskelett postuliert. Um die Funktion von Comitín in der Zelle weiter aufzuklären, untersuchte **A. v. Krempelhuber** verschiedene zellbiologische Aspekte an der Comitín-defizienten Mutante 1a1. Er konnte jedoch keine phänotypische Ausprägung der Comitín-Defizienz in bezug auf das Wachstum, die Entwicklung, die Motilität, die Endocytose und die Sekretion im Vergleich zum Wildtyp AX2 feststellen.

Im folgenden werden weitere Experimente zum Wachstumsverhalten und zur Expression entwicklungsregulierter Gene sowie neue Versuche zur Phagozytose und zur Fähigkeit, osmotischem Streß zu widerstehen, an der Comitín-defizienten Mutante 1a1 vorgestellt, die die bisherigen Untersuchungen und Ergebnisse **A. v. Krempelhubers** untermauern und ergänzen sollen.

2.1.2.1. Wachstum unter optimalen und erschwerten Bedingungen

Zellwachstum ist das Ergebnis eines Zusammenspiels verschiedener zellulärer Vorgänge wie Rezeptor-vermittelter Phagozytose und Zytokinese. Veränderte Temperatur-, Feuchtigkeits-, Ionen- und Osmolaritätsbedingungen stellen eine physiologische Herausforderung für das Wachstum und Überleben einer Zelle dar. Die Rolle eines ausgeschalteten Proteins in einer Mutante wird oft unter optimalen Wachstumsbedingungen im Labor nicht sichtbar, sondern nur unter Streßbedingungen [Rivero *et al.*, 1999]. **A. v. Krempelhuber** untersuchte das Wachstum der 1a1-Comitin-defizienten Mutante im Vergleich zum Wildtyp AX2 in Flüssigkultur bei 20°C. Als erschwerende Bedingungen wurde das Wachstum unter Zugabe von EGTA zum axenischen Medium beobachtet. EGTA bildet mit Calcium Chelatkomplexe und kann deshalb calciumabhängige Prozesse wie z. B. Signaltransduktionswege stören. Dieses Experiment wäre ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Ca²⁺-abhängigen Signaltransduktionswegen und der Anlagerung von Comitin an Vesikel. Die Droge Brefeldin A [Singleton *et al.*, 1958] inhibiert den Transportweg vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, ohne den rückläufigen Weg zu blockieren. Diese Inhibierung führt letztendlich zu einer Auflösung des Golgi-Apparates [Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989]. Da Comitin ein Golgi-Apparat lokalisiertes Protein ist, könnte die Comitin-Defizienz den Brefeldin A-Einfluß auf die Zelle noch verstärken und zu einem verminderten Wachstum von 1a1 gegenüber AX2 führen. Allerdings konnte **A. v. Krempelhuber** in seinen Untersuchungen keinen Unterschied im Wachstumsverhalten von 1a1 im Vergleich zu AX2 finden. Einige *D. discoideum*-Mutanten zeigen jedoch ein verändertes Wachstum unter veränderten Temperaturbedingungen: So weist z. B. die 34 kDa-Protein-Minusmutante eine um zehn Stunden längere Generationszeit und eine stark reduzierte Zelldichte in der stationären Wachstumsphase auf. Die α -Actinin-Minusmutante in *D. discoideum* zeigt ein geringeres Wachstum im Vergleich zum Wildtyp unter osmotischem Streß [Rivero *et al.*, 1999]. Ein weiterer Temperatureffekt ist, daß in *Vero*-Zellen der Transport vom endoplasmatischem Retikulum zum Golgi-Apparat bei 15°C unterbrochen wird [Pepperkok *et al.*, 2000]. Die Comitin-Defizienz könnte sich nachhaltig auf diesen Vorgang in *D. discoideum* und damit auf das Zellwachstum der 1a1-Mutante auswirken. Deshalb wurde hier zusätzlich der Einfluß veränderter Temperatur- (bei 20°C (Abb. 10A), 15°C (Abb. 10B) und 27°C (Abb. 10C)) und Osmolaritätsbedingungen (mit 30mM NaCl (Abb. 10D) bzw. mit 150 mM Sorbitol (Abb. 10E)) analysiert. Da die Bindung von Comitin an Aktin pH-abhängig ist, wurde außerdem der pH-Wert-Einfluß auf das Wachstum von 1a1 überprüft (Abb. 10F). Weiterhin wurde der Einfluß von Brefeldin A (Abb. 10G) und Methanol (Abb. 10H) auf beide *D. discoideum*-Stämme untersucht.



vorhergehende Seite

Abb. 10: Analyse des Wachstumsverhaltens der Comitín-defizienten Mutante 1a1 und des Wildtyps AX2 unter verschiedenen Bedingungen. Zellen wurden aus der logarithmischen Wachstumsphase in frisches Medium in einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/ml überimpft. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die jeweilige Zellzahl durch Auszählen am Mikroskop bestimmt. Die Daten stellen Durchschnittswerte aus mindestens drei unabhängigen Durchführungen dar.

Das Wachstumsverhalten der Comitín-defizienten Mutante 1a1 zeigt zu dem des Wildtyps AX2 in axenischem Medium bei verschiedenen Temperaturen (15°C in Abb. 10B, 20°C in Abb. 10A und 27°C in Abb. 10C) keinen Unterschied. Auch die Mutante 1a1 erreicht die jeweilige maximale Zellzahl von $1,2 \times 10^7$ Zellen/ml des Wildtyps in der stationären Phase des Wachstums. Die Generationszeiten sind sowohl bei 1a1 und AX2 entsprechend den Temperaturbedingungen gleichermaßen verändert. So beträgt die Generationszeit bei einer Temperatur von 20°C und 27°C ungefähr neun Stunden, bei einer Temperatur von 15°C verdoppeln sich die Zellen nur ungefähr alle 24 Stunden.

Die Zugabe von NaCl und Sorbitol zum AX2-Medium könnte die Zellen osmotischem Streß aussetzen. Dabei ist im Versuch mit 30 mM NaCl (Abb. 10D) keine Wirkung auf die 1a1-Mutante und den Wildtyp AX2 im Vergleich zum Wachstum unter optimalen Bedingungen bei 20°C festzustellen, da sich weder die Generationszeit noch die Zelldichte in der stationären Wachstumsphase verändert haben. Sorbitol in einer Konzentration von 150 mM führt jedoch für 1a1 und AX2 gleichermaßen zu einer verlängerten Generationszeit von ca. 14 Stunden. Die stationäre Phase des Wachstums liegt bei ungefähr 8×10^6 Zellen/ml (Abb. 10E).

Das pH-Optimum für Wachstum von *D. discoideum* in axenischem Medium liegt bei 6,7. Ein erhöhter pH-Wert führt zu erschwerten Wachstumsbedingungen. Sowohl AX2-Wildtypzellen als auch die Comitín-defiziente Mutante 1a1 zeigen kaum noch Wachstum in axenischem Medium bei pH 9,0 (Abb. 10F). Wachstum bei pH 8,0 führt bei beiden *D. discoideum*-Kulturen zu einer verlängerten Generationszeit von ungefähr 26 Stunden. Außerdem verringert sich die Zelldichte in der stationären Wachstumsphase auf 5×10^6 Zellen/ml (Abb. 10F).

Unter Zugabe von 0,75µg Brefeldin A zu 10 ml AX2-Medium zeigen sowohl die AX2-Zellen als auch die 1a1-Zellen eine erniedrigte Zelldichte von 6×10^6 Zellen/ml in der stationären Wachstumsphase (Abb. 10G). Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung von **A. v. Krempelhuber** (1997), daß Brefeldin A zu einer Stagnation des Wachstums bei niedrigeren Zelldichten als unter optimalen Bedingungen führt. Da Brefeldin A in Methanol gelöst wird, muß das Wachstum beider *D. discoideum*-Stämme auch unter dem Einfluß derselben Menge an Methanol verfolgt werden. Dadurch soll geklärt werden, ob der beobachtete Effekt einer erniedrigten Zelldichte in der Stagnationsphase auf Brefeldin A oder auf Methanol beruht. Abbildung 10H beschreibt das Wachstumsverhalten von AX2 und 1a1 unter Methanoleinfluß. Es unterscheidet sich weder in den Verdopplungszeiten noch in der erreichten Zelldichte der stationären Wachstumsphase vom Verhalten unter optimalen Bedingungen. Die im Versuch

mit Brefeldin A gefundene erniedrigte Sättigungszellichte von 6×10^6 Zellen/ml ist folglich auf die Wirkung der Droge zurückzuführen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen AX2-Wildtypzellen und Comitín-defizienten 1a1-Zellen besteht. Daraus läßt sich folgern, daß unter allen getesteten Bedingungen die Teilungsfähigkeit der Zellen und die Fähigkeit zur Pinozytose, durch die die Zellen Nährstoffe aus dem Medium aufnehmen können, in der Mutante 1a1 im Vergleich zum Wildtyp AX2 nicht beeinträchtigt ist.

2.1.2.2. Zellkernmarkierung in AX2-Wildtyp- und 1a1-Mutantenzellen

D. discoideum-Zellen besitzen in der Regel ein bis drei Zellkerne pro Zelle. Allerdings weisen einige beschriebene Mutanten eine erhöhte Anzahl vielkerniger Zellen im Vergleich zum Wildtyp auf. So zeichnen sich mehr als 5% aller Zellen einer Filamin- und α -Aktinin-defizienten Doppelmutantenpopulation durch Multinuklearität aus [Rivero *et al.*, 1996]. Ähnliche Ergebnisse werden für die Myosin-II- [De Lozanne und Spudich, 1987; Mannstein *et al.*, 1989] und die Coronin-defizienten [De Hostos *et al.*, 1991, 1993] Einzelmutanten. Auch die Profilin-Doppelmutante in *D. discoideum* zeigt Vielkernigkeit [Haugwitz, 1993]. Das Fehlen solcher aktinquervernetzender Proteine scheint verantwortlich für einen Defekt in der Zytokinese zu sein, der die Trennung der Kerne bei der Zellteilung beeinflusst. Zudem haben wir in unabhängigen Untersuchungen festgestellt, daß Behandlung mit Brefeldin A zu einer erhöhten Zellkernzahl führt. Die Ursachen dafür sind unbekannt [Mohrs *et al.*, 2000].

Abbildung 11 verdeutlicht, daß unter Zugabe von Methanol zum axenischem Medium sowohl die Wildtypzellen als auch die 1a1-Mutante keinen erhöhten Anteil an vier- und mehrkernigen Zellen besitzen. Allerdings ist der Anteil der einkernigen Zellen innerhalb der 1a1-Population um fast 15% höher als in der AX2-Kultur. Es finden sich entsprechend weniger zweikernige 1a1-Zellen als Wildtypzellen.

Nach Inkubation in Brefeldin A-haltigem Medium besitzen beide *D. discoideum*-Stämme rund 4% mehr vier- und mehrkernige Zellen. Im Falle des Wildtyps AX2 nimmt der prozentuale Anteil der einkernigen Zellen um 4,5% ab. Die AX2-Population besitzt auch nach Inkubation in Gegenwart von Brefeldin A einen gleich hohen Anteil an zweikernigen Zellen. Das Verhalten der Comitín-defizienten Mutante ist für Zellen mit einem oder zwei Kernen jedoch unterschiedlich. Die Anzahl der einkernigen 1a1-Zellen nimmt erheblich stärker ab (-10%), während die Zahl zweikerniger Zellen um 4% zunimmt. Der deutlich

höhere Anteil einkerniger Zellen in der 1a1-Population (67%) gegenüber dem Wildtyp (58%) bleibt jedoch erhalten (Abb. 11).

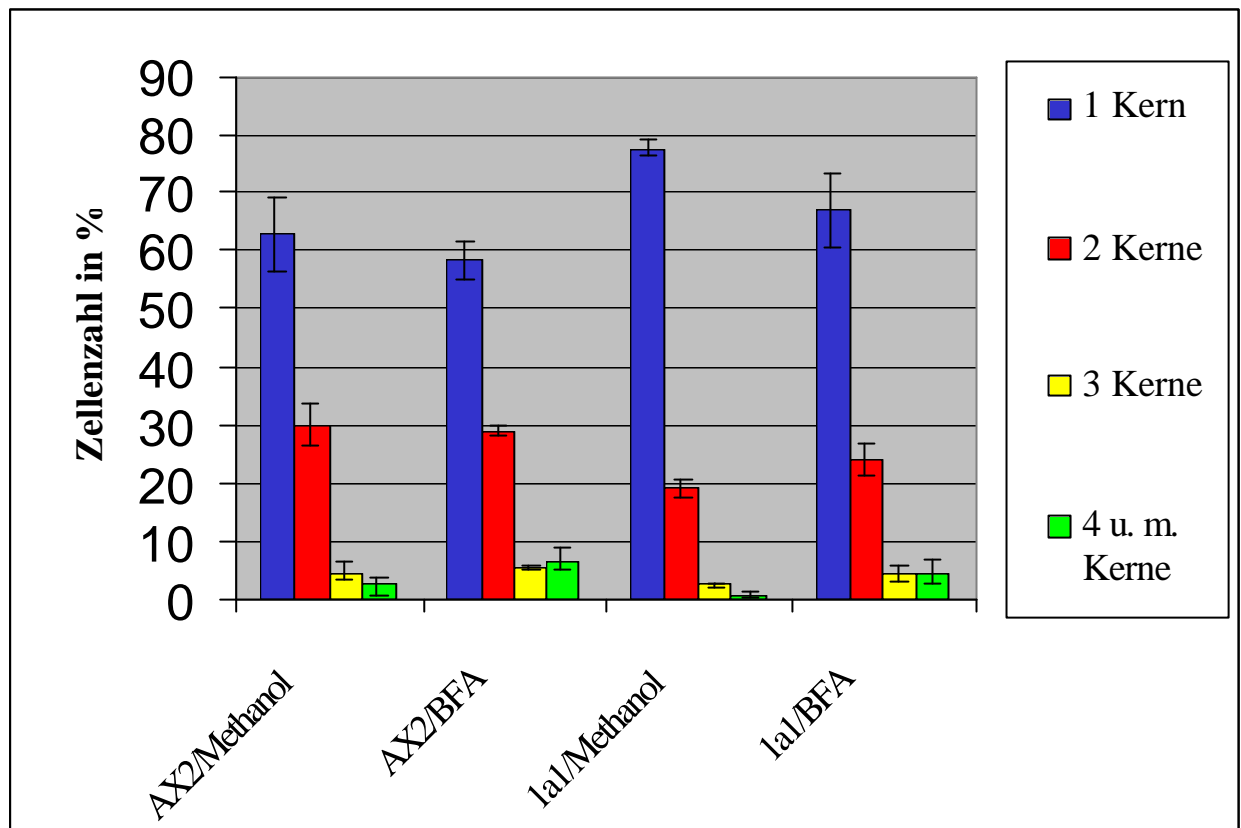


Abb. 11: Anzahl der Zellkerne pro Zelle für AX2- und 1a1-Kulturen bei Behandlung mit Brefeldin A in Methanol und unter alleinigem Methanoleinfluß. Die prozentualen Werte ergeben sich aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Es sind pro Experiment zwischen 400 und 800 Zellen ausgewertet worden.

Anhand dieser Ergebnisse läßt sich ein Defekt in der Zytokinese, der vielkernige Zellen zur Folge haben kann, durch fehlende Comitín-Expression nicht nachweisen. Dagegen besitzt die Comitín-Minusmutante 1a1 jedoch mehr einkernige Zellen als der Wildtyp AX2. Die Versuche bestätigen jedoch die Beobachtung, daß die Behandlung von *D. discoideum*-Kulturen mit Brefeldin A zu einer erhöhten Kernzahl führt, da Methanol-haltiges AX2-Medium selbst keine erhöhte Vielkernigkeit verursacht hat.

2.1.2.3. Expression entwicklungsregulierter Gene

Der Ablauf der Entwicklung und die Differenzierung von *D. discoideum* in Stiel- und Sporenzellen wird durch ein zeitlich gesteuertes Expressionsmuster verschiedener Gene festgelegt, das sich bei Fehlen aktinbindender Gene erheblich vom Wildtyp unterscheiden kann [Witke *et al.*, 1992; Köppel, 1994; Rivero *et al.*, 1996].

Bisher ist das zeitliche Expressionsmuster in der Mutante 1a1 im Vergleich zum Wildtyp AX2 schon für die Gene cARI, D19, D56 und D63 untersucht worden. Das cARI-Gen kodiert für den cAMP-Rezeptor, ein Transmembranprotein mit sieben Membrandurchgängen [Klein *et al.*, 1988]. *D. discoideum* beginnt bereits in der frühen Entwicklungsphase mit der Bildung dieses Proteins. Später wird dieser Rezeptor durch andere cAMP-Rezeptoren abgelöst. [Saxe *et al.*, 1991]. Die Gene D19, D56 (ecmB) und D63 (ecmA) werden von Zellen exprimiert, die im Entwicklungsverlauf zu Sporen- bzw. Stielzellen und zu Zellen der Basalplatte differenzieren und für die Proteine PsA, ST310 und ST430 kodieren. PsA ist ein Bestandteil von Prä-Sporvesikeln. St310 und St430 sind in der extrazellulären Protein-Cellulose-Matrix lokalisiert [Jermin *et al.*, 1987; McRobbie *et al.*, 1988]. Das zeitliche Expressionsmuster der cARI-, D56- und D63-Gene ist in der Mutante 1a1 und im Wildtyp AX2 gleich [v. Krempelhuber, 1997].

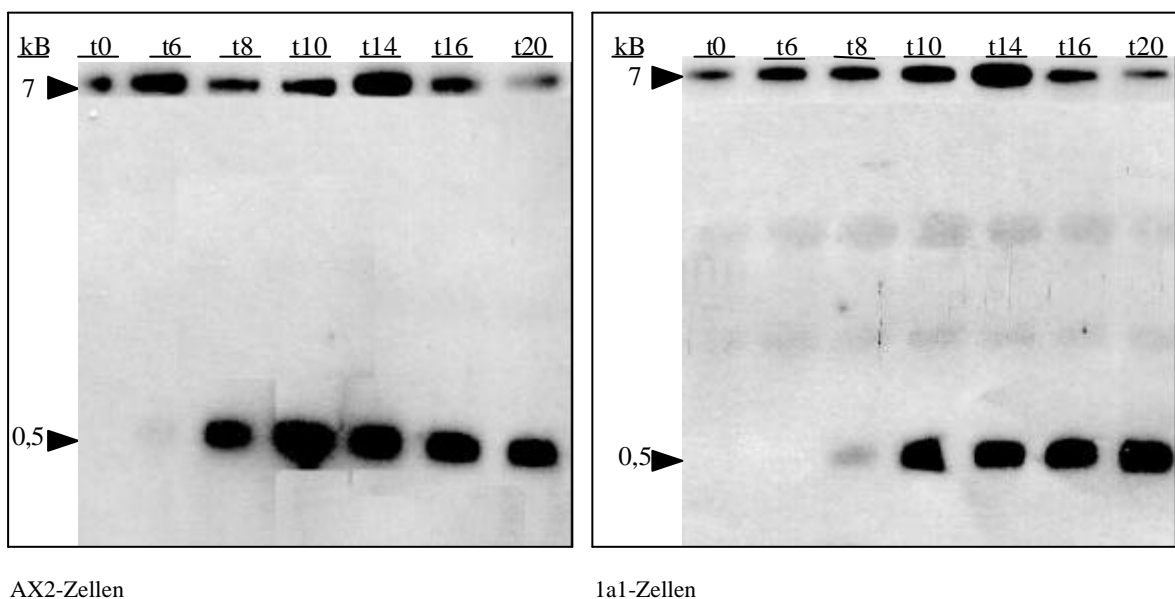


Abb. 12: Untersuchung der mRNA-Expression des D19-Gens in AX2 und 1a1 zu verschiedenen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus von *D. discoideum*. Gesamt-RNA wurde aus AX2- und 1a1-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert, in einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblotet. Der Zeitpunkt t0 gibt vegetative Zellen wieder. Der Zeitraum t6-t8 steht für aggregierende Zellen. Zur Zeit t14 und t16 war das „slug“-Stadium, bei t20 die Kulmination erreicht. Zur Hybridisierung wurden cDNA-Fragmente von Myosin und dem D19-Gen verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit ist das Expressionsmuster für das Gen D19 im Northern-Blot betrachtet worden. Es kodiert für ein Prä-Sporen-spezifisches, mehrfach glykosyliertes

Protein mit unbekannter Funktion. Zellen der Comitín-Minusmutante und des Wildtyps wurden auf Phosphatagarplatten zur Entwicklung gebracht und Gesamt-RNA zu definierten Zeitpunkten isoliert. Die Northern-Blots sind neben der spezifischen Sonde für das D19-Gen zusätzlich mit einem Myosin-Fragment hybridisiert worden. Danach sind gleiche Mengen an mRNA von AX2 und 1a1 aufgetragen worden. Mutante und Wildtyp exprimieren vergleichbare Mengen an mRNA zwischen der 8. und 20. Stunde des Entwicklungszyklus (Abb. 12).

Die Expression der „contact site A“ (csA), eines weiteren ebenfalls mehrfach glykosylierten Zelloberflächenproteins, wurde unter definierten Bedingungen in der 1a1-Mutante und im Wildtyp AX2 auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden 1a1- und AX2-Zellen in Schüttelkultur mit Soerensen-Phosphat-Puffer zur Entwicklung gebracht. Der Western-Blot wurde mit den monoklonalen Antikörpern 190-68-1 gegen Comitín, Act-1-7 gegen Aktin und 33-294-17 gegen csA inkubiert (Abb. 13).

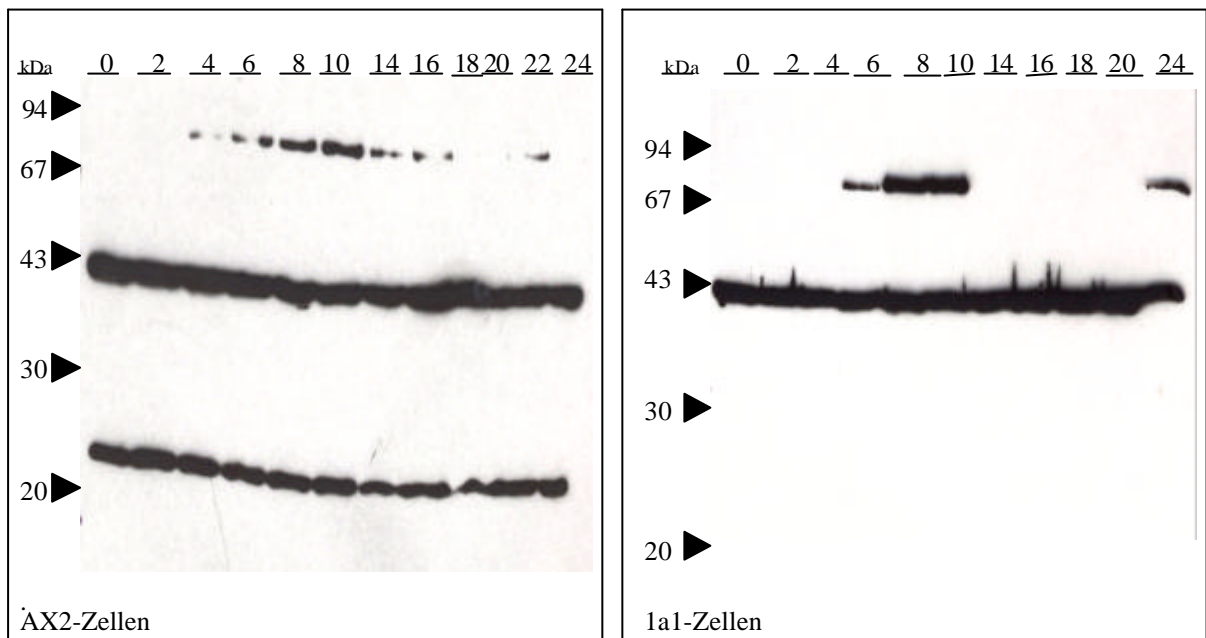


Abb. 13: Untersuchung zur Expression des csA-Proteins in AX2 und 1a1 zu verschiedenen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus von *D. discoideum*. 1×10^7 Zellen/ml wurden in Soerensen-Phosphat-Puffer inkubiert. Im Abstand von zwei Stunden wurden Proben entnommen, die Proteine auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Der Western-Blot wurde mit den monoklonalen Antikörpern 190-68-1 gegen Comitín, Act-1-7 gegen Aktin und 33-294-17 gegen csA inkubiert. Die Detektion des ersten Antikörpers erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper.

AX2-Wildtypzellen exprimieren das Oberflächenprotein csA, das als eine Bande von 80 kDa detektiert wird, in der frühen Aggregationsphase am stärksten sowie nochmals am Ende der Kulminationsphase (22. Stunde). Das Maximum der Proteinexpression liegt im Zeitraum zwischen acht und zehn Stunden. Comitín und Aktin zeigen jeweils gleichmäßige Signale während des gesamten Zeitraums. In der Comitín-Minusmutante ist der zeitliche Ablauf der csA-Expression etwas verändert. Das Oberflächenprotein wird nur im Zeitraum zwischen

sechs und zehn Stunden und zum Zeitpunkt 24 Stunden des Entwicklungszyklus detektiert. Die Zeitspanne der Proteinexpression ist also in 1a1 erheblich kürzer als in AX2, jedoch werden zu diesen Zeitpunkten größere Mengen an csA exprimiert. Allerdings liegt die maximale csA-Expression im Zeitraum zwischen acht und zehn Stunden für beide *D. discoideum*-Stämme. Die Aktinbande ist während der gesamten Entwicklung stets gleichmäßig vorhanden. Ein Vergleich der Aktinsignale in den Western-Blots für 1a1 und AX2 zeigt, daß jeweils gleiche Mengen an Gesamtzellhomogenat aufgetragen worden sind. Ein Signal für Comitín entfällt natürlich im Western-Blot für die Comitín-defiziente Mutante (Abb. 13).

2.1.2.4. Lokalisation von Comitín

2.1.2.4.1. Lokalisation von Comitín in fixierten und lebenden *D. discoideum*-Zellen

Die Lokalisation von Comitín wurde bereits früher schon in Immunfluoreszenzstudien mit den anti-Comitín-Antikörpern 190-23-5, 190-68-1 und 190-340-8 an Methanol-fixierten Zellen untersucht. Der Antikörper 190-23-5 zeigt eine vesikuläre Verteilung des Antigens in der Zelle, während der mAk 190-68-1 eine diffuse Verteilung von Comitín in *D. discoideum* detektiert. Der Antikörper 190-340-8 erkennt punktförmige, vesikuläre Strukturen und eine kappenförmige, in der Nähe des Zellkerns liegende Struktur, die dem Golgi-Apparat zugeordnet wurde (Abb. 14).

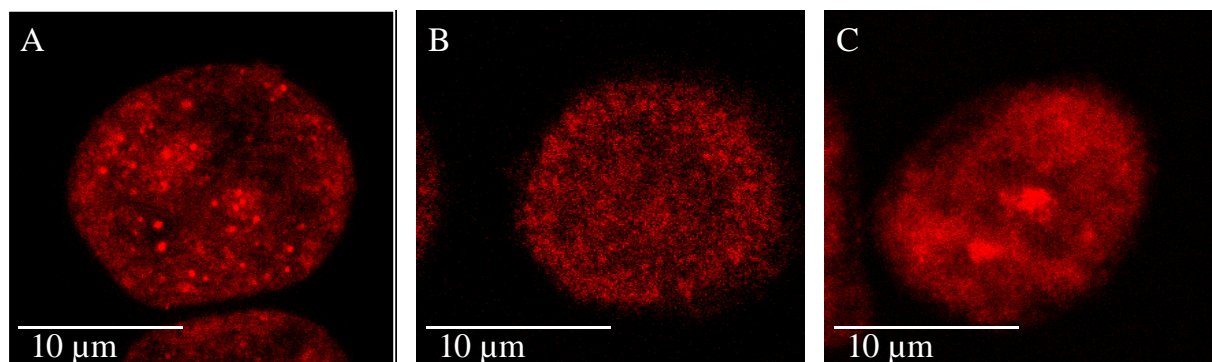


Abb. 14: Immunfluoreszenzanalyse mit Comitín-spezifischen Antikörpern in AX2-Zellen. *D. discoideum*-Zellen wurden nach Methanol-Fixierung mit den anti-Comitín-Antikörpern 190-23-5 (A), 190-68-1 (B) und 190-340-8 (C) inkubiert. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit Cy3-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörpern.

Da die drei gegen Comitín gerichteten monoklonalen Antikörper in Immunfluoreszenzstudien in *D. discoideum* unterschiedliche Strukturen erkennen [Weiner *et al.*, 1993], wurde auf das inzwischen etablierte System der Fusion des zu untersuchenden Proteins mit dem „green

fluorescent protein“ (GFP) zurückgegriffen. Dies ermöglicht es, die Lokalisierung eines Proteins in lebenden Zellen zu beobachten.

Die cDNA von GFP wurde 1992 kloniert [Prasher *et al.*, 1992] und kodiert ein 238 Aminosäuren langes, 27 kDa schweres Protein mit einer chromophoren Gruppe. Nach Anregung mit kurzwelligem Licht im blauen Absorptionsbereich (Absorptionsmaximum bei 395 nm) emittiert das Protein bei einem Emissionsmaximum von 508 nm. Diese Wellenlänge liegt im grünen Spektralbereich.

Für die Untersuchung wurde der GFP-Expressionsvektor pDNeogfp (J. Niewöhner) verwendet (Abb. 15), in dem das Comitín-Gen stromabwärts (3') vom GFP-Gen kloniert worden ist. Der resultierende Vektor ist pDNeogfp-p24. Das Fusionsprotein wird unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors des Aktin-6-Gens exprimiert.

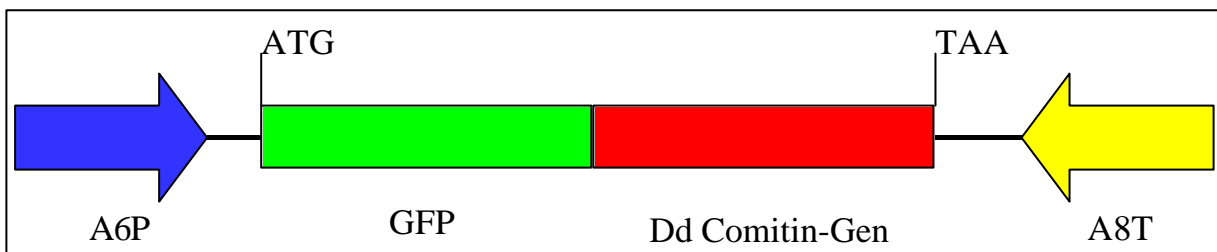


Abb. 15: Konstruktion des GFP-Comitin-Expressionsvektors pDNeogfp-p24. Das Stopcodon des GFP-Gens ist mutiert und ermöglicht so die Expression des Fusionsproteins. Comitín ist nach PCR-Amplifikation aus cDNA als Vorlage mit Oligonukleotiden, die eine BamHI- (5') bzw. eine EcoRI-Schnittstelle (3') enthielten, in die BamHI/EcoRI-Stelle des Polylinkers von pDNeogfp kloniert worden. Das GFP besitzt einen Serin-gegen-Threonin-Austausch in der Aminosäureposition 65 aufgrund einer Punktmutation. Dies führt zu einer längerwelligen Emission bei 511 nm. Dieser Serin-gegen-Threonin-Austausch ist auch in allen anderen verwendeten GFP-Expressionsvektoren vorhanden. Der Vektor pDNeogfp-p24 enthält eine Neomycin-Resistenzkassette.

Transformanten von Wildtyp und Mutante wurden mit Geneticin-418 selektioniert und die Expression des Fusionsproteins in Immunfluoreszenzmikroskopie und im Immunoblot überprüft. Bei diesem Versuch dienten Gesamtzellextrakte von AX2 und 1a1 als Kontrolle (Abb. 16).

Der Western-Blot ist mit den monoklonalen Antikörpern mAk 190-68-1 gegen Comitín, mAk Act-1-7 gegen Aktin und mAk K3-184-2 gegen GFP behandelt worden. In transformierten AX2- und 1a1-Zellen wird das Fusionsprodukt bei ca. 52 kDa sichtbar. Zusätzlich erkennt mAk 190-68-1 in Wildtypzellen das endogene Comitín. Zur Kontrolle für gleichmäßiges Laden wurde der Blot mit dem Aktin-spezifischen Antikörper Act-1-7 getestet (Abb. 16).

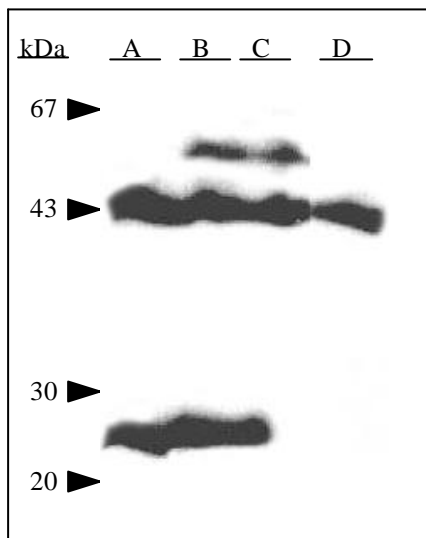


Abb. 16: Nachweis der Expression des GFP-Comitin-Fusionsproteins in AX2- und 1a1-Zellen. Zellhomogenate von 2×10^6 Zellen wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Der Western-Blot wurde mit mAk 190-68-1 gegen Comitin, mAk Act-1-7 gegen Aktin und K3-184-2 gegen GFP inkubiert. Die Detektion des ersten Antikörpers erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper. Die Spur A zeigt Proteinextrakt aus *D. discoideum*-Wildtypzellen. In Spur B wurde Zellhomogenat von GFP-Comitin exprimierenden AX2-Zellen aufgetragen. Proteinextrakt von GFP-Comitin-exprimierenden 1a1-Zellen ist in Spur C zu sehen. Spur D zeigt Zellhomogenat aus nicht transformierten Mutantenzellen. Das 52 kDa GFP-Comitin-Fusionsprotein wurde in den Spuren B und C detektiert, Aktin mit einem Molekulargewicht von ca. 42 kDa in allen Spuren.

Das GFP-Comitin-Fusionsprotein hebt in beiden *D. discoideum*-Stämmen die gleichen Zellstrukturen hervor. Es lassen sich neben kleineren vesikulären noch größere stark leuchtende Strukturen beobachten (Abb. 17A und B). Zur Identifizierung der durch das Fusionsprotein hervorgehobenen Strukturen sollten Immunfluoreszenzanalysen an diesen Zellen mit den anti-Comitin-Antikörpern durchgeführt werden. Das GFP-Fusionsprotein ging jedoch bei der Zellfixierung mit Methanol oder Pikrinsäure immer verloren, so daß Kolokalisationsversuche nicht möglich waren.

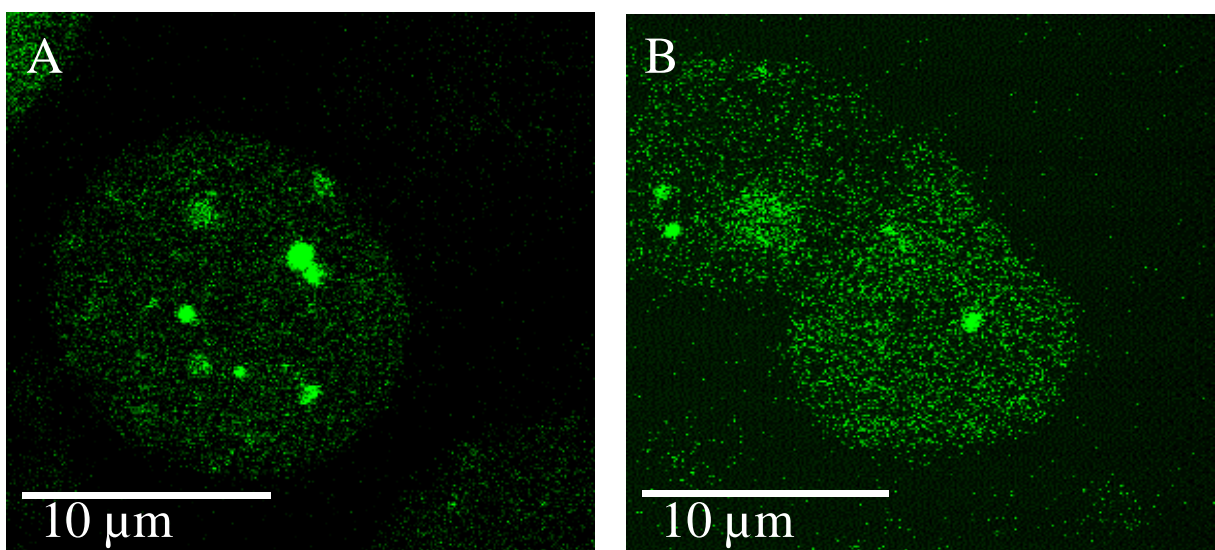


Abb. 17: Fluoreszenzaufnahmen von lebenden GFP-Comitin-transformierten AX2- und 1a1-Zellen. *D. discoideum*-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor pDNeogfp-p24 transformiert, positive Klone selektiert und im Fluoreszenzmikroskop lebend photographiert. Bild A zeigt die Verteilung des GFP-Comitin-Fusionsproteins in Wildtyp-Zellen. Bild B gibt die Fluoreszenzaufnahme von Mutantenzellen wieder.

2.1.2.5. Osmotischer Schock

Eukaryontische Zellen zeigen eine Vielzahl von Reaktionen gegenüber hyperosmotischem Streß. In Säugetierzellen beeinflusst das durch hyperosmotischen Streß vergrößerte Zellvolumen den anterograden Transport zwischen dem endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi-Apparat. So wird in Lösungen hoher Osmolarität der ER-Export, der Transport vom ER zum Golgi-Apparat und die Transportschritte zwischen ER und dem medialen Golgikompartment (ERGIC) gehemmt. Der retrograde Transport wird durch das veränderte Zellvolumen nicht beeinflusst. Letztendlich kommt es zu einer Entleerung des ERGIC und des Golgi-Apparates in das endoplasmatische Retikulum. Osmotischer Streß wirkt nämlich auch auf die Funktion von COPI ein, da in Experimenten gezeigt wurde, daß die von Brefeldin A induzierte β -COP-Dissoziation von den Golgi-Membranen verlangsamt wird. Auf diesen Beobachtungen beruht die Annahme, daß der anterograde und retrograde Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Komplex unabhängig voneinander reguliert wird [Lee und Linstedt, 1999].

Ein osmotischer Schock führt auch zu einer Umordnung des Zytoskeletts. Daher könnten beim Fehlen F-aktinbindender Proteine Veränderungen nach Inkubation von Zellen in hyperosmotischen Lösungen auftreten.

Nach den bisherigen Ergebnissen ist Comitín als ein F-aktinbindendes Membranprotein von Vesikeln und des Golgi-Apparates auch an Transportprozessen und am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt. Veränderungen des Zellvolumens infolge osmotischen Stresses könnte also bei einer Comitín-defizienten Mutante eine geringere Überlebensfähigkeit in hyperosmotischen Lösungen bewirken, da sowohl das Aktin-Zytoskelett als auch der Golgi-Apparat und Membranvesikel durch das Fehlen von Comitín betroffen sind.

2.1.2.5.1. Verteilung von Comitín bei hyperosmotischen Bedingungen

Immunfluoreszenzuntersuchungen von AX2-Wildtypzellen nach Inkubation in hyperosmotischen Lösungen zeigen eine veränderte Comitínverteilung in *D. discoideum*-Wildtypzellen. Dazu wurden AX2-Zellen in Soerensen-Phosphat-Puffer mit einer Sorbitolkonzentration von 0,4 mol/l 90 Minuten lang inkubiert. Für die anschließenden Immunfluoreszenzstudien wurden die anti-Comitín-Antikörper 190-23-5 und 190-340-8, der anti-Aktin-Antikörper Act-1-7 und der anti-Hisactophilin-Antikörper 54-11-10 verwendet. Hisactophilin ist ein 17 kDa F- und G-aktinbindendes und Membran-assoziiertes Protein, dessen Bindung an F-Aktin und an die Zellmembran pH-abhängig ist. Dem Protein wird eine Funktion als pH-Sensor zugeschrieben, der bei Erniedrigung des pH-Wertes des umgebenden Milieus die Bindung der Zellmembran an das Mikrofilamentsystem stabilisiert. Hisactophilin induziert die Aktinpolymerisierung auch in Abwesenheit von Mg^{2+} und K^+ . Das Protein ist zu

gleichen Teilen an der inneren Zellmembran und im Zytosol lokalisiert [Schleicher *et al.*, 1984; Scheel *et al.*, 1989; Stoeckelhuber *et al.*, 1996]. Als Anker zwischen der Plasmamembran und dem Mikrofilamentsystem sollte auch Hisactophilin eine Rolle bei der Zellantwort auf hyperosmotischen Streß spielen. Zusätzlich wurden für dieses Experiment AX2-Zellen mit dem polyklonalen anti-DdLIMP-Antikörper inkubiert. Das integrale Membranglykoprotein DdLIMP aus *D. discoideum* hat ein Molekulargewicht von 88 kDa. Es weist hohe Homologie zu CD36/LIMP-II-Proteinen aus Säugern auf. Dd-LIMP besitzt je eine Transmembrandomäne am N- und C-Terminus und unterscheidet sich somit als echtes Transmembranprotein von Comitín und Hisactophilin, die peripher an der zytosolischen Seite von Membranen angelagert sind. Seine Funktion liegt im Bereich der Zelladhäsion und der Signaltransduktion. DdLIMP ist ein Protein der an Cystein-Proteasen reichen Lysosomenpopulation, die einen neutralen pH-Wert haben [Karakesisoglou *et al.*, 1999].

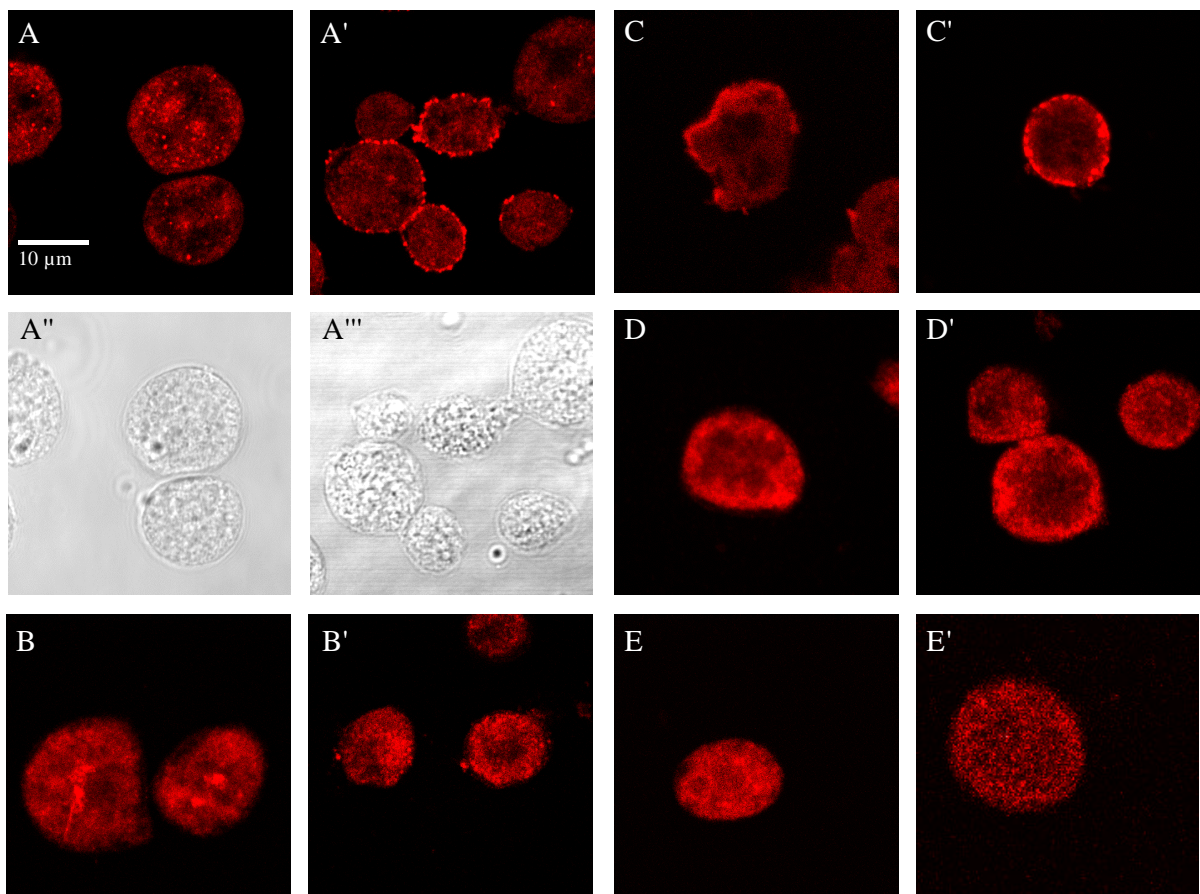


Abb. 18: Immunfluoreszenzuntersuchungen an *D. discoideum*-Wildtypzellen nach hyperosmotischem Streß. AX2-Zellen wurden 90 Minuten in 0,4 M Sorbitol inkubiert, dann mit Methanol auf Deckgläschen fixiert und mit folgenden ersten Antikörpern markiert: A-A' mAk 190-23-5 und B-B' mAk 190-340-8 gegen Comitín, C-C' mAk Act-1-7 gegen Aktin, D-D' mAk 54-11-10 gegen Hisactophilin sowie E-E' mit dem polyklonalen anti-DdLIMP-Antikörper. Die monoklonalen Antikörper wurden durch Cy3-konjugierte Ziege-anti-Maus-Antikörper erkannt. Zur Detektion des polyklonalen Antikörpers wurde ein TRITC-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Die Bilder A-E geben die Zellen vor, die Aufnahmen A'-E' nach hyperosmotischem Streß wieder. Die Phasenkontrastaufnahme von A bzw. A' zeigen die Bilder A'' bzw. A'''.

In AX2-Kontrollzellen erkennt der Antikörper 190-23-5 punktförmige Comitín-dekorierte Vesikel innerhalb der Zellen (Abb. 18A). Nach Inkubation in hypertotonischer Lösung ist Comitín mit mAk 190-23-5 vor allem an der Plasmamembran an punktförmigen Strukturen angereichert (Abb. 18A'). Der Antikörper 190-340-8 detektiert neben vesikulären Strukturen auch den Golgi-Apparat in AX2-Zellen (18B). Infolge hyperosmotischen Stresses wird der Golgi-Apparat von mAk 190-340-8 in Wildtypzellen nicht mehr erkannt (Abb. 18B'). Diese Beobachtung entspricht der beschriebenen Entleerung des Golgi-Apparates in das ER als Antwort auf hyperosmotischen Schock [Lee und Linstedt, 1999]. Zahlreiche Immunfluoreszenzanalysen haben gezeigt, daß Aktin in *D. discoideum* hauptsächlich an Zellfronten unterhalb der Plasmamembran lokalisiert ist (Abb. 18C). Der Einfluß hypertotonischer Lösung auf AX2-Zellen führt zu einer punktförmig erscheinenden Aktinverteilung an der gesamten Plasmamembran. Eine Frontseite existiert nicht mehr, da die *D. discoideum*-Zellen dem osmotischen Druck durch Abrunden der Zellgestalt ausweichen (Abb. 18C').

Die Immunfluoreszenzuntersuchung mit dem mAk 54-11-10 an unbehandelten Wildtypzellen bestätigt die oben genannte intrazelluläre Verteilung von Hisactophilin (Abb. 18D). Inkubation in hypertotonischer Lösung führt zu einer stärker vesikulär erscheinenden Verteilung von Hisactophilin im Zytosol (Abb. 18D'). Immunfluoreszenzstudien mit dem polyklonalen anti-DdLIMP-Antikörper zeigen keine besondere Markierung der Plasmamembran. Das Protein ist in kleinen Vesikeln ($<0,5 \mu\text{m}$) verschiedener Größe und in Ringen um größere vesikuläre Strukturen lokalisiert (Abb. 18E) [Karakesisoglou *et al.*, 1999]. Hyperosmotischer Streß verursacht eine weniger dichte vesikuläre DdLIMP-Verteilung im Zytosol (Abb. 18E'). In diesem Versuch wurde für alle getesteten Antigene eine veränderte intrazelluläre Verteilung beobachtet.

2.1.5.2. Einfluß des hyperosmotischen Schocks auf die Überlebensfähigkeit von *D. discoideum*

In den oben beschriebenen Experimenten wurde eine Umverteilung von Comitín nach Inkubation in hypertotonischer Lösung beobachtet. Im folgenden Versuch wurde die Überlebensfähigkeit des Wildtyps und der Mutante nach hyperosmotischem Streß getestet (Abb. 19).

Die Überlebensrate für die Comitín-defiziente Mutante 1a1 beträgt nach einstündiger Inkubation in der Hochzuckerlösung und anschließender Verdünnung in Soerensen-Phosphat-Puffer 46,6%. Dagegen überleben 82,5% der Wildtypzellen den osmotischen Schock. Dieses

unterschiedliche Verhalten der beiden *D. discoideum*-Stämme fällt noch deutlicher nach zweistündiger Behandlung mit Sorbitol aus: Nur noch 34,2% der 1a1-Zellen sind dann lebensfähig, während die Überlebensrate des Wildtyps AX2 mit 77,7% auf hohem Niveau verbleibt (Abb. 19). Die Comitín-Minusmutante 1a1 besitzt folglich eine erheblich reduzierte Überlebensfähigkeit in hyperosmotischen Lösungen gegenüber dem Wildtyp AX2. Nach diesen Ergebnissen ändert sich nicht nur die intrazelluläre Verteilung von Comitín in *D. discoideum*, sondern sein Vorhandensein bietet der Zelle auch Schutz vor hyperosmotischem Streß.

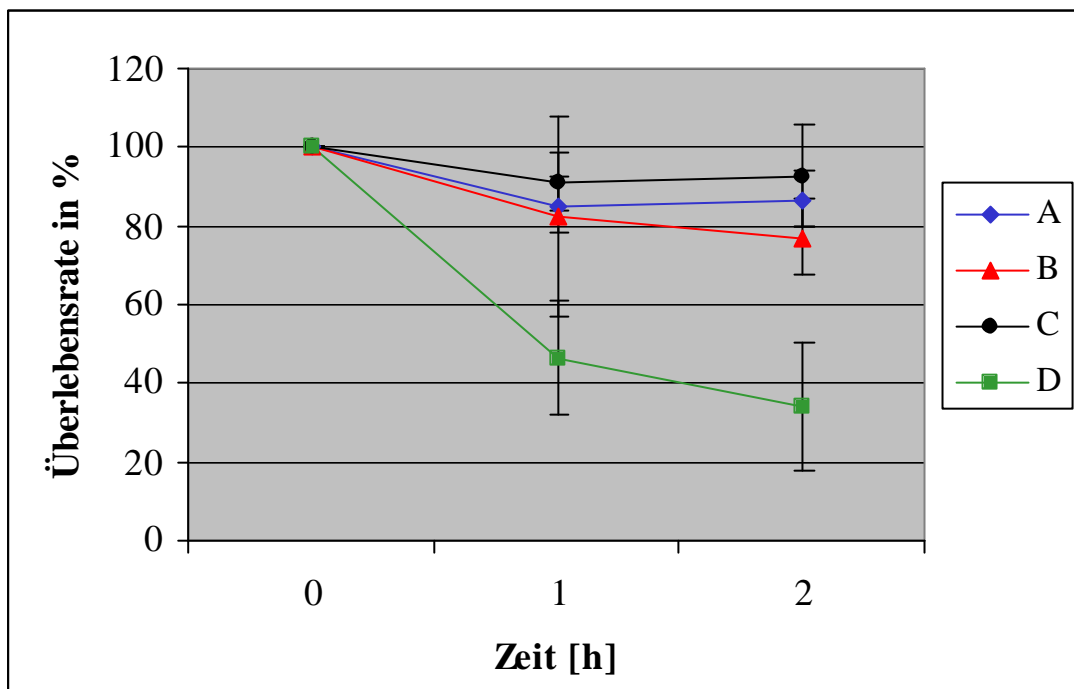


Abb. 19: Widerstandsfähigkeit von AX2 und 1a1 gegenüber hyperosmotischem Streß. Beide Stämme wurden für die angegebene Zeit in 0,4 M Sorbitol inkubiert, dann in Soerensen-Phosphat-Puffer verdünnt und die Zellen auf SM-Agarplatten mit *K. aerogenes* ausgebracht, um die Überlebensrate zu bestimmen. A: AX2 in Soerensen-Phosphat-Puffer; B: AX2 in Sorbitol; C: 1a1 in Soerensen-Phosphat-Puffer; D: 1a1 in Sorbitol. Die Daten stellen Durchschnittswerte aus vier unabhängigen Versuchen dar.

2.1.2.5.3. Immunfluoreszenzstudien an AX2-Zellen nach hypoosmotischem Schock

Auch unter hypotonischen Bedingungen kommt es zu einer Veränderung des Zellvolumens. Hier werden, wie bei hyperosmotischem Streß, die anterograden Transportschritte zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat inhibiert. **T. H. Lee** und **A. D. Linstedt** (1999) untersuchten den Einfluß von hypotonischen Medien auf Säugetierzellen und betrachteten die unterschiedliche Verteilung von Proteinen des Golgi-Komplexes, wie z. B.

des integralen Membranproteins GPP 130 [Linstedt *et al.*, 1997], des Enzyms Mannosidase II, das an der Biosynthese von Glykoproteinen beteiligt ist [Novikoff *et al.*, 1993], und des Giantins [Linstedt und Hauri, 1993]. Giantin ist ein Golgi-Membranprotein mit einer über eine Disulfidbrücke verknüpften lumenalen Domäne. Werden Zellen hypotonischen Bedingungen ausgesetzt, so bilden die Golgi-Zisternen zeitweise röhrenförmige Kanäle aus. Diese Morphologieänderung des Golgi-Komplexes wird nicht durch hyperosmotischen Streß ausgelöst. Diese Röhren stellen wahrscheinlich nur ein Intermediat im Prozeß zwischen der Auflösung des Golgi-Apparates und der Aufnahme eines Teils der Golgi-Partikel in das endoplasmatische Retikulum dar. Die Aufnahme von Golgi-Teilchen in das ER ist in der Zellantwort auf hypoosmotischen Streß erheblich schneller als auf hyperosmotischen Schock [Lee und Linstedt, 1999]. Um eine Beteiligung von Comitín an der intrazellulären Antwort auf hypoosmotischen Schock zu untersuchen, wurden AX2-Wildtypzellen 90 Minuten in destilliertem Wasser inkubiert. Für die anschließenden Immunfluoreszenzstudien wurden wieder die monoklonalen anti-Comitín-Antikörper 190-23-5, 190-340-8, der monoklonale anti-Aktin-Antikörper Act-1-7, der monoklonale anti-Hisactophilin-Antikörper 54-11-10 sowie der polyklonale anti-DdLIMP-Antikörper verwendet.

Der anti-Comitín-Antikörper 190-23-5 erkennt in AX2 vor und nach hypoosmotischen Schock vergleichbare vesikuläre Strukturen (Abb. 20A-A'). Den Einfluß hypotonischer Lösung auf den Golgi-Apparat verdeutlichen die Abbildungen 20B-B'. MAk 190-340-8 markiert nach Inkubation von AX2-Zellen in destilliertem Wasser nur noch Comitín-dekorierte Vesikel, aber nicht mehr den Golgi-Komplex. Diese Beobachtung bestätigt die von **T. H. Lee** und **A. D. Linstedt** (1999) beschriebene Auflösung des Golgi-Apparates. F-Aktin ist als Reaktion auf den hypoosmotischen Streß nicht mehr hauptsächlich an der Frontseite der Plasmamembran lokalisiert, sondern es werden runde Strukturen im Cytosol vom mAk Act-1-7 detektiert (Abb. 20C-C'). Inkubation in destilliertem Wasser führt nach dieser Immunfluoreszenzstudie nicht zu einer veränderten intrazellulären Verteilung von Hisactophilin (Abb. 20D-D'). Abbildung 20E gibt die vom polyklonalen DdLIMP-Antikörper erkannten kleinen Vesikel wieder. Infolge des hypoosmotischen Stresses zeigt sich ein ähnlich verändertes Bild der DdLIMP-bedeckten Vesikel wie nach Inkubation in hypertonischer Lösung (Abb. 20E', s. Abschnitt 2.1.5.1), also eine weniger dichte Verteilung der DdLIMP-haltigen Vesikel.

Die Immunfluoreszenzanalysen weisen also auf veränderte Lokalisation von Comitín, Aktin und dem DdLIMP-Protein an der Zellantwort auf hypoosmotischen Schock hin.

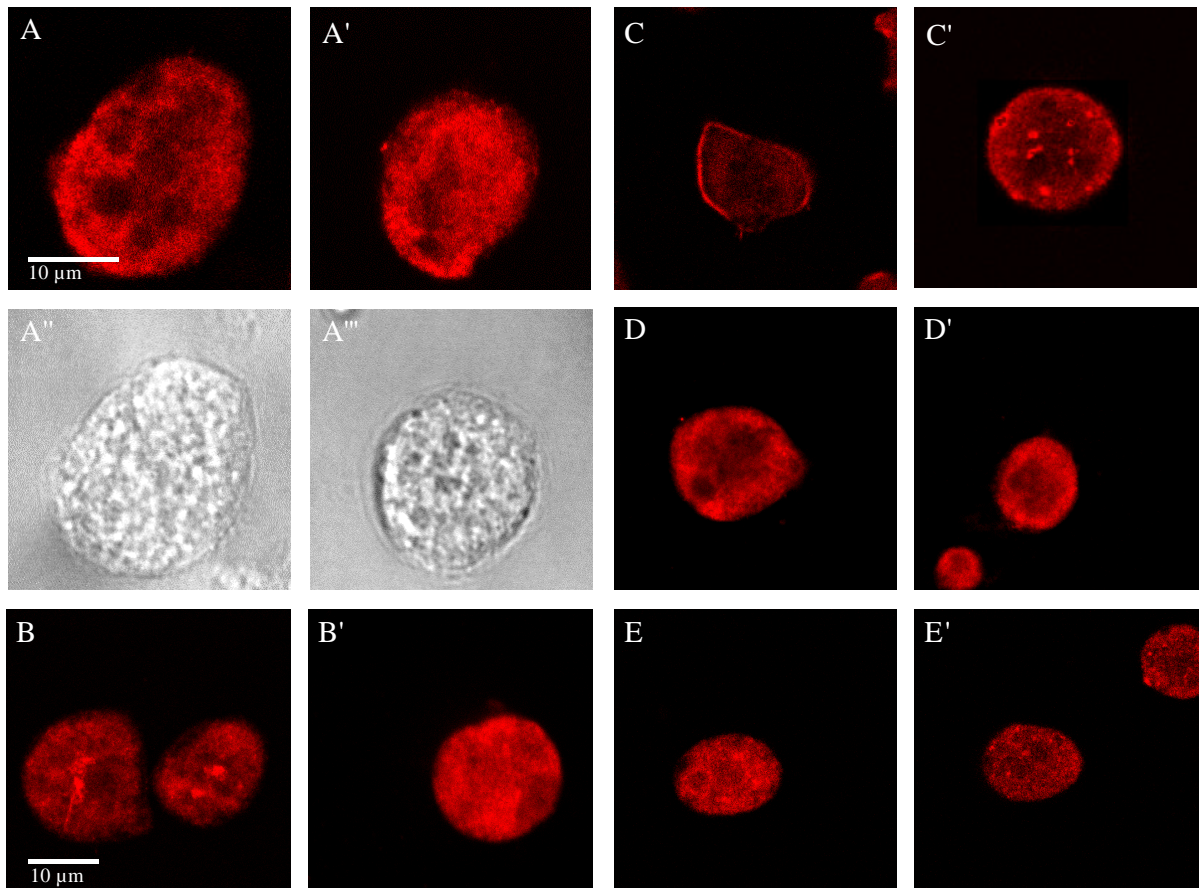


Abb. 20: Immunfluoreszenzstudien an AX2-Zellen nach hypoosmotischem Schock in destilliertem Wasser. Die Zellen wurden 90 Minuten in destilliertem Wasser inkubiert, dann mit Methanol fixiert und anschließend mit verschiedenen Antikörpern markiert. Folgende erste Antikörper wurden verwendet: A-A' mAk 190-23-5 und B-B' mAk 190-340-8 gegen Comitín, CC' mAk Act-1-7 gegen Aktin, DD' mAk 54-11-10 gegen Hisactophilin sowie der polyklonale anti-DdLIMP-Antikörper (E-E'). Die Detektion des ersten monoklonalen Antikörpers erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG. Antikörper. Der polyklonale Antikörper wurde mit einem TRITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper erkannt. Die Bilder A'-E' geben AX2-Zellen nach hypoosmotischem Streß wieder. Die Aufnahmen A'' und A''' zeigen den Phasenkontrast zu A bzw. A'.

2.1.2.6. Phagozytose

Untersuchungen mit Hemmstoffen der Aktin-Polymerisation haben gezeigt, daß das Aktinnetzwerk wesentlich an der Phagozytose beteiligt ist. Bei der phagozytotischen Aufnahme von Bakterien werden zunächst Pseudopodien ausgebildet, die das Bakterium umschließen. Nach dem Verschmelzen der Pseudopodien und der vollständigen Aufnahme des Bakteriums wird ein Phagosom abgeschnürt und dem Abbauweg zugeführt, der in der Verschmelzung von Phagosom und Lysosom endet.

Hauptsächlich wird die Phagozytose durch F-Aktin reguliert [Maniak *et al.*, 1995]. Als regulatorische Komponenten wurden in den letzten Jahren weitere an der phagozytotischen Aufnahme von Feststoffen beteiligte Proteine beschrieben, so z. B. G β [Wu *et al.*, 1995], Talin [Niewohner *et al.*, 1997], Coronin [Maniak *et al.*, 1995], die Rho Proteine RacC

[Seastone *et al.*, 1998] und RacF1 [Rivero *et al.*, 1999], Myosin-I-Isoformen B [Jung und Hammer, 1990] und K [Schwarz *et al.*, 2000], sowie die Ras-ähnliche GTPase Rap1 [Seastone *et al.*, 1999] und das RasS-Protein [Chubb *et al.*, 2000].

In Immunfluoreszenzstudien ist Comitín als Vesikel- und Golgi-Apparat-assoziiertes Protein beschrieben worden [Weiner *et al.*, 1993]. Die Anzahl und die Größe der vesikulären Strukturen legen die Vermutung nahe, daß es sich bei den von den Antikörpern markierten Strukturen um endosomale Kompartimente, die an der Phagozytose beteiligt sind, handeln könnte. In den nachfolgenden Abschnitten wurde die Rolle von Comitín an phagozytotischen Prozessen in *D. discoideum* untersucht.

2.1.2.6.1. Lokalisation von F-Aktin während der Phagozytose in AX2- und 1a1-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit ist zunächst die Beteiligung von F-Aktin an der Phagozytose von Hefen für die *D. discoideum*-Stämme AX2 und 1a1 untersucht worden. Zur Lokalisation von F-Aktin während der phagozytotischen Aufnahme TRITC-markierter Hefen sind AX2- und 1a1-Zellen isoliert worden, die ein GFP-Aktin-Fusionsprotein exprimieren [Westphal *et al.*, 1997].

Als Grundlage für den hier verwendeten Expressionsvektor dient das Transformationsplasmid pDexRH. Dabei ist die kodierende Sequenz von *D. discoideum* Aktin an seinem 5'-Ende an die GFP-DNA-Sequenz aus *A. victoria* über einen Pentapeptid-Linker gehängt worden. Die Expression des GFP-Aktin-Fusionsproteins selbst steht unter der Kontrolle des Aktin-15-Promotors.

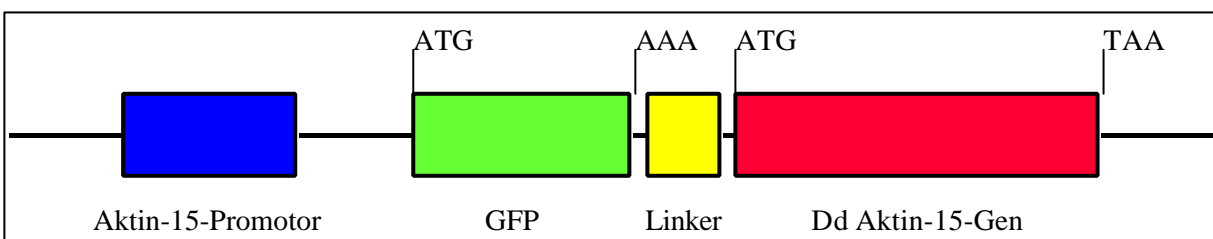


Abb. 21: Schematische Darstellung des GFP-Aktin-Expressionsvektors. Der Aktin-15-Promotor kontrolliert die Transkription des über einen Linker verknüpften GFP-Aktin-Fusionsproteins [Westphal *et al.*, 1997].

Nach der Transformation mit dem Expressionsvektor sind positive Transformanten, die eine Neomycin-Resistenzkassette tragen, mit Geneticin-418 selektioniert worden. Die Expression des GFP-Aktin-Fusionsproteins wurde im Western-Blot überprüft.

In transformierten AX2- und 1a1-Zellen war das 71 kDa GFP-Aktin-Fusionsprotein nachweisbar (Spur A). Nur die AX2-Zellen geben die 24 kDa Bande für Comitín wieder (Spur A und B). Die Inkubation mit mAk Act-1-7 zeigten, daß gleiche Mengen an Zellhomogenat geladen wurde (Abb. 22).

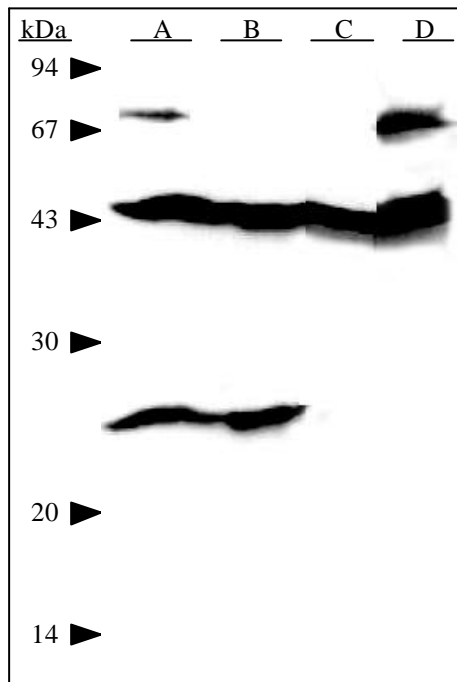


Abb. 22: Nachweis der Expression des GFP-Aktin-Fusionsproteins in AX2- und 1a1-Zellen. Gesamtprotein von 2×10^6 Zellen wurde in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Der Western-Blot wurde mit mAk Act-1-7 gegen Aktin, mAk 190-68-1 gegen Comitin und K3-184-2 gegen GFP inkubiert. Die Detektion des ersten Antikörpers erfolgte mit einem Peroxidase-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper. Homogenate von das GFP-Aktin-Fusionsprotein exprimierenden *D. discoideum*-Zellen wurden in Spur A (AX2-Zellen) und in Spur D (1a1-Zellen) aufgetragen. Die Spur B zeigt Gesamtzellhomogenat nicht transformierter Wildtypzellen, Spur C nicht transformierter Mutantenzellen.

2.1.2.6.1.1. Beteiligung des GFP-Aktin-Proteins an der Phagozytose in 1a1 und AX2

Die Akkumulation von Aktin an der Phagozytosekappe während der phagozytotischen Aufnahme TRITC-markierter Hefen wurde an GFP-Aktin-exprimierenden AX2- und 1a1-Transformanten im Mikroskop untersucht. Dabei unterscheidet sich die GFP-Aktin-Lokalisation in der Comitin-Minusmutante 1a1 nicht von derjenigen im Wildtyp AX2 während der Phagozytose der markierten Hefen. Deshalb gibt die nachfolgende Abbildung 23 nur den Verlauf der phagozytotischen Aufnahme von Hefezellen durch GFP-Aktin-exprimierende 1a1-Zellen wieder.

F-Aktin reichert sich deutlich an der Zelloberfläche nach Kontakt mit dem aufzunehmenden Teilchen an (Abb. 23A-C). Diese GFP-Aktin-Anreicherung ist an der Kontaktstelle deutlich stärker als in anderen Zellbereichen. Es bilden sich zunächst mit GFP-Aktin-angereicherte Pseudopodien, die durch Verschmelzen die Hefe vollständig umschließen (Abb. 23C-E). Das Phagosom schnürt sich nach der vollständigen Aufnahme der Hefe von der Plasmamembran ab. Dieser Phagozytoseschritt geht mit einer abnehmenden GFP-Aktin-Konzentration an der Phagosomenmembran einher (Abb. 23F-H). Die GFP-Aktin-Konzentration an der Membran des reifen Phagosoms unterscheidet sich nicht mehr von der Konzentration des Fusionsproteins in den anderen Zellbereichen (Abb. 23I). Abbildung 23P zeigt als Vergleich die Aufnahme einer TRITC-markierten Hefezelle durch eine das GFP-Aktin-Fusionsprotein exprimierende AX2-Zelle. Auch in AX2-Wildtypzellen liegt eine erhöhte Konzentration des GFP-Aktin-Fusionsbereichs in den aktiven Zonen vor, wie z. B. an der Kontaktstelle zur Hefezelle und bei der Ausbildung der Pseudopodien.

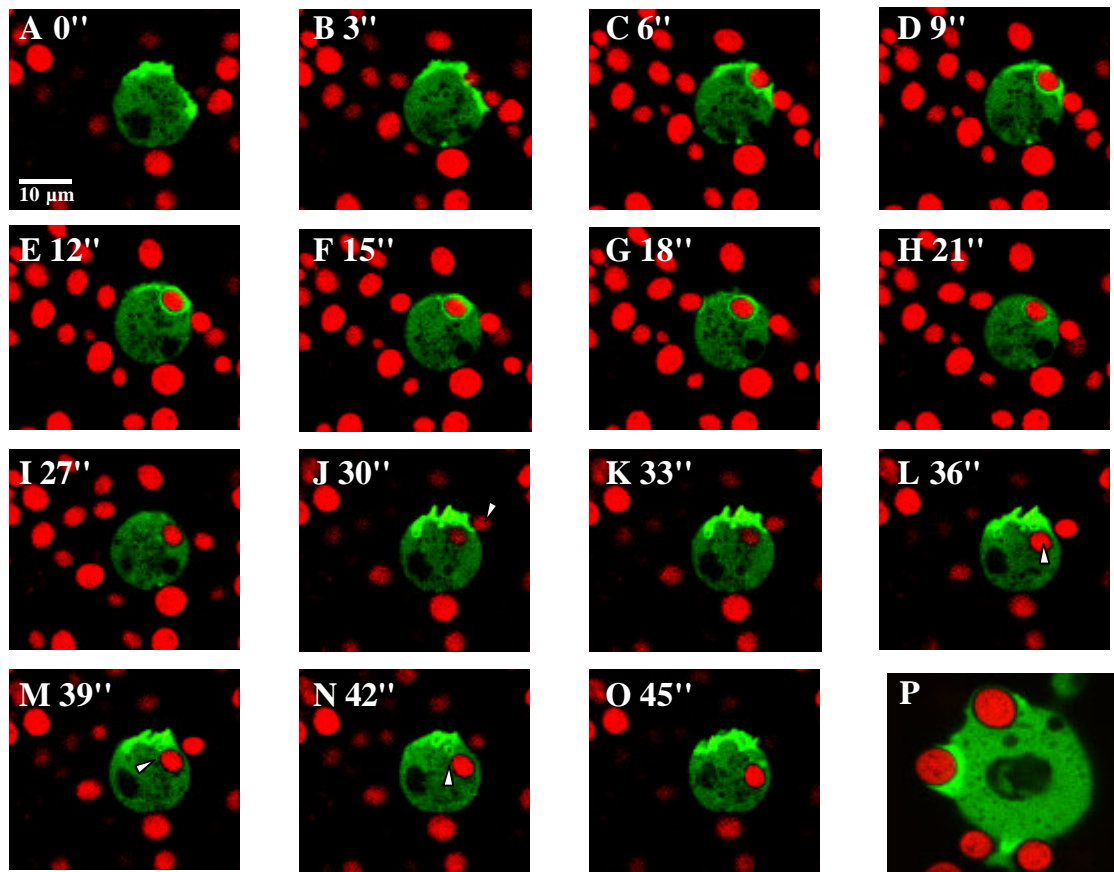


Abb. 23: Phagozytose einer TRITC-markierten Hefezelle und Pinozytose durch eine ein GFP-Aktin-Fusionsprotein exprimierende 1a1-Zelle. Die Bilder sind am konfokalen Mikroskop in Abständen von 3 Sekunden aufgenommen worden. Die Aufzeichnungen A-I geben den Phagozytose- und die Bilder J-O den Pinozytoseprozeß wieder. Die Momentaufnahme P zeigt im Vergleich zu den Bildern A-I die Phagozytose einer Hefezelle durch eine das GFP-Aktin-Fusionsprotein exprimierende AX2-Zelle.

1a1-Mutantenzellen weisen ebenfalls keinen veränderten Ablauf der Pinozytose im Vergleich zum Wildtyp AX2 auf. Auch der Pinozytoseprozeß beginnt mit der Ausbildung von Pseudopodien, die deutlich durch die hohe Konzentration von GFP-Aktin-Fusionsprotein zu erkennen sind (Abb. 23 J-L). Diese Bilder spiegeln zudem die Erhöhung der F-Aktin-Konzentration an der Kontaktseite mit einem Hefeteilchen wider. Die Bilder M und N zeigen, daß nach Ausbildung der Pseudopodien sich diese zu einem Pinosom zusammenschließen. Das Pinosom wandert in das Zellinnere und verliert dann die hohe Konzentration an GFP-Aktin-Fusionsprotein an seiner Membran (Abb. 23 N-O).

2.1.2.6.2. Biochemische Analyse der Comitin-Lokalisation

Zur Untersuchung der von den anti-Comitin-Antikörpern erkannten Kompartimente wurden phagozytotische Membranen isoliert, die sich durch eine relativ leichte Methode anreichern lassen. Dazu wurden AX2-Zellen mit magnetischen Eisenkügelchen für zehn Minuten inkubiert und anschließend schnell abgekühlt, um den Phagozytoseprozeß zu unterbrechen. Nach dem Öffnen der Zellen wurden die membranumhüllten Eisenkügelchen mit einem Dauermagneten aus dem Gesamthomogenat extrahiert und durch mehrmaliges Waschen gereinigt. Die angereicherte Plasmamembran wurde mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem anti-Comitin-Antikörper 190-68-1, dem anti-Aktin-Antikörper Act-1-7 und dem anti- α -Aktinin-Antikörper 47-60-8 im Vergleich zum Resthomogenat und Gesamtextrakt analysiert. In Abbildung 24 sind isolierte Phagosomen aus AX2 (Spur C) gegen gleiche Mengen Gesamtzellhomogenat (Spur A) und des Resthomogenats nach der magnetischen Isolation (Spur B) aufgetragen.

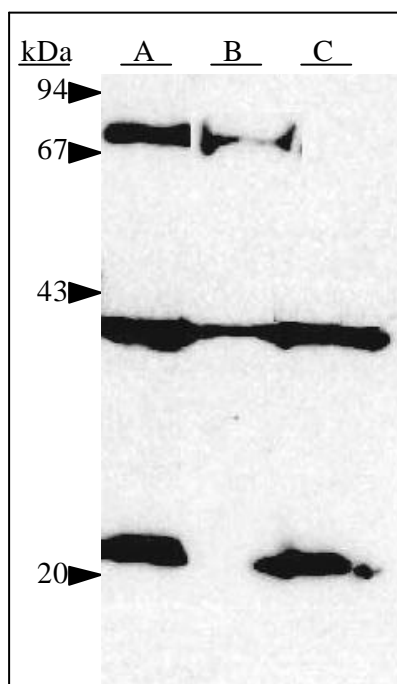


Abb. 24: Western-Blot-Analyse der isolierten Phagosomenmembran aus *D. discoideum*-Wildtypzellen. In Spur A ist Gesamtzellhomogenat aus AX2-Zellen, in Spur B Resthomogenat und in Spur C die Phagosomenfraktion aufgetragen. Die Proteinextrakte wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Der Western-Blot wurde mit den monoklonalen Antikörpern Act-1-7 gegen Aktin, 47-60-8 gegen α -Aktinin und 190-68-1 gegen Comitin inkubiert. Zur Detektion des ersten Antikörpers wurde ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper verwendet. Nur im Gesamtzellhomogenat (Spur A) und in der Phagosomenfraktion (Spur C) ist das 24 kDa Protein Comitin nachweisbar.

Comitin ist stark in der Phagosomenfraktion (Spur C) angereichert, während es im Resthomogenat (Spur B) nicht nachweisbar ist. Aktin sollte auf Phagosomen angereichert, α -Aktinin abgereichert vorliegen. Die Inkubation des Western-Blots mit den Antikörpern mAk Act-1-7 für Aktin und mAk 47-60-8 für α -Aktinin bestätigt, daß Aktin in der Phagosomenfraktion (Spur C) deutlich angereichert ist, während α -Aktinin im

Resthomogenat (Spur B), nicht aber in der Phagosomenfraktion (Spur C) gefunden wird (Abb. 24).

2.1.2.6.3. Versuche zum Phagozytoseverhalten am Wildtyp AX2 und an den Comitín-defizienten Mutanten 1a1 und 3a1

Da Comitín in den Phagosomen angereichert ist, wurde vermutet, daß das Protein an der phagozytotischen Aufnahme von Feststoffen in *D. discoideum* beteiligt ist. Ein Ausschalten der Comitín-Expression in *D. discoideum* sollte folglich zu einem Defekt im Phagozytoseprozeß führen. Dies konnte schon für andere Proteine aus *D. discoideum*, die in der Phagosomenmembran nachgewiesen wurden, gezeigt werden. Die Aufnahme von abgetöteten Hefen ist in der Comitín-Minusmutanten um 70% geringer als die Phagozytoserate des Wildtyps [Maniak *et al.*, 1995]. In Myosin-IB-defizienten- [Jung und Hammer, 1990] und Myosin-IK-defizienten-Zellen [Schwarz *et al.*, 2000] liegt eine um 30% reduzierte Phagozytoserate verglichen mit dem Wildtyp vor.

A. v. Krempelhuber beschrieb in seiner Arbeit die phagozytotische Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Bakterien und von fluoreszierenden Latexkügelchen durch den Wildtyp AX2 und die Comitín-defiziente Mutante 1a1. Dabei hat er beobachtet, daß die Aufnahme der Bakterien bei der Mutante um 30% reduziert war, während die Aufnahme von Latexkügelchen nicht beeinträchtigt war [v. Krempelhuber, 1997]. Eine solche „Diskrepanz“ könnte durch unterschiedliche Rezeptoren und Aufnahmemechanismen erklärt werden. Ein ähnliches Verhalten wurde für die α -Aktinin/Filamin-Doppelmutante beobachtet, die kein vermindertes Wachstum auf mit *E. coli*-bewachsenen Agarplatten zeigte, aber in einem quantitativen Versuch doch eine reduzierte Aufnahmefähigkeit von Bakterien aufwies [Rivero *et al.*, 1996].

Hier wurde die phagozytotische Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Hefen durch AX2 und die Comitín-defizienten Mutanten 1a1 und 3a1 untersucht. Nach Anregung mit einer Wellenlänge von 544 nm wurde die Emission bei 574 nm gemessen. Abbildung 25 spiegelt die Ergebnisse für AX2, 1a1 und 3a1 wider.

Die Comitín-defizienten Mutanten 1a1 und 3a1 weisen im Vergleich zum Wildtyp AX2 einen deutlichen Defekt in der Phagozytose TRITC-markierter Hefen auf. Der Unterschied in der Phagozytoserate verringert sich jedoch mit der Zeit. So beträgt die Aufnahmefähigkeit von Hefen für die Comitín-defiziente Mutanten nach 30 Minuten nur durchschnittlich 38% der

Phagozytoserate des Wildtyps. Nach 80 Minuten liegt die Aufnahme rate für die Comitinin-Minusmutanten bei rund 67,5% der Phagozytoserate von AX2 (Abb. 25).

Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß der Phagozytosedefekt auf einer verringerten Fähigkeit zur Hefeaufnahme begründet ist. Nachfolgende Zellreaktionen, die das reife Phagosom betreffen, sind nicht für den gefundenen Phagozytosedefekt verantwortlich.

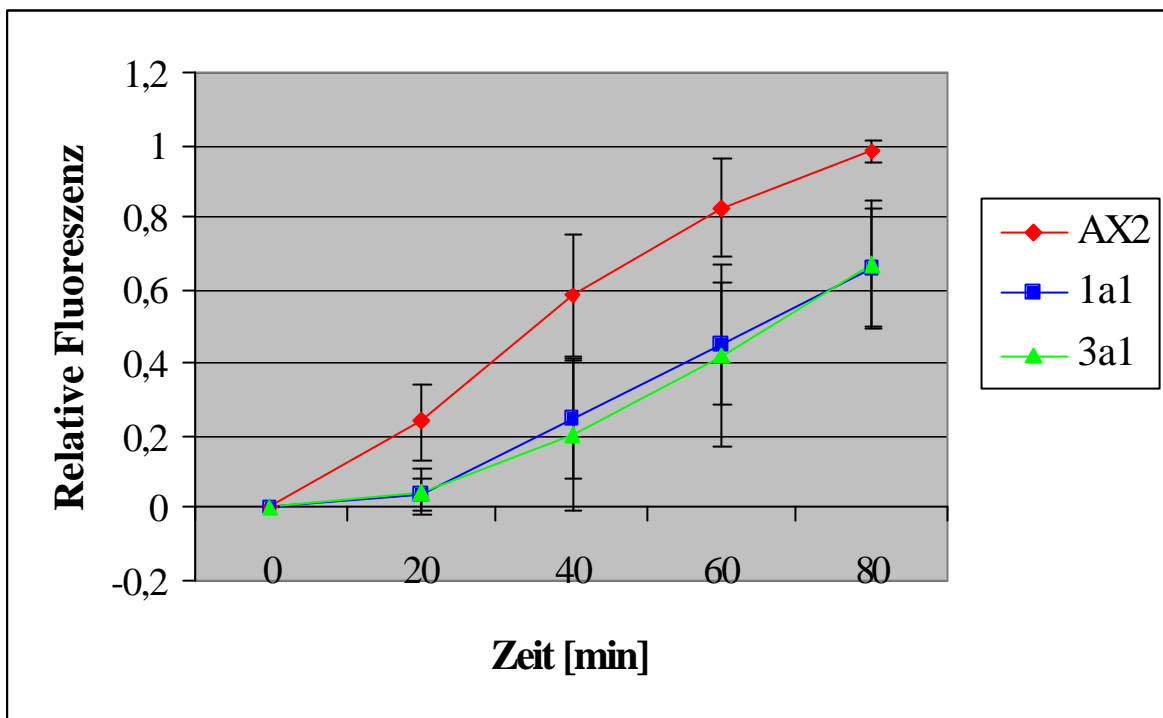


Abb. 25: Diagramm zur Phagozytose von TRITC-markierten Hefen durch *D. discoideum*. TRITC-markierte Hefen wurden mit 2×10^6 *D. discoideum*-Zellen/ml in Soerensen-Phosphat-Puffer inkubiert. Alle zwanzig Minuten wurden Proben entnommen und mit Trypan Blau-Lösung versetzt, um die Fluoreszenz nicht phagozytierter Hefen zu quenchen. Nach Entfernen der Quenchlösung wurden die Zellen erneut in Soerensen-Phosphat-Puffer suspendiert und die Fluoreszenz bei 574 nm gemessen. Die Daten stellen Durchschnittswerte aus drei Versuchsdurchführungen dar.

Zur Untermauerung dieses Ergebnisses sind in weiteren drei Versuchen die Anzahl der aufgenommenen Hefen pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit in AX2 und 1a1 am Mikroskop ausgezählt worden.

Abbildung 26 läßt deutlich erkennen, daß die durchschnittlich phagozytierte Hefezahl mit rund 0,79 Hefen/Zelle in AX2 zu Beginn des Experimentes (zehn Minuten) deutlich höher ist als in 1a1-Zellen (0,37 Hefen/Zelle). Nach sechzig Minuten zeigen beide *D. discoideum*-Stämme ein ähnliches Gleichgewichtsniveau von aufgenommenen Hefen. Dies verdeutlicht auch eine Aufschlüsselung des Quotienten Anzahl Hefen/Anzahl Zellen in die Zahl der aufgenommenen Hefen pro Zelle (Abb. 27A-C).

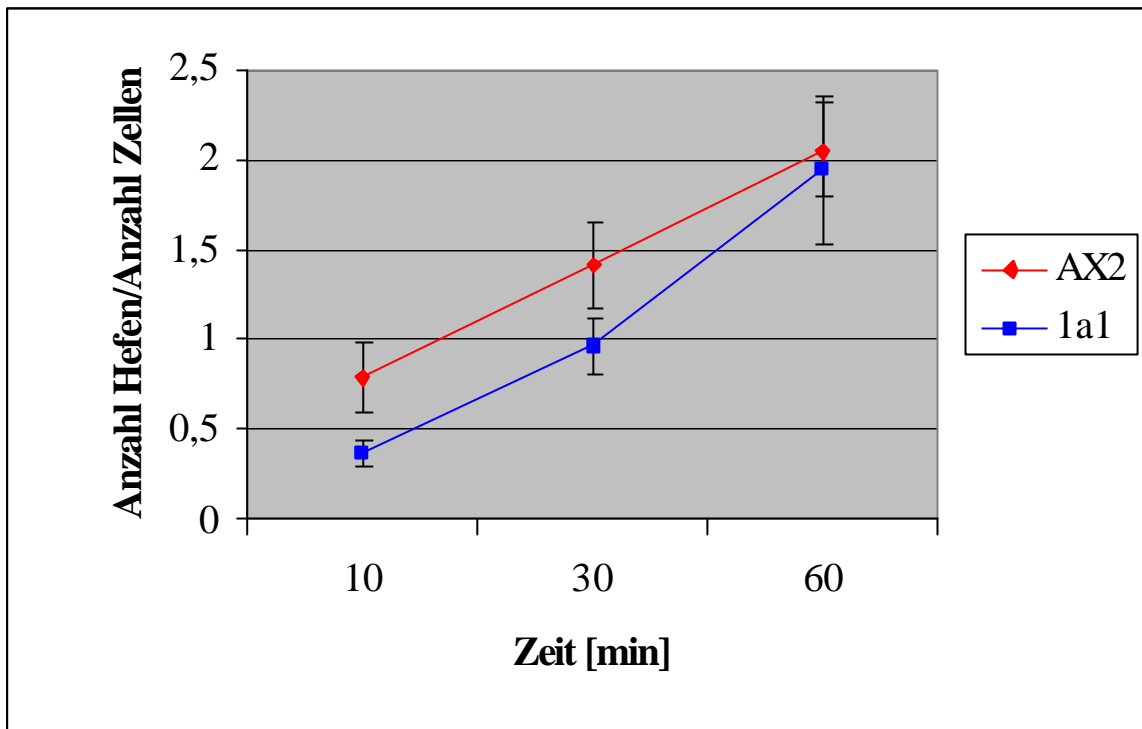


Abb. 26: Phagozytose von TRITC-markierten Hefen durch AX2-Wildtyp- und 1a1-Mutantenzellen, aufgetragen in Anzahl Hefen/Anzahl Zellen gegen die Zeit [min]. *D. discoideum*-Zellen wurden für 10, 30 und 60 Minuten in Soerensen-Phosphat-Puffer mit TRITC-markierten Hefen inkubiert. Nach Methanolfixierung wurde die Anzahl der aufgenommenen Hefen pro Zelle am Mikroskop bestimmt. Für jeden Zeitpunkt und Stamm wurden insgesamt zwischen 950 und 1300 Zellen ausgewertet. Die Daten stellen Durchschnittswerte aus drei Versuchsdurchführungen dar.

Auffällig in Abbildung 27A ist die hohe Zahl von 1a1-Zellen (71,3%), die nach zehn Minuten noch keine Hefezelle aufgenommen haben, im Vergleich zum Wildtyp AX2 (52,3%). Entsprechend größer ist die Anzahl derjenigen AX2-Zellen, die eine, zwei, drei oder mehr Hefen phagozytiert haben.

Nach dreißig Minuten (Abb. 27B) beträgt der Unterschied zwischen den 1a1- und AX2-Zellen, die noch keine Hefezelle phagozytiert haben, nur noch rund 14% im Gegensatz zu rund 19% nach zehn Minuten (Abb. 27A). Die Zahl der Comitín-Minusmutanten mit einer Hefezelle liegt nun auf gleichem Niveau mit derjenigen des Wildtyps. Unterschiede zeigen sich jedoch bei der erfolgten Aufnahme von zwei, drei und mehr Hefezellen. 20,9% der AX2-Zellen haben zwei Hefezellen und 17,7% drei und mehr Hefen aufgenommen. Die prozentualen Anteile liegen für die Comitín-defiziente Mutante mit 14,6% für zwei und mit 9% für drei und mehr phagozytierte Hefen deutlich niedriger. Der auffällige Unterschied von 12,4% zwischen den AX2- und 1a1-Zellen, die eine Hefezelle nach zehn Minuten phagozytieren konnten, hat sich zum Zeitpunkt dreißig Minuten auf die Anzahl von *D. discoideum*-Zellen mit zwei, drei und mehr Hefezellen verschoben (Abb. 27B).

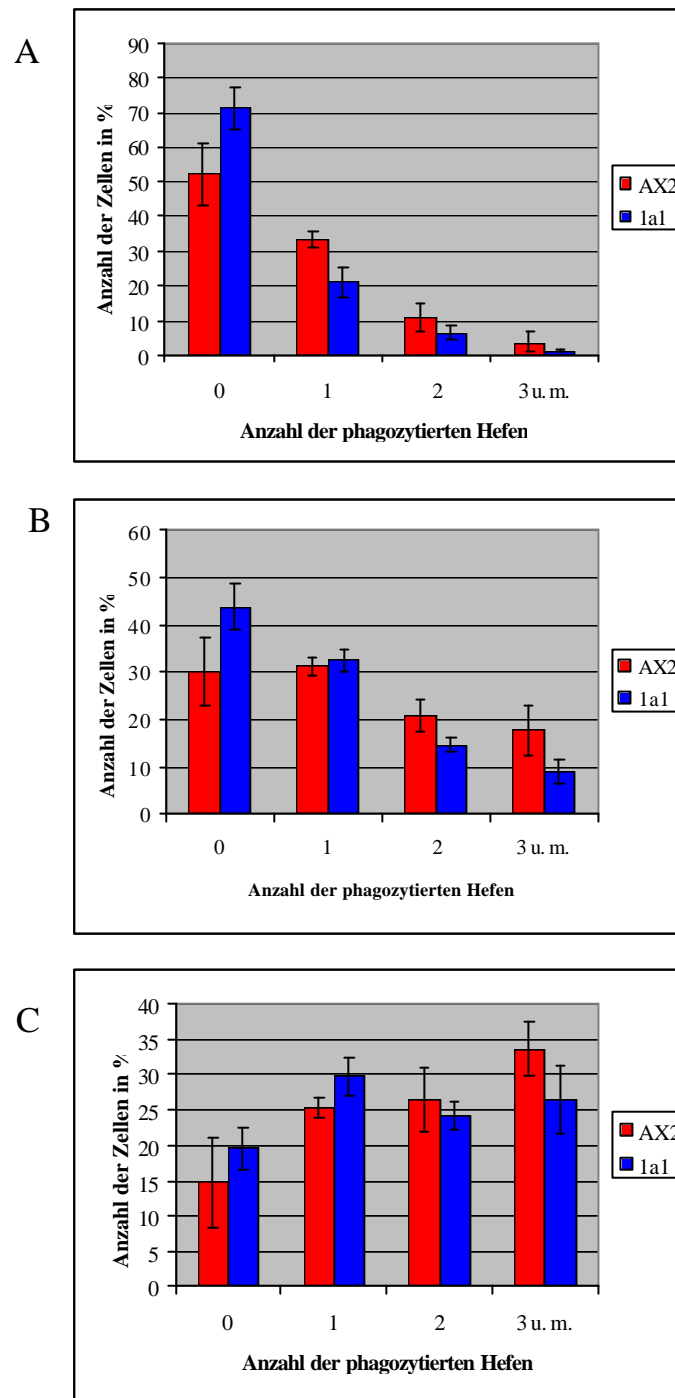


Abb. 27: Anzahl phagozytierter Hefen durch AX2 und 1a1 zu verschiedenen Zeitpunkten, aufgetragen in Anzahl Zellen in % gegen Anzahl der aufgenommenen Hefen. Das Experiment wurde, wie in Abbildung 26 beschrieben, durchgeführt. Die Daten repräsentieren Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Versuchen. A: 10 Minuten, B: 30 Minuten, C: 60 Minuten.

Die Prozentzahl der *D. discoideum*-Zellen ohne Hefe nach sechzig Minuten (Abb. 27C) hat sowohl beim Wildtyp als auch bei der Comitín-Minusmutante weiter abgenommen. Der prozentuale Anteil derjenigen Zellen mit zwei, drei und mehr Hefen hat für beide Zelltypen im Vergleich zum Zeitpunkt dreißig Minuten nach sechzig Minuten deutlich zugenommen. Der prozentuale Anteil an AX2- und 1a1-Zellen mit nur einer Hefe, sinkt unter 30%. Im Rahmen der Fehlertoleranz läßt sich nach sechzig Minuten kein auffallender Unterschied zwischen dem Wildtyp AX2 und der Comitín-defizienten Mutante 1a1 in Bezug auf die Anzahl aufgenommener Hefen feststellen.

Die Comitín-Minusmutante besitzt nach diesen Experimenten einen Phagozytosedefekt, der sich in einer verringerten Aufnahmerate der aufzunehmenden Partikel äußert. Zelluläre Vorgänge, die das reife Phagosom betreffen, können als Ursache für die verminderte Phagozytoseleistung der Comitín-defizienten Mutante ausgeschlossen werden.

2.2. Bestimmung von Interaktionspartnern des Comitins mit dem „Two-Hybrid“-System

2.2.1. „Two-Hybrid“-cDNA-Bank-Durchmusterung

Das Hefe-„Two-Hybrid“-System ist mittlerweile eine anerkannte und sehr erfolgreiche Methode zur Untersuchung und Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen [Bartel *et al.*, 1993a, 1993b; Chien *et al.*, 1991; Fields, 1993; Fields und Sternglanz, 1994; Luban und Goff, 1995; Fritz und Green, 1992; Guarente, 1993]. Sein Erfolg beruht auf der Möglichkeit, Interaktionen zwischen bekannten Proteinen zu testen und auf seinem Potential neue Wechselwirkungspartner eines Proteins durch cDNA-Bank-Durchmusterung zu finden.

Grundlage für diese Methode sind zwei Plasmide, die die durch sie kodierten zwei Fusionsproteine simultan in *Saccharomyces cerevisiae* exprimieren, so daß die DNA-bindende Domäne und die Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors physikalisch getrennt vorliegen. Das pAS2-Plasmid kodiert für die ersten 147 Aminosäuren der DNA-bindenden Domäne des Gal4-Transkriptionsfaktors [Harper *et al.*, 1993]. Dieser Teilbereich des Gal4-Transkriptionsfaktors wird mit dem N-Terminus des zu untersuchenden Proteins verknüpft. Das pACT2-Plasmid [Durfee *et al.*, 1993] kodiert für die Aminosäuren 768 bis 881 der Gal4-Aktivierungsdomäne [Keegan *et al.*, 1986; Hope und Struhl, 1986; Ma und Ptashne, 1987]. Die cDNA des potentiellen Bindungspartners wird über sein 5'-Ende mit diesem Nukleotidsequenzbereich der Gal4-Aktivierungsdomäne verknüpft. Zur Anwendung des „Two-Hybrid“-Systems werden die zwei Plasmide in Hefestämme transformiert, deren His3- und LacZ-Reportergene unter der Kontrolle der stromaufwärts liegenden Gal-Aktivierungssequenz stehen. Die in den pAS2- und pACT2-Plasmiden räumlich getrennten Gal4-Domänen sind nach ihrer Expression bei fehlender Interaktion der Fusionsproteine nicht in der Lage, die Transkription der His3- und LacZ-Reportergene einzuleiten [Ma und Ptashne, 1988; Brent und Ptashne, 1985]. Die Interaktion kann aber durch die in den Plasmiden kodierten Proteine hergestellt werden. Dazu müssen die Fusionsproteine zunächst in den Zellkern wandern und im Falle einer Interaktion wird ein funktionierender Komplex des Gal4-Transkriptionsfaktors gebildet [McGregor *et al.*, 1990; Silver *et al.*, 1984; Chien *et al.*, 1991]. Dadurch kann nun die Transkription der Reportergene gestartet werden, so daß die Hefekclone nun auf Histidin-freiem Selektionsmedium wachsen können. Die LacZ-Expression, die unter der Kontrolle des Gal1-Promotors steht, läßt sich anhand der β -Galaktosidase-Aktivität aufzeigen (Abb. 28).

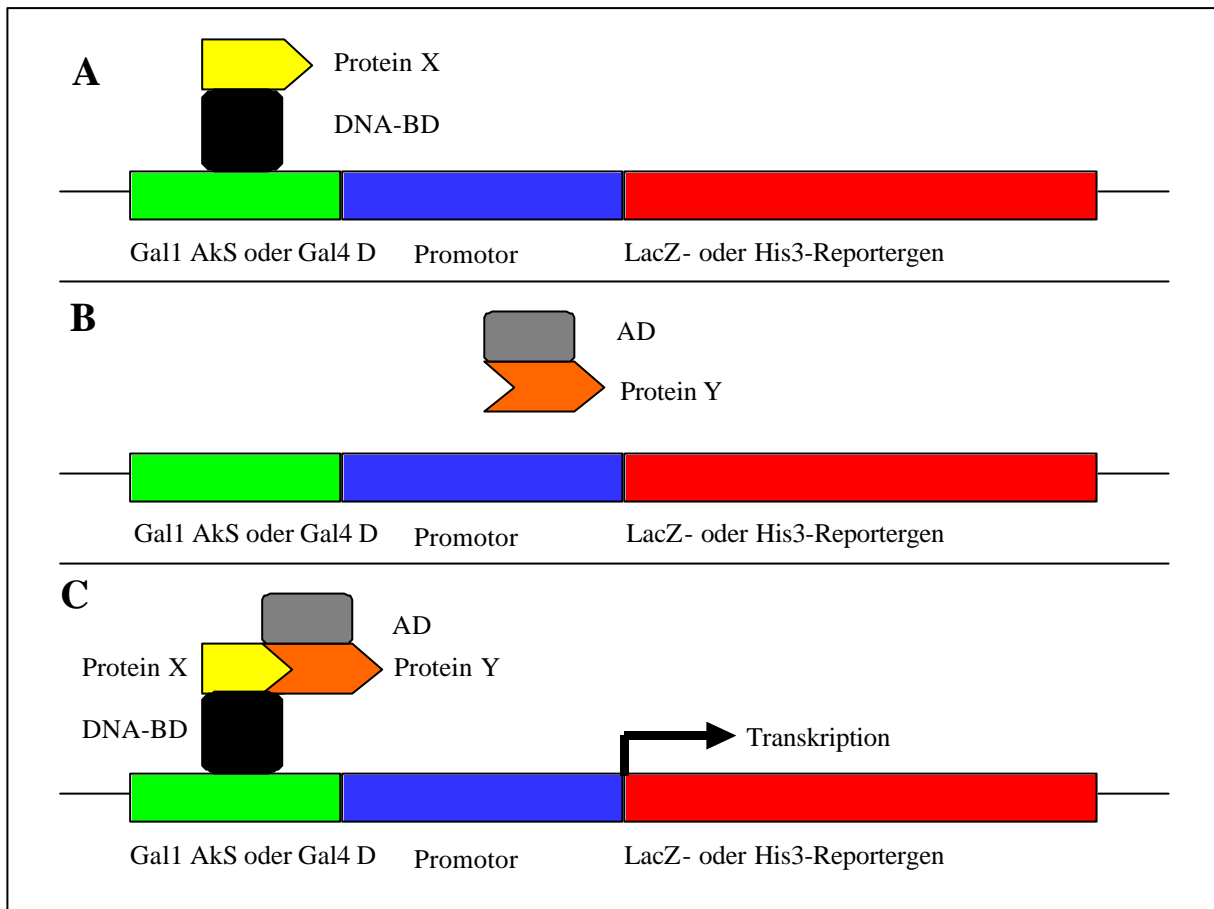


Abb. 28: Schematische Darstellung des „Two-Hybrid“-Systems. A: Das Hybrid aus Gal4 DNA-Bindungsdomäne (BD) und dem Protein X bindet an die Gal1-Aktivierungssequenz (AkS) oder an die Gal4-17mer-Domäne (Gal4 D). Die Transkription kann aber nicht ohne die Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) beginnen. B: Das Hybrid aus der Gal4-Aktivierungsdomäne und Protein Y ist nicht an der Gal1-Aktivierungssequenz oder an der Gal4-17mer-Domäne lokalisiert. Die Transkription des LacZ- oder His3-Reporter gens kann nicht beginnen. C: Die *in-vivo*-Interaktion der beiden „Two-Hybrid“-Proteine X und Y stellt die Gal4-Funktion wieder her. Das LacZ- oder His3-Reporter gen kann exprimiert werden.

Der Ablauf der Durchmusterung einer „Two-Hybrid“-cDNA-Bank besteht aus einer mehrfachen Selektion der Hefeklonen, die eine positive Interaktion der Fusionsproteine aus Gal4-DNA-bindender Domäne und Comitin und Gal4-transkriptionsaktivierender Domäne und cDNA-Fragment über die Selektionsmarker His⁺ und LacZ anzeigen. Der ersten His⁺-Selektion folgen zwei weitere His⁺- und LacZ-Analysen. Daran schließt sich die Cycloheximidselektion an, bei der Hefezellen erhalten werden, die nur noch das pACT2/cDNA-Fragment-Plasmid enthalten [Harper *et al.*, 1993]. Nach der Cycloheximidselektion wird aus den Cycloheximid-resistenten-Hefeklonen das jeweilige pACT2-Plasmid isoliert. Um die Interaktion zu überprüfen und falsche positive Klone auszuschließen, werden pACT2 und Comitin retransformiert und einer erneuten LacZ-Analyse unterzogen. Zur Negativkontrolle werden die pACT2-Plasmide der Cycloheximid-resistenten-Klone mit pAS2/Filamin in Y190-Hefezellen transformiert und mit einem β -Galaktosidase-Test auf LacZ-Aktivität kontrolliert. Das pAS2/Filamin-Plasmid wurde für die Negativkontrolle

ausgewählt, da bisherige Untersuchungen keinerlei Hinweise auf eine Interaktion gegeben haben.

2.2.1.1. Einfluß der Gal4BD/Comitin-Expression auf das Wachstum der Hefezellen

Um den Versuch unter optimalen Bedingungen durchführen zu können, wurde zuerst der Einfluß der Gal4BD/Comitin-Expression auf das Wachstum von Y190-Hefezellen untersucht. Dabei wurde das Wachstum der Hefekulturen in einem Zeitraum von 6,5 Stunden über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) verfolgt. Sollte sich ein verändertes Wachstumsverhalten zeigen, so muß dieses in den folgenden Selektionsschritten der „Two Hybrid“-Durchmusterung berücksichtigt werden.

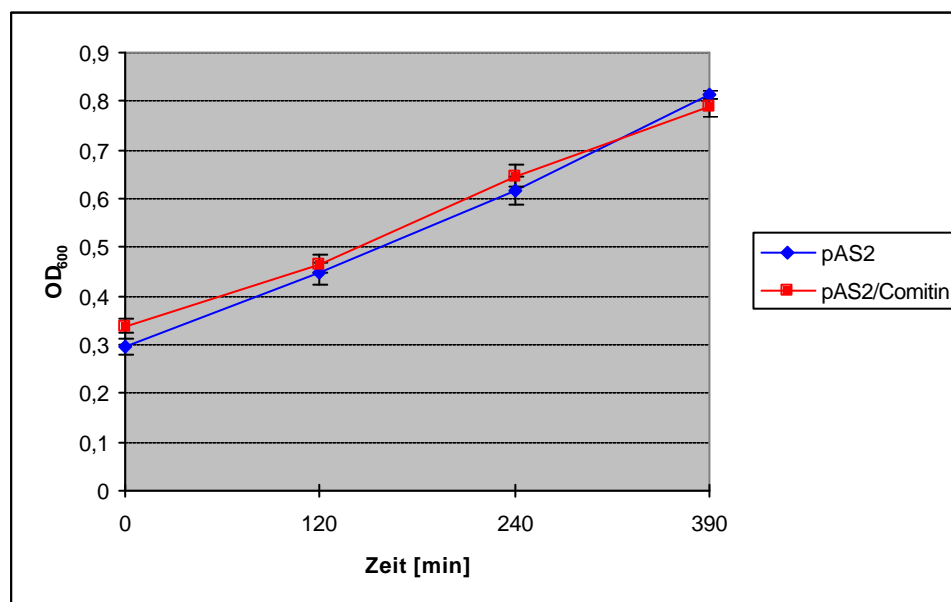


Abb. 29: Wachstumskurve von Y190-Hefezellen mit pAS2- oder pAS2/Comitin bei 30°C.

Die Y190-Hefezellen mit leerem pAS2-Plasmid besitzen eine ähnliche Wachstumsrate wie Hefezellen, die das Gal4BD-Comitin-Fusionsprotein enthalten (Abb. 29). Folglich beeinflusst die Gal4BD/Comitin-Expression nicht das Wachstumsverhalten der Hefezellen.

2.2.1.2. Beschreibung der *D. discoideum*-Phagenbibliotheken und ihre Konvertierung in cDNA-Banken

Die für die „Two-Hybrid“-Durchmusterung verwendeten drei *D. discoideum*-cDNA-Banken, stammen aus Phagenbibliotheken, die von A. Kuspa zur Verfügung gestellt worden sind. Es existieren neben der entwicklungsspezifischen Phagenbibliothek noch zwei separate vegetative Phagenbibliotheken, die sich in ihrer Fragmentgröße unterscheiden. Ihre Eigenschaften beschreibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Phagenbibliotheken

Phagenbibliothek	Fragmentgröße	Anzahl Klone
1. vegetative	1,0 – 1,6 kB	$2,8 \times 10^7$
2. vegetative	1,6 – 5,0 kB	$8,0 \times 10^6$
entwicklungsspezifische	1,3 – 5,0 kB	$1,1 \times 10^7$

Die Bestimmung des Phagentiters ergab für die erste vegetative Phagenbibliothek 6×10^8 Pfu/ml, für die zweite vegetative Phagenbibliothek $9,2 \times 10^8$ Pfu/ml und für die entwicklungsspezifische Phagenbibliothek $1,1 \times 10^8$ Pfu/ml. Die entwicklungsspezifische Phagenbibliothek wurde aufgrund des niedrigen Phagentiters mit 2×10^6 Phagen amplifiziert. Nach der Amplifikation ergab sich ein Phagentiter von $3,6 \times 10^9$ Pfu/ml. Zur Konvertierung der Phagenbibliotheken in cDNA-Banken sind für die vegetativen Phagenbibliotheken 1×10^8 Phagen und für die Entwicklungs-Phagenbibliothek 1×10^9 Phagen eingesetzt worden. Anschließend erfolgte die Isolierung der pACT2-Plasmide aus dem *E. coli*-Stamm BNN132.

2.2.1.3. Sequentielle Transformation von Y190-Hefezellen mit Plasmid-DNA

Kompetente Y190-Hefezellen wurden mit pAS2/Comitin transformiert und auf eine autokatalytische Aktivierung der LacZ-Reportergene in einem β -Galaktosidase-Test untersucht. Hefezellen, bei denen das LacZ-Reportergen aktiviert ist, färben sich nach Inkubation bei 30°C durch Spaltung des 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Galaktosepyranosids blau. In diesem Test zeigten die Zellen mit pAS2/Comitin keine Blaufärbung auf. Eine Autoaktivierung der LacZ-Reportergene durch das exprimierte Gal4BD/Comitin-Fusionsprotein fand nicht statt, so daß diese Zellen für die cDNA-Bank-Durchmusterung benutzt werden können. Kompetente Hefezellen mit pAS2/Comitin wurden mit der pACT2/cDNA-Bank nach dem „large-scale“-Protokoll der Clontech Anweisung transformiert.

Für jede cDNA-Bank ergibt sich bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten Plasmid-DNA die in Tabelle 2 gezeigte Gesamtzahl der in der jeweiligen „Two-Hybrid“-Durchmusterung untersuchten Klone:

Tabelle 2: Anzahl der in der „Two-Hybrid“-Durchmusterung untersuchten Klone

cDNA-Bank	Anzahl der durchmusterter Klone
1. vegetative	$1,0 \times 10^5$
2. vegetative	$8,3 \times 10^4$
entwicklungsspezifische	$2,0 \times 10^5$

2.2.1.4. His⁺-Selektion der transformierten Hefezellen

Insgesamt wurden 1176 His⁺-Kolonien, die ein deutlich stärkeres Wachstum als der Durchschnitt der gewachsenen Klone aufwiesen, weiter analysiert. Eine Aufschlüsselung für die einzelnen cDNA-Banken zeigt Tabelle 3:

Tabelle 3: Anzahl der untersuchten Klone nach His⁺-Selektion

cDNA-Bank	Anzahl der untersuchten Klone
1. vegetative	357
2. vegetative	454
entwicklungsspezifische	365

2.2.1.5. b-Galaktosidase-Tests der His⁺-Hefekolonien

Mit den His⁺-Hefeklonen wurden β -Galaktosidase-Filter-Tests durchgeführt. Diejenigen Hefekolonien, die eine Aktivierung der LacZ-Reportergene durch die von der β -Galaktosidase katalysierte Blaufärbung aufwiesen, wurden in einem zweiten β -Galaktosidase-Test erneut untersucht. Danach wurden aus allen drei cDNA-Banken 106 stark, 32 mittel und 63 schwach blau gefärbte LacZ⁺-Kolonien ermittelt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Aufstellung über die His⁺/LacZ⁺-Klone nach den ersten zwei b-Galaktosidase-Tests

cDNA-Bank:	1. vegetative	2. vegetative	entwicklungsspezifische
Starke Blaufärbung	20 Klone	28 Klone	58 Klone
Mittlere Blaufärbung	18 Klone	5 Klone	9 Klone
Schwache Blaufärbung	35 Klone	16 Klone	12 Klone
Summe der His ⁺ /LacZ ⁺ -Klone	73	49	79

2.2.1.6. Cycloheximidselektion

Die His⁺- und LacZ⁺-Hefeklonen verlieren durch die Cycloheximidselektion spontan pAS2/Comitin und enthalten nur noch pACT2/cDNA-Fragment. Die Grundlage dieser Selektion ist der Befund, daß der ursprünglich Cycloheximid-resistente Hefestamm Y190 durch pAS2 Cycloheximid-sensitiv wird. Das pAS2-Plasmid besitzt das Wildtyp-Gen CYH^{S2} für Cycloheximidsensitivität. Die als Cycloheximid-resistent erkannten Kolonien wurden einem weiteren β -Galaktosidase-Test unterzogen, um autokatalytisch wirkende Hefeklonen von der weiteren Untersuchung auszuschließen. Von insgesamt 201 His⁺- und LacZ⁺-Klonen blieben nach der Cycloheximidselektion und dem anschließenden β -Galaktosidase-Test aus der ersten cDNA-Bank 56 Klone, aus der zweiten vegetativen cDNA-Bank 46 Hefeklonen und aus der entwicklungspezifischen cDNA-Bank 53 Klone übrig. 46 His⁺- und LacZ⁺-Klone wurden nicht weiter analysiert, da sie trotz mehrfacher Wiederholung der Cycloheximidselektion keine Kolonien bildeten.

2.2.1.7. Isolation des pACT2/Fragment-Hefepasmids und Transformation in *E. coli*

Die pACT2-Derivate der Cycloheximid-resistenten Klone wurden aus den Hefezellen isoliert und in die *E. coli*-Stämme DH5 α , JM 109 oder XL1 blue transformiert. Die aus den *E. coli*-Zellen gewonnene amplifizierte Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsverdauung mit dem Enzym BglII und anschließender Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Insgesamt 55 Klone enthielten nur pACT2 ohne Fragment, so daß nur noch 100 Hefeklonen in den weiteren Untersuchungen berücksichtigt wurden.

2.2.1.8. Retransformation der pACT2-Derivate in Y190-Hefezellen

Die pACT2-Plasmide wurden simultan mit pAS2/Comitin in Y190-Hefezellen retransformiert. Für die Negativkontrolle wurde pAS2/Filamin-Plasmid verwendet, um solche falsch positiven Klone zu erkennen, deren pACT2-Derivate einen beliebigen Proteinrest an der Gal4-Bindungsdomäne brauchen, um die Transkription der Reportergene auch ohne Interaktion mit dem zu untersuchenden Protein einzuleiten. Die pACT2-Plasmide, die die Information für potentielle Bindungspartner in sich tragen, führen in Verbindung mit dem pAS2/Comitin-Plasmid zu einer Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test. In Kontrollexperimenten sollten sie mit pAS2/Filamin keine Blaufärbung zeigen. Insgesamt ergaben sieben Klone ein positives Ergebnis. 23 Klone konnten als falsch positive Klone identifiziert werden. In diesen Fällen war der β -Galaktosidase-Test sowohl bei den Transformanten mit

pAS2/Comitin-Plasmid als auch bei denen mit dem pAS2/Filamin-Plasmid positiv. Die restlichen siebzig Klone zeigten auch nach 14 Stunden keine β -Galaktosidase-Aktivität und wurden nicht weiter untersucht.

2.2.1.9. Zusammenfassung der Ergebnisse der „Two-Hybrid“-Durchmusterung

In der nachfolgenden Tabelle 5 sind die Ergebnisse der „Two-Hybrid“-Durchmusterung von Comitin gegen die drei *D. discoideum*-cDNA-Banken zusammengefaßt.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Durchmusterung der „Two-Hybrid“-cDNA-Banken

cDNA-Bank	1. vegetative	2. vegetative	entwickl.-spezifische
Zahl der untersuchten Klone	1,0 x 10 ⁵	8,3 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁵
His ⁺ -Klone	357	454	365
2. β -Gal.-Test (His ⁺ /LacZ ⁺)	73	49	79
Cycloheximidselektion	56	46	53
Retransformation (richtig His ⁺ /LacZ ⁺)	3	4	0

2.2.1.10. Sequenzinformation der potentiellen Bindungspartner

Die Sequenz der Inserts der pACT2-Plasmide wurden mit Hilfe der Oligonukleotide Gal4AD und Rev4AD bestimmt. Bei Fragmenten mit einer Länge von über 1000 Basen sind zusätzlich geeignete Oligonukleotide aus den schon sequenzierten bekannten Sequenzabschnitten zur weiteren Analyse eingesetzt worden. Die Ergebnisse der einzelnen Sequenzierungsreaktionen wurden miteinander kombiniert und sind der Charakterisierung der potentiellen Bindungspartner beigefügt.

2.2.2. Comitín als Bindungspartner

Drei pACT2-Derivate 105-1, 122-1 und 165-4 trugen die Information für Comitín, und Comitín konnte somit als sein eigener Bindungspartner identifiziert werden. Die drei cDNA-Fragmente besitzen kein vollständiges N-terminales Ende, sondern beginnen erst bei der dritten Aminosäure. Der Rest der Sequenz ist vollständig vorhanden. Somit bestätigt die „Two-Hybrid“-Durchmusterung, daß Comitín in der Lage ist, Dimere zu bilden [Jung *et al.*, 1996].

2.2.2.1. Charakterisierung der Dimerisierungsdomäne von Comitín

E. Jung grenzte 1996 die Dimerisierungsdomäne mit Hilfe von Cross-linking-Experimenten mit Comitinteilkonstrukten auf den Aminosäurebereich 90 bis 135 ein. Jedoch konnte aus experimentellen Gründen die Frage nicht geklärt werden, ob auch das C-terminale Ende des Comitíns an der Bildung von Dimeren beteiligt ist.

Das „Two-Hybrid“-System bietet eine weitere Möglichkeit, die Frage der Dimerisierung über den C-Terminus, der durch das GYP(P)Q-Motiv charakterisiert ist, zu klären. Außerdem läßt sich mit dem „Two-Hybrid“-System der schon identifizierte Dimerisierungsbereich (AS 90-135) innerhalb des N-Terminus erneut experimentell überprüfen [Jung *et al.*, 1996].

Für die „Two-Hybrid“-Experimente sind die schon existierenden Comitínkonstrukte verwendet worden [Jung *et al.*, 1996]. Die Konstrukte wurden entweder mit den Enzymen NdeI, EcoRI bzw. ClaI aus dem pT7-7-Vektor geschnitten oder mittels PCR erhalten und in den entsprechenden Zielvektor pAS2 oder pACT2 eingesetzt. Tabelle 6 und Abbildung 30 zeigen eine Übersicht über alle hier verwendeten Konstrukte.

Tabelle 6: Klonierungsstrategie für die einzelnen Konstrukte in den pAS2- und pACT2-Vektor

Konstrukt	Nukleotide	Aminosäuren	Restriktionsenzyme für				Oligonukleotide
			pT7-7	pAS2	pACT2	PCR	
I	1 - 417	1 - 139	NdeI/EcoRI	NdeI/EcoRI	*	*	*
I	1 - 417	1 - 139	*	*	BamHI/SacI	BamHI/SacI	Comv26/Comr417
II	268 - 582	89 - 185	NdeI/ClaI b.e.	NdeI/SmaI	*	*	*
III	392 - 582	124 - 185	*	*	BamHI/SacI	BamHI/SacI	Comv269/Comr592
IV ¹⁾	1 - 582	1 - 185	*	*	BamHI/SacI	BamHI/SacI	Comv26/Comr592
V	431 - 582	136 - 185	NdeI/ClaI b.e.	NdeI/SmaI	*	*	*
V	431 - 582	136 - 185	*	*	NcoI/XhoI	NcoI/XhoI	Comv431/Comr592

Legende: Konstrukte – Bezeichnungen sind der Diplomarbeit von **E. Jung** (1996) entnommen; Nukleotide – entsprechende Nukleotide des Comitíns; Aminosäuren – entsprechende Aminosäuren des Comitíns; Restriktionsenzyme für pT7-7 – verwendete Schnittstellen im pT7-7-Vektor; Restriktionsenzyme für pAS2 – Klonierungsstellen des pAS2-Plasmids; Restriktionsenzyme für pACT2 – Klonierungsstellen des pACT2-Plasmids; Restriktionsenzyme für PCR – über PCR angehängte Schnittstellen; Oligonukleotide – verwendete Oligonukleotide für die PCR; b.e. – glatte Enden; ¹⁾Konstrukt IV bezeichnet das vollständige Comitín.

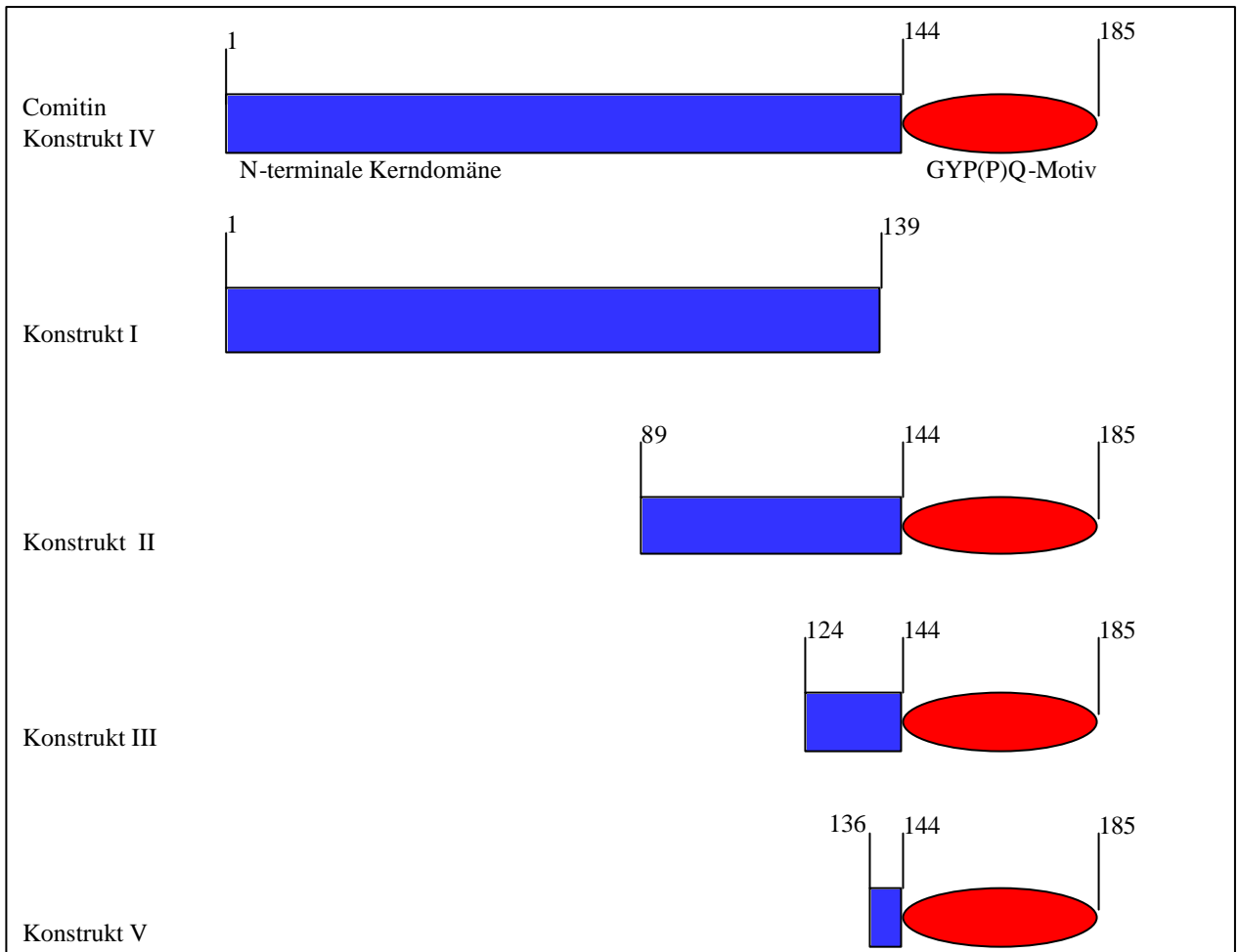


Abb. 30: Schematische Darstellung der im „Two-Hybrid“-Versuch eingesetzten Comitinkonstrukte. Die Zahlen geben die jeweilige Aminosäureposition bezogen auf das N-terminale Methionin von Comitin (Konstrukt IV) wider.

Die erfolgreiche Klonierung aller Comitinkonstrukte in das pAS2- oder das pACT2-Plasmid ist durch Sequenzierung bestätigt worden. Um eine autokatalytische Aktivierung der Gal4-Domänen durch die einzelnen Konstrukte auszuschließen, sind die Vektoren zunächst einzeln in Y190-Zellen transformiert und einem β -Galaktosidase-Test unterzogen worden. Keines der Konstrukte war in den pAS2- oder pACT2-Plasmiden zu einer autokatalytischen Reaktion fähig. Um die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Comitinteilstücken zu untersuchen, wurden die entsprechenden pAS2- und pACT2-Vektoren in Y190-Hefezellen kotransformiert und mögliche Interaktionen in einem sich anschließenden β -Galaktosidase-Test detektiert.

Tabelle 7: Ergebnisse der „Two-Hybrid“-Experimente zur Bestimmung der Dimerisierungsdomäne von Comitin

Plasmid/Konstrukt	pAS2/I	pAS2/II	pAS2/Comitin	pAS2/V	pAS2/Filamin
pACT2/I	++	-	++	-	-
pACT2III	-	-	-	-	-
pACT2/IV ¹⁾	++	-	++	+	-
pACT2/V	++	-	+	+	-

Legende: +/++ Stärke der Blaufärbung; - negativer β -Galaktosidase-Test; ¹⁾Konstrukt IV bezeichnet das Vollängenkonstrukt.

Die Wechselwirkung der N-terminalen Kerndomäne (Konstrukt I) mit sich selbst und mit dem gesamten Comitin ist in ihrer Stärke vergleichbar mit derjenigen der beiden vollständigen Proteine. Die Transformanten mit pAS2/Comitinkonstrukt V und mit pACT2/Comitinkonstrukt V weisen eine etwas schwächere Blaufärbung als andere Konstruktkombinationen im β -Galaktosidase-Test auf. Der C-Terminus (Konstrukt V), der das GYP(P)Q-Motiv enthält, zeigt eine etwas schwächere Interaktionsfähigkeit mit dem vollständigen Comitin. Eine Wechselwirkung zwischen Konstrukt I und Konstrukt V konnte in diesem Versuch nicht festgestellt werden. Im Falle der Comitinkonstrukte II und III wurde keine Interaktion mit irgendeinem Comitinkonstrukt detektiert, obwohl Konstrukt II und III den C-Terminus von Comitin beinhalten. Die Kontrollversuche mit Filamin/pAS2 waren für alle Konstrukte im pACT2-Vektor negativ. Aus den Ergebnissen des „Two-Hybrid“-Experiments kann man schließen, daß Comitin zwei Dimerisierungsbereiche besitzt, die zum einem in der N-terminalen Kerndomäne und zum anderem im GYP(P)Q-Motiv lokalisiert sind (Abb. 31).

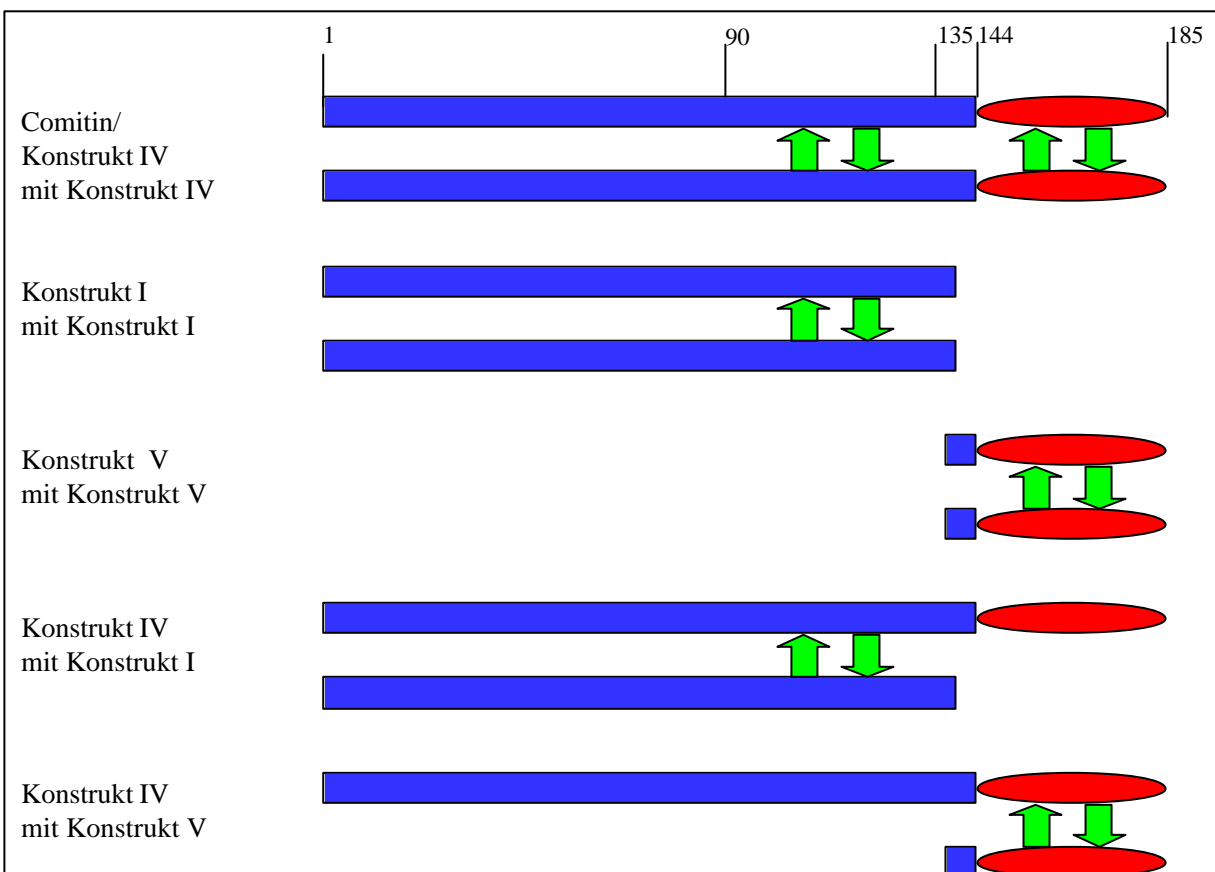


Abb. 31: Schematische Darstellung der mit „Two-Hybrid“-Experimenten gefundenen Dimerisierungsdomänen von Comitin. Die Pfeile geben die jeweilige Dimerisierungsdomäne zweier getesteter Konstrukte an. Der erste Dimerisierungsbereich liegt im N-Terminus zwischen der 90. und 135. Aminosäure. Die zweite Dimerisierungsbereich umfaßt den Aminosäurebereich 136-185. Die Zahlen bezeichnen die jeweilige Aminosäureposition relativ zum Startmethionin.

2.2.3. Der „Two-Hybrid“-Klon 116-1

Das Insert des Klons 116-1 hat eine Länge von 1458 Basenpaaren. Ein Vergleich der Nukleotidsequenz des Klons 116-1 mit der Datenbank des Jenaer *D. discoideum* Genomprojekts zeigt das Vorhandensein von zwei Introns innerhalb der genomischen Sequenz an. Das erste Intron ist 112 Basen lang und beginnt bei der 158. Base der cDNA-Sequenz. Der Anfang des 85 Basenpaare langen, kleineren zweiten Introns befindet sich hinter dem 501. Nukleotid der cDNA-Sequenz (Abb. 32 und 33). Beide Introns bestehen vorwiegend aus den Basen Adenin und Thymin und sind von den typischen Spleißsequenzen 5'-GT... und ...AG-3' flankiert.

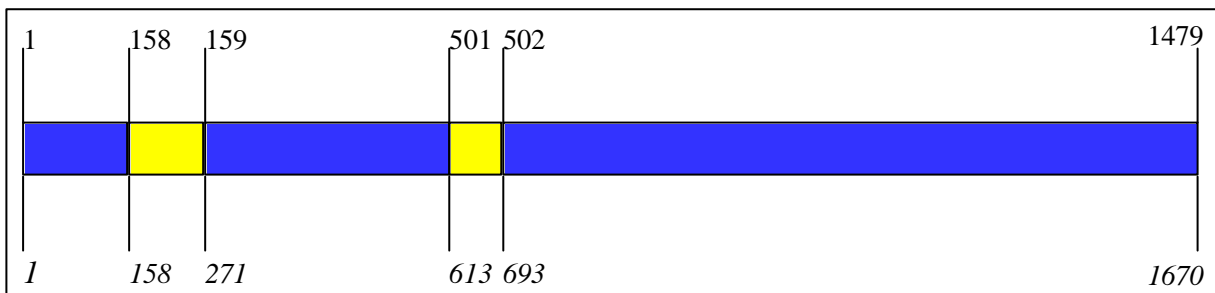


Abb. 32: Schema der genomischen Sequenz des Klons 116-1. Die Zahlen oberhalb des Balkens geben die Nukleotidpositionen relativ zum A des Startcodons ATG für die cDNA-Sequenz wieder. Die kursiv gedruckten Zahlen stellen die Basenpositionen für die genomische Sequenz dar. Die zwei Introns innerhalb der genomischen Sequenz sind gelb unterlegt.

Die Sequenz enthält einen offenen Leserahmen, der für ein Protein (P116-1) von 485 Aminosäuren Länge kodiert. Für dieses Protein gibt es auch eine cDNA-Sequenz aus dem japanischen cDNA-Sequenz-Projekt. Der Vergleich mit dem Klon FC-AC03 des *D. discoideum*-cDNA-Projekts zeigt, daß der translatierten Nukleotidsequenz von Klon 116-1 die ersten sieben Aminosäuren fehlen. Der vollständige ORF kodiert dann für ein Protein von 492 Aminosäuren (Abb. 33) mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 55,8 kDa und einem pI von 9,74 bzw. unter Berücksichtigung aller Cysteinreste 9,65. Das Programm "Pôle Bio-Informatique Lyonnais" berechnet eine Sekundärstruktur mit einem α -Helix-Anteil von 32,3%, β -Schleifen-Anteil von 9,6%, β -Faltblatt-Anteil von 23,6% und einen Anteil von 34,6%, in dem eine ungeordnete Sekundärstruktur vorliegt [Geourjon und Deléage, 1995].

1 *ATG GAA AAT AGA TAC ATT TCC* AGA ATC GAA ACC ATT TCT TCT CAT TTG
 1 *M E N R Y I S* R I E T I S S H L

49 TTA TCA ACA AAT GAT GTC TCC TCA CAA AAT GAA AGT GAA TCA ATT ACC
 17 L S T N D V S S Q N E S E S I T

97 TTT GTA AAA CCA TTA CCA AAG AAT AAA AAA GAT CAC GAC CAG TCC ATC
 33 F V K P L P K N K K D H D Q S I

145 GAA TCC GAT TCA TC *GTATGTTTAA* AAAAAANTAAA ATAAAAAATT NTTTATTAAA
 49 E S D S S

AAAAATTAAT TAATANTAAN CAATAAATAN TTTTACTAAT TATTTTTACA CCANTAAAATA

159 ATAAAAATAAAAGATTT ACA AGA GAA AAA CAA TTT GAA GAA GAA TTA GAT ATT
 54 F T R E K Q F E E E L D I

199 TTA GGA GAG ATT AAT TCA AAG ACA GGT TTA TTT GAA ATT AAA CAA GTA
 67 L G E I N S K T G L F E I K Q V

247 CCA TAT CAA TTA TCA TTT GAT CAA GGA TTT TTT CAT GCA TGT AGG GCA
 83 P Y Q L S F D Q G F F H A C R A

295 ATT GAA ATA TTA ACA GAA AAA GAT CCA AAA AGA ATT ATA TGT TTA GGT
 99 I E I L T E K D P K R I I C L G

343 ATT GCT GGC CCA GTT GGT GCT GGA AAA ACA ACA TTA GCT AAT AAA ATC
 115 I A G P V G A G K T T L A N K I

391 GGT AGT CTT GTT AAT GGT GTT ATA ATT TCA CTT CAA GAT TTC GTT AAA
 131 G S L V N G V I I S L Q D F V K

439 CTT GAA AAT GTT AAA GAT AAT AAT TAT GAT GAT CCT GTA TTA ATT GAT
 147 L E N V K D N N Y D D P V L I D

487 TTT GAT AAA GTT ATT *GTAAGNTTTT* TTTTTTTTTT TTTTAAAAAT AAATAATAATAA
 163 F D K V I

502 TAATAAAT TTTATAAAAATTATTAATTA TTTAAATNAATTAGTCA ACA TTA AAT GAA TTA
 168 S T L N E L

520 AAA GAA AAT AAA ACA GTT ATA ATT CCA AAG ATT GTA AAT AGA AAG ATG
 174 K E N K T V I I P K I V N R K M

568 GAA AGT AGA AGT ATA TCA TTA TCA ACA TCA AAA GTT ATT ATA TTA GAG
 190 E S R S I S L S T S K V I I L E

616 GGT GCA TAT GCA TTG AGT GCA CGT ATT AGA CCA CTA TTG GAT ATT AGT
 206 G A Y A L S A R I R P L L D I S

664 GTT GCA ATTACA GGT GGT GTA CAT TTG GAT CTA ATA AAG AGT ATA ATG
 222 V A I T G G V H L D L I K S I M

712 AGA GGT ATT GTT ACG AGT GGT AAG AAT TCA AGT AAG GAT GTA TTG GCA
 238 R G I V T S G K N S S K D V L A

```

760 CAA ATT ACC AAT GTT GTA TTT CCA ATG TTT AAA GCA TTT GTT GAA CCA
254 Q I T N V V F P M F K A F V E P

808 GAT TTA GAT CAA GCA AAG ATT AAA ATT CAT AGT AGT TTC AAT CCA ATG
270 D L D Q A K I K I H S S F N P M

856 AGT CAA GTG GTT GAA CCA GTT TAC GTT TGT AAA GCC AAA TAC GAT AAT
286 S Q V V E P V Y V C K A K Y D N

904 AAT AAA CAG TTT TTC GAT CAA TTC CTC TCA TCA CTC AAT GTT GTA CCA
302 N K Q F F D Q F L S S L N V V P

952 GTT AAA AAG AAC TTT AGC GAT ATG TAT CTC TAT CCA CCA AAA TAT GGT
318 V K K N F S D M Y L Y P P K Y G

1000 GTC GAT GGT ATC TCT CAA GCC GAT AAA AGA AAT TGG ATT AGA ATT CGT
334 V D G I S Q A D K R N W I R I R

1048 CGT TCT GAG CAT GGT CAA TTC AAT ATC ACC TTC TAC AAT GAA ATG ATG
350 R S E H G Q F N I T F Y N E M M

1096 GAT GGT GCC GTC AAT ACT CGT CCA TCT TTA AAT TTC GAA ATC TCT GTC
366 D G A V N T R P S L N F E I S V

1144 AAA ACT TTG GGT GGT CTA CTC TCT TTA GGT TAT CAA ATT GGT GCT ATC
382 K T L G G L L S L G Y Q I G A I

1192 CTC AAT CGT ACC GTT GAG GTT TGG TAT GAT AAA AAT GGT GTT GTC ATC
398 L N R T V E V W Y D K N G V V I

1240 ACT AAA GAA TAT ATC AAA GAA TTG GAG AAA CAT TTC ATT CAA ATT AAA
414 T K E Y I K E L E K H F I Q I K

1288 GGT CAC TCT CGT AGA GAA GTA TTA GAT AGT GCT GAA AAA TTA AAA ATC
430 G H S R R E V L D S A E K L K I

1336 ACT GGT AAT CAT GTC CCT CAA ACT TTT CTT TAT CTT TAT TTT AAA AAA
446 T G N H V P Q T F L Y L Y F K K

1384 TTA AAA AAA AGT AAA AAT CCA AAT TAT TCA AAA TTA AAA CCA AAT AAT
462 L K K S K N P N Y S K L K P N N

1432 ACA AAT TCA AAA ATT TTA AAA AAT AAT AAA GAT AAA AAA AAT TTA TAA
478 T N S K I L K N N K D K K N L *

```

Abb. 33: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Proteins P116-1. Die kodierende Nukleotidsequenz ist in der oberen Reihe wiedergegeben; die Intronsequenzen sind kursiv dargestellt. Die Aminosäuresequenz sowie das Start- und Stopcodon wurden durch Fettdruck hervor-gehoben. Die nicht im „Two-Hybrid“-Klon 116-1 kodierten Aminosäuren sind kursiv und rot gedruckt. Die einfach gedruckten Zahlen am linken Rand geben die Position der Basen der kodierenden Nukleotidsequenz relativ zum A des Startcodons ATG wieder. Die durch Fett- und Kursivdruck hervorgehobenen Zahlen am linken Rand bezeichnen die Aminosäureposition relativ zum Startmethionin.

Computer unterstützte Datenbank-Durchsuchungen mit dem Programm „Advanced Blast Search“ zeigen, daß das Protein P116-1 die höchsten Homologien zu Uridinkinasen anderer Organismen hat. Die Homologie auf Aminosäureebene zwischen dem Protein P116-1 und Uridinkinasen aus anderen Organismen wird in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tabelle 8: Übersicht über identische und homologe Aminosäureanteile zwischen Uridinkinasen aus anderen Organismen und dem Protein P116-1

Organismus	Zugriffsnummer	<i>D. discoideum</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<i>S. pombe</i>	AL023860	15,6% / 32,0%	38,1% / 75,1%	37,4% / 74,2%
<i>D. melanogaster</i>	AAF57871.1	11,2% / 42,5%	51,3% / 74,1%	*
<i>H. sapiens</i>	AK000524	13,3% / 40,0%	*	*

Die erste Prozentangabe steht für identische Aminosäuren, während durch die zweite Zahl der Anteil homologer Aminosäuren beschrieben wird. Der Begriff „homologe“ Aminosäuren steht für die Summe aus identischen und ähnlichen Aminosäuren. Die Prozentangaben beziehen sich immer auf die gesamte Aminosäuresequenz der Uridinkinase des links stehenden Organismus. Die Zugriffsnummer bezeichnet den Code der Sequenz im Computerprogramm „Advanced Blast Search.“ *S. pombe* steht für *Schizosaccharomyces pombe*, *D. melanogaster* für *Drosophila melanogaster* und *H. sapiens* für *Homo sapiens*.

Der Vergleich zwischen dem Protein P116-1 und den Uridinkinasen aus anderen Organismen liefert zwischen 11,2 bis 15,6% identische und zwischen 32 bis 42,5% homologe Aminosäuren (Abb. 34). Allerdings sind die bekannten Uridinkinasen untereinander stärker konserviert. Der Anteil identischer Aminosäuren liegt zwischen 37,4 und 51,3%. Rund 74% aller Aminosäuren sind homolog zueinander. Trotz der nur geringen Zahl identischer und homologer Aminosäuren zwischen den Uridinkinasen und dem Protein P116-1 zeichnet sich der Aminosäurebereich 117 bis 181 (bezogen auf das *D. discoideum*-Protein) durch rund 40% identischen Aminosäuren zwischen den Uridinkinasen und dem Protein P116-1 aus. Innerhalb dieses Teilstücks findet sich in allen verglichenen Proteinen die für Uridinkinasen wichtige ATP/GTP-Bindungsstelle mit „P-Loop“ (AS 117-124 für die Sequenz aus *D. discoideum*). 75% der Aminosäuren der Uridinkinase aus *Schizosaccharomyces pombe* sind in diesem Proteinbereich identisch mit denjenigen aus dem Protein P116-1. Der Anteil konservierter Aminosäuren in diesem Bereich beträgt für die Proteine aus *Drosophila melanogaster* und dem Menschen zu Protein P116-1 aus *D. discoideum* 50%.

Die Ergebnisse des Aminosäurevergleichs zwischen dem Protein P116-1 aus *D. discoideum* und den Uridinkinasen aus anderen Organismen lassen den Schluß zu, daß der „Two-Hybrid“-Klon 116-1 für ein Uridinkinase-ähnliches Protein in *D. discoideum* kodiert.

Die höchste Homologie wurde zu Uridinkinasen beobachtet, außerdem wies die korrespondierende Aminosäuresequenz von Klon 116 homologe Bereiche zu einer Vielzahl anderer Proteine auf. Eine Computersuche mit dem Programm „MotifFinder“ findet zweimal das CAP-Protein aus *D. discoideum* (AS 211-254, 414-459) und jeweils einmal Proteine aus der Ribonuklease-II-Familie (AS 25-52), Poly(ADP-Ribose)Polymerase mit einer Zink-Fingerdomäne (AS 113-158) und ein Protein des Clathrin-Adaptor-Komplexes (290-314). Im Protein P116-1 sind neben dem potentiellen ATP/GTP-Bindungsstellenmotiv mit „P-Loop“ (AS 117-124) mehrere potentielle Caseinkinase-II-Phosphorylierungsstellen (AS 7-10, 18-21, 24-27, 103-106, 140-143, 169-172, 247-250, 338-341, 432-435), Proteinkinase-C-Phosphorylierungsstellen (AS 103-105, 198-200, 211-213, 243-245, 247-249, 380-382, 432-434) und Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstellen (AS 320-328, 400-406, 484-492) vorhanden.

Dd	-----	0
Sp	-----	0
Dm	MSSITFLCSKSGHNTNNNSINSSNNDVPKGAKANSFAAAASAGLLTIANHQQQQLLOQPH	60
Hs	-----	0
Dd	----MENRYISRIETISSHLLSTNDVSSQNESESITFVKPLPKNKDHDQSIESDSSFT	59
Sp	-----	0
Dm	QQQQQQQQHHQSKVKIAAAKTNEQLYVDPYADLSNGLPGDLNCCPASPTTVPAKASLD	120
Hs	-----MAAPPARADADPSPTSPPTARDTPGRQAEKSETACEDRSNAESLDRL	47
Dd	REKQFEEELDILGETNSKGLFEIKQVPYQLSFDQGFHACRAIEILTEKDPKRIICLGI	115
Sp	-----MPEAFERYSSNPTY---EPPWR-----KVRFIGI	26
Dm	SPLKRSRRQRTTSGNQTTANPSECIIRANNRTIYTAGRPPWYNCAG--QVPEPVI	179
Hs	LPPVGTGRSPRKR---TSQCKSEPPLRRTSKRTIYTAGRPPWYNEHGTQSKAEFAICL	103
Dd	AGPVGAGKTLANKIGSLVNG---VIIISLQDFVKLENVK---DN----NYDDEVLIDFD	164
Sp	AGPSGSGKTSVAQLIVKALNLPHVVLISLDSFYKSLNAEQKKRAFNNNDYDFSEPADWD	86
Dm	CGGSASGKTIIVAEKIIIESLDVWPVLTLLSMDCFYKILNEKQHEQALINEYNFHPDAFDIE	239
Hs	GGGSASGKTIIVARMTIEALDVPWVLLSMDSEFYKVLTEQQQEQAHHNFFHPDAFD	163
Dd	KVISTLNELEKNTVILPKIVNRKME--SRISLSTSKVILEGAYALS-ARIRPLLDIS	221
Sp	LLFVKLELEKQGRKVDIPIYSFNEHNRLPETNTLFGASITILEGIFALYDEKTRSLLDVS	146
Dm	LLLDVLTKEGRKVEVPVYNFVTHGREQTKTMYGANVIFEGILTTFHSEPVKLLDMK	299
Hs	LIISTKLEKQGRKSVKVIYDFTTSHRKKDWKTYGANVIFEGIMAFADKTLELDDMK	223
Dd	VAITGGVHLDLIKSIMRGIVTSGKNSSKDVLAOITNVVFMKAFVEPDLQAKIKIHSS	281
Sp	VFLDTSVCLSRRLNRDINRGR-DIVGVLEOYNKFKVSYENFVRRLSYTDLIVPRG	205
Dm	IFVDTDPDIRIARRLRDLSQRGR-DLKGVLKQYLNWVKSYSYCNIAPTMAHADIVPRG	358
Hs	IFVDTSDIRIVRRLRDLSERGR-DIEGVIKQYNKFKVSESDQYIQPTMRLADIVVPRG	282
Dd	FNPMSQVVEPVYVCKAKYDNNKQFFDQFLS----SLN-----VVPVKKNFSDMYL	327
Sp	RDNKLAIMVINFIRRTLSIQSETHVKNIDSLQQIVPTIPHLPLNLVQLKITPEISAIRT	265
Dm	GDNKVAIHLIVQHVHTQLQLRGFKLRETANSYKDQP---MPHSLHLLHPTPQIKGLHT	414
Hs	SGNTVAINLIVQVHVSQLEERELSVRAALASAHQCHP---LPRTLVLKSTPQVRGMHT	338
Dd	YPPKYGVDGISQADKRNWIRIRRSEHGQFNITFYNEMMDGAVNTRPSLNFELSVKTLGG-	386
Sp	ILINKNTHPDDLQFFLSRGTMLMNLAGDSLAYEKKTITLHNGNQWEG-LQMAKELCGVS	324
Dm	FIRCNRSTRDEFIFYSKRLIRLVIEYALSLFPFKKTTVETPQGVLYEGKRMSRKICGVS	474
Hs	IIRDKETSRDEFIFYSKRLMRLLEHALSFLPQDCVVTQPGQDYAGKCYAGKQITGVS	398
Dd	LLSLGYQIGAILNRTVEVWYDKNGVVIKEYIKLEKHFIIQKHSRREVLDSAEKLKIT	446
Sp	VLRSGTLETALCRQFPVCLGKILVQINKVTQEPPTLHYHKLPRGIATMNVVLMASHLIT	384
Dm	ILRAGETMEQAVCDVCKDIRIGKILIQTNLKTGEPPELYLRLPKDIKDYKVIIMDATVAT	534
Hs	ILRAGETMEPALRAVCKDVRIGTILIQTNLKTGEPPELYLRLPKDISDDHVILMDCVST	458
Dd	GNHVPQTFLYLYFKKLLKSKNPNYSKLEKPNNTNSKILKNNKDKKLNL-----	492
Sp	HADVLMATQIVDFGVPEENIIIVVYVCYSESIKALAYIFPKVTIVTAFLESVAEP----	440
Dm	GAAAMMAIRVLLDHDVPEENIILASLMAEIGVHSTAYAFPKVKIVTSALDPEINSKFYV	594
Hs	GAAAMMAVRVLLDHDVPEENIFLLSLMAEMGVHSAVAFPRVRIITTAVDKRVNDLFR	518
Dd	-----	492
Sp	VVGRLDIEKVYYGC-----	454
Dm	IPGIGNFGDRYFGTEPSDEY-----	614
Hs	IPGIGNFGDRYFGTDAVPDGSDEEEVAYTG	548

Abb. 34: Übersicht über identische Aminosäuren zwischen dem Protein P116-1 aus *D. discoideum* zu Uridinkinase aus *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), *Drosophila melanogaster* (Dm) und Mensch (Hs). Die rot unterlegten Aminosäuren sind in allen fünf Proteinen identisch. Grün hervorgehobene Aminosäuren sind zumindest in dem Protein P116-1 und in einem weiteren Protein identisch.

2.2.3.1. Charakterisierung der Bindungsstelle des Proteins P116-1 zu Comitin

Die Bindungsstelle zwischen Comitin und dem Protein P116-1 sollte mit Hilfe des „Two-Hybrid“-Systems eingegrenzt werden. Hierzu sind von Klon 116-1 verschiedene Deletionsmutanten hergestellt und in das pACT2-Plasmid kloniert worden. Die Klonierungsstrategie ist in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Klonierungsstrategie für die einzelnen P116-1-Konstrukte

Konstrukt	Nukleotide	Aminosäuren	Restriktionsenzyme für			Oligonukleotide
			pAS2	pACT2	PCR	
116-1 A	22 - 646	8 - 215	*	BamHI/XhoI	BamHI/XhoI	pACT2-1/Uri-656
116-1 B	339 - 1074	113 - 358	*	BamHI/XhoI	BamHI/XhoI	Uri-340/Uri-1074
116-1 C	621 - 1355	207 - 452	*	BamHI/XhoI	BamHI/XhoI	Uri-626/Uri-1355
116-1 D	1036 - 1479	345 - 492	EcoRI/XhoI	EcoRI/XhoI	*	*

Legende: Nukleotide – entsprechende Nukleotide der Uridinkinase-ähnlichen Sequenz; Aminosäuren – entsprechende Aminosäuren der Uridinkinase-ähnlichen Sequenz; Restriktionsenzyme für pAS2 – verwendete Schnittstellen im Klons 116-1; Restriktionsenzyme für pACT2 – Klonierungsstellen des pACT2-Plasmids; Restriktionsenzyme für PCR – über PCR angehängte Schnittstellen; Oligonukleotide – verwendete Oligonukleotide für die PCR.

Die ersten 22 Nukleotide bzw. die ersten sieben Aminosäuren des Uridinkinase-ähnlichen Gens wurden bei diesem Experiment nicht berücksichtigt, da sie im ursprünglich isolierten Klon 116-1 fehlten. Im „Two-Hybrid“-Experiment dient das pAS2/Filamin-Plasmid als Negativkontrolle. Die pACT2/P116-1-Konstrukt-Plasmide wurden jeweils mit pAS2/Comitin und pAS2/Filamin in Y190-Hefezellen transformiert und die Interaktion zwischen den P116-1-Teilstücken und Comitin im β -Galaktosidase-Test getestet. Die nachfolgende Abbildung 35 gibt eine Übersicht über das Ergebnis dieses Experiments.

Keines der neu gebildeten P116-1-Konstrukte zeigt im β -Galaktosidase-Test eine Blaufärbung. Nur der „Two-Hybrid“-Klon 116-1 ergab ein positives Ergebnis. Die Bindungsstelle zum Comitin des Proteins P116-1 konnte mit diesen Konstrukten und dem „Two-Hybrid“-System nicht näher eingegrenzt werden.

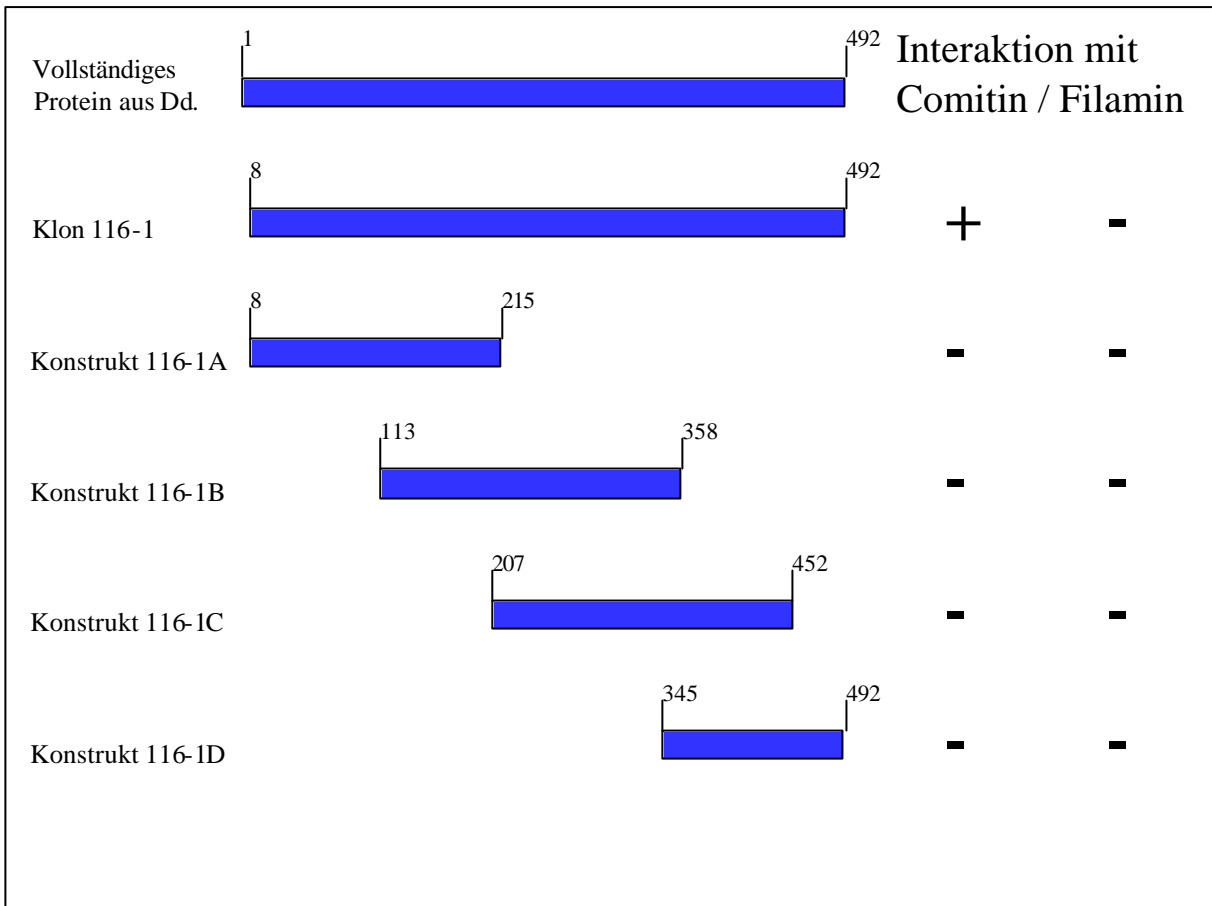


Abb. 35: Bestimmung der Bindungsdomäne des Proteins P116-1 zu Comitin. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen der Konstrukte wieder. + bezeichnet eine positive Interaktion im „Two-Hybrid“-Versuch. – steht für eine nicht gefundene Interaktion im „Two-Hybrid“-Experiment.

2.2.3.2. „Two-Hybrid“-Experiment zur Bestimmung der Bindungsdomäne des Comitins für das Protein P116-1

Die kodierende Sequenz des Klons 116-1 ist für diesen Versuch in den pAS2-Vektor kloniert worden. Das Insert aus pACT2 wurde zunächst mit dem Enzym BglIII herausgeschnitten. Nach Auffüllen des überstehenden 5'-Endes mit dem Klenow-Enzym folgte eine Restriktionsverdauung mit dem Enzym BamHI. Das isolierte 1,5 kB große cDNA-Fragment wurde in den vorbereiteten pAS2-Vektor kloniert. Dazu ist das pAS2-Plasmid nach Schneiden mit dem Restriktionsenzym SalI und Auffüllen des überstehenden 5'-Endes noch mit dem Enzym BamHI behandelt worden. Für dieses Experiment sind die schon in Abschnitt 2.2.2.1. beschriebenen Comitinkonstrukte herangezogen worden.

Die Transformation von pAS2/P116-1-Teilstücken und pACT2/Comitinkonstrukten in Y190-Hefezellen erfolgte simultan. Die Interaktion zwischen dem Protein P116-1 und den Comitinteilstücken wurde im β -Galaktosidase-Test überprüft (Tabelle 10). Für keine der getesteten Kombinationen zeigte der β -Galaktosidase-Test eine Blaufärbung der Hefezellen. Die Bindungsdomäne des Comitins zum Protein P116-1 ließ sich also mit Hilfe des „Two-Hybrid“-Systems nicht näher eingrenzen.

Tabelle 10: Versuche zur Bestimmung der Bindungsdomäne des Comitins zu P116-1

Plasmid/Konstrukt	pAS2/P116-1	pACT2/P116-1
pACT2/Comitinkonstrukt KI	-	*
pACT2/Comitinkonstrukt KIII	-	*
pACT2/Comitinkonstrukt KIV	-	*
pACT2/Comitinkonstrukt KV	-	*
pAS2/Comitinkonstrukt KI	*	-
pAS2/Comitinkonstrukt KII	*	-
pAS2/Comitinkonstrukt KV	*	-

Das Minuszeichen bedeutet keine gefundene positive Interaktion. Ein Sternchen steht für eine nicht mögliche Kombination der beiden „Two-Hybrid“-Plasmide.

2.2.3.3. „Two-Hybrid“-Versuch zu einer möglichen Dimerisierungsfähigkeit des Proteins P116-1

Für viele Kinasen wurde schon eine Dimerisierungsfähigkeit gezeigt. Die UDP-N-Acetylhexosamin-Phosphorylase besteht aus zwei Untereinheiten [Wang-Gillam *et al.*, 1998]. Sie katalysiert die Synthese von UDP-Glucose-N-Acetylhexosamin und UDP-Galaktose-N-Acetylhexosamin aus UTP und N-Acetylhexosamin-1-Phosphat [Szumilo *et al.*, 1996]. Auch Kinasen die kein Uridin-haltiges Substrat verwenden, zeigen eine Dimerisierungsfähigkeit. Die Transmembran-Serin/Threonin-Proteinkinasen IRE1 und PERK des endoplasmatischen Retikulums besitzen eine N-terminal gelegene ER-lumenale Domäne. Erst die durch ER-Streß ausgelöste Homodimerisierung dieser Domänen aktiviert die beiden Enzyme. IRE1 und PERK sind in den Faltungsprozeß neusynthetisierter Proteine eingebunden [Liu *et al.*, 2000]. Da das Protein P116-1 als ein Uridinkinase-ähnliches Protein eingeordnet wurde, ist es in einem „Two-Hybrid“-Experiment auf eine mögliche Dimerisierungsfähigkeit getestet worden.

Für diesen Versuch wurden Y190-Hefezellen simultan mit den Plasmiden pAS2/116-1 und pACT2/116-1 transformiert und die Transformanten analysiert. Es wurde keine Blaufärbung der Hefezellen detektiert. Eine Dimerisierungsfähigkeit des Proteins P116-1 kann also nicht mit diesem „Two-Hybrid“-Versuch gezeigt werden.

2.2.3.4. Northern- und Southern-Blot-Analyse für Klon 116-1

Für die Analyse der RNA-Expression während des Entwicklungszyklus von *D. discoideum* wurden Northern-Blot-Experimente durchgeführt. Als Probe wurde das vollständige cDNA-Fragment aus dem „Two-Hybrid“-Klon 116-1 verwendet. Diese Sonde erkennt eine 1,5 kB mRNA, die in vegetativen Zellen in großen Mengen vorhanden ist. Während der Entwicklung

nimmt die mRNA-Menge ab, bleibt aber bis zur späten Kulminationsphase nachweisbar (Abb. 36A).

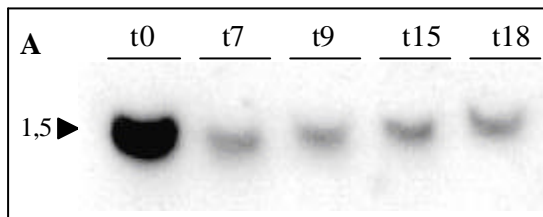
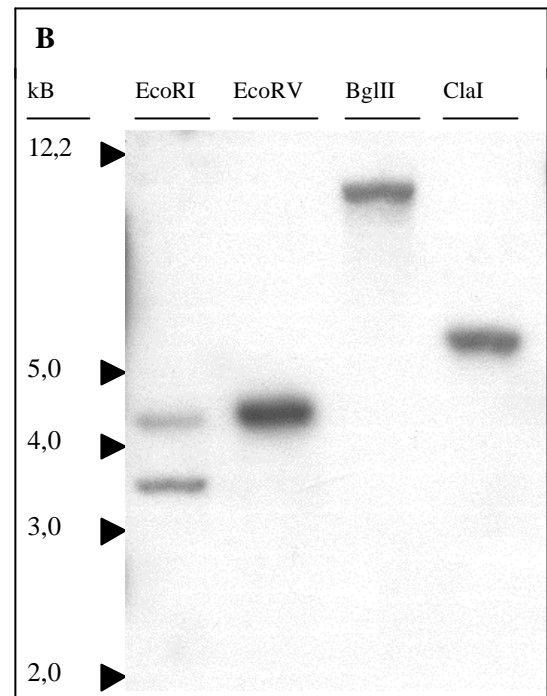


Abb. 36A: Transkriptanalyse für das *D. discoideum*-Protein P116-1 während des Entwicklungszyklus. 20 µg Gesamt-RNA je Zeitpunkt aus AX2 wurden in einem 1,2%igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und auf Nylonmembran gebloftet. Als Probe wurde das radioaktiv markierte, 1,5 kB cDNA-Fragment verwendet.

Abb. 36B: Charakterisierung des *D. discoideum*-P116-1-Gens. AX2-DNA wurde mit den angegebenen Enzymen verdaut, in einem 0,7%igen Agarosegel (Tris-Borat-Puffer, pH 8,0) aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit dem radioaktiv markierten, 1,5 kB cDNA-Fragment aus Klon 116-1.



Für die Southern-Blot-Analyse wurde DNA aus AX2 mit den Restriktionsenzymen EcoRI, EcoRV, BglII oder ClaI verdaut. Nach Auftrennung der verdauten DNA im Agarosegel wurde die DNA auf Nylonmembran übertragen und mit der schon im Northern-Blot verwendeten radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Die cDNA von Protein P116-1 besitzt zwei interne EcoRI-Schnittstellen an den Positionen 735 und 1040. Dies erklärt die zwei detektierten Signale bei 4,3 und 3,5 kB. Das außerdem zu erwartende Signal bei 0,3 kB ist im Rahmen dieser Southern-Blot-Analyse nicht erfaßt worden. BglII, EcoRV und ClaI haben keine internen Schnittstellen in der cDNA des Proteins P116-1. Im Southern-Blot wurde nach Verdauung der genomischen AX2-DNA nur jeweils ein starkes Signal bei ca. 6 kB für ClaI, bei ca. 4,5 kB für EcoRV und bei 10 kB für BglII detektiert (Abb. 36B). Der Vergleich zwischen der Nukleotidsequenz des Inserts aus Klon 116-1 mit der genomischen Sequenz des Jenaer Dictyostelium Genom-Projekts findet nur ein Gen für P116-1. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß im Genom von *D. discoideum* nur ein einzelnes Gen für das Protein P116-1 kodiert.

2.2.3.5. Lokalisation des Proteins aus Klon 116-1 in *D. discoideum*

2.2.3.5.1. Konstruktion des GFP-P116-1-Expressionsvektors

Die Lokalisation des Proteins P116-1 in *D. discoideum* erfolgte mit Hilfe eines GFP-Fusionsproteins, da entsprechende Antikörper gegen dieses Protein nicht vorhanden sind und Versuche, Fusionsproteine für nachfolgende Antikörper zu isolieren, nicht erfolgreich waren. Die 116-1-Sequenzen wurden in den pBsr-GFP-Vektor stromabwärts (3') vom GFP-Gen kloniert [Mohrs *et al.*, 2000]. Der so entstandene Expressionsvektor pBsr-GFP-P116-1 wurde zur Überprüfung an der Fusionsstelle zwischen dem GFP-Gen und der Nukleotidsequenz aus Klon 116-1 sequenziert. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors des Aktin-15-Gens (Abb. 37).

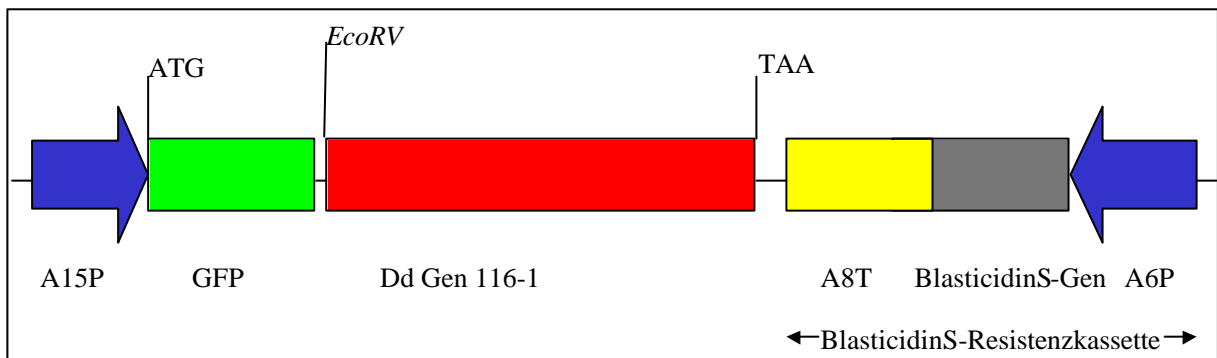


Abb. 37: Konstruktion des pBsr-GFP-P116-1-Expressionsvektors. Die cDNA-Sequenz von Klon 116-1 ist mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Xho*I aus dem pACT2-Vektor isoliert und mit glatten Enden in die *EcoRV*-Schnittstelle des pBsr-GFP-Vektors kloniert worden. Dadurch ist das Stopcodon der cDNA-Sequenz von Klon 116-1 erhalten geblieben. Als Terminator fungiert der A8Tandem-Terminator der BlasticidinS-Resistenzkassette.

Die Transformation mit dem pBsr-GFP-P116-1-Expressionsvektor erfolgt in *D. discoideum*-Wildtypzellen. Transformanten wurden durch Zugabe von 35 µg Blasticidin zu 10 ml axenischem Medium selektioniert.

2.2.3.5.2. Lokalisation des GFP-P116-1-Fusionsproteins in lebenden AX2-Zellen

AX2-Zellen, die das GFP-P116-1-Fusionsprotein exprimieren, sind am konfokalen Mikroskop in Soerensen-Phosphat-Puffer analysiert worden. Das Fusionsprotein ist demnach in oder an kleinen, scharf abgegrenzten Strukturen lokalisiert, die einer hohen Fluktuation in der Zelle unterliegen. Die nachfolgende Abbildung 38 spiegelt die schnelle dynamische Bewegung dieser Strukturen wider. Dazu ist dieselbe Zelle über einen Zeitraum von mehr als fünfzehn Sekunden beobachtet worden.

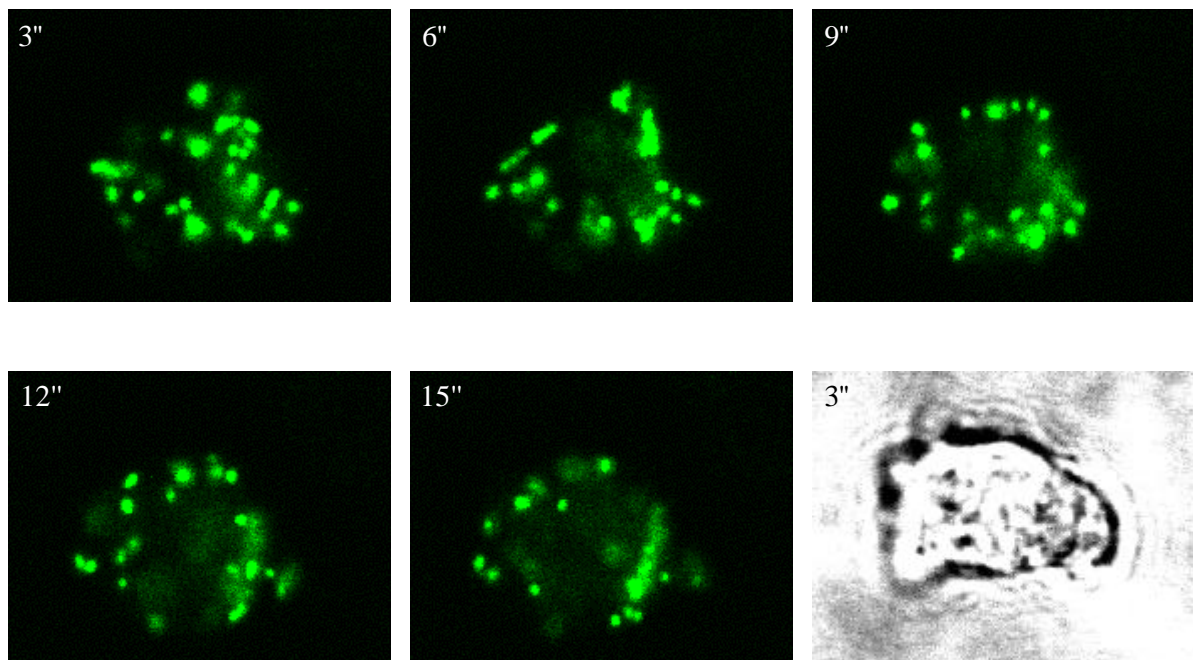
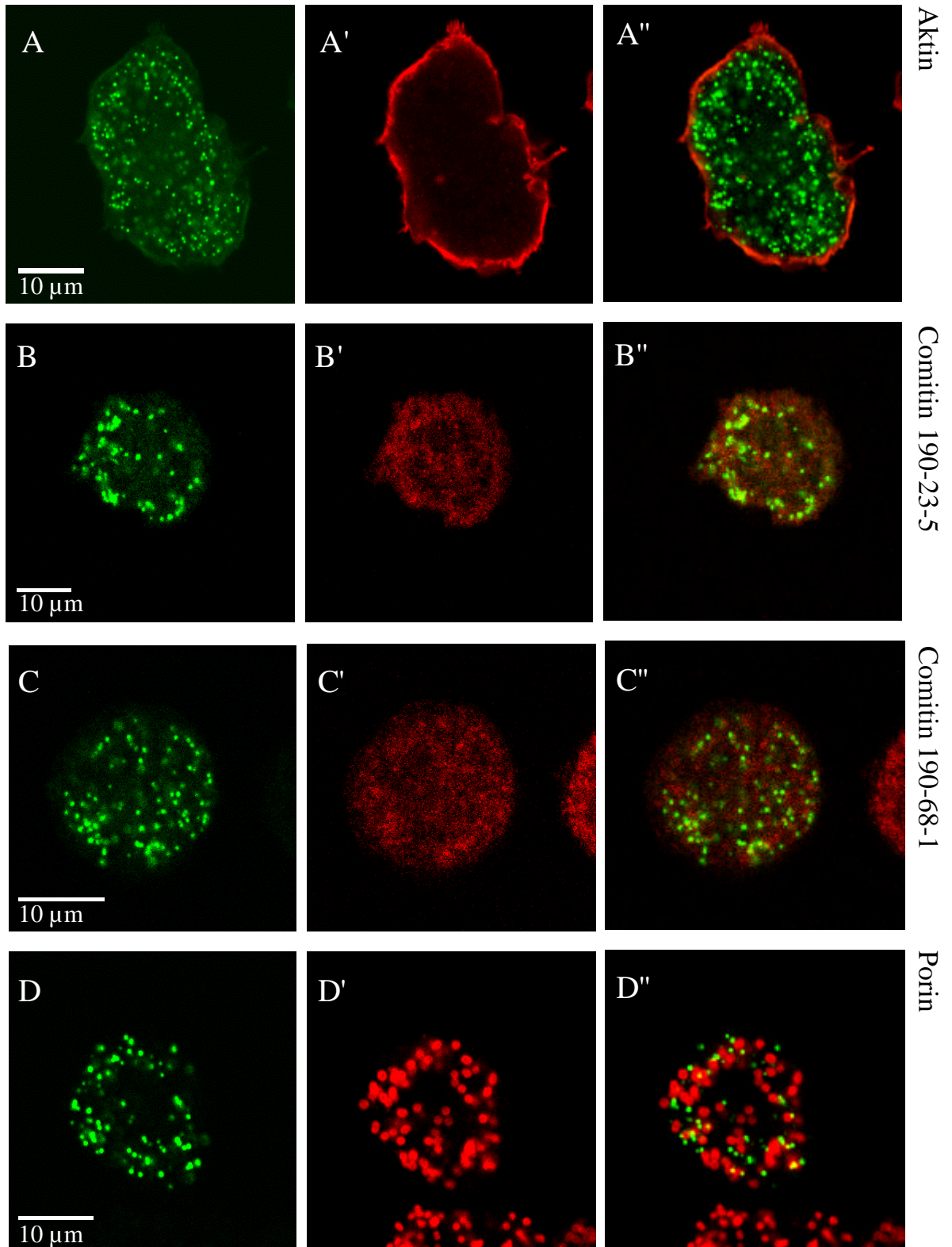


Abb. 38: Lokalisation des P116-1-GFP-Fusionsproteins in lebenden AX2-Zellen. Dieselbe Zelle wurde in Abständen von drei Sekunden aufgenommen, wobei die Aufnahmeebene beibehalten wurde. Zusätzlich wird die Phasenkontrastaufnahme der Zelle zum Zeitpunkt drei Sekunden gezeigt.

2.2.3.5.3. Immunfluoreszenzanalyse des GFP-P116-1-Fusionsproteins in fixierten AX2-Zellen

Um die vesikulären Strukturen, die das GFP-P116-1-Fusionsprotein tragen, näher zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenzstudien an Methanol-fixierten Zellen durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem monoklonalen anti-Aktin-Antikörper Act-1-7, den anti-Comitin-Antikörpern 190-23-5 und 190-68-1, sowie mit dem anti-Porin-Antikörper 70-100-1, dem mAk 221-457-5, dem mAk 221-342-5 und mit dem polyklonalen anti-DdLIMP-Antikörper inkubiert.



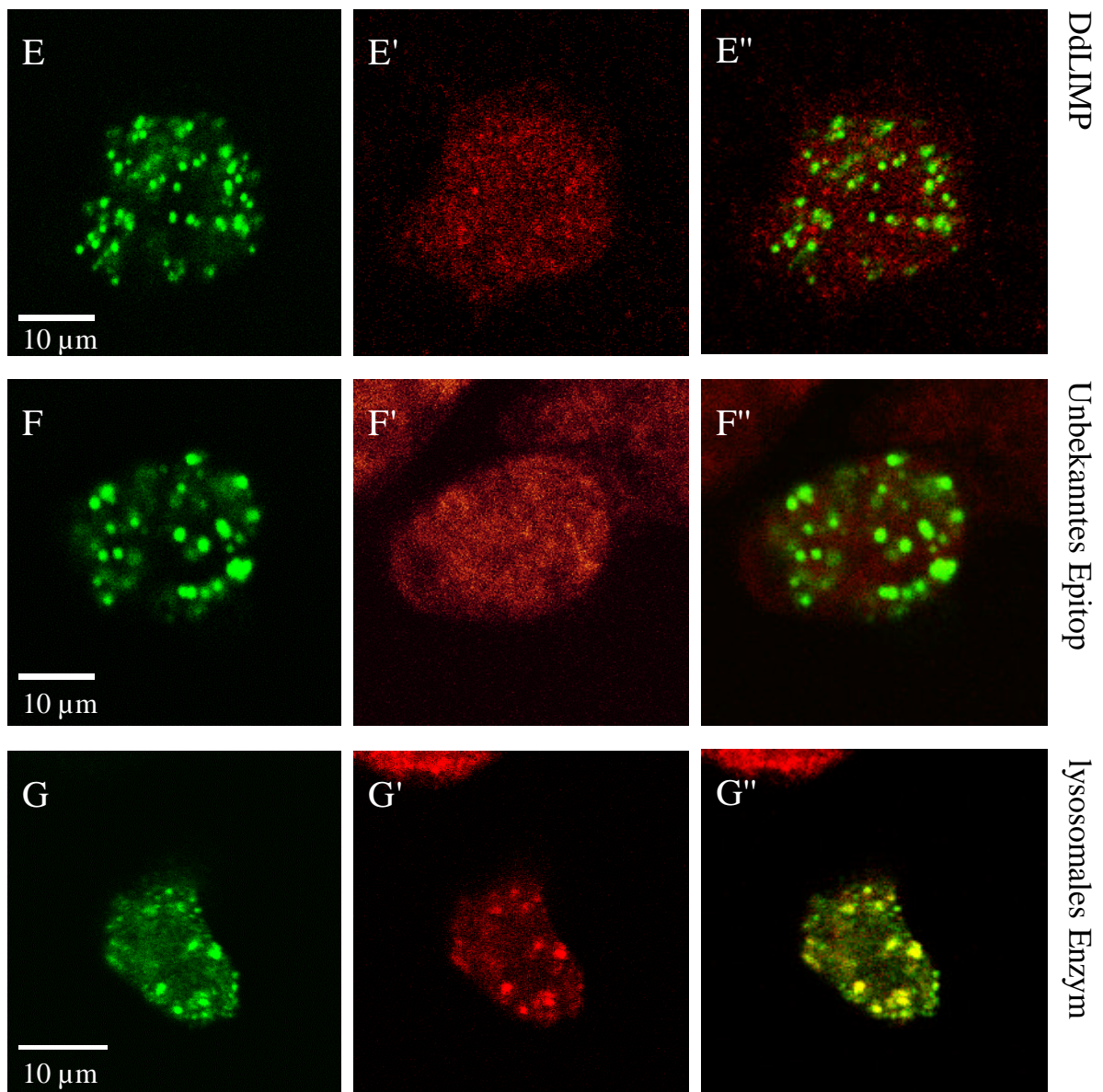


Abb. 39: Immunfluoreszenzstudien zur Lokalisation des GFP-P116-1-Fusionsproteins in AX2-Zellen. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: A', A'' mAk Act-1-7 gegen Aktin; B', B'' mAk 190-23-5 und C', C'' mAk 190-68-1 gegen Comitín; D', D'' mAk 70-100-1 gegen Porin; E', E'' pAk gegen DdLIMP; F', F'' mAk 221-457-5 gegen ein unbekanntes Epitop; G', G'' mAk 221-342-5 gegen ein gemeinsames Kohlenhydrat-Epitop lysosomaler Proteine. Die monoklonalen Antikörper wurden durch Cy3-konjugierte Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper erkannt. Zur Detektion des polyklonalen Antikörpers wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper (TRITC-Konjugat) als sekundärer Antikörper verwendet. Die Bilder A-G geben die GFP-Fluoreszenz wieder. Die durch den jeweiligen Antikörper markierten Strukturen werden in den Aufnahmen A'-G' wiedergegeben. Die Überlagerung der Bilder A-G und A'-G' zeigen die Abbildungen A''-G''.

Die Abbildungen 39A-A" geben die Markierungsversuche der fixierten Zellen mit dem anti-Aktin-Antikörper Act-1-7 wieder. Die durch das Fusionsprotein aufgezeigten Strukturen sind im Cytosol verteilt. Die anti-Comitin-Antikörper 190-23-5 und 190-68-1 erkennen andere, erheblich kleinere Vesikel in *D. discoideum*. Beide Proteine kolokalisieren also nicht (Abb. 39B-B" und 39C-C"). Die Vermutung, daß es sich bei den durch die GFP-Fluoreszenz detektierten Strukturen um Mitochondrien handeln könnte, konnte nicht bestätigt werden, da der anti-Porin-Antikörper 70-100-1 ein abweichendes Muster zeigt (Abb. 39D-D"). Das hydrophile Porin ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und an der Ausbildung von Ionenkanälen beteiligt [Troll *et al.*, 1992]. Die durch mAk 70-100-1 markierten Mitochondrien sind erheblich größer als die durch das GFP-Protein detektierten Vesikel. Außerdem zeigt die Überlagerung der Bilder 39D und 39D' keine Kolokalisation beider Strukturen. Weitere Charakterisierungen der P116-1-tragenden Vesikel wurden mit dem polyklonalen Antikörper gegen das DdLIMP-Protein durchgeführt. Dieses integrale Membranglykoprotein aus *D. discoideum* ist ein lysosomenspezifisches Protein und in solchen Lysosomen lokalisiert, die einen neutralen pH-Wert haben. Die Überlagerung der durch das GFP-P116-1-Fusionsprotein hervorgehobenen Zellstrukturen mit der Immunfluoreszenz des polyklonalen anti-DdLIMP-Antikörpers läßt erkennen, daß beide Proteine nicht Bestandteil derselben Zellkompartimente sind. Der monoklonale Antikörper 221-457-5 erkennt ein unbekanntes vesikuläres Protein. Die Abbildungen 39F-F" zeigen keine Kolokalisation zwischen dem GFP-P116-1-Fusionsprotein und dem unbekanntem vesikulären Epitop. Dagegen zeigt die Immunfluoreszenzanalyse mit dem monoklonalen Antikörper 221-342-5, der gegen ein Kohlenhydrat-Epitop lysosomaler Enzyme gerichtet ist, solche Vesikel, die auch durch das GFP-P116-Fusionsprotein hervorgehoben werden (Abb. 39G-G"). Das GFP-P116-1-Fusionsprotein ist also Bestandteil einer Subpopulation von Lysosomen, die nicht vom polyklonalen anti-DdLIMP-Antikörper erkannt werden.

2.2.4. Der „Two-Hybrid“-Klon 165-2

Der offene Leserahmen des Klons 165-2 (396 Basenpaare) kodiert für ein 129 Aminosäuren langes Peptid. Ein Vergleich mit der Datenbank zeigt, daß die ersten drei Aminosäuren dieses potentiellen Bindungspartners von Comitín im cDNA-Fragment von Klon 165-2 nicht vorhanden sind. Der Sequenzvergleich mit der Datenbank des Jenaer *D. discoideum*-Genomprojekts zeigte auch, daß das Gen nicht durch Introns unterbrochen wird. Das vollständige Protein P165-2 hat ein Molekulargewicht von 14,35 kDa. Der errechnete pI beträgt 12,07 und ist auf einen hohen prozentualen Anteil von Argininresten (7,38%) und Lysinresten (13,64%) zurückzuführen. Die Sekundärstruktur des Proteins ist nach Berechnungen des Programms „Pôle Bio-Informatique Lyonnais“ durch einen hohen α -Helix-Anteil von 40,15% und „Random-Coil“-Anteil von 37,12% gekennzeichnet. Als weitere Strukturelemente werden β -Faltblätter mit einem Anteil von 18,18% und β -Schleifen mit einem Anteil von 4,55% vorhergesagt [Geourjon und Deléage, 1995].

```

1  ATG TCT CAA GAT CTC GTT TGG AGC ATT ATC AAA AAG AAC AAC GCT TTC
I  M  S  Q  D  L  V  W  S  I  I  K  K  N  N  A  F

49  TTA AAA TCC TCA CAC GGT TTA ACC TTA TCT GCT GAA CCA GGT AAT TTA
17  L  K  S  S  H  G  L  T  L  S  A  E  P  G  N  L

97  AGA AAC AAA AAC TCC TTA AAA TAC TCC GGT CTT GCC AGA AGA ACC ACC
33  R  N  K  N  S  L  K  Y  S  G  L  A  R  R  T  T

145 ATC GAC GTT GCT GCC GTT AAC GGT AAA GTT GTT GTC TCA TCA AAG ATT
49  I  D  V  A  A  V  N  G  K  V  V  V  S  S  K  I

193 GTT AAA AAA GCT GCC TTC CCA GCT CAA TCA AAA AAA ACC ACC ACT TTC
65  V  K  K  A  A  F  P  A  Q  S  K  K  T  T  T  F

241 TCA ACT GTC AAC ACC AGA AAG ACT GCT AGA TTC GTC AAA ACT TTA GCC
81  S  T  V  N  T  R  K  T  A  R  F  V  K  T  L  A

289 ACC CAA TAT GCT CCA GAA TTA AGA GCT GCT GCC TTA GGT CGT TTA CAC
97  T  Q  Y  A  P  E  L  R  A  A  A  L  G  R  L  H

337 AGA GTC CAA TCT GCT CTC CGT TCT GCC AAA AAA GCT GCT GCC CGT AAA
113 R  V  Q  S  A  L  R  S  A  K  K  A  A  A  R  K

385 GCC AAG AAA AAC TAA
129 A  K  K  N  *

```

Abb. 40: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Proteins P165-2. Die Nukleotidsequenz ist in der oberen Reihe dargestellt. Die Aminosäuresequenz sowie das Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die nicht im „Two-Hybrid“-Klon 165-2 enthaltenen Aminosäuren sind kursiv und rot gedruckt. Die einfach gedruckten Zahlen am linken Rand geben die Position der Basen relativ zum A des Startcodons ATG wieder. Die durch Fett- und Kursivdruck hervorgehobenen Zahlen am linken Rand bezeichnen die Aminosäureposition bezogen auf das Startmethionin.

In der Aminosäuresequenz sind mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für die cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase (AS 45-48, 75-78) und die Proteinkinase-C (AS 37-39, 61-63, 74-76, 85-87, 88-90, 120-122) vorhanden. Eine Caseinkinase-II-Phosphorylierungsstelle wird von den Aminosäuren 47 bis 50 repräsentiert. Eine Datenbanksuche [Altschul *et al.*, 1990] zeigt für das gesamte Protein P165-2 einen Anteil von rund 28% identischer Aminosäuren zu ribosomalen Proteinen L28 aus verschiedenen Organismen. Die

Aminosäuresequenz des Proteins P165-2 weist zwischen 60,6 und 70,1% homologe Aminosäuren zu den anderen ribosomalen L28 Proteinen auf (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht über identische und homologe Aminosäuren zwischen ribosomalen Proteinen aus anderen Organismen und dem Protein P165-2

Organismus	Zugriffsnummer	<i>D. discoideum</i>	<i>M. musculus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<i>S. pombe</i>	O14069	27,6% / 65,7%	35,1% / 64,9%	35,1% / 63,4%	32,1% / 70,0%
<i>D. melanogaster</i>	AAF447742	29,2% / 70,1%	41,6% / 79,9%	38,8% / 78,5%	*
<i>H. sapiens</i>	AI929482	28,5% / 62,0%	95,6% / 100%	*	*
<i>M. musculus</i>	AA 763917	28,5% / 60,6%	*	*	*

Die erste Prozentangabe repräsentiert identische Aminosäuren. Die zweite Zahl steht für homologe Aminosäuren. Die Bezeichnung „homologe“ Aminosäuren steht für die Summe aus identischen und ähnlichen Aminosäuren. Die prozentualen Angaben beziehen sich immer auf die Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins L28 des links stehenden Organismus. Die Sequenzen lassen sich mit der Zugriffsnummer im Computerprogramm „Advanced Blast Search“ identifizieren.

Die identischen und homologen Aminosäureanteile zwischen ribosomalen Proteinen L28 aus den angeführten Organismen und dem Protein P165-2 entsprechen in ihrer Größenordnung den Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen von *Schizosaccharomyces pombe* zu *D. melanogaster*, *M. musculus* und *H. sapiens*. Die höchste Zahl konservierter Aminosäuren zeigen die ribosomalen Proteine L28 aus *M. musculus* und *H. sapiens* untereinander (Tabelle 11). Aufgrund der Ergebnisse des Aminosäuresequenzvergleichs ist das Protein, das von Klon 165-2 kodiert wird, das homologe ribosomale Protein L28 aus *D. discoideum*. Abbildung 41 zeigt den Vergleich des Proteins P165-2 mit den angeführten ribosomalen Proteinen L28 aus anderen Organismen.

Dd	--MSQDLVMSLIIKKNNAFLLKSSHG---LTL SAEPGNLRNKNLSLKYSGLARFTTIDVAAVN	55
Sp	MSVSNDLIIQVIRDNRFLLVKKRPEFGGIQFNREPNNVSGKNAQRFSGLCNDKAVGVQANS	60
Dm	MATSSHLNLLIRNNAFLKLRDV-KKPFSTEPNNLASVSSYRYSGLVHKKTLGVVPAA	59
Mm	--MSAHLQMMVVRNCSSFLIKRN---KQTYSTEPNNLKARNSFRYNGLIHRKTVGVPEAA	55
Hs	--MSAHLQMMVVRNCSSFLIKRN---KQTYSTEPNNLKARNSFRYNGLIHRKTVGVPEAA	55
Dd	--GKVVVSSKIVKKAAPPAQSKKTTTFSTVNTTRKTARFVKTLAT--QYAPELRAAALGRL	111
Sp	PRGVVLIITKTNPKNAQKPAKLFKRDVIANASSRKTYKSIAGRIGRTGYRDDIVKVSVARA	120
Dm	DKKGFTAVLKKGYAQRPAKNTVRVDEK-AGPRRSLKKLKLLIGSKYRKDITQAALRA	118
Mm	DGKGVVVVMKRRSGQRKPATSYVRTTIN-KNARATLSSIRHMIRKNKYREDLRMAAIRA	114
Hs	DGKSVVVVVKRRSGQRKPATSYVRTTIN-KNARATLSSIRHMIRKNKYREDLRMAAIRA	114
Dd	HRVQSALRSKAKAAARKAKKN-----	132
Sp	SAILSSQRPKKTVA-----	134
Dm	SAVILRSQKPA PVKGGKAEFAKGGKPE	144
Mm	SAILRSQKPVVVKRKRTRPTKSS---	137
Hs	SAILRSQKPVVVKRKRTRPTKSS---	137

Abb. 41: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Protein P165-2 und ribosomalen Proteinen L28 aus *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), *Drosophila melanogaster* (Dm), Maus (Mm) und Mensch (Hs). Rot unterlegte Aminosäuren sind in allen fünf Proteinen identisch. Grün hervorgehobene Aminosäuren sind mindestens in einem Protein eines anderen Organismus identisch mit der betreffenden Aminosäure aus *D. discoideum*.

2.2.4.1. Charakterisierung der Bindungsdomäne des L28-Proteins zu Comitin

Um die Bindungsdomäne des ribosomalen Proteins L28 zu Comitin näher einzugrenzen, wurden mehrere Konstrukte von P165-2 hergestellt und getestet (Tabelle 12 und Abb. 42).

Tabelle 12: Klonierungsstrategie für die Konstrukte von Klon 165-2

Konstrukt	Nukleotide	Aminosäuren	Restriktionsenzyme für			Oligonukleotide
			pAS2	pACT2	PCR	
165-2 A	9 – 162	4 – 53	*	BamHI/XhoI	BamHI/XhoI	Gal4ADW/Rib28-172
165-2 B	149 – 276	51 – 92	*	BamHI/XhoI	BamHI/SacI	Rib28-150/Rib28-276
165-2 C	153 – 399	56 – 132	HpaI/XhoI	EcoRI b.e./XhoI	*	*
165-2 D	269 – 399	91 – 132	*	BamHI/SacI	BamHI/SacI	Rib28-269/Rib28-397

Legende: Nukleotide – entsprechende Nukleotide des ribosomalen Proteins L28; Aminosäuren – entsprechende Aminosäuren des ribosomalen Proteins L28; Restriktionsenzyme für pAS2 – verwendete Schnittstellen im Klon 165-2; Restriktionsenzyme für pACT2 – Klonierungsstellen des pACT2-Plasmids; Restriktionsenzyme für PCR – über PCR angehängte Schnittstellen; Oligonukleotide – verwendete Oligonukleotide für die PCR; b.e. – glatte Enden.

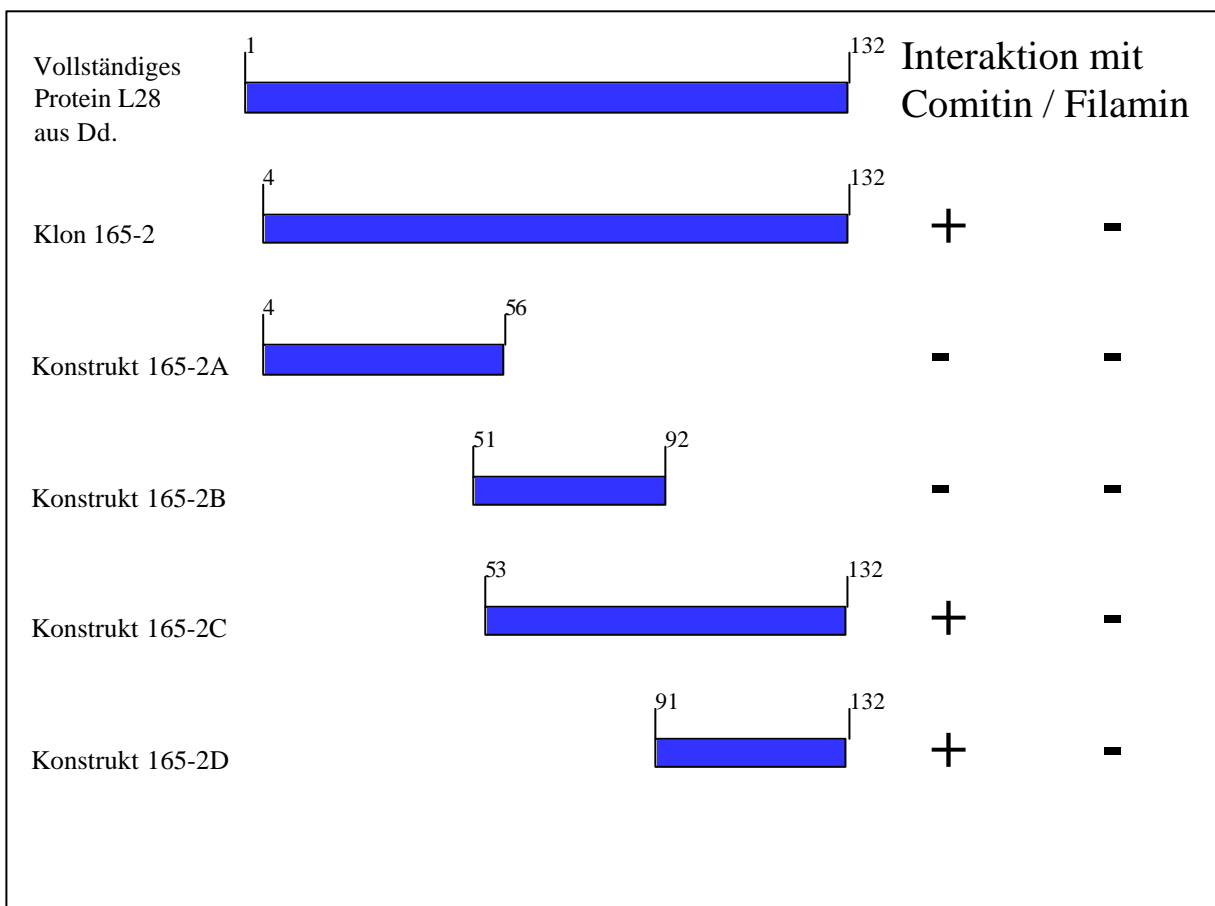


Abb. 42: Bestimmung der Bindungsdomäne des ribosomalen Proteins L28 zu Comitin. Die Zahlen bezeichnen die jeweilige Aminosäureposition der Konstrukte im Vergleich zum vollständigen Protein. Die Symbol + und steht für eine positive Interaktion im „Two-Hybrid“-Experiment. Ein Minuszeichen symbolisiert ein negatives Ergebnis im β -Galaktosidase-Test.

Die Konstrukte 165-2 C und D zeigten im „Two-Hybrid“-Versuch neben dem Vollängenklon 165-2 in pACT2 mit pAS2/Comitin eine Blaufärbung. Demnach kann die Bindungsdomäne zu Comitin auf die Aminosäuren 91 bis 132 (Konstrukt 165-2D) eingegrenzt werden. Dieses Peptidteilstück des ribosomalen Proteins L28 aus *D. discoideum* zeigt mit einem pI von 12,25 noch höheren basischen Charakter als das vollständige Protein (pI 12,07).

2.2.4.2. „Two-Hybrid“-Experiment mit dem ribosomalen Protein L28 aus Maus

Die gesamte Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins L28 aus *M. musculus* zeigt hohe Homologie (28,5% identische und 60,6% homologe Aminosäuren) zu P165-2 aus *D. discoideum*. Der in P165-2 identifizierte Bindungsbereich (AS 91 – 132) zum Comitin weist im entsprechenden Sequenzabschnitt eine etwas geringere Ähnlichkeit (23,8% identische und 55,5% homologe Aminosäuren) zum Maushomologen auf (Abb. 43).

Dd	MSQDLVMSIIKKNNNAFLKSSHGLTLSAEPGNLRNKNLSLKYVGLARRTTIDVAAVN-GKVV	59
Mm	MSAHLQVMVVRNCSSFLIKRNKQTYSTEPNNLKARNSEFRVNGLIHRKTVGVFAWPDGKGV	60
Dd	VSSKIVKKAFFPAQSKKTTTFSTVNTKRLARFVKTLAT--OYAPELRAAALGRLHRVQSA	117
Mm	VVVMKRKRSQQRKPAATSVVRTINKNARATLSSIRHMRKKNVREDLRMAAIREASAILRS	120
Dd	LR--SARKAAARKAKKN	132
Mm	QKPVVVKRKRTRPTKSS	137

Abb. 43: Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen dem Protein P165-2 aus *D. discoideum* und dem ribosomalen Protein L28 aus *Mus musculus* (Mm). Identische Aminosäuren sind rot, ähnliche Aminosäuren grün unterlegt.

In einem „Two-Hybrid“-Experiment wurde untersucht, ob das Säugerhomolog trotzdem mit Comitin aus *D. discoideum* eine Protein-Protein-Interaktion eingeht. Dazu ist mit RT-PCR die Einzelstrang-DNA aus Mausherz-RNA mit den Oligonukleotiden Mau28-1 und Mau28-2 amplifiziert worden. Das Oligonukleotid Mau28-1 enthält eine eingebaute BamHI-Schnittstelle und Mau28-2 eine XhoI-Schnittstelle. Das ca. 0,4 Basenpaare große PCR-Fragment wurde in den pGem-Teasy-Vektor ligiert, die Sequenz bestimmt und das Insert mit den Enzymen XhoI und BamHI ausgeschnitten. Nach Überführung der überstehenden 5'-Enden in glatte Enden wurde das Fragment in den entsprechend vorbereiteten pACT2-Vektor kloniert. Für das nachfolgende „Two-Hybrid“-Experiment wurden die Plasmide pACT2/MauRPL28 und pAS2/Comitin gleichzeitig in Y190-Hefezellen transformiert. Als Negativkontrolle wurde eine parallele Transformation mit pACT2/MauRPL28 und pAS2/Filamin durchgeführt. Die folgende Analyse hat jedoch gezeigt, daß beide Proteine nicht miteinander reagieren.

2.2.4.3. „Two-Hybrid“-Experiment zur Bestimmung der Bindungsdomäne des Comitins für das L28-Protein

Für diese Analyse wurde die cDNA-Sequenz des Klons 165-2 in den pAS2-Vektor kloniert. Das Fragment 165-2 wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI aus pACT2 isoliert, das überstehende 5'-Ende der XhoI-Schnittstelle mit Klenow-Enzym aufgefüllt und das Fragment in den vorbereiteten pAS2-Vektor kloniert. Der pAS2-Vektor wurde mit Sall geschnitten, die überstehenden 5'-Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und dann wurde er mit NdeI geschnitten. Für das „Two-Hybrid“-Experiment wurden die in Abschnitt 2.2.2.1. beschriebenen Comitinkonstrukte in pACT2 und pAS2 benutzt. In keinem der durchgeführten „Two-Hybrid“-Experimente ließ sich eine Wechselwirkung zwischen den Comitinteilstücken und dem Protein P165-2 feststellen, unabhängig davon, ob pAS2/P165-2 mit Comitinkonstrukten in pACT2 bzw. das pACT2/P165-2 mit Comitinkonstrukten in pAS2 in Y190-Hefezellen transformiert worden ist (Tabelle 13).

Tabelle 13: Versuche zur Bestimmung der Bindungsdomäne des Comitins zu L28

Plasmid/Konstrukt	pAS2/P165-2	pACT2/P165-2
pACT2/Comitinkonstrukt KI	-	*
pACT2/Comitinkonstrukt KIII	-	*
pACT2/Comitinkonstrukt KIV	-	*
pACT2/Comitinkonstrukt KV	-	*
pAS2/Comitinkonstrukt KI	*	-
pAS2/Comitinkonstrukt KII	*	-
pAS2/Comitinkonstrukt KV	*	-

-: Fehlende Interaktion β -Galaktosidase-Test. *: Nicht mögliche Kombination der beiden „Two-Hybrid“-Plasmide.

2.2.4.4. Northern- und Southern-Blot-Analyse für Klon 165-2

In Northern-Blot-Analysen wird eine 0,5kB große mRNA von der L28-cDNA erkannt. Diese RNA ist in den ersten Stunden der Entwicklung in hoher Menge vorhanden. Erst nach der Aggregationsphase (nach neun Stunden) nimmt die mRNA-Menge ab (Abb. 44A).

In einer Southern-Blot-Analyse erkennt die cDNA in EcoRI, EcoRV, BglII, ClaI, HindIII und XhoI geschnittener AX2-DNA je eine Bande, die in allen Fällen größer als 10 kB ist. Das Enzym BglII besitzt eine interne Schnittstelle hinter dem 9. Nukleotid der cDNA. Das für den Verdau mit BglII zu erwartende Signal bei <0,4 kB ist in dieser Untersuchung nicht erfaßt worden (Abb. 44B). Sowohl die Ergebnisse dieses Versuchs als auch der Vergleich zwischen

der cDNA und genomischen Sequenzen des Jenaer *D. discoideum*-Genomprojektes lassen vermuten, daß das ribosomale Protein L28 in *D. discoideum* von einem Gen kodiert wird.

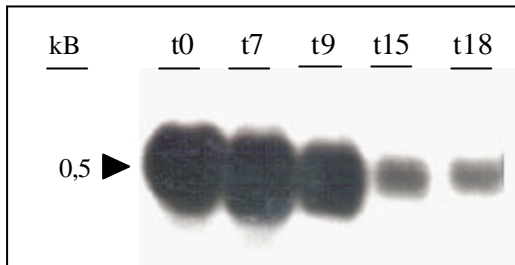


Abb. 44A: Transkriptanalyse für *D. discoideum*-L28 während des Entwicklungszyklus. Je Zeitpunkt wurden 20 µg Gesamt-RNA aus AX2 in einem 1,2%igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment aus Klon 165-2.

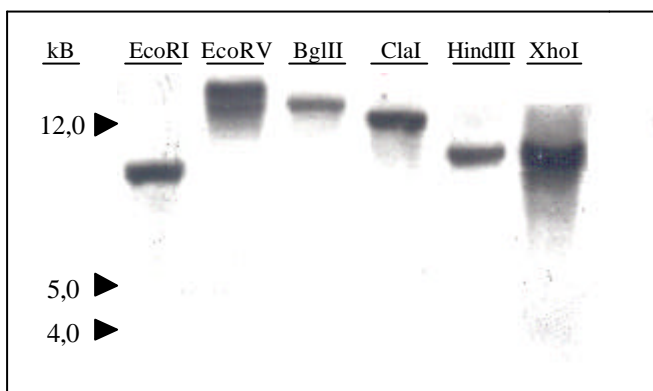


Abb. 44B: Charakterisierung des *D. discoideum*-L28-Gens. Genomische DNA aus AX2 wurde mit den angegebenen Enzymen geschnitten, in einem Agarosegel (0,7%, Tris-Borat-Puffer, pH8,0) aufgetrennt und auf Nylonmembran übertragen. Als Probe wurde das radioaktiv markierte cDNA-Fragment aus Klon 165-2 verwendet.

2.2.4.5. Lokalisation des Proteins aus Klon 165-2 in *D. discoideum*

2.2.4.5.1. Konstruktion des GFP-L28-Expressionsvektors

Mehrere Versuche zur Expression des Proteins P165-2 für eine Antikörpergewinnung sind fehlgeschlagen. Deshalb wurde zur Lokalisation des L28-Homologs die cDNA mit glatten Enden in den GFP-Expressionsvektor pDexRH stromabwärts (3') vom GFP-Gen kloniert. Das Fusionsprotein wird unter der Kontrolle des Aktin-15-Promotors in *D. discoideum* exprimiert (Abb. 45).

Nach Elektroporation von pDexRH-GFP-P165-2 in AX2 und in die Comitine-defiziente Mutante 1a1 wurden G418 resistente Transformanten isoliert und die Expression des GFP-L28-Fusionsproteins in der Fluoreszenzmikroskopie getestet.

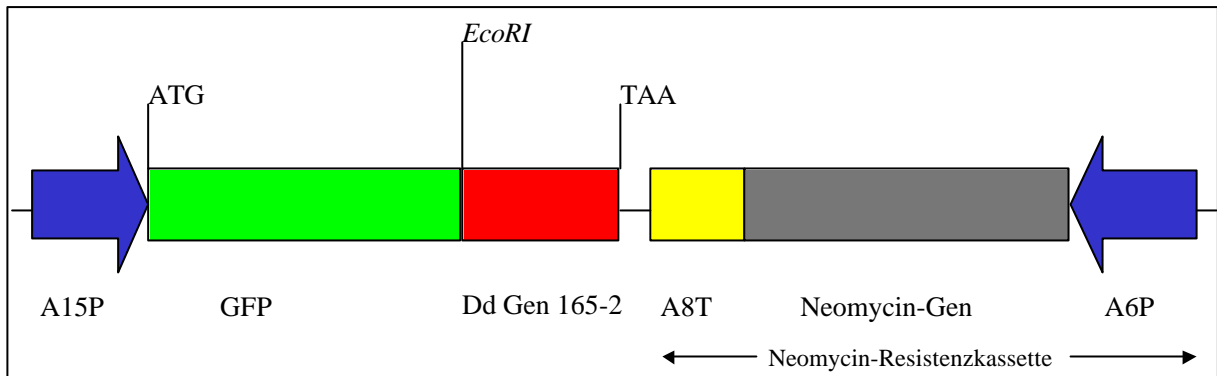


Abb. 45: Konstruktion des pDexRH-GFP-P165-2-Expressionsvektors. Die cDNA-Sequenz von 165-2 wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Sma*I und *Xho*I aus dem pACT2-Vektor isoliert. Nach Überführung der *Xho*I-Schnittstelle in ein glattes Ende wurde die cDNA in die aufgefüllte *Eco*RI-Schnittstelle des pDexRH-Vektors eingeführt. Dabei ist das Stopcodon des Gens 165-2 erhalten geblieben. Der Aktin-8-Terminator der Neomycin-Resistenzkassette ermöglicht auch eine Terminierung der GFP-L28-RNA.

2.2.4.5.2. Lokalisation des GFP-L28-Fusionsproteins in fixierten AX2- und 1a1-Zellen

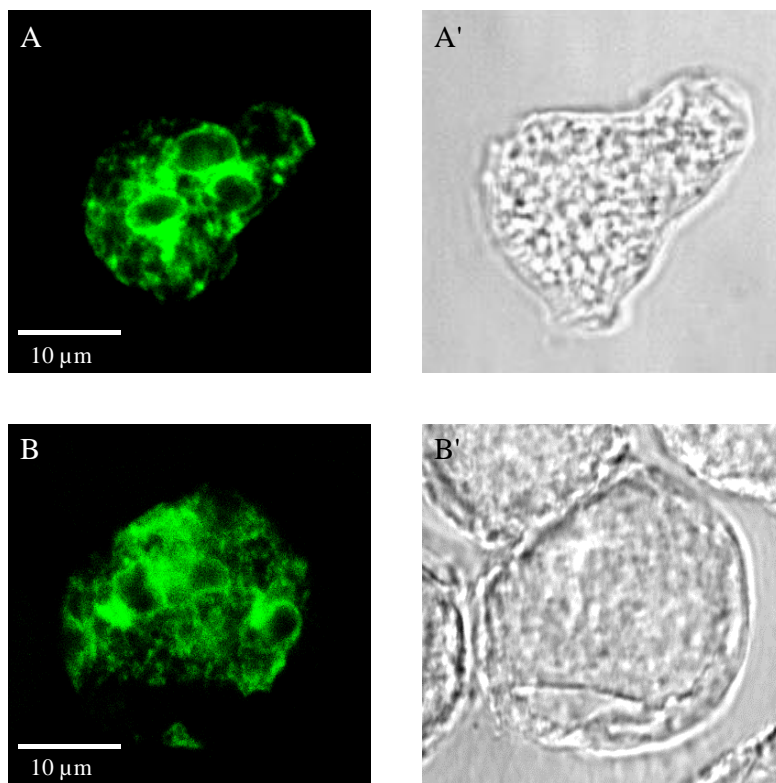


Abb. 46: Lokalisation des GFP-L28-Fusionsproteins in fixierten AX2- und 1a1-Zellen. Die Zellen wurden dazu mit Methanol bei einer Temperatur von -20°C fixiert. A: GFP-L28 exprimierende AX2-Zellen; A': Phasenkontrast zu A; B: GFP-L28 exprimierende 1a1-Zellen; B': Phasenkontrast zu B.

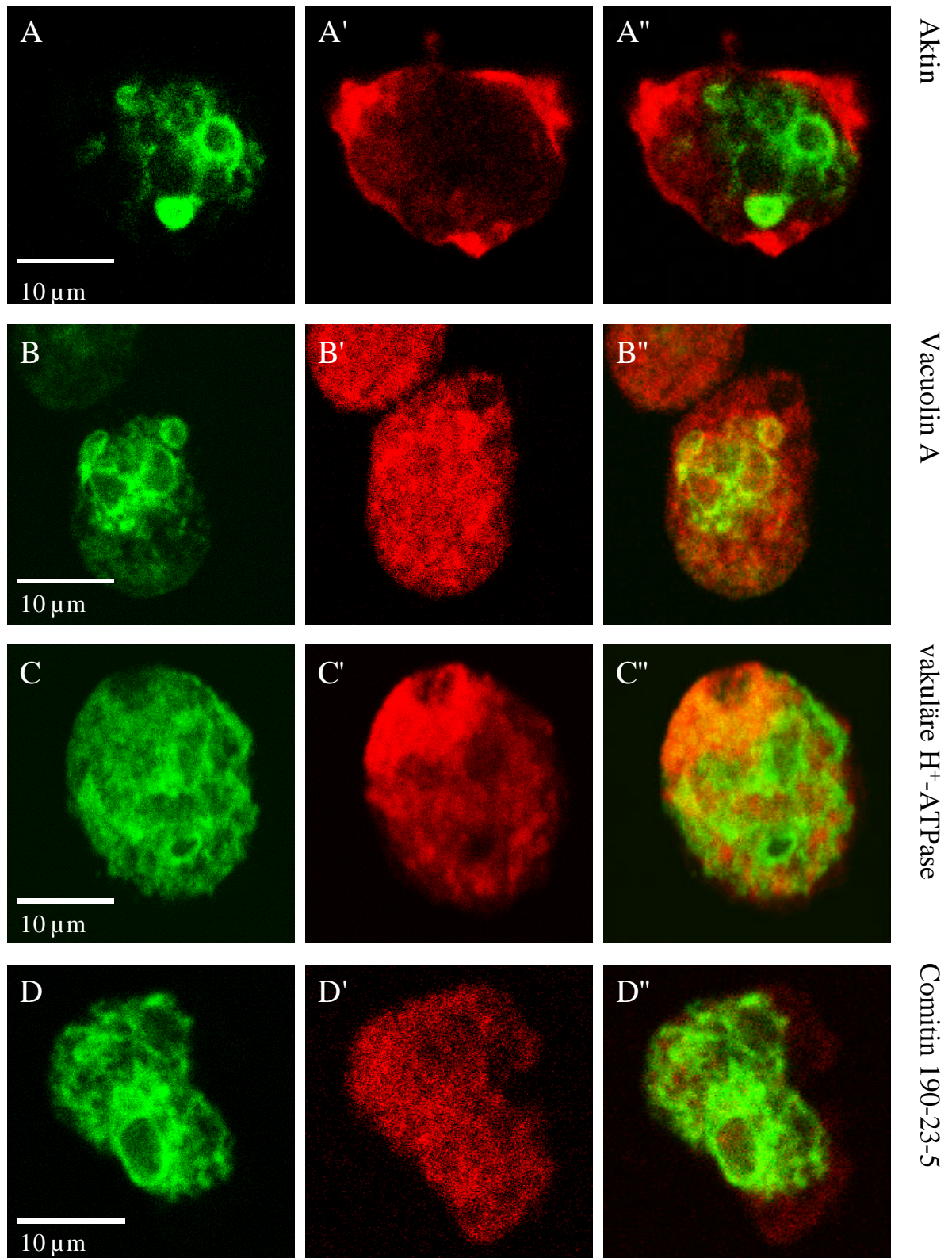
Das Fusionsprotein zeigt in beiden *D. discoideum*-Stämmen dieselbe intrazelluläre Verteilung. Es ist an netzartigen Strukturen lokalisiert, die andere Zellstrukturen zu umschließen scheinen. Neben diesen retikulären Strukturen zeigen sich noch lokale Anhäufungen des Fusionsproteins in der Nähe der umschlossenen Zellkompartimente. Ein

ähnliches Muster der Verteilung des GFP-L28-Proteins wurde auch in lebenden AX2- und 1a1-Zellen beobachtet. Es könnte sich bei den durch das GFP-L28 hervorgehobenen Strukturen entweder um Vakuolen, den Golgi-Apparat oder die ER-Membran handeln (Abb. 46).

2.2.4.5.3. Immunfluoreszenzstudien an fixierten ein GFP-L28-Fusionsprotein exprimierenden Wildtypzellen

Eine eindeutige Identifizierung der durch das GFP-L28-Fusionsprotein aufgezeigten Strukturen ist anhand der GFP-Fluoreszenz allein nicht möglich. Deshalb wurden Kolo-kalisationsstudien an Methanol-fixierten AX2-Zellen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt, die spezifisch für bestimmte zelluläre Kompartimente sind. Dafür standen folgende Antikörper zur Verfügung, mAk Act-1-7 für Aktin und 221-1-1 für Vacuolin A, einem Protein, das zusammen mit der Isoform B, an endocytotischen Prozessen in der Zelle beteiligt ist. Beide Isoformen kommen in post-lysosomalen Vakuolen und in der Plasmamembran vor. Der Antikörper Act-1-7 markiert die Plasmamembranbereiche. Die durch die GFP-Fluoreszenz wiedergegebenen Strukturen liegen im Cytosol innerhalb der vom mAk Act-1-7 markierten Zellmembran (Abb. 47A-A"). Die Überlagerung der von mAk 221-1-1 erkannten Vakuole mit der GFP-Fluoreszenz zeigt, daß das L28-Protein nicht in post-lysosomalen Vakuolen lokalisiert ist (Abb. 47B-B"). Neben den post-lysosomalen Vakuolen, die sich durch einen neutralen bis basischen pH-Wert auszeichnen, gibt es noch Vesikel mit einem sauren pH-Wert. Diese azidischen Vesikel besitzen Untereinheiten der vakuolären H⁺-ATPase gegen die der monoklonale Antikörper mAk 221-35-2 gerichtet ist. Die Abbildungen 47C-C" lassen erkennen, daß die durch GFP-L28 und mAk 221-35-2 markierten Zellbereiche nicht identisch sind. Immunfluoreszenzuntersuchungen mit dem monoklonalen anti-Comitin-Antikörper 190-23-5 ergaben ebenfalls keine Kolo-kalisation zwischen den Comitin-bedeckten Vesikeln und den durch die GFP-Fluoreszenz hervorgehobenen Zellstrukturen (Abb. 47D-D"). Eine Überlagerung wurde jedoch detektiert bei dem Vergleich des durch den anti-Comitin-Antikörper 190-340-8 markierten Golgi-Apparates mit der GFP-Fluoreszenz. Danach ist L28 im Golgi-Apparat lokalisiert (Abb. 47E-E"). Zusätzlich ist das L28-Homolog an ER-Membranen lokalisiert, da sich die durch GFP-L28 aufgezeigten Strukturen mit den durch den monoklonalen anti-Interaptin-Antikörper 260-60-10 erkannten ER-Membranen überlagern (Abb. 47F-F"). Dieses Ergebnis wurde durch die Immunfluoreszenzanalyse mit dem monoklonalen Antikörper 221-135-1 bestätigt (Abb. 47G-G"). Der monoklonale

Antikörper 221-135-1 erkennt die ER-assoziierte Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), die die Oxidation freier Sulfhydryl-Gruppen zur Bildung von Disulfidbrücken katalysiert. PDI unterstützt die Faltung und Assoziation vieler Proteine, die in das Lumen des ER transportiert werden.



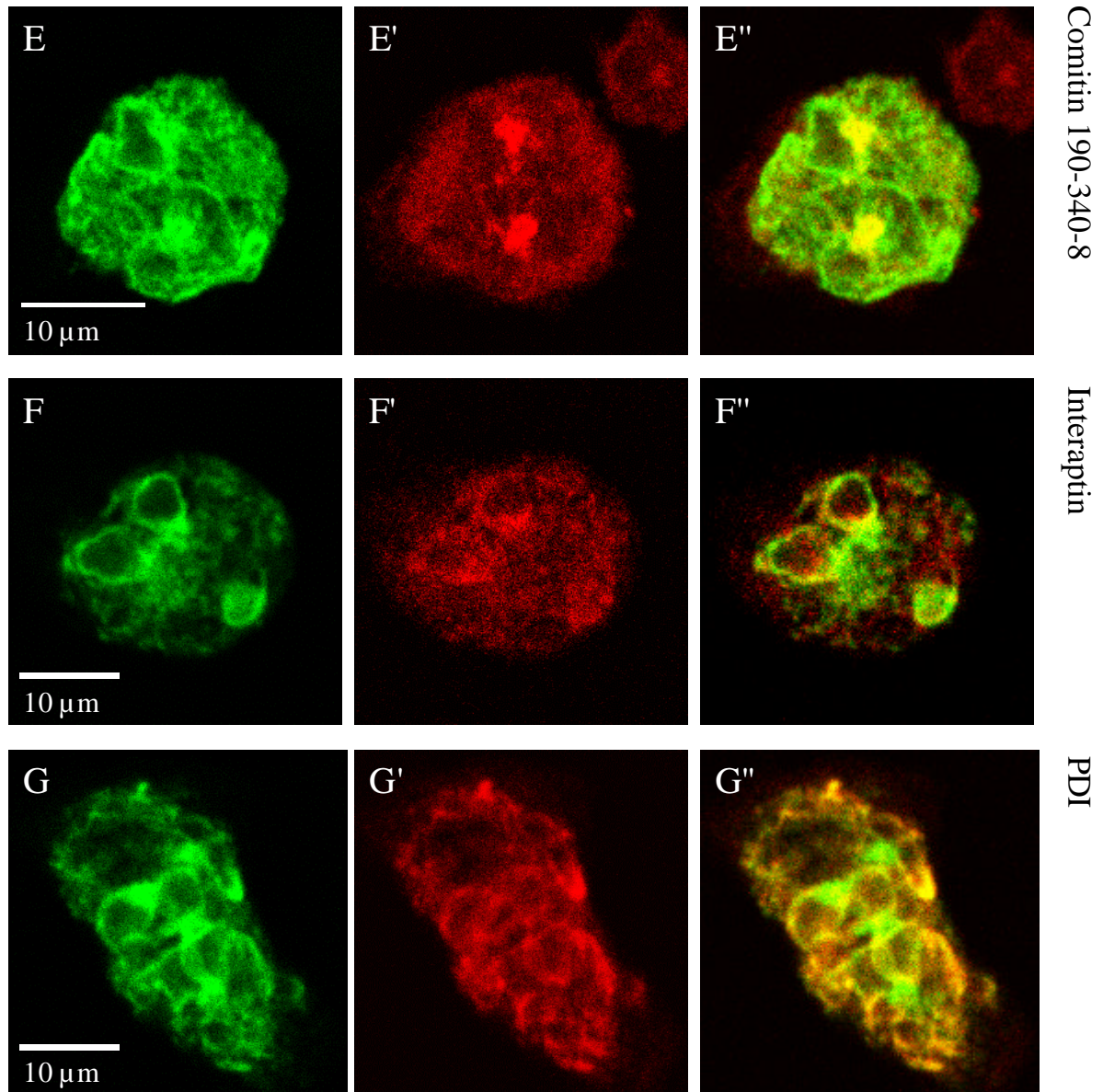


Abb. 47: Immunfluoreszenzstudien zur Lokalisation des GFP-P165-2-Fusionsproteins in fixierten AX2-Zellen. Die Zellen wurden mit Methanol bei -20°C fixiert und verschiedenen monoklonalen Antikörpern markiert. Die Detektion des ersten Antikörpers erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten Ziegenanti-Maus-IgG-Antikörper. Folgende monoklonale Antikörper wurden verwendet: A', A'' mAk Act-1-7 gegen Aktin, B', B'' mAk 221-1-1 gegen Vacuolin A, C', C'' mAk 221-35-2 gegen die vakuoläre H^+ -ATPase, D', D'' mAk 190-23-5 und E', E'' mAk 190-340-8 gegen Comitin, F', F'' mAk 260-60-10 gegen Interaptin sowie G', G'' mAk 221-135-1 gegen PDI. Die Bilder A-G geben die GFP-Fluoreszenz wieder. Die Aufnahmen A'-G' stellen die von den Antikörpern markierten Strukturen dar. Die Überlagerung der Bilder A-G und A'-G' wird in den Abbildungen A''-G'' gezeigt.

2.2.4.5.4. Lokalisation von GFP-L28 in aggregierenden AX2- und 1a1-Zellen

Um die Entwicklung einzuleiten, wurden *D. discoideum*-Zellen nach zweimaligem Waschen bei einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml in Soerensen-Phosphat-Puffer gehungert. Zu Beginn des Experimentes (t_0) und nach sechs Stunden (t_6) wurde ein Aliquot entnommen und die Zellen nach Absitzen auf dem Deckgläschen für die anschließende Immunfluoreszenzanalyse mit Methanol bei -20°C fixiert.

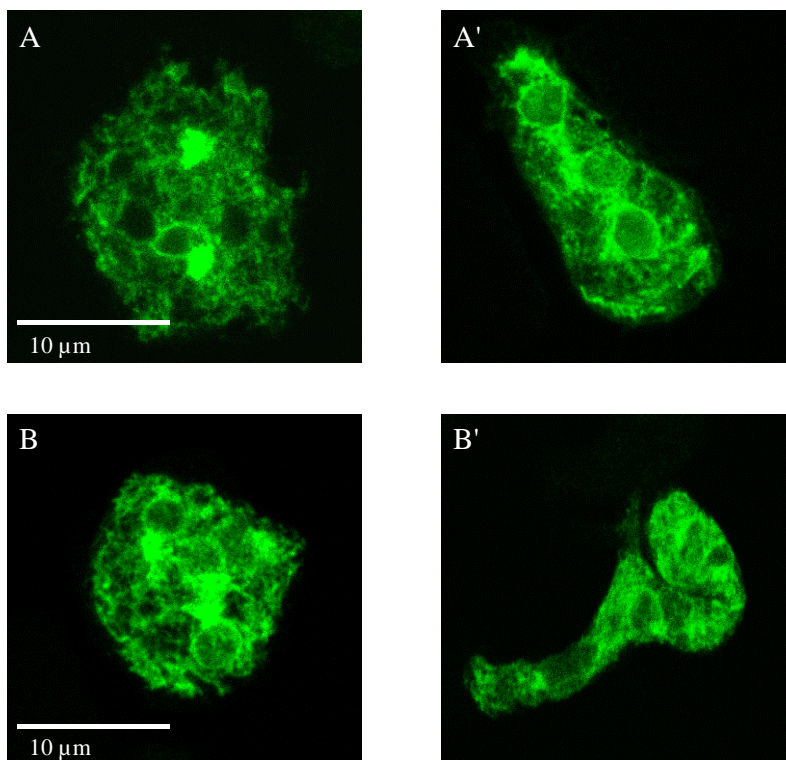


Abb. 48: Lokalisation von GFP-L28 in aggregierenden AX2- und 1a1-Zellen. Dazu wurden die Zellen sechs Stunden in Soerensen-Phosphat-Puffer gehungert, dann mit Methanol fixiert und im konfokalen Mikroskop beobachtet.

A: AX2 zum Zeitpunkt t_0
A': AX2 zum Zeitpunkt t_6
B: 1a1 zum Zeitpunkt t_0
B': 1a1 zum Zeitpunkt t_6

Nach sechsständiger Inkubation in Soerensen-Phosphat-Puffer sind die Zellen beider *D. discoideum*-Stämme langgestreckt. Die Verteilung des GFP-L28-Fusionsproteins in 1a1- und AX2-Zellen hat sich im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 nicht verändert. Das Fusionsprotein ist weiterhin an der ER-Membran und am Golgi-Apparat lokalisiert (Abb. 48).

2.2.5. Der „Two-Hybrid“-Klon 180-3

Die Inserts der beiden „Two-Hybrid“-Klone 180-3 und 197-4 enthalten eine identische Sequenz von 267 Nukleotiden. Ein Computervergleich mit der Datenbank des *D. discoideum*-cDNA-Projekts (Klon SSK360) zeigt, daß dem von beiden Klonen kodierten Protein die ersten 16 Aminosäuren fehlen. Die kodierende Region ist intronfrei, wie ein Vergleich mit Sequenzierungsdaten des Jenaer *D. discoideum* Genomprojekts ergab.

Das vollständige Protein P180-3 besteht aus 105 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 11,55 kDa (Abb. 49). Der errechnete pI beträgt 11,84. Die Sekundärstruktur ist durch einen hohen α -Helix-Anteil (50,48%) und einen hohen ungeordneten Struktur-Anteil (27,61%) gekennzeichnet. Als weitere sekundäre Strukturelemente werden laut Computerprogramm „Pôle Bio-Informatique Lyonnais“ β -Faltblätter (14,29%) und β -Schleifen (7,62%) vorhergesagt [Geourjon und Deléage, 1995].

```

1  ATG TCA TCA GCT GCC ACT AAA CCA GTT AAA AGA TCA GGT ATC ATT AAA
1  M  S  S  A  A  T  K  P  V  K  R  S  G  I  I  K

49  GGT TTC AAC AAA GGT CAT GCA GTA GCT AAA CGT ACT GTT ACC TCA ACC
17  G  F  N  K  G  H  A  V  A  K  R  T  V  T  S  T

97  TTC AAA AAA CAA GTT GTC ACC AAA CGT GTT GCT GCC ATC CGT GAT GTT
33  F  K  K  Q  V  V  T  K  R  V  A  A  I  R  D  V

145 ATT CGT GAA ATC TCC GGT TTC TCC CCA TAC GAA CGT CGT GTT TCT GAG
49  I  R  E  I  S  G  F  S  P  Y  E  R  R  V  S  E

193 TTA TTA AAA TCA GGT TTA GAT AAA CGT GCC CTC AAA GTT GCC AAG AAG
65  L  L  K  S  G  L  D  K  R  A  L  K  V  A  K  K

241 AGA TTA GGT TCA ATC CAA GCT GGT AAA AAG AAG AGA GAT GAT ATT GCT
81  R  L  G  S  I  Q  A  G  K  K  K  R  D  D  I  A

289 AAC ATC AAC AGA AAA GCC TCC GCC AAA TAA
97  N  I  N  R  K  A  S  A  K  *
```

Abb. 49: cDNA- und Aminosäuresequenz des Proteins P180-3. Die Nukleotidsequenz ist in der oberen Reihe dargestellt und die Aminosäuresequenz sowie das Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die nicht im „Two-Hybrid“-Klon 180-3 kodierten Aminosäurebereiche sind kursiv und rot gedruckt. Die einfach gedruckten Zahlen am linken Rand geben die Positionen der Basen relativ zum A des Startcodons ATG wieder. Die durch Fett- und Kursivdruck hervorgehobenen Zahlen am linken Rand bezeichnen die relative Aminosäureposition bezogen auf das Startmethionin.

Das *D. discoideum*-Protein P180-3 besitzt zwei potentielle Phosphorylierungsstellen für die cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase (AS 60-63, 100-103). Neben zwei weiteren möglichen Caseinkinase-II-Phosphorylierungsstellen (AS 56-59, 68-71) existieren noch drei mögliche Proteinkinase-C-Phosphorylierungsstellen (AS 32-34, 39-41, 103-105). Eine vom Computer-unterstützte Motivsuche mit dem Programm „MotifFinder“ erkennt homologe Bereiche zum ribosomalen Protein L29 (AS23-52) und zu Proteinen mit POU-Domänen (AS 81-101). POU-Domänen sind hochgeladene, 155 bis 162 Aminosäuren lange Regionen, die

Ähnlichkeiten zu den drei Transkriptionsfaktoren Pt-1, Oct-1 und Oct-2 aus Säugern, sowie zum Expressionsprodukt des Nematoden-Gens Unc-86 aufweisen. Diese zweiteilige DNA-bindende Domäne besteht aus zwei konservierten Bereichen, einer N-terminalen POU-spezifischen Region und einer C-terminalen „homoeo“-Domäne. Beide Subdomänen enthalten ein „Helix-turn-Helix“-DNA-bindendes Motiv und sind an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt [Latchman, 1999; Kakizawa *et al.*, 1999; Sturm und Herr, 1988].

Die Identifizierung des Proteins P180-3 als ribosomales Protein L36 aus *D. discoideum* wird durch einen Aminosäuresequenzvergleich mit ribosomalen Proteinen L36 aus anderen Organismen bestätigt.

Tabelle 14: Übersicht über identische und homologe Aminosäuren zwischen ribosomalen Proteinen L36 aus anderen Organismen und dem Protein P180-3

Organismus	Zugriffsnummer	<i>D. discoideum</i>	<i>M. musculus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<i>S. pombe</i>	AL035655	38,4% / 76,8%	52,5% / 79,8%	53,3% / 79,8%	27,3% / 74,7%
<i>D. melanogaster</i>	AAF45531.1	31,3% / 65,2%	57,4% / 80,0%	58,3% / 79,1%	*
<i>M. musculus</i>	AA314832	42,9% / 72,3%	97,1% / 100%	*	*
<i>H. sapiens</i>	AF077043-1	40,9% / 73,3%	*	*	*

Die erste Prozentangabe gibt die Zahl identischer Aminosäuren an, die zweite steht für homologe Aminosäuren. Mit dem Begriff „homologe“ Aminosäuren wird die Summe aller identischen und ähnlichen Aminosäuren bezeichnet. Die prozentualen Angaben beziehen sich immer auf die gesamte Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins L36 des links stehenden Organismus. Unter der Zugriffsnummer ist das entsprechende Protein im Computerprogramm „Advanced Blast Search“ zu finden.

Der prozentuale Anteil identischer Aminosäuren zwischen dem Protein P180-3 aus *D. discoideum* und ribosomalen Proteinen L36 aus anderen Organismen liegt zwischen 31,3 und 42,9%. Der Anteil homologer Aminosäuren zwischen P180-3 und den ribosomalen Proteinen beträgt 65,2 bis 76,8% und entspricht in seiner Größenordnung den Anteilen an homologen Aminosäuren zwischen *S. pombe* und *M. musculus*, *H. sapiens* und *D. melanogaster*, sowie dem Verhältnis von *D. melanogaster* zu *M. musculus* und *H. sapiens*. Die höchste Zahl konservierter Aminosäuren weisen die ribosomalen Proteinen L36 aus dem Menschen und der Maus untereinander auf (Tabelle 14 und Abb. 50).

Dd	MSSAATKPVKR	SGI	IKGFNKGH	AVAKR	-----	TVTSTFKK	QVV	TKRVA	AI	R	D	V	I	49																																															
Sp	-----	MAPGLV	VGLNKG	KTLTKR	-----	QLPERPS	RRK	GHL	SKRTA	FV	R	S	I	V	42																																														
Dm	-----	MAVRYE	LAI	GLNKG	HKT	SK	IRNV	KYTGD	KKV	GLR	GS	R	L	K	NIQ	TR	H	T	K	F	M	R	D	L	V	54																																			
Mm	-----	MALRYP	MAV	GLNKG	H	KV	TKN	-----	VSKPR	HS	RRR	G	R	L	T	K	H	T	K	F	V	R	D	M	I	44																																			
Hs	-----	MALRYP	MAV	GLNKG	H	KV	TKN	-----	VSKPR	HS	RRR	G	R	L	T	K	H	T	K	F	V	R	D	M	I	44																																			
Dd	REIS	GF	SPY	ERRV	SE	LLK	SGL	DKR	AL	KV	AK	K	R	L	G	S	I	Q	A	G	K	K	R	D	D	I	A	N	---	R	K	A	S	A	K	--	105																								
Sp	REV	AG	F	APY	ERRV	MEL	IR	NS	Q	D	K	R	A	R	K	L	A	K	K	R	L	G	T	L	K	R	A	K	G	I	E	E	L	T	S	V	I	Q	S	S	R	L	A	H	----	99															
Dm	RE	V	V	G	H	A	P	Y	E	K	R	T	M	E	L	L	K	V	S	K	D	K	R	A	L	K	F	L	K	R	R	L	G	T	H	I	R	A	K	R	K	R	E	E	L	S	N	I	L	T	Q	L	R	K	A	Q	T	H	A	K	115
Mm	RE	V	C	A	F	A	P	Y	E	R	R	A	M	E	L	L	K	V	S	K	S	K	R	A	L	K	F	I	K	K	R	V	G	T	H	I	R	A	K	R	K	R	E	E	L	S	N	V	L	A	A	M	R	K	A	A	A	K	D	105	
Hs	RE	V	C	G	F	A	P	Y	E	R	R	A	M	E	L	L	K	V	S	K	D	K	R	A	L	K	F	I	K	K	R	V	G	T	H	I	R	A	K	R	K	R	E	E	L	S	N	V	L	A	A	M	R	K	A	A	A	K	D	105	

Abb. 50: Vergleich der Aminosäuresequenz des Proteins P180-3 aus *D. discoideum* mit homologen Proteinen aus *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), *Drosophila melanogaster* (Dm), der Maus (Mm) und dem Menschen (Hs). Die rot unterlegten Aminosäuren sind in allen fünf Proteinen identisch. Grün hervorgehobene Aminosäuren von *D. discoideum* sind mindestens mit einer Aminosäuren eines Proteins eines anderen Organismus identisch.

2.2.5.1. Charakterisierung der Bindungsdomäne des L36-Proteins zu Comitín

Der Klon 180-3 kodiert für die Aminosäuren 16 bis 105 des ribosomalen Proteins L36 von *D. discoideum*. Zur Charakterisierung der Bindungsdomäne dieses Proteins zu Comitín werden verschiedene Teilstücke des Klons in einem „Two-Hybrid“-Experiment untersucht. Dabei wurden die P180-3-Konstrukte mittels PCR oder Restriktionsverdau des Fragments aus Klon 180-3 hergestellt. Tabelle 15 beschreibt die Klonierungsstrategie für die einzelnen Konstrukte.

Tabelle 15: Klonierungsstrategie für die Konstrukte des Klons 180-3

Konstrukt	Nukleotide	Aminosäuren	Restriktionsenzyme für			Oligonukleotide
			pAS2	pACT2	PCR	
180-3 A	58 - 189	16 - 63	Ddel b.e./EcoRI	EcoRI/XhoI b.e.	*	*
180-3 B	58 - 264	16 - 88	*	BamHI/XhoI	BamHI/XhoI	pACT21/Rib36-264
180-3 C	79 - 264	27 - 88	*	BamHI/XhoI	BamHI/XhoI	Rib36-79/Rib36-264
180-3 D	79 - 318	27 - 105	*	BamHI/XhoI	BamHI/XhoI	Rib36-79/Rib36-318
180-3 E	163 - 318	55 - 105	*	BamHI/XhoI	BamHI/XhoI	Rib36-161/Rib36-318

Legende: Nukleotide – entsprechende Nukleotide des ribosomalen Proteins L36; Aminosäuren – entsprechende Aminosäuren des ribosomalen Proteins L36; Restriktionsenzyme für pAS2 – verwendete Schnittstellen im Klon 165-2; Restriktionsenzyme für pACT2 – Klonierungsstellen des pACT2-Plasmids; Restriktionsenzyme für PCR – über PCR angehängte Schnittstellen; Oligonukleotide – verwendete Oligonukleotide für die PCR; b.e. – glatte Enden

Der β -Galaktosidase-Test fiel für alle Konstrukte mit pAS2/Filamin sowie für die Konstrukte 180-3A und 180-3E mit pAS2/Comitín-Plasmid negativ aus. Das Konstrukt 180-3C zeigte nur eine schwache Interaktion mit Comitín, während die Konstrukte 180-3B und 180-3D wie Klon 180-3 eine starke Wechselwirkung mit Comitín aufwiesen. Die Aminosäuren 1 bis 16 des von Klon 180-3 kodierten Proteins wurden bei diesem Experiment nicht berücksichtigt,

da sie auch bei der „Two-Hybrid“-Durchmusterung im Klon 180-3 und 197-4 nicht vorlagen. Folglich kann dieser Aminosäurebereich für eine Interaktion mit Comitin nicht von Bedeutung sein. Somit stellen die Aminosäuren 27 bis 88 des ribosomalen Proteins L36 das kleinste Teilstück dar, das eine Protein-Protein-Wechselwirkung mit Comitin im „Two-Hybrid“-Versuch zeigt (Abb. 51). Dieses Teilstück 180-3C des ribosomalen Proteins L36 zeichnet sich durch eine ähnlich hohe Basizität wie das Gesamtprotein aus. Das Konstrukt besitzt acht von elf Argininresten und acht von 18 Lysinresten des vollständigen Proteins. Der errechnete isoelektrische Punkt beträgt für die vermutliche Bindungsdomäne 11,68 und ist damit nur um 0,16 niedriger als der pI des gesamten ribosomalen Proteins L36. Die meisten potentiellen Phosphorylierungsstellen des Gesamtproteins sind innerhalb der vermutlichen Bindungsdomäne zum Comitin lokalisiert. Weiterhin sind in diesem Aminosäurebereich des Proteins P180-3 die meisten Aminosäuren (55,7%) identisch mit denjenigen aus ribosomalen Proteinen L36 anderer Organismen (Abb. 50).

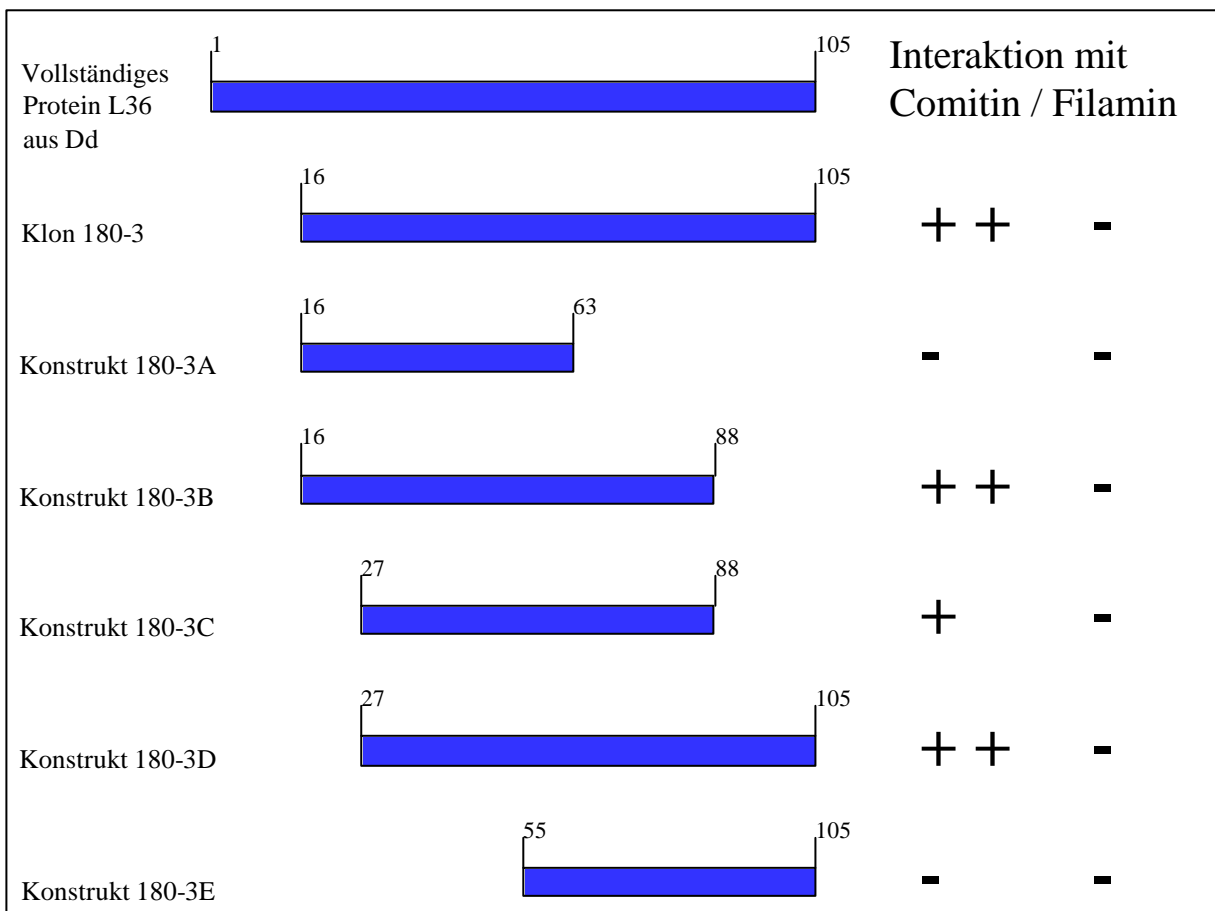


Abb. 51: Bestimmung der Bindungsdomäne des ribosomalen Proteins L36 zu Comitin. Die Zahlen bezeichnen die jeweilige Aminosäureposition bezogen auf das vollständige Protein. +/++ gibt die Stärke der gefundenen Interaktion wieder. Ein Minuszeichen verweist auf eine fehlende Wechselwirkung zwischen den P180-3-Konstrukten in pACT2 und Comitin in pAS2.

2.2.5.2. „Two-Hybrid“-Experiment mit dem ribosomalen Protein L36 aus Maus

Im folgenden „Two-Hybrid“-Experiment sollte geklärt werden, ob auch ribosomale Proteine L36 aus Säugern, die eine hohe Homologie zu dem im Klon 180-3 kodierten Protein aufweisen, eine Interaktion mit Comitín aus *D. discoideum* eingehen können. Dazu wurde das ribosomale Protein L36 aus *M. musculus* ausgewählt, das eine hohe Homologie (42,6% identische und 78,7% homologe Aminosäuren) im Bindungsbereich von *D. discoideum*-L36 zu Comitín und darüber hinausgehend Homologie zum gesamten Protein besitzt. Maus L36-Sequenz aus Mausmuskel wurde mit den Oligonukleotiden Mau36-1 mit interner BamHI-Schnittstelle und Mau36-2 mit eingebauter XhoI-Schnittstelle amplifiziert. Das 0,3 kB große PCR-Fragment wurde in den pGemTeasy-Vektor ligiert, mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI ausgeschnitten und in den entsprechend vorbereiteten pACT2-Vektor kloniert. Die Sequenz wurde überprüft. Dabei wurden Abweichungen zu der in der Datenbank enthaltenden Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins L36 aus Maus festgestellt. Ein Sequenzierungsfehler ist unwahrscheinlich, da stets alle drei Basen jedes betroffenen Codons ausgetauscht worden sind. Außerdem ist die Homologie zwischen der hier bestimmten Aminosäuresequenz des ribosomalen Protein L36 und dem Protein aus Klon 180-3 um 7% höher als in den Literaturdaten. Die ausgetauschten Aminosäuren gibt die Tabelle 16 wieder.

Tabelle 16: Gegenüberstellung der ausgetauschten Aminosäuren des ribosomalen Proteins L36 aus der Maus

Organismus	Sequenzquelle	Aminosäure				
		31	35	66	98	99
Maus	Literatur ¹⁾	S	N	S	E	E
Maus	RT-PCR	G	K	D	R	K
<i>D. discoideum</i>	Klon 180-3	S	K	L	N	K

1) Literatur: Advanced Blast-Search , Zugriffsnummer AAF45531.1

Die Maus-cDNA wurde in pACT2 kloniert und die Interaktion mit Comitín in einem „Two-Hybrid“-Versuch getestet. Auch in diesem Fall konnte, wie beim L28-Homologen, keine Interaktion mit Comitín festgestellt werden.

2.2.5.3. „Two-Hybrid“-Experiment zur Bestimmung der Bindungsdomäne des Comitíns für das L36-Protein

Zur Bestimmung der Bindungsdomäne des Comitíns für Protein P180-3 wurden die schon in Abschnitt 2.2.2.1. beschriebenen Comitínkonstrukte verwendet. Die Klonierungsstrategie, um die kodierende Sequenz aus Klon 180-3 in pAS2 einzuführen, entspricht dergleichen Vorgehensweise wie bei dem *D. discoideum*-L28-Homolog (s. Abschnitt 2.2.4.3.). Der β -

Galaktosidase-Test fiel für alle getesteten Versuchskombinationen negativ aus, unabhängig davon, ob die Nukleotidsequenz der Comitinkonstrukte im pACT2- oder pAS2-Vektor bzw. die Sequenz für das L36-Proteins in pACT2 oder pAS2 vorlagen (Tabelle 17). Die Bindungsstelle von Comititn zum ribosomalen Protein L36 aus *D. discoideum* konnte also mit Hilfe des „Two-Hybrid“-Systems nicht näher eingegrenzt werden.

Tabelle 17: Versuche zur Bestimmung der Bindungsdomäne des Comitins zu L36

Plasmid/Konstrukt	pAS2/P180-3	pACT2/P180-3
pACT2/Comitinkonstrukt KI	-	*
pACT2/Comitinkonstrukt KIII	-	*
pACT2/Comitinkonstrukt KIV	-	*
pACT2/Comitinkonstrukt KV	-	*
pAS2/Comitinkonstrukt KI	*	-
pAS2/Comitinkonstrukt KII	*	-
pAS2/Comitinkonstrukt KV	*	-

Ein Minuszeichen bedeutet keine gefundene positive Interaktion. Ein Sternchen steht für eine nicht mögliche Kombination der beiden „Two-Hybrid“-Plasmide.

2.2.5.4. Gen- und Transkriptcharakterisierung des Klons 180-3

In der Northern-Blot-Analyse erkannte das cDNA-Fragment aus Klon 180-3 eine 0,4 kB große mRNA, die in vegetativen und aggregierenden Zellen (t0 bis t9) in großen Mengen vorhanden ist. Nach der Aggregationsphase nimmt die mRNA-Expression deutlich ab, so daß nach fünfzehn Stunden die RNA mittels Northern-Blot kaum noch detektierbar ist. Die mRNA-Expression des ribosomalen Proteins L36 verläuft also ähnlich zu der des ribosomalen Proteins L28 (Abb. 52A).

Für die Southern-Blot-Analyse wurde genomische Wildtyp-AX2-DNA mit Restriktionsenzymen verdaut, die keine Schnittstellen in der cDNA besaßen. EcoRI ergibt ein starkes und ein schwächeres Signal bei 8 bis 9 kB. Im Southern-Blot wird nur ein Signal für BglII detektiert. Restriktionsverdauung mit den Enzymen PstI bzw. SacI führt zu Signalen bei 8 bzw. 7 kB. Zusätzlich lassen sich noch jeweils zwei weniger gut auflösbare Banden oberhalb von 10 kB erkennen. Die Southern-Blot-Analyse mit XbaI liefert ein starkes Signal bei 5 kB und eine schwächere Bande bei 8 kB. Im Bereich oberhalb von 10 kB zeigen sich noch weitere, kaum aufgetrennte Signale. Die Restriktionsanalyse mit dem Enzym ClaI führt neben einem schwachen Signal bei 0,9 kB auch zu einem starken Signal bei 7 kB. Aufgrund der mehrmals im Rahmen dieser Southern-Blot-Analyse gefundenen starken und schwachen Signale muß die cDNA-Sequenz von Klon 180-3 Sequenzbereiche besitzen, die auch in anderen Genen vorhanden sind (Abb. 52B).

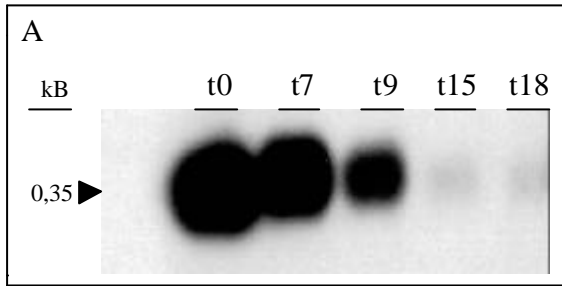
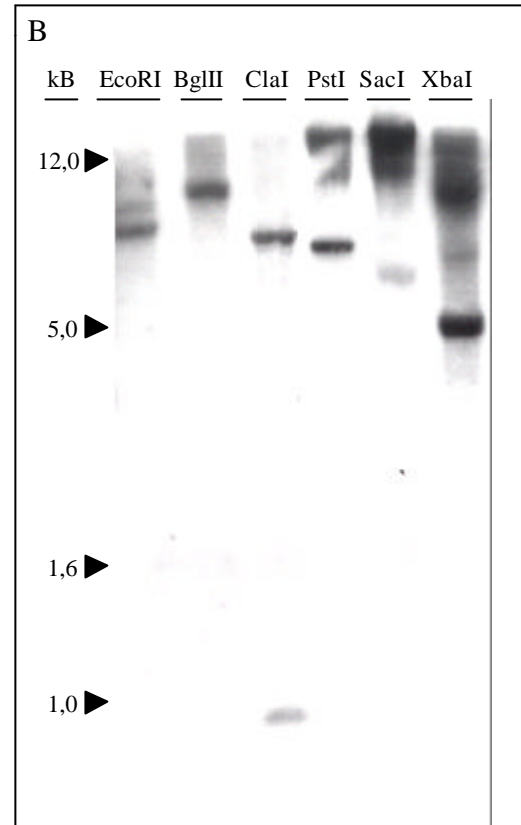


Abb. 52A: Transkriptanalyse für *D. discoideum*-L36 während des Entwicklungszyklus. 20 µg AX2-Gesamt-RNA je Zeitpunkt wurden in einem 1,2%igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Als Probe wurde das radioaktiv markierte, 0,4 kB große cDNA-Fragment aus Klon 180-3 verwendet.

Abb. 52B: Charakterisierung des *D. discoideum*-L36-Gens. AX2-DNA wurde mit den angegebenen Enzymen verdaut, in einem 0,7%igen Agarosegel (Tris-Borat-Puffer, pH 8,0) aufgetrennt und geblotet. Die Hybridisierung erfolgte mit dem cDNA-Insert aus Klon 180-3.



2.2.5.5. Konstruktion von GFP-L36-Expressionsvektoren

Die intrazelluläre Lokalisation des ribosomalen Proteins L36 aus *D. discoideum* sollte mit Hilfe eines GFP-Fusionsproteins geklärt werden, da Antikörper gegen das Protein nicht zur Verfügung standen. Die kodierende Sequenz des Klons 180-3 ist jeweils über ihr 5'-Ende an das GFP-Gen der zwei vorhandenen GFP-Expressionsvektoren, den pDexRH- und pBsr-GFP-Vektor, ligiert worden. Das pDexRH-Plasmid enthält eine Neomycin-, der pBsr-GFP-Vektor eine BlasticidinS-Resistenzkassette. Die Überprüfung der Fusionsstelle zwischen dem GFP-Gen und der Nukleotidsequenz des Klons 180-3 ist durch Sequenzierung erfolgt. Die Expression des GFP-P180-3-Fusionsproteins steht in beiden Vektoren unter der Kontrolle des Aktin-15-Promotors (Abb. 53). Es konnten trotz mehrfach wiederholter Transformationen dieser Plasmide in *D. discoideum* keine Zellen selektiert werden, die das GFP-L36-Fusionsprotein exprimierten.

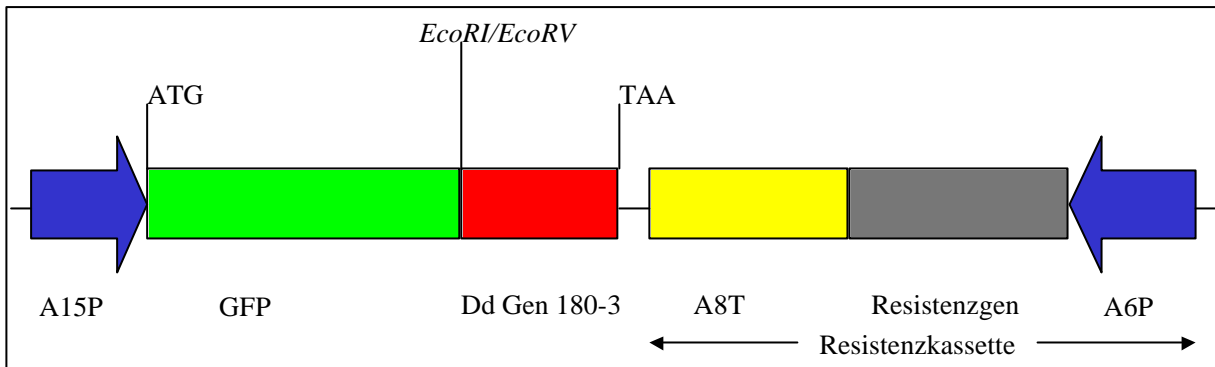


Abb. 53: Übersicht über die GFP-L36-Expressionsvektoren. Konstruktion des pDexRH-GFP-L36-Expressionsvektors: Die cDNA-Sequenz von 180-3 wurde als SmaI/XhoI-Fragment aus dem pACT2-Vektor geschnitten. Nach Überführung der XhoI-Schnittstelle in ein glattes Ende ist die cDNA in die aufgefüllte EcoRI-Schnittstelle des pDexRH-Vektors eingeführt worden. Dabei ist das Stopcodon des L36-Gens erhalten geblieben. Der pDexRH-GFP-L36-Expressionsvektor enthält eine Neomycin-Resistenzkassette. Konstruktion des pBsr-GFP-L36-Expressionsvektors. Die cDNA-Sequenz von Klon 180-3 ist mit den Restriktionsenzymen SmaI und XhoI aus dem pACT2-Vektor isoliert und mit glatten Enden in die EcoRV-Schnittstelle des pBsr-GFP-Vektors kloniert worden. Dadurch ist das Stopcodon der cDNA-Sequenz von Klon 180-3 erhalten geblieben. Der pBsr-GFP-L36-Expressionsvektor besitzt eine BlasticidinS-Resistenzkassette.

2.3. Comitín-Homologe in anderen Organismen

Die Kreuzreaktionen der anti-Comitín-spezifischen Antikörper 190-23-5, 190-68-1 und 190-340-8 mit Proteinen aus Säugerzellen in Immunoblots und Immunfluoreszenzuntersuchungen gaben Hinweise auf das Vorhandensein ähnlicher Proteine in Säugern. Eine Computer-unterstützte Datenbanksuche nach Homologen des *D. discoideum*-Comitíns lieferte ein *D. melanogaster*-Protein unbekannter Funktion (Advanced Blast Search, Zugriffsnummer AE003528.1). Dieses 479 Aminosäure lange Protein zeigt innerhalb der ersten 159 Aminosäuren Homologien (14,5% identische und 30,3% homologe Aminosäuren) zu dem dreifach repetitiven Sequenzbereich des N-Terminus von Comitín (As 1- 115) (Abb. 54).

Dd	-----MELLRQGEHLHSTSRSTLESKCRKYKLIQNDGNLVLYIC-----SLKSSQDEYC	44
Dm	MANNNYAGFNFCGTQYNTGOVSYPVNTNATYANAAAYQNAAVAAAGGGYGAAGAGAGAT	60
	+ + + + + * * * * * *	
Dd	LWSSASCCKGHGHPYRLSMQEDGNLVIYDSRNSAIWASGTMGHGVRGHYSMKLRS-----	104
Dm	SGPGAGGYGGYGDYRSAMQYDATKTFYQSPASYNASGSTASVSKTHYSAPPVKLNQVKGK	120
	+ + + * * * * * + + +	
Dd	-----SGQIVVYDKYKQILYSSK	122
Dm	MDKSNGGPKPPSSAPAGNNYSGYDTALYNAA	159
	* * * * *	

Abb. 54: Übersicht über identische und homologe Aminosäuren zwischen Comitín aus *D. discoideum* (Dd) und einem Protein aus *D. melanogaster* (Dm). Rot hinterlegte Aminosäuren sind identisch, grün hervorgehobene Aminosäuren ähnlich zueinander. Ein Pluszeichen markiert die für den hydrophoben Charakter der N-terminalen Kerndomäne verantwortlichen Aminosäuren. Ein Sternchen steht für Aminosäuren, die an der Proteinoberfläche die Mannose-bindende Domäne bilden.

Dieser Aminosäurebereich des Comitíns weist Homologie zu Lektinen auf. Es sind vor allem zwischen Comitín und Mannose-bindenden Lektinen diejenigen Aminosäuren konserviert, die an der Proteinoberfläche die Bindung des Zuckermoleküls vermitteln [Jung *et al.*, 1996].

Comitín scheint auch Homologien zu Säugerproteinen zu besitzen. Ein Computer-unterstützter Vergleich mit menschlichen EST-Klonen findet 19-mal dieselbe homologe Sequenz, die 28,6% identische und 56,7% homologe Aminosäuren zu Comitín in diesem Aminosäurebereich der N-terminalen Kerndomäne aufweist (Abb. 55). Dieses Comitínteilstück enthält auch die Erkennungsdomäne des Comitín-spezifischen Antikörpers 190-68-1. Keine Homologien wurden zwischen Comitín und den translatierten Sequenzen von Maus-EST-Klonen gefunden.

Dd	--MELLRQ--GEHLHSTSRSTLESKCRKYKLTMQNDGNLVLYIGSLKSQSDHEYCLWSSAS	56
Hs	RLLSGIRCYLGELHSTSMWNSIWCRRWRIVSCSRMNIFFKNSKKEQSEPEIDCLCVNVV	60

Abb. 55: Übersicht über identische und ähnliche Aminosäuren zwischen Teilstücken von Comitín aus *D. discoideum* (Dd) und einem Protein aus *Homo sapiens* (Hs). Rot gefärbte Aminosäuren sind zwischen beiden Sequenzen identisch. Grün unterlegte Aminosäuren sind ähnlich zueinander.

O. Weiner untersuchte bereits früher die Existenz von Comitín-Homologen in Maus NIH 3T3-Fibroblasten, Maus Makrophagen, in der Maus-Neuroblastoma-Zelllinie Neuro 2A, Ratten-Glia-Zellen RN22, menschlichen HeLa-Zellen, Keratinocyten und Maus-Myelomazellen. In Immunoblots konnte er in Zellhomogenaten ein 17 kDa und ein 36 kDa großes Protein mit Comitín-spezifischen Antikörpern 190-23-5, 190-68-1, 190-340-8 und 115-242-4 identifizieren. Die Comitín-spezifischen Antikörper markierten in Immunfluoreszenzuntersuchungen punktförmige, vesikuläre, sowie um den Kern angeordnete Strukturen. Allerdings ergab nur der Antikörper 190-68-1 in den Immunoblots und in den Immunfluoreszenzuntersuchungen in allen Zelltypen eine Markierung. Die anderen Comitín-spezifischen Antikörper reagierten nicht in allen Zelltypen positiv.

Zusätzliche Experimente an neuronalen Rattenzellen PC12 sollen die Ergebnisse von **O. Weiner** untermauern und abrunden. Zunächst wurden PC12-Zellhomogenate in einem Western-Blot daraufhin untersucht, ob der Antikörper 190-68-1 Proteine erkennt. Dazu wurden die PC12-Zellen mit einem Natriumdeoxycholat haltigem Puffer aufgeschlossen und nach Zentrifugation Überstand (PC12 Ü) und Pellet (PC12 P) im SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Der mAk 190-68-1 markierte im Pellet zwei Proteine bei 17 kDa und 36 kDa. Im Überstand wurde kein Signal detektiert. In *D. discoideum* AX2-Zellen erkennt der Antikörper nur das 24 kDa Protein Comitín. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen an den oben aufgeführten Zelllinien. In Zellfraktionierungsexperimenten wurde gezeigt, daß Comitín im Saccharose-Gradienten in zwei unterschiedlich dichten Populationen vorlag. Die „leichte“ Comitín-Population (0,95 bis 1,32 M Saccharose) wies eine identische Verteilung wie Plasma- und Golgi-Membranen auf. Die zweite, „schwere“ Comitín-Population (1,4-2,49 M Saccharose) kam in Saccharosefraktionen vor, die ER und Nuklei enthielten [Weiner, 1993]. Dieser Zellfraktionierungsversuch wurde mit den PC12-Zellen wiederholt, um den Bereich zu identifizieren, in dem die im Western-Blot (Abb. 56) detektierten Proteine vorkommen. Das Zellhomogenat wurde dazu auf einen aus 1,32 M und 2,5 M Saccharose bestehenden Stufengradienten aufgetragen. Nach der Zentrifugation wurde sowohl die „leichte“ Fraktion (Grenzschicht 1,32 M Saccharose) als auch die „schwere“ Fraktion (Grenzschicht 2,5 M Saccharose) im Western-Blot untersucht. Der anti-Comitín-Antikörper markierte nur in der schweren Fraktion das 17 kDa und das 36 kDa Protein (ohne Abbildung). Versuche, mittels

Immunpräzipitation mit mAk 190-68-1 das 17 kDa und das 36 kDa Protein aus dem PC12-Zellhomogenat anzureichern, waren nicht erfolgreich. Auch die intrazelluläre Lokalisation mit Immunfluoreszenzspektroskopie gelang nicht, da der zweite Cy3-konjugierte Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper stets zu einem stark leuchtenden Hintergrund führte.

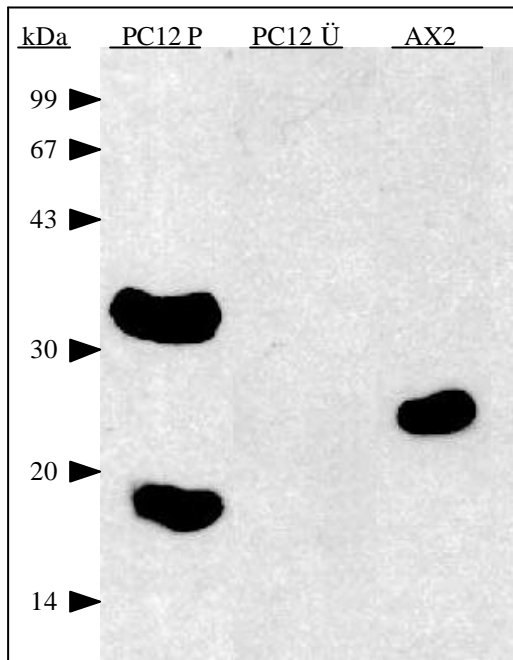


Abb. 56: Nachweis von Comitín-Homologen in PC12-Zellen. 3×10^6 PC-Zellen wurden in RIPA-Puffer aufgenommen und mit einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet (PC12 P) und der Überstand (PC12 Ü) in SDS-Probenpuffer aufgenommen, zusammen mit Proteinextrakt aus *D. discoideum*-Wildtypzellen im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Der Western-Blot wurde mit dem anti-Comitín-Antikörper 190-68-1 inkubiert. Die Detektion des ersten Antikörpers erfolgte mit einem Peroxidase-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper. Im PC12-Pellet zeigten sich zwei Signale bei 17 kDa und 36 kDa, während keine Banden im Überstand detektiert wurden. In AX2-Zellen war nur das 24 kDa Protein Comitín nachweisbar.

3. Diskussion

3.1. Analyse der *in-vivo*-Funktion von Comitín

Bisher konnten mit Hilfe von biochemischen Methoden die *in-vitro*-Funktionen von Comitín, wie seine Fähigkeit zur Mannose- und Aktinbindung und zur Dimerbildung aufgeklärt werden. Seine Lokalisation an Vesikelmembranen und am Golgi-Apparat erfolgte an fixierten Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz und durch Zellfraktionierung mit anschließender Immunpräzipitation aus Membranpräparationen. Dazu sind Comitín-spezifische-Antikörper verwendet worden. Die Funktion von Comitín in lebenden Zellen konnte bisher nicht geklärt werden. Die Schaffung einer Comitín-Minusmutante in *D. discoideum* sollte deshalb weiteren Aufschluß über die *in-vivo*-Funktionen dieses Proteins geben. Das Comitín-Gen wurde dazu mit Hilfe eines „gene-replacement“-Vektors inaktiviert.

3.1.1. Zellbiologische Untersuchungen der Comitín-defizienten Mutante

Da Comitín als ein aktinbindendes und Membran-assoziiertes Protein beschrieben wurde [Weiner *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 1996], lag der Schwerpunkt der zellbiologischen Untersuchungen der Minusmutante auf Aktin- und Membran-vermittelten zellulären Prozessen wie Wachstum in Flüssigkultur, Verhalten gegenüber osmotischem Streß und Phagozytose. Zunächst möchte ich die Ergebnisse zum Wachstumsverhalten in axenischem Medium diskutieren. Das Ausschalten der Comitín-Expression führt in der Mutante zu keinem veränderten Wachstumsverhalten in axenischem Medium im Vergleich zum Elternstamm AX2. Sowohl die Generationszeiten als auch die Zelldichte in der stationären Wachstumsphase verändern sich je nach gewählten Bedingungen für beide *D. discoideum*-Stämme gleichermaßen. Das Fehlen einzelner aktinbindender Proteine in *D. discoideum* wie der Membran-assoziierten Proteine Hisactophilin I und II oder der F-Aktin Quervernetzer α -Aktinin und Filamin führt ebenfalls zu keinem veränderten Wachstumsverhalten [Stoeckelhuber *et al.*, 1996; Rivero *et al.*, 1996]. Die Comitín-defiziente Mutante zeigt nicht nur ein unverändertes Wachstumsverhalten in Flüssigkultur, sondern auch ihre Pinozytosefähigkeit ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert [v. Krempelhuber, 1997]. Pinozytose ist ein Prozeß, der durch das Aktin-Zytoskelett vermittelt wird und der Aufnahme von Flüssigkeit dient. Eine Korrelation zwischen herabgesetzter Pinozytoseleistung und

erniedrigtem Wachstumsverhalten wurde für Myosin-I-Mutanten sowie für die 34 kDa-Protein/ α -Aktinin- und α -Aktinin/Filamin-Doppelmutanten gefunden [Novak *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1996; Novak und Titus, 1997; Rivero *et al.*, 1996]. Die Verknüpfung von Wachstum in axenischem Medium und Pinozytose weist auf eine zentrale Rolle des Aktin-Zytoskeletts in diesen zellulären Vorgängen hin.

Zur intrazellulären Lokalisation von Comitín in *D. discoideum* sind Untersuchungen an GFP-Comitín-exprimierenden AX2- und 1a1-Mutanten-Zellen durchgeführt worden. Die dort beobachteten kleineren und größeren vesikulären Strukturen sind denen vergleichbar, die auch von den monoklonalen anti-Comitín-Antikörpern 190-23-5, 190-68-1 und 190-340-8 erkannt werden. Allerdings war eine Kofärbung von GFP-Fusionsprotein und Antikörpern nicht möglich, da das GFP-Comitín-Fusionsprotein bei der Zellfixierung verloren ging. Nur der mAk 190-340-8 markiert in *D. discoideum* den Golgi-Apparat, so daß sich die Frage stellt, ob Comitín tatsächlich eine Komponente des Golgi-Komplexes ist. Diese Frage muß bejaht werden, da andere Experimente auf die Anwesenheit von Comitín im Golgi-Apparat hinweisen. In Zellfraktionierungen weisen die Comitín-dekorierten Membranen die gleiche Verteilung wie die Plasma- und somit auch die trans-Golgi-Membranen auf. Diese Comitín-bedeckten Membranstrukturen entsprechen in Größe, Form und Lage dem in elektronenmikroskopischen Studien identifizierten Golgi-Apparat. Außerdem wird die Comitín-dekorierte Membranstruktur durch eine Depolymerisierung der Mikrotubuli *in-vivo* reversibel fragmentiert, was auch für den Golgi-Apparat typisch ist [Weiner *et al.*, 1993].

Osmotischer Streß führt zu einer Veränderung des Zellvolumens und beeinflusst möglicherweise indirekt somit das Aktin-Zytoskelett. In Einklang damit steht, daß das Fehlen F-aktinbindender Proteine wie z. B. von α -Aktinin und Filamin in einer *D. discoideum*-Doppelmutante eine erniedrigte Widerstandsfähigkeit gegenüber osmotischem Schock zur Folge hat [Rivero *et al.*, 1996]. Hyperosmotischer Streß stört aber auch Transportprozesse. So wurde beobachtet, daß der anterograde Transport zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat beeinträchtigt ist, ohne daß der Rücktransport behindert ist. Dadurch kommt es zu einer Entleerung des Golgi-Apparates in das endoplasmatische Retikulum [Lee und Linstedt, 1999]. Eine fehlende Expression von Comitín als F-aktinbindendes Membran-assoziiertes Protein von Vesikeln und des Golgi-Apparates könnte zu einer Beeinträchtigung des anterograden Transportweges zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat sowie der Umordnung des Zytoskeletts führen. Eine Comitín-Defizienz sollte deshalb unter Streßsituationen stärkere Auswirkungen haben.

In den entsprechenden Versuchen hat sich gezeigt, daß die Überlebensfähigkeit der Comitindefizienten Mutante 1a1 in Vergleich zum Wildtyp AX2 infolge hyperosmotischen Stresses erheblich eingeschränkt ist. Dies weist auf eine durch das Ausschalten eines aktinbindenden und Vesikel-assoziierten Proteins reduzierte Fähigkeit des corticalen Zytoskeletts hin, internen Kräften zu widerstehen. Diese Kräfte werden durch eine Änderung des Zellvolumens hervorgerufen. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von Comitine an der Zellantwort auf osmotischen Schock zeigen Immunfluoreszenzstudien an fixierten AX2-Zellen, die osmotischem Streß ausgesetzt worden sind. Neben Comitine wurde auch eine veränderte intrazelluläre Verteilung für Aktin, Hisactophilin und das DdLIMP-Protein detektiert. Die nach Inkubation in hypertotonischer Lösung an der Plasmamembran markierten Comitinebedeckten Strukturen weisen auf eine Transportfunktion dieser Vesikel zwischen dem Zytoplasma und der Plasmamembran und auf eine Blockade des Rücktransportes hin. Der mAk 190-340-8 zeigt nach osmotischem Streß in *D. discoideum*-Zellen nicht mehr den typischen Golgi-Apparat an. Die Auflösung des Golgi-Apparats infolge veränderter äußerer osmotischer Bedingungen ist auch schon in anderen Zelltypen wie in COS7-Zellen und HeLa-Zellen beobachtet worden. Die Umverteilung des Golgi-Apparats sowie des ER-Golgi-Intermediat-Kompartiments in das endoplasmatische Retikulum wird dafür als Ursache angesehen. Diese Golgi-Partikel lassen sich in zwei Klassen unterteilen: Ein Teil der Golgi-Partikel wandert vollständig und sehr schnell in das endoplasmatische Retikulum, was anhand der Markerproteine GM130 [Nakamura *et al.*, 1995] und Mannosidase-II [Novikoff *et al.*, 1993] gezeigt worden ist, und die zweite Klasse von Golgi-Partikeln läßt sich anhand der Proteine GPP130 [Linstedt *et al.*, 1995] und Giantin [Linstedt und Hauri, 1993] beobachten. Ihre durch osmotischen Streß ausgelöste Aufnahme in das endoplasmatische Retikulum geschieht nur unvollständig und langsamer als bei der anderen Gruppe von Golgi-Markern [Lee und Linstedt, 1999]. Die Entleerung des Golgi-Apparates und des ER-Golgi-Intermediat-Kompartiments in das endoplasmatische Retikulum läßt sich mit einer Blockierung der anterograden Transportschritte vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat erklären. Ist der anterograde Transportweg unterbrochen, so kommt es zu einer Anreicherung von Golgi- und ER-Golgi-Intermediat-Kompartiment-Vesikeln im endoplasmatischen Retikulum, ohne daß der Rücktransport möglich ist. Dies führt letztendlich zur Auflösung des Golgi-Apparates und des ER-Golgi-Intermediat-Kompartiments. Die Änderung des Zellvolumens aufgrund osmotischen Stresses macht einen Umbau des Aktin-Zytoskeletts notwendig. Die in den hier erfolgten Immunfluoreszenzuntersuchungen gefundene veränderte intrazelluläre Verteilung von Aktin bestätigt die bedeutende Rolle des corticalen Zytoskeletts

in der Zellreaktion gegenüber veränderten äußeren osmotischen Bedingungen. So können auch Melanoma-Zellen, in denen das aktinbindende Protein ABP280 ausgeschaltet ist, nicht mehr ihren Kaliumkanal aktivieren und ihr Volumen regulieren, wenn ihr Zellvolumen aufgrund äußerer osmotischer Bedingungen angeschwollen ist. Die Wiederherstellung der ABP280-Expression in diesen Zellen behebt diesen Defekt [Cantiello *et al.*, 1993]. Als Reaktion auf die veränderten osmotischen Bedingungen zeigt sich in den hier durchgeführten Untersuchungen eine geringere Anzahl von DdLIMP-Protein-dekorierten Vesikeln. Da Lysosomen sich durch eine hohe Hydrolasenaktivität auszeichnen, reichern sich in diesen Zellorganellen viele Hydrolyseprodukte wie kleine Moleküle und Aminosäuren an. Dies ist ein Grund für die Sensitivität der Lysosomen gegenüber osmotischem Streß [de Duve *et al.*, 1955]. Ein weiterer Grund für die verringerte Anzahl an Lysosomen nach Inkubation unter osmotischen Bedingungen findet sich in den die Lysosomen-Proteine betreffenden, intrazellulären Transportprozessen. Lysosomen-Hydrolasen und Lysosomen-Membranproteine entstehen im rauen endoplasmatischen Retikulum und werden durch den Golgi-Apparat transportiert. Die Transportvesikel, die diese Proteine zu den späten Endosomen bringen, schnüren sich vom Golgi-Netz ab. Aus den späten Endosomen bilden sich im weiteren Verlauf die Lysosomen [Alberts *et al.*, 1995]. Die Entleerung des Golgi-Apparates in das endoplasmatische Retikulum verhindert natürlich auch den Transport der Lysosomen-Hydrolasen und –Membranproteine durch den Golgi-Apparat und das Abschnüren der Transportvesikel. Da keine neuen Lysosomen gebildet werden können, nimmt ihre Zahl möglicherweise mit der Zeit ab.

Die Phagozytose von Feststoffen wird durch F-Aktin und aktinbindende Proteine gesteuert. Das Ausschalten aktinbindender Proteine in *D. discoideum* führt oft zu einer herabgesetzten Phagozytoseleistung. Es wurde deshalb anhand der Comitín-Minusmutante untersucht, ob auch dieses Protein an der Phagozytose beteiligt ist. Die Aufnahme von TRITC-markierter Hefe durch GFP-Aktin-Fusionsprotein exprimierende *D. discoideum*-Zellen verdeutlicht die essentielle Rolle des Aktin-Zytoskeletts für diesen Vorgang. Die GFP-Fluoreszenzaufnahmen zeigen, daß die F-Aktin-Konzentration an der Kontaktstelle mit der aufzunehmenden Hefezelle deutlich ansteigt. Es bildet sich dann ein an F-Aktin reiches Pseudopodium, das die Hefe letztlich umschließt. Nach der vollständigen Aufnahme der Hefezelle schnürt sich das Phagosom ab. Dieser Prozeß verläuft sowohl in 1a1 als auch in AX2-Zellen gleich. Die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts für die Phagozytose wird auch darin deutlich, daß dieser Prozeß sich durch das Aktin-Zytoskelett-auflösende Cytochalasin A fast vollständig unterbinden läßt [Maniak *et al.*, 1995]. Die Ausbildung der Pseudopodien und der

Phagosomen geht einher mit der Anreicherung aktinbindender Proteine wie dem 30 kDa aktinbindenden Protein [Furukawa *et al.*, 1994], Coronin [Maniak *et al.*, 1995], Myosin-IB [Fukui *et al.*, 1989] und Myosin-IK [Schwarz *et al.*, 2000]. Myosin-IK ist mit einer Länge von 858 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 94 kDa eines der kleinsten Myosine. Es wird zur Klasse der Myosine-I gerechnet, zeigt jedoch einige unterschiedliche Merkmale. Myosin-IK besitzt nur eine kurze Hals-Region ohne das typische IQ-Motiv. Die Schwanzdomäne fehlt ganz. Innerhalb des Kopfbereiches weist das Protein eine Insertion in der Oberflächenschleife auf, die hohe Ähnlichkeit zu der Aktinbindestelle in der Schwanzregion der Myosine-I zeigt [Schwarz *et al.*, 2000]. Die Anreicherung in den Pseudopodien und in der Phagosomenmembran ist jedoch keine allgemeine Eigenschaft aktinbindender Proteine, so ist z. B. α -Aktinin kein Bestandteil der Pseudopodien. Das Ausschalten der α -Aktinin-Expression in *D. discoideum* führt auch zu keiner verminderten Phagozytoseleistung. [Furukawa und Fehheimer, 1994; Witke *et al.*, 1992]. In Immunfluoreszenzanalysen mit anti-Comitin-Antikörpern konnte eine Beteiligung von Comitin an Phagozytosevorgängen nicht von der normalen Antikörpermarkierung unterschieden werden. Deshalb wurde auf eine biochemische Untersuchung der Phagosomenmembran zurückgegriffen, nach der Comitin in den Phagosomen vorhanden ist. Die Western-Blot-Analyse bestätigt außerdem die Anreicherung von Aktin und das Fehlen von α -Aktinin in der Phagosomenmembran. Die Comitin-defiziente Mutante 1a1 zeigt eine um 60% geringere Phagozytoseleistung zu Beginn der Experimente im Vergleich zum Wildtyp AX2. Nach sechzig bis achtzig Minuten erreicht die Comitin-Minusmutante ein ähnliches Gleichgewichtsniveau wie AX2 an aufgenommen Hefen. Aus dieser Beobachtung läßt sich folgern, daß das Fehlen von Comitin zu einer verminderten Aufnahme rate führt, nicht aber Prozesse beeinträchtigt, die das reife Phagosom betreffen. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse von anderen *D. discoideum*-Mutanten gestützt. So zeigt auch die Myosin-IK-defiziente Mutante zunächst eine um bis zu 30% verringerte Phagozytoserate im Vergleich zu Wildtypzellen. Der Unterschied in der Phagozytoseleistung verringerte sich wie bei der Comitin-Minusmutante mit der Zeit [Schwarz *et al.*, 2000]. In Experimenten zur Phagozytose von Bakterien weist die α -Aktinin- und Filamin-defiziente Doppelmutante in den ersten fünf Minuten eine gleiche Aufnahme rate wie der Wildtyp auf. Nach dreißig Minuten zeigt die Doppelmutante eine um 40-60% verringerte Phagozytoseleistung im Vergleich zu AX2. Es wird deshalb eine spätere Beteiligung an Phagozytosevorgängen dieser beiden quervernetzenden aktinbindenden Proteine diskutiert, da diese Proteine anders als Comitin und auch Myosin-IK nicht Bestandteile der Phagosomenmembran sind [Rivero *et al.*, 1996].

Die Beteiligung aktinbindender Proteine an der Phagozytose ist unterschiedlich. Die Phagozytoserate ist in der MyosinVII-Minusmutante um 80%, in Coronin-defizienten Zellen um 70% und in der Comitín-Minusmutante um 60% reduziert, während die Myosin-IB- und Myosin-IK-defizienten Einzelmutanten nur eine um 30% verringerte Phagozytoseleistung zeigen [Titus, 1999; Maniak *et al.*, 1995; Jung und Hammer, 1990; Schwarz *et al.*, 2000]. Der schwache Effekt in den Myosin-I-Minusmutanten könnte auf die Anwesenheit anderer Myosin-I-Isoformen zurückzuführen sein, die das Fehlen von Myosin-IB bzw. Myosin-IK teilweise kompensieren können. Umgekehrt ließe sich dann auch aufgrund der stark erniedrigten Phagozytoseleistung in Coronin- und Comitín-defizienten Einzelmutanten auf die Abwesenheit anderer Isoformen oder ähnlicher Proteine in *D. discoideum* schließen, die die von den beiden Proteinen wahrgenommen Aufgaben in intrazellulären Vorgängen kompensieren können. Es könnte aber auch sein, daß diese Ersatzproteine wichtigere Funktionen haben und deshalb nicht an phagozytotischen Vorgängen beteiligt sind. Die vermehrte Anreicherung von Aktin an der Kontaktstelle mit dem aufzunehmenden Partikel sowie die Lokalisation von Comitín in der Phagosomenmembran deutet auf eine Vermittlerrolle von Comitín zwischen Vesikeltransport und Aktin-Zytoskelett hin. Dieser Zusammenhang läßt sich auch aufgrund der Experimente zum osmotischen Schock vermuten.

3.2. Bestimmung von Comitín-Bindungspartnern mit dem „Two-Hybrid“-System

Nach bisherigen Erkenntnissen besitzt Comitín die Fähigkeit zur Aktinbindung und zur Dimerisierung. Die Bindung von Comitín an Vesikel- oder Golgi-Membranen und seine Assoziation an das Aktin-Zytoskelett sind zum Teil noch ungeklärt. Vermutungen gehen dahin, daß Comitín Bindungen zu Glykoproteinen eingeht, da es Homologien zu Lektinen zeigt und die Fähigkeit zur Bindung an Mannose hat. Biochemische Versuche zur Identifizierung von Bindungspartnern wie Immunpräzipitation oder Affinitätschromatographie mit gereinigtem Comitín waren nicht erfolgreich. Deshalb wurde mit dem „Two-Hybrid“-System ein genetischer Ansatz gewählt.

3.2.1. „Two-Hybrid“-cDNA-Bank-Durchmusterung

Das „Two-Hybrid“-System bietet die Möglichkeit, eine Interaktion zwischen zwei bekannten Proteinen *in-vivo* zu testen und neue Wechselwirkungspartner eines Proteins durch cDNA-Bank-Durchmusterung zu finden. Es eignet sich für eine Vielzahl von Proteinen, die normalerweise im Zellkern, Zytoplasma, in den Mitochondrien oder extrazellulär exprimiert werden. Auch die Untersuchung von assoziierten Membranproteinen ist möglich [Fields und Sternglanz, 1994; Phizicky und Fields, 1995]. Da Comitín ein auf Golgi- und Vesikel-Membranen lokalisiertes Protein ist, kann es für eine „Two-Hybrid“-cDNA-Bank-Durchmusterung eingesetzt werden. Comitín ist hierfür im pAS2-Plasmid über seinen N-Terminus mit der DNA-bindenden Domäne des Gal4-Transkriptionsfaktors verknüpft worden. Einige Hybridgene können nach ihrer Expression in Hefezellen schädlich oder sogar letal sein, da eine Wechselwirkung des Fusionsproteins mit zellulären Vorgängen in der Hefe eintreten kann [Allen *et al.*, 1995]. Aus diesem Grund wurde das Wachstumsverhalten von transformierten Y190-Hefezellen mit pAS2 ohne Fragment und dem pAS2/Comitín verglichen. Danach hat die Expression des Gal4-BD/Comitín-Fusionsproteins keinen Einfluß auf das Wachstum der Hefezellen (s. Abschnitt 2.2.1.1., Abb. 29). Vor Beginn der cDNA-Bank-Durchmusterung wurde mit einem β -Galaktosidase-Test ausgeschlossen, daß das Gal4-BD/Comitín-Fusionsprotein eine Autoaktivierung der Transkription der Reportergene LacZ und His3 auslöst. Andernfalls hätten Comitínkonstrukte verwendet werden müssen, die den für die Transkriptionsaktivierung verantwortlichen Bereich nicht mehr besitzen. Die „Two-Hybrid“-cDNA-Bank-Durchmusterung ist mit zwei vorhandenen vegetativen cDNA-Banken und einer entwicklungspezifischen cDNA-Bank von *D. discoideum* durchgeführt worden. Comitín wird zu allen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus in *D. discoideum* exprimiert. Die RNA-Expressionsstärke nimmt allerdings nach zwölf Stunden deutlich ab, kann aber noch im Northern-Blot detektiert werden [Noegel *et al.*, 1990]. Deshalb ist auch der Einsatz der entwicklungspezifischen cDNA-Bank in der „Two-Hybrid“-Durchmusterung gerechtfertigt. Andernfalls hätten Interaktionspartner des Comitíns gefunden werden können, die *in-vivo* eigentlich nicht miteinander wechselwirken können, da sie zu verschiedenen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus exprimiert werden. Die *D. discoideum*-cDNA-Banken enthalten zwischen 8×10^6 und $2,8 \times 10^7$ Klone. In der „Two-Hybrid“-Durchmusterung sind für jede cDNA-Bank rund 1×10^5 unabhängige Klone auf eine Interaktion mit Comitín untersucht worden. In keinem Fall ist die vollständige cDNA-Bank in der „Two-Hybrid“-Durchmusterung analysiert worden und schwächer in den cDNA-Banken repräsentierte Klone sind

unter Umständen nicht erfaßt worden. Möglicherweise sind deshalb seltene Bindungspartner des Comitins nicht ermittelt worden. Nach der sequentiellen Transformation der Y190-Hefezellen mit pAS2/Comitin und pACT2/Fragment wachsen neben größeren und weiter untersuchten His⁺-Klonen sehr viele kleinere Kolonien auf den SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT-Selektionsagarplatten. Die His⁺-Selektion auf den SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT-Agarplatten unterbindet trotz des kompetitiven Inhibitors 3-Amino-1,2,4-triazol nicht vollständig das Wachstum von His⁻ Y190-Hefezellen. Alle 1176 größeren His⁺-Kolonien aus den drei cDNA-Bank-Durchmusterungen wurden zur weiteren Analyse ausgewählt. Nach zwei β -Galaktosidase-Tests verblieben nur noch insgesamt 201 His⁺- und LacZ⁺-Klone. Der Ausschluß von über 800 Hefeklonen beruht hauptsächlich auf His⁺- aber LacZ⁻-Hefezellen. Die kontinuierliche Histidinselektion bewirkt durch Zellteilung die Elimination irrelevanter cDNA-Bank-Plasmide, die möglicherweise mit einem pACT2-Plasmid, das zu einem His⁺- und LacZ⁺-Klon führt, kotransformiert worden sind [Fields und Sternglanz, 1994]. Die His⁺- und LacZ⁺-Hefeklone verlieren durch die Cycloheximidselektion spontan das pAS2/Comitin-Plasmid und enthalten nur noch das pACT2/Fragment-Plasmid. Die Cycloheximid-resistenten Hefen werden einem erneuten β -Galaktosidase-Test unterzogen. Dadurch können Hefeklone detektiert und ausgeschlossen werden, deren Fragment im pACT2-Vektor die LacZ- und His3-Reportergene autokatalytisch aktiviert. Aus den verbliebenen 155 Klonen sind die pACT2/cDNA-Plasmide isoliert und in *E. coli* transformiert worden. Die anschließende Isolation und Restriktionsverdauung der Plasmid-DNA zeigte, daß 55 Klone ein pACT2-Plasmid ohne Fragment enthielten. Die Retransformation der pACT2/Fragment-Plasmide in den Y190-Hefestamm erfolgt gleichzeitig mit pAS2/Comitin oder mit pAS2/Filamin zur Kontrolle. Nach dem anschließenden β -Galaktosidase-Test sind 23 Klone als falsche Positive erkannt worden. In diesen 23 Hefeklonen wird das LacZ-Reportergen immer transkribiert, unabhängig davon, ob eine Interaktion mit einem Gal4BD/Fusionsprotein stattfindet. Solche positiven Klone kodieren für Proteine, die eine eigene DNA-bindende Domäne (z. B. Transkriptionsfaktoren) besitzen, oder deren Aminosäuresequenz in manchen Bereichen der Aktivierungsdomäne ähneln. Weiterhin führen Proteine, die an Proteine mit der Fähigkeit zur Wechselwirkung mit der Gal4-Aktivierungsdomäne binden, zu falschen positiven Klonen. Andere Proteine interagieren mit der Gal4-Bindungsdomäne und nicht mit dem zu untersuchenden Protein [Allen *et al.*, 1995; Hengen, 1997]. Falsche positive Klone, in denen die Reportergene aktiviert werden, ohne daß eine Interaktion potentieller Bindungspartner notwendig ist, sind nach der Cycloheximidselektion durch einen β -Galaktosidase-Test von der weiteren Analyse ausgeschlossen worden. Die Kontrollretransformation mit dem

pACT2/Fragment-Plasmid und dem pAS2/Filamin-Plasmid dient der Identifizierung solcher falsch positiver Hefeklone, die an der Gal4-Bindungsdomäne noch einen beliebigen Proteinrest benötigen, um die Transkription der Reportergene einzuleiten. 70 Klone zeigten nach der Retransformation in Y190-Hefezellen weder mit pAS2/Comitin noch mit pAS2/Filamin eine positive Reaktion auf den β -Galaktosidase-Test. Möglicherweise enthielten diese Klone vor der Cycloheximidselektion mehrere pACT2/Fragment-Plasmide, von denen mindestens eines durch Interaktion mit dem Gal4/BD-Fusionsprotein oder durch Autoaktivierung der Reportergene ein positives Ergebnis im β -Galaktosidase-Test bewirkte. Die Auswahl von nur einer getesteten Cycloheximid-resistenten Kolonie eines Klons zur weiteren Analyse ist deshalb unter Umständen zu klein gewesen. Dies würde auch die hohe Zahl an pACT2-Plasmiden ohne Fragment erklären. Es ist aber auch möglich, daß in den 70 pACT2-Plasmiden, die nach der Retransformation mit pAS2/Comitin kein positives Ergebnis im β -Galaktosidase-Test zeigten, eine Mutation erfolgt ist, die die Expression des Hybrids aus cDNA-Bank-Fragmenten und der DNA der Aktivierungsdomäne verhindert. Zellen, die solche Plasmide in sich tragen, überleben normalerweise nicht die nachfolgenden Selektionsschritte [Fields und Sternglanz, 1994]. Die Lösung dieses Problems bedarf weiterer Aufklärung und Untersuchungen an mehreren tatsächlich Cycloheximid-resistenten Kolonien eines Hefeklons. Nur sieben von ursprünglich $3,83 \times 10^5$ durchmusterten Klonen der cDNA-Banken konnten als richtig positive Klone erkannt werden. Dies liegt zum einem an der Zahl der pACT2-Plasmide ohne Fragment oder derjenigen, die nach der Retransformation keinen positiven β -Galaktosidase-Test mehr zeigen, und zum anderen daran, daß im Durchschnitt nur 1/6 aller Klone einer cDNA-Bank im richtigen Leserahmen und richtig orientiert im Plasmid vorliegen [Fields und Sternglanz, 1994]. Die geringe Zahl an richtig positiven Klonen ist weiter in den vom „Two-Hybrid“-System selbst gesetzten Grenzen begründet. So können alle die Proteine, die sich nicht richtig falten oder in den Zellkern transportiert werden konnten, nicht detektiert werden. Auch Proteine, deren Interaktion mit dem zu untersuchenden Protein über das N-terminale Ende vermittelt wird, können nicht erkannt werden, da die Transkriptionsdomäne eine Wechselwirkung zwischen diesen Proteinen verhindert. Posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Disulfidbrückenbildung, Acetylierung und Phosphorylierung sind oft für eine Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen notwendig. Solche Bindungspartner können mit Hilfe des „Two-Hybrid“-Systems ebenfalls nicht gefunden werden, da posttranslationale Modifikationen im Zytoplasma der Hefezelle nicht vollzogen werden [Fields und Sternglanz, 1994; Allen *et al.*, 1995; Phizicky und Fields, 1995].

3.2.2. Charakterisierung der mit dem „Two-Hybrid“-System gefundenen potentiellen Bindungspartner von Comitín

Von den sieben als richtig positiv erkannten His⁺ als auch LacZ⁺-Klone kodierten drei für Comitín, zwei für das ribosomale Protein L28 (P165-2) und je einer für ein Uridinkinase-ähnliches Protein (P116-1) und für das ribosomale Protein L36 (P180-3). Alle drei neuen potentiellen Bindungspartner sind wie Comitín mit einem pI größer 9 basische Proteine. Eine Interaktion aufgrund Säure-Base-Anziehung kann deshalb ausgeschlossen werden. Ribosomale Proteine werden häufig als falsche Positive im „Two-Hybrid“-System gefunden, die auch ohne Interaktion mit einem Protein eine Blaufärbung der Hefen im β -Galaktosidase-Test hervorrufen. Die hier entdeckten Proteine L28 und L36 konnten aber als richtig Positive erkannt werden, da sie in Kontrolltransformationen mit pAS2/Filamin keine Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test zeigen. Im „Two-Hybrid“-Versuch wurde außerdem von einigen Teilstücken beider Proteine keine Interaktion mit Comitín detektiert.

Die Homologie zwischen P116-1 und den Uridinkinasen aus *S. pombe*, *D. melanogaster* und *H. sapiens* besteht nur in einem 64 Aminosäuren langen Teilstück. Der Anteil an identischen Aminosäuren beträgt für diesen Bereich 40%. Innerhalb dieses Aminosäureteilstücks liegt in P116-1 und in den Uridinkinasen eine potentielle ATP/GTP-Bindungsstelle mit „P-Loop“. Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen in vergleichbarer Größenordnung wurden für das Protein P116-1 nicht gefunden. Deshalb wurde es als ein Uridinkinase-ähnliches Protein eingestuft. Eine durchgehende Homologie liegt dagegen bei den „Two-Hybrid“-Proteinen P165-2 und P180-3 zu ribosomalen Proteinen L28 und L36 vor. L36 ist ein Protein der 60S ribosomalen Untereinheit aus Säugern [Marion und Marion, 1987]. Für das homologe L36 aus *Saccharomyces cerevisiae* wird vermutet, daß es möglicherweise in den Mitochondrien lokalisiert sein könnte [Andrade *et al.*, 1997]. Nach bisherigen Forschungsergebnissen kodiert in *E. coli* das rpmB,G-Operon für das ribosomale Protein L28. Es ist an der 50S Ribosomenuntereinheit lokalisiert und ist an der Ribosomensynthese beteiligt [Coleman *et al.*, 1993; Maguire und Wild, 1997].

Die „Two-Hybrid“-cDNA-Bank-Durchmusterung bestätigte außerdem die Fähigkeit von Comitín zur Dimerisierung. Der Einsatz verkürzter Comitínkonstrukte ermöglichte die Identifizierung des GYP(P)Q-Motivs als zweiten Dimerisierungsbereich neben den Aminosäuren 90-139 der N-terminalen Kerndomäne. Der Bindungsbereich der ribosomalen Proteine L28 und L36 zum Comitín konnte durch verkürzte Teilstücke der Proteine P165-2 und P180-3 eingegrenzt werden. Im Falle des Proteins P116-1 zeigte jedoch keines der

verkürzten Konstrukte eine Wechselwirkung mit Comitín in „Two-Hybrid“-Versuchen. Möglicherweise beruht die Interaktionsfähigkeit auf der Sekundär- oder Tertiärstruktur, so daß verkürzte Konstrukte nicht den gesamten, für eine Wechselwirkung mit Comitín notwendigen Aminosäurebereich erfassen. Die „Two-Hybrid“-Experimente, in denen die Bindungsdomäne des Comitíns zu den drei neu gefundenen potentiellen Bindungspartnern näher bestimmt werden sollte, sind nicht erfolgreich gewesen. Ebenso haben die verkürzten Comitínkonstrukte II und III keine Wechselwirkung mit Comitín oder den Teilstücken I und V gezeigt. Die Konstrukte II und III enthalten jedoch die beiden identifizierten Dimerisierungsdomänen von Comitín. Die Ursache für die nicht erfolgreich verlaufenen Experimente zur Bestimmung der Bindungsdomäne des Comitíns zu den drei möglichen Bindungspartnern sowie für die Comitínkonstrukte II und III könnte eine falsche Faltung der Proteine bzw. der Proteinteilstücke sein. Es besteht auch die Möglichkeit, daß die Gal4-Domänen Proteinregionen verdecken, die durch die jeweils andere Gal4-Domäne für die Interaktion zugänglich bleiben. Auch das Verhältnis der Fusionsproteine Gal4-BD/Protein (Konstrukt) und Gal4-AD/Protein (Konstrukt) zueinander ist für eine positive Aktivierung der Reportergene entscheidend. Deshalb bedeutet ein negatives Ergebnis für diese Versuche nicht, daß die zuvor ermittelten potentiellen Bindungspartner bzw. die gefundenen zwei Dimerisierungsdomänen in Comitín in Frage zu stellen sind [Fields und Sternglanz, 1994]. Northern-Blot-Analysen zeigten, daß die Transkription für L28, L36 und das Uridinkinase-ähnliche Protein zur gleichen Zeit vorhanden sind wie Comitín. Eine *in-vivo*-Interaktion zwischen Comitín und P116-1, L28 und L36 wäre also wegen desselben Expressionszeitraums durchaus möglich.

Die intrazelluläre Lokalisation der möglichen Interaktionspartner von Comitín erfolgte über Immunfluoreszenzstudien an GFP-Fusionsprotein exprimierenden AX2-Zellen, da keine Antikörper gegen diese Proteine vorhanden waren. Auch die Herstellung von Antikörpern war nicht möglich, da Versuche, die Proteine P116-1, L28 und L36 in *E. coli* zu exprimieren, scheiterten. Koimmunfluoreszenzuntersuchungen mit mAk 190-340-8 zeigten, daß L28 wie Comitín auch am Golgi-Apparat lokalisiert ist. Das L28-Protein ist nach Immunfluoreszenzstudien mit dem anti-PDI-Antikörper 221-135-1 und dem anti-Interaptin-Antikörper 260-60-10 als ein ER-Membran-assoziiertes Protein identifiziert worden. Dabei zeigt sich jedoch eine stärkere Kolo-kalisation zwischen dem ribosomalen Protein und PDI als mit Interaptin. Dies liegt an der unterschiedlichen Expressionsstärke dieser beiden Proteine in vegetativen Zellen. Interaptin wird in vegetativen Zellen und in der frühen Aggregationsphase nur sehr schwach exprimiert. Maximale Expression liegt in der späten Aggregationsphase und während der

Kulminationsphase des Entwicklungszyklus von *D. discoideum* vor [Rivero *et al.*, 1998]. Dagegen wird PDI zu allen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus von *D. discoideum* stark exprimiert mit einem leichten Maximum während der frühen Aggregationsphase und der Kulmination und Sporendifferenzierung [Monnat *et al.*, 1997].

In Zellfraktionierungsversuchen wurde Comitín in zwei Fraktionen nachgewiesen. Die erste Fraktion bestand aus Plasma- und Golgi-Membranen, die zweite enthielt unter anderem ER-Membranen [O. Weiner, 1993]. Comitín und L28 sind also Membran-assoziierte Proteine, allerdings zeigt das Protein L28 auch eine Verteilung an ER-Membranen. Protein P116-1 kolokalisiert mit den vom monoklonalen Antikörper 221-342-5 markierten Lysosomen, die nicht vom DdLIMP-Antikörper erkannt werden. Der Antikörper 221-342-5 ist gegen ein gemeinsames Kohlenhydrat-Epitop lysosomaler Proteine gerichtet. In Immunfluoreszenzexperimenten wurde keine Kolokalisation mit Comitín beobachtet. P116-1 kann trotzdem ein potentieller Bindungspartner von Comitín sein, da das „Two-Hybrid“-System eine sehr sensitive Methode ist, die auch transiente Protein-Protein-Wechselwirkungen entdeckt. Die Empfindlichkeit des „Two-Hybrid“-Systems ist in der für eine Detektion zwischen zwei interagierenden Proteinen ausreichenden Bindungskonstante von 1 μM begründet, so daß Interaktionen gefunden werden können, die von anderen Methoden nicht erkannt werden [Phizicky und Fields, 1995; Li und Fields, 1993]. So konnte die Interaktion zwischen RAS und RAF nur mit dem „Two-Hybrid“-System gezeigt und mit einer Vielzahl an „Two-Hybrid“-Experimenten belegt werden, da andere Methoden, wie „Crosslinking“-Versuche oder Koimmunpräzipitation, versagten. Auch Koimmunpräzipitationsversuche zwischen RAS und seinem bekannten Effektor Adenylat-Cyclase waren nicht erfolgreich, so daß das Scheitern dieser *in-vitro*-Experimente im isolierten Protein begründet ist [Van Aelst *et al.*, 1993]. Die intrazelluläre Lokalisation für das Protein L36 konnte nicht durchgeführt werden, da keine das GFP-L36-Fusionsprotein exprimierenden *D. discoideum*-Transformanten erhalten wurden.

3.3. Bedeutung der Ergebnisse für die *in-vivo*-Funktion von Comitin

Comitin nimmt nach den Ergebnissen zur zellbiologischen Untersuchung der Minusmutante und der „Two-Hybrid“-Durchmusterung eine Vermittlerrolle zwischen intrazellulären Membranen, dem Aktin-Zytoskelett und Vesikeltransport in *D. discoideum* ein. Für eine Verknüpfung zwischen dem Aktin-Zytoskelett und Comitin spricht die vermehrte Anreicherung von Aktin an der Kontaktstelle mit dem aufzunehmenden Partikel, sowie die Lokalisation von Comitin und Aktin in der Phagosomenmembran. Ein Zusammenhang zwischen Aktinnetzwerk und Comitin läßt sich auch aufgrund der Experimente zum osmotischen Schock herstellen, da unter anderem eine veränderte intrazelluläre Verteilung von Comitin und Aktin als Folge osmotischen Stresses gefunden wurde. Einen weiteren Hinweis liefert die Lokalisation des potentiellen Comitin-Bindungspartners P116-1 in frühen Lysosomen.

Die mit dem „Two-Hybrid“-System gefundene Interaktion zwischen dem ribosomalen Protein L28 und dem aktinbindenden Comitin deutet auf einen Zusammenhang zwischen ER- und Golgi-Membranen und dem Aktin-Zytoskelett hin. Die Vernetzung von Aktin-Zytoskelett und den Membranen ist gut untersucht worden und an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Die Plasmamembran und das darunterliegende Aktin-Zytoskelett sind an der Zellformgebung und an der Weiterleitung extrazellulärer Signale über den Signaltransduktionsweg beteiligt [Hitt und Luna, 1994; Cowin and Burke, 1996]. In *D. discoideum* können eine Vielzahl von Proteinen wie Ponticulin [Hitt *et al.*, 1994], Hisactophilin [Scheel *et al.*, 1989] und Talin [Kreitmeier *et al.*, 1995] diese Funktion übernehmen. Myosin-I kann über seine basische C-terminale Domäne an die Plasmamembran binden und so zur Zellform beitragen [Uyeda und Titus, 1997].

Für die *in-vivo*-Funktion des aktinbindenden und Vesikel-assoziierten Comitin bedeutet dies, daß das Protein an der Vernetzung von Golgi- und ER-Membranen an das Aktin-Zytoskelett beteiligt sein und am Vesikeltransport mitwirken könnte. Die Verknüpfung der Membranen mit dem Aktin-Zytoskelett sowie die Bindung an Vesikel könnte über dimerisiertes Comitin geschehen. Die Glykosylierung von Proteinen vollzieht sich in der Regel im ER- und Golgi-Lumen. Daneben werden einige Proteine jedoch im Zytoplasma durch N-Acetylglucosamin glykosyliert [Hart *et al.*, 1994; Hayes und Hart, 1994], so z. B. erkennt das im Zytoplasma lokalisierte Lektin CBP70 N-Acetylglucosaminreste. Galektin-3, ein Laktose-bindendes Lektin, ist innerhalb des Kerns an Spleißvorgängen und an der Plasmamembran an

Adhäsionsprozessen beteiligt. Im Zytoplasma interagiert Galektin-3 mit Bcl-2, einem antiapoptischen Protein [Rousseau *et al.*, 2000]. Außerdem wurde auch eine durch den GPI-Anker vermittelte Glykosylierung im Zytoplasma beschrieben [Vidugiriene und Menon, 1994]. Denkbar wäre es deshalb auch, daß die Bindung endozytischer Vesikel und intrazellulärer Membranen an das Zytoskelett über Glykokonjugate vermittelt wird, da für Comitin *in-vitro* eine Mannose-abhängige Bindung an Membranen nachgewiesen worden ist [Jung *et al.*, 1996].

4. Zusammenfassung und Ausblick

4.1. Analyse der *in-vivo*-Funktion von Comitín anhand der Minusmutante 1a1

Der *D. discoideum*-Klon 1a1 wurde in Western-, Northern- und Southern-Blot-Analysen als eine Comitín-defiziente Mutante charakterisiert. Diese Minusmutante wurde zur Identifizierung der *in-vivo*-Funktion von Comitín in Versuchen zum osmotischem Schock und zur Phagozytose eingesetzt. Beide Prozesse involvieren sowohl das Aktin-Zytoskelett als auch Membranen. Comitín bietet Schutz gegen osmotischen Streß, da die Comitín-Minusmutante 1a1 eine erheblich reduzierte Überlebensfähigkeit in hypertotonischer Lösung besitzt. Infolge osmotischen Stresses verändert sich die intrazelluläre Lokalisation des Proteins und Comitín wird -danach nicht nur an zytoplasmatischen Vesikeln sondern auch in Strukturen an der Plasmamembran detektiert wird. Ferner wird der Golgi-Apparat nach Inkubation in hypertotonischer Lösung nicht mehr vom mAk 190-340-8 erkannt. Für die Beteiligung von Comitín an frühen Phagozytosevorgängen sprechen folgende Ergebnisse: Eine biochemische Analyse zeigte, daß Comitín, genau wie Aktin und Coronin, an der Phagosomenmembran lokalisiert ist. Die Phagozytoserate ist in der Comitín-defizienten Mutante im Vergleich zum Wildtyp eingeschränkt, erreicht aber mit der Zeit ein ähnliches Gleichgewichtsniveau an aufgenommenen Hefen wie AX2. Die Funktion von Comitín liegt im Bereich der Aufnahme des zu phagozytierenden Partikels und nicht in zellulären Vorgängen, die das reife Phagosom betreffen.

Die Comitín-defiziente Mutante zeigt kein verändertes Wachstumsverhalten in Flüssigkultur gegenüber dem Wildtyp AX2. Auch in den schon früher gemachten Versuchen zur Zellgröße, Zellmorphologie, Entwicklung, Fähigkeit zur Pinozytose und Exozytose lysosomaler Enzyme ergab sich kein Unterschied zum Wildtyp AX2 [v. Krempelhuber, 1997].

Die Wiederherstellung der Comitín-Expression sollte die verringerte Widerstandsfähigkeit gegenüber osmotischen Streß und die verringerte Phagozytosefähigkeit der Comitín-Minusmutante beheben. Dies wäre eine zusätzliche Bestätigung der hier gefundenen Defekte in der Comitín-defizienten Mutante 1a1.

4.2. „Two-Hybrid“-cDNA-Bank-Durchmusterung und Charakterisierung potentieller Bindungspartner von Comitín

Die „Two-Hybrid“-cDNA-Bank-Durchmusterung lieferte neben Comitín als neue potentielle Bindungspartner ein Uridinkinase-ähnliches Protein (P116-1) und die ribosomalen Proteine L28 (P165-2) und L36 (P180-3). „Two-Hybrid“-Experimente mit verkürzten Comitín-konstrukten erlaubten die Identifikation des GYP(P)Q-Motivs als weitere Dimerisierungsdomäne des Comitíns. Mit Hilfe verkürzter Konstrukte der ribosomalen Proteine L28 und L36 konnten in „Two-Hybrid“-Versuchen die Bindungsdomänen von L28 und L36 für Comitín auf die Aminosäuren 91 bis 132 bzw. 27 bis 88 eingegrenzt werden. Die intrazelluläre Lokalisation des Proteins P116-1 und des ribosomalen Proteins L28 gelang mit dem Einsatz von GFP-Fusionsproteinen in Immunfluoreszenzstudien durch Kolokalisation mit monoklonalen Antikörpern. Danach ist P116-1 ein Protein der Lysosomen. Das ribosomale Protein L28 ist hauptsächlich in der ER-Membran zu finden wie Kolokalisationsversuche mit dem anti-Interaptin-Antikörper 260-60-10 und dem anti-PDI-Antikörper 221-135-1 zeigten. Außerdem ist das ribosomale Protein L28 wie Comitín Bestandteil des Golgi-Apparates. Die intrazelluläre Verteilung des ribosomalen Proteins L36 konnte nicht bestimmt werden, da keine das GFP-Fusionsprotein exprimierenden Transformanten isoliert werden konnten. Dazu sind weitere Experimente notwendig.

Die bisher vorgenommenen Lokalisationsversuche der drei neuen potentiellen Bindungspartner von Comitín könnten noch mit GFP-Fusionsproteinen wiederholt werden, in denen das GFP C-terminal an das jeweilige Protein gebunden ist. Eine weitere Bestätigung der intrazellulären Verteilung ist auch über Immunfluoreszenzanalysen mit monoklonalen Antikörpern möglich. Dazu müßten zunächst diese Proteine aus *D. discoideum* isoliert oder Teilstücke dieser Proteine in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden. Gereinigtes Protein bzw. verkürzte Konstrukte könnten nicht nur zur Antikörperherstellung eingesetzt, sondern auch für Immunpräzipitationsversuche oder Affinitätschromatographie verwendet werden, um mit einer weiteren unabhängigen Methode die Interaktion zum Comitín zu bestätigen. Zusätzlich könnten in „Crosslinking“-Experimenten mit den verkürzten Konstrukten der drei möglichen Interaktionspartner die Bindungsdomäne des Uridinkinase-ähnlichen Proteins P116-1 zu Comitín näher bestimmt und die schon in „Two-Hybrid“-Versuchen identifizierten Bindungsdomänen der ribosomalen Proteine L28 und L36 verifiziert werden. Mit solchen „Crosslinking“-Analysen sollte es außerdem möglich sein, die Bindungsdomäne in Comitín

zu den potentiellen Wechselwirkungspartnern zu bestimmen. Zur Aufklärung der *in-vivo*-Funktionen der drei potentiellen Bindungspartner könnten Minus- und/oder Überexpressionsmutanten in *D. discoideum* eingesetzt werden.

4.3. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Comitin, ein 24 kDa F-aktinbindendes aus *D. discoideum*, ist an Vesikelmembranen und auf der cytoplasmatischen Seite des Golgi-Apparates lokalisiert. *In-vitro*-Studien haben gezeigt, daß Comitin die Fähigkeit besitzt, an Mannose zu binden und Dimere zu bilden. Zur Analyse seiner *in-vivo*-Funktionen wurde eine Comitin-defiziente Mutante isoliert und auf ihre Eigenschaften in Bezug auf Vesikeltransport und Mikrofilamentfunktionen untersucht. Comitin scheint der Zelle Schutz gegen osmotischen Streß zu bieten, da die Comitin-negative Mutante eine erheblich reduzierte Überlebensfähigkeit in hypertonischer Lösung besitzt. Hyperosmotischer Schock führt auch zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation von Comitin in *D. discoideum*. Die Isolierung und Anreicherung phagozytotischer Membranen zeigte, daß Comitin, genau wie Aktin und Coronin, an der Phagosomenmembran lokalisiert ist. Die Phagozytoseleistung der Comitin-Minusmutante ist gegenüber dem Wildtyp AX2 zunächst vermindert, erreicht aber mit der Zeit ein ähnliches Niveau an aufgenommenen Hefen, so daß als Ursache des Phagozytosedefektes Vorgänge, die das reife Phagosomom betreffen, ausgeschlossen werden können.

Die Hefe-„Two-Hybrid“-cDNA-Bank-Durchmusterung lieferte neben Comitin als neue potentielle Bindungspartner ein Uridinkinase-ähnliches Protein und die ribosomalen Proteine L28 und L36. „Two-Hybrid“-Experimente mit verkürzten Comitin-Konstrukten erlaubten die Identifikation der GYP(P)Q-Domäne als weitere Dimerisierungsdomäne des Comitins. Die Bindungsstelle von L28 und L36 zu Comitin konnte durch Einsatz verkürzter L28- und L36-Konstrukte näher eingegrenzt werden. Mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen und Koimmunfluoreszenzexperimenten konnte gezeigt werden, daß das Uridinkinase-ähnliche Protein an den Lysosomen und das L28-Protein am Golgi-Apparat und am ER lokalisiert ist.

4.4. Abstract in englischer Sprache

Comitin is a F-actin binding and membrane associated protein from *Dictyostelium*. It has been identified on Golgi and vesicle membranes and its localisation was shown to be sensitive to agents affecting the cytoskeleton. To investigate its in vivo functions knock out mutants were generated by gene replacement. Based on comitin's in vitro functions we examined properties related to vesicular transport and microfilament function were examined. Comitin minus cells were impaired in phagocytosis and exhibited an altered response to hyperosmotic shock in comparison to wild type. Analysis of comitin distribution in wild type cells during these cellular reactions showed its presence on early phagosomes and redistribution during hyperosmotic shock suggesting a direct involvement of comitin decorated vesicles in these processes.

The yeast two-hybrid system was used to search for interacting proteins which might reveal proteins involved in intracellular trafficking or are present on membrane surfaces. As binding partners of comitin several clones were isolated coding for comitin itself, the ribosomal proteins L28 and L36 and a lysosomal protein showing similarities to uridine kinases from other organisms. The latter three proteins have not been described in *D. discoideum* so far. Additional two-hybrid experiments allowed to identify comitin's dimerization domain and the binding sites of L28 and L36 for comitin. Using GFP-fusions we colocalized L28 and comitin in the Golgi apparatus and the uridine-kinase related protein in lysosomes.

5. Material und Methoden

5. 1. Material

5.1.1. Labormaterialien

Einfrierröhrchen, 2,2 ml	Nunc
Einweg-Pipettenspitzen	Greiner
Elektroporationsküvette	Bio-Rad
Fotofilm, Typ 100-6	Kodak
Hybridisierungsröhrchen	Hybaid
3MM Filterpapier	Whatman
Multipipette	Finnigan
Nitrocellulose, Typ BA85	Schleicher und Schüll
Nitrocellulose-Rundfilter, BA85 Ø 82mm	Schleicher und Schüll
Sterilfilter, 0,45 µm	Gelman Science
Sterilfilter, 0,2 µm	Gelman Science
Petrischalen, Typ 3003	Falcon
Plastikküvette	Greiner
Quarzküvette Infrasil	Hellma
15 ml Röhrchen, Typ 2095	Falcon
50 ml Röhrchen, Typ 2070	Falcon
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß, 2,2 ml	Eppendorf
Röntgenfilm X-omat AR-5, 18 x 24 mm	Kodak
Röntgenfilm X-omat AR-5, 535 x 43 mm	Kodak
Pipetten, 1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl	Gilson

5.1.2. Geräte

Blotkammer Trans-Blot SD	Bio-Rad
Crosslinker UVC 500	Hofer
Elektroporationsgerät, Typ Gene-Pulser	Bio-Rad
pH-Meter 766	Knick
Heizblöcke:	
Typ DIGI-Block JR	neoLab
Typ Dri-Block DB x 20	Techne
Hybridisierungsöfen	Hybaid
Inkubationsofen Lab-Therm	Kühner
Magnetrührer, Typ MR 3001 K	Heidolph
Mikroskope:	
Lichtmikroskop	Olympus
Lichtmikroskop, Typ DMIL	Leica
Plattengießmaschine	Technomat

Rotoren:

Typ JA-10	Beckman
Typ JA-25.50	Beckman
SLA-1500	Sorvall
SLA-3000	Sorvall
SS-34	Sorvall
Rüttler 3015	GFL
Rüttler Lab-Shaker	Kühner
Spannungsverstärker Power Pac 200	Bio-Rad
Spannungsverstärker Power Pac 300	Bio-Rad
Spektralphotometer, Typ Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Tischzentrifugen:	
Centrifuge 5414	Eppendorf
Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Kühlzentrifuge Biotech fresco	Heraeus Instruments
Sigma	B. Braun Biotech Instruments
UV-Auflichtmonitor TFS-35 M	Faust
UV-Transilluminator	MWG-Biotech
Vortex REAX top	Heidolph
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen:	
Beckman Avanti J25	Beckman
Sorvall RC 5C plus	Sorvall

5.1.3. Kits

Nucleobond AX	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plus	Macherey-Nagel
pGem-Teasy-Vector System I	Promega
Stratagene Prime [®] It II	Stratagene
Original TA Cloning [®]	Invitrogen

5.1.4. Enzyme, Substrate, Antikörper, Inhibitoren, Antibiotika, ChemikalienEnzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase	Roche
DNase I (Desoxyribonuklease)	Sigma
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Sigma
Restriktionsendonukleasen	Roche, Amersham, Gibco-BRL, New England Biolabs
RNase A (Ribonuklease)	Sigma

T₄-DNA-Ligase

Gibco-BRL

Taq-Polymerase

Roche

Primäre Antikörper

anti-Aktin-Antikörper mAk Act 1-7

Simpson *et al.*, 1984anti- α -Aktinin-Antikörper mAk 47-60-8Schleicher *et al.*, 1984

anti-Comitin-Antikörper mAk 190-68-1

Weiner *et al.*, 1993

anti-Comitin-Antikörper mAk 190-340-8

Weiner *et al.*, 1993

anti-Comitin-Antikörper mAk 190-23-5

Weiner *et al.*, 1993

anti-CsA-Antikörper mAk 33-294-17

Berthold *et al.*, 1985

anti-GFP-Antikörper mAk K3-184-2

unveröffentlicht

anti-Hisactophilin-Antikörper mAk 54-11-10

Scheel *et al.*, 1989

anti-Interaptin-Antikörper mAk 260-60-10

Rivero *et al.*, 1998

anti-PsA-Antikörper mAk Mud-1

Gregg *et al.*, 1982

anti-PDI-Antikörper mAk 221-135-1

Monnat *et al.*, 1997anti-V/H⁺-ATPase-Antikörper mAk 221-35-2Jenne *et al.*, 1998

anti-Vacuolin-Antikörper mAk 221-1-1

Jenne *et al.*, 1998

anti-34 kDa-Protein-Antikörper mAk 169-90-2

unveröffentlicht

anti-unbekanntes Epitop mAk 221-457-5

unveröffentlicht

anti-Kohlenhydrat-Epitop-lysosomaler Enzyme
mAk 221-342-5Neuhaus *et al.*, 1998

polyklonaler DLimp-Antikörper

Karakesisoglou *et al.*, 1999Sekundäre Antikörper

Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat

Sigma

Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3-Konjugat

Sigma

Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-Konjugat

Sigma

Ziege-anti-Kaninchen-IgG, TRITC-Konjugat

Sigma

Inhibitoren

Benzamidin

Sigma

Brefeldin A

Sigma

Cytochalasin A

Sigma

DEPC

Sigma

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Sigma

Complete-Inhibitoren-Mix

Roche

Antibiotika

Ampicillin

Grünenthal

Blasticidin S

ICN

Dihydrostreptomycinsulfat

Sigma

Geneticin (G-418)

Gibco-BRL

Kanamycin

Sigma

Tetracyclin

Sigma

Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)	Nat. Diagnostics
Agar-Agar (BRC-RG)	Biomatic
Agarose (Elektrophoresis Grade)	Gibco
3-Aminophthalhydrazid	Fluka
Aminosäuren	Sigma
3-Amino-1,2,4-triazol	Sigma
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Pepton	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Borsäure	Merck
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth
Bromphenolblau (Na-Salz)	Serva
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Cäsiumchlorid	Biomol
Chloroform	Riedel-de Haen
Coomassie-Brilliant-Blau G 250	Roche
Coomassie-Brilliant-Blau R 250	Serva
p-Cumarsäure	Fluka
Cycloheximid	Sigma
Dimethylformamid	Riedel-de Haen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylenglycolbis[2-aminoethylether]- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Essigsäure 98-100%	Riedel-de Haen
Ethanol	Riedel-de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylphenylpolyethylenglycol (NP-40)	Fluka
Formamid	Merck
Gelatine	Sigma
Glucose	Merck
Glycerin	Riedel-de Haen
Glycin	Degussa
Harnstoff	Gerbu
Heringssperma	Roche
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES)	Biomol
Hefeextrakt	Oxoid
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Kaliumhydrogenphosphat-Triphosphat	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Loewe Biochemica
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Maltose	Merck

β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel-de Haen
[Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Gerbu
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Riedel-de Haen
Natriumlaurylsarcosinat	Sigma
Nukleotide	Sigma, Roche
Pepton	Oxoid
Phenol	Roth
Phosphorsäure	Merck
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Sigma
Polyvinylglykol MW 10000	Sigma
Ponceau S Konzentrat	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
Saccharose	Fluka
Salzsäure 32%ig	Fluka
Sorbitol	Fluka
N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Trichloressigsäure	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Fluka, Riedel-de Haen
Triton X-100	Merck
Trypan Blau	Merck
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid (30%ige Lösung)	Merck
Yeast Nitrogen Base	Difco
Xylencyanoblau	Fluka

Radiochemikalien

α- ³² P-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (10 mCi/ml)	Amersham
--	----------

5.1.5. Vektoren

pACT2	Durfee <i>et al.</i> , 1993
pAS2	Harper <i>et al.</i> , 1993
pBsr-GFP	Mohrs <i>et al.</i> , 2000
pCR-2.1	Kit: Invitrogen
pDexRH	Faix <i>et al.</i> , 1992
pGemTeasy	Kit: Promega
pIC19	Marsh <i>et al.</i> , 1984
pT7-7	Tabor, 1990

5. 1. 6. Oligonukleotide

Die für Sequenzierungen oder die „Polymerase-Chain“-Reaktionen (PCR) eingesetzten Oligonukleotide sind von der Firma MWG-Biotech AG in Ebersberg bezogen worden.

a) Oligonukleotide für Comitin:

Comv26: (5' -GGG ATC CGA ATG GAA TTA TTA AGA CAA GGT GA-3')
Comv269: (5' -GGG ATC CGA AGA CGT TAT ACC CGA AGT CCT TG-3')
Comr417: (5' -CTC GAG TGA TTT GGC ACA AGG GAG TG-3')
Comv431: (5' -CTG GCC ATG GCC AAA CCA TCA GGA CAT CCA-3')
Comr592: (5' -GAG CTC GAG TTC ATT ACT TTA ATA ATA TCC TGG-3')

b) Oligonukleotide für das Uridinkinase-ähnliche Protein aus *D. discoideum* (Klon 116-1):

Uri-299: (5' -TCA ATT GCC CTA GCA TG-3')
Uri-340: (5' -GGA TCC GAG GTA TTG CTG GCC CAG TTG G-3')
Uri-619: (5' -GCA TAT GCA TTG AGT GCA CG-3')
Uri-626: (5' -GGA TCC ATG CAT TGA GTG CAC GTA TTA GA-3')
Uri-656: (5' -CTC GAG GTC TAA TAC GTG CAC TCA ATG C-3')
Uri-1074: (5' -CTC GAG GAT ATT GAA TTG ACC ATG AG-3')
Uri-1287: (5' -AGG TCA CTC TCG TAG AGA AG-3')
Uri-1355: (5' -CTC GAG TGA GGG ACA TGA TTA CCA GTG-3')

c) Oligonukleotide für das ribosomale Protein L28 aus *D. discoideum* (Klon 165-2):

Rib28-172: (5' -GAG CTC AAT AAC GGC AGC AAC GTC GAT GGT G-3')
Rib28-269: (5' -GGA TCC GAT TCG TCA AAA CTT TAG CCA C-3')
Rib28-397: (5' -GAG CTC GTT AGT TTT TCT TGG CTT TAC GG-3')
Rib28-150: (5' -GGA TCC ACG TTG CTG CCG TTA ACG G-3')
Rib28-276: (5' -GAG CTC AAT GAC GAA TCT AGC AGT CTT TC-3')

d) Oligonukleotide für das ribosomale Protein L36 aus *D. discoideum* (Klon 180-3):

Rib36-79: (5' -GGA TCC GTA CTG TTA CCT CAA CCT TC-3')
Rib36-161: (5' -GGA TCC GTT TCT CCC CAT ACG AAC GTG -3')
Rib36-318: (5' -CTC GAG TTA TTT GGC GGA GGC TTT TCT G-3')
Rib36-264: (5' -CTC GAG ACC AGC TTG GAT TGA ACC TAA T-3')

e) Oligonukleotide für das ribosomale Protein L28 aus Maus:

Mau28-1: (5' -GGA TCC CCA TGT CCG CGC ATC TGC AG-3')
Mau28-2: (5' -CTC GAG GCT CAG GAG CTC TTG GTG GG-3')

f) Oligonukleotide für das ribosomale Protein L36 aus Maus:

Mau36-1: (5' -GGA TCC CCA TGG CTC TGC GCT ACC C-3')
 Mau36-2: (5' -CTC GAG GGA GGG TTC ACT CAA TCC TTC-3')

g) Oligonukleotide für den pACT2-Vektor des „Two-Hybrid“-Systems:

Gal4AD: (5' -TAC CAC TAC AAT GGA TG-3')
 GAL4ADW: (5' -TAC CAC TAC AAT GGA TGA TGT A-3')
 pACT21: (5' -GCC CCG GGG ATC CGA ATT C-3')
 Rev4AD: (5' -GAG ATG GTG CAC GAT GCA CAG-3')

h) Oligonukleotide für den pAS2-Vektor des „Two-Hybrid“-Systems:

PpAS2-1: (5' -TCA TCG GAA GAG AGT AG-3')

5.1.7. Puffer und andere Lösungen

Puffer und Lösungen, die hier nicht verzeichnet sind, finden sich unter den jeweiligen Methoden.

Hepes-Phenol: 1 kg (10,6 mol) Phenol wird bei 60°C im Wasserbad geschmolzen und mit etwa einem Volumen 1 M Hepes pH 7,5 äquilibriert. Die Lösung wird in kleineren Portionen bei -20°C eingefroren.

10 x MOPS (pH 7,0/ pH 8,0): 41,9 g (0,2 mol) MOPS
 16,7 ml 3 M Natriumacetatlösung
 20 ml 0,5 M EDTA-Lösung
 mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

10 x NCP-Puffer (pH 8,0): 12,1 g (0,1 mol) Tris/HCl
 87,0 g (1,5 mol) NaCl
 5,0 ml Tween 20
 2,0 g (30,7 mmol) Natriumazid
 mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Natriumphosphat-Puffer (pH 8,0): 0,14 M Na₂HPO₄
 0,1% Natriumazid

PBG (pH 7,4): 0,5% Rinderserumalbumin
 0,1% Gelatine
 in 1 x PBS

<u>PBS (pH 7,2/ pH 8,0):</u>	Eine Lösung aus 30 mM KH_2PO_4 und 150 mM NaCl wird mit 70 mM Na_2HPO_4 auf einen pH-Wert von 7,2 oder 8,0 eingestellt. Die Lösung wird anschließend autoklaviert.
<u>1,2 M Phosphatpuffer (pH 6,8):</u>	1,2 M Na_2HPO_4 -Lösung wird mit 1,2 M NaH_2PO_4 -Lösung in einem Verhältnis von 2:1 gemischt.
<u>20 x SSC:</u>	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
<u>TE-Puffer (pH 8,0):</u>	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA, pH 8,0
<u>Tris-Phenol:</u>	1 kg (10,6 mol) Phenol wird im Wasserbad bei einer Temperatur von ungefähr 60°C geschmolzen und mit einem Volumen 1 M Tris/HCl pH 8,0 äquilibriert.
<u>10 x Tris/Phosphatpuffer (pH 8,0):</u>	43 g (0,36 mol) Tris 41,4 g (0,25 mol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$ 3,7 g (10 mmol) EDTA auf 1 l mit Wasser auffüllen. Der pH-Wert wird mit Phosphorsäure eingestellt. Die Lösung wird anschließend autoklaviert.
<u>10 x Tris/Boratpuffer (pH 8,3):</u>	108 g (0,9 mol) Tris 55 g (0,9 mol) Borsäure 7,4 g (20 mmol) EDTA auf 1 l mit Wasser auffüllen.
<u>50 x Tris/Acetatpuffer (pH 8,0):</u>	242 g (2 mol) Tris 57,1 ml 16,6 M Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung auf 1 l mit Wasser auffüllen.

5.1.8. Medien

Die verwendeten Medien werden mit deionisiertem Wasser, das über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) gefiltert wird, angesetzt und bei 120°C autoklaviert. Antibiotika werden nach Abkühlen des Mediums auf etwa 50°C zugegeben. Das Gießen der Platten erfolgt mit einer halbautomatischen Plattengießmaschine.

5.1.8.1. Medien für *E. coli*-Kulturen [Sambroock *et al.*, 1989]

LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g (85,5 mmol) NaCl
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

SOC-Medium:

20 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g (8,5 mmol) NaCl
20 mM Glucose
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

Der pH-Wert von 7,4 wird jeweils mit NaOH eingestellt. Für Agarplatten werden den Medien 0,9 % (w/v) Agar und bei Bedarf 50 mg/l Ampicillin oder Kanamycin zugesetzt. Für Farbindikatorplatten zur Blau/Weiß-Selektion von *E. coli*-Transformanten werden die fertigen Platten jeweils mit 50 µl 0,1 M IPTG-Lösung und 90 µl X-gal-Lösung (200 mg/10 ml Dimethylformamid) bestrichen.

5.1.8.2. Medien für *D. discoideum*-Kulturen

Kulturmedium (pH 6,7):

[Watts und Ashworth, 1970]
14,3 g Pepton
18 g (0,1 mol) Maltose
0,616 g (3,5 mmol) Na₂HPO₄ x 2 H₂O
0,486 g (3,6 mmol) KH₂PO₄
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Phosphatagarplatten (pH 6,0):

15 g Agar agar
mit Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 6,0) auf 1 l
auffüllen.

Salzlösung:

[Bonner, 1947]
10 mM NaCl
10 mM KCl
2,7 mM CaCl₂

SM-Agarplatten (pH 6,5):

20 g Agar agar
10 g Pepton
10 g (55 mmol) Glucose
1 g Hefeextrakt
1 g (4,1 mmol) MgSO₄ x 7 H₂O
2,2 g (16,2 mmol) KH₂PO₄
1 g (5,7 mmol) K₂HPO₄
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 6,0):

[Malchow *et al.*, 1972]
2 mM Na₂HPO₄
15 mM KH₂PO₄

5.1.8.3. Medien, Agarplatten und Stocklösungen für Hefekulturen

YEPD-Medium:

20 g/l Difco Pepton
10 g/l Hefeextrakt

YEPD- Agarplatten:

20 g/l Difco Pepton
10 g/l Hefeextrakt
18 g/l Agar agar

10 x Aminosäurelösung:

300 mg (2,3 mmol) Isoleucin
1500 mg (1,1 mmol) Valin
200 mg (0,9 mmol) Arginin
300 mg (1,6 mmol) Lysin
200 mg (1,34 mmol) Methionin
500 mg (3 mmol) Phenylalanin
2000 mg (16,8 mmol) Threonin
mit Wasser auf 1 l auffüllen
und steril filtrieren.

100 x Adeninlösung:

200 mg (1,1 mmol) Adenin in 100 ml Wasser mit
etwas HCl lösen und steril filtrieren.

100 x Tyrosinlösung:

300 mg (1,7 mmol) Tyrosin in 100 ml Wasser mit
etwas NaOH lösen und steril filtrieren.

100 x Uracillösung:

200 mg (1,8 mmol) Uracil in 100 ml Wasser unter
Erwärmen lösen und steril filtrieren.

100 x Histidinlösung:

200 mg (1 mmol) Histidin
in 100 ml Wasser lösen und
steril filtrieren.

1 M 3-Amino-1,2,4-triazollösung :

8,4 g 3-Amino-1,2,4-triazol in 100 ml Wasser lösen,
einmal filtrieren und Filtrat steril filtrieren.

100 x Leucinlösung:

1000 mg (7,6 mmol) Leucin
in 100 ml Wasser lösen und
steril filtrieren.

100 x Tryptophanlösung:

200 mg (1 mmol) Tryptophan in 100 ml Wasser lösen
und steril filtrieren.

Cycloheximidlösung: 1 mg/ml Cycloheximid in Wasser lösen und steril filtrieren.

Die Zusammensetzung der Agarplatten wird in Tabelle 18 angegeben. Nach Zugabe von Yeast Nitrogen Base, Agar agar und Wasser wird die Mischung zunächst autoklaviert und dann auf 55°C abgekühlt. Danach erfolgt die Zugabe der restlichen Stocklösungen.

Tabelle 18: Zusammensetzung der Selektionsagarplatten für das „Two-Hybrid“-System¹⁾²⁾

Selektionsplatten/ Reagenzien	SD/-Leu	SD/-Leu+Cyh	SD/-Leu/-Trp	SD/-Trp	SD/-Leu/-His/-Trp/+3-AT
Yeast Nitrogen Base [g]	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
Agar agar [g]	20	20	20	20	20
Wasser [ml]	750	750	770	750	745
20%ige Glucoselösung ³⁾ [ml]	100	100	100	100	100
10 x Aminosäurelösung [ml]	100	100	100	100	100
100 x Adenin [ml]	10	10	10	10	10
100 x Tyrosin [ml]	10	10	10	10	10
100 x Uracil [ml]	10	10	10	10	10
100 x Histidin [ml]	10	10	10	10	*
100 x Leucin [ml]	*	*	*	10	*
100 x Tryptophan [ml]	10	10	*	*	*
Cycloheximidlösung [ml]	*	10	*	*	*
3-AT-Lösung [ml]	*	*	*	*	25

1) Angaben für 1 l Agarplatten. 2) Die Zusammensetzung der Selektionsmedien entspricht der Zusammensetzung der jeweiligen Agarplatten ohne Agar agar. 3) Glucoselösung vor Gebrauch steril filtrieren.

5.1.8.4. Medien für die Zellkultur

Das für die PC12-Zelllinie verwendete Medium besteht aus 500 ml DMEM/F12 (Biochrom F 4815), 28 ml Rinderserum, 60 ml Pferdeserum, 6 ml einer Penicilin/Streptomycin-Lösung und 6 ml einer Glutamin-Lösung. Alle verwendeten Lösungen werden von der Fa. Biochrom bezogen.

5.1.9. Bakterien-, *D. discoideum*- und Hefestämme sowie Kulturzellen

Bakterienstämme

<i>E. coli</i> JM 38	Vieira und Messing, 1982
<i>E. coli</i> K 38	Tabor und Richardson, 1985
<i>E. coli</i> XL1 blue	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> BL21 (DE)	Studier und Moffat, 1986
<i>E. coli</i> DH5 α	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> MC1061	Wertman <i>et al.</i> , 1986
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Williams und Newell, 1976

D. discoideum-Stämme

AX2-214	Axenisch und auf Bakterien wachsender Abkömmling von NC4 [Raper, 1935].
1a1	Comitin-defiziente Mutante von AX2-214 [v. Kremplhuber, 1997].
3a1	Comitin-defiziente Mutante von AX2-214 [v. Kremplhuber, 1997].

Hefestämme

Y190	Harper <i>et al.</i> , 1993 Flick und Johnston, 1990
Y187	Harper <i>et al.</i> , 1993

Kulturzellen

PC-12	Ratte Adrenale Pheochromocytoma Zelllinie [Greene und Tischler, 1976; Levi <i>et al.</i> , 1985]
-------	--

5.2. Methoden

5.2.1. Molekularbiologische Methoden

5.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Mikromaßstab

5.2.1.1.1. Boiling-Methode [Ausubel *et al.*, 1993]

Das von **F. M. Ausubel** beschriebene Verfahren ist geeignet, eine große Anzahl von Versuchsansätzen parallel zu bearbeiten. Die Methode beruht darauf, daß Proteine, Zellwandmaterial und chromosomale DNA beim Erhitzen auf knapp 100°C koagulieren und abzentrifugiert werden können, während RNA und Plasmid-DNA löslich sind und im Überstand bleiben.

1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur werden in einem Eppendorfgesäß bei 16.000 x g für drei Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 250 µl STET-Puffer suspendiert. Zur Bakterienlyse werden ca. 70 µg Lysozym hinzugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wird anschließend für neunzig Sekunden auf 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 16.000 x g wird das Pellet entfernt und der Überstand zur Fällung der Plasmid-DNA mit 20 µl 3 M Natriumacetat, pH 7,0, und 400 µl 96%igem Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgt für dreißig Minuten bei -80°C. Die gefällte Plasmid-DNA wird zehn Minuten bei 16.000 x g pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, danach ungefähr zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 20 µl Wasser gelöst.

<u>STET-Puffer:</u>	0,1 M NaCl 10 mM Tris, pH 9,0 1 mM EDTA, pH 8,0 5 % Triton X-100
---------------------	---

5.2.1.1.2. Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel

Um bis zu 40 µg saubere Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen zu gewinnen, wird das von der Firma Macherey-Nagel angebotene „NucleoSpin Plus“-Kit benutzt. Hierzu werden 5 bis 10 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur in LB-Medium, das das entsprechende Antibiotikum enthält, abzentrifugiert. Das Pellet wird dann mit 250 µl Lösung A1, die RNase enthält, versetzt. Danach werden 250 µl Lösung A2 zugegeben, drei- bis fünfmal geschüttelt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Infolge der SDS- und Alkalibehandlung werden bei diesem Reaktionsschritt die Zellmembranen zerstört und durch die RNase die RNA verdaut. Anschließend erfolgt die Zugabe von 300 µl eiskalter Lösung A3 zur Reaktionsmischung, die dann gemischt und fünf Minuten bei 0°C inkubiert wird. Dadurch werden Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile gefällt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C wird der Überstand auf eine NucleoSpin-Säule gegeben. Es wird eine Minute bei 18.000 x g zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial bindet. Anschließend wird die Säule zuerst mit 500 µl Puffer AW und dann mit 700 µl Puffer A4 gewaschen. Danach wird noch einmal ohne vorherige Pufferzugabe zentrifugiert, um Ethanolreste zu entfernen. Zur Elution werden schließlich 50 µl Lösung AE auf die Säule gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann eine Minute bei 18.000 x g zentrifugiert.

5.2.1.2. Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

D. discoideum besitzt einen hohen Gehalt an RNA und Kohlenhydraten, die bei der Reinigung chromosomaler DNA diese begleiten. Deshalb wird die DNA aus angereicherten Zellkernen isoliert [Noegel *et al.*, 1985]. *D. discoideum*-Zellen werden mit 10 ml kaltem Wasser von einer dicht bewachsenen SM-Agarplatte geerntet und bei 720 x g zwei Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird mit kaltem Wasser gewaschen, um *D. discoideum*-Zellen von *K. aerogenes* zu befreien. Anschließend werden die *D. discoideum*-Zellen in 5 ml kaltem NLB-Puffer, der Zellen lysiert aber die Kernmembran nicht angreift, resuspendiert und erneut bei 2.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die pelletierten Kerne werden in 1 ml TE-Puffer aufgenommen und mit 50 µl 10%iger SDS-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 10 µl einer Proteinase K-Lösung [100 µg/ml] wird die Reaktionsmischung zwei bis vier Stunden bei 37°C inkubiert. Restliche Proteine und RNA werden durch zweifache Extraktion mit Wasser gesättigtem Phenol pH 8,0 entfernt. Zum erhaltenen Überstand werden zur DNA-Präzipitation

das zweifache Volumen 96%iger Ethanol und das 1/10-fache Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 pipettiert. Die gefällte DNA wird mit einem Glashäckchen aus der Lösung gefischt und mit reinem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen an der Luft wird die chromosomale DNA in TE-Puffer gelöst und bis zu ihrer Verwendung bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt.

NLB-Puffer: 10 mM Magnesiumacetat
 10 mM NaCl
 30 mM Hepes, pH 7,5
 10% Saccharose
 2% Nonidet P 40

5.2.1.3. DNA-Agarose-Gelelektrophorese [Sambrook *et al.*, 1989]

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegelmatrix. Je nach Auftrennungsziel und Verwendung des Gels werden 0,6 bis 2%ige Gele in Tris-Borat-Puffer oder in Tris-Acetat-Puffer als Gel- und Laufpuffer eingesetzt.

Nach Erhitzen der Agarose im jeweiligen Puffer wird die Lösung in Flachbett-Gelträger verschiedener Größen (7,5 cm x 8 cm; 11,5 cm x 14 cm; 12,5 cm x 19 cm) mit Taschenformern gegossen. Nach der Polymerisierung der Agarose und dem Entfernen der Taschenformer werden die Gele in eine mit Laufpuffer, der identisch mit dem Gelpuffer sein muß, gefüllte Gelkammer gelegt, so daß der Puffer die Gele bedeckt. Die zu trennende DNA wird mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in die Probenaschen geladen. Zur Größenbestimmung der Restriktionsfragmente wird ein geeigneter DNA-Größenstandard zusätzlich aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei einer Spannung von 80 bis 120 V. Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung werden die Gele mit Ethidiumbromidlösung fünf Minuten gefärbt. Die DNA-Fragmente werden mit Hilfe eines Transilluminators bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

DNA-Probenpuffer: 40% Saccharose
 0,5% Natriumdodecylsulfat
 0,25% Bromphenolblau (Na-Salz)
 in TE-Puffer

DNA-Größenstandards:

100 Bp DNA Leiter (Gibco BRL): von 100 - 1500 Bp in 100 Bp-Schritten; 2072 Bp
1 kB DNA Leiter (Gibco BRL): 12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090;
4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506,17; 396; 344; 298;
220; 201; 154; 134; 75 Bp

5.2.1.4. Southern-Blot-Analyse [Southern, 1975]

Das als Southern-Blot bezeichnete Verfahren dient dazu, die nach Größe aufgetrennte DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen zu transferieren. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Probe können spezifische Fragmente identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sind ausschließlich genomische Southern-Blots angefertigt worden.

Dafür wird genomische DNA in einem Volumen von 300 µl mindestens fünfzehn Stunden mit Restriktionsenzymen geschnitten. Anschließend wird die DNA mit dem zweifachen Volumen 96%igen Ethanols und dem 1/10-fachen Volumen 3 M Natriumacetat, pH 7,0, für zwei Stunden bei -20°C gefällt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 4°C wird der Überstand verworfen und die gefällte DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wird nach dem Trocknen in 20 µl Wasser aufgenommen, mit 4 µl Ladungspuffer versetzt und in einem 0,6 bis 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt, wobei zusätzlich ein DNA-Größenmarker mitläuft. Um eine gute Auftrennung der DNA-Fragmente zu erreichen, wird der Gellauf ungefähr siebzehn Stunden bei 35 V durchgeführt. Das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel wird gemeinsam mit einem angelegten Lineal bei einer Wellenlänge von 302 nm photographiert, um eine spätere Größenbestimmung der Signale zu ermöglichen. Anschließend wird das Gel zunächst zwanzig Minuten in einem Denaturierungspuffer und danach zwanzig Minuten in einem Neutralisierungspuffer inkubiert. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgt in 20 x SSC-Lösung über einen Zeitraum von achtzehn Stunden aufgrund von Kapillarkräften. Dabei liegt das Agarosegel auf zwei in 20 x SSC-Lösung getränkten Whatman 3 MM Papier mit Kontakt zu einem 20 x SSC-Lösungsreservoir. Das Gel wird mit der zunächst in Wasser, dann in 20 x SSC-Lösung befeuchteten Nylonmembran, mit zwei feuchten Whatman 3 MM Papieren und mit einem ca. 7 cm dicken Stapel von Saugpapier überschichtet und mit einem Gewicht beschwert. Nach dem Transfer wird die Nylonmembran kurz in 2 x SSC-Lösung inkubiert und dann zweimal im Crosslinker unter UV-Licht bestrahlt. Die Nylonmembran wird bis zu ihrer Verwendung im Dunkeln aufbewahrt.

Denaturierungspuffer:

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisierungspuffer:

1,5 M NaCl
0,5 M Tris/HCl, pH 7,5

5.2.1.5. Isolierung von Gesamt-RNA aus *D. discoideum*

Zum Schutz vor RNasen werden während der Arbeit stets Handschuhe getragen. Außerdem werden nur sterile Plastikgefäße und Pipetten, sowie autoklavierte Lösungen verwendet.

Für einen RNA-Time course werden auf Phosphatagarplatten 5×10^7 Zellen in 5 ml Lösung ausgebracht. Zu den jeweiligen Zeitpunkten werden die Zellen mit 15 ml eiskaltem Wasser geerntet und mit 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5, gewaschen. Die *D. discoideum*-Zellen werden dann in 5 ml 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5, resuspendiert und durch Zugabe von 1 ml 10%iger SDS-Lösung und 100 µl DEPC unter heftigem Schütteln lysiert. Diese Suspension wird unverzüglich mit dem zweifachen Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Hierzu werden gleiche Volumen an Phenol, das mit 1 M Hepes, pH 7,5, gesättigt ist, mit Chloroform gemischt. Zur Phasentrennung wird die Suspension bei 5.000 x g zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird so oft mit Phenol/Chloroform extrahiert, bis keine Interphase mehr sichtbar ist. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 10 M LiCl-Lösung und zwei Volumen Ethanol wird die RNA zwei Stunden bei -20°C gefällt. Danach wird dreißig Minuten bei 5.000 x g und 4°C zentrifugiert, die RNA mit 70%igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in Wasser aufgenommen. Die RNA wird bis zu ihrer Verwendung bei -78°C gelagert. Die Konzentration der RNA wird photometrisch bestimmt, indem die Extinktion bei 260 nm gemessen wird. Eine Extinktion von 1 entspricht 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis E_{260}/E_{280} soll für saubere RNA bei 2,0 liegen.

5.2.1.6. RNA-Agarose-Gelelektrophorese [Lehrach *et al.*, 1977]

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA werden Agarosegele mit einer Endkonzentration von 1,2% Agarose verwendet. Dazu werden 2,4 g Agarose mit 20 ml 10 x MOPS-Puffer, pH 8,0, und 148 ml Wasser versetzt und in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt. Nachdem die Mischung auf eine Temperatur unter 65°C abgekühlt ist, werden 32 ml 36%iger Formaldehydlösung hinzugegeben. Anschließend wird die Mischung in eine Flachbett-Gelapparatur (12,5 cm x 21 cm) mit Taschenformern gegossen. Die zu trennende RNA wird mit 1/3 Volumen RNA-Puffer versetzt und fünf Minuten bei 68°C denaturiert. Nach Zugabe

von 5 µl RNA-Farbmarker wird die Probe auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei einer Spannung von 35 V.

RNA-Puffer:

50 µl 10 x MOPS, pH 8,0
83 µl Formaldehyd
250 µl Formamid

RNA-Farbmarker:

50 % Saccharose
Bromphenolblau
in Wasser

5.2.1.7. Northern-Blot-Analyse

Nach der Elektrophorese werden die RNA-Gele zunächst zehn Minuten in Wasser und anschließend zehn Minuten in 20 x SSC-Lösung gewaschen. Der Transfer auf die Nylonmembran erfolgt in einem Zeitraum von ungefähr 18 Stunden in 20 x SSC Lösung analog zum Southern-Blot (Abschnitt 5.2.1.4.). Die Membranen werden nach dem Transfer in 2 x SSC-Lösung gewaschen, kurz getrocknet und im UV-Crosslinker bestrahlt.

5.2.1.8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgt nach Anleitung des „NucleoSpin Extract 2 in 1“-Kit der Firma Macherey-Nagel.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Restriktionsfragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese mit Tris-Acetat-Puffer als Gel- und Laufpuffer wird die Bande des gewünschten DNA-Fragments mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Zu je 100 mg Agarosegel werden jeweils 300 µl Puffer NT 1 pipettiert. Die Probe wird zehn Minuten auf 50°C erwärmt und zwischendurch geschüttelt. Danach wird die Lösung auf eine NucleoSpin-Säule geladen. Nach Zentrifugation bei 6.000 x g für sechzig Sekunden wird der Durchfluß verworfen und die Säule mit 700 µl Puffer NT3 beladen. Es wird dann sechzig Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Waschschriff mit Puffer NT3 wird wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit ohne erneute Zugabe des Puffers NT3 wird die Säule in ein sauberes 1,5 ml Gefäß überführt. Anschließend wird mit 50 µl Elutionspuffer NE eluiert.

5.2.1.9. Radioaktive Markierung von DNA-Proben mit dem Stratagene Prime^â It II-Kit

Die zur Markierung verwendete DNA wird mit Restriktionsenzymen aus Plasmiden geschnitten. Es werden ungefähr 25 ng DNA mit Wasser zu einem Endvolumen von 24 µl aufgefüllt und mit 10 µl Lösung aus zufällig angeordneten Oligonukleotiden versetzt. Nach fünfminütigem Erhitzen auf 92°C werden zu der auf Raumtemperatur abgekühlten Reaktionsmischung nacheinander 10 µl 5 x Primer-Puffer, 5 µl α-³²P-dATP (50 µCi) und 2 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) pipettiert und für zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch Zentrifugation über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-Puffer abgetrennt. Die radioaktiv markierte Probe wird vor ihrem Einsatz im Southern- oder Northern-Blot bei 100°C für zehn Minuten denaturiert und danach fünf Minuten auf Eis abgekühlt.

5.2.1.10. Nachweis mit radioaktiv markierten Sonden

Die hier angeführten Hybridisierungsbedingungen sind eine Abwandlung der von **M. C. Mehdy** 1983 veröffentlichten Technik. Die mit 2 x SSC-Lösung angefeuchtete Nylonmembran wird in eine Glashybridisierungsröhre überführt und mit 5 ml Hybridisierungspuffer eine halbe Stunde bei 37°C in einem Röhrenofen zur Vorhybridisierung inkubiert. Zur Vermeidung späterer unspezifischer Bindungen der radioaktiven Sonde an die Membran wird während der Vorhybridisierung 1 ml denaturiertes Heringssperma (200 µg/ml) zur Lösung gegeben. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Probe zur Vorhybridisierungslösung wird achtzehn Stunden in einem Rotationsofen bei 37°C hybridisiert. Danach wird die radioaktive Probe abgegossen und die Membran zweimal für zehn Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln in einer Metallbox mit einer Vorwaschlösung behandelt. Anschließend wird zweimal eine halbe Stunde mit dem Waschpuffer bei 37°C unter Schütteln gewaschen. Nach dem Trocknen wird die Membran in Polyethylen-Folie eingepackt und ein Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -70°C exponiert.

Hybridisierungspuffer:

50% Formamid
1% Natriumlaurylsarcosinat
2 mM EDTA, pH 7,2
0,12 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8
in 2 x SSC
4 x Denhardt' s Reagenz

Waschpuffer:

50% Formamid
1% Natriumlaurylsarcosinat
0,2% Natriumdodecylsulfat
2 mM EDTA, pH 7,2
0,12 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8
in 2 x SSC

5.2.1.11. Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgt jeweils in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem und unter den empfohlenen Temperaturbedingungen. Pro μg DNA werden 2 bis 10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Plasmid-DNA wird ein bis zwei Stunden, chromosomale DNA mindestens fünfzehn Stunden verdaut. Die Vollständigkeit der Reaktion wird mit Hilfe eines Agarosegels kontrolliert.

5.2.1.12. Phosphatase-Behandlung

Die 5'-Phosphatgruppen eines linearisierten Vektors werden mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) entfernt, um eine Religation des Vektors zu verhindern.

Ein 50 μl Ansatz mit 5 bis 10 μg linearisierter Vektor-DNA wird mit 3 U alkalischer Phosphatase und 5 μl CIAP-Puffer versetzt. Die Dephosphorylierung erfolgt durch eine dreißigminütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wird die Reaktion durch eine zehn Minuten lange Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70°C gestoppt. Danach wird der Reaktionsansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der linearisierte Vektor wird mit dem „NucleoSpin Extract 2 in 1“-Kit der Fa. Macherey-Nagel isoliert (s. Abschnitt 5.2.1.5.).

10 x CIAP-Puffer (pH 9,0):

0,5 M Tris/HCl
10 mM MgCl_2
1 mM ZnCl_2
10 mM Spermidin

5.2.1.13. Überführung überstehender Enden in glatte Enden

Viele Restriktionsenzyme erzeugen kohäsive Enden mit einem 5'- oder 3'-überstehenden Ende. 5'-DNA-Überhänge können mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I

aufgefüllt werden. Der den 3'-Überhang tragende DNA-Strang kann von der T₄-Polymerase abgebaut und nach Zugabe von Nukleotiden wieder zu einem glatten Ende aufgefüllt werden.

- a) Reaktionsansatz für das Klenow-Enzym:
- 1 µg DNA
 - 2 µl 10 x NT-Puffer
 - 2 µl d(ATP/GTP/TTP/CTP), je 1 mM
 - 1 U Klenow-Enzym
 - mit Wasser auf 20 µl auffüllen

Der Reaktionsansatz wird dreißig Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wird die Reaktion durch zehnminütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Die DNA wird nach Zugabe des DNA-Probenpuffers in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des „NucleoSpin Extract 2 in1“-Kit der Fa. Macherey-Nagel aus dem Gel isoliert (s. Abschnitt 5.2.1.5.).

- b) Reaktionsansatz für die T₄-Polymerase:
- 1 µg DNA
 - 2 µl 10 x T₄-Pol.-Puffer
 - 1-2 U T₄-Polymerase
 - mit Wasser auf 18 µl auffüllen
 - 2 µl d(ATP/GTP/TTP/CTP), je 5 mM

- 10 x T₄-Pol.-Puffer (pH 7,9):
- 330 mM Tris-Acetat
 - 660 mM Kaliumacetat
 - 100 mM Magnesiumacetat
 - 5 mM DTT
 - 1 mg/ml Rinderserumalbumin

Nach Zugabe der T₄-Polymerase wird zwei Minuten bei 37°C, nach Zugabe der Nukleotide weitere fünfzehn Minuten bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wird einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit zwei Volumen Ethanol gefällt.

5.2.1.14. DNA-Ligase-Reaktion

DNA-Fragmente werden mit der T₄-DNA-Ligase verknüpft. Zur Verbindung glatter Enden wird 24 Stunden bei 21°C, und zur Verbindung überhängender Enden zwölf bis sechzehn Stunden bei 8°C inkubiert. Für die Ligation kleiner Fragmente (< 1000 Bp) wird ein etwa 10-fach molarer Überschuss des Fragments, große Fragmente (> 3000 Bp) werden mit der halben Menge Vektor ligiert. Die verwendeten Vektoren werden stets dephosphoryliert eingesetzt.

Reaktionsansatz:

linearisierte Vektor-DNA (200-400 ng)
 DNA Fragment
 2 µl Ligationspuffer
 1 µl 10 mM ATP
 2 µl T₄-Ligase
 mit Wasser auf 20 µl auffüllen.

Ligationspuffer:

660 mM Tris/HCl, pH 7,6
 100 mM MgCl₂
 10 mM Spermidin

5.2.1.15. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann bei Wahl geeigneter Oligonukleotide zur *in-vitro*-Amplifikation von DNA-Abschnitten verwendet werden [Saiki *et al.*, 1985]. Dazu werden eine doppelsträngige DNA-Vorlage und zwei begrenzende Oligonukleotide einer kontinuierlich aufeinanderfolgenden Reihe von Denaturierungen, Primer-Hybridisierungen und DNA-Polymerisierungen in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und hitzeresistenter *Taq*-DNA-Polymerase [Chien *et al.*, 1976] ausgesetzt. Die Oligonukleotide haben unter Umständen an den Enden einen Überhang von nicht hybridisierenden Nukleotiden, mit deren Hilfe andere Sequenzen, wie z. B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, eingeführt werden können. Um die DNA-Vorlage zu Beginn der Reaktion vollständig zu denaturieren, wird für den ersten Zyklus eine Denaturierungsdauer von 180 s gewählt. Für den letzten Zyklus wird eine Polymerisationsdauer von 300 s benutzt, um vollständig polymerisierte Endprodukte zu erhalten. Die Hybridisierungstemperatur (T_H) eines bestimmten Oligonukleotids wird anhand seiner Basenzusammensetzung folgendermaßen abgeschätzt [Suggs *et al.*, 1981]:

$$T_H = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 2$$

Mit einem programmierbaren „Thermocycler“ werden die Zyklen automatisch gesteuert. Die DNA kann aus Agarosegelen isoliert werden (s. Abschnitt 5.2.1.5.).

Reaktionsansatz:

0,5 µg Plasmid-DNA
 2 µl Oligonukleotid A (10 pmol/ml)
 2 µl Oligonukleotid B (10 pmol/ml)
 5 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
 5 µl 10 x *Taq*-Polymerase Puffer
 1 µl *Taq*-Polymerase (3-4 U)
 mit Wasser auf 50 µl auffüllen.

10 x *Taq*-Polymerase-Puffer:

100 mM Tris/HCl (pH 8,3)
 500 mM KCl
 0,1% (w/v) Gelatine

Reaktionsbedingungen:

Denaturieren: 180 s bei 94°C
 Hybridisieren: 60 s bei T_H
 Verlängerung: 90 s bei 72°C
 Zyklenzahl: 40

5.2.1.16. Transformation von *E. coli*-Zellen

5.2.1.16.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation

1 l LB-Medium wird mit 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 250 Upm kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht ist. Die Zellen werden zwanzig Minuten auf Eis abgekühlt und dann bei 3.000 x g und 4°C zehn Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit insgesamt 1 l autoklaviertem Wasser gewaschen. Anschließend werden die *E. coli*-Zellen mit 50 ml 15%igem autoklaviertem Glycerin resuspendiert und bei 3.000 x g und 4°C pelletiert. Nach erneutem Resuspendieren in 1 bis 2 ml 15%igem Glycerin werden 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.1.16.2. Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation

1 µg DNA wird mit 50 µl kompetenten *E. coli*-Zellen in eine eiskalte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgt in einer Elektroporationsapparatur bei einem Widerstand von 200 Ω, einer Spannung von 2,5 kV und bei einer Kondensatorkapazität von 25 µF. Anschließend werden die Zellen in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach werden Aliquots der Suspension auf die entsprechenden Selektionsagarplatten ausgebracht.

5.2.1.17. *E. coli*-Dauerkulturen

Wichtige Transformanten werden als Dauerkultur konserviert. 910 µl einer Übernachtskultur in LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, werden mit 90 µl DMSO gemischt und bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt.

5.2.2. Proteinchemische und immunologische Methoden

5.2.2.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese [Lämmli, 1970] werden 10-15%ige Trenngele in einer Größe von 7,5 cm x 10 cm x 0,05 cm mit 5% igem Sammelgel (s. Tabelle 19) verwendet. Zu den aufzutrennenden Proteinlösungen werden je nach Bedarf unterschiedliche Mengen 5 x SDS-Probenpuffer gegeben. Die Mischung wird anschließend

für fünf Minuten bei einer Temperatur von 95°C inkubiert. Als Molekülmassenstandard wird ein Proteinmarker parallel behandelt. Die Gele werden in eine Gelapparatur gespannt. Die Kammern werden mit 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt und die Taschen mit der behandelten Proteinlösung geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei einer Spannung zwischen 100 und 190 V. Nach der Elektrophorese werden die Proteine entweder mit Coomassie-Blau (s. Abschnitt 5.2.2.3.) gefärbt oder durch Semi-Dry-Transfer auf Nitrocellulose (s. Abschnitt 5.2.2.2.) übertragen.

Tabelle 19: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele¹⁾

Trenngel:	10%	12%	15%
Acrylamid 30:0,8 ²⁾ [ml]:	19,7	23,6	30
Wasser [ml]:	23,5	19,6	13,2
1,5 M Tris/HCl pH 8,8 [ml]:	16	16	16
10% SDS [µl]:	590	590	590
TEMED [µl]:	23	23	23
10% APS [µl]:	165	165	165
Sammelgel:	5%		
Acrylamid 30:0,8 ²⁾ [ml]:	3,4		
Wasser [ml]:	14,3		
0,5 M Tris/HCl pH 6,8 [ml]:	2		
10% SDS [µl]:	200		
TEMED [µl]:	8		
10% APS [µl]:	80		

1) Mengenangaben für 12 Minigele; 2) Acrylamid : Bisacrylamid

5 x SDS-Probenpuffer:

2,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,5
 4,0 ml 10% Natriumdodecylsulfat
 2,0 ml Glycerin
 1,0 ml 14,3 M β-Mercaptoethanol
 200 µl 10% Bromphenolblau-Lösung

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer:

0,25 mol Tris
 1,9 mol Glycin
 1% Natriumdodecylsulfat

Molekülmassenstandard:

LMW-Marker (Pharmacia) [Da]: 94.000; 67.000; 43.000; 30.000; 20.100; 14.400

5.2.2.4. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird nach der von **M. M. Bradford** (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Bindung von Coomassie „Brilliant Blue“ G 250 an Proteine. Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm verschoben. Zur Erstellung der Eichkurve wird Rinderserumalbumin als Standard verwendet. Sowohl für die Probe als auch für den Standard werden für jeden Ansatz 33 µl Proteinlösung mit 33 µl Wasser versetzt. Anschließend wird 1 ml Bradford-Reagenz (Sigma) hinzugegeben. Nach fünf Minuten wird die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen.

5.2.2.5. Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose

Die Nitrocellulose-Membran wird nach dem Protein-Transfer für mindestens zwei Stunden, meistens jedoch über Nacht, mit NCP-Puffer abgesättigt. Danach wird sie in Hybridomaüberständen, in der Regel 1:1 mit NCP-Puffer verdünnt, für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Membran einmal kurz, dann zweimal zehn Minuten mit NCP-Puffer gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation der Nitrocellulose-Filter mit dem sekundären Antikörper, der 1:10.000 in NCP-Puffer verdünnt wird, für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Rahmen dieser Arbeit handelt es sich stets um einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus IgG Antikörper. Nicht gebundene Antikörper werden anschließend durch sechsfaches Waschen mit NCP-Puffer für je fünf Minuten entfernt. Die Immunmarkierung wird nun mit Hilfe eines ECL-Systems sichtbar gemacht. Dabei oxidiert die am sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase Luminol, was zu einer Lichtreaktion bei 430 nm führt. Dies führt zu einer Schwärzung des Röntgenfilms. Die Membran wird kurz in der Luminollösung inkubiert und ein Röntgenfilm für fünf Sekunden bis dreißig Minuten exponiert.

Luminol: 2 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,0
 200 µl (0,25 mol in DMSO) 3-Aminonaphthylhydrazid
 89 µl (0,1 mol in DMSO) p-Cumarsäure
 18 ml Wasser
 6,1 µl 30%ige H₂O₂-Lösung

5.2.2.6. Isolierung von Phagosomen aus *D. discoideum*

Die Isolierung von Phagosomen wurde nach **Maniak et al.** (1995) durchgeführt. 300 ml einer Zellkultur mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml werden mit dem hundertfachen Überschuß an supermagnetischen Eisenoxid-Kügelchen (Polysciences) bei 21°C für zehn Minuten geschüttelt. Um den Endocytoseprozeß zu stoppen, werden die Zellen sofort auf Eis

gekühlt. Alle weiteren Schritte werden auf Eis vorgenommen. Die Zellen werden in einer vorgekühlten Zentrifuge dreimal bei 720 x g mit eiskaltem Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 10 ml Homogenisationspuffer aufgenommen. Nach dem durch dreifach wiederholtes Einfrieren und Auftauen erfolgten Zellaufschluß wird die Suspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und durch fünfzehnminütige magnetische Extraktion dreimal mit 10 ml Homogenisationspuffer gewaschen. Vom ersten Überstand wird ein Aliquot zur Kontrolle abgenommen und der Proteingehalt bestimmt. Nach dem letzten Waschen wird 1 ml des Pellets in einer Eppendorf-Zentrifuge bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Das Pellet wird geteilt. Zur Bestimmung des Proteingehalts werden 500 µl des Pellets in 200 µl Lysispuffer aufgenommen und fünf Minuten auf 100°C erhitzt. Die Proteinbestimmung erfolgt mit Hilfe des Bradford-Reagenzes (s. Abschnitt 5.2.2.4.). Die restlichen 500 µl des Pellets werden mit 200 µl SDS-Probenpuffer (s. Abschnitt 5.2.2.1.) versetzt und fünf Minuten auf 100°C erhitzt. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet.

Homogenisationspuffer:

30 g (88 mmol) Saccharose
3 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5
200 µl 1 M DTT-Lösung
800 µl 0,5 M EGTA-Lösung, pH 8,0
500 µl 1 M Benzamidinlösung
500 µl 0,1 M PMSF-Lösung
mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

Lysispuffer:

2 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5
100 µl 1 M DTT-Lösung
5 ml 0,2 M EDTA-Lösung, pH 7,2
500 µl 1 M Benzamidinlösung
500 µl 0,1 M PMSF-Lösung
mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

5.2.3. Kultur von *D. discoideum*

5.2.3.1. Anzucht in Flüssigmedium

Der *D. discoideum* Stamm AX2 sowie Transformanten können in Flüssigmedium kultiviert werden. Dazu werden sie aus Vorkulturen, Sporen oder von SM-Platten in AX2-Medium, gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, angeimpft. Um Kulturen von *K. aerogenes* zu befreien, wird dem Medium außerdem 100 µl Dihydrostreptomycinsulfat (40 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Die Generationszeit beträgt in 300 ml Schüttelkulturen bei 21°C und 160 Upm ungefähr neun Stunden.

5.2.3.2. Sporengewinnung und Konservierung

Axenisch gewachsene Zellen werden zweimal mit kaltem Soerensen-Phosphat-Puffer, pH 6,0, gewaschen und in einer Dichte von 2×10^8 Zellen/ml suspendiert. Jeweils 500 μ l der Suspension werden auf eine Phosphatagarplatte ausgebracht. Die Zellen bilden innerhalb von zwei Tagen Fruchtkörper. Die Sporen werden im Deckel der Petrischale gesammelt. Anschließend werden sie in 10 ml kaltem Soerensen-Phosphat-Puffer aufgenommen und als 1 ml Aliquots auf Nunc-Einfrierröhrchen verteilt. Nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff lassen sich die Sporen bei -80°C lagern.

Zum Animpfen wird ein aufgetautes Aliquot in 30 ml AX2-Medium gegeben. Nach drei Tagen bei 21°C und 160 Upm hat diese Vorkultur eine Dichte von ungefähr 5×10^6 Zellen/ml.

900 μ l einer *D. discoideum*-Kultur mit einer Zelldichte von 2 bis 4×10^6 Zellen/ml werden zum Einfrieren mit 100 μ l DMSO und 100 μ l Pferdeserum versetzt und in ein steriles Einfrieröhrchen pipettiert. Zunächst wird das Gefäß ein bis zwei Stunden bei 0°C und anschließend für zwei Stunden bei -20°C inkubiert, um schließlich bei -80°C gelagert zu werden.

5.2.3.3. Transformation von *D. discoideum*

Das Einführen von DNA wird nach dem Elektroporationsverfahren von **P. K. Howard** vorgenommen [Howard *et al.* 1988].

D. discoideum-Zellen werden bis zu einer Dichte von 2 bis 3×10^6 Zellen/ml kultiviert, durch Zentrifugation bei $720 \times g$ geerntet und einmal mit kaltem Soerensen-Phosphat-Puffer pH 6,0, sowie ein weiteres Mal mit kaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Danach werden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml in eiskaltem Elektroporationspuffer suspendiert. 500 μ l dieser Zellsuspension werden zusammen mit 15 bis 30 μ g des zu transformierenden Vektors in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation wird in einer Elektroporationsapparatur bei einer Kondensatorkapazität von 3 μ F, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 0,9 kV durchgeführt. Danach werden die Zellen in eine Petrischale überführt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird CaCl_2 und MgCl_2 zu einer Endkonzentration von 1 mM tropfenweise als Lösung hinzugegeben. Nach fünfzehn Minuten leichtem Schütteln bei einer Temperatur von 21°C werden 10 ml AX2-

Gelvatol: 20 g Gelvatol 20-30 (Polyvinylglykol, MW 10.000)
in PBS 16 h rühren
40 ml Glycerin zugeben, 16 h rühren
15 min bei 12.000 x g zentrifugieren
25 ng/ml DABCO [Langanger *et al.*, 1983] zum Überstand geben
Lagerung bei -20°C

5.2.3.5. Indirekte Immunfluoreszenz an *D. discoideum*-Zellen mit phagozytierten Hefen

D. discoideum-Zellen werden nach dem Ernten einmal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen und dann auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. 500 µl der Zellsuspension werden auf ein Deckgläschen mit einem Durchmesser von 18 mm pipettiert. Nach zwanzig Minuten, in denen sich die Zellen absetzen können, wird die Flüssigkeit entfernt. Die TRITC-, FITC- oder unmarkierten Hefen mit einer Zelldichte von 1×10^9 Zellen/ml werden 1:10 in Soerensen-Phosphat-Puffer verdünnt. Anschließend werden 300 µl Hefesuspension für zwanzig Minuten auf die vorbereiteten Deckgläschen gegeben. Daran schließt sich die Methanolfixierung an. Der weitere Verlauf des Experimentes entspricht der Vorschrift in Abschnitt 5.2.3.4.

5.2.3.6. T6-Versuch mit GFP-Fusionsprotein exprimierenden AX2-Zellen

GFP-Fusionsprotein exprimierende *D. discoideum*-Zellen werden zweimal in Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Danach werden die Zellen in einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml resuspendiert. Die Kultur wird bei 160 Upm und 21°C geschüttelt. Zum Zeitpunkt null Stunden und nach sechs Stunden wird ein Aliquot entnommen und auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml verdünnt. 500 µl der Zellsuspension werden zur Fixierung auf ein Deckgläschen verwendet. Die Methanolfixierung verläuft genau wie in Abschnitt 5.2.3.4. beschrieben.

5.2.3.7. Phagozytose von Fluoreszenz-markierten Hefen

Fluoreszenz-markierte YSC-Hefen (Sigma) sind entsprechend der Vorschrift aus dem EMBO Course, Juli 3-15, 1994 hergestellt worden. Dazu werden 5 g Hefen in 50 ml PBS suspendiert und dreißig Minuten unter Rühren erhitzt. Anschließend werden die Zellen fünfmal mit PBS und danach zweimal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Es wird eine Zelldichte von

1×10^9 Zellen/ml eingestellt. Aliquots lassen sich bei einer Temperatur von -20°C aufbewahren. Zur Fluoreszenzmarkierung werden 2×10^{10} dieser vorbereiteten Zellen in 20 ml 50 mM Na_2HPO_4 -Lösung, pH 9,2, die 2 mg TRITC enthält, resuspendiert und danach dreißig Minuten bei 37°C rotiert. Die Hefezellen werden zweimal mit Natriumhydrogenphosphat-Puffer und anschließend viermal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Aliquots von 1×10^9 Zellen/ml werden in Soerensen-Phosphat-Puffer bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt. Diese Vorschrift läßt sich auch für die Hefemarkierung mit FITC anwenden. Um die Fluoreszenz nicht phagozytierter Hefen zu quenchen wird eine Trypan Blau-Lösung verwendet. Dazu wird Trypan Blau in einer Endkonzentration von 20 mg/ml in 20 mM Natriumcitratlösung, die zusätzlich 150 mM NaCl enthält, gelöst. Der pH-Wert wird auf 4,5 eingestellt. Die Lösung wird dreißig Minuten bei Raumtemperatur gerührt, dann filtriert und anschließend durch einen Filter mit einer Porenweite von $0,45 \mu\text{m}$ gepreßt.

D. discoideum-Zellen werden mehr als fünf Generationen in axenischem Medium bis zu einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml gezüchtet. Nach Zentrifugation bei $720 \times g$ für zwei Minuten bei Raumtemperatur werden die Zellen einmal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in demselben Puffer in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Nach zehn-minütiger Inkubation bei 21°C auf einem Schüttler bei 160 Upm werden 20 ml Zellsuspension mit 200 μl Fluoreszenz-markierter Hefe versetzt. Alle zwanzig Minuten nach Zugabe der Hefe wird jeweils ein 1 ml Aliquot entnommen und mit 100 μl Trypan Blau-Lösung versetzt. Die Mischung wird drei Minuten geschüttelt und anschließend 15 Sekunden bei $1.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig und vollständig abgenommen. Das Zellpellet wird in 1 ml Soerensen-Phosphat-Puffer resuspendiert. Die Emission wird bei 574 nm bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm gemessen.

5.2.3.8. Hyperosmotischer Schock

D. discoideum-Zellen des Wildtyps AX2 sowie der Comitit-Minusmutante 1a1 werden bei einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml geerntet. Nach zweimaligem Waschen mit Soerensen-Phosphat-Puffer werden die Zellen in einer Dichte von 3×10^7 Zellen/ml resuspendiert. 5 ml dieser Zellsuspension werden anschließend bei 21°C und 160 Upm für eine Stunde geschüttelt. Danach wird 2 M Sorbitollösung bis zu einer Endkonzentration von 0,4 mol/l hinzugegeben. Zu den Zeitpunkten 0, 1 und zwei Stunden nach Zugabe des Sorbitols werden 900 μl Aliquots entnommen, in Soerensen-Phosphat-Puffer, der suspendierte *K. aerogenes*-Zellen enthält, zunächst 1:10, dann aus dieser Verdünnung 1:100 verdünnt. 6,7 μl dieser

Verdünnung werden zusammen mit 100 µl *K. aerogenes*, in Soerensen-Phosphat-Puffer resuspendiert, auf SM-Agarplatten ausgebracht. Die SM-Agarplatten werden nun bei 21°C inkubiert, bis Kolonien sichtbar sind. Die Zahl der nach Sorbitolzugabe vorhandenen Freßhöfe wird für den jeweiligen *D. discoideum*-Typ in Beziehung zu der Kolonienzahl vor der Sorbitolzugabe (Stunde 0) gesetzt.

5.2.3.9. Hypoosmotischer Schock

AX2-Zellen und 1a1-Zellen werden bei einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml geerntet. Nach zweimaligem Waschen in Soerensen-Phosphat-Puffer werden die Zellen in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in destilliertem Wasser resuspendiert. 10 ml dieser Zellsuspension werden dann 90 Minuten bei 21°C und 160 Upm geschüttelt. Anschließend werden die Zellen zur Methanolfixierung und den darauffolgenden Immunfluoreszenzstudien (s. Abschnitt 5.2.3.4.) auf Deckgläschen überführt.

5.2.4. Kultur von PC12-Zellen

5.2.4.1. Anzucht in Flüssigmedium

Ratten PC12-Zellen werden bei 37°C mit 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 5% Rinder- und 10% Pferdeserum angezogen.

5.2.4.2. Proteinchemische Untersuchungen an PC12-Zellen

5.2.4.2.1. Zellaufschluß für Western-Blot-Analyse

3×10^6 Zellen werden nach Waschen mit PBS, pH 7,0, mit 500 µl RIPA-Puffer versetzt und dreißig Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen zehn Minuten bei 13.000 x g bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Das Pellet und der Überstand werden getrennt in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. Abschnitt 5.2.2.1.) untersucht.

RIPA-Puffer: 150 mmol NaCl
 1% Nonidet P-40
 0,5% Natriumdeoxycholat
 0,1% Natriumdodecylsulfat
 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

5.2.4.2.2. Zellfraktionierung

1×10^{10} PC12-Zellen werden mit kaltem PBS-Puffer, pH 7,0, geerntet und zweimal bei 1.000 x g und 4°C gewaschen. Das Zellpellet wird in 3 ml Hepes-DTT-Puffer resuspendiert und mit einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Das Homogenat wird auf einen Saccharose-Gradienten, bestehend aus einer Schicht aus 2,5 M Saccharose und einer Schicht 1,32 M Saccharose, aufgetragen und achtzehn Stunden bei 100.000 x g zentrifugiert. Die an der 2,5 M Saccharose- bzw. an der 1,32 M Saccharose-Grenzschicht liegenden Membranfraktionen werden abgenommen und mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. Abschnitt 5.2.2.1.) weiter untersucht.

Hepes-DTT-Puffer: 10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4
 1 mM DTT
 0,5 mM PMSF
 2 mM Benzamidin

5.2.5. Mikroskopie

Für die konfokale Lasermikroskopie wird das von der Fa. Leica entwickelte CLSM-SP-Mikroskop benutzt, das optische Schnitte durch die Präparate erlaubt. Die Präparate können bei 63-facher Vergrößerung (Pl APO 63x/1,32-0,6/ Öl) betrachtet werden. Das Gerät ist mit einem Krypton- und einem Argonlaser ausgestattet und ermöglicht elektronische Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen. Der Emissionsbereich des zu empfangenden Signals kann durch die Software eingegrenzt werden, so daß Kreuzanregungen durch die beiden Laser verhindert werden. Die Daten werden mit dem begleitenden Bildverarbeitungssystem der Fa. Leica weiterverarbeitet.

5.2.6. Methoden zum „Two-Hybrid“-System

5.2.6.1. Isolation der pACT2/Fragment-Plasmid-DNA aus den Phagenbibliotheken

5.2.6.1.1. Titerbestimmung der *D. discoideum*-Phagenbibliotheken

Zur Titerbestimmung wird eine serielle Verdünnungsreihe (1:10², 1:10⁴, 1:10⁶ und 1:10⁸) der Phagenstocks in sterilem SM-Puffer erstellt. Für XL1-blue-Maltosezellen wird eine *E. coli*-XL1 blue-Übernachtkultur in 50 ml LB-Medium mit 0,2% Maltose und 10 mM MgSO₄ abzentrifugiert und in 10 ml 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert. Die Phagenverdünnung wird mit 100 µl XL1 blue-Maltosezellen versetzt. Die Proben werden zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so daß die Phagen an die *E. coli*-Zellen anhaften können. Anschließend erfolgt eine weitere Inkubation der Proben bei 37°C für zehn Minuten. Die Kulturen werden dann zu 4 ml vorgewärmter Top-Agarose-Aliquots gegeben, vorsichtig gemischt und auf vorgewärmte LB-Agarplatten (42°C) ausgebracht. Die Agarplatten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Titer läßt sich aus der Anzahl der Plaques auf der LB-Agarplatte unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnung berechnen.

5.2.6.1.2. Amplifikation der *D. discoideum*-Phagenbibliotheken

1 x 10⁵ Phagen werden zu 250 µl XL1 blue-Maltosezellen (s. Abschnitt 5.2.6.1.1.) gegeben. Die Probe wird fünfzehn Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 0,5 ml der *E. coli*-Phagenmischung zu 8 ml 47°C warmer Top-Agarose pipettiert und dann auf frische 37°C vorgewärmte LB-Agarplatten gegeben. Nach Inkubation der Platten bei 37°C für sieben Stunden wird jede Agarplatte mit 10 ml SM-Puffer überschichtet. Die Agarplatten werden nun sechzehn Stunden bei 4°C aufbewahrt. Danach wird der SM-Puffer mit einer Pasteurpipette abgenommen. Die Überstände werden vereinigt und fünf Minuten bei 3.000 x g zentrifugiert. Der Zentrifugenüberstand wird mit 500 µl Chloroform versetzt. Die Phagenbibliothek läßt sich bei 4°C lagern. Zur Aufbewahrung bei -80°C werden 930 µl Aliquots des Zentrifugenüberstandes, der kein Chloroform enthält, mit 70 µl DMSO versetzt.

SM-Puffer: 5,85 g (0,1 mol) NaCl
2 g (8,1 mmol) MgSO₄ x 7 H₂O
50 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,4
5 ml 2% Gelatine
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

5.2.6.1.3. Konvertierung der 1 -Bibliotheken in Plasmid-cDNA-Banken und Isolation der pACT2/Fragment-Plasmid-DNA

Eine 1:10 verdünnte *E. coli*-BNN 132 Übernachtskultur wird bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert. Nach Zugabe desselben Volumens 10 mM MgCl₂-Lösung wird 1 ml der Bakteriensuspension mit 1 x 10⁸ Phagen versetzt. Die Kultur wird dreißig Minuten bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend werden 2,5 ml LB-Medium hinzugefügt. Nach einer Stunde Wachstum bei 30°C unter Schütteln (150 Upm) werden 300 µl Aliquots der Kultur auf 12 cm x 12 cm Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten werden über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Die Kolonien auf den Agarplatten werden vorsichtig mit TB-Medium geerntet. Anschließend wird die Bakteriensuspension in insgesamt 6 l TB-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln (250 Upm) inkubiert. Die Plasmid-DNA wird entsprechend des Maxi-Präparationsprotokolls der Fa. Macherey-Nagel isoliert.

TB-Medium: 12 g Bacto Trypton
24 g Bacto Hefeextrakt
4 ml Glycerin
900 ml Wasser
autoklavieren und anschließend mit 100 ml steriler Lösung, bestehend aus 0,17 M KH₂PO₄- und 0,72 M K₂HPO₄-Lösung, versetzen.

5.2.6.2. Transformation der Hefezellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA ist entsprechend der modifizierten Lithiumacetat-Hefetransformationsmethode durchgeführt worden. Die „Two-Hybrid“-Durchmusterung der *D. discoideum*-cDNA-Banken erfolgt nach dem Clontech-Protokoll.

5.2.6.2.1. Modifizierte Lithiumacetat-Hefetransformationsmethode

Y190-Hefezellen werden über Nacht in YEPD-Medium bei einer Temperatur von 30°C bis zur Sättigung kultiviert. Für jeden Transformationsansatz wird 1 ml dieser Hefesuspension in einer Mikrozentrifuge für fünf Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen. Das Pellet wird in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Daran schließt sich die Zugabe von 2 µl

einer 10 mg/ml Heringssperma-DNA enthaltenden Lösung und jeweils ungefähr 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA an. Die Reaktionsmischung wird geschüttelt und dann mit 500 µl Plate-Mischung versetzt. Nach erneutem Schütteln werden 50 µl einer 1 M DTT-Lösung hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird nach vorherigem Schütteln über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Dann erfolgt eine Inkubation der Zellen bei 42°C für zehn Minuten. Nach kurzer Zentrifugation wird der Überstand abgegossen und die Zellen in 300 µl Wasser resuspendiert. Die Hefesuspension wird auf die entsprechenden SD-Agarplatten, wie in Tabelle 20 angegeben, ausgebracht.

Tabelle 20: Verwendete SD-Agarplatten für Hefetransformationen

Plasmid	SD-Agarplatte	SD-Kontrollagarplatte
pAS2	SD/-Trp	*
pACT2	SD/-Leu	*
pAS2 und pACT2	SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT	SD/-Leu/-Trp

Plate-Mischung:
 90 ml 50%ige PEG-4000-Lösung
 10 ml 1 M Lithiumacetatlösung
 1 ml 1 M Tris-HCl-Lösung, pH 7,5
 0,2 ml 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0

5.2.6.2.2. Transformation der Hefezellen nach dem Clontech-Protokoll

5.2.6.2.2.1. Präparation von kompetenten Hefezellen

Für eine Transformation werden einige Kolonien des Y190-Hefestammes in 1 ml YEPD-Medium bzw. Y190-Hefezellen mit pAS2/Comitin in 1 ml SD/-Trp-Medium aufgenommen und durch heftiges Schütteln suspendiert. Die Hefezellsuspension wird mit 50 ml des entsprechenden Mediums verdünnt und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (250 Upm) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ größer 1,5 erreicht ist. Dann wird die Übernachtskultur mit 300 ml frischem Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,3 verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden bei 30°C unter Schütteln (230 Upm) werden die Zellen bei 1.000 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird in 50 ml sterilem Wasser resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wird das Hefepellet in 1,5 ml frisch hergestelltem, sterilen 1 x TE/LiAc-Puffer aufgenommen.

10 x LiAc-Puffer:
1 M Lithiumacetat, pH 7,5

10 x TE-Puffer:
0,1 M Tris-HCl, pH 7,5
10 mM EDTA

5.2.6.2.2. Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation von kompetenten Y190-Hefezellen wird entsprechend des „small scale“-Protokolls von der Fa. Clontech durchgeführt.

In jedem Transformationsansatz werden 0,1 µg Plasmid-DNA (pAS2/Comitin), 100 µg Heringssperma-DNA und 100 µl kompetente Hefezellen gemischt. Nach Zugabe von 600 µl frisch hergestellter steriler PEG/LiAc-Lösung wird die Reaktionsmischung geschüttelt und anschließend für dreißig Minuten bei 30°C unter Schütteln bei 200 Upm inkubiert. Dann werden 70 µl DMSO zum Transformationsansatz hinzugegeben. Nach fünfzehn Minuten bei einer Temperatur von 15°C werden die Zellen auf Eis abgekühlt. Die Suspension wird danach fünf Sekunden bei 13.000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Hefepellet wird in 500 µl sterilem TE-Puffer aufgenommen und jeweils 100 µl der Suspension werden auf die entsprechende SD-Selektionsagarplatte ausgestrichen. Die Agarplatten werden bei 30°C inkubiert, bis sich Kolonien zeigen.

Die cDNA-Bank-Durchmusterung mit kompetenten Y190-Hefezellen, die bereits das pAS2/Comitin-Plasmid enthalten, wird nach der „large-scale“-Vorschrift der Clontech-Anweisung vorgenommen.

Jeder Transformationsansatz besteht aus 100 µg pACT2/Fragment-Plasmid-DNA aus der jeweiligen *D. discoideum*-cDNA-Bank, 2 mg Heringssperma-DNA und 1 ml kompetente Hefezellen. Nach Zugabe von 6 ml frisch hergestellter, steriler PEG/LiAc-Lösung wird der Reaktionsansatz kurz gemischt und dreißig Minuten bei 30°C unter Schütteln (200 Upm) inkubiert. Anschließend werden 700 µl DMSO hinzugegeben. Dann werden die Zellen 15 Minuten in einem Wasserbad auf 42°C erhitzt. Nachdem die Zellen kurz auf Eis abgekühlt worden sind, wird die Suspension für fünf Minuten bei 1.000 x g und 21°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Hefepellet wird in 10 ml sterilem TE-Puffer aufgenommen. Jeweils 170 µl der Suspension werden auf SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT-Agarplatten mit einer Oberfläche von 12 cm x 12 cm ausplattiert.

PEG/LiAc-Lösung:

8 ml	50% PEG 4000-Lösung
1 ml	10 x TE-Puffer
1 ml	10 x LiAc-Lösung

5.2.6.2.2.3 Ermittlung der Transformationseffizienz

100 µl einer Suspension transformierter Hefezellen, die bereits das pAS2/Comitin-Plasmid enthalten, werden in einer Verdünnung von 1:10, 1:100 und 1:1000 auf SD/-Trp- und SD/-Leu/-Trp-Selektionsagarplatten mit einem Durchmesser von 100 mm ausgebracht. Die Platten werden bei einer Temperatur von 30°C inkubiert, bis Kolonien sichtbar sind.

Zur Ermittlung der Transformationseffizienz wird zuerst die Zahl der Kolonien im Verhältnis zur eingesetzten DNA ermittelt:

$$\text{cfu}/\mu\text{g DNA} = \frac{\text{cfu} \times \text{Gesamtvolumen } [\mu\text{l}]}{\text{ausplatt. Volumen } [\mu\text{l}] \times \text{Verdünnung} \times \text{DNA-Menge } [\mu\text{g}]}$$

Bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten Plasmid-DNA ergibt sich als Gesamtzahl der Klone:

$$\text{Zahl der analysierten Klone} = (\text{cfu}/\mu\text{g DNA}) \times \text{DNA Menge } [\mu\text{g}]$$

5.2.6.3. His⁺-Selektion der transformierten Hefezellen

Nach zehn Tagen werden die Hefeklone, die nach der Transformation mit dem pAS2/Comitin-Plasmid und dem pACT2/Fragment-Plasmid auf den SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT-Selektionsagarplatten bei 30°C gewachsen sind, mit sterilen Zahnstochern gepickt und auf eine neue SD/-His/-Leu/-Trp/+3-AT-Agarplatte ausgestrichen. Diese Platten werden erneut ungefähr fünf Tage bei einer Temperatur von 30°C inkubiert.

5.2.6.4. b-Glaktosidase-Test der His⁺-Hefeklonen [Schneider *et al.*, 1996]

Auf eine Agarplatte mit His⁺-Hefekolonien wird ein Nitrocellulosefilter gelegt und vorsichtig so angedrückt, daß die Hefeklone daran haften bleiben. Die Position des Filters auf der Platte wird markiert. Nach kurzer Inkubation wird der Filter vorsichtig entfernt und zehn Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend wird der Filter bei Raumtemperatur aufgetaut und mit der Kolonienseite nach oben auf einen mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung angefeuchteten Filter aus Whatman-Papier gelegt. Die Filter werden bei 30°C inkubiert und in regelmäßigen Abständen auf blau gefärbte Hefekolonien kontrolliert.

Z-Puffer (pH 7,0):

10,69 g (0,04 mol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
5,5 g (0,04 mol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
0,75 g (0,01 mol) KCl
0,246 g (0,01 mol) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Z-Puffer/X-gal-Lösung:

100 ml Z-Puffer, pH 7,0
0,27 ml 14,4 M β -Mercaptoethanol
1,67 ml X-gal-Lösung (20 mg/ml DMF)

5.2.6.5. Cycloheximid-Selektion

Jeweils eine Kolonie der His^+ - und LacZ^+ -Hefeklone wird in 400 μl sterilem Wasser aufgenommen und vollständig durch heftiges Schütteln suspendiert. 100 ml der Zellsuspension wird auf SD/-Leu-Cycloheximid-Agarplatten ausgebracht. Danach erfolgt eine Inkubation der Platten für zehn bis vierzehn Tage bei 30°C. Anschließend werden von jeder Platte mehrere Kolonien auf SD/-Trp- und SD/-Leu-Selektionsagarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation bei 30°C für einige Tage werden nur diejenigen Klone im weiteren Verlauf berücksichtigt, die nicht auf den SD/-Trp-Agarplatten gewachsen sind. Die Hefeklone auf den SD/-Leu-Selektionsplatten werden einem erneuten β -Galaktosidase-Test (s. Abschnitt 5.2.3.5.) unterzogen, um Klone auszuschließen, deren pACT2/Fragment-Plasmid autokatalytisch wirkt. Die so erhaltenen Leu^+ -, Trp^- - und cyh^{R} -Klone werden zur Isolierung der pACT2/Fragment-Plasmid-DNA eingesetzt.

5.2.6.6. Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen ist nur in sehr geringen Ausbeuten und mit Verunreinigung genomischer DNA möglich. Deshalb liefert diese Methode Plasmid-DNA, die in einem weiteren Schritt (s. Abschnitt 5.2.3.7.) in Bakterien amplifiziert werden muß [Hoffman *et al.*, 1987].

Eine Einzelkolonie der transformierten Hefezellen wird in 5 ml des entsprechenden Selektionsmediums (bei Leu^+ -Transformanden: SD/-Leu-Medium) aufgenommen und vollständig suspendiert. Nach mindestens 20 Stunden Inkubation bei 30°C unter Schütteln (250 Upm) wird die Kultur für fünf Minuten bei 1.000 x g und 21°C zentrifugiert. Das überstehende Medium wird abgossen. Das Pellet wird in etwas Restmedium resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 μl Hefe-Lysis-Puffer, 200 μl Phenol/Chloroform-Mischung im Verhältnis 1:1 und 0,4 g säuregewaschenen Glaskügelchen wird die Suspension eine Minuten heftig geschüttelt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur in einer Sigma-Tischzentrifuge bei 13.000 Upm wird die

obere wäßrige Phase in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wird durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung, pH 7,0, und 2,5 Volumen Ethanol bei -78°C für dreißig Minuten gefällt. Nach zehnminütiger Zentrifugation in einer Heraeus-Kühlzentrifuge bei 4°C mit maximaler Umdrehungszahl wird der Überstand abgegossen. Das Pellet wird anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das anschließend kurz getrocknete Pellet wird in 20 μl Wasser aufgenommen.

Hefe-Lysis-Puffer: 2% Triton X-100
 1% Natriumdodecylsulfat
 100 mM NaCl
 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA

5.2.6.7. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA aus Hefezellen

Die Transformation der aus Hefezellen isolierten Plasmid-DNA erfolgt nach der in Abschnitt 5.2.1.16.2. beschriebenen Elektroporationsmethode in XL1 blue- und DH5 α -*E. coli*-Zellen. Anschließend wird die Plasmid-DNA einer Kolonie nach der Boiling-Methode (s. Abschnitt 5.2.1.1.1.) isoliert und durch Restriktionsverdau mit dem Enzym BglIII kontrolliert. Von den Kolonien mit eindeutigen Klonen wird die Plasmid-DNA mittels der Minipräparationsmethode (s. Abschnitt 5.2.1.1.2.) isoliert. Zusätzlich wird von diesen Klonen jeweils eine *E. coli*-Dauerkultur (s. Abschnitt 5.2.1.17.) angelegt.

5.2.6.8. Anlegen von Hefedauerkulturen

Von einer 5 ml Übernachtskultur eines Hefeklons im entsprechenden Medium werden 910 μl in ein 1,5 ml Minipräparationsgefäß pipettiert und mit 90 μl DMSO versetzt. Die Dauerkultur wird bei -78°C aufgehoben.

5.2.6.9. Sequenzanalyse der „Two-Hybrid“-Klone

Die sequenzierten „Two-Hybrid“-Klone werden sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Proteinebene mittels Datenbankvergleich untersucht. Zur Suche auf Nukleinsäureebene werden mit den Programmen BLASTN und TBLASTN die Datenbanken Genbank, EST Division, EMBL, DDBJ und PDB durchsucht [Altschul *et al.*, 1990]. Während BLASTN möglichst schnell sehr ähnliche Sequenzen mit hoher Homologie erkennt, werden mit dem

Programm TBLASTN ähnliche Sequenzen mit größeren Lücken ermittelt. Peptidsequenzvergleiche der „Two-Hybrid“-Klone werden mit den Computerprogrammen BLASTP und TBLASTP gegen die Datenbanken Genbank, PDB, SwissProt und PIR durchgeführt [Altschul *et al.*, 1990]. Der isoelektrische Punkt und das Molekulargewicht werden mit dem Programm „abi“ berechnet (www.up.uni-mrs.fr/~wabim/d_abim/compop.html). Die Sekundärstruktur der Proteine wird mit dem Programm „Pôle Bioinformatique Lyonnais“ ermittelt (phil.bcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) [Geourjon und Deléage, 1995]. Die Übersicht über Aminosäuresequenzen verschiedener Proteine ist mit Hilfe des Computerprogramms „Ebi“ erstellt worden (www2.ebi.ac.uk/clustalw/). Mit Hilfe der Programme MOTIF Search und MotifFinder [Bairoch, 1992] werden bekannte Motive in Peptidsequenzen ermittelt. Verweise auf die genannten Programme sind im Internet unter der World Wide Web-Adresse „Pedro' s BioMolecular Research Tools“ (www.biophys.uni-duesseldorf.de/bionet/research_tools.html) oder (www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html) zu finden.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, R. J. und Pollard, T. D. (1986). Propulsion of organelles isolated from *Acanthamoeba* along actin filaments by myosin-I. *Nature* **322**, 754-756.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D. (1994). Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, 1 korr. Nachdruck 1997, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland.
- Allen, J. B., Walberg, M. W., Edwards, M. C. und Elledge, S. J. (1995). Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. *Trends Biochem Sci.* **20**, 511-516.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Andrade, M. A., Daruvar, A., Casari, G., Schneider, R., Termier, M. und Sander, C. (1997). Characterization of new proteins found by analysis of short open reading frames from the full yeast genome. *Yeast* **13**, 1363-1374.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1993). Current protocols in molecular biology. *Current Protocols Green Publishing Associates, John Willy Son, Inc.*, New York.
- Axline, S. G. und Reaven, E. P. (1974). Inhibition of phagocytosis and plasma membrane mobility of the cultivated macrophage by cytochalasin D. *J. Cell Biol.* **62**, 647-659.
- Bairoch, A. (1992). PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res.* **11**, 2013-2018.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M., Ravazzola, M., Amherd, M. und Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmatic reticulum. *Cell* **77**, 894-907.
- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R. und Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**, 920-924.
- Becker, B., Bolinger, B. und Melkonian, M. (1995). Anterograde transport of algal scales through the Golgi complex is not mediated by vesicles. *Trends Cell. Biol.* **5**, 305-307.
- Berthold, G., Stadler, J., Bozzaro, S., Fichtner, B. und Gerisch, G. (1985). Carbohydrate and other epitopes of the contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum* as characterized by monoclonal antibodies. *Cell Differ.* **16**, 187-202.
- Bonfanti, L., Mironov, A. A. Jr., Martínez-Menárguez, J. A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H. J., Mironov, A. A. und Luini, A. (1998). Procollagen Traverses the Golgi Stack without Leaving the Lumen of Cisternae: Evidence for Cisternal Maturation. *Cell* **95**, 993-1003.
- Bonner, J. T. (1947). Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Exp. Zool.* **106**, 1-26.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brent, R. und Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**, 729-736.
- Brown, S. S., Yamamoto, K. und Spudich, J. A. (1982). A 40,000-dalton protein from *Dictyostelium discoideum* affects assembly properties of actin in a Ca²⁺-dependent manner. *J. Cell. Biol.* **93**, 205-210.
- Bullock, W. O. (1987). *BiotTechniques* **5**, 376-378.

- Burridge, K. und Bray, D. (1975). Purification and structural analysis of myosin from brain and other non-muscle tissue. *J. Mol. Biol.* **99**, 1-14.
- Cantiello, H. F., Prat, A. G., Bonventre, J. V., Cunningham, C. C., Hartwig, J. H. und Ausiello, D. A. (1993). Actin-binding protein contributes to cell volume regulatory ion channel activation in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 4596-4599.
- Carlsson, L., Nystrom, L. E., Sundkvist, I., Markey, F. und Lindberg, U. (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* **115**, 465-483.
- Carlsson, L., Nystrom, L., Sundkvist, I., Markey, F. und Lindberg, U. (1977). Profilin, a low-molecular weight protein controlling actin polymerisability. *Monograph*, 39-49.
- Casella, J. F., Maack, D. J. und Lin, S. (1986). Purification and initial characterization of a protein from skeletal muscle that caps the barbed ends of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **261**, 10915-10921.
- Chien, A., Edgar, D. B. und Trela, J. M. (1976). Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550-1557.
- Chien, C. T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. und Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 9578-9582.
- Coleman, S. H., Maguire, B. A. und Wild, D. G. (1993). Ribosome assembly in three strains of *Escherichia coli* with mutations in the rpmB,G operon. *J. Gen Microbiol.* **139**, 707-716.
- Cowin, P und Burke, B. (1996). Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 56-65.
- Chubb, J. R., Wilkins, A., Thomas, G. M. und Insall, R. H. (2000). The *Dictyostelium* RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J. Cell Sci.* **113**, 709-719.
- Cole, N. B. und Lippincott-Schwartz, J. (1995). Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opi. Cell Biol.* **7**, 55-64.
- Condeelis, J., Vahey, M., Carboni, J. M., DeMey, J. und Ogihara, S. (1984). Properties of the 120,000- and 95,000-dalton actin-binding proteins from *Dictyostelium discoideum* and their possible functions in assembling the cytoplasmic matrix. *J. Cell. Biol.* **99**, 119s-126s.
- Dahan, S., Ahluwalia, L., Wong, L., Posner, B. I. und Bergeron, J. J. M. (1994). Concentration of intracellular hepatic apolipoprotein E in Golgi apparatus saccular distentions and endosomes. *J. Cell Biol.* **127**, 1859-1869.
- De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. und Appelmans, F. (1955). Intracellular Distribution Patterns of Enzymes in Rat-Liver Tissue. *Biochem. J.* **60**, 604-617
- DeHostos, E. L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R. und Gerisch, G. (1991). Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *EMBO J.* **10**, 4097-4104.
- DeHostos, E. L., Rehfueß, C., Bradtke, B., Waddel, D. R., Albrecht, R., Murphy, J. und Gerisch, G. (1993). *Dictyostelium discoideum* mutants lacking the cytoskeletal protein Coronin are defective in cytokinesis and cell motility. *J. Cell Biol.* **120**, 163-173.
- De Lozanne, A. und Spudich, J. A. (1987). Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**, 1086-1091.
- Donaldson, J. G. und Klausner, R. D. (1994). ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Curr. Opi. Cell Biol.* **6**, 527-532.
- Döring, V., Schleicher, M. und Noegel, A. A. (1992). Characterisation of actin- and lipid-binding domains in severin, a Ca²⁺-dependent F-actin fragmenting protein. *Biochemistry* **31**, 4779-4787.

- Driouich, A., Faye, L. und Staehelin, L. A. (1993). The plant Golgi-Apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *TIBS* **18**, 210-214.
- Duden, R., Griffith, G., Frak, R., Argos, P. und Kreis, T. E. (1991). β -COP, a 110 kD protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to β -adaptin. *Cell* **64**, 649-665.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. und Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Devel.* **7**, 555-569.
- Eichinger, L., Noegel, A. A. und Schleicher, M. (1991). Domain structure in actin-binding proteins: Expression and functional characterization of truncated severin. *J. Cell. Biol.* **112**, 665-676.
- Eichinger, L., Lee, S. S. und Schleicher, M. (1999). *Dictyostelium* as Model System for Studies of the Actin Cytoskeleton by Molecular Genetics. *Microsc. Res. Tech* **47**, 124-134.
- Faix, J., Noegel, A. A. und Gerisch, G. (1992). Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP regulated promoter impairs morphogenesis in *Dictyostelium*. *J. Cell. Sci.* **102**, 203-214.
- Fields, S. (1993). The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-247.
- Fields, S. und Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* **10**, 286-292.
- Flick, J. S. und Johnson, M. (1990). Two systems of glucose repression of the *Gall* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**(9), 4757-4769.
- Franke, W. W. (1993). The intermediate filaments. In *Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins* (Kreis, T. und Vale, R., eds.), Oxford University Press, Oxford, 137-144.
- Fritz, C. C. und Green, M. R. (1992). Fishing for partners. *Current Biol.* **2**, 403-405.
- Fulgenzi, G., Graciotti, L., Granata, A. L., Corsi, A., Fucini, P., Noegel, A. A., Kent, H. M. und Stewart, M. (1998). Location of the Binding Site of the Mannose-specific Lectin Comitin on F-Actin. *J. Mol. Biol.* **284**, 1255-1263.
- Fukui, Y., Lynch, T. J., Brzeska, H. und Korn, E. D. (1989). Myosin I is located at the leading edges of locomoting *Dictyostelium* amoebae. *Nature* **341**, 328-331.
- Furukawa, R. und Fechheimer, M. (1994). Differential localization of α -actinin and the 30 kD actin-bundling protein in the cleavage furrow, phagocytic cup, and contractile vacuole of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskeleton* **29**, 46-56.
- Gärtner, A., Ruhnau, K., Schöer, E., Selve, N., Wanger, M. und Wegner, A. (1989). Probing nucleation, cutting and capping of actin filaments. *J. Muscle Res. Cell Mot.* **10**, 1-9.
- Gerisch, G. (1965). Spezifische Zellkontakte als Mechanismen der tierischen Entwicklung. *Umschau* **13**, 392-395.
- Gill, S. R., Schroer, T. A., Szilak, I., Steuer, E. R., Sheetz, M. P. und Cleveland, D. W. (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic Dynein. *J. Cell. Biol.* **115**, 1639-1650.
- Gottwald, U., Brokamp, R., Karakesisoglou, I., Schleicher, M. und Noegel, A. A. (1996). Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in *Dictyostelium discoideum* and characterization of its interaction with actin. *Mol. Biol. Cell* **7**, 261-272.
- Goud, B. und McCaffrey, M. (1991). Small GTP-binding proteins and their role in transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 626-633.
- Geourjon, C. und Deleage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.*, **11**, 681-684.

- Gregg, J. H., Krefft, M., Haas-Kraus, A. und Williams, K. L. (1982). Antigenic differences detected between prespore cells of *Dictyostelium discoideum* and *Dictyostelium mucoroides* using monoclonal antibodies. *Exp. Cell. Res.* **142**, 229-233.
- Greene, L. A. und Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **73**, 2424-2428.
- Griffiths, G. und Simons, K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**, 438-443.
- Guarente, L. (1993). Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1639-1641.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanakam, F., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Müller-Taubenberger, A., Schäfer, W. und Gerisch, G. (1995). The pH-sensitive actin-binding protein hisactophilin of *Dictyostelium* exists in two isoforms which both are myristoylated and distributed between plasma membrane and cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **270**, 596-602.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G 1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Hart, G. W., Kelly, W. G., Roquomore, E. P., Blomberg, M. A., Dong, L.-Y. D., Chou, T.-Y., Snow, D. und Greis, K. D. (1994). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is as abundant and as dynamic as phosphorylation. In Wieland, F. und Reutter, W. (eds), *Glyco- and Cell Biology*. 44th Mosbach Colloquium, Springer Verlag, Heidelberg, 91-103.
- Hartmann, H., Noegel A. A., Eckershorn, C., Rapp, S. und Schleicher, M. (1989). Ca²⁺-independent F-actin capping proteins: cap32/34, a capping protein from *Dictyostelium*, does not share homologies with known actin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **264**, 12639-12647.
- Haugwitz, M., Noegel A. A., Rieger, D., Lottspeich, F. und Schleicher, M. (1991). *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J. Cell. Sci.* **100**, 481-489.
- Haugwitz, M., Noegel, A. A., Karkesisoglou, J. und Schleicher, M. (1994). *Dictyostelium* amoebae that lack G-actin sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis and development. *Cell* **79**, 303-314.
- Haus, U., Trommler, P., Fisher, P. R., Hartmann, H., Lottspeich, F., Noegel, A. A. und Schleicher, M. (1993). The heat shock cognate protein from *Dictyostelium* affects actin polymerization through interaction with the actin-binding protein cap32/34. *EMBO J.* **12**, 3763-3771.
- Hayes, B. K. und Hart, G. W. (1994). Novel forms of protein glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 692-696.
- Hengen, P. N. (1997). False positives from the yeast two-hybrid system. *Trends Biochem Sci.* **22**, 33-34.
- Hitt, A. L. und Luna, E. J. (1994). Membrane interactions with the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 120-130.
- Hitt, A. L., Lu, T. H. und Luna, E. J. (1994). Ponticulin is an atypical membrane protein. *J. Cell Biol.* **126**, 1421-1431.
- Hoffmann, C. S. und Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Hope, I. A. und Struhl, K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional protein, GNN4 of yeast. *Cell* **46**, 885-894.

- Howard, P. K., Ahern, K. G. und Firtel, R. A. (1988). Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 2613-2618.
- Jenne, N., Rauchenberger, R., Hacker, U., Kast, T. und Maniak, M. (1998). Targeted gene disruption reveals a role of vacuolin B in the late endocytic pathway and exocytosis. *J. Cell Sci.* **111**, 61-70.
- Jermin, K. A., Berks, M., Kay, R. R. und Williams, J. E. (1987). Two distinct classes of Prestalk-enriched mRNA sequences in *Dictyostelium discoideum*. *Development* **100**, 745-755.
- Johnston, G. C., Prendergats, J. A. und Singer, R. A. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol.* **113**, 539-551.
- Jung, E. (1996). Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Comitín, einem aktin-bindenden membranassoziierten Protein aus *Dictyostelium discoideum*. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Jung, E., Fucini, P., Stewart, M., Noegel, A. A. und Schleicher, M. (1996). Linking microfilaments to intracellular membranes: the actin-binding and vesicle associated protein comitin exhibits a mannose-specific lectin activity. *EMBO J.* **15**, 1238-1246.
- Jung, G. und Hammer, J. A. (1990). Generation and characterization of *Dictyostelium* cells deficient in a myosin I heavy chain isoform. *J. Cell Biol.* **110**, 1955-1964.
- Kachar, B. (1985). Direct visualization of organelle movement along actin filaments dissociated from *Characean algae*. *Nature* **227**, 1355-1357.
- Karakesisoglou, I., Janssen, K.-P., Eichinger, L., Noegel, A. A. und Schleicher, M. (1999). Identification of a Suppressor of the *Dictyostelium* Profilin-minus Phenotype as a CD36/LIMP-II Homologue. *J. Cell Biol.* **145**, 167-181.
- Kakizawa, T., Miyamoto, T., Ichikawa, K., Kaneko, A., Hara, M., Nagasawa, T., Takeda, T., Mori, J.-i., Kumagai, M. und Hashizume, K. (1999). Functional Interaction between Oct-1 and Retinoid X Receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 19103-19108.
- Keegan, L., Gill, G. und Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from transcription-activating function of an eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**, 699-704.
- Klein, P. S., Sun, T. J., Saxe III, C. L., Kimmel, A. R., Johnson, R. L. und Devreotes, P. N. (1988). A Chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **241**, 1467-1472.
- Knecht, D. A. und Loomis, W. F. (1987). Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **236**, 1081-1086.
- Kobayashi, K., Kamakura, T., Tanaka, T., Yamaguchi, I. und Endo, T. (1991). Nucleotide sequence of the bsr gene and N-terminal amino acid sequence of blasticidin S deaminase from blasticidin S resistant *Escherichia coli* TK121. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 3155-3157.
- Köppel, B. (1994). Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Gelationsfaktors aus *Dictyostelium discoideum*. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Kreitmeier, M., Gerisch, G., Heizer, C. und Müller-Taubenberger, A. (1995). A talin homologue of *Dictyostelium* rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *J. Cell Biol.* **129**, 179-188.
- Kuznetsov, S. A., Langford, G. M. und Weiss, D. G. (1992). Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* **356**, 722-725.
- Lamaze, C. und Schmid, S. L. (1995). The emergence of clathrin-independent pinocytotic pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 573-580.
- Langanger, G., De Mey, J. und Adam, H. (1983). 1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-oktan (DABCO) verzögert das Ausbleichen von Immunfluoreszenzpräparaten. *Mikroskopie* **40**, 237-241.

- Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 722-725.
- Latchman, L. (1999). POU family transcription factors in the nervous system." *J. Cell Physiol.* **179**, 126-133.
- Leblond, C. P. (1989). Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone, and dentin. *Anat. Rec.* **224**, 123-138.
- Lee, T. H. und Linstedt, A. D. (1999). Osmotically Induced Cell Volume Changes Alter Anterograde and Retrograde Transport; Golgi Structure, and COPI Dissociation." *Mol. Biol. Cell* **10**, 1445-1462.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. und Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem.* **16**, 4743-4751.
- Leiting, B. und Noegel, A. A. (1988). Construction of an extrachromosomally replicating transformation vector for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid* **20**, 241-248.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Démollière, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezmann, H. und Cosson, P. (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**, 1199-1207.
- Levi, A., Eldridge, J. D. und Paterson, B. M. (1985). Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science* **229**, 393-395.
- Li, B. und Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* **7**, 957-963.
- Linstedt, A. D., Mehta, A., Suhan, J., Reggio, H. und Hauri, H. P. (1997). Sequence and overexpression of GPP130/GIMPc: evidence for saturable pH-sensitive targeting of a type II early Golgi membrane protein. *Mol. Biol. Cell.* **8**, 1073-1087.
- Linstedt, A. D. und Hauri, H. P. (1993). Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol. Biol. Cell.* **4**, 679-693.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S. und Klausner R. D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* **56**, 801-813.
- Liu, C. Y., Schroder, M. und Kaufman, R. J. (1972). Ligand-independent dimerization activates the stress-response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.*, im Druck.
- Luban, J. und Goff, S. P. (1995). The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions. *Current Opinion in Biotechnol.* **6**, 59-64.
- Ma, J. und Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**, 113-119.
- Ma, J. und Ptashne, M. (1988). Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* **55**, 443-446.
- Maguire, B. A. und Wild, D. G. (1997). Mutations in the *rpmBG* Operon of *Escherichia coli* That Affect Ribosome Assembly. *J. Bacteriol.* **179**, 2486-2493.
- Malchow, D. B., Nägele, B., Schwarz, H. und Gerisch, G. (1972). Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **28**, 136-142.
- Mandelkow, E. und Mandelkow, E.-M. (1995). Microtubules and microtubule associated proteins. *Curr. Opinion Cell Biol.* **7**, 72-81.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J. und Gerisch, G. (1995). Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag. *Cell* **83**, 915-924.
- Manstein, D. J., Ruppel, K. M. und Spudich, J. A. (1989). Expression and characterization of a functional myosin head fragment in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **246**, 656-658.

- Marsh, J. L., Erfle, M. und Wykes, E. J. (1984). The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**, 481-485.
- McRobbie, S. J., Jermyn, K. A., Duffy, K., Blight, K. und Williams, J. E. (1988). Two DIF-inducible, prestalk-specific mRNAs of *Dictyostelium* encode extracellular matrix proteins of the slug. *Development* **104**, 275-284.
- Mehdy, M. C., Ratner, D. und Firtel, R. A. (1983). Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Cell* **32**, 763-771.
- Melancon, P., Franzusoff, A. und Howell, K. E. (1991). Vesicle budding: insights from cell-free assays. *Trends in Cell Biol.* **1**, 165-171.
- Mironov, A. A., Weidman, P. und Luini, A. (1997). Variations on the Intracellular Transport Theme: Maturing Cisternae and Trafficking Tubules. *J. Cell Biol.* **138**, 481-484.
- Mohrs, M. R., Janssen, K.-P., Kreis, T., Noegel, A. A. und Schleicher, M. (2000). Cloning and characterization of β -COP from *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 350-357.
- Monnat, J., Hacker, U., Geissler, H., Rauchenberger, R., Neuhaus, E. M., Maniak, M. und Soldati, T. (1997). *Dictyostelium discoideum* disulfid isomerase, an endoplasmic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal. *FEBS Lett.* **418**, 357-362.
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T. E. und Warren, G. (1995). Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J. Cell Biol.* **131**, 1715-1726.
- Neuhaus, E. M., Horstmann, H., Almers, W., Maniak, M. und Soldati, T. (1998). Ethane-freezing/methanol-fixation of cell monolayers: a procedure for improved preservation of structure and antigenicity for light and electron microscopies. *J. Struct. Biol.* **121**, 326-342.
- Nellen, W., Silan, C. und Firtel, R. A. (1984). DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2890-2898.
- Niewohner, J., Weber, I., Maniak, M., Muller-Taubenberger, A. und Gerisch, G. (1997). Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J. Cell Biol.*, **28**, 349-361.
- Noegel, A. A., Welker, D. L., Metz, B. A. und Williams, K. L. (1985). Presence of nuclear associated plasmids in the lower eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* **185**, 447-450.
- Noegel, A. A., Rapp, S., Lottspeich, F., Schleicher, M. und Stewart, M. (1989). The *Dictyostelium* gelation factor shares a putative actin binding site with α -actinins and dystrophin and also has a rod domain containing six 100-residue motifs that appear to have a cross- β conformation. *J. Cell Biol.* **109**, 607-618.
- Noegel, A. A., Gerisch, G., Lottspeich, F. und Schleicher, M. (1990). A protein with homology to the C-terminal repeat sequence of *Octopus* rhodopsin and synaptophysin is a member of a multigene family in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS* **266**, 118-122.
- Novak, K. D. und Titus, M. A. (1997). Myosin I overexpression impairs cell migration. *J. Cell Biol.* **136**, 633-647.
- Novikoff, P. M., Tulsiani, D. R., Touster, O., Yam, A. und Novikoff, A. B. (1983). Immunocytochemical localization of α -D-mannosidase II in the Golgi apparatus of rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **80**, 4364-4368.
- Paschal, B. M., King, S. M., Moss, A. G., Collins, C. A., Vallee, R. B. und Witman, G. B. (1987). Isolated flagellar outer arm dynein translocates brain microtubules *in vitro*. *Nature* **330**, 672-674.

- Phizicky, E. M. und Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev.* **59**, 94-123.
- Pearse, B. M. F. und Robinson, M. S. (1990). Clathrin, adaptors and sorting. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 151-171.
- Pepperkok, R., Whitney, J. A., Gomez, M. und Kreis, T. E. (2000). COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J. Cell Sci.* **113**, 135-144.
- Pollard, T. D. und Cooper, J. A. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 987-1035.
- Pollard, T. D. und Korn, E. D. (1973). *Acanthamoeba* myosin. II. Interaction with actin and with a new cofactor protein required for actin activation of Mg²⁺ adenosine triphosphatase activity. *J. Biol. Chem.* **248**(13), 4691-4697.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. und Cornier, M. J. (1992). primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.
- Pryer, N. K., Wuestehube, L. J. und Schekman, R. (1992). Vesicle-mediated protein sorting." *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 471-516.
- Pugsley, A. P. (1989). *Protein Targeting*. Academic Press Inc. San Diego, New York,
- Raper, K. B. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mould from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**, 135-147.
- Rivero, F., Koppel, B., Peracino, B., Bozzaro, S., Siebert, F., Weijer, C. J., Schleicher, M., Albrecht, R. und Noegel, A. A. (1996). The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. *J. Cell Sci.* **109**, 2679-2691.
- Rivero, F., Kuspa, A., Brokamp, R., Matzner, M. und Noegel, A. A. (1998): Interaptin, an Actin-binding Protein of the α -Actinin superfamily in *Dictyostelium discoideum*, Is Developmentally and cAMP regulated and Associates with Intracellular Membrane Compartments. *J. Cell Biol.* **142**, 735-750.
- Rivero F., Furukawa R., Fechheimer M. und Noegel A. A. (1999). Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein, α -actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **112**, 2737-2751.
- Rivero, F., Albrecht, R., Dislich, H., Bracco, E., Graciotti, L., Bozzaro, S., Noegel, A. A. (1999). RacF1, a novel member of the Rho protein family in *Dictyostelium discoideum*, associates transiently with cell contact areas, macropinosomes, and phagosomes. *Mol. Biol Cell.* **10**, 1205-1219.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y.-S., Glenney, J. R. und Anderson, R. G. W. (1992). Calveolin, a protein component of calveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682.
- Rousseau, C., Muriel, M., Musset, M., Botti, J. und Seve, A. (2000). Glycosylated nuclear lectin CBP70 also associated with endoplasmic reticulum and the golgi apparatus: Does the "classic pathway" of glycosylation also apply to nuclear glycoproteins? *J. Cell Biochem.* **78**, 638-649.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sambroock, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sandvig, K. und van Deurs, B. (1990). Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in transferrin endocytosis. *J. Biol. Chem.* **265**, 6382-6388.

- Saxe III, C. L., Johnson, R., Devreotes, P. N. und Kimmel, A. R. (1991). Analysis of the c-AMP-receptor gene in *Dictyostelium*: Evidence of a multigene family. *Genes Dev.* **5**, 1-8.
- Schleicher, M., Gerisch, G. und Isenberg, G. (1984). New actin binding proteins from *Dictyostelium discoideum*. *EMBO J.* **3**, 2095-2100.
- Schleicher, M., André, E., Andréoli, C., Eichinger, L., Haugwitz, M., Hofmann, A., Karakesisoglou, J., Stöckelhuber, M. und Noegel, A. A. (1995). Structure/function studies on cytoskeletal proteins in *Dictyostelium amoeba* as a paradigm. *FEBS* **369**, 38-42.
- Scheel, J., Ziegelbauer, K., Kupke, T., Humbel, B., Noegel, A. A., Gerisch, G. und Schleicher, M. (1989). Hisactophilin, a histidin-rich actin-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **264**, 2832-2839.
- Silver, P. A., Keegan, L. P. und Ptashne, M. (1984). Amino terminus of the yeast Gal4 gene product is sufficient for nuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5951-5955.
- Schroer, T. A. und Sheetz, M. P. (1991). Two activators of microtubule-based vesicle transport. *J. Cell Biol.* **115**, 1309-1318.
- Schroer, T. A., Bingham, J. B. und Gill, S. R. (1996). Actin-related protein 1 and cytoplasmic dynein-based motility – what's the connection? *Trends Cell Biol.* **6**, 212-215.
- Schwarz, E. C., Neuhaus, E. M., Kistler, C., Henkel, A. W. und Soldati, T. (2000). *Dictyostelium myosin* IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis. *J. Cell Sci.* **113**, 621-633.
- Seastone, D. J., Lee, E., Bush, J., Knecht, D. und Cardelli, J. (1998). Overexpression of a novel rho family GTPase, RacC, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 2891-2904.
- Seastone, D. J., Zhang, L., Buczynski, G., Rebstein, P., Weeks, G., Spiegelman, G. und Cardelli, J. (1999). The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 393-406.
- Simon, S. (1993). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 581-588.
- Simpson, P. A., Spudich, J. A. und Parham, P. (1984). Monoclonal antibodies prepared against *Dictyostelium* actin: Characterisation and interactions with actin. *J. Cell Biol.* **99**, 287-295.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Stoeckelhuber, M., Noegel, A. A., Eckerskorn, C., Köhler, J., Rieger, D. und Schleicher, M. (1996). Structure/function studies on the pH-dependent actin-binding protein hisactophilin in *Dictyostelium* mutants. *J. Cell Sci.* **109**, 1825-1835.
- Stossel, T. P. (1986). The actin system and the rheology of peripheral cytoplasm. *Biorheology* **23(6)**, 621-631
- Stratford, C. A. und Brown, S. S. (1985). Isolation of an actin binding protein from membranes of *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **100**, 727-735.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Strum, R. A. und Herr, W. (1988). The POU domain is a bipartite DANN-binding structure. *Nature* **336**, 601-604.
- Suggs, S. V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E. H., Johnson, M. J., Itakura, K. und Wallace, R. B. (1981). Use of synthetic oligodesoxy-ribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences using purified genes. In: *Developmental Biology* (Brown, D. D. & Fox, C. F., eds.), Academic Press NY, 683-693.

- Sussman, R. R. und Sussman, M. (1969). Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **56**, 53-55.
- Szumilo, T., Zeng, Y., Pastuszak, I., Drake, R., Szumilo, H. und Elbein, A. D. (1996). Purification to homogeneity and properties of UDP-GlcNAc (GalNAc) pyrophosphorylase. *J Biol. Chem.*, **271**, 13147-13154.
- Tabor, S. (1990). Expression using the T7 RNA polymerase system. In: *Methods in Cell Biology*. **Vol. 29**, (eds. Wang, Y. L. und D. L. Taylor), 137-151. Academic Press Inc. New York.
- Tabor, S. und Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1074-1078.
- Titus, M. A. (1999). A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis. *Curr. Biol.* **9**, 1297-1303.
- Troll, H., Malchow, D., Muller-Taubenberger, A., Humbel, B., Lottspeich, F., Ecke, M., Gerisch, G., Schmid, A und Benz, R. (1992). Purification, functional characterization, and cDNA sequencing of mitochondrial porin from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **267**, 21072-21079.
- Uyeda, T. Q. P. und Titus, M. A. (1997). The myosins of *Dictyostelium*. In *Dictyostelium*, a model system for cell and development biology. Y. Maeda, K. Inouye und I. Takeuchi, editors. Universal Academy Press, Inc., Tokyo, 43-64.
- Vale, R. D., Schnapp, B. J., Mitchison, T., Steuer, E., Reese, T. S. und Sheetz, M. P. (1985). Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules *in vitro*. *Cell* **43**, 623-632.
- Van Aelst, L., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A. und Wigler, M. (1993). Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 6213-6217.
- Vidugiriene, J. und Menon, A. K. (1994). The GPI anchor of cell surface proteins is synthesized on the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **127**, 333-341.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982). The pUC plasmid, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.
- V. Krempelhuber, A. (1997). *In-vivo*-Untersuchungen zu Funktion und Lokalisation des Aktin- und Membran-assoziierten Proteins Comitín in *Dictyostelium discoideum*. Doktorarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Wang-Gillam, A., Pastuszak, I. und Elbein, A. D. (1998). A 17-amino acid insert changes UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase specificity from UDP-GalNAc to UDP-GlcNAc. *J. Biol. Chem.*, **273**, 27055-270557.
- Watts, D. J. und Ashworth, J. M. (1970). Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 171-174.
- Weeds, A. und Way, M. (1991). Is thymosin- β 4 the missing link? *Curr. Biol.* **1**, 307-308.
- Wegner, A. und Isenberg, G. (1983). 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4922-4925.
- Weiner, O. H., Murphy, J., Griffiths, G., Schleicher M. und Noegel, A. A. (1993). The actin-binding protein Comitín (p24) is a component of the Golgi Apparatus. *J. Cell Biol.* **123**, 23-34.
- Weiner, O. H. (1994). *In vitro* und *in vivo* Charakterisierung des Membran-assoziierten Aktin-bindenden Proteins Comitín. Doktorarbeit. Ludwig-Maximilians Universität, München.

- Wertman, K. F., Wyman, A. R. und Bolstein, D. (1986). Host/vector interaction which affect the viability of recombinant phage λ clones. *Gene* **49**, 253-262.
- Westphal, M., Jungbluth, A., Heidecker, M., Muhlbauer, B., Heizer, C., Schwartz, J. M., Marriott, G. und Gerisch, G. (1997). Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr Biol.* **7**, 176-183.
- Witke, W., Hofmann, A., Köppel, B., Schleicher, M. und Noegel, A. A. (1993). The Ca^{2+} -binding domains in non-muscle type α -actinin: Biochemical and genetic analysis. *J. Cell Biol.* **121**, 599-606.
- Witke, W., Schleicher, M. und Noegel, A. A. (1992). Redundancy in the microfilament system: Abnormal development of *Dictyostelium* cells lacking two F-Actin cross-linking proteins. *Cell* **68**, 53-62.
- Williams, C. und Newell, G. (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* **82**, 287-307.
- Wu, L., Valkema, R., Van Haastert, P. J. und Devreotes, P. N. (1995). The G protein beta subunit is essential for multiple responses to chemoattractants in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* **129**, 1667-1675.
- Wuestehube, L. J. und Luna, E. J. (1987). F-actin binds to the cytoplasmatic surface of ponticulín, a 17-kD integral glycoprotein from *Dictyostelium discoideum* plasma membranes. *J. Cell. Biol.* **105**, 1741-1751.
- Yin, H. L. und Stossel, T. P. (1979). Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependant regulatory protein. *Nature* **281**, 583-586.
- Zerial, M. und Stenmark, H. (1993). Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Opi. Cell Biol.* **5**, 613-620.
- Zhang, G. F. und Staehelin, L. A. (1992). Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells. *Plant. Physiol.* **99**, 1070-1083.

Erklärung:

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen beantragten Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht ist, sowie, daß ich eine Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. Noegel betreut worden.

Köln, den 13.07.2000

Generation and Characterization of a Comitín knock-out in *Dictyostelium discoideum*.

Autoren: Thomas Schreiner, Alfred von Krempelhuber, Michael Schleicher und Angelika A. Noegel.

Characterization of potential binding partners of Comitín.

Autoren: Thomas Schreiner, Adam Kuspa und Angelika A. Noegel.

Danksagungen

Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel danke ich herzlich für die interessante Themenstellung, die Betreuung der Arbeit und die zahlreichen Tips und Anregungen sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft. Besonders möchte ich mich für die Möglichkeit, mein Wissen auf Seminaren zu erweitern, bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. W. Klein danke ich für die freundliche Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Anja Neubert, Frau Dipl. Chem. Monika Knuth, Herrn Dipl. Biol. Michael Leichter und Herrn Dipl. Chem. Markus Schroeder für die Bereitschaft meine Arbeit durchzusehen.

Herzlich will ich Frau Rosi Blau, Frau Dipl. Biol. Tina Mohrs, Frau Dipl. Chem. Monika Knuth, Herrn cand. med. Christoph Clemen, Herrn Dipl. Biol. Michael Leichter und Herrn Dr. Alfred Lautwein für die freundliche Arbeitsatmosphäre und immerwährende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft in Labor 14 danken.

Bedanken möchte ich mich auch ausdrücklich bei Frau Dipl. Biol. Claudia Herr, Frau Dipl. Chem. Claudia Pikzack, Frau Maria Stumpf, Frau Heidrun Dislich, Herrn Rolf Müller, Herrn Berthold Gassen und Herrn Dr. Francisco Rivero Crespo für die zahlreichen Anregungen und praktischen Tips.

Außerdem gilt mein Dank allen weiteren Kolleginnen und Kollegen unseres Arbeitskreises.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Schreiner
Vormane: Thomas Klaus
Geburtsdatum: 22.03.1972
Geburtsort: Köln

Schulbildung

1978 – 1982 Gemeinschaftsgrundschule Alzeyer Str., 50739 Köln
1982 – 1991 Erich-Kästner-Gymnasium,
Castroper Str. 7, 50735 Köln
10.06.1991 Allgemeine Hochschulreife

Ersatzdienst

1991 - 1998 Dienst im Katastrophenschutz nach § 8 Abs. 2 KatSG
beim Malteser Hilfsdienst e. V. in Köln

Hochschulbildung

Oktober 1991 Beginn des Chemie-Studiums an der Universität zu Köln
24.10.1994 Diplom-Chemiker-Vorprüfung
03.07.1996 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
12.08.1996 – 07.05.1997 Diplomarbeit mit dem Thema: „Versuche zur Synthese und zum
Isomerisierungsverhalten von Corticocin.“ bei Prof. Dr. F.-J.
Marner, Institut für Biochemie, Mat.-Nat. Fakultät, Universität
zu Köln

seit 01.08.1997

Promotion bei Frau Prof. Dr. A. A. Noegel mit dem Thema:
„Untersuchungen zur *in-vivo*-Funktion von Comitín,
einem aktinbindenden Membranprotein aus *Dictyostelium*
discoideum.“, Institut für Biochemie I, Med. Fakultät,
Universität zu Köln

Veröffentlichungen

Schreiner, Th., Hildebrandt, U., Bothe, H. und Marnier, F. J., „Chemical and Biological Characterization of Corticocin, a Yellow Pigment Formed by the Ectomycorrhizal Fungus *Piloderma croceum*“, *Z. Naturforsch.* **53c**, 4-8, (1998).