

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin Heike Nöthe
aus München

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2001

Thema:

**Identifizierung und funktionelle Charakterisierung
von Dynamin B
aus *Dictyostelium discoideum***

Gutachter:

Prof. Dr. Jürgen Wolfrum

Prof. Dr. Kenneth C. Holmes

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Dynamine - eine neue Proteinfamilie	4
2.2	Die Struktur der Dynamine	6
2.3	Die Regulation von GTPasen	10
2.4	Funktionsweise von Dynamin	12
2.5	Die Mitglieder der Dynaminfamilie	17
2.5.1	Die „echten“ Dynamine	19
2.5.2	Vps1p	19
2.5.3	<i>D. discoideum</i> Dynamin A	20
2.5.4	Dnm1p/Drp1	20
2.5.5	Mgm-Proteine	21
2.5.6	Mx-Proteine	22
2.5.7	Dynamin-ähnliche Proteine in Pflanzen	23
2.6	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus in der Zellbiologie	23
2.7	Zellbiologischer Hintergrund	26
2.7.1	Endocytose und Phagozytose	26
2.7.2	Mitochondrien	27
3	Material und Methoden	30
3.1	Material	30
3.1.1	Chemikalien	30
3.1.2	Allgemeine Lösungen	31
3.1.3	Laborgeräte	31
3.1.4	Enzyme und andere Proteine	32
3.1.5	Größenstandards	33
3.1.6	Plasmide	33
3.1.7	Primer	33
3.1.8	Kits	34
3.1.9	Bakterienstämme	34
3.1.10	Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	35
3.1.11	Medien für die Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	35
3.1.12	Computerprogramme	36
3.1.13	Antikörper	36
3.2	Molekularbiologische Methoden	37
3.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> Bakterien	37
3.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien	38
3.2.2.1	Die CaCl ₂ -Methode	38
3.2.2.2	Elektroporation	38
3.2.3	Präparation von Nucleinsäuren	39

3.2.3.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>D. discoideum</i>	39
3.2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
3.2.3.3	Messung des Nukleinsäuregehaltes	40
3.2.4	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	40
3.2.4.1	Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen	40
3.2.4.2	5'-Dephosphorylierung von DNA	40
3.2.4.3	Ligation von DNA-Fragmenten	41
3.2.4.4	Herstellung von DIG-markierten DNA-Fragmenten	41
3.2.4.5	Serielle Deletionen von Plasmid-Inserts	42
3.2.5	Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	44
3.2.5.1	Native DNA-Agarosegele	44
3.2.5.2	Denaturierende RNA-Agarosegele	45
3.2.5.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	45
3.2.6	Die Polymerase-Kettenreaktion	46
3.2.7	Transfer und Hybridisierung von Nukleinsäuren	48
3.2.7.1	Southern-Blot Analyse von DNA	48
3.2.7.2	Transfer von Bakterienkolonien	49
3.2.7.3	Northern-Blot Analyse von RNA	49
3.2.7.4	Hybridisierung und Detektion mit DIG-markierten Sonden	50
3.2.8	Durchmusterung von DNA-Banken aus <i>D. discoideum</i>	51
3.2.8.1	Herstellung und Durchmusterung von gröbenselektionierten genomischen Banken	51
3.2.8.2	Durchmusterung einer λ ZAP-cDNA-Bank	51
3.2.9	Konstruktion der Expressionsvektoren	53
3.2.9.1	Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamin B mit aminoterminalen Histidinpeptid	53
3.2.9.2	Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamin B mit carboxyterminalem Histidinpeptid	54
3.2.9.3	Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamin B ohne Markierung	54
3.2.9.4	Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamin B ohne aminoterminalen Extension mit carboxyterminalem Histidinpeptid	54
3.2.9.5	Konstruktion von Vektoren zur Produktion von Dynamin B mit Mutationen in der GTPase-Domäne	55
3.2.9.6	Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamin B mit carboxyterminalem YFP	55
3.2.9.7	Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamin B ohne aminoterminalen Extension mit carboxyterminalem YFP	55
3.2.9.8	Konstruktion eines Vektors zur Produktion der aminoterminalen Extension von Dynamin B mit carboxyterminalem YFP	56
3.2.9.9	Konstruktion von Vektoren zur Produktion von Dynamin B mit Mutationen in der GTPase-Domäne mit carboxyterminalem YFP	56
3.3	Proteinchemische Methoden	56
3.3.1	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	56
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	58
3.3.2.1	Proteinbestimmung nach Bradford	58
3.3.2.2	Proteinbestimmung durch A ₂₈₀ -Messung	58
3.3.3	Versuche zur Reinigung von Dynamin B aus <i>D. discoideum</i>	59
3.3.3.1	Extraktion von Dynamin B aus <i>D. discoideum</i> im analytischen Maßstab	59
3.3.3.2	Testen der Bindung von Dynamin B an verschiedene Säulenmaterialien	59
3.3.4	Isolierung eines Dynamin B-Fragments als Antigen für die Antikörperproduktion	60

3.3.4.1	Klonierung des Dynamin B-Fragments in den Expressionsvektor	60
3.3.4.2	Testen der Expression und der Löslichkeit des Dynamin B-Fragments	61
3.3.4.3	Präparative Isolierung des Dynamin B-Fragments	61
3.3.5	Affinitätsreinigung der Antikörper	63
3.3.5.1	Kopplung des Antigens an das Säulenmaterial	63
3.3.5.2	Chromatographische Reinigung der Antiseren	64
3.4	Immunchemische Methoden	64
3.4.1	Western-Blot-Technik	64
3.5	Zellbiologische Methoden	66
3.5.1	Kultivierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen	66
3.5.2	Konservierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen	66
3.5.2.1	Einfrieren von <i>D. discoideum</i> -Zellen	66
3.5.2.2	Konservierung von <i>D. discoideum</i> -Sporen	66
3.5.3	Transformation von <i>D. discoideum</i> -Zellen	67
3.5.4	Funktionelle Analysen von <i>D. discoideum</i> -Zellen	67
3.5.4.1	Messung der Pinocytose	67
3.5.4.2	Messung der Phagocytose	68
3.5.4.2.1	Messung der Phagocytose mit Fluoreszenz-markierten Polystyrol-Partikeln	68
3.5.4.2.2	Messung der Phagocytose mit Fluoreszenz-markierten Hefen	68
3.5.4.3	Analyse der Adhäsivität von <i>D. discoideum</i> -Zellen	69
3.5.4.4	Wachstum auf Bakterienrasen	69
3.5.4.5	Analyse der Osmostabilität von <i>D. discoideum</i> -Zellen	70
3.5.4.6	Funktionelle Analyse der Mitochondrien	70
3.6	Mikroskopische Methoden	71
3.6.1	Fixierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen	71
3.6.2	Immunfluoreszenzfärbung von fixierten <i>D. discoideum</i> -Zellen	71
3.6.3	Mikroskopie der fixierten Zellen	71
3.6.4	Mikroskopie von lebenden Zellen	72
4	Ergebnisse	73
4.1	Identifizierung und Isolierung des <i>dymB</i>-Gens	73
4.1.1	Identifizierung von <i>dymB</i> mit Southern-Blot-Analyse	73
4.1.2	Isolierung einer Teilsequenz von <i>dymB</i> aus einer gröbenselektionierten genomischen DNA-Bank von <i>D. discoideum</i>	76
4.1.3	Isolierung eines <i>dymB</i> -cDNA-Klons aus einer <i>D. discoideum</i> λ -ZAP cDNA-Bank	79
4.1.4	Isolierung des 3'-Endes von <i>dymB</i> aus einer gröbenselektionierten genomischen DNA-Bank aus <i>D. discoideum</i>	80
4.1.5	Sequenzvergleich von Dynamin B mit Proteinen der Dynamin-Familie	83
4.1.6	Entwicklungsregulation der Transkription	87
4.2	Produktion von polyklonalem Antiserum gegen Dynamin B	88
4.2.1	Herstellung des Antigens	88
4.2.2	Ergebnisse der Immunisierung und Reinigung der erhaltenen Antiseren	90
4.3	Überproduktion von Dynamin B in <i>D. discoideum</i> und Versuche zur Isolierung des Proteins	91
4.3.1	Konstruktion der Expressionsvektoren	91
4.3.2	Western-Blot-Analyse der Dynamin B-Fusionsproteine	92
4.3.3	Löslichkeitsverhalten von rekombinantem Dynamin B	93

4.3.4	Versuche zur Isolierung von rekombinantem Dynamin B	94
4.3.5	Versuche zur Isolierung von Dynamin B ohne aminoterminalen Signalpeptid (Δ NTS-Dynamin B)	95
4.4	Gezielte Geninaktivierung von <i>dymB</i> in <i>D. discoideum</i>	96
4.4.1	Konstruktion des Geninaktivierungsvektors	97
4.5	Charakterisierung der <i>dymB</i>⁻-Zellen	101
4.5.1	Analyse der <i>dymB</i> ⁻ -Zellen hinsichtlich morphologischer Veränderungen	101
4.5.2	Zellwachstum	102
4.5.2.1	Wachstum in Suspensionskultur	102
4.5.2.2	Wachstum auf Bakterienrasen	103
4.5.3	Analyse der Zelladhäsion	104
4.5.4	Untersuchung des endosomalen Systems	105
4.5.5	Analyse verschiedener subzellulärer Strukturen in <i>dymB</i> ⁻ -Zellen	107
4.5.6	Funktionelle und morphologische Analyse der Mitochondrien	109
4.5.7	Charakterisierung von Dynamin B überproduzierenden Zellen (<i>dymB</i> ⁺ -Zellen)	110
4.6	Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Dynamin B in <i>D. discoideum</i>	113
4.6.1	Expression von YFP-markiertem Dynamin B	113
4.6.2	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Dynamin B-YFP produzierenden Zellen	114
4.6.3	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Dynamin B-YFP produzierenden Zellen ohne aminoterminalen Extension	118
4.6.4	Fluoreszenzmikroskopische und funktionelle Analyse von Dynamin B-Mutanten	119
4.7	Elektronenmikroskopische Lokalisierung von Dynamin B in <i>D. discoideum</i>	120
5	Diskussion	122
5.1	Dynamin B – ein neues Mitglied der Dynaminfamilie	122
5.2	Expression von rekombinantem Dynamin B	125
5.3	Funktionelle Charakterisierung von Dynamin B	127
5.4	Dynamin B - ein mitochondriales Protein ?	131
5.5	Modell zur Funktionsweise von Dynamin B	135
6	Literaturverzeichnis	137
7	Publikationen und Präsentationen	152
8	Abkürzungsverzeichnis	153
	Danksagung	155

1 Zusammenfassung

Die Dynamine bilden eine eigenständige Proteinklasse innerhalb der Superfamilie GTP-bindender Proteine. Sie sind an so unterschiedlichen zellulären Prozessen wie dem Vesikeltransport, verschiedenen Formen der Endocytose und der Organisation des mitochondrialen Systems beteiligt. Die Aufgabe der Dynamine besteht wahrscheinlich in der Abschnürung von Membranen, wobei sie die Freisetzung von Vesikeln induzieren und bei der Formerhaltung von Organellen mitwirken. Die exakte Funktion Dynamins ist aber noch nicht geklärt. Daneben sind Mitglieder der Dynaminfamilie auch bei der meiotischen Trennung der Spindelpole und der Abwehr von Virusinfektionen involviert.

Ziel der Arbeit war die Identifizierung, Isolierung und Untersuchung neuer Dynamine aus dem eukaryontischen Modellorganismus *Dictyostelium discoideum*. Im Vergleich zu höher entwickelten Organismen läßt sich *D. discoideum* aufgrund seines kleinen, haploiden Genoms molekularbiologisch leicht manipulieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein neues Gen, *dymB*, identifiziert werden, das ein Dynamin-ähnliches Protein (Dynamin B) in *D. discoideum* kodiert. Für die Isolierung des gesamten Gens wurden mit verschiedenen DNA-Sonden mehrere genomische DNA-Banken sowie eine cDNA-Bank aus *D. discoideum* durchmustert. Es wurden drei überlappende Klone isoliert, die zusammen die gesamte kodierende Sequenz von 2763 Basenpaaren sowie 5'- und 3'-flankierende Bereiche enthalten.

Das Genprodukt Dynamin B hat eine Länge von 920 Aminosäuren und eine aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekülmasse von 105,3 kDa. Die phylogenetische Analyse ordnet Dynamin B der Vps1p/Dnm1p-Gruppe zu, deren Mitglieder am Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Vakuole (*S. cerevisiae* Vps1p) bzw. bei der Organisation des mitochondrialen Systems (*S. cerevisiae* Dnm1p und Säugetier-DLP1) beteiligt sind. Dementsprechend enthält Dynamin B Domänen, die auch in anderen Vertretern der Dynaminfamilie vorkommen und dort wichtige regulatorische Funktionen ausüben. Dazu gehören die GTPase-Domäne, die mögliche GTPase-Effektor-Domäne und die prolinreiche Region. Zusätzlich besitzt Dynamin B eine Sequenz von 136 Aminosäuren am Aminoterminus, die es von den anderen Mitgliedern der Vps1p/Dnm1p-Gruppe unterscheidet.

Um die zelluläre Funktion von Dynamin B zu bestimmen, wurden *D. discoideum*-Mutanten hergestellt, die kein Dynamin B mehr produzieren. Die *dymB*⁻-Zellen wurden mit der Technik der gezielten Geninaktivierung erzeugt. Im Vergleich zu den genetisch unveränderten Zellen weisen sie ein beschleunigtes Wachstum auf Bakterienrasen und eine erhöhte Adhäsivität gegenüber Oberflächen und anderen Zellen auf. Funktionen, die bei anderen Dynaminmutanten häufig betroffen sind, wie die Aufnahme von Flüssigkeit und die Morphologie und Funktion von Mitochondrien sind dagegen normal. Dieses Ergebnis bringt einen bisher kaum beachteten Aspekt in die Dynaminforschung ein, nämlich eine mögliche Rolle dieser Proteine bei der Vermittlung der Zelladhäsion, und zeigt, daß die Mitglieder der Dynaminfamilie noch an weiteren Prozessen als den bisher bekannten beteiligt sind.

Die Isolierung des vollständigen *dymB*-Gens ermöglichte die Konstruktion von Expressionsvektoren zur Überproduktion von Dynamin B in *D. discoideum*. Untersuchungen des Löslichkeitsverhaltens ergaben, daß sich der Großteil des Proteins nach Lyse und Zentrifugation im Sediment befindet. Dieses Verhalten wurde auch für andere Mitglieder der Dynaminfamilie beschrieben und ist ein Hinweis, daß Dynamin B in der Zelle in Assoziation mit Membranen oder dem Cytoskelett vorliegt. Zur Isolierung von rekombinantem Dynamin B wurde das Protein in *D. discoideum* und *E. coli* überproduziert. Es wurden verschiedene Reinigungsbedingungen getestet. Allerdings war es nicht möglich, ausreichende Mengen des nativen Proteins für dessen kinetische und strukturelle Charakterisierung zu isolieren.

Die Überproduktion von Dynamin B in *D. discoideum* lieferte Hinweise über die Funktion der aminoterminalen Extension. Die Sequenzanalyse identifizierte eine potentielle Schnittstelle für eine mitochondriale Signalpeptidase am Ende der Extension. Der Nachweis der posttranslationalen Abspaltung erfolgte durch Western-Blot-Analyse: Ein gegen Dynamin B gerichteter Antikörper erkennt in Zellysaten von *D. discoideum*-Zellen eine Bande bei 92 kDa anstelle der Bande bei 105 kDa, wie sie der berechneten Molekülmasse des Proteins entspricht. Die Abspaltung eines 13 kDa großen Fragments stimmt mit der vorhergesagten Schnittstelle an Aminosäureposition 106 überein. Mit Hilfe von rekombinantem Dynamin B, das endständig markiert war (Histidinpeptid- oder *Yellow Fluorescent Protein* (YFP)-Markierung), wurde nachgewiesen, daß die Prozessierung wie erwartet am Aminoterminus und nicht am Carboxyterminus des Proteins erfolgt. Bei rekombinantem Dynamin B mit carboxyterminaler Markierung dominiert die prozessierte Form des Proteins, während bei Dynamin B mit aminoterminaler Markierung die nicht prozessierte Form überwiegt. Offensichtlich hemmt die Markierung am Aminoterminus die Prozessierung.

Zur Visualisierung des Proteins *in vivo* wurde Dynamin B mit carboxyterminalem YFP in *D. discoideum* produziert. Fixierte und lebende Zellen zeigen eine charakteristische Färbung im Fluoreszenzmikroskop, die hinsichtlich Form, Verteilung und Dynamik der von Mitochondrien gleicht. Die Kollokalisierung von Dynamin B-YFP und Mitochondrien wurde anhand von einzelnen konfokalen Schnitten bestätigt.

Die Produktion von Dynamin B-YFP ohne Extension führt in *D. discoideum* zu einer völlig veränderten Lokalisation. Statt der ringförmigen und ovalen Strukturen ist ein feines Netzwerk im Fluoreszenzmikroskop erkennbar, das sich über die gesamte Zelle erstreckt und nicht mit den Mitochondrien kollokalisiert. Immunogold-Elektronenmikroskopie bestätigte die Lokalisation von Dynamin B-YFP an den Mitochondrien auf ultrastruktureller Ebene und ergab darüber hinaus, daß das Protein mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist. Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß die aminoternale Extension ein mitochondriales Signalpeptid darstellt, das für die Assoziation des Proteins mit den Mitochondrien notwendig ist. Außerdem wurde Dynamin B-YFP auch an der Plasmamembran und an der Membran der kontraktilen Vakuole gefunden. Daraus läßt sich schließen, daß Dynamin B zu einigen außergewöhnlichen Proteinen gehört, die ein mitochondriales Importsignal besitzen, nach der Prozessierung in der Mitochondrienmatrix aber wieder aus den Mitochondrien exportiert werden, um zu ihrem Wirkort zu gelangen.

2 Einleitung

Zellen werden durch eine Plasmamembran umschlossen und gegen ihre äußere Umgebung abgegrenzt. Innerhalb einer Eukaryontenzelle sorgen Membranen für die Unterteilung in mehrere funktionell unterschiedliche Kompartimente. Membranen wirken hierbei als selektive Barrieren, die nur für bestimmte Moleküle durchlässig sind. Die Durchquerung der Membran erfolgt über Kanäle oder mit Hilfe von Transportproteinen.

Als dynamische Strukturen sind Membranen ständigen Abschnürungs- und Fusionsprozessen unterworfen. Ohne diese Prozesse wären viele zelluläre Vorgänge nicht denkbar. So werden Makromoleküle und Partikel durch Einstülpung und Abschnürung der Plasmamembran ins Zellinnere aufgenommen. Diese Vorgänge werden als Endocytose (Aufnahme von Flüssigkeiten und darin gelösten Stoffen) und als Phagozytose (Internalisierung von festen Partikel) bezeichnet. Neben der Aufnahme von Nährstoffen spielt die Endocytose auch eine wichtige Rolle bei der Präsentation von Antigenen und der Rückgewinnung von Bestandteilen der Plasmamembran.

Membranabschnürungen finden auch am Golgi-Apparat statt, der als zentrales Verteilungssystem von Proteinen und Lipiden innerhalb der Zelle fungiert. Hier werden neu synthetisierte Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum aufgenommen und in Vesikel verpackt, die für den Transport zu anderen Kompartimenten oder für die Sekretion bestimmt sind.

Die Abschnürung von Membranen erfolgt aber nicht nur in Form von Vesikeln für Transportzwecke, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Teilung und Formerhaltung von Organellen. Hierzu gehören insbesondere die äußerst dynamischen Mitochondrien, die in der Lage sind, sich zu strecken, zu verkürzen und zu verzweigen. Da Mitochondrien nicht *de novo* entstehen können, ist die Teilung dieses Organells Voraussetzung für die Weitergabe an Tochterzellen. Hierbei müssen sogar zwei Membranen mehr oder weniger gleichzeitig durchtrennt werden: die äußere Mitochondrienmembran und die innere, die den Matrixraum umgibt.

Der Prozeß der Membranabschnürung ist sehr komplex und beruht auf dem Zusammenspiel verschiedener Proteine. Im Fall der Endocytose lagert sich das Gerüstprotein Clathrin an eine Einbuchtung der Plasmamembran in Form eines polyhedralen Gitters und formt die Plasmamembran zu einer Membranknospe. Clathrin bindet nicht direkt an die Membran, sondern an sogenannte Adapterproteine, die eine Verbindung zwischen Clathrin und den Rezeptoren der Plasmamembran herstellen, die wiederum die Frachtmoleküle gebunden haben. Nach der Abschnürung der Membranknospe (Vesikulation) kommen weitere Proteine ins Spiel, wie die der Rab-Familie, die die Fusionierung der Vesikel mit Endosomen regulieren (Chavrier *et al.*, 1990).

Bei den oben genannten Membranabschnürungsprozessen konnte die Beteiligung von Dynaminen und Dynamin-ähnlichen Proteinen nachgewiesen werden. Diese Proteine gehören

der Familie der großen GTPasen an. Humanes Dynamin-1 lagert sich ringförmig um den Hals einer Clathrin-umhüllten Membranknospe und induziert die Vesikulation (Takei *et al.*, 1995). Das Dynamin-ähnliche Protein Vps1p aus Hefe (*S. cerevisiae*) könnte eine ähnliche Rolle bei der Abschnürung von Vesikeln am Golgi-Apparat spielen (Rothman *et al.*, 1990a). Eine zunehmende Zahl an Dynamin-ähnlichen Proteinen wird entdeckt, die bei der Abschnürung von mitochondrialen Membranen beteiligt sind. So wurde gezeigt, daß Dnm1p aus Hefe (*S. cerevisiae*) (Bleazard *et al.*, 1999) und Drp1 aus dem Fadenwurm (*C. elegans*) (Labrousse *et al.*, 1999) an der Außenseite der Mitochondrien lokalisiert sind und dort durch Ab- und Einschnürung von Membranen bei der Formgebung der Mitochondrien beteiligt sind. Mgm1p aus der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) (Wong *et al.*, 2000) und Msp1p aus der Spaltheife (*S. pombe*) (Pelloquin *et al.*, 1999), ebenfalls Dynamin-Homologe, sind dagegen im Inneren der Mitochondrien lokalisiert und könnten dort eine ähnliche Funktion wie Dnm1p und Drp1 an der Außenseite ausüben. Wie diese Abschnürungsprozesse im Detail verlaufen ist noch nicht geklärt. Es ist auch noch strittig, ob die Dynamine die Abschnürung direkt vornehmen oder ob sie als signalgebender Faktor für andere Proteine wirken. Daneben gibt es auch Dynamin-ähnliche Proteine, die bisher nicht in Zusammenhang mit Membranabschnürung gebracht werden konnten, wie z.B. die Mx-Proteine, die an der Übertragung von viralen Resistenzen beteiligt sind (Staheli *et al.*, 1986; Aebi *et al.*, 1989). Daher stellt sich die Frage, ob es überhaupt eine gemeinsame Grundfunktion wie die Abschnürung von Membranen gibt oder ob Dynamine ganz unterschiedliche Aufgaben erfüllen.

Zur Aufklärung dieser Fragen und zum besseren Verständnis von Dynaminen und ihrer Funktion ist daher die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung möglichst vieler Mitglieder dieser relativ jungen Proteinfamilie nötig.

2.1 Dynamine - eine neue Proteinfamilie

Dynamine bilden eine eigenständige Gruppe innerhalb der GTPasen. Aufgrund ihrer Molekülmassen zwischen 70 und 100 kDa sind sie beträchtlich größer als die GTPasen der Ras-Familie (Molekülmassen zwischen 20 und 30 kDa) und der heterotrimeren G-Proteine, deren α -Untereinheiten Molekülmassen zwischen 40 und 55 kDa aufweisen. Wie die anderen GTPasen binden und hydrolysieren aber auch sie GTP und lösen dadurch bestimmte zelluläre Prozesse aus.

Das erste Dynamin, Dynamin-1, wurde 1987 bei der Suche nach Mikrotubuli-assoziierten Proteinen aus Kälberhirn entdeckt (Paschal *et al.*, 1989). Bei der Extraktion von Mikrotubuli mit ATP und GTP wurde neben den bekannten Motorproteinen Kinesin und Dynein auch ein 100 kDa Protein gefunden. Das isolierte Protein zeigte ATPase-Aktivität und war außerdem in der Lage, einzelne Mikrotubuli zu organisierten Filamentbündeln zu verbrücken. Daraus schloß man, daß es sich bei diesem 100 kDa-Protein um ein weiteres Mikrotubuli-assoziiertes Motorprotein handelte (Shpetner und Vallee, 1989). Motorproteine nutzen die bei der Nukleotid-Hydrolyse freiwerdende chemische Energie, um sich an Proteinfilamenten entlang zu bewegen. Man vermutete, daß das 100 kDa-Protein ein Aneinandergleiten von Mikrotubuli

ermöglicht und gab ihm daher die Bezeichnung Dynamin, in Anlehnung an das griechische Wort „*dynamis*“ für Kraft.

Anhand von Untersuchungen mit reinem Dynamin stellte sich jedoch heraus, daß Dynamin-1 die Mikrotubuli nicht miteinander verbrückt, sondern sich spiralförmig um diese anlagert (Maeda *et al.*, 1992). Das beobachtete Aneinandergleiten von Mikrotubuli wurde stattdessen mit einer Verunreinigung durch andere Motorproteine erklärt (Vallee, 1992). Außerdem wurde gezeigt, daß nicht ATP sondern GTP das Hauptsubstrat von Dynamin-1 ist (Maeda *et al.*, 1992). Letzteres bestätigte eine für Dynamin-1 vorhergesagte GTPase-Aktivität aufgrund von Sequenzdaten, die inzwischen durch Klonierung einer cDNA für Dynamin-1 aus Ratte vorlagen (Obar *et al.*, 1991). Demnach enthielt Dynamin-1 alle für die GTP-Bindung und -Hydrolyse notwendigen Bindungsmotive. Die Sequenzähnlichkeit zu den anderen bekannten Motorproteinen Kinesin und Dynein und dem Aktin-assoziierten Motorprotein Myosin war jedoch gering. Stattdessen wies es eine auffällige Homologie zu zwei anderen Proteinen auf: den durch Interferon-induzierbaren Mx Proteinen, die antiviral wirken und in Säugetieren und Fischen gefunden wurden (Staehele *et al.*, 1986; Muller *et al.*, 1992) und dem Produkt des Vsp1-Gens aus Hefe. Dieses ist an der Zielsteuerung von Proteinen vom Golgi-Apparat zur Vakuole, ein dem Lysosom der Säugetierzellen entsprechendes Kompartiment, beteiligt (Rothman *et al.*, 1990b).

Erste Hinweise auf die Funktion von Dynamin erhielt man, nachdem man das *shibire*-Gen aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* isoliert hatte (Chen *et al.*, 1991; van der Bliek AM und Meyerowitz, 1991). Von dem *shibire*-Genprodukt war schon seit 1973 bekannt, daß es an endocytotischen Vorgängen beteiligt ist. Fliegen, die temperatursensitive Mutationen im *shibire*-Gen tragen, werden bei Erreichen der kritischen Temperatur innerhalb von zwei Minuten völlig bewegungsunfähig (Grigliatti *et al.*, 1973). Diese Lähmungserscheinungen sind auf Störungen bei der Bildung von synaptischen und mit Neurotransmittern gefüllten Vesikeln zurückzuführen. Die Vesikel werden nicht mehr abgeschnürt und reichern sich an der präsynaptischen Plasmamembran in Form von Clathrin umhüllten Einstülpungen an. Da Dynamin-1 und das *shibire*-Genprodukt zu 70 % identisch sind, wurde auch für Dynamin-1 eine Rolle bei der Endocytose vermutet. Anhand von Experimenten mit Säugetierzellen, die mutiertes Dynamin-1 exprimierten, wurde diese Vermutung bestätigt. Die Aufnahme von Transferrin, einem Marker für die Rezeptor-vermittelte Endocytose, war im Vergleich zu Wildtypzellen um 60 % reduziert (Van der Bliek *et al.*, 1993; Herskovits *et al.*, 1993). Das Genprodukt von *shibire* erwies sich somit als ein echtes Homologes von Dynamin-1.

1992 wurde ein viertes Protein mit Dynamin-ähnlicher Sequenz identifiziert. Es wird durch das Mgm1-Gen kodiert und spielt in der Bäckerhefe eine Rolle bei der Replikation des mitochondrialen Genoms (Jones und Fangman, 1992). Die Genprodukte von Mgm1 und Vps1, die Mx-Proteine und Dynamin-1 weisen am Aminoterminus eine Sequenzhomologie von über 40 % auf, die sich über einen Bereich von ca. 300 Aminosäuren erstreckt. In der carboxyterminalen Hälfte ist die Sequenzhomologie mit ca. 20 % dagegen wesentlich geringer. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten wurden diese Proteine zu einer neuen Familie GTP-bindender Proteine zusammengefaßt (Vallee, 1992).

Die Familie der großen GTPasen ist seitdem beträchtlich gewachsen. Dynamine und Dynamin-ähnliche Proteine wurden nicht nur in Säugetieren, in *Drosophila* und der

Bäckerhefe gefunden, sondern mittlerweile auch in der Spaltheife, dem Fadenwurm und in Pflanzen wie der Sojabohne (*G. maximus*) und der Ackerschmalwand (*A. thaliana*). Man nimmt daher an, daß Mitglieder der Dynaminfamilie in allen Eukaryonten vorkommen. Außerdem gibt es Hinweise für ihr Vorkommen in Bakterien (Van der Blik, 1999).

2.2 Die Struktur der Dynamine

Das wichtigste Merkmal der Dynamine ist eine etwa 300 Aminosäuren umfassende Domäne, die am Aminoterminus lokalisiert ist. Sie enthält die für die GTP-Bindung und –Hydrolyse notwendigen vier Konsensuselemente. Diese Sequenzelemente sind zwischen den meisten GTPasen konserviert, und finden sich u.a. auch bei den Mitgliedern der Ras-Familie und den α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteinen. Für Ras, den Elongationsfaktor Tu und G_{α} konnte die Röntgenkristallstruktur gelöst werden (Pai *et al.*, 1989; Berchtold *et al.*, 1993; Noel *et al.*, 1993). Ein Vergleich dieser Strukturen zeigte, daß die GTP-Bindungsdomänen dieser funktionell unterschiedlichen Proteine weitgehend deckungsgleich sind (Pai *et al.*, 1989b). In Verbindung mit Mutagenesestudien liefern diese strukturellen Daten einen Beweis für die Beteiligung dieser vier Konsensusbereiche an der Bindung des Guaninnukleotids (Bokoch und Der, 1993; Lowy und Willumsen, 1993).

Das erste Konsensuselement dieser Domäne, GxxxxGK[S/T], kommt in fast allen GTP- und einigen ATP-bindenden Proteinen vor (Saraste *et al.*, 1990). Diese Aminosäuren bilden eine Schleife, die für die Phosphatbindung verantwortlich ist und daher „P-Loop“ (engl. *phosphate binding loop*) genannt wird (Abb. 2-1, orange markiert). Das zweite Element besteht aus einem einzelnen Threonin (Abb. 2-1, innerhalb der blauen Markierung). Es wechselwirkt über den Amidstickstoff der Hauptkette mit einem der Sauerstoffatome des γ -Phosphats. Außerdem koordiniert das Threonin über den Sauerstoff der Seitenkette an das Magnesiumion und hilft so, den GTP-Mg²⁺-Komplex im aktiven Zentrum richtig zu positionieren. Das für die GTP-Hydrolyse essentielle Magnesiumion wird insgesamt oktaedrisch von sechs Sauerstoffatomen umgeben. Die restlichen Sauerstoffatome stammen jeweils vom β - und γ -Phosphat, dem Seitenkettensauerstoff des Serins des P-Loops und zwei Wassermolekülen, die die axiale Position einnehmen. Das Glycin des DxxG-Motivs bildet eine Wasserstoffbrücke zum γ -Phosphat aus und ist in allen GTP-bindenden Proteinen konserviert (Abb. 2-1, magenta markiert). Das vierte Element [N/T][K/Q]xD geht diverse Wechselwirkungen mit dem Guaninring ein und ist für die Nukleotidspezifität verantwortlich (Abb. 2-1, grün markiert) (Sigal *et al.*, 1986).

Bei den Mitgliedern der Dynaminfamilie befindet sich zwischen dem ersten und zweiten Motiv noch das sogenannte Signaturmotiv LPRG(S/T)GIVTR, für das eine Rolle bei der Oligomerisierung von Mx-Proteinen postuliert wurde (Nakayama *et al.*, 1993). Die Dynamine und viele der Dynamin-ähnlichen Proteine besitzen außerdem eine konservierte GGARI-Box, die das carboxyterminale Ende des hoch homologen Bereichs zwischen diesen Untergruppen markiert. Die sich anschließenden carboxyterminalen Hälften sind weniger gut konserviert. Anhand von Sequenzhomologien kann die Proteinfamilie in mindestens 5 Untergruppen

eingeteilt werden, die nach ihren typischen Vertretern benannt sind. Es sind dies die Dynamin-1-Untergruppe, die Vps1p/Dnm1p-Untergruppe, Phragmoplastin, die Mx-Proteine und Mgm1p. Auf die einzelnen Mitglieder der Untergruppen wird in Kapitel 2.5 näher eingegangen.

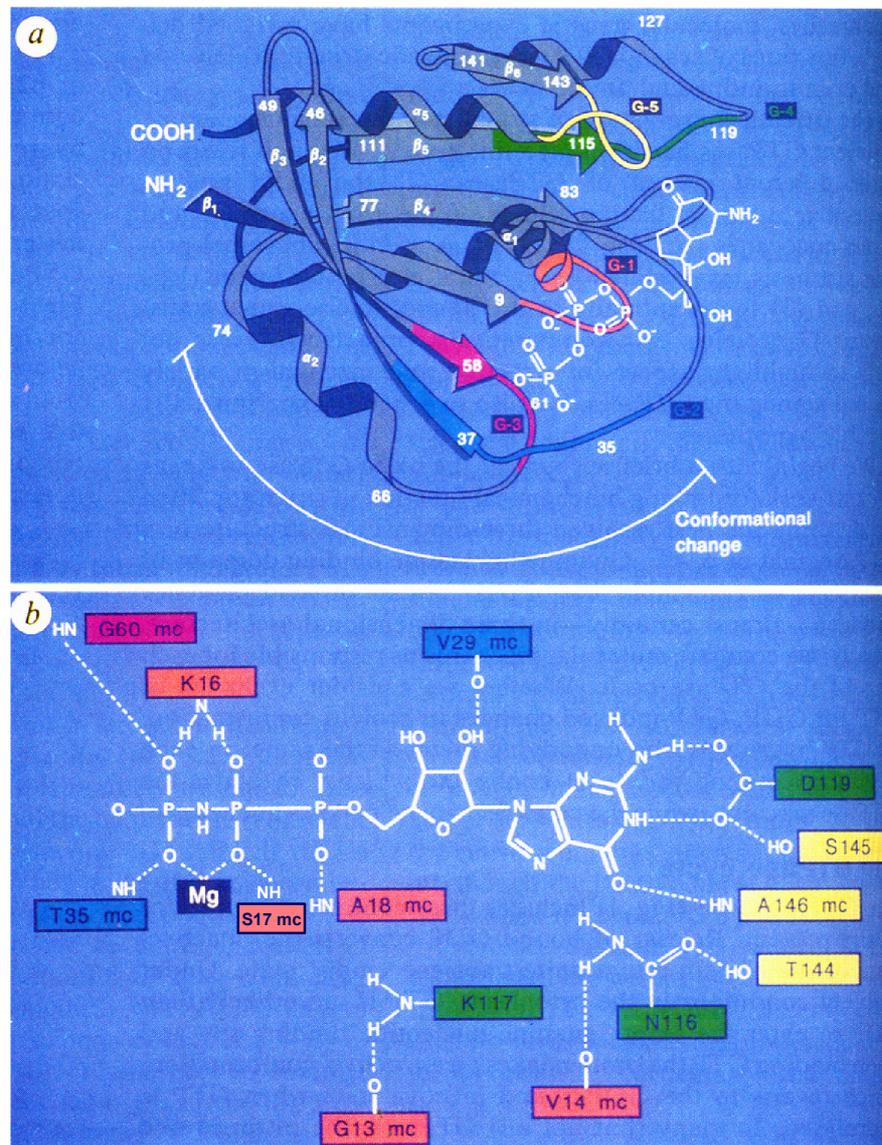


Abb 2-1.: Dreidimensionale Struktur von Ras (modifiziert nach Bourne *et al.*, 1991)

(A) Dreidimensionale Struktur von Ras in der GTP-gebundenen Form. Die hochkonservierten und an der Wechselwirkung mit GTP beteiligten Regionen (G-x) sind farbig markiert. G-1 („P-Loop“) ist orangefarben, G-2 („switch I“) blau, G-3 („switch II“) magenta, G-4 grün und G-5 ist gelb dargestellt. Die Bereiche *switch I* und *switch II* erfahren während der GTP-Hydrolyse die größte Konformationsänderung. (B) Interaktion ausgewählter Aminosäuren von Ras mit dem GTP-Analogen Gpp(NH)p. Die gestrichelten Linien entsprechen Wasserstoffbrückenbindungen. Die Aminosäure S17 wurde nachträglich in die Abbildung eingefügt (entsprechend Pai *et al.*, 1989).

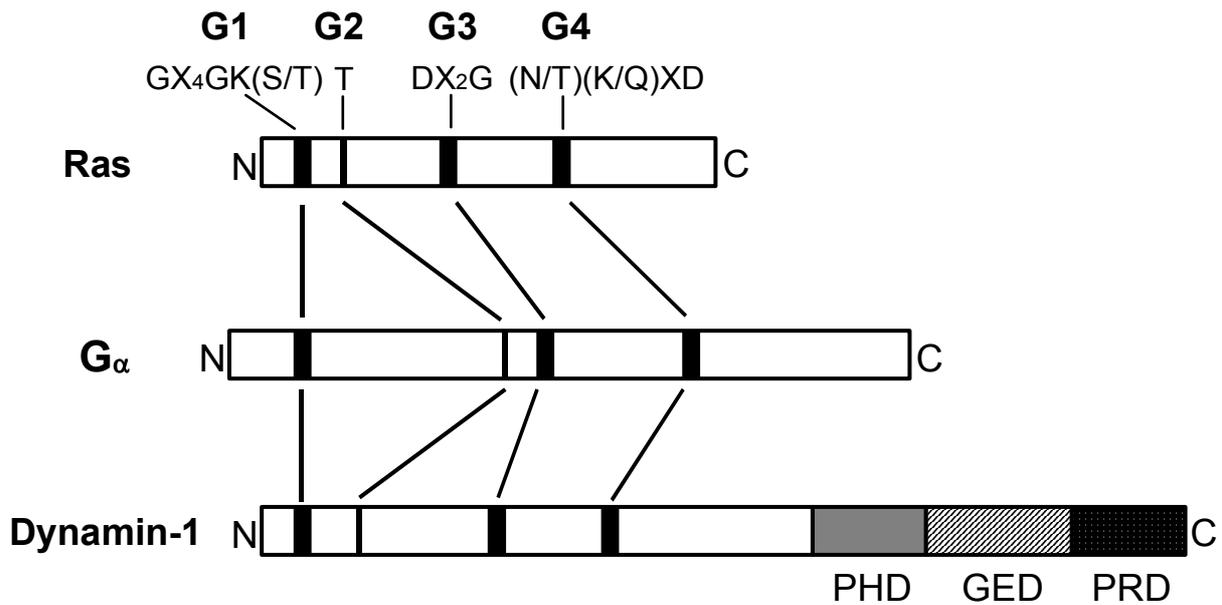


Abb. 2-2: Strukturelemente der GTP-bindenden Proteine

Die horizontalen Balken stellen die linearen Aminosäuresequenzen dar. Darin eingezeichnet sind als dünne vertikale Balken die konservierten Sequenzmotive G1 bis G4 für die GTP-Bindung und GTP-Hydrolyse. Variable Aminosäuren sind mit einem X gekennzeichnet und deren Anzahl als Ziffer dargestellt. Abkürzungen: N: Aminoterminus, C: Carboxyterminus, PHD: Pleckstrin-Homologie-Domäne (grau), GED: GTPase-Effektor-Domäne (gestreift), PRD: Prolin-Arginin-reiche-Domäne (gepunktet).

Der GTPase-Domäne folgt ein wenig charakterisierter, 200 Aminosäuren umfassender Bereich von geringer Sequenzhomologie. An diese „Mitteldomäne“ schließt sich der Carboxyterminus an, der bei den Proteinen der Dynamin-1-Untergruppe, den sogenannten „echten“ Dynaminen, eine ausgeprägte Domänenstruktur aufweist. Der Mitteldomäne benachbart ist die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne). Sie hat eine durchschnittliche Länge von 100 bis 120 Aminosäuren und ist Bestandteil vieler Proteine, die an intrazellulärer Signaltransduktion beteiligt sind (Haslam *et al.*, 1993; Mayer *et al.*, 1993). Obwohl die PH-Domäne von Dynamin-1 bereits gentechnisch hergestellt und die Struktur mittels NMR und Röntgenkristallographie gelöst wurde, ist ihre genaue Funktion noch nicht eindeutig geklärt (Downing *et al.*, 1994; Ferguson *et al.*, 1994). Generell scheinen PH-Domänen jedoch an Protein-Protein- sowie Protein-Lipid-Interaktionen beteiligt zu sein (Musacchio *et al.*, 1993; Shaw, 1993).

Einen weiteren funktionell wichtigen Bereich stellt die Prolin-Arginin-reiche Domäne (PR-Domäne) am carboxyterminalen Ende der Proteine aus der Dynamin-1-Untergruppe dar. Über einen Abschnitt von 112 Aminosäuren liegt der Anteil an Prolin bei 32 % und an Arginin bei 10 %. Die PR-Domäne ist an der Interaktion mit anderen Proteinen beteiligt. Sie enthält mehrere mögliche Bindungsstellen mit der konservierten Sequenz PxxP, an die bevorzugt Proteine mit Src-Homologie3-Domänen (SH3-Domänen) binden (Yu *et al.*, 1994). Ähnlich wie PH-Domänen sind SH3-Domänen häufig Bestandteil von Proteinen, die an der

Signaltransduktion beteiligt sind. Tatsächlich binden eine Reihe rekombinanter SH3-Domänen *in vitro* spezifisch an die PR-Domäne von Dynamin-1 und stimulieren dessen enzymatische Aktivität (Gout *et al.*, 1993). Ferner bindet Dynamin-1 über seine PR-Domäne *in vitro* an Mikrotubuli. (Shpetner und Vallee, 1992a). Neben der Wechselwirkung mit anderen Proteinen ist die PR-Domäne auch für die Interaktion mit sich selbst, d.h. für die Oligomerisierung von Dynamin notwendig (Hinshaw und Schmid, 1995). Bei hohen Salzkonzentrationen (> 300 mM NaCl) liegt Dynamin-1 in Lösung als Tetramer vor (Muhlberg *et al.*, 1997). Diese Tetramere lagern sich in Puffer geringer Ionenstärke zu sedimentierbaren Ringen und halbkreisförmigen Strukturen zusammen, die sich bei Proteinkonzentrationen oberhalb 1 mg/ml zu langen Helices aufeinanderstapeln (Hinshaw und Schmid, 1995). Wird diese Domäne proteolytisch abgespalten, so ist die Aggregationsfähigkeit des Proteins und die Struktur der Oligomere verändert (Carr und Hinshaw, 1997). Bemerkenswerterweise ist ein Bereich von 40 Aminosäuren innerhalb der PR-Domäne sowohl an der Bindung von SH3-Domänen beteiligt als auch für die Dynamin-Dynamin-Interaktion notwendig. Offensichtlich konkurrieren diese beiden Arten von Wechselwirkungen miteinander, da Proteine mit SH3-Domänen konzentrationsabhängig die Auflösung der helikalen Dynaminstrukturen bewirken (Scaife *et al.*, 1998).

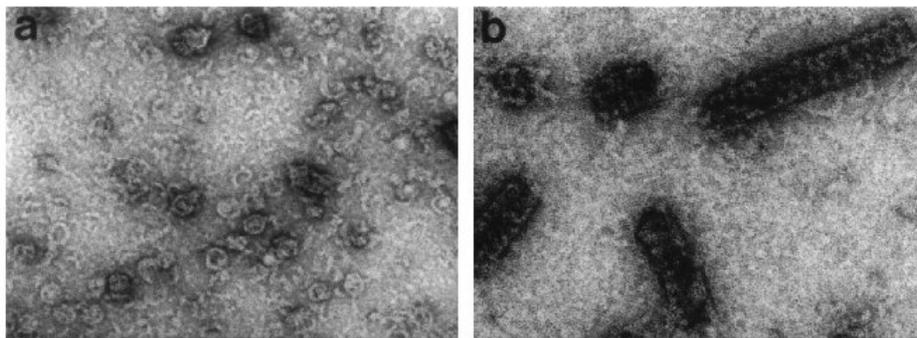


Abb. 2-3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ gefärbtem Dynamin-1 (Urrutia *et al.*, 1997)

Die Aufnahmen zeigen die Strukturen, zu denen sich Dynamin-1 unter verschiedenen Bedingungen zusammenlagert. (A) Bei einer Proteinkonzentration unter 1 mg/ml aggregiert Dynamin-1 zu individuellen Ringen. Bei Erhöhung der Proteinkonzentration über 1 mg/ml lagern sich die Oligomere zu langen Stapeln zusammen (B).

Die PR- und die PH-Domäne sind über ein 13 kDa großes Segment miteinander verbunden. Dieses weist gemäß Sekundärstrukturanalysen einen stark α -helikalen Charakter auf und bildet möglicherweise eine superhelikale (*coiled-coil*) Struktur aus. Durch chemische Vernetzung (*cross-linking*) von proteolytischen Fragmenten wurde gezeigt, daß diese Region mit der GTPase-Domäne interagiert und für eine effiziente GTP-Hydrolyse essentiell ist. Sie wurde deshalb GTPase-Effektor-Domäne (GE-Domäne) genannt (Muhlberg *et al.*, 1997). Weiterführende Experimente bestätigten die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Domänen und ergaben zusätzlich, daß die GE-Domäne auch an die Mitteldomäne und an sich selbst bindet (Smirnova *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1999). Da diese Region anscheinend eine

wichtige Rolle bei der Oligomerisierung spielt, wird sie teilweise auch als Assemblierungsdomäne bezeichnet. Während nur Mitglieder der Dynamamin-1-Untergruppe eine PR- und die PH-Domäne besitzen, kommt die GE-Domäne auch bei den Dynamamin-ähnlichen Proteinen vor.

2.3 Die Regulation von GTPasen

GTPasen alternieren zwischen bestimmten Konformationen, die sich mit dem Phosphorylierungszustand des gebundenen Nukleotids ändern. Die meisten GTP-bindenden Proteine fungieren deshalb als molekulare Schalter und kontrollieren viele zelluläre Vorgänge. Im allgemeinen stellt die GTP-gebundene Form den aktiven Zustand des Proteins dar, in der es mit potentiellen Effektoren interagiert und einen zellulären Prozeß auslösen kann (Abb. 2-4). Das Signal wird abgeschaltet, sobald das GTP zu GDP hydrolysiert wird und das Protein im GDP-gebundenen Zustand vorliegt. Der nukleotidfreie Zustand ist aufgrund der hohen GTP-Konzentration in der Zelle nur sehr kurzlebig. In den GTPase-Zyklus greifen weitere Proteine regulierend ein. Die „GTPase aktivierenden Proteine“ (GAPs) bewirken eine Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeit und dadurch eine Verkürzung des aktiven Zustands. Die „Guaninnukleotid-Austauschfaktoren“ (GEFs) beschleunigen dagegen die Dissoziation von GDP und tragen somit zu einem größeren Anteil an aktiven, GTP-gebundenen Molekülen bei. Die Dissoziation von GDP kann durch „Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren“ (GDIs) blockiert werden. Im Fall der Ras-Signalübertragungskette werden extrazelluläre Signale (Wachstumsfaktoren) durch Rezeptoren, Adapterproteine und Austauschfaktoren auf die GTPase Ras übertragen. Die Wechselwirkung mit einem Austauschfaktor katalysiert die Abdissoziation des gebundenen GDPs und die Bindung von GTP. In dieser aktiven Form bindet Ras an bestimmte Kinasen und setzt eine Kinase-Kaskade in Gang, wodurch im weiteren Verlauf der Signalverarbeitung Transkriptionsfaktoren aktiviert werden und die DNA-Replikation eingeleitet wird (McCormick, 1989). Die intrinsische GTPase-Aktivität der Ras-ähnlichen Proteine ist mit einer Größenordnung von 10^{-2} min^{-1} relativ niedrig (Downward, 1990). Durch GAPs kann die Hydrolyserate jedoch um das mehr als tausendfache erhöht werden (Trahey und McCormick, 1987). Bei anderen G-Proteinen erfolgt die Aktivierung nicht oder nicht allein durch intermolekulare, sondern auch durch intramolekulare Stimulation. So bestehen beispielsweise die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine aus zwei Domänen: einer kleinen Ras-ähnlichen Domäne, die das GTP hydrolysiert und einer aktivierenden Domäne, die die Hydrolyse des GTP durch Wechselwirkung mit der GTPase-Domäne stimuliert (Markby *et al.*, 1993).

Im Vergleich zu den GTPasen der Ras-Familie zeigen die Dynamine eine bedeutend höhere basale Hydrolyserate für GTP (1 bis 80 min^{-1}) und eine geringere Affinität für dieses Substrat ($K_M = 10^{-4}$ bis 10^{-5} M) (Maeda *et al.*, 1992; Shpetner und Vallee, 1992; Warnock *et al.*, 1997). Durch Wechselwirkung mit bestimmten Aktivatoren kann die GTP-Hydrolyserate Dynamins um das 100fache gesteigert werden. Zu den Aktivatoren von Dynamamin-1 zählen Mikrotubuli (Shpetner und Vallee, 1992), Proteine mit Src-Homologie-Domänen (SH3-Domänen)

(Gout *et al.*, 1993) und saure Phospholipide (Tuma *et al.*, 1993). Mikrotubuli und Proteine mit SH3-Domänen interagieren mit der PR-Domäne von Dynamin-1. Die Stimulation durch Mikrotubuli ist *in vitro* besonders effizient (Warnock *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1997), obwohl eine Wechselwirkung Dynamins mit Mikrotubuli *in vivo* nicht nachgewiesen werden konnte und daher physiologisch wahrscheinlich nicht relevant ist. Man vermutet, daß die Mikrotubuli aufgrund ihrer Dimensionen ein geeignetes Substrat darstellen, um das sich die Dynamin-Moleküle anlagern können, da sie einen ähnlichen Durchmesser aufweisen wie die Häuse von *Clathrin-coated pits* (20 bis 25 μm) (Maeda *et al.*, 1992). Auch monoklonale Antikörper, die gegen die PR-Domäne gerichtet sind, stimulieren die GTPase-Rate, wohingegen die entsprechenden monovalenten Fab-Fragmente keinen Effekt haben (Warnock *et al.*, 1995). Diese Beobachtungen zeigen, daß vermutlich eine Dynamin-Dynamin-Wechselwirkung für die Aktivierung verantwortlich ist. Tatsächlich führt bereits die Oligomerisierung von Dynamin-1 allein zu einer drei bis zehnfachen Steigerung der GTP-Hydrolyserate (Lin und Gilman, 1996; Warnock *et al.*, 1996). Es ist also denkbar, daß die Wirkungsweise einiger Effektoren darauf beruht, daß sie das Gleichgewicht zwischen monomerem und oligomerem Dynamin-1 in Richtung des aggregierten Proteins verschieben.

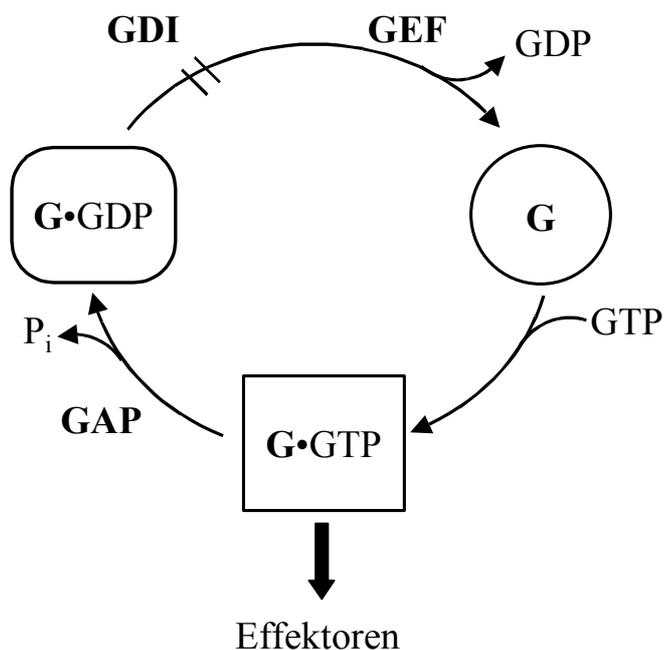


Abb. 2-4: Der GTPase-Zyklus GTP-bindender Proteine

Das nukleotidfreie Enzym (G) geht durch Bindung von GTP ($\text{G}\cdot\text{GTP}$) in den aktiven Zustand über und löst bestimmte zelluläre Prozesse aus. Mit der Hydrolyse des GTP zu GDP und der Freigabe des Phosphats endet der aktive Zustand. Das Protein befindet sich in der GDP-Konformation bis das GDP wieder durch GTP ersetzt wird. Die nukleotidfreie Form tritt in der Regel nur transient auf. Weitere Enzyme sind an der Regulation des GTPase-Zyklus beteiligt: GAP: GTPase-aktivierendes Protein (*GTPase activating protein*), GDI: Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*), GEF: Guaninnukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*).

Die Bindung saurer Phospholipide an die PH-Domäne von Dynamin-1 wirkt ebenfalls stimulierend auf die GTPase-Aktivität. Das Ausmaß der Aktivierung korreliert dabei mit der Affinität zum jeweiligen Lipid (Tuma *et al.*, 1993; Salim *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1996). Die isolierte PH-Domäne von Dynamin-1 weist insbesondere zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) eine hohe Affinität auf (Salim *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1996). Bei Dynamin-Mutanten ohne funktionelle PH-Domäne führt die Anwesenheit von Lipiden wie erwartet zu keiner Steigerung der GTPase-Aktivität (Salim *et al.*, 1996). Das Fehlen der PH-Domäne bewirkt aber eine Steigerung der basalen GTPase-Aktivität (Muhlberg *et al.*, 1997; Scaife *et al.*, 1998). Möglicherweise fungiert die PH-Domäne daher als negativer Regulator der GTPase-Domäne (Muhlberg *et al.*, 1997).

Für die GE-Domäne wurde nachgewiesen, daß sie mit der GTPase-Domäne interagiert. Die GTP-Hydrolyserate der isolierten GTPase-Domäne wird durch Zugabe der gereinigten GE-Domäne um das fünffache gesteigert (Muhlberg *et al.*, 1997; Sever *et al.*, 1999). Vermutlich stellt die GE-Domäne ein intramolekulares GAP dar (Sever *et al.*, 1999).

2.4 Funktionsweise von Dynamin

Erste Hinweise auf die Funktion von Dynamin-1 ergaben sich, nachdem das *shibire*-Gen aus *Drosophila* kloniert worden war und die große Sequenzhomologie zwischen Dynamin-1 und dem *shibire*-Genprodukt festgestellt wurde (Chen *et al.*, 1991; van der Blik AM und Meyerowitz, 1991). Da das Produkt des *shibire*-Gens bei der Endocytose von synaptischen Vesikeln eine Rolle spielt, wurde für Dynamin-1 eine ähnliche Funktion vermutet. Dazu wurden Dynamin-Mutanten hergestellt, die nicht mehr in der Lage waren, GTP zu binden und zu hydrolysieren. Dabei wurde u.a. eine K44A-Mutation in Dynamin-1 eingeführt, in Analogie zur K16A-Mutation in Ras, die dort zu einer verringerten Affinität gegenüber GTP und GDP führt (Sigal *et al.*, 1986). Bei Expression dieser dominant-negativen Dynamin-Mutante in Säugetierzellen wurde beobachtet, daß die Bildung von endocytotischen Vesikeln in einem Stadium blockiert ist, bei dem sich zwar eine deutliche Einstülpung gebildet hatte, aber noch keine Abschnürung der Clathrin-umhüllten Membranknospe (*coated pit*) stattgefunden hatte (Damke *et al.*, 1994). Zellfraktionierungsexperimente und die immunohistochemische Lokalisation von Dynamin-1 ergaben, daß das Protein sowohl cytosolisch als auch membrangebunden vorliegt (Scaife und Margolis, 1990; Herskovits *et al.*, 1993; Van der Blik *et al.*, 1993). Die subzelluläre Lokalisation von Dynamin-1 zeigte, daß der membrangebundene Anteil des Proteins mit den *coated pits* an der Plasmamembran assoziiert ist. Dabei ist Dynamin-1 entweder direkt mit dem Clathrin-Gitter am Kopf der Einbuchtungen oder ringförmig um den Hals der *coated pits* lokalisiert. Die K44A-Mutante wurde dagegen ausschließlich am Clathrin-umhüllten Kopf der Einstülpung detektiert, so daß die Bindung von GTP an Dynamin-1 möglicherweise dessen Umverteilung zum Hals des *coated pits* einleitet (Damke *et al.*, 1994). Für die endgültige Abschnürung des Vesikels von der Plasmamembran ist die Hydrolyse von GTP notwendig. In Anwesenheit des schwer hydrolysierbaren GTP-Analogs GTP γ S kann sich Dynamin zwar als helikale Struktur um die

Hälsa der *coated pits* anlagern, aber die Freisetzung der Vesikel ist blockiert (Carter *et al.*, 1993; Takei *et al.*, 1995).

Anhand der experimentellen *in vitro* und *in vivo* Beobachtungen wurde 1995 von S. Schmid und Mitarbeitern folgendes Modell für die Funktionsweise von Dynamin-1 aufgestellt (Hinshaw und Schmid, 1995; Warnock und Schmid, 1996) (Abb. 2-5). Dynamin-1 assoziiert in einem GDP-gebundenen oder nukleotidfreien Zustand an das Clathrin-Gitter eines *coated pits*. Die anschließende Bindung von GTP führt zu einer Umverteilung von Dynamin-1 an den Hals der Membranknospe. Dynamin lagert sich dort zu helikalen Ringen zusammen. Die Hydrolyse von GTP verursacht eine vermutlich konzertierte Konformationsänderung bei den Dynaminoligomeren und somit die Abschnürung des Vesikels von der Plasmamembran. GDP-gebundenes bzw. nukleotidfreies Dynamin steht nun für einen neuen Kreislauf zur Verfügung, da es sich kurz nach der Freisetzung des Vesikels von diesem ablöst.

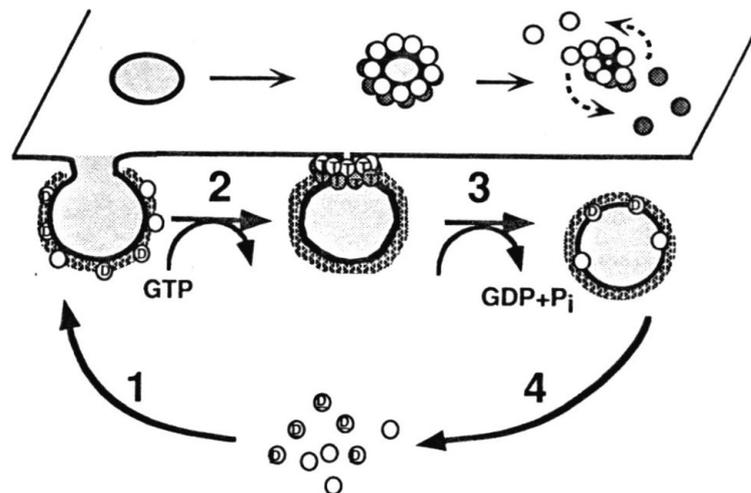


Abb. 2-5: Modell zur Funktion von Dynamin-1 *in vivo* (Schmid *et al.*, 1995)

Dynamin-1 wird durch Kreise symbolisiert, die je nach Nukleotidzustand des Proteins mit einem T (für gebundenes GTP) oder D (für gebundenes GDP) versehen sind. Offene Kreise stellen die nukleotidfreie Form dar. Dynamin-1 lagert sich in seiner GDP-gebundenen oder nukleotidfreien Form an das Clathrin-Gitters einer Membranknospe an (Schritt 1). Im zweiten Schritt bewirkt die Bindung von GTP die Umlagerung von Dynamin-1 an den Hals des *coated pits*. Die anschließende Hydrolyse von GTP (Schritt 3) induziert eine Konformationsänderung in den Dynamin-Molekülen, die zur Schließung der Ringstruktur und Abschnürung des Vesikels führen. Im vierten Schritt lösen sich die Dynamin-Aggregate auf und können sich erneut an ein *coated pit* anlagern.

Die Rekrutierung von Dynamin an die Plasmamembran erfolgt möglicherweise durch Proteine mit SH3-Domänen, die an die prolinreiche Domäne von Dynamin-1 binden. Ein potentieller Kandidat ist das neuronenspezifische Protein Amphiphysin. Dieses bindet sowohl an eine Komponente des Clathrin-Gitters, den AP2-Komplex, als auch an Dynamin-1, und zwar über unterschiedliche Bindungsstellen (David *et al.*, 1996).

Dieses Basismodell wurde im folgenden durch neue experimentelle Daten ergänzt und verändert (Abb. 2-5).

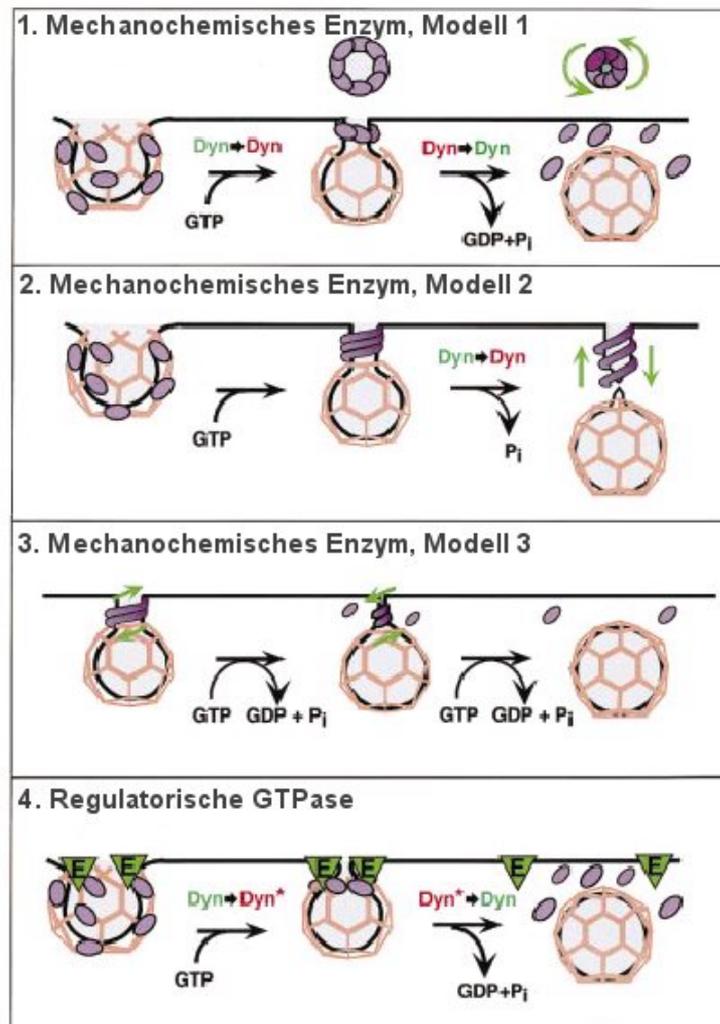


Abb. 2-6: Verschiedene Modelle zur Funktion von Dynamin-1 bei der Vesikelbildung (modifiziert nach S. Sever *et al.*, 2000)

Die Schritte, in denen Dynamin-1 GTP bindet und hydrolysiert sind durch Pfeile verdeutlicht. Änderungen der Schriftfarbe bedeuten Konformationsänderungen in den Dynamin-Molekülen. Die grünen Pfeile repräsentieren Schritte, bei denen die Konformationsänderung mit Bewegung verbunden ist. **(1)** GTP-gebundenes Dynamin-1 lagert sich wie ein Kragen um den Hals eines *coated pits*. Durch Hydrolyse des GTPs wird in den Dynaminmolekülen eine Konformationsänderung induziert, die zu einer Konstriktion der Membran am Hals und zur Abschnürung des Vesikels führt. **(2)** Dynamin-1 lagert sich nach Bindung von GTP spiralförmig um den Hals eines *coated pits*. Die durch die GTP-Hydrolyse induzierte Konformationsänderung bewirkt eine Ausdehnung der Spirale und das Abreißen des Vesikels von der Plasmamembran. **(3)** Dynamin-1 lagert sich in seiner GTP-gebundenen Form um den Hals einer Membranknospe. Die sequentielle Hydrolyse von GTP durch die Dynamindimere liefert die Energie, die nötig ist, damit sich Dynamindimere über benachbarte Dimere schieben. Die Membran am Hals des *coated pits* wird immer stärker eingeschnürt bis sie schließlich vollständig abgeschnürt ist. Im Gegensatz zu den Modellen 1 und 2 ist bei diesem Modell keine konzertierte Konformationsänderung der Dynaminmoleküle nötig. **(4)** Nach der Bindung von GTP befindet sich Dynamin-1 am Hals des *coated pits*. Durch Hydrolyse des GTPs liefert Dynamin das Signal an weitere Effektoren (E) für die Abschnürung des Vesikels. Hier hat Dynamin-1 die Funktion einer regulatorischen GTPase.

Die Frage, ob Dynamin als mechanochemisches Enzym, das die GTP-Hydrolyse zur Vesikelfreisetzung nutzt, oder ob es wie ein molekularer Schalter arbeitet, der nur das Signal zur Abschnürung gibt, stand dabei im Vordergrund.

Zunächst glaubte man, daß Dynamin das erste Protein sei, das seine GTPase-Aktivität nutze, um mechanische Arbeit zu leisten. Diese Annahme wurde bekräftigt als Sweitzer und Hinshaw 1998 zeigten, daß gereinigtes rekombinantes Dynamin ausreicht, um bei Zugabe von GTP die Fragmentierung von synthetischen Liposomen in kleine Vesikel auszulösen (Sweitzer und Hinshaw, 1998). Die wenigen noch vorhandenen und mit Dynaminspiralen umgebenen tubulären Lipidstrukturen hatten durchgehend einen kleineren Durchmesser (40 nm) als vor der GTP-Zugabe (50 nm). Man schloß daraus, daß dies einen intermediären Zustand darstelle, bei dem die Membran zwar schon eingeschnürt, aber die Vesikel noch nicht völlig abgeschnürt waren (Abb. 2-5, Modell 1).

McMahon und Mitarbeiter untersuchten ebenfalls das Verhalten von Dynaminspiralen um Lipidzylinder bei verschiedenen Nukleotidzuständen (Stowell *et al.*, 1999). Ihre Beobachtung wichen jedoch von den oben genannten ab. Sie fanden, daß die Abstände der einzelnen durch Dynamin gebildeten Spiralen nach der GTP-Hydrolyse (20 ± 3 nm) doppelt so groß waren wie vor der Hydrolyse ($11 \pm 1,5$ nm). Der GTP-gebundene Zustand wurde dabei durch die Bindung des nicht hydrolysierbaren GTP-Analogs GTP γ S, der Übergangszustand durch Bindung von GDP-AlF $_4^-$ und der Zustand nach der Hydrolyse durch die Anwesenheit von GDP repräsentiert. Sie schlugen daher vor, daß Dynamin sich wie eine Sprungfeder verhalte (Abb. 2-5, Modell 2). Die durch eine konzertierte GTP-Hydrolyse hervorgerufene Konformationsänderung induziere eine plötzliche Abstandsvergrößerung zwischen den Dynaminhelices, was das Abreißen der Lipidmembran verursacht.

Ein anderes Modell schlägt vor, daß Ein- und Abschnürung der Membran dadurch zustande kommen, indem sich Dynamindimere gleichermaßen entlang eines Zahnrads über benachbarte Dimere schieben, wobei ein Dynamindimeres einem Zahn entspricht (Smirnova *et al.*, 1999). Auf diese Weise ziehen sich die Dynaminhelices immer weiter zusammen bis es zur endgültigen Membranabschnürung kommt. Da diesem Modell nach nur die GTPase-, die Mittel- und die GE-Domäne, nicht aber die PH- und PR-Domäne für intermolekulare Wechselwirkungen innerhalb der Dynaminhelices notwendig sind, ist es auch für die Dynamin-ähnlichen Proteine interessant (Abb. 2-6, Modell 3).

Die bisher aufgeführten Befunde sprechen eher für die Rolle Dynamins als mechanochemisches Enzym. Es gibt aber auch Hinweise, daß Dynamin eine regulatorische Funktion ausüben könnte. 1999 führten Schmid und Mitarbeiter Mutationen in die als intramolekulares GAP wirkende GE-Domäne von Dynamin-1 ein (Sever *et al.*, 1999). Diese Mutationen verhinderten die durch Oligomerisation hervorgerufene Stimulation der GTPase-Aktivität, während die basale GTPase-Aktivität unbeeinflusst blieb. Um den Effekt dieser Mutationen *in vivo* zu testen, wurden Fibroblasten-Zellen mit den Mutanten transfiziert und die Aufnahme von Transferrin in diesen Zellen beobachtet. Wider Erwarten war die Endocytoserate im Vergleich zu Kontrollzellen nicht verringert, sondern beschleunigt. Daraus schloß man, daß der GTP-gebundene Zustand, der in diesen Mutanten gegenüber dem Wildtyp verlängert ist, die aktive Form Dynamins darstellt, und daß Dynamin in diesem aktivierten Zustand weitere, für die eigentliche Abschnürung zuständige Effektoren rekrutiert. Die

Dynaminkragen könnten als Sensoren fungieren, die den Durchmesser der Hälse der *coated pits* messen und somit das Fortschreiten des Abschnürvorgangs verfolgen. Kommen die Enden eines Dynaminrings soweit zusammen, daß sie überlappen, stimuliere dies die oligomerisationsabhängige GTPase-Aktivität, das gebundene GTP wird hydrolysiert und das Signal für die Vesikelabschnürung abgeschaltet. Diesem Modell nach wäre Dynamin eine klassische regulatorische GTPase (Abb. 2-6, Modell 4).

Die Beobachtung, daß GED-Mutanten die Transferrin-Aufnahme beschleunigen widerspricht dem Befund, daß die Anwesenheit von nicht hydrolysierbarem GTP γ S die Aufnahme von Transferrin blockiert (Carter *et al.*, 1993). In beiden Fällen geht man davon aus, daß Dynamin-1 überwiegend im GTP-gebundenen Zustand vorliegt. Bei den von Sever *et al* durchgeführten Experimenten ist aber nicht endgültig geklärt, in welchem Nukleotidzustand Dynamin-1 *in vivo* tatsächlich vorlag, so daß die beschleunigte Endocytoserate durch einen erhöhten GTP-Umsatz bedingt sein kann.

Es wurde daher versucht, Dynamin-Mutanten mit Mutationen in der GTPase-Domäne herzustellen, die oligomerisieren und GTP binden, dieses aber nicht hydrolysieren können (Yang und Cerione, 1999). Stimulieren diese Mutanten die Rezeptor-vermittelte Endocytose, so wäre dies ein deutlicher Hinweis auf eine regulatorische Funktion, wird die Endocytose dagegen inhibiert, spräche dies für eine aktive Rolle Dynamins bei der Vesikelabschnürung. Bislang ist es jedoch nicht gelungen, derartige Mutanten zu erzeugen.

Ferner wird nach Interaktionspartnern Dynamins gesucht, die auch an Membranabschnürungsprozessen beteiligt sind. Als potentieller Partner wurde das in Synapsen vorkommende 40 kDa große Protein Endophilin-1 identifiziert. (Schmidt *et al.*, 1999). Endophilin-1 katalysiert die Reaktion von Lysophosphatidsäure zu Phosphatidsäure, indem es die ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure auf die Lysophatidsäure überträgt. Dieser Vorgang ist vermutlich mit einer Biegung der Membran verbunden, da die Wölbung einer Membran u.a. von der Form der Lipide, die in ihr enthalten sind, abhängt (Lipowsky, 1993). In diesem Fall würde die konkav geformte Membran eine konvexe Form annehmen. Findet dieser Fettsäuretransfer am Hals einer Membranknospe statt, fördert Endophilin-1 die Vesikelbildung, da die abzuschnürende Membran entsprechend geformt wird. Der Vorgang ist in Abb. 2-7 verdeutlicht.

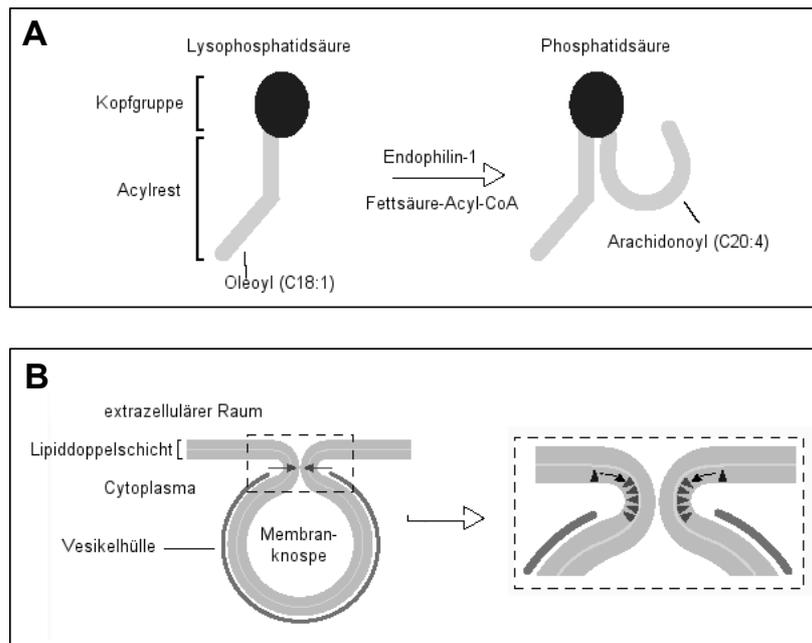


Abb. 2-7: Modell zur Funktionsweise von Endophilin-1 bei der Vesikelabschnürung (modifiziert nach F. Barr *et al.*, 2000)

(A) Endophilin-1 katalysiert den Transfer von Arachidonsäure von Coenzym A zur Lysophosphatidsäure (links) unter Bildung von Phosphatidsäure (rechts). Der Glycerinrest und die Phosphatgruppe bilden die Kopfgruppe, die durch die dunkle ovale Struktur repräsentiert wird, der Fettsäurerest ist hellgrau dargestellt. Die Anzahl der Kohlenwasserstoffe und der Doppelbindungen sind in Klammern angegeben. (B) Durch die Anlagerung von Hüllproteinen (dunkelgrau) an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran (hellgrau) wird die Membranknospe gebildet. Der verengte Bereich am *coated pit* wird durch Pfeile markiert. Durch Verschmelzen der Lipiddoppelschicht an dieser Stelle wird das Vesikel abgeschnürt (linke Abbildung). Rechts ist der relevante Ausschnitt vergrößert gezeigt, der die lokale Bildung von Phosphatidsäure (helle Pfeilspitzen) zu Lysophosphatidsäure (dunkle Pfeilspitzen) verdeutlicht. Hierbei wölbt sich die Membran nach innen, was die Vesikulation unterstützt.

Außerdem wurde gezeigt, daß Endophilin-1 *in vitro* über seine SH3-Domäne an Dynamin-1 bindet (Ringstad *et al.*, 1997). Möglicherweise wird Endophilin-1 durch die Bindung an Dynamin-1 aktiviert und bewirkt so letztlich die Vesikelabschnürung.

2.5 Die Mitglieder der Dynaminfamilie

Die Mitglieder der Dynaminfamilie kommen in vielen verschiedenen Organismen vor und üben dort zum Teil recht unterschiedliche Funktionen aus. Die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den einzelnen Mitgliedern sind in Abb. 2-8 in Form eines Dendrogramms dargestellt.

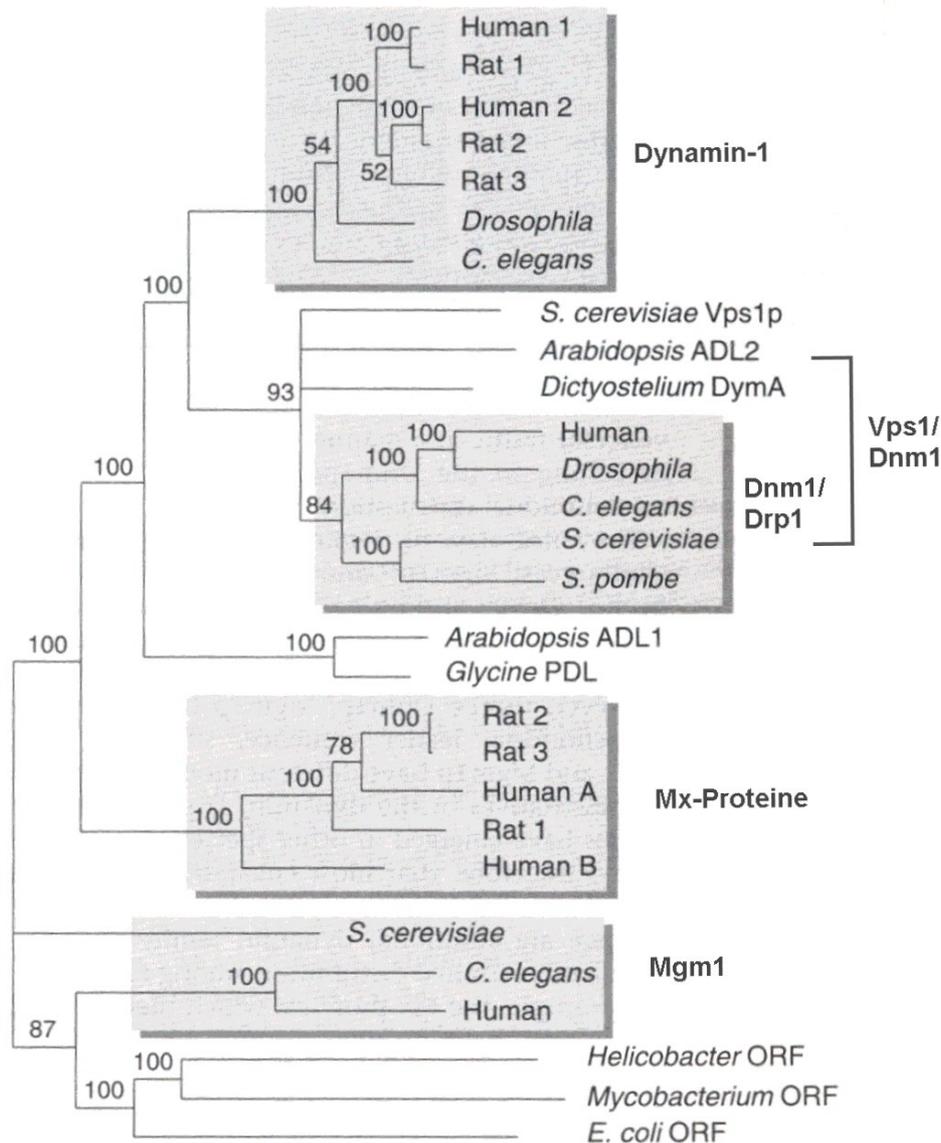


Abb. 2-8: Phylogenetische Analyse der Dynamine und Dynamin-ähnlichen Proteine (modifiziert nach Van der Bliek, 1999)

Die für den Vergleich verwendeten Aminosäuresequenzen beginnen mit dem ersten Konsensusmotiv (G1) und umfassen die folgenden 470 Aminosäuren. Der Vergleich erfolgte nach der ClustalW-Methode. Die Länge der Zweige repräsentieren die Länge zwischen dem jeweiligen Sequenzpaar. Vier Gruppen sind hervorgehoben (graue Unterlegung), deren Mitglieder ähnliche Funktionen ausüben: Die Dynamine der Dynamin-1-Untergruppe, die am Vesikeltransport beteiligt sind; Dnm1p und Drp1, die bei der Erhaltung der Mitochondrienmorphologie involviert sind; Mgm1p, das ebenfalls an Erhaltung der Mitochondrienmorphologie und an der Erhaltung des mitochondrialen Genoms beteiligt ist und die Mx-Proteine, die für die Abwehr von Virusinfektionen bei Wirbeltieren sorgen. Vps1p (*S. cerevisiae*) wird nicht der Dynamin-Untergruppe zugeordnet, ist jedoch auch am Vesikeltransport beteiligt. Vps1p, ADL2 (*A. thaliana*) und Dynamin A (*D. discoideum*) können gemeinsam mit den Mitgliedern der Dnm1/Drp1-Gruppe als Vps1/Dnm1-Gruppe zusammengefaßt werden. Weitere Mitglieder wurden in den Pflanzen *A. thaliana* (ADL1) und *G. max* (PDL = Phragmoplastin) sowie in Bakterien (*E. coli*, *H. pylori*, *M. tuberculosis*) gefunden.

2.5.1 Die „echten“ Dynamine

Die sogenannten echten Dynamine besitzen im Gegensatz zu den Dynamin-ähnlichen Proteinen eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) und eine Prolin-Arginin-reiche-Domäne (PR-Domäne). Am intensivsten wurde bisher das Dynamin-1 untersucht. Neben dieser neuronalen Form sind in Säugetieren aber noch zwei weitere Dynamine bekannt: das ubiquitär vorkommende Dynamin-2 und das in Testes und Lunge angereicherte Dynamin-3.

Das biochemische Verhalten und die zelluläre Lokalisation von Dynamin-2 an der Plasmamembran weisen auf eine ähnliche Funktion bei der Endocytose hin wie sie für Dynamin-1 gefunden wurde (Warnock *et al.*, 1997). Daneben gibt es biochemische und morphologische Hinweise auf eine Beteiligung von Dynamin-2 bei der Abschnürung von Vesikeln am Golgi-Apparat (Henley und McNiven, 1996; Maier *et al.*, 1996). Durch Fluoreszenzmikroskopie an kultivierten Leberzellen aus Ratte konnte gezeigt werden, daß das Fusionsprotein aus einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und Dynamin-2 mit Clathrin-umhüllten Vesikeln am Golgi-Komplex kolokalisiert. Außerdem inhibieren Antikörper gegen Dynamin-1 die Bildung von trans-Golgi-Vesikeln (Jones *et al.*, 1998). Diese Befunde wurden von einer anderen Gruppe jedoch nur zum Teil bestätigt (Altschuler *et al.*, 1998), die für Dynamin-2 lediglich eine Rolle bei der Vesikelabschnürung von der Plasmamembran, nicht aber vom Golgi-Apparat fanden. Neuere Daten weisen auf eine weitere mögliche Funktion Dynamins-2 hin. Eventuell ist Dynamin-2 Bestandteil eines Signaltransduktionswegs, das den Transkriptionsfaktor p53 aktiviert und die Apoptose einleitet (Fish *et al.*, 2000). Schon die schwache Überexpression von Dynamin-2 genügt, um in HeLa-Zellen Apoptose zu induzieren, wogegen die Expression von mutiertem Dynamin-2 oder starke Überexpression von Dynamin-1 keine Apoptose auslöst.

2.5.2 Vps1p

Von den drei Dynamin-Homologen in Hefe (s. unten) ist Vps1p dasjenige, daß den „echten“ Dynaminen bezüglich Sequenz und Funktion am ähnlichsten ist. Interessanterweise wurde das Gen mit zwei unterschiedlichen funktionellen Ansätzen isoliert. In einem Ansatz wurde Vps1p bei der Suche nach Hefemutanten mit Defekten in der Zielsteuerung von Proteinen identifiziert (Rothman und Stevens, 1986). Außerdem wurde im Zusammenhang mit Sporulationsdefizienten Hefezelllinien ein Gen mit der Bezeichnung SPO15 beschrieben, das mit VPS1 identisch ist (Yeh *et al.*, 1991). Der SPO15-Phänotyp konnte mit einer Blockade der Spindelpoltrennung während der meiotischen Zellteilung in *S. cerevisiae* erklärt werden. Dagegen handelt es sich bei Vps1p um eines von mehr als 50 Proteinen, die an der Zielsteuerung und am Transport von vakuolären Hydrolasen beteiligt sind. Die Geninaktivierung von Vps1p führt dazu, daß das vakuoläre Markerprotein Carboxypeptidase Y nicht in die Vakuole der Zelle gelangt, sondern ausgeschieden wird (Rothman *et al.*, 1990). Immunhistochemische Experimente lieferten Hinweise auf eine mögliche Assoziation von Vps1p mit dem Golgi-Apparat in *S. cerevisiae*. Durch Komplementierungsexperimente konnte außerdem gezeigt werden, daß Vps1p notwendig ist, damit bestimmte Golgi-ansässige Proteine nicht fälschlicherweise in andere Kompartimente

der Zelle gelangen (Wilsbach und Payne, 1993). Es ist also denkbar, daß Vps1p bei der Entstehung von Vesikeln am Golgi-Komplex eine vergleichbare Funktion zukommt wie Dynamin-1 bei der Endocytose.

2.5.3 *D. discoideum* Dynamin A

Ein weiteres Dynamin-ähnliches Protein, Dynamin A, wurde in der einzelligen Amöbe *Dictyostelium discoideum* identifiziert (Wienke *et al.*, 1999). Die Inaktivierung des *dymA*-Gens führt zu vielfältigen phänotypischen Veränderungen. Viele der Nullzellen sind aufgrund eines Cytokinesedefekts deutlich größer als die Wildtypzellen und besitzen mehrere Zellkerne. Anstelle diskreter ovalrunder Mitochondrien sind die Mitochondrien in den Nullzellen zu fadenförmigen Strukturen zusammengelagert, deren Atmungsaktivität zudem um die Hälfte reduziert ist. Ferner ist die Aufnahme von Flüssigphasenmarker deutlich verringert. Die subzelluläre Lokalisation von Dynamin A-GFP ergab eine Assoziation mit cytoplasmatischen, über die gesamte Zelle verteilten Vesikeln. Außerdem kolokalisiert Dynamin A mit Vakuolin, einem Marker für das postlysosomale Kompartiment in *D. discoideum* (Rauchenberger *et al.*, 1997). Möglicherweise spielt Dynamin A eine Rolle beim Membrantransport entlang des endo-lysosomalen Transportwegs. Tatsächlich ist aber noch unklar, ob Dynamin A primär am Vesikeltransport beteiligt ist, ähnlich wie Vps1p, oder ob es wie Dnm1p/Drp1 an der Erhaltung der Mitochondrienmorphologie und -verteilung involviert ist.

2.5.4 Dnm1p/Drp1

1995 wurde ein weiteres Dynamin-Homologes, Dnm1p, aus der Bäckerhefe isoliert (Gammie *et al.*, 1995). Zunächst dachte man, daß Dnm1p an der Rezeptor-vermittelten Endocytose beteiligt sei. Die Analyse der Halbwertszeit für den Ste3p-Pheromonrezeptor ergab, daß Dnm1p eine Funktion nach der Aufnahme des Rezeptors in die Zelle, aber vor der Fusion des Endosoms mit der Vakuole ausübt (Gammie *et al.*, 1995). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, daß Dnm1p primär an der strukturellen Organisation der Mitochondrien beteiligt ist (Shaw *et al.*, 1997). In Dnm1p-Mutanten waren die Mitochondrien nicht mehr gleichmäßig an der Zellperipherie verteilt, sondern auf einer Seite der Zelle kollabiert. Trotz der stark veränderten Morphologie war die Funktion der Mitochondrien nicht gestört ebenso wenig wie die Weitergabe an Tochterzellen. Mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, daß Dnm1p an der Außenseite der Mitochondrien lokalisiert ist und zwar hauptsächlich an den Enden und verengten Regionen (Bleazard *et al.*, 1999). Dies sind möglicherweise Membranbereiche, die gerade abgeschnürt wurden bzw. abgeschnürt werden sollen. In Hefezellen ohne funktionelles Dnm1p sind die Mitochondrien kollabiert und netzartig miteinander verbunden. In Zellen, die gleichzeitig nicht funktionelles Fzo1p produzieren, sehen die Mitochondrien wiederum normal aus (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999). Die alleinige Expression von mutiertem Fzo1p bewirkt dagegen die Fragmentierung der Mitochondrien. Fzo1p ist eine GTPase, die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und an der Fusionierung von Mitochondrien in Hefe beteiligt ist. Daraus läßt sich

schließen, daß Dnm1p direkt an der Abschnürung von Mitochondrienmembranen involviert ist, und daß Dnm1p und Fzo1p Antagonisten sind.

Mittlerweile wurden auch in Säugetieren Dynamin-ähnliche Proteine identifiziert, die mit Mitochondrien assoziiert sind und wahrscheinlich Homologe zu Dnm1p darstellen. Drp1 aus humanen Zelllinien (Imoto *et al.*, 1998), das auch DVLP1 (Shin *et al.*, 1997) und Dymple (Kamimoto *et al.*, 1998) genannt wurde, und DLP1 aus Ratte (Yoon *et al.*, 1998) sind zu über 98 % identisch. Übereinstimmend wurde für Drp1, bzw. DLP1 eine schwache cytoplasmatische und intensive perinukleäre Färbung beobachtet. Da die Färbung aber nicht mit der von Golgi-Markern überlappte, verwarf man die These, daß es sich um das entsprechende Vps1p-Homologe in Säugetieren handelte. Erst die Expression von Drp1 mit Mutationen in der GTPase-Domäne ergab, daß Drp1 ebenfalls an der Erhaltung der Mitochondrienmorphologie und -verteilung involviert sein könnte (Smirnova *et al.*, 1998). In den entsprechenden Mutanten waren die Mitochondrien zu großen Aggregaten in der Nähe des Zellkerns zusammengeballt, während sie sich normalerweise bis zur Zellperipherie erstrecken. Die von Shin, Kamimoto und Imoto beobachtete perinukleäre Färbung muß nicht durch Kolokalisation von Drp1 mit dem Golgi-Apparat oder dem ER bedingt sein, sondern kann auch mit einer Lokalisation an den Mitochondrien erklärt werden, da sich Mitochondrien oftmals in unmittelbarer Nähe des ERs befinden (Cascarano *et al.*, 1995).

Ein weiteres Drp1p-Homologes wurde kürzlich in dem Fadenwurm *C. elegans* entdeckt (Labrousse *et al.*, 1999). *C. elegans* DRP-1 ist zu 62 % identisch mit humanem Drp1. Mutiertes DRP-1 bewirkt die Zusammenballung der ansonsten langgestreckten Mitochondrienmatrix zu großen runden Strukturen, die untereinander durch Membranstränge verbunden sind. Diese Verbindungsstränge werden von der äußeren Mitochondrienmembran gebildet. Es scheint, daß DRP-1 für Abschnürungsprozesse an der äußeren, nicht aber an der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist. Anhand von Videomikroskopie an lebenden Zellen wurde außerdem gezeigt, daß ein DRP-1-GFP-Fusionsprotein punktförmig an den Bereichen der Mitochondrien lokalisiert ist, die gerade abgeschnürt werden oder kurz vorher abgeschnürt wurden. Dieses Ergebnis bekräftigt die Vermutung, daß Dynamine der Dnm1/Drp1-Gruppe an der Abspaltung von Mitochondrienmembranen beteiligt sind.

2.5.5 Mgm-Proteine

Mgm1p ist phylogenetisch am weitesten von den Säugetierdynaminen und den Dynamin-ähnlichen Proteinen entfernt. Das Gen wurde bei der Analyse von Mutanten ohne mitochondriale DNA in Bäckerhefe identifiziert (Jones und Fangman, 1992). Mutationen in dem Gen bzw. dessen Deletion führt zum Verlust der mitochondrialen DNA. Außerdem ist die Verteilung und Morphologie der Mitochondrien verändert (Guan *et al.*, 1993). Statt der verzweigten, tubulären Mitochondrienstrukturen, die über die gesamte Zelle verteilt sind, weisen die Hefemutanten aggregierte Mitochondrien auf, die auf einer Seite der Zelle konzentriert sind. Konditionelle Mutationen in Mgm1p haben gezeigt, daß die morphologischen Veränderungen dem Verlust der mitochondrialen DNA vorausgehen. Der DNA-Verlust ist daher vermutlich nur ein sekundärer Effekt. (Shepard und Yaffe, 1999). Wahrscheinlich spielt Mgm1p primär eine Rolle bei der Umorganisation der dynamischen

Mitochondrienstrukturen. Das Protein scheint peripher mit der inneren Mitochondrienmembran (dem Intermembranraum zugewandt) assoziiert zu sein und könnte daher an der Formgebung der inneren Membran beteiligt sein (Wong *et al.*, 2000).

1998 wurde ein Protein aus der Spaltheefe identifiziert, das zu Mgm1p eine Sequenzhomologie von 58 % aufweist (Pelloquin *et al.*, 1998). Wie Mgm1p besitzt es eine aminoterminal Extension von ca. 200 Aminosäuren. Für Msp1p wurde gezeigt, daß es sich bei der Extension um ein mitochondriales Signalpeptid handelt (Pelloquin *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu Mgm1p ist Msp1p aber in der inneren, der Matrix zugewandten Mitochondrienmembran lokalisiert. Das Fehlen des Proteins führt zu verringerter Atmungsaktivität und Wachstumsinhibition der Hefezellen. Nach wenigen Sporulationszyklen sterben die Deletionsmutanten aufgrund fehlender mitochondrialer DNA. (Pelloquin *et al.*, 1998). Möglicherweise verankert Msp1p die mitochondriale DNA an der inneren Mitochondrienmembran, um die Vererbung der DNA zusammen mit dem Organell zu gewährleisten.

2.5.6 Mx-Proteine

Obwohl die Mx-Proteine die am längsten bekannte Gruppe innerhalb der Dynaminfamilie bilden, ist deren zelluläre Funktion nur wenig verstanden. Ursprünglich wurde das erste Mx-Protein in Labormäusen identifiziert, die gegen Influenza-Viren immun waren (Horisberger *et al.*, 1983). Es zeigte sich, daß Mx1 ein Mitglied einer Familie von Interferon-induzierbaren GTP-bindenden Proteinen ist, die auch in Ratten, Menschen, Schweinen und Fischen, nicht aber in wirbellosen Tieren vorkommen (Meier *et al.*, 1990; Aebi *et al.*, 1989; Muller *et al.*, 1992). Neben der stark konservierten aminoterminalen GTP-Bindungsdomäne, die etwa ein Drittel des jeweiligen Gesamtproteins ausmacht, verfügen die Mx-Proteine über eine einheitliche Länge von 630-670 Aminosäuren. In anderen Bereichen als der GTP-Bindungsdomäne weisen sie jedoch nur geringe Sequenzhomologien auf. Dies könnte bedeuten, daß der carboxyterminale Teil der Proteine für die Bestimmung der zellulären Funktion oder die Wechselwirkung mit verschiedenen Effektoren wichtig ist. Die meisten Wirbeltiere haben zwei oder drei Mx-Protein-Isoformen mit unterschiedlichen antiviralen Aktivitäten und intrazellulären Lokalisationen. Mx1 aus Maus und Ratte sind im Zellkern lokalisiert (Meier *et al.*, 1988) und scheinen dort die Bildung der viralen Primärtranskripte zu inhibieren (Pavlovic *et al.*, 1992). Die meisten anderen Tierarten besitzen ausschließlich oder zusätzlich cytosolische Formen der Mx-Proteine (Aebi *et al.*, 1989; Horisberger und Gunst, 1991). Cytoplasmatische Mx-Proteine wie das humane MxA scheinen, je nach Virus, entweder den Eintritt des Nukleocapsids in den Kern und somit die Transkription des Virusgenoms zu verhindern (Kochs und Haller, 1999) oder greifen in einem der Transkription folgenden Schritt ein, z.B. beim Transport der viralen mRNA innerhalb des Cytoplasmas oder bei der Synthese von Virusproteinen (Pavlovic *et al.*, 1992). Der molekulare Mechanismus, mit dem Mx-Proteine der Virusvermehrung entgegenwirken, ist noch ungeklärt. Möglicherweise verhindern sie die Virusinfektion durch Umwickeln bestimmter viraler Strukturen, da Mx-Proteine *in vitro* in der Lage sind, zu helikalen Strukturen zu

oligomerisieren (Nakayama *et al.*, 1993). Offen ist auch, welche Rolle die mit den Mx-Proteinen assoziierte GTPase-Aktivität bei der Virusabwehr spielt (Flohr *et al.*, 1999).

2.5.7 **Dynamamin-ähnliche Proteine in Pflanzen**

Dynamamin-ähnliche Proteine wurden nicht nur in tierischen Organismen, sondern auch in Pflanzen gefunden. Hierzu gehört u.a. das Phragmoplastin aus der Sojabohne (Gu und Verma, 1996). Der Name des Proteins leitet sich von seiner zellulären Lokalisation an der Zellplatte der sich teilenden Pflanzenzelle ab: Die pflanzliche Cytokinese erfolgt vom Inneren der Zelle heraus, indem in der Ebene zwischen den beiden Tochterzellkernen eine neue Zellwand, die Zellplatte, aufgebaut wird. An jeder Seite der Teilungsebene befindet sich ein Doppelring kurzer Mikrotubuli mit dazu parallel laufenden Aktinfilamenten. Diese scheibchenförmige Struktur, die sich während der Telophase bildet, wird als Phragmoplast bezeichnet. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß Phragmoplastin während der Zellteilung über die gesamte Breite des Phragmoplastenzentrums lokalisiert ist. Hingegen zeigt das Protein während der Interphase eine perinukleäre, cytosolische Verteilung. Möglicherweise ist Phragmoplastin mit den vom Golgi-Apparat stammenden Vesikeln assoziiert, die die Mehrzahl der Komponenten zu der wachsenden Zellplatte transportieren. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an gereinigtem Phragmoplastin ergaben, daß sich das Protein unter Niedrigsalzbedingungen zu helikalen Strukturen zusammenlagert (Zhang *et al.*, 2000). Eventuell wickelt sich Phragmoplastin um die Vesikel und verformt diese zu hantelförmigen Strukturen wie sie an der sich bildenden Zellplatte beobachtet werden.

Das Dynamamin-ähnliche Protein ADL1 aus *Arabidopsis thaliana* ist dagegen mit den Thylakoid-Membranen der pflanzlichen Chloroplasten assoziiert. Es scheint an der Biogenese der Thylakoid-Membranen beteiligt zu sein, da die Anzahl der Chloroplasten in transgenen Pflanzen, die verschiedene Mutanten von ADL1 enthalten, stark reduziert ist (Park *et al.*, 1998). *Arabidopsis* ADL2 ist ebenfalls in den Chloroplasten lokalisiert (Kang *et al.*, 1998). Interessanterweise weist es eine höhere Sequenzhomologie zu Dnm1p und Vps1p als zu ADL1 und Phragmoplastin auf. Die Funktion von ADL2 ist noch unbekannt.

2.6 ***Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus in der Zellbiologie**

Der Mikroorganismus *Dictyostelium discoideum* ist ein niederer Eukaryont, der als einzellige Amöbe in Waldböden lebt und sich durch Phagozytose von Bakterien und Hefen ernährt (Raper, 1935). *Dictyostelium*-Amöben haben im Gegensatz zu Hefen keine Zellwand und können sich selbständig fortbewegen. Sie besitzen außerdem chemotaktische Aktivität. Die taxonomische Einordnung von *Dictyostelium discoideum*, der in der Literatur oftmals als zellulärer Schleimpilz bezeichnet wurde, ist umstritten. Einerseits belegt der Vergleich von Proteinsequenzdaten eine Verwandtschaft mit Tieren und Pilzen, andererseits zeigen manche Eigenschaften von *D. discoideum*, wie die Produktion von Zellulose und die Nutzung von

Ethylen als Hormon, Ähnlichkeiten mit Pflanzen. Im allgemeinen wird *D. discoideum* der Klasse der Mycetozoa zugeordnet (Olive, 1975).

Bei *D. discoideum* tritt zum ersten Mal in der Evolution ein primitive Form der Zelldifferenzierung auf. Diese weist Parallelen zu Entwicklungsvorgängen in tierischen Organsimen auf. Die Differenzierung von *D. discoideum* wird durch Nahrungsmangel ausgelöst und führt durch Aggregation der Amöben zur Bildung von multizellulären Strukturen. Im ersten Stadium des Entwicklungszyklus sekretieren die Zellen pulsartig zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), das als chemotaktisches Signal wirkt (Gerisch und Wick, 1975). Die Zellen bewegen sich entlang des cAMP-Gradienten und bilden ein Aggregat, das aus etwa 10^5 Zellen besteht. Die Adhäsion der Zellen wird durch spezifische Zell-Adhäsionsmoleküle vermittelt, die während der Aggregation exprimiert werden. Die vorderen $2 \cdot 10^4$ Zellen bilden hierbei die Prä-Stielzellen, die hinteren restlichen Zellen die Prä-Sporenzellen (Firtel, 1995). Je nach Umweltbedingungen (Feuchtigkeit, Dunkelheit) bildet das Aggregat einen wurmförmigen Zellverband mit einer Länge von 1 bis 2 mm, das sogenannte Pseudoplasmodium. Dieses ist lichtempfindlich und bewegt sich phototaktisch zu einer trockenen, hellen Umgebung, wo der nächste Schritt, die Kulmination, eingeleitet wird. Unter günstigen Bedingungen kann die Kulmination auch sofort eingeleitet werden. Aus dem Zellverband wird ein Fruchtkörper mit Basalplatte, Stiel und Sporenkopf gebildet. Die Zellen des Stiels und der Basalplatte sind stark vakuolisiert, bilden eine Zellwand und sterben im fertigen Sporenträger ab. Die Sporenzellen bilden ebenfalls eine Zellwand, verlieren Wasser und werden metabolisch inaktiv. Der Differenzierungsprozeß von *D. discoideum* ist 24 bis 30 Stunden nach Beginn der Aggregation beendet. Bei Berührung des Sporenkopfes werden die Sporen freigesetzt und beginnen unter geeigneten Bedingungen mit der Keimung. Dadurch bilden sich wieder einzelne Amöben, und der Entwicklungszyklus von *D. discoideum* ist abgeschlossen.

D. discoideum verfügt als Modellorganismus über praktische Vorteile gegenüber anderen, komplizierteren Zellsystemen. Das Genom von *D. discoideum* ist mit $35 \cdot 10^6$ Basenpaaren nur etwa zehnmal größer als das von Bakterien und liegt haploid vor. Dies erleichtert die Isolierung von Mutanten im Vergleich zu anderen gentechnisch manipulierbaren, eukaryontischen Zellsystemen. Die Möglichkeiten zur molekularbiologischen Manipulation von *D. discoideum* wurden zudem durch die Etablierung eines Transformationssystems erweitert (Nellen *et al.*, 1984). Die gezielte Unterbrechung und Deletion von Genen durch homologe Rekombination kann in *D. discoideum* mit relativ hoher Effizienz durchgeführt werden (De Lozanne und Spudich, 1987; Manstein *et al.*, 1989). Durch die Einführung von mutierten Genen, gegebenenfalls unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors, können auch solche Genprodukte analysiert werden, deren Geninaktivierung für die Zelle letal wäre. Mit Hilfe der genannten Techniken können somit Gene gezielt inaktiviert oder Gene überexprimiert werden. *D. discoideum* hat sich insbesondere bei der Überproduktion komplexer Proteine bewährt, wie zum Beispiel bei der Expression und Isolierung von Myosin-Kopffragmenten (Manstein *et al.*, 1995).

Ein weiterer Vorteil von *D. discoideum* ist die einfache Handhabung im Labor. Der Organismus ist nicht pathogen und läßt sich seit der Einführung von axenischen Mutationen

nicht nur auf Bakterienrasen, sondern auch in flüssigen Medien kultivieren (Sussman und Sussman, 1967; Watts und Ashworth, 1970).

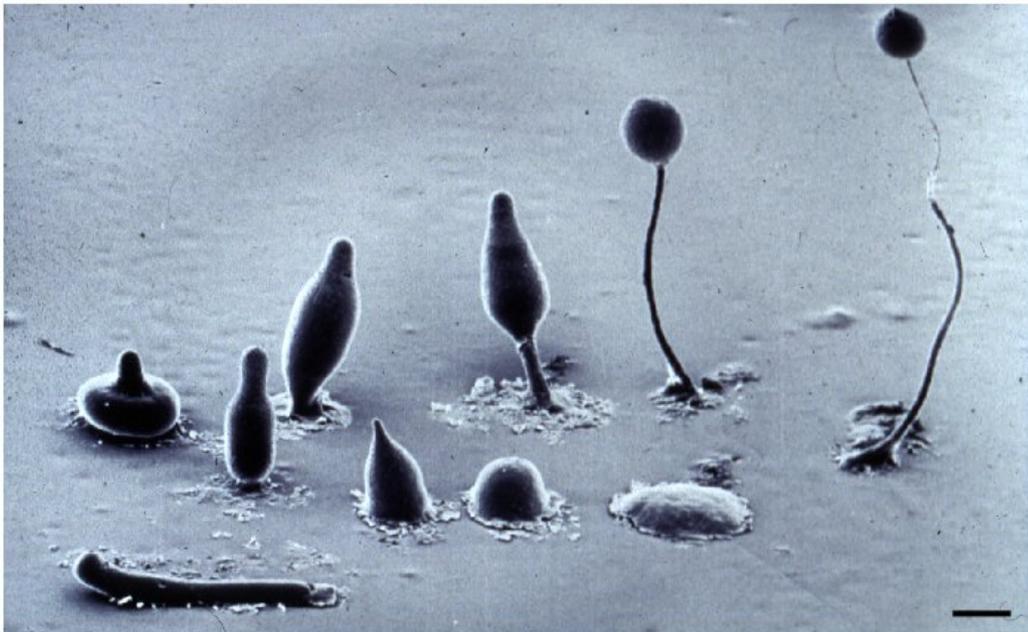


Abb. 2-9: Entwicklungszyklus von *D. discoideum*

Bei Nahrungsmangel senden vereinzelte *D. discoideum*-Zellen pulsartig zyklisches AMP aus, worauf benachbarte Zellen chemotaktisch reagieren. Die Zellen beginnen zu aggregieren und einen Zellverband aus ca. 10^5 Zellen zu bilden. Der Zellverband reagiert auf Licht und Temperatur. Abhängig von äußeren Bedingungen kann er sich als Pseudoplasmodium weiterbewegen (im Vordergrund des Bildes), oder es wird direkt die Kulmination eingeleitet. Aus dem vorderen Bereich des Zellverbands bilden sich die Stielzellen, aus dem hinteren die Sporenzellen, die von dem wachsenden Stiel nach oben getragen werden. Der reife Sporenkopf setzt bei Berührung die Sporen frei. Unter geeigneten Nahrungsbedingungen schlüpfen die Amöben aus, und der Zyklus kann von neuem beginnen. Die Skala entspricht 0,5 mm. (Elektronenmikroskopische Aufnahme von L. Blanton, Texas Tech. Univ.)

D. discoideum wurde in den letzten Jahrzehnten zu Untersuchungen auf diversen zellbiologischen Gebieten herangezogen. So eignet sich dieser Organismus aufgrund seines dynamischen Cytoskeletts zum Studium der Zellmotilität (Schleicher *et al.*, 1995). Besonders intensiv wurden bisher verschiedene Myosin-Isoformen, aber auch einige andere Aktin bindende Proteine aus *D. discoideum* untersucht (Noegel *et al.*, 2000). Während der Aggregation und der Differenzierung von *D. discoideum* spielen mehrere konservierte Signaltransduktionsvorgänge eine zentrale Rolle. Deswegen bietet sich *D. discoideum* als Modellorganismus für die Analyse der Übertragung von extrazellulären Signalen auf intrazelluläre Prozesse und die entwicklungsbedingte Genexpression an (Van Haastert, 1995). Neben diesen etablierten Schwerpunkten der *Dictyostelium*-Forschung werden zunehmend auch andere Fragestellungen untersucht, wie z.B. die Aufnahme von Makromolekülen und Partikeln in die Zelle und der Membrantransport im Cytoplasma.

Die Einführung von axenischen Zelllinien (AX1, AX2 und AX3) der ansonsten phagozytierenden *Dictyostelium*-Amöben ermöglicht somit das Studium pinocytotischer und phagozytotischer Prozesse an demselben Organismus. Außerdem ähneln Endocytose und Membrantransport in *D. discoideum* in vielen Aspekten den Vorgängen in tierischen Organismen. So weist *D. discoideum* eine ähnlich hohe Endocytose-Kapazität auf wie die Makrophagen der Säugetiere. Ferner konnten auch in *D. discoideum* Clathrin-umhüllte Strukturen identifiziert werden (Ohalloran und Anderson, 1992; Ruscetti *et al.*, 1994). Daneben sind viele Komponenten der Zielsteuerung und des Transports lysosomaler Enzyme auch in *D. discoideum* vorhanden (Cardelli *et al.*, 1989; Freeze *et al.*, 1989).

2.7 Zellbiologischer Hintergrund

Die Funktionen der meisten Dynamine und Dynamine-ähnlichen Proteine werden mit Membrantransportprozessen und der Erhaltung der Mitochondrienmorphologie in Verbindung gebracht. Daher soll an dieser Stelle auf den Prozeß der Endocytose und der Phagozytose sowie auf einige die Mitochondrien betreffende Vorgänge eingegangen werden.

2.7.1 Endocytose und Phagozytose

Bei der Endocytose werden Flüssigkeiten und darin gelöste Stoffe durch Einstülpung der Plasmamembran ins Zellinnere aufgenommen. Man unterscheidet prinzipiell zwischen zwei verschiedenen Formen der Endocytose. Bei der Pinocytose werden unspezifisch kleine Flüssigkeitsmengen aus der Umgebung aufgenommen. Die Rezeptor-vermittelte Endocytose ist dagegen ein spezifischer Vorgang, bei dem Oberflächenrezeptoren einen extrazellulären Liganden erkennen und binden. Auf diese Weise wird ein bestimmter Ligand auf der Membranoberfläche konzentriert bevor er ins Zellinnere gelangt. Die Endocytose ist neben der Aufnahme von Nährstoffen für die Biosynthese von Rezeptoren, die Präsentation von Antigenen und die Rückgewinnung von Plasmamembran-Komponenten notwendig.

In tierischen Zellen ist die Clathrin-vermittelte Endocytose die bislang am besten charakterisierte Form der Internalisierung. Dabei werden mit Clathrin umhüllte Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt, die anschließend ihre Hülle verlieren und mit sogenannten „frühen“ endosomalen Kompartimenten fusionieren. In diesen Endosomen werden internalisierte Plasmamembran-Komponenten und Makromoleküle sortiert und entweder zur Zelloberfläche zurücktransportiert oder in nachfolgenden endosomalen und lysosomalen Kompartimenten weiterverarbeitet. Daneben gibt es aber auch von Clathrin unabhängige und oftmals zelltypische Formen der Endocytose. So werden in Endothelzellen charakteristische flaschenförmige Plasmamembran-Einstülpungen beobachtet, die als Caveolae bezeichnet werden und an der Internalisierung bestimmter Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerter Proteine beteiligt sind (Henley *et al.*, 1998). Auch in anderen Zelltypen werden endocytotische Kompartimente beschrieben, die keine Clathrinhülle aufweisen (Raposo *et al.*,

1989; Oliver und Hand, 1978; Hansen *et al.*, 1991). Für Dynamin-1 konnte sowohl eine Beteiligung bei der Clathrin-vermittelten Endocytose als auch bei der Abschnürung von Caveolae nachgewiesen werden.

Feste Partikel werden über einen anderen Mechanismus, die Phagozytose aufgenommen. Die Phagozytose ist im Gegensatz zur Endocytose ein Aktin-abhängiger Prozeß. Hier wird die Plasmamembran durch Aktin-Polymerisation ausgestülpt und die so gebildeten Pseudopodien umschließen das anhaftende Partikel. Durch Verschmelzung der Pseudopodien-Enden bildet sich ein Phagosom. Die internalisierten Partikel weisen eine heterogene Größe von bis zu 5 µm auf (Swanson, 1989), während die Clathrin-umhüllten Vesikel einen einheitlichen Durchmesser von 85 bis 110 nm besitzen (Bretscher und Thomson, 1983). Phagozytose kann nach zwei unterschiedlichen Mechanismen ablaufen (Swanson und Baer, 1995). Bei dem als *Zippering* bezeichneten Prozeß wird die Internalisierung durch die Bindung eines Partikels an bestimmte Rezeptoren ausgelöst. Der Phagocyt beginnt Pseudopodien entlang des Partikels auszustrecken bis dieses eng umschlossen ist. Voraussetzung für die vollständige Internalisierung ist, daß die Oberflächenrezeptoren des Phagocyten sequentiell in Wechselwirkung mit der restlichen Partikeloberfläche treten. Ist dies nicht der Fall wird der Vorgang abgebrochen. Das Umschließen eines Partikels ist mit dem Schließen eines Reißverschlusses (engl. *zipper*) vergleichbar. Der zweite Mechanismus ist weniger spezifisch. Ungerichtete Pseudopodien falten sich in Form von Membranfältchen (*ruffles*) auf die Zelloberfläche zurück und umschließen dabei großräumig Partikel und anderes extrazelluläres Material. Beide Formen der Phagozytose, das *Zippering* wie das *Ruffling*, werden in *D. discoideum* beobachtet (Maniak *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 1997). Wird beim *Ruffling* nur Flüssigkeit aufgenommen und keine festen Partikel, so spricht man von Makropinocytose. Bei der Makropinocytose wird also konstitutiv Flüssigkeit internalisiert, indem sich die Plasmamembran durch Aktin-Polymerisation ausstülpt. Makropinocytose wird besonders häufig in Makrophagen bei der Aufnahme von Antigenen beobachtet (Sallusto *et al.*, 1995). Auch axenisch wachsende *D. discoideum*-Zellen nehmen Nährstoffe durch Makropinocytose auf. Sie stellt sogar den wichtigsten Aufnahmeweg dar (Hacker *et al.*, 1997).

Möglicherweise sind Dynamine auch an phagozytotischen Prozessen beteiligt. So könnte Dynamin-2 eine Rolle bei der Phagozytose in Makrophagen spielen (Gold *et al.*, 1999). Dynamin-2 reichert sich in Fraktionen von frühen Phagosomen an. Außerdem ist die Partikelaufnahme bei Zellen, die eine dominant-negativ mutierte Form von des Proteins produzieren, stark beeinträchtigt. Allerdings ist die Internalisierung schon in einem Stadium blockiert, bei dem sich Pseudopodien um das Partikel zu erstrecken beginnen, und nicht erst in einem Stadium zwischen vollständiger Internalisierung und Abschnürung des Phagosoms von der Membran.

2.7.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind der Ort der oxidativen Phosphorylierung (Atmung). Sie erzeugen ATP, das für die energieverbrauchenden Prozesse vom Metabolismus bis zur Motilität für die meisten eukaryontischen Zellen benötigt wird.

Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom, das aber nicht für die Kodierung aller mitochondrialer Proteine ausreicht. Die Mehrheit der mitochondrialen Proteine (>95 %) ist kernkodiert und muß nach ihrer Synthese an cytoplasmatischen Ribosomen in das Organell transportiert werden. Sie werden als Prä-Proteine mit einer Signalsequenz am Aminoterminus synthetisiert, die für den Transport des Proteins in die Mitochondrien sorgt. Die Signalsequenz ist im allgemeinen zwischen 20 und 80 Aminosäuren lang, reich an basischen, hydrophoben und hydroxylierten Aminosäuren und enthält kaum oder keine sauren Seitenketten (von Heijne, 1986). Sie besitzt die Fähigkeit eine amphiphile α -Helix auszubilden. Mit deren hydrophoben Seite stellt sie vermutlich über hydrophobe Wechselwirkungen den ersten Kontakt zu einem Rezeptor (Tom20) her (Abb. 2-10).

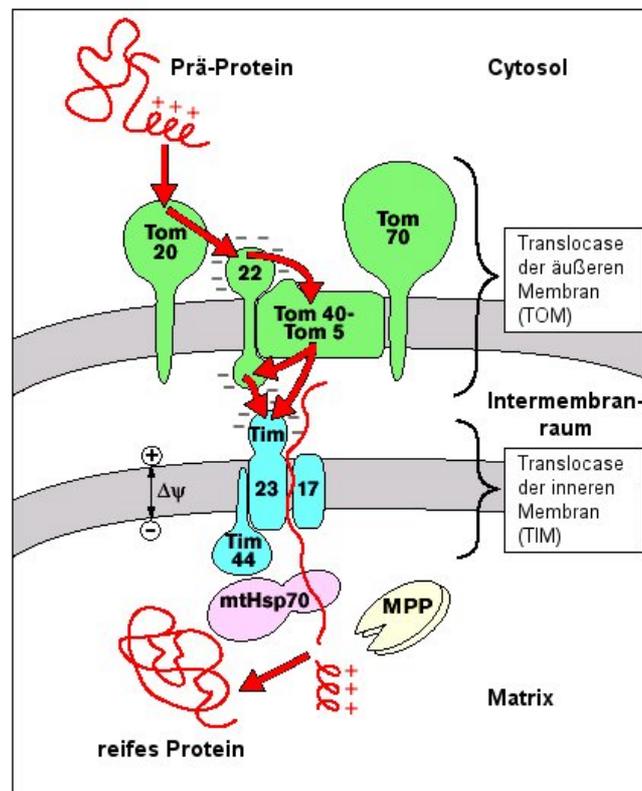


Abb. 2-10: Transport von Proteinen mit Präsequenz in Mitochondrien (modifiziert nach Pfanner, 2000).

Die aminoterminalen Präsequenz (positiv geladen) des Prä-Proteins interagiert nacheinander mit den Rezeptoren Tom20 und Tom22, dem Kanal-bildenden Protein Tom40 und den Intermembranraum-Domänen von Tom22 und Tim23. Das Membranpotential $\Delta\Psi$ entlang der inneren Membran und das Hitzeschockprotein mtHsp70 bewirken den Transport des Proteins in die Matrix. Hier wird die Präsequenz durch eine mitochondriale Signalpeptidase MPP (*mitochondrial processing peptidase*) abgespalten. Abkürzungen: Tom: Translocase der äußeren Membran (*translocase of the outer membrane*), Tim: Translocase der inneren Membran (*translocase of the inner membrane*)

Tom20 ist in der äußeren Mitochondrienmembran verankert und Bestandteil eines größeren Proteinkomplexes. Der positiv geladene Teil der α -Helix könnte über ionische Wechselwirkung den Kontakt zu einem weiteren Rezeptor (Tom22) herstellen und somit die

Spezifität der Bindung des Signalpeptids an die Mitochondrien erhöhen oder für den Eintritt in den negativ geladenen Matrixraum notwendig sein. In der Matrix wird die Signalsequenz durch eine mitochondriale Signalpeptidase abgespalten. Für Proteine aus dem Cytoplasma gibt es vier verschiedene Bestimmungsorte in den Mitochondrien: die Matrix, die innere Membran, den Intermembranraum und die äußere Membran. Bei manchen Proteinen erfolgt die Translokation in die innere Membran und in den Intermembranraum über einen Umweg über die Matrix.

Mitochondrien sind normalerweise über die gesamte Zelle verteilt, können aber auch an Orten hohen Energiebedarfs, wie z.B. entlang von Myofibrillen konzentriert sein. An der Verteilung und Bewegung von Mitochondrien sind Bestandteile des Cytoskeletts beteiligt, vor allem Mikrotubuli. Zahlreiche Studien an unterschiedlichen Organismen zeigen, daß die Verteilung von Mitochondrien mit der von Mikrotubuli korreliert (Heggeness *et al.*, 1978), (Summerhayes *et al.*, 1983). Daneben wird auch die Beteiligung von Intermediärfilamenten und von Aktin am Mitochondrientransport diskutiert (Mose-Larsen *et al.*, 1982; Simon *et al.*, 1997). Möglicherweise dienen Mikrotubuli dem schnellen Transport über lange Strecken, während andere Mechanismen für die exakte Positionierung dieser Organellen zuständig sind. Außerdem scheint der Transportmechanismus auch von Zelltyp zu Zelltyp zu variieren. So wurde für die Mitochondrien in Zellen der Spaltheife (*S. pombe*) eine Assoziation mit Mikrotubuli gefunden (Yaffe *et al.*, 1996) während sie in der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) in erster Linie mit Aktin assoziiert sind (Simon *et al.*, 1995).

Die Verankerung an das Cytoskelett beeinflusst die Morphologie der Mitochondrien. Bei Hefezellen, die nicht funktionelles Mmm1p produzieren, ist das normalerweise retikuläre mitochondriale System zu großen runden Organellen kollabiert. Als Folge werden die aberranten Mitochondrien bei der Knospung nicht an Tochterzellen weitergegeben, da sie vermutlich zu groß sind. Mmm1p ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Wahrscheinlich verankert Mmm1p die äußere Mitochondrienmembran mit dem Cytoskelett und ist so an der Erhaltung der Mitochondrienmorphologie beteiligt (Burgess *et al.*, 1994). Neben der Verankerung spielen aber noch andere Faktoren bei der Formgebung von Mitochondrien eine Rolle. Im Gegensatz zur lange verbreiteten Ansicht, daß Mitochondrien bakterienähnliche, steife Strukturen sind, verdeutlichen videomikroskopische Aufnahmen von lebenden Zellen, daß Mitochondrien ausgesprochen bewegliche und flexible Organellen sind, die sogar miteinander fusionieren und sich trennen. Sehr wahrscheinlich sind Mitglieder der Dynaminfamilie an diesen Prozessen beteiligt (s. Kap. 2-5).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Standardlaborchemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe) und Amersham (Braunschweig) bezogen. Medienbestandteile für die Zellkultur stammten von der Firma Gibco/BRL (Eggenstein).

Acrylamid (Protogel)	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka, Neu-Ulm
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Biomol, Ilvesheim
Bromphenolblau	Fluka, Neu-Ulm
Chloroform/Isoamylalkohol-Fertiglösung	Appligene, Frankreich
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Böhringer, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Böhringer, Mannheim
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Biomol, Ilvesheim
Glycin	Biomol, Ilvesheim
Harnstoff	Fluka, Neu-Ulm
N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinöthansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Imidazol	BDH Lab. Supplies, GB
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Maltose	Fluka, Neu-Ulm
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Fluka, Neu-Ulm
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumiodid	Roth, Karlsruhe
Natrium-N-laurylsarcosin	Serva, Heidelberg
Phenol-Fertiglösung	Appligene, Frankreich

Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]-dinatriumsalz (PIPES)	Fluka, Neu-Ulm
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tetranitrobluetetrazoliumchlorid (TNBT)	Sigma, Deisenhofen
tri-Natriumcitrat	Fluka, Neu-Ulm
Triton X-100	Fluka, Neu-Ulm

3.1.2 Allgemeine Lösungen

TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM	EDTA (pH 8,0)

TBS

20 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
137 mM	NaCl

TAE-Puffer

40 mM	Tris-Base
20 mM	CH ₃ COOH
2 mM	EDTA

TBST

20 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
137 mM	NaCl
0,05 %	Tween-20

20x SSC

3 M	NaCl
0,3 M	tri-Natriumcitrat (pH 7,0)

PBS

80 mM	Na ₂ HPO ₄
20 mM	NaH ₂ PO ₄
100 mM	NaCl

Zum Ansetzen der Lösungen und Medien, sowie bei der Durchführung von Experimenten wurde Milli-Q-Wasser verwendet.

3.1.3 Laborgeräte

Elektrophoreseapparatur V15-17	Gibco BRL, Eggenstein
Elektroporator (Gene Pulser II)	Biorad, München
Entwickler für Röntgenfilme	DuPont, Neu-Isenburg
Exponierboxen	DuPont, Neu-Isenburg
Fluoreszenzspektrometer SLM 8000C	SLM Instruments, USA
Fixierer für Röntgenfilme	DuPont, Neu-Isenburg
<i>French-Press</i>	SLM Instruments, USA
Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT 2-E)	Finn-Aqua, Finnland
Geltrockner Drygel SR	Höfer, USA
Heizblöcke:	
DIGI-Block	Laboratory Devices, USA
Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg

Hybond N-Membranen	Amersham, Braunschweig
Hybridisierschrank	Hybaid, Heidelberg
Mikroskope:	
Leica DM/IRB Konfokalmikroskop	Leica, Heidelberg
Olympus B061	Olympus,
Mikroskop Zeiss Axiovert 135	Zeiss, Oberkochen
Quarzküvetten	Hellma, Frankfurt/Main
Röntgenfilme Hyperfilm MP	Amersham, Braunschweig
Schüttelgeräte:	
Gyrotory Shaker G10	New Brunswick Sci., USA
Gyrotory Shaker G2	New Brunswick Sci., USA
KS 500	Ika-Werke, Staufen
Speedvac (Speedvac Concentrator)	Bachofer, Reutlingen
Spektralphotometer Beckmann DU-40	Beckmann, Dreieich
Spannungsgerät Consort E455	Consort, GB
UV-Kammer (GS Gene Linker)	Biorad, München
UV-Transilluminator	Fröbel, Karlsruhe
Whatman 3 MM-Papier	Whatman, Großbritannien
Zentrifugen (Rotoren):	
Labofuge Sepatech	Heraeus, Osterode
Tischzentrifuge Universal K2S	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Modell 5415C	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifugen L5, L8 (SW28, Ti60)	Beckman, Dreieich
Ultrazentrifuge TL-100 (TLA 100, TLA 100.3)	Beckman, Dreieich
Avanti J25 (JA14, JA25)	Beckman, Dreieich
Modell J-6B	Beckman, Dreieich
Zentrifugen RC2-B und RC5 (GSA, HB4, SS34)	Sorvall, Neu-Isenburg
Biofuge 15R	Heraeus-Christ, Osterode

3.1.4 Enzyme und andere Proteine

Alkalische Phosphatase aus Garnelen	USB, Cleveland, USA
Klenow-Fragment	Böhringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Böhringer, Mannheim
	New England Biolabs,
	Schwalbach
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
RNase A	Böhringer, Mannheim
Proteinase K	Böhringer, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Böhringer, Mannheim
T4 DNA-Polymerase	Böhringer, Mannheim
T4 DNA-Polymerase	Böhringer, Mannheim
Pfu DNA-Polymerase	Böhringer, Mannheim

3.1.5 Größenstandards

DNA-Molekular-Gewichts-Marker:

1 kBp Leiter

Stratagene, Heidelberg

Protein-Molekular-Gewichts-Marker:

Benchtop

Gibco BRL, Eggenstein

Prestain

Gibco BRL, Eggenstein

3.1.6 Plasmide

pBluescriptSK(+) II (Stratagene, Heidelberg)

universeller Vektor zur Klonierung von DNA-Fragmenten von bis zu 10 kb.

pEYFP (Clontech, Heidelberg)

Vektor für die Expression von YFP-Fusionsproteinen

pBSR von Dr. J. Williams, University College, London (Sutoh, 1995)

Plasmid mit BlasticidinS-Resistenzkassette

pDXA-HC und pDXA-3H von Dr. D. Manstein, MPI für Med. Forschung, Heidelberg
Expressionsvektor für *D. discoideum* (Manstein *et al.*, 1995)

pREP von Dr. D. Manstein, MPI für Med. Forschung, Heidelberg

Vektor für das Ddp2 ORF-Produkt für die autonome Replikation von
Expressionsvektoren in *D. discoideum*-Zellen

3.1.7 Primer

HN-10: 5'-GTAGTTGCCAAGAGAAACGAATG-3'

HN-12: 5'-GCCATCTAAATCAGCTCTG-3'

BLA: 5'-GTAAGTCCTTGTGGTATGTGTAGG-3'

Dym-Sac I: 5'-TAATATGAGCTCTTGAGTTCAACAGCAATATTAAAGGCATCAGG-3'

Dym-Xho I: 5'-ATCACTCGAGATACAAATGAAGTAAATCAC-3'

Dym-01: 5'-TGGTCTAGATGATGCTCCAACTGTTTC-3'

Dym-02: 5'-GGAGAGCTCCTTTTACCAATTATAAATAAATTACAAGAGAATGC-3'

Dym-03: 5'-CACTCGAGCATACAAATGAAGTAAATCAC-3'

K170A: 5'-CACAATCATCTGGTGCTAGTTCAGTTTTAGAGAATTTGG-3'

S171N: 5'-CACAATCATCTGGTAAAAATTCAGTTTTAGAGAATTTGG-3'

Die Primer Dym-Sac I und Dym-02 enthalten jeweils eine künstliche *Sac* I Erkennungssequenz, die Primer Dym-Xho I und Dym-03 eine künstliche *Xho* I-Erkennungssequenz und der Primer Dym-01 eine künstliche *Xba* I-Erkennungssequenz. Die jeweiligen Erkennungssequenzen sind unterstrichen.

3.1.8 Kits

DIG-labelling-Kit	Böhringer, Mannheim
<i>Erase-a-Base</i> -System	Promega, USA
<i>Easy Pure</i> -DNA Purification Kit	Biozym, Hess. Oldendorf
ECL-Chemilumineszenz-Detektions-Kit	Amersham, Braunschweig
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Düsseldorf
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Düsseldorf

3.1.9 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, [F'proAB, *lacI*^q, Δ M15, Tn10(Tet^r)]

E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: Δ (*mcrA*)183, Δ (*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*)173, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *supE44*, *relA1* *lac* [F'proAB, *lacI*^q, Δ M15, Tn10 (Tet^r), *Amy*, *Cam*^r] ^a

E. coli XL2-Blue (Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, [F'proAB, *lacI*^q, Δ M15, Tn10(Tet^r), *Amy*, *Cam*^r] ^a

E. coli SOLR (Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: *e14*^(McrA⁻), Δ (*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*)171, *sbcC*, *recJ*, *uvrC*, *umuC*:Tn5 (Kan^r), *lac*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*, *lac*, *endA1*, λ^R , [F'proAB, *lacI*^q, Δ M15], *Su*⁻ (nonsuppressing)

E. coli SG 13009 [pRep4] Quiagen, Duesseldorf

E. coli RY 1090: von Dr. D. Manstein, MPI für Med. Forschung, Heidelberg

K. aerogenes: von Dr. D. Manstein, MPI für Med. Forschung, Heidelberg

3.1.10 Medien für die Kultivierung von *E. coli*LB-Medium

10 g/l	Trypton	mit 5 N NaOH auf pH 7,0 einstellen und 30 min bei 121 °C autoklavieren
5 g/l	Hefeextrakt	
10 g/l	NaCl	zur Selektion transformierter <i>E. coli</i> wurden 75 µg/ml Ampicillin zugefügt

LB-Agar

15 g/l	Agar in LB-Medium
--------	-------------------

SOB-Medium

20 g/l	Trypton	30 min bei 121 °C autoklavieren und je 1 % einer sterilen Lösung von 1M MgCl ₂ und 1 M MgSO ₄ zufügen.
5 g/l	Hefeextrakt	
10 mM	NaCl	
2,5 mM	KCl	

SOC-Medium

0,4 % (w/v)	Glucose (sterilfiltrierte Lösung) in SOB-Medium
-------------	---

3.1.11 Medien für die Kultivierung von *D. discoideum*HL5c-Medium

5 g/l	Protease-Pepton
2,5 g/l	Casein-Pepton
5 g/l	Bacto Hefeextrakt
2,5 g/l	Bacto Trypton
10 g/l	D-Glucose
1,2 g/l	KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)
0,4 g/l	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)

mit 2 N NaOH auf pH 6,6 einstellen und 30 min bei 121 °C autoklavieren

SM-AGAR

10g/l	Glucose
10g/l	Bacto Pepton (Difco)
10g/l	Bacto Hefeextrakt (Difco)
1g/l	Mg ₂ SO ₄ 7 H ₂ O
1,9 g/l	KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)
1g/l	K ₂ HPO ₄ (wasserfrei)
20g/l	Bacto Agar (Difco)

mit 2 N NaOH auf pH 6,4 einstellen und 30 min bei 121 °C autoklavieren

MES-Puffer

20 mM	MES-NaOH, pH 6,8
0,2 mM	CaCl ₂
2,0 mM	MgCl ₂

Bonner's Lösung

0,6 g/l	NaCl
0,75 g/l	KCl
0,3 g/l	CaCl ₂

mit 2 N NaOH auf pH 6,8 einstellen und
30 min bei 121 °C autoklavieren

EP-Puffer

10 mM	Natriumphosphat, pH 6,3
50 mM	Saccharose

MES-Agar

20 g/l Agar in MES-Puffer

jeweils in 1 l Wasser lösen und 30 min
bei 121 °C autoklavieren

3.1.12 Computerprogramme

Die Programme EDITSEQUENCE, MEGALIGN, MAPDRAW, PROTEAN und PRIMERSELECT des Programmpakets DNASTAR wurden für die Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen, Sequenzvergleiche, die Erstellung von Dendrogrammen und Restriktionskarten sowie für die Sekundärstrukturanalyse und die Auswahl von Primern verwendet. Für die graphische Darstellung von Sequenzvergleichen wurde das Programm GENEDOC und von Dendrogrammen das Programm TREEV32 benutzt. Mit dem Programm ORIGIN 5.0 wurde die Auswertung von kinetischen Daten vorgenommen. Graphische Darstellungen wurden mit PowerPoint und CANVAS (für Macintosh) angefertigt. Die Verarbeitung von Bildern, z.B. Gelen, erfolgte mit PaintShopPro, die Verarbeitung von Mikroskopieaufnahmen mit den Programmen IMARIS (Bitplane) und PaintShopPro.

3.1.13 Antikörper

Maus-IgG, Anti-Porin (mAK 70-100-1)

von Dr. G. Gerisch, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
(Troll *et al.*, 1992)

Maus-IgG, Anti-Proteindisulfid-Isomerase (mAK 221-135)

von Dr. G. Gerisch, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Maus-IgG, Anti-vakuoläre H⁺-ATPase (mAK 221-352)

von Dr. M. Maniak, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Maus-IgG, Anti-Comitin (mAK 190-340-8)

von Dr. A. Nögel, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
(Weiner *et al.*, 1993)

Maus-IgG, Anti-Coronin (mAK 176-2-5)

von Dr. M. Maniak, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
(Dehostos *et al.*, 1991)

Maus-IgG, Anti-Vacuolin (mAK 221-1-1)

von Dr. M. Maniak, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Kaninchen-IgG, Anti-Clathrin (schwere Untereinheit)

eigene Herstellung

Ziegen-IgG, Anti-(Kaninchen-IgG), Alexa 488-konjugiert

Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Ziegen-IgG, Anti-(Maus-IgG), Alexa 488-konjugiert

Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Ziegen-IgG, Anti-(Kaninchen-IgG), Cy3-konjugiert

Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Ziegen-IgG, Anti-(Maus-IgG), Cy3-konjugiert

Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Ziegen-IgG, Anti-(Kaninchen-IgG), Meerrettich-Peroxidase-konjugiert

Bio-Rad, München

Ziegen-IgG, Anti-(Maus-IgG), Meerrettich-Peroxidase-konjugiert

Bio-Rad, München

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *E. coli* Bakterien

E. coli-Bakterien wurden nach einer Transformation mit DNA oder zur Erhaltung von Einzelkolonien auf LB-Platten kultiviert. Zur Selektion transformierter Bakterien enthielten die Platten das entsprechende Antibiotikum. Die Plattenkulturen wurden nach dem Ausstreichen der Bakterien über Kopf für mindestens 12 h bei 37 °C bebrütet. Plattenkulturen können bei 4 °C gelagert werden und sind so mehrere Wochen haltbar.

Zur Herstellung von *E. coli*-Flüssigkulturen wurden 3 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie einer Plattenkultur angeimpft und 12 bis 16 h bei 200 bis 230 UpM und 37 °C geschüttelt. Zum Anlegen größerer Flüssigkulturen wurden 100 bis 150 ml LB-Medium mit 100 µl einer

Flüssigkultur angeimpft und wie beschrieben geschüttelt. Bei Ampicillin-resistenten Stämmen wurde das Medium auf eine Ampicillin-Konzentration von 75 µg/ml eingestellt. Die Ermittlung der Zelldichten beim Bakterienwachstum erfolgte durch Trübungsmessung im sichtbaren Bereich bei 600 nm (OD_{600}) in Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm.

Für die Konservierung der *E. coli*-Stämme wurden in 2 ml Eppendorf-Gefäßen 0,5 ml einer Übernachtskultur mit 0,5 ml 80 % (v/v) Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Transformation von *E. coli* Bakterien

3.2.2.1 Die $CaCl_2$ -Methode

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen nach der $CaCl_2$ -Methode wurden 50 ml LB-Medium mit 0,5 ml einer Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Stamms angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C bei 220 UpM geschüttelt, bis die Suspension eine OD_{600} von 0,4 bis 0,6 erreicht hatte (2 bis 3 h). Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und 10 min bei 3000 UpM und 4 °C geerntet. Danach wurde das Zellsediment in 20 ml 100 mM $CaCl_2$ (eiskalt) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Es wurde nochmals 10 min zentrifugiert, und die Zellen wurden anschließend in 3 ml 100 mM $CaCl_2$ aufgenommen. Nach einer weiteren mindestens einstündigen Inkubation auf Eis waren die Zellen kompetent. Die Zellen konnten 2 bis 3 Tage auf Eis gelagert oder nach Zugabe von Glycerin zu einer Endkonzentration von 20 % (v/v) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C konserviert werden.

Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Zellsuspension mit Plasmid-DNA (1 ng) oder Ligationsansätzen (bis zu 10 µl) für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 37 °C hitzebehandelt, nochmals 2 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 100 µl SOC für 60 min bei 37 °C inkubiert. Von der Zellsuspension wurden 10 bis 200 µl pro LB-Agarplatte mit 75 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Die nach der $CaCl_2$ -Methode hergestellten kompetenten Zellen ergaben Transformationsausbeuten von etwa $1 \cdot 10^7$ Kolonien/µg DNA.

3.2.2.2 Elektroporation

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde 1 l LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C mit 220 UpM geschüttelt, bis eine OD_{600} von 0,5 bis 0,7 erreicht war. Die Zellen wurden für 15 bis 30 min auf Eis abgekühlt, in sterilen Falconröhrchen abzentrifugiert (4000 g, 10 min, 4 °C) und in 200 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen sechsmal in 10 %igem Glycerin gewaschen und abzentrifugiert, wobei bei jedem Waschschrift das Volumen um die Hälfte reduziert wurde. Das Zellsediment von etwa 1 ml wurde in 120 µl-Portionen auf Einfrierröhrchen verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation von Zellen durch Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und 2 bis 3 μl einer wässrigen Lösung des Ligationsansatzes zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde das Zell-DNA-Gemisch in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette gefüllt. Die Zellen wurden mit dem „Gene-Pulser“ (Biorad) bei 25 μF , 200 Ω und 2,5 kV transformiert, was eine Zeitkonstante von etwa 4,7 ms ergab. Anschließend wurde der Transformationsansatz in 1 ml eiskaltem SOC-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 37 °C unter Schütteln regeneriert und auf LB-Platten ausplattiert, die 75 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin enthielten. Bei dieser Methode wurden höhere Transformationsausbeuten erzielt als mit der CaCl_2 -Methode (bis zu $1 \cdot 10^{10}$ Kolonien/ μg DNA).

3.2.3 Präparation von Nukleinsäuren

3.2.3.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *D. discoideum* ging von $1 \cdot 10^8$ Zellen aus, die von Schüttel- oder Plattenkultur geerntet wurden. Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem TE-Puffer gewaschen (1000 g, 4 °C, 7 min), in 2 ml TE-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 0,1 ml 30 %iger Natrium-N-laurylsarkosin-Lösung lysiert. Bei den folgenden Extraktionsschritten wurden die Lösungen in Polypropylenröhrchen mit Hilfe eines *Roto-Torque*-Geräts durchmischt und anschließend bei 1200 g und 4 °C für 7 min zentrifugiert. Die erste Extraktion des Zellysats erfolgte mit 2 ml Phenollösung. Die Phenol-Phase wurde nach der Trennung der Phasen mit 1 ml TE-Puffer gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dann mit 3 ml Phenol/Chloroform und anschließend mit Chloroform allein extrahiert. Danach wurde die wässrige Phase mit 15 μl hitzebehandelter RNase A-Lösung (10 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurden 10 μl einer Proteinase K-Lösung (5 mg/ml) zugefügt und nochmals 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten zwei Extraktionsschritte mit je 3 ml Phenol/Chloroform bzw. Chloroform. Zur Fällung der genomischen DNA wurde die wässrige Phase mit dem 0,1fachen Volumen an 3 M Kaliumacetat-Lösung und dem 2,5fachen Volumen an absolutem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2500 g und 4 °C für 20 min wurde die sedimentierte DNA zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 bis 300 μl TE-Puffer gelöst. In der Regel konnten aus $1 \cdot 10^8$ Zellen 0,4 bis 0,6 mg genomischer DNA isoliert werden.

3.2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte gemäß Herstellerangaben mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Düsseldorf). Die Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurde mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit (Quiagen, Düsseldorf) durchgeführt.

3.2.3.3 Messung des Nukleinsäuregehaltes

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der Spektraleigenschaften der in ihnen enthaltenen Basen ultraviolettes Licht zwischen 250 und 270 nm Wellenlänge, wobei ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Proteine haben dagegen ein Absorptionsmaximum von 280 nm. Konzentration und Reinheit von nukleinsäurehaltigen Lösungen wurden durch Messung eines Absorptionsspektrums zwischen 220 und 300 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm an einem Beckmann DU-650 Spektralphotometer bestimmt. Für die Konzentration gilt folgende Beziehung:

$$1,0 A_{260}\text{-Einheit} = 50 \mu\text{g/ml dsDNA} = 33 \mu\text{g/ml ssDNA} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

Der Quotient A_{260}/A_{280} gibt die Reinheit einer Nukleinsäurelösung an, er sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen durch Proteine hin, höhere Werte auf die Anwesenheit von niedermolekularen aromatischen Verbindungen wie Nukleotide oder Phenol.

3.2.4 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

3.2.4.1 Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA wurde nach den Herstellerangaben hinsichtlich Pufferbedingungen und Reaktionstemperatur durchgeführt. Für die Konstruktion von DNA-Plasmiden und zur Überprüfung von Transformanten wurde der Restriktionsverdau von 0,5 bis 10 μg Plasmid-DNA mit 5 bis 10 U des Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 bis 50 μl für 1 h durchgeführt. Die Hydrolyse von genomischer DNA für Southern-Blot-Analysen (s. 3.2.7.1) und die Herstellung der gröbenselektionierten genomischen Banken (s. 3.2.8.1) erfolgte mit 30 bis 50 U der Restriktionsendonuklease in einem Volumen von 100 μl über 12 bis 16 h. Um eine vollständige Spaltung der genomischen DNA zu gewährleisten, wurde nach 12 bis 16 h 10 U frisches Restriktionsenzym zugefügt und nochmals für 2 bis 4 h inkubiert. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde durch Gelelektrophorese (s. 2.2.5.1.) überprüft. Für weitere enzymatische Reaktionen unter anderen Pufferbedingungen wurde die DNA durch Phenolextraktion und Fällung mit 2-Propanol gereinigt.

3.2.4.2 5'-Dephosphorylierung von DNA

Die Entfernung endständiger Phosphatgruppen wurde durchgeführt, um eine Religation des hydrolysierten Vektors zu verhindern. Hierzu wurde alkalische Phosphatase aus Garnelen verwendet. Diese konnte meist direkt der Reaktionsmischung des Restriktionsverdaus zugefügt werden, da sie in den meisten Puffern arbeitet. Pro Reaktionsansatz wurde 1 h mit 1 bis 2 U des Enzyms bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 15minütige Hitzedenaturierung bei 65 °C inaktiviert.

3.2.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Nicht kompatible, überstehende Enden wurden zuvor durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase geglättet. In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden 20 bis 50 ng dephosphorylierte Vektor-DNA und ein 1 bis 3facher molarer Überschuss der zu inserierenden DNA in Ligationspuffer mit 1 bis 5 U T4 DNA-Ligase versetzt. Die Ligation erfolgte durch eine 5minütige Behandlung im Ultraschallbad gefolgt von einer 30minütigen Inkubation bei 20 °C. Von dem Ligationsansatz wurden 3 bis 10 µl direkt in eine Transformation nach der CaCl₂-Methode eingesetzt. Für eine Transformation mittels Elektroporation wurde die DNA des Ligationsansatzes mit Ethanol gefällt, wenn mehr als 2 µl des Ansatzes transformiert werden sollten, und wieder in sterilem Wasser gelöst, da Salze bei der Elektroporation stören. Die Lagerung von Ligationsmischungen erfolgte bei -20 °C.

<u>Ligationspuffer</u>	50	mM	Tris-HCl (pH 7,6)
	10	mM	MgCl ₂
	10	mM	DTT
	1	mM	ATP
	5	% (w/v)	PEG 8000
	100	µg/ml	BSA

3.2.4.4 Herstellung von DIG-markierten DNA-Fragmenten

Die Herstellung von Hybridisierungssonden für den spezifischen Nachweis von DNA und RNA in Southern- und Northern-Blot Analysen oder für die Durchmusterung der genomischen Banken (s. 2.2.9.) wurde mit Hilfe des DIG-Systems von Böhlinger Mannheim durchgeführt. Das DIG-System stellt eine Alternative zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten dar und beruht auf dem Einbau des modifizierten Nukleotids Digoxigenin-11-dUTP in den Nukleinsäurestrang. Digoxigenin ist ein Steroid-Hapten, das ausschließlich in Pflanzen der Fingerhut-Familie vorkommt und das durch Antikörper immunochemisch nachgewiesen werden kann. Der Einbau von Digoxigenin-11-dUTP in den Nukleinsäurestrang erfolgte unter Verwendung des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I in einer *Random-Primed*-Reaktion.

Hierfür wurde 1 µg der Matrizen-DNA in einem Volumen von 15 µl für 10 min in einem kochenden Wasserbad hitzedenaturiert und anschließend sofort auf Eis überführt. Zu diesem Ansatz wurden folgende Substanzen zu einem Gesamtvolumen von 20 µl gegeben:

<u>2 µl Hexanukleotid-Lösung:</u>	1,56 mg/ml Hexanukleotide
	500 mM Tris-HCl
	100 mM MgCl ₂
	1 mM DTE
	2 mg/ml BSA, pH 7,2

2 µl Oligodesoxynukleotid-Lösung: 1 mM dATP
1 mM dCTP
1 mM dGTP
0,65 mM dTTP
0,35 mM DIG-dUTP, pH 6,5

1 µl Klenow-Fragment (2 U/µl)

Nach einer Inkubation von mindestens 60 min bei 37 °C wurde das Enzym durch Zugabe von 2 µl EDTA-Lösung (200 mM, pH 8,0) inaktiviert.

Die Effizienz der DIG-Markierung der Hybridisiersonde wurde in einem *Dot-Blot* überprüft. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Hybridisiersonde und einer DIG-markierten Vergleichs-DNA auf Hybond-N-Membran aufgebracht und die markierte DNA gemäß 3.2.7.4 nachgewiesen.

3.2.4.5 Serielle Deletionen von Plasmid-Inserts

Sollen DNA-Fragmente sequenziert werden, die zu lang sind, um von einer einzigen Primer-Bindungsstelle aus sequenziert werden zu können, kann das Problem durch Einführung von Deletionen (Doppelstrangverkürzung) in die betreffende DNA umgangen werden. Hierbei werden Plasmide unterschiedlicher Insertlänge hergestellt, um so immer entferntere Sequenzierbereiche in die Nähe des Sequenzierprimers zu bringen. Die Doppelstrangverkürzung des Plasmids pE1, dessen vollständige Nukleotidsequenz bestimmt werden sollte, erfolgte mit dem „*Erase-a-Base-System*“ von Promega.

Das Enzym Exonuklease III greift spezifisch doppelsträngige DNA-Moleküle an, deren Enden entweder 5'-überhängend oder glatt sind. DNA mit 3'-überhängenden Enden werden nicht angegriffen und können so vor einem Exonuklease III-Verdau geschützt werden. Das Plasmid wird daher mit einer Restriktionsendonuklease, die ein 5'-überhängendes Ende oder glattes Ende und mit einer, die einen 3'-Überhang erzeugt, geschnitten. Nach Herstellung einer Serie von Deletionen mittels Exonuklease III, werden die erzeugten, einzelsträngigen Bereiche mit der einzelstrangspezifischen S1-Nuklease abgebaut (s. Abb.3.1).

Zur Einführung eines 3'-überhängenden Endes (Schutzschnitt) wurde das Plasmid pE1 mit der Restriktionsendonuklease *Apa* I geschnitten. Hierfür wurden 3 µl (=13,5 µg) pE1-DNA in 10 µl 10x A-Puffer und 83 µl Wasser für 2,5 h bei 30 °C mit 4 µl *Apa* I inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdau wurde mittels eines Agarosegel überprüft. Das Enzym wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolfällung entfernt. Nach dem Trocknen des Pellets wurde es in 5 µl TE-Puffer aufgenommen. Danach erfolgte der Abbauschritt mit 4 µl *Hind* III, bei dem ein 5'-überhängendes Ende erzeugt wurde. 5 µl der linearisierten Plasmid-DNA wurden in 10 µl 10x B-Puffer und 81 µl Wasser bei 37 °C für 3 h mit *Hind* III verdaut. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt und das Pellet in 10 µl TE-Puffer gelöst. Die Menge an DNA wurde anhand eines Minigels abgeschätzt.

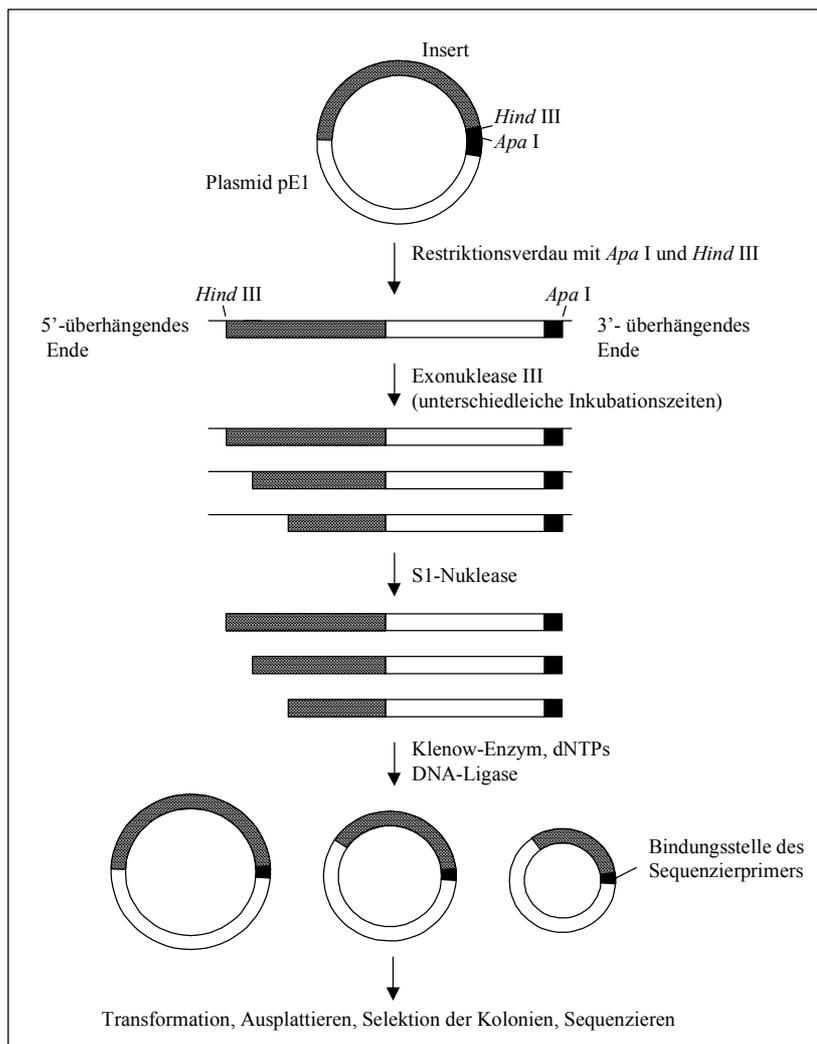


Abb. 3-1: Serielle Deletion des Plasmids pE1

Plasmid pE1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Apa* I verdaut. Durch Inkubation mit Exonuklease III für unterschiedliche Zeiten wurden Plasmidinserts unterschiedlicher Länge erhalten. Überstehende DNA-Enden wurden mittels S1-Nuklease entfernt und die Vektoren religiert.

Die so vorbereitete DNA konnte nun einem Verdau mit der Exonuklease III unterzogen werden. 4,5 μ l (= 5 μ g) der DNA wurden mit 6 μ l Exo III-10x Puffer versetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 60 μ l gebracht. Nach Vorwärmen der Mischung auf 37 °C, wurde die Deletion durch Zugabe von 2,5 μ l (= 437 U) Exonuklease III gestartet. Jede halbe Minute wurden 2,5 μ l dieser Mischung entnommen und zu den vorbereiteten 500 μ l-Reaktionsgefäßen auf Eis gegeben, die jeweils 7,5 μ l des S1-Nuklease-Mischung enthielten, um die Reaktion abzustoppen. Nach Entnahme aller Proben wurden diese 0,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei wurden die überhängenden DNA-Stränge durch die S1-Nuklease entfernt. Anschließend wurden jeweils 1 μ l Nuklease-Stop-Puffer zugegeben und die Mischungen 10 min bei 70 °C erhitzt, um die S1-Nuklease zu inaktivieren. Das Ausmaß des Exonuklease III-Verdau wurde getestet, indem für jeden Zeitpunkt jeweils 3 μ l der Probe auf 0,8 %ige Minigele aufgetragen wurde (s. Kap 4, Abb. 4-3).

Die DNA wurde durch Zugabe des 0,3fachen Volumens an 7,5 M Ammoniumacetatlösung und des 2fachen Volumens an 100 %igem Ethanol 15 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 15000 UpM wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, im Speed-Vac-Konzentrator getrocknet und in 9 μl TE-Puffer resuspendiert. Um die Enden der DNA-Moleküle vollständig zu glätten, wurde die DNA abschließend mit dem Klenow-Enzym behandelt. Die Proben wurden auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt und jeweils 1 μl Klenow-Mischung (3-5 U Klenow-Fragment in 30 μl Klenow-Puffer) zugegeben. Nach dreiminütiger Inkubation wurden jeweils 1 μl der Desoxynukleotidmischung (0,125 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) hinzugefügt und für weitere 5 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurde das Klenow-Enzym bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min Hitze-inaktiviert.

Für die Ligation der linearisierten Plasmide wurde zu jeder Probe 40 μl Ligase-Mischung pipettiert und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Jeweils 10 μl der Ligationsansätze wurden in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue nach der CaCl_2 -Methode gemäß 3.2.2.1 transformiert. Pro Zeitpunkt, d.h. pro Transformation wurden 15 bis 20 Bakterienkolonien erhalten.

<u>Exo III-10x Puffer:</u>	660 mM Tris-HCl, pH 8,0, 6,6 mM MgCl_2
<u>S1-Nuklease-Mischung:</u>	172 μl Wasser; 27 μl S1-7,4x Puffer; 60 U S1-Nuklease (für 25 Zeitpunkte)
<u>S1-7,4x Puffer:</u>	300 mM Natriumacetat, pH 4,6; 2,5 M NaCl; 10 mM ZnSO_4 ; 50 %iges Glycerin
<u>Nuklease-Stop-Puffer:</u>	300 mM Tris; 50 mM EDTA
<u>Klenow-Puffer:</u>	20 mM Tris-HCl; pH 8,0; 100 mM MgCl_2
<u>Ligase-Mischung:</u>	790 μl Wasser; 100 μl Ligase-10x Puffer; 100 μl 50 % PEG; 10 μl 100 mM DTT; 5 U T4 DNA-Ligase
<u>Ligase-10x Puffer:</u>	500 mM Tris-HCl, pH 7,6; 100 mM MgCl_2 ; 10 mM ATP

3.2.5 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

3.2.5.1 Native DNA-Agarosegele

Die Trennung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten erfolgte nach ihrer Größe in 0,7 bis 2,0 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989). Die Proben wurden mit 1/6 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und bei 30 bis 100 V in Minigelen (Laufstrecke 8 cm) getrennt. Für DNA-Mengen $>5\text{ }\mu\text{g}$ wurden Midigelen (Laufstrecke 18 cm) über 12 bis 16 h bei 30 bis 40 V verwendet. Die DNA wurde durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Zur Abschätzung der Größe und Menge der DNA-Fragmente wurden DNA-Lösungen mit Fragmenten bekannter Größe mitgeführt.

<u>DNA-Auftragspuffer:</u>	50	% (v/v)	Glycerin
	0,2	% (w/v)	SDS
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,05	% (w/v)	Xylencyanol
			in 1 x TAE-Puffer

3.2.5.2 Denaturierende RNA-Agarosegele

Beim Arbeiten mit Ribonukleinsäuren wurden besondere Vorsichtsmaßnahmen zur Entfernung von RNAsen getroffen (Sambrook *et al.*, 1989). Hitzestabile Gefäße und Geräte wurden gründlich gereinigt, über Nacht in 0,1 %iger DEPC-Lösung inkubiert und anschließend autoklaviert. Wässrige Lösungen wurden zur Inaktivierung von RNAsen ebenfalls mit 0,1 % (w/v) DEPC versetzt, über Nacht inkubiert und autoklaviert. DEPC-empfindliche Geräte wie Elektrophoreseapparatur und Kämme wurden gründlich mit Spülmittel gereinigt, mit Ethanol getrocknet, 10 min in 3 %iger H₂O₂ inkubiert und mit DEPC behandeltem Wasser gespült.

Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose in 15 ml 10x MOPS-Puffer und 108 ml Wasser durch Erhitzen gelöst. Nachdem die Agarose auf ca. 50 °C abgekühlt war, wurden unter Rühren 27 ml 37 %iges Formaldehyd zugegeben und der Ansatz in die Elektrophoreseapparatur gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit 1 x MOPS-Puffer unter Zusatz von 2,2 M Formaldehyd überschichtet. 15 µg Gesamt-RNA wurden in 5 µl Wasser gelöst, mit 10 µl Auftragspuffer versetzt und mindestens 15 min bei 65 °C denaturiert. Danach wurde die RNA-Lösung sofort auf Eis überführt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 60 V.

<u>10x MOPS-Puffer:</u>	200	mM	MOPS
	50	mM	Natriumacetat
	10	mM	EDTA
			(pH 7,0; autoklavieren)

<u>RNA-Auftragspuffer:</u>	750	µl	Formamid, deionisiert
	150	µl	10 x MOPS-Puffer
	240	µl	37 %ige Formaldehydlösung
	100	µl	Wasser
	100	µl	Glycerin
	800	µl	10 %ige Bromphenolblaulösung

3.2.5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Reinigung von DNA aus Agarosegelen wurde durchgeführt, um nach Restriktionen ein gewünschtes Fragment zu isolieren. Hierzu wurde der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch

nach Größe aufgetrennt und das gewünschte Fragment nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Für die Elution der DNA aus der Agarose wurden zwei verschiedene Methoden angewendet:

Das folgende Reinigungsverfahren beruht auf unpolaren Wechselwirkungen von DNA mit suspendiertem Glasmehl („Glasmilch“), so daß DNA-Fragmente bei hohen Salzkonzentrationen gebunden und anschließend in salzarmen Lösungen eluiert werden können. Bei dieser Methode wurde das DNA enthaltende Agarosestück mit dem dreifachen Volumen einer gesättigten Natriumiodid-Lösung (Lösung SALT) versetzt und die Agarose durch Erwärmen auf 55 °C innerhalb von 10 min gelöst. Das Natriumiodid verhinderte die Repolymerisation der Agarose bei niedrigeren Temperaturen. In diese Lösung wurde entsprechend dem Gehalt an DNA ein bestimmtes Volumen an „Glasmilch“ (Lösung BIND) zugegeben und gut vermischt. Nach zehninütiger Inkubation bei RT wurde kurz bei 14000 UpM zentrifugiert und das Sediment zweimal mit ethanolhaltiger Salzlösung (Lösung WASH) gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von TE-Puffer, dessen Volumen sich nach der eingesetzten Menge an „Glasmilch“ richtete. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese auf Konzentration und Reinheit untersucht. Diese Methode eignete sich besonders für die Isolierung großer Mengen an DNA und wurde bei der Herstellung der Hybridisierungs sonden verwendet.

Für die DNA-Isolierung mit der „Glasmilch“-Methode wurden die Lösungen und Reagenzien des „*Easy Pure*“ DNA Purification Kits von Biozym (Hess. Oldendorf) verwendet.

Bei der „*Freeze-Squeeze*“-Technik wird die DNA durch Zentrifugation durch silikonisierte Glaswolle von der Agarose getrennt. Zunächst wurde das die DNA enthaltende Agarosestück in einer Lösung aus 0,3 M Natriumacetat und 1 mM EDTA (pH 7,0) äquilibriert und anschließend in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt, das an der unteren Spitze mit einem 1 mm großen Loch versehen ist, das mit Glaswolle abgedichtet ist. Das Gefäß samt Inhalt wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in ein deckellooses 1,5 ml Eppendorfgefäß gesteckt und 5 min bei 11000 UpM zentrifugiert. Die aufgefangene DNA-Lösung wird mit 1 % des Gesamtvolumens an 10 %iger Essigsäure versetzt und die DNA durch Zugabe des 2,5fachen Volumens an eiskaltem Ethanol gefällt. Anschließend wurde 30 min bei 4 °C zentrifugiert und das Sediment zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen der DNA wurde diese in TE-Puffer oder Wasser gelöst. Diese Methode wurde vor allem für die Isolierung von Fragmenten angewandt, die für eine nachfolgende Klonierung bestimmt waren.

3.2.6 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die spezifische *in vitro* Amplifikation von DNA-Sequenzen ausgehend von kleinsten Mengen an Vorlagen-Molekülen (Saiki *et al.*, 1992; Saiki *et al.*, 1988; Mullis und Faloona, 1987). Sie basiert auf dem Prinzip der Primer-Hybridisierung mit anschließender Polymerisationsreaktion und Denaturierung des entstandenen DNA-Stranges. Dies führt zur exponentiellen Amplifikation einer von zwei Primern begrenzten DNA-Sequenz über mehrere Zyklen hinweg. Jeder Zyklus setzt sich aus drei Schritten zusammen: Bei der Denaturierung (94 °C) werden aus der Matrize Einzelstränge

erzeugt, an die sich im zweiten Schritt die Oligonukleotid-Primer anlagern können ($T_m - 5\text{ °C}$). Ausgehend von den Primern erfolgt im dritten Schritt die Polymerisationsreaktion. Katalysiert wird die DNA-Synthese durch das hitzestabile Enzym *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* bei 72 °C , das auch durch die Denaturierung bei 94 °C nicht inaktiviert wird. Als Matrize wurde chromosomale DNA zum Nachweis bestimmter eingesetzt.

Ein wichtiges Kriterium bei der Wahl von Oligodesoxynukleotid-Primern ist ihre Schmelztemperatur. Diese läßt sich bei kurzen Oligodesoxynukleotiden nach folgender Formel berechnen:

$$T_m = (A+T) \cdot 2\text{ °C} + (C+G) \cdot 4\text{ °C}$$

Hierbei sind Temperaturen zwischen 50 °C und 60 °C günstig, da sie eine ausreichende Spezifität ermöglichen. Wichtig ist, daß die Schmelztemperaturen der beiden in die PCR-Reaktion eingesetzten Oligonukleotid-Primer um nicht mehr als 4 °C differieren. Die Länge solcher Oligodesoxynukleotide liegt im allgemeinen zwischen 18 und 25 Nukleotiden. Für eine spezifische Anlagerung ist es günstig, wenn die letzte Base ein G oder ein C ist, da diese stabilere Basenpaarungen eingehen.

Weiterhin ist zu beachten, daß die eingesetzten Primer untereinander keine intermolekularen oder intramolekularen Wechselwirkungen eingehen, was zu einer Herabsetzung der effektiven Konzentration führt.

Für die Durchführung einer PCR-Reaktion wurde in der Regel folgender Ansatz gewählt:

- Matrizen-DNA: 0,1-1 pmol
- Primer: je ca. 300 pmol
- Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs): $1\text{ }\mu\text{M}$
- Puffer: 10x *Taq*-Polymerase-Puffer
- Polymerase: 1-5 U *Taq* DNA-Polymerase
- mit Wasser wurde auf das gewünschte Reaktionsvolumen ($50\text{ }\mu\text{l}$ oder $100\text{ }\mu\text{l}$) aufgefüllt.

Für die einzelnen Schritte der PCR-Reaktion wurden die Temperaturen und Inkubationsdauern wie folgt gewählt:

- Denaturierung: $92\text{-}94\text{ °C}$
4 min für die erste Stufe, 45 s für alle späteren Stufen
- Anlagerung: $45\text{-}56\text{ °C}$ abhängig von Primerlänge und G/C-Gehalt
1 min
- DNA-Synthese: $68\text{-}72\text{ °C}$
1 min bei Produktlänge $< 1000\text{ bp}$
2 min bei Produktlänge $> 1000\text{ bp}$
10 min bei der letzten Stufe zur Vervollständigung der Produkte

Die Anzahl der Zyklen betrug zwischen 20-30 und wurde dem jeweiligen Experiment angepasst. Die Produkte der PCR wurden auf Agarosegelen analysiert und entweder mit der „Freeze-Squeeze“-Methode oder dem „PCR-Purification“-Kit von Qiagen gereinigt.

3.2.7 Transfer und Hybridisierung von Nukleinsäuren

3.2.7.1 Southern-Blot Analyse von DNA

Zur Identifizierung spezifischer DNA-Fragmente wurden diese nach Auftrennung in nativen Agarosegelen durch Kapillartransfer auf Nylon-Membranen übertragen, fixiert und anschließend mit Digoxigenin markierten DNA-Sonden hybridisiert (Southern, 1975).

Für eine Southern-Blot-Analyse genomischer DNA wurden 50 bis 100 µg DNA in einem Volumen von 100 µl mit den gewünschten Restriktionsendonukleasen gespalten, mit Ethanol präzipitiert und anschließend in 25 µl TE-Puffer gelöst. Die DNA-Fragmente eines solchen Ansatzes wurden auf einem 0,8 %igem (w/v) Agarosegel bei 30 V aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Für die Zuordnung der Fragmentgrößen wurde das Gel mit einem angelegten Lineal fotografiert. Anschließend wurde das Gel zur Denaturierung der DNA zuerst 30 min in Denaturierungslösung, kurz mit Wasser gespült und danach zweimal 15 min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Der DNA-Transfer durch Kapillarblot auf Hybond N-Membranen erfolgte über 16-20 h mit 20x SSC. Hierzu wurde das behandelte Agarosegel auf eine Salzbrücke aus Whatman 3 MM Filterpapier gelegt, die mit beiden Enden in Pufferreservoirs endete, die mit 20x SSC gefüllt waren. Danach wurde die Nylonmembran aufgelegt und die Taschen des Agarosegels darauf markiert. Die Ränder wurden mit Parafilm abgedeckt, anschließend wurden drei Lagen Whatman 3 MM Filterpapier und ein Stapel Papiertücher aufgelegt, der mit einem 1 kg Gewicht beschwert wurde. Nach dem Transfer wurde der Blot kurz mit 2x SSC gespült, um anhaftende Agarose zu entfernen, und dann an der Luft getrocknet. Die DNA wurde anschließend mit UV-Licht (50 mJoule) auf dem Filter fixiert. Die Blots konnten nun bei 4 °C gelagert oder direkt in die Hybridisierung eingesetzt werden. Die Effizienz des Transfers wurde durch Färben des Agarosegels mit Ethidiumbromid überprüft.

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung: 1,5 M NaCl
0,5 M Tris-HCl (pH 7,2)
1 mM EDTA

3.2.7.2 Transfer von Bakterienkolonien

Eine Möglichkeit, um DNA-Fragmente voneinander abzutrennen, ist ihre Subklonierung in einen bakteriellen Vektor und die anschließende Transformation in Bakterien. Für die Identifizierung von Bakterienkolonien, die Plasmide mit dem gesuchten DNA-Fragment enthalten, werden die Kolonien auf eine Membran übertragen („*Kolonie-Lifting*“). Die Zellen werden auf der Membran lysiert, und ihre DNA freigesetzt. Diese wird auf dem Filter fixiert und kann nun mit einer geeigneten Sonde hybridisiert werden.

Vor der Übertragung der Bakterien auf die Filter wurden die Agarplatten mit den Bakterien für mindestens eine halbe Stunde bei 4 °C inkubiert. Das *Kolonie-Lifting* erfolgte durch vorsichtiges Auflegen einer Membran passender Größe auf die Platten. Zur Orientierung wurden sowohl Filter wie Platten markiert, um positive Klone nach der Detektion wieder aufzufinden. Nach 1 bis 1,5 min wurden die Filter mittels einer Pinzette abgenommen und kurz auf Whatman 3 MM Filterpapier getrocknet. Für die Denaturierung wurden 2 Lagen Whatman-Papier mit Denaturierungslösung getränkt und die Membranen mit der Bakterien-Seite nach oben für 15 min darauf gelegt. Danach wurden sie 15 min auf Whatman-Papier, das mit Neutralisierungslösung getränkt worden war, inkubiert und schließlich 10 min auf Papier, das mit 2x SSC-Lösung getränkt worden war. Vor jeder neuen Inkubation wurden die Blots kurz auf Whatman-Papier getrocknet. Die DNA wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht (150 mJoule) auf der feuchten Membran fixiert. Zur Inaktivierung von noch vorhandenen bakteriellen Proteinen, insbesondere von DNAsen, wurden die Membranen mit Proteinase K behandelt. 0,5 ml einer Proteinase K-Lösung (2 mg/ml) wurde auf einer Membran (Durchmesser 82 mm) verteilt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Um feste Zell- und Agarbestandteile zu entfernen, wurden die Blots zwischen feuchte Whatman-Papiere gelegt und durch mehrmaliges Darüberrollen mit einer Flasche zusammengepresst. Dieser Vorgang wurde solange mit frischem Whatman-Papier wiederholt bis keine Zell- und Agarreste mehr an der Membran hafteten.

Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung: 1,0 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl

Proteinase K-Lösung: 2 mg/ml in 2x SSC

3.2.7.3 Northern-Blot Analyse von RNA

Denaturierende RNA-Agarosegele wurden für den Kapillartransfer zuerst kurz in Wasser und anschließend zweimal 15 min in 20x SSC geschwenkt. Der Blot wurde wie unter Punkt 3.2.7.1 beschrieben aufgebaut, wobei jedoch 20x SSC verwendet wurde. Nach einem Transfer von 15-18 h wurde die RNA durch UV-Licht (50 mJoule) auf der trockenen Membran fixiert. Der Filter wurde entweder direkt in die Hybridisierung eingesetzt oder bei 4 °C gelagert. Zur Abschätzung der aufgetragenen RNA-Menge wurde der Filter mit Methylblau gefärbt, mit Wasser gewaschen und zur Dokumentation fotokopiert.

3.2.7.4 Hybridisierung und Detektion mit DIG-markierten Sonden

Hybridisierungen wurden in Glasröhren (15 cm • 3,5 cm bzw. 25 cm • 3,5 cm) in einem temperierbaren Hybridisierungsschrank unter Rotation durchgeführt. Zur Hybridisierung wurden die Filter kurz in 2x SSC geschwenkt und in die Hybridisierungsröhren überführt. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurden zuerst 15 bis 20 ml Prähybridisierungslösung zugegeben und die Filter 2 bis 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Prähybridisierungslösung durch Hybridisierungslösung ersetzt und 15 bis 20 h bei 37 °C inkubiert. Die Hybridisierungslösung konnte bei - 20 °C gelagert und mehrmals verwendet werden.

Im Anschluß an die Hybridisierung wurden unspezifisch angelagerte Sondenmoleküle durch mehrere Waschstufen entfernt. Die Filter wurden zweimal für 5 min bei Raumtemperatur mit einer 0,1 % (w/v) SDS-Lösung in 2x SSC und zweimal für 15 min bei 50 °C mit einer 0,1 % (w/v) SDS-Lösung 1x SSC gewaschen. Diese Waschbedingungen wurden sowohl bei Southern- und Northern-Blot-Analysen wie auch bei Koloniehybridisierungen gewählt.

Die Detektion der DIG-markierten DNA wurde nach Herstellerangaben (Böhringer, Mannheim) wie folgt durchgeführt. Die Membranen wurden für 1 min in Waschpuffer äquilibriert und für mindestens 30 bis 60 min in Blockierungspuffer geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für 30 min in einer 1:10000 Verdünnung des Anti-Digoxigenin-Antikörpers in Blockierungspuffer inkubiert. Die Membran wurde danach zweimal für 15 min mit Waschpuffer gewaschen und für 1 min in Detektionspuffer äquilibriert. Das Chemolumineszenz-Substrat CSPD[®] wurde 1:100 mit Detektionspuffer verdünnt und auf die Membran getropft. Nach 5 min wurde die Membran zwischen zwei Plastikfolien gelegt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Detektion der Chemolumineszenz-Signale erfolgte durch Exposition der Membran auf Röntgenfilm über 1 bis 48 h.

Prähybridisierungslösung: (HIGH-SDS mit 40 % Formamid):

7 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) deionisiertes Formamid;
5x SSC; 2 % (w/v) Blockierungsreagenz (Kasein);
50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0;
0,1 % (v/v) Natrium-N-Laurylsarcosin

Hybridisierungslösung: Prähybridisierungslösung mit 5-25 ng/ml hitzedenaturierter, DIG-markierter DNA

Waschpuffer:

100 mM	Maleinsäure, pH 7,5
150 mM	NaCl
0,3 % (v/v)	Tween-20

Blockierungspuffer:

100 mM	Maleinsäure, pH 7,5
150 mM	NaCl
1 % (w/v)	Blockierungsreagenz (Kasein)

Detektionspuffer:

100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
100 mM	NaCl

3.2.8 Durchmusterung von DNA-Banken aus *D. discoideum*

3.2.8.1 Herstellung und Durchmusterung von gröbenselektierten genomischen Banken

Bei Kenntnis der Größe einer bestimmten genomischen DNA-Sequenz kann dieser DNA-Bereich aus einer gröbenselektierten genomischen Bank isoliert werden.

Zu diesem Zweck wurde 1 mg genomischer DNA aus AX2-Wildtypzellen mit Restriktionsendonukleasen gespalten, die das gewünschte Fragment lieferten. Die DNA-Fragmente wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und der entsprechende Größenbereich mit der *Freeze-Squeeze*-Technik nach 3.2.5.3 aus dem Gel isoliert. Die gereinigte DNA wurde anschließend in Vektorplasmide, die mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten worden waren, ligiert und die Ligationsansätze für die Transformation in *E. coli* eingesetzt. Da für die Klonierung der genomischen Banken hohe Transformationseffizienzen essentiell waren, erfolgten die Transformationen in kommerzielle kompetente Zellen. Die Plasmide mit den 3 kBp großen *Eco* RI-Fragmenten wurden in elektroporationskompetente XL-I Blue MRF⁺-Zellen (Stratagene) mittels Elektroporation eingeschleust, die Plasmide mit den 4,5 kBp *Hind* III-Inserts in XL-II Blue „ultrakompetente“ Zellen (Stratagene) mittels Hitzeschock nach Herstellerangaben. Zur Bestimmung der Titer wurden verschiedene Mengen der Transformations-Suspensionen auf LB-Agarplatten ausgestrichen.

Für die Durchmusterung dieser gröbenselektierten genomischen Banken wurden die Transformationsmischungen so auf LB-Agarplatten verteilt, daß 400 Kolonien pro Agarplatte erhalten wurden. Anschließend wurden die Bakterien gemäß 3.2.7.2 auf eine Nylonmembran transferiert. Nach der Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden und der Chemolumineszenz-Detektion wurden die ermittelten positiven Klone von der Platte gepickt und zur Vereinzelung auf frische LB-Agarplatten ausgestrichen. Die vereinzelt Kolonien wurden dann auf die gleiche Weise hinsichtlich positiver Klone durchmustert. Mit den positiven Klonen der Vereinzelung wurden Flüssigkulturen angeimpft und die Plasmid-DNA isoliert. Die weitergehende Analyse der genomischen DNA-Insertionen der positiven Klone erfolgte durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen bzw. DNA-Sequenzierung.

3.2.8.2 Durchmusterung einer λ ZAP-cDNA-Bank

Für die Isolierung eines *dymB*-cDNA-Klons wurde eine λ -ZAP-Bank mit cDNA aus *D. discoideum* durchmustert. Die cDNA-Bank war von der Firma Stratagene hergestellt und von Dr. W. Loomis, UC San Diego, USA zur Verfügung gestellt worden. Die Durchmusterung einer cDNA-Bank verläuft ähnlich dem *Screenen* einer genomischen Bank, allerdings werden hier Bakteriophagen als Träger der cDNA eingesetzt. Bei diesem Verfahren macht man sich zunutze, daß die Phagen anwesende Bakterien infizieren und dabei ihr Erbgut auf die befallene Zelle übertragen. Die eingedrungene Nukleinsäure steuert in den infizierten Zellen die Synthese neuer Bakteriophagen, welche nach der Lyse des Bakteriums ins Freie gelangen und neue Zellen infizieren können. Die lysierten Bakterien hinterlassen sichtbare, klare Flächen, sogenannte Plaques.

Für die Durchmusterung konnte auf drei Agarplatten (Durchmesser 14 cm) zurückgegriffen werden, die bereits Plaques der optimalen Dichte enthielten (von E. Schwarz zu Verfügung gestellt). Diese wurden einem *Plaque-Lifting* unterzogen. Die erhaltenen Filter mit den anhaftenden infizierten Bakterien wurden wie in 3.2.7.1 behandelt, allerdings war nur eine fünfminütige Denaturierung nötig. Die Hybridisierung erfolgte mit der *dymB*-spezifischen *Bgl* II-Sonde. Sieben Plaques, die mögliche positive Signale ergeben hatten, wurden aus dem Agar ausgeschnitten und in jeweils 1 ml SM-Puffer unter Zusatz von 2 Tropfen CHCl_3 gegeben. Diese Mischung wurde über Nacht stehen gelassen, um die Phagen ausdiffundieren zu lassen.

Für eine neue Durchmusterungsrunde mit den oben isolierten Bakteriophagen, mußte zunächst der Titer an Phagen bestimmt werden, um eine optimale Plaquedichte für die Durchmusterung zu erhalten. Hierfür wurden von einer der sieben Bakteriophagen-Lösungen 10x-Verdünnungen in SM-Puffer angesetzt, die zwischen 10^9 und 10^2 geschätzten *pfu/ml* lagen (*pfu* = plaque forming unit). Je 0,1 ml dieser Phagen-Lösungen wurde mit 0,1 ml Bakteriensuspension des *E. coli*-Stamms RY 1090 für die Infektion bei 37 °C unter Schütteln 20 min inkubiert. Anschließend wurden 3 ml geschmolzene Top-Agarose, die vorher auf 48 °C erwärmt worden war und 100 µg/ml Ampicillin enthielt, zugegeben. Diese Mischung wurde auf kleine Agarplatten (Durchmesser 9 cm) verteilt, und die Platten nach Erhärten der Agarose bei 37 °C für ca. 12 h inkubiert. Die Verdünnung von 10^3 *pfu/ml* erwies sich am besten, so daß die restlichen Proben in dieser Verdünnung angesetzt wurden.

Nach drei Durchmusterungsrunden entsprechend obigem Verfahren waren die mutmaßlich positiven Phagen soweit angereichert, daß die Isolierung der cDNA aus den Phagen erfolgen konnte. In der letzten Runde wurden statt Agarplatten Agaroseplatten verwendet, da Agar für viele Enzyme inhibierende Substanzen enthält.

Die *D. discoideum*-cDNA war vor Einbringen in die Phagen in den pBluescript SK(-)-Vektor (über Linker mit künstlichen *Eco* RI-Schnittstellen) subkloniert worden. Um den pBS-Vektor einschließlich der gewünschten cDNA-Sequenz aus den Phagen zu isolieren, mußte er mittels eines Helferphagen aus dem Phagen genom geschnitten werden. Für diese *in vivo* Excision wurden 200 µl einer XL-1 Blue MRF³-Bakteriensuspension mit 100 µl der entsprechenden Phagenstocklösung ($> 10^5$ Phagenpartikel) und 1 µl ExAssist Helfer-Phage ($>10^8$ *pfu/ml*, Stratagene) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 3 ml 2x YT-Medium zugegeben und 2 bis 2,5 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde 20 min bei 70 °C erhitzt, um die Zellen abzutöten. Die toten Bakterien wurden durch eine 15minütige Zentrifugation bei 4000 g entfernt und der Überstand mit den Phagen bei 4 °C aufbewahrt. Mit dieser Phagenlösung wurden Bakterien des *E. coli*-Stamms SOLR infiziert. Dieser Schritt war notwendig, um eine Koinfektion mit dem Helferphagen zu vermeiden, der zwar in dem *E. coli*-Stamm XL-1 Blue vermehrungsfähig ist, nicht aber in SOLR-Zellen. 1 µl der Phagenlösung wurde zusammen mit 200 µl einer Bakteriensuspension 15 min bei 37 °C inkubiert. 100 µl dieser Mischung wurden auf LB-Agarplatten, die 50 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin enthielten, ausgestrichen und inkubiert. Aus 20 Klonen (jeweils 4 von jeder der 5 Proben) wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsverdau analysiert. Zum Teil wurde die Plasmid-DNA auch in XL-1 Blue-Zellen transformiert, da die Qualität der DNA dieser Zellen besser ist und sich leichter analysieren ließ. 3 Klone wurden sequenziert, von denen einer die gesuchte *dymB*-cDNA enthielt.

Für eine effiziente Infektion mit den Phagen mußten die verwendeten Bakterienkulturen wie folgt präpariert werden.

RY 1090-Zellen: 50 ml NZCYM-Medium mit 0,2 % Maltose wurden mit den *E. coli*-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation bei 4000 g pelletiert und mit einer entsprechenden Menge an 10 mM MgSO₄-Lösung verdünnt bis die OD₆₀₀ 2 betrug (ca. 16 ml).

XL-1 Blue MRF'-Zellen: 10 ml NZCYM-Medium, dem 30 µg/ml Tetrazyklin zugesetzt waren, wurden mit den XL-1 Blue-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden bei 4000 g pelletiert und in einer entsprechenden Menge an 10 mM MgSO₄-Lösung verdünnt bis die OD₆₀₀ 1 betrug (ca. 20 ml).

SOLR-Zellen: 10 ml-LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin wurden mit SOLR-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in frischem kanamycinhaltigem LB-Medium aufgenommen bis eine OD₆₀₀ von 1 erreicht war.

SM-Puffer: 20 mM Tris, pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄

Maltose-Stammlösung: 20 % in Wasser, sterilfiltriert

NZCYM-Medium: 22 g NZCYM-Pulver (GibcoBRL) in 1 l Wasser

Agarplatten: NZCYM-Medium mit 1,5 % Agar

Top-Agarose: NZCYM-Medium mit 0,7 % Agarose; 2 mM MgCl₂

2x YT-Medium: 10 g NaCl; 10 g Hefeextrakt; 16g Trypton

Alle Medien und Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert, wenn nicht anders angegeben.

3.2.9 Konstruktion der Expressionsvektoren

Für die Überproduktion von Dynamamin B in *D. discoideum* wurden Vektoren hergestellt, welche die Expression eines Dynamamin B-Fusionsproteins mit terminalen Heptahistidinpeptiden ermöglichen. Die Histidinreste sollten die affinitätschromatographische Reinigung des Fusionsproteins an einer Metallchelatomatrix ermöglichen. Als Ausgangsvektoren dienten die Expressionsvektoren der pDXA-Reihe (Manstein *et al.*, 1995).

3.2.9.1 Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamamin B mit aminoterminalen Histidinpeptid

Die vollständige Sequenz von *dymB* wurde mittels PCR-Synthese erhalten, wobei AX2-Wildtyp-DNA als Matrize diente. Als Primer wurde ein Oligonukleotid verwendet, das komplementär zum 5'-Ende der *dymB*-Sequenz ist (Basenpaar 4 bis 35) mit 12 zusätzlichen

Basenpaaren stromaufwärts, die eine künstliche *Sac* I-Schnittstelle enthalten (Primer Dym-Sac I). Das native Startkodon wurde hierbei zerstört. Der Gegenprimer ist komplementär zum 3'-Ende von *dymB* (Basenpaare 2741 bis 2760) und hat eine Sequenzverlängerung von 10 Nukleotiden, die eine künstliche *Xho* I-Schnittstelle beinhalten (Primer Dym-*Xho* I). Das Insert wurde über die *Sac* I- und *Xho* I-Schnittstelle zwischen die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pDXA-HY subkloniert. Dieser enthält vor dem Polylinkerbereich die kodierende Sequenz für das Heptahistidinpeptid. Das Plasmid pDXA-*dymB* kodiert für Dynamin B mit einer aminoterminalen Histidinmarkierung. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abschnitt 3.1.7 aufgeführt.

3.2.9.2 Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamin B mit carboxyterminalem Histidinpeptid

Für die Herstellung eines Dynamin B-Expressionskonstrukts mit carboxyterminalem Histidinpeptid (pC-*dymB*) wurde das Insert des Plasmids pDXA-*dymB* durch Restriktionsverdau mit *Sac* I und *Xho* I ausgeschnitten und zwischen die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pDXA-3H eingefügt. Vorher wurden die *Xho* I-Schnittstellen des Inserts und des Vektors mit T4 DNA-Polymerase aufgefüllt, damit sich das Insert im richtigen Leserahmen befand.

3.2.9.3 Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamin B ohne Markierung

Ferner wurde ein Dynamin B-Expressionskonstrukt ohne Markierung (pDXA-*dymB* ohne His) für zellbiologische Untersuchungen erzeugt. Dieses Konstrukt setzt sich aus der Vektorsequenz von pC-*dymB* und der für Dynamin B kodierenden Sequenz von pDXA-*dymB* zusammen. Das Insert des Plasmids pC-*dymB* wurde durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *Sac* I und *Xba* I entfernt. Hierbei wurde auch die Sequenz für das Histidinpeptid entfernt, welche sich direkt neben der *Xba* I-Schnittstelle befand. Das Plasmid pDXA-*dymB* wurde ebenfalls mit *Sac* I/*Xba* I geschnitten und das 2,7 kBp große Insertfragment, das die Histidinmarkierung durch den *Sac* I-Verdau verlor, in den vorbereiteten Vektor inseriert.

3.2.9.4 Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamin B ohne aminoterminaler Extension mit carboxyterminalem Histidinpeptid

Das Insert des Vektors pDymB- Δ NTS wurde mittels PCR hergestellt. Die verwendeten Primer waren Dym-02, der komplementär zu den Basenpaaren 440 bis 443 der *dymB*-Sequenz ist und eine künstliche *Sac* I-Schnittstelle enthält, und Dym-03, der komplementär zu den Basenpaaren 2741 bis 2760 ist und eine Sequenzverlängerung von 9 Nukleotiden mit einer artifiziellen *Xho* I-Schnittstelle beinhaltet. Als Matrize diente die Plasmid-DNA von pDXA-*DymB*. Das entstandene 2,4 kBp große Fragment wurde mit *Sac* I und *Xho* I geschnitten und

zwischen die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors pDXA-3H eingefügt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abschnitt 3.1.7 aufgeführt.

3.2.9.5 Konstruktion von Vektoren zur Produktion von Dynamin B mit Mutationen in der GTPase-Domäne

Für die Synthese von Vektoren, die für Dynamin B mit Mutationen in der GTPase-Domäne kodieren, diente das Plasmid pDXA-dymB ohne His als Ausgangsvektor. Dieses wurde mit den Restriktionsenzymen *Sac* I und *Bst* XI verdaut. Das dabei ausgeschnittene 1,3 kBp große Fragment wurde durch *Sac* I/*Bst* XI-Fragmente ersetzt, die die gewünschten Mutationen enthielten. Letztere wurden durch PCR-Synthese mit den Primern K170A (für die K170A-Mutation) bzw. S171N (für die S171N-Mutation) und dem Gegenprimer HN12 erzeugt. Als Matrize wurde das Plasmid pDXA-dymB verwendet. Die hierbei entstandenen ca. 1 kBp großen Amplifizierungsprodukte wurden in einer zweiten PCR als „Megaprimer“ eingesetzt, wobei als Gegenprimer jeweils Dym-*Sac* I und als Matrize das Plasmid pDXA-dymB diente. Die ca. 1,5 kBp großen Amplifizierungsprodukte wurden mit *Sac* I und *Bst* XI geschnitten und in den oben vorbereiteten pDXA-dymB ohne His-Vektor eingefügt. Es entstanden die Vektoren pDymB-ohne-His-K170A und pDymB-ohne-His-S171N. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abschnitt 3.1.7 aufgelistet.

Zur Visualisierung von Dynamin B in der Zelle wurden Plasmide hergestellt, die die Expression des Proteins mit einer YFP-Markierung am Carboxyterminus ermöglichen:

3.2.9.6 Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamin B mit carboxyterminalem YFP

Für die Herstellung eines Dynamin B-YFP-Fusionsproteins wurde der Vektor pDymB-EYFP konstruiert. Ausgangsvektor war das Plasmid pDXA-mcs-EYFP, das wiederum auf den Plasmiden pEYFP (Clontech) und pDXA-3H (Manstein) basiert. pDXA-mcs-EYFP ist so aufgebaut, daß dem Aktin-15 Promotor ein Polylinkerbereich folgt, der über ein 12 Aminosäuren langes Verbindungsstück (*Linker*) mit der Sequenz, die für das YFP-Protein kodiert, verbunden ist. Diesem folgt der A8-Terminator aus *D. discoideum*. Zwischen die *Sac* I- und *Xba* I-Schnittstellen dieses Plasmids wurde das Insert eingefügt, welches aus dem Verdau von pDXA-DymB mit *Sac* I/*Xba* I resultierte. Die YFP-Markierung befindet sich am Carboxyterminus von Dynamin B.

3.2.9.7 Konstruktion eines Vektors zur Produktion von Dynamin B ohne aminoterminaler Extension mit carboxyterminalem YFP

Für die Expression von Dynamin B ohne aminoterminaler Signalpeptid und mit carboxyterminalem YFP wurde der Vektor pDymB-ΔNTS-EYFP konstruiert. Hierfür wurde

das Plasmid pDymB- Δ NTS mit den Enzymen *Sac* I und *Xho* I geschnitten und das Insert in den Vektor pDXA-mcs-EYFP, der ebenfalls mit *Sac* I/*Xho* I verdaut worden war, eingefügt.

3.2.9.8 Konstruktion eines Vektors zur Produktion der aminoterminalen Extension von Dynamin B mit carboxyterminalem YFP

Zur Produktion eines Fusionsproteins bestehend aus der aminoterminalen Extension von Dynamin B und YFP wurde der Vektor pDymB-NTS hergestellt. Das Plasmid pDymB-EYFP wurde mit den Restriktionsenzymen *Sac* I und *Xba* I verdaut. Zwischen die entstandenen Schnittstellen wurde das 410 Bp große Insert eingefügt, das durch PCR-Synthese erhalten wurde. Als Matrize bei der PCR wurde das Plasmid pDXA-dymB verwendet und als Primer die Oligonukleotide Dym-*Sac* I und Dym-01, die eine künstliche *Sac* I bzw. *Xba* I-Erkennungssequenz enthielten.

3.2.9.9 Konstruktion von Vektoren zur Produktion von Dynamin B mit Mutationen in der GTPase-Domäne mit carboxyterminalem YFP

Für die Expression von mutiertem Dynamin B mit carboxyterminalem YFP wurden die Vektoren pDymB-EYFP-K170A und pDymB-EYFP-S171N konstruiert. Es wurde wie in 3.2.9.5 beschrieben vorgegangen. Statt des Plasmids pdymB-ohne-His diente jedoch das Plasmid pDymB-EYFP als Ausgangsvektor, in das die 1,3 kBp großen *Sac* I/*Bst* XI-Fragmente mit den entsprechenden Mutationen inseriert wurden.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische, eindimensionale Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe wurden in der Regel 8 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet, um eine gute Auflösung in dem Molekulargewichtsbereich um 100 kDa zu erhalten (Laemmli, 1970). Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele entweder für das Western-Blot-Verfahren (s. 3.4.1) verwendet oder zur Analytik von Proteinfractionen mit Coomassie-Blau angefärbt.

Es wurden sogenannte „Minigele“ mit einer Größe von ca. 5,5 • 8 cm für das Trenngel bzw. 2 • 8 cm für das Sammelgel und einer Dicke von 1mm verwendet. Deren Herstellung erfolgte durch radikalische Polymerisation des Acrylamids mit Quervernetzung durch N,N'-Methylenbisacrylamid.

Ansatz für 15 ml 8 %iges Trenngel (für 2 Minigele):

30 %ige Acrylamid-Lösung	4	ml
Trennpuffer	3,75	ml
Wasser.	7,25	ml
10 %ige (w/v) APS-Lösung	75	µl
TEMED	7,5	µl

Trennpuffer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS

Die Komponenten wurden gemischt und rasch in die vorbereitete Elektrophoreseapparatur überführt und mit n-Butanol überschichtet. Sobald die Polymerisation abgeschlossen war, konnte das n-Butanol abgegossen, die Apparatur mit Wasser gespült und das Sammelgel hergestellt werden:

Ansatz für 5 ml 6 %iges Sammelgel (für 2 Minigele):

30 %ige Acrylamid-Lösung	1,0	ml
Sammelpuffer	1,25	ml
Wasser	2,75	ml
10 %ige (w/v) APS-Lösung	30	µl
TEMED	5	µl

Sammelpuffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS

APS = Ammoniumperoxodisulfat

Nach der Mischung der Komponenten wurde die Lösung für das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und ein Taschenformer in das Sammelgel eingesetzt.

Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden diese mit Probenauftragspuffer in einem Volumenverhältnis von 2 zu 1 (Probe zu Probenauftragspuffer) versetzt. Es folgte eine Hitzedenaturierung bei 95 °C für 5 min im Heizblock. Vor dem Auftrag auf das Gel wurde die Probe 1 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Elektrophorese der Minigele wurde bei einem konstanten Strom von 35 mA durchgeführt. Die Ausgangsspannung betrug etwa 120 V. Nach ca. 1,5 h waren die Proben aufgetrennt. Zur Molmassenabschätzung der Proteinbanden im Gel wurde als Größenstandard ein Gemisch von Markerproteinen eingesetzt. Bei einer Western-Blot-Analyse wurde als Größenstandard eine Mischung von vorgefärbten Markerproteinen mitgeführt. Die Proteinbanden in Polyacrylamidgelen wurden durch Inkubation in einer Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. Polyacrylamidgele wurden 20 bis 30 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend mit der Entfärbelösung unter mehrmaligem Wechseln solange entfärbt, bis der Hintergrund weitgehend farblos und die Proteinbanden deutlich erkennbar waren. Nach dem Waschen in Wasser konnte das Gel im feuchten Zustand photographiert werden. Anschließend wurde es in einer 3 %igen Glycerinlösung äquilibriert, mit der Geltrockenapparatur für 1 h auf 3MM Filter-Papier bei 70 °C im Vakuum getrocknet und in dieser Form aufbewahrt.

<u>Probenauftragspuffer:</u>	65 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	10 % (v/v)	Glycerin
	100 mM	DTT
	2 % (w/v)	SDS
	0,01 % (w/v)	Bromphenolblau
<u>Elektrodenpuffer:</u>	25 mM	Tris-Base
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
<u>30 %ige Acrylamidlösung:</u> (Protogel)	29,2 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	N,N'-Methylenbisacrylamid
<u>Färbelösung:</u>	0,25 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250
	9,2 % (v/v)	Essigsäure, technisch
	45,4 % (v/v)	Ethanol, technisch
	45,15 % (v/v)	Wasser
<u>Entfärbelösung:</u>	10 % (v/v)	Essigsäure, technisch
	30 % (v/v)	Ethanol, technisch
	60 % (v/v)	Wasser

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.3.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei dieser Methode werden 50 µl der Proteinlösung mit 1 ml einer 25 %igen Bradford-Färbelösung (Biorad) gemischt, 5 min inkubiert und die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen. Anhand einer Eichkurve, die mit verschiedenen Verdünnungen von BSA erstellt wurde, wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

3.3.2.2 Proteinbestimmung durch A₂₈₀-Messung

Diese Methode erlaubt eine schnelle und einfache Abschätzung des Proteingehalts von Proben. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, daß die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bei einer Wellenlänge von 280 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen.

Zur Konzentrationsbestimmung genügte ein Probevolumen von 400 µl, das in einer Quarzküvette gegen den proteinfreien Puffer als Referenz gemessen wurde. Die ermittelte Absorption entsprach in etwa der Proteinkonzentration in mg/ml.

3.3.3 Versuche zur Reinigung von Dynamin B aus *D. discoideum*

3.3.3.1 Extraktion von Dynamin B aus *D. discoideum* im analytischen Maßstab

Um die Löslichkeit von rekombinantem Dynamin B zu untersuchen und die Extraktionsbedingungen von Dynamin B zu optimieren, wurde nach folgendem analytischen Extraktionsverfahren vorgegangen. $3 \cdot 10^7$ bis $1 \cdot 10^8$ Zellen wurden entweder aus Schüttelkultur oder von Petrischalen geerntet. Die Zellen wurden mit Lysispuffer ohne Proteaseinhibitoren gewaschen und anschließend in 600 μ l Lysispuffer resuspendiert. Durch Zugabe von 600 μ l Lysispuffer mit 1 % Triton X-100 und 15minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wurde für 30 min bei 15000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Das Pellet wurde mit 500 μ l Lysispuffer gewaschen, nochmals für 15 min wie beschrieben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Extraktion erfolgte durch Zugabe von 50 μ l Lysispuffer unter Zusatz von 10 mM GTP, 300 mM NaCl und 12 mM MgCl₂ mit Hilfe eines Eppendorf-Pistills. Nach einer 20 bis 30minütigen Zentrifugation bei 15000 UpM wurde der Extrakt abgezogen und aufbewahrt. Das verbliebene Pellet wurde gewaschen und in 50 μ l Lysispuffer resuspendiert. Alle Proben wurden zur Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese mit Probenauftragspuffer versetzt.

<u>Lysispuffer:</u>	50 mM	Tris-HCl, pH 8,1
	2 mM	EDTA
	0,2 mM	EGTA
	5 mM	Benzamidin
	1 mM	DTT (alternativ 7 mM β -Mercaptoethanol)
	2 μ g/ml	Pepstatin
	5 μ g/ml	Leupeptin
	80 μ g/ml	TPCK
	100 μ g/ml	TAME
	0,1 mM	PMSF

3.3.3.2 Testen der Bindung von Dynamin B an verschiedene Säulenmaterialien

Bevor eine präparative Reinigung von Dynamin B durchgeführt werden konnte, wurde zunächst im analytischen Maßstab untersucht, an welches Säulenmaterial Dynamin B bindet. Für Histidin-markiertes Dynamin B kam hierbei die Bindung an Ni-NTA in Frage. Hierzu wurde eine Minisäule präpariert. 1 ml Ni-NTA-Suspension (Qiagen) wurde dreimal mit 50 mM Hepes, pH 7,3 gewaschen und jeweils bei 2000 UpM in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach dem letzten Waschen wurde das Säulenmaterial in einem Gesamtvolumen von 1 ml desselben Puffers aufgenommen. 100 μ l dieser Suspension wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben, das vorher mit etwas Glaswolle gefüllt und am spitzen Ende mit einem kleinen Loch versehen worden war. Der Überstand der GTP-Extraktion aus 3.3.3.1 wurde auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 50 mM Hepes, pH 7,3 unter Zusatz

von 40 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte mit Hepespuffer, der 2 mM EDTA enthielt.

Für die Bindungstests von Dynamin B an die Anionenaustauschmaterialien DEAE (DEAE-Toyopearl 650S von Tosoh, Japan) und SuperQ (SuperQ-Toyopearl 650S von Tosoh, Japan) wurden die Anionenaustauschermaterialien nach 10maligem Waschen mit Lysispuffer, der 50 mM NaCl enthielt, 1 h bei 4 °C äquilibriert. 50 µl an Feststoff wurde in einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß mit 250 µl der Probe inkubiert. Bei der Probe handelte es sich entweder um einen GTP-Extrakt aus $2,5 \cdot 10^8$ Zellen oder um den Überstand der Zentrifugation nach der Zellyse. Diese Mischung wurde 2 h bei 4 °C rotiert, danach 3 min bei 13000 UpM in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand aufbewahrt. Das Sediment wurde durch Zugabe von Lysispuffer mit 50 mM NaCl unter Schwenken gewaschen und der Überstand nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 13000 UpM verworfen. Anschließend wurde mit 100 µl Lysispuffer unter Zusatz von 500 mM NaCl eluiert. Vor der Entnahme des Eluats wurde 10 min auf Eis inkubiert.

3.3.4 Isolierung eines Dynamin B-Fragments als Antigen für die Antikörperproduktion

3.3.4.1 Klonierung des Dynamin B-Fragments in den Expressionsvektor

Für die Gewinnung von polyklonalen Antiseren gegen Dynamin B wurde ein bakteriell exprimiertes Fusionsprotein aus 155 Aminosäuren von Dynamin B mit einem aminoterminalen Hexa-Histidinpeptid erzeugt. Zunächst wurde ein entsprechendes DNA-Fragment in einen bakteriellen Expressionsvektor inseriert, um das Plasmid pQE30-Kpn/Hd herzustellen. Hierfür wurde das Plasmid pA3-1b, das den cDNA-Klon enthielt (s. 3.2.8.2), mit den Enzymen *Hind* III und *Asp* 718 geschnitten. Auf diese Weise wurde aber nicht nur das gewünschte 462 Bp große *Kpn* I/*Hind* III-Insert erhalten, sondern auch ein 461 Bp großes *Hind* III/*Kpn* I-Fragment, da sich in gleichen Abständen von der *Hind* III-Schnittstelle stromaufwärts und stromabwärts je eine *Kpn* I-Schnittstelle im Gen befindet. Nach der Isolierung der beiden Fragmente wurden sie zwischen die *Hind* III- und *Asp* 718-Schnittstelle des Expressionsvektors pQE-30 (Qiagen) eingefügt. Das Mengenverhältnis von Vektor zu Insert betrug bei der Ligation 1:3,3. Nach der Ligation gemäß 3.2.4.3, wurden 2 µl (13 ng DNA) des Ligationsansatzes entsprechend 3.2.2.2 in den *E. coli*-Stamm XL-1-Blue (55 µl Zellsuspension) transformiert. Es wurden mehr als 500 Transformanten erhalten. Aus 24 von ihnen wurde die Plasmid-DNA isoliert und einem Restriktionsverdau mit *Eco* RI/*Xba* I unterzogen. 11 Klone wiesen das richtige Bandenmuster mit den Fragmentgrößen 2,4, 1,1 und 0,4 kBp auf. Das Plasmid mit dem anderen *Hind* III/*Kpn* I-Insert ergab dagegen Fragmente der Größen 2,4 und 1,5 kBp.

Für die Proteinexpression wurde die Plasmid-DNA eines positiven Klons in den *E. coli*-Stamm SG 13009 (Quiagen) eingeführt. Die Transformation erfolgte mit der CaCl_2 -Methode nach 3.2.2.1 (5 µl DNA/100 µl Zellsuspension). 50, 100 und 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf Ampicillin- (100 µg/ml) und Kanamycin- (25 µg/ml) haltigen LB-

Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf allen 3 Platten waren zahlreiche Klone gewachsen, so daß von der Platte mit den wenigsten Kolonien (50 µl Ansatz) 12 Klone isoliert wurden.

3.3.4.2 Testen der Expression und der Löslichkeit des Dynamin B-Fragments

Um die Expression des Dynamin B-Fragments zu testen, wurde je 0,6 ml Ampicillin- (100 µg/ml) und Kanamycin- (25 µg/ml) haltiges LB-Medium mit den 12 isolierten Bakterienkolonien angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 UpM geschüttelt. Von diesen Kulturen wurden 150 µl entnommen und zu je 3 ml Ampicillin- und Kanamycin-haltigem Medium in 15 ml-Kulturröhrchen gegeben. Die Bakterien wurden bei 37 °C unter starkem Schütteln (300 UpM) solange inkubiert, bis sie eine Dichte OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 erreichten. Dies war nach ca. 1,5 h der Fall. Von einer Kultur wurde 1 ml als nicht induzierte Vergleichsprobe entnommen, zentrifugiert und das Pellet in 50 µl 5x Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurde zu allen Kulturen IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM gegeben, um die Expression des Fusionsproteins zu induzieren. Nach 4,5 h Induktionsdauer wurden jeweils 1 ml entnommen und das Pellet nach Zentrifugation in 100 µl 5x Probenpuffer resuspendiert. Es wurden 10 µl von jeder Probe auf ein 15 %iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Proteine durch Elektrophorese getrennt.

Vor der präparativen Isolierung des Fusionsproteins mußte bestimmt werden, ob es in löslicher oder unlöslicher Form in der Zelle vorliegt. Dazu wurde von Klon 1 eine 20 ml-Kultur angesetzt. Nach einer Induktionszeit von 4,5 h wurden 10 ml der Bakteriensuspension entnommen und 20 min bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Bakterien wurden durch eine halbstündige Inkubation mit 1 mg/ml Lysozym in Lysispuffer auf Eis lysiert, gefolgt von zweimaligem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen („Freeze-Thaw“-Methode). Das Lysat wurde anschließend 30 min bei 4 °C und 13 000 UpM in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1 ml 2x Probenpuffer aufgenommen und das Sediment in 1 ml Lysispuffer. Außerdem wurde das Pellet nach der Lyse zweimal mit Extraktionspuffer extrahiert, um membranassoziertes Protein in Lösung zu bringen.

Lysispuffer: 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0; 300 mM NaCl

Extraktionspuffer: 0,25 % Tween-20 und 0,1 mM EGTA in Lysispuffer

3.3.4.3 Präparative Isolierung des Dynamin B-Fragments

3 l Ampicillin- (100 µg/ml) und Kanamycin- (25 µg/ml) haltiges LB-Medium wurden mit 66 ml einer Übernachtskultur von Klon 1 angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde bei 270 UpM und 37 °C 2,5 h inkubiert bis eine Zelldichte von OD₆₀₀ 0,6 erreicht war. Anschließend wurde 4,5 h mit 1 mM IPTG induziert. Vor und nach der Induktion wurden jeweils 1 ml der Suspension als nicht induzierte und induzierte Kontrolle entnommen und in 50 bzw. 100 µl 5x Probenpuffer aufgenommen. Die restlichen Bakterien wurden 20 min bei

4000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Nach Bestimmung des Nassgewichts der Bakterien (13 g), wurde das Pellet in 40 ml Lysispuffer (3 ml Lysispuffer/g Nassgewicht) resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte mechanisch mit der *French-Press*, wobei die Bakterien mit hohem Druck (hier 1000 Psi) durch eine Kapillare gepreßt werden und aufgrund der Scherkräfte aufplatzen. Das Lysat wurde 15 min bei 12000 g in der Kälte zentrifugiert und der Überstand verworfen. So wurden die löslichen Proteine in einem ersten Reinigungsschritt von dem im Pellet befindlichen zu isolierendem Protein abgetrennt. Der Feststoff wurde in 40 ml Waschpuffer 1 resuspendiert und über Nacht auf Eis aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde erneut 15 min bei 12000 g zentrifugiert, um ein festes braunes Sediment zu erhalten, daß die Einschlußkörper enthielt. Dieses wurde 1x mit Waschpuffer 2 und 2x mit Waschpuffer 3 gewaschen. Waschpuffer 1 und 2 enthielten kein EDTA, da dieses mit den Nickel-Ionen des Säulenmaterials interagiert. Durch Zugabe von 40 ml Denaturierungspuffer und 45 minütigem Rühren bei Raumtemperatur konnte der Feststoff solubilisiert werden. Die trübe Flüssigkeit wurde 2x bei 12000 g für 15 min zentrifugiert. Der nun klare, gelbliche und leicht viskose Überstand konnte auf die mit Denaturierungspuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgebracht werden.

Die chromatographische Reinigung fand bei Raumtemperatur statt, da das Protein in der konzentrierten Harnstofflösung bei 4 °C ausfiel. Die Reinigung erfolgte mittels einer peristaltischen Pumpe. Nach Auftragen der Probe auf die Säule wurde mit 7 Säulenvolumina an Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch Erhöhung des pH-Wertes. Zunächst wurde mit Elutionspuffer 1 eluiert, wobei 3 10 ml-Fractionen aufgefangen wurden und dann mit Elutionspuffer 2 (2 10 ml-Fractionen). Die letzten 4 Fractionen wurden nach der Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese vereinigt. Sie wurden über Nacht 2x gegen eine 40 mM Hepeslösung, pH 7,3 mit 1 mM EDTA (2 x 4 l) dialysiert und anschließend 5 h gegen Wasser. Das Fusionsprotein fiel dabei als weißer Feststoff aus. Die Ausbeute betrug ca. 21 mg. 4 mg des Fusionsproteins wurden in lyophilisierter Form als Antigen für die Immunisierung verschickt. Nach der ersten Injektion des Antigens folgten vier Verstärkungsinjektionen in Abständen von zwei bis vier Wochen.

Für die Lyse und Solubilisierung benötigte Puffer:

<u>Lysispuffer:</u>	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 mM Polymethansulfonsäurefluorid (PMSF)
<u>Waschpuffer 1:</u>	10 mM EDTA und 0,05 % Triton X-100 in Lysispuffer
<u>Waschpuffer 2:</u>	wie Waschpuffer 1 aber ohne EDTA
<u>Waschpuffer 3:</u>	wie Waschpuffer 1 aber ohne EDTA und ohne Triton X-100
<u>Denaturierungspuffer:</u>	8 M Harnstoff; 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM PMSF

Für die Affinitätschromatographie benötigte Puffer:

<u>Waschpuffer:</u>	8 M Harnstoff; 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,3; 10 mM Tris-HCl, pH 6,3; 0,1 mM PMSF
<u>Elutionspuffer 1:</u>	8 M Harnstoff; 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,9; 10 mM Tris-HCl, pH 5,9; 0,1 mM PMSF
<u>Elutionspuffer 2:</u>	8 M Harnstoff; 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 4,5; 10 mM Tris-HCl, pH 4,5; 0,1 mM PMSF
<u>Chromatographiesäule:</u>	Durchmesser: 1 cm, Betthöhe: 12 cm
<u>Chromatographiematerial:</u>	Ni-NTA Superflow TM (Qiagen)

3.3.5 Affinitätsreinigung der Antikörper

In einem polyklonalen Antiserum befinden sich neben Immunglobulinen, die spezifisch an das gewünschte Antigen binden, auch solche, die fremde Epitope erkennen. Diese Antikörper können bei Western-Blot-Analysen und bei der Immunfluoreszenz zu unspezifischen Signalen führen. Solche störenden Antikörper können durch Affinitätsreinigung entfernt werden, indem die spezifischen Immunglobuline an das immobilisierte Antigen, das für die Immunisierung verwendet wurde, gebunden und in geeigneter Weise wieder eluiert werden.

3.3.5.1 Kopplung des Antigens an das Säulenmaterial

3 mg der Proteinprobe, die als Präzipitat in HEPES-Puffer vorlag (s. 3.3.4.3), wurde für 15 min bei 14000 UpM und 4 °C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand enthielt kein Protein wie mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft wurde. Der Feststoff wurde in 3 ml einer 4 M Harnstofflösung mit 40 mM HEPES, pH 7,2 und 20 mM NaCl resuspendiert, worauf er sich größtenteils, aber nicht vollständig löste. Die gelelektrophoretische Analyse zeigte, daß sich das Protein wie erwartet in dieser Fraktion befand. Als Säulenmaterial wurde Affi-Gel 10 (Biorad) verwendet. 1 ml der Affi-Gel 10-Isopropanol-Suspension wurde mehrmals mit eiskaltem Wasser gewaschen, um den Alkohol zu entfernen. Das Gel wurde gemeinsam mit der proteinhaltigen Flüssigkeit in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und über Nacht bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Um die Vollständigkeit der Kopplungsreaktion zu kontrollieren, wurde der Überstand nach fünfminütiger Zentrifugation bei 3000 UpM mittels Gelelektrophorese untersucht. Das Fehlen einer Bande auf dem SDS-Gel sowie die Proteingehaltsbestimmung mittels Bradford zeigten, daß das gesamte Protein an das Säulenmaterial gekoppelt war. Zur Inaktivierung möglicher Estergruppen wurde 1 h mit 100 mM Ethanolamin in 40 mM HEPES, pH 7,2 und 20 mM NaCl unter Rotieren geblockt. Anschließend wurde 2x mit 5 ml kaltem HEPES/NaCl-Puffer gewaschen und 2x mit einer 100 mM Glycinlösung, pH 2,5. Danach wurde das Säulenmaterial solange mit einer 50 mM Tris-Puffer, pH 7,2 behandelt bis der pH-Wert des Überstands neutral blieb. Das Gel wurde in demselben Puffer in einem Gesamtvolumen von 1 ml aufbewahrt und konnte für mehrere Reinigungen verwendet werden.

3.3.5.2 Chromatographische Reinigung der Antiseren

1,5 ml des Antiserums (Kaninchen SA 6256, 3. Verstärkungsinjektion) wurde mit 150 µl 10x TBS versetzt und mit dem Säulenmaterial (1 ml) über Nacht unter Rotieren inkubiert. Diese Suspension wurde in eine Säule (Qiagen, Größe 20), deren Inhalt bis auf die Fritte entfernt wurde, gefüllt. Am Ausgang der Säule wurde ein kleiner Schlauch mit Schlauchklemme befestigt, um die Tropfgeschwindigkeit regulieren zu können. Diese betrug etwa 70 Tropfen pro Minute. Der Durchfluß wurde aufbewahrt und die Säule mit 10 ml TBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit 4 ml 100 mM Glycinlösung, pH 2,5. Die Fraktionen wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäßen gesammelt, in denen 100 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0 vorgelegt waren, um die Proben schnellstmöglich zu neutralisieren. Es wurden acht 0,5 ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen 1 bis 3 und 4 bis 8 wurden jeweils vereinigt.

Schließlich wurden die Antikörperlösungen durch Zentrifugation in Centricon 50-Röhrchen (Amicon) mit einem Ausschlußvolumen von 50 kDa aufkonzentriert. Vorher wurde zur Stabilisierung der Antikörper BSA beigefügt. Die Konzentration an BSA betrug nach der Aufkonzentrierung 1 mg/ml. Das Endvolumen war jeweils 400 µl.

3.4 Immunchemische Methoden

3.4.1 Western-Blot-Technik

Durch die Western-Blot-Technik werden Proteinproben, die vorher durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Kyhse-Andersen, 1984). Der Nachweis der Proteine erfolgt dann durch Inkubation mit spezifischen Erst- und Zweitantikörpern und einer nachfolgenden Färbereaktion.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde die Transfer-Einheit wie folgt zusammengebaut:

Anode der Blot-Apparatur

3MM-Filterpapiere, in Transferpuffer getränkt (3 Stück)

Nitrocellulosemembran, in Transferpuffer getränkt

Polyacrylamidgel

3MM-Filterpapiere, in Transferpuffer getränkt (3 Stück)

Kathode der Blot-Apparatur

Die einzelnen Lagen wurden luftblasenfrei zu gestapelt. Um Kurzschlüsse zu vermeiden, mußten Filterpapiere und Nitrocellulosemembran exakt auf Gelgröße zurechtgeschnitten, sowie überschüssiger Transferpuffer entfernt werden.

Der elektrophoretische Transfer auf die Nitrocellulosemembran erfolgte über eine Zeitspanne von 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 1,5 mA/cm² Gelfläche.

Nach Beendigung des Transfers der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde das Polyacrylamidgel entweder verworfen oder zur Überprüfung der Transfereffektivität einer Coomassiefärbung unterzogen. Die Nitrocellulosemembran wurde zur unspezifischen Färbung der Proteinbanden für 5 min in eine Ponceau S-Färbelösung getaucht.

Die rotgefärbte Membran wurde zweimal mit Wasser gewaschen bis die Proteinbanden gut vor dem hellen Hintergrund zu erkennen waren. Anschließend konnte die Nitrocellulosemembran beschriftet und nach Bedarf mit einem Skalpell zerteilt werden.

Die Entfärbung der Membran erfolgte durch Waschen mit TBST. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 1 h bei RT wahlweise in TBST-BSA oder TBST-MP geschwenkt. Der Erstantikörper wurde in TBST-BSA bzw. TBST-MP verdünnt und die Membran darin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei 10minütige Waschschritte mit TBST. Der Zweitantikörper wurde 1:10000 in TBST verdünnt und die Membran 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen, kurz mit TBS gespült und für 10 min in TBS, das 1 M NaCl enthielt, inkubiert. Zum Schluß wurde dreimal 10 min mit TBS gewaschen.

Die Detektion des Zweitantikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham) nach Herstellerangabe. Der Blot wurde 1 min in der Substratlösung, die 1:1 mit Wasser verdünnt wurde, inkubiert und anschließend trockengetupft. Die Exposition erfolgte entsprechend der Signalstärke auf Röntgenfilm für 10 bis 90 s.

Transferpuffer: 48 mM Tris
 39 mM Glycin
 0,037 % (w/v) SDS
 8 % (v/v) Methanol

Ponceau S-Färbelösung: 0,2 % (w/v) PonceauS
 3 % (w/v) Trichloressigsäure

TBST-BSA: 3 % (w/v) BSA in TBST

TBST-MP: 4 % (w/v) Milchpulver in TBST

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Kultivierung von *D. discoideum*-Zellen

D. discoideum-Zellen wurden entweder in Schüttelkultur (180 UpM) oder auf Petrischalen in HL5c-Medium bei einer Temperatur von 21 °C kultiviert. Für die Selektion und das Wachstum von transformierten Zellen wurde dem Medium 10 µg/ml G418 bzw. 4 µg/ml Blasticidin S zugefügt.

In Schüttelkulturen wurden die Zellen bis zu einer Dichte von 4 bis $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml angezogen. Ab $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml beginnt die Wachstumskurve in die stationäre Phase überzugehen. Die Zelldichte in Suspension wurde mit Hilfe eines Hämacytometers bestimmt. Kulturen auf Petrischalen wurden bei Erreichen der Konfluenz mit HL5c-Medium ab gespült und gegebenenfalls eine neue Petrischale angeimpft.

Für die Isolierung klonaler Zelllinien wurden Zellen auf SM-Agarplatten (Durchmesser 14 cm) kultiviert. Dazu wurden 50 bis 100 Zellen mit 500 µl einer Suspension von *Klebsiella aerogenes*-Bakterien in MES-Puffer vermischt und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Nach ca. drei Tagen zeigten sich die *D. discoideum*-Kolonien als kleine Freßhöfe (Plaques) auf dem Bakterienrasen. Am Rand dieser Plaques befinden sich die vegetativen Zellen, die mit Hilfe eines Zahnstochers in andere Kulturen überführt werden können.

3.5.2 Konservierung von *D. discoideum*-Zellen

3.5.2.1 Einfrieren von *D. discoideum*-Zellen

Zur Konservierung von *D. discoideum*-Zellen wurden axenisch gewachsene Zellen geerntet und mit einer Dichte von $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium (HL5c + 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots auf Einfrier Röhrchen verteilt, die auf Eis gehalten wurden. Um eine langsame Einfrier rate zu erreichen, wurden die Röhrchen in einen Behälter überführt, der mit einem Handtuch umwickelt wurde. Die Zellen wurden dann zunächst bei -20 °C für 2 bis 4 h aufbewahrt, bevor sie bei -80 °C gelagert wurden. Um eingefrorene Zellen wieder anzuziehen, wurde eine Ampulle auf Eis aufgetaut, die Zellen sofort zweimal mit kaltem HL5c-Medium gewaschen und in eine Petrischale mit HL5c-Medium überführt. Bei Transformanten wurde nach 24 h das Medium gewechselt und das entsprechende Antibiotikum zugegeben.

3.5.2.2 Konservierung von *D. discoideum*-Sporen

Axenisch gewachsene *D. discoideum*-Zellen wurden zweimal mit kaltem MES-Puffer gewaschen und mit einer Dichte von $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 500 µl auf einer MES-Agarplatte (Durchmesser 9 cm) ausgestrichen und in der Sterilbank für 10 min getrocknet. Die Agarplatten wurden auf den Kopf gestellt und die Zellen

entwickelten sich innerhalb von 24 bis 48 h zu Fruchtkörpern. Die Sporen wurden durch Abklopfen im Deckel einer Petrischale gesammelt. Die Sporen einer Agarplatte wurden in 500 µl 10 % Glycerin-Lösung resuspendiert, in 100 µl Aliquots auf Einfrierröhrchen verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zum Animpfen wurde ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut und in eine Petrischale mit HL5c-Medium überführt.

3.5.3 Transformation von *D. discoideum*-Zellen

Für die Transformation von *D. discoideum*-Zellen wurden Zellen aus Schüttelkultur oder von Petrischalen geerntet, zweimal in EP-Puffer gewaschen und bei einer Zelldichte von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml in demselben Puffer resuspendiert. 800 µl dieser Zellsuspension wurden mit 10 µg Plasmid-DNA gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Außer bei der Transformation von AX3-ORF-Zellen wurden der Transformationsmischung auch 10 µg des Plasmids pREP zugefügt. Die Cotransformation mit pREP ermöglicht die autonome Replikation von Expressionsvektoren in *D. discoideum*-Zellen. Die Zellsuspension wurde zur Transformation in eine gekühlte Elektroporationsküvette (0,4 cm) überführt, die in die Elektrodenkammer der *Gene-Pulser*-Apparatur geschoben wird. Der Elektroporationsimpuls erfolgte bei 1,2 kV, 25 µF und 600 Ω, was eine Zeitkonstante von etwa 0,8 ms ergab. Nach dem Impuls wurde der Transformationsansatz für 15 min auf Eis gekühlt und anschließend auf zwei bis drei Petrischalen mit je 10 ml HL5c-Medium verteilt. 18-24 h nach der Transformation wurde das Medium gegen Selektionsmedium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausgetauscht. Das Selektionsmedium wurde täglich gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Nach 5 bis 10 Tagen wurden in der Regel die ersten Kolonien sichtbar, die durch Absaugen mittels einer Pipettierhilfe auf Petrischalen (Durchmesser 4 cm) mit Selektionsmedium überführt wurden. Alternativ konnten die Kolonien auch mit einer Bakteriensuspension von *K. aerogenes* gemischt und auf SM-Agarplatten ausgestrichen werden.

3.5.4 Funktionelle Analysen von *D. discoideum*-Zellen

3.5.4.1 Messung der Pinocytose

Für die Messung der Aufnahme von flüssiger Phase in *D. discoideum*-Zellen wurde Fluorescein-markiertes Dextran (FITC-Dextran) als fluoreszenzmikroskopisch nachweisbare und quantifizierbare Markersubstanz verwendet (Bacon *et al.*, 1994).

D. discoideum-Zellen wurden bis zur Konfluenz auf 9 cm-Petrischalen kultiviert und mit einer Lösung von 1 mg/ml FITC-Dextran in HL5c-Medium inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurde die FITC-Dextran-Lösung abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem 200 mM Phosphatpuffer, pH 6,3 und einmal mit eiskaltem 50 mM Phosphatpuffer, pH 9,2 gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 1 ml des 50 mM Phosphatpuffers, pH 9,2 von der Petrischale abgespült, in ein Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 150 µl

0,4 %iger Triton X-100-Lösung lysiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 8000 UpM wurde der Überstand abgenommen und die Fluoreszenz des Zellysats bei einer Anregungswellenlänge von 493 nm und einer Emissionswellenlänge von 516 nm gemessen. Die Fluoreszenzdaten wurden auf den Proteingehalt des Zellysats genormt, der gemäß 3.3.2.1 bestimmt wurde. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität wurde graphisch gegen die Zeit aufgetragen.

3.5.4.2 Messung der Phagozytose

3.5.4.2.1 Messung der Phagozytose mit Fluoreszenz-markierten Polystyrol-Partikeln

Für die quantitative Messung der phagozytotischen Aktivität von *D. discoideum*-Zellen wurden Fluoreszenz-markierte Polystyrol-Kügelchen verwendet. Die Zellen wurden bei einer Dichte von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Schüttelkultur mit den Polystyrol-Kügelchen im Verhältnis 1:100 inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde 1 ml der Schüttelkultur entnommen und mit 4 ml eiskaltem MES-Puffer, pH 6,5 vermischt. Diese Mischung wurde in einem 15 ml-Röhrchen auf 8 ml 20 %ige PEG-8000 Lösung in MES-Puffer geschichtet und bei 2000 g und 4 °C für 10 min im *Swing-out*-Rotor zentrifugiert. Diejenigen Polystyrol-Kügelchen, die nicht in die Zellen aufgenommen worden waren, wurden bei diesem Schritt abgetrennt. Die oberste Schicht und die PEG-Lösung wurden vorsichtig durch Absaugen entfernt. Das Sediment wurde zweimal mit GS-Puffer gewaschen und in 0,1 ml GSO-Puffer lysiert. Das Zellysat wurde mit GS-Puffer auf 1 ml verdünnt und die Fluoreszenz des Lysats bei einer Anregungswellenlänge von 595 nm und einer Emissionswellenlänge von 644 nm gemessen. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität wurde graphisch gegen die Zeit aufgetragen.

GS-Puffer: 5 mM Glycin, pH 8,5
 100 mM Saccharose

GSO-Puffer: 5 mM Glycin, pH 8,5
 100 mM Saccharose
 1 % n-Octylglucosid

3.5.4.2.2 Messung der Phagozytose mit Fluoreszenz-markierten Hefen

10 ml *D. discoideum*-Zellen ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) in HL5c-Medium wurden mit FITC-markierten Hefezellen ($1,2 \cdot 10^7$ Zellen/ml) in einem 25 ml-Erlenmeyerkolben bei 150 UpM geschüttelt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde 1 ml dieser Mischung entnommen, 100 µl einer Trypanblau-Lösung zugegeben und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 3 min bei 500 g zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Die Fluoreszenz dieser Suspension wurde bei einer Anregungswellenlänge von 493 nm und einer Emissionswellenlänge von 516 nm gemessen und die erhaltenen Werte auf die Zellzahl normiert und gegen die Zeit aufgetragen.

Trypanblau-Lösung: 150 mM NaCl, 20 mM Natriumcitrat, pH 4,4 und 2 mg/ml Trypanblau wurden in Wasser gelöst und 30 min bei RT gerührt. Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter und anschließend durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert.

Phosphatpuffer: 17 mM Natrium-Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0

3.5.4.3 Analyse der Adhäsivität von *D. discoideum*-Zellen

Zur Messung der Adhäsion auf Oberflächen wurden 4 ml einer Zellsuspension ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) in 50 ml-Erlenmeyerkolben gegeben und stehengelassen (Vogel, 1983). Nach 45 min wurden die Kolben für 3 min bei 80 UpM geschüttelt und die Zellzahl im Überstand mittels eines Hämocytometers bestimmt.

Um die Zell-Zell-Adhäsion von *D. discoideum*-Zellen zu untersuchen, wurden diese bei einer Ausgangszelldichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml über einen Zeitraum von 3 Tagen in Suspensionskultur wachsen gelassen. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Zellen mittels eines Hämocytometers gezählt. Hierbei wurde zum einen die Zellzahl der nicht aggregierten Zellen bestimmt, d.h. Zellaggregate wurden nicht berücksichtigt, zum anderen wurde die tatsächliche Zellzahl bestimmt, indem die Zellen vor dem Zählen durch 20maliges Auf- und Abpipettieren (gelbe Pipettenspitze) vereinzelt wurden. Die Differenz der beiden Werte wurde graphisch gegen die tatsächlichen Zelldichten aufgetragen.

3.5.4.4 Wachstum auf Bakterienrasen

Um das Wachstumsverhalten von *D. discoideum*-Zellen auf Bakterienrasen zu untersuchen, wurden 100 Zellen mit *K. aerogenes*-Bakterien in MES-Puffer gemischt und auf eine 1/3 SM-Agarplatte verteilt. Da viele der Zellen die vorangegangene Verdünnungsprozedur nicht überleben, resultiert diese Ausgangszellzahl erfahrungsgemäß in einer für den Versuch angemessenen Anzahl an Freßhöfen. Die Platten wurden über Kopf für mehrere Tage bei 21 °C inkubiert. Nach Erscheinen der ersten Freßhöfe (nach ca. 3 Tagen) wurden deren Durchmesser in regelmäßigen Abständen mit Hilfe eines Lineals gemessen. Da in einem Zeitrahmen von 3 bis 4 Tagen nach Sichtbarwerden der ersten Freßhöfe immer noch neue Plaques erscheinen, wurden die Plaques auf der Plattenunterseite farbig markiert. Diejenigen Plaques, die am gleichen Tag erschienen sind, wurden mit der gleichen Farbe gekennzeichnet. In die Auswertung gingen jeweils nur die Durchmesser von Freßhöfen ein, die mit derselben Farbe markiert worden waren.

Für die Bestimmung der absoluten Wachstumsgeschwindigkeiten wurden die Meßdaten, die im linearen Bereich lagen, gegen die Zeit aufgetragen und einer linearen Anpassung (*Fit*) unterzogen. Aus den erhaltenen Steigungen wurden für jede Zelllinie die Mittelwerte (aus drei bis sechs unabhängigen Messungen) gebildet.

3.5.4.5 Analyse der Osmostabilität von *D. discoideum*-Zellen

Um die Osmostabilität von *D. discoideum*-Zellen zu untersuchen wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und dreimal im jeweiligen Inkubationsmedium gewaschen. Die Inkubation unter hypertonen (350 mM Sorbitol in MES-Puffer), isotonischen (HL5c-Medium) und hypotonischen (Aqua dest.) Bedingungen erfolgte unter Schütteln (180 UpM) bei 21 °C für 1 h. Für die Quantifizierung der Überlebensrate wurde ein Äquivalent von 100 Zellen auf einen Bakterienrasen mit *K. aerogenes* ausgestrichen und die Anzahl der Freßhöfe nach 96 h gezählt. Um sicherzustellen, daß einzelne Zellen und keine Zellaggregate ausplattiert wurden, war den Medien vor der einstündigen Inkubation 5 mM EDTA zugesetzt worden. EDTA verhindert die Zell-Zell-Adhäsion. Die Anzahl der Freßhöfe, die von den osmotisch gestreßten Zellen stammten, wurde auf die Anzahl der Freßhöfe normiert, die von den Zellen, die unter isotonischen Bedingungen (HL5c-Medium) inkubiert worden waren, normiert.

3.5.4.6 Funktionelle Analyse der Mitochondrien

Für die funktionelle Untersuchung des mitochondrialen Systems wurde die enzymatische Aktivität des mitochondrialen Markerenzym Succinat-Dehydrogenase in Gesamtzellysaten von *D. discoideum*-Zellen gemessen. Die Zellen wurden in MES-Puffer gewaschen, bei einer Zelldichte von $3 \cdot 10^7$ Zellen/ml resuspendiert und durch Passage durch einen 5 µm-Filter (Schleicher & Schüll, Dassel) lysiert. Zur Messung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität wurden 10 bis 50 µl des Gesamtzellysats mit einem Puffer, der sich aus 40 mM Natriumphosphat (pH 7,4), 250 µg/ml Tetranitrobluetetrazoliumchlorid und 10 mM Natriumsuccinat zusammensetzte, gemischt (Gesamtvolumen 500 µl) und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 bis 60 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 4 %iger SDS-Lösung gestoppt und die Absorption bei 570 nm gemessen. Als Negativkontrollen wurde in einem Ansatz das Gesamtzellysat und in einem anderen Ansatz das Natriumsuccinat weggelassen. Die Werte der Succinat-Dehydrogenase-Messung wurden auf den Gesamtproteingehalt der Zelle normiert.

3.6 Mikroskopische Methoden

3.6.1 Fixierung von *D. discoideum*-Zellen

Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Gefriersubstitution (Neuhaus *et al.*, 1998). Eine Zellsuspension mit einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ bis $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in HL5c-Medium wurde auf Saphir-Deckgläser der Stärke 0 mit einem Durchmesser von 12 mm gebracht, worauf sich die Zellen innerhalb von 15 min anhafteten. Die Deckgläser wurden in HL5c-Medium gewaschen und zur Fixierung in Methanol, der auf -85 °C vorgekühlt war, überführt. In einem temperierbaren Gefäß wurden die Proben dann innerhalb von 30 bis 45 min von -85 °C auf -35 °C aufgewärmt. Bei dieser Behandlung wurden die Proteine durch Präzipitation fixiert und gleichzeitig die Plasmamembran für die anschließende Immunfluoreszenzfärbung permeabilisiert. Die Proben wurden aus dem Methanol genommen und zur Rehydratisierung und Entfernung des Methanols bei Raumtemperatur in PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde 5 min in PBS-BSA (3 % (w/v) BSA in PBS) inkubiert.

3.6.2 Immunfluoreszenzfärbung von fixierten *D. discoideum*-Zellen

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Technik kann das Protein, gegen das der Antikörper gerichtet ist, in seiner physiologischen Umgebung detektiert und mikroskopisch lokalisiert werden. Dazu werden fixierte *D. discoideum*-Zellen mit dem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Der Antikörper-Antigen-Komplex läßt sich dann fluoreszenzmikroskopisch sichtbar machen, indem ein Zweitantikörper zugegeben wird, der für den ersten spezifisch und außerdem mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist.

Für die Detektion des zu lokalisierenden Antigens wurden die Deckgläschen in der Erstantikörperlösung für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit der Zweitantikörperlösung für 20-30 min. Danach wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen und zur Entsalzung mehrmals in Wasser getaucht, bevor sie in dem Einbettmedium auf Objektträgern fixiert wurden.

Einbettmedium: ProLongTM Mounting Medium (Molecular Probes), welches nach Herstellerangaben vor Benutzung mit dem ProLongTM Antifade Reagenz (Molecular Probes) vermischt wurde.

3.6.3 Mikroskopie der fixierten Zellen

Die Analyse der Präparate erfolgte an einem Leica DM/IRB Konfokalmikroskop mit einem 63x Plan-Apo Objektiv (numerische Apertur N.A. 1,40). Konfokale optische Schnitte wurden mit einer Schrittweite von 0,2 bis 0,4 μm und 8facher Mittelung angefertigt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm Imaris, Version 2.7 (Bitplane, Zürich).

3.6.4 Mikroskopie von lebenden Zellen

Die Zellen wurden in MES-Puffer gewaschen und in geeigneter Dichte in Borosilikatkammern für die Mikroskopie (Lab-Tek[®]-Kammern von NalgeNunc) oder auf Deckgläser überführt. Die Analyse der Zellen für die Phasenkontrastaufnahmen erfolgte an einem Zeiss Axiovert 135 Mikroskop mit angeschlossener CCD-Kamera PCO VX44 und dem Bildverstärkungssystem Hamamatsu Argus 20.

Die Epifluoreszenz-Aufnahmen wurden an einem Olympus IX 70-Mikroskop mit angeschlossener 12-Bit CCD-Kamera Imago S-V6A (T.I.L.L. Photonics, Martinsried) durchgeführt. Die Steuerung der Kamera, des Monochromators und des Shutters sowie die Bildanalyse erfolgten mit dem Programm TILLvisION, Version 3.3 (T.I.L.L. Photonics, Martinsried).

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung und Isolierung des *dymB*-Gens

Vor dieser Arbeit konnte bereits ein erstes Dynamamin-Homologes, *dymA*, in *D. discoideum* identifiziert und isoliert werden (Wienke, Dissertation, 1998). Bei der Restriktionsanalyse genomischer DNA aus *D. discoideum* wurden auf Southern-Blots neben den von *dymA* stammenden Banden auch zusätzliche schwächere Banden detektiert, wenn eine Sonde verwendet wurde, deren DNA-Sequenz komplementär zum konservierten Bereich von *dymA* war. Dies war ein erster Hinweis darauf, daß *D. discoideum* möglicherweise neben *dymA* noch ein oder mehrere Dynamamin-Homologe besitzt, die aufgrund ähnlicher DNA-Sequenz ebenfalls mit der Sonde hybridisieren.

4.1.1 Identifizierung von *dymB* mit Southern-Blot-Analyse

Zunächst wurde ein genomischer Klon isoliert, der das gesuchte Gen oder eine Teilsequenz des Gens enthielt. Hierfür wurde genomische DNA aus AX2-Wildtypzellen und *dymA*⁻-Zellen mit Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente geschnitten und diese gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Es wurden solche Restriktionsenzyme verwendet, die erfahrungsgemäß im Genom von *D. discoideum* nicht zu häufig schneiden, um keine zu kleinen Fragmente zu erzeugen, und die zudem kohäsive Fragmentenden produzieren, um die anschließende Klonierung zu erleichtern. Die Fragmente wurden auf eine Nylonmembran übertragen. Diese wurde mit einer Sonde inkubiert, die mit dem Fragment, welches das gesuchte Gen enthält, hybridisieren sollte. Entscheidend war hierbei die Wahl der Sonde. Sie mußte ausreichend komplementär zur gesuchten DNA-Sequenz sein, um mit dieser hybridisieren zu können und schließlich ein spezifisches und starkes Signal zu ergeben. In diesem Fall war die Sequenz des gesuchten Gens nicht bekannt. Da aber alle Dynamine, einschließlich Dynamamin A, im aminoterminalen, die GTPase-Domäne umfassenden Bereich eine hohe Sequenzhomologie untereinander aufweisen, wurden Sonden mit DNA-Sequenzen aus dieser Region hergestellt. Es wurden verschiedene Fragmente mit Restriktionsenzymen aus dem konservierten Bereich des *dymA*-Gens, welches bereits als Plasmid vorlag, ausgeschnitten und Digoxigenin-markiert. Unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen sollten die so erhaltenen Sonden nicht nur mit DNA-Sequenzen des *dymA*-Gens hybridisieren sondern auch mit anderen Dynamamin-kodierenden Genen. Im einfachsten Fall war für jedes Dynamamin-kodierende Gen ein Signal zu erwarten.

Es wurden vier verschiedene Sonden mit Längen zwischen 200 und 740 Bp, die unterschiedliche Regionen des konservierten Bereichs von *dymA* abdeckten, getestet. Zudem wurden Parameter wie Hybridisierungstemperatur (zwischen 68 und 37 °C) und Hybridisierungspuffer verändert. Je höher die Hybridisierungstemperatur und je höher der Salzgehalt im Puffer ist, desto stringenter sind die gewählten Bedingungen, d.h. um so größer

muß die Sequenzhomologie zwischen Sonde und Zielsequenz sein, um ein Signal detektieren zu können. Sind die Bedingungen dagegen nicht ausreichend stringent, ist die Spezifität nicht mehr gewährleistet. Unter den getesteten Hybridisierungsbedingungen wurden jedoch nur vom *dymA*-Gen stammende Signale erhalten. Die Sonden erwiesen sich als zu spezifisch bezüglich *dymA*, um weitere Dynamin-kodierende Gene zu detektieren. Aus diesem Grund wurde eine Oligonukleotidsonde unter Berücksichtigung folgender Gesichtspunkte entwickelt:

- Die Sonde sollte DNA-Sequenz aus einem möglichst konservierten Bereich der Dynamin-Familie enthalten. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß die Sonde nicht nur mit *dymA*-sondern mit weiteren Dynamin-Homologen in *D. discoideum* reagiert.
- Sie sollte nicht das erste GTP-Bindungsmotiv enthalten, um nicht mit DNA-Sequenzen zu hybridisieren, die für andere GTPasen als für Dynamine kodieren.
- Sie sollte der bevorzugten Kodonnutzung für *D. discoideum* angepaßt sein (Grant *et al.*, 1990).

Für die Oligonukleotidsonde wurde die Nukleotidsequenz des *dymA*-Gens (Bp 127 bis 176) folgendermaßen modifiziert:

- Bei Basentriplets, die im *D. discoideum*-Genom selten vorkommen, wurden entsprechenden Basen in der *dymA*-Sequenz durch Desoxy-Inosin ersetzt. Desoxy-Inosin bildet mit allen der vier Basen schwache Wasserstoffbrückenbindungen aus.
- Insgesamt an drei der Nukleotide war Digoxigenin gekoppelt, um eine Detektion mittels Chemolumineszenz zu ermöglichen.

Die resultierende 50 Bp große Oligonukleotidsonde und ihre Position auf dem *dymA*-Lokus ist in Abb. 4-1 gezeigt.

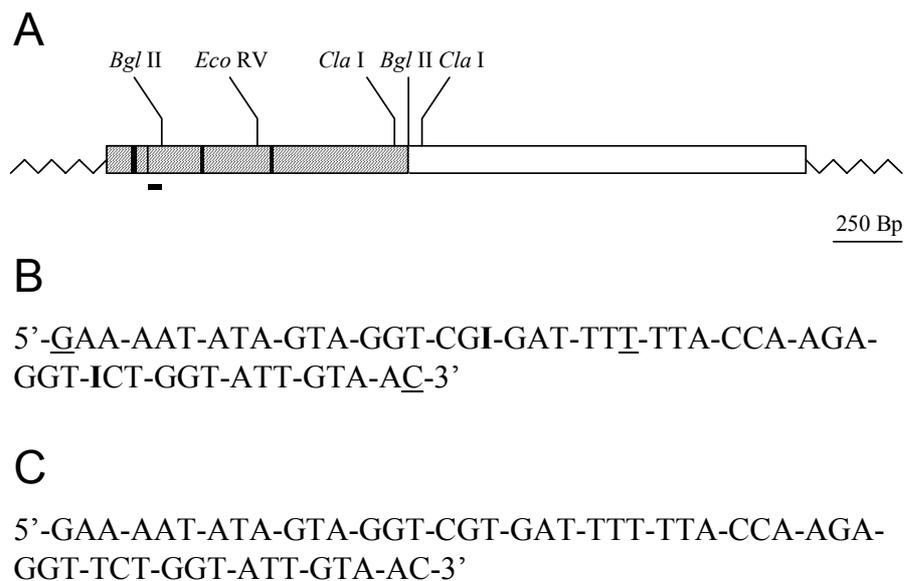


Abb. 4-1: Restriktionskarte des *dymA*-Lokus und Position und Sequenz der Oligonukleotid-Sonde

(A) Restriktionskarte des *dymA*-Lokus mit den für die folgende Arbeit wichtigsten Restriktionsschnittstellen. Die konservierte Region von *dymA* ist schraffiert gezeichnet, die Konsensusmotive der entsprechenden Aminosäuresequenz sind als schwarze vertikale Balken dargestellt. Der kleine Balken unterhalb der Karte markiert die Position der Oligonukleotidsonde. (B) Sequenz der Oligonukleotidsonde. Die Basen, an die Digoxigenin gekoppelt wurde, sind unterstrichen, Desoxy-Inosine sind fett dargestellt. (C) *DymA*-Sequenz, von der die Sondensequenz abgeleitet wurde.

Mit dieser Sonde gelang es, Banden zu detektieren, die nicht *dymA* zugeordnet werden konnten. Abb. 4-2 (A) zeigt den Southern-Blot, der mit der Oligonukleotidsonde inkubiert wurde. Die intensiven Banden rühren von Fragmenten des *dymA*-Gens. Als Kontrolle wurde DNA von *dymA*-Nullzellen aufgetragen. Das Gen ist in den Nullzellen nicht vollständig deletiert, so daß die Sonde mit der noch vorhandenen *dymA*-Sequenz reagiert. Daß hier zwei intensive Signale erhalten werden, die beide vom *dymA*-Gen stammen, läßt sich durch Mehrfachinsertion der Geninaktivierungskassette in das Genom erklären. Diese Banden sind jedoch erwartungsgemäß gegenüber denen im Wildtyp verschoben. Die schwächeren Banden stammen vom neuen Dynamamin-Homologen, *dymB*. Wie zu erwarten haben sie in *dymA*⁻- und Wildtypzellen die gleiche Größe. Das 2,9 kBp große *Eco* RI-Fragment mit DNA-Sequenzen des *dymB*-Gens wurde aufgrund seiner geeigneten Größe für eine Subklonierung ausgewählt.

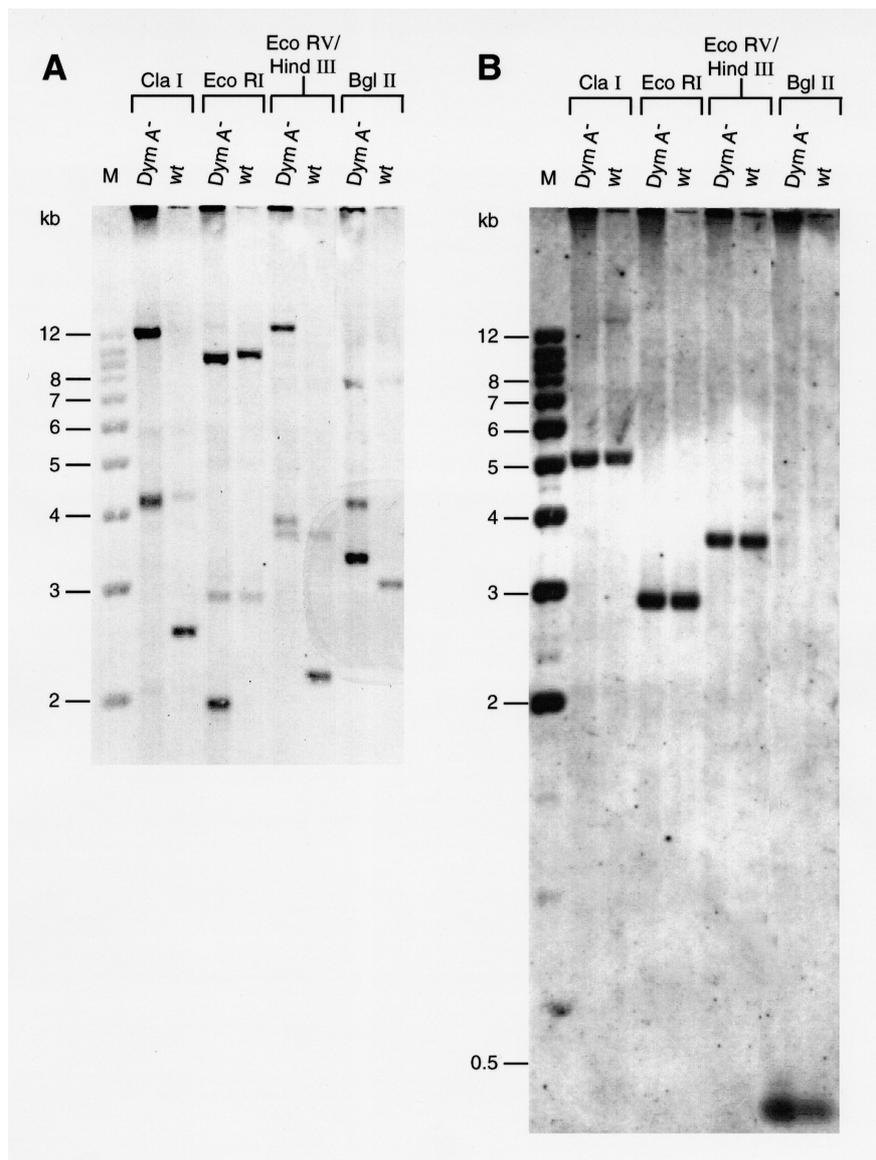


Abb. 4-2: Southern-Blot, der mit der Oligonukleotidsonde hybridisiert wurde (A) und derselbe Blot hybridisiert mit der für *dymB* spezifischen *Bgl* II-Sonde (B).

Pro Spur wurden 100 µg genomischer DNA, die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen fragmentiert worden war, auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA zunächst mit der Oligonukleotidsonde (A) und später, nach deren Entfernung, mit der *dymB* spezifischen *Bgl* II-Sonde (B) hybridisiert. Die Detektion der Digoxigeninmarkierten Sonden erfolgte durch Chemolumineszenz, wobei die Expositionsdauer auf Röntgenfilmen 2 bis 3 Stunden betrug. Die Größen der als Markerfragmente verwendeten 1-kBp-Leiter sind jeweils links angegeben.

4.1.2 Isolierung einer Teilsequenz von *dymB* aus einer gröbenselektionierten genomischen DNA-Bank von *D. discoideum*

Zur Isolierung des 2,9 kBp großen *Eco* RI-Fragments wurde eine gröbenselektionierte genomische DNA-Bank aus *D. discoideum* hergestellt. Hierzu wurde genomische DNA aus AX2-Wildtypzellen in präparativen Mengen mit dem Restriktionsenzym *Eco* RI geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der Bereich um 2,9 kBp wurde großzügig

ausgeschnitten und gemäß 3.2.5.3 mit der *Freeze-Squeeze*-Technik aus dem Gel isoliert. Das gesuchte Genfragment lag nun in angereicherter Form vor, mußte aber noch von DNA-Bruchstücken ähnlicher Größe abgetrennt werden. Dazu wurde die entsprechende DNA-Fraktion in die *Eco* RI-Schnittstelle des Vektors pBluescript SK(+) inseriert und in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue MRF⁷ transformiert.

Für die Identifizierung *dymB*-positiver Klone wurden etwa 1800 Bakterienkolonien dieser gröbenselektionierten genomischen Bank mit der Oligonukleotidsonde durchmustert. Es wurden 50 Klone isoliert, die ein Signal ergeben hatten. Sie wurden zur Vereinzelung und Konservierung nochmals auf Agarplatten ausgestrichen. In der zweiten Runde der Durchmusterung wurden hiervon 10 Klone ausgewählt und deren Plasmid-DNA isoliert. Die DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco* RI und *Sca* I verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Drei der 10 Klone ergaben das erwartete Bandenmuster mit Banden der Größen 2,9 kBp, 1,8 und 1,1 kBp, wobei das 2,9 kBp-Fragment dem *Eco* RI-Insert entspricht. Gleichzeitig wurden die 10 isolierten Bakterienkolonien nochmals mit der Oligonukleotidsonde durchmustert. Hierbei wurden zwei starke Signale erhalten. Die zugehörigen Bakterienkolonien enthielten zudem die Plasmide, die bei der Restriktionsanalyse das richtige Bandenmuster ergeben hatten. Beide Klone, E1 und E4, wurden daher sequenziert und erwiesen sich als identisch. Im folgenden wurde mit Klon E1 weitergearbeitet.

Das *Eco* RI-Insert wurde von beiden Enden um 600 Nukleotide ansequenziert. Eines der Enden enthielt Sequenzen, die fast ausschließlich Desoxy-Adenosin (A)- und Desoxy-Thymidintriphosphate (T) enthielten, wie sie für nicht kodierende Bereiche in *D. discoideum* typisch sind (Firtel *et al.*, 1976). Die Sequenz des anderen Endes hatte dagegen einen höheren Anteil an Desoxy-Guanosin (G)- und Desoxy-Cytidintriphosphaten (C). Außerdem wurde die GC-haltige DNA-Sequenz im Gegensatz zur AT-reichen Hälfte des Inserts nach Translation in die entsprechende Aminosäuresequenz nicht durch Stopkodons unterbrochen. Daraus ließ sich schließen, daß das 2,9 kBp-Insert kodierende Sequenz enthielt.

Um festzustellen, ob es sich hierbei um *dymB* handelte, wurden die erhaltenen Nukleotidsequenzen in die Aminosäuresequenzen translatiert und mit denen anderer Proteine der SWISSPROT Datenbank verglichen. Dabei wies die abgeleitete Aminosäuresequenz des GC-haltigen Nukleotidbereichs eine signifikante Homologie zu anderen Dynamin-ähnlichen Proteinen auf und enthielt zudem die für die GTP-Bindung verantwortlichen Konsensusmotive und das Dynamin-Leitmotiv. Da diese Sequenz nicht identisch mit der von *dymA* war, mußte es sich um ein neues Dynamin-Homologes in *D. discoideum* handeln. Dieses erhielt den Namen *dymB* und das zugehörige Protein Dynamin B.

Die vollständige Sequenzierung des E1-Klons erwies sich als ausgesprochen schwierig. Das *D. discoideum*-Genom hat einen hohen A- und T-Anteil. Nicht kodierende Bereiche wie Intergenregionen und Introns bestehen überwiegend (> 90 %) aus Adenosin- und Thymidinbasen und enthalten zudem viele repetitive Sequenzen (Firtel *et al.*, 1976). Die Methode des *Primer-Walkings* war daher nur bedingt erfolgreich, da die nötigen sehr AT-haltigen Primer nicht ausreichend stark oder ausreichend spezifisch mit der Zielsequenz hybridisierten. Beim *Primer-Walking* wird aus einer bereits bestimmten Sequenz eine neue Primersequenz ausgewählt, diese synthetisiert und als neuer Primer eingesetzt, von dem aus weitersequenziert wird. Aus diesem Grund wurde nach einer anderen Strategie vorgegangen,

bei der das zu sequenzierende Insert nach und nach verkürzt wurde, so daß stets vom Vektor aus in das Insert hineinsequenziert wurde. Auf diese Weise konnten für die Sequenzierung Primer verwendet werden, die an die komplementäre Vektorsequenz und nicht an das Insert banden.

Das Prinzip der Doppelstrangverkürzung beruht auf fortschreitenden unidirektionalen Deletionen von DNA-Inserts mit Hilfe des Enzyms Exonuklease III. Dieses verdaut spezifisch DNA mit 5'-Überhang oder glatten Enden. Um die benachbarte Primer-Bindungsstelle vor einem Verda durch Exonuklease III zu schützen, muß zunächst ein Restriktionsverda durchgeführt werden, bei dem ein 3'-Überhang entsteht. Die für den Schutz- und den Abdauschnitt verwendeten Restriktionsendonukleasen dürfen jeweils nur einmal in der Vektorsequenz und gar nicht im Insert schneiden. Außerdem müssen die Schnittstellen benachbart und richtig zueinander orientiert sein, damit nicht fälschlicherweise die Vektorsequenz abgebaut wird. Diese Voraussetzungen waren für das Plasmid pBS-E1 bei Verwendung der Restriktionsenzyme *Apa* I (Schutzschnitt) und *Hind* III (Abdauschnitt) gegeben. Nach Reinigung wurde das nun linear vorliegende Plasmid für unterschiedliche Zeiten mit der Exonuklease III inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurden zur Kontrolle von jedem Zeitpunkt Proben entnommen und auf ein Agarosegel aufgetragen. Dieses ist in Abb. 4-3 gezeigt. Je länger die Inkubationszeit mit Exonuklease III dauerte, desto kürzer ist das entsprechende DNA-Fragment. Die erhaltenen Fragmente der Zeitpunkte 1 bis 4 wiesen die passende Länge auf und wurden weiter behandelt.

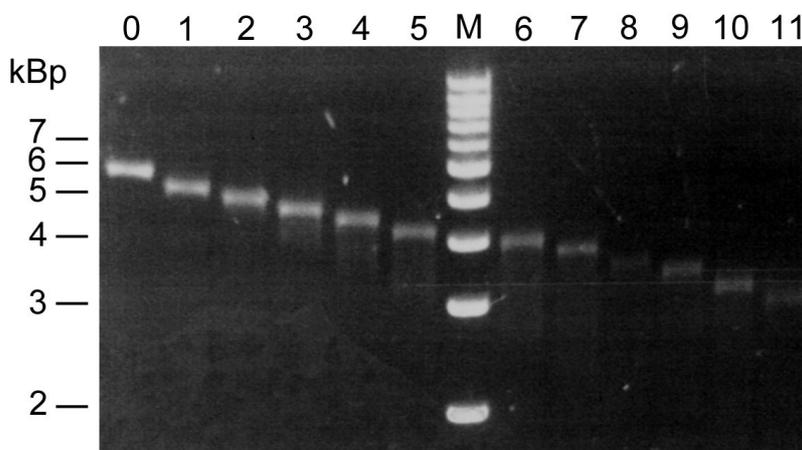


Abb. 4-3: Einführung von seriellen Deletionen in das Plasmid pBS-E1

Das linearisierte Plasmid pBS-E1 wurde für unterschiedliche Zeiten mit Exonuklease III inkubiert. In 0,5 minütigen Abständen wurden gleiche Mengen des Reaktionsansatzes entnommen und die Reaktion abgestoppt. Zur Analyse des Verdaus wurden jeweils 60 ng an Proben-DNA auf ein 0,8 %iges Minigel aufgetragen. Der Zeitpunkt 0 entspricht dem Ausgangsplasmid, das nicht mit Exonuklease III behandelt wurde.

Nach Glätten der Fragmentenden mit Hilfe des Klenow-Enzyms wurde die DNA religiert und in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert. Von jeder Platte, die jeweils einem der vier Zeitpunkte entsprach, wurden 12 Klone gepickt und deren DNA isoliert. Nach einer

Restriktionsanalyse wurden die Klone mit richtigem Bandenmuster und geeigneter Insertlänge aufbewahrt und sequenziert.

Mit dieser Methode gelang es schließlich, die Nukleotidsequenz des gesamten 2,9 kBp *Eco* RI-Fragment zu bestimmen. Hierbei zeigte sich, daß das Insert tatsächlich eine Größe von 3003 Bp hatte, von denen etwa die Hälfte (1465 Bp) kodierende Sequenz war. Diese enthielt das 5'-Ende des gesuchten *dymB*-Gens (Abb. 4-4).

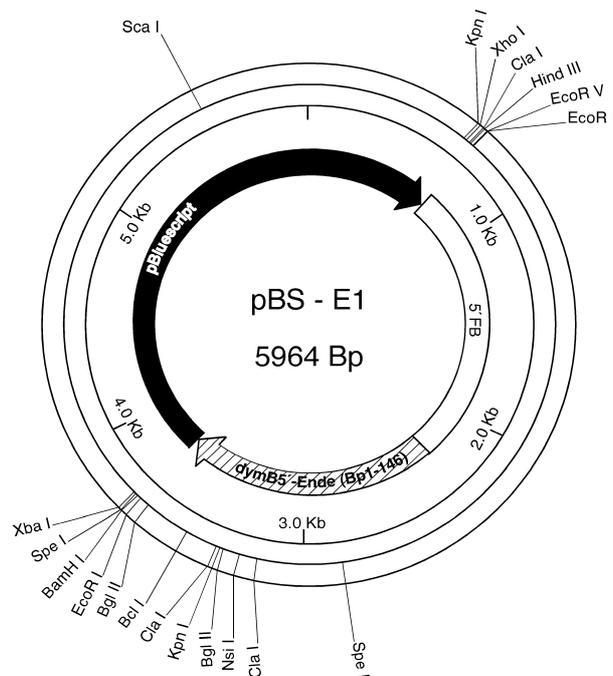


Abb. 4-4: Plasmidkarte von pBS-E1

Die Plasmidkarte wurde anhand der vollständigen Sequenz des genomischen Klon E1 mit Hilfe des Computerprogramms DNASTAR MAPDRAW angefertigt und enthält die wichtigsten Restriktionsschnittstellen. Die für *dymB* kodierende Teilsequenz ist schraffiert dargestellt, der 5' flankierende Bereich als 5' FB bezeichnet. Die Sequenz des Vektors pBluescriptSK(+) ist schwarz gezeichnet.

4.1.3 Isolierung eines *dymB*-cDNA-Klons aus einer *D. discoideum* λ -ZAP cDNA-Bank

Für die Suche nach dem 3'-Ende des Gens wurde eine *dymB*-spezifische DNA-Sonde hergestellt. Das Plasmid pE1 wurde mit dem Restriktionsenzym *Bgl* II geschnitten und das erzeugte 340 Bp große *Bgl* II-Fragment danach mit Digoxigenin markiert. Um die Spezifität der Sonde zu testen, wurde derselbe Blot aus Abb. 4-2 nach Entfernen der alten Sonde mit der neuen *Bgl* II-Sonde inkubiert. Diese erkennt nur von *dymB* stammende Fragmente wie aus dem Bandenmuster und der Intensität der Signale hervorgeht.

Mit der *Bgl* II-Sonde wurde eine λ -ZAP cDNA-Bank (hergestellt von Stratagene und von Dr. W. Loomis, UC San Diego, USA zur Verfügung gestellt) durchmustert. Aus $1,3 \cdot 10^6$ cDNA-Klonen konnte ein positiver Klon, A3-1b, mit einer Insertlänge von 2428 Bp identifiziert

werden. A3-1b enthielt am 3'-Ende ein Stopkodon und eine kurze AT-reiche Sequenz, und somit vermutlich das 3'-Ende von *dymB*. Es fehlte jedoch das äußerste 5'-Ende des Gens, da kein Startkodon vorhanden war und die Sequenz erst ab Basenpaar 56 mit der des genomischen Klons E1 übereinstimmte. Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, daß der Klon auch in anderen DNA-Regionen unvollständig war. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine genomische DNA-Bank nach dem 3'-Ende von *dymB* durchmustert.

4.1.4 Isolierung des 3'-Endes von *dymB* aus einer gröbenselektionierten genomischen DNA-Bank aus *D. discoideum*

Für die Durchmusterung einer genomischen DNA-Bank nach dem 3'-Ende von *dymB*, wurde eine neue DNA-Sonde hergestellt. Diese umfaßte die letzten 206 Basenpaare des cDNA-Klons. Sie wurde durch Verdau von A3-1b mit den Restriktionsenzymen *Eco* RV und *Eco* RI und anschließender Digoxigenin-Markierung erhalten.

Für die Herstellung einer neuen gröbenselektionierten genomischen DNA-Bibliothek, wurde anhand von Southern-Blots, die mit der *Eco* RV/*Eco* RI-Sonde inkubiert worden waren, entsprechende Fragmente für eine Klonierung ausgewählt. Dabei sollte das zu klonierende Fragment groß genug sein, um das gesamte 3'-Ende von *dymB*, einschließlich flankierender Sequenzen, zu enthalten. Außerdem sollte es mit den bereits isolierten Klonen überlappen. Zu diesem Zweck wurde ein 4,5 kBp großes *Hind* III-Fragment subkloniert. Aus der gröbenselektionierten DNA-Bank konnten zwei unabhängige *dymB*-positive Klone (Klon HD5 und HD7) isoliert werden, die sich als identisch erwiesen. Sie enthalten 1200 Bp kodierende Sequenz, die mit dem in *D. discoideum* häufigsten Stopkodon TAA endet. Ihm folgen mehrere AATAAA-Polyadenylierungsstellen. Klon HD5 wurde konserviert und für die weitere Untersuchung verwendet.

Der Sequenzvergleich mit dem cDNA-Klon zeigte, daß die Stopkodons für den cDNA- und den gDNA-Klon identisch sind und somit beide Klone das 3'-Ende von *dymB* besitzen. Der Sequenzvergleich ergab außerdem, daß Klon HD5 ca. 400 Bp stromaufwärts vom Stopkodon einen Bereich von 186 Bp aufweist, der in der cDNA-Sequenz fehlt. Es konnte jedoch aus mehreren Gründen ausgeschlossen werden, daß es sich um ein Intron handelt. Zum einen ist diese Sequenz relativ GC-haltig, während Intronsequenzen in *D. discoideum* fast ausschließlich aus Adenosin- und Thymidintriphosphaten bestehen und daher leicht zu erkennen sind. Zum anderen fehlen die für *D. discoideum* typischen Akzeptor- und Donorspleißstellen (Grant *et al.*, 1990). Abb. 4-5 gibt eine Übersicht über den *dymB*-Lokus und die Klone, die *dymB*-Sequenzen enthalten. Die vollständige Nukleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Abb. 4-6 gezeigt. Sie basiert auf der Sequenz der genomischen Klone, da hier jeweils zwei unabhängige identische Klone (E1 und E4, HD5 und HD7) isoliert wurden, während nur ein cDNA-Klon (A3-1b) isoliert werden konnte.

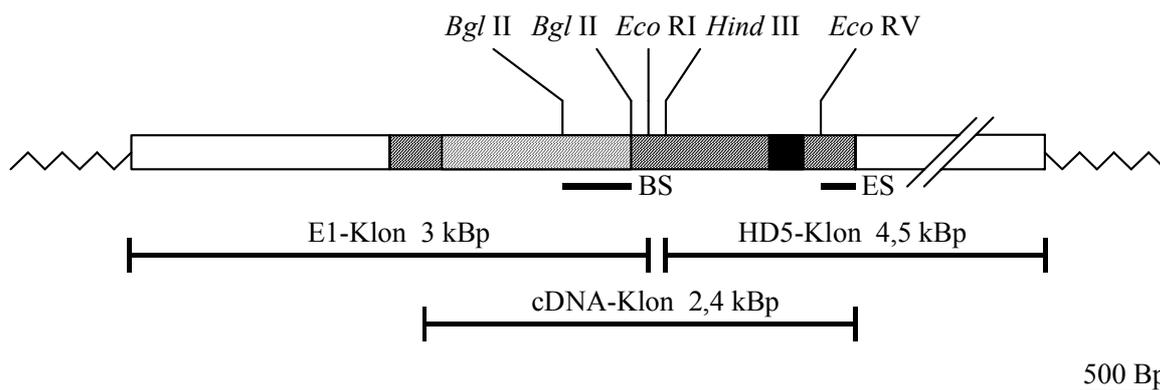


Abb. 4-5: Restriktionskarte des genomischen *dymB*-Lokus und Positionen der *dymB*-positiven Klone

Die schematische Restriktionskarte wurde anhand der vollständigen *dymB*-Sequenz erstellt, wobei nur einige Restriktionsschnittstellen gezeigt sind. *DymB* ist als schraffierter Balken dargestellt. Die flankierenden Bereiche sind als offene Balken (für Sequenz, die in klonierter Form vorliegt) bzw. gezackt (für unbekannte Sequenz) gezeichnet. Innerhalb der kodierenden Sequenz wurde die konservierte Region durch eine helle Schraffur betont, die schwarze Fläche markiert den DNA-Bereich, der in dem cDNA-Klon A3-1b fehlt. Unterhalb der Restriktionskarte sind die verwendeten *dymB*-spezifischen Sonden als schwarze dünne Balken gekennzeichnet, wobei BS für die *Bgl* II-Sonde und ES für die *Eco* RI/*Eco* RV-Sonde steht. Darunter befinden sich die Positionen der *dymB*-positiven Klone.

4.1.5 Sequenzvergleich von Dynamin B mit Proteinen der Dynamin-Familie

In Abb. 4-7 sind die N-terminalen Aminosäuresequenzen von Dynamin B mit denen von Dynamin A (*D. discoideum*), Dynamin-1 (Mensch) und Dnm1p (*S. cerevisiae*) verglichen. Der gezeigte Ausschnitt stellt den Bereich der größten Homologie dar, der bei Dynamin B etwa ab Aminosäure 137 beginnt. Diese Region enthält die GTP-Bindungsdomäne der Dynamine mit den vier konservierten Motiven, die für die Nukleotidbindung essentiell sind. Sie sind in Abb. 4-7 schwarz unterstrichen. Dem ersten Bindungselement folgt das sogenannte Dynamin-Leitmotiv (LPRG(S/T)G(I/L)VTR), das bei allen Mitgliedern der Dynamin-Familie vorhanden ist. Bei Dynamin B sind dies die Aminosäuren 183 bis 192. Dieses Motiv ist in der Abbildung durch die unterbrochene Linie markiert. Das Dynamin-Leitmotiv enthält zudem das zweite Bindungsmotiv, das aus einem einzelnen Threonin besteht. Der konservierte Bereich endet mit einem weiteren Konsensusmotiv (GGARI), das bei Dynamin B die Aminosäuren 512 bis 516 umfaßt. Dieses fehlt jedoch bei den phylogenetisch entfernten Mx-Proteinen und Mgm1p.

Für den konservierten Bereich (bis zur GGARI-Box) von Aminosäure 137 bis 516 liegt die Sequenzübereinstimmung von Dynamin B zu Dynamin A (Aminosäuren 1 bis 365) bei 53 % und zu DLP1 (Aminosäuren 1 bis 379) bei 52 %, zu Dnm1p (Aminosäuren 1 bis 404) sowie zu Vps1p (Aminosäuren 1 bis 401) bei 49 % und zu Dynamin-1 (Aminosäuren 1 bis 362) bei 48 %.

Im Fall von Dynamin B geht der GTP-Bindungsdomäne eine Extension von 136 Aminosäuren voran. Sie ist stark basisch (pI = 9,8) und enthält einen hohen Anteil an Asparaginresten (26 %) und Lysinresten (12 %). Relativ stark sind auch die Aminosäuren Isoleucin (10 %), Tyrosin (9 %), Serin (8 %) und Glutamin (8 %) in diesem Sequenzabschnitt vertreten. Ferner wird ein R-2-Motiv vorhergesagt mit einer möglichen Schnittstelle für eine mitochondriale Signalpeptidase an Position 106 (Gavel und von Heijne, 1990). Neben Dynamin B besitzen auch die Hefepoteine Mgm1p und Msp1p N-terminale Extensionen. Die Sequenzhomologie zu diesen Regionen beträgt 22 % bzw. 7 %. Für Mgm1p und Msp1p wurde nachgewiesen, daß es sich um mitochondriale Signalsequenzen handelt.

Dem konservierten Bereich (ab GGARI-Box) schließt sich ein etwa 150 Aminosäuren umfassender zentraler Bereich an, der relativ geringe Sequenzübereinstimmung aufweist. Die beste Übereinstimmung zeigt Dynamin B (Aminosäuren 517 bis 659) zu Dynamin A (32 %), Dnm1p (30 %) und DLP1 (28 %), während die Homologie zu Vps1p 25 % und zu Dynamin-1 (20 %) beträgt.

DymB	MLSSTAILKASGDVAINYQQYIYPIIINKLSTLNYTIKNKKYYSQYKYSIQFQNE	55
DymA	-----	-
Dnm1p	-----	-
Dyn-1	-----	-
DymB	FQKNLKIYNNNSNNNNNNNNNNKINKNNNNNNNNNISKFFIQNNNIDKKVLRHFYSS	110
DymA	-----	-
Dnm1p	-----	-
Dyn-1	-----	-
DymB	TKLNYAKQQQQLFKNNETFNETVGASLLPIINKLQENAALIGS-E-ITLPQIIIVV	163
DymA	-----MDQLIPVINKLQDVFNLTGSDP-LDLPQIVVV	31
Dnm1p	-----MAS--LEDLIPTVNKLQDVMYDSGITD-LDLPILAVV	34
Dyn-1	-----MGNRGMEDLIPLVNRLQDAFSAIGQNADLDLPQIAVV	37
DymB	GSQSSGKSSVLENLVGRDFLPRGSGLVTRRPLVLQLYQTTTTSRNNVNEDEDEDE	218
DymA	GSQSSGKSSVLENIVGRDFLPRGSGIVTRRPLILQLTHLPIAD-----	74
Dnm1p	GSQSSGKSSILETLVGRDFLPRGTGIVTRRPLVLQLNNTSPNSPLIEEDDNSVNP	89
Dyn-1	GGQSA GKSSVLENFVGRDFLPRGSGIVTRRPLVLQLVNATTT-----	78
DymB	DDNYD-----NDNDDNSLEEWGEFGHTG---TNRFN-FQEIKEEIE	256
DymA	-----DGSQTQEWGEFLHKP---NDMFYDFSEIREEII	104
Dnm1p	HDEVTKISGFEAGTKPLEYRGKERNHAD EWGEFLISPDI PGKRFYDFDDIKREIE	144
Dyn-1	-----EYAEFLHCK---GKKFTDFEEVRLEIE	102
DymB	RETERIAGPNKDISSEPIVLKIYSPKVVPLTLVDLPGLTRVAIEDQPPDIEEKIK	311
DymA	RDTRMTGKNKGISAQPINLKIYSPHVVNLTTLVDLPGITKVPVGDQPTDIEQQIR	159
Dnm1p	NETARIAGKDKGISKIPINLKVFSPHVNLTLVDLPGITKVPVIGEQQPDIEKQIK	199
Dyn-1	AETDRVTGTNKGISPVPINLRVYSPHVNLTLVDLPGMTKVPVGDQPPDIEFQIR	157
DymB	SMIIDYISNPNSTILAITPANQDIVTSDALKLAQQVDPLGKRTIGVLTKLDMDK	366
DymA	RMVMAYIKKQNAIIVAVTPANTDLANS DALQLAKEVDPEGKRTIGVITKLDLMDK	214
Dnm1p	NLILDYIATPNCLILAVSPANVDLVNSES LKLAREVDPOGKRTIGVITKLDLMS	254
Dyn-1	DMLMQFVTKENC LILAVSPANSDLANS DALKVAKEVDPOGQRTIGVITKLDLMD	212

Abb. 4-7: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Dynamin B mit Proteinen der Dynamin-Familie

Dargestellt ist der Bereich, der zwischen den Dynaminen die stärkste Homologie aufweist (welcher bei Dynamin B ab Aminosäure 137 beginnt), und die aminoternale Extension von Dynamin B. Der Vergleich wurde mit dem Programm ClustalW der EBI (European Bioinformatics Institute)-Datenbank unter Verwendung der vorgegebenen Algorithmen durchgeführt. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen von Dynamin B und Dynamin A aus *D. discoideum* (Wienke *et al.*, 1999), Dnm1p aus *S. cerevisiae* (Gammie *et al.*, 1995) und Dynamin-1 aus Mensch (Van der Blik *et al.*, 1993). Die Konsensbereiche sind farbig unterlegt, wobei die Unterlegung um so dunkler ist, je größer die Übereinstimmung ist. Die vier Konsensuselemente sind als schwarze Balken unterhalb der Sequenzen gekennzeichnet, das Dynamin-Konsensusmotiv ist als unterbrochener Strich dargestellt.

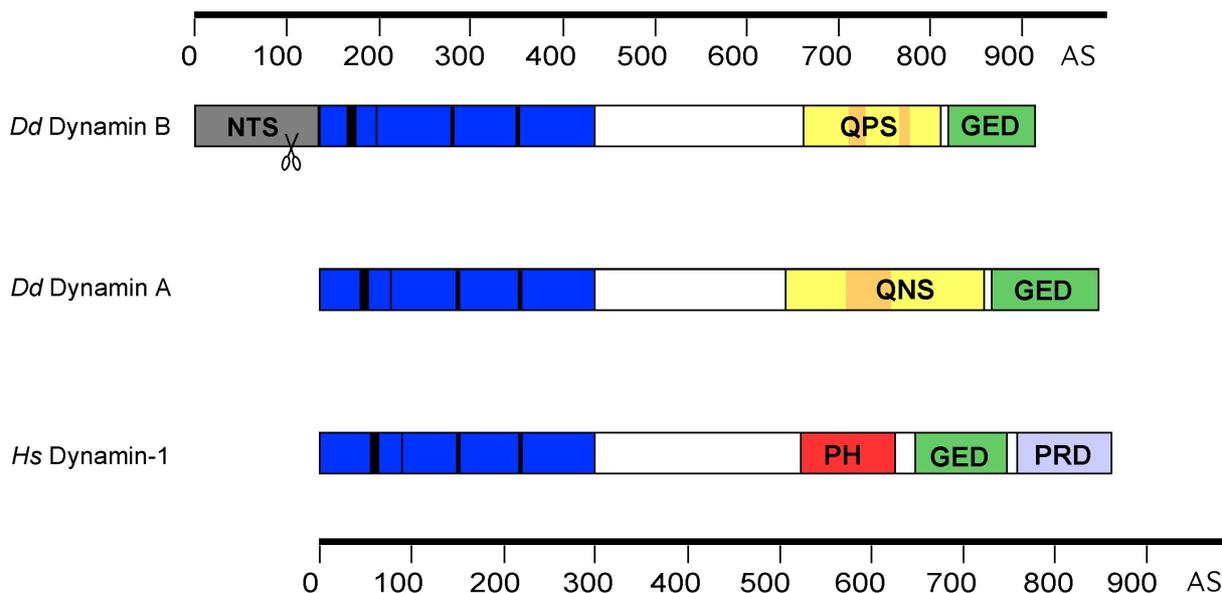


Abb. 4-8: Domänenvergleich zwischen Dynamin B, Dynamin A und menschlichem Dynamin-1

Die GTPase-Domänen mit den vier GTP-Bindungsmotiven sind blau dargestellt. Die aminoterminal Extension von Dynamin B ist grau gezeichnet. (NTS, aminoterminal Extension (*N-terminal targeting sequence*); PH, Pleckstrin-Homologie-Domäne; PRD, Prolin-Arginin-reiche-Domäne; GED, GTPase-Effektordomäne; QPS, Glutamin-Prolin-Serin-reiche Domäne; QNS, Glutamin-Arginin-Serin-reiche Domäne). Die orangefarbenen Flächen der QPS und QNS-Domänen markieren Bereiche, in denen die Prolinreste gehäuft auftreten.

Die Aminosäuren 660 bis 800 bilden eine Region aus, die nur wenige geladene Aminosäuren (12 %), aber einen hohen Anteil an polaren Resten (63 %) enthält. Auffällig sind hier die langen Ketten von bis zu 12 Glutamin- und Serinresten, mit einem Aminosäureanteil von 31 % bzw. 21 %. Prolinreste sind zu 10 % vorhanden. Diese Domäne wurde daher als QPS-Domäne bezeichnet. Eine entsprechende Domäne gibt es auch in Dynamin A. Die QNS-Domäne in Dynamin A ist um 90 Aminosäuren länger als die QPS-Domäne, dennoch weisen beide Domänen viele Gemeinsamkeiten auf. Die QNS-Domäne ist reich an Glutamin- (26 %), Asparagin (24 %) und Serinresten (14 %). Sie enthält ebenfalls einen hohen Anteil an polaren Aminosäuren und lange Glutamin- (und Asparagin-) ketten. Polyglutaminsequenzen werden auch in vielen anderen Proteinen aus *D. discoideum* gefunden, wie z.B. bei der Protein-Tyrosin-Phosphatase PTP3 (Gamper *et al.*, 1996) und der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase PKAC (Burki *et al.*, 1991). Die Funktion dieser Primärstrukturelemente ist nicht bekannt. Die Prolinreste sind im zentralen Bereich (Aminosäuren 698 bis 774) der QPS-Domäne angehäuft (16 %) und werden von einer langen Polyglutaminsequenz unterbrochen. Möglicherweise erfüllt dieser Bereich eine ähnliche Funktion wie die prolinreiche Domäne des Dynamin-1 aus Säugetieren, die an der Wechselwirkung mit anderen Proteinen beteiligt ist. Die PR-Domäne von Dynamin-1 ist jedoch wesentlich länger, enthält prozentual mehr Prolinreste (32 %) und befindet sich am äußersten Carboxyterminus des Proteins.

Der äußerste Carboxyterminus von Dynamin B (Aminosäuren 826 bis 920) weist im Vergleich zur QPS-Domäne erneut stärkere Homologie zu den entsprechenden Regionen anderer Dynamin-Homologe auf. Am höchsten ist die Identität zu DLP1 (32 %) und Dnm1p (30 %). Zu Dynamin A und Vps1p beträgt sie 29 % bzw. 28 %. Der Sequenzvergleich mit der als GTPase-Effektordomäne bezeichneten Region von Dynamin-1 (Aminosäuren 660 bis 751) ergab eine schwache Übereinstimmung von 21 %. Sekundärstrukturanalysen dieser Regionen weisen jedoch für beide Proteine auf einen stark α -helikalen Charakter hin (Muhlberg *et al.*, 1997).

Abb. 4-9 zeigt eine Sekundärstrukturanalyse basierend auf der Aminosäuresequenz von Dynamin B. Die aminoterminalen Extension hebt sich als positiv geladener Bereich ab und die QPS-Domäne als schwach geladener Bereich mit starker Oberflächenwahrscheinlichkeit.

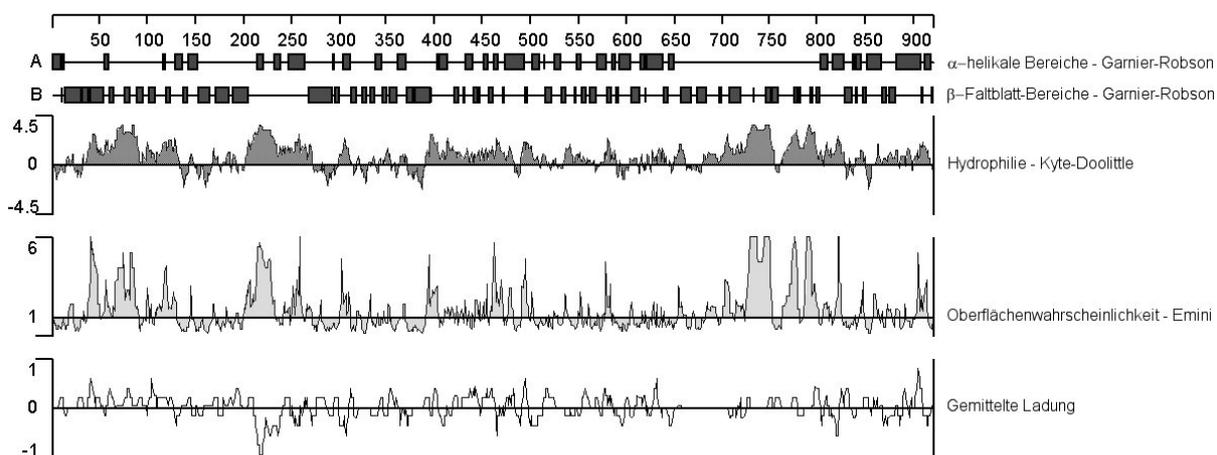


Abb. 4-9: Sekundärstrukturanalyse von Dynamin B

Die Analyse wurde mit dem Computerprogramm DNASTAR PROTEAN durchgeführt. Es sind die Ergebnisse für die Berechnung von α -Helices und β -Faltblätter nach dem Algorithmus nach Garnier und Robson (Garnier *et al.*, 1978) dargestellt, der Hydrophilie nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982), der Oberflächenwahrscheinlichkeit nach Emini (Emini *et al.*, 1985) und der über neun Seitenketten gemittelten Ladung.

Bei einem Vergleich der gesamten Aminosäuresequenzen zeigt Dynamin B die größte Übereinstimmung zu Dnm1p und DLP1 (jeweils 43 %), gefolgt von Vps1P (42 %) und Dynamin-1 (38 %). Interessanterweise ist die Sequenzidentität zu Dynamin A (35 %) am geringsten, sieht man von den entfernteren Homologen Mgm1p (26 %) und Mx1 (33 %) ab.

Die Analyse der Primärstruktur zeigt, daß Dynamin B viele konservierte Motive enthält, die es als Mitglied der Dynamin-Familie identifiziert. Die phylogenetische Analyse ordnet Dynamin B der Dnm1p/Vps1p-Untergruppe zu (siehe Abb. 4-10).

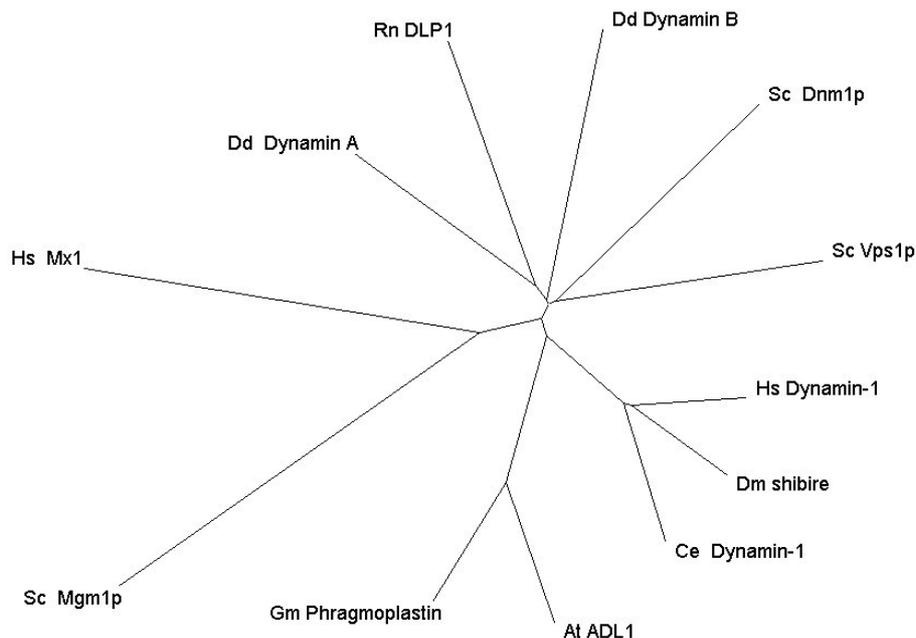


Abb. 4-10: Phylogenetische Analyse von Mitgliedern der Dynamin-Proteinfamilie

Die für den Vergleich verwendeten Aminosäuresequenzen beginnen in der Nähe des ersten GTP-Bindungsmotivs und beinhalten die folgenden 300 Aminosäuren der GTPase-Domäne. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW der EBI-Datenbank unter Verwendung der vorgegebenen Algorithmen durchgeführt. Es wurden die Sequenzen folgender Proteine verwendet: *H. sapiens* Dynamin-1 und Mx1, *D. melanogaster* shibire, *C. elegans* Dynamin-1, *S. cerevisiae* Dnm1p, Vps1p und Mgm1p, *R. norvegicus* (Ratte) DLP1, *D. discoideum* Dynamin A und Dynamin B, *A. thaliana* ADL1 und *G. max* phragmoplastin.

4.1.6 Entwicklungsregulation der Transkription

Die transkriptionale Regulation der *dymB*-Expression während der Differenzierung zu Fruchtkörpern wurde anhand von Northern-Blots analysiert. Die Differenzierung wird durch Nahrungsmangel in *D. discoideum* auslöst. Die Zellen geben zu Beginn Pulse zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) ab, was die Aggregation der Zellen stimuliert. Die Aggregate, bestehend aus ca. 10^5 Zellen, durchlaufen bis zur Fruchtkörperbildung verschiedene morphologische Stadien. Nach 20 bis 24 h ist der Entwicklungszyklus abgeschlossen.

Für die Northern-Blot-Analyse wurde nach Auslösung des Entwicklungsprogramms in bestimmten Zeitabständen Gesamt-RNA aus den Wildtypzellen isoliert. Gleiche Mengen an Gesamt-RNA wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und nach Auftrennung auf eine Nylonmembran übertragen. Diese wurde mit der *dymB*-spezifischen *Bgl* II-Sonde inkubiert. Mit dieser Sonde ließ sich ein ca. 3 kBp großes Transkript nachweisen, das während des gesamten Zeitraums der Differenzierung in geringem Maß vorhanden war. Zwischen 4 und 12 h ist die Menge an *dymB*-RNA etwa um das dreifache erhöht.

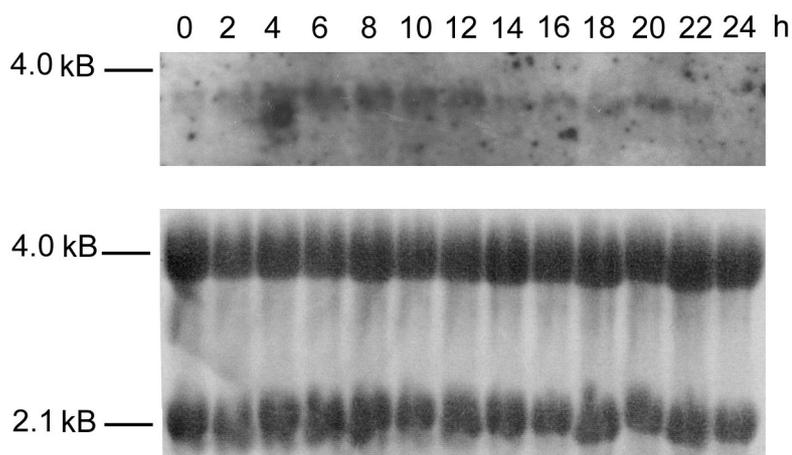


Abb. 4-11: Entwicklungsregulation der Transkription von *dymB*

Für die Northern-Blot-Analyse der Transkription von *dymB* war Gesamt-RNA aus AX2-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus isoliert und auf einem denaturierenden 1,2 %igen Agarosegel aufgetrennt worden (15 µg RNA pro Spur). Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde der Blot (obere Abbildung) mit der *Bgl* II-Sonde hybridisiert. Oberhalb der Spur ist der Zeitpunkt nach Überführung der Zellen auf nährstofflose Agarplatten, wodurch der Entwicklungszyklus ausgelöst wird, in Stunden angegeben. Zur Abschätzung der aufgetragenen RNA-Mengen und der Größe des Transkripts wurde die ribosomale RNA auf der Nylonmembran mit dem Farbstoff Methylblau angefärbt (untere Abbildung).

4.2 Produktion von polyklonalem Antiserum gegen Dynamin B

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Dynamin B und für die zelluläre Lokalisierung des Proteins wurden Antikörper produziert, die spezifisch an Dynamin B binden. Für die Gewinnung des polyklonalen Antiserums wurden Kaninchen mit einem Fragment von Dynamin B immunisiert und die Antiseren aus dem Blut der Tiere gewonnen.

4.2.1 Herstellung des Antigens

Die Expression eines Fragments von Dynamin B gelang durch die Isolierung eines 462 Bp großen *Kpn* I/*Hind* III-Stücks von *dymB*. Es wurde in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen) subkloniert, der in 5'-Richtung vom Polylinkerbereich die kodierende Sequenz für ein Hexahistidinpeptid enthielt. Das Expressionskonstrukt pQE30-*Kpn*/Hd wurde in den *E. coli*-Stamm SG 13009 (Qiagen) transformiert. Alle getesteten Klone produzierten das 18 kDa große Fragment nach Induktion mit IPTG gleichermaßen gut (Abb. 4-12 A).

Vor der präparativen Isolierung des Proteinfragments wurde geprüft, ob das Fusionsprotein in löslicher Form vorliegt. Dies ist Voraussetzung für eine effektive Reinigung mittels Affinitätschromatographie. Bakterien des Klons 1 wurden lysiert und durch 30minütige

Zentrifugation bei 13000 UpM in eine lösliche und unlösliche Fraktion getrennt. Es zeigte sich, daß das Fusionsprotein unter diesen Bedingungen jedoch unlöslich war. Da Änderungen der Expressionsbedingungen dazu führen können, daß geringere Mengen an rekombinantem Protein produziert werden, und somit die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, daß es dann in seiner löslichen nativen Form vorliegt, wurden verschiedene Expressionsbedingungen getestet.

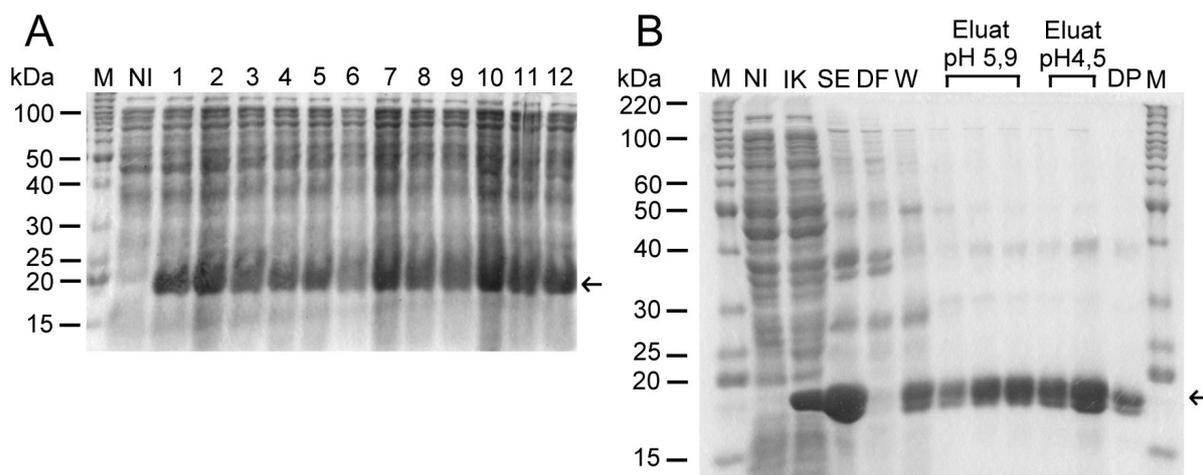


Abb. 4-12: Expression des 18 kDa großen Dynamin B-Fragments (A) und dessen präparative Isolierung (B)

(A) Zum Testen der Expression wurde (nach 4,5 stündiger Induktion mit IPTG) Gesamtzelllysate von *E. coli*-Zellen, die mit dem Expressionsvektor pQE30-Kpn/Hd transformiert worden waren, auf ein 15 %iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Zahlen oberhalb der Spuren stehen für die entsprechenden Klone. NI kennzeichnet die nicht induzierte Vergleichsprobe. Der Pfeil markiert das Dynamin B-Fragment. (B) Bakterien von Klon 1 wurden für 4,5 h induziert, lysiert und das Lysat für 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Das Sediment, welches das Proteinfragment in Form von unlöslichen Einschlusskörpern enthielt, wurde durch 8 M Harnstofflösung solubilisiert (Fraktion SE). Nach weiteren Zentrifugationsschritten wurde der klare Überstand auf die Ni-NTA-Säule aufgetragen und der Durchfluß (Fraktion DF) aufgefangen. Nach dem Waschen (Fraktion W) erfolgte die Elution, wobei mehrere Fraktionen gesammelt wurden. Zunächst wurde bei einem pH-Wert von 5,9 und danach bei pH 4,5 eluiert. Die Elutionsfraktionen (ausgenommen die erste Fraktion) wurden vereinigt und gegen eine 40 mM Hepeslösung dialysiert. Das dialysierte Protein ist in der Abbildung als DP bezeichnet. NI stellt die nicht induzierte Kontrolle, IK die induzierte Kontrolle, d.h. das Gesamtproteinlysate nach Induktion, dar. Die Proben wurden auf einem 15 %igen Polyacrylamid getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Der Pfeil markiert das Dynamin B-Fragment.

Die Bakterien wurden vor und während der Induktionsphase bei drei verschiedenen Temperaturen (37 °C, 30 °C und 20 °C) inkubiert. Gleichzeitig wurden die Induktionsperioden variiert (3 h, 4,5 h und 6 h), so daß insgesamt neun Bedingungen getestet wurden. Außerdem wurde das Pellet nach der Lyse zweimal mit dem Detergens Tween-20 extrahiert, um Membran-assoziiertes Protein in Lösung zu bringen. Das exprimierte Proteinfragment war jedoch unter allen Bedingungen unlöslich. Für eine präparative Isolierung des Proteins mußte deshalb unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet werden.

Für die Isolierung des Fusionsproteins im präparativen Maßstab wurde eine 3 l-Kultur von Klon 1 angesetzt. Nach der Zellyse und Zentrifugation gemäß 3.3.4.3 wurde ein festes braunes Pellet erhalten, welches das Proteinfragment in Form von schwer löslichen Einschlusskörpern enthielt. Dieses wurde durch Rühren in 8 M Harnstoff in Lösung gebracht. Die anschließende Reinigung des Fusionsproteins erfolgte durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA (Qiagen). Hierbei bindet das Fusionsprotein über sein Histidinpeptid an das Nickel des Säulenmaterials und wird nach dem Waschen mit geeignetem Puffer eluiert. Abb. 4-12 B zeigt die verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung. Das Proteinfragment wurde als Antigen für die Immunisierung von zwei Kaninchen eingesetzt (durchgeführt von der Firma Eurogentec, Belgien).

4.2.2 Ergebnisse der Immunisierung und Reinigung der erhaltenen Antiseren

Die Untersuchung der beiden Antiseren auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern gegen Dynamin B erfolgte mittels Western-Blot-Analyse, wobei als antigenhaltige Probe ein Gesamtlysate aus AX2-Wildtypzellen eingesetzt wurde. Die ungereinigten Antiseren SA6255 und SA6256 detektierten zahlreiche Banden, von denen die bei 95, 70 und 50 kDa dominierten. Durch Affinitätsreinigung konnte die Spezifität der Antiseren deutlich erhöht und das Signal/Hintergrund-Verhältnis verbessert werden. Die gereinigten Antiseren detektierten nur noch die Bande bei 95 kDa (Abb. 4-13), wobei je nach Experiment manchmal auch schwächere Banden detektiert wurden. Die Affinitätsreinigung erfolgte an dem immobilisierten als Antigen verwendeten Proteinfragment von Dynamin B.

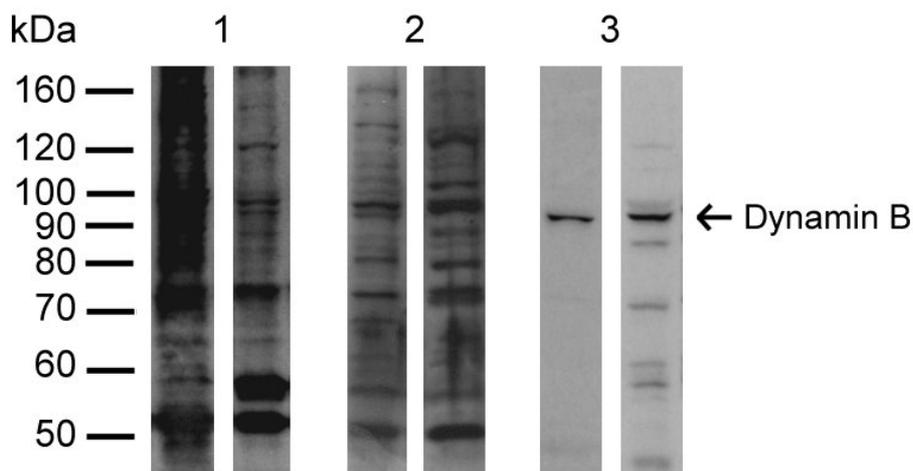


Abb. 4-13: Western-Blot-Analyse mit Dynamin B-Antiseren

Das Gesamtprotein aus AX2-Zellysate wurde elektrophoretisch auf einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. In (1) wurden die Präimmunsereen von Kaninchen SA6255 und SA6256 getestet, die in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt wurden. In (2) wurden die aus der 3. Verstärkungsinjektion resultierenden Antiseren mit einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. (3) zeigt das Ergebnis der Affinitätsreinigung der Antiseren aus der 3. Verstärkungsinjektion. Die Antikörper wurden hier ebenfalls 1:1000 verdünnt eingesetzt. Die Seren von Kaninchen SA6255 und SA6256 sind jeweils abwechselnd aufgetragen. Die Position der Dynamin B-Bande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

4.3 Überproduktion von Dynamin B in *D. discoideum* und Versuche zur Isolierung des Proteins

Für eine *in vitro* Charakterisierung von Dynamin B war es nötig, das Protein in größeren Mengen zu produzieren und zu isolieren. Als Expressionssystem diente *D. discoideum*, da es der natürliche Wirtsorganismus dieses Proteins ist und somit zu erwarten war, daß Dynamin B funktionell und mit der richtigen Faltung synthetisiert wurde. Gleichzeitig bot die Verwendung von *D. discoideum* die Möglichkeit, die Auswirkungen der Überproduktion von natürlichem Dynamin B bzw. von mutierten Varianten des Enzyms auf die Zelle zu analysieren. Geeignete Basisvektoren (Manstein *et al.*, 1995) waren bereits vorhanden. Davon abgeleitete Plasmide wurden durch Elektroporation in die Zellen eingeführt, die diese Plasmide extrachromosomal in hoher Kopienzahl replizierten. Durch Verwendung des konstitutiven Aktin15-Promotors sollte das Expressionsniveau zusätzlich gesteigert werden.

4.3.1 Konstruktion der Expressionsvektoren

Für die Überproduktion von Dynamin B in *D. discoideum* wurden Vektoren hergestellt, welche die Expression eines Dynamin B-Fusionsproteins mit terminalen Heptahistidinpeptiden erlauben. Die Histidinreste sollten die affinitätschromatographische Reinigung des Fusionsproteins an einer Metallchelatomatrix ermöglichen. Als Ausgangsvektoren dienten die Expressionsvektoren der pDXA-Reihe (Manstein *et al.*, 1995).

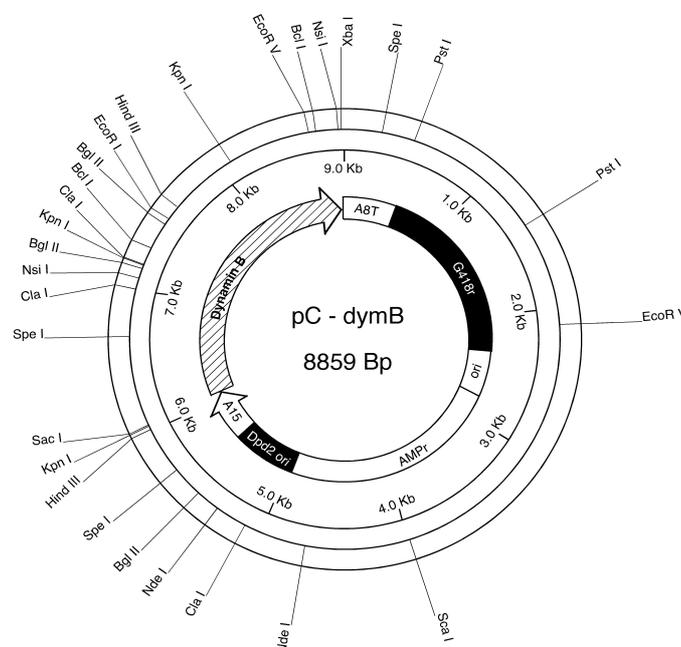


Abb. 4-14: Plasmidkarte des Expressionsvektors pC-DymB

pC-dymB kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus Dynamin B und einem carboxyterminalen Heptahistidinpeptid. Die Expression erfolgt unter Kontrolle des Aktin15-Promotors (A15). Weitere Abkürzungen: A8T = Aktin8-Terminator, MCS = Polylinkerregion (*multiple cloning site*); G418r = G418-Resistenzkassette; *ori* = Replikationsursprung des Plasmids pUC19; AMP^r = Ampicillin-Resistenzkassette; Ddp2 *ori* = Replikationsursprung des *D. discoideum*-Plasmids Ddp2.

Der Aufbau dieser Expressionsvektoren ist beispielhaft anhand des Plasmids pC-dymB in Abb. 4-14 gezeigt, das für Dynamin B mit einem carboxyterminalen Heptahistidinpeptid kodiert. Daneben wurde auch ein Vektor hergestellt, der für Dynamin B mit einem Heptahistidinpeptid am Aminoterminus kodiert (pDXA-dymB).

4.3.2 Western-Blot-Analyse der Dynamin B-Fusionsproteine

Die Expressionsvektoren wurden in *D. discoideum* AX3-ORF-Zellen eingeführt. Danach erfolgte eine Selektion der transformierten Zellen durch Zusatz von 10 µg/ml des Antibiotikums G418 im Nährmedium. 12 bis 15 Klone wurden isoliert und deren Gesamtproteinlysate hinsichtlich der Expression von rekombinanten Dynamin B anhand von Western-Blots untersucht. Die Transformanten mit der stärksten Expression wurden ausgewählt und konserviert.

Abb. 4-15 zeigt den Western-Blot mit Gesamtproteinlysate von ORF-dymB(N)- und ORF-dymB(C) -Zellen, die Dynamin B mit einem aminoterminalen bzw. carboxyterminalen Histidinpeptid produzieren. Als Kontrollen wurden Gesamtproteinlysate von AX2-Wildtypzellen und *dymB*⁻-Zellen (Zellen, die kein Dynamin B produzieren, s. Kap. 4.5) aufgetragen. Der gereinigte gegen Dynamin B gerichtete Antikörper detektierte bei den Wildtypzellen eine Bande bei ca. 92 kDa, während die berechnete Molekülmasse von Dynamin B jedoch 105 kDa betrug. Die *dymB*⁻-Zellen ergaben wie erwartet kein Signal. Bei den überproduzierenden Zellen wurden zwei Banden detektiert: eine bei 92 kDa, wie sie bei den Wildtypzellen vorkommt, und eine bei 105 kDa, wie sie der berechneten Molekülmasse des Proteins entspricht. Diese Daten lieferten einen deutlichen Hinweis, daß Dynamin B posttranslational prozessiert wird. Während bei den überproduzierenden Zellen mit aminoterminaler Markierung die obere Bande (105 kDa) viel intensiver als die untere (92 kDa) ist, liegt der Fall bei den Zellen mit carboxyterminalen Histidinpeptid gerade umgekehrt. Daraus läßt sich schließen, daß Dynamin B am Aminoterminus geschnitten wird. Möglicherweise blockiert das aminoternale Histidinpeptid den Prozessierungsvorgang. Aus dem Bandenmuster ist jedoch nicht ersichtlich, ob das Histidinpeptid die Prozessierung vollständig oder nur teilweise hemmt, da auch noch endogenes reifes Dynamin B vorhanden ist. Dies ließ sich mit Hilfe von *dymB*⁻-Zellen feststellen, die Dynamin B mit einer Histidinmarkierung am Aminoterminus produzierten. Gesamtproteinlysate dieser Zellen wiesen eine dominante Bande bei 105 kDa und ein schwache bei 92 kDa auf, woraus hervorgeht, daß das aminoternale Histidinpeptid die Prozessierung nicht vollständig blockiert (ca. zu 80 %). Bei den überexproduzierenden Zellen mit carboxyterminaler Markierung liegt der überwiegende Anteil des Proteins in der reifen Form vor, so daß die Fusion mit den Histidinresten am Carboxyterminus nicht zu stören scheint. Die Beobachtung, daß Dynamin B innerhalb der aminoterminalen Extension geschnitten wird, stimmt auch mit der Vorhersage einer Schnittstelle für eine mitochondriale Signalpeptidase an dieser Position (Aminosäure 106) überein .

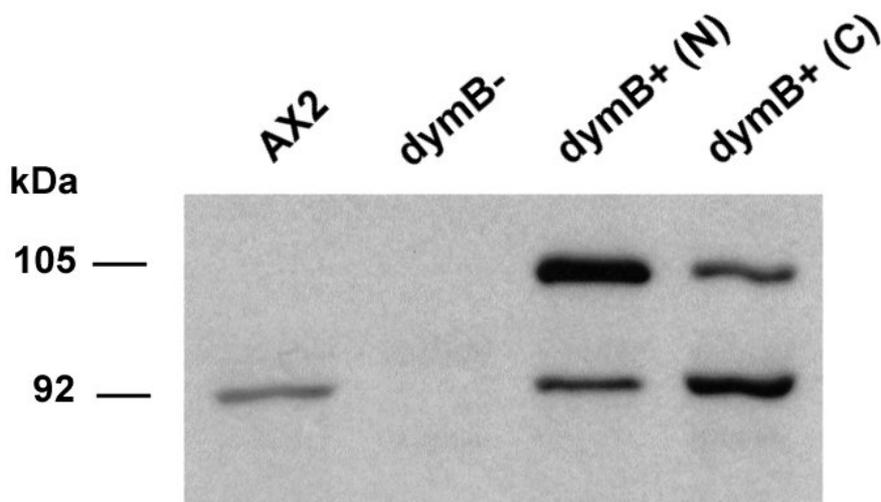


Abb. 4-15: Überproduktion von Dynamin B

Präparationen von Gesamtprotein aus ORF-Wildtypzellen, *dymB*⁻-Zellen und ORF-Zellen, die Dynamin B-Fusionsproteine mit aminoterminalen (*dymB*⁺(N)) oder carboxyterminalem (*dymB*⁺(C)) Heptahistidinpeptid produzieren, wurden auf einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Der Blot wurde mit dem affinitätsgereinigten anti-Dynamin B Antikörper und Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Anti-(Kaninchen-IgG)-Zweitantikörpern aus Ziege inkubiert. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des ECL-Detektions-Kits.

4.3.3 Löslichkeitsverhalten von rekombinantem Dynamin B

Für die Isolierung und Aufreinigung von Dynamin B kam nur das Fusionsprotein mit dem carboxyständigen Histidinpeptid in Frage, da anzunehmen war, daß die prozessierte Form des Proteins die physiologisch aktive war.

Bei der Wahl der Solubilisierungs- und Extraktionsbedingungen konnte auf die Erkenntnisse, die bereits bei der Reinigung von Dynamin A gewonnen worden waren, zurückgegriffen werden. Bei der Extraktion von Dynamin A waren neben GTP 300 mM NaCl notwendig, um das Protein in Lösung zu bringen, während Detergenzien wie Triton X-100, n-Octylglucosid und CHAPS keine solubilisierende Wirkung auf Dynamin A hatten (D. Wienke, Dissertation 1998).

Um das Löslichkeitsverhalten von rekombinantem Dynamin B zu testen, wurden ORF-*dymB* (C) -Zellen nach der Lyse und Zentrifugation bei 15000 UpM (Tischzentrifuge) oder bei 60000 UpM (Beckman-Rotor, Typ TLA 100.3) in eine lösliche und eine sedimentierbare Fraktion geteilt. Unter beiden Zentrifugationsbedingungen befand sich der überwiegende Anteil von Dynamin B im Pellet. Die sedimentierbare Fraktion wurde anschließend mit 10 mM Mg²⁺-GTP unter Verwendung verschiedener Salzkonzentrationen extrahiert. Hierbei zeigte sich, daß die prozessierte Form von Dynamin B (Bande bei 92 kDa) zum größten Teil extrahierbar war, während die nicht prozessierte Form (Bande bei 105 kDa) überwiegend im Pellet verblieb. Die prozessierte Form ließ sich am besten in Anwesenheit von 300 mM NaCl extrahieren. Unter diesen Bedingungen wurde etwa die zweifache Menge an prozessierter

Form aus dem Pellet extrahiert im Vergleich zur Extraktion ohne Zugabe von NaCl bzw. mit 1 M NaCl. Dynamin B ließ sich im übrigen auch mit 10 mM Mg^{2+} -ATP und 300 mM NaCl extrahieren. Bei der Isolierung von Dynamin B im präparativen Maßstab kann daher auch das kostengünstigere Mg^{2+} -ATP oder eine Mischung aus Mg^{2+} -ATP und Mg^{2+} -GTP zur Extraktion eingesetzt werden.

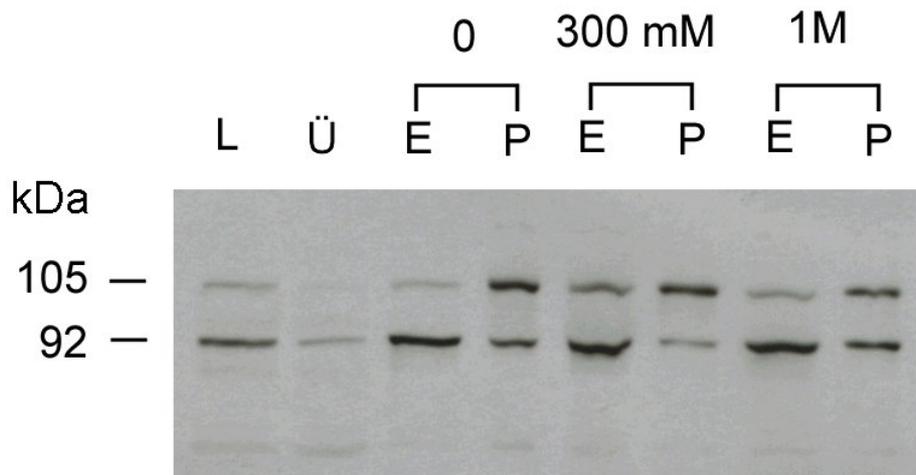


Abb. 4-16: Löslichkeitsverhalten von Dynamin B bei unterschiedlichen Extraktionsbedingungen
ORF-dymB(C) -Zellen ($3,5 \cdot 10^7$ Zellen pro Extraktionsbedingung) wurden gemäß 3.3.3.1 durch Zugabe von Triton X-100 lysiert. Ein Teil des Zellysats wurde als Gesamtproteinlysate (L) aufbewahrt und der restliche Teil für 30 min bei 60000 g zentrifugiert. Der Überstand (Ü) wurde ebenfalls aufbewahrt. Das gewaschene Pellet wurde mit 10 mM Mg^{2+} -GTP und den oben angegebenen Konzentrationen an NaCl (0, 300, 1000 mM) extrahiert. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation (gemäß 3.3.3.1) wurden der Extrakt (E) und das gewaschene Pellet (P) in 5x Probenauftragspuffer aufgenommen. Pro Spur wurde die gleiche Menge an Zellen aufgetragen. Nach der gelelektrophoretischen Trennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Nachweis von Dynamin B erfolgte durch Inkubation mit dem affinitätsgereinigten anti-Dynamin B Antikörper und Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-(Kaninchen-IgG)-Zweitantikörpern aus Ziege.

4.3.4 Versuche zur Isolierung von rekombinantem Dynamin B

Zur Isolierung von Dynamin B wurde eine Affinitätschromatographische Reinigung an Ni-NTA im analytischen Maßstab durchgeführt. Der GTP-Extrakt von $5 \cdot 10^8$ ORF-dymB(C)-Zellen wurde auf eine Minisäule mit Ni-NTA als Matrix aufgetragen. Es fand jedoch keine Anreicherung des Proteins im Eluat statt. Stattdessen wurde eine Bande bei 220 kDa gefunden, welche der schweren Kette von Myosin-II entsprach und eine weitere bei 43 kDa, bei der es sich um das Cytoskelettprotein Aktin handelte. Beide Proteine sind in *D. discoideum* in großen Mengen vorhanden und werden durch die Zugabe von Mg^{2+} -ATP und in geringerem Maß von Mg^{2+} -GTP extrahiert. Sie stellen bei Präparationen, bei denen mit Nukleotiden gearbeitet wird, in *D. discoideum* stets die Hauptkontaminationen dar. Möglicherweise ist Dynamin B so gefaltet, daß das Heptahistidinepitop maskiert wird und somit eine Bindung an das Metallchelatomaterial verhindert wird. Daß Proteine mit terminaler Markierung nicht an das

Säulenmaterial binden ist nicht ungewöhnlich und wurde u.a. auch bei Dynamin A mit aminoterminalen Histidinpeptid beobachtet.

Erschwerend für eine effiziente Reinigung von Dynamin B war die relativ schwache Expression von rekombinantem Dynamin B. Die 6 bis 10fach stärkere Expression von Histidin-markiertem Dynamin B gegenüber endogenem Protein reichte nicht aus, um es auf Coomassie-Blau gefärbten Gelen nachzuweisen. Selbst im GTP-Extrakt ließ es sich nur auf Western-Blots eindeutig nachweisen.

4.3.5 Versuche zur Isolierung von Dynamin B ohne aminoterminalen Signalpeptid (Δ NTS-Dynamin B)

Die aminoterminalen Extension von Dynamin B besteht zu 26 % aus Asparaginresten, die hauptsächlich in langen Homopolymerketten angeordnet sind. Aufgrund dieses hohen Anteils an Asparaginresten könnte die entsprechende Aminoacyltransferase für die Translation des Proteins limitierend sein. Daher wurde ein Konstrukt synthetisiert, welches für ein Fusionsprotein aus Dynamin B ohne aminoterminalen Signalpeptid und mit carboxyterminalem Heptahistidinpeptid (pDymB- Δ NTS) kodiert.

Das Plasmid pDymB- Δ NTS wurde in AX3-ORF-Zellen transformiert und die Produktion von Dynamin B- Δ NTS anhand von Western-Blot-Analyse untersucht. Die Abwesenheit der Extension führte zu einer 15 bis 20fachen Steigerung der Expression gegenüber endogenem Dynamin B, wie anhand der Signalintensitäten abgeschätzt wurde (Abb. 4-17).

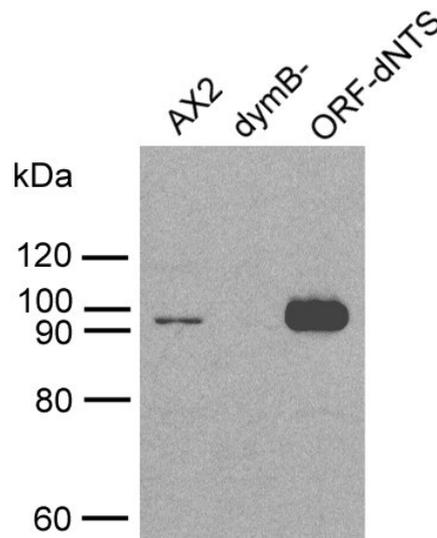


Abb. 4-17: Western-Blot-Analyse zur Expression von Δ NTS-Dynamin B

Gesamtproteinlysate von AX2-Zellen, *dymB*-Zellen und Δ NTS-Dynamin B produzierenden ORF-Zellen (ORF- Δ NTS-Zellen) wurden auf einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wurde mit dem affinitätsgereinigten anti-Dynamin B Antikörper und Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-(Kaninchen-IgG)-Zweitantikörpern aus Ziege inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits.

Für die Isolierung von Δ NTS-Dynamin B wurde zunächst im analytischen Maßstab eine GTP-Extraktion gemäß 3.3.3.1 durchgeführt. Da Δ NTS-Dynamin B am Carboxyterminus ein Heptahistidinpeptid trägt, wurde die Bindung an Ni-NTA untersucht. Es wurde aber weder im GTP-Extrakt noch im Eluat der Affinitätsreinigung eine auf Coomassie-Blau gefärbten Gelen detektierbare Anreicherung von Dynamin B gefunden.

Daher wurde eine Reinigung und Anreicherung von Δ NTS-Dynamin B an anderen Chromatographiematerialien versucht, falls auch bei diesem Konstrukt das Heptahistidinepitop maskiert sein sollte. Hierbei bot sich insbesondere die Anionenaustauschchromatographie an, da Δ NTS-Dynamin B bei Verwendung des leicht alkalischen Puffersystems negativ geladen ist (pI = 5,4). Mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie wurde außerdem schon Dynamin A erfolgreich aufgereinigt (Wienke, Doktorarbeit, 1998). Getestet wurde die Bindung an die Anionenaustauschermaterialien DEAE, der ein schwacher Ionenaustauscher ist, und an SuperQ als starken Ionenaustauscher. Es wurden jeweils die Überstände, die aus der Zentrifugation nach der Lyse resultierten, sowie der GTP-Extrakt mit dem Säulenmaterial inkubiert (s. 3.3.3.2). Die Elution erfolgte mit einer 500 mM NaCl-Lösung. Unter keiner der getesteten Bedingungen hat eine Anreicherung von Dynamin B im Eluat stattgefunden. Die von den Zellen produzierte Menge an rekombinantem Δ NTS-Dynamin B war trotz stärkerer Expression immer noch zu gering für eine effiziente Isolierung des Proteins.

Schließlich wurde versucht, Δ NTS-Dynamin B in Bakterien zu produzieren. Hierzu wurde das Konstrukt p Δ NTS-DymB mit carboxyterminalem Heptahistidinpeptid in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-60 umklont. Das entstandene Plasmid pQE-60- Δ NTS-DymB wurde in den *E. coli*-Stamm SG 13009 transformiert und die Expression nach Induktion mit IPTG untersucht (gemäß 3.3.4.2). Keiner der 12 Klone wies ein erhöhtes Expressionsniveau an Δ NTS-Dynamin B im Vergleich zur nicht induzierten Probe auf. Möglicherweise wirkt das Produkt in größeren Mengen auf die Bakterien toxisch. Daher wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt.

4.4 Gezielte Geninaktivierung von *dymB* in *D. discoideum*

Mit der Methode der gezielten Geninaktivierung wird der genomische Locus des zu untersuchenden Gens so verändert, daß das Genprodukt in der Zelle nicht mehr funktionell produziert wird. Aus der Analyse des Phänotyps der mutierten Zellen lassen sich dann Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins in dem Organismus ableiten. Die gezielte Geninaktivierung erfolgt *in vivo* durch homologe Rekombination zwischen dem Ziel-Gen und einem DNA-Fragment, das außer flankierenden homologen Segmenten einen selektierbaren Marker enthält. Die flankierenden Bereiche müssen ausreichend lang sein, um eine hohe Rekombinationseffizienz zu gewährleisten. Durch die Isolierung des genomischen Klons E1 mit dem 5'-Ende von *dymB* konnte die Methode der gezielten Geninaktivierung zur funktionellen Charakterisierung von Dynamin B eingesetzt werden.

4.4.1 Konstruktion des Geninaktivierungsvektors

Grundlage für die Herstellung des Geninaktivierungsvektors pBS-E1- $\Delta dymB$ war der Vektor pBS-E1. Durch enzymatischen Verdau mit *Pst* I und *Xba* I und anschließender Religation wurde die *Spe* I-Schnittstelle in dem Polylinkerbereich des Vektors entfernt. Das entstandene Konstrukt pE1- ΔSpe I wurde mit *Spe* I und *Nsi* I geschnitten und die *Nsi* I-Schnittstelle geglättet. Dadurch wurde ein ca. 400 Bp großes Fragment aus *dymB* entfernt, in das die Blasticidin S-Resistenzkassette eingefügt wurde. Hierzu wurde die 1,4 kBp große Resistenzkassette mit *Hind* III und *Xba* I aus dem Vektor pBSR geschnitten und die *Hind* III-Schnittstelle geglättet. Die Kassette wurde nun zwischen die *Spe* I-Schnittstelle, die kompatibel zur *Xba* I-Schnittstelle der Kassette ist, und die geglättete *Nsi* I-Schnittstelle des Vektors pE1- ΔSpe I inseriert.

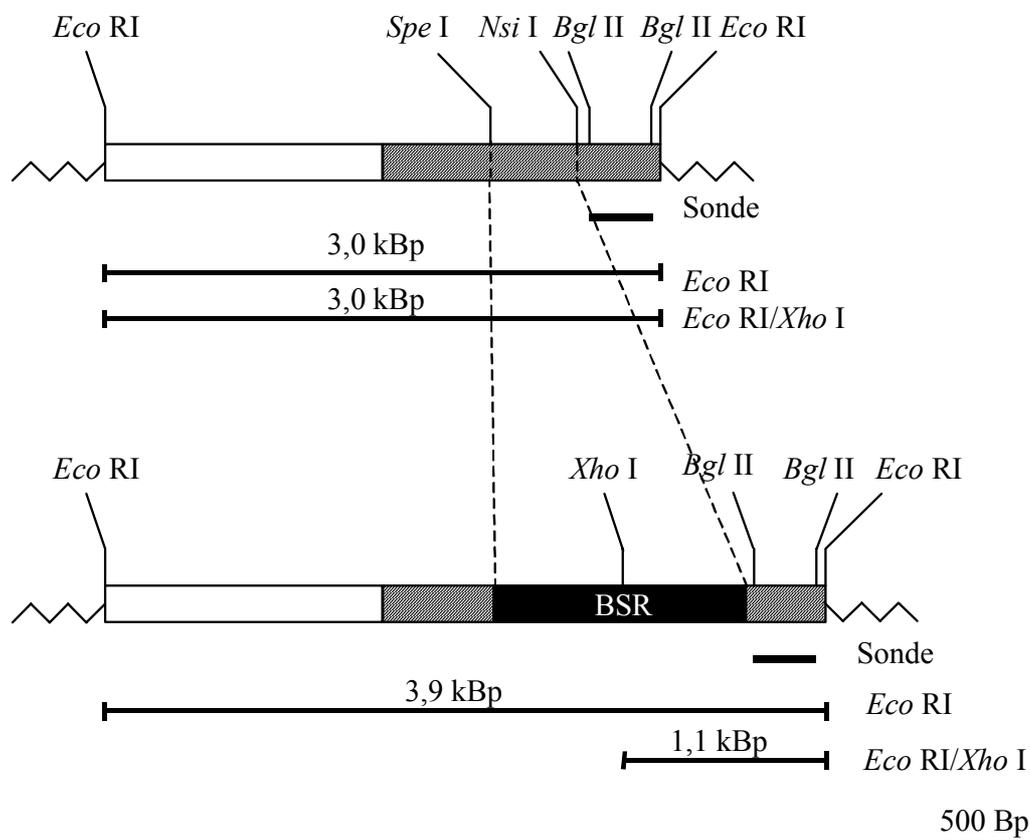


Abb. 4-18: Schematische Restriktionskarten des partiellen *dymB*-Lokus in AX2-Wildtypzellen (A) und in *dymB*⁻-Zellen (B)

(A) Restriktionskarte des genomischen *Eco* RI-Fragments von Plasmid pBS-E1, welches das 5'-Ende von *dymB* enthält. (B) Restriktionskarte, die auf den erwarteten Veränderungen nach homologer Rekombination mit der Geninaktivierungskassette basiert. Die kodierende Sequenz ist jeweils durch schraffierte Balken dargestellt, nicht kodierende Sequenzen durch weiße. Die Blasticidin S-Resistenzkassette (BSR) ist als schwarze Fläche gekennzeichnet. Die schwarzen Balken unterhalb der Restriktionskarten verdeutlichen die Längen der Fragmente, die mit der Sonde (*Bgl* II-Sonde, kurzer Balken direkt unterhalb der Karten) hybridisieren, wenn genomische DNA der entsprechenden Zelllinie mit den angegebenen Restriktionsenzymen behandelt wird.

Für die Herstellung von *dymB*-Zellen wurden AX2-Wildtypzellen verwendet. Vor der Einführung in die AX2-Zellen wurde das Insert mit *Eco* RI aus dem Geninaktivierungsvektor isoliert, dephosphoryliert und gereinigt. Die Verwendung von linearisierten und dephosphorylierten DNA-Fragmenten erhöht die Effizienz der homologen Rekombination und reduziert unbeabsichtigte Rekombinationsereignisse wie z.B. Mehrfachinsertionen. Nach der Transformation des 4 kBp großen Fragments mittels Elektroporation wurden die Mutanten durch Zusatz von 5 µg/ml des Antibiotikums Blasticidin S in das Nährmedium selektiert. Nach fünftägiger Selektion wurden viele Zellkolonien erhalten, von denen 36 isoliert und in 24-Loch-Mikrotiterplatten überführt wurden. Nach einer weiteren Woche im Selektionsmedium wurden 8 der Kolonien durch Wachstum auf Bakterienrasen kloniert.

Die Einführung des Geninaktivierungskonstrukts in den *dymB*-Lokus wurde mit Hilfe der Southern-Blot-Technik überprüft. Aus 8 Transformanten wurde genomische DNA isoliert und durch Restriktionsverdau analysiert. Als Sonde diente wiederum die *Bgl* II-Sonde. Die Restriktionskarten in Abb. 4-18 verdeutlichen die Veränderungen des nativen *dymB*-Lokus durch die Insertion der Resistenzkassette.

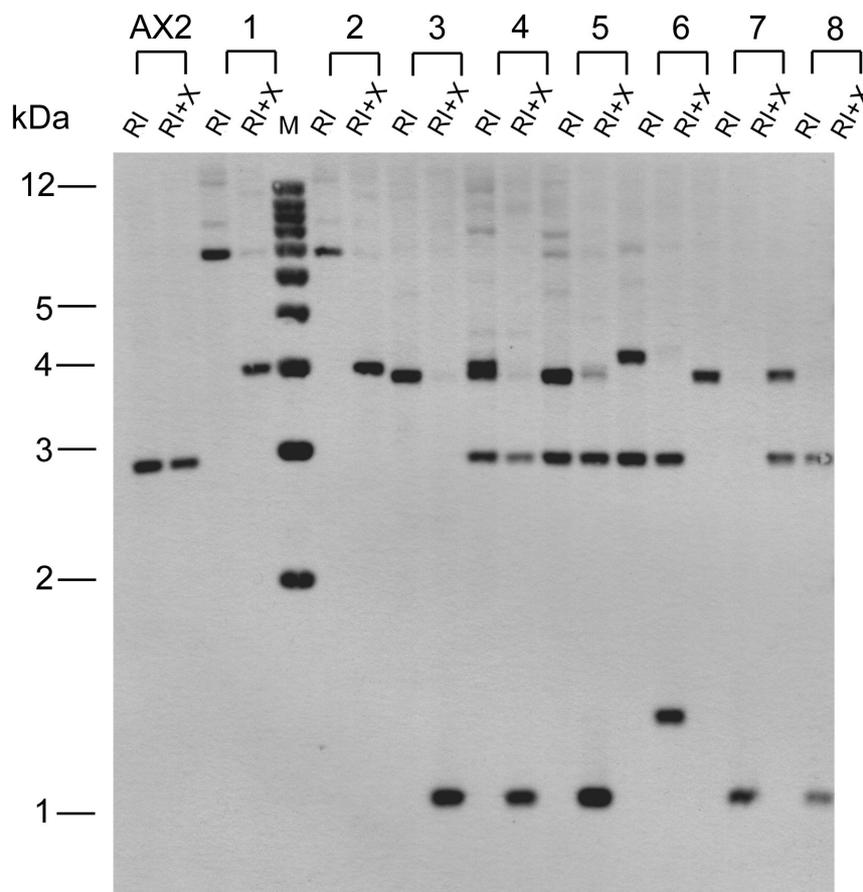


Abb. 4-19: Southern-Blot-Analyse des *dymB*-Lokus in AX2-Wildtypzellen und *dymB*-Zellen

Chromosomale DNA wurde aus AX2- und *dymB*-Zellen isoliert, mit den angegebenen Restriktionsenzymen fragmentiert und auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (50 µg pro Spur). Nach Übertragung auf eine Nylonmembran wurde die DNA mit der *dymB*-spezifischen *Bgl* II-Sonde hybridisiert. Die Detektion der Digoxigenin-markierten Sonde erfolgte durch Chemolumineszenz und Exposition auf Röntgenfilm für 3 h bei RT. Die Größen der Markerfragmente sind links angegeben.

Abb. 4-19 zeigt den Southern-Blot mit DNA-Fragmenten vom Wildtyp und von den 8 Transformanten. In zwei Fällen (Klone 3 und 7) stimmen die Southern-Blot-Analysen mit den erwarteten Hybridisierungsmustern für das Rekombinationsereignis überein. In drei Fällen wurde ein Muster erhalten, das einer Mischung aus Wildtyp- und positivem Signal entspricht (Klone 4, 5 und 8), was bedeutet, daß diese Transformanten nicht monoklonal waren. Und nur drei Transformanten lieferten ein Bandenmuster (Klone 1, 2 und 6), das für ein unerwartetes Rekombinationsereignis sprach. Die Effizienz für das gewünschte Rekombinationsereignis war somit sehr hoch (um die 50 %). Der Vergleich zwischen AX2-Zellen und der Klone 3 und 7 zeigt die erwarteten Veränderungen der Bandengrößen von 3,0 kBp nach 3,9 kBp (*Eco* RI) und von 3,0 kBp nach 1,1 kBp (*Eco* RI/*Xho* I). Die von Klon 3 stammenden Zellen wurden bewahrt und im folgenden als *dymB*⁻-Zellen bezeichnet.

Da auf dem Southern-Blot pro Restriktionsverdau jeweils nur eine Bande detektiert wurde, konnten Mehrfachinsertionen der Kasette in das Genom ausgeschlossen werden. Mittels PCR-Analyse wurde zusätzlich sichergestellt, daß die Geninaktivierungskassette an dem gewünschten Lokus inseriert wurde. Dies wurde durch Verwendung eines Primers, der außerhalb des Geninaktivierungskonstrukts lag, ermöglicht, da nur bei richtiger Insertion ein Amplifizierungsprodukt erwartet wurde. Primer HN-12 hybridisiert mit einem Bereich von *dymB*, der außerhalb des Konstrukts stromabwärts liegt. Als gegenläufigen Primer wurden die Oligonukleotide BLA und HN-10 verwendet, die innerhalb des Konstrukts lagen, wobei BLA komplementär zu einer Region innerhalb der Resistenzkassette und HN-10 zu einer Region stromaufwärts der Kasette ist (s. Abb. 4-20). Die erwarteten Amplifizierungsprodukte sind in Tab. 4-1 zusammengefaßt. Sie stimmen mit den erhaltenen Produkten aus Abb. 4-21 überein.

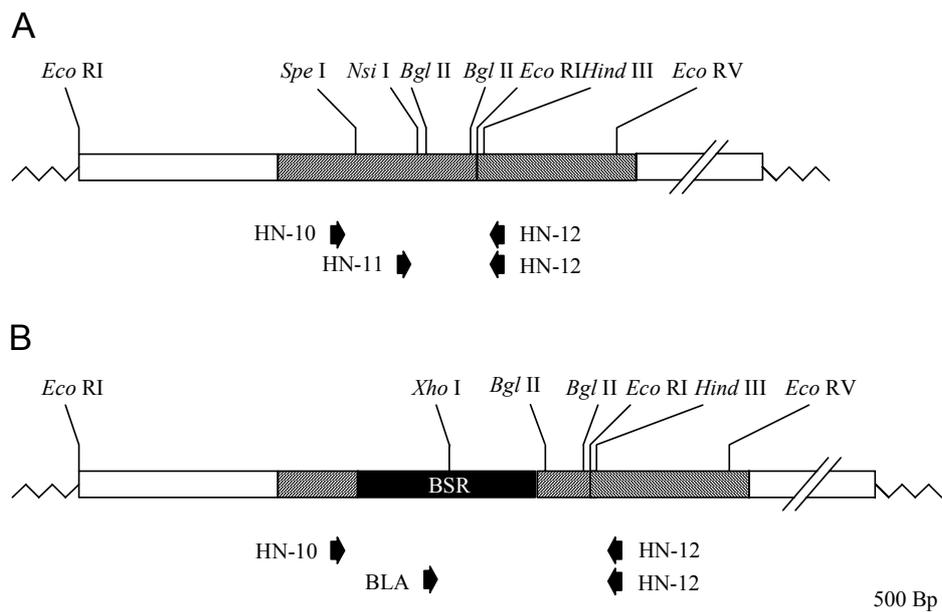


Abb. 4-20: Restriktionskarten des vollständigen *dymB*-Lokus in AX2-Wildtypzellen (A) und in *dymB*⁻-Zellen (B)

Die Restriktionskarten basieren auf den erwarteten Veränderungen nach homologer Rekombination des *dymB*-Lokus mit der Geninaktivierungskassette. Kodierende Sequenz wird durch schraffierte Balken dargestellt, wobei die rechts schraffierte Fläche der *dymB*-Sequenz im klonierten *Eco* RI-Fragment (Plasmid pBS-E1) entspricht. Die flankierenden Bereiche sind als offene Balken (für Sequenz, die in klonierter Form vorliegt) bzw. gezackt (für unbekannte Sequenz) gezeichnet. Unterhalb der Karten sind die Positionen der für die PCR-Analyse verwendeten Primer durch Pfeilspitzen markiert.

Primerkombination	AX2-Wildtypzellen	<i>dymB</i> ⁻ -Zellen
HN-10 und HN-12	1,0 kBp	2,0 kBp
HN-11 und HN-12	0,6 kBp	kein Produkt
BLA und HN-12	kein Produkt	1,3 kBp

Tab. 4-1: Erwartete Größen der Amplifizierungsprodukte der PCR-Analyse von AX2-Wildtypzellen und *dymB*⁻-Zellen

Mit der Primerkombination HN-10 und HN-12 wird bei den Mutantenzellen ein größeres Produkt erwartet, da bei der Geninaktivierung ein 0,4 kBp-Fragment durch die 1,4 kBp große Blastocidin-Resistenzkassette ersetzt wird. Bei Verwendung der Primerkombination HN-11 und HN-12 kann nur mit Wildtyp-DNA als Matrize ein Produkt erhalten werden, da der genomische Bereich, mit dem Primer HN-11 hybridisiert in den *dymB*⁻-Zellen fehlt. Mit den Primern BLA und HN-12 wird dagegen nur ein Produkt für *dymB*⁻-Zellen erwartet, da BLA mit der Resistenzkassette hybridisiert.

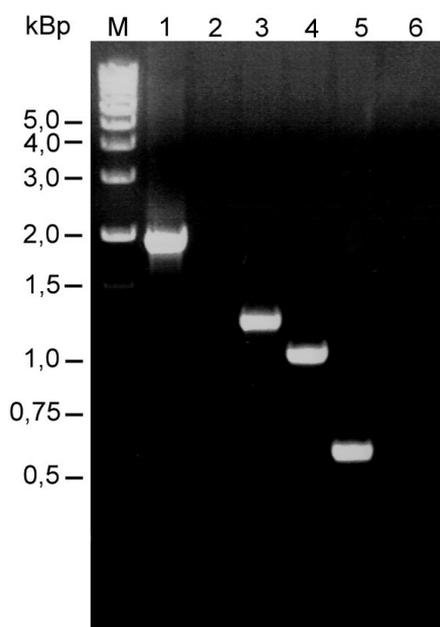


Abb. 4-21: PCR-Analyse genomischer DNA aus AX2-Wildtypzellen und *dymB*⁻-Zellen

Als Primerkombinationen für die PCR-Reaktionen wurden verwendet: HN-10 und HN-12 (Spuren 1 und 4), HN-11 und HN-12 (Spuren 2 und 5) und BLA und HN-12 (Spuren 3 und 6). Als Matrize wurde genomische DNA aus *dymB*⁻-Zellen (Spuren 1 bis 3) und aus AX2-Zellen (Spuren 4 bis 6) eingesetzt. Es wurden jeweils 10 µl der Ansätze auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und die Banden durch Färben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Größen der als Markerfragmente (M) verwendeten 1 kBp-Leiter sind links angegeben.

Ferner wurde die Auswirkung der Geninaktivierung auf die Expression von Dynamin B in den *dymB*⁻-Zellen durch Western-Blot-Analyse untersucht. Unter Verwendung des gegen Dynamin B gerichteten Antikörpers wies das Gesamtproteinlysate von AX2-Wildtypzellen eine Bande bei 92 kDa, die dem prozessierten Protein entspricht, auf. In *dymB*⁻-Zellen wurde wie erwartet kein Signal detektiert (s. Abb. 4-15).

4.5 Charakterisierung der *dymB*⁻-Zellen

4.5.1 Analyse der *dymB*⁻-Zellen hinsichtlich morphologischer Veränderungen

DymB⁻-Zellen und AX2-Wildtypzellen wurden hinsichtlich morphologischer Unterschiede im Lichtmikroskop (Phasenkontrast und DIC) untersucht. Die *dymB*⁻-Zellen wiesen keine offensichtlichen morphologischen Anomalitäten auf. Sie hatten wie die Wildtypzellen eine uniforme Größenverteilung mit einem Zelldurchmesser von 10 bis 20 μm .

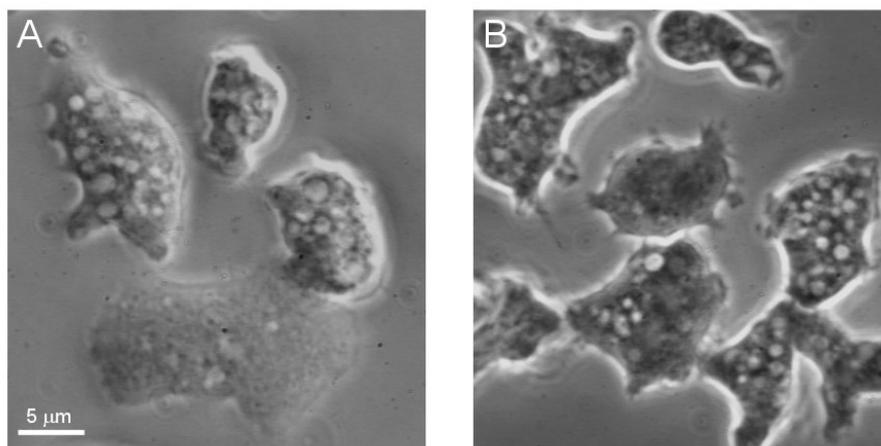


Abb. 4-22: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von AX2-Zellen (A) und *dymB*⁻-Zellen (B) Die Zellen wurden mit MES-Puffer gewaschen und in Borosilikatkammern für die Mikroskopie (Lab-Tek[®]-Kammern von NalgeNunc) überführt. Die Analyse der Zellen erfolgte nach 2,5 h an einem Zeiss Axiovert 135 Mikroskop mit angeschlossener Videokamera PCO VX44 und dem Bildverstärkungssystem Hamamatsu Argus 20. Es gilt die gleiche Skala für beide Abbildungen.

Daneben wurde die Ultrastruktur der Zellen mit Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Auf ultrastruktureller Ebene konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien gefunden werden, der nicht auf unterschiedliche Schnittebenen der Zellpräparate, individuelle Unterschiede innerhalb einer Zellpopulation oder auf den jeweiligen Zustand einer Zelle zurückgeführt werden könnte. Form, Größe und Verteilung der verschiedenen Organellen in *dymB*⁻-Zellen ähnelten prinzipiell denen in Wildtypzellen. Abb. 4-23 zeigt die elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer AX2- und einer *dymB*⁻-Zelle. Der Zellkern in den Mutantenzellen hat eine normale Morphologie. Bei den Kernen beider Zellen ist deutlich die Kernkappe zu erkennen, die sich innerhalb des Zellkerns dunkel abhebt. Die kontraktile Vakuole erscheint in der AX2-Zelle größer als bei der *dymB*⁻-Zelle. Dies kann damit erklärt werden, daß die Vakuole der AX2-Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung mehr Flüssigkeit als die der *dymB*⁻-Zelle enthielt, da auf weiteren, hier nicht gezeigten Aufnahmen auch *dymB*⁻-Zellen mit großen Vakuolen erkennbar sind. Die Mitochondrien der *dymB*⁻-Zellen

sehen normal aus und haben die für das Organell charakteristische ovale Form. Sie sind gleichmäßig über die Zelle verteilt. Bei *dymA*⁻-Zellen und einigen anderen Mutanten von Dynamin-ähnlichen Proteinen, z.B. von Drp1 und Dnm1p, sind die Mitochondrien dagegen morphologisch stark verändert und meist innerhalb eines Bereiches der Zelle akkumuliert.

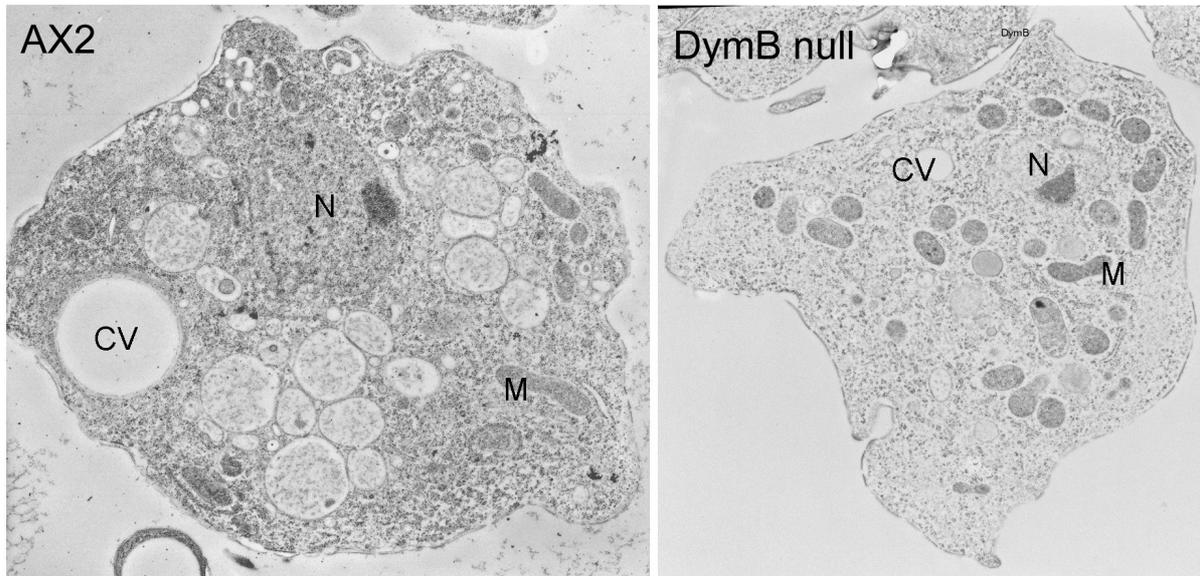


Abb. 4-23: Vergleich der subzellulären Morphologie von AX2-Zellen und *dymB*⁻-Zellen

Die Zellen wurden in Form von Monolagen auf Deckgläsern durch Gefriersubstitution in flüssigem Ethan fixiert. Nach Einbettung in Lowicryl HM-20 wurden die Präparate horizontal geschnitten. Es wurde die gleiche Skala für beide Abbildungen verwendet. Abkürzungen: N = Zellkern, CV = kontraktile Vakuole, M = Mitochondrium

4.5.2 Zellwachstum

4.5.2.1 Wachstum in Suspensionskultur

Das Fehlen des Genprodukts von *dymB* hatte keinen Einfluß auf das Wachstum von *D. discoideum*, da *dymB*⁻-Zellen sowohl auf Platten als auch in Suspensionskultur stabil kultiviert werden konnten. *DymB*⁻-Zellen verdoppelten sich genauso schnell wie AX2-Zellen, wie aus Abb. 4-21 ersichtlich ist. Die Verdopplungszeiten betragen jeweils 12 h. In Schüttelkultur erreichten beide Zelllinien eine maximale Zelldichte zwischen $1 \cdot 10^7$ - $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml.

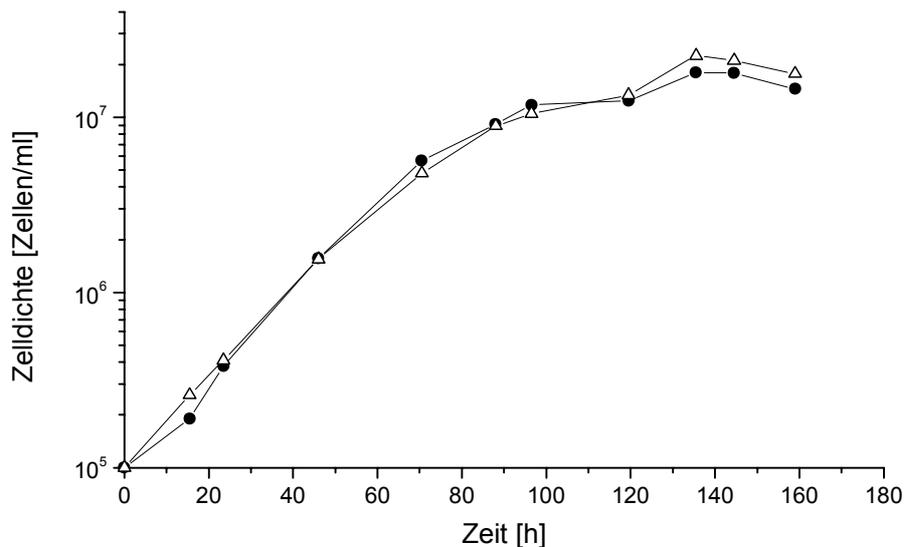


Abb. 4-24: Wachstum von AX2-Wildtypzellen (geschlossene Kreise) und *dymB*⁻-Zellen (offene Dreiecke) in Schüttelkultur

Die Zellen wurden bei 180 UpM und 21 °C in HL5c-Medium geschüttelt, und die Zelldichten zu den angegebenen Zeitpunkten mit Hilfe eines Hämocytometers bestimmt. Die Werte für die Zelldichte sind logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen.

4.5.2.2 Wachstum auf Bakterienrasen

Plattiert man *D. discoideum*-Zellen zusammen mit Bakterien auf Agarplatten aus, so werden nach wenigen Tagen runde Freßhöfe (Plaques) sichtbar. Diese entstehen, indem sich die *D. discoideum*-Zellen von den Bakterien ernähren und dabei klare, bakterienfreie Flächen hinterlassen, wie in Abb. 4-25 beispielhaft gezeigt ist. Die Plaquedurchmesser nehmen hierbei linear mit der Zeit zu.



4. Tag

5. Tag

6. Tag

Abb. 4-25: Bildung von *D. discoideum*-Freßhöfen auf Bakterienrasen

DymB⁻-Zellen wurden mit einer Bakteriensuspension (*K. aerogenes*) gemischt und auf 1/3 SM-Agarplatten (Durchmesser 14 cm) verteilt. Nach 3 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur waren die ersten winzigen Freßhöfe mit bloßem Auge erkennbar. Die Platten wurden am 4., 5. und 6. Tag nach dem Ausplattieren fotografiert.

Das Wachstum auf Bakterienrasen der *dymB*⁻-Zellen ist gegenüber den AX2-Wildtypzellen deutlich erhöht (Abb. 4-26). Die Mutanten wuchsen im Schnitt um ca. 40 % (± 8 %) schneller als die AX2-Zellen, wie durch Mittelwertbildung der berechneten Steigungen von fünf unabhängigen Experimenten hervorging (s. auch Kap. 4.5.7).

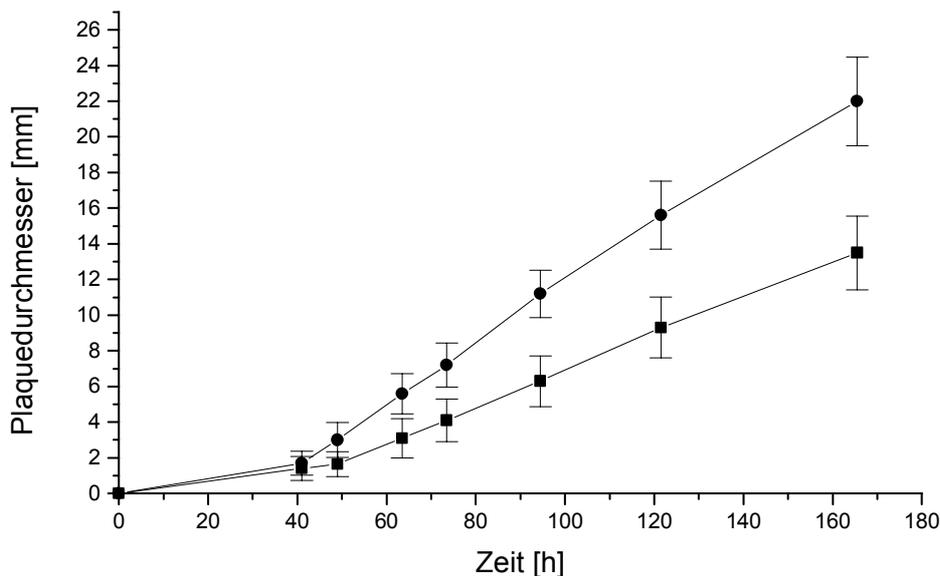


Abb. 4-26: Wachstum von AX2-Wildtypzellen und *dymB*⁻-Zellen auf Bakterienrasen

Je 100 AX2- und *dymB*⁻-Zellen wurden mit einer Bakteriensuspension (*K. aerogenes*) gemischt und auf 1/3 SM-Agarplatten (Durchmesser 14 cm) verteilt. Da nicht alle der ausplattierten Zellen die vorherige Verdünnungsprozedur überleben und Freßhöfe bilden, erwies sich die letztlich daraus resultierende Anzahl an Zellen bzw. Freßhöfen als für die Messung geeignet (s. auch Abb. 4-25). Die Durchmesser der gebildeten Plaques wurden zu den angegebenen Zeiten gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Der Zeitpunkt 0 entspricht dem Zeitpunkt des Ausplattierens. Pro Zeitpunkt und Zelllinie wurden die Plaquedurchmesser von 3 Platten bestimmt.

4.5.3 Analyse der Zelladhäsion

Beim Abspülen der *dymB*⁻-Zellen von den Kulturplatten wurde eine erhöhte Haftung im Vergleich zu den AX2-Zellen beobachtet, die sich leichter von den Platten entfernen ließen. Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurden gleiche Mengen an *dymB*⁻-Zellen und AX2-Zellen in Erlenmeyerkolben inkubiert und dann für kurze Zeit bei niedriger Umdrehungszahl geschüttelt (Vogel, 1983). Anschließend wurde der Prozentsatz an nicht haftenden Zellen durch Zählen der Zellen im Überstand bestimmt. In einem parallelen Ansatz wurde zu den Proben 10 mM EDTA gegeben, um den Einfluß von EDTA auf die Zelladhäsion zu testen.

DymB⁻-Zellen zeigen im Vergleich zu den Wildtypzellen eine um ca. dreifach erhöhte Adhäsion (335 % ± 17 % bzgl. des Wildtyps). Bei *dymB*⁻-Zellen, die in EDTA-haltigem

Medium inkubiert wurden, sank die Adhäsion auf das 1,4fache des Wildtypwertes ($141\% \pm 38\%$ bzgl. des Wildtyps). Dies deutet darauf, daß die erhöhte Adhäsion der *dymB*⁻-Zellen über Ca^{2+} -abhängige Rezeptoren verläuft, d.h. über sogenannte Kontaktbindungsstellen B (*contact sites B*). *Contact sites B* sind Oberflächenrezeptoren, die in *D. discoideum* die Zell-Zell-Adhäsion zwischen vegetativ wachsenden Zellen vermitteln. Im Gegensatz dazu sind *contact sites A* Ca^{2+} -unabhängige Rezeptoren, die die Adhäsion zwischen Zellen, die sich im Entwicklungsstadium befinden, vermitteln.

Neben der Adhäsion auf Substrat wurde auch die Zell-Zell-Adhäsion von *dymB*⁻-Zellen in Schüttelkultur untersucht. Bei niedriger Zelldichte liegen die Zellen einzeln vor, mit zunehmender Zelldichte fangen sie an zu aggregieren. Die *dymB*⁻-Zellen sind bei gleicher Zelldichte deutlich stärker aggregiert. Diese Beobachtung konnte auch durch folgendes Experiment bestätigt werden. Die verschiedenen Zellen wurden über mehrere Tage in Schüttelkultur kultiviert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Zellzahl bestimmt, wobei ein Teil der Zellen vor dem Zählen vereinzelt wurde, der andere Teil dagegen nicht. In beiden Fällen wurden nur die vereinzelt Zellen gezählt, aber keine Zellaggregate. Die Differenz zwischen beiden Proben (vereinzelt und nicht vereinzelt) war bei den *dymB*⁻-Zellen deutlich größer als die der AX2-Zellen. Sie betrug für die Nullzellen $66\% (\pm 6\%)$, während sie für die Wildtypzellen nur $27\% (\pm 5\%)$ betrug. Dies bedeutet, daß die Zell-Zell-Adhäsion der *dymB*⁻-Zellen gegenüber den Wildtypzellen um das 2,4fache erhöht ist. Die *dymB*⁻-Zellen sind zudem schon bei der geringen Zelldichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml merklich aggregiert. Ab dieser Zelldichte sind die Unterschiede zwischen der Zahl vereinzelter und nicht vereinzelter Zellen für den folgenden gemessenen Zeitraum bzw. die folgenden gemessenen Zelldichten ($4 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) für alle Zelllinien relativ konstant.

4.5.4 Untersuchung des endosomalen Systems

Die am besten untersuchte Funktion von Dynamin ist seine Rolle bei der Endocytose. Dynamin-1-Mutanten wiesen starke Defekte bei der Internalisierung von Flüssigphasenmarkern, Transferrin oder Neurotransmittern auf. Daher lag es nahe, die *dymB*⁻-Zellen auch auf einen möglichen Internalisierungsdefekt zu überprüfen.

Der Einfluß von Dynamin B auf die Aufnahme von flüssigen und gelösten Stoffen (Pinocytose) wurde durch quantitative Messung der Internalisierung des fluoreszierenden Flüssigphasenmarkers FITC-Dextran in AX2-Wildtyp- und *dymB*⁻-Zellen analysiert. Die Aufnahmeraten sowie die maximal aufgenommene Menge an FITC-Dextran waren für beide Zelltypen identisch. Die Geninaktivierung von *dymB* hatte demnach keine Auswirkungen auf die endocytotische Aktivität von *D. discoideum*-Zellen (Abb. 4-27).

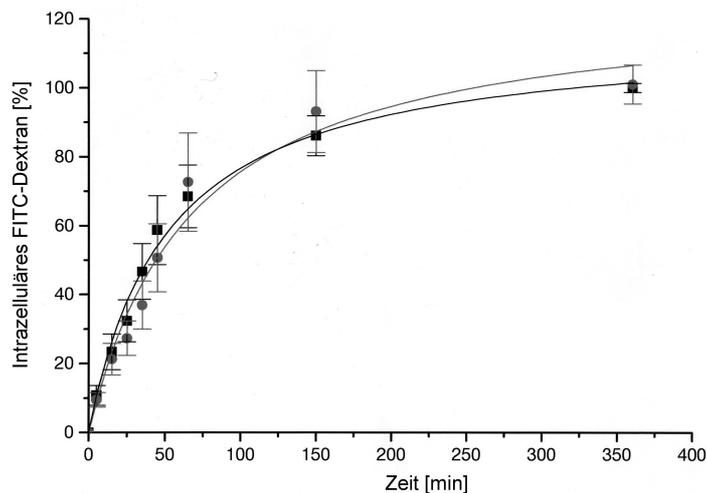


Abb. 4-27: Analyse der Pinocytose in AX2- (Quadrate) und *dymB*⁻-Zellen (Kreise)

Die Analyse der Pinocytose erfolgte durch Messung der Aufnahme des Flüssigphasenmarkers FITC-Dextran. Die Zellen wurden mit 1 mg/ml FITC-Dextran inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten gewaschen und mit 0,4 % Triton X-100 lysiert. Die internalisierte Menge an FITC-Dextran wurde fluoreszenzspektroskopisch bestimmt.

Ferner wurde die phagozytotische Aktivität in *dymB*⁻-Zellen analysiert. Bei der Phagozytose werden feste Substanzen in das Zellinnere aufgenommen. Sie wird durch Anheften von Partikeln an die Zelloberfläche ausgelöst. Zur quantitativen Bestimmung der Partikelaufnahme wurden die Zellen mit fluoreszierenden Polystyrol-Kügelchen über verschiedene Zeiträume inkubiert. Die Abtrennung von nicht internalisierten Partikeln erfolgte über Zentrifugation auf einem PEG-8000 Kissen, wobei die freien Partikel auf dem Kissen schwammen, während die Zellen sedimentierten. Die Zellen wurden lysiert und der Fluoreszenzgehalt fluorimetrisch gemessen. Hierbei wurde für die *dymB*⁻-Zellen eine Zunahme der Phagozytose um 15 % gegenüber den Wildtypzellen gefunden.

Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß an der Zelloberfläche Polystyrol-Kügelchen haften blieben, die ebenfalls zu einer Erhöhung der Fluoreszenz beitragen. Daher wurde der Fluoreszenzgehalt nach Zugabe eines Fluoreszenzlöschers (*Quenchers*) bestimmt, wobei nur die internalisierten Partikel vor dem *Quencher* geschützt waren (Maniak *et al.*, 1995) AX2- und *dymB*⁻-Zellen wurden über unterschiedliche Zeiträume mit FITC-markierten Hefen inkubiert. Nach dem Quenchen mit einer Trypanblaulösung (hergestellt nach Hed, 1986) wurden die Zellen in Puffer aufgenommen und die Fluoreszenz direkt gemessen. Unter diesen Bedingungen waren die Partikel-Aufnahmeraten von AX2- und *dymB*⁻-Zellen identisch. Das Fehlen von Dynamin B in der Zelle scheint daher keinen Einfluß auf das endosomale System in *D. discoideum* zu haben.

Diese Daten wurden durch eine immunfluoreszenzmikroskopische Analyse ergänzt. Späte endocytotische Vesikel wurden mit einem gegen Vacuolin gerichteten Antikörper gefärbt. In Anzahl, Größe und Verteilung dieser Vesikel konnte kein Unterschied zwischen AX2- und *dymB*⁻-Zellen beobachtet werden. Das gleiche galt auch für die Färbung von frühen Endosomen, die mit einem gegen Coronin gerichteten Antikörper visualisiert wurden.

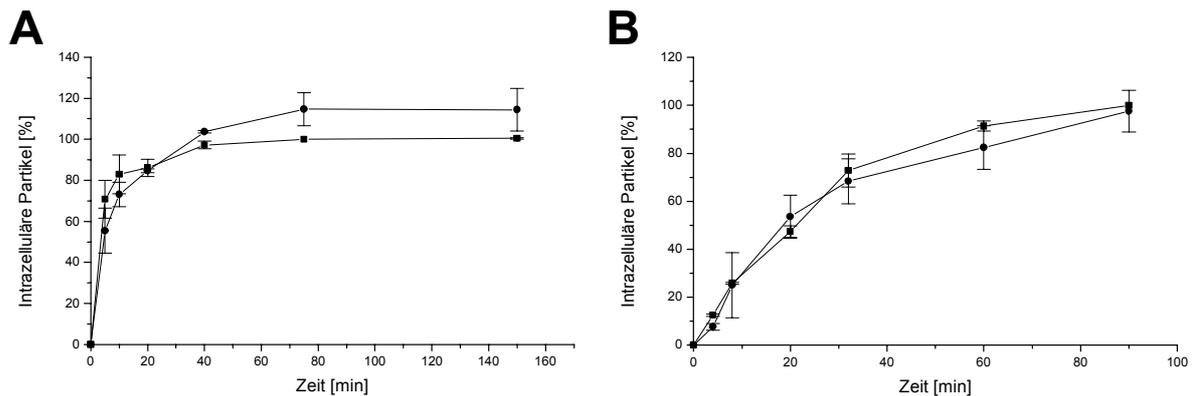


Abb. 4-28: Analyse der Phagozytose in AX2-Wildtypzellen (Quadrate) und *dymB*⁻-Zellen (Kreise)
(A) Analyse der Phagozytose durch Aufnahme von fluoreszierenden Polystyrol-Kügelchen. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten in einer Suspension von Polystyrol-Kügelchen in HL5c-Medium inkubiert, gewaschen, lysiert und die aufgenommene Menge an fluoreszierenden Partikeln fluoreszenzspektroskopisch bestimmt. **(B)** Analyse der Phagozytose durch Aufnahme von fluoreszierenden Hefezellen. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten in einer Suspension von FITC-markierten Hefezellen in HL5c-Medium inkubiert und dann mit Trypanblaulösung versetzt, um die Fluoreszenz nicht internalisierter Partikel zu löschen. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in Puffer resuspendiert und die Menge an aufgenommenen Hefezellen fluoreszenzspektroskopisch gemessen. Die Werte beziehen sich auf den für AX2-Zellen erhaltenen Maximalwert, der 100 % entspricht.

4.5.5 Analyse verschiedener subzellulärer Strukturen in *dymB*⁻-Zellen

Die kontraktile Vakuole von *D. discoideum* ist ein komplexes Organell, das aus Vakuolen unterschiedlicher Größe besteht, die wiederum über ein röhrenartiges System miteinander verbunden sind. Die Hauptaufgabe der kontraktilen Vakuole besteht in der Osmoregulation, indem überschüssiges Wasser durch Verschmelzen einer flüssigkeitsgefüllten Vakuole mit der Plasmamembran nach außen befördert wird. Um die Funktionalität dieses Organells in *dymB*⁻-Zellen zu untersuchen, wurden AX2- Wildtypzellen und *dymB*⁻-Zellen in hypotonischen und hypertonen Puffern inkubiert und eine bestimmte Anzahl dieser Zellen zusammen mit Bakterien auf Agarplatten verteilt. Nach einer dreitägigen Inkubation bei Raumtemperatur war die relative Anzahl an entstandenen Freßhöfen, normiert auf die Anzahl von Zellen, die vorher unter isotonen Bedingungen inkubiert worden waren, gleich. Die Überlebensrate betrug bei beiden Zelltypen unter hypo- und hypertonen Bedingungen zwischen 30 und 40 %.

Zusätzlich wurde die Morphologie der vakuolären Kompartimente von Wildtyp- und *dymB*⁻-Zellen miteinander verglichen. Die vakuoläre H⁺-ATPase ist mit den Membranen der kontraktilen Vakuole und in geringem Maß mit Endosomen assoziiert (Heuser *et al.*, 1993; Fok *et al.*, 1993; Temesvari *et al.*, 1996). Die Lokalisation dieses vakuolären Markers durch Immunfluoreszenz zeigte, daß es keine prinzipiellen Unterschiede in der Organisation der kontraktilen Vakuole zwischen Wildtyp- und Mutantenzellen gibt (Abb. 4-29 A). Folglich hat das Fehlen des *dymB*-Genprodukts keinen Einfluß auf die Osmosensibilität von *D. discoideum*.

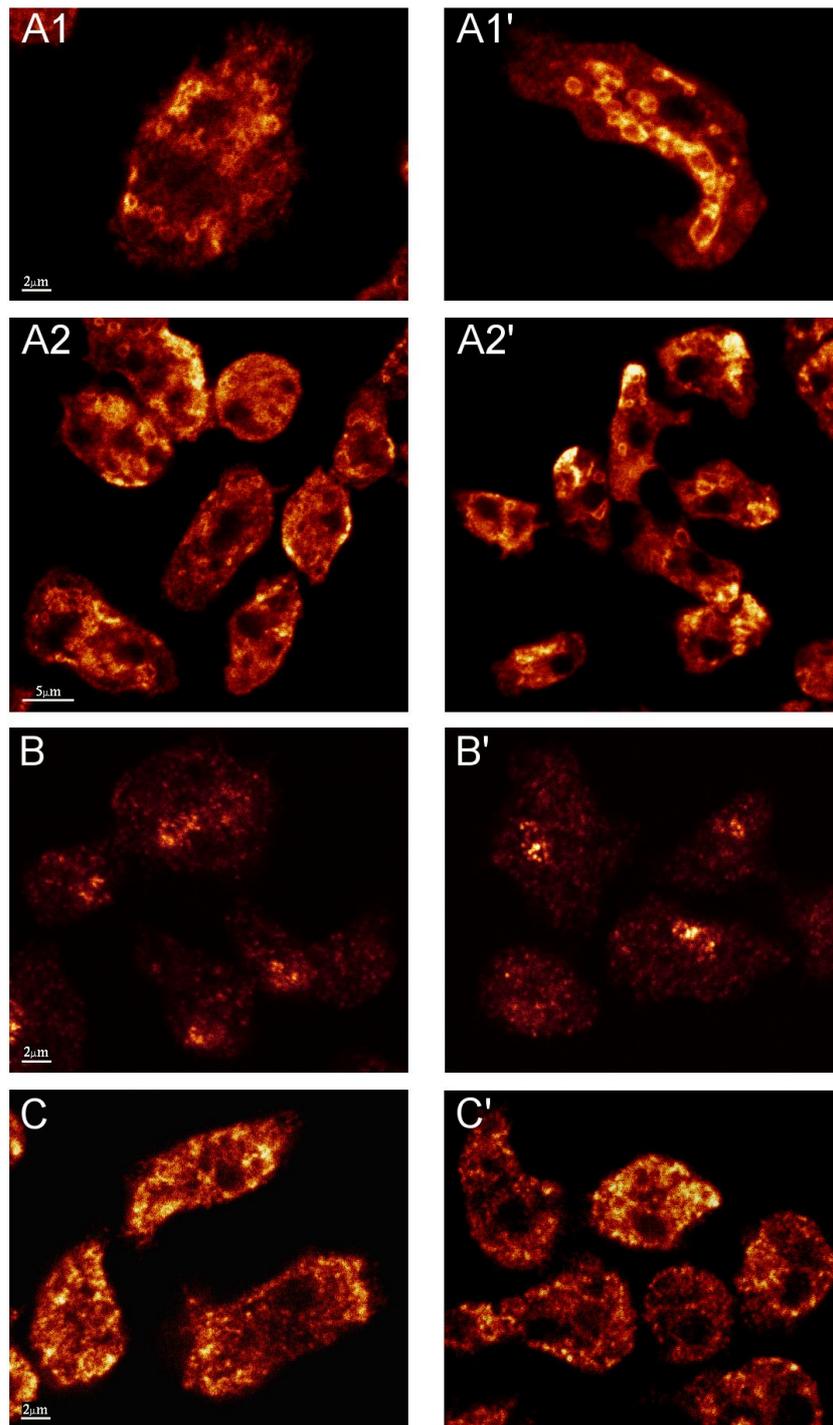


Abb. 4-29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Lokalisation von der vakuolären H^+ -ATPase (A), Clathrin (B) und Proteindisulfid-Isomerase (C) in AX2-Wildtypzellen (A1, A2, B, C) und *dymB*⁻-Zellen (A1', A2', B', C')

Die Zellen wurden durch Gefriersubstitution in Methanol fixiert und mit folgenden Erstantikörpern inkubiert: (A1, A1', A2, A2') monoklonaler Antikörper gegen die vakuoläre H^+ -ATPase in *D. discoideum* als Markerenzym für die kontraktile Vakuole (1:5 verdünnt), (B, B') polyklonaler Antikörper gegen die schwere Untereinheit von *D. discoideum* Clathrin (1:500 verdünnt), (C, C') monoklonaler Antikörper gegen *D. discoideum* Protein-Disulfid-isomerase als Markerenzym für das endoplasmatische Retikulum (1:10 verdünnt). Als Zweitantikörper wurden Alexa488-gekoppelte Anti-(Maus-IgG)-Antikörper (A1, A1', A2, A2', C, C'), bzw. Anti-(Kaninchen-IgG)-Antikörper (B, B') verwendet. Die Präparate wurden mit einem Konfokalmikroskop Leica DM/IRB aufgenommen und repräsentieren jeweils einen konfokalen optischen Schnitt.

Weiterhin wurde die Lokalisation von Clathrin durch Immunfluoreszenz mit einem gegen die schwere Untereinheit von Clathrin gerichteten Antikörper untersucht. Clathrin ist am Membrantransport beteiligt, indem es bestimmte Vesikel, die (in tierischen Zellen) an der Plasmamembran und am Golgi-Apparat gebildet werden, umhüllt. Abb. 4-28 B zeigt die Verteilung von Clathrin in AX2- und *dymB*⁻-Zellen, wobei granuläre, vesikuläre Strukturen sichtbar sind. Die Färbung ist im perinukleären Bereich am intensivsten. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Clathrin-umhüllte Vesikel, die mit dem Golgi-Apparat assoziiert sind (Ohalloran und Anderson, 1992). Eine ähnliche Färbung wurde auch für ein Fusionsprotein aus *D. discoideum*-Clathrin und GFP beschrieben (Damer und O'Halloran, 2000). Die Rolle von Clathrin bei der Endocytose in *D. discoideum* ist noch nicht vollständig geklärt. Die Clathrin-Färbung in *dymB*⁻-Zellen ist identisch mit der in Wildtypzellen.

Daneben wurde die Lokalisation des endoplasmatischen Retikulums mit dem Markerenzym Protein-Disulfidisomerase überprüft (Abb. 4-29 C) Wildtyp- und *dymB*⁻-Zellen weisen eine gleichartige Färbung des retikulären Systems auf. Auch die Verteilung der Cytoskelettproteine Aktin und Tubulin war in beiden Zelltypen gleich.

4.5.6 Funktionelle und morphologische Analyse der Mitochondrien

Es wird eine zunehmende Anzahl an Dynamin-ähnlichen Proteinen entdeckt, die offenbar eine Rolle bei der Erhaltung der Mitochondrienmorphologie und -verteilung spielen. Hierbei sind sie entweder an der Außenseite der Mitochondrien lokalisiert, wie z.B. Dnm1p und Drp1, und helfen bei der Abschnürung von Mitochondrienmembranen oder sind im Mitochondrieninneren lokalisiert, wie im Fall von Mgm1p und Msp1p. Letztere besitzen ein mitochondriales Signalpeptid am Aminoterminus, das ihnen den Import in die Mitochondrien ermöglicht. Die Tatsache, daß Dynamin B am Aminoterminus prozessiert wird und daß in dieser Region eine Schnittstelle für eine mitochondriale Signalpeptidase vorhergesagt wird, sind wichtige Hinweise dafür, daß Dynamin B möglicherweise auch solch ein mitochondriales Signalpeptid besitzt. Daher wurden die Mitochondrien der *dymB*⁻-Zellen hinsichtlich Morphologie und Funktion analysiert, um eine mögliche Assoziation von Dynamin B mit den Mitochondrien zu finden.

Abb. 4-30 zeigt die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von AX2- und *dymB*⁻-Zellen, deren Mitochondrien mit einem gegen Porin gerichteten Antikörper angefärbt wurden. Porin ist ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran. Die Mitochondrien der Mutantenzellen weisen eine ähnliche Morphologie wie die der Wildtypzellen auf, die von ringförmigen bis wurmähnlichen Strukturen reichen. Sowohl in Form, Größe, Anzahl und Verteilung der Mitochondrien konnte kein Unterschied zwischen den beiden Zelltypen beobachtet werden. Auch auf ultrastruktureller Ebene konnten keine erkennbaren Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen festgestellt werden, wie schon die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 4-23 zeigten.

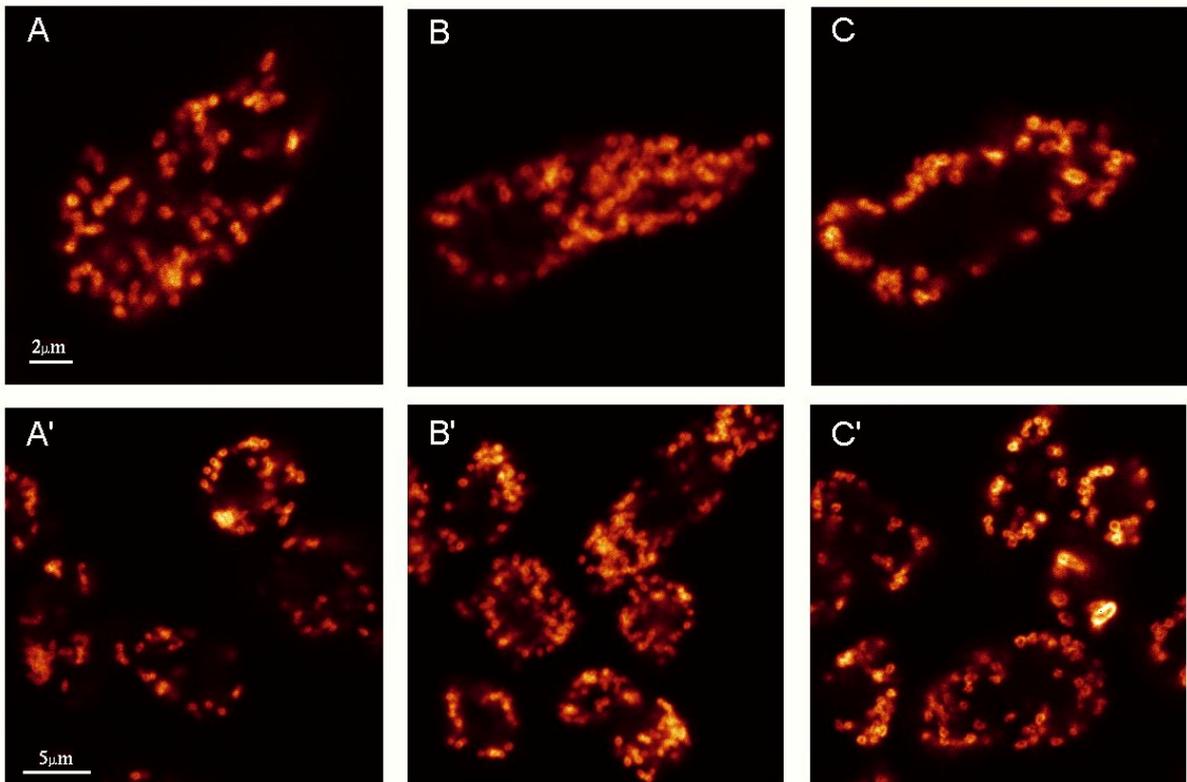


Abb. 4-30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Lokalisation von Mitoporphin in AX2-Wildtypzellen (A, A'), *dymB*⁻-Zellen (B, B') und *dymB*⁺-Zellen (C, C')

Die Zellen wurden durch Gefriersubstitution in Methanol fixiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen *D. discoideum* Porin als Markerenzym für die Mitochondrien inkubiert (1:5 verdünnt). Als Zweitantikörper wurde ein Alexa488-gekoppelter Anti-(Maus-IgG)-Antikörper eingesetzt. Die Präparate wurden mit dem konfokalen Mikroskop Leica DM/IRB aufgenommen und repräsentieren jeweils einen konfokalen optischen Schnitt.

Um die Funktion der Mitochondrien zu testen, wurde die Aktivität des mitochondrialen Markerenzym Succinat-Dehydrogenase in *dymB*⁻-Zellen gemessen. Succinat-Dehydrogenase ist ein integraler Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran und katalysiert im Zitronensäurezyklus die Oxidation von Succinat zu Fumarat. Die Messung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität in Gesamtzelllysaten von *dymB*⁻-Zellen und AX2-Zellen ergab für die Mutanten eine leicht verringerte Aktivität, die 89 % (± 6 %) der des Wildtyps entsprach.

Das Fehlen von Dynamin B in *D. discoideum* hat somit keine maßgebliche Auswirkung auf Form und Funktion der Mitochondrien.

4.5.7 Charakterisierung von Dynamin B überproduzierenden Zellen (*dymB*⁺-Zellen)

Neben der Untersuchung von Zellen, die ein bestimmtes Protein nicht mehr produzieren, kann auch das Verhalten von Zellen, die dieses verstärkt exprimieren, Rückschlüsse auf die

Funktion des Proteins liefern. Das Plasmid pDXA-dymB-ohne-His (Kap. 4.3.1) wurde für die Expression von Dynamin B ohne zusätzliche Peptidmarkierungen in AX2-Zellen transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte mit dem Antibiotikum G418. Das Expressionsniveau von rekombinantem Dynamin B lag um etwa das sechsfache höher als das von endogenem Dynamin B, wie anhand von Western-Blots abgeschätzt wurde. Neben der prozessierten Form war auch das nicht prozessierte 105 kDa große Protein vorhanden, wie bei den ORF-Zellen, die Dynamin B mit einem carboxyterminalem Histidinpeptid produzieren (s. Abb. 4-15).

Das morphologische Erscheinungsbild der *dymB*⁺-Zellen war wie das der *dymB*⁻-Zellen völlig normal. Sie waren imstande Fruchtkörper zu bilden, die in ihrer Morphologie ebenfalls den von AX2-Zellen glichen. Auf Bakterienrasen wuchsen *dymB*⁺-Zellen mit der gleichen Geschwindigkeit wie der Wildtyp, wie der Graph in Abb. 4-31 zeigt.

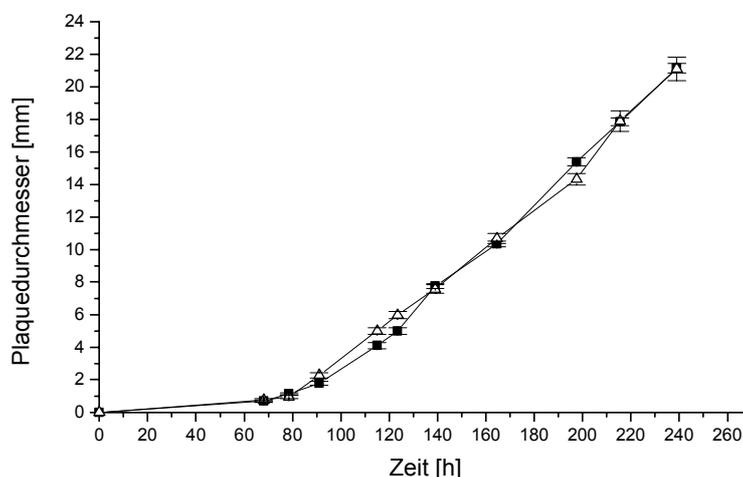


Abb. 4-31 Wachstum von AX2-Wildtypzellen (geschlossene Quadrate) und *dymB*⁺-Zellen (offene Dreiecke) auf Bakterienrasen

Entsprechend 4.5.2.2 wurden je 100 AX2-Wildtypzellen und *dymB*⁺-Zellen mit *K. aerogenes*-Bakterien auf 1/3 SM Agarplatten verteilt und für mehrere Tage inkubiert. Die Durchmesser der gebildeten Freßhöfe wurden zu den angegebenen Zeiten gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Der Zeitpunkt 0 entspricht dem Zeitpunkt des Ausplattierens. Pro Zeitpunkt und Zelllinie wurden die Plaquedurchmesser von drei Platten bestimmt

Der in Abb. 4-31 gezeigte Graph gibt ein repräsentatives Experiment wieder. Die durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeiten für AX2-, *dymB*⁺- und *dymB*⁻-Zellen aus drei bis sechs Experimenten betragen für AX2-Zellen 136 $\mu\text{m}/\text{h} \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{h}$ (= 100 % \pm 1%), für *dymB*⁻-Zellen 188 $\mu\text{m}/\text{h} \pm 11 \mu\text{m}/\text{h}$ (= 138 % \pm 8 %) und für *dymB*⁺-Zellen 126 $\mu\text{m}/\text{h} \pm 21,5 \mu\text{m}/\text{h}$ (= 93 % \pm 16 %).

Das Wachstum der *dymB*⁺-Zellen in Suspensionskultur war dagegen im Vergleich zu AX2-Wildtypzellen verringert. Die Verdopplungszeit der *dymB*⁺-Zellen betrug 16 h, während die der AX2-Zellen unter diesen Bedingungen 11 h betrug.

Da der auffälligste Phänotyp der *dymB*⁻-Zellen ihre erhöhte Adhäsivität gegenüber Oberflächen und anderen Zellen war, wurden auch die *dymB*⁺-Zellen hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens untersucht. Um die Haftung auf Substrat (Glas) zu testen, wurden Wildtyp- und *dymB*⁺-Zellen gemäß 3.5.4.3 für eine gewisse Zeit erschütterungsfrei in Erlenmeyerkolben inkubiert, die Kolben kurz bei niedriger Umdrehungszahl geschüttelt und die Anzahl der nicht haftenden Zellen, die sich im Überstand befanden, bestimmt. Die Haftung von *dymB*⁺-Zellen auf Glasoberflächen war wildtypartig. Die Zugabe von 10 mM EDTA zum Inkubationsmedium beeinflusste das Adhäsionsverhalten in gleicher Weise wie das der Wildtypzellen. Der Graph in Abb. 4-32 zeigt sowohl die Adhäsivität von *dymB*⁻- wie von *dymB*⁺-Zellen. Die Werte wurden auf die Werte des Wildtyps (= 100 %) in Prozent bezogen.

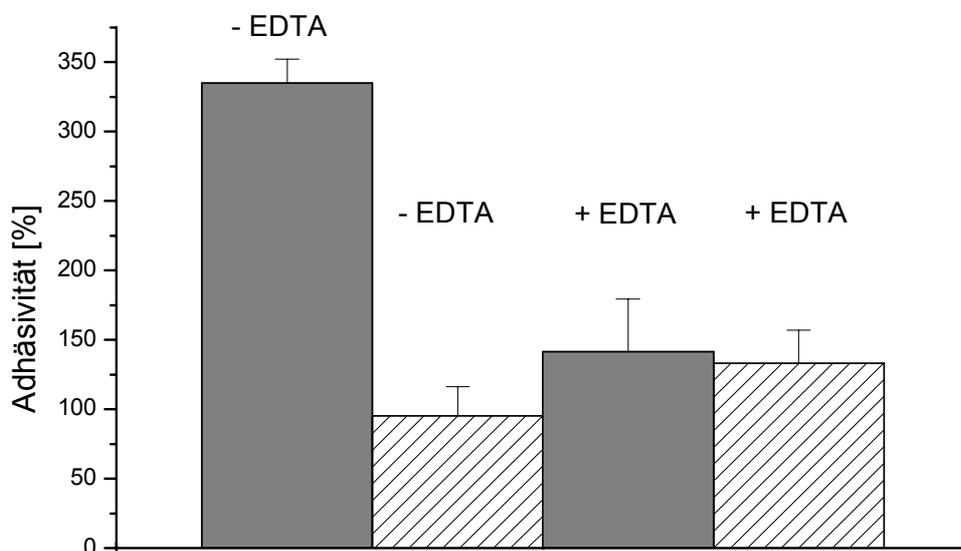


Abb. 4-32 Adhäsion von *dymB*⁺-Zellen (schraffiert) und *dymB*⁻-Zellen (grau) auf Glasoberflächen
Die gleiche Anzahl an *dymB*⁻-Zellen, *dymB*⁺-Zellen und AX2-Wildtypzellen wurden für 45 min in Erlenmeyerkolben (aus Glas) in HL5c-Medium, das wie angegeben EDTA bzw. kein EDTA enthielt, erschütterungsfrei inkubiert. Anschließend wurde kurz bei 80 UpM geschüttelt und die Zahl der Zellen, die sich im Überstand befanden, bestimmt. Die Anzahl der AX2-Wildtypzellen im Überstand, die 100 % entsprachen, wurde durch die Anzahl der Mutantenzellen im Überstand dividiert. Die Haftung war um so stärker je weniger Zellen sich im Überstand befanden. Da die Haftung der AX2-Zellen jeweils 100 % gleichgesetzt wurde, sind diese Werte nicht gesondert im Graphen aufgeführt. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Messungen.

Die Zell-Zell-Adhäsion der *dymB*⁺-Zellen wurde wie in Kap. 4.5.3 beschrieben bestimmt. Die Differenz in der Zellzahl zwischen vereinzelt Zellen und nicht vereinzelt Zellen, wobei Zellaggregate nicht berücksichtigt wurden, betrug für die *dymB*⁺-Zellen 18 % (± 8 %), und war somit etwas geringer als die der AX2-Wildtypzellen (27 ± 5 %). Allerdings unterlagen die Werte für die *dymB*⁺-Zellen größeren Schwankungen als die der AX2- und *dymB*⁻-Zellen.

Schließlich wurde die Morphologie und Funktionalität der Mitochondrien der *dymB*⁺-Zellen geprüft. Abb. 4-30 zeigt die Mitochondrien der Dynamamin B überproduzierenden Zellen in der Immunfluoreszenz. Sie gleichen in Form und Verteilung denen der Wildtyp- und *dymB*⁻-

Zellen. Die Funktionalität der Mitochondrien wurde durch Messung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität in Gesamtzellsaten entsprechend 3.5.4.6 geprüft. Die Aktivität dieses mitochondrialen Markerenzym betrug in *dymB*⁺-Zellen 89 % ± 11 % der des Wildtyps (*dymB*⁻-Zellen: 89 % ± 6 %)

4.6 Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Dynamin B in *D. discoideum*

Die gegen Dynamin B gerichteten polyklonalen Antiseren waren bei der Western-Blot-Analyse sehr hilfreich, erwiesen sich aber für die Immunfluoreszenzmikroskopie als ungeeignet, da sie *dymB*⁻-Zellen fast in gleicher Masse anfärbten wie AX2-Wildtypzellen. Aus diesem Grund wurde ein Fusionsprotein aus Dynamin B und dem „gelb fluoreszierenden Protein“ (YFP) hergestellt. Bei YFP handelt es sich um eine Variante des „grün fluoreszierenden Proteins“ (GFP) (Prasher *et al.*, 1992; Chalfie *et al.*, 1994) GFP ist ein Protein, das aus der Quallenart *Aequorea victoria* isoliert wurde, und bei Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge grün fluoresziert. Durch Fusion von GFP an beliebige zu untersuchende Proteine kann deren subzelluläre Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch bestimmt werden. Diese Methode kommt ohne Antikörper aus, die teilweise schwer in der für die Immunfluoreszenz nötigen Reinheit herzustellen sind. Ein weiterer Vorteil der Fusionierung eines Proteins mit GFP ist, daß das Fusionsprotein in dem lebenden Organismus beobachtet werden kann, da die Proben nicht fixiert werden müssen.

Für die Lokalisation von Dynamin B wurde eine Fusion mit YFP anstelle von GFP gewählt, da YFP mit längerwelligem Licht angeregt wird als GFP und somit weniger Strahlungsschäden in der Zelle verursacht werden. Dies ist insbesondere bei der Untersuchung von lebenden Zellen entscheidend, die wie *D. discoideum* sehr strahlungsempfindlich sind.

4.6.1 Expression von YFP-markiertem Dynamin B

Für die Expression von YFP-markiertem Dynamin B wurden zwei Vektoren konstruiert. Vektor pDymB-EYFP kodiert für das gesamte Protein, während pDymB-ΔNTS-EYFP für Dynamin B ohne aminoterminalen Signalpeptid kodiert. In beiden Fällen wird das Protein mit einem YFP-Molekül am Carboxyterminus produziert.

Beide Vektoren wurden sowohl in AX2-Wildtypzellen als auch in *dymB*⁻-Zellen transformiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde anhand von Western-Blot-Analyse überprüft. Beim Dynamin B-YFP-Konstrukt wurden zwei Banden detektiert: eine bei 132 kDa, die der nicht prozessierten Form von YFP markiertem Dynamin B entsprach und eine bei 119 kDa, die von dem prozessierten Protein herrührte. Bei AX2-Zellen, die Dynamin B-YFP produzierten, wurde eine weitere Bande bei 92 kDa detektiert, die vom endogenen (prozessierten) Protein

stammte. Im Fall von Δ NTS-Dynamin B-YFP fehlte wie erwartet die Bande bei 132 kDa. Die Produktion der Fusionsproteine war insgesamt relativ gering. Nur bei Dynamin B-YFP, das in AX2-Zellen transformiert worden war, konnte ein Klon (AX2-YFP-8) isoliert werden, der das Fusionsprotein stärker, d.h. zwischen 20 und 30fach über endogenem Expressionsniveau, produzierte. Daneben wurde auch ein Klon (AX2-YFP-7) konserviert, der Dynamin B-YFP im Verhältnis von ca. 1:1 gegenüber endogenem Protein produzierte.

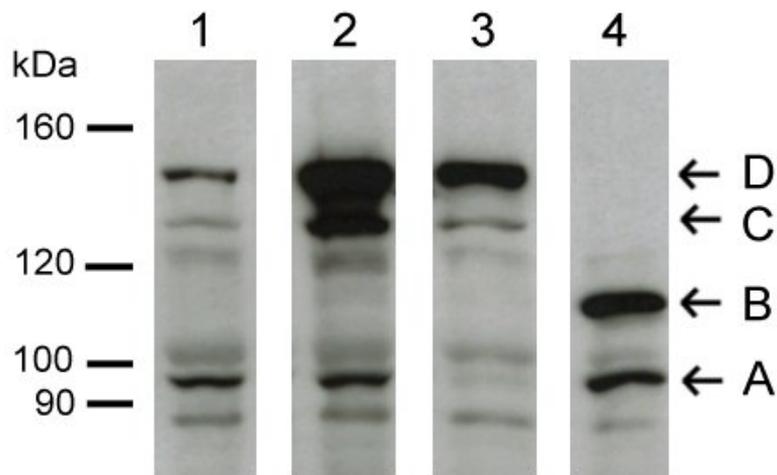


Abb. 4-33: Western-Blot zur Analyse der Expression von Dynamin B-YFP in AX2-Zellen und in *dymB*⁻-Zellen

Gesamtproteinlysate von AX2-Zellen (Spuren 1 und 2) und *dymB*⁻-Zellen (Spur 3), die mit dem Plasmid pDymB-YFP transformiert worden waren, wurden auf einem 0,8 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion des Proteins erfolgte mit dem affinitätsgereinigten anti-Dynamin B Antikörper und Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-(Kaninchen -IgG)-Zweitantikörpern aus Ziege. Spur 1: AX2-Zellen, die Dynamin-B-YFP schwach exprimieren (Klon AX2-YFP-7), Spur 2: AX2-Zellen, die Dynamin-B-YFP relativ stark exprimieren (Klon AX2-YFP-8), *dymB*⁻-Zellen, die Dynamin B-YFP exprimieren. Spur 4: ORF-Zellen, die Dynamin B mit einem aminoterminalen Histidinpeptid exprimieren (ORF-*dymB*⁺(N)-Zellen), die zur Orientierung aufgetragen wurden. Links sind die Größen der Markerfragmente angegeben (in kDa), rechts sind die vom Antikörper detektierten Banden durch Pfeile markiert. Pfeil A: endogenes, prozessiertes Dynamin B, Pfeil B: rekombinantes unprozessiertes Dynamin B, Pfeil C: prozessiertes Dynamin B mit carboxyterminalem YFP, Pfeil D: unprozessiertes Dynamin B mit carboxyterminalem YFP

4.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Dynamin B-YFP produzierenden Zellen

Zellen, die Dynamin B-YFP produzieren, zeigen im Fluoreszenzmikroskop eine charakteristische Färbung, die in Form und Verteilung der von Mitochondrien ähnelt. Dabei macht es keinen Unterschied, ob das Konstrukt in AX2-Wildtypzellen oder *dymB*⁻-Zellen transformiert wurde. Abb. 4-34 (A) zeigt die Fluoreszenzaufnahmen zweier Dynamin B-YFP exprimierenden Zellen. Die ringförmigen Strukturen, die auch bei der Färbung der Mitochondrien mit dem anti-Porin-Antikörper beobachtet wurden (Abb. 4-30), sind hier deutlich erkennbar. Wahrscheinlich ist Dynamin B daher, wie Porin, mit der äußeren

Mitochondrienmembran assoziiert. Bei der großen Zelle in Abb. 4-34 (A) sind besonders viele Mitochondrien sichtbar, weil die Zelle offenbar stark abgeflacht ist. Neben der strukturierten Färbung ist außerdem eine schwache, vermutlich cytosolische Färbung erkennbar. Bei den AX2-YFP-7-Zellen ist die diffuse Färbung relativ schwach, so daß die charakteristische (mitochondriale) Färbung gut sichtbar ist. Die Fluoreszenzintensitäten waren bei allen Zellen dieses Klons ähnlich. Die insgesamt stärker exprimierenden AX2-YFP-8-Zellen waren hinsichtlich der Intensität sehr viel heterogener. Das Phänomen, daß ein einzelner Klon eine sehr heterogene Population an Zellen aufweist, wird in *D. discoideum* häufig beobachtet, u.a. auch bei GFP exprimierenden Zellen (Pang *et al.*, 1999). Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. So reichte das Spektrum von AX2-YFP-8-Zellen, die das Fusionsprotein kaum exprimierten über verschiedene Grade mittelstarker bis zu relativ starker Expression. Bei den stärker exprimierenden Zellen war die cytosolische Färbung intensiver als bei den schwach exprimierenden. Offensichtlich kann nur eine bestimmte Menge an Dynamin B zu oder/und in die Mitochondrien transportiert bzw. prozessiert werden. Überschüssiges Protein scheint im Cytosol zu verbleiben. Da auch bei den schwach exprimierenden Zellen eine geringe diffuse bis leicht granuläre Färbung vorhanden war, ist Dynamin B vermutlich auch außerhalb der Mitochondrien lokalisiert.

Mit Immunfluoreszenzmikroskopie wurde geprüft, ob Dynamin B-YFP und die Mitochondrien kolokalisieren. Die Mitochondrien in fixierten AX2-YFP-8-Zellen wurden mit einem Antikörper gegen Porin gefärbt. Wie aus Abb. 4-34 ersichtlich ist, überlappt die Färbung von Dynamin B-YFP in hohem Grad mit der der Mitochondrien. Dynamin B ist somit mit den Mitochondrien assoziiert.

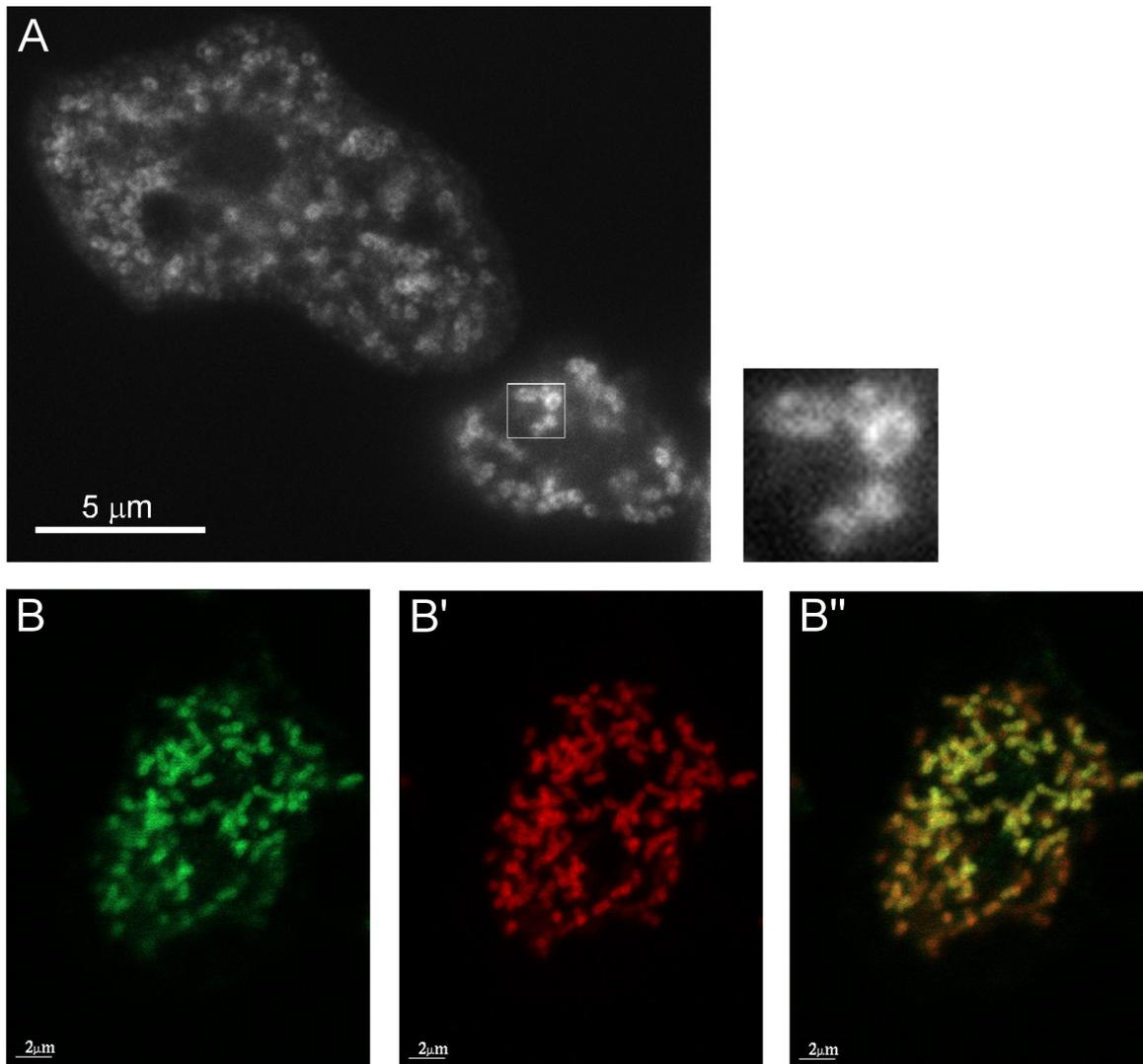


Abb. 4-34: Lokalisation von YFP-markiertem Dynamin B in AX2-Zellen

Die Dynamin B-YFP exprimierenden Zellen wurden durch Gefriersubstitution in Methanol fixiert. **(A)** Die Aufnahme der AX2-YFP-8-Zellen erfolgte im Epifluoreszenzmodus an einem Olympus IX 70-Mikroskop. Rechts ist ein vergrößerter Ausschnitt der linken Abbildung dargestellt, der die fluoreszierenden ringförmigen Strukturen detaillierter zeigt. **(B, B', B'')** Einzelner optischer Schnitt einer AX2-YFP-7-Zelle, der mit einem Konfokal-Mikroskop Leica DM-IRB aufgenommen wurde. **(B)** Lokalisation von Dynamin B-YFP. Zur Intensivierung des Fluoreszenzsignals wurde die Zelle nach der Fixierung mit einem gegen GFP gerichteten polyklonalen Antikörper (Clontech, 1:200 verdünnt) inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein mit Alexa488-gekoppelter Anti-(Kaninchen-IgG)-Antikörper verwendet. **(B')** Zur Visualisierung der Mitochondrien wurde dieselbe Zelle gleichzeitig mit einem monoklonalen Antikörper gegen Mitoporin (1:5 verdünnt) inkubiert. Als Zweitantikörper diente ein mit Cy3-gekoppelter Anti-(Maus-IgG)-Antikörper. **(B'')** Überlagerung der Bilder (B) und (B'). Dynamin B-YFP erscheint grün, die Mitochondrien rot und überlappende Bereiche (Kokalisation) gelb.

Neben den fixierten Zellen wurden auch lebende Dynamin B-YFP produzierende Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 4-34). Die beobachteten fluoreszierenden Strukturen glichen auch hier in Form, Größe und Verteilung Mitochondrien und waren höchst dynamisch. Auch in der Literatur werden Mitochondrien als sehr dynamische Organellen beschrieben, die ständig in Bewegung sind und dabei ihre Form verändern (Bereiter-Hahn und Voth, 1994).

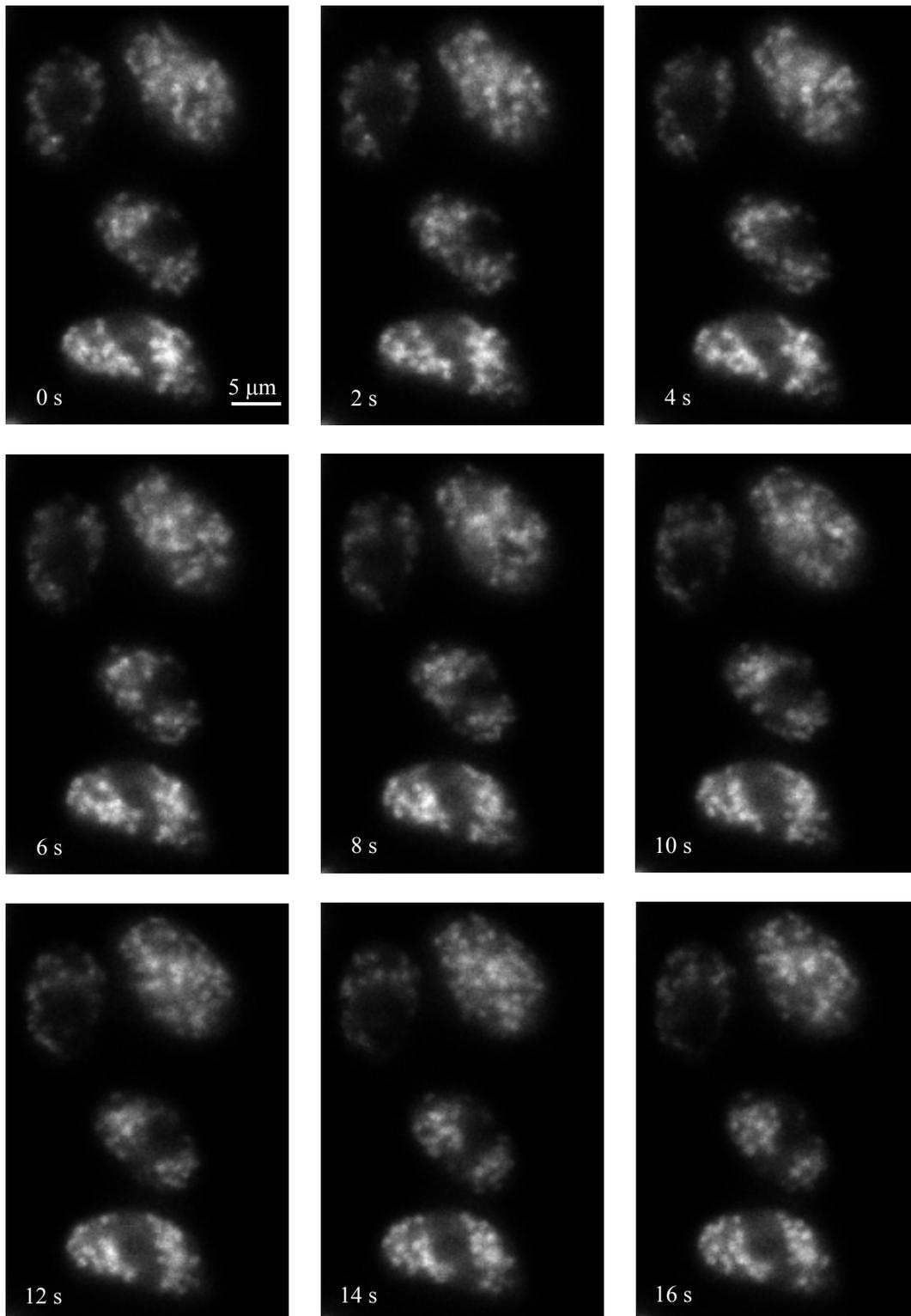


Abb. 4-34: Videomikroskopische Aufnahmen von Dynamin B-YFP exprimierenden Zellen

Die Zellen (Klon AX2-YFP-8) wurden in MES-Puffer gewaschen und auf Objektträger überführt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem Olympus IX 70-Mikroskop im Epifluoreszenzmodus, bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm. Alle zwei Sekunden wurde eine Aufnahme gemacht, wobei die Belichtungsdauer 777 ms betrug.

4.6.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Dynamin B-YFP produzierenden Zellen ohne aminotermine Extension

Es sollte geprüft werden, ob die 137 Aminosäuren umfassende aminotermine Extension von Dynamin B ein mitochondriales Signalpeptid darstellt. Daher wurden Zellen untersucht, die das Protein ohne Extension produzierten (Δ NTS-Dynamin B-YFP-Zellen). Es war zu erwarten, daß das deletierte Protein nicht mit den Mitochondrien assoziiert ist. In der Tat wies Dynamin B ohne Extension in *D. discoideum* eine völlig andere Verteilung auf als das intakte Protein. Δ NTS-Dynamin B-YFP war als feines fadenförmiges Netzwerk, das sich über die gesamte Zelle erstreckte, sichtbar (Abb. 4-35 B und D). In einigen Zellen war das Protein auch in Form großer Aggregate verteilt und das feine Netz verschwunden. In anderen Zellen waren sowohl das Netzwerk als auch Aggregate vorhanden (Abb. 4-35 C).

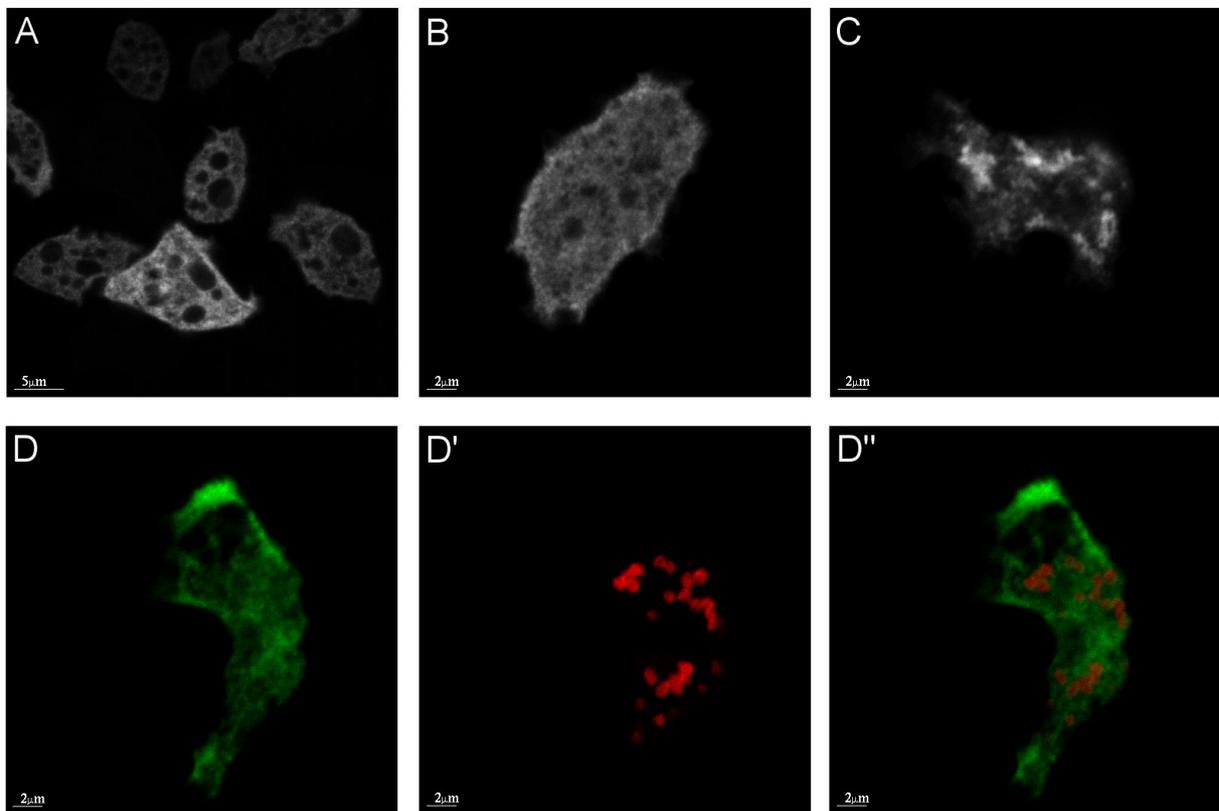


Abb. 4-35: Lokalisation von YFP-markiertem Dynamin B ohne aminotermine Extension

Die Δ NTS-Dynamin B-YFP-Zellen wurden durch Gefriersubstitution in Methanol fixiert und anhand von konfokalen optischen Schnitten (0,2 bis 0,3 μ m Dicke) mit einem Konfokal-Mikroskop Leica DM/IRB analysiert. (A) Mehrere Zellen, die Δ NTS-Dynamin B-YFP unterschiedlich stark produzieren. (B, C, D) Einzelne Δ NTS-Dynamin B-YFP produzierende Zellen. (D) Lokalisation von Dynamin B-YFP ohne aminotermine Extension. (D') Zur Visualisierung der Mitochondrien wurde dieselbe Zelle gleichzeitig mit einem monoklonalen Antikörper gegen Mitoporphin (1:5 verdünnt) inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein mit Cy3-gekoppelter Anti-(Maus-IgG)-Antikörper verwendet. (D'') Überlagerung der Bilder (D) und (D'). Δ NTS Dynamin B-YFP erscheint grün, die Mitochondrien rot und überlappende Bereiche gelb.

Das Expressionsniveau zwischen einzelnen Zellen eines Klons war sehr unterschiedlich und reichte von Zellen, die kaum fluoreszierten bis zu stark fluoreszierenden Zellen (Abb. 4-35 A). Die Morphologie der Mitochondrien war in diesen Mutanten völlig normal (Abb. 4-35 D'). Die Superposition von Mitochondrienfärbung und Δ NTS-Dynamin B-YFP-Fluoreszenz ergab, daß das deletierte Protein nicht oder kaum mit den Mitochondrien kolokalisierte (Abb. 4-35 D''). Dies bestätigte die Vermutung, daß die aminoterminal Extension von Dynamin B für die Lokalisation des Proteins an den Mitochondrien notwendig ist.

In einem weiteren Kontrollexperiment sollte die Lokalisation eines nicht mitochondrialen Proteins, das mit der aminoterminalen Extension von Dynamin B versehen wurde, bestimmt werden. Dieses Fusionsprotein sollte in den Mitochondrien lokalisiert sein, wenn die Extension eine mitochondriale Signalsequenz darstellt. Zu diesem Zweck wurde ein Vektor erzeugt, der für ein Fusionsprotein aus YFP mit der Extension von Dynamin B am Aminoterminus kodiert. Obwohl der Vektor in verschiedene Zelllinien (AX2- und *dymB*-Zellen) transformiert und die Transformanten unter unterschiedlichen Bedingungen selektioniert wurden, konnten keine Transformanten erhalten werden. Möglicherweise wirkt das Genprodukt toxisch auf die Zellen.

4.6.4 Fluoreszenzmikroskopische und funktionelle Analyse von Dynamin B-Mutanten

Die meisten Erkenntnisse über die Funktion von Dynaminen und Dynamin-ähnlichen Proteinen stammen von Untersuchungen an Zellen, die eine mutierte Form des Proteins produzieren. Hierbei wurden vor allem Zelllinien mit Mutationen in der GTPase-Domäne von Dynamin erzeugt. Da bislang noch keine Röntgenstruktur eines Mitglieds der Dynaminfamilie (abgesehen von der PH-Domäne von Dynamin-1) vorliegt, wurde auf die bekannte dreidimensionale Struktur von Ras zurückgegriffen. Man nimmt an, daß sie aufgrund der hohen Sequenzhomologie auch strukturell der GTPase-Domäne von Dynaminen ähnelt. In Analogie zu den K16N- und S17N-Mutationen in Ras, die in den jeweiligen Mutanten wachstumsinhibierend oder sogar letal wirken, wurden entsprechende Mutationen u.a. auch in Dynamin-1 und in die Dynamin-ähnlichen Proteine Dnm1p und Drp1 eingeführt. Bei Dynamin-1 haben diese Mutationen einen inhibitorischen Effekt auf die Rezeptor-vermittelte Endocytose und bei Dnm1p und Drp1 führen sie zu einem Kollabieren des mitochondrialen Systems. Diese Mutationen betreffen das erste GTP-Bindungsmotiv, so daß GTP nicht mehr gebunden und hydrolysiert werden kann. Bei Ras führt die K16N-Mutation zu einer verringerten Affinität gegenüber Nukleotiden, während die S17N-Mutation nur die Affinität zu GTP, nicht aber zu GDP reduziert (s. Einleitung, Kap. 2.2).

Bei diesen Beispielen wirkten die Mutationen dominant-negativ. Vermutlich bindet die mutierte Form von Dynamin an Interaktionspartner oder/und an intaktes endogenes Dynamin und führt zur Bildung von nicht funktionellen Proteinkomplexen. Daher kann die Einführung von Mutationen u.U. stärkere Auswirkungen auf die Zelle haben als die völlige Abwesenheit eines Proteins, da im ersten Fall auch andere Proteinfunktionen direkt betroffen sein können.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden zwei Dynamin B-Mutanten mit den entsprechenden Mutationen in der GTPase-Domäne hergestellt. Bei der K170A-Mutante wurde das Lysin an Aminosäureposition 170 durch Alanin ausgetauscht, bei der S171N-Mutante das Serin an Position 171 gegen Asparagin. Außerdem wurden Versionen mit carboxyterminalem YFP konstruiert, um den Einfluß des Nukleotidzustands des Proteins auf die Lokalisation zu untersuchen. So wurde bei der K44A-Mutante von Dynamin-1 ein verändertes Lokalisationsmuster beobachtet (Herskovits *et al.*, 1993). Die Konstrukte wurden in AX2-Wildtypzellen transformiert.

Beide YFP-markierten Mutanten zeigten im Fluoreszenzmikroskop die charakteristische mitochondriale und die diffuse bis leicht granuläre Hintergrundfärbung wie sie auch bei nicht mutiertem Dynamin B-YFP beobachtet wurde. Auf lichtmikroskopischer Ebene war somit keine Veränderung in der Lokalisation des mutierten Proteins erkennbar.

Die K170A- und S171N-Mutanten wiesen auch keine auffälligen phänotypischen Veränderungen auf. Sie waren morphologisch nicht von den AX2-Wildtypzellen zu unterscheiden, zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten in Suspensionskultur und auf Bakterienrasen wie diese und bildeten normale Fruchtkörper und lebensfähige Sporen. Form und Verteilung der Mitochondrien waren ebenfalls normal.

4.7 Elektronenmikroskopische Lokalisierung von Dynamin B in *D. discoideum*

Zur Lokalisierung von Proteinen auf ultrastruktureller Ebene bietet sich die Methode der Immunogold-Elektronenmikroskopie an. Hier werden Proteine mit einem gegen sie gerichteten, an Goldpartikel gekoppelte Antikörper im Elektronenmikroskop visualisiert. Da sich der anti-Dynamin B-Antikörper schon für die Immunfluoreszenzmikroskopie als ungeeignet erwiesen hatte, wurden Dynamin B-YFP produzierende Zellen verwendet und diese mit einem gegen GFP-gerichteten Antikörper behandelt. Mit der Immunogold-Elektronenmikroskopie konnte die mitochondriale Lokalisation von Dynamin B bestätigt und die Assoziation von Dynamin B mit der äußeren Mitochondrienmembran nachgewiesen werden.

Interessanterweise wurde Dynamin B-YFP nicht nur an Mitochondrienmembranen gefunden, sondern auch in Assoziation mit Membranen anderer Kompartimente, insbesondere mit der Plasmamembran und an den Membranen von Phagosomen und der kontraktile Vakuole (Abb.4-36).

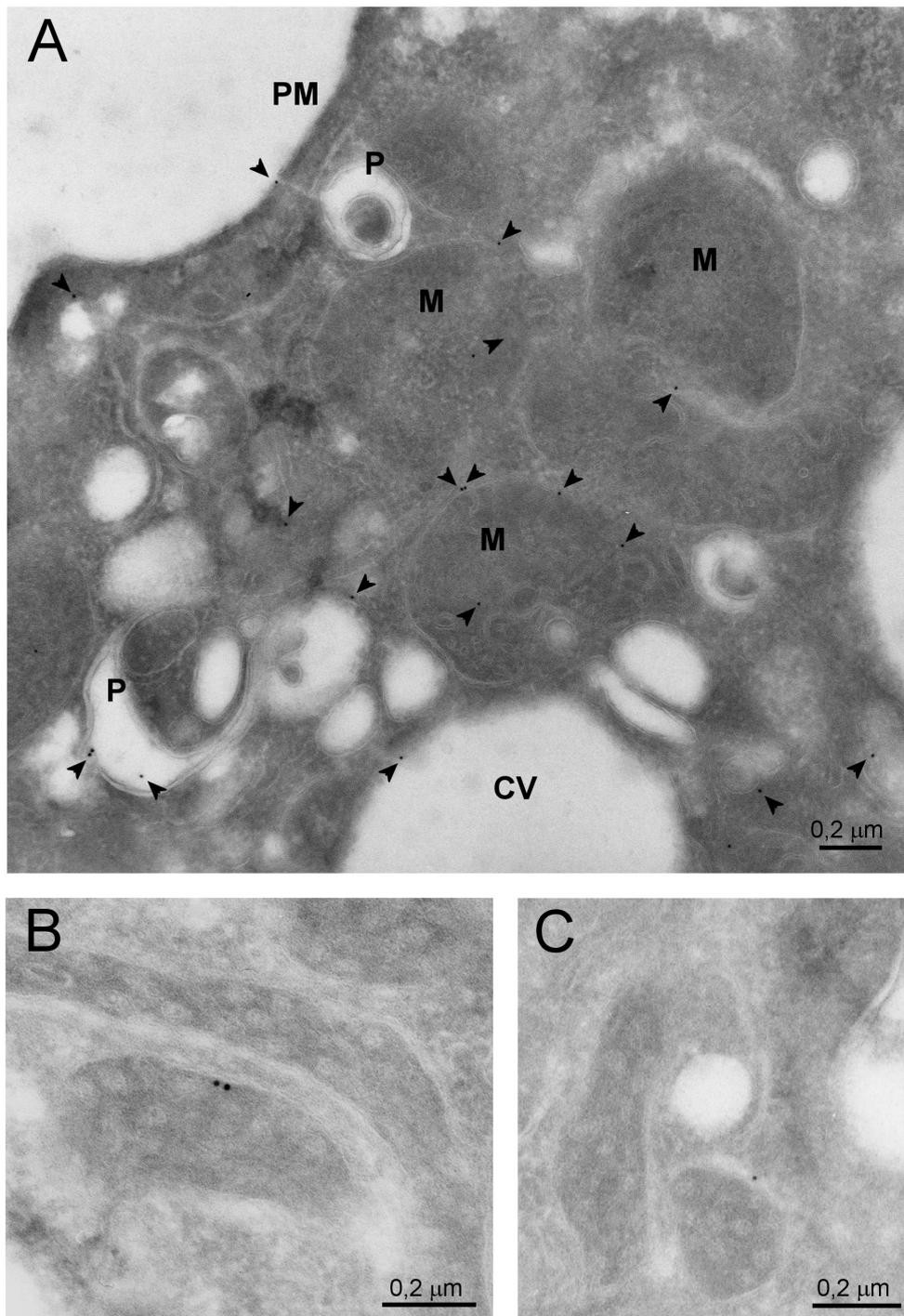


Abb. 4-36: Immun-Elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Lokalisierung von Dynamin B-YFP (durchgeführt von Dr. Geraldina Santandrea, MPI für Medizinische Forschung)

Die AX2-YFP8-Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd und 0,5 % Glutaraldehyd in Hespuffer fixiert und wie in (Griffiths *et al.*, 1983) beschrieben weiterbearbeitet. Die Präparate wurden mittels Kryosektionierung in Ultradünnschnitte von 90 nm Dicke geschnitten. Die Immunogoldmarkierung erfolgte mit Protein A, an das Goldpartikel mit einem Durchmesser von 10 nm gekoppelt waren, und die an den gegen GFP gerichteten polyklonalen Antikörper (Clontech) banden. Die Analyse der Präparate erfolgte an einem Philips 400 T Elektronenmikroskop. (A) Ausschnitt einer AX2-YFP8-Zelle. Die Pfeile verdeutlichen die Positionen der Goldpartikel. Abkürzungen: PM: Plasmamembran, M: Mitochondrium, CV: kontraktile Vakuole, P: Phagosom (B, C) Ausschnitte von AX2-YFP8-Zellen mit goldmarkierten Mitochondrien.

5 Diskussion

5.1 Dynamin B – ein neues Mitglied der Dynaminfamilie

In der Zelle werden eine Vielzahl von Prozessen durch GTP-bindende und -hydrolysierende Proteine gesteuert. Die meisten von ihnen wirken als molekulare Schalter: Solange sie GTP gebunden haben sind sie aktiv und lösen eine Reihe von Signalen aus. Das Abschalten des Signals erfolgt durch die Hydrolyse des Nukleotids, wodurch das Protein in die inaktive GDP-gebundene Form übergeht. Auf diese Weise sind GTPasen an Vorgängen wie der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung, an der Organisation des Cytoskeletts und der Kontrolle des Vesikeltransport beteiligt.

Die Dynamine und Dynamin-ähnlichen Proteine bilden eine eigenständige Proteinklasse innerhalb der Familie der GTPasen. Die GTP-Bindungsdomänen der Dynamine zeigen große Sequenzähnlichkeit mit den entsprechenden Regionen anderer GTP-bindender Proteine. Ansonsten nehmen die Mitglieder der Dynaminfamilie eine Sonderstellung unter den GTPasen ein. Zum einen unterscheiden sie sich aufgrund ihres großen Molekulargewichts von den kleinen GTPasen und den α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteinen und besitzen im Vergleich zu den GTPasen der Ras-Familie eine wesentlich höhere basale Hydrolyserate und eine geringere Affinität für GTP (Maeda *et al.*, 1992; Shpetner und Vallee, 1992b). Zum anderen erfüllen die Mitglieder der Dynamin-Familie vermutlich eine andere Aufgabe in der Zelle als die bekannten GTPasen. So deutet die funktionelle Charakterisierung von Dynamin-1 bei der Clathrin-vermittelten Endocytose auf eine mechanische Aktivität dieser Klasse von GTPasen hin (Warnock *et al.*, 1996). Möglicherweise sind die Dynamin-ähnlichen Proteine in gleicher Weise an der Abschnürung von intrazellulären Membranen beteiligt wie Dynamin-1 an der Plasmamembran. Daher ist die Aufklärung der exakten Funktionsweise von Dynaminen von besonderem Interesse.

Zur Untersuchung von Dynaminen bot sich der Modellorganismus *D. discoideum* an. Dieser einfache Eukaryont gleicht in Morphologie und Verhalten in vielen Aspekten den Säugetierzellen, ist aber im Gegensatz zu diesen molekularbiologisch leicht zu manipulieren.

Ziel dieser Arbeit war daher die Isolierung und funktionelle Charakterisierung eines weiteren Dynamin-ähnlichen Proteins aus *D. discoideum*. Für die Identifizierung des Gens wurde eine gröbenselektionierte genomische DNA-Bank aus *D. discoideum* hergestellt. Aus dieser konnte mit Hilfe einer Oligonukleotidsonde, deren Sequenz von dem konservierten DNA-Bereich anderer Dynamin-Homologe abgeleitet war, der *dymB*-positive Klon E1 isoliert werden. Klon E1 enthielt zur Hälfte kodierende Sequenz, die anhand von Sequenzanalysen als 5'-Ende des *dymB*-Gens identifiziert werden konnte. Aus dieser Teilsequenz wurde ein ca. 350 Bp umfassendes Fragment herausgeschnitten und als neue, *dymB*-spezifische Sonde für die Durchmusterung einer λ -ZAP cDNA-Bank aus *D. discoideum* eingesetzt. Auf diese Weise wurde ein cDNA-Klon identifiziert, der 2428 Bp umfaßte. Aufgrund von Hinweisen, daß diese Sequenz unvollständig war, wurde eine weitere genomische gröbenselektionierte DNA-Bank

nach dem 3'-Ende des *dymB*-Gens durchmustert. Als Sonde diente hierbei ein Fragment, das dem 3'-Ende der kodierenden Sequenz aus dem cDNA-Klon entnommen wurde. Es konnte ein 4,5 kBp großer Klon (Klon HD5) isoliert werden, der das 3'-Ende von *dymB* enthielt (1200 Bp kodierende Sequenz), einschließlich des Stopkodons, der Polyadenylierungsstelle und des 3'-flankierenden Bereichs. Beim Vergleich der Sequenzen vom cDNA-Klon und vom HD5-Klon stellte sich heraus, daß im cDNA-Klon ein ca. 190 Bp großer DNA-Abschnitt fehlte, der im genomischen Klon vorhanden war. Aufgrund der Basenzusammensetzung dieses Bereichs und des Fehlens von Spleißstellen konnte ausgeschlossen werden, daß es sich um ein Intron handelte.

Die beiden genomischen Klone und der cDNA-Klon umfaßten zusammen die gesamte *dymB*-Sequenz, einschließlich flankierender Bereiche. Aus diesen drei Klonen, die überlappende Teilsequenzen von *dymB* enthielten, konnte die kodierende Sequenz zusammengesetzt werden. Sie besteht aus 2763 Basenpaaren einschließlich des Stopkodons und enthält kein Intron. Das Genprodukt von *dymB* (Dynamamin B) hat eine Länge von 920 Aminosäuren und eine berechnete Molekülmasse von 105,3 kDa. Somit ist Dynamamin B das größte der bisher identifizierten Proteine der Dynamamin-Familie. Die Molekülmasse von Mgm1p aus *S. cerevisiae* ist mit 101,5 kDa etwas kleiner (Guan *et al.*, 1993a). Die Molekülmassen von menschlichem Dynamamin-1 betragen 97,4 kDa (van der Bliek AM *et al.*, 1993), von Dnm1p aus *S. cerevisiae* 85,2 kDa (Shaw *et al.*, 1997) und von Dynamamin A, dem ersten in *D. discoideum* identifizierten Dynamamin-Homologen, 96,1 kDa (Wienke *et al.*, 1999).

Die GTP-Bindungsdomäne ist der unter den Dynamaminen am stärksten konservierte Bereich. Sie umfaßt bei den meisten Dynamamin-Homologen die ersten 300 bis 350 Aminosäuren. Bei Dynamamin B beginnt der konservierte Bereich erst ab Aminosäure 137. Die GTPase-Domäne von Dynamamin B enthält alle vier Konsensusmotive, die für die GTP-Bindung essentiell sind. Außerdem verfügt es über das für Dynamamine charakteristische Signaturmotiv LPRG(S/T)G(L/I)VTR, das sich wenige Aminosäuren hinter dem ersten GTP-Bindungsmotiv befindet. Die Sequenzidentität der GTPase-Domäne von Dynamamin B zu der von anderen Mitgliedern beträgt zwischen 36 % (zu Mgm1p) und 54 % (zu Dynamamin A und DLP1).

Der GTPase-Domäne von Dynamamin B geht eine 136 Aminosäuren lange Sequenz voraus, die mit großer Wahrscheinlichkeit ein mitochondriales Signalpeptid darstellt. Dieser Bereich ist basisch (pI = 9,8) und enthält einen hohen Anteil an Asparaginresten (26 %), die als lange Homopolymerketten auftreten. Daneben enthält diese Region einen relativ hohen Anteil an Lysin- (12 %), Isoleucin- (10 %), Tyrosin- (9 %), Serin- (8 %) und Glutaminresten (8 %). Hierauf wird in Abschnitt 5.3 näher eingegangen.

Der GTPase-Domäne folgt bei den Dynamaminen und Dynamamin-ähnlichen Proteinen ein Bereich, der weitaus weniger gut konserviert ist und vermutlich unterschiedliche Funktionen in der Zelle widerspiegelt. Die Mitglieder der Dynamamin-Familie können aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in mindestens fünf Gruppen unterteilt werden. Die sogenannten „echten“ Dynamamine, dessen bekanntester Vertreter das Dynamamin-1 ist, besitzen am Carboxyterminus eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne), gefolgt von der GTPase-Effektor-Domäne (GE-Domäne) und einer Prolin-Argininreichen Domäne (PR-Domäne) am äußersten Carboxyterminus. Allen anderen Mitgliedern der Dynamamin-Familie fehlen die PH-

und die PR-Domäne und werden daher als Dynamin-ähnliche Proteine bezeichnet. Die phylogenetische Analyse ordnet Dynamin B der Dnm1p/Vps1p-Gruppe zu. Deren Mitglieder sind an der Organisation des mitochondrialen Systems beteiligt (Dnm1p, Drp1, und DLP1) oder am Vesikeltransport vom Golgi-Apparat (Vps1p). Innerhalb dieser Gruppe, zu der auch Dynamin A zählt, ist Dynamin B das einzige Protein mit einer mitochondrialen Signalsequenz. Lediglich die phylogenetisch entfernteren Mgm-Proteine besitzen ebenfalls ein derartiges Signalpeptid.

Der GTPase-Domäne schließt sich eine ca. 150 Aminosäuren große Region geringer Sequenzübereinstimmung an (Aminosäuren 517 bis 659). Ab Aminosäure 660 beginnt bei Dynamin B ein Bereich, der auffällig viele Glutamin- (31 %), Serin- (21 %) und Prolinreste (10 %) enthält und daher als QPS-Domäne bezeichnet wurde. Eine derartige Domäne befindet sich auch in Dynamin A an entsprechender Stelle. Diese enthält allerdings zusätzlich einen hohen Anteil an Asparaginresten und erhielt deshalb den Namen QNS-Domäne. Sowohl bei der QPS- als auch bei der QNS-Domäne liegen die oben genannten Aminosäurereste zum Großteil als bis zu 13 Aminosäuren lange Homopolymerketten vor. Solche Polyglutamin- und Polyasparaginsequenzen wurden auch in einigen anderen Proteinen aus *D. discoideum* gefunden wie z.B. bei der Protein-Tyrosin-Phosphatase PTP3 (Gamper *et al.*, 1996) und der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase PKAC (Burki *et al.*, 1991). Die Funktion dieser Aminosäureketten ist noch nicht geklärt. Es wurde jedoch gezeigt, daß Polyglutaminsequenzen in Proteinen miteinander wechselwirken und zur Bildung von Proteinoligomeren führen können. Einige neurodegenerative Krankheiten wurden mit unnatürlich verlängerten Polyglutaminsequenzen in Verbindung gebracht (Stott *et al.*, 1995). Die QPS- bzw. QNS-Domäne scheinen für die *D. discoideum*-Dynamine spezifisch zu sein, da in Dynamin-ähnlichen Proteinen aus anderen Organismen keine vergleichbaren Domänen vorhanden sind.

Die QPS- und die QNS- Domänen enthalten im zentralen Bereich einen erhöhten Anteil an Prolinresten. Möglicherweise kommt dieser Region eine ähnliche Funktion zu wie der Prolin-Arginin-reichen Domäne (PR-Domäne) in Dynamin-1. Für die PR-Domäne in Dynamin-1 wurde eine Wechselwirkung mit Proteinen, die eine Src-Homologie3-Domäne (SH3-Domäne) besitzen, nachgewiesen (Gout *et al.*, 1993). Allerdings ist PR-Domäne von Dynamin-1 länger, enthält prozentual mehr Prolinreste und ist am äußersten Carboxyterminus des Proteins lokalisiert.

Am äußersten Carboxyterminus von Dynamin B (Aminosäuren 826 bis 920) befindet sich ein Bereich, der gemäß Sekundärstrukturanalysen einen stark α -helikalen Charakter aufweist. Die Sequenzidentität zu entsprechenden Regionen in DLP1 und Dnm1p betragen jeweils 32 % und 30 %, zu Dynamin A 29 %. Eine entsprechende Region wurde zuerst in Dynamin-1 entdeckt. Sie wurde als GTPase-Effektor-Domäne (GE-Domäne) bezeichnet, da für sie eine Wechselwirkung mit der GTPase-Domäne von Dynamin-1 nachgewiesen werden konnte. Durch diese Interaktion wird die Hydrolyserate von gebundenem GTP beschleunigt. Die GE-Domäne fungiert hier vermutlich als GTPase aktivierendes Protein (GAP) (Sever *et al.*, 1999). Die Sequenzidentität der möglichen GE-Domäne von Dynamin B zu der von Dynamin-1 beträgt jedoch nur 21 %, während die von Dynamin A zu Dynamin-1 42 % beträgt. Bislang wurden noch keine potentiellen GE-Domänen anderer Mitglieder der Dynaminfamilie

bezüglich einer GTPase-stimulierenden Wirkung untersucht. Interessant ist jedoch, daß Ras-spezifische GAPs aus α -Helices aufgebaut sind, und daß die als intramolekulare GAP wirkende Domäne der α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine ebenfalls helikal sind (Markby *et al.*, 1993).

Bei einem Vergleich der gesamten Aminosäuresequenzen zeigt Dynamin B die größte Identität zu Dnm1p und DLP1 (jeweils 43 %), gefolgt von Vps1p (42 %) und Dynamin-1 (38 %). Die Sequenzidentität zu Dynamin A (35 %) ist sogar am geringsten, sieht man von den entfernteren Homologen Mgm1p (26 %) und Mx1 (33 %) ab.

Zusammenfassend ergab die Primärstrukturanalyse, daß Dynamin B viele konservierte Motive enthält, die es als Mitglied der Dynamin-Familie ausweist. Die Sequenzähnlichkeit geht jedoch über die GTPase-Domäne hinaus. Die carboxyterminale Hälfte enthält Bereiche, die eventuell eine ähnliche Aufgabe erfüllen wie die PR- und die GE-Domäne von Dynamin-1, wenngleich auch die Organisation dieser Strukturelemente in beiden Proteinen unterschiedlich ist. Hinsichtlich des strukturellen Aufbaus gleicht Dynamin B am stärksten Dynamin A.

5.2 Expression von rekombinantem Dynamin B

Voraussetzung für die *in vitro*-Charakterisierung von Dynamin B war die Produktion und Reinigung des Proteins. Die Isolierung der vollständigen *dymB*-Sequenz ermöglichte die Herstellung entsprechender Vektoren, die die Expression von rekombinantem Dynamin B in *D. discoideum* erlaubten. Die Isolierung des Proteins erfolgte nach folgendem Grundprinzip. Die Zellen wurden mit Detergens lysiert und durch anschließende Zentrifugation in eine sedimentierbare und eine lösliche Fraktion getrennt. Die Zentrifugationsbedingungen wurden so gewählt, daß sich der überwiegende Teil an Dynamin B im Sediment befand. Dadurch wurde ein erster Reinigungsschritt erzielt, indem lösliche Proteine größtenteils entfernt wurden. Anschließend wurde Dynamin B mit Hilfe von Mg^{2+} -GTP aus dem Pellet extrahiert, um es von den meisten Cytoskelettproteinen, Membranen und Membranproteinen abzutrennen. Hauptverunreinigungen waren stets die Cytoskelettproteine Myosin-II und Aktin. In Abwesenheit von ATP bilden Myosin-II und filamentöses Aktin einen Komplex, der im Zentrifugationsschritt sedimentiert. In Anwesenheit von Mg^{2+} -ATP oder Mg^{2+} -GTP löst sich Myosin-II von Aktin und verbleibt im Überstand. Da das schwerlösliche filamentöse Aktin mit globulärem Aktin im Gleichgewicht steht, befindet sich im Überstand der Extraktion immer auch Aktin. Die Abtrennung dieser Verunreinigungen sollte im Fall von Dynamin B, das mit einem Heptahistidinpeptid am Carboxyterminus versehen war, durch Säulenchromatographie an einer Metallchelatmatrix (Ni-NTA) erfolgen. Dynamin B ließ sich jedoch nicht im Eluat anreichern, da es offensichtlich nicht an das Säulenmaterial band. Vermutlich oligomerisiert Dynamin B zu höhermolekularen Strukturen, so daß das Histidinepitop womöglich nicht an der Oberfläche exponiert ist. Dies ist insofern wahrscheinlich, da für die bisher isolierten Mitglieder der Dynaminfamilie gezeigt wurde, daß sie oligomerisieren und auch unter physiologischen Salzbedingungen als Multimere vorliegen (Urrutia *et al.*, 1997; Carr und Hinshaw, 1997; Melen *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2000; Wienke, Dissertation, 1998).

Erschwerend für die Aufreinigung war außerdem die geringe Konzentration an Dynamin B im Extrakt. Das Protein ließ sich nur auf Western-Blots detektieren, aber nicht auf den weniger sensitiven Coomassie-Blau gefärbten Gelen. Dagegen wurde Dynamin A unter gleichen Extraktionsbedingungen in hohem Maß im Extrakt angereichert.

Die geringe Menge an Dynamin B im Extrakt läßt sich auf zwei Faktoren zurückführen. Zum einen war das Expressionsniveau mit einer nur 6 bis 10fach erhöhten Expression gegenüber der Expression von endogenem Dynamin B von vornherein gering. Zum anderen konnte nur ein Teil des Proteins extrahiert werden (60 – 70 %). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wird die aminoternale Extension von Dynamin B posttranslational abgespalten. Bei der Überproduktion von Dynamin B ist die Prozessierung nicht vollständig, so daß neben dem reifen Protein in der Zelle auch nicht prozessiertes Protein vorhanden ist (s. Kap. 5.4). Bei der Extraktion von Dynamin B befand sich der Großteil der prozessierten Form im Extrakt, während die nicht prozessierte Form überwiegend im Sediment verblieb und für die Reinigung nicht verfügbar war. Ursache für das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten der beiden Proteinformen könnte sein, daß die Polyasparaginsequenzen der aminoternalen Extension interagieren, so daß sich schwerlösliche Proteinoligomere bilden, die unter diesen Bedingungen nicht extrahiert werden können. Für Polyglutaminsequenzen, deren Aminosäureseitenketten ebenfalls Amidgruppen als funktionelle Gruppen enthalten, wurde gezeigt, daß diese miteinander wechselwirken und Proteinoligomere bilden (Stott *et al.*, 1995). Ein derartiges Verhalten wurde auch bei Proteinen mit Asparagin-/Glutamin-reichen Regionen gefunden (Michelitsch *et al.*, 2000). Die aminoternale Extension besteht zu 26 % aus Asparaginsäure- und zu 8 % aus Glutaminresten.

Um das Expressionsniveau zu steigern und die Menge an Dynamin B im Extrakt zu erhöhen, wurden Zellen hergestellt, die das Protein ohne die aminoternale Extension produzierten. Die aminoternale Extension von Dynamin B besteht zu 26 % aus Asparaginresten, die hauptsächlich in langen Homopolymerketten angeordnet sind. Aufgrund dieses hohen Anteils an Asparaginresten könnte die Menge an Aminoacyltransferasen für die Translation des Proteins limitierend sein. In diesen Zellen war das Expressionsniveau an rekombinantem Dynamin B auf das 15 bis 20fache gegenüber endogenem Protein erhöht. Bei der Untersuchung des Löslichkeitsverhaltens zeigte sich, daß sich der Großteil des Proteins nach Lyse und Zentrifugation im Sediment befand. Dies war immer noch zu gering, um eine ausreichende Anreicherung im GTP-Extrakt zu bewirken, die auf Coomassie-Gelen detektierbar gewesen wäre. Um das Protein stärker zu konzentrieren, wurde versucht, die mit einem Polyhistidinpeptid versehene Form von Δ NTS-Dynamin B an Ni-NTA zu binden und mit entsprechend geringen Mengen an Elutionslösung zu eluieren. Da auch dieses Konstrukt nicht an die Metallchelatomatrix band, wurde die Bindung an anderen Säulenmaterialien getestet. Aber auch unter Verwendung der Anionenaustauschmaterialien DEAE und SuperQ als feste Phasen konnte keine Konzentrierung des Proteins erreicht werden.

Anhand von Western-Blots lassen sich nur relative, aber keine absoluten Mengen an Protein abschätzen. Hinweise, daß endogenes Dynamin B nur in geringen Mengen von der Zelle produziert wird, lieferten jedoch die Durchmusterung der λ -ZAP cDNA-Bank, bei der aus $1,3 \cdot 10^6$ durchmusterter Klonen nur ein einziger *dymB*-positiver cDNA-Klon isoliert werden konnte, sowie die sehr schwachen Banden, die bei der Transkriptionsanalyse auf Northern-

Blots sichtbar waren. Beides gibt Aufschluß über die Kopienzahl an mRNA in der Zelle, die wiederum die Menge an produziertem Protein beeinflusst.

Um in Zukunft die effiziente Reinigung von Dynamin B aus *D. discoideum* zu ermöglichen, ist eine weitere Steigerung des Expressionsniveaus notwendig. Eine Möglichkeit hierfür besteht in der Fusion von Dynamin B mit der schweren Kette von *Dictyostelium*-Myosin-II. Dieser Ansatz wurde auch schon erfolgreich bei der Isolierung der GTPase-Domäne von Dynamin A verfolgt. Myosin-II wird in *D. discoideum* aufgrund seiner Bedeutung bei der Zellmotilität und Cytokinese in großen Mengen produziert. Außerdem ist Myosin-II ein lösliches Protein. Die Fusion von Dynamin B an die schwere Kette von Myosin-II könnte daher zu einer erhöhten Expression von Dynamin B führen, das zudem mit größerer Wahrscheinlichkeit in löslicher Form in der Zelle vorliegen wird. Nach der Isolierung des Dynamin B-Myosin II-Fusionsproteins könnte Dynamin B mit Hilfe einer Protease freigesetzt werden, wenn zwischen den beiden Proteinen vorher eine entsprechende Protease-Schnittstelle eingeführt wurde.

5.3 Funktionelle Charakterisierung von Dynamin B

D. discoideum bietet gegenüber komplizierteren eukaryontischen Systemen den Vorteil der einfachen molekularbiologischen Manipulation. Durch gezielte Geninaktivierung lassen sich Mutanten herstellen, die ein bestimmtes Protein nicht mehr produzieren. Auf diese Weise wurden auch sogenannte *dymB*⁻-Zellen hergestellt, deren Verhalten Hinweise auf die Funktion von Dynamin B liefern sollten.

Die *dymB*⁻-Zellen waren morphologisch hinsichtlich Größe und Form nicht von den AX2-Wildtypzellen zu unterscheiden. Sie durchliefen den Entwicklungszyklus in gleicher Weise wie die Wildtypzellen und bildeten normale Fruchtkörper mit lebensfähigen Sporen aus. Die Abwesenheit von Dynamin B hatte keinen Einfluß auf die Endocytose oder auf die Osmosensibilität von *D. discoideum*. Das Genprodukt von *dymB* war auch nicht essentiell für das Wachstum dieses Organismus, da die *dymB*⁻-Zellen unter allen getesteten Bedingungen lebensfähig waren. In Suspensionskultur vermehrten sie sich mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Wildtypzellen.

Eine phänotypische Veränderung der *dymB*⁻-Zellen zeigte sich jedoch beim Wachsen auf Bakterienrasen. Die Durchmesser der runden Freßhöfe, die durch Phagozytose der Bakterien entstehen, waren bei den *dymB*⁻-Zellen zu gleichen Zeitpunkten sogar größer als bei den AX2-Wildtypzellen. Die *dymB*⁻-Zellen wuchsen unter diesen Bedingungen um ca. 40 % schneller als die AX2-Wildtypzellen. Dies deutete auf eine erhöhte Phagozytoserate bei den Mutantenzellen hin (Niewohner *et al.*, 1997). Um dies eingehender zu untersuchen wurde die Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Polystyrolkugeln gemessen. Es zeigte sich, daß bei gleicher Zellzahl das Fluoreszenzsignal bei den Mutantenzellen um 15 % größer war als bei den Kontrollzellen. Allerdings konnte bei diesem Experiment nicht zwischen internalisierten und anhaftenden Partikel unterschieden werden. In einem anderen Experiment wurde daher die Fluoreszenz von haftenden Partikel durch Zugabe eines *Quenchers* gelöscht. Die

internalisierten Partikel waren durch die Plasmamembran geschützt, so daß nur deren Fluoreszenzsignal berücksichtigt wurde. Unter diesen Bedingungen war das Fluoreszenzsignal für beide Zelllinien gleich intensiv, was bedeutete, daß die *dymB*⁻- und AX2-Zellen gleiche Mengen an Partikeln aufgenommen hatten. Die erhöhte Fluoreszenz der *dymB*⁻-Zellen im ersten Fall läßt sich damit erklären, daß die Partikel besser an der Oberfläche der *dymB*⁻-Zellen haften.

Eine erhöhte Haftungsfähigkeit der *dymB*⁻-Zellen wurde auch beim Ablösen der Zellen von Gewebekulturschalen beobachtet. Die Quantifizierung dieser Beobachtung ergab, daß die *dymB*⁻-Zellen ca. dreimal so stark auf Glasoberflächen adhärieren wie die AX2-Wildtypzellen. Durch Zugabe von EDTA zum Reaktionsansatz wird die erhöhte Adhäsion der *dymB*⁻-Zellen größtenteils aufgehoben und erreicht in etwa die Haftungsfähigkeit von Wildtypzellen unter gleichen Bedingungen. Dies deutet darauf hin, daß die verstärkte Adhäsivität der Mutantenzellen durch sogenannte Kontaktbindungsstellen B (*contact sites B*) vermittelt wird.

In *D. discoideum* wird prinzipiell zwischen zwei Arten von Oberflächenrezeptoren unterschieden (Beug *et al.*, 1973). Beide umfassen eine Reihe von Glykoproteinen unterschiedlicher Größe (Siu, 1990). Die Kontaktbindungsstellen A (*contact sites A*) sind in erster Linie an der Zell-Zell-Adhäsion von Zellen, die in den Entwicklungszyklus eingetreten sind, beteiligt. Sie sind für die Aggregation der Zellen zu Pseudoplasmodien und Fruchtkörpern verantwortlich (Gerisch, 1980). Diese Art von Rezeptoren sind Ca²⁺-unabhängig, da die Zelladhäsion durch Zugabe des Chelatbildners EDTA nicht beeinflusst wird. Die weniger gut untersuchten Kontaktbindungsstellen B (*contact sites B*) sind dagegen Ca²⁺-abhängige Rezeptoren und entsprechend EDTA-sensitiv. Sie vermitteln die Zell-Zell-Adhäsion zwischen vegetativ wachsenden *D. discoideum*-Zellen und zwischen Zellen im frühen Entwicklungsstadium. Zu diesen Kontaktbindungsstellen B gehört u.a. das Glykoprotein gp126 (Chadwick *et al.*, 1984; Chia und Luna, 1989; Chia, 1996). Dieses spielt neben der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten möglicherweise auch eine Rolle als Phagozytose-Rezeptor, da Fab-Fragmente (monovalente, antigenbindende Strukturen) gegen dieses Protein nicht nur die Zell-Zell-Adhäsion in vegetativ wachsenden Zellen unterbinden, sondern auch die Phagozytose von Bakterien. Außerdem scheint dieser Rezeptor an der Adhäsion auf (Glas-) Oberflächen beteiligt zu sein, da die Anwesenheit der Fab-Fragmente gleichzeitig zu einer verringerten Haftung auf Substrat führt (Chadwick *et al.*, 1984).

Gp126 könnte daher bei der erhöhten Adhäsion der *dymB*⁻-Zellen involviert sein, da die Nullzellen auch eine 2,4fach erhöhte Zell-Zell-Adhäsion in Schüttelkultur aufweisen. Es ist aber nicht auszuschließen, daß mehrere Kontaktbindungsstellen B für die erhöhte Haftungsfähigkeit von *dymB*⁻-Zellen verantwortlich sind. Um dies herauszufinden, wäre es nötig, den Einfluß von spezifischen gegen gp126 gerichtete Antikörper auf das Verhalten der Mutantenzellen zu untersuchen.

Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist, daß bei HeLa-Zellen, die eine dominant-negative Mutante von Dynamin-1 (K44A-Mutation) exprimieren, neben einem Endocytosedefekt ebenfalls ein verändertes Adhäsionsverhalten festgestellt wurde. Die Mutantenzellen waren im Vergleich zu den Wildtypzellen stärker abgeflacht, hatten eine rundere Form und ließen sich schwerer von Oberflächen ablösen. Dieses Verhalten wurde auf Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts zurückgeführt, wobei allerdings ungeklärt blieb, ob es

sich um eine direkte oder indirekte Folge der Expression von mutiertem Dynamin-1 handelte (Damke *et al.*, 1994b).

Die Phagocytose-Experimente mit fluoreszenzmarkierten Polystyrolkugeln oder Hefepartikeln hatten keine erhöhte Aufnahme der *dymB*⁻-Zellen im Vergleich zu den Wildtypzellen ergeben. Dies steht scheinbar im Widerspruch zu dem gesteigerten Wachstum der *dymB*⁻-Zellen auf Bakterienrasen, da Wachstum auf Bakterien, ein indirektes Maß für die Phagocytoserate ist, wenn die Bakterien vollständig aufgefressen werden (Niewohner *et al.*, 1997). Ein Erklärungsansatz könnte sein, daß bei den Phagocytose-Experimenten mit fluoreszenzmarkierten Partikeln andere Partikel verwendet wurden als beim Wachstum auf Bakterienrasen, wo *K. aerogenes*-Bakterien als Nahrungsquelle dienen. Die unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit der zu phagocytierenden Partikel könnte Ursache für die unterschiedlichen Aufnahmeraten der *dymB*⁻-Zellen und AX2-Wildtypzellen sein. Für die Wechselwirkung von Oberflächenrezeptoren mit Zuckerresten, wie sie an der Oberfläche von Zellen und an Bakterien zu finden sind, sind in *D. discoideum* vermutlich Rezeptoren vom sogenannten Lektin-Typ verantwortlich (Vogel *et al.*, 1980). Sie erkennen und binden verschiedene Zuckerreste in unterschiedlichem Ausmaß. Da die Zusammensetzung der Oberflächen von Bakterien hinsichtlich ihrer Zucker sehr verschieden ist, werden manche Bakterien sehr gut, andere sehr schlecht phagocytiert (Cohen *et al.*, 1994). Eventuell ist auch bei den *dymB*⁻-Zellen die Affinität zu bestimmten Zuckerresten erhöht, indem z.B. die entsprechenden Rezeptoren verstärkt an der Oberfläche von *dymB*⁻-Zellen exprimiert werden. So könnte die Affinität zu Zuckerresten wie sie *K. aerogenes*-Bakterien besitzen in den *dymB*⁻-Zellen erhöht sein, während sie gegenüber den Oberflächen von Hefen oder bestimmten synthetischen Oberflächen unverändert ist.

Unklar ist jedoch die Rolle, die Dynamin B beim beschleunigten Wachstum auf Bakterien wie auch bei der erhöhten Adhäsivität spielt, und ob es diese Funktion direkt oder nur indirekt über zwischengeschaltete Proteine ausübt. Pleiotrope Effekte wurden im übrigen auch bei der Charakterisierung vieler anderer Dynamin-ähnlicher Proteine beschrieben. So wurde bei Hefezellen, denen funktionelles Vps1p fehlt, sowohl Defekte bei der Zielsteuerung von Proteinen vom Golgi-Apparat als auch ein Sporulationsdefekt durch unvollständige Trennung der Spindelpole beobachtet (Rothman und Stevens, 1986; Rothman *et al.*, 1990). Bei *Dnm1p*-defizienten Zellen wurde neben einem kollabierten mitochondrialen System zunächst auch ein Endocytose-Defekt gefunden (Shaw *et al.*, 1997; Gammie *et al.*, 1995). Besonders extrem ist der pleiotrope Phänotyp von *dymA*⁻-Zellen, der neben einer reduzierten Endocytoserate auch einen Cytokinesedefekt und eine stark veränderte Mitochondrienmorphologie aufweist (Wienke *et al.*, 1999). Die primäre Funktion von Dynamin A ist noch unklar. Eine Erklärung für das Verhalten der *dymB*⁻-Zellen könnte sein, daß Dynamin B verschiedene Bindungspartner in der Zelle hat, die die Funktion des Proteins mitbestimmen. Für zukünftige Projekte ist es daher interessant herauszufinden, mit welchen Proteinen Dynamin B wechselwirkt.

Neben den Auswirkungen die das Fehlen von Dynamin B auf *D. discoideum* haben, wurde auch der Einfluß der Überproduktion des Proteins auf den Organismus untersucht. Die *dymB*⁺-Zellen wiesen wie die *dymB*⁻-Zellen keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen auf. Da die stärksten phänotypischen Veränderungen bei den *dymB*⁻-Zellen die erhöhte

Adhäsion auf Oberflächen und gegenüber anderen Zellen ist, lag es nahe, auch die *dymB*⁺-Zelle in dieser Hinsicht zu untersuchen. Die *dymB*⁺-Zellen verhielten sich jedoch sowohl bezüglich der Adhäsion auf Glasoberflächen als auch gegenüber anderen Zellen normal. Das Wachstum auf Bakterienrasen war im Vergleich zu AX2-Wildtypzellen ebenfalls unverändert. Die einzige auffällige Veränderung der *dymB*⁺-Zellen ist ihr verlangsamtes Wachstum in Schüttelkultur, das gegenüber AX2-Zellen um ca. 50 % reduziert ist. Die Ursache für dieses Verhalten ist noch ungeklärt.

Zusätzlich zur Überproduktion von intaktem Dynamin B wurden auch zwei mutierte Formen von *dymB* in *D. discoideum* exprimiert. In Anlehnung an die K16N- und S17N-Mutationen in Ras wurden die entsprechenden Dynamin B-Mutanten K170A und S171N hergestellt. Diese Mutationen betreffen das erste GTP-Bindungselement und haben in Säugetier- und Hefezellen, die mutiertes Ras exprimieren, einen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum (Sigal *et al.*, 1986). Nukleotidbindungsstudien an mutiertem Ras ergaben, daß die K16N-Mutation eine geringere Affinität von Ras gegenüber GTP und GDP bewirkt, so daß Ras^{K16N} vermutlich überwiegend im nukleotidfreien Zustand vorliegt (Sigal *et al.*, 1986). Die S17N-Mutation führt dagegen zu einer geringeren Affinität von Ras zu GTP, während die Affinität zu GDP nur geringfügig verändert ist (Feig und Cooper, 1988). Man nimmt an, daß Ras^{S17N} hauptsächlich im GDP-gebundenen Zustand vorliegt, und daß sowohl die nukleotidfreie wie die GDP-gebundene Form die regulatorische Funktion von Ras blockieren. Entsprechende Mutationen wurden auch in Dynamin-1 eingeführt (Herskovits *et al.*, 1993; van der Blik *et al.*, 1993). Auffälligster Phänotyp von Säugetierzellen, die Dynamin-1 mit einer K44A- oder S45N-Mutation produzieren, ist die stark verringerte Endocytoserate. In einigen Dynamin-ähnlichen Proteinen führten die entsprechende Mutation wie K38A in Drp1 in Säugetierzellen (Smirnova *et al.*, 1998) oder wie K41N und S42N in Dnm1p in Hefezellen (Shaw *et al.*, 1997) zu einem Kollabieren des mitochondrialen Systems. In allen Fällen wirkten die Mutationen dominant-negativ, da in den jeweiligen Zellen auch nicht mutiertes, endogenes Protein vorhanden war. Wahrscheinlich konkurrieren mutiertes und nicht mutiertes Protein um die Bindungsstellen an denselben Bindungspartnern. Da die mutierte Form aufgrund der Überexpression in der Zellen im Überschuß vorliegt, werden interagierende Proteine überwiegend von mutiertem Dynamin gebunden, was zur Bildung von nicht funktionellen Proteinkomplexen führen kann (Sigal *et al.*, 1986). Daher wurden die Konstrukte, die für die Dynamin B-Mutanten K170A und S171N kodieren, in AX2-Wildtypzellen transformiert. Die Mutanten wiesen jedoch keinen auffälligen Phänotyp auf. Sie glichen in Morphologie den AX2-Wildtypzellen, zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten in Suspensionskultur und auf Bakterienrasen und bildeten normale Fruchtkörper und lebensfähige Sporen. Form und Verteilung der Mitochondrien entsprachen ebenfalls der in Wildtypzellen. Um den Einfluß des Nukleotidzustands von Dynamin B auf die Lokalisation des Proteins zu untersuchen, wurden Zellen hergestellt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht, die mutierten Formen von Dynamin B mit YFP produzierten. Sowohl bei den K170A-Dynamin B-YFP wie auch bei den S171N-Dynamin B-YFP-Mutanten glich die Fluoreszenzfärbung und -verteilung der Färbung in Zellen, die nicht mutiertes Dynamin B-YFP produzierten (s. Kap. 5-4). In Säugetierzellen führte die Expression der Dynamin-1-Mutante K44A dagegen zu einem veränderten Lokalisationsmuster (Herskovits *et al.*, 1993). Statt einer gleichmäßigen Verteilung über die gesamte Zelle war bei den Mutanten in der

Immunfluoreszenz eine stärker punktuierete Färbung erkennbar, die im Zellinneren am intensivsten war.

Die bisher getesteten Mutationen in Dynamin B basieren auf der bekannten Kristallstruktur von Ras, da bislang noch keine röntgenkristallographischen Daten zu einer GTPase-Domäne eines Mitglieds der Dynaminfamilie vorlagen. Nachdem es jedoch gelungen ist, die GTPase-Domäne von Dynamin A aus *D. discoideum* zu isolieren und zu kristallisieren (H. Niemann, D. Manstein und J. Kull, MPI für Medizinische Forschung, persönliche Mitteilung), konnte erstmals die Struktur der GTP-Bindungsdomäne eines Dynamins bestimmt werden. Dies sollte eine gezieltere Einführung von Mutationen in die GTPase-Domäne von Dynaminen und Dynamin-ähnlichen Proteinen erlauben.

Eine weitere Möglichkeit zur Funktionsbestimmung der Dynamin-Homologe in *D. discoideum* ist die Charakterisierung von Zellen, die weder Dynamin B noch Dynamin A produzieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Versuche zur Herstellung solch einer Mutante unternommen. Da keine Transformanten erhalten wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die gleichzeitige Deletion von *dymA* und *dymB* für *D. discoideum* letal ist. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist die Expression eines der beiden Gene unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors. So könnte die Expression von *dymA* in Zellen, die kein Dynamin B mehr produzieren, schrittweise hinunterreguliert werden bis kein oder kaum noch Dynamin A produziert wird und der Phänotyp dieser quasi *Doppel-knockout*-Mutante untersucht werden. Das ursprünglich für Säugetierzellen entwickelte Tetrazyklin-regulierte Genexpressionssystem (Gossen und Bujard, 1992) konnte kürzlich auch in *D. discoideum* etabliert werden (Blaauw *et al.*, 2000). Es ist zu erwarten, daß die Genexpression unter der Kontrolle des Tet-Promotors stringenter und feiner regulierbar ist als unter der Kontrolle des bisher verfügbaren induzierbaren Discoidin (*disI*)-Promotors (Blusch *et al.*, 1992; Manstein *et al.*, 1995).

5.4 Dynamin B - ein mitochondriales Protein ?

Für die aminoternale Extension von Dynamin B wurde bei der Sequenzanalyse eine Spaltungsstelle für eine mitochondriale Signalpeptidase am Ende dieses Abschnitts vorhergesagt (Gavel und von Heijne, 1990). Dies war ein Hinweis, daß die Extension als Signalpeptid fungiert, welches Dynamin B in die Mitochondrien dirigiert. Mitochondriale Signalpeptide lassen sich zwar nicht anhand von Sequenzhomologien identifizieren, weil sie keine charakteristischen Konsenselemente enthalten, dennoch weisen sie bestimmte Gemeinsamkeiten untereinander auf. Sie sind reich an basischen, hydrophoben und hydroxylierten Aminosäuren und enthalten kaum oder keine sauren Seitenketten (von Heijne, 1986). Außerdem besitzen sie die Fähigkeit eine amphiphile α -Helix auszubilden. Diese Voraussetzungen sind für die aminoternale Extension von Dynamin B gegeben, die mit einem isoelektrischen Punkt von 9,8 basisch ist. Bei der vorhergesagten Schnittstelle handelt es sich um ein sogenanntes R-2-Motiv. Durch Sequenzvergleich von mitochondrialen Proteinen fand man, daß Argininreste in den Aminosäurepositionen -2, -3, -10 und -11 relativ

zur mitochondrialen Schnittstelle (Richtung Aminoterminus) überdurchschnittlich oft vorkommen (Kwong *et al.*, 1989). Diese R-x-Motive lassen nur in Verbindung mit den für mitochondriale Signalpeptide typischen Eigenschaften eine Vorhersage auf eine mitochondriale Schnittstelle zu. In der Regel befinden sich diese Schnittstellen zwischen 20 und 80 Aminosäuren stromabwärts vom Aminoterminus des Prä-Proteins (Hartl und Neupert, 1990). Das reife Protein ist somit um wenige kDa kleiner als das nicht prozessierte Protein. Im Fall von Dynamin B befindet sich das R-2-Motiv an Aminosäureposition 106, was in einem um 13 kDa kleineren reifen Protein resultiert. Die Präsequenz von Dynamin B ist somit vergleichsweise groß.

Mit Hilfe von Western-Blot-Analyse konnte nachgewiesen werden, daß Dynamin B prozessiert wird. Der polyklonale Antikörper, der gegen den C-terminalen Teil der GTPase-Domäne von Dynamin B gerichtet ist, erkannte in Gesamtzelllysaten von AX2-Wildtypzellen eine Bande bei 92 kDa anstelle der erwarteten 105 kDa-Bande, wie sie der berechneten Molekülmasse von Dynamin B entspricht. Das prozessierte Protein ist somit um 13 kDa kleiner als die nicht prozessierte Form, in Einklang mit der vorhergesagten Schnittstelle für eine mitochondriale Signalpeptidase an Position 106. Die Überproduktion von Dynamin B in AX3-ORF-Wildtypzellen lieferte zudem Hinweise, daß die Prozessierung am Aminoterminus und nicht am Carboxyterminus stattfindet. Gesamtzelllysate von Zellen, die Dynamin B mit einem Histidinpeptid am Aminoterminus überproduzieren, ergaben auf Western-Blots ein starkes Signal bei 105 kDa und ein schwaches bei 92 kDa, das in erster Linie vom endogenen Protein stammte. Dagegen erkannte der Antikörper in Lysaten aus Zellen, die Dynamin B mit einem carboxyterminalen oder ohne zusätzliches Histidinpeptid produzieren, eine intensive Bande bei 92 kDa und eine schwache bei 105 kDa. Daraus läßt sich schließen, daß Dynamin B am Aminoterminus prozessiert, und die Prozessierung durch das aminoterminale Histidinpeptid gehemmt wird. Die Beobachtung, daß Dynamin B mit einem carboxyterminalen oder ohne Histidinpeptid nicht vollständig prozessiert wird, läßt sich durch eine Sättigung der Bindungsstellen für Dynamin B an den Mitochondrien oder/und einen Sättigungseffekt bei der Prozessierung des Proteins durch die Signalpeptidase erklären. Sättigungseffekte, die zu einer unvollständigen Modifizierung des Präproteins führen, werden häufig bei überproduzierten Proteinen beobachtet, u.a. auch bei der Überproduktion von Msp1p (Pelloquin *et al.*, 1999).

Schließlich wurde mit Fluoreszenzmikroskopie bestätigt, daß Dynamin B an den Mitochondrien lokalisiert ist. Zur Visualisierung des Proteins wurden Zellen hergestellt, die Dynamin B mit YFP am Carboxyterminus produzieren. Sowohl bei fixierten wie auch lebenden Zellen ähnelte die Fluoreszenzfärbung in Form, Verteilung und Dynamik (in lebenden Zellen) der von Mitochondrien. Neben der mitochondrialen Färbung war auch eine cytosolische Färbung, die mehr oder weniger über die gesamte Zelle verteilt war, zu erkennen. Intensität und Verteilung der Färbung waren vom Expressionsniveau des Fusionsproteins abhängig. In Zellen, die Dynamin B-YFP nur schwach produzierten, war die charakteristische mitochondriale Färbung deutlicher erkennbar als in Zellen, die das Protein stärker produzierten und eine stärker cytosolische Färbung aufwiesen. Möglicherweise sind die Bindungsstellen für Dynamin B an den Mitochondrien gesättigt, so daß überschüssiges Protein im Cytosol zurückbleibt. Bei Anfärben der Mitochondrien in fixierten Dynamin B-

YFP produzierenden Zellen wurde eine deutliche Kolokalisation zwischen Dynamin B-YFP und den Mitochondrien beobachtet. In Zellen, die Dynamin B-YFP ohne aminoterminaler Extension produzierten, war die charakteristische mitochondriale Färbung verschwunden. Stattdessen erstreckte sich ein feines Netzwerk über die gesamte Zelle mit Ausnahme einiger runder Flächen, die wahrscheinlich die Positionen der Vakuolen und des Zellkerns markierten. In manchen Zellen schien das Netzwerk stellenweise auch zu Aggregaten zusammengeballt zu sein.

Die experimentellen Daten bekräftigten die Vermutung, daß die aminoterminaler Extension ein Signalpeptid darstellt, welches für die korrekte Lokalisation von Dynamin B notwendig ist. In einem weiteren Kontrollexperiment sollte bestätigt werden, daß die aminoterminaler Extension von Dynamin B notwendig und ausreichend für den Import eines Proteins in die Mitochondrien ist. Hierzu wurde YFP, ein Protein, das normalerweise nicht mit Mitochondrien assoziiert ist, am Aminoterminus mit der Extension von Dynamin B versehen. Anschließend sollte die Lokalisation dieses Fusionsproteins im Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden. Obwohl der Vektor, der für das Fusionsprotein kodiert, in verschiedene Zelllinien von *D. discoideum* transformiert wurde und unter verschiedenen Bedingungen selektioniert wurde, konnten keine Transformanten isoliert werden, die das Fusionsprotein produzierten. Möglicherweise ist dieses Genprodukt für die *D. discoideum*-Zellen toxisch.

Die Funktion, die Dynamin B in Verbindung mit den Mitochondrien ausübt, ist noch unklar. Weder Zellen, die das Protein nicht mehr produzieren, noch Zellen, die es verstärkt produzieren, weisen offensichtliche morphologische Veränderungen oder eine veränderte Verteilung der Mitochondrien auf. Zudem ist die mitochondriale Aktivität dieser Zellen kaum betroffen wie die Messung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität ergeben hat. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß das Fehlen von Dynamin A zu einer stark veränderten Mitochondrienmorphologie und zu einer um mehr als 50 % reduzierten Atmungsaktivität der Mitochondrien in *D. discoideum* führt, obwohl Dynamin A nicht mit Mitochondrien, sondern mit späten Endosomen kolokalisiert.

Dynamin B ist nicht das erste Dynamin-ähnliche Protein, das mit Mitochondrien in Verbindung gebracht wird. Dnm1p (*S. cerevisiae*) und Drp1 (*C. elegans*) sind an der Außenseite der Mitochondrien lokalisiert und spielen hier eine Rolle bei der Abschnürung von Membranen (Bleazard *et al.*, 1999; Labrousse *et al.*, 1999). Sie wurden insbesondere an Membranbereichen gefunden, die gerade im Begriff waren durchtrennt zu werden oder gerade durchtrennt worden sind. Das Fehlen dieser Proteine hat im Gegensatz zum Fehlen von Dynamin B starke Auswirkungen auf Form und Verteilung der Mitochondrien in den jeweiligen Zellen. Dnm1p und Drp1 scheinen spezifisch für das Durchtrennen der äußeren Mitochondrienmembran verantwortlich zu sein. In Zellen ohne funktionelles Drp1 findet bei sich teilenden Mitochondrien weiterhin die Trennung der inneren Mitochondrienmembran statt, während der Abschnürungsvorgang an der äußeren Membran blockiert ist. Dadurch bleiben die Mitochondrien über Membranstränge miteinander verbunden (Labrousse *et al.*, 1999). Weniger gut untersucht ist die Aufgabe, die die Dynamin-ähnlichen Proteine Mgm1p und Msp1p bei der Erhaltung der Mitochondrienmorphologie spielen. Sie besitzen wie Dynamin B ein mitochondriales Signalpeptid und sind im Inneren der Mitochondrien lokalisiert, wobei Msp1p in der inneren Membran Richtung Matrix verankert ist (Pelloquin *et*

al., 1999) und Mgm1p vermutlich peripher mit der inneren Membran assoziiert ist, die dem Intermembranraum zugewandt ist (Wong *et al.*, 2000). Das Fehlen von funktionellem Mgm1p führt zur Zusammenballung des mitochondrialen Systems in den Hefezellen (Guan *et al.*, 1993). Außerdem ist die Atmungsaktivität in Zellen gestört, die kein funktionelles Mgm1p oder Msp1p produzieren. Mgm1p und Msp1p könnten eine ähnliche Rolle an der inneren Membran spielen wie Dnm1p und Drp1 an der äußeren, und bei der Formung der Christae beteiligt sein. Möglicherweise ist Dynamin B ebenfalls an Abschnürungsprozessen von Mitochondrienmembranen beteiligt. Im Gegensatz zu den angeführten Proteinen, hat das Fehlen von Dynamin B jedoch keine offensichtlichen Auswirkungen auf Form und Funktion der Mitochondrien in *D. discoideum*. Es ist daher nicht auszuschließen, daß weitere Proteine in *D. discoideum* vorhanden sind, die eine überlappende Funktion haben und beim Fehlen von Dynamin B dessen Aufgabe mitübernehmen. Eventuell wird diese Rolle von dem GTP-bindenden Protein FtsZ, das Ähnlichkeit zu Tubulin aufweist, übernommen.

FtsZ ist wie Dynamin in der Lage, sich zu Ringen und Spiralen zusammenzulagern (Lu *et al.*, 2000). Außerdem ist FtsZ an der Zellteilung von Prokaryonten involviert. Während der Zellteilung bildet sich in der Mitte des Bakteriums ein Ring aus FtsZ-Molekülen aus. Die Kontraktion des Rings führt zu einer konzentrischen Einschnürung der Plasmamembran und zur Bildung von zwei Tochterzellen. FtsZ wurde auch in den Chloroplasten von Eukaryonten gefunden. Offenbar haben die Chloroplasten, die durch Endosymbiose von Bakterien entstanden sind, den bakteriellen Teilungsmechanismus beibehalten. In *A. thaliana* wurden zwei FtsZ-Homologe identifiziert (Osteryoung *et al.*, 1998). FtsZ1 besitzt ein Signalpeptid, das es in die Chloroplasten transportiert, FtsZ2 fehlt dagegen ein derartiges Importsignal und bleibt an der cytoplasmatischen Seite der Chloroplasten. Ein Modell geht davon aus, daß FtsZ1 einen Ring im Inneren des Chloroplasts bildet und die Chloroplastenmembran von innen zusammenzieht, während FtsZ2 einen äußeren Ring um das Chloroplast bildet und die Membran von außen zusammenschiebt. Bei der Teilung von Mitochondrien könnte FtsZ im Laufe der Evolution durch Mitglieder der Dynaminfamilie ersetzt worden sein (Erickson, 2000). Eine Ausnahme bildet die Braunalgenart *M. splendens*, die ein FtsZ-Homologes besitzt, das in den Mitochondrien lokalisiert ist (Beech *et al.*, 2000). Besonders interessant ist, daß auch *D. discoideum* zwei FtsZ-Homologe besitzt, die erst kürzlich identifiziert wurden (Margolin und Yu, 2000). Das eine Homologe, FtsZ2, kolokalisiert mit Mitochondrien, während die Lokalisation des anderen Homologes noch unbekannt ist. *D. discoideum*-Zellen, bei denen jeweils eines der FtsZ-Proteine fehlt, zeigen keine auffälligen phänotypischen Veränderungen. Die gleichzeitige Abwesenheit beider Homologe führt dagegen zu anormal vergrößerten Mitochondrien. FtsZ und Dynamin B könnten auf ähnliche Weise an der Abschnürung von Membranen beteiligt sein.

Zur Aufklärung der Funktion von Dynamin B ist es notwendig, die genaue Lokalisation von Dynamin B in oder an den Mitochondrien zu kennen. Die mikroskopischen Daten weisen darauf hin, daß Dynamin B mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist. So zeigen Zellen, die Dynamin B-YFP produzieren, charakteristische ringförmige Strukturen im Fluoreszenzmikroskop. Die gleichen ringförmigen Strukturen werden beobachtet, wenn die Mitochondrien mit einem gegen Porin gerichteten Antikörper visualisiert werden (Troll *et al.*, 1992). Porin ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, was auch das

ringförmige Erscheinungsbild dieser Organellen in der Immunfluoreszenz erklärt. Die Lokalisation von Dynamin B-YFP an der äußeren Mitochondrienmembran wurde durch Immunogold-Elektronenmikroskopie bestätigt. Allerdings läßt sich aus den Daten keine Aussage darüber machen, ob Dynamin B innerhalb der Mitochondrienmembran oder peripher an der Membran lokalisiert ist. Die Assoziation von Dynamin B mit der äußeren Membran ist ungewöhnlich, da Proteine der äußeren Membran normalerweise kein Signalpeptid besitzen (Mihara, 2000). Außerdem ergab die Immun-Elektronenmikroskopie, daß Dynamin B-YFP zusätzlich auch an der Plasmamembran, an der Membran von Phagosomen und der kontraktile Vakuole lokalisiert ist. Wahrscheinlich gehört Dynamin B zu einer Reihe von Proteinen, die ein mitochondriales Importsignal besitzen, deren prozessierte Form aber an Kompartimenten außerhalb der Mitochondrien gefunden wird (Soltys und Gupta, 1999). Ein Beispiel hierfür ist die mitochondriale Aspartat-Aminotransferase (mAspAT), die eine mitochondriale Präsequenz besitzt. Die prozessierte Form des Proteins ist identisch mit dem Protein FABP (*fatty acid binding protein*), das an der Plasmamembran lokalisiert ist und dort die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren ins Zellinnere beschleunigt. Die Transfektion von mAspAT-cDNA in Fibroblastenzellen, die das Enzym normalerweise nicht produzieren, bewirkt die verstärkte Aufnahme von gesättigten Fettsäuren (Isola *et al.*, 1995).

5.5 Modell zur Funktionsweise von Dynamin B

Aus den hier gewonnenen Ergebnissen läßt sich folgendes Modell ableiten. Dynamin B wird aufgrund seines Signalpeptids in die mitochondriale Matrix transportiert. Nach Entfernung des Peptids durch eine mitochondriale Signalpeptidase wird das reife Protein wieder exportiert, um zum Wirkort in der Zelle zu gelangen. Dies sind Membranen wie die äußere Mitochondrienmembran, die Plasmamembran und die Membran von Phagosomen und der kontraktile Vakuole. Die Ähnlichkeit zu anderen Mitgliedern der Dynaminfamilie läßt vermuten, daß Dynamin B an der Abschnürung von Membranen und bei der Formgebung von Organellen beteiligt ist. Die Morphologie der Organellen in *dymB*-Zellen ist jedoch kaum verändert, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, daß die Dynamin B-Funktion von anderen Proteinen mit überlappender Funktion übernommen werden kann. Ein potentieller Kandidat hierfür ist Dynamin A.

Für eine überlappende Funktion von Dynamin A und Dynamin B spricht, daß es nicht möglich war, beide *dym*-Gene gleichzeitig auszuschalten. Das Fehlen beider Dynamin-Homologe ist für *D. discoideum* offenbar letal.

Die Funktion, die Dynamin B an den Mitochondrien ausübt, könnte von dem oben beschriebenen FtsZ2 übernommen werden. FtsZ2 ist an den Mitochondrien lokalisiert und wahrscheinlich an der Teilung von Mitochondrien beteiligt.

Dynamin B wurde auch an der Membran der kontraktile Vakuole gefunden. Die Abwesenheit des Proteins führte zu keiner Beeinträchtigung der Funktion oder zu einer veränderten Morphologie dieses Organells. Allerdings sind morphologische Veränderungen der

kontraktilen Vakuole, die aus einem hochkomplizierten vakuolären und tubulären System aufgebaut ist, häufig nur schwer erkennbar.

Die Lokalisation von Dynamin B an der Plasmamembran steht im Einklang mit dem veränderten Adhäsionsverhalten der *dymB*⁻Zellen. Dynamin B könnte an der Internalisierung von Oberflächenrezeptoren beteiligt sein, indem es z. B. bei der Abschnürung von Rezeptor-enthaltenden Vesikel mitwirkt. Bei Zellen, die kein Dynamin B mehr produzieren, wären diese Rezeptoren verstärkt an der Oberfläche exponiert, was zu der erhöhten Adhäsion führt. Als Adhäsions-Rezeptoren kommen wegen der beobachteten EDTA-Sensitivität *contact sites B* in Betracht, die in *D. discoideum* für die Zell-Zelladhäsion während des vegetativen Wachstums verantwortlich sind.

6 Literaturverzeichnis

- Aebi, M., Fah, J., Hurt, N., Samuel, C. E., Thomis, D., Bazzigher, L., Pavlovic, J., Haller, O., and Staeheli, P.** (1989). cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Molecular & Cellular Biology* **9**, 5062-5072.
- Altschuler, Y., Barbas, S. M., Terlecky, L. J., Tang, K., Hardy, S., Mostov, K. E., and Schmid, S. L.** (1998). Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms. *Journal of Cell Biology* **143**, 1871-1881.
- Bacon, R. A., Cohen, C. J., Lewin, D. A., and Mellman, I.** (1994). Dictyostelium discoideum mutants with temperature-sensitive defects in endocytosis. *Journal of Cell Biology* **127**, 387-399.
- Beech, P. L., Nheu, T., Schultz, T., Herbert, S., Lithgow, T., Gilson, P. R., and McFadden, G. I.** (2000). Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga. *Science* **287**, 1276-1279.
- Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C. O., Schirmer, N. K., Sprinzl, M., and Hilgenfeld, R.** (1993). Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* **365**, 126-132.
- Bereiter-Hahn, J. and Voth, M.** (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy Research & Technique* **27**, 198-219.
- Beug, H., Katz, F. E., and Gerisch, G.** (1973). Dynamics of antigenic membrane sites relating to cell aggregation in Dictyostelium discoideum. *Journal of Cell Biology* **56**, 647-658.
- Blaauw, M., Linskens, M. H., and Van Haastert, P. J.** (2000). Efficient control of gene expression by a tetracycline-dependent transactivator in single Dictyostelium discoideum cells. *Gene* **252**, 71-82.
- Bleazard, W., McCaffery, J. M., King, E. J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., and Shaw, J. M.** (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nature Cell Biology* **1**, 298-304.
- Blusch, J., Morandini, P., and Nellen, W.** (1992). Transcriptional regulation by folate: inducible gene expression in Dictyostelium transformants during growth and early development. *Nucleic Acids Research* **20**, 6235-6238.
- Bokoch, G. M. and Der, C. J.** (1993). Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB Journal* **7**, 750-759.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F.** (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127.
- Bretscher, M. S. and Thomson, J. N.** (1983). Distribution of ferritin receptors and coated pits on giant HeLa cells. *Embo Journal* **2**, 599-603.

- Burgess, S. M., Delannoy, M., and Jensen, R. E.** (1994). MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *Journal of Cell Biology* **126**, 1375-1391.
- Burki, E., Anjard, C., Scholder, J. C., and Reymond, C. D.** (1991). Isolation of 2 genes encoding putative protein-kinases regulated during Dictyostelium discoideum development. *Gene* **102**, 57-65.
- Cardelli, J. A., Richardson, J., and Miers, D.** (1989). Role of acidic intracellular compartments in the biosynthesis of Dictyostelium lysosomal enzymes. The weak bases ammonium chloride and chloroquine differentially affect proteolytic processing and sorting. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 3454-3463.
- Carr, J. F. and Hinshaw, J. E.** (1997). Dynamin assembles into spirals under physiological salt conditions upon the addition of GDP and gamma-phosphate analogues. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 28030-28035.
- Carter, L. L., Redelmeier, T. E., Woollenweber, L. A., and Schmid, S. L.** (1993). Multiple GTP-binding proteins participate in clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis. *Journal of Cell Biology* **120**, 37-45.
- Cascarano, J., Chambers, P. A., Schwartz, E., Poorkaj, P., Gondo, and RE.** (1995). Organellar clusters formed by mitochondrial-rough endoplasmic reticulum associations: an ordered arrangement of mitochondria in hepatocytes. *Hepatology* **22**, 837-846.
- Chadwick, C. M., Ellison, J. E., and Garrod, D. R.** (1984). Dual role for Dictyostelium contact site B in phagocytosis and developmental size regulation. *Nature* **307**, 646-647
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K., and Zerial, M.** (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**, 317-329.
- Chen, M. S., Obar, R. A., Schroeder, C. C., Austin, T. W., Poodry, C. A., Wadsworth, S. C., and Vallee, R. B.** (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature* **351**, 583-586.
- Chia, C. P.** (1996). A 130-kDa plasma membrane glycoprotein involved in Dictyostelium phagocytosis. *Experimental Cell Research* **227**, 182-189.
- Chia, C. P. and Luna, E. J.** (1989). Phagocytosis in Dictyostelium discoideum is inhibited by antibodies directed primarily against common carbohydrate epitopes of a major cell surface plasma membrane glycoprotein. *Experimental Cell Research* **181**, 11-26.
- Cohen, C. J., Bacon, R., Clarke, M., Joiner, K., and Mellman, I.** (1994). Dictyostelium discoideum mutants with conditional defects in phagocytosis. *Journal of Cell Biology* **126**, 955-966.

- Damer, C. K. and O'Halloran, T. J.** (2000). Spatially regulated recruitment of clathrin to the plasma membrane during capping and cell translocation. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 2151-2159.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E., and Schmid, S. L.** (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *Journal of Cell Biology* **127**, 915-934.
- David, C., McPherson, P. S., Mundigl, O., and De, C. P.** (1996). A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 331-335.
- De Lozanne, A. and Spudich, J. A.** (1987). Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**, 1086-1091.
- Downing, A. K., Driscoll, P. C., Gout, I., Salim, K., Zvelebil, M. J., and Waterfield, M. D.** (1994). Three-dimensional solution structure of the pleckstrin homology domain from dynamin. *Current Biology* **4**, 884-891.
- Downward, J.** (1990). The ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 469-472.
- Emini, E., Eminlio, A., Hughes, J., Perlow, D., and Boger, J.** (1985). Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by virus-specific synthetic peptide. *Journal of Virology* **55**, 836-839.
- Erickson, H. P.** (2000). Dynamin and FtsZ. Missing links in mitochondrial and bacterial division. *Journal of Cell Biology* **148**, 1103-1105.
- Feig, L. A. and Cooper, G. M.** (1988). Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Molecular & Cellular Biology* **8**, 3235-3243.
- Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., and Sigler, P. B.** (1994). Crystal structure at 2.2 Å resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell* **79**, 199-209.
- Firtel, R. A.** (1995). Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in Dictyostelium. *Genes & Development* **9**, 1427-1444.
- Firtel, R. A., Cockburn, A., Frankel, G., and Hershfield, V.** (1976). Structural organization of the genome of Dictyostelium discoideum: analysis by EcoRI restriction endonuclease. *Journal of Molecular Biology* **102**, 831-852.
- Fish, K. N., Schmid, S. L., and Damke, H.** (2000). Evidence that dynamin-2 functions as a signal-transducing GTPase. *Journal of Cell Biology* **150**, 145-154.
- Flohr, F., Schneider-Schaulies, S., Haller, O., and Kochs, G.** (1999). The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures. *Febs Letters* **463**, 24-28.

- Fok, A. K., Clarke, M., Ma, L., and Allen, R. D.** (1993). Vacuolar H(+)-ATPase of *Dictyostelium discoideum*. A monoclonal antibody study. *Journal of Cell Biology* **106**, 1103-1113.
- Freeze, H. H., Koza-Taylor, P., Saunders, A., and Cardelli, J. A.** (1989). The effects of altered N-linked oligosaccharide structures on maturation and targeting of lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 19278-19286.
- Gammie, A. E., Kurihara, L. J., Vallee, R. B., and Rose, M. D.** (1995). DNMI, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *Journal of Cell Biology* **130**, 553-566.
- Gamper, M., Howard, P. K., Hunter, T., and Firtel, R. A.** (1996). Multiple roles of the novel protein tyrosine phosphatase PTP3 during *Dictyostelium* growth and development. *Molecular & Cellular Biology* **16**, 2431-2444.
- Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B.** (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *Journal of Molecular Biology* **120**, 97-120.
- Gavel, Y. and von Heijne, G.** (1990). Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Engineering* **4**, 33-37.
- Gerisch, G.** (1980). Univalent antibody fragments as tools for the analysis of cell interactions in *Dictyostelium*. *Current Topics in Developmental Biology* **14**, 243-270.
- Gerisch, G. and Wick, U.** (1975). Intracellular oscillations and release of cyclic AMP from *Dictyostelium* cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **65**, 364-370.
- Gold, E. S., Underhill, D. M., Morrissette, N. S., Guo, J., McNiven, MA, and Aderem, A.** (1999). Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *Journal of Experimental Medicine* **190**, 1849-1856.
- Gossen, M. and Bujard, H.** (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 5547-5551.
- Gout, I., Dhand, R., Hiles, I. D., Fry, M. J., Panayotou, G., Das, P., Truong, O., Totty, NF, Hsuan, J., and Booker, G. W.** (1993a). The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell* **75**, 25-36.
- Grant, C. E., Bain, G., and Tsang, A.** (1990). The molecular basis for alternative splicing of the CABP1 transcripts in *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Research* **18**, 5457-5463.
- Griffiths, G., Simons, K., Warren, G., and Tokuyasu, K. T.** (1983). Immunoelectron microscopy using thin, frozen sections: application to studies of the intracellular transport of Semliki Forest virus spike glycoproteins. *Methods In Enzymology* **96**, 466-485.

- Grigliatti, T. A., Hall, L., Rosenbluth, R., and Suzuki, D. T.** (1973). Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. A selection of immobile adults. *Molecular & General Genetics* **120**, 107-114.
- Gu, X. and Verma, D. P.** (1996). Phragmoplastin, a dynamin-like protein associated with cell plate formation in plants. *Embo Journal* **15**, 695-704.
- Guan, K., Farh, L., Marshall, T. K., and Deschenes, R. J.** (1993). Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the MGM1 gene. *Current Genetics* **24**, 141-148.
- Hacker, U., Albrecht, R., and Maniak, M.** (1997). Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *Journal of Cell Science* **110**, 105-112.
- Hansen, S. H., Sandvig, K., and van Deurs, B.** (1991). The preendosomal compartment comprises distinct coated and noncoated endocytic vesicle populations. *Journal of Cell Biology* **113**, 731-741.
- Hartl, F. U. and Neupert, W.** (1990). Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* **247**, 930-938.
- Haslam, R. J., Koide, H. B., and Hemmings, B. A.** (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature* **363**, 309-310.
- Hed, J.** (1986). Methods for distinguishing ingested from adhering particles. *Methods In Enzymology* **132**, 198-204.
- Heggeness, M. H., Simon, M., and Singer, S. J.** (1978). Association of mitochondria with microtubules in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 3863-3866.
- Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J., and McNiven, M. A.** (1998). Dynamin-mediated internalization of caveolae. *Journal of Cell Biology* **141**, 85-99.
- Henley, J. R. and McNiven, M. A.** (1996). Association of a dynamin-like protein with the Golgi apparatus in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* **133**, 761-775.
- Herskovits, J. S., Burgess, C. C., Obar, R. A., and Vallee, R. B.** (1993). Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *Journal of Cell Biology* **122**, 565-578.
- Heuser, J., Zhu, Q., and Clarke, M.** (1993). Proton pumps populate the contractile vacuoles of *Dictyostelium amoebae*. *Journal of Cell Biology* **121**, 1311-1327.
- Hinshaw, J. E. and Schmid, S. L.** (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-192.
- Horisberger, M. A. and Gunst, M. C.** (1991). Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology* **180**, 185-190.
- Horisberger, M. A., Staeheli, P., and Haller, O.** (1983). Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 1910-1914.

- Imoto, M., Tachibana, I., and Urrutia, R.** (1998). Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. *Journal of Cell Science* **111**, 1341-1349.
- Isola, L. M., Zhou, S. L., Kiang, C. L., Stump, D. D., Bradbury, M. W., and Berk, P. D.** (1995). 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 9866-9870.
- Jones, B. A. and Fangman, W. L.** (1992). Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes & Development* **6**, 380-389.
- Jones, S. M., Howell, K. E., Henley, J. R., Cao, H., and McNiven, M. A.** (1998). Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science* **279**, 573-577.
- Kamimoto, T., Nagai, Y., Onogi, H., Muro, Y., Wakabayashi, T., and Hagiwara, M.** (1998). Dymple, a novel dynamin-like high molecular weight GTPase lacking a proline-rich carboxyl-terminal domain in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 1044-1051.
- Kang, S. G., Jin, J. B., Piao, H. L., Pih, K. T., Jang, H. J., Lim, J. H., and Hwang, I.** (1998). Molecular cloning of an Arabidopsis cDNA encoding a dynamin-like protein that is localized to plastids. *Plant Molecular Biology* **38**, 437-447.
- Kochs, G. and Haller, O.** (1999). Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2082-2086.
- Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., and Sigler, P. B.** (1989). Beta-bungarotoxin. Preparation and characterization of crystals suitable for structural analysis. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 19349-19353.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical & Biophysical Methods* **10**, 203-209.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F.** (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**, 105-132.
- Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A., and Van der Bliek, A. M.** (1999). *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Molecular Cell* **4**, 815-826.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lin, H. C., Barylko, B., Achiriloaie, M., and Albanesi, J. P.** (1997). Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate-dependent activation of dynamins I and II lacking the proline/arginine-rich domains. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 25999-26004.

- Lin, H. C. and Gilman, A. G.** (1996). Regulation of dynamin I GTPase activity by G protein betagamma subunits and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 27979-27982.
- Lipowsky, R.** (1993). Domain-induced budding of fluid membranes. *Biophysical Journal* **64**, 1133-1138.
- Lowy, D. R. and Willumsen, B. M.** (1993). Function and regulation of ras. *Annual Review of Biochemistry* **62**, 851-891.
- Lu, C., Reedy, M., and Erickson, H. P.** (2000). Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *Journal of Bacteriology* **182**, 164-170.
- Maeda, K., Nakata, T., Noda, Y., SatoYoshitake, R., and Hirokawa, N.** (1992). Interaction of dynamin with microtubules: Its structure and GTPase activity investigated by using highly purified dynamin. *Molecular Biology of the Cell* **3**, 1181-1194.
- Maier, O., Knoblich, M., and Westermann, P.** (1996). Dynamin II binds to the trans-Golgi network. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **223**, 229-233.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J., and Gerisch** (1995). Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag. *Cell* **83**, 915-924.
- Manstein, D. J., Schuster, H.-P., Morandini, P., and Hunt, D. M.** (1995). Cloning vectors for the production of proteins in Dictyostelium discoideum. *Gene* **162**, 129-134.
- Manstein, D. J., Titus, M. A., De Lozanne, A., and Spudich, J. A.** (1989). Gene replacement in Dictyostelium: generation of myosin null mutants. *Embo Journal* **8**, 923-932.
- Margolin, W., and Yu, X.** (2000). Dual FtsZ homologs in Dictyostelium: a bacteria-like mitochondrial division system? *Molecular Biology of the Cell* **11** (Supplement).
- Markby, D. W., Onrust, R., and Bourne, H. R.** (1993). Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G alpha subunit. *Science* **262**, 1895-1901.
- Mayer, B. J., Ren, R., Clark, K. L., and Baltimore, D.** (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* **73**, 629-630.
- McCormick, F.** (1989). ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell* **56**, 5-8.
- Meier, E., Fah, J., Grob, M. S., End, R., Staeheli, P., and Haller, O.** (1988). A family of interferon-induced Mx-related mRNAs encodes cytoplasmic and nuclear proteins in rat cells. *Journal of Virology* **62**, 2386-2393.
- Meier, E., Kunz, G., Haller, O., and Arnheiter, H.** (1990). Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *Journal of Virology* **64**, 6263-6269.
- Melen, K., Ronni, T., Lotta, T., and Julkunen, I.** (1994). Enzymatic characterization of interferon-induced antiviral GTPases murine Mx1 and human MxA proteins. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 2009-2015.

- Michelitsch, M. D., and Weissman, J. S.** (2000). A census of glutamine/asparagine-rich regions: Implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 11910-11915.
- Mihara, K.** (2000). Targeting and insertion of nuclear-encoded preproteins into the mitochondrial outer membrane. *Bioessays* **22**, 364-371.
- Mose-Larsen, P., Bravo, R., Fey, S. J., Small, J. V., and Celis, J. E.** (1982). Putative association of mitochondria with a subpopulation of intermediate-sized filaments in cultured human skin fibroblasts. *Cell* **31**, 681-692.
- Muhlberg, A. B., Warnock, D. E., and Schmid, S. L.** (1997). Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO Journal* **16**, 6676-6683.
- Muller, M., Winnacker, E. L., and Brem, G.** (1992). Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *Journal of Interferon Research* **12**, 119-129.
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods In Enzymology* **155**, 335-350.
- Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J., and Saraste, M.** (1993). The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 343-348.
- Nakayama, M., Yazaki, K., Kusano, A., Nagata, K., Hanai, N., and Ishihama, A.** (1993). Structure of mouse Mx1 protein. Molecular assembly and GTP-dependent conformational change. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 15033-15038.
- Nellen, W., Silan, C., and Firtel, R. A.** (1984). DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Molecular & Cellular Biology* **4**, 2890-2898.
- Neuhaus, E. M., Horstmann, H., Almers, W., Maniak, M., and Soldati, T.** (1998). A universal ethane-freezing/methanol-fixation procedure highly improves preservation of structure and antigenicity in immunofluorescence and pre-embedding immunoelectron microscopy. *Journal of Structural Biology* **121**, 326-342.
- Niewohner, J., Weber, I., Maniak, M., Muller-Taubenberger, A., and Gerisch, G.** (1997). Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *Journal of Cell Biology* **138**, 349-361.
- Noegel, A. A., and Schleicher, M.** (2000). The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *Journal of Cell Science* **113**, 759-766.
- Noel, J. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B.** (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin-α complexed with GTP γS. *Nature* **366**, 654-663.
- Obar, R. A., Shpetner, H. S., and Vallee, R. B.** (1991). Dynamin: a microtubule-associated GTP-binding protein. *Journal of Cell Science - Supplement* **14**, 143-145.

- O'Halloran, T. J., and Anderson, R. G. W.** (1992). Clathrin heavy chain is required for pinocytosis, the presence of large vacuoles, and development in *Dictyostelium*. *Journal of Cell Biology* **118**, 1371-1377.
- Olive, L.** (1975). *The mycetozoans. Academic Press, NY.*
- Oliver, C. and Hand, A. R.** (1978). Uptake and fate of luminally administered horseradish peroxidase in resting and isoproterenol-stimulated rat parotid acinar cells. *Journal of Cell Biology* **76**, 207-229.
- Osteryoung, K. W., Stokes, K. D., Rutherford, S. M., Percival, A. L., and Lee, W. Y.** (1998). Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial *ftsZ*. *Plant Cell* **10**, 1991-2004.
- Otsuga, D., Keegan, B. R., Brisch, E., Thatcher, J. W., Hermann, G. J., Bleazard, W., Shaw, J. M.** (1998) The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *Journal of Cell Biology* **143**, 333-49
- Pai, E. F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K. C., John, J., and Wittinghofer, A.** (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209-214.
- Pang, K. M., Lynes, M. A., and Knecht, D. A.** (1999). Variables controlling the expression level of exogenous genes in *Dictyostelium*. *Plasmid* **41**, 187-197.
- Park, J. M., Cho, J. H., Kang, S. G., Jang, H. J., Pih, K. T., Piao, H. L., Cho, M. J., and Hwang, I.** (1998). A dynamin-like protein in *Arabidopsis thaliana* is involved in biogenesis of thylakoid membranes. *EMBO Journal* **17**, 859-867.
- Paschal, B. M., Obar, R. A., and Vallee, R. B.** (1989). Interaction of brain cytoplasmic dynein and MAP2 with a common sequence at the C terminus of tubulin. *Nature* **342**, 569-572.
- Pavlovic, J., Haller, O., and Staeheli, P.** (1992). Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *Journal of Virology* **66**, 2564-2569.
- Pelloquin, L., Belenguer, P., Menon, Y., and Ducommun, B.** (1998). Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **251**, 720-726.
- Pelloquin, L., Belenguer, P., Menon, Y., Gas, N., and Ducommun, B.** (1999). Fission yeast Msp1 is a mitochondrial dynamin-related protein. *Journal of Cell Science* **112**, 4151-4161.
- Pfanner, N.** (2000). Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Current Biology* **10**, R412-R415.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J.** (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.

- Raper, K. B.** (1935). Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *Journal of Agricultural Research* **58**, 135-147.
- Raposo, G., Dunia, I., Delavier-Klutchko, C., Kaveri, S., Strosberg, A. D., and Benedetti, E. L.** (1989). Internalization of beta-adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles. *European Journal of Cell Biology* **50**, 340-352.
- Rauchenberger, R., Hacker, U., Murphy, J., Niewohner, J., and Maniak, M.** (1997). Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in Dictyostelium. *Current Biology* **7**, 215-218.
- Ringstad, N., Nemoto, Y., and De Camilli, P.** (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 8569-8574.
- Rothman, J. H., Raymond, C. K., Gilbert, T., O'Hara, P. J., Stevens, and TH.** (1990). A putative GTP binding protein homologous to interferon-inducible Mx proteins performs an essential function in yeast protein sorting. *Cell* **61**, 1063-1074.
- Rothman, J. H. and Stevens, T. H.** (1986). Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell* **47**, 1041-1051.
- Ruscetti, T., Cardelli, J. A., Niswonger, M. L., and O'Halloran, T. J.** (1994). Clathrin heavy chain functions in sorting and secretion of lysosomal enzymes in Dictyostelium discoideum. *Journal of Cell Biology* **126**, 343-352.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N.** (1992). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotechnology* **24**, 476-480.
- Salim, K., Bottomley, M. J., Querfurth, E., Zvelebil, M. J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R. L., Gigg, R., Smith, C. I., Driscoll, P. C., Waterfield, M. D., and Panayotou, G.** (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *Embo Journal* **15**, 6241-6250.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A.** (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment – downregulation by cytokinesis and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 389-400.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saraste, M., Sibbald, P. R., and Wittinghofer, A.** (1990). The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 430-434.

- Scaife, R. and Margolis, R. L.** (1990). Biochemical and immunochemical analysis of rat brain dynamin interaction with microtubules and organelles in vivo and in vitro. *Journal of Cell Biology* **111**, 3023-3033.
- Scaife, R., Venien-Bryan, C., and Margolis, R. L.** (1998). Dual function C-terminal domain of dynamin-1: modulation of self-assembly by interaction of the assembly site with SH3 domains. *Biochemistry* **37**, 17673-17679.
- Schleicher, M., Andre, B., Andreoli, C., Eichinger, L., Haugwitz, M., Hofmann, A., Karakesisoglou, J., Stockelhuber, M., and Noegel, A. A.** (1995). Structure/function studies on cytoskeletal proteins in Dictyostelium amoebae as a paradigm. *Febs Letters* **369**, 38-42.
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B., and Soling, H. D.** (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* **401**, 133-141.
- Sesaki, H. and Jensen, R. E.** (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *Journal of Cell Biology* **147**, 699-706.
- Sever, S., Muhlberg, A. B., and Schmid, S. L.** (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* **398**, 481-486.
- Shaw, G.** (1993). Identification of novel pleckstrin homology (PH) domains provides a hypothesis for PH domain function. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **195**, 1145-1151.
- Shepard, K. A. and Yaffe, M. P.** (1999). The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *Journal of Cell Biology* **144**, 711-720.
- Shin, H. W., Shinotsuka, C., Torii, S., Murakami, K., and Nakayama, K.** (1997). Identification and subcellular localization of a novel mammalian dynamin-related protein homologous to yeast Vps1p and Dnm1p. *Journal of Biochemistry* **122**, 525-530.
- Shin, H. W., Takatsu, H., Mukai, H., Munekata, E., Murakami, K., and Nakayama, K.** (1999). Intermolecular and interdomain interactions of a dynamin-related GTP-binding protein, Dnm1p/Vps1p-like protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 2780-2785.
- Shpetner, H. S. and Vallee, R. B.** (1989). Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* **59**, 421-432.
- Shpetner, H. S. and Vallee, R. B.** (1992). Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature* **355**, 733-735.
- Sigal, I. S., Gibbs, J. B., D'Alonzo, J. S., Temeles, G. L., Wolanski, B.S., Socher, S. H., and Scolnick, E. M.** (1986). Mutant ras-encoded proteins with altered nucleotide binding exert dominant biological effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 952-956.

- Simon, V. R., Karmon, S. L., and Pon, L. A.** (1997). Mitochondrial inheritance: cell cycle and actin cable dependence of polarized mitochondrial movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Motility & the Cytoskeleton* **37**, 199-210.
- Simon, V. R., Swayne, T. C., and Pon, L. A.** (1995). Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *Journal of Cell Biology* **130**, 345-354.
- Siu, C. H.** (1990). Cell cell-adhesion molecules in *Dictyostelium*. *Bioessays* **12**, 357-362.
- Smirnova, E., Shurland, D. L., Newman-Smith, E. D., Pishvae, B., and Van der Blik, A. M.** (1999). A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 14942-14947.
- Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N., and Van der Blik, A. M.** (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *Journal of Cell Biology* **143**, 351-358.
- Soltys, B. J. and Gupta, R. S.** (1999). Mitochondrial-matrix proteins at unexpected locations: are they exported?. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 174-177.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-517.
- Staeli, P., Haller, O., Boll, W., Lindemann, J., and Weissmann, C.** (1986). Mx proteins: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* **44**, 147-158.
- Stott, K., Blackburn, J. M., Butler, P. J. G., and Perutz, M.** (1995). Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: Implications for neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 6509-6513.
- Stowell, M. H., Marks, B., Wigge, P., and McMahon, H. T.** (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nature Cell Biology* **1**, 27-32.
- Summerhayes, I. C., Wong, D., and Chen, L. B.** (1983). Effect of microtubules and intermediate filaments on mitochondrial distribution. *Journal of Cell Science* **61**, 87-105.
- Sussman, R. and Sussman, M.** (1967). Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **29**, 53-55.
- Swanson, J. A.** (1989). Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *Journal of Cell Science* **94**, 135-142.
- Swanson, J. A. and Baer, S. C.** (1995). Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends in Cell Biology* **5**, 89-93.
- Sweitzer, S. M. and Hinshaw, J. E.** (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* **93**, 1021-1029.

- Takei, K., McPherson, P. S., Schmid, S. L., and De Camilli, P.** (1995). Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gammaS in nerve terminals. *Nature* **374**, 186-190.
- Temesvari, L. A., Rodriguez-Paris, J. M., Bush, J. M., Zhang, L., and Cardelli, J. A.** (1996). Involvement of the vacuolar proton-translocating ATPase in multiple steps of the endo-lysosomal system and in the contractile vacuole system of *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Cell Biology* **109**, 1479-1495.
- Trahey, M. and McCormick, F.** (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**, 542-545.
- Troll, H., Malchow, D., Muller-Taubenberger, A., Humbel, B., Lottspeich, F., Ecke, M., Gerisch, G., Schmid, A., and Benz, R.** (1992). Purification, functional characterization, and cDNA sequencing of mitochondrial porin from *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 21072-21079.
- Tuma, P. L., Stachniak, M. C., and Collins, C. A.** (1993). Activation of dynamin GTPase by acidic phospholipids and endogenous rat brain vesicles. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 17240-17246.
- Urrutia, R., Henley, J. R., Cook, T., and McNiven, M. A.** (1997). The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases?. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 377-384.
- Vallee, R. B.** (1992). Dynamin: Motor protein or regulatory GTPase. *Journal Of Muscle Research And Cell Motility* **13**, 493-496.
- van der Blik AM; and Meyerowitz, E. M.** (1991). Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature* **351**, 411-414.
- van der Blik AM, Redelmeier, T. E., Damke, H., Tisdale, E. J., Meyerowitz, E. M., and Schmid, S. L.** (1993). Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *Journal of Cell Biology* **122**, 553-563.
- Van der Blik, A. M.** (1999). Functional diversity in the dynamin family. *Trends in Cell Biology* **9**, 96-102.
- Van der Blik, A. M., Redelmeier, T. E., Damke, H., Tisdale, E. J., Meyerowitz, E. M., and Schmid, S. L.** (1993). Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *Journal of Cell Biology* **122**, 553-563.
- Van Haastert, P. J.** (1995). Transduction of the chemotactic cAMP signal across the plasma membrane of *Dictyostelium* cells. *Experientia* **51**, 1144-1154.
- Vogel, G.** (1983). *Dictyostelium discoideum* as a model system to study recognition mechanisms in phagocytosis. *Methods In Enzymology* **98**, 421-430.
- Vogel, G., Thilo, L., Schwarz, H., and Steinhart, R.** (1980). Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *Journal of Cell Biology* **86**, 456-465.

- von Heijne, G.** (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *Embo Journal* **5**, 1335-1342.
- Warnock, D. E., Baba, T., and Schmid, S. L.** (1997). Ubiquitously Expressed Dynamin-II has a higher intrinsic GTPase activity and a greater propensity for self-assembly than neuronal Dynamin-I. *Molecular Biology of the Cell* **8**, 2553-2562.
- Warnock, D. E., Hinshaw, J. E., and Schmid, S. L.** (1996). Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 22310-22314.
- Warnock, D. E. and Schmid, S. L.** (1996). Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. *Bioessays* **18**, 885-893.
- Warnock, D. E., Terlecky, L. J., and Schmid, S. L.** (1995). Dynamin GTPase is stimulated by crosslinking through the C-terminal proline-rich domain. *Embo Journal* **14**, 1322-1328.
- Watts, D. J. and Ashworth, J. M.** (1970). Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochemical Journal* **119**, 171-174.
- Wienke, D. C., Knetsch, M. L., Neuhaus, E. M., Reedy, M. C., and Manstein, D. J.** (1999). Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 225-243.
- Wienke, D. C.** (1998). Funktionelle Charakterisierung von Dynamin A aus *Dictyostelium discoideum*. *Dissertation an der Technischen Universität Darmstadt*.
- Wilsbach, K. and Payne, G. S.** (1993). Vps1p, a member of the dynamin GTPase family, is necessary for Golgi membrane protein retention in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Journal* **12**, 3049-3059.
- Wong, E. D., Wagner, J. A., Gorsich, S. W., McCaffery, J. M., Shaw, J. M., and Nunnari, J.** (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *Journal of Cell Biology* **151**, 341-352.
- Yaffe, M. P., Harata, D., Verde, F., Eddison, M., Toda, T., Nurse, and P.** (1996). Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11664-11668.
- Yang, W. and Cerione, R. A.** (1999). Endocytosis: Is dynamin a 'blue collar' or 'white collar' worker?. *Current Biology* **9**, R511-R514.
- Yeh, E., Driscoll, R., Coltrera, M., Olins, A., and Bloom, K.** (1991). A dynamin-like protein encoded by the yeast sporulation gene SPO15. *Nature* **349**, 713-715.
- Yoon, Y., Pitts, K. R., Dahan, S., and McNiven, M. A.** (1998). A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* **140**, 779-793.
- Yu, H., Chen, J. K., Feng, S., Dalgarno, D. C., Brauer, A. W., and Schreiber, S. L.** (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**, 933-945.

- Zhang, Z., Hong, Z., and Verma, D. P.** (2000). Phragmoplastin polymerizes into spiral coiled structures via intermolecular interaction of two self-assembly domains. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 8779-8784.
- Zheng, J., Cahill, S. M., Lemmon, M. A., Fushman, D., Schlessinger, J., and Cowburn, D.** (1996). Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *Journal of Molecular Biology* **255**, 14-21.

7 Publikationen und Präsentationen

Nöthe, H. B. und Manstein, D. J. (1998) Identification and Characterization of *Dictyostelium* Dynamin B, *Mol. Biol. Cell* **9**, 198A-198A Suppl.

Nöthe, H. B. und Manstein, D. J. (1999) Functional Characterization of *Dictyostelium* Dynamin B, *Mol. Biol. Cell* **10**, 314A-314A Suppl.,

Nöthe, H. B. und Manstein, D. J. Characterization of a *Dictyostelium* Dynamin-Homologue with a Mitochondrial Leader Sequence (Manuskript in Vorbereitung)

Posterpräsentationen

Nöthe, H. B. und Manstein, D. J. Identification and Characterization of *Dictyostelium* Dynamin B, *American Society for Cell Biology Annual Meeting*, San Francisco, USA; 12.-16. Dezember 1998

Nöthe, H. B. und Manstein, D. J. Identification and Characterization of a Second *Dictyostelium* Dynamin Homologue; *Joint ASCB / EMBO workshop: Membrane trafficking and the cytoskeleton: an integrated view*; Imbaro, Italien, 26.-30. Juni 1999

Nöthe, H. B. und Manstein, D. J. Functional Characterization of *Dictyostelium* Dynamin B; *American Society for Cell Biology Annual Meeting*, Washington, D.C., USA; 11.-15. Dezember 1999

Nöthe, H. B. und Manstein, D. J. Identification and Characterization of *Dictyostelium* Dynamin B, im Rahmen der Begutachtung des Graduiertenkollegs 388 „Biotechnologie-molekulare und biochemische Grundlagen“ seitens der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Heidelberg, 28.7.2000

Die Dynamin B-Sequenzen sind in den Datenbanken von GenBank und EMBL veröffentlicht und unter folgenden Zugangsnummern (*accession numbers*) abrufbar:

AJ251163 für die Nukleotidsequenz und Q9U1M9 für die Peptidsequenz

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A _{xxx}	Absorption bei einer Wellenlänge von xxx nm
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
C-terminal	carboxyterminal
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Fadenwurm)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
SAP	Alkalische Phosphatase aus Garnele
cDNA	komplementäre DNA (copy DNA)
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruchtfliege)
Da	Dalton (Einheit der relativen Atommasse)
DEAE	Diethylaminoethyl-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGTA	Ethylenbis-(oxyethylennitrilo)-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
<i>G. max</i>	<i>Glycinus max</i> (Sojabohne)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP _γ S	Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
GuSCN	Guanidiniumisothiocyanat

h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazinoethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
<i>K. aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
kBp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
mA	Milliampere
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
N-terminal	aminoterminal
NTS	aminoterminal Extension (<i>N-terminal targeting sequence</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
OD _{xxx}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]-dinatriumsalz
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Spaltheife)
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TBS	Trisgepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Alkylphenylpolyethylenglykol
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galactopyranosid
% (v/v)	Prozent (Volumen/Volumen)
% (w/v)	Prozent (Gewicht/Volumen)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wolfrum für die Betreuung der Doktorarbeit und für seine Förderung von interdisziplinärer Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Kenneth C. Holmes für die Betreuung der Doktorarbeit und die Bereitstellung der finanziellen und apparativen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Dietmar J. Manstein für die sehr interessante Themenstellung. Er ermöglichte mir, eine Vielzahl biologischer Methoden in seiner Arbeitsgruppe zu erlernen. Für sein entgegengebrachtes Vertrauen, seine fortwährende wissenschaftliche und menschliche Unterstützung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Wink und dem Graduiertenkolleg „Biotechnologie-molekulare und biochemische Grundlagen“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung und der Möglichkeit, an zahlreichen interessanten Workshops teilzunehmen.

Ganz herzlich danke ich meinen KollegInnen für die gute Zusammenarbeit und für das ausgezeichnete Arbeitsklima, zu dem sie alle beigetragen haben:

Sabine Zimmermann für ihre sehr gute und engagierte technische Unterstützung.

Dr. Dirk Wienke und Dr. Menno Knetsch für die Einführung in molekular- und zellbiologisches Arbeiten sowie für die „Einweihung in die Geheimnisse“ von *Dictyostelium discoideum*.

Boris Klockow, der stets ein angenehmer „Zimmergenosse“ war, für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Dr. Geraldina Santandrea für die immun-elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Irene Upmann und Dr. Muriel Erent für die hilfreichen Tips bei der Mikroskopie.

Dr. Setsuko Fujita-Becker, Ulrike Dürrwang, Thomas Reubold, Nicole Schäfers, Georgios Tsiavaliaris und Ursula Rühl für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und manche Denkanstöße, sowie den ehemaligen Kollegen Dr. Marcus Furch, Dr. Renu Batra und Bettina Rimmel, die mir das Einleben in den „biologischen“ Laboralltag angenehm gemacht haben.

der Arbeitsgruppe Dr. Jon F. Kull mit Hartmut Niemann und Martin Kollmar. Ihnen danke ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen anregenden Gespräche.

der Arbeitsgruppe Dr. Thierry Soldati, ehemalige Abteilung „Zellforschung“, für die hilfreichen Anregungen sowie für die Überlassung von Antikörpern. Insbesondere danke ich Heidi Geissler für die wertvollen Tips bei der Antikörperherstellung, Heinz Horstmann für elektronenmikroskopische Aufnahmen und Claudia Kistler für interessante Diskussionen.

allen MitarbeiterInnen der Abteilung Biophysik für das gute und freundschaftliche Arbeitsklima. Ein besonderer Dank an Anke Hennemann für ihr Engagement in organisatorischen Dingen.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern, die mich während des Studiums immer ermutigt und unterstützt haben.

Und Daniel - für die aufmunternden Worte und seine Freundschaft.

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Dissertation selbst verfaßt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Desweiteren erkläre ich hiermit, daß ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 21.01.2001