

Identifizierung und Charakterisierung
von β -COP in *Dictyostelium discoideum*

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

vorgelegt von
Martina R. Mohrs
aus Solingen
Köln, 2001

Berichtersteller:

Frau Prof. Dr. A. A. Noegel

Frau Priv. Doz. Dr. Sabine Waffenschmidt

Herr Prof. Dr. Michael Melkonian

Tag der mündlichen Prüfung:

Dezember 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1998 bis Juni 2001 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. A. A. Noegel am Biochemischen Institut I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.

*Für Fe
den Glücklichen*

und

*Meinen Eltern
in irdischer Abwesenheit*

INHALT	I
Abkürzungen	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus	1
1.2 Intrazelluläre Kompartimentierung - Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat	2
1.3 Intrazellulärer Transport	4
1.3.1 Clathrin und Caveolin bedeckte Transportvesikel	5
1.3.2 COPI und COPII Vesikel	6
1.4 Zielsetzung der Arbeit	9
2 MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Material	10
2.1.1 Plasmide	10
2.1.2 <i>D. discoideum</i> Transformanten	18
2.1.3 Bakterienstämme	18
2.1.4 Oligonukleotide	19
2.1.5 Labormaterialien	20
2.1.6 Geräte	20
2.1.7 Kits	21
2.1.8 Antibiotika	22
2.1.9 Enzyme	22
2.1.10 Inhibitoren	22
2.1.11 Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.12 Antikörper	23
2.1.13 Puffer und Lösungen	24
2.1.14 Kulturmedien	24
2.1.14.1 Bakterienmedien	25
2.1.14.2 Medien für <i>D. discoideum</i> Kulturen	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	26
2.2.1.1 Anzucht von <i>D. discoideum</i> in Flüssigkultur	26
2.2.1.2 Anzucht von <i>D. discoideum</i> auf Agarplatten	26

2.2.1.3	Transformation von <i>D. discoideum</i> durch Elektroporation	26
2.2.1.4	Einfrieren und Sporengewinnung zur Lagerung von <i>D. discoideum</i>	27
2.2.1.5	Entwicklung von <i>D. discoideum</i> in Suspensionskultur	27
2.2.1.6	Entwicklung von <i>D. discoideum</i> auf Phosphat-Agar-Platten	28
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.2.1	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	28
2.2.2.1.1	Erzeugung elektrokompeter <i>E. coli</i>	28
2.2.2.1.2	<i>E. coli</i> Transformation durch Elektroporation	28
2.2.2.1.3	Konservierung von <i>E. coli</i>	29
2.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im Mikromaßstab	29
2.2.2.2.1	„Boiling Methode“	29
2.2.2.2.2	Plasmidisolierung mit dem Macherey und Nagel-Kit	29
2.2.2.3	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> im Makromaßstab gemäß Macherey und Nagel	30
2.2.2.4	Präparation genomischer DNA aus <i>D. discoideum</i>	30
2.2.2.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>D. discoideum</i>	30
2.2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
2.2.2.7	Lagerung isolierter Nukleinsäuren	31
2.2.2.8	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	32
2.2.2.9	Southern-Blot-Analyse	32
2.2.2.10	Elektrophoretische Auftrennung von RNA	33
2.2.2.11	Northern-Blot-Analyse	34
2.2.2.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
2.2.2.13	Radioaktive Markierung von DNA mit dem Stratagene Prime [®] It II-Kit	34
2.2.2.14	Nachweis mit radioaktiv markierten Sonden	35
2.2.2.15	<i>In vitro</i> Rekombination von DNA	35
2.2.2.15.1	Restriktion von DNA	35
2.2.2.15.2	Auffüllreaktion einzelsträngiger DNA-5'-Enden	36
2.2.2.15.3	Dephosphorylierung von DNA-5'-Phosphatgruppen	36
2.2.2.15.4	Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.2.2.16	Polymerase-Kettenreaktion	37
2.2.2.17	Durchmusterung einer <i>D. discoideum</i> λ ZAP Phagenbibliothek	38
2.2.2.17.1	Herstellung von kompetenten XL1blue-Wirtszellen	38
2.2.2.17.2	Durchmusterung der Phagenbibliothek	38
2.2.3	Proteinchemische und immunologische Techniken	40
2.2.3.1	Peptidsynthese	40
2.2.3.2	Kopplung der synthetischen Peptide an das Trägerprotein Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) durch Glutaraldehyd	40
2.2.3.3	Herstellung monoklonaler Anti-Peptid-Antikörper	41

2.2.3.3.1	Immunisierung der Balb/C Mäuse	41
2.2.3.3.2	Herstellung von Hybridomazellen	41
2.2.3.3.3	Isolierung von Makrophagen	42
2.2.3.3.4	Test der Überstände mittels ELISA, Western-Blot und Immunfluoreszenz	43
2.2.3.3.5	Subklonierung von Hybridomazellen	44
2.2.3.3.6	Konservierung der Hybridomaklone	44
2.2.3.4	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel	45
2.2.3.5	Western-Blot-Analyse	45
2.2.3.6	Immunmarkierung von Western-Blots	46
2.2.3.7	Coomassie-Färbung	46
2.2.3.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	47
2.2.3.9	Western-Blot-Stripping	47
2.2.3.10	Herstellung eines „Protein-timecourse“	47
2.2.3.11	Phagosomenisolierung aus <i>D. discoideum</i>	48
2.2.3.12	Saccharosegradientfraktionierung von <i>D. discoideum</i> Proteinextrakten	48
2.2.3.13	Immunpräzipitation des GFP- β -COP Fusionsprotein unter Einfluß von GTP γ S und Aluminiumfluorid aus <i>D. discoideum</i> Extrakten	49
2.2.4	Zellbiologische Methoden	50
2.2.4.1	Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von <i>D. discoideum</i>	50
2.2.4.2	Fluoreszenzuntersuchungen an lebenden GFP- β -COP exprimierenden <i>D. discoideum</i> Zellen	51
2.2.4.3	Phagozytose von Hefezellen	51
2.2.4.4	DMSO-Behandlung von GFP- β -COP exprimierenden <i>D. discoideum</i> Zellen und Ax2-Zellen	52
2.2.4.5	Behandlung von <i>D. discoideum</i> Zellen mit Brefeldin A	52
2.2.4.6	Identifizierung der Mitochondrien mittels des MitoTrackers [®] in Immunfluoreszenzen	52
2.2.4.7	Hyper- und hypoosmotischer Schock	53
2.2.4.8	Fluoreszenzmikroskopie	53
3	ERGEBNISSE	54
3.1	Analyse des β-COP Gens	54
3.2	Analyse β-COP spezifischer RNA während des Entwicklungszyklus von <i>D. discoideum</i>	55
3.3	Sequenzvergleiche des β-COP Proteins in verschiedenen Organismen	56

3.4	Charakterisierung und Untersuchung von GFP-β-COP Fusionsprotein exprimierenden <i>D. discoideum</i> Zellen	57
3.4.1	Lokalisation des GFP- β -COP Fusionsproteins in lebenden Zellen	58
3.4.2	Das GFP- β -COP Fusionsprotein lokalisiert vorwiegend im Golgi-Apparat	59
3.4.3	Charakterisierung von unabhängigen GFP- β -COP exprimierenden <i>D. discoideum</i> Zelllinien auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene	63
3.4.4	Auswirkungen von Brefeldin A auf GFP- β -COP exprimierende <i>D. discoideum</i> Zellen	67
3.4.5	Auswirkung von DMSO auf die intrazelluläre Lokalisation von GFP- β -COP	68
3.4.6	Reaktion der intrazellulären GFP- β -COP Verteilung auf osmotische Veränderungen	70
3.4.7	Lokalisation des GFP- β -COP Proteins während der Phagozytose	74
3.4.8	Membraninteraktion des GFP- β -COP Proteins in Gegenwart von Aluminiumfluorid oder GTP γ S	77
3.4.9	GFP- β -COP exprimierende Zellen bilden in Schüttelkultur Zellaggregate	79
3.4.10	GFP- β -COP exprimierende Zellen zeigen einen verlangsamten Entwicklungszyklus	81
3.5	Herstellung monoklonaler anti-Peptid-β-COP-Antikörper	86
3.6	Versuch zur Generierung einer „knock-out“- und „knock-in“-Mutante sowie verschiedener GFP-β-COP Teilfusionen	90
3.7	Suche nach zusätzlichen β-COP Homologen in <i>D. discoideum</i>	92
3.8	Welche bekannten intrazellulären Transportwege können aufgrund von Sequenzhomologien in <i>D. discoideum</i> existieren?	94
4	DISKUSSION	96
4.1	β-COP in <i>D. discoideum</i>	96
4.2	Intrazelluläre Lokalisation des GFP-β-COP Fusionsproteins	97
4.2.1	Intrazelluläre Lokalisation des GFP- β -COP unter Brefeldin A Einwirkung	98
4.2.2	Intrazelluläre Umverteilung des GFP- β -COP unter DMSO Einwirkung	99
4.2.3	Osmotisch induzierte Rückverteilung des GFP- β -COP in das endoplasmatische Retikulum	100
4.2.4	Ist das GFP- β -COP Fusionsprotein an Phagosomen lokalisiert?	102

4.3	Genetische Charakterisierung der GFP-β-COP Zellen	104
4.3.1	Warum sind die GFP- β -COP exprimierenden Zellen im Entwicklungszyklus verlangsamt?	104
4.4	β-COP spezifische Antikörper gegen das <i>D. discoideum</i> β-COP Protein	105
4.5	Eine fehlende β-COP Expression könnte in <i>D. discoideum</i> letal sein	107
4.6	Perspektiven	108
5	ZUSAMMENFASSUNG	109
6	LITERATUR	111
7	ABSTRACT	124
	Erklärung	125
	Lebenslauf	126
	Danksagung	127

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bsr	Blasticidinresistenzgen
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA (revers von mRNA)
cfu	engl.: colony forming unit
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxiribonukleotid-5'-triphosphat
dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DTT	Dithiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNP	2,4-Dinitrophenol
E	Extinktion
E 64	trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether),N,N,N',N'-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma
g	Gramm
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: „green fluorescent protein“)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
hs	<i>Homo sapiens</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
<i>K. aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
kV	Kilovolt

k. i.	“knock-in”
k. o.	“knock-out”
M	Molar
Mb	Megabasen
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
Pfu	engl.: plaque forming unit
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rn	<i>Rattus norvegicus</i>
s.	siehe
sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T	Thymidin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
CFP	cyan fluoreszierendes Protein (engl.: „cyan shifted GFP protein“)
z. B.	zum Beispiel

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

1 Einleitung

1.1 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

Dictyostelium discoideum ist ein amöboid lebender Protist der Klasse der Acrasiomyceten. Er wurde erstmals 1935 von Raper beschrieben. Das 34 Mb große Genom enthält ca. 11.000 Gene, von denen viele homolog zu denen in höheren Eukaryonten sind und z. B. in *S. cerevisiae* fehlen. *D. discoideum* hat als eigenständiger Organismus weit vielfältigere Funktionen als die Einzelzellen eines Mehrzellers zu erfüllen. Aufgrund dieses Funktionsspektrums eignet er sich insbesondere zur Untersuchung grundlegender zellulärer Prozesse wie Zytokinese, Zellmotilität, Phagozytose, Endozytose, Chemotaxis, zellulärem Transport und Signaltransduktion sowie zur Untersuchung der Entwicklung und Zelldifferenzierung.

Die natürlicherweise im Waldboden lebende eukaryontische Amöbe ernährt sich durch Phagozytose von Bakterien und vermehrt sich durch einfache mitotische Zellteilung unbegrenzt. Der Entzug der Nahrungsquelle startet einen morphogenetischen Entwicklungs- und Differenzierungsprozeß (Abb. 1.1.1). Dabei sezernieren die Zellen cAMP als Chemoattraktans, das als Signal zur Koordination der Zellwanderungsbewegung dient und so die Aggregationsphase einleitet. In dieser lagern sich ca. 100.000 Zellen zu einem sog. Pseudoplasmodium zusammen. In der anschließenden Migrationsphase differenzieren die Zellen in prä-Stiel und prä-Sporzellen, was letztendlich in der Kulminationsphase mit der Ausbildung eines Fruchtkörpers endet. Die prä-Stielzellen differenzieren dabei zu einem sog. Sorophor und bilden die Achse des Fruchtkörpers, die prä-Sporzellen zu einem Sporenkopf an der Spitze, dem Sorokarp. Sowohl Sorophor als auch Sorokarp sind von einer Zellwand umgeben, in die zur Verstärkung Zellulose eingelagert ist. Die vom reifen Sorokarp ausgeschütteten Sporen können auskeimen und Amöben freisetzen und so einen neuen Zyklus starten. Die Zellen des Sorophors sterben ab. Diese einfache Form der Zelldifferenzierung läßt also bereits eine Segregation in generative und vegetative Funktionen erkennen.

Durch Mutationen freilebender Wildtypstämme läßt sich *D. discoideum* leicht unter Laborbedingungen in axenischen Medien kultivieren (Sussman und Sussman, 1969) und ist einem großen Spektrum molekularbiologischer und biochemischer Untersuchungsmöglichkeiten zugänglich.

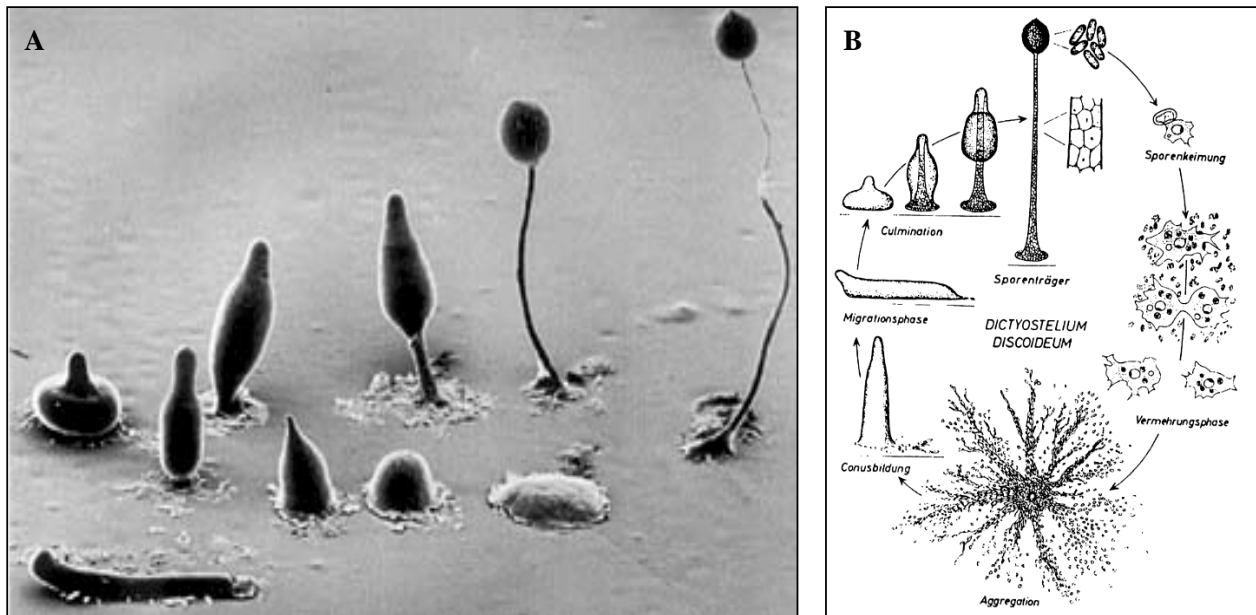


Abb. 1.1.1: REM Aufnahme und schematische Darstellung des *D. discoideum* Entwicklungszyklus. (A) nach Grimson und Blanton; (B) nach Gerisch, 1965.

1.2 Intrazelluläre Kompartimentierung - Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat

Im Gegensatz zu prokaryontischen Zellen, die aus einem intrazellulären Raum bestehen, sind eukaryontische Zellen durch verschiedene Membransysteme in funktionsspezifisch unterschiedliche Kompartimente unterteilt. Dadurch entstehen abgeschlossene intrazelluläre Reaktionsräume, Kompartimente bzw. Zellorganellen mit jeweils eigenen Charakteristika und Aufgaben. So sind eukaryontische Zellen in die subzellulären Hauptkompartimente Cytosol, Mitochondrien, rauhes und glattes endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Kern, Peroxisomen, Lysosomen und Endosomen unterteilt. Pflanzenzellen enthalten Plastiden wie z. B. Chloroplasten als zusätzliches Organell. Durch diese Zellkompartimentierung bedarf es eines komplexen intrazellulären Verteilungssystems, das spezifische Moleküle bzw. Verbindungen von einem Kompartiment zum anderen transportiert. Hierbei nehmen Signalpeptide innerhalb einer Proteinsequenz eine wichtige Rolle ein. Diese arbeiten als Sortiersignale und bestimmen so die Verteilung des jeweiligen Proteins zur richtigen zellulären Adresse, z. B. in den Kern, in die Mitochondrien, in das endoplasmatische Retikulum, zum Golgi-Apparat und in die Peroxisomen (Übersichtsartikel: Blobel, 2000). Generell sind drei unterschiedliche Transmembran-Transportprinzipien zu unterscheiden, in die diese Sortiersignale involviert sind (Bradshaw, 1989; Sabatini et al., 1982). Erstens existiert ein Schleusen-Transport z. B. durch die selektiven Kernporen-Komplexe. Er ist vom Transmembrantransport zu unterscheiden. Dieser bringt spezifische Proteine mittels membrangebundener Protein-Translokatoren

durch die Membran aus dem Cytosol in einen topologisch unterschiedlichen Raum wie z. B. die Mitochondrien. Zum dritten stehen die Kompartimente über Transportvesikel in Verbindung, die sich, beladen mit einer Molekülfracht, aus dem Lumen des Donor-Kompartiments von der Membran abschnüren und mit der Membran des Akzeptor-Kompartiments verschmelzen. Beim Vesikeltransport übernehmen endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat eine zentrale Rolle. Das endoplasmatische Retikulum (ER) bildet ein verbundenes Netz aus sich verzweigenden Röhren und abgeflachten Säckchen, das sich durch das gesamte Cytoplasma erstreckt. Es wird in rauhes ER, welches an der Membranoberfläche Ribosomen gebunden hat, und in glattes ER, das keine Ribosomen gebunden hat, unterteilt. Die Biosynthese der meisten Lipide und Proteine erfolgt an der cytosolischen Seite des ER. Das ER nimmt Proteine bereits während ihrer Biosynthese aus dem Cytosol auf. Je nach Lokalisationsort im ER wird zwischen Transmembranproteinen und lumenalen Proteinen unterschieden. Der SRP-Rezeptor, ein in die ER-Membran eingebettetes Transmembranprotein, ist an der Translokation der an den Ribosomen synthetisierten Proteine in das ER beteiligt. Dabei wird ein spezielles hydrophobes Signalpeptid innerhalb der wachsenden Polypeptidkette von einem Signalerkennungspartikel (SRP = „signal recognition particle“) erkannt, das dann das jeweilige Protein an den SRP-Rezeptor in der ER-Membran bindet und so den Translokationsprozeß ermöglicht (Simon, 1993). Die vollständig in das ER-Lumen transportierten lumenalen Proteine werden dann im ER gefaltet. Einige dieser Proteine sind ER ansässig und besitzen ein ER-Retentionssignal - z. B. KDEL in Säugerzellen und HDEL in Hefezellen (Pelham, 1991; Letourneur et al., 1994; Wieland und Harter, 1999; Barlowe, 2000). Dieses wird beim Transport in den Golgi-Apparat von einem vorwiegend im cis-Golgi lokalisierten KDEL- bzw. HDEL-Rezeptor erkannt und ist so für die Rückverteilung seines Liganden aus dem Golgi-Apparat über einen durch COPI Vesikel vermittelten retrograden Transport verantwortlich (Semenza et al., 1990; Pelham, 1991; Griffiths et al., 1994; Majoul, 2001). Eine weitere wichtige Aufgabe des ER ist die Modifizierung vieler im Lumen des ER befindlichen Proteine durch N-Glykosylierung (Hart, 1992). Dabei wird ein vorgefertigter Oligosaccharidkomplex mit 14 Zuckerresten bestehend aus N-Acetylglucosamin, Mannose und Glucose an die NH₂-Gruppe eines Asparaginrestes gebunden. Die meisten dieser lumenalen ER-Proteine werden in Transportvesikel verpackt und von dort zum Golgi-Apparat transportiert.

Der Golgi-Apparat befindet sich in der Nähe des Zellkerns und ist mit dem Centrosom assoziiert. Er besteht aus parallel angeordneten flachen Membranstapeln, den membranumhüllten Zisternen. Die Anzahl der Zisternen variiert mit dem Zelltyp. Jeder Golgi Stapel besitzt eine Polarität und wird in eine dem ER zugewandten cis- oder Bildungsseite und eine dem Cytoplasma zugewandten trans- oder Reifungsseite unterteilt. Diese beiden Kompartimente sind durch ein Netzwerk von Zisternen miteinander verbunden, dem medialen Golgi-Kompartiment (Griffiths und Simons, 1986; Driouich et

al., 1993). Korrekt gefaltete Proteine werden aus dem ER in besonderen Transportvesikeln an das cis-Golgi-Kompartiment weitergegeben, ER-ansässige Proteine aber wie bereits erwähnt zurückgebracht. Von dort aus wandern die nicht ER-ansässigen Proteine durch das mediale Golgi-Kompartiment in das trans-Golgi-Kompartiment. Hier werden die Proteine an ihren endgültigen Bestimmungsort verschickt wie z. B. zu den Endosomen, Lysosomen und zur Plasmamembran transportiert sowie in sekretorische Vesikel verpackt. Alle diese Transportschritte werden von speziellen Transportvesikeln durchgeführt, die nach Abschnürung von der Donor-Membran mit einer Akzeptor-Membran verschmelzen. Der Golgi-Apparat besitzt aber nicht nur Sortier- und Verteilerfunktion, sondern ist auch Hauptsyntheseort vieler Kohlenhydrate, die u. a. zur weiteren Modifizierung von Proteinen durch Glykosylierung genutzt werden. Die im ER erfolgten N-Glykosylierungen werden im Golgi-Apparat weiter modifiziert oder es werden zusätzliche O-Glykosylierungen von Proteinen eingefügt. Zusätzlich können Proteine im Golgi proteolytisch prozessiert, angehangene Zucker phosphoryliert oder Tyrosinreste sulfatiert werden. Dabei übernehmen die aufeinanderfolgenden Zisternen von cis- in trans-Richtung distinkte Aufgaben (Zhang und Staehlin, 1992). Die für die jeweiligen Modifikationen benötigten Enzyme sind auf die jeweiligen Golgi-Kompartimente beschränkt (Pugsley, 1989).

1.3 Intrazellulärer Transport

Für den intrazellulären Transport sind zwei Modelle vorgeschlagen worden: Zum einen das zisterne Reifungsmodell, zum anderen das Vesikeltransportmodell (Melkonian et al., 1991; Becker et al., 1995; Mironov et al., 1997; Kirchhausen, 2000). Hier wird ausschließlich auf den Vesikeltransport eingegangen, der den intrazellulären Transport zwischen unterschiedlichen Zellkompartimenten durch verschiedene mit einem Proteinmantel bedeckte spezifische Transportvesikel vermittelt. Diese schnüren sich von der Membran eines Donor-Kompartiments ab und verschmelzen mit der Membran eines Akzeptor-Kompartiments. Der intrazelluläre Bestimmungsort hängt von der Art der Vesikeloberflächenproteine und den korrespondierenden Rezeptoren des Zielkompartiments ab, sowie von der Beteiligung verschiedener löslicher Komponenten wie kleiner GTP-bindender Proteine (Goud und McCaffrey, 1991; Zerial und Stenmark, 1993, Pepperkok et al., 2000). Heute werden hauptsächlich vier Typen Protein bedeckter Vesikel, „coated“ Vesikel, unterschieden: Clathrin, Caveolin, COPI und COPII bedeckte Vesikel. Die Assemblierung der Vesikelhülle scheint einem generellen Mechanismus zu folgen: Er wird von der Rekrutierung eines GTPase Proteins in der GTP-gebundenen Form initiiert. Die darauffolgende Bindung eines heterooligomeren Proteinkomplexes an die Donormembran führt zur Deformation der Membran und Bildung einer umhüllten Vesikelknospe.

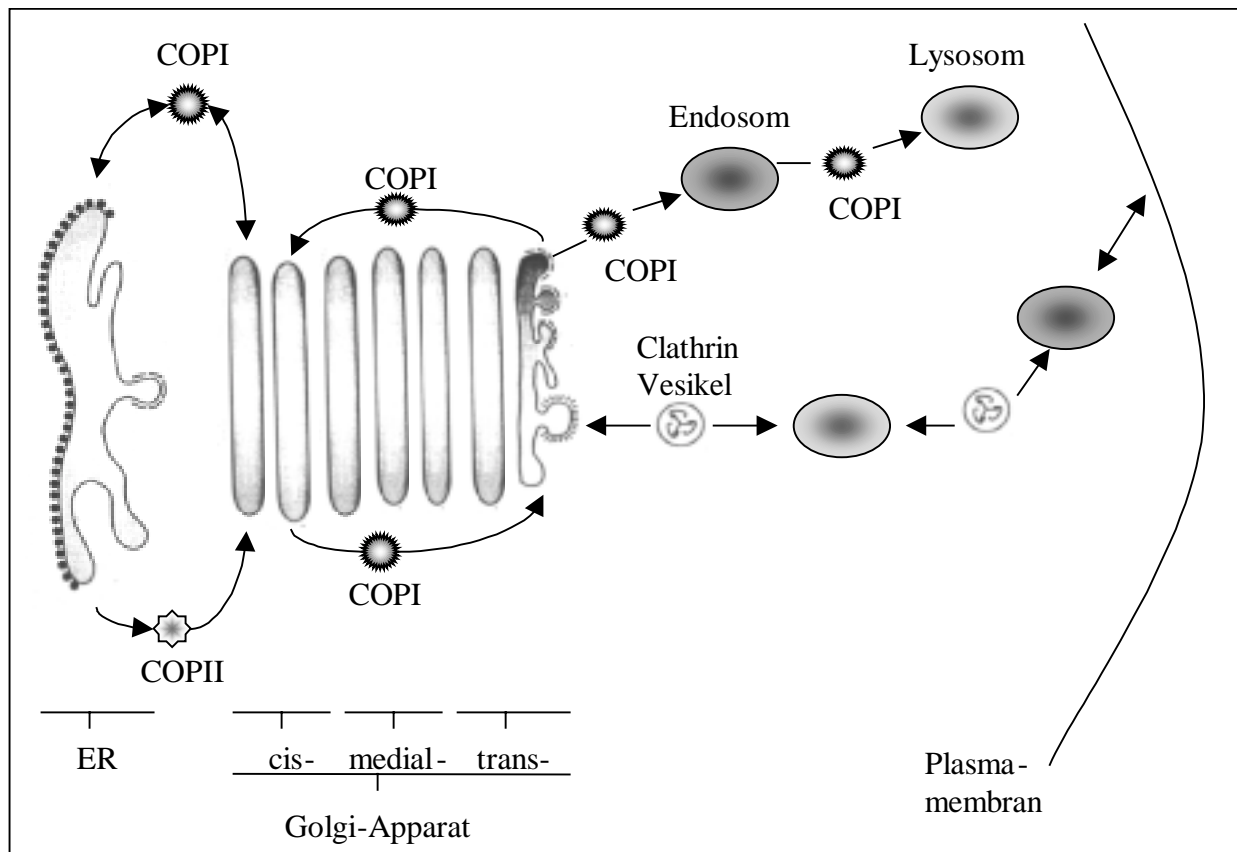


Abb. 1.3.1: Intrazellulärer Vesikeltransport durch Clathrin, COPI und COPII bedeckte Vesikel.

1.3.1 Clathrin und Caveolin bedeckte Transportvesikel

Die ersten beschriebenen „coated“ Vesikel waren die Clathrin bedeckten Vesikel (Pearse, 1976). Zwei oligomere Proteinkomplexe bilden die Oberfläche der Clathrin bedeckten Vesikel, der Clathrin Proteinkomplex selbst, der aus drei großen und drei kleinen Polypeptidketten zusammen ein dreiarmliges sog. *Triskelion* bildet und die heterotetrameren Adaptorkomplexe AP-1 und AP-2, die im trans-Golgi-Kompartiment bzw. in der Plasmamembran lokalisiert sind (Übersichtsartikel: Kirchhausen, 2000). Die Clathrin bedeckten Vesikel, die am trans-Golgi gebildet werden, beinhalten den AP-1 Adaptorkomplex, wogegen die an der Plasmamembran gebildeten den AP-2 Adaptorkomplex beinhalten. Dementsprechend sind sie am Transport vom trans-Golgi-Kompartiment über Endosomen zur Plasmamembran und an der Rezeptor vermittelten Endozytose extrazellulärer Liganden an der Plasmamembran beteiligt.

Ein in jüngerer Zeit diskutierter Clathrin unabhängiger aber bisher wenig charakterisierter Vesikeltransportweg ist der durch Caveolin vermittelte Weg (Rothberg et al., 1992). Dabei bilden sich an der Plasmamembran Einstülpungen, sog. Caveolen, die sich als Caveolin bedeckte Vesikel von der Plasmamembran abschnüren und u. a. am Cholesterintransport beteiligt sind (Übersichtsartikel: Schlegel und Lisanti, 2001).

1.3.2 COPI und COPII Vesikel

Coatomeer bedeckte Vesikel stellen eine weitere Klasse dar, die sich in COPI und COPII bedeckte Vesikel unterteilen lässt. COPII bedeckte Vesikel sind vorwiegend in den anterograden Transport neu synthetisierter Proteine aus speziellen ER-Regionen zum Golgi-Apparat involviert (Springer et al., 1999; Barlowe, 2000). Die Hülle dieser COPII bedeckten Vesikel besteht aus fünf cytosolischen Proteinkomponenten, dem kleinen GTP-bindenden Protein Sar1, dem Sec23-Sec24 Komplex und dem Sec13-Sec31 Komplex (Barlowe et al., 1994). Sec12, ein GTP-Austauschfaktor für Sar1, sowie das Sec16 Membranprotein sind ebenfalls zur korrekten Verschickung und Membranfusion COPII bedeckter Vesikel notwendig (Barlowe und Schekman, 1993).

Die Hülle der COPI bedeckten Vesikel wird aus einem heptameren 700-800 kDa großen Proteinkomplex gebildet: α -COP, β -COP, β' -COP, δ -COP, ϵ -COP, γ -COP und ζ -COP sowie dem ras-ähnlichen GTP-bindenden ARF1 Protein (ADP-Ribosylierungsfaktor) (Malhotra et al., 1989; Waters et al., 1991; Serafini et al., 1991). Interessanterweise zeigen einige der COP Untereinheiten Homologien in der Proteinsequenz zu den Adaptinen der Clathrin Vesikel, β -COP mit β/β' -Adaptin (Duden et al., 1991), δ -COP mit μ -Adaptin (Faulstich et al., 1996) und ζ -COP mit σ -Adaptin (Kuge et al., 1993). α - und β' -COP besitzen mehrere WD-40 Wiederholungen als gemeinsames Strukturmotiv (Neer et al., 1994). Dieses Motiv wurde zuerst in den β -Untereinheiten trimerer G-Proteine charakterisiert.

Im Vergleich zu den COPII bedeckten Vesikeln scheinen COPI bedeckte Vesikel in komplexere und vielfältigere Transportwege involviert zu sein. Bisherige Untersuchungen weisen auf eine Funktion im anterograden und retrograden Transport zwischen ER und Golgi-Apparat sowie im intra-Golgi Transport hin. Die Beteiligung der COPI Vesikel am retrograden Transport konnte an der Rückverteilung von ER-ansässigen Proteinen aus dem Golgi gezeigt werden, die ein ER-Rückholsignal (KKXX) aufweisen (Cosson und Letourneur, 1994; Letourneur et al., 1994; Harter et al., 1996) und Orci et al. (1997) konnten eine Beteiligung am intra-Golgi Transport nachweisen. Die COPI-Komponenten β -, β' -COP und γ -COP wurden als essentielle Proteine für den anterograden Transport zwischen ER und Golgi identifiziert (Hosobuchi et al., 1992; Pepperkok et al., 1993; Peter et al., 1993; Duden et al., 1994; Aridor et al., 1995; Bednarek et al., 1995). β -COP Antikörper hemmen *in vitro* und *in vivo* den anterograden Vesikeltransport zwischen ER und Golgi-Apparat (Pepperkok et al., 1993; Peter et al., 1993), und in Hefemutanten, in denen die β -COP Expression fehlt, akkumulieren sekretorische Proteine im ER (Duden et al., 1994). In temperatursensitiven β' -COP bzw. γ -COP Hefemutanten wurde ebenfalls ein Defekt im Transport vom ER zum Golgi beschrieben (Hosobuchi et al., 1992; Duden et al., 1994). In Gegenwart von GTP γ S bindet COPI an

Endosomen, weshalb eine Beteiligung am endosomalen Transport angenommen wird (Whitney, et al., 1995; Aniento et al., 1996). Die Notwendigkeit von ϵ -COP für den Transport von frühen zu späten Endosomen bestätigt dies (Gu et al., 1997). Untersuchungen von Piguet et al. (1999) bestätigen nicht nur die Beteiligung von β -COP am endosomalen Transport sondern weisen auch auf eine Funktion beim Sortierungsprozeß hin. β -COP erkennt spezifisch ein di-azides Dipeptid (QQ) in Endosomen, das als Signalpeptid zum Transport zu den Lysosomen gilt. In jüngster Zeit wird sogar eine Beteiligung von COPI an der peroxisomalen Vesikelbildung diskutiert. Einerseits gibt es Anhaltspunkte für die spezifische Bindung von ARF1 und COPI an Peroxisomen (Anton et al., 2000), andererseits werden peroxisomale Membranproteine trotz der Einwirkung von COPI Vesikeltransportinhibitoren zu den Peroxisomen transportiert (Voorn-Brouwer et al., 2001).

Biochemische Analysen zeigen, daß die COPI Hülle *en bloc* aus cytosolischen Subkomplexen an die Golgi-Membranen rekrutiert wird (Hara-Kuge et al., 1994). Mit „Two-Hybrid“-Analysen wurden vier interagierende Untereinheiten der COPI Hülle identifiziert (Faulstich et al., 1996): β -/ δ -COP, γ -/ ζ -COP, α -/ ϵ -COP und α -/ β' -COP. *In vitro* zerfällt die COPI Hülle durch hohe Salzkonzentrationen in zwei Subkomplexe, die jeweils noch Teilfunktionen besitzen (Cosson und Letourneur, 1994; Lowe und Kreis, 1995; Fiedler et al., 1996; Pavel et al., 1998). Unter diesen Bedingungen entsteht ein stabiler α - β - ϵ -Subkomplex der mit KKXX Motiven interagiert (Cosson und Letourneur, 1994; Lowe und Kreis, 1995). Weiterhin entsteht ein β -, γ -, δ -, ζ -Subkomplex (Fiedler et al., 1996), der wiederum in zwei stabile Heterodimere zerfallen kann, die aus β -/ δ -COP und γ -/ ζ -COP bestehen (Lowe und Kreis, 1995; Pavel et al., 1998). Das β -/ δ -COP Heterodimer kann in einer von ARF1- und GTP-abhängigen Weise an Golgi-Membranen binden. Die interne Domänenstruktur der beiden Subkomplexe ist bisher unbekannt.

Die molekularen Mechanismen, die der Vesikelbildung zugrunde liegen, sind in Teilen bekannt (Abb.1.3.2). Der Austausch von GDP gegen GTP im cytosolischen ARF1 Protein führt über einen Myristoylrest zur Verankerung in der Golgi-Membran (Franco et al., 1993) und leitet so die Assemblierung der COPI Hülle an Golgi-Membranen ein. Die geringe intrinsische GTPase Aktivität des ARF1 wird durch ein GTPase aktivierendes Protein (ARF1-GAP) und durch einen GTP Austausch Faktor (ARF1-GEF) verstärkt (Dogic et al., 1999; Poon et al., 1999; Jackson und Casanova, 2000; Peyroche et al., 2001). Es wird angenommen, daß die GTP-Hydrolyse im ARF1 eine Rolle als Zeitschalter in der kinetischen Regulation der COPI Vesikel spielt (Goldberg, 1999). Das aktivierte ARF1 Protein erlaubt dann die Rekrutierung der COPI Untereinheiten, führt zur Deformation der Membran, Knospung von COPI Vesikeln und Rekrutierung der Frachtmoleküle (Rothman und Wieland, 1996). Die Hydrolyse des durch ARF1 gebundenen GTP zu GDP führt zur Dissoziation der COPI Vesikel (Tanigawa et al., 1993).

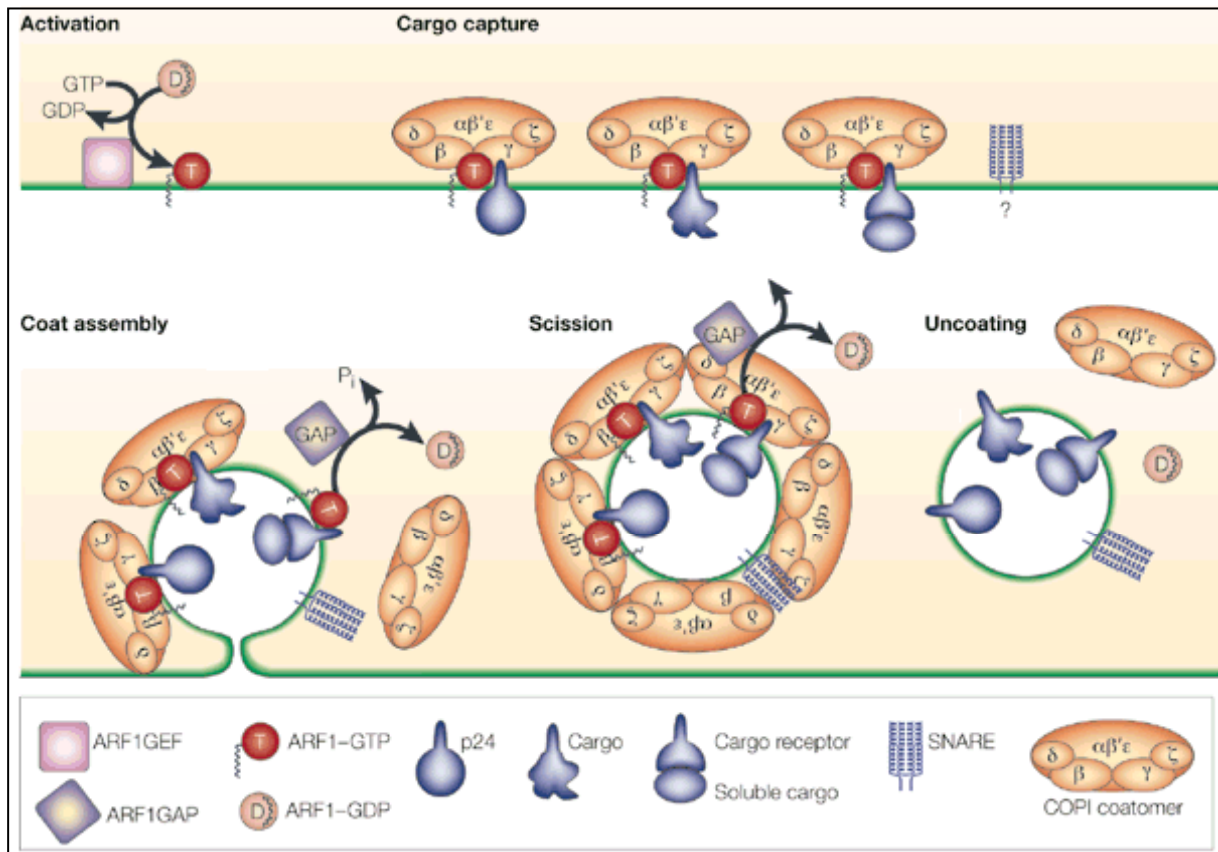


Abb. 1.3.2: Schematische Darstellung der COPI Vesikelbildung (aus Kirchhausen, 2000). Durch die Membran-Rekrutierung des ARF1-GTP wird die Assemblierung der COPI Hülle eingeleitet. Dies erlaubt die nachfolgende Rekrutierung der COPI Komponenten und der Frachtmoleküle. Die Membrandeformation passiert gleichzeitig mit der Rekrutierung der COPI Komponenten. Mit Vervollständigung der Hülle werden die COPI Vesikel abgeschnürt. Die Inaktivierung des ARF1 zu ARF1-GDP führt zur Dissoziation der COPI Vesikel. ARF1-GEF und ARF1-GAP beeinflussen die GTP-Bindung bzw. Hydrolyse und spielen eine Rolle als Zeitschalter in der kinetischen Kontrolle der COPI Vesikel.

Im Falle von β -COP, γ -COP und ϵ -COP konnte eine direkte Bindung an ARF1 gezeigt werden, γ - und β' -COP interagieren dagegen mit ARF1-GAP (Zhao et al., 1997; Pavel et al., 1998; Eugster et al., 2000). γ -COP bindet zusätzlich an p23/24, die zu einer integralen Typ I Rezeptorfamilie gehören und als mögliche Rezeptoren für COPI Vesikel diskutiert werden. p24 und γ -COP scheinen auch für die Frachterkennung mitverantwortlich zu sein (Harter et al., 1996; Harter und Wieland, 1998; Dominguez et al., 1998). Der bereits erwähnte KDEL-Rezeptor spielt ebenfalls eine Rolle, er interagiert mit β -COP und p23/24. p23 und p24 interagieren wiederum mit ARF1 bzw. nur ARF1-GAP (Majoul et al., 2001). In Hefe hat allerdings die Ausschaltung der acht für p24 Proteine kodierenden Gene keine Effekte, wogegen Mäuse mit einer Inaktivierung des p23 Gens bereits in der frühen Embryogenese sterben (Springer et al., 2000; Denzel et al., 2000). Eine besondere Subpopulation der Phospholipase D, die aus Golgi-Membranen gereinigt wurde, scheint auch in die Bildung von COPI Vesikeln involviert zu sein (Ktistakis et al., 1996). Sie katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylcholin zu Cholin und

Phosphorsäure, kann so zur Membrandeformation beitragen und erhöht die Konzentration des „Second Messenger“ Diacylglycerol (Bi et al., 1997; Zimmerberg, 2000). ARF konnte als ein cytosolischer Faktor zur Aktivierung der Phospholipase D identifiziert werden (Brown et al., 1993; Cockcroft et al., 1994).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Innerhalb einer Zelle gibt es verschiedene Transportvesikel, die je nach ihrer spezifischen Proteinhülle in Clathrin, Caveolin, COPII und COPI Vesikel unterteilt werden. Die COPI vermittelten Transportprozesse zwischen ER und Golgi-Apparat wurden in Hefemutanten und Säugerzellen bereits intensiv untersucht, in *D. discoideum* wurden sie bisher nicht charakterisiert.

Zu Beginn dieser Arbeit waren Homologe der COPI Komponente β -COP nur aus *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* und Säugern bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung des β -COP Homologs in *D. discoideum*. Zur zellbiologischen Charakterisierung und Analyse von Transportprozessen sollten ein GFP- β -COP Fusionsprotein und spezifische β -COP Antikörper eingesetzt werden. Die Fusion von Proteinen mit GFP ist in *D. discoideum* eine für die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation erfolgreich angewandte Methode.

Zur weiteren Charakterisierung des β -COP Proteins sollten verkürzte GFP- β -COP Teilfusionen eingesetzt werden, die Aufschluß über die Funktionen der β -COP Domänen geben könnten. Die Herstellung einer *D. discoideum* Mutante, in der die Expression des β -COP Proteins beeinträchtigt ist, sollte zur Analyse der durch COPI vermittelten Transportprozesse beitragen.

Mit Ausnahme von Comitín, einem F-Aktin- und Membran-assoziierten Protein, stehen in *D. discoideum* keine Golgi-Marker zur Verfügung. Darum war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Etablierung des GFP- β -COP Fusionsproteins als neuer Golgi-Marker, der im Gegensatz zu Comitín die Untersuchung des dynamischen Golgi-Apparates in *in vivo* Zellstudien ermöglicht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Plasmide

pBluescript[®] II SK⁻ (*Stratagene*)

Dieser Phagemid Vektor ist ein pUC19-Derivat mit einer Größe von 2,9 kb. Es ist ein bakterieller Klonierungsvektor mit einer hohen Kopienzahl, der den transformierten Zellen eine Ampicillinresistenz vermittelt. Außerdem ermöglicht er eine Blau-Weiß-Selektion, da der Polylinker in die LacZ-Region inseriert ist. Er ist Grundlage für alle in dieser Arbeit entwickelten Expressionsvektoren für *D. discoideum*.

pCR[™]2.1 (*Invitrogen*)

Der 3,9 kb große Klonierungsvektor pCR[™]2.1 des TA Cloning[®] Kits ermöglicht eine Einschritt-Klonierung zur Inserierung von PCR-Produkten. Er nutzt die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase einfache Adenosinüberhänge an die 3'-Enden von PCR-Produkte anzuhängen. Der linearisierte pCR[™]2.1 Vektor besitzt einen einfachen 3' Thymidin-Überhang, so daß sich PCR-Produkte leicht ligieren lassen. Damit transformierte Bakterien zeigen Ampicillinresistenz und ermöglichen eine Blau-Weiß-Selektion.

pGem Teasy[®] (*Promega*)

Das Ligationsprinzip des Klonierungsvektors dieses Vektor Kits entspricht dem des pCR[™]2.1 Vektor. pGem Teasy[®] besitzt auch einen einfachen 3' Desoxythymidin-Überhang, so daß sich PCR-Produkte leicht klonieren lassen. Damit transformierte Bakterien zeigen ebenfalls Ampicillinresistenz und ermöglichen eine Blau-Weiß-Selektion.

pB-β-COP 20 (Mohrs et al., 2000)

Dieses Plasmid trägt in der EcoRI-Schnittstelle des pBluescript[®] die vollständige („full-length“) cDNA für β-COP einschließlich Start- und Stopcodon. Alle in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten PCR-Produkte des β-COP, wurden mit diesem Plasmid hergestellt.

pUC-BsrΔBamHI (Adachi et al., 1994)

Dieser auf pUC118 basierende Vektor enthält als XbaI/HindIII-Fragment die 1,4 kb große vollständige Blasticidinresistenzkassette aus pBsr2 (Sutoh, 1993). Die BamHI-Schnittstelle im Bsr-Gen wurde durch einen einfachen Basenaustausch deletiert.

pBsr-GFP (Mohrs et al., 2000) (Abb. 2.1.1)

Dieser *D. discoideum* Transformationsvektor erlaubt die Expression N-terminaler Fusionen eines beliebigen Proteins mit GFP. Die Expression steht unter der Kontrolle des Aktin-15-Promotors. Als Selektionsmarker für *D. discoideum* trägt der Vektor eine Blasticidinresistenzkassette unter der Kontrolle des Aktin-6-Promotors. Die Termination wird durch einen Aktin-8-Terminator vermittelt, der die benötigten Terminationssequenzen für das Fusionsprotein stellt. Zur Selektion und Vermehrung in Bakterien trägt er ein Ampicillinresistenzgen.

Für die Herstellung des Vektors wurde zunächst die Blasticidinresistenzkassette als XbaI/HindIII-Fragment aus pUC-BsrΔBamHI (Adachi et al., 1994) isoliert, die 5'-Überhänge aufgefüllt und in pBluescript® ligiert. pBluescript® wurde zuvor mit Acc65I, dem Isoschizomer von KpnI, geschnitten und die überhängenden 5'-Enden aufgefüllt. Nun wurde die Aktin-15-Promotor GFP-Kassette als BglII/EcoRI-Fragment aus pDex-GFP (Westphal et al., 1997) isoliert, der durch EcoRI produzierte 5'-Überhang wurde aufgefüllt, und in den BamHI/SmaI geschnittenen pBluescript® kloniert, der die Blasticidinkassette trägt. Der Vektor pBsr-GFP besitzt eine Größe von ca. 5,8 kb.

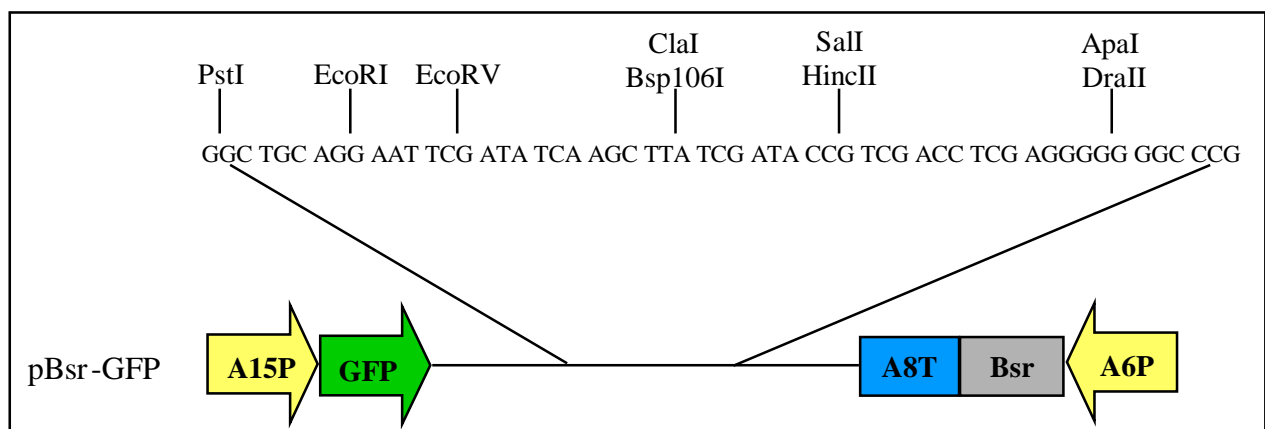


Abb. 2.1.1: Schema des pBsr-GFP Transformationsvektors für *D. discoideum* zur Expression N-terminaler Protein-GFP-Fusionen mit den zur Verfügung stehenden Klonierstellen

A15P:	Aktin-15-Promotor	A6P:	Aktin-6-Promotor
Bsr:	Blasticidinresistenzgen	GFP:	„Green-fluorescent-protein“-Gen
A8T:	A8Tandem Terminationssequenz		

pDex-GFP 79 und 27 (Westphal et al., 1997)

Der Expressionsvektor pDex-GFP 79 erlaubt die Expression N-terminaler GFP-Proteinfusionen, der Expressionsvektor pDex-GFP 27 die Expression C-terminaler GFP-Proteinfusionen. Dabei wird das jeweilige Fusionsprotein unter der Kontrolle des Aktin-15-Promotors exprimiert. Als Selektionsmarker trägt der Vektor eine Geneticinresistenzkassette unter der Kontrolle des Aktin-8-Promotors. Der Vektor pDex-GFP 27 besitzt im Gegensatz zu pDex-GFP 79 ein Stopcodon am Ende der GFP-Sequenz.

pBsr-GFP- β -COP (Mohrs et al., 2000) (Abb. 2.1.2)

Dieser Vektor ermöglicht die Expression eines GFP- β -COP Fusionsproteins in *D. discoideum*. Eine durch PCR gewonnene „full-length“ β -COP cDNA mit einer angehangenen PstI und SalI-Schnittstelle, die ein TAA-Stopcodon enthält, wurde als PstI/SalI-Fragment aus dem pCR2.1 Vektor isoliert und als PstI/SalI-Fragment in den pBsr-GFP Expressionsvektor kloniert (Oligonukleotide COP1 PstI, COP2738 SalI). So ist das GFP-Protein mit seinem C-terminalen Ende an den N-Terminus des β -COP-Proteins fusioniert.

pDex-GFP- β -COP (Abb. 2.1.2)

Dieser *D. discoideum* Transformationsvektors sollte die Expression einer C-terminalen Proteinfusion des „full-length“ β -COP an GFP ermöglichen. Dafür wurde in den EcoRI/HindIII geschnittenen pDex-GFP 79, ein GFP- β -COP XbaI/SalI Fragment, nach Auffüllung der jeweiligen 5'-Überhänge aus pBsr-GFP- β -COP k.i. (s. entsprechender Vektor) kloniert.

pBsr-GFP-N- β -COP (Abb. 2.1.2)

Zur Fusion des konservierten N-terminalen Bereichs von β -COP an GFP wurde ein PCR Produkt mit einer angehangenen PstI und SalI-Schnittstelle und Stopcodon hergestellt, das die Nukleotidsequenzen von 1-1396 der β -COP cDNA umfaßt (Oligonukleotide COP1 PstI, COP1396revSTOP SalI). Dieses PCR-Produkt wurde in pGem Teasy[®] zwischenkloniert, als PstI/SalI-Fragment isoliert und in den PstI/SalI geschnittenen pBsr-GFP Expressionsvektor kloniert.

pBsr-GFP-CP- β -COP (Abb. 2.1.2)

Zur Fusion des schwach konservierten mittleren Bereichs von β -COP an GFP wurde ein PCR Produkt mit einer angehangenen PstI und SalI-Schnittstelle und Stopcodon hergestellt, das die Nukleotidsequenzen von 1397-2010 der β -COP cDNA umfaßt (Oligonukleotide COP1397 PstI, COP2010revSTOP SalI). Dieses PCR-Produkt wurde in pGem Teasy[®] zwischenkloniert, als PstI/SalI-Fragment isoliert und in den PstI/SalI geschnittenen pBsr-GFP Expressionsvektor kloniert.

pBsr-GFP-C- β -COP (Abb. 2.1.2)

Zur Fusion des konservierten C-terminalen Bereichs von β -COP an GFP wurde ein PCR Produkt mit einer angehangenen PstI und SalI-Schnittstelle und Stopcodon hergestellt, das die Nukleotidsequenzen von 2010-2738 der β -COP cDNA umfaßt (Oligonukleotide COP2010 PstI, COP2738 SalI). Dieses PCR-Produkt wurde in pGem Teasy[®] zwischenkloniert, als PstI/SalI-Fragment isoliert und in den PstI/SalI geschnittenen pBsr-GFP Expressionsvektor kloniert.

pBsr-GFP- β -COP Δ N (Abb. 2.1.2)

Zur Herstellung eines *D. discoideum* Transformationsvektors, der die Expression eines GFP- β -COP Proteins erlaubt, indem der N-terminale Bereich von β -COP deletiert ist, wurde zunächst ein PCR-Produkt in pGem Teasy[®] zwischenkloniert, das die Nukleotidsequenzen der Positionen 1397-2738 der β -COP cDNA umfaßt (Oligonukleotide COP1397 PstI, COP2738 SalI). Das PCR-Produkt wurde als PstI/SalI-Fragment mit einem Stopcodon amplifiziert. Dieses 1,4 kb große PCR-Produkt wurde als PstI/SalI-Fragment in den PstI/SalI geschnittenen pBsr-GFP Expressionsvektor kloniert.

pBsr-GFP- β -COP Δ CP (Abb. 2.1.2)

Dieser Vektor sollte die Expression eines GFP- β -COP Fusionsproteins unter der Kontrolle des Aktin-15-Promotors in *D. discoideum* Zellen erlauben, indem der schwach konservierte mittlere Bereich des β -COP Proteins deletiert und durch GFP ersetzt wurde. Zunächst wurden dafür zwei PCR-Produkte der β -COP cDNA amplifiziert und in pGem Teasy[®] zwischenkloniert. Das 1,4 kb große PCR-Produkt umfaßt die Nukleotidsequenzen der Positionen 1-1396 und angehangener PstI-Schnittstelle und stellt damit den N-terminalen Bereich dar (Oligonukleotide COP1 PstI/2, COP1396rev PstI/2), das 0,7 kb große PCR-Produkt umfaßt die Nukleotidsequenzen der Positionen 2011-2738 und angehangener SallI-Schnittstelle und stellt den C-terminalen Bereich dar (Oligonukleotide COP2011 SallI, COP2738 SallI). Weiterhin mußte ein *D. discoideum* Transformationsvektor vorbereitet werden, der die Blasticidinresistenzkassette sowie den Aktin-15-Promotor unabhängig von der GFP-Sequenz trägt. So ist eine Inserierung von beliebigen DNA-Stücken zwischen Aktin-15-Promotor und GFP-Sequenz möglich, sowie eine Inserierung hinter der GFP-Sequenz. Dafür wurde der Aktin-15-Promotor als BglII/HindIII-Fragment aus pDex-GFP 79 isoliert, der 5' Überhang der HindIII-Schnittstelle aufgefüllt und so gerichtet in den pBluescript[®] kloniert, der die Blasticidinresistenzkassette trägt (s. Klonierung für pBsr-GFP). Anschließend wurde in dieses HindIII geschnittene Klonierungszwischenprodukt, die GFP-Sequenz ohne Stopcodon als HindIII-Fragment aus pDex-GFP 79 ligiert. Dieses weitere Zwischenprodukt wurde mit PstI geschnitten und das N-terminale PCR-Produkt als PstI-Fragment kloniert. Dieses letzte Zwischenprodukt wurde mit SallI linearisiert und das C-terminale PCR-Produkt als SallI-Fragment ligiert.

pBsr-GFP- β -COP Δ C (Abb. 2.1.2)

pBsr-GFP- β -COP Δ C soll die konstitutive Expression eines GFP- β -COP Fusionsprotein erlauben, in dem der C-terminale Bereich von β -COP deletiert ist. Zum einen wurde dafür ein PCR-Produkt mit angehangenen PstI-Schnittstellen, das die Nukleotidsequenzen der Positionen 1-2010 der β -COP cDNA umfaßt in pGem Teasy[®] zwischenkloniert (Oligonukleotide COP1 PstI, COP2010rev PstI). Zum anderen wurde dafür in den pBluescript[®] Vektor, der die Blasticidinresistenzkassette sowie den Aktin-15-Promotor trägt, die GFP-Sequenz mit Stopcodon als HindIII-Fragment aus pDex-GFP 27 in das HindIII geschnittene Klonierungszwischenprodukt ligiert. Dieses Ligationsprodukt wurde mit PstI geschnitten und das PCR-Produkt Position 1-2010 als PstI-Fragment kloniert.

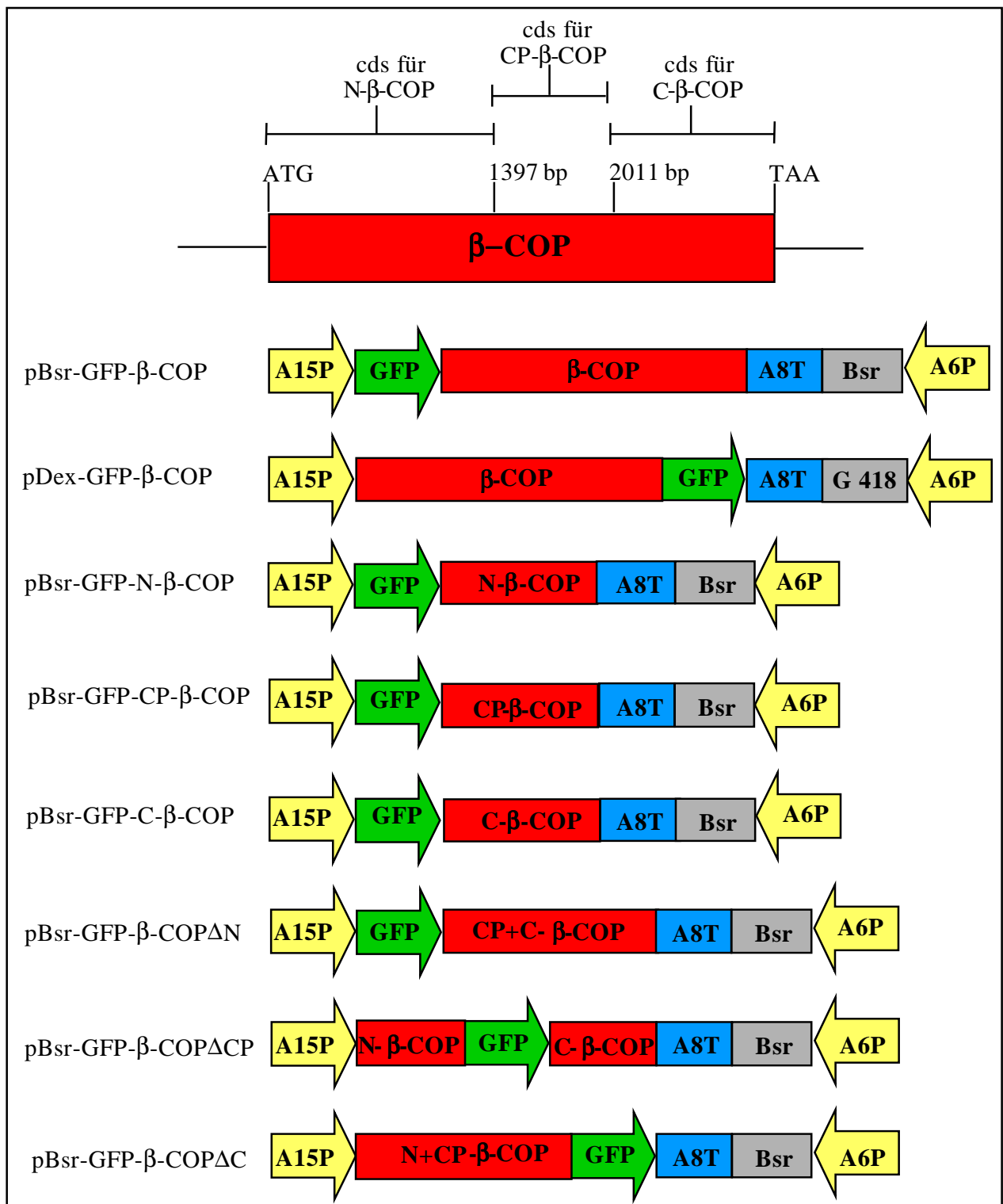


Abb. 2.1.2: Schematische Übersicht der GFP-β-COP Fusionskonstrukte sowie der GFP-β-COP-Deletions- und Teilfusionskonstrukte

A15P: Aktin-15-Promotor
 A6P: Aktin-6-Promotor
 β-COP: β-COP-Gen
 cds: codierende Sequenz
 G 418: Geneticinresistenzgen
 Bsr: Blastidinresistenzgen

N-β-COP: Nukleotid 1-1396 der β-COP cDNA
 GFP: „Green-fluorescent-protein“-Gen
 A8T: A8Tandem Terminationssequenz
 CP-β-COP: Nukleotid 1397-2010 der β-COP cDNA
 C-β-COP: Nukleotid 2011-2738 der β-COP cDNA

pBsr-GFP- β -COP k.i. (Abb. 2.1.3)

Mit diesem *D. discoideum* Transformationsvektors soll über homologe Rekombination das endogene β -COP Gen durch eine „full-length“ GFP- β -COP Fusion („knock-in“) im *D. discoideum* Genom ersetzt werden. Dafür wurde die GFP-Sequenz als HindIII-Fragment aus pDex-GFP 27 in den HindIII geschnitten pBluescript[®] Vektor ligiert, der die Blasticidinresistenzkassette trägt. Dann wurde ein zuvor in pGem Teasy[®] kloniertes β -COP PCR-Produkt, das die Nukleotidsequenzen 1-2738 ohne Stopcodon umfaßt, als PstI-Fragment hinein kloniert (Oligonukleotide COP1 XbaI, COP2738 PstI).

pBsr-GFP- β -COP 1793-2738 k.i. (Abb. 2.1.3)

pBsr-GFP- β -COP 1793-2738 k.i. wurde generiert, um eine PCR-Durchmusterung potentieller „knock-in“ Klone zu ermöglichen. Dafür wurde ein PCR-Produkt, das die Nukleotidsequenzen von Position 1793-2738 der β -COP cDNA ohne Stopcodon mit angehangenen XbaI/PstI-Schnittstellen umfaßt, in pGem Teasy[®] zwischenkloniert (Oligonukleotide COP1793 XbaI, COP2738 PstI). Dieses wurde dann als XbaI/PstI-Fragment in den ebenso geschnittenen „knock-in“ Transformationsvektor kloniert, der sowohl die Blasticidinresistenzkassette als auch die GFP-Sequenz mit Stopcodon ohne Aktin-15-Promotor beinhaltet (s. pBsr-GFP- β -COP k.i. Vektor).

pCOP-Bsr k.o. (Abb. 2.1.3)

Grundlage für diesen Vektor bildet das pB- β -COP 20 Plasmid. Das Plasmid wurde mit KpnI/SalI geschnitten, die überhängenden 5'-Enden wurden jeweils aufgefüllt und der Vektor religiert. So wurde die XhoI-Schnittstelle des Polylinkers deletiert. Das resultierende Produkt wurde mit XhoI/BglII geschnitten. Dadurch wurden im mittleren Bereich der β -COP-cDNA 0,4 kb deletiert und die überhängenden 5'-Enden aufgefüllt. In diese glatten Enden, wurde die 1,4 kb große Blasticidinresistenzkassette aus pUC-Bsr Δ BamHI (Adachi et al., 1994) als XbaI/HindIII-Fragment nach Auffüllen der 5'-Überhänge eingesetzt. Dieser Vektor sollte es ermöglichen, das endogene β -COP Gen durch homologe Rekombination zu ersetzen, um so zur Ausschaltung des β -COP Gens zu führen.

p β -COP5'-Bs Δ A6P- β -COP3' (Abb. 2.1.3)

Dieser *D. discoideum* Transformationsvektors soll über homologe Rekombination ermöglichen das endogene β -COP Gen durch eine Bsr- β -COP Fusion („knock-out“) im *D. discoideum* Genom zu ersetzen. Da das Bsr-Gen in diesem Fall keinen eigenen Promotor besitzt, sollte dessen Expression in *D. discoideum* nur dann möglich sein, wenn durch homologe Rekombination das β -COP Gen durch die Bsr- β -COP Fusion ersetzt wurde und so die Expression unter dem endogenen β -COP Promotor stattfindet. Das Bsr-Gen wurde im resultierenden Transformationsvektor von ca. 1,1 kb am 5'-Ende und von ca. 0,5 kb am 3'-Ende von entsprechenden β -COP Sequenzen flankiert. Ausgangsplasmid war ein pBluescript[®], der das Bsr-Gen ohne Aktin-6-Promotor trägt. Dieser Vektor wurde mit SacI/SmaI geschnitten und ein ca. 1,1 kb großes SacI/EcoRV-Fragment aus dem 5'-Bereich des p β -COP 20 gerichtet inseriert. Das Zwischenprodukt wurde wiederum mit EcoRV/HindIII geschnitten und ein ca. 0,5 kb großes Fragment aus dem 3'-Bereich der β -COP cDNA aus p β -COP 20 isoliert und als EcoRV/HindIII-Fragment gerichtet ligiert.

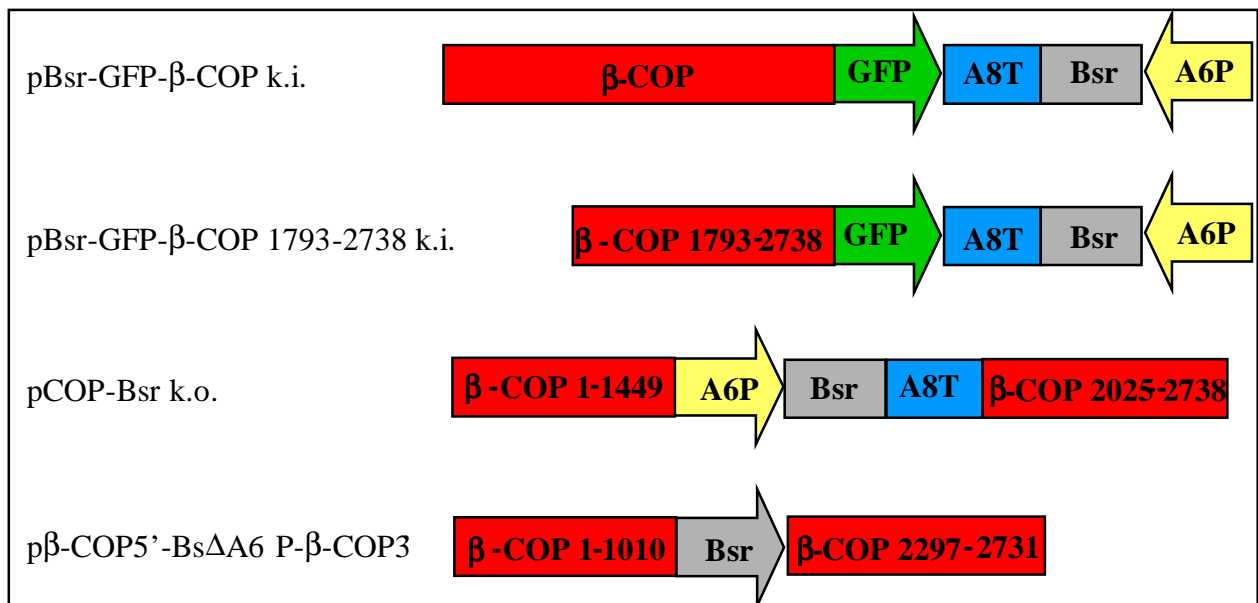


Abb. 2.1.3: „knock-in“ und „knock-out“ β -COP-Konstrukte

A15P:	Aktin-15-Promotor	Bsr:	Blasticidinresistenzgen
A6P:	Aktin-6-Promotor	A8T:	A8Tandem Terminationssequenz
β -COP:	β -COP (die Zahlen verweisen auf die Position in der β -COP cDNA)		

2.1.2 *D. discoideum* Transformanten

In allen Transformationen wurde der Stamm Ax2 als Rezipient verwendet. Die entsprechenden *D. discoideum* Transformationsvektoren sind unter Abschnitt 2.1.1 angegeben. Die Bezeichnung der Transformanten erfolgte entsprechend der Transformationsvektoren.

Bsr-GFP	(Mohrs et al., 2000)
GFP- β -COP	(Mohrs et al., 2000)
GFP-N- β -COP	
GFP-CP- β -COP	
GFP-C- β -COP	
GFP- β -COP Δ N	
GFP- β -COP Δ CP	
GFP- β -COP Δ C	

2.1.3 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> :	DH5 α	(Hanahan, 1985)
	XL1 blue	(Bullock et al., 1987)
	JM 38	(Vieira und Messing, 1982)
<i>Klebsiella aerogenes</i>		(Williams und Newell, 1976)

2.1.4 Oligonukleotide

allg. β -COP Oligonukleotide:

COP1	5'-GATGTCAGCATTAAACACAATCAG-3'
COP470uni	5'-CATTAAGATTTTTATGTA-3'
COP513rev	5'-CAGATGGGACTAATGGT-3'
COP878	5'-TCATCACCAGCAGTTAAATATG-3'
COP1045	5'-TCATAGTAAGATTATGGAGGA-3'
COP1295uni	5'-TTGGTAATGTTGTACCA-3'
COP1350rev	5'-TGACTIONATCAACGGCT-3'
COP1721	5'-ATATCGATAATGCAGACTCC-3'
COPf1940	5'-ATTAAACAAAGTGAAAATAAAAAGAAAACAG-3'
COPr2160	5'-CGTAAATTGGATCAGAGAAACCAGACAATTG-3'
COP2276uni	5'-TTTGCGAACGTGTCCCA-3'
COP2284rev	5'-GTAAATGGTGGGACACG-3'
COPr2446	5'-TTAGGATGACACAATTCTTATCAGACATAC-3'

β -COP Oligonukleotide mit Schnittstellen zur Generierung der verschiedenen Transformationsvektoren (2.1.1):

COP1 PstI	5'-AGACTGCAGGATGTCAGCATTAAACACAATCAG-3'
COP1 PstI/2	5'-CTGCAGGATGTCAGCATTAAACACAATCAG-3'
COP1 XbaI	5'-AGATCTAGAATGTCAGCATTAAACACAATCAGG-3'
COP1397 PstI	5'-AGACTGCAGTGTCACTTGTCTTGAGGATCTT-3'
COP1396rev PstI	5'-TCTCTGCAGATATTCAGCGATCACCCAAACA-3'
COP1396rev PstI/2	5'-CTGCAGATATTCAGCGATCACCCAAACA-3'
COP1396revSTOP SalI	5'-GTCGACTTAATATTCAGCGATCACCCAAACA-3'
COP1793XbaI	5'-ACATCTAGAGCTTCAAGATTGTCGTGACTC-3'
COP2010 PstI	5'-CTGCAGAAATGAATACTCAAAGATCTCTCAA-3'
COP2010rev PstI	5'-TCTCTGCAGTTGATCTTTATTGGCTTCACCAG-3'
COP2010revSTOP SalI	5'-GTCGACTTATTGATCTTTATTGGCTTCACCAG-3'
COP2011 SalI	5'-AGAGTCGACAATGAATACTCAAAGATCTCTCAAT-3'
COP2011rev PstI	5'-TCTCTGCAGTTGATCTTTATTGGCTTCACCAG-3'
COP2738 SalI	5'-TCTGTCGACTTAAGCTTTCATACCCATATTACC-3'
COP2738 PstI	5'-TCTCTGCAGAGCTTTCATACCCATATTACCAAT-3'

δ -COP Oligonukleotide:

δ -COP 1	5'-ATGGTGGTTTTAGCAGCAG-3'
δ -COP 1071	5'-TATTTGGTGAACAATCAGTATTAA-3'
δ -COP 1638 STOPr	5'-TTATTTAATTTTCATAAGTATCAACTG-3'

p24 Oligonukleotide:

p24 1 PstI	5'-CTGCAGATGATGAATAATAAATTATTATTATTAGT-3'
p24 617 SalI	5'-GTCGACTTATACTGCACGTTTGACTTCAAA-3'
p24 228 rev	5'-CTGGTGAATGATAGTGAAATCA-3'
p24 439	5'-GACTTTATCAGATGGTGTATTG-3'

2.1.5 Labormaterialien

Einfrierröhrchen, 1,8 ml und 2,2 ml	<i>Nunc</i>
Einweg-Pipetten, 5 ml, 10 ml und 25 ml	<i>Greiner</i>
Einweg-Pipettenspitzen	<i>Greiner</i>
Elektroporationsküvette	<i>BioRad</i>
Fotofilm, Typ 100-6	<i>Kodak</i>
Gewebekulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ²	<i>Nunc</i>
Gewebekulturplatten, 24 Loch, Ø 16 mm	<i>Nunc</i>
Hybridisierungsröhrchen	<i>Hybaid</i>
3MM Filterpapier	<i>Whatman</i>
Mikrotiterplatten, 96 Loch, flacher Boden	<i>Nunc</i>
Mikrotiterplatten, 96 Loch, U96 Maxisorb	<i>Nunc</i>
Nitrocellulose, Typ BA85	<i>Schleicher und Schüll</i>
Nitrocellulose-Rundfilter, BA85 Ø 82mm	<i>Schleicher und Schüll</i>
Nuclepore-Filter	<i>Nuclepore</i>
Nylonmembran, Biodyne	<i>Gelman Science</i>
Sterilfilter, 0,2 µm und 0,45 µm	<i>Gelman Science</i>
Sterilfilter, 150 ml, Porengröße 0,22 µm	<i>Falcon</i>
Petrischalen, Typ 3003	<i>Falcon</i>
Petrischalen, Ø 90 mm x 17 mm	<i>Greiner</i>
Petrischalen, 120 x 120 x 17 mm	<i>Greiner</i>
Plastikküvette	<i>Greiner</i>
Quarzküvette Infrasil	<i>Hellma</i>
15 ml Röhrchen, Typ 2095	<i>Falcon</i>
50 ml Röhrchen, Typ 2070	<i>Falcon</i>
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,2 ml	<i>Sarstedt</i>
Röntgenfilm X-omat AR-5, 18 x 24 mm	<i>Kodak</i>
Röntgenfilm X-omat AR-5, 535 x 43 mm	<i>Kodak</i>

2.1.6 Geräte

Blotkammer Trans-Blot SD	<i>BioRad</i>
Chromatographiesäulen:	
Leersäulen	<i>BioRad</i>
Chromatographiesysteme:	
BioLogic Workstation	<i>BioRad</i>
Smart [®] Mikrochromatographiesystem	<i>Pharmacia Biotech</i>
Crosslinker UVC 500	<i>Hoefer</i>
Elektroporationsgerät, Typ Gene-Pulser	<i>BioRad</i>
Elisa Reader, Multiscan RC	<i>Labsystems</i>
Fraktionssammler, Modell 2128	<i>BioRad</i>
Fraktionssammler, RediFrac	<i>Pharmacia Biotech</i>
pH-Meter 766	<i>Knick</i>
Heizblöcke:	
Typ DIGI-Block JR	<i>neoLab</i>
Typ Dri-Block DB x 20	<i>Techne</i>
Hybridisierungsöfen	<i>Hybaid</i>
Inkubationsöfen Lab-Therm	<i>Kühner</i>
Magnetrührer, Typ MR 3001 K	<i>Heidolph</i>

Mikroskope:

Fluoreszenzlichtmikroskop	<i>Olympus</i>
Fluoreszenzlichtmikroskop, Typ DMR	<i>Leica</i>
Fluoreszenzlichtmikroskop, Typ DMIL	<i>Leica</i>
Stereofluoreszenzmikroskop, Typ MZ FLIII	<i>Leica</i>
Laser Scan Mikroskop, Typ CLSM-SP	<i>Leica</i>

Multipipette, Multipette plus

Eppendorf

PCR-Maschine

MWG-Biotech

Plattengießmaschine

Technomat

Rotoren:

Typ JA-10	<i>Beckman</i>
Typ JA-25.50	<i>Beckman</i>
SLA-1500	<i>Sorvall</i>
SLA-3000	<i>Sorvall</i>
SS-34	<i>Sorvall</i>
TLA 45	<i>Beckman</i>
SW 41	<i>Beckman</i>

Rüttler 3015

GFL

Rüttler Lab-Shaker

Kühner

Spannungsverstärker Power Pac 200 und 300

Bio-Rad

Spektralphotometer, Typ Ultraspec 2000

Pharmacia Biotech

Tischzentrifugen:

Centrifuge 5414	<i>Eppendorf</i>
Centrifuge 5415 D	<i>Eppendorf</i>
Kühlzentrifuge Biotech fresco	<i>Heraeus Instruments</i>
Sigma	<i>B. Braun Biotech Instruments</i>

Ultrazentrifuge Optima TLX

Beckman

UV-Auflichtmonitor TFS-35 M

Faust

UV-Transilluminator

MWG-Biotech

Vortex REAX top

Heidolph

Wasserbäder

GFL

Zentrifugen:

Beckman Avanti J25	<i>Beckman</i>
Sorvall RC 5C plus	<i>Sorvall</i>

2.1.7 Kits

Nucleobond AX 20,100 und 500

Macherey-Nagel

NucleoSpin Extract 2 in 1

Macherey-Nagel

NucleoSpin Plus

Macherey-Nagel

pGem-Teasy-Vector System I

Promega

Stratagene Prime It II

Stratagene

Original TA Cloning Kit

Invitrogen

2.1.8 Antibiotika

Folgende Antibiotikalösungen wurden in den angegebenen Konzentrationen verwendet. Alle Antibiotika wurden in H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

- für Bakterienkulturen:

	Stocklösung	Endkonzentration	
Ampicillin:	100 mg/ml	100 µg/ml	<i>Grünenthal</i>
Kanamycin:	100 mg/ml	50 µg/ml	<i>Sigma</i>

- für *D. discoideum* Kulturen:

Geneticin (G 418):	10 mg/ml	2 µg/ml	<i>Gibco-BRL</i>
Blasticidin S:	10 mg/ml	3,5 µg/ml	<i>ICN</i>
Dihydrostreptomycinsulfat:	10 mg/ml	100 µg/ml	<i>Sigma</i>
Tetracyclin:	10 mg/ml	10 µg/ml	<i>Sigma</i>

2.1.9 Enzyme

Alkalische Phosphatase	<i>Roche</i>
Desoxyribonuklease I	<i>Sigma</i>
Lysozym	<i>Sigma</i>
Ribonuklease A	<i>Sigma</i>
Restriktionsenzyme und Puffer	<i>Boehringer</i>
	<i>New England Biolabs</i>
	<i>Roche</i>
	<i>Amersham</i>
	<i>Gibco-BRL</i>
Taq-Polymerase	<i>Roche</i>
T4-DNA-Ligase	<i>Gibco-BRL</i>
Klenow-Fragment	<i>Life-Technologies</i>
Proteinase K	<i>Sigma</i>

2.1.10 Inhibitoren

Aprotinin	<i>Sigma</i>
Benzamidin	<i>Sigma</i>
Complete [®] Inhibitoren Cocktail	<i>Roche</i>
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	<i>Sigma</i>
2,4-Dinitrophenol (DNP)	<i>Sigma</i>
E 64 (trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan)	<i>Sigma</i>
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	<i>Sigma</i>

2.1.11 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad p.a. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia
Biochemica
Biochrom
Biomatic Nat. Diagnostics
Degussa
Difco
Fluka
Gerbu
Gibco BRL
Loewe

Merck
Molecular Probes
Oxoid
Promega
Riedel-de-Haen
Roche
Roth
Serva
Sigma
Whatman

2.1.12 Antikörper

Primäre Antikörper:

anti-Aktin-Antikörper	mAk Act 1-7	Simpson et al., 1984
anti- α -Aktinin-Antikörper	mAk 47-62-17	Schleicher et al., 1984
anti-GFP-Antikörper	mAk K3-184-2	nicht veröffentlicht
anti-Comitin-Antikörper	mAk 190-340-2	Weiner et al., 1993
anti-Comitin-Antikörper	mAk 190-68-1	Weiner et al., 1993
anti-Comitin-Antikörper	mAk 190-23-5	Weiner et al., 1993
anti-Interaptin-Antikörper	mAk 260-60-10	Rivero et al., 1998
anti-PDI-Antikörper	mAk 221-135-1	Monat et al., 1997
anti- β -COP-Antikörper	maD	Pepperkok et al., 1993
anti-Annexin VII-Antikörper	185-338-1	Döring et al., 1995
anti-Contact-Site A-Antikörper	33-294-17	Berthold et al., 1985
anti-N-csA-Glycosylrest-Antikörper	123-353	Barth et al., 1994
anti-Prespore Antigen-Antikörper	mud1	Kreff et al., 1983

sekundäre Antikörper:

Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase Konjugat	<i>Sigma</i>
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3 Konjugat	<i>Sigma</i>
Ziege-anti-Maus-IgG, FITC Konjugat	<i>Sigma</i>
Ziege-anti-Maus-IgG, alkalische Phosphatase Konjugat	<i>Sigma</i>
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, alkalische Phosphatase Konjugat	<i>Sigma</i>

2.1.13 Puffer und Lösungen

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

Hepes-Phenol:	1 kg (10,6 mol) 1 M	Phenol, bei 60 °C geschmolzen Hepes (pH 7,5) bis zur Sättigung
10 x MOPS (pH 7,0/ pH 8,0):	0,2 M 3 M 10 mM	MOPS Natriumacetat EDTA
10 x NCP-Puffer (pH 8,0):	0,1 M 1,5 M 5,0 ml	Tris/HCl NaCl Tween 20
PBS (pH 7,2/ pH 8,0):	30 mM 150 mM 70 mM	KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ (zur pH Einstellung)
1 M Phosphatpuffer (pH 7,4):	77,4 ml 1M 22,6 ml 1 M	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ pro Liter
20 x SSC:	3 M 0,3 M	NaCl Natriumcitrat
TE-Puffer (pH 8,0):	10 mM 1 mM	Tris/HCl EDTA (pH 8)
Tris-Phenol:	1 kg (10,6 mol) 1 M	Phenol, bei 60 °C geschmolzen Tris/HCl pH 8,0 bis zur Sättigung
10 x Tris/Phosphatpuffer (pH 8,0):	0,36 M 0,25 M 10 mM	Tris NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O EDTA pH wurde mit Phosphorsäure eingestellt
10 x TBE-Puffer (pH 8,3):	0,9 M 0,9 M 20 M	Tris Borsäure EDTA
50 x TAE-Puffer (pH 8,0):	2 M 16,6 M 50 mM	Tris Eisessig EDTA

2.1.14 Kulturmedien

Alle verwendeten Medien wurden mit deionisiertem Wasser, das über eine Ionenaustauschanlage (*Millipore*) gefiltert wurde, angesetzt und bei 120 °C autoklaviert. Antibiotika wurden nach Abkühlung des Mediums auf etwa 50 °C zugegeben. Das Gießen der Platten erfolgte mit einer halbautomatischen Plattengießmaschine.

2.1.14.1 Bakterienmedien (Sambroock *et al.*, 1989)

LB-Medium: 10 g	Bacto-Trypton	SOC-Medium: 20 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt
5 g (85,5 mmol)	NaCl	20 mM	Glucose
	pro 1 l Wasser	0,5 g (8,5 mmol)	NaCl
			pro 1 l Wasser

Der jeweilige pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden den Medien 0,9 % (w/v) Agar und bei Bedarf 100 mg/l Ampicillin oder 50 mg/l Kanamycin zugesetzt. Für Farbindikatorplatten zur Blau/Weiß-Selektion von *E. coli*-Transformanten wurden die fertigen Platten jeweils mit 50 µl 0,1 M IPTG-Lösung und 90 µl X-Gal-Lösung (200 mg/10 ml Dimethylformamid) bestrichen.

2.1.14.2 Medien für *D. discoideum* Kulturen

Ax2-Kulturmedium (pH 6,7) (Watts und Ashworth, 1970):	14,3 g 18 g (0,1 mol) 0,616 g (3,5 mmol) 0,486 g (3,6 mmol)	Pepton Maltose Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄ pro 1 l Wasser
Phosphatagarplatten (pH 6,0):	15 g	Agar Agar pro 1 l Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 6,0)
Salzlösung: (Bonner, 1947):	10 mM 10 mM 2,7 mM	NaCl KCl CaCl ₂
SM-Agarplatten (pH 6,5):	10 g 10 g 10 g (55 mmol) 1 g 1 g (4,1 mmol) 2,2 g (16,2 mmol) 1 g (5,7 mmol)	Agar Agar Pepton Glucose Hefeextrakt MgSO ₄ x 7 H ₂ O KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ pro 1 l Wasser
Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 6,0): (Malchow et al., 1972)	2 mM 15 mM	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von *D. discoideum*

2.2.1.1 Anzucht von *D. discoideum* in Flüssigkultur

Der Wildtypstamm Ax2 und seine Transformanten können durch Inokulation von Sporen oder Amöben von SM-Agarplatten im Ax2-Flüssigmedium kultiviert werden. Bei der Kultivierung von Transformanten ist die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums als Resistenzmarker notwendig, bei der Kultivierung ausgehend von SM-Agarplatten wurde Dihydrostreptomycinsulfat (40µg/ml) zugegeben, um verbliebene *K. aerogenes* zu entfernen. Die Generationszeit beträgt in Schüttelkultur bei 21°C und 160 UpM zwischen neun und zehn Stunden. Für alle zellbiologischen Untersuchungen wurden die Zellen bis zu einer maximalen Dichte von 5×10^6 Zellen/ml angezogen.

Ebenso können die Zellen in Petrischalen in Flüssigmedium kultiviert werden. Hierbei wurde das Medium ein- bis zweimal pro Woche gewechselt. Bei Transformanten wurde das entsprechende Selektionsantibiotikum zugegeben.

2.2.1.2 Anzucht von *D. discoideum* auf Agarplatten

Neben der Kultivierung in Flüssigmedium besteht die Möglichkeit zur Kultivierung von *D. discoideum* auf SM-Agarplatten. Hierzu wurden 100 µl einer dichten *K. aerogenes* Suspension in Salzlösung zusammen mit *Dictyostelium*-Zellen oder Sporen auf SM-Agarplatten ausgebracht. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation bei 21°C zeigten sich *D. discoideum* Kolonien als abgegrenzte Freßhöfe („Plaques“) auf dem dichten Bakterienrasen. SM-Agarplatten wurden zur Vereinzelung von *D. discoideum* Zellen oder auch zur Massenzucht verwendet. Die Generationszeit beträgt drei bis vier Stunden.

2.2.1.3 Transformation von *D. discoideum* durch Elektroporation (Howard et al., 1988)

D. discoideum Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert, durch Zentrifugation bei $720 \times g$ geerntet, einmal mit kaltem Soerensen-Phosphat-Puffer und einmal mit kaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in kaltem Elektroporationspuffer auf eine Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml resuspendiert. Für jede Elektroporation wurden 500 µl dieser Zellsuspension mit 15-30 µg DNA des zu transformierenden Vektors in einer Elektroporationsküvette gemischt und bei einer

Kondensatorkapazität von 3 μF , einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 0,9 kV die Elektroporation durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend in eine Petrischale überführt und 10 Minuten bei 21°C inkubiert. Danach wurde tropfenweise CaCl_2 und MgCl_2 bis zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Nach 20 Minuten Inkubation bei 50 UpM und 21°C wurde Ax2-Medium zugegeben. Bevor das im Vektor als Resistenzmarker verwendete Antibiotikum zugefügt wurde, erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei 21°C ohne Selektionsmarker.

Elektroporationspuffer: 50 mM Saccharose
10 mM Kaliumphosphat (pH 6,1)

2.2.1.4 Einfrieren und Sporengewinnung zur Lagerung von *D. discoideum*

I. Zur Lagerung wurden 900 μl einer axenisch gewachsenen *D. discoideum* Zellkultur mit einer Zelldichte von $2\text{-}4 \times 10^6$ Zellen/ml mit 100 μl Pferdeserum und 100 μl DMSO versetzt. Aliquots von 1 ml wurden zunächst ca. eine Stunde bei 4 °C, dann ca. zwei Stunden bei –20 °C inkubiert, um dann bei –80 °C gelagert zu werden. Diese Zellen konnten nach Auftauen und Waschen zur Anzucht neuer Kulturen verwendet werden.

II. *D. discoideum* Zellen aus axenisch gewachsener Kultur wurden zweimal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen und auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 500 μl wurden auf eine Phosphatagarplatte ausgebracht. Die aus den Zellen entstandenen Fruchtkörper lassen sich innerhalb von 48 Stunden ernten. Dafür wurden die Sporen im Deckel der Petrischale gesammelt, in 10 ml kaltem Soerensen-Phosphat-Puffer aufgenommen und in 1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei –80 °C. Diese Sporen konnten zur Inokulation neuer Kulturen verwendet werden.

2.2.1.5 Entwicklung von *D. discoideum* in Suspensionskultur

Nahrungsentzug induziert in *D. discoideum* Zellen einen Entwicklungs- und Differenzierungsprozeß, der von der Expression entwicklungsregulierter Gene begleitet ist (Abb.). Die mit Soerensen-Phosphat-Puffer mediumfrei gewaschenen Zellen wurden zum Start des Entwicklungsprozesses (t_0) auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml in Soerensen-Phosphat-Puffer eingestellt und bei 21°C und 160 UpM inkubiert.

2.2.1.6 Entwicklung von *D. discoideum* auf Phosphat-Agar-Platten

Die mit Soerensen-Phosphat-Puffer mediumfrei gewaschenen Zellen wurden auf eine Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml in Soerensen-Phosphat-Puffer resuspendiert. Je 5 ml dieser Suspension mit insgesamt 1×10^8 Zellen wurden auf eine Phosphat-Agar-Platte ausplattiert, die Zellen 15 Minuten absitzen gelassen, der überschüssige Puffer abgenommen und die Zellen bei 21°C inkubiert. Zu den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten wurden die Zellen durch Abspülen mit Soerensen-Phosphat-Puffer geerntet. Unter diesen Bedingungen Durchlaufen die Zellen einen Entwicklungszyklus, der nach ungefähr 24 Stunden mit der Ausbildung eines Fruchtkörpers beendet ist.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Transformation von *E. coli* Zellen

2.2.2.1.1 Erzeugung elektrokompenter *E. coli*

Es wurden 1 l LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C und 250 UpM inkubiert und bis zu einer optischen Dichte von OD = 0,4 – 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm herangezogen. Die Zellen wurden zehn Minuten auf Eis abgekühlt, durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit je 500 ml eiskaltem sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml 15 %igem Glycerin resuspendiert und bei $3.000 \times g$, 4 °C pelletiert und in 2 ml 15 %igem Glycerin resuspendiert. Aliquots von 50 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

2.2.2.1.2 *E. coli* Transformation durch Elektroporation

Zur Transformation wurde ein 50 µl Aliquot elektrokompenter Bakterienzellen mit 200 ng Plasmid-DNA zur Retransformation oder 5 µl eines Ligationsansatzes in einer Elektroporationsküvette gemischt. Die Transformation erfolgte dann bei 200 Ω, 2,5 kV und 25 µF im Elektroporator. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Verschiedene Volumina dieser Zellsuspension wurde auf entsprechende Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.1.3 Konservierung von *E. coli*

Es wurden 800 µl einer aus einer Einzelkolonie angelegten Bakterienübernachtskultur mit 200 µl Glycerin gemischt und bei -80 °C eingefroren.

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

2.2.2.2.1 „Boiling Methode“ (Ausubel et al., 1993)

Das hier beschriebene Verfahren eignet sich, um eine große Anzahl von Versuchsansätzen parallel zu bearbeiten. Grundlage dieser Methode ist, daß Proteine, Zellwandmaterial und chromosomale DNA bei Erhitzen auf ca. 100°C koagulieren. So können diese Bestandteile anschließend durch Zentrifugation von der löslichen RNA und Plasmid-DNA getrennt werden.

Ungefähr 1,5 ml einer mit einer Kolonie inokulierten Bakterienübernachtskultur wurden in einem Eppendorfgefäß in einer Biofuge sedimentiert (1 Minute, 16.000 x g). Das Pellet wurde in 200 µl STET-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von ca. 70 µg Lysozym wurden die Bakterien drei Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Das Lysat wurde ca. eine Minute auf 95 °C erhitzt und 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde entfernt und der Überstand zur Fällung der Plasmid-DNA mit 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 400 µl 95 % Ethanol (-20 °C) gemischt. Die Fällung erfolgte ca. 20 Minuten bei -20 °C. Die gefällte Plasmid-DNA wurde 10 Minuten bei 16.000 x g pelletiert, mit 70 % igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur ca. 15 Minuten getrocknet und anschließend in 20 µl Wasser resuspendiert.

STET-Puffer: 0,1 M NaCl
10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA (pH 8,0 mit NaOH)
5 % Triton X-100

2.2.2.2.2 Plasmidisolierung mit dem Macherey und Nagel-Kit

Die Zellen einer Bakterienübernachtskultur wurden durch Zentrifugation (2 x 1,5 ml, 1 Minute; 16.000 x g) pelletiert. Nach Angaben des Herstellers (Macherey und Nagel) erfolgte anschließend die Plasmidisolierung mit Hilfe des „NucleoSpin Plus“-Kits oder des „Nucleobond AX 20“-Kits. Die DNA wurde mit 30-50 µl Wasser von der Säule eluiert.

2.2.2.3 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* im Makromaßstab gemäß Macherey und Nagel

Die Zellen einer 50 ml Bakterienübernachtskultur wurden durch Zentrifugation (5 Minuten; 4.000 x g) pelletiert. Nach Angaben des Herstellers (Macherey und Nagel) erfolgte anschließend die Plasmidisolierung mit Hilfe des „Nucleobond AX 100“-Kits. Die DNA wurde mit 200 µl Wasser von der Säule eluiert.

2.2.2.4 Präparation genomischer DNA aus *D. discoideum* (Noegel et al., 1985)

D. discoideum Zellen besitzen einen hohen Kohlenhydrat- und RNA-Anteil. Um bei der Isolierung genomischer DNA eine RNA Kontamination und störende Zucker zu vermeiden, wurde diese aus angereicherten Zellkernen isoliert. Die Zellen wurden mit 10 ml kaltem Wasser von einer dichtbewachsenen SM-Agarplatte geerntet und vier Minuten bei 720 x g pelletiert. Um die *D. discoideum* Zellen von *K. aerogenes* zu befreien, wurden sie mit Wasser gewaschen. Das resultierende *D. discoideum* Zellpellet wurde in 5 ml kaltem NLB-Puffer resuspendiert. NLB-Puffer lysiert die Zellmembran, läßt die Kernmembran aber unversehrt. Durch erneutes Zentrifugieren bei 2.000 x g, 4°C wurden die Zellkerne pelletiert und in 1ml TE-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µl 10 %igem SDS und 10 µl Proteinase K [100 µg/ml] wurde das Gemisch zwei bis vier Stunden bei 37°C inkubiert. Noch verbliebene Proteine und RNA wurden mit Wasser gesättigtem Phenol pH 8,0 extrahiert. Die Extraktionshäufigkeit ist abhängig von der eingesetzten Zellmenge. Aus dem wäßrigen Überstand wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,0 und zweifachem Volumen 96 %igem Ethanol präzipitiert. Die präzipitierte DNA wurde durch fünf minütiges Zentrifugieren bei 10.000 x g pelletiert und einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Evaporation des Ethanols wurde die DNA in Wasser gelöst.

NLB-Puffer:	10 mM	Magnesiumacetat
	10 mM	NaCl
	30 mM	Hepes (pH 7,5)
	10 %	Saccharose

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

Für einen „RNA-timecourse“ wurden 1 x 10⁸ Zellen je Phosphatagarplatte ausgebracht (2.2.1.6). Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 10 ml eiskaltem Wasser geerntet und mit 50 mM Hepes-Puffer (pH 7,5) gewaschen. Nach erneuter Pelletierung der Zellen wurden sie in

10 ml Hepes-Puffer resuspendiert und zum Schutz vor RNasen wurde 100 µl DEPC zugefügt. Die anschließende Zellyse erfolgte durch Zugabe von 1 ml 10 %igem SDS. Proteine wurden durch Zugabe des gleichen Volumens Phenol/Chloroform extrahiert. Hierfür wurde zuvor das mit 1 M Hepes-Puffer gesättigte Phenol im Verhältnis 1:1 mit Chloroform gemischt. Nach Schütteln wurde die Suspension zur Phasentrennung zehn Minuten, bei 4°C und 5.000 x g zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde sofort einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen, bis der Überstand klar war und keine Interphase mehr sichtbar war. Zur Fällung der RNA wurde anschließend 1/10 Volumen 10 M LiCl-Lösung und zwei Volumen 96 % Ethanol zugegeben und mindestens eine Stunde bei -20 °C inkubiert, danach 20 Minuten bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende RNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser resuspendiert.

2.2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde spektralphotometrisch bei 260 bzw. 280 nm bestimmt. Eine OD von 1 entspricht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergibt sich folgende Beziehung:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Grad der Verunreinigung mit Proteinen und Phenolen läßt sich mit Hilfe des Quotienten OD_{260}/OD_{280} abschätzen. Beträgt der Wert des Quotienten 1,8 oder mehr, kann die DNA- bzw. RNA-haltige Lösung als rein angesehen werden.

Zusätzlich war es möglich die jeweiligen Konzentrationen von Plasmid-DNA, genomischer DNA und RNA in einer Agarose-Gelelektrophorese abzuschätzen. Sie wurden hier durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und ermöglichten so eine Abschätzung der Menge durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen.

2.2.2.7 Lagerung isolierter Nukleinsäuren

Genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert, isolierte RNA bei -80 °C und Plasmid-DNA bei -20 °C.

2.2.2.8 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten (Sambrook et al., 1989)

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegelmatrix. Je nach Verwendung und Auftrennungsziel wurden 0,7-2,5 %ige Gele in TBE- oder TAE-Puffer verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die Agarose im jeweiligen Puffer aufgeköcht, mit Ethidiumbromid versetzt, und nach Abkühlung auf einen Gelträger verschiedener Größe (7,5 cm x 8 cm, 11,5 cm x 14 cm, 12,5 cm x 19 cm) mit Taschenformer gegossen. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Probenaschen geladen. Die DNA-Auftrennung erfolgte horizontal in Flachbett-Gelapparaturen. In Abhängigkeit von der Gelgröße, Laufdauer und Auftrennungseffizienz wurde eine Spannung von 15 V bis 100 V angelegt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA wurde mit einem Transilluminator (302 nm) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren unter UV-Licht mit einem Videodokumentationsgeräts. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte jeweils im Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard.

Probenpuffer: 15 % Ficoll 400
 75 mM EDTA (pH 8,0 mit NaOH)
 0,25 % Bromphenolblau

2.2.2.9 Southern-Blot-Analyse (Southern, 1975)

Unter dieser Methode versteht man den Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran. Durch Hybridisierung mit einer markierten DNA-Probe lassen sich so spezifische Fragmente identifizieren.

Genomische DNA wurde in einem Volumen von 400 µl mit Restriktionsenzymen über Nacht geschnitten. Anschließend wurde die DNA mit einem zweifachen Volumen 96 %igem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) für mindestens 30 Minuten bei -20 °C gefällt und nach Pelletierung der DNA durch Zentrifugation mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknung wurde die DNA in 15 µl Wasser aufgenommen, 10 µl Ladungspuffer zugegeben und anschließend die DNA-Fragmente in einem 0,6 -0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Um eine gute Auftrennung der DNA-Fragmente zu erreichen, wurde der Gellauf ca. 18 h bei 15 V bis 30 V durchgeführt. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel zur späteren Größenbestimmung der Signale mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. Das Gel wurde zunächst 20 Minuten in Denaturierungspuffer und dann 20 Minuten in Neutralisierungspuffer bei Raumtemperatur im Schüttelbad inkubiert.

Der Transfer der DNA erfolgte mittels Kapillarkräften über einen Zeitraum von ca. 10 Stunden. Dafür wurde das Gel auf eine Brücke aus zwei Lagen 3MM Whatman Papier gelegt, die in Kontakt mit einem 20 x SSC-Puffer Reservoir stand. Das vorbereitete Gel wurde mit einer zunächst mit Wasser, dann mit 20 x SSC-Puffer angefeuchteten Nylonmembran, zwei weiteren Lagen 3MM Papier und einem ca. 10 cm hohen Stapel Saugpapier überschichtet und zur Verstärkung der kapillaren Sogwirkung mit einem Gewicht beschwert. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran kurz in 2 x SSC-Puffer gewaschen und 2 x im UV-Quervernetzer mit UV-Licht bestrahlt. Die Blots wurden trocken bei Raumtemperatur gelagert.

Denaturierungspuffer:	1,5 M NaCl	Neutralisierungspuffer:	1,5 M NaCl
	0,5 M NaOH		0,5 M Tris/HCl (pH 7,5)

2.2.2.10 Elektrophoretische Auftrennung von RNA (Lehrach et al., 1977)

Vor jeder RNA-Elektrophorese wurden die Gelträger, Taschenformer sowie die Gelkammern mit 1 %igem SDS inkubiert. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden 1,2 %ige Agarosegele verwendet, die durch Erhitzen von 2,4 g Agarose in 20 ml 10 x MOPS-Puffer (pH 8,0) und 148 ml Wasser, sowie durch Zugabe von 32 ml 36 %iger Formaldehydlösung nach Abkühlung auf 60 °C, hergestellt wurden. Es wurden zwischen 15 und 30 µg RNA je Spur aufgetrennt. Die RNA wurde vorher durch Zugabe von 1/3 Volumen RNA-Puffer und fünf Minuten Inkubation bei 68°C denaturiert. Nach Zugabe von RNA-Ladungspuffer wurde die RNA in die Probenaschen geladen. Die RNA-Auftrennung erfolgte horizontal in Flachbett-Gelapparaturen mit einer Spannung von 30 V.

Solche aufgetrennte RNA wurden zum einen als Qualitätskontrolle zum anderen zum Transfer auf Membranen verwendet.

RNA-Puffer:	50 µl 10 x MOPS (pH 8,0)	RNA-Ladungspuffer:	50 % (w/v) Saccharose
	83 µl Formaldehyd		0,25 % (w/v) Brom-phenolblau
	250 µl Formamid		

2.2.2.11 Northern-Blot-Analyse

Durch eine Northern-Blot-Analyse läßt sich das RNA-Produkt eines Gens nachweisen. Unter dieser Methode versteht man den Transfer von RNA auf eine Nylonmembran, die zuvor nach ihrer Größe in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt wurde. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 Minuten in Wasser und weitere 10 Minuten in 20 x SSC-Puffer unter Schütteln inkubiert. Der Transfer auf die Nylonmembran erfolgte analog zum Southern-Blot Verfahren (2.2.2.9). Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran kurz in 2 x SSC-Puffer gewaschen und zur irreversiblen Bindung der RNA an die Membran 2 x im UV-Quervernetzer mit UV-Licht bestrahlt. Bis zur Hybridisierung wurden die Blots trocken bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.2.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zunächst wurde die mit Restriktionsenzymen behandelte DNA (2.2.2.15.1) im TAE-Agarosegel (2.2.2.8) ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die zu isolierende Bande wurde unter UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten. Das Gelstück wurde in ein 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt, dessen Boden vorher mit einer Kanüle durchstoßen und mit silanisierter Glaswolle gefüllt wurde. Dieses Gefäß wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gestellt, in dem durch zweimalige Zentrifugation bei 3.000 x g für jeweils 30 Sekunden das DNA-Eluat des Gelstücks aufgefangen wurde. Die so eluierte DNA wurde dann mit dem zweifachen Volumen 96 % igen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) gefällt, zehn Minuten bei 16.000 x g und 4 °C pelletiert. Abschließend wurde die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 10 – 20 µl Wasser aufgenommen.

2.2.2.13 Radioaktive Markierung von DNA mit dem Stratagene Prime[®] It II-Kit

Die zur Markierung verwendete DNA wurde aus Plasmiden durch Restriktionsenzyme geschnitten und anschließend gereinigt (2.2.2.12), oder durch spezifische Primer in einer PCR-Reaktion amplifiziert (2.2.2.16). Zur Markierung wurden 2,5 ng - 25 ng Sonden-DNA in einem Volumen von 24 µl Wasser verwendet, die nach Zugabe von 10 µl „random-oligonucleotide-primern“ fünf Minuten bei 95 °C denaturiert wurden. Anschließend wurde 10 µl 5 x Primer-Puffer, 5 µl α -³²P-dATP (50 µCi) und 2 U Klenow-Enzym zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wurde 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung nicht eingebauter radioaktiver Nukleotide wurde anschließend zwei Minuten bei 3.000 UpM über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-

Puffer zentrifugiert. Vor der Verwendung der markierten DNA-Probe im Southern- oder Northern-Blot wurde sie bei 95 °C denaturiert.

2.2.2.14 Nachweis mit radioaktiv markierten Sonden (modifiziert nach Mehdy, 1983)

Durch Hybridisierung mit einer spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Probe lassen sich zum einen spezifische RNA im Northern-Blot (2.2.2.11) und zum anderen spezifische DNA im Southern-Blot (2.2.2.9) als Bande im Autoradiogramm nachweisen.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Membranen zunächst 30 Minuten in Hybridisierungspuffer, der 200 µg/ml denaturiertes Heringssperma enthielt, bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem Rotationsofen in einer Glashybridisierungsröhre. Nach Zugabe der radioaktiv markierten DNA-Probe wurde die Membran über Nacht bei 37 °C im Rotationsofen inkubiert. Sondenreste sowie unspezifisch gebundene DNA wurden nach Entfernung der radioaktiv markierten DNA-Probe durch dreimaliges Waschen im Schüttelbad bei 37 °C für jeweils 30 Minuten entfernt. Das Ergebnis der Hybridisierung wurde mittels Autoradiographie mit verschiedenen Expositionszeiten bestimmt.

Das Entfernen einer Sonde von einer Membran, das sog. „stripping“, erfolgte durch 30 Minuten Inkubation der Membran in heißem 0,1 %igen SDS, 10 mM EDTA.

Hybridisierungspuffer:

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

Waschpuffer:

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

2.2.2.15 *In vitro* Rekombination von DNA

2.2.2.15.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen. Restriktionsdauer und Volumen hängen von Art und Konzentration der DNA ab. Pro µg DNA wurden generell 2-10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Plasmid-DNA wurde eine bis drei Stunden, genomische DNA über Nacht verdaut. Die Vollständigkeit der Restriktion wurde im Agarosegel überprüft (2.2.2.8).

2.2.2.15.2 Auffüllreaktion einzelsträngiger DNA-5'-Enden

Viele Restriktionsenzyme erzeugen 5'- oder 3'-überstehende, einzelsträngige kohäsive Enden. In Gegenwart von Desoxyribonukleotiden können diese 5'-DNA-Überhänge mittels des Klenow-Fragments der DNA-PolymeraseI aufgefüllt werden.

Reaktionsansatz für das Klenow-Enzym: 50 µl Restriktionsansatz
4 mM dNTP
1 U Klenow-Enzym

Der Reaktionsansatz wurde dreißig Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch zehnminütige Inkubation bei 65 °C gestoppt.

2.2.2.15.3 Dephosphorylierung von DNA-5'-Phosphatgruppen

Zur Verhinderung der Religation eines linearisierten Vektors, wurden 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm enternt. Dafür wurden in einem 50 µl Ansatz 5 – 10 µg linearisierte Vektor-DNA mit 3 U Alkalischer Phosphatase in CIP-Puffer 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde durch Inhibition der Alkalischen Phosphatase mit 2 µl 0,2 M EGTA und zehnminütige Inkubation bei 65 °C gestoppt.

CIP-Puffer: 0,5 M Tris/HCl (pH 8,0)
 10 mM MgCl₂
 1 mM ZnCl₂
 10 mM Spermidin

2.2.2.15.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden in doppelsträngiger DNA, sowie auch in Einzelstrangbrüchen. Im Falle kohäsiver Enden wurde das zu klonierende Fragment in mindestens fünffachem molarem Überschuß, im Falle glatter Enden in mindestens 10fachem Überschuß zum Vektor eingesetzt. Die Ligation erfolgte in der Regel über Nacht bei ca. 8 °C in einem Volumen von 10 µl. Die verwendeten Vektoren wurden jeweils vorher dephosphoryliert.

2.2.2.16 Polymerase-Kettenreaktion (Saiki, 1988)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion können mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide (Primer) spezifische DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden. Dazu wird ein Reaktionsgemisch aus doppelsträngiger DNA, Desoxyribonukleotiden, einer thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase (Chien et al., 1976) sowie eines Primer-Paares, welches den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankiert, einer kontinuierlich aufeinanderfolgenden Reihe von Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Elongation ausgesetzt. Die Wahl der spezifischen Primer kann auch zur Modifikation des PCR-Produkts verwendet werden. So können z.B. mittels eines nicht hybridisierenden Nukleotidüberhangs an den Enden der Primer Schnittstellen für Restriktionsnukleasen eingeführt werden. Die Hybridisierungstemperatur (T_H) eines bestimmten Primers wurde anhand seiner Basenzusammensetzung wie folgt abgeschätzt (Suggs et al., 1981):

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

Mit einem programmierbaren „Thermocycler“ wurden die PCR-Zyklen automatisch gesteuert. Die DNA wurde anschließend aus dem Gel eluiert (2.2.2.12) und in der Regel als DNA-Probe zur radioaktiven Markierung (2.2.2.13) oder zur Ligation (2.2.2.15.4) verwendet.

Die unten angegebenen Reaktionsparameter für Temperatur und Zeit beziehen sich jeweils auf Standardbedingungen. Für jede PCR wurden individuelle Parameter berücksichtigt. Die Hybridisierungstemperatur der Primer wurde so gewählt, daß sie ca. 2 °C unter der ermittelten Schmelztemperatur der Primer lag.

PCR-Ansatz:	2 µl (20 ng)	Plasmid-DNA
	2 µl (10 pmol/µl)	5'→3' Primer
	2 µl (10 pmol/µl)	3'→5' Primer
	5 µl	10 x PCR-Puffer
	1 µl (3-4 U)	Taq-Polymerase
	2 µl (je 10 mM)	dNTP-Mix
	37 µl	H ₂ O

PCR-Bedingungen:	<u>3</u>	<u>Minuten</u>	<u>95 °C</u>	<u>initiale Denaturierung</u>	
	60	Sekunden	95 °C	Denaturierung	
	60	Sekunden	58-66 °C	Primer-Hybridisierung	x 25 PCR-Zyklen
	<u>90</u>	<u>Sekunden</u>	<u>72 °C</u>	<u>DNA-Elongation</u>	
	10	Minuten	72 °C	terminale Elongation	
			4 °C	abschließende Kühlung	

10 x PCR-Puffer:	100 mM Tris/HCl (pH 8,3)
	500 mM KCl
	0,1 % (w/v) Gelatine

2.2.2.17 Durchmusterung einer *D. discoideum* λ ZAP Phagenbibliothek

2.2.2.17.1 Herstellung von kompetenten XL1blue-Wirtszellen (Benton und Davis, 1977)

Eine Übernachtskultur von *E. coli* XL1blue-Zellen in LB-Medium mit 0,2 % Maltose sowie 10 mM Magnesiumsulfat wurde geerntet (3.000 x g, 10 Minuten) und in 10 ml steriler 10 mM Magnesiumsulfatlösung resuspendiert. Die Zellen waren 2 –3 Tage bei 4 °C haltbar.

2.2.2.17.2 Durchmusterung der Phagenbibliothek

I. Plattieren der Genbank:

Zur Vorbereitung wurden 20 Reagenzgläser mit je 9 ml Top-Agarose auf 49 °C, 20 LB-Agarplatten (12 x 12 cm), sowie die gleiche Anzahl 1,5 ml Eppendorfgefäße mit je 200 μ l Maltosezellen auf 42 °C vorgewärmt. Zur Ausbringung der Phagenbibliothek, basierend auf dem temperenten Phagen Lambda, wurden 0,5 μ l der Phagenbibliothek mit 200 μ l SM-Puffer gemischt, davon jeweils 10 μ l zu den aliquotierten Maltosezellen gegeben und zur Infektion 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Hier wird die Virus-DNA in die Bakterienzelle inkorporiert und verursacht nach intrazellulärer Vermehrung die Lyse der Bakterienzellen (lytischer Zyklus). Anschließend wurde diese Mischung mit der vorbereiteten Top-Agarose gemischt und auf den LB-Agarplatten gleichmäßig verteilt und nach Festwerden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die stark lysierten Bakterien-Platten wurden jetzt auf 4 °C abgekühlt.

SM-Puffer: 5,8 g NaCl
 2 g MgSO₄ x 7 H₂O
 50ml 1 M Tris/HCl (pH 7,5)
 0,01 % Gelatine
 pro 1 l H₂O

II. Übertragen der Lambda-DNA auf Membranfilter:

Es wurde auf jede Agarplatte ein Nitrocellulosefilter aufgelegt und die Orientierung markiert. Nach einer Minute wurde der Filter vorsichtig abgenommen und im Schüttelbad in den entsprechenden Puffern für eine Minute denaturiert, fünf Minuten neutralisiert und weitere fünf Minuten in 2 x SSC-Puffer gewaschen. Bakterienzellreste wurden im Gegensatz zur Phagen-DNA von den Filtern gewaschen. Nach Trocknung der Filter wurden sie zur irreversiblen Bindung der DNA an die Filter eine Stunde bei 80 °C inkubiert. Zur Identifizierung bestimmter Phagenbibliothekklone wurden die Filter mit einer für das gesuchte Gen spezifischen radioaktiv markierten DNA-Probe hybridisiert und ein Röntgenfilm exponiert.

Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl Neutralisierungspuffer: 1,5 M NaCl
 0,5 M NaOH 0,5 M Tris/HCl (pH 8,0)

III. Identifizierung und Reinigung von positiven Lambda Klonen:

Die Stellen der Phagenplatten, die ein Signal auf dem exponierten Röntgenfilm verursachten, wurden herausgestochen und über Nacht in 1 ml SM-Puffer bei 4 °C inkubiert. Die Phagen diffundieren so in den Puffer. 500 µl dieser Phagenlösung wurden mit 100 µl Maltosezellen gemischt und wie unter I. beschrieben auf Agarplatten (Ø 9 cm) mit 4 ml Top-Agarose ausgebracht. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden wiederum Filterabzüge dieser Platten hergestellt und anschließend hybridisiert. Die Stellen der Phagenplatten, die erneut ein Signal verursachten wurden über Nacht wieder in 1 ml SM-Puffer inkubiert. Zuletzt wurde eine 1/1000 Verdünnung dieser Phagenlösung ausplattiert. Um von Einzelphagenklonen ausgehen zu können, sollte diese Verdünnung so gewählt sein, daß möglichst nur einzelne Phagenplaques auf den Platten zu erkennen sind. Nach Herstellung von Filterabzügen dieser Platten und folgender Hybridisierung wurden die durch die radioaktive DNA-Probe markierten Einzelphagenplaques aus dem Agar gestochen und in 500 µl SM-Puffer überführt.

IV. *In vivo* Konvertierung der Phagen-DNA in Plasmide und Präparation:

Die vereinzelt Phagenklone wurden zunächst in ihre lysogene Form konvertiert. Dabei wird die Phagen-DNA in das *E. coli* Wirtsgenom eingebaut und mit jeder Zellteilung von Generation zu Generation weitergegeben. Die DNA der Bibliotheksphagen enthält Sequenzen des pBluescript® SK(-) Phagemidvektors flankiert von der Initiationsstelle und Terminationsstelle der DNA-Synthese. Bei gleichzeitiger Infektion von *E. coli* Zellen mit λZAP II Phagen und dem f1 Helferphagen wird durch von den f1 Phagen kodierten Proteinen ein einzelsträngiger DNA-Abschnitt der λ-DNA zwischen Initiations- und Terminationsstelle synthetisiert und zyklisiert. Diese DNA enthält die pBluescript® Vektorsequenz zusammen mit der *D. discoideum* cDNA. Dazu wurden je 200 µl Maltosezellen (OD₆₀₀ = 1) mit 25 µl bzw. 250 µl Phagenlösung (ca. 10⁶ pfu/ml) und 1 µl R408 Helferphage (10¹¹ pfu/ml) 15 Minuten bei 37 °C und 250 UpM inkubiert. Anschließend wurden jeweils 5 ml LB-Medium zugeben, nochmals für drei Stunden inkubiert und abschließend 20 Minuten bei 70 °C inkubiert. Der nach Zentrifugation bei 3.000 x g für 10 Minuten resultierende Phagemidstock wurde wieder mit 200 µl Maltosezellen und 10 µl einer 1/10 bzw. 1/100 Verdünnung des Phagemidstocks 15 Minuten bei 37 °C und 250 UpM inkubiert. 100 µl dieser Mischung wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, die als Selektionsmarker 100 µg/ml Ampicillin enthielten. Nach Inkubation über Nacht wurden die entsprechenden Bakterienkolonien sichtbar.

2.2.3 Proteinchemische und immunologische Techniken

2.2.3.1 Peptidsynthese

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide (Tabelle 2.2.1) wurden vom Servicelabor des ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) von Dr. M. Macht hergestellt und gereinigt.

Peptidbezeichnung	Peptidsequenz
N111-131	NDLNHPNEFVRGSTLRFLCKL
CP 482-506	NDLEELLKPKQTEEVILETKAKVKI
C 803-823	FRNHWLEFEWENKIPVNTNI

Tabelle 2.2.1: Peptidsequenzen der zur Immunisierung verwendeten Peptide

2.2.3.2 Kopplung der synthetischen Peptide an das Trägerprotein Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) durch Glutaraldehyd

Peptide sind zu klein um sie zur Immunisierung zu verwenden. Deshalb ist es nötig sie an eine Trägersubstanz zu koppeln. Grundlage der hier verwendeten Methode ist die Fähigkeit von Glutaraldehyd, Peptide und spezielle Trägersubstanzen über ihre Aminogruppen quer zu vernetzen. Hier wurde KLH (Sigma) als Trägersubstanz verwendet.

Zur Kopplung wurden jeweils 5 μmol Peptid und 25 mg lyophilisiertes KLH Puder (entspricht 5 mg KLH-Protein) in 1 ml 0,1 M Boratpuffer (pH 10,0) in einem Glasröhrchen (Corex) gelöst. Nun wurde unter vorsichtigem Rühren (Schaumbildung vermeiden) langsam 500 μl 0,3 %iges Glutaraldehyd (in 0,1 M Boratpuffer pH 10,0) zupipettiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Die Lösung verfärbte sich in allen drei Kopplungsreaktionen gelb, ein Zeichen für gute Kopplungseffizienz. Zum Abstoppen der Kopplungsreaktion wurde dann 125 μl 1 M Glycin zugegeben und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zuletzt wurde das Peptid-Protein-Konjugat über Nacht gegen 5 l 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,3) dialysiert und bis zur Immunisierung bei 4 °C gelagert.

2.2.3.3 Herstellung monoklonaler Anti-Peptid-Antikörper

2.2.3.3.1 Immunisierung der Balb/C Mäuse

Es wurden zwei Balb/C Mäuse mit den an KLH gekoppelten Peptiden immunisiert (2.2.3 und 2.2.3.2). Die Immunisierung erfolgte mit dem ImmunEasy Mouse Adjuvant der Firma Qiagen zweimal im Abstand von drei Wochen. Zur Immunisierung wurden 100 µl Adjuvants mit jeweils 33 µl von jedem gekoppelten Peptid verwendet und je 100 µl pro Hinterlauf der Maus injiziert (ca. 10 µl Adjuvant/1 µg Antigen). Eine letzte Nachinjektion erfolgte drei Tage vor der Milzzellfusion.

2.2.3.3.2 Herstellung von Hybridomazellen

Hybridomazellen gewinnt man durch die Fusion von Milzzellen (B-Lymphozyten) mit Myelomazellen (Köhler und Milstein, 1976). Dies ist notwendig, um die Eigenschaft der B-Lymphozyten, die Fähigkeit zur Antikörperproduktion, mit der Fähigkeit zur unbegrenzten Teilungsfähigkeit der Myelomazellen zu vereinigen. Um die resultierenden Hybridomazellen selektionieren zu können, werden Myelomazelllinien verwendet, die keine Hypoxanthinphosphoribosyltransferase zur Purinsynthese über Hypoxanthin (HPRT) besitzen. Die de novo Synthese ist durch Aminopterin blockiert. So sterben sie in einem Kulturmedium, das mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin supplementiert ist. Im Gegensatz dazu können Milzzellen das HPRT-Enzym synthetisieren, so daß in entsprechendem Selektionsmedium nur fusionierte Hybridomazellen sich vermehren können.

Die stark vergrößerten Milzen der beiden Mäuse wurden steril präpariert und in je 5 ml kaltem RPMI 1640-Medium (*Gibco*) aufgenommen. Die von Bindegewebe befreiten Milzen wurden noch zweimal mit 5 ml Medium gewaschen, bevor sie mit steriler Schere und Dumont-Pinzette grob zerkleinert wurden. Zur weiteren Zerlegung der Milzen und Abtrennung grober Partikel wurden diese durch eine Spritze mit Watte schonend filtriert. Die Watte wurde nochmals gespült, und die Milzzellsuspension im Glashomogenisator weiter vorsichtig zerlegt. Die Zellen wurden bei 1.500 UpM, 5 Minuten bei 4 °C (Beckmann-Zentrifuge) pelletiert, zweimal mit serumfreien RPMI-Medium gewaschen und dann in 10 ml RPMI-Medium ohne HEPES-Puffer (RPMIoH) resuspendiert. Jeweils die Hälfte wurde mit zwei unterschiedlichen Myelomastämmen fusioniert, zum einen mit dem Stamm x68-Ag8.6538 zum anderen mit dem Stamm PAIB₃ag81. Dafür wurde von beiden Mäusen die Hälfte der jeweiligen Milz (ca. 5×10^7 Zellen) in 5 ml RPMIoH-Medium und $2,5 \times 10^7$ Myelomazellen in RPMIoH-Medium gemischt und zentrifugiert (Beckmann, 1.500 UpM, 5 Minuten, 4 °C). Das Pellet wurde mit einer zugeschmolzenen

Pasteurpipette in der Spitze des Reaktionsgefäßes möglichst gut ausgebreitet, mit 0,5 ml PEG 4000 (PEG solution ready to use, Sigma) gemischt und exakt eine Minute unter vorsichtigem Schwenken im 37 °C Wasserbad inkubiert. Nach einer weiteren Minute Inkubation bei Raumtemperatur wurden tropfenweise 10 ml RPMIoH-Medium zugegeben, anschließend zehn Minuten auf Eis inkubiert und die fusionierten Zellen abzentrifugiert. Das Pellet einer jeden Fusion wurde in 250 ml Normalmedium resuspendiert und zu 500 µl Aliquots auf 20 Costarplatten gegeben. Am Vortag wurde in jedes Loch 500 µl Makrophagensuspension vorgelegt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit wurde in jedes Loch 500 µl dreifach konzentriertes HAT-Selektionsmedium gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte je nach Wachstumsschnelligkeit der Zellen ein- bis dreimal die Woche. Nach 14 Tagen wurde das HAT-Medium durch HA-Medium ersetzt und nach weiteren zwei Wochen die Selektion beendet.

Normalmedium:	500 ml	RPMI 1640 mit Hepes und Glutamin
	55 ml	fetales Kälberserum
	5,5 ml 200 mM	L-Glutamin
	5,5 ml	Kanamycinlösung (Gibco)
	5,5 ml 10 ⁻³ M	β-Mercaptoethanol
3 x HAT-Medium:	571,5 ml	Normalmedium
	16,5 ml	HAT-Stocklösung
	16,5 ml	Aminopterinstocklösung
1 x HAT-Medium:	571,5 ml	Normalmedium
	5,5 ml	HAT-Stocklösung
	5,5 ml	Aminopterinstocklösung
HAT-Stocklösung:	1 x 10 ⁻² M	Hypoxanthin
	1,6 x 10 ⁻³ M	Thymidin
Aminopterinstocklösung:	4 x 10 ⁻⁵ M	Aminopterin

2.2.3.3.3 Isolierung von Makrophagen

Zur Makrophagenpräparation wurden insgesamt 12 Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden durch Genickdislokation getötet und ihr Peritonealraum durch eine Spritze mit 3 x 10 ml Normalmedium gespült. Die vereinigten Makrophagenspülfraktionen wurden anschließend zentrifugiert (Beckmann, 1.000 UpM ohne Bremse, 5 Minuten, 4°C) und weitere zweimal mit Normalmedium gewaschen. Die Makrophagen wurden in 500 ml HAT-Medium resuspendiert und zu 500 µl auf 20 Costarplatten aliquotiert. Zur Subklonierung von Hybridomazellen wurden Makrophagen einer Maus in 10 ml Normalmedium aufgenommen.

2.2.3.3.4 Test der Überstände mittels ELISA (Enzyme Linked Immunoassay), Western-Blot und Immunfluoreszenz

Sobald einzelne Zellplaques in den Löchern der Costarplatten sichtbar wurden und das Medium sich gelblich verfärbte, sollte der Antikörpertiter des Überstandes genügen, um ihn für erste Antigenizitätstests im ELISA zu verwenden. Die Gelbfärbung (Farbumschlag durch zugesetzten Indikator) im Medium ist auf eine Ansäuerung des Mediums durch Stoffwechselprodukte zurückzuführen. Für den ELISA wurden Mikrotiterplatten mit je 1 µg von jedem Peptid (in Voller's-Puffer) als Antigen beschichtet. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde eine Stunde in Blockierungspuffer (4 % Milchpulver oder 1 % BSA in PBS/Triton-Puffer) und anschließend eine Stunde mit 100 µl jeweiligem Antikörperüberstand inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Triton-Puffer wurde 45 Minuten mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem sekundärem Ziege-anti-Maus-Antikörper inkubiert. Nach dreimaliger Waschung erfolgte die Substratumsetzung mittels p-Nitrophenyl-Phosphat (Sigma Fast™ Tabletten, Sigma). Dieses farblose Substrat wird durch die alkalische Phosphatase in gelbes p-Nitrophenol umgewandelt. Die Umsetzung des Substrats wurde nach 20 Minuten durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Meßgerät ermittelt. Überstände, die eine größere Extinktion als 0,2 hervorriefen wurden weiter im Western-Blot getestet.

Für den weiteren Test der ELISA positiven Überstände im Western-Blot (2.2.3.5) wurden Nitrocellulosestreifen (3-5 mm breit), auf die im SDS-Gel (2.2.3.4) aufgetrennter Proteinextrakt von COP-GFP-Zellen oder Ax2 Wildtyp-Zellen transferiert wurde, mit 500 µl der Überstände über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit NCP-Puffer wurde für eine Stunde mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper als sekundärem Antikörper inkubiert. Die Streifen wurden wiederum in NCP-Puffer gewaschen. Positive Überstände zeigten sich als Bande durch Chemilumineszenz nach Substratumsetzung auf dem exponierten Röntgenfilm. Im Falle von Ax2 Wildtypzellen sollte eine Band bei 100 kDa erkannt werden, im Falle von COP-GFP-Zellen eine Doppelbande bei 100 kDa und 120 kDa. Zuletzt wurden die Klone mittels Immunfluoreszenz getestet (2.2.4.1).

Voller's-Puffer (pH 9,6):	1,59 g	Na ₂ CO ₃	PBS/Triton-Puffer (pH 7,4):	8 g	NaCl
	2,93 g	Na HCO ₃		0,2 g	KCl
				1,15 g	Na ₂ HPO ₄
				0,2 g	KH ₂ PO ₄

2.2.3.3.5 Subklonierung von Hybridomazellen

Dieses Verfahren dient der Vereinzelung von Hybridomazellen, um sicher von einem monoklonalen Antikörper ausgehen zu können. Hierfür wurden Tropfen verdünnter Zellen mit einer ausgezogenen Pasteurpipette in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Vertiefungen, die nur eine Zelle enthielten, wurden dann mit einer Makrophagensuspension aufgefüllt und weitere ca. zehn Tage bei 37 °C inkubiert. Angewachsene Einzelklone wurden wieder mit ELISA, Western-Blot und in der Immunofluoreszenz getestet. ELISA-positive Klone wurden zunächst auf Costarplatten übergeimpft und zum Sammeln größerer Hybridomaüberstandmengen anschließend in Gewebekulturflaschen (5 ml, 15 ml, 50 ml) überführt. Zum Sammeln der Hybridomaüberstände wurde ca. 3 x wöchentlich der Überstand der Kulturflaschen abgenommen. Verbliebene Zellen wurden durch Zentrifugation (*Beckman*, 1.500 UpM, 5 Minuten, 4 °C) aus dem Überstand getrennt. Die Überstände wurden bei 4 °C oder -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.3.6 Konservierung der Hybridomaklone

Zur Konservierung von Hybridomaklonen wurden dichtgewachsene Zellen einer 15 ml bzw. 50 ml Kultur geerntet und je nach Menge der Zellen in 2 - 6 ml Einfriermedium resuspendiert. 1 ml Aliquots (in 2,2 ml Nunc-Einfrierröhrchen) wurden vom Eis in einen isolierenden Styroporbehälter überführt und für mindestens 24 Stunden bei -80 °C inkubiert. So ist eine langsame Abkühlung der Zellen gewährleistet. Anschließend wurden die Zellen in einen Stickstofftank gebracht.

Um die konservierten Zellen wiederum heranzuziehen, wurden diese im 37 °C Wasserbad aufgetaut und die Zellen mit 10 ml Normalmedium verdünnt. Die Zellen wurden dann geerntet (*Beckman*, 1.500 UpM, 5 Minuten, 4 °C), zunächst in 1 ml Normalmedium resuspendiert und über Nacht im 37 °C Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung bereits verdünnt.

Einfriermedium:	70 ml	RPMI mit Hapes und L-Glutamin
	20 ml	fötales Kälberserum
	12 ml	DMSO
	1 ml 10 ⁻³ M	β-Mercaptoethanol

2.2.3.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Die Größenauftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde unter denaturierenden Bedingungen in 8 bis 15 %igen Trenngelen durchgeführt. Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden je nach Bedarf mit unterschiedlichen Mengen 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. In der Regel wurden 10 – 20 µl Zellextrakt in jede Probentasche geladen (1 x 10⁶ Zellen/10 µl SDS-Probenpuffer). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung zwischen 120 und 180 V. Als Größenstandard wurde ein Gemisch definierter Proteingrößen verwendet.

5 x SDS-Probenpuffer:	2,5 ml	1M	Tris/HCl (pH 6,5)
	4 ml	10 %	Natriumdodecylsulfat
	2 ml		Glycerin
	1 ml	14,3 M	β-Mercaptoethanol
10 x SDS-Page-Laufpuffer:	200 µl		Bromphenolblau
	0,25 M		Tris
	1,9M		Glycin
Molekülmassenstandards:	1 %		Natriumdodecylphosphat
			LMW-Marker (Pharmacia) [kDa]: 94; 67; 43; 30; 20,1; 14,4
			HMW-Marker (Pharmacia) [kDa]: 212; 170; 116; 76; 53
			Prestained-Marker (BioRad) [kDa]: 250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 15; 10

2.2.3.5 Western-Blot-Analyse

Die Übertragung von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen wurde sowohl mittels Naß-Transfer-Verfahren (Proteine > 80 kDa) als auch Halbtrocken-Transfer-Verfahren durchgeführt (Proteine < 80 kDa). Vorteil des Halbtrocken-Transfer-Verfahren ist die kurze Transferdauer (30 – 45 Minuten, 10 V) und geringer Pufferverbrauch im Vergleich zum Naß-Transfer-Verfahren (mind. 14 Stunden, 20 V, 4 °C), das besonders für größere Proteine eine wesentlich bessere Transfereffizienz besitzt.

Zur Größenmarkierung des Proteinstandards, sowie zu Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran mit Ponceau-Lösung (*Sigma*) gefärbt und anschließend wieder mit Wasser entfärbt.

Western-Blot-Puffer:	25 mM	Tris
	190 mM	Glycin
	20%	Methanol

2.2.3.6 Immunmarkierung von Western-Blots (Towbin et al., 1979; Blake et al., 1984)

Zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen wurden Nitrocellulose-Membranen nach dem Protein-Transfer zunächst mindestens zwei Stunden mit 4 % Magermilchpulver in NCP-Puffer (*Heirler*) inkubiert. Bevor die Membran dann mit dem entsprechenden primären Antikörper (1 bis 14 Stunden) inkubiert wurde, wurde sie kurz in NCP-Puffer gewaschen. Nach Waschen für 5 x 5 Minuten mit NCP-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper als sekundärem Antikörper (1 Stunde, 1:10000 in NCP Puffer/4 % Milchpulver). Weiteres fünfmaliges Waschen mit NCP-Puffer entfernt nichtgebundene Antikörper. Die Detektion dieser Immunmarkierung erfolgte mittels Chemilumineszenz. Diese entsteht über Oxidation von Luminol durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase. Dies führt zu einer Lichtreaktion bei 430 nm, die zu einer Schwärzung des Röntgenfilms an den entsprechenden Stellen führt. Die Membran wurde zwei bis drei Minuten in Luminol inkubiert und ein Röntgenfilm für 10 Sekunden bis 30 Minuten exponiert.

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

2.2.3.7 Coomassie-Färbung (Neuhoff et al., 1985)

Zur Färbung der aufgetrennten Proteine wurden SDS-Gele 15 Minuten in Färbelösung geschüttelt. Die nicht an Proteine gebundenen Farbstoffpartikel wurden durch Schütteln in Entfärbelösung entfernt.

Färbelösung:	0,1 % (w/v)	Coomassie-Brilliant-Blau R 250
	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
		vor Gebrauch filtrieren

Entfärbelösung:	10 % (v/v)	Ethanol
	7 % (v/v)	Essigsäure

2.2.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Proteinextrakten erfolgte mit Hilfe des Bradford-Proteinfärbereagenzes von *Sigma*. Durch die Bindung von Coomassie-Brilliant-Blau G 250 an Proteine wird das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 596 nm verschoben. Dabei ist die Höhe der Absorption proportional zur Proteinkonzentration. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte immer im Vergleich zu einer BSA-Eichkurve. Die Extinktion des Protein-Farbstoffgemischs wurde jeweils nach fünf Minuten bei 596 nm im Photometer gemessen. Es wurde immer 1 ml des Bradford-Reagenzes mit unterschiedlichen Volumina des jeweiligen Proteinextraktes im allerdings gleichen Endvolumen verwendet. Das Volumen des verwendeten Proteinextraktes hing von der darin enthaltenen Proteinmenge ab.

2.2.3.9 Western-Blot-Stripping

Durch diese Methode wurden primärer und sekundärer Antikörper von einer zuvor zur Immunodetektion verwendeten Western-Blot-Membran entfernt. Dafür wurde die Membran 30 Minuten bei 50 °C in Stripping-Puffer geschüttelt und anschließend zweimal mit NCP-Puffer gewaschen. Die Membran stand nun zur Probung mit einem anderen primären Antikörper zur Verfügung.

Stripping-Puffer: 100 mM β -Mercaptoethanol
 2 % Natriumdodecylsulfat
 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,7)

2.2.3.10 Herstellung eines „Protein-timecourse“

Für einen „Protein-timecourse“ wurden 1×10^8 Zellen je Phosphatagarplatte ausgebracht (2.2.1.6). Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 10 ml eiskaltem Soerensen-Phosphat-Puffer geerntet, wieder in 10 ml Soerensen-Phosphat-Puffer resuspendiert, zu 1 ml aliquotiert und nach erneuter Pelletierung der Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei -80 °C. Bei Verwendung dieser Aliquots für ein SDS-PAGE wurden diese in 100 μ l SDS-Probenpuffer resuspendiert (2.2.3.4).

2.2.3.11 Phagosomenisolierung aus *D. discoideum* (Maniak et al., 1995)

Es wurden 150 ml einer Zellkultur mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml mit einem hundertfachen Überschuß an supermagnetischen Eisenoxid-Kügelchen (*Polysciences*) versetzt. Um eine endocytotische Aufnahme der Eisenpartikel zu ermöglichen, wurden die Zellen bei 21°C, 160 UpM für zehn Minuten geschüttelt. Zur Beendigung des Endocytoseprozesses wurden die Zellen sofort auf Eis gekühlt. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Zur Entfernung der nicht aufgenommenen Eisenkügelchen wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation für vier Minuten bei 720 x g. Das resultierende Zellpellet wurde in 5 ml Homogenisationspuffer aufgenommen. Anschließend erfolgt der Zellaufschluß durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff. Die Phagosomen wurden durch fünfzehnminütige magnetische Extraktion gewonnen und dreimal mit Homogenisationspuffer gewaschen. Von jedem Überstand wurde ein Aliquot zur Bestimmung des Proteingehalts entnommen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die extrahierte Fraktion geteilt. Die beiden Teile wurden bei maximaler Umdrehungszahl in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Zur Bestimmung des Proteingehalts mittels des Bradford-Reagenz wurde der eine Teil in 100 µl Lysispuffer aufgenommen und fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Der andere Teil wurde in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, fünf Minuten auf 95°C erhitzt, und anschließend im SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

Homogenisationspuffer: 88 mM	Saccharose	Lysispuffer: 20 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
30 mM	Tris/HCl (pH 8,0)	5 mM	Benzamidin
2 mM DTT	1 mM DTT	0,5 mM	PMSF
5 mM	Benzamidin	10 mM	EDTA (pH 7,2 mit NaOH)
0,5 mM	PMSF		
4 mM EGTA	(pH 8,0 mit NaOH)		

2.2.3.12 Saccharosegradientfraktionierung von *D. discoideum* Proteinextrakten

Zur Saccharosegradientfraktionierung wurde ein 6 ml Gradient verwendet, dessen 1 ml Fraktionen sich von unten nach oben aus 2,49 M, 1,45 M, 1,32 M, 1,17 M, 1,02 M und 0,88 M Saccharose zusammengesetzt haben. Es wurden dafür 9×10^8 Zellen geerntet, zweimal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen und in 3 ml kaltem Hapes-Puffer resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen durch viermalige Passage eines Nucleopore-Filters geöffnet (Porendurchmesser 5 µm). Die Lyse der Zellen wurde am Mikroskop kontrolliert. Durch Zentrifugation bei 15.000 x g, 30 Minuten, 4 °C erfolgte eine

Fraktionierung in cytosolische und membrangebundene Proteine. Der Überstand wurde verwahrt ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) und das Pellet in 1,5 ml Hepes-Puffer resuspendiert. Diese Pellet-Fraktion wurde auf den vorbereiteten Saccharosegradienten geladen und 18 Stunden bei $100.000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen wurden abgenommen und bis zur weiteren Analyse im Western-Blot bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Hepes-Puffer:10mM	Hepes (pH 7,4)
2 mM	Benzamidin
0,5 mM	PMSF
1 mM	DTT
pro 15 ml	1 Tablette Complete [®] Inhibitoren Cocktail

2.2.3.13 Immunpräzipitation des GFP- β -COP Fusionsprotein unter Einfluß von GTP γ S und Aluminiumfluorid aus *D. discoideum* Extrakten

Für diesen Versuch sollte die Ausgangszellkultur eine Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml nicht überschritten haben. 30×10^6 Zellen wurden geerntet und einmal in Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen und in 3 ml $0,33 \times$ PBS resuspendiert. Diese 3 ml Zellsuspension wurden gedrittelt, ein Drittel mit $20\text{ }\mu\text{l}$ 100 mM GTP γ S und ein Drittel mit $30\text{ }\mu\text{l}$ 1 M Natriumfluorid (Endkonzentration 30 mM) und $5\text{ }\mu\text{l}$ 10 mM Aluminiumchlorid (Endkonzentration $50\text{ }\mu\text{M}$) versetzt. Das letzte Drittel wurde als Kontrolle mit keinen Zusätzen versetzt. Die Zellen wurden nun durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff geöffnet. Die Qualität der Zellyse wurde am Mikroskop kontrolliert. Nach zehn Minuten Inkubation auf Eis wurde die cytosolische Fraktion durch Zentrifugation ($10.000 \times g$, 5 Minuten, 4°C) von der Membranfraktion getrennt. Die Pellets wurden in je $150\text{ }\mu\text{l}$ $0,33 \times$ PBS/ 1% Triton resuspendiert und weitere drei Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von $150\text{ }\mu\text{l}$ $0,33 \times$ PBS wurde zehn Minuten, $10.000 \times g$ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Sowohl $300\text{ }\mu\text{l}$ von diesem Überstand als auch $300\text{ }\mu\text{l}$ des cytosolischen Überstands wurden mit je $100\text{ }\mu\text{l}$ monoklonalem K3-184-2 anti-GFP-Antikörper versetzt und eine Stunde unter Rotation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nun wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ ProteinA-Sepharose (1:5 in $0,33 \times$ PBS) zugegeben und weitere zwei Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ rotiert. Die ProteinA-Sepharose wurde durch Zentrifugation ($2.000 \times g$, 2 Minuten, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in $50\text{ }\mu\text{l}$ SDS-Probenpuffer aufgenommen. Davon wurden jeweils $20\text{ }\mu\text{l}$ zur Analyse im Western-Blot verwendet (2.2.3.5).

0,33 x PBS:	3,3 ml	PBS
	$100\text{ }\mu\text{l}$	$0,1\text{ M}$ PMSF
	1 Tablette	Complete [®] Inhibitoren Cocktail

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von *D. discoideum*

Mit Hilfe dieser Methode läßt sich die intrazelluläre Verteilung bestimmter Proteine in fixierten Zellen nachweisen. Dabei wurden spezifische Proteine mit ihren korrespondierenden Antikörpern markiert. Der Nachweis erfolgte dann indirekt, indem der erste Antikörper mit einem fluoreszierenden zweiten Ziege-anti-Maus-Antikörper markiert wurde, der bei Anregung mit bestimmten Wellenlängen eine sichtbare Fluoreszenz verursacht. Zellkerne wurden durch 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) markiert.

In den durchgeführten Immunfluoreszenzstudien wurden vegetative oder für sechs Stunden in Soerensen-Phosphat-Puffer entwickelte Zellen verwendet. Vegetative Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml angezogen, geerntet (4 Minuten, $780 \times g$, $4^\circ C$), einmal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen und auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Entwickelte Zellen wurden wie in 2.2.1.5 beschrieben vorbereitet und zur Fixierung zum entsprechenden Zeitpunkt auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Es wurden jeweils $300 \mu l$ dieser Zellsuspension je Deckgläschen ($\varnothing 18 \text{ mm}$) verwendet. Nach zehnmütigem Absitzen wurden die Zellen in der Regel für zehn Minuten bei $-20^\circ C$ in Methanol fixiert. Zum Teil wurde aber auch mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixiert. Für die letztere Fixierungstechnik wurden die Zellen auf dem Deckglas mit je $300 \mu l$ Paraformaldehyd/Pikrinsäure Lösung überschichtet und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fixierungslösung wurde dann durch 10 mM PIPES ersetzt und fünf Minuten inkubiert. Die folgenden Schritte der beiden unterschiedlichen Methoden waren wieder identisch. Die Deckgläser wurden 4×5 Minuten mit PBS/Glycin gewaschen und zur Vermeidung unspezifischer Bindungen 2×15 Minuten mit PBG inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte dann für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur. Verlängerte Inkubationszeiten bis zu 16 Stunden wurden bei $4^\circ C$ durchgeführt. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurde nun 6×5 Minuten mit PBG gewaschen. Anschließend wurde mit dem Cy3 gekoppelten sekundären Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000 in PBG) und DAPI ca. eine Stunde inkubiert (1:1.000 in PBG). Nach 2×5 Minuten Waschung mit PBG und 3×5 Minuten Waschung mit PBS/Glycin wurden die Deckgläschen vorsichtig mit Wasser gespült und zuletzt in Gelvatol eingebettet und zur Aushärtung über Nacht bei $4^\circ C$ aufbewahrt.

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

PBS/Glycin:	50 mM	Glycin in 1 x PBS
Gelvatol:	20 g 40 ml	Gelvatol 20 – 30 (Polyvinylglykol, MW 10.000) Glycerin in PBS 16 Stunden rühren 15 Minuten bei 12.000 x g zentrifugieren
	25 ng/ml	DABCO (Langanger et al., 1983) Lagerung in Aliquots zu 1 ml bei –20 °C
Paraformaldehyd/	0,4 g	Paraformaldehyd
Pikrinsäure:	7 ml	Wasser mit NaOH bei 40 °C lösen
	10 ml 20mM	PIPES (pH 6)
	3 ml	gesättigte Pikrinsäure

2.2.4.2 Fluoreszenzuntersuchungen an lebenden GFP- β -COP exprimierenden *D. discoideum* Zellen

Zur Fluoreszenzuntersuchung an lebenden *D. discoideum* Zellen wurden Zellen mit einer Ausgangszelldichte von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml geerntet, einmal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen und auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml gebracht. Davon wurden 200 μ l auf ein gerahmtes und abgedichtetes Deckgläschen gegeben, zehn Minuten absitzen gelassen und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop studiert.

2.2.4.3 Phagozytose von Hefezellen

Zur Phagozytose wurden sowohl unmarkierte als auch fluoreszenzmarkierte YSC-Hefen (*Sigma*) verwendet. Die fluoreszenzmarkierten Hefen wurden entsprechend der Vorschrift des EMBO Course, Juli 3-15, 1994 vorbereitet. Dafür wurden 5 g dieser Hefen in 50 ml PBS dreißig Minuten bei 95 °C unter Schütteln inkubiert, fünfmal mit PBS und zweimal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Die Hefen wurden zuletzt auf eine Zelldichte von 1×10^9 Zellen/ml eingestellt und zu 1 ml Aliquots bei –20 °C aufbewahrt. Zur Fluoreszenzmarkierung wurden davon 2×10^{10} Zellen in 20 ml 50 mM Na_2HPO_2 (pH 9,2), die 2 mg TRITC enthält, resuspendiert und 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Zellen zweimal mit Natriumhydrogenphosphat-Puffer und viermal mit Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Aliquots von 1×10^9 Zellen/ml wurden in Soerensen-Phosphat-Puffer bei –20 °C gelagert. Mit dieser Methode lassen sich auch FITC-markierte Hefezellen herstellen.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung wurden 300 μ l einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml nach Waschen mit Soerensen-Phosphat-Puffer auf ein Deckglas

gegeben, mit 30 µl markierten bzw. unmarkierten Hefen versetzt und ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben mit Methanol fixiert. Gegebenenfalls wurde auch eine indirekte Immunfluoreszenzuntersuchung durchgeführt.

2.2.4.4 DMSO-Behandlung von GFP-β-COP exprimierenden *D. discoideum* Zellen und Ax2-Zellen (nach Yumura und Fukui, 1983; Weiner et al., 1993)

GFP-β-COP exprimierende *D. discoideum* Zellen wurden auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in Soerensen-Phosphat-Puffer eingestellt. Davon wurden jeweils 300 µl für 15 Minuten auf einem Deckgläschen absitzen gelassen. Zur Auflösung des Aktin-Netzwerks wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 0, 5, 10, 20, 30, 40 und 50 Minuten in 5 % DMSO/Soerensen-Phosphat-Puffer inkubiert. Die DMSO behandelten Zellen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten sofort in Methanol fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt (2.2.4.1). Die Dokumentation erfolgte mit dem konfokalen Laser-Scan Mikroskop.

2.2.4.5 Behandlung von *D. discoideum* Zellen mit Brefeldin A

GFP-β-COP exprimierende *D. discoideum* Zellen und Ax2-Zellen wurden auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt, mit Brefeldin A bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt und sechs Stunden bei 21 °C geschüttelt (160 UpM). Brefeldin A mußte in Methanol gelöst werden. Um auszuschließen, daß das Lösungsmittel Methanol einen Einfluß besitzt, wurde jeweils auch eine Kultur nur mit Methanol als Kontrolle angesetzt. 300 µl dieser Zellsuspension wurden nun auf Deckgläser pipettiert, absitzen gelassen, fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenz (2.2.4.1) mit dem monoklonalen Antikörper 190-340-3 durchgeführt.

2.2.4.6 Identifizierung der Mitochondrien mittels des MitoTrackers® in Immunfluoreszenzen

Der Zellmembran permeierende MitoTracker® Red CMXRos (*Molecular Probes*) ist ein Thiol-reaktives Chlormethylderivat von X-Rosamin, akkumuliert in Mitochondrien und markiert sie auf diese Weise bei Anregung (579 nm) durch seine Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich (599 nm). In der Zelle wird der Mitrotracker oxidiert in die Mitochondrien transportiert, reagiert dort mit den Thiolgruppen von Peptiden und Proteinen und bildet so ein fixierbares Konjugat.

Es wurden 300 µl Zellen einer *Dictyostelium*-Kultur mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml auf einem Deckglas absitzen gelassen, für 30 Minuten bei einer Endkonzentration von 250 nM und 500 nM MitoTracker[®] (1mM Stocklösung in DMSO) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für zehn Minuten in Methanol fixiert (2.2.4.1). Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde überprüft, ob eine Überlagerung der durch den monoklonalen Antikörper K17-559-3 markierten Strukturen und der durch den MitoTracker[®] markierten Strukturen zu beobachten war.

2.2.4.7 Hyper- und hypoosmotischer Schock

Es wurden jeweils 300 µl einer *Dictyostelium*-Kultur (GFP-β-COP exprimierende Zellen und Ax2-Zellen) mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml Ax2-Medium eine Stunde auf einem Deckglas inkubiert. Für den hyperosmotischen Schock wurde das Medium durch 0,4 M Sorbitol/Soerensen-Phosphat-Puffer ersetzt und die Zellen nach 30 Sekunden, einer Stunde und zwei Stunden für zehn Minuten bei -20 °C in Methanol fixiert. Nach zwei Stunden erfolgte ein hypoosmotischer Schock, indem die Sorbitol-Lösung 1:10 verdünnt wurde. Die entsprechenden Deckgläschen wurden ebenfalls fixiert.

Für den hypoosmotischen Schock wurde das Medium auf den Deckgläschen durch Wasser ersetzt und die Zellen zu den Zeitpunkten 30 Sekunden, 1 Stunde und 2 Stunden in Methanol fixiert. Abschließend wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt.

2.2.4.8 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde das Fluoreszenzmikroskop DMR der Firma Leica mit der PCO CCD Imaging Software sowie ein Leica MZ FLIII Stereomikroskop mit der Diskus Software von C. H. Hilgers verwendet.

Für die konfokale Laserscanmikroskopie wurde das CLSM-SP-Mikroskop der Firma Leica verwendet. Es ermöglicht optische Schnitte durch das jeweilige Präparat bei einer 63-fachen Vergrößerung (PLAPO 63x/1,32-0,6/Öl). Durch die Anregung mit einem Krypton- und Argon-Laser bei unterschiedlichen Wellenlängen werden Signale in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen emittiert. Dieser Emissionsbereich kann durch die Software eingegrenzt werden, so daß Kreuzanregungen vermieden werden. Die produzierten Daten wurden weiter mit dem Bildverarbeitungssystem der Firma Leica bearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des β -COP Gens

Die vollständige β -COP cDNA wurde durch PCR mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide, die aus der Ratten β -COP Nukleotidsequenz abgeleitet wurden, und Durchmusterung der λ ZAPII Phagenbibliothek isoliert (Mohrs et al., 2000). Der offene Leserahmen der cDNA besteht aus 2738 Basenpaaren und kodiert für ein Protein mit 912 Aminosäuren und einer theoretischen Masse von 102 kDa. Der Beginn ist durch das Startcodon ATG definiert und das Ende durch das in *D. discoideum* häufig verwendete Stopcodon TAA gegeben. β -COP wird von einem einzelnen Gen kodiert, das mit Hilfe der durch das *D. discoideum* Genomsequenzierprojekt zur Verfügung stehenden Daten auf dem Chromosom 4 identifiziert wurde.

Ein Sequenzvergleich der β -COP cDNA mit „Contig“-Sequenzen der Datenbank des *D. discoideum* Genomprojektes zeigt das Vorhandensein mindestens einer Intronsequenz in der genomischen β -COP Sequenz (Abb. 3.1.1 B). Das Vorhandensein weiterer Intronsequenzen kann nicht ausgeschlossen werden, da bisher keine vollständige „Contig“-Sequenz der genomischen β -COP Sequenz in der Datenbank existiert. Die Position des identifizierten 80 Basenpaar langen Introns beginnt an der Nukleotidposition 847 der β -COP cDNA. *D. discoideum* benutzt die gängigen „Splicing“-Erkennungsstellen GT und GA.

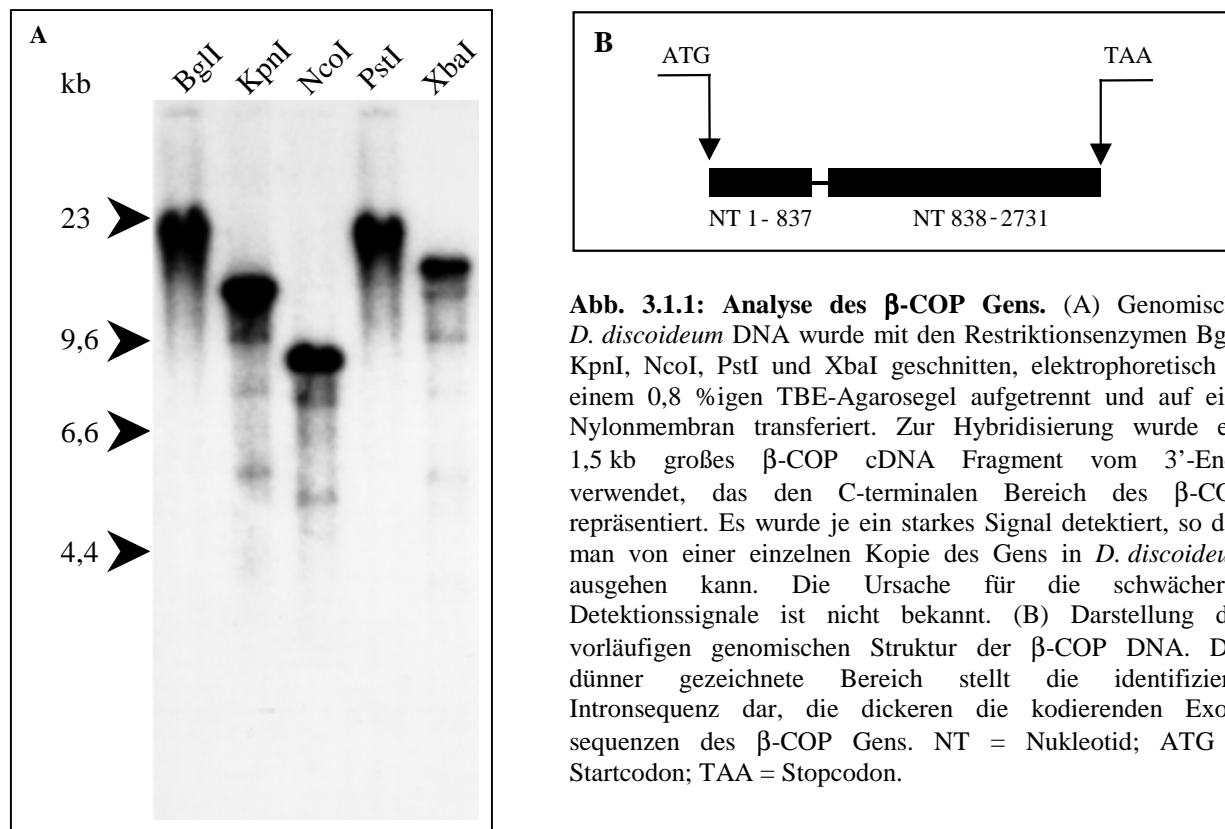


Abb. 3.1.1: Analyse des β -COP Gens. (A) Genomische *D. discoideum* DNA wurde mit den Restriktionsenzymen BglI, KpnI, NcoI, PstI und XbaI geschnitten, elektrophoretisch in einem 0,8 %igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Hybridisierung wurde ein 1,5 kb großes β -COP cDNA Fragment vom 3'-Ende verwendet, das den C-terminalen Bereich des β -COP repräsentiert. Es wurde je ein starkes Signal detektiert, so daß man von einer einzelnen Kopie des Gens in *D. discoideum* ausgehen kann. Die Ursache für die schwächeren Detektionssignale ist nicht bekannt. (B) Darstellung der vorläufigen genomischen Struktur der β -COP DNA. Der dünner gezeichnete Bereich stellt die identifizierte Intronsequenz dar, die dickeren die kodierenden Exonsequenzen des β -COP Gens. NT = Nukleotid; ATG = Startcodon; TAA = Stopcodon.

Zur Southern-Blot-Analyse wurden die Restriktionsenzyme BglI, KpnI, NcoI, PstI und XbaI verwendet, die keine Erkennungsstelle im β -COP Gen haben (Abb. 3.1.1 A). Als Hybridisierungsprobe wurde ein 1,5 kb großes β -COP cDNA Fragment vom 3'-Ende eingesetzt. Jede Spur zeigt ein starkes Signal, was das Vorhandensein lediglich einer Kopie des β -COP Gens bestätigt.

3.2 Analyse β -COP spezifischer RNA während des Entwicklungszyklus von *D. discoideum*

D. discoideum Amöben differenzieren unter Nahrungsentzug und bilden während dieses Entwicklungszyklus innerhalb von 24 Stunden einen multizellulären Organismus. Dabei differenzieren die einzelligen Amöben zu prä-Stiel und prä-Sporzellen. In der folgenden Kulminationsphase bildet sich der Sporenträger. Um mögliche Zu- und Abnahmen des β -COP Transkripts während des Entwicklungszyklus festzustellen, wurde Gesamt-RNA aus wachsenden Zellen (t_0) und aus entwickelten Zellen ($t_3 - t_{21,5}$) durch Northern-Blot-Analyse untersucht (Abb. 3.2.1). Zur Hybridisierung diente ein 1,5 kb großes Fragment vom 3'-Ende der β -COP cDNA. β -COP wird von einem ca. 4 kb großen Transkript kodiert, das während des gesamten Entwicklungszyklus nachweisbar ist und in der Aggregationsphase zunimmt. Daneben konnte ein kleineres Transkript detektiert werden, dessen Menge während der späteren Entwicklungsstadien wie der Kulmination und Sporenträgerbildung zunimmt (in Abb. 3.2.1 mit Stern markiert). Die Identität dieses Transkript konnte bisher nicht geklärt werden.

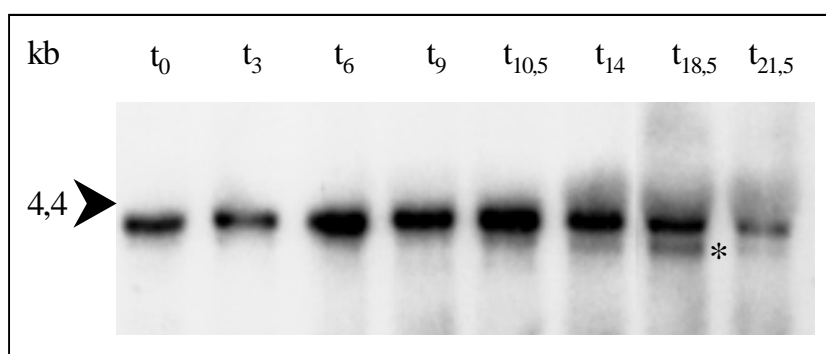


Abb. 3.2.1: Nachweis der β -COP RNA während des Entwicklungszyklus. Es wurden 20 μ g Gesamt-RNA der entsprechenden Zeitpunkte unter denaturierenden Bedingungen in einem 0,7 %igen Agroseigel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Hybridisierung diente ein 1,5 kb großes 3'-Fragment der β -COP cDNA mit dem ein ca. 4 kb großes Transkript detektiert werden konnte.

3.3 Sequenzvergleiche des β -COP Proteins in verschiedenen Organismen

Das β -COP Protein ist ein sehr konserviertes Protein, das in allen eukaryontischen Organismen zu finden ist.

dd	MSALTQSGSIEKPKCTILINVD--KGPPOVNEFKONFHEGTTTEQKIETLKKVILYTINGEPTPQLLMPITILVMPNSDHTIKKLLLIYWE	88
rn	-----MTAAENVCYTLINVPM-DSEPPSEISLKNLLEKGDVKSKEALKKVIIVTILNGEKPGLLMTIIRFVLPLODHTIKKLLLVWE	83
sc	-----MTSLSSQPAYTLVDFDPSMETYSSTDFOKALEKGSDEQKILTKMSHLVYMLEGNVPELLMHIIRFVMPKSKKEIKKLLLYFWE	85
dm	-----MISOVPCYTIINSE--DLEVTNEMQLKRDLEKGDENVKLETLRKRVIKLLNGERYPGLIMTIIRFVLPVENHTIKKLLLIYWE	81
dd	VIEKTHL-GKLESEMILVONSLLNLDLHPNEFVRGSTRFLCKLKEAEVLEPLVPSVRSNLENRHHAYCRRNAVLAITYNIYSEFFVYLTPDA	177
rn	IVPKTTPDGRLLHEMILVCAAYRKDLQHPNEFVRGSTRFLCKLKEAEELLEPLVPAIRACLEDHRHSYVRRNAVLAITYYRNFENLTPDA	173
sc	IVPKLAEDGKLRHEMILVCAIOHDLQHPNEYVRGNTLRFLTKLKEAEELLEQVPSVLACLEVRHAYVRKYATLAVFSIPFVSHELLTPDA	175
dm	IVPKTSADGKLLQEMILVCAAYRKDLQHPNEFVRGSTRFLCKLKEPELLEPLVPAIRACLEDHRHSYVRRNAVLAIFTIYKNFOWLAPDG	171
dd	PELIYNFTLQEDASCKRNAFTMLFNCAPEKAVEYLSVVIDVPSFGDMLQFTWVELIRKVKCTSPSPERSKYIKCIFTLLNSS-SPAVKYY	266
rn	PELIHDFVNEEDASCKRNAFMMLIHADQDRALDYLSTCIDVQVTFGDITLQLVIVELIYKVCNANPSEARAFIRCYLNLLQSS-SPAVKYY	262
sc	KEITNSFTVAETDPICKRNAFTGLAELDRFNALHYLENNIADHENLDPILQAVFVQFIRQDANRTPALKAOYLELMELLSTTTTSDVEIF	265
dm	PELLIASPFDTOQDMSCKRNAFLMLIHADQERALNYLASCIDVHTFGDITLQLVIVELIYKVCNANPADGSRFIRCYLNLLNSS-SNAVRY	260
dd	ESAGTLLSLSAPTAVRGAASAYIDLICNESDNNVKLVLDKILTEIKKN--HSKIMEFLVMDILRALSSPNIDTCRQKVLNIVLDSVTPKN	354
rn	EAAGTLLVLSAPTAKAAACQYIDLITKESDNNVKLVLDRLVEIKHAPHERVQLQDLVMDILRVLSTPDLVEVRKTKLQALDLVSSRN	352
sc	ETALALIVLSANPNVIVPAVNKLLDLAVKVSDDNLIKLVLDRIQDINAN--NVGALBELTIDILRVINAEDLIVRSKALDTSMDLATSRN	353
dm	ESAGTLLVLSAPTAKAAASCYIELVVKESDNNVKLVLDRLVAMKEHEGMEKVMQDLVMDVLPVLAAPDTEVRKTKLQALDLVYSRN	350
dd	IEETILFLKKEFNKTSQK-EFDKGLFYRHILIRTHVSSIKYPEVLGNVVEILMAYLGD SYLPSAVDVVIFREVVEYTPSLRELIKKI	443
rn	VEELVIVLKKKEIKTNNVSEHEDTDKYRQLLVRTLHSCSVRFPDMAANVIVPVLVEFLSDSNEAAAADVLEFVREATORFDNLRMLIVEKM	442
sc	ABDVQILKKEFQTTVNNPQDKAMCYRQLLIKTRIVAVNFVEMAAASVVSILLDFIIGDLSVAASGTFATKKEVTEKYPQLRANIIENM	443
dm	IGEMVVLKKEVAKTHNV-EHEDTGKYRQLLVRTLHCSIKFPDVAANVIVPVLVEFLSDINELAAADVLEFVREATORFPALRALIIEHL	439
dd	TENLSSIKVSKYVRVAVWVIAEYVTCLEPLQYAMTSTINDLEEL-----LKKPK-----T	493
rn	LEVFAIKSVKLYRGALWILGEYCSTKELIQSVMTEVRRSLGETPIVSEETKKEAGELKPEEETITVG---P--VQ-----KIVT	516
sc	VQILDKVFSAKAYRGALWILGEYAEGETIQHCWKHTNSVGEVPILOSEIKKLTQNCQHTPEVEVDATAKPTG-----PVIL	521
dm	IEAFPQIKSSKIHRAAVWILGEYVEGSC-ILEVIAVILQTLGEPVVEAEQRRLAGDQTEEQQQGSEAAQDLRAEGSGSGNASNKVY	528
dd	EEVILETKAKVKIE-----KVSITQKLADGDWYLASCISLSTLTKLFFRAEQLNINADSNKLLKAOVMVITSVLTNLSKASQV	570
rn	EMGTYATISALSSSRPTK-----KEEDRPPLRGFLDGDFFVAASATITLTKLALRYVALVQKPKKQNSFVAEAMLMATLHLGKSSLP	601
sc	PDGTYATISAFVYKTSQKSVFDEEDRSRPPTRRFVLSGDFYTAALDANTIKLVLEKFNYSKNTVINALKAEATLILVSVIRVCGSSLV	611
dm	SDGTYATISAYSIP-PVA-----KAEKRPPLOYLMDGDFFGAALSATITLKLALRYAELETBARAQNRITQVMLIMSSLHLGKSGFP	612
dd	S--TSKSAYERMLSCFOVLI-DSNATIKKILWQDCRDSFANYLYKYLKQSE--NKKKTEKEVL----VKPNN-IINIRQLKSKK--AF	647
rn	KKPTIDDDVDRISLQKLVLS-ECSPLMNDIFNKECROSLSQLSAKLEEBKLSQKKESEKRNVT----VQDD-PISFMOLTAKNEMNC	684
sc	EKKIDEDSLERVMTSSILLDEVNPEEKKEEVKLLVEAFLDITKSFKRIEIAKKNKHKRALKDSCKNIDPIDTPIISFRQFAGVDSTNV	701
dm	SKPTINDDTRIFVCLRTLS-ERTPEAISVFTLYCREALGKMLDAQHDEQQR-MLKPKQKATAK----VQDD-PVLAQLSNGRDNQL	694
dd	GPVDEDDLKAVGNTGEANKDQ-----NEYSKISQLSGFSDPIYVEAYVRVHQYDIVLDTISVFNQINDTLQNVTELEVLTLGDLKICERV	732
rn	KEEQQLSLLAAMGNITQKAEADPLA--SKLNKVTQITGFSDPVYAEAYVHVNQYDIVLVDVIVNQTSDDTLQNTLELATLGDGLKLVEMP	772
sc	QKDSIEEDLQALMKGDAIHATSS--SSI SKLKKITVPLCGFSDPVYAEACTNNOEDVLDVIVNQTKETLNLHVCFATLGDGLKIDTIP	789
dm	GENVFESSLNQALAGSKNAQLSDVASPNSKLNKVTQITGFSDPVYAEAYVHVNQYDIVLVDVIVNQINDTLQNTLELATLGDGLKLVEMP	784
dd	PPFTVAPREKTSKASIKVSSSTDNGVIMGTIADIDIASVSSMSDKNCVILNELHIDVIDYILPANHQYTDVLFRNHWLEFEWENKIPVNT	822
rn	SPLTLAPHDFANIKANVKVASTENGLIFGNIVYDVS---GAASDRNCVLSDDIHDIMDYIQPAT--CTDAEFROMWAEFEWENKIVTNT	857
sc	QKTNVIPHGFHKFTVIVKVSADTGVIFGNITVDG---AHGEDARYVILNDVHIDIMDYIKPAT--ADDEHFRTMWNAFEWENKISVKS	873
dm	HPVVLAPHDFONIKANVKVSSSTENGLIFGNIVYET-----ALNINVVVLTNTHIDIMDYIIPAS--CTDTEFROMWQFEWENKIVTNT	866
dd	NIITDLVKYVHHHSKVTNMGILTPVHLSN-DTGILSANLCAKSVFGEDALANICIEKQADG----KLSGYIRIRAKVQSLAVTLGEKIGN	907
rn	NVITDLNDYLOHLKSTNMKCLTPKALSG-YCGFMAANLYASTIFGEDALANVSIKPVHQGPDAAVTGHIRIRAKSQGVALSLGDKINL	946
sc	QLPTLHAYLRELKGTNMGILTPESELGEDDCRRLSCNLYAKSFGEDALANLCEKDSKTN---DVIGYRIRIRSKGQVALSLGDRVAL	960
dm	SFTDLHEYLKHLKSTNMKCLTPKALSG-QCGFMAANMYAKSIFGENALANLSIEKPVDD-PDSKVTGHIRIRQES-GVALSLGDKISS	953
dd	MGMKA----- 912	
rn	SQKKTSL----- 953	
sc	IAKKTNKLALTHV 973	
dm	SQKOSVQAA---- 962	

Abb. 3.3.1: Übersicht über die Homologie des β -COP Proteins aus *D. discoideum* (dd) zu den β -COP Proteinen aus *Rattus norvegicus* (rn), *S. cerevisiae* (sc) und *D. melanogaster* (dm). Identische Aminosäuren sind gelb, ähnliche Aminosäuren sind blau unterlegt. Die Pfeile markieren die Grenzen zwischen den putativen Domänen. Besonders ausgeprägt ist die Homologie im C- und N-terminalen Bereich des β -COP Proteins, während die mittlere Region eine hohe Variabilität in der Sequenz und in der Länge aufweist. Der C-terminale Bereich ist stärker konserviert als der N-terminale Bereich.

Das *D. discoideum* β -COP Protein zeigt die höchste Homologie zum β -COP Protein aus Ratte (63 % ähnliche, 49 % identische Aminosäuren; Abb. 3.3.1 Abb. 3.3.2). Die Homologie zum *Drosophila* Protein ist etwas geringer (60 % ähnliche, 47 % identische Aminosäuren; Abb. 3.3.2). Die schwächste Homologie ist mit 52 % ähnlichen und 39 % identischen Aminosäuren zum Hefeprotein gegeben (Abb. 3.3.2). Ein Vergleich des β -COP Proteins aus *D. discoideum*, *R. norvegicus*, *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* zeigt einen Aufbau aus einem hochkonservierten N- und C- terminalen Bereich und einem schwächer konservierten mittleren Verbindungsbereich (Abb. 3.3.1). Im Verhältnis zu den anderen β -COP Proteinen besitzt das *D. discoideum* β -COP Protein einen verkürzten mittleren Bereich.

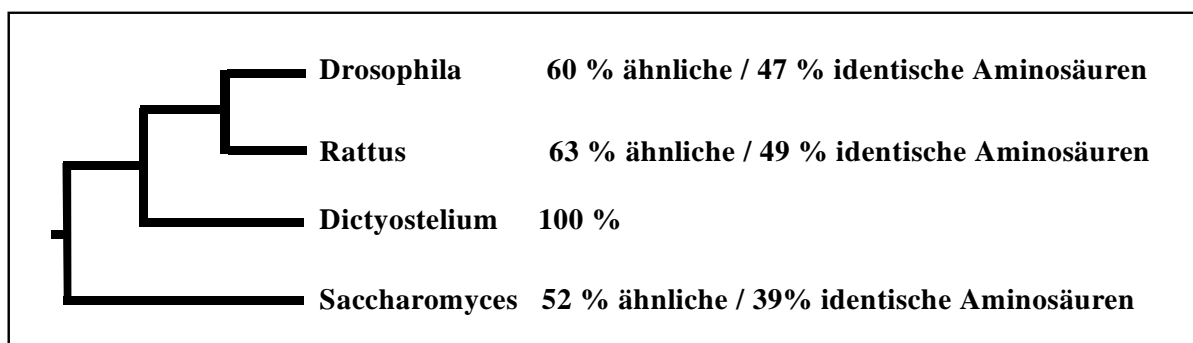


Abb. 3.3.2: Phylogenetischer Vergleich des β -COP Proteins aus *R. norvegicus*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* und *D. discoideum*.

3.4 Charakterisierung und Untersuchung von GFP- β -COP Fusionsprotein exprimierenden *D. discoideum* Zellen

Das 27 kDa große „green-fluorescent-protein“ aus *Aequorea victoria* (Prasher et al., 1992) ist ein häufig genutztes Werkzeug der Zellbiologie (Übersichtsartikel: Ludin und Matus, 1998). Es wird *in vivo* in der Fusion mit anderen Proteinen als Reporterprotein zum Studium intrazellulärer Proteindynamik genutzt. Die Seitenketten der drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin der Positionen 65-67 zyklisieren zu einem Fluorophor. So kann diese Gruppe durch Absorption von Strahlung des blauen Wellenlängenbereichs (Absorptionsmaximum 395 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Dabei emittiert das Protein Licht mit einem Emissionsmaximum von 508 nm im grünen Spektralbereich. In der Zwischenzeit wurden einige Varianten des GFP kloniert, die Licht in anderen Spektralbereichen emittieren (Übersichtsartikel: Ellenberg et al., 1999). Die in dieser Arbeit verwendete GFP-Variante besitzt einen Austausch von Serin gegen Threonin in der Position 65 (GFPS64T), so daß das Emissionsmaximum des Fluorophors auf die Wellenlänge von 511 nm verschoben ist.

Zur Expression eines GFP- β -COP Fusionsproteins in *D. discoideum* Zellen wurde der im Rahmen dieser Arbeit hergestellte pBsr-GFP Transformationsvektor genutzt (2.1.1) (Mohrs et al., 2000). In diesen Vektor wurde die 2,7 kb große β -COP cDNA unter Erhalt des offenen Leserahmens stromabwärts vom GFP-Gen ligiert, so daß im resultierenden Fusionsprotein β -COP mit seinem N-Terminus an den C-Terminus des GFP Proteins fusioniert ist. Es setzt sich aus dem vollständigen β -COP (Aminosäuren 1-912), drei zusätzlichen Aminosäuren (Gly, Cys, Arg) und GFP zusammen und wird konstitutiv unter der Kontrolle des Aktin-15-Promotors (Knecht et al., 1986) exprimiert. Obwohl Interaktionen des β -COP mit anderen Proteinen veröffentlicht wurden, sind bisher keine Hinweise über funktionell wichtige Domänen des β -COP erhältlich (Zhao, et al., 1997; Pavel et al., 1998; Eugster et al., 2000). Majoul et al. (2001) konnten aber die Funktionalität eines β -COP-CFP Fusionsprotein im COPI Coatomer und in der Interaktion mit dem KDEL-Rezeptor ERD2 zeigen. Dieser Befund und die im folgenden dokumentierte Verteilung des GFP- β -COP an Vesikeln und am Golgi-Apparat läßt auch hier auf die Funktionalität des Fusionsproteins schließen.

3.4.1 Lokalisation des GFP- β -COP Fusionsproteins in lebenden Zellen

Die Lokalisation des GFP- β -COP Fusionsproteins wurde fluoreszenzmikroskopisch am konfokalen Laserscanmikroskop untersucht. *D. discoideum* Zellen, die nach Transformation des Expressionsvektors pBsr-GFP- β -COP (2.1.1) das Fusionsprotein exprimierten, zeigten in erster Linie eine perinukleäre Lokalisation, die an die Centrosom assoziierte Golgi-Lokalisation des Proteins Comitín erinnert (Weiner et al., 1993). Zusätzlich ist aber auch eine diffuse vesikuläre Verteilung über die gesamte Zelle zu erkennen. Die Abb. 3.4.1 zeigt eine Zeitreihe und versucht die dynamische, bewegliche Anordnung der fluoreszierenden vesikulären Zellstrukturen wiederzugeben, wobei die vesikulären Strukturen eine höhere Beweglichkeit aufwiesen als die perinukleäre Struktur.

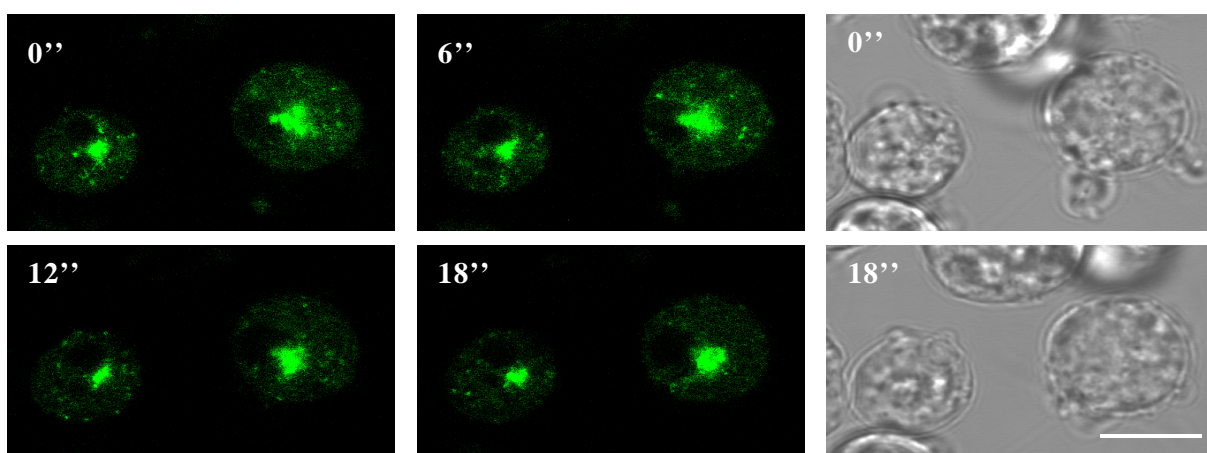


Abb. 3.4.1: Lokalisation des GFP- β -COP Fusionsproteins in lebenden *D. discoideum* Zellen. Die Zellen (in Soerensen-Phosphat-Puffer) wurden in sechs Sekunden-Abständen aufgenommen. Die Aufnahmeebene wurde dabei nicht verändert. Es ist eine dynamische perinukleäre und schwächere vesikuläre Struktur des GFP- β -COP Fusionsproteins zu beobachten. Zusätzlich ist eine Phasenkontrastaufnahme zum Zeitpunkt null und 18 Sekunden gezeigt. Maßstab: 10 μ m.

3.4.2 Das GFP- β -COP Fusionsprotein lokalisiert vorwiegend im Golgi-Apparat

Die perinukleäre Lokalisation des GFP- β -COP Fusionsprotein erinnert an die Comitin Lokalisation, einem Golgi lokalisierten Protein (Weiner et al., 1993). Die Identität der Vesikel ist unklar. Um die Zellkompartimente zu bestimmen, in denen das Fusionsprotein lokalisiert, wurden Koloalisationsstudien und Zellfraktionierungsuntersuchungen (Abb. 3.4.2 und Abb. 3.4.3) durchgeführt. Dafür wurden Antikörper gegen bekannte Markerproteine verwendet, die im Golgi-Apparat, in Vesikeln, im tubulären retikulären System und im Kern-assoziierten endoplasmatischen Retikulum lokalisieren. Die Verteilung des GFP- β -COP Proteins wird durch die für die Koloalisationsstudien notwendige MeOH-Fixierung nicht beeinflusst. Die Untersuchung mit drei unterschiedlichen monoklonalen anti-Comitin-Antikörpern erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. Comitin ist ein Aktin-bindendes Membranprotein, das im Golgi-Apparat und in kleinen vesikulären Strukturen lokalisiert (Weiner et al., 1993). Die Antikörper 190-23-5 und 190-68-1 markieren kleine vesikuläre Strukturen (Abb. 3.4.2 A', B') und zeigen keine Koloalisation mit dem GFP- β -COP Fusionsprotein (Abb. 3.4.2 A'', B''). Dagegen zeigt der Antikörper 190-340-2 (Abb. 3.4.2 C'), der in *D. discoideum* als etablierter Golgi-Marker gilt, eine eindeutige Koloalisation mit GFP- β -COP (Abb. 3.4.2 C''). Somit konnte der Golgi-Apparat als vorwiegender Lokalisationsort für das GFP- β -COP Fusionsprotein identifiziert werden (Abb. 3.4.2 C). Mit den vom Interaptin spezifischen Antikörper 260-60-10 markierten Strukturen konnte keine Koloalisation beobachtet werden (Abb. 3.4.2 D'') (Rivero et al., 1998). Interaptin ist ein Aktin-bindendes Protein der α -Aktinin Familie und lokalisiert vorwiegend ringförmig um den Kern im ER sowie in vesikulären Strukturen (Abb. 3.4.2 D'). Der monoklonale Antikörper 221-135 ist gegen die *D. discoideum* Proteindisulfidisomerase PDI gerichtet (Monnat et al., 1997). PDI katalysiert die Oxidation freier Sulfhydryl-Gruppen zur Bildung von Disulfidbrücken und unterstützt die Faltung und Assoziation vieler Proteine, die in das Lumen des ER transportiert werden. Dieses Protein lokalisiert ebenfalls im ER, ist aber im Gegensatz zu Interaptin vorwiegend im tubulären retikulären System zu finden (Abb. 3.4.2 E'). Es zeigt auch keine Koloalisation mit dem GFP- β -COP Protein (Abb. 3.4.2 E''). Weiterhin wurde der gegen das β -COP Protein aus Ratte hergestellte monoklonale Anti-Peptid-Antikörper maD (Pepperkok et al., 1993) verwendet. Dieser Antikörper erkennt β -COP auch in anderen Organismen wie z. B. Maus und Mensch. Das Peptid QRKEAADPLASKLNK (Aminosäuren 664-675) gegen das maD generiert wurde, ist in *D. discoideum* wenig konserviert. maD erkennt in *D. discoideum* im Western-Blot ein 70 kDa großes Protein und markiert größere ringförmige sowie vesikuläre Strukturen in der Immunfluoreszenz (Abb. 3.4.2 F'). maD erkennt also nicht das *D. discoideum* β -COP Protein und koloalisiert nicht mit GFP- β -COP (Abb. 3.4.2 F''). GFP- β -COP konnte somit am Golgi-Apparat lokalisiert werden. Die Identität der GFP- β -COP tragenden vesikulären Strukturen konnte aber nicht geklärt werden, da sie durch keinen der verwendeten Antikörper erkannt wurden.

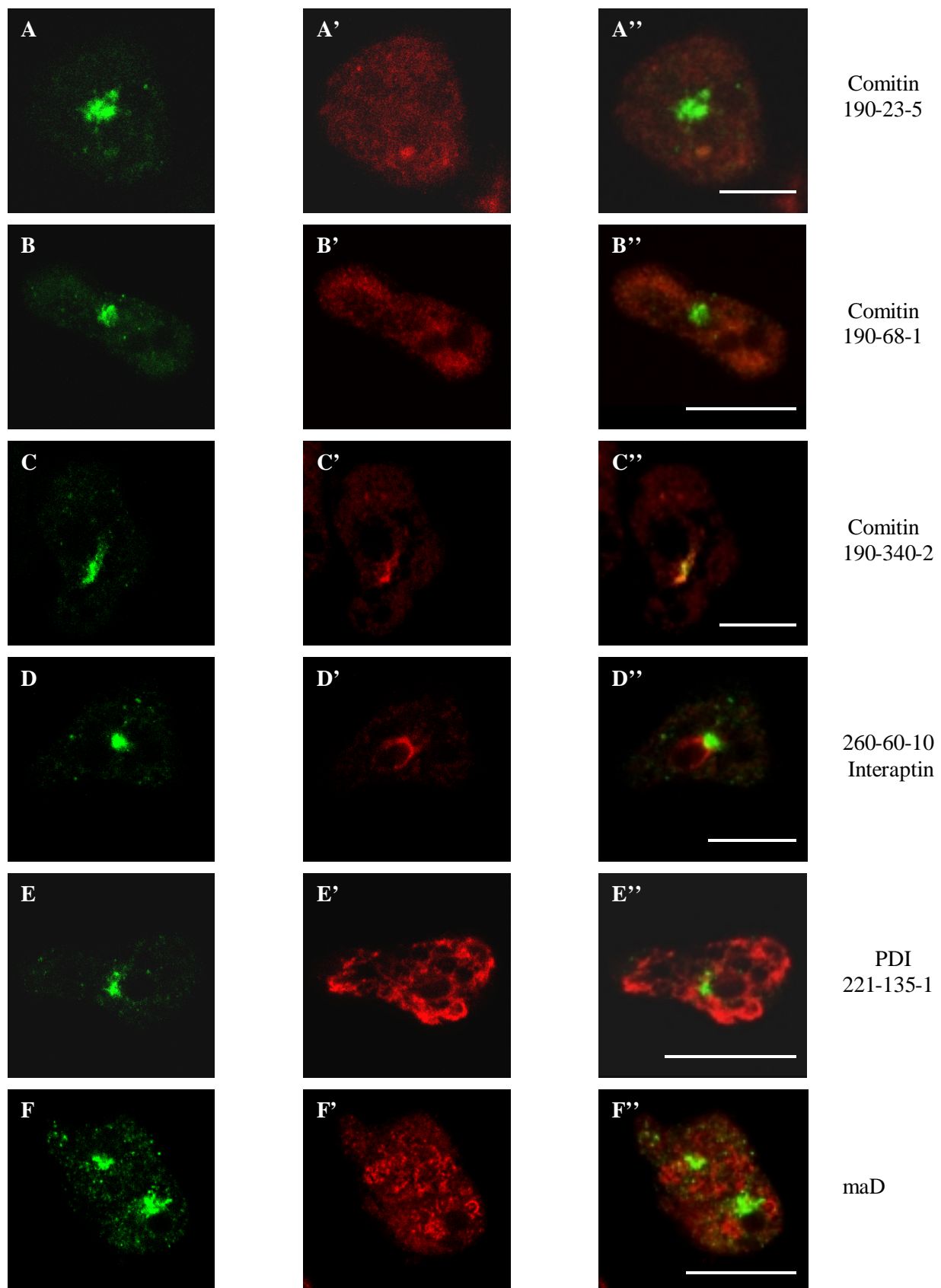


Abb. 3.4.2: Immunfluoreszenzstudien zur Identifizierung der intrazellulären Lokalisation des GFP- β -COP Fusionsproteins. Gezeigt sind Methanol fixierte GFP- β -COP exprimierende Zellen, die mit verschiedenen Antikörpern markiert wurden. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3-gekoppelter anti-Maus-Antikörper verwendet. (A') mAk 190-23-5, (B') mAk 190-68-1, (C') mAk 190-340-2 gegen Comitin; (D') mAk maD gegen β -COP aus Ratte; (E') mAk 260-60-10 gegen Interaptin; (F') mAk 221-135-1 gegen PDI. A-F zeigen die jeweilige GFP-Fluoreszenz. A''-F'' geben die jeweiligen Überlagerungen der vorangegangenen Bilder an. Maßstab: 10 μ m.

Für Zellfraktionierungsuntersuchungen wurden *D. discoideum* Zellen unter nativen Bedingungen geöffnet und in cytosolische und membrangebundene Bestandteile getrennt (2.2.3.12). Das Membranpellet wurde auf einen 0,88 M – 2,49 M diskontinuierlichen Saccharosegradienten geladen und die Fraktionen mit den monoklonalen Antikörpern 185-338-1 gegen Annexin VII, 221-135-1 gegen PDI und 190-68-1 gegen Comitín im Western-Blot analysiert (Abb. 3.4.3). Die Verteilung des GFP- β -COP Proteins wurde mit dem anti-GFP-Antikörper K3-184-2 untersucht. Der anti-GFP-Antikörper detektiert spezifisch in GFP- β -COP exprimierenden Zellen ein Protein, dessen molekulare Masse von ca. 120.000 mit der aus der Sequenz abgeleiteten theoretischen Masse des Fusionsproteins übereinstimmt. Im Wildtyp Ax2 erkennt der Antikörper kein Protein. Die verwendeten Markerproteine lokalisieren in Ax2 und GFP- β -COP exprimierenden Zellen identisch.

Das *D. discoideum* Annexin VII (Synexin) ist ein cytosolisches Phospholipid und Ca^{2+} bindendes Protein (Döring et al., 1991, 1995; Liemann et al., 1997). Es bildet einen spannungsregulierten Ionenkanal in artifiziellen und natürlichen Membranen. In *D. discoideum* existieren zwei Isoformen des Annexin VII bei 47 und 51 kDa. Annexin VII ist sowohl im Cytosol als auch in Membranfraktionen zu finden (Abb. 3.4.3 Spur 3, 4). Im diskontinuierlichen Saccharosegradienten lokalisieren beide Isoformen in den Golgi-haltigen Fraktionen (Spur 7), in der endosomalen und lysosomalen Fraktion (Spur 8) sowie in den ER-haltigen Fraktionen (Spur 9-11) und in der Plasmamembranfraktion (Spur 6). Comitín zeigt eine ähnliche Verteilung. Es ist in den Golgi-Fraktionen (Spur 7), in der lysosomalen, endosomalen Fraktion (Spur 8) und in den ER-enthaltenden Fraktionen zu finden (Spur 9-11). In der Plasmamembranfraktion ist es nur in geringen Mengen vorhanden (Spur 6). PDI lokalisiert vorwiegend in den ER-Fraktionen (Spur 9-11), ist aber auch in vergleichsweise geringeren Mengen in der Plasmamembran (Spur 6), im Golgi (Spur 7) und in den Endosomen, Lysosomen zu entdecken. GFP- β -COP ist in den Zellen vor allem im Cytosol (Spur 3) aber auch im Membranpellet (Spur 4) vorhanden. Der Vergleich des GFP- β -COP mit den Markerproteinen zeigt die Lokalisation des Proteins in der Golgi-Fraktion sowie der endo- und lysosomalen Fraktion (Spur 7, 8). Bei längeren Expositionszeiten ist es zusätzlich in geringen Mengen in den ER-Fraktionen zu finden (Daten hier nicht gezeigt).

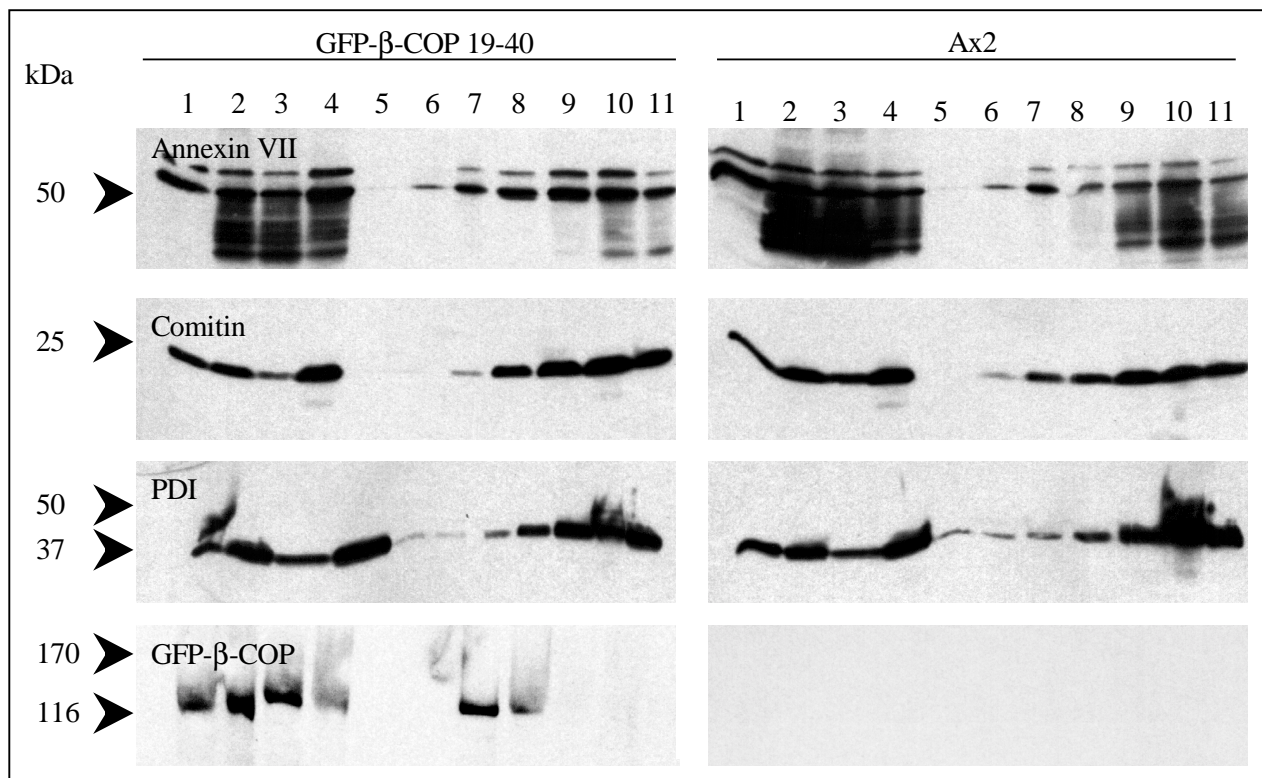


Abb. 3.4.3: Subzelluläre Membranfraktionierung im Saccharosegradienten. Gezeigt ist die Western-Blot-Analyse eines Saccharosegradienten von GFP-β-COP und Ax2 Zellen. Es wurden Volumenäquivalente der Fraktionen geladen. Das Ergebnis der Markierung mit einem Annexin VII (185-138-1), Comitin (190-68-1), PDI (221-135-1) und einem anti-GFP-Antikörper (K3-184-2) wurde über einen Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper mittels ECL-Reaktion ermittelt. Es ist eine Überlappung der Markerproteine mit GFP-β-COP in der Golgi-Fraktion und der endosomalen, lysosomalen Fraktion zu erkennen. Das Annexin VII Protein ist stark degradiert. Spur 1 = Gesamtzellhomogenat; Spur 2 = Zellaufschluß für Saccharosegradient; Spur 3 = cytosolischer Überstand nach Zellaufschluß; Spur 4 = Membranfraktion des Zellaufschluß (Gradientbeladung); Spur 5 = Überstand des Saccharosegradienten; Spur 6 = 0,88 M Saccharose (Plasmamembran-Fraktion); Spur 7 = 1,02 M Saccharose (Golgi-Fraktion); Spur 8 = 1,17 M Saccharose (Endosomen, Lysosomen); Spur 9 = 1,32 M Saccharose; Spur 10 = 1,45 M Saccharose; Spur 11 = 2,49 M Saccharose (ER-Fraktion).

3.4.3 Charakterisierung von unabhängigen GFP- β -COP exprimierenden *D. discoideum* Zelllinien auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene

Zur Herstellung von unabhängigen GFP- β -COP *D. discoideum* Zelllinien wurden Zellen aus drei unabhängigen Transformationen vereinigt und anschließend auf SM-Agarplatten vereinzelt. Einzelkolonien wurden dann wieder in Flüssigkultur mit entsprechendem Selektionsmedium überführt. Die Auswahl von GFP- β -COP exprimierenden Zellen erfolgte durch visuelle Inspektion unter dem Fluoreszenzmikroskop. Ungefähr 40 GFP- β -COP exprimierende Zelllinien konnten so identifiziert werden, aus denen nach dem Zufallsprinzip vier Zelllinien zur weiteren Analyse ausgewählt wurden (Linien: 19-5, 19-27, 19-37, 19-40).

Für die Southern-Blot-Analyse wurde genomische DNA von Ax2 und den jeweiligen Zelllinien mit den Restriktionsenzymen KpnI und BglII geschnitten. Nach Auftrennung im Agarosegel wurden die Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert (2.2.2.8 und 2.2.2.9) und mit einer spezifischen 2 kb großen EcoRI/BglII 5'- β -COP Probe hybridisiert und nach nachfolgender Entfernung der β -COP Probe mit einer spezifischen 0,8 kb großen HindIII GFP-Probe hybridisiert (2.2.2.14). Die vier unabhängigen Linien zeigten dabei identische Signale. Hybridisierungsproben und Restriktionen der genomischen DNA wurden dabei so gewählt, daß jedes zusätzliche Signal neben dem endogenen β -COP-Signal auf eine Insertion des GFP- β -COP zurückzuführen sein sollte. So wurden bei Restriktion mit BglII, zwei zusätzliche Signale bei jeweils 7 kb und 8,5 kb neben dem endogenen Gen bei 12,5 kb detektiert (Abb. 3.4.4). Dies entspricht einer zweifachen Insertion der entsprechenden Vektorabschnitte in das Genom. Bei Restriktion mit KpnI dagegen wurde nur ein zusätzliches Signal bei 6 kb neben dem endogenen Signal bei 8 kb detektiert. Da KpnI weder im GFP- noch im β -COP-Gen schneidet, ist dies darauf zurückzuführen, daß zwischen den beiden Insertionen der entsprechenden Vektorabschnitte keine KpnI-Restriktionsstelle liegt.

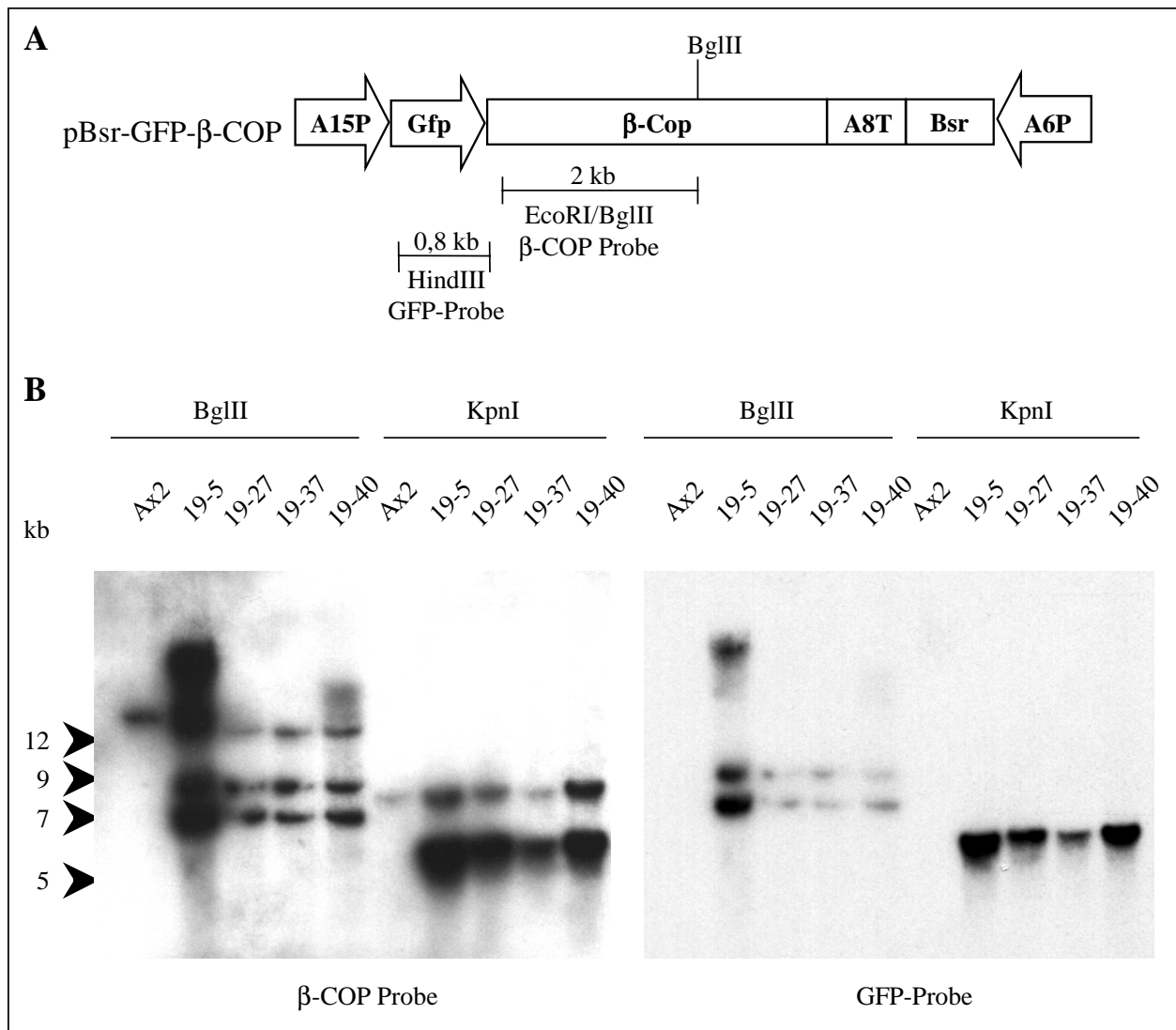


Abb. 3.4.4: Southern-Blot-Analyse der vier unabhängigen GFP-β-COP exprimierenden Zelllinien. (A) Schematische Darstellung der einfachen Vektorinsertion und Markierung der verwendeten Hybridisierungsproben. (B) Die genomische DNA wurde mit KpnI oder BglII geschnitten, die Fragmente in einem 0,8% igen TBE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer spezifischen, radioaktiv markierten β-COP oder GFP-Probe. Es konnte eine zweifache Insertion der entsprechenden Vektorabschnitte gezeigt werden. Der „Shift“ in der Ax2 Spur im linken Blot ist auf ein langsames Laufverhalten dieser DNA zurück zu führen. Das Signal bei ca. 12 kb im mit β-COP geprobten Blot entspricht dem endogenen Gen.

Zur Analyse der Transkriptmenge des GFP-β-COP im Vergleich zum endogenen β-COP Transkript wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt (Abb. 3.4.5; 2.2.2.10 und 2.2.2.11). Die Hybridisierung erfolgte mit den bereits im Southern-Blot verwendeten radioaktiv markierten GFP- und β-COP Proben. Im Gegensatz zum Wildtyp Ax2 und der heterogenen GFP-β-COP Zellpopulation zeigten die GFP-β-COP Einzelklone eine höhere Transkriptmenge des GFP-β-COP im Verhältnis zum endogenen β-COP Transkript. Auch konnte eine höhere Transkriptmenge des GFP-β-COP in den monoklonalen Zelllinien im Vergleich zum Mischklon festgestellt werden. GFP-β-COP und das endogene β-COP Transkript konnten unter den

verwendeten Gelbedingungen nicht aufgetrennt werden, da die Transkriptionssignale des GFP- β -COP und des endogenen β -COP übereinander liegen. Ein Vergleich der Menge der beiden Transkripte ist deshalb nicht möglich, es ist aber ersichtlich daß die GFP- β -COP RNA stark überexprimiert wird.

Die Hybridisierung des Northern-Blots mit einer Myosin-Probe zeigte, daß vergleichbare RNA-Mengen geladen waren (Abb. 3.4.6).

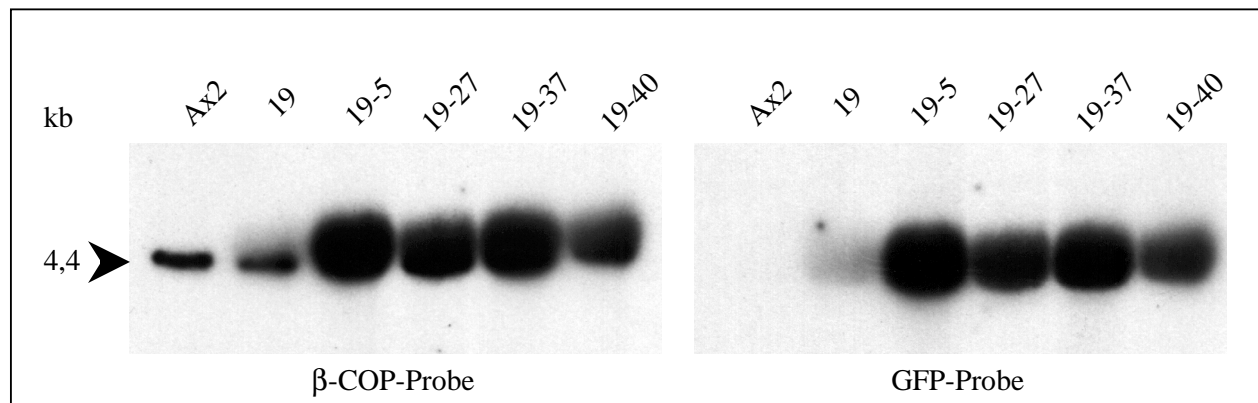


Abb. 3.4.5: Transkriptanalyse des endogenen β -COP und GFP- β -COP in den vier unabhängigen GFP exprimierenden Zelllinien. 30 μ g isolierte Gesamt-RNA aus wachsenden Ax2 Zellen, aus einer GFP- β -COP Mischkultur (19) sowie aus den monoklonalen GFP- β -COP Zelllinien wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem 1,2 %igen Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der Transkripte erfolgte mit einer spezifischen N-terminalen β -COP-Probe. Derselbe Blot wurde nach Entfernen der Probe mit einer GFP-spezifischen Probe hybridisiert

β -COP interagiert zur Bildung von COPI Vesikeln mit verschiedenen Proteinkomponenten wie dem p24 Protein und dem δ -COP Protein. δ -COP ist als direkter Bindungspartner von β -COP innerhalb des COPI-Komplexes identifiziert worden (Lowe und Kreis, 1995, 1996; Faulstich et al., 1996; Pavel et al., 1998). Im Falle von p24 wird diskutiert, ob es einen integralen Rezeptor für COPI Komponenten darstellt (Sohn et al., 1996; Rojo et al., 1997).

Eine erhöhte Transkriptmenge des GFP- β -COP könnte deshalb auch die Transkriptmengen des p24 bzw. des δ -COP beeinflussen. Um dies zu analysieren wurde der Blot zusätzlich mit einer p24 und δ -COP spezifischen Probe hybridisiert (Abb. 3.4.6). In allen vier GFP- β -COP Linien wurde eine Zunahme des δ -COP Transkripts im Vergleich zum Wildtyp Ax2 und der Mischpopulation beobachtet. Diese ist allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Linien 19-5 und 19-40 zeigen im Vergleich zu den Linien 19-27 und 19-37 eine geringere Zunahme des δ -COP Transkripts. Die Transkriptmenge des p24 nimmt dagegen homogen in allen vier GFP- β -COP Linien zu (Abb. 3.4.6).

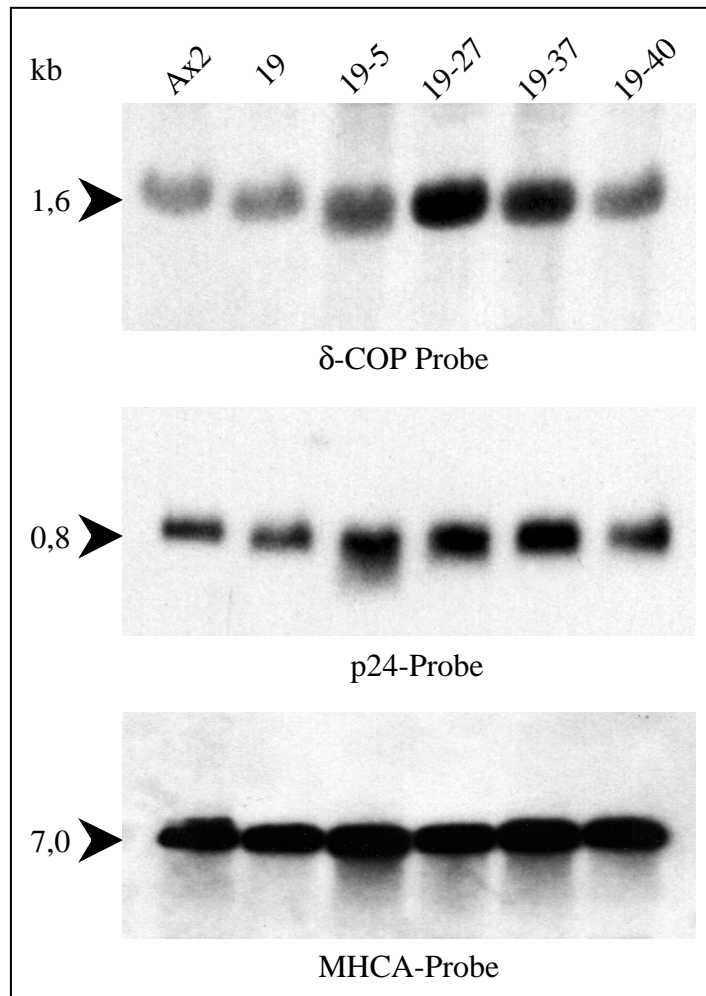


Abb. 3.4.6: Transkriptanalyse des δ -COP und des p24 Gens in den vier unabhängigen GFP exprimierenden Zelllinien im Vergleich zum Wildtyp und der Mischpopulation der GFP- β -COP exprimierenden Zellen (19). Der bereits in Abb. 3.4.5 verwendete Northern-Blot wurde zusätzlich mit einer radioaktiv markierten δ -COP und p24-Probe analysiert. Es ist eine Zunahme des δ -COP Transkripts in den vier monoklonalen GFP- β -COP Linien zu beobachten, während die p24 Transkriptmenge weniger stark zunimmt. Die im untersten Bild gezeigte Markierung der schweren Myosin-Kette (MHCA) im Northern-Blot zeigt daß vergleichbare RNA-Mengen geladen waren.

In Western-Blot-Analysen mit dem anti-GFP-Antikörper K3-184-2 wurden in den vier monoklonalen GFP- β -COP Zelllinien vergleichbare Mengen des 120 kDa großen Fusionsproteins nachgewiesen.

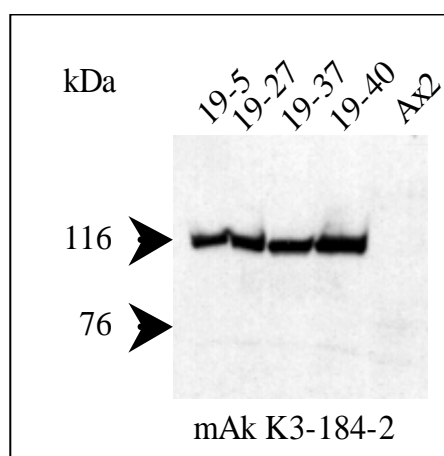


Abb. 3.4.7: Western-Blot-Analyse der vier unabhängigen GFP- β -COP exprimierenden Zelllinien. Zellhomogenate von 1×10^6 Zellen in SDS-Probenspuffer wurden in einem 8 %igen SDS-Polyacrylamid aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis des GFP- β -COP Fusionsproteins erfolgte mit dem anti-GFP-Antikörper K3-184-2 über einen Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper mittels ECL-Reaktion. In allen Zelllinien konnte eine vergleichbare Expression des Fusionsproteins mit einer Größe von ca. 120 kDa gezeigt werden.

3.4.4 Auswirkungen von Brefeldin A auf GFP- β -COP exprimierende *D. discoideum* Zellen

Säugetierzellen reagieren auf Brefeldin A Behandlung mit einer Umverteilung von Golgi-Membranelementen in das ER (Fujiwara et al., 1988; Doms et al., 1989; Lippincott-Schwartz, 1989, Orci et al., 1991). In Fibroblasten konnte insbesondere eine Umverteilung von β -COP beinhaltenden Zellstrukturen beobachtet werden (Robinson und Kreis, 1992). Ursache für diese Umverteilung ist die Wirkung von Brefeldin A auf das Membran-assoziierte kleine G-Protein ARF1. (Donaldson et al., 1992; Helms und Rothman, 1992). Dieses ARF1 Protein ist u.a. durch die Bindung an β -COP an der Bildung und dem Zerfall von COPI Vesikeln beteiligt (Zhao et al., 1997).

Um die Wirkung von Brefeldin A auf die Verteilung des GFP- β -COP Fusionsproteins zu untersuchen, wurden GFP- β -COP Zellen für sechs Stunden mit Brefeldin A (75 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzstudie mit dem anti-Comitin-Antikörper 190-340-2 durchgeführt (Abb. 3.4.8). Dabei wurde beobachtet, daß Brefeldin A weder die Golgi-Lokalisation von Comitin noch von GFP- β -COP beeinflusst. Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, daß *D. discoideum* insensitive gegenüber Brefeldin A ist. Wildtyp Hefe Stämme zeigen aufgrund einer nahezu impermeablen Zellmembran ebenfalls eine natürliche Resistenz gegenüber Brefeldin A. Es existieren allerdings einige Mutantenstämme, die durch einen Defekt in der Sterolbiosynthese eine veränderte Zellmembranpermeabilität besitzen. Brefeldin A führt hier zu einer Blockierung der Proteinsekretion und zu Veränderungen in der Morphologie der subzellulären Kompartimente (Graham et al., 1993; Shah und Klausner, 1993; Vogel et al., 1993). In *D. discoideum* könnte die Insensitivität gegenüber Brefeldin A aber auch auf das Vorhandensein eines Gens zurückzuführen sein, das in *S. pombe* für ein Brefeldin A Resistenzgen kodiert (Nagao et al., 1995).

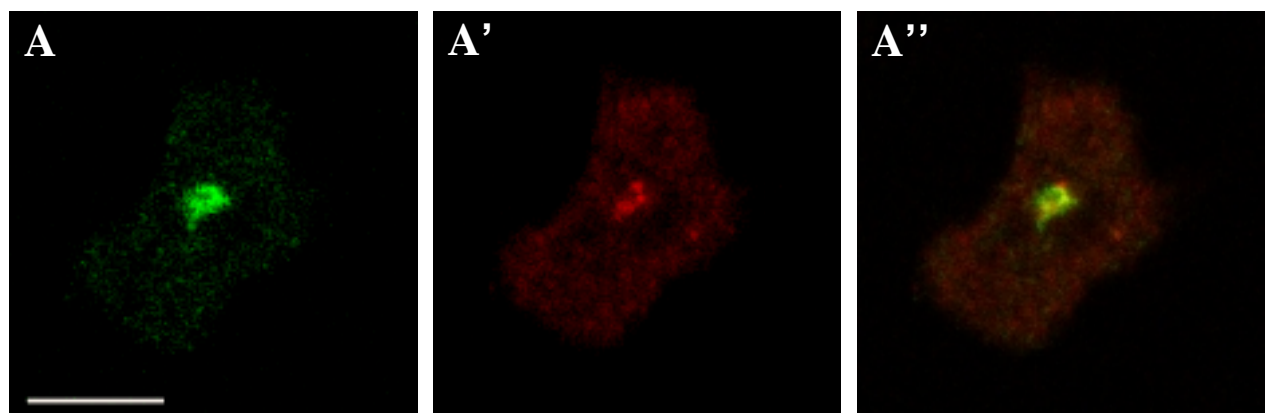


Abb. 3.4.8: Lokalisation von GFP- β -COP nach Brefeldin A Behandlung. (A) Gezeigt ist eine Methanol fixierte GFP- β -COP exprimierende Zelle nach 72 Stunden Inkubation in Brefeldin A. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3-gekoppelter anti-Maus-Antikörper verwendet. Die Lokalisation des Fusionsprotein ist unverändert. (A') Die perinukleäre Struktur, die durch den Comitin spezifischen Antikörper mAk 190-340-2 erkannt wird, ist ebenfalls erhalten geblieben. (A'') Überlagerung von A und A'. Maßstab: 10 μ m.

3.4.5 Auswirkung von DMSO auf die intrazelluläre Lokalisation von GFP- β -COP

Bereits 1993 konnten Weiner et al. mit dem gegen Comitín gerichteten Antikörper 190-340-2 zeigen, daß DMSO in *D. discoideum* Zellen zu einer reversiblen Fragmentierung des Golgi-Apparates führt. Dies wurde auf eine reversible Deassemblierung des Aktin-Netzwerkes unter DMSO-Einwirkung zurückgeführt. DMSO führt zur Dissoziation von Aktin und Myosin von der Plasmamembran und zur Depolymerisierung der Aktinfilamente sowie zur Bildung intranukleärer Aktin-Bündel (Fukui, 1978; Yumura und Fukui, 1983).

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von DMSO auf die Lokalisation des GFP- β -COP Fusionsprotein untersucht und vergleichend mit der intrazellulären Comitín-Verteilung analysiert. GFP- β -COP exprimierende Zellen wurden sofort, fünf, 20 und 40 Minuten nach DMSO-Zugabe in Methanol fixiert und mit dem monoklonalen anti-Comitín-Antikörper 190-340-2 analysiert. Sofort nach DMSO Zugabe (Zeitpunkt 0) zeigen sowohl GFP- β -COP als auch Comitín noch die ursprüngliche Golgi-Lokalisation (Abb. 3.4.9 A, A'), aber bereits nach fünf Minuten beginnt die Deassemblierung des Aktin-Netzwerkes und die Fragmentierung des Golgi-Apparates (Daten hier nicht gezeigt). Nach 20 Minuten ist die Auflösung des Golgi-Apparates vollständig, Comitín und GFP- β -COP kolokalisieren nun nicht mehr (Abb. 3.4.9 B''). GFP- β -COP befindet sich in unterschiedlich großen vesikulären Strukturen. Comitín zeigt dagegen eine diffuse cytosolische intrazelluläre Verteilung mit kleineren vesikulären Strukturen (Abb. 3.4.9 B, B'). Obwohl die Zellen weiterhin in DMSO inkubiert wurden, bilden sich die ursprünglichen GFP- β -COP und Comitín Strukturen nach 40 Minuten wieder (Abb. 3.4.9 C, C''). Bei der DMSO-Behandlung zeigen beide Golgi-Proteine vergleichbare Fragmentierungsgeschwindigkeiten, die Reassemblierungsgeschwindigkeiten sind dagegen unterschiedlich. GFP- β -COP reassembliert schneller als Comitín. In Abb. 3.4.9 a, b, c ist zum Vergleich die De- und Reassemblierung des Aktin-Netzwerkes gezeigt. Die Markierung mit dem Act1-7 Antikörper zeigt die Auflösung des Aktinnetzwerkes und die Bildung von intranukleären Aktinbündeln.

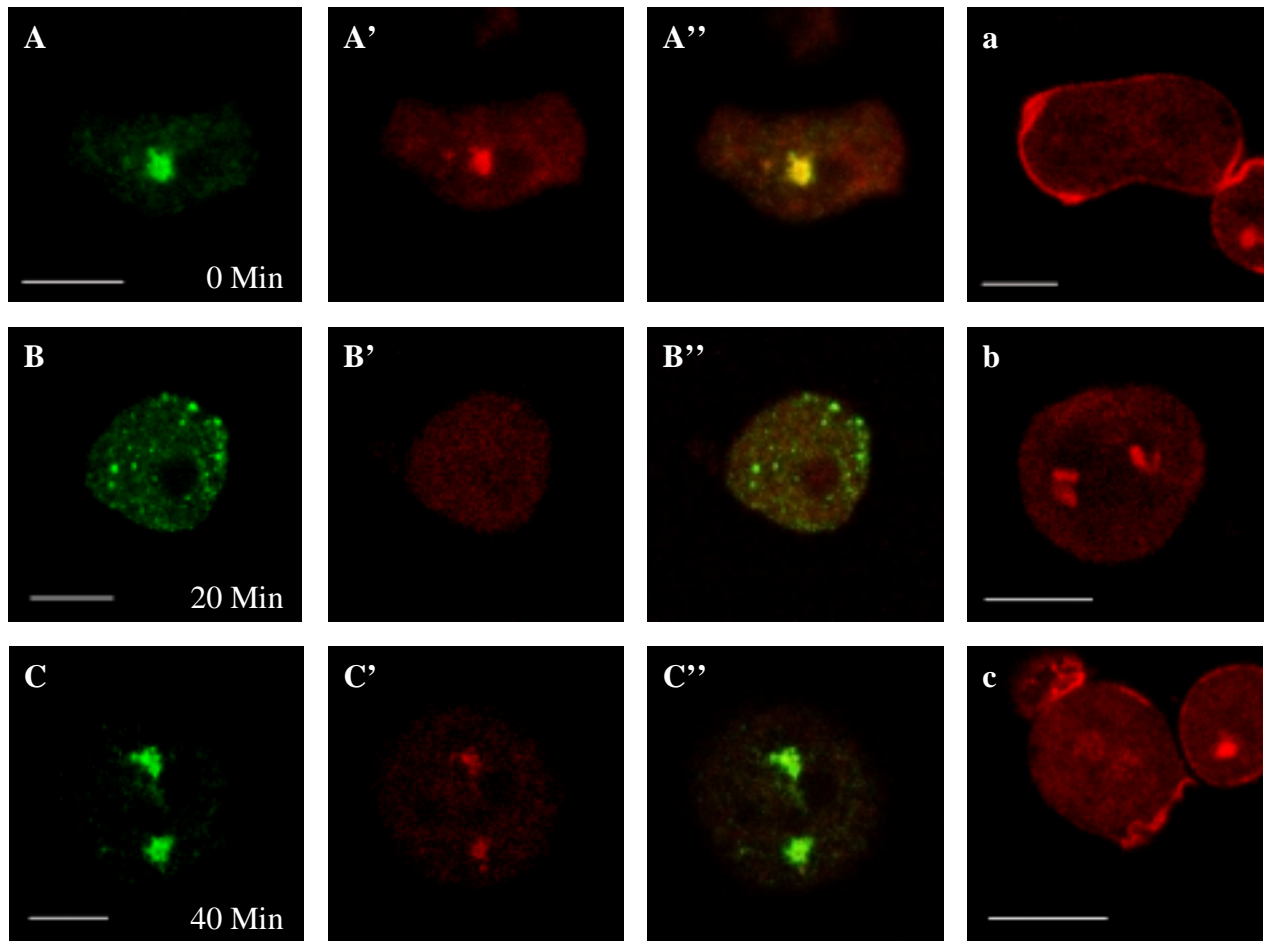


Abb. 3.4.9: Immunfluoreszenzstudien zur Umverteilung des GFP-β-COP Fusionsprotein unter DMSO-Einwirkung. Gezeigt sind GFP-β-COP exprimierende Zellen, nach MeOH-Fixierung zum Zeitpunkt 0, 20 und 40 Minuten Inkubation in 5 % DMSO (A, B, C), die mit dem mAk 190-340-2 markiert wurden (A', B', C'). Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3-gekoppelter anti-Maus-Antikörper verwendet. Zum Zeitpunkt 0 sind das Fusionsprotein und Comitin am Golgi-Apparat lokalisiert (A, A'). Nach 20 Minuten sind Golgi-artige Strukturen nicht mehr nachweisbar und Vesikel unterschiedlicher Größe sind über die Zelle verteilt. Comitin und GFP-β-COP zeigen zu diesem Zeitpunkt keine Kolo-kalisation (B, B'). Nach 40 Minuten ist der Golgi-Apparat vollständig reassembliert (C, C'). A'', B'', C'' zeigen die jeweiligen Überlagerung der GFP-Fluoreszenz und der Antikörperfluoreszenz. a, b, c zeigen die ebenfalls reversible Umverteilung von Aktin. Maßstab: 10 µm.

3.4.6 Reaktion der intrazellulären GFP- β -COP Verteilung auf osmotische Veränderungen

Pharmakologische Studien belegen, daß der konstitutive intrazelluläre Transport über diverse Signaltransduktionswege reguliert wird (Davidson et al., 1992; de Matteis et al., 1993; Hansen und Casanova, 1994; Ohashi und Huttner, 1994; Pimplikar und Simons, 1994; Muniz et al., 1996; siehe auch 3.4.4). Lee und Linstedt (1999) konnten zeigen, daß osmotischer Streß ebenso als Regulator des konstitutiven intrazellulären Transports wirken kann und die durch den osmotischen Streß veränderte Zellgröße den anterograden Transport zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat beeinflußt. Sowohl der ER-Export, der Transport vom ER zum Golgi, als auch die Transportschritte vom medialen ER-Golgi-Kompartiment (ERGIC) zum Golgi sind inhibiert. Der retrograde Transport bleibt dagegen unbeeinflußt. Dies führt zu einem ERGIC- und Golgi-Kollaps in das endoplasmatische Retikulum. Weiterhin konnten sie zeigen, daß hypo- und hyperosmotischer Streß auch die COPI Funktion beeinflußt. So ist die Brefeldin A induzierte β -COP Dissoziation von den Golgi-Membranen verlangsamt. Bemerkenswert ist, daß verschiedene Golgi-Proteine nach einigen Stunden Inkubation unter hypo- bzw. hyperosmotischen Bedingungen wieder ihre normale Golgi Lokalisation zeigen. Diese Rückverteilung der Proteine scheint unabhängig von neuer Proteinsynthese zu sein, sondern ist vielmehr abhängig von der Proteinkinase C (Lee und Linstedt, 1999), die u.a. in die Zellvolumenregulierung unter osmotischem Streß involviert ist (Lang et al., 1998).

Hier wurde die intrazelluläre Verteilung des Fusionsproteins in GFP- β -COP exprimierenden *D. discoideum* Zellen sowohl unter hypo- als auch hyperosmotischen Bedingungen untersucht. Hypoosmotische Bedingungen wurden durch Ersetzen des Ax2-Kulturmediums gegen Wasser erzeugt, hyperosmotische Bedingungen durch Ersetzen des Kulturmediums mit 0,4 M Sorbitol in Soerensen-Phosphat-Puffer (2.2.4.7). Zusätzlich wurde ein hypoosmotischer Schock nach zwei Stunden hyperosmotischem Schock durchgeführt. Die Zellen wurden dann zu den entsprechenden Zeitpunkten nach 30 Sekunden, einer Stunde und zwei Stunden in Methanol fixiert und in Immunfluoreszenzstudien mit den beiden ER-Markern PDI (mAk 221-135-1) und Interaptin (mAk 260-60-10) sowie dem Golgi-Marker Comitín (mAk 190-340-2) analysiert. Die Ergebnisse mit dem gegen PDI gerichteten Antikörper sind nicht gezeigt, da GFP- β -COP weder unter hypo- noch hyperosmotischen Bedingungen mit den dadurch markierten tubulären retikulären Strukturen kolokalisierte. Das GFP- β -COP Protein zeigt eine Umverteilung, die PDI-Lokalisation bleibt dagegen erhalten. Als Kontrolle wurden in diesen Versuch Wildtypzellen mit einbezogen. Die Ergebnisse der Interaptin- und Comitín-Antikörpermarkierung waren mit denen der GFP- β -COP exprimierenden Zellen identisch (Daten hier nicht gezeigt).

Die Lokalisation von Interaptin bleibt durch hyper- und hypoosmotische Bedingungen unbeeinflusst (Abb. 3.4.10 A', B', C'; Abb. 3.4.11 D', E', F'; Abb. 3.4.12 G'), die Lokalisation von Comitín und GFP- β -COP verändert sich dagegen. Nach 30 Sekunden hyperosmotischem Schock zeigen die meisten Zellen noch die ursprüngliche Golgi-Lokalisation (Abb. 3.4.10 a, a', a''). Einige wenige Zellen weisen jedoch schon eine veränderte Lokalisation von Comitín und GFP- β -COP auf wie sie nach einer Stunde in vielen Zellen beobachtet werden konnte. Nach einer Stunde hyperosmotischem Streß ist der Golgi-Apparat völlig fragmentiert. Comitín ist diffus über die Zelle verteilt (Abb. 3.4.10 b; Schreiner, 2000) und GFP- β -COP markiert größere Vesikel-artige Strukturen (Abb. 3.4.10 B, b), die den Strukturen ähneln wie sie unter DMSO-Behandlung auftauchen (3.4.5). Comitín und GFP- β -COP kolokalisieren nicht (Abb. 3.4.10 b''). Nach zwei Stunden hyperosmotischem Streß überlagert sich die Interaptin-Antikörpermarkierung mit GFP- β -COP und zeigt somit eine Rückverteilung des GFP- β -COP in das ER an (Abb. 3.4.10 C''). GFP- β -COP lokalisiert nun zum Teil auch wieder im Golgi-Apparat (Abb. 3.4.10 c). Ein ähnliches Umverteilungsverhalten zeigt auch Comitín, jedoch scheint die Rückverteilung zur ER- bzw. ursprünglichen Golgi-Lokalisation wie unter DMSO-Behandlung langsamer abzulaufen (Abb. 3.4.10 c, c'). Die moderatere ER-Rückverteilung des Comitín ist indirekt durch die Überlagerung mit GFP- β -COP in Abb. 3.4.10 c'' zu sehen, die Rückverteilung in den Golgi-Apparat ist in diesem Beispiel nicht zu sehen. Sowohl Comitín als auch GFP- β -COP zeigen somit eine partielle Rückverteilung in das ER. Werden diese Zellen anschließend einem hypoosmotischen Streß ausgesetzt, fragmentiert der Golgi-Apparat wiederum in größere vesikuläre Strukturen im Falle von GFP- β -COP und diffus cytosolisch bei Comitín (Abb. 3.4.12 G, g und Abb. 3.4.12 g').

Die intrazelluläre Umverteilung von Comitín und GFP- β -COP verhält sich unter hypoosmotischen Bedingungen ähnlich, die Fragmentierung des Golgi-Apparates scheint aber schneller einzutreten. Sie ist unter hypoosmotischen Bedingungen bereits nach 30 Sekunden in vielen Zellen zu sehen (Abb. 3.4.11 D, d, d'). Comitín und GFP- β -COP kolokalisieren partiell in vesikulären Strukturen unterschiedlicher Größe (Abb. 3.4.11 d''). Es liegt jedoch keine vollständige Kolokalisation der beiden Proteine vor. Nach einer Stunde lokalisieren beide Proteine zum Teil wahrscheinlich im ERGIC (Abb. 3.4.11 e, e') und wie durch die Überlagerung des GFP- β -COP mit Interaptin zu erkennen, ist auch eine partielle ER-Lokalisation zu beobachten (Abb. 3.4.11 E, E', E''). Nach zwei Stunden hypoosmotischem Streß lokalisieren beide Proteine wieder im Golgi (Abb. 3.4.11 F, f, f', f'').

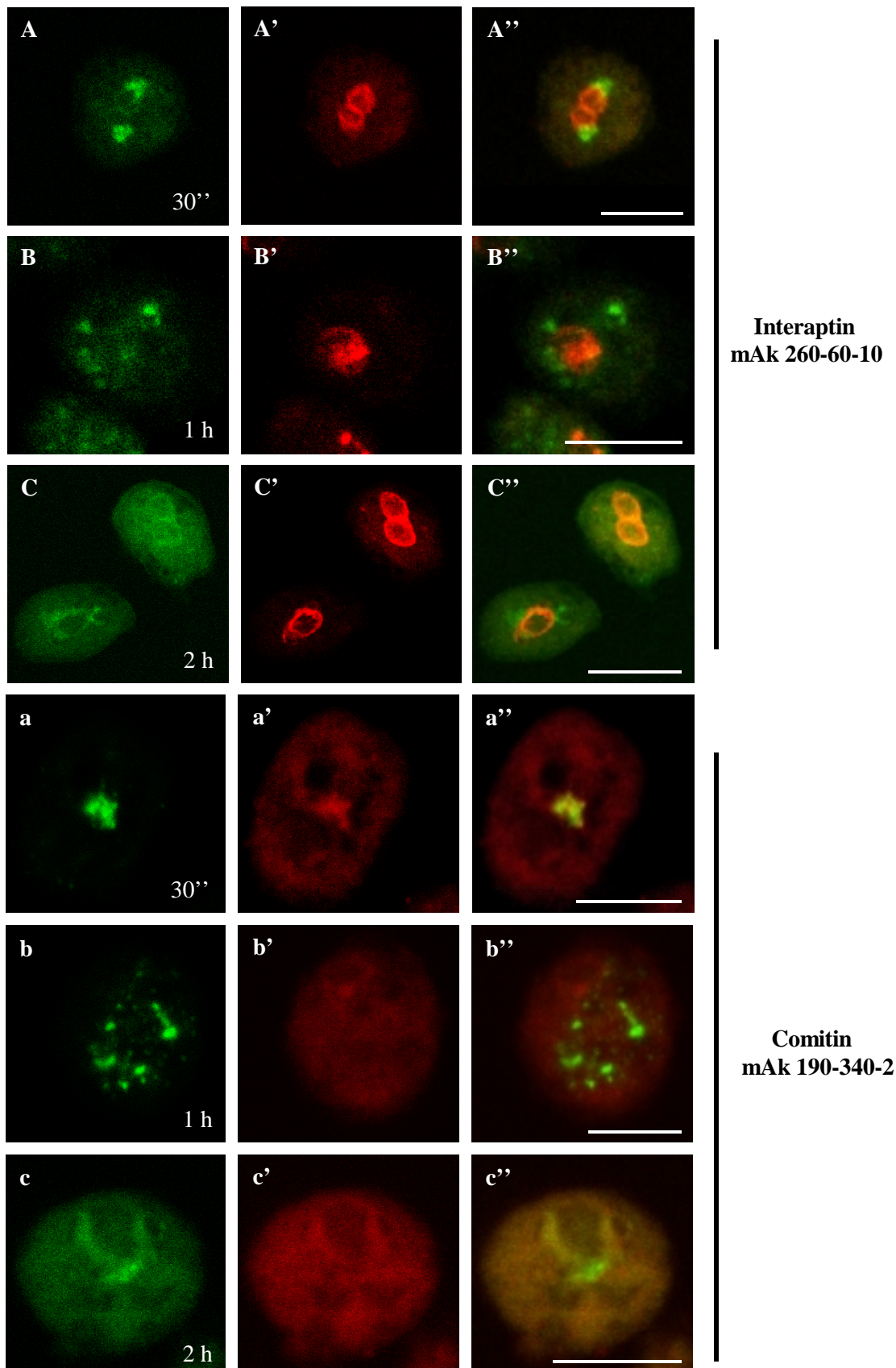


Abb. 3.4.10: Immunfluoreszenzstudien an MeOH-fixierten GFP-β-COP exprimierenden *D. discoideum* Zellen nach hyperosmotischem Streß. Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz nach 30 Sekunden (A, a), nach einer Stunde (B, b), nach zwei Stunden hyperosmotischem Schock (C, c) und die Antikörpermarkierung mit mAk 260-60-10 (A', B', C') sowie mit dem mAk 190-340-2 (a', b', c') zu den entsprechenden Zeitpunkten. A'', B'', C'', a'', b'', c'' zeigen die jeweiligen Überlagerungen der Antikörpermarkierung und GFP-Fluoreszenz. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3-gekoppelter anti-Maus-Antikörper verwendet. Maßstab: 10 µm.

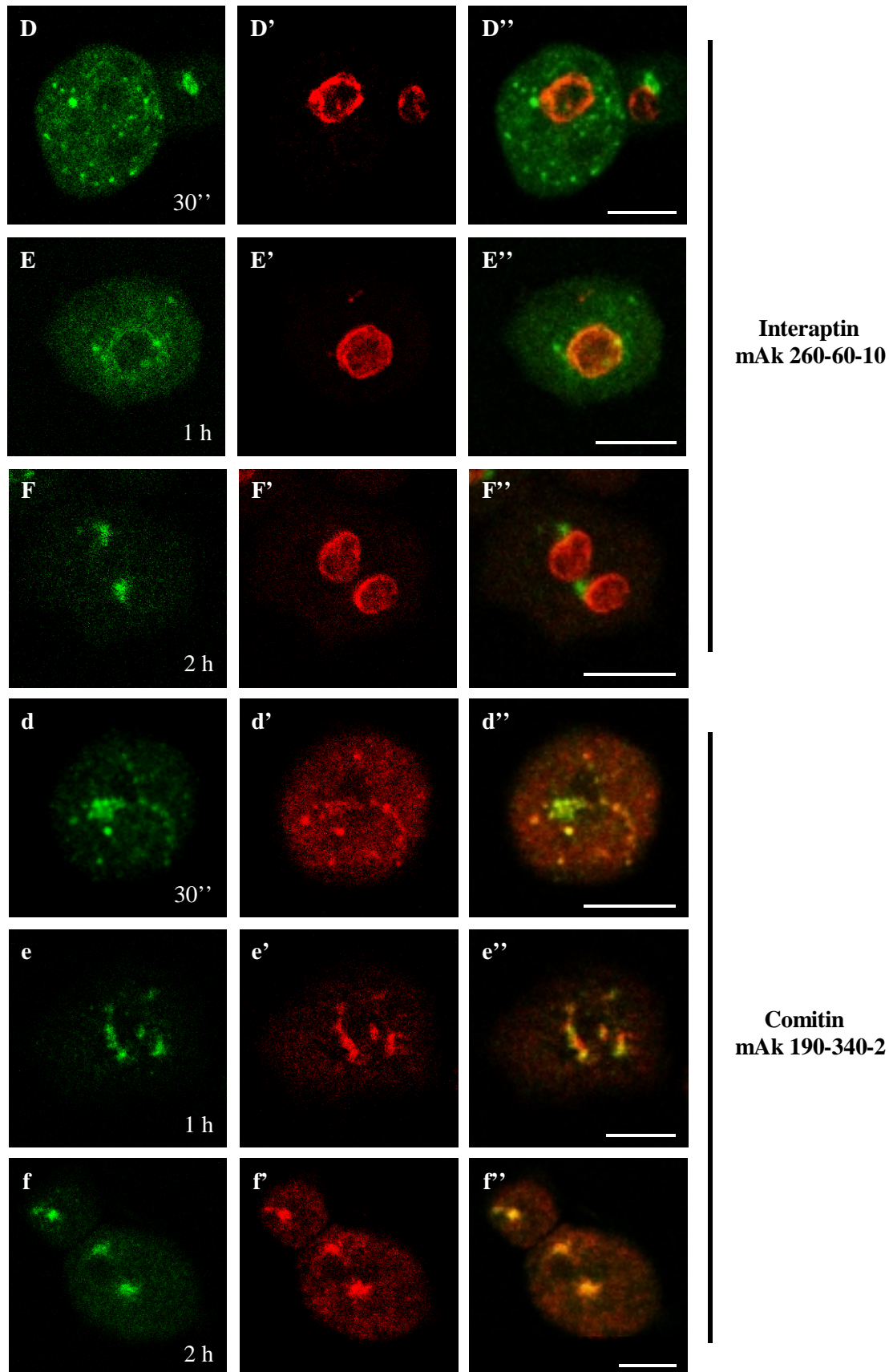


Abb. 3.4.11: Immunfluoreszenzstudien an MeOH-fixierten GFP- β -COP exprimierenden *D. discoideum* Zellen nach hyposmotischem Streß. Gezeigt ist die GFP-Fuoreszenz nach 30 Sekunden (D, d), nach einer Stunde (E, e), nach zwei Stunden hyposmotischem Schock (F, f) und die Antikörpermarkierung mit mAk 260-60-10 (D', E', F') sowie mit dem mAk 190-340-2 (d', e', f') zu den entsprechenden Zeitpunkten. D'', E'', F'', d'', e'', f'' zeigen die jeweiligen Überlagerungen der Antikörpermarkierung und GFP-Fluoreszenz. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3-gekoppelter anti-Maus-Antikörper verwendet. Maßstab: 10 μ m.

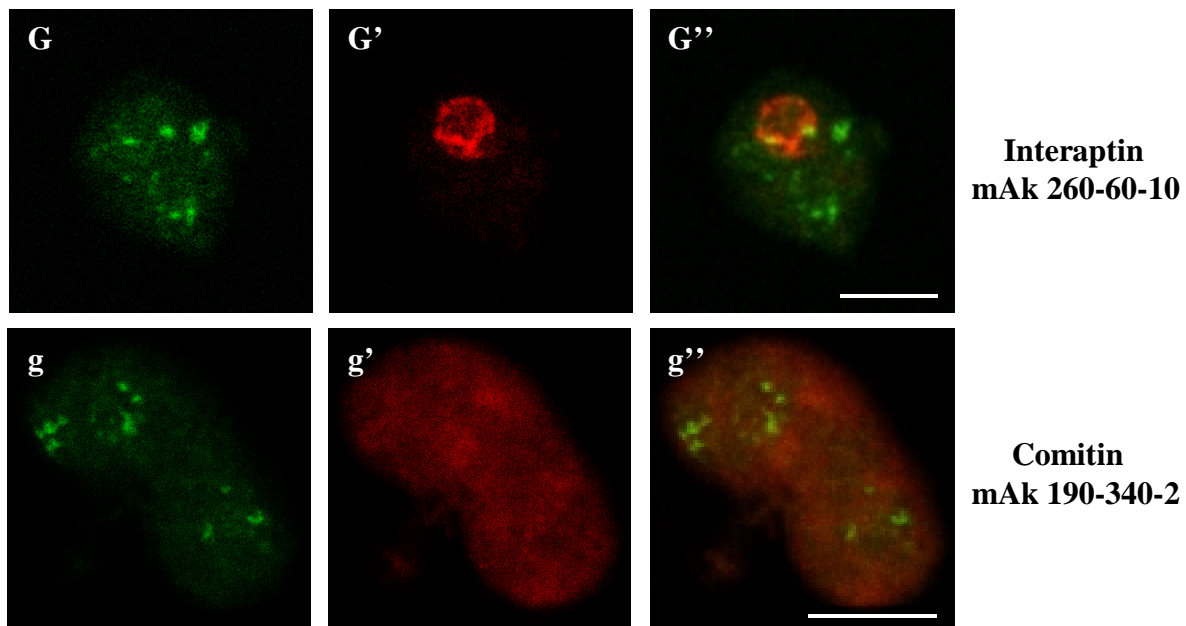


Abb. 3.4.12: Hypoosmotischer Schock nach zwei Stunden hyperosmotischem Streß in MeOH-fixierten GFP- β -COP exprimierenden *D. discoideum* Zellen. Gezeigt ist die GFP-Fuoreszenz nach hypoosmotischem Schock nach zwei Stunden hyperosmotischem Streß (G, g), die Antikörpermarkierung mit mAk 260-60-10 (G') und mit dem mAk 190-340-2 (g'). G'', g'' zeigen die jeweiligen Überlagerungen der Antikörpermarkierung und GFP-Fluoreszenz. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3-gekoppelter anti-Maus-Antikörper verwendet. Maßstab: 10 μ m.

3.4.7 Lokalisation des GFP- β -COP Proteins während der Phagozytose

Die Internalisierung großer Partikel durch Zellen erfolgt durch Phagozytose (Metchnikoff, 1893). Phagozytose ist für freilebende *D. discoideum* Zellen die einzige Möglichkeit der Nahrungsaufnahme. Sie besitzen die Fähigkeit zur Aufnahme von festen Stoffen und können sich von Bakterien und Hefen ernähren. Zur Etablierung von *D. discoideum* Laborstämmen wurden Wildtypstämme so modifiziert, daß sie auch durch Pinozytose überlebensfähig wurden und somit in flüssigem Medium kultiviert werden konnten. Sowohl an der Phagozytose als auch an der Pinozytose ist das Aktinnetzwerk wesentlich beteiligt. Bei der Phagozytose werden zunächst Pseudopodien ausgebildet, die das zu phagozytierende Material umschließen. Die Pseudopodien verschmelzen, und ein sog. Phagosom wird in das Zellinnere abgeschnürt. Das gereifte Phagosom wird in der Regel einem Abbauweg zugeführt, der zur Degradation des internalisierten Partikels führt und mit der Verschmelzung mit einem Endosom, das zum Lysosom reift, beendet ist. Die Regulation erfolgt in *D. discoideum* u. a. über F-Aktin (Maniak et al., 1995) unter Beteiligung zahlreicher Aktin-bindender Proteine wie z. B. Talin und Coronin (Maniak et al., 1995; Niewöhner et al., 1997; Hacker et al., 1997). Außerdem greifen auch einige kleine G-Proteine der Rho- und Ras-Familie ein (Seastone et al., 1998; Rivero et al., 1999; Seastone et al., 1999; Chubb et al., 2000). Es konnte auch eine Beteiligung von Motorproteinen

– Myosin I (Jung und Hammer, 1990) und Myosin K (Schwarz et al., 2000) – gezeigt werden. Die Phagozytose zeichnet sich also durch eine Vielzahl von Regulationsmöglichkeiten aus, in die verschiedene Signaltransduktionswege involviert sind (Aderem und Underhill, 1999; Kwiatkowska und Sobota, 1999).

Stoorvogel et al. (1996) und Whitney et al. (1995) konnten eine Beteiligung von Clathrin und COPI Vesikeln an Endosomen zeigen. ϵ -COP und ARF1 sind ebenso in die Endosomenfusion involviert wie β -COP (Lenhard et al., 1992, 1994; Aniento et al., 1996; Daro et al., 1997; Gu et al., 1997 und 2000). Für β -COP konnte sogar eine Bindung an Phagosomenmembranen über ARF1 in einer Makrophagen-Zelllinie gezeigt werden (Berón et al., 2001). Deshalb wurde die Lokalisation des GFP- β -COP Fusionsprotein in *D. discoideum* sowohl immunzytochemisch als auch biochemisch untersucht. In Abb. 3.4.13 A und B ist exemplarisch eine Fluoreszenzstudie an GFP- β -COP exprimierenden Zellen während der Phagozytose von fluoreszierenden TRITC-markierten Hefen gezeigt. Die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme ist in a und b zu sehen. Das Fusionsprotein bleibt während der Phagozytose weiterhin vorwiegend im Golgi-Apparat lokalisiert. Es ist keine auffällige Zunahme GFP- β -COP tragender vesikulärer Strukturen am Phagosom zu erkennen. Ebenso ist keine spezifische Anreicherung des GFP- β -COP an den sich bildenden Pseudopodien bei der Invagination der Hefezelle zu sehen. Dagegen ist Aktin während der Phagozytose am Phagosom vorhanden und ist an der Ausbildung der phagozytierenden Tasche maßgeblich beteiligt (Abb. 3.4.13 C, c). β -COP-GFP scheint also nicht sichtbar in Phagozytoseprozesse involviert zu sein.

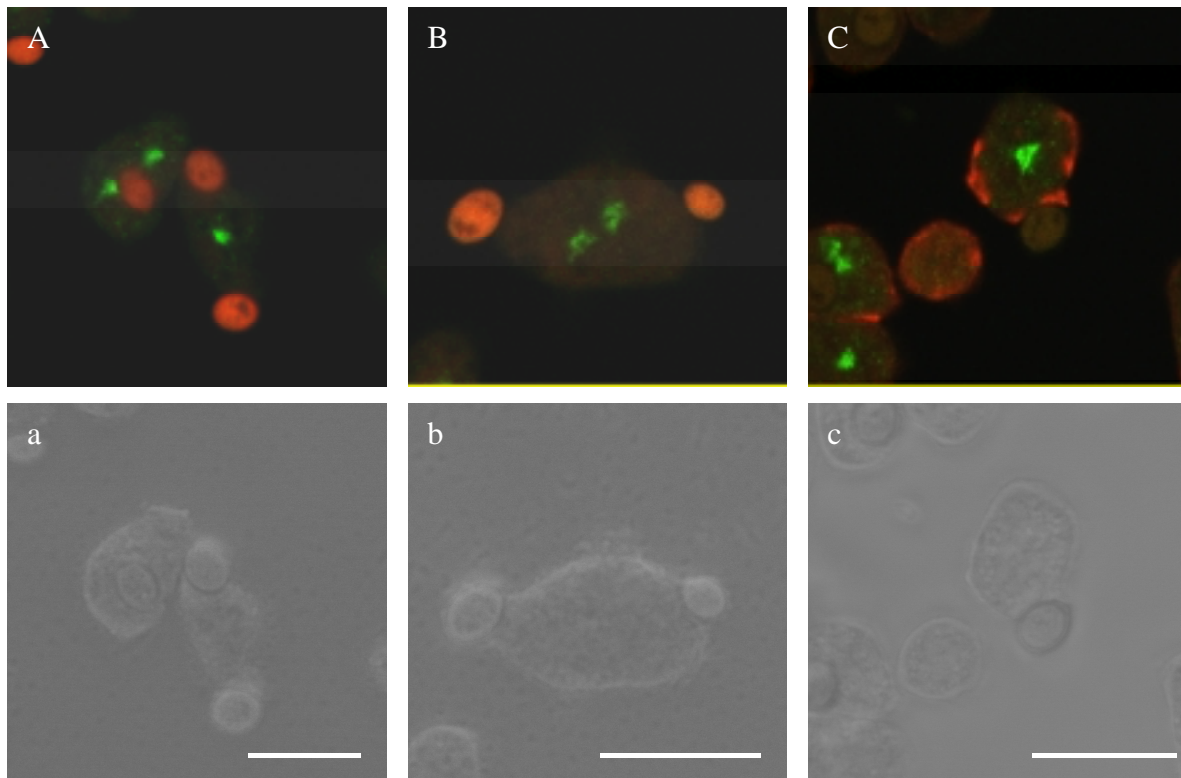


Abb. 3.4.13: Lokalisation des GFP- β -COP Proteins während der Phagozytose von Hefezellen. A, B und C zeigen exemplarisch die Lokalisation des GFP- β -COP während der Phagozytose, a, b und c geben die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen wieder. C zeigt zusätzlich eine Markierung mit dem anti-Aktin-Antikörper Act 1-7. Gezeigt sind MeOH-fixierte Zellen. Die Markierung des primären Antikörpers erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. Maßstab: 10 μ m.

Biochemische Daten unterstützen diese Ergebnisse. Dazu wurden Phagosomenmembranen von phagozytierenden GFP- β -COP und Wildtyp Zellen isoliert. Die Zellen wurden zehn Minuten mit magnetischen Eisenkugeln inkubiert, zur Unterbrechung der Phagozytose auf Eis abgekühlt und anschließend geöffnet (2.2.3.11). Die membranumhüllten Eisenkugeln wurden nun mit einem Dauermagneten aus dem Zellhomogenat extrahiert und durch dreimaliges Waschen gereinigt. Abb. 3.4.14 zeigt einen Western-Blot der angereicherten Phagosomenmembranen, die mit Antikörpern gegen Comitín (mAk 190-68-1), α -Aktinin (mAk 47-62-17) und gegen das GFP-Protein (mAK K3-184-2) im Vergleich zum Gesamtzellhomogenat und Aliquots aus den Waschschritten analysiert wurden. Dazu wurden jeweils gleiche Proteinmengen in jede Spur geladen. In Wildtypzellen ist Comitín in den Phagosomenfraktionen (PF) angereichert (Schreiner, 2000), dagegen zeigt α -Aktinin kaum eine Anreicherung. Im Vergleich zum Wildtyp ist in den GFP- β -COP Zellen keine spezifische Anreicherung des α -Aktinin in den Phagosomenfraktionen zu erkennen. Die Anreicherung von Comitín in den Phagosomenfraktionen der GFP- β -COP Zellen ist ebenfalls weniger ausgeprägt. GFP- β -COP konnte nicht an den Phagosomenmembranen lokalisiert werden. Das Protein ist nur im Gesamtzellhomogenat vorhanden und in den ersten beiden Waschschritten zu detektieren. Durch

eine Wiederholung des Experiments konnte das Ergebnis reproduziert werden und bestätigt so die Signifikanz des Ergebnis.

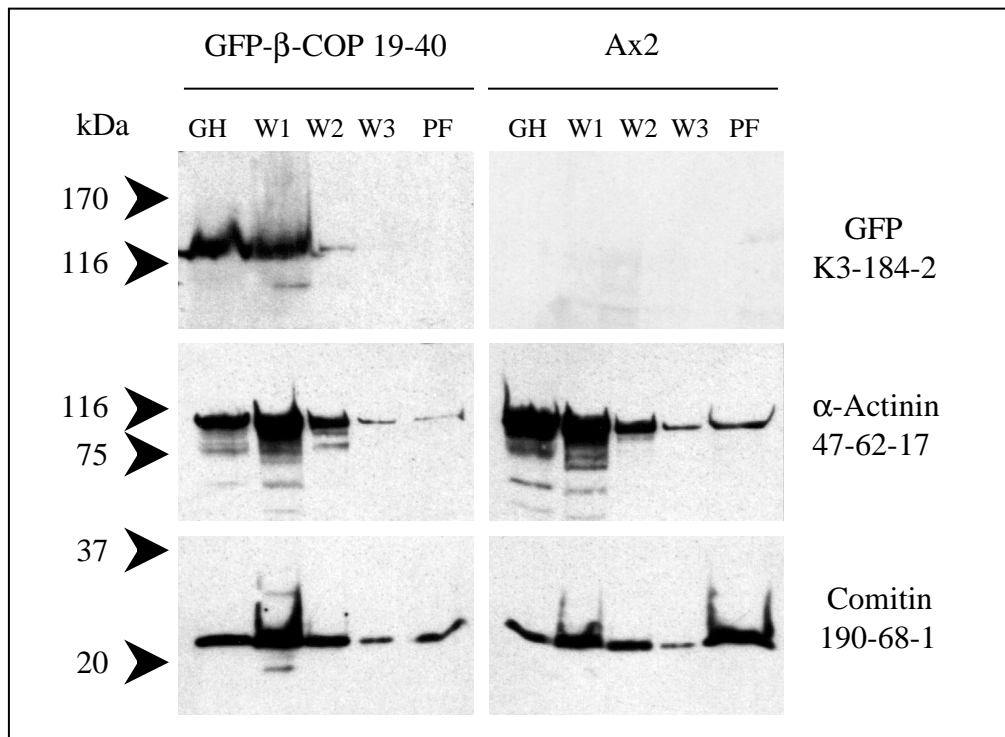


Abb. 3.4.14 : GFP- β -COP ist nicht in isolierten Phagosomenmembranen angereichert. Gezeigt ist ein Western-Blot eines 12 % SDS-Polyacrylamidgels. Die Immundetektion erfolgte mit den primären Antikörpern 47-62-17 gegen α -Aktinin, 190-68-1 gegen Comitin und K3-184-2 gegen GFP. Als sekundärer Antikörper wurde ein Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet, so daß das Ergebnis mit einer ECL-Reaktion sichtbar gemacht werden konnte. GH = Gesamtzellhomogenat; W1, W2, W3 = Waschschritt 1,2,3; PF = Phagosomenfraktion.

3.4.8 Membraninteraktion des GFP- β -COP Proteins in Gegenwart von Aluminiumfluorid oder GTP γ S

Der ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF1) ist als Bindungspartner für β -COP an der Bildung und dem Zerfall von COPI Vesikeln beteiligt (Zhao et al., 1997). Der Austausch von GDP zu GTP im cytosolischen ARF-GDP führt zur membranverankerten ARF-GTP Form (Franco et al., 1993). Hierfür ist aufgrund der geringen intrinsischen GTPase Aktivität des ARF1 ein GTPase aktivierendes Protein (ARF-GAP) und ein GTP Austausch Faktor (ARF-GEF) nötig (Dogic et al., 1999; Poon et al., 1999; Jackson und Casanova, 2000; Peyroche et al., 2001). Das ARF1-GTP vermittelt die Rekrutierung von β -COP an Golgi-Membranen und führt zur Bildung von COPI Vesikeln (Donaldson et al., 1991 und 1992, Robinson und Kreis, 1992). Zur Dissoziation der COPI Vesikel ist die Hydrolyse des durch ARF 1 gebundenen GTP zu GDP nötig (Tanigawa et al., 1993). Die G-Protein Aktivatoren GTP γ S, ein nicht hydrolysierbares GTP-Analogon, und Aluminiumfluorid sind häufig benutzte

Substanzen zur Analyse von COPI vermittelten Transportprozessen (Donaldson et al., 1992; Aniento et al., 1996; Nickel et al., 1998; Pepperkok et al., 1998; Jones et al., 1999; Pepperkok et al., 2000). Sie verursachen eine verstärkte Rekrutierung und somit Akkumulation des β -COP Proteins an Golgi-Membranen (Duden et al., 1991; Palmer et al., 1993; Finazzi et al., 1994) und verhindern die Abschnürung von COPI Vesikeln. Aluminiumfluorid wirkt dabei nicht direkt auf ARF1.

Hier sollte die Membraninteraktion des GFP- β -COP Proteins in Gegenwart von GTP γ S bzw. Aluminiumfluorid durch Immunpräzipitation mit dem anti-GFP-Antikörper K3-184-2 untersucht werden (2.2.3.13). Der Nachweis des immunpräzipitierten GFP- β -COP Proteins erfolgte im Western-Blot wiederum mit dem anti-GFP-Antikörper K3-184-2 (Abb. 3.4.15).

Die Immunpräzipitate aus der cytosolischen und der Membranfraktion zeigen in der Kontrolle (ohne GTP γ S und Aluminiumfluorid) ein deutliches Signal, das ungefähr gleichen Proteinmengen entspricht (Abb. 3.4.15). Das GFP- β -COP Fusionsprotein liegt also unter normalen Bedingungen, wie es auch für endogenes β -COP beschrieben ist, im Cytosol und an Membranen vor. In der cytosolischen Fraktion nimmt die Menge des immunpräzipitierten GFP- β -COP nach Zugabe von GTP γ S und Aluminiumfluorid allerdings deutlich ab. In Gegenwart von Aluminiumfluorid ist nur ein schwaches Signal zu detektieren. Die Zugabe von GTP γ S führt zum völligen Verschwinden des GFP- β -COP Proteins aus der cytosolischen Fraktion. Das GFP- β -COP Protein scheint also wie das endogene β -COP Protein unter Einfluß von GTP γ S oder Aluminiumfluorid an die Golgi-Membranen zu rekrutieren. Im Gegensatz dazu wurde aber keine Zunahme des GFP- β -COP Proteins in Gegenwart von GTP γ S oder Aluminiumfluorid in den Immunpräzipitaten der Membranfraktion beobachtet (Abb. 3.4.15). Dies wurde auf ein methodisches Problem zurückgeführt. Eine Ursache könnte die Absättigung des anti-GFP-Antikörpers mit dem Fusionsprotein sein. Im Western-Blot werden dann keine unterschiedlichen Proteinmengen identifiziert. Eine weitere Ursache könnte eine zu geringe Menge eingesetzter ProteinA-Sepharose im Verhältnis zur Antikörpermenge darstellen. Bisher konnte dieses Problem trotz zahlreicher methodischer Modifikationen nicht gelöst werden.

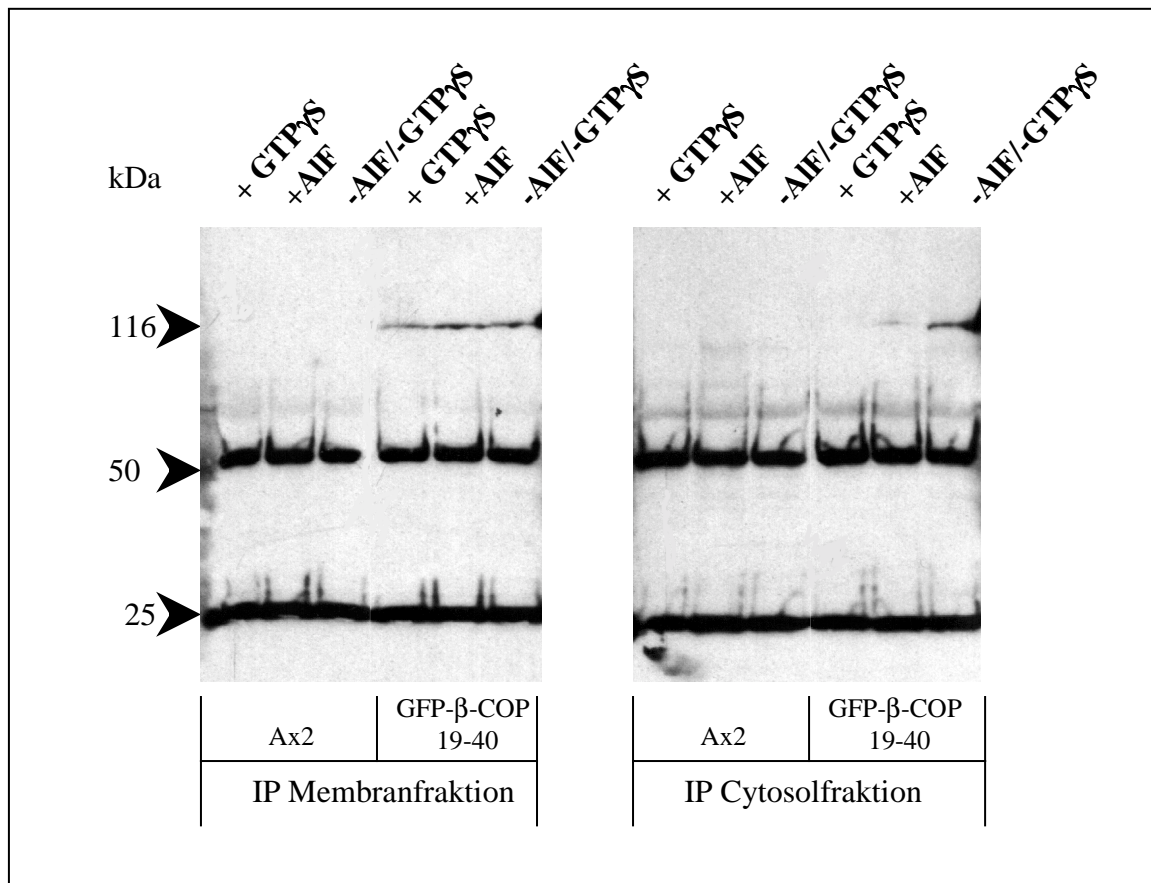


Abb. 3.4.15: Immunpräzipitation des GFP- β -COP Fusionsprotein in Membran- und cytosolischer Fraktion unter Einfluß von GTP γ S und Aluminiumfluorid. In Gegenwart von GTP γ S oder Aluminiumfluorid (AIF) erfolgte ein Zellaufschluß mit nachfolgender Fraktionierung in cytosolische und Membranbestandteile. Das über den anti-GFP-Antikörper gebundene GFP- β -COP wurde über diesen an ProteinA-Sepharose gebundenen Antigen-Antikörper-Komplex nach Erhitzen auf 95 °C in SDS-Probenpuffer in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitozellulosemembran transferiert und mit dem anti-GFP-Antikörper K3-184-2 nachgewiesen. Das Ergebnis wurde über einen Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörper mittels einer ECL-Reaktion detektiert. In allen Spuren werden die leichten und schweren Ketten bei 25 und 50 kDa der zur Präzipitation eingesetzten IgG-Moleküle durch den sekundären Antikörper erkannt. Zusätzlich wird spezifisch das immunpräzipitierte GFP- β -COP Protein bei 120 kDa detektiert.

3.4.9 GFP- β -COP exprimierende Zellen bilden in Schüttelkultur Zellaggregate

D. discoideum Ax2-Wildtypzellen liegen für gewöhnlich in Schüttelkultur als Einzelzellen vor (Abb. 3.4.16 A'), in seltenen Fällen jedoch können auch Zellaggregate auftreten, für die Zell-Adhäsionsproteine verantwortlich sind. In *D. discoideum* existieren zwei Adhäsionssysteme (Fontana, 1995; Bozzaro und Ponte, 1995), ein EDTA sensitives, das während der prä-Aggregationsphase auftritt, und ein EDTA resistentes, das während der Aggregationsphase auftritt (Garrod 1972; Beug et al., 1973). Das CAD-1 Protein vermittelt eine EDTA sensitive Zelladhäsion (Wong et al., 1996), das csA Protein dagegen eine EDTA resistente (Beug et al., 1973; Müller und Gerisch, 1978; Noegel et al., 1986). In den Arbeiten mit GFP- β -COP exprimierenden Zellen konnte beobachtet werden, daß die Kultivierung der Zellen in

Schüttelkultur stets zur Bildung von Zellaggregaten führt (Abb. 3.4.16 A). Die Auflösung der Zellaggregate in GFP- β -COP exprimierenden Zellen konnte durch 30-minütige Inkubation in Gegenwart von 10 mM EDTA erreicht werden (Abb. 3.4.16 B, B'), während die Inkubation für eine Stunde auf Eis nicht zur Auflösung der Zellakkumulate führte (Abb. 3.4.16 C, C'). Es handelt sich hier also um die Störung eines EDTA sensitiven Zell-Adhäsionssystems.

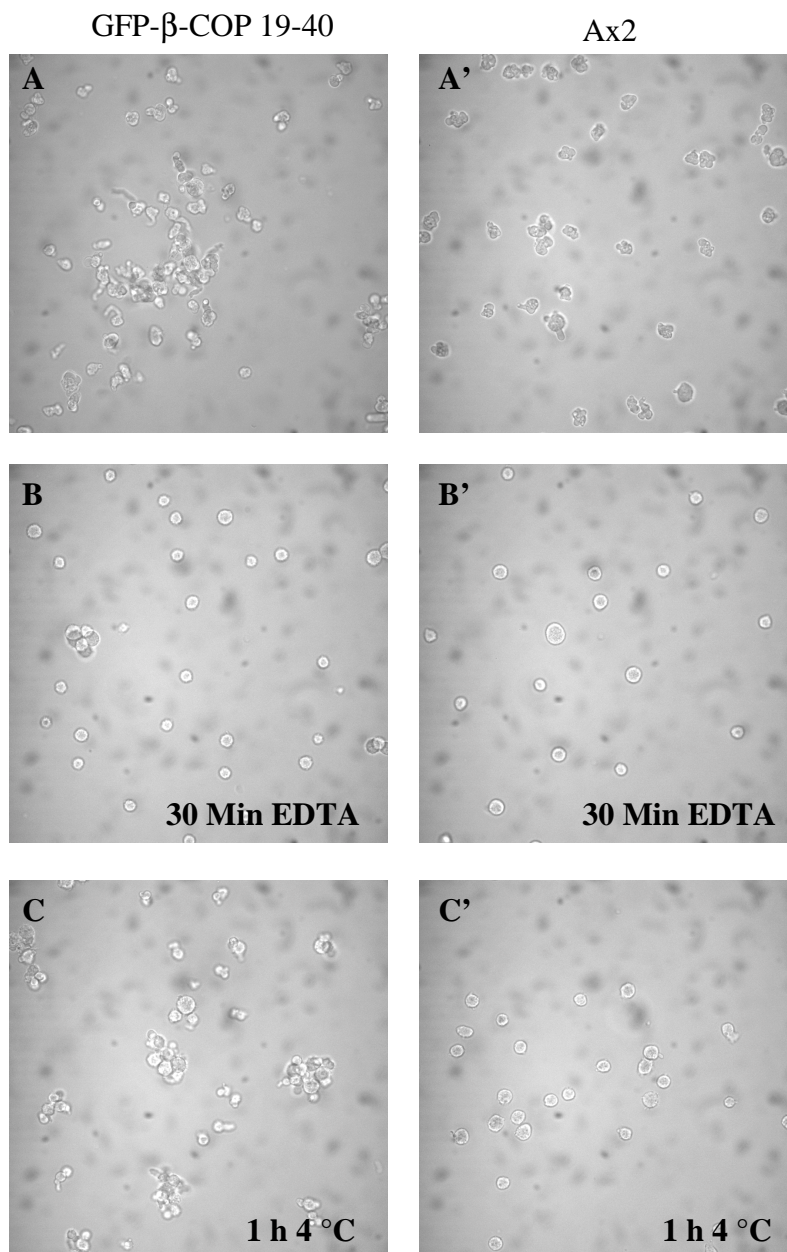


Abb. 3.4.16: Bildung von EDTA-sensitiven Zellaggregaten in GFP- β -COP exprimierenden Zellen in Schüttelkultur. GFP- β -COP exprimierende Zellen und Wildtypzellen wurden auf einem Deckgläschen absitzen gelassen und im Lichtmikroskop dokumentiert. (A, A') unbehandelte Zellen; (B, B') Zellen 30 Minuten in Gegenwart von 10 mM EDTA geschüttelt; (C, C') Zellen eine Stunde auf Eis geschüttelt. Im Gegensatz zur Inkubation in Gegenwart von 10 mM EDTA führt die Inkubation auf Eis nicht zur Auflösung der Zellaggregate.

3.4.10 GFP- β -COP exprimierende Zellen zeigen einen verlangsamtent Entwicklungszyklus

Unter Nahrungsentzug durchläuft *D. discoideum* einen Entwicklungszyklus, der zur Ausbildung eines multizellulären Organismus führt (Abb. 3.4.17). Die Amöben wandern durch einen chemotaktischen Reiz angelockt auf einen zentralen Punkt zu und formen Aggregate, die sich in ein Pseudoplasmodium, den sog. „Slug“, umwandeln. Als Chemoattraktans dient cAMP, das von den Zellen auf den Reiz hin selbst sezerniert wird (cAMP-Relay). Für die Aggregation sind mehrere Zelladhäsionssysteme erforderlich. Für die frühe Phase ist das CAD-Protein notwendig, ein 24 kDa, Calcium bindendes Protein (Wong et al., 1996). Es wird abgelöst von der „contact site A“ (csA), einem 80 kDa Glykoprotein (Beug et al., 1973; Müller und Gerisch, 1978; Noegel et al., 1986). Nach 12-16 Stunden ist das Slugstadium erreicht, in dem sich das Pseudoplasmodium phototaktisch bewegen kann. Die spezifische Expression des D19 Gens, dessen Genprodukt das „prespore“ Antigen (psA) ist, startet mit der Differenzierung in prä-Sporzellen und prä-Stielzellen. Das psA Protein ist ein glykosyliertes Zelloberflächenprotein, das ebenso wie das csA Protein als typischer Zelldifferenzierungsmarker in *D. discoideum* gilt (Early et al., 1988). Der Entwicklungszyklus endet nach ca. 24 Stunden im Kulminationsstadium mit der Ausbildung eines Fruchtkörpers.

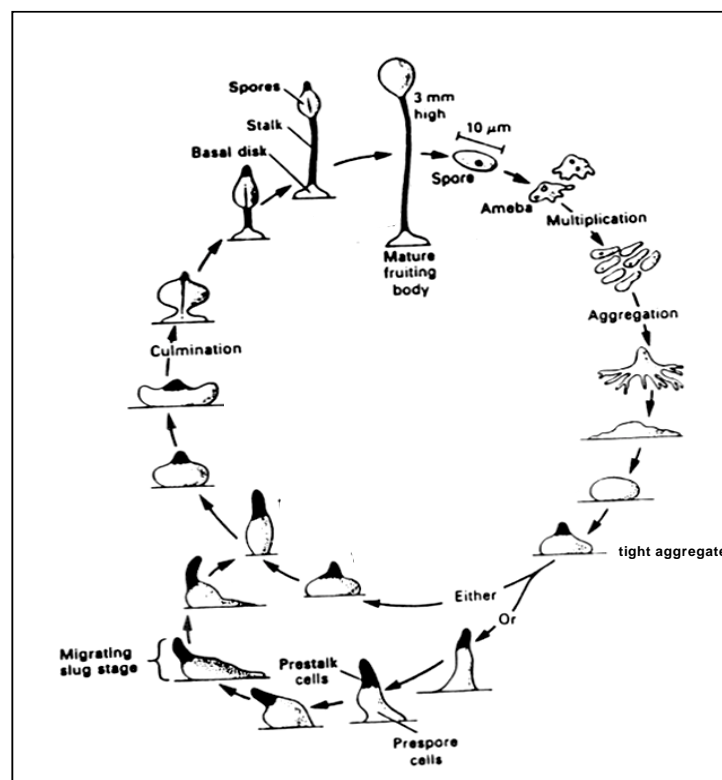


Abb. 3.4.17: Morphologische Stadien der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* (aus Witke, 1991).

Während der Entwicklungsanalyse der monoklonalen GFP- β -COP 19-40 Zelllinie auf Phosphatagarplatten wurde im Vergleich zu Ax2-Wildtypzellen eine Verlangsamung festgestellt (Abb. 3.4.18). Nach sechs Stunden befinden sich GFP- β -COP Zellen und Wildtypzellen im Aggregationsstadium. Während Ax2-Wildtypzellen nach 15 Stunden bereits das „Slug“-Stadium erreicht haben, befinden sich die GFP- β -COP Zellen noch im Aggregationsstadium. Der Wildtyp zeigt im weiteren Verlauf eine normale Zellmorphogenese, durchläuft das Kulminationsstadium und bildet morphologisch normale Fruchtkörper aus. Die GFP- β -COP Zellen haben im Vergleich dazu nach 22 Stunden Nahrungsentzug das „tight aggregate“ Stadium erreicht. Nach 30 Stunden erreichen sie die Kulminationsphase, ein morphologisch normal aussehender Fruchtkörper wird jedoch erst nach 40 Stunden gebildet. Zusätzlich zur Entwicklungsverzögerung ist eine deutliche Reduzierung in der Größe in den sich ausbildenden Zellaggregaten und Fruchtkörpern der GFP- β -COP Zellen zu erkennen.

In *D. discoideum* existieren für die einzelnen Entwicklungsstadien Markerproteine. So definiert das Auftreten des csA Proteins die Aggregationsphase, während das psA Protein als Marker für die Differenzierung in prä-Sporzellen gilt (s. o.). Um die zeitliche Verzögerung im GFP- β -COP exprimierenden 19-40 Stamm detailliert zu untersuchen, wurde Gesamtproteinextrakt von verschiedenen Entwicklungszeiten im Western-Blot auf die Expression verschiedener Proteine getestet. Das GFP- β -COP Protein selbst wird kontinuierlich über einen 24-stündigen Entwicklungszeitraum exprimiert (Abb. 3.4.19). Das csA Protein tritt in Ax2 und GFP- β -COP Zellen zwar zur gleichen Zeit auf (t_6) weist aber einen großen Unterschied in der Menge des csA Proteins auf. Im Wildtyp ist das csA Protein bei t_6 maximal exprimiert, in GFP- β -COP Zellen ist dagegen nur ein schwaches Signal zu detektieren. Das csA Protein trägt mehrere N- und O-glykosidisch gebundene Zuckerreste (Berthold et al., 1985). Zur Detektion dieser Modifikationen sind spezifische Antikörper vorhanden, wie der mAk 123-135 der die N-glykosidisch gebundenen Zucker an der csA erkennt. Zusätzlich erkennt er auch die Zuckermodifikationen an einem 90 kDa und einem 100 kDa Protein. Das 100 kDa Protein ist in wachsenden Zellen und in der frühen Aggregationsphase bis t_9 nachweisbar, das 90 kDa Protein ist neun Stunden nach Beginn des Entwicklungszyklus maximal exprimiert und bleibt bis zum Ende des Entwicklungszyklus nachweisbar.

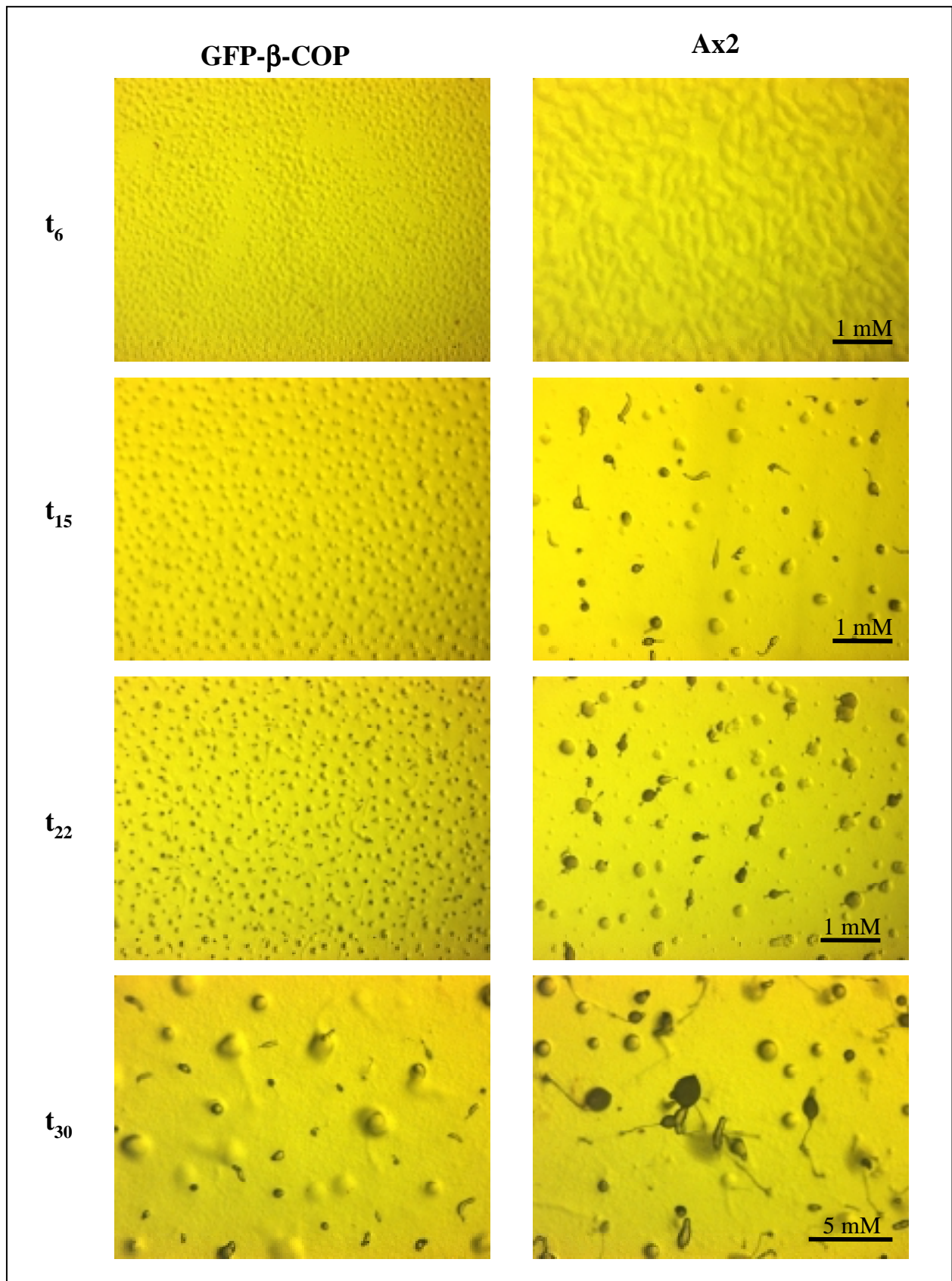


Abb. 3.4.18: Vergleichende Analyse der Entwicklungsstadien von GFP-β-COP und Ax2-Zellen. Je 1×10^8 Zellen wurden auf einer Phosphatagarplatte ausgebracht und bei 21 °C inkubiert. Der Entwicklungszustand wurde jeweils zu den angegebenen Zeitpunkten dokumentiert. Mit Ausnahme der beiden unteren Aufnahmen ist jeweils ein gleich großer Bildausschnitt dargestellt.

In GFP- β -COP Zellen beginnt die Expression der csA ebenfalls nach sechs Stunden Entwicklung auf Phosphat-Agar-Platten und bleibt im Gegensatz zum Wildtyp auf einem konstant niedrigen Niveau. Ebenso wird das 100 kDa Protein detektiert, das bis t_{18} nachweisbar ist, jedoch fehlt das Signal bei 90 kDa. Dies könnte auf eine veränderte Prozessierung glykosylierter Proteine in GFP- β -COP Zellen hinweisen.

Ein bemerkenswertes Ergebnis lieferte die Markierung des Western-Blots mit dem monoklonalen Antikörper mud1, der spezifisch das 30 kDa große „prespore antigen“ psA erkennt (Krefft, 1983). In Wildtypzellen ist das psA Protein nach ca. 12 Stunden nachweisbar und bleibt bis zum Abschluß des Entwicklungszyklus nach 24 Stunden auf einem konstant hohen Niveau. In GFP- β -COP Zellen konnte mit dem mud1-Antikörper kein psA Protein spezifisches Signal detektiert werden. Eine Ursache könnte eine veränderte Biosynthese des psA Proteins sein. Das D19-Gen, das für das psA Protein kodiert, könnte aber auch durch eine zufällige Insertion des pBsr-GFP- β -COP Vektors in den D19-Genabschnitt inaktiviert sein.

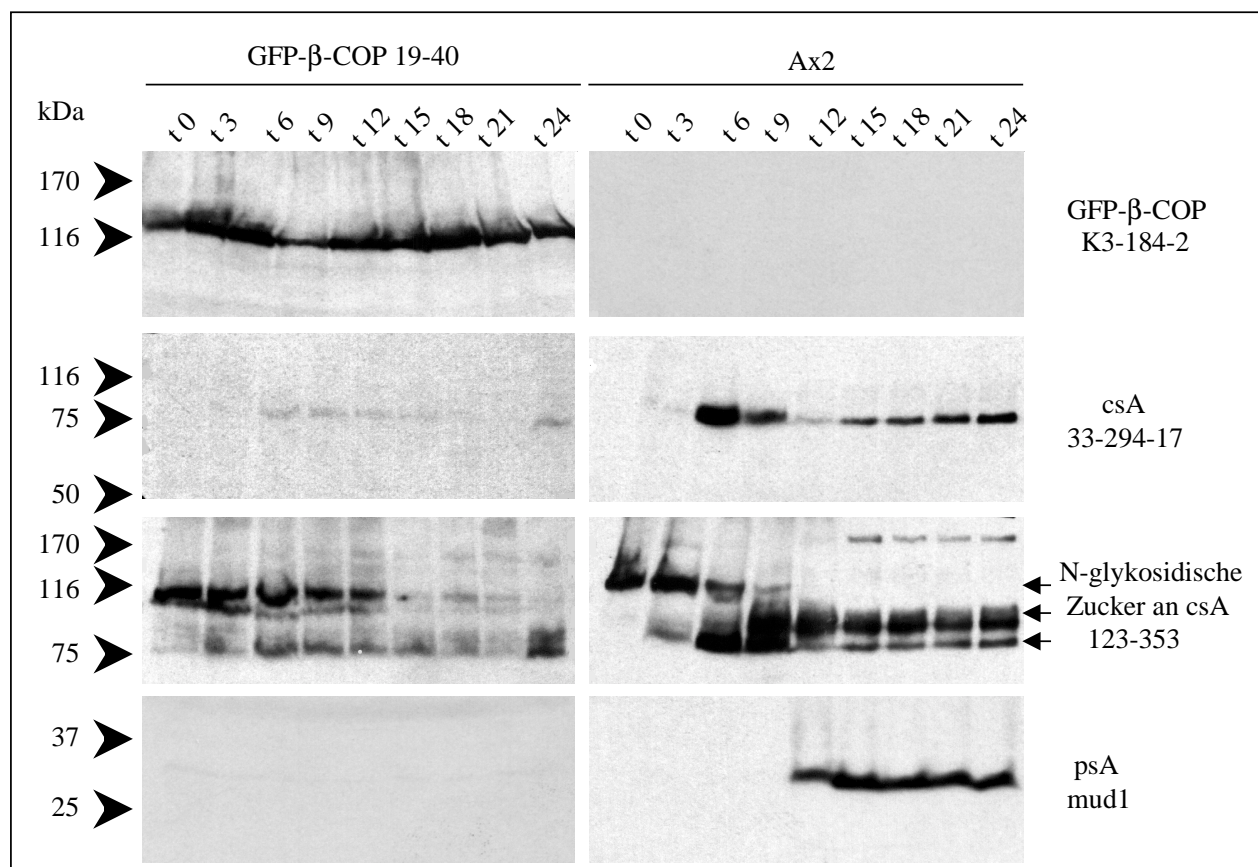


Abb. 3.4.19: Vergleichende Western-Blot-Analyse eines „Protein-Timecourse“ von Ax2 und GFP- β -COP Zellen. Gezeigt sind jeweils identische Expositionszeiten der Immunmarkierung eines Western-Blots mit den angegebenen Antikörpern zur Detektion des GFP- β -COP, psA und csA Proteins. Geladen sind identische Volumina eines Gesamtzellhomogenats ($= 1 \times 10^8$) der entsprechenden Zeitpunkte. Die dafür verwendeten Zellen wurden auf Phosphat-Agar-Platten entwickelt.

Eine Insertion des Vektors in den für das psA Protein kodierenden Genabschnitt wurde im Southern-Blot überprüft. Die Restriktion der genomischen DNA der GFP- β -COP Zelllinien 19-5, 19-27 und 19-37 und 19-40 erfolgte mit BglII. Dieses Restriktionsenzym besitzt keine Erkennungsstellen im D19-Gen, spaltet aber im pBsr-GFP- β -COP Vektor einmal innerhalb der β -COP Sequenz. Das Auftreten zweier Banden im Southern-Blot wäre auf die Insertion des Vektors in den D19-Genabschnitt zurückzuführen. Außerdem sollte dies zudem ein Restriktionsmuster produzieren, wie es auch durch Hybridisierung mit einer spezifischen GFP-Sonde entsteht. Die vier Linien 19-5, 19-27, 19-37 und 19-40 zeigen dabei jeweils identische Restriktionsmuster mit zwei Signalen. Dieses ist wiederum identisch mit dem durch eine GFP-Sonde produzierten Restriktionsmuster. Damit wurden diese GFP- β -COP *D. discoideum* Zelllinien als „knock-out“-Mutanten des D19-Gens identifiziert, was die fehlende Detektion des psA Proteins in Western-Blot-Analysen und die Entwicklungsverzögerung erklären kann.

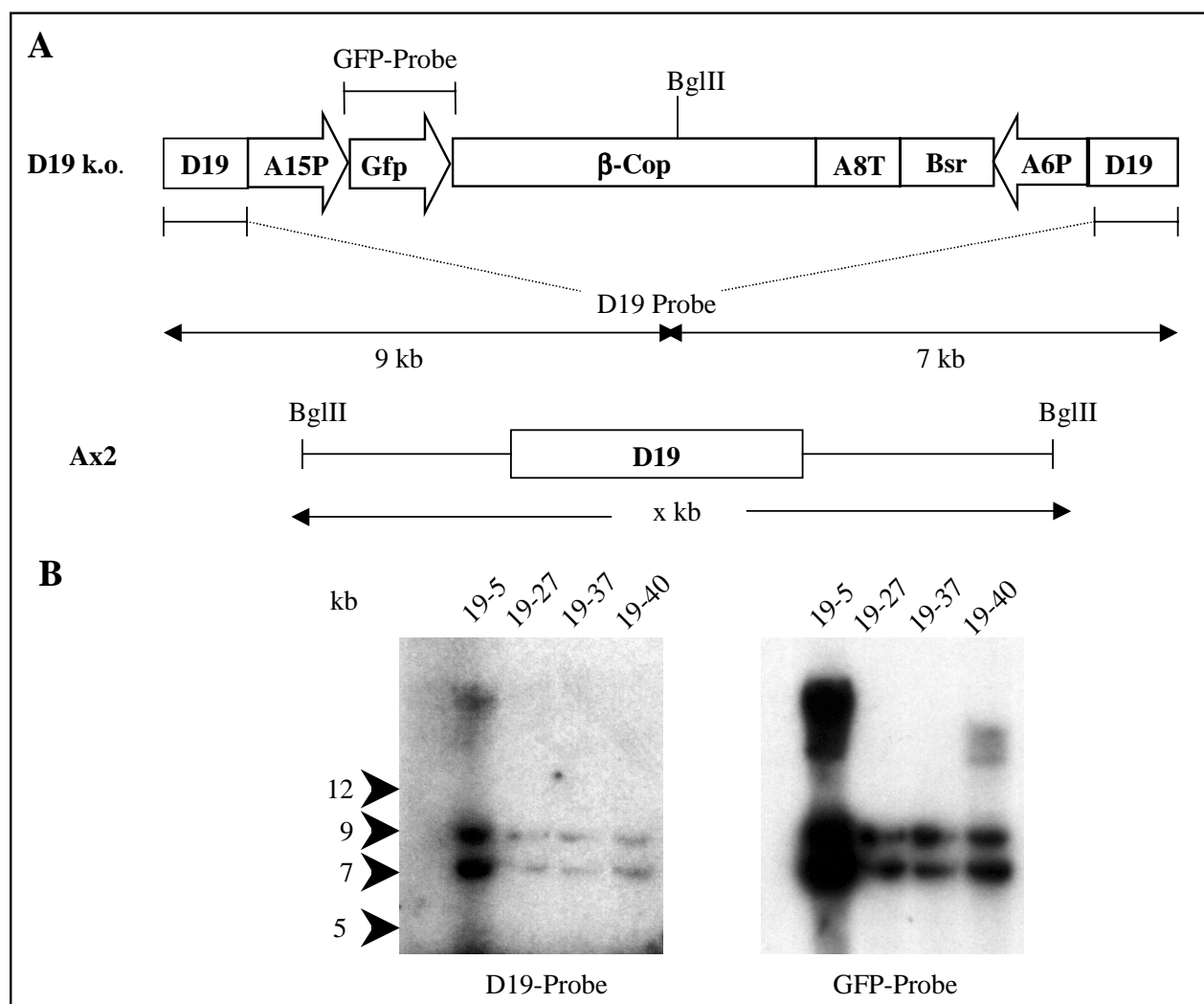


Abb. 3.4.20. Southern-Blot-Analyse der vier unabhängigen GFP- β -COP exprimierenden Zelllinien mit einer spezifischen D19-Sonde. (A) Schematische Darstellung der Vektorinsertion in das D19-Gen sowie Darstellung im Wildtyp und Markierung der verwendeten Hybridisierungsproben. (B) Die genomische DNA wurde mit BglII geschnitten, gelelektrophoretisch im 0,8 %igen TAE-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer spezifischen radioaktiv markierten D19- oder GFP-Probe. Durch das identische Hybridisierungsmuster der beiden verwendeten Sonden konnte eine Insertion der entsprechenden Vektorabschnitte in die genomische D19-Sequenz nachgewiesen werden.

3.5 Herstellung monoklonaler anti-Peptid- β -COP-Antikörper

Zur Herstellung von anti- β -COP-Antikörpern wurden drei synthetisch hergestellte Peptide verwendet. Dafür wurden aus der N-terminalen, mittleren und C-terminalen Domäne des β -COP Proteins je ein Sequenzbereich zur Peptidsynthese ausgewählt, der in Abhängigkeit von der Peptidposition mit N 111-131, CP 482-506 und C 803-823 bezeichnet wurde (Abb. 3.5.1). Zur Immunisierung wurden diese Peptide an KLH gekoppelt (2.2.3.2).

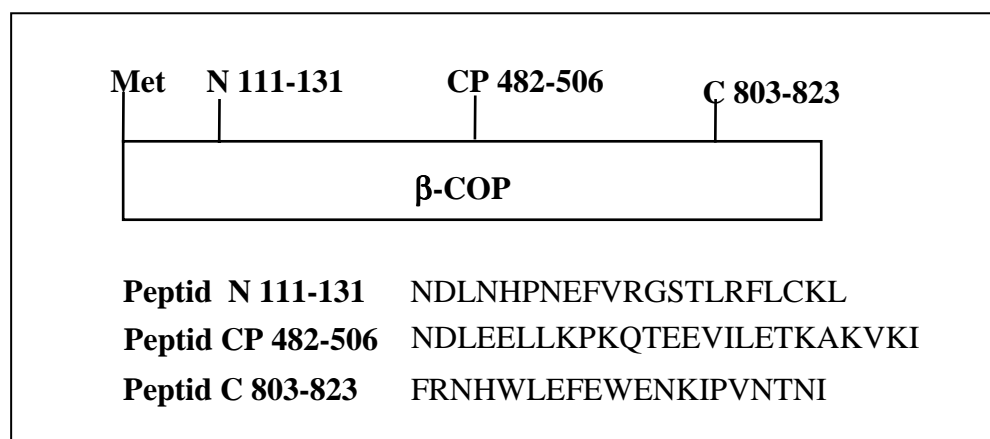


Abb. 3.5.1: Position der synthetischen Peptide in Relation zur β -COP Proteinsequenz.

Mit diesen Peptiden wurde zunächst die Herstellung polyklonaler Kaninchen Antikörper versucht. Trotz einer positiven Immunantwort der jeweiligen Kaninchen gegen die Peptide, führten die entsprechenden Antiseren auch nach Aufreinigung nicht zur Detektion eines spezifischen Signals erwarteter Größe in Western-Blot-Analysen. Es konnte auch keine spezifische Immunmarkierung in Immunfluoreszenzstudien festgestellt werden. Mit denselben Peptiden wurde die Generierung monoklonaler Antikörper versucht (2.2.3.3). Die Überstände der Hybridoma-Zellpopulationen wurden zunächst mittels ELISA gegen die drei unterschiedlichen Peptide durchmustert (2.2.3.3.4). Überstände aus Zellpopulationen, die eine positive Immunreaktion zeigten, wurden weiterhin durch Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Analysen von Ax2 und GFP- β -COP Gesamtzellhomogenat untersucht. Zellklone, die im Immunoblot ein Signal bei ca. 100 kDa zeigten, bzw. eine spezifische Immunfluoreszenzmarkierung aufwiesen, wurden subkloniert.

Reaktion und Spezifität der Antikörperüberstände der subklonierten Zellen wurden dann nochmals im ELISA, Immunoblot und in Immunfluoreszenzstudien getestet. Dabei wurden zwei Zelllinien identifiziert, die ein ELISA positives Signal mit dem N 111-131 Peptid zeigten (Linien: K17-559-3, K16-351-7) und drei Zelllinien, die mit dem C 803-823 Peptid (K17-498-2,

K17-861-1; K17-871-2) reagierten. Es konnten keine Zelllinien identifiziert werden, deren Antikörperüberstände eindeutig mit dem CP 482-506 Peptid reagierten. Die identifizierten Zelllinien lassen sich durch die Ergebnisse der Immunfluoreszenzstudien und Western-Blot-Analysen in zwei unterschiedliche Gruppen einteilen. Antikörperüberstände aus den Zelllinien, die das C 803-823 Peptid erkennen, wie z. B. der K17-498-2 Antikörper, zeigen in Immunfluoreszenzstudien mit Ax2 die spezifische Markierung einer Struktur, die in Form einer Kappe am Zellkern lokalisiert ist (Abb. 3.5.2 A). Zusätzlich ist eine diffuse Färbung über die ganze Zelle verteilt. Der Antikörper K17-559-3, der das N 111-131 Peptid im ELISA erkennt, markiert dagegen in Immunfluoreszenzstudien mit Ax2 größere vesikuläre Strukturen, die über die Zelle verteilt sind (Abb. 3.5.2 B).

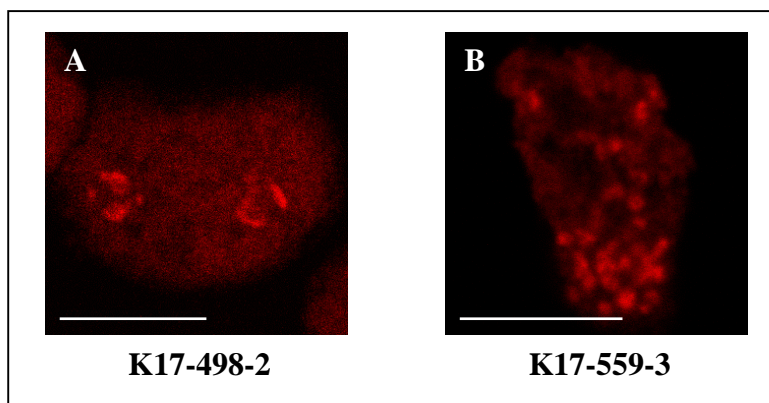


Abb. 3.5.2: Immunfluoreszenzstudien an Methanol fixierten Ax2-Wildtypzellen mit Antikörperüberständen der K17-498-2 und K17-559-3 Zelllinien. (A) Immunmarkierung mit Antikörperüberstand der K17-498-2 Zelllinie; (B) Immunmarkierung mit Antikörperüberstand der K17-559-3 Zelllinie. Maßstab: 10 μ m.

In GFP- β -COP Zellen erkennt der K17-559-3 Antikörper nicht das GFP- β -COP Fusionsprotein (Abb. 3.5.3). Er zeigt die bereits in Wildtypzellen beobachtete vesikuläre Struktur und keine Kolo-kalisation mit dem GFP- β -COP Protein. Der K17-498-2 Antikörper erkennt dagegen neben der perinukleären Struktur auch das GFP- β -COP Fusionsprotein in einigen aber nicht allen Zellen. In Abb. 3.5.3 A'' ist teilweise eine Kolo-kalisation der durch den Antikörper markierten und den GFP-markierten Strukturen zu erkennen.

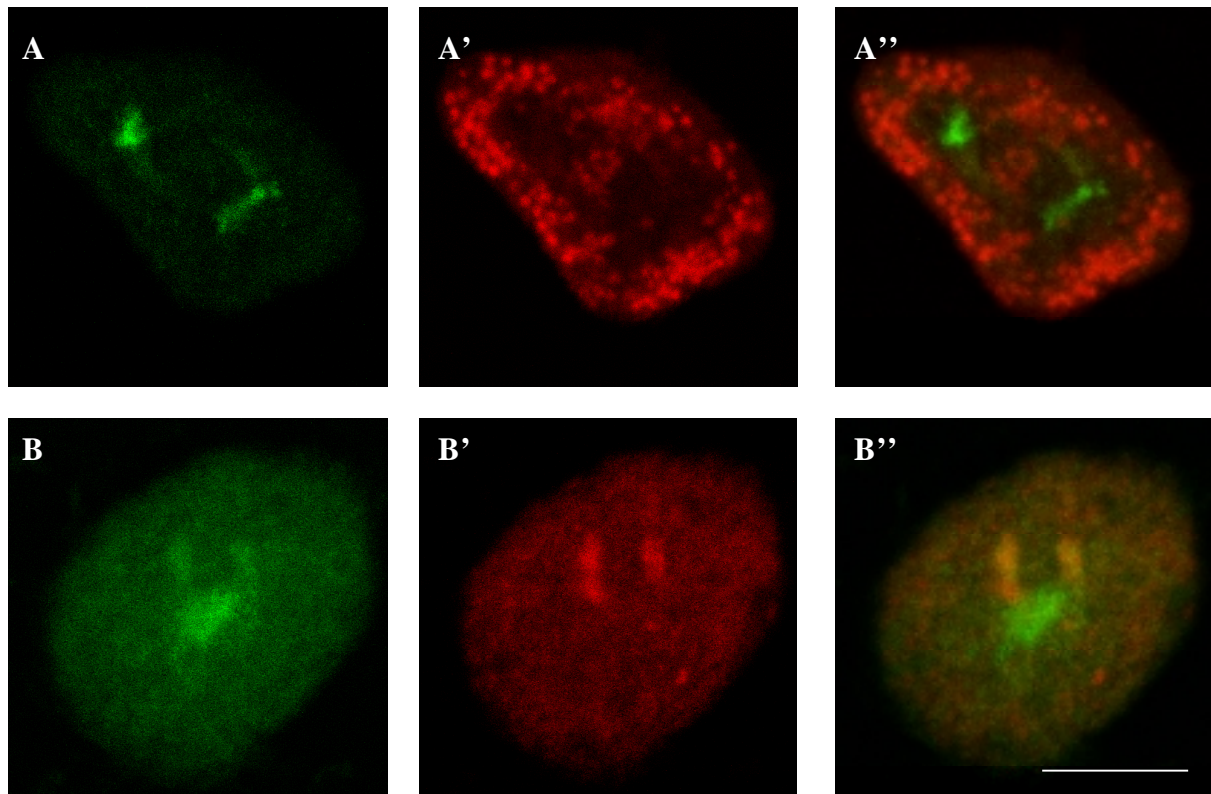


Abb. 3.5.3: Immunfluoreszenzstudien an Methanol fixierten GFP- β -COP Zellen mit Antikörperüberständen der K17-498-2 und K17-559-3 Zelllinien. (A, B) GFP-Fluoreszenz in GFP- β -COP Zellen (A') Immunmarkierung mit Antikörperüberständen der K17-559-3 Zelllinie; (B') Immunmarkierung mit Antikörperüberständen der K17-498-2 Zelllinie; (A'', B'') Überlagerung der beiden vorangegangenen Bilder. Maßstab: 10 μ m.

Die durch den Antikörper K17-559-3 markierten Zellstrukturen wurden nicht weiter charakterisiert werden, da polyklonale Antikörper, die eine ähnliche Immunfluoreszenzmarkierung hervorrufen, nicht vorhanden sind. Es konnte aber sichergestellt werden, daß es sich bei den markierten Strukturen nicht um Mitochondrien handelt, die ein ähnliches Muster aufweisen (Abb. 3.5.5 A''). Dafür wurden die Mitochondrien von Ax2 Wildtypzellen mit dem MitoTracker[®] Red CMXRos markiert (2.2.4.6). Die Zellen wurden anschließend mit Methanol fixiert und mit dem K17-559-3 Antikörper getestet. Der Nachweis des primären Antikörpers erfolgte in diesem Fall mit einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper, so daß dessen Markierung durch eine Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich sichtbar ist. In der Überlagerung der mit dem Antikörper und dem MitoTracker markierten Strukturen ist keine Kolokalisation der jeweils markierten Strukturen zu erkennen (Abb. 3.5.4 A'').

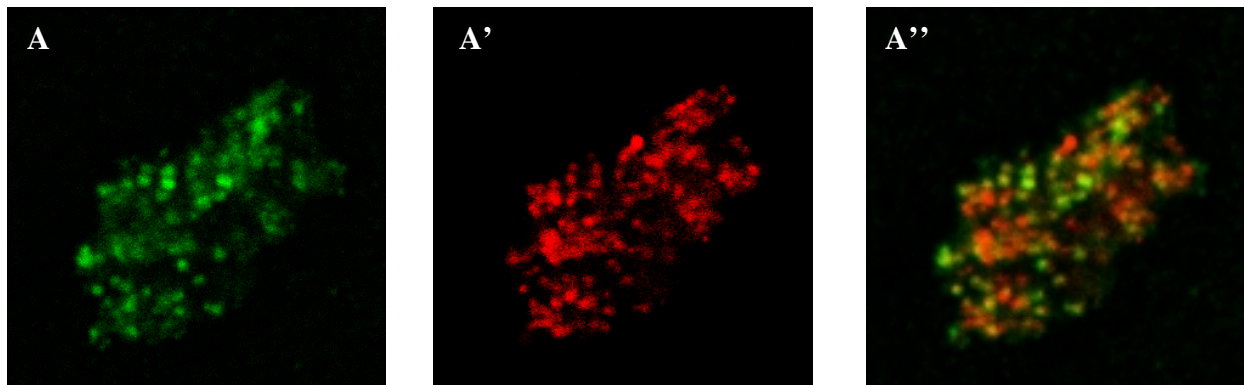


Abb. 3.5.4: Fluoreszenzmarkierung der Mitochondrien in *D. discoideum* Ax2-Zellen mit dem MitoTracker® Red CMXRos und anschließender Immunfluoreszenzstudie mit dem Antikörper K17-559-3. (A) Immunmarkierung mit Antikörperüberstand der K17-559-3 Zelllinie; (A') Fluoreszenzmarkierung mit dem MitoTracker® Red CMXRos; (A'') Überlagerung der beiden vorangegangenen Bilder. Maßstab: 10 µm.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen von Gesamtproteinextrakt aus GFP-β-COP und Ax2-Zellen bestätigten die Einteilung in zwei Antikörpergruppen. Der mAk K17-559-3 erkennt in Western-Blot-Analysen spezifisch ein Protein von 100 kDa in Wildtyp und GFP-β-COP Zellen (Pfeil in Abb. 3.5.5). Dies entspricht der theoretischen Masse des β-COP Proteins. Die zusätzlich erkannten kleineren Signale sind möglicherweise Degradationsprodukte. In den vier GFP-β-COP exprimierenden Linien wird zusätzlich ein schwaches Signal bei 120 kDa Protein detektiert, was der theoretischen Masse des GFP-β-COP Fusionsprotein entspricht (Stern in Abb. 3.5.5). Die geringe Ausprägung dieses Signals könnte auf eine schwächere Antikörperbindung an das Fusionsprotein zurückzuführen sein, so daß dieses Ergebnis nicht unbedingt der Northern-Blot-Analyse widerspricht. Es könnte aber auch sein, daß die GFP-β-COP spezifische RNA aufgrund einer fehlerhaften Termination nur wenig effizient translatiert wird. Die monoklonalen Antikörper, die gegen das C 803-823 Peptid gerichtet sind, reagieren nicht im Western-Blot (hier nicht gezeigt).

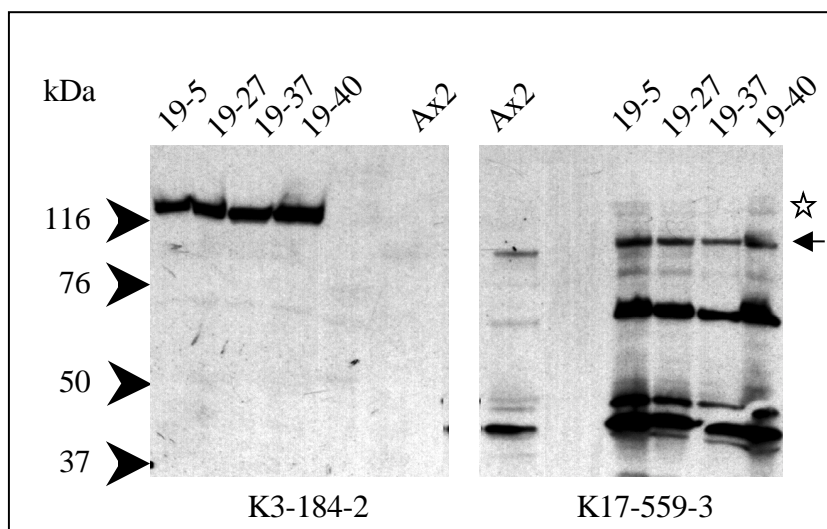


Abb. 3.5.5: Reaktion des K17-559-3 Antikörpers im Western-Blot von *D. discoideum* Ax2 und GFP-β-COP Proteinextrakten. Gesamtprotein von 1×10^6 Zellen wurde in einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit dem anti-GFP-Antikörper K3-184-2, bzw. mit dem potentiellen anti-β-COP-Antikörper K17-559-3 inkubiert. Die Bindung wurde durch einen Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper und anschließende ECL-Reaktion nachgewiesen.

3.6 Versuch zur Generierung einer „knock-out“- und „knock-in“-Mutante sowie verschiedener GFP- β -COP Teilfusionen

„Knock-out“-Mutanten sind in *D. discoideum* ein weit verbreitetes Werkzeug zur funktionalen Analyse von Genen. Zur Herstellung einer „knock-out“-Mutante werden üblicherweise Resistenzkassetten, z. B. Blastocidin oder Geneticin, in das jeweilige Gen inseriert. Dies führt im Idealfall zu einem Ausfall der Expression des entsprechenden Gens. Je nach Insertionsort der Resistenzkassette im Gen können Teilexpressionen des entsprechenden Gens vorkommen. Der Austausch des endogenen Gens erfolgt über homologe Rekombination. Dazu wird ein Vektor in *D. discoideum* Zellen transformiert, der eine Resistenzkassette enthält, die von Sequenzen des Gens flankiert ist. Zur Generierung einer spezifischen β -COP „knock-out“-Mutante wurden in dieser Arbeit zwei Konstrukte hergestellt (Abb. 2.1.3). Im pCOP-Bsr-k.o. Konstrukt wurden die Nukleotide zwischen den Position 1449 und 2025 (A des Starcodons = Position 1) deletiert und durch eine Blastocidinresistenzkassette ersetzt, die nach Transformation in *D. discoideum* die Expression des Resistenzmarkers unter der Kontrolle des konstitutiven Aktin-6-Promotors erlaubt. Im p β -COP5'-Bsr Δ A6P- β -COP3' wurden die Nukleotidpositionen zwischen 1010 und 2297 deletiert und durch das Blastocidinresistenzgen so ersetzt, das der offene Leserahmen erhalten bleibt und nur eine Expression des Resistenzmarker erfolgt, wenn es als Fusionsprotein mit dem 5'- β -COP Teilstück unter der Kontrolle des endogenen β -COP Promotors exprimiert wird. Mehrfache Transformation beider Vektoren und unterschiedliche Durchmusterungsverfahren wie PCR-, Southern-Blot-, Northern-Blot-Analyse Blastocidin-resistenter Transformanten zeigten keine Deletion des endogenen β -COP Gens und führten somit nicht zur Identifizierung einer *D. discoideum* „knock-out“-Zelllinie.

Ähnliche Resultate ergaben sich im Versuch zur Generierung einer „knock-in“ *D. discoideum* Zelllinie. „knock-in“ Vektoren sind ebenfalls zur Analyse von *in vivo* Gen-Funktionen geeignet (Eichinger et al., unveröffentlicht) und erlauben nach homologer Rekombination die Expression eines entsprechenden GFP-Fusionsproteins. So kann das Fusionsprotein unter der Kontrolle des jeweiligen endogenen Promotors studiert werden. In dieser Arbeit wurden dafür die Vektoren pBsr-GFP- β -COP k.i. und pBsr-GFP-COP 1793-2738 k.i. verwendet. Im ersten Vektor wurde die vollständige β -COP cDNA ohne Stopcodon mit dem 5'-Ende unter Erhalt des offenen Leserahmens an das 3'-Ende der GFP Sequenz fusioniert. Gleiches gilt für Transformanten des pBsr-GFP-COP 1793-2738 k.i. Vektors. Um eine PCR-Durchmusterung zu ermöglichen, sind hier allerdings nur die Nukleotidpositionen 1793-2738 mit der GFP-Sequenz unter Erhalt des offenen Leserahmens fusioniert. In grün fluoreszierenden Transformanten sollte also durch

homologe Rekombination das endogene β -COP Gen durch das Fusionsgen ersetzt sein. Positive Transformanten sollten dann durch mikroskopische Inspektion identifiziert werden können. Es führten aber weder diese Möglichkeit noch Southern- oder Northern-Blot-, PCR-, oder Western-Blot-Analysen mit dem anti-GFP-Antikörpers K3-184-2 zur Identifizierung eines „knock-in“ Ereignisses.

Weiterhin wurde versucht verschiedene GFP- β -COP Teilfusionen in *D. discoideum* zu exprimieren. Wie bereits in Abb. 3.3.1 gezeigt, besteht das β -COP Protein aus einem konservierten N- und C-terminalen Bereich, die von einem nur schwach konservierten mittleren Verbindungsstück unterbrochen werden. Die hergestellten Vektoren zur Expression von GFP- β -COP Teilfusionen sollten eine funktionale Analyse dieser drei Domänen ermöglichen (Abb. 2.1.2). Die Vektoren pBsr-GFP-N- β -COP, pBsr-GFP-CP- β -COP und pBsr-GFP-C- β -COP sollten nach Transformation in *D. discoideum* zur Expression des N-terminalen, des mittleren (CP = „center part“) oder des C-terminalen Bereichs als GFP-Fusion führen. Die Vektoren pBsr-GFP- β -COP Δ N, pBsr-GFP- β -COP Δ CP und pBsr-GFP- β -COP Δ C sollten nach Transformation die Expression von GFP-Fusionsproteinen ermöglichen, in denen jeweils der N-terminale, der mittlere Bereich oder der C-terminale Bereich deletiert und durch GFP ersetzt ist. Blasticidin-resistente Transformanten wurden mittels visueller Inspektion am Fluoreszenzmikroskop, oder in Western-Blot-Analysen mit dem anti-GFP-Antikörper K3-184-2 untersucht. Es konnten auch hier keine positiven Transformanten identifiziert werden.

3.7 Suche nach zusätzlichen β -COP Homologen in *D. discoideum*

Aufgrund von Southern-Blot-Analysen, die neben dem β -COP Signal zusätzliche Signale zeigten, wurde das Vorhandensein von weiteren β -COP Homologen für möglich gehalten. Zur Identifikation dieser möglichen β -COP Homologe wurde mehrmals eine *D. discoideum* λ -ZAP cDNA Bank mittels Filterhybridisierung durchmustert (2.2.2.17). So wurde diese cDNA-Bank viermal mit jeweils unterschiedlichen β -COP DNA-Proben unter schwach stringenten Bedingungen (30-40 % Formamid im Hybridisierungs- und Waschpuffer) durchmustert. Die erste Durchmusterung erfolgte mit einer Probe, die die Nukleotidreste 1449-2738 einschließt und den konservierten C-terminalen Bereich des β -COP repräsentiert. Die zweite Durchmusterung erfolgte mit einer N-terminalen Sonde aus dem ebenfalls konservierten Bereich des β -COP. Diese Sonde umfaßte die Nukleotidreste 87-1449. Die Verwendung beider Proben führte zu zahlreichen Signalen in der Filterhybridisierung, jedoch zeigten anschließende Sequenzierungsanalysen, daß es sich bei keinem der identifizierten Klone um β -COP Homologe handelte. So wurde eine neue Strategie entwickelt. Dafür wurden jeweils identische Filterabzüge der cDNA-Bank zum einen mit einer konservierten Probe aus dem C-terminalen Bereich des β -COP (Nukleotidreste 2236-2731), zum anderen mit einer Probe aus dem schwach konservierten mittleren Bereich des β -COP getestet (Nukleotidreste 1449-2025). Die Idee war, daß β -COP Homologe ebenso aus einem konservierten N- und C-terminalen sowie einem schwach konservierten mittleren Bereich bestehen könnten. Im Idealfall sollte die Hybridisierung mit der C-terminalen Sonde ein Signal zeigen, das auf dem Filter, der mit der Probe aus dem mittleren Bereich getestet wurde, schwächer bzw. nicht vorhanden ist. Diese Durchmusterung der cDNA Bank führte ebenfalls nicht zur Identifikation von β -COP Homologen. Generell wurden zahlreichen Klone mit WD-40 Wiederholungen identifiziert.

Ebenso konnte bis heute durch wiederholte Durchmusterung der Daten des *D. discoideum* Genomprojekts kein mögliches β -COP Homolog identifiziert werden. β -COP zeigt dagegen eine ausgeprägte Homologie zu β -Adaptin (Abb. 3.7.1). *D. discoideum* β -COP und β -Adaptin besitzen 15 % identische und 18 % ähnliche Aminosäuren als Gemeinsamkeit. Die Homologie des β -COP zu β -Adaptin ist bereits früher beschrieben worden (Duden et al., 1991; Serafini et al., 1991). Der Vergleich von β -Adaptin aus verschiedenen Organismen mit β -COP zeigt einen stärker konservierten N-terminalen Bereich und einen schwach konservierten C-terminalen Bereich.

dd beta-Adaptin	-----IGETHELKPELLSQREDKKKEAVKKVTAAMTVGKDVSMFLF	40
dd beta-COP	MSALTQSGSIEKPCITILINYDKGDPFQVNEFKQNFHEGTTTEQKIETLKKVILYTINGEPIPQLIM	65
dd beta-Adaptin	THVLNMQTHNLETKKLVYLYVMNYAKNHP----DRAITLAVNIFQKDASDPNPLIRALAVRTMGC	101
dd beta-COP	PIITLYVMPSNDHTTKKLLLYWEVIEKTHLGKLGKSEMILVCNLSLLNDLNHPNEFVRGSTRFLCK	130
dd beta-Adaptin	IRVDNITEHLCEPLRHALKVSYEFYFLYINILYHIFFLFFIFYFFFIIDQDPYVRKTAAVCVAK	166
dd beta-COP	LREAEVLEPLVPSVRSNLENRHAVCRRNAVLAAYNIYS-----EFDYLIP-----D-----	176
dd beta-Adaptin	LYDVNPELIVENQGFNLINLNDLLGDSNPMVVANAVASLTEIDEVSKKEVFRIHSGNLNKLDAALNE	231
dd beta-COP	----APELITYN--FLLQEKDASCKRNAFIMLFCAPKAVEYLS-----S--VLDEVESFGD	225
dd beta-Adaptin	CTEWGQVFTLNSLCKYTPRDSQEAENVCERVAPRLQHANSVLSAVKVLKMYMNSIGNNDVIRL	296
dd beta-COP	MLQFIVVELIRKVKCTSP---SERSKYIKCFITLNSSSPAVKYESAGTILSLSSAP-----T--	280
dd beta-Adaptin	FCCKMAPPLVITLLSKEPE--IQFVGLRNINLIVCKRPEILQYEMKVVFFCKYNDP--IYVKMEKLEI	358
dd beta-COP	AVRGAASAYIDLLCNESDNNVKMIVLDKLIEIKRNHNSKIMBEELVMDILRALSSPNIDICKKVLNI	345
dd beta-Adaptin	MIMLANEKNIEEVLLEFKEYATEID-----VEFVRKAMRAIGRCAIKIDRASERCIOVLLDLI	416
dd beta-COP	VLDSVTPKNIDEITLFLKKEINKIQSKEFDKGLIYRHILIRTIHVSSI KYPEVLGNVPIIMEYIL	410
dd beta-Adaptin	QTKVNYVVQEAITVTKDIFRKYPNKYEGITATLCANLESIDEPKAKASMTWITGEYAERLDNAHE	481
dd beta-COP	GDSYLPASAVDVIIFLREVVETYPSLRELIKKLLENLSSIKVSKVYRVAVWVIAEYVTOLEDLQY	475
dd beta-Adaptin	LLNSFLEGFKDENSQVQLQLLTSIVKFLFKRFDACQMVCTVLNLSTQESDNPDLRDRGFVYWRL	546
dd beta-COP	AMTSITN-----DLLELLKPKQTEEVILETKAKVKIEKVSIQKLIADG--DWYL	522
dd beta-Adaptin	LSTDFAAKAVVLSBKPLITDITSHLDESLLNELITINISTLASVYHKPPETFVTKLKLGNKRGRLR	611
dd beta-COP	ASCISSSLTKLFFRAEQNLIDNAD--SNKLLKAVMMIISVLIINLSKAS---QVSTSKSAYDRMLS	582
dd beta-Adaptin	NKEEEDDEEPDYVDDNMMNQGGQQQQGGYQQQQQQQQGGYQQQQPQQPQPKSGNLIDDLSD	676
dd beta-COP	CIOVLIDSN-ATIKKIWLQDCRDSFANYLKYLLIKQSENK----KKTEKEVLVVKPNNTINIRQLK	642
dd beta-Adaptin	LGGALPNMNNNNYGNMNNNMYSPPQPFQFNGNSNLSFLGGGGGGGEVQAPVNKVVVFGGDRSQA	741
dd beta-COP	SKKAFGFPVDTEDDLKAVGNTG----EANKDQNEYSKISQLSGFSDPIYVEAYVRVHQYDIVLD	702
dd beta-Adaptin	IQTSGAFTRFQGRINLELNLLNTSQQGMSKFKIQFYQNSFGLSPADQILSCGATEVQGSDVTIIP	806
dd beta-COP	ISVFNQINDTLQNVITLLELVTLG-----DLKICERVPPFIMAPREKTSKASIKVSSIDNGVIM	760
dd beta-Adaptin	ISCNGQISNPLNPVIDMAMMVLPSQERFYFKMNFPLLCLLLETGRLDRESVLS-MWKSIPESNER	870
dd beta-COP	GTLAFDIAGSVSSMSDKNCVTLN--ELHIDVIDYILPANHQYTDVLFRNHWLEFEWENKIPVNTIN	823
dd beta-Adaptin	SVEIQVRLPHVDVDSILRRLNSKNI FEIVRKKAPNQEISFLSCKTESVYITLIELAFNISTNTCR	935
dd beta-COP	ITDLVKYVHHISKVITMGIITPEVHLSNDTGILSANLCAKSVFGEDALANICIEKQADGKISGYI	888
dd beta-Adaptin	CSSKTTSPDIMALFEHNLNLLINNQI	961
dd beta-COP	RIRAKVQSIAVITLGEKIGNVGMKA--	912

Abb. 3.7.1: Sequenzvergleich von *D. discoideum* β -Adaptin und β -COP. Gelb markierte Aminosäuren zeigen identische, blau markierte Aminosäuren ähnliche Aminosäuren der beiden Proteine an.

3.8 Welche bekannten intrazellulären Transportwege können aufgrund von Sequenzhomologien in *D. discoideum* existieren?

Der Vesikeltransport gehört in eukaryontischen Säugetierzellen zu den wichtigsten Transportmöglichkeiten. Hefe gilt als Modellorganismus zum Studium des Vesikeltransports. Eine Zusammenstellung von homologen Proteinen aus Säugern und Hefe zeigte, daß die Proteine aus Säugern, die in den Vesikeltransport involviert sind, fast alle in Hefe ebenso vorhanden sind (Kirchhausen, 2001). Um zu beurteilen, ob *D. discoideum* ebenso wie Hefe in diesem Bereich als Modellorganismus dienen könnte, wurden mit Hilfe des *D. discoideum* Genomprojektes Datenbanksequenzvergleiche der wichtigsten in den Vesikeltransport involvierten Proteine gemacht.

Die Datenbank des *D. discoideum* Genomprojektes wurde in der Regel mit Hefesequenzen durchmustert. Ausgehend von der Proteinsequenz des jeweiligen Suchpartners wurde die *D. discoideum* Datenbank mit dem entsprechenden BLAST-Programm (Altschul et al., 1997) gegen alle sechs möglichen offenen Leserahmen der vorhandenen Nukleotidsequenzen durchsucht. Mit Ausnahme weniger Beispiele läßt sich die Aussage treffen, daß die Hauptkomponenten der drei großen durch Clathrin, COPI und COPII vermittelten Vesikeltransportwege aufgrund der Sequenzhomologien in *D. discoideum* ebenso existieren wie in Säugern und Hefe. Ebenfalls sind Homologe der entsprechenden Partner und Clathrin Adaptoren vorhanden. Die Clathrin Adaptoren und die schwere Clathrinkette zeigen sogar nach den kleinen G-Proteinen ARF und Sar1p die ausgeprägteste Homologie zueinander. Stark konserviert sind auch β' -COP und β -COP. Dagegen sind die übrigen Komponenten des COPI Coatomers weniger stark konserviert. Das COPII Coatomer ist wie das COPI Coatomer auch nur in Teilen konserviert. So weisen Sec13p und Sec23p eine Identität von nahezu 50 % auf, jedoch liegt die Homologie des Sec24p beispielweise bei nur 25 %. Bemerkenswert ist, daß zu Dynamamin, Syndapin, Endophilin und Intersectin in *D. discoideum* homologe Sequenzen vorhanden sind, im vollständig sequenzierten Hefegenom bisher aber nicht gefunden wurden.

Tab. 3.8.1: (nächste Seite) Zusammenfassung der Sequenzvergleiche der wichtigsten in den Vesikeltransport involvierten Proteine aus Hefe und Säugern mit der Datenbank des *D. discoideum* Genomprojektes. Die erste Spalte der Tabelle gibt die drei Vesikelgruppen Clathrin, COPI und COPII, sowie einige ihrer Partner an. Spalte 2 und 3 benennen dann die jeweiligen Proteine aus Säuger und Hefe. In der vierten Spalte ist die „genebank“ Datenbankzugangsnummer („accession number“) des jeweiligen Proteins gegeben, mit dem die Datenbank des *D. discoideum* Genomprojektes geprüft wurde. In der Regel wurde mit Hefesequenzen gesucht. Die fünfte Spalte zeigt die Homologie in Prozent, die mit der Suchproteinsequenz in der *D. discoideum* Genomdatenbank gefunden wurde. Weiterhin gibt sie die Anzahl der identischen Aminosäuren pro Anzahl der Aminosäuren im Homologiebereich wieder. Spalte 6 zeigt den Aminosäurebereich in dem die Homologie zwischen den Suchproteinsequenzen und den in der Datenbank gefundenen Sequenzen liegt. Dabei gilt Aminosäure 1 immer als Startcodon. Die Gesamtproteingröße der Suchsequenz ist rechts in der gleichen Spalte gegeben. Die letzte Spalte gibt, wenn vorhanden, die „genebank“ Datenbankzugangsnummer des gefundenen *D. discoideum* Proteins an. Da es sich bei den meisten in der *D. discoideum* Genomdatenbank gefundenen Sequenzen um zusammengefügte „Contig“-Sequenzen handelt, wurde auf deren Bezeichnung verzichtet. Bis zum Abschluß des *D. discoideum* Genomprojektes unterliegen die Bezeichnungen der „Contig“-Sequenzen einer permanenten Namensänderung.

Protein	Mammalia	Hefe	Suchpartner	Dictyostelium Homologie	Homologiebereich/ Proteingröße Suchpartners	des	Datenbank Zugangsnummer
Clathrin							
Clathrin	HC	Chc1p	NP 011309	45 % 753/1637	1-1637	1653	gb M83660
	Lca/b	Clc1p	NP 011683	25 % 41/170	38-207	233	
Adaptoren							
AP-1	γ	Apl4p	NP 015354	35 % 193/579	1-579	832	
	β 1	Apl2p	NP 012787	36 % 232/628	26-653	726	
	μ 1	Apm1p	NP 015064	50 % 232/467	2-468	475	gb AY007278.1
	σ 1	Aps1p	NP 013271	50 % 48/96	6-101	156	
		Aps3p	NP 012510	40 % 59/144	27-170	194	
AP-2	α /c	Apl3p	NP 009516	30 % 98/310	391-700	1025	
	β 2	Apl1p	NP 012538	35 % 200/576	33-608	700	
	μ 2	Apm4p	NP 014579	32 % 160/490	1-490	491	gb U44890
	σ 2	Aps2p	NP 012592	50 % 73/143	3-146	147	
β -Arrestin	β -Arrestin	keins	AAH03636	keine			
COPI							
ARF1	ARF1	yARF 1/2/3	NP 014737 NP010144 NP010089	55 % 100/183	1-183	183	
Coatomer	α -COP	Ret1p	CAA565588	50 % 378/793	2-794	1201	
	β -COP	Sec26p	NP 010524	39 % 379/973	1-902	973	gi AF247143
	β' -COP	Sec27p	NP 011378	1. 50 % 257/543	48-590	889	
				2. 25 % 209/779	9-787		
	δ -COP	Ret2p	NP 116709	20 % 71/312	20-331	546	
	γ -COP	Sec21p	NP 014112	35 % 207/604	332-935	935	
	ϵ -COP	Sec28p	NP 012189	20 % 66/329	30-358	359	
ξ -COP	Ret3p	NC 001148	30 % 39/131	5-141	189		
ARF-GAP	ARF-GAPs	Glo3p	AAC03220	?			
ARF-GEF	ARF-GEFs	Gea1p/2p	NP 010892 NP 012565	?			
COPII							
Sar1p	hSar1p	Sar1p	NP 015106	60 % 110/190	6-190	190	gb/C22765
Sec13p-Sec31p	hSec13p	Sec13p	NP 013309	50 % 149/297	13-290	297	gb/AU053225
	hSec31p	Sec31p	NP010086	35 % 147/424	3-425		
				30 % 192/778	525-1204	1273	
	hSec23p	Sec23p	NP 015507	45 % 306/694	71-764	768	
	hSec24p	Sec24p	NP 012157	25 % 228/894	24-917	926	
	?	Sec12p	NP 014423	?			
?	Sec16p	NP 015240	?				
Partner							
Amphiphysin	Amphiphysin	Rvs161p	NP 009935	keine			
Ap180	AP180	yAP180	NP 011757	30 % 108/370	199-568	568	
ARF1	ARF1	Arf1p/2p	NP 010144	75 % 134/181	1-181	181	gb C91936
Auxilin	Auxilin2	Aux1p/Swa 2p	NP 010606	35 % 46/132	532-663	668	
Dynamin	Dynamin		XP 009079	45 %	1-505 737-850	850	CAA67983
Endophilin	Endophilin		AAC71774	35 % 43/128	220-347	352	gb AU039890
Epsin	Epsin	Ent1p/2p	NP 013307 NP 010120	?			
GGA	GGA	Gga1p Gga2p	NP 010645	20 % 86/377 keine	92-468	557 585	
Intersectin	Intersectin 1/2		XP 009741	45 % 35/77 25 % 84/332	1-77 612 943 1097		gb U82517
Synaptojanin	Synaptojanin	Sjl1p/3p	Q62910	35 % 217/597 30 % 116/413	217-813 949-1361	1574	
Synaptotagmin	Synaptotagmin		NP 115755	keine			
Syndapin	Syndapin		AAD16887	20 % 99/431	8-438	441	
uncoating ATPase	Hsc70	Ssa1p	NP 013076	74 % 476/639	4-642	642	Emb X75263

4 Diskussion

4.1 β -COP in *D. discoideum*

COPI vermittelte intrazelluläre Transportwege wurden bisher hauptsächlich in Hefe- und Säugerzellen untersucht. In *D. discoideum* waren COPI assoziierte Transportprozesse nicht charakterisiert. Der heptamere Proteinkomplex, aus dem sich die COPI Hülle zusammensetzt und der aus α -COP, β -COP, β' -COP, δ -COP, ε -COP, γ -COP und ζ -COP besteht sowie aus dem zur COPI Assemblierung notwendigen ARF1, einem ras-ähnlichen GTP-bindenden Protein, ist in Hefe- und Säugerzellen auf molekularer Ebene vollständig charakterisiert (Malhotra et al., 1989; Waters et al., 1991; Serafini et al., 1991). Homologe für einige dieser Proteine wurden inzwischen auch in anderen Organismen identifiziert. β -COP Homologe sind u. a. in *R. norvegicus* (Pepperkok et al., 1993), *H. sapiens* (Benichou et al., 1994), *M. musculus* (Li et al., 1999), *D. melanogaster* (Ripoche et al., 1994) und *S. cerevisiae* (Duden et al., 1994) bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Durchmusterung einer *D. discoideum* Phagenbibliothek eine cDNA isoliert, die für das *D. discoideum* β -COP Homolog kodiert. Die vollständige kodierende Sequenz besitzt eine Länge von 2738 Basenpaaren. Southern-Blot- und Sequenzdatenbankanalysen des *D. discoideum* Genomprojektes weisen auf das Vorhandensein einer einzelnen Kopie des β -COP Gens auf Chromosom 4 hin. Die genomische Sequenz des β -COP Gens wird von mindestens einem Intron unterbrochen und kodiert für ein 102 kDa großes Protein. Introns sind im Genom von *D. discoideum* im Vergleich zu höheren Eukaryonten selten (Kessin, 2001). Sie sind in der Regel AT-reich und sehr kurz. Vergleiche der *D. discoideum* β -COP Proteinsequenz mit der β -COP Sequenz aus *D. melanogaster*, *R. norvegicus* und *S. cerevisiae* zeigen die höchste Homologie zum β -COP Protein aus Ratte. Die Homologie erstreckt sich über den gesamten Proteinbereich und zeigt auch im *D. discoideum* Protein einen Aufbau aus einem konservierten N- und C-terminalen Bereich und einem schwächer konservierten mittleren Verbindungsbereich (Duden et al., 1994). Das *D. discoideum* β -COP Protein ist im Vergleich zu den Proteinen aus *D. melanogaster*, *R. norvegicus* und *S. cerevisiae* etwas kleiner, da die mittlere Region verkürzt ist. Bisher konnten den einzelnen Domänen des β -COP Proteins keine spezifischen Funktionen zugeordnet werden.

β -COP ist Bestandteil der heptameren COPI Hülle. Das kleine ras-ähnliche GTP-bindende ARF1 Protein, der KDEL-Rezeptor ERD2 und die COPI Komponenten δ -, γ -, ζ -COP sind direkte Interaktions- bzw. Bindungspartner des β -COP Proteins (Faulstich et al., 1995; Lowe und Kreis 1995, 1996; Zhao et al., 1997; Pavel et al., 1998; Majoul et al., 2001). Durchsuchungen der Datenbanken des *D. discoideum* Genomprojektes mit den COPI Komponenten aus Hefe weisen auf die Vollständigkeit

der COPI Hülle in *D. discoideum* hin. Homologe der an der COPII und Clathrin Vesikelbildung beteiligten Proteine sind ebenfalls in der Datenbank des *D. discoideum* Genomprojektes zu finden. Hinweise auf die Existenz von β -COP Homologen, über die immer wieder berichtet wurde, werden durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse nicht unterstützt. Whitney et al. (1995) diskutierten ein Endosomen assoziiertes β -COP Homolog, was durch weitere Untersuchungen jedoch bisher nicht bestätigt wurde. Von Futatsumori et al. (2000) wurden allerdings γ - und ζ -COP Homologe identifiziert, denen sie redundante Funktionen zuordneten. Die Homologie ist extrem hoch, so daß dieses Ergebnis auch auf mögliche Sequenzierfehler zurückzuführen sein könnte. In *D. discoideum* kann das Vorhandensein zusätzlicher Homologe neben dem identifizierten β -COP Protein nahezu ausgeschlossen werden. Das *D. discoideum* Genomprojekt ist weit fortgeschritten und trotzdem konnte in den dadurch zur Verfügung stehenden Sequenzdaten nur eine homologe Sequenz identifiziert werden. Bei dieser Sequenz handelt es sich um das *D. discoideum* β -Adaptin, dessen Homologie zu β -COP bereits früher beschrieben wurde (Duden et al., 1991; Serafini et al., 1991).

4.2 Intrazelluläre Lokalisation des GFP- β -COP Fusionsproteins

Zur Analyse der intrazellulären β -COP Verteilung in *D. discoideum* wurde zum ersten Mal ein GFP- β -COP Fusionsprotein verwendet. In diesem Protein ist das vollständige β -COP Protein N-terminal an den C-Terminus des GFP Proteins fusioniert. Das GFP- β -COP Fusionsprotein lokalisiert in diffusen vesikulären und perinukleären Strukturen, die an das Verteilungsmuster des Comitins Proteins erinnern (Weiner et al., 1993). Kolokalisationsstudien mit einem Comitinspezifischen Antikörper identifizierten den Golgi-Apparat als vorwiegenden Lokalisationsort des GFP- β -COP Fusionsproteins. Damit konnte das GFP- β -COP Protein als neuer Golgi-Marker etabliert werden, wodurch nun auch *in vivo* Studien zum Golgi-Apparat in *D. discoideum* möglich sind. Diese Golgi-Lokalisation stimmt gut mit der in Säugerzellen beobachteten β -COP Lokalisation überein und weist auf die Funktionalität des Fusionsproteins hin (Duden et al., 1991). Die Identität der GFP- β -COP tragenden vesikulären Strukturen konnte dagegen nicht geklärt werden, da sie durch keinen der in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Antikörper erkannt wurden. Membranfraktionierungsuntersuchungen weisen aber auf eine zusätzliche Lokalisation an Endosomen bzw. Lysosomen hin. Zur weiteren zellbiologischen Charakterisierung wurde die intrazelluläre Verteilung des GFP- β -COP Fusionsproteins unter Einwirkung pharmakologisch wirksamer Substanzen und unter veränderten physiologischen Bedingungen untersucht.

4.2.1 Intrazelluläre Lokalisation des GFP- β -COP unter Brefeldin A Einwirkung

Brefeldin A wurde zur Charakterisierung der COPI Hülle und des β -COP Proteins in Säugerzellen erfolgreich eingesetzt. Es beeinflusst in Fibroblasten die intrazelluläre Lokalisation von β -COP markierten Zellstrukturen und inhibiert den Transport vom ER zum Golgi-Apparat (Robinson und Kreis, 1992). Allgemein wurde in Säugerzellen eine reversible Umverteilung von Golgi-Membranelementen in das ER unter Einwirkung von Brefeldin A beobachtet (Fujiwara et al., 1988; Doms et al., 1989; Lippincott-Schwartz, 1989, Orci et al., 1991). Ursache für diese Umverteilung ist die Wirkung von Brefeldin A auf das Membran-assoziierte kleine G-Protein ARF1, das durch die Bindung an β -COP an der Assemblierung der COPI-Hülle beteiligt ist (Donaldson et al., 1992; Helms und Rothman, 1992; Zhao et al., 1997). In *D. discoideum* konnten dagegen keine Veränderungen der GFP- β -COP und Comitins Lokalisation im Golgi-Apparat durch Brefeldin A beobachtet werden. Dies ist auf eine Insensitivität von *D. discoideum* gegenüber Brefeldin A zurückzuführen. Eine ähnliche Situation wurde in Wildtyp Hefe Stämmen beobachtet, die aufgrund einer nahezu impermeablen Zellmembran ebenfalls eine natürliche Resistenz gegenüber Brefeldin A besitzen. In Hefemutanten, die durch einen Defekt in der Ergosterol-Biosynthese eine veränderte Zellmembranpermeabilität besitzen, konnte unter Brefeldin A Einwirkung eine Blockierung der Proteinsekretion und eine Veränderung in der Morphologie der subzellulären Kompartimente beobachtet werden (Graham et al., 1993; Shah und Klausner, 1993; Vogel et al., 1993). Brefeldin A verursacht allerdings in *D. discoideum* eine Brefeldin A konzentrationsabhängige Vielkernigkeit (Mohrs et al., 2000), so daß eine für Brefeldin A impermeable Zellmembran unwahrscheinlich ist. Daher könnte die Insensitivität von *D. discoideum* gegenüber Brefeldin A eher auf das Vorhandensein eines Gens zurückzuführen sein, das z. B. in *S. pombe* für eine Brefeldin A Resistenz kodiert (Nagao et al., 1995; Turi und Rose, 1995). Das Brefeldin A Resistenz-Protein zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zum P-Glykoprotein aus Säugern, das für eine Zellgift-Multiresistenz in Tumorzellen verantwortlich ist (Endicott und Ling, 1989). Es gehört zur Familie der ABC-Transporter (ABC = ATP-binding cassette) und dient wie einige andere Beispiele aus der ABC-Transporterfamilie als Efflux-Pumpe für verschiedene Antibiotika und Zellgifte. Ein Homolog dieses Gens wurde im Rahmen des *D. discoideum* Genomprojektes identifiziert.

4.2.2 Intrazelluläre Umverteilung des GFP- β -COP unter DMSO Einwirkung

In der Suche nach Agenzien, die den intrazellulären Transport und so auch die intrazelluläre Verteilung des GFP- β -COP Proteins beeinflussen, wurde DMSO eingesetzt. DMSO verursacht die reversible Deassemblierung des Aktin-Zytoskeletts und gleichzeitig die reversible Fragmentierung des Golgi-Apparates (Weiner et al., 1993). Ursache dafür ist die Dissoziation von Aktin und Myosin von der Plasmamembran, was zur Depolymerisierung der Aktinfilamente sowie zur Bildung intranukleärer Aktin-Bündel führt (Yumura und Fukui, 1983; Fukui, 1978).

Durch die Analyse der intrazellulären Lokalisation des GFP- β -COP Fusionsproteins, aber auch des Comitin Proteins, konnte tatsächlich unter Einwirkung von DMSO eine reversible Fragmentierung der GFP- β -COP und Comitin tragenden Golgi-Strukturen in größere vesikuläre Strukturen parallel zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beobachtet werden. Immunfluoreszenzstudien mit dem β -COP spezifischen Antikörper maD in Säugerzell-Fibroblasten zeigen nach Behandlung mit DMSO ebenfalls eine Fragmentierung des Golgi-Apparates parallel zur Depolymerisierung der Aktinfilamente (Mohrs et al., 2000). Obwohl GFP- β -COP und Comitin in *D. discoideum* Zellen unter DMSO Einwirkung vergleichbare Fragmentierungsgeschwindigkeiten zeigen, kolokalisieren sie nun nicht mehr und zeigen auch unterschiedliche Reassemblierungsgeschwindigkeiten. Dies läßt auf eine Lokalisation von GFP- β -COP und Comitin in unterschiedlichen Golgi-Subkompartimenten schließen. Comitin wurde ursprünglich als Membran-assoziiertes Aktin-bindendes Protein isoliert, so daß die DMSO induzierte Comitin-Umverteilung auf eine spezifische Interaktion mit dem Aktinnetzwerk zurückgeführt wurde (Stratford und Brown, 1985; Weiner et al., 1993). Im Falle von β -COP ist unklar, ob die Umverteilung auf den generellen Kollaps des Zytoskeletts oder auf eine spezifische Interaktion β -COP tragender Membranstrukturen mit dem Aktinnetzwerk zurückzuführen ist. Eine Rolle des Aktin-Zytoskeletts im intrazellulären Vesikeltransport ist wahrscheinlich. Die Rekrutierung von Myosin II an Golgi-Membranen ist Aktin abhängig (Musch et al., 1997). Myosin II wurde z. B. an Golgi-Membranen und Transportvesikeln nachgewiesen (Musch et al., 1997; Ikonen et al., 1997). Heimann et al. (1999) konnten sogar eine Assoziation des Aktin verwandten Proteins Centractin (ARP1) mit COPI Vesikeln nachweisen. In Säugerzellen ist die Bildung und der Erhalt des dynamischen ER-Netzwerkes Mikrotubuli-abhängig, in Pflanzenzellen scheinen dafür eher Aktinfilamente als Mikrotubuli wichtig zu sein (Terasaki et al., 1986, 1990; Liebe und Menzel, 1995). In Hefe existiert kein ausgeprägtes kortikales Aktin-Netzwerk. So ist es nicht verwunderlich, daß im Gegensatz zu Säugerzellen der Erhalt des dynamischen ER-Netzwerkes nicht direkt Mikrotubuli oder Aktin-Filament abhängig zu sein scheint (Prinz et al., 2000). Trotzdem scheint das Aktin-Zytoskelett für ER-Bewegungsvorgänge bzw. Transportvorgänge notwendig zu sein. Die Einwirkung des Aktin-Inhibitors Latrunculin A führt in

Hefezellen innerhalb von Minuten zu einer drastischen Reduzierung der ER-Dynamik. Die ER-Struktur ist auch in einer Hefemutante verändert, die eine Mutation im β' -COP Protein (sec27-95) trägt (Prinz et al., 2000).

4.2.3 Osmotisch induzierte Rückverteilung des GFP- β -COP in das endoplasmatische Retikulum

Die Rückverteilung von Golgi ansässigen Proteinen in das ER ist unter Einwirkung verschiedener Substanzen wie Brefeldin A und NDGA bzw. durch Überexpression der Proteine RAB6, ARF1-T31N oder eines ERD-2 ähnlichen Proteins in verschiedenen Organismen zu beobachten (Fujiwara et al., 1988, 1998; Doms et al., 1989; Lippincott-Schwartz et al., 1989; Hsu et al., 1992; Dascher und Balch, 1994; Martinez et al., 1997). Unter Brefeldin A Einwirkung erfolgt der retrograde Transport Golgi ansässiger Proteine und damit die Auflösung des Golgi-Apparates über tubuläre vesikuläre Membranstrukturen (Lippincott-Schwartz et al., 1990; Sciaky et al., 1997). Lee und Linstedt (1999) konnten demonstrieren, daß ein physiologischer Stimulus wie osmotischer Streß den anterograden Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat inhibiert. Der retrograde Transport bleibt dagegen unbeeinflusst. Dies verursacht die Rückverteilung von Golgi-Proteinen in das ER, die sich in zwei Klassen einteilen lassen. Die erste Klasse ist durch die Golgi-Markerproteine GM130 und Mannosidase-II vertreten, die sehr schnell und vollständig in das ER wandern (Novikoff et al., 1983; Nakamura et al., 1995). Die Golgi-Markerproteine GPP130 und Giantin, die zur zweiten Klasse gehören, werden dagegen unvollständig und nur langsam in das ER transportiert (Linstedt und Hauri, 1993; Linstedt et al., 1995).

Eine Rolle des Aktin-Zytoskeletts im intrazellulären Transport und somit auch in der Rückverteilung von Golgi Proteinen in das ER ist durchaus wahrscheinlich (s. auch 4.2.2). Osmotischer Streß führt zu einer Veränderung des Zellvolumens und beeinflusst so möglicherweise das Aktin-Zytoskelett. Rivero et al. (1996) konnten in einer *D. discoideum* Mutante, in der die F-Aktin-bindenden Proteine α -Aktinin und Filamin fehlen, eine geringere Widerstandsfähigkeit gegenüber osmotischem Streß zeigen. Schreiner (2000) beschrieb dann auch eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts unter osmotisch veränderten Bedingungen.

Obwohl osmotischer Streß den Transport zwischen ER und Golgi beeinflusst, konnten Lee und Linstedt (1999) in Säugerzellen keinen direkten Einfluß auf die β -COP Lokalisation beobachten. Sie konnten aber nachweisen, daß hypo- und hyperosmotischer Streß die Brefeldin A induzierte β -COP Dissoziation von den Golgi-Membranen verlangsamt. Dagegen wurde bei der Untersuchung der intrazellulären GFP- β -COP Lokalisation sowohl unter hypo- als auch hyperosmotischen

Bedingungen ein direkter Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung beobachtet. Entsprechend den Beobachtungen, die Lee und Linstedt für die intrazelluläre Rückverteilung der verwendeten Golgi-Markerproteine in das ER unter hypo- und hyperosmotischen Bedingungen machten, wird auch das GFP- β -COP Fusionsprotein vom Golgi-Apparat in das ER zurückverteilt. Hierbei ist ähnlich wie unter Brefeldin A Einwirkung in Säugerzellen zunächst eine Auflösung des Golgi-Apparates in vesikuläre Strukturen zu beobachten, die später mit dem ER fusionieren. Dies läßt sich durch die Blockierung des anterograden Transports vom ER zum Golgi-Apparat erklären, wodurch eine Anreicherung von Golgi-Proteinen im ER zu beobachten ist, die durch die Auflösung des Golgi-Apparates und Rückverteilung der Golgi-Proteine in das ER verursacht wird. Für Comitín wurden ähnliche Beobachtungen gemacht, im Gegensatz zu GFP- β -COP lokalisiert Comitín nach Auflösung des Golgi-Apparates aber in kleineren vesikulären Strukturen.

Bemerkenswert ist, daß die von Lee und Linstedt verwendeten Golgi-Markerproteine nach einigen Stunden Inkubation unter hypo- bzw. hyperosmotischen Bedingungen wieder ihre normale Golgi Lokalisation zeigen. Auch das GFP- β -COP Protein und Comitín lokalisieren nach längerer Inkubation in hypo- oder hyperosmotischem Medium wieder im Golgi-Apparat. Dies könnte zum einen durch eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zu erklären sein. Lee und Linstedt (1999) machten aber die Proteinkinase C dafür verantwortlich, die u. a. in die Zellvolumenregulierung unter osmotischem Streß involviert ist (Lang et al., 1998). Calphostin C, ein selektiver Inhibitor der Proteinkinase C, verhindert, daß die Zellen ihr normales Zellvolumen zurückgewinnen und inhibiert die Wiederbildung des Golgi-Apparates (Lee und Linstedt, 1999). Calphostin C verursacht keinen Effekt in ungestreßten Zellen. Die Anpassung der Zellen auf osmotischen Streß weist also auf eine Kopplung von Zellvolumen und Transport hin (Lee und Linstedt, 1999).

Ein Vergleich von GFP- β -COP und Comitín offenbart unterschiedliche Umverteilungsgeschwindigkeiten. Dies deutet wie die Ergebnisse aus dem DMSO-Experiment auf eine Lokalisation in unterschiedlichen Golgi-Subkompartimenten hin und bestätigt anhand dieser Geschwindigkeiten die Einteilung in zwei Klassen von Golgi-Proteinen. Obwohl sowohl hypo- als auch hyperosmotischer Streß potente Inhibitoren des anterograden Transports sind, erfolgt die Rückverteilung des GFP- β -COP und Comitín in das ER unter hypoosmotischen Bedingungen schneller als unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Ursache dafür ist unklar, wurde aber auch von Lee und Linstedt beobachtet (1999). Zusammengefaßt weisen diese Untersuchungen auf eine Rolle des GFP- β -COP Proteins im anterograden und retrograden COPI Vesikeltransport hin und können als weiteres Indiz für die Beteiligung von COPI Vesikeln am Transport zwischen ER und Golgi bzw. zwischen Golgi und ER bewertet werden.

4.2.4 Ist das GFP- β -COP Fusionsprotein an Phagosomen lokalisiert?

Die durch Phagozytose internalisierten Partikel oder Zellen werden durch ein Phagosom in das Zellinnere abgeschnúrt. Dieses Phagosom durchláuft dann Reifungsschritte bis zum Endosom- bzw. weiter zum Lysosom-ähnlichen Organell. Für COPI Vesikel wurde bereits eine Endosomen-Assoziation beschrieben (Stoorvogel et al., 1996; Whitney et al., 1995). Dabei wurden α -, β -, β' -, ϵ -COP, ζ -COP und ARF1 als an der Endosomenfusion beteiligte Komponenten identifiziert (Lenhard et al., 1992, 1994; Aniento et al., 1996; Daro et al., 1997; Gu et al., 1997, 2000). Das reifende Phagosom tauscht Material mit anderen intrazellulären Kompartimenten aus um z. B. hydrolytisch wirkende Enzyme zu erwerben, die der Degradation des internalisierten Materials dienen. Der für die Wiederverwertung des Materials aus dem Phagosom verantwortliche Mechanismus ist wenig bekannt. Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß tubuläre Strukturen und spezifische Transportvesikel sowie heterotrimere G-Proteine involviert sind (Pitt et al., 1992; Berón et al., 1995). Um weiter Aufschluß über die Phagosomenfunktion zu bekommen, starteten Garin et al. (2001) eine systematische Proteom-Analyse der involvierten Proteine. Sie identifizierten bisher mehr als 140 Proteine in Phagosomen, unter ihnen Zytoskelettproteine wie Aktin, Myosine und Tubuline, lysosomale Proteine wie z. B. die Cathepsin-Proteasen, heterotrimere G-Proteine oder die V-ATPase Protonenpumpe, aber auch viele unerwartete neue Proteine wie z. B. das Apoptose-Protein Alix oder kleine G-Proteine der rab-Familie. Bisher identifizierten sie keine Hüllproteine der bekannten Coatomer bedeckten Vesikelformen. Diese Analyse ist allerdings noch nicht vollständig. Darum ist es nicht verwunderlich, daß Berón et al. (2001) eine Rekrutierung von β -COP an gereinigte Phagosomen einer Makrophagenzelllinie beschrieben. Sowohl GTP γ S als auch Aluminiumfluorid verstärken die Assoziation von β -COP an Phagosomen, was die schon bekannte Beteiligung eines oder mehrerer G-Proteine bestätigt (Berón et al., 1995). GTP γ S verhindert zusätzlich die inhibitorische Wirkung von Brefeldin A auf die Rekrutierung von β -COP an Phagosomen. Dies weist darauf hin, daß ein Brefeldin A sensitives Protein der ARF-Familie in die Phagosomen-Assoziation von β -COP involviert ist. Ein möglicher Grund für die Phagosomen-Assoziation von β -COP könnte eine Beteiligung an der Wiederverwertungsmechanik für Proteine sein, die von den Phagosomen zurück zur Plasmamembran gebracht werden. Botelho et al. (2000) bestätigten eine Beteiligung von COPI Vesikeln an der Phagosomenbildung und -reifung, zeigten aber gleichzeitig, daß sie dafür nicht essentiell sind.

Eine Assoziation von β -COP an Phagosomen konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In Fluoreszenzstudien mit GFP- β -COP exprimierenden *D. discoideum* Zellen konnte keine

Beteiligung an Phagozytosevorgängen beobachtet werden. Dies wird auch durch biochemische Analysen isolierter Phagosomenmembranen unterstützt. Dennoch widerspricht dies nicht unbedingt den Beobachtungen von Berón et al. (2001). Bei der Isolierung der Phagosomen aus *D. discoideum* könnte die Inkubationszeit bis zur Stoppung des Phagozytoseprozesses von entscheidender Bedeutung sein. Von ihr hängt das Reifestadium des Phagosoms ab und somit auch die Zusammensetzung der Proteinkomponenten im Phagosom. In dieser Arbeit wurden Phagosomenmembranen nach zehn Minuten Phagozytose isoliert und die Anwesenheit von GFP- β -COP an den Phagosomen untersucht. Es ist möglich, daß β -COP nicht zu allen Zeitpunkten an Phagosomen zu detektieren ist und die Assoziation von β -COP vom Reifestadium des Phagosoms abhängt. Berón et al. (2001) verwendeten dagegen eine Makrophagenzelllinie, die die Isolierung einer gemischten Phagosomenpopulation ermöglicht. Wenn man also eine Beteiligung von β -COP an der Wiederverwertungsmaaschinerie von Phagosomen-Komponenten annimmt, ist eine Assoziation von β -COP eher an reife Phagosomen zu erwarten. Darum sollten weitere Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stoppung der Phagozytose durchgeführt werden und die resultierenden Phagosomenmembranen hinsichtlich einer GFP- β -COP Beteiligung untersucht werden.

Interessanterweise ist Comitín an isolierten Phagosomenmembranen aus GFP- β -COP exprimierenden Zellen weniger angereichert als in Wildtypzellen. Es wird angenommen, daß Comitín eine Vermittlerrolle zwischen dem Vesikeltransport und dem Aktin-Zytoskelett einnimmt und eher an Prozessen beteiligt ist, die das frühe Phagosom betreffen (Schreiner, 2000). Dabei ist unklar, an welchen Transportprozessen Comitín beteiligt ist. Eine Überexpression des β -COP, wie sie in den GFP- β -COP exprimierenden Zellen vorliegt, könnte natürlich allgemein eine reduzierte Beteiligung von Comitín an Transportvesikeln verursachen.

4.3 Genetische Charakterisierung der GFP- β -COP Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier monoklonale GFP- β -COP Protein exprimierende Zelllinien mittels Southern-Blot-, Northern-Blot- und Western-Blot untersucht. Southern-Blot-Analysen zeigen eine zweifache Insertion des entsprechenden Vektorabschnitts in das *D. discoideum* Genom. Eine Analyse der GFP- β -COP Transkriptmenge im Vergleich zum endogenen β -COP Transkript im Wildtyp zeigt eine starke Überexpression des GFP- β -COP Transkripts. Interessanterweise konnte ein Einfluß der starken Überexpression des GFP- β -COP Transkripts auf die Transkriptmenge des β -COP Bindungspartners δ -COP (Lowe und Kreis, 1995, 1996; Faulstich et al., 1996; Pavel et al., 1998) und des putativen COPI-Rezeptor p24 festgestellt werden (Sohn et al., 1996; Rojo et al., 1997). Im Vergleich zum Wildtyp führt eine erhöhte Transkriptmenge des GFP- β -COP auch zu erhöhten Transkriptmengen für p24 bzw. δ -COP, was eine Interaktion dieser Komponenten bestätigt.

4.3.1 Warum sind die GFP- β -COP exprimierenden Zellen im Entwicklungszyklus verlangsamt?

Im Vergleich zu Wildtypzellen zeigen die monoklonalen GFP- β -COP exprimierenden Zellen einen deutlich verlangsamen Entwicklungszyklus. Innerhalb von sechs Stunden haben GFP- β -COP Zellen und Wildtypzellen das Aggregationsstadium erreicht. Die Ausbildung von Fruchtkörpern in Ax2-Zellen ist innerhalb von 24 Stunden abgeschlossen, während GFP- β -COP exprimierende Zellen nach Erreichen des Aggregationsstadiums eine signifikant reduzierte Entwicklungsgeschwindigkeit haben und ca. 40 Stunden zur Fruchtkörperbildung benötigen. Zusätzlich zur Entwicklungsverzögerung ist eine deutliche Größenreduzierung bei den Zellaggregaten und Fruchtkörpern der GFP- β -COP Zellen zu erkennen.

Dies könnte auf die durch Western-Blot-Analysen festgestellte fehlende Expression des psA Proteins in GFP- β -COP Zellen zurückzuführen sein. Das psA Protein ist ein Zelloberflächenprotein, das die Zell-Zell-Adhäsion in späten Entwicklungsstadien vermittelt. Dagegen tritt das csA Protein, das für die Zell-Zell-Adhäsion in der frühen Aggregationsphase verantwortlich ist, in GFP- β -COP und Wildtypzellen zwar zum gleichen Zeitpunkt (t_6) auf, wird aber in GFP- β -COP Zellen nur gering exprimiert. Dies könnte die bereits in der frühen Entwicklungsphase vorhandenen Veränderungen erklären. Zusätzlich konnte eine veränderte Prozessierung nicht identifizierter entwicklungsregulierter glykosylierter Proteine in GFP- β -COP

Zellen festgestellt werden. Das GFP- β -COP Protein selbst wird kontinuierlich und auf einem konstant hohen Niveau exprimiert. Southern-Blot-Analysen zeigten, daß die fehlende Expression des psA Proteins auf die Insertion des GFP- β -COP Vektorabschnitts in den für das psA Protein kodierenden Genabschnitt zurückzuführen ist. Eine „knock-out“-Mutante des D19-Gens wurde bisher nicht veröffentlicht. Die Mutante könnte dazu genutzt werden, genauere Informationen über die Funktion des psA Proteins zu erhalten. Das psA Protein gilt bisher als entwicklungsreguliertes prä-Sporzellen spezifisches Markerprotein und ist ein glykosyliertes Zelloberflächenprotein, das durch einen Glykosyl-Phosphatidylinositolrest in der Membran verankert ist und dessen Expression durch cAMP induziert wird (Early et al., 1988). Es wird angenommen, daß es wie das csA Protein in die Zelladhäsion involviert ist (Beug et al., 1973; Müller und Gerisch, 1978; Noegel et al., 1986). Ein Einfluß auf das GFP- β -COP Protein in wachsenden Zellen kann ausgeschlossen werden, da das psA Protein erst in der späten Entwicklung auftritt.

4.4 β -COP spezifische Antikörper gegen das *D. discoideum* β -COP Protein

Antikörper sind ein geeignetes Werkzeug zum spezifischen Nachweis von Proteinen in Western-Blot- oder Immunfluoreszenzanalysen und können Informationen über Größe und intrazelluläre Lokalisation des jeweiligen Proteins geben. Zur Charakterisierung des endogenen β -COP Proteins wurden monoklonale anti-Peptid- β -COP-Antikörper hergestellt. Die Antikörper K17-559-3 und K16-351-7 sind gegen ein Peptid aus dem N-terminalen Bereich (N111-131) der β -COP Sequenz gerichtet, die Antikörper K17-498-2, K17-861-1 und K17-871-1 sind gegen ein Peptid aus dem C-terminalen Bereich (C-803-823) gerichtet. Alle Antikörper erkennen im ELISA spezifisch ihr Antigen. Datenbankanalysen des *D. discoideum* Genomprojektes mit den jeweiligen Peptidsequenzen weisen darauf hin, daß diese Peptide nur im β -COP Protein vorhanden sind. Die identifizierten Antikörper sind also β -COP spezifisch.

Der N-Terminus spezifische Antikörper K17-559-3 erkennt in Western-Blot-Analysen das endogene β -COP Protein ebenso wie das GFP- β -COP Protein in *D. discoideum* Extrakten. Das GFP- β -COP Protein wird dabei aber nur schwach detektiert. In Immunfluoreszenzstudien MeOH-fixierter Zellen erkennt er das GFP- β -COP Protein dagegen nicht. Eine Ursache dafür könnte die Lage der von dem Antikörper erkannten Epitope im GFP- β -COP Protein sein. Die Struktur des Proteins bzw. des Komplexes liegt noch nicht vor. In Immunfluoreszenzstudien MeOH-fixierter Zellen liegen die Proteine in nahezu nativer Form vor. Eine weitere Ursache könnte aber auch die dichte Packung der Golgi-Membranstapel sein, so daß viele darin

lokalisierte Proteine schlecht zugänglich für Antikörper sind. Blum et al. (1999) zeigten, daß eine Golgi-Lokalisation für den möglichen COPI p24A/p23-Rezeptor nur dann zu beobachten war, wenn die Immunfluoreszenzstudien unter stark denaturierenden oder reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurden, wodurch einerseits die Golgi-Membranstruktur aufgebrochen wird, aber auch die Proteine denaturiert werden. Interessanterweise markiert der K17-559-3 Antikörper größere vesikuläre Strukturen in Immunfluoreszenzanalysen. Die Identität dieser Strukturen konnte bisher nicht geklärt werden, da polyklonale Antikörper, die ähnliche Immunfluoreszenzmarkierungen verursachen, nicht vorhanden waren. Es konnte aber ausgeschlossen werden, daß diese Strukturen Mitochondrien darstellen, die ein ähnliches Lokalisationsmuster aufweisen. Nach Verteilung und Größe der Vesikel ähneln sie der Lysosomen- und Endosomen-Lokalisation in *D. discoideum* (Temesvari et al., 1996; Karakesisoglou et al., 1999; Schneider et al., 2000). Da β -COP auch am endosomalen Transport beteiligt ist (Whitney et al., 1995; Aniento et al., 1996; Gu et al., 1997; Gu und Gruenberg, 2000), ist es also möglich, daß es sich bei den markierten vesikulären Strukturen um Endosomen handelt. Im Vergleich zu den biosynthetischen COPI Vesikeln ist die endosomale COPI Hülle unvollständig und einfacher organisiert. γ - und δ -COP, ein β -COP Bindungspartner, fehlen in endosomalen COPI Vesikeln (Whitney et al., 1995; Aniento et al., 1996). Dies kann Auswirkungen darauf haben, welche Proteinsequenzbereiche des β -COP Proteins exponiert sind. So könnte das durch den K17-559-3 Antikörper erkannte Epitop in der endosomalen COPI Hülle leichter zugänglich sein und für die Markierung der vesikulären Strukturen verantwortlich sein. Der Antikörper K17-498-2, der ein Peptid im C-Terminus erkennt, markiert in Immunfluoreszenzstudien eine Struktur, die in Form einer Kappe am Zellkern lokalisiert ist, nicht aber den gesamten Zellkern umschließt. Dies weist darauf hin, daß er nicht unbedingt eine ER-Struktur, sondern wahrscheinlich eine Struktur im ER-Golgi Übergangsbereich oder im trans-Golgi-Bereich markiert, was der in Vero-Säugerzellen beobachteten β -COP Lokalisation entspricht (Griffiths et al., 1995). Im Gegensatz zu K17-559-3 markiert der Antikörper K17-498-2 in Immunfluoreszenzstudien das GFP- β -COP Protein und zeigt z. T. eine Kolokalisation mit der perinukleären GFP- β -COP Lokalisation. Allerdings wird der Golgi-Apparat nicht angefärbt. Eine Ursache könnte das von Blum et al. (1999) beschriebene Phänomen sein. Diese Hypothese ließe sich durch Immunfluoreszenzanalysen unter denaturierenden Bedingungen überprüfen. Der Einsatz von Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixierten Zellen führte weder mit K17-559-3 noch mit K17-498-2 zur Verbesserung der Immunfluoreszenzstudien, da sie keine Markierung von spezifischen Zellstrukturen zeigten.

4.5 Eine fehlende β -COP Expression könnte in *D. discoideum* letal sein

Es existieren einige Studien, in denen die fehlende Expression verschiedener COPI Untereinheiten untersucht wurde. Die Analyse einer α -COP defizienten Hefe-Mutante zeigt, daß das Fehlen des α -COP Proteins letal ist (Gerich et al., 1995). Ebenso ist ein „knock-out“ des Hefe δ -COP Proteins letal (Faulstich et al., 1996). Die Zerstörung des Golgi-Apparates und ein fehlender Membrantransport in einer thermosensitiven, konditionalen „knock-out“ CHO-Säugerzellmutante IdIF (CHO = chinese hamster ovary), führt zum Absterben der Zellen unter restriktiven Bedingungen (39,5 °C) (Guo et al., 1994). Der Phänotyp spiegelt die Wirkung von Brefeldin A in Wildtypzellen wieder. Die letalen Effekte in der Mutante können durch Transformation mit einem ε -COP-Expressionsvektor, der zur Expression des Wildtyp ε -COP Proteins führt, kompensiert werden. Wenn allerdings im ε -COP Protein an Position 251 Glutaminsäure durch Lysin ersetzt wird, können die letalen Effekte nicht aufgehoben werden (Guo et al., 1996). Zusammengefaßt weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß Organismen in denen die Expression einer COPI Untereinheit fehlt, nicht überlebensfähig sind und die Bildung einer intakten COPI Hülle essentiell ist. Darum ist es nicht unerwartet, daß der Versuch zur Generierung einer β -COP defizienten *D. discoideum* Mutante erfolglos war. *D. discoideum* ist ein haploider Organismus, wodurch z. B. im Gegensatz zu Hefe entsprechende Transformanten direkt erhalten werden. Wenn also die Expression eines Gens in *D. discoideum* essentiell ist, können entsprechende Transformanten nicht identifiziert werden.

4.6 Perspektiven

Es stehen nun charakterisierte *D. discoideum* Zelllinien zur Anwendung des GFP- β -COP Fusionsproteins als Golgi-Marker für *in vivo* Zellstudien des Golgi-Apparates zur Verfügung. Da es immer noch umstritten ist, ob der Golgi-Apparat während der Mitose fragmentiert, können diese Zellen zur Beantwortung dieser Frage beitragen.

Zur weiteren Charakterisierung der COPI Hülle in *D. discoideum* sollten die übrigen Komponenten der COPI Vesikel α -COP, β' -COP, δ -COP, ε -COP, γ -COP und ζ -COP sowie das ARF1 Protein identifiziert und charakterisiert werden. Um Kollokalisationsstudien dieser Komponenten im Vergleich zu GFP- β -COP durchzuführen, könnten entsprechende fluoreszierende Fusionsproteine mit einem verschobenen Emissionsmaximum im blauen, roten oder gelben Wellenlängenbereich eingesetzt werden. Diese könnten auch weiter Aufschluß über die „Coat“-Assemblierung an den COPI-Vesikeln geben.

Die derzeit zur Verfügung stehenden spezifischen β -COP Antikörper sollten eine detailliertere Analyse des endogenen *D. discoideum* β -COP Proteins ermöglichen. Die Struktur der durch einen der Antikörper markierten vesikulären Strukturen sollte bestimmt werden. Wenn diese als endosomale Struktur identifiziert würde, könnten sie zur weiteren Analyse der endosomalen COPI Vesikel genutzt werden. Mit diesen gegen den N- bzw. C-Terminus gerichteten Antikörpern könnten auch Informationen über putative Domänen im β -COP Protein durch Expression von verkürzten Proteinteilen in *D. discoideum* gewonnen werden.

Eine Beteiligung des GFP- β -COP Proteins an Phagosomen sollte weiter untersucht werden. Da insbesondere eine β -COP Assoziation an der Phagosomem-Wiederverwertungsmechanik in späten Phagosomen diskutiert wird, sollte dabei besondere Aufmerksamkeit auf eine Beteiligung an reifen Phagosomen gelegt werden.

Die Entwicklung neuer Methoden sollte es in Zukunft gestatten die Letalität einer fehlenden Proteinexpression nachzuweisen. In *D. discoideum* könnte dies ein Tetracyclin-abhängiges Transaktivierungssystem ermöglichen (Blaauw et al., 2000), mit dessen Hilfe evtl. auch die Letalität einer fehlenden β -COP Expression nachgewiesen werden könnte.

5 Zusammenfassung

Der intrazelluläre Transport wird vorwiegend durch verschiedene Transportvesikel vermittelt. Die COPI Vesikel, die sich aus β -COP und sechs weiteren Proteinkomponenten sowie dem ARF1 Protein zusammensetzen, sind am anterograden und retrograden Transport zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat sowie am intra-Golgi-Transport beteiligt.

In dieser Arbeit wurde eine 2738 Basenpaar große cDNA isoliert, die für das 102 kDa große *D. discoideum* β -COP Protein kodiert. Dieses Protein weist die höchste Homologie zum β -COP aus Ratte auf. Ein Vergleich der β -COP Proteine aus *R. norvegicus*, *D. melanogaster* und *S. cerevisiae* mit dem *D. discoideum* β -COP Homolog zeigt einen Aufbau aus einem konservierten N- und C-terminalen Bereich und einem schwächer konservierten mittleren Verbindungsbereich, der im *D. discoideum* Homolog verkürzt ist. Das *D. discoideum* β -COP wird durch eine einzelne Kopie des β -COP Gens auf Chromosom 4 kodiert. Weitere β -COP Homologe konnten in *D. discoideum* nicht identifiziert werden. Das RNA-Transkript ist während des gesamten *D. discoideum* Entwicklungszyklus nachweisbar und zeigt eine schwache Zunahme während der Aggregationsphase.

Für Lokalisationsstudien des β -COP Proteins wurde erstmals ein GFP- β -COP Fusionsprotein eingesetzt. Dafür wurden *D. discoideum* Zellen generiert, in denen konstitutiv dieses GFP- β -COP Fusionsprotein exprimiert wird. Dieses Fusionsprotein zeigt eine ausgeprägte Golgi-Lokalisation sowie eine vesikuläre Verteilung über die ganze Zelle. Subzelluläre Membranfraktionierungsexperimente bestätigen diese Golgi-Lokalisation und weisen auch auf eine endosomale bzw. lysosomale Lokalisation hin. Dieses GFP- β -COP Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit als Golgi-Marker etabliert, der nun auch *in vivo* Zellstudien ermöglicht. Die Golgi-Lokalisation des Fusionsproteins wird aufgrund eines in *D. discoideum* vorhandenen Brefeldin A Resistenzgens nicht durch Brefeldin A beeinflusst. Allerdings führt die Einwirkung von DMSO zu einer reversiblen Fragmentierung der GFP- β -COP-haltigen Golgi-Struktur. Unter hypo- bzw. hyperosmotischen Bedingungen ist zunächst ebenfalls eine Fragmentierung des Golgi-Apparates zu beobachten, das GFP- β -COP Protein wird aber dann in das endoplasmatische Retikulum zurückverteilt und zeigt nach längeren Inkubationszeiten wieder seine ursprüngliche Golgi-Lokalisation. Dies bestätigt die Rolle des β -COP Proteins im anterograden bzw. retrograden Transport zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat und beweist die Funktionalität des Fusionsproteins. Nach bisher in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen ist das GFP- β -COP Fusionsprotein nicht an Phagozytoseprozessen

beteiligt und auch nicht an Phagosomen assoziiert. Außerdem wurden in dieser Arbeit anti-Peptid- β -COP Antikörper hergestellt, die in Immunfluoreszenzstudien eine perinukleäre Markierung bzw. eine Markierung größerer vesikulärer Strukturen zeigen. Im Western-Blot erkennt nur einer der Antikörper das endogene β -COP und das Fusionsprotein.

Die GFP- β -COP exprimierenden Zellen sind aufgrund einer fehlenden Expression des psA Proteins sowie einer reduzierten Expression des contact site A Proteins im Entwicklungszyklus deutlich verlangsamt. Zusätzlich ist eine deutliche Größenreduzierung bei den Zellaggregaten und Fruchtkörpern der GFP- β -COP Zellen zu erkennen. Als Ursache dafür wurde eine Insertion der GFP- β -COP Vektorsequenzen in das psA-Gen festgestellt, das für ein Zelladhäsionsprotein der späten Entwicklungsphase kodiert.

6 Literatur

- Adachi, H. T., Hasebe, T., Yoshinaga, K., Ohta, T., Sutoh, K. (1994): Isolation of *Dictyostelium discoideum* cytokinesis mutants by restriction enzyme-mediated integration of the blasticidin S resistance marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1808-1841
- Aderem, A., Underhill, D. M. (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **154**, 593-623.
- Aniento, F., Gu, F., Parton, R. G., Gruenberg, J. (1996): An endosomal β -COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J. Cell Biol.* **133**, 29-41.
- Anton, M., Passreiter, M., Lay, D., Thai, T. P., Gorgas, K., Just, W. W. (2000): ARF- and coatomer-mediated peroxisomal vesiculation. *Cell. Biochem. Biophys.* **32**, 27-36.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipmann, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Aridor, M., Bannykh, S. I., Rowe, T., Balch, W. E. (1995): Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmatic reticulum to Golgi transport. *J. Cell Biol.* **131**, 875-893.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1993): *Current protocols in molecular biology*. Current Protocols Green Publishing Associates, John Willy & Son, Inc., New York.
- Barlowe, C., Schekman, R. (1993): SEC12 encodes a guanine nucleotide exchange factor essential for transport vesicle formation of the ER. *Nature* **365**, 347-349.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M., Ravazzola, M., Amherd, M., Schekman, R. (1994): COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmatic reticulum. *Cell* **77**, 897-907.
- Barlowe, C. (2000): Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic* **1**, 371-377.
- Barth, A., Müller-Taubenberger, A., Taranto, P., Gerisch, G. (1994): Replacement of the phospholipid-anchor in the contact site A glycoprotein of *D. discoideum* by a transmembrane region does not impede cell adhesion but reduces residence time on the cell surface. *J Cell Biol.* **124**, 205-215.
- Becker, B., Moelinger, B., Melkonian, M. (1995): Anterograde transport of algal scales through the Golgi complex is not mediated by vesicles. *Trends Cell Biol.* **5**, 305-307.
- Bednarek, S. Y., Ravazzola, M., Hosobuchi, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Schekman, R., Orci, L. (1995): COPI- and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmatic reticulum in yeast. *Cell* **83**, 1183-1196.
- Benichou, S., Bomsel, M., Bodeus, M., Durand, H., Doute, M., Letourneur, F., Camonis, J., Benarous, R. (1994): Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. *J. Biol. Chem.* **269**, 30073-30076.
- Benton, W. D., Davis R. W. (1977): Screening of Igt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**: 180-182.

- Berón, W., Colombo, M. I., Mayorga, L. S., Stahl, P. D. (1995): In vitro reconstitution of phagosome-endosome fusion: evidence for regulation by heterotrimeric GTPases. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 337-342.
- Berón, W., Mayorga, L. S., Colombo, M. I., Stahl, P. D. (2001): Recruitment of coat-protein-complex proteins on the phagosomal membranes is regulated by a brefeldin A-sensitive ADP-ribosylation factor. *Biochem. J.* **355**, 409-415.
- Berthold, G., Stadler, J., Bozzaro, S., Fichtner, B., Gerisch, G. (1985): Carbohydrate and other epitopes of the contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum* as characterized by monoclonal antibodies. *Cell Differ.* **16**, 187-202.
- Beug, H., Katz, E. F., Gerisch, G. (1973): Dynamics of antigenic membrane sites relating to cell aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **56**, 647-658.
- Bi, K., Roth, M. G., Ktistakis, N. T. (1997): Phosphatidic acid formation by phospholipase D is required for transport from the endoplasmatic reticulum to the Golgi complex. *Curr. Biol.* **7**, 301-307.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russel-Jones, G. J., Gotschlich E. C. (1984): A rapid and sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on westernblots. *Anal. Biochem.* **136**, 175-179.
- Blaauw, M., Linskens, M. H., van Haastert, P. J. (2000): Efficient control of gene expression by tetracycline-dependent transactivator in single *Dictyostelium discoideum* cells. *Gene* **252**, 71-82.
- Blobel, G. (2000): Protein targeting. *Biosci. Rep.* **20**, 303-344.
- Blum, R., Pfeiffer, F., Feick, P., Nastainczyk, W., Kohler, B., Schäfer, K. -H., Schulz, I. (1999): Intracellular localization and in vivo trafficking of p24A and p23. *J. Cell Sci.* **112**, 537-548.
- Bonner, J. T. (1947): Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Exp. Zool.* **106**, 1-26.
- Botelho, R. J., Hackam, D. J., Schreiber, A. D., Grinstein, S. (2000): Role of COPI in phagosome maturation. *J. Biol. Chem.* **275**, 15717-15727.
- Bozzaro, S., Ponte, E. (1995): Cell adhesion in the life cycle of *Dictyostelium*. *Experientia* **51**, 1175-1188.
- Bradford, M.M. (1979): A rapid and sensitive method for the quantification of microgramme quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bradshaw, R. A. (1989): Protein translocation and turnover in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 276-279.
- Brown, H. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C., Sternweiss, P. C. (1993): ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulated phospholipase D activity. *Cell* **75**, 1137-1144.
- Bullock, W. O. (1987): *Bio Techniques* **5**, 376-378.
- Chubb, J. R., Wilkins, A., Thomas, G. M., Insall, R. H. (2000): The *Dictyostelium* RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J. Cell Sci.* **113**, 709-719.

- Cockcroft, S., Thomas, G. M., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N. F., Truong, O., Hsuan, J. J. (1994): Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* **263**, 523-526.
- Cosson, P., Letourneur, F. (1994): Coatamer interaction with di-lysine endoplasmatic reticulum retention motifs. *Science* **263**, 1629-1631.
- Daro, E., Sheff, D., Gomez, M., Kreis, T. E., Mellman, I. (1997): Inhibition of endosome function in CHO cell bearing a temperature-sensitive defect in coatamer (COPI) component ϵ -COP. *J. Cell Biol.* **29**, 1747-1759.
- Dascher, C., Balch, W. (1994): Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmatic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **269**, 1437-1448.
- Davidson, H. W., McGowan, C. H., Balch, W. E. (1992): Evidence for the regulation of exocytic transport by protein phosphorylation. *J. Cell Biol.* **116**, 1343-1355.
- de Matteis, M. A., Santini, G., Kahn, R. A., Di Tullio, G., Luini, A. (1993): Receptor and protein kinase C-mediated regulation of ARF binding to the Golgi complex. *Nature* **26**, 818-821.
- Denzel, A., Otto, F., Girod, A., Pepperkok, R., Watson, R., Rosewell, I., Bergeron, J. J., Solari, R. C., Owen, M. J. (2000): the p24 family member p23 is required for early embryonic development. *Curr. Biol.* **10**, 55-58.
- Döring, V., Schleicher, M., Noegel, A.A. (1991): *Dictyostelium* annexin VII (synexin). cDNA sequence and isolation of a gene disruption mutant. *J. Biol Chem.* **266**, 17509-17515.
- Döring, V., Veretout, F., Albrecht, R., Mühlbauer, B., Schlatterer, C., Schleicher, M., Noegel, A.A. (1995): The *in vivo* role of annexin VII (synexin): characterization of an annexin VII-deficient *Dictyostelium* mutant indicates an involvement in Ca²⁺-regulated processes. *J. Cell Sci.* **108**, 2065-2076.
- Dogic, D., Chassey, B., Pick, E., Cassel, D., Lefkir, Y., Hennecke, S., Cosson, P., Letourneur, F. (1999): The ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Glo3p is involved in ER-retrieval. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 305-310.
- Dominguez, M., Dejgaard, K., Füllekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J.-P., Thomas, D. Y., Bergeron, J. J. M., Nilsson, T. (1998): gp25l/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COPI and II coatamer. *J. Cell Biol.* **140**, 751-765.
- Doms, R.W., Russ, G., Yewdell, J.W. (1989): Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmatic reticulum. *J. Cell Biol.* **109**, 61-72.
- Donaldson, J. G., Kahn, R. A., Lippincott-Schwartz, J., Klausner, R. D. (1991): Binding of ARF and β -COP to Golgi membranes: possible regulation by trimeric G proteins. *Science* **254**, 1197-1199.
- Donaldson, J. G., Finazzi, D., Klausner, R. D. (1992): Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalyzed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* **360**, 350-352.
- Donaldson, J. G., Cassel, D., Kahn, R. A., Klausner, R. D. (1992): ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein β -COP to Golgi membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6408-6412.
- Driouich, A., Faye, L., Staehlin, L. A. (1993): The plant Golgi-Apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *TIBS* **18**, 210-214.

- Duden, R., Griffiths, G., Frank, R., Argos, P., Kreis, T. E. (1991): β -COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to β -Adaptin. *Cell* **64**, 649-665.
- Duden, R., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Winey, M., Byers, B., Schekman, R. (1994): Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmatic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J. Biol. Chem.* **269**, 24486-24495.
- Early, A. E., Williams, J. G., Meyer, H. E., Por, S. B., Smith, E., Williams, K. L., Gooley, A. A. (1988): Structural characterization of *Dictyostelium discoideum* prespore-specific gene D19 and of its product, cell surface glycoprotein psA. *Mol. Cell.Biol.* **8**, 3458-3466.
- Ellenberg, J., Lippincott-Schwartz, J., Presley, J.F. (1999): Dual-colour imaging with GFP variants. *Trends Cell Biol.* **9**, 52-56.
- Endicott, J. A., Ling, V. (1989): The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 137-171.
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M., Duden, R. (2000): COPI domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *Embo J.* **19**, 3905-3917.
- Faulstich, D., Auerbach, S., Orci, L., Ravazzola, M., Wegehingel, S., Lottspeich, F., Stenbeck, G., Harter, C., Wieland, F.T., Tschochner, H. (1996): Architecture of coatomer: molecular characterization of delta COP and protein interactions within the complex. *J. Cell Biol.* **135**, 53-61.
- Fiedler, K., Veit, M., Stamnes, M. A., Rothman, J. E. (1996): Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**, 1396-1399.
- Finazzi, D., Cassel, D., Donaldson, J.G., Klausner, R. D. (1994): Aluminium fluoride acts on the reversibility of ARF1-dependent coat protein binding to Golgi membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 13325-13330.
- Fontana, D. R. (1995): *Dictyostelium discoideum* cohesion and adhesion. In: Richardson P. D., Steiners, M. (eds) The principles of cell adhesion. *CRC Press, Florida*, 63-86.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M., Paris, S. (1993): Myristoylation is not required for GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor ARF1 to phospholipids. *J. Biol. Chem.* **268**, 24531-24534.
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A., Ikehara, Y. (1988): Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmatic reticulum. *J. Biol. Chem.* **263**, 18545-18552.
- Fujiwara, T., Takami, N., Misumi, Y., Ikehara, Y. (1998): Nordihydroguaiaretic acid blocks protein transport in the secretory pathway causing redistribution of Golgi proteins into the endoplasmatic reticulum. *J. Biol. Chem.* **273**, 3068-3075.
- Fukui, Y. (1978): Intranuclear actin bundles induced by dimethyl sulfoxide in interphase nucleus of *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* **76**, 146-157.
- Futatsumori, M., Kasai, K., Takatsu, H., S, H.-W., Nakayama, K. (2000): Identification of novel isoforms of COPI subunits. *J. Biochem.* **128**, 793-801.
- Garrod, D. (1972): Acquisition of cohesiveness by slime mould cells prior to morphogenesis. *Exp. Cell Res.* **72**, 588-591.
- Gerich, B., Orci, L., Tschochner, H., Lottspeich, F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Wieland, F., Harter, C. (1995): Non-clathrin-coat protein alpha is a conserved subunit of coatomer and

- in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3229-3233.
- Gerisch, G. (1965): Spezifische Zellkontakte als Mechanismen der tierischen Entwicklung. *Umschau* **13**, 392-395.
- Goldberg, J. (1999): Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in the GTP hydrolysis. *Cell* **96**, 893-902.
- Griffiths, G., Simons, K. (1986): The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**, 438-443.
- Griffiths, G., Ericsson, M., Krijnse-Locker, J., Nilsson, T., Goud, B., Soling, H. D., Tang, B. L., Wong, S. H., Hong, W. (1994): Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* **127**, 1557-1574.
- Griffiths, G., Pepperkok, R., Krijnse Locker, J., Kreis, T. E. (1995): Immunocytochemical localization of β -COP to the ER-Golgi boundary and the TGN. *J. Cell Sci.* **108**, 2839-2856.
- Goud, B., McCaffrey, M. (1991): Small GTP-binding proteins and their role in transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 626-633.
- Graham, T. R., Scott, P. A., Emr, S. D. (1993): Brefeldin A reversibly blocks early but not late protein transport steps in the yeast secretory pathway. *Embo J.* **12**, 869-877.
- Gu, F., Aniento, F., Parton, R.G., Gruenberg, J. (1997): Functional dissection of COPI subunits in the biogenesis of multivesicular endosomes. *J. Cell. Biol.* **139**, 1183-1195.
- Gu., F., Gruenberg, J. (2000): ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early secretory pathway. *J Biol. Chem.* **275**, 8154-8160.
- Guo, Q., Vasile, E., Krieger, M. (1994): Disruption in Golgi structure and membrane traffic in conditional lethal mammalian cell mutant are corrected by epsilon-COP. *J. Cell Biol.* **125**, 1213-1224.
- Guo, Q., Penman, M., Trigatti, B. L., Krieger, M. (1996): A single point mutation in epsilon-COP in temperature-sensitive, lethal defects in membrane transport in Chinese hamster ovary cells mutant. *J. Biol. Chem.* **271**, 11191-11196.
- Hacker, U., Albrecht, R., Maniak, M. (1997): Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **110**, 105-112.
- Hanahan D. (1985): Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: Cloning 1 (Glover, D.M., ed), *Practical Approach Series*. IRL Press.
- Hansen, S. H., Casanova, J. E. (1994): Gs-alpha stimulates transcytosis and apical secretion in MDCK cells through cAMP and protein kinase A. *J. Cell Biol.* **126**, 677-687.
- Hara-Kuge, S., Kuge, O., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Wieland, F. T. Rothman, J. E. (1994): En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *J. Cell Biol.* **124**, 883-892.
- Hart, G. W. (1992): Glycosylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 1017-1023.
- Harter, C., Pavel, J., Coccia, F., Draken, E., Wegehangel, S., Tschochner, H., Wieland, F. T. (1996): Nonclathrin coat protein γ , a subunit of coatamer, binds to the cytoplasmic dilysine motifs of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1902-1906.

- Harter, C., Wieland, F. T. (1998): A single binding site for di-lysine retrieval motifs and p23 within the γ -subunit of coatomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 116649-11654.
- Heimann, k., Percival, J. M., Weinberger, R., Gunning, P., Stow, J. L. (1999): Specific isoforms of actin-binding proteins on distinct populations of Golgi-derived vesicles. *J. Biol. Chem.* **274**, 10743-10750.
- Helms, J. B., Rothman, J. E. (1992): Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyzes exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**, 352-354.
- Hosobuchi, M., Kreis, T. E., Schekman, R. (1992): sec21 is a gene required for ER to Golgi transport that encodes a subunit of a yeast coatomer. *Nature* **360**, 603-605.
- Howard, P. K., Ahern, K. G., Firtel, R. A. (1988): Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 2613-2618.
- Hsu, V. W., Shah, N., Klausner, R. D. (1992): A brefeldin A-like phenotype is induced by overexpression of a human ERD-2-like protein, ELP-1. *Cell* **69**, 625-635.
- Ikonen, E., de Almeida, J. B., Fath, K. R., Burgess, D. R., Ashman, K., Simons, K., Stow, J. L. (1997): Myosin II is associated with Golgi membranes: identification of p200 as nonmuscle myosin I on Golgi derived vesicles. *J. Cell Sci.* **110**, 2155-2164.
- Jackson, C. L., Casanova, J. E. (2000): Turning in ARF: the sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* **10**, 60-67.
- Jones, A. T., Spiro, D. J., Kirchhausen, T., Melançon, Wessling-Resnick, M. (1999): Studies on the inhibition of endosome fusion by GTP γ S-bound ARF. *J. Cell Sci.* **112**, 3477-3485.
- Jung, G., Hammer, J. A. (1990): Generation and characterization of *Dictyostelium* cells deficient in a myosin I heavy chain isoform. *J. Cell Biol.* **110**, 1955-1964.
- Karakesisoglou, I., Janssen, K.-P., Eichinger, L., Noegel, A. A., Schleicher, M. (1999): Identification of a supressor of the *Dictyostelium* profilin-minus phenotype as a CD36/LIMP-II homologue. *J. Cell Biol.* **145**, 167-181.
- Kessin, R. H. (2001): Evolution, cell biology and the development of multicellularity. Development and cell biology series, *Cambridge University Press, Cambridge*.
- Kirchhausen, T. (2000): Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 699-727.
- Kirchhausen, T. (2000): Three ways to make vesicle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 187-198.
- Köhler, G., Milstein, C. (1976): Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* **6**, 511-519.
- Knecht, D. A., Cohen, S. M., Loomis, W. F., Lodish, H. F. (1986): Developmental regulation of *Dictyostelium discoideum* actin gene fusions carried on low-copy and high-copy transformation vectors. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3973-3983.
- Kreffft, M., Voet, L., Mairhofer, H., Williams K. L. (1983): Analysis of proportion regulation in slugs of *Dictyostelium discoideum* using a monoclonal antibody and a FACS-IV. *Exp. Cell Res.* **147**, 235-239.
- Ktistakis, N., Brown, H. A., Waters, M. G., Sternwiess, P. C., Roth, M. G. (1996): Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J. Cell Biol.* **134**, 295-306.

- Kuge, O., Hara-Kuge, S., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Tanigawa, G., Wieland, F. T., Rothman, J. E. (1993): Zeta-COP, a subunit of coatomer, is required for COP-coated vesicle assembly. *J. Cell Biol.* **123**, 1727-1734.
- Kuspa, A., Loomis, W. F. (1996): Ordered yeast artificial chromosome clones representing the *Dictyostelium discoideum* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5562-5566.
- Kwiatkowska, K., Sobota, A. (1999): Signaling pathways in phagocytosis. *Bio Essays* **21**, 422-431.
- Laemmli, U. K., (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Häussinger, D. (1998): Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**, 247-306.
- Langanger, G., De Mey, J., Adam, H. (1983): 1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-oktan (DABCO) verzögert das Ausbleichen von Immunfluoreszenzpräparaten. *Mikroskopie* **40**, 237-241.
- Lee, T. H., Linstedt, A. D. (1999): Osmotically induced cell volume changes alter anterograde and retrograde transport, Golgi structure, and COPI dissociation. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1445-1462.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., Boedtker, H. (1977): RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751.
- Lenhard, J. M., Kahn, R. A., M. I., Stahl, P. D. (1992): Evidence for ADP-ribosylation factor (ARF) as a regulator for *in vitro* endosome-endosome fusion. *J. Biol. Chem.* **267**, 13047-13052.
- Lenhard, J. M., Colombo, M. I., Stahl, P. D. (1994): Heterotrimeric GTP-binding proteins (G proteins) and ADP-ribosylation factor (ARF) regulate priming of endosomal membrane for fusion. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 474-479.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, E. D., Riezman, H., Cosson, P. (1994): Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmatic reticulum. *Cell* **79**, 1199-1207.
- Li, W., Elliott, R. W., Novak, E. K., Swank, R. T. (1999): cDNA sequence and mapping of the mouse Copb gene encoding beta subunit of the coatomer complex. *Somat. Cell Mol. Genet.* **25**, 177-183.
- Liebe, S., Menzel, D. (1995): Actomyosin-based motility of endoplasmatic reticulum and chloroplasts in *Vallisneria* mesophyll cells. *Biol. Cell.* **85**, 207-222.
- Liemann, S., Bringemeier, I., Benz, J., Gottig, P., Hofmann, A., Huber, R., Noegel, A. A., Jacob, U. (1997): Crystal structure of the C-terminal tetrad repeat from synexin (annexin VII) of *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* **270**, 79-88.
- Linstedt, A. D., Hauri, H.-P. (1993): Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350kDa. *Mol. Biol. Cell* **4**, 679-693.
- Linstedt, A. D., Mehta, A., Suhan, J., Reggio, H., Hauri, H.-P. (1997): Sequence and overexpression of GPP130/GIMPc: evidence for saturable pH-sensitive targeting of a type II early Golgi membrane. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1073-1087.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S., Klausner, R. D. (1989): Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* **56**, 801-813.

- Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J. G., Schweizer, A., Berger, E. G., Hauri, H.-P., Yuan, L. C., Klausner, R. D. (1990): Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* **60**, 821-836.
- Lowe, M., Kreis, T. E. (1995): *In vitro* assembly and disassembly of coatomer. *J. Biol. Chem.* **270**, 31364-31371.
- Lowe, M., Kreis, T. E. (1996): In vivo assembly of coatomer, the COPI coat precursor. *J. Biol. Chem.* **271**, 30725-30730.
- Ludin, B., Matus, A. (1998): GFP illuminates the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **8**, 72-77.
- Majoul, I., Straub, M., Hell, S. W., Duden, R., Söling, H. D. (2001): KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Developmental Cell* **1**, 139-153.
- Malchow, D. B., Nägele, B., Schwarz, H., Gerisch, G. (1972): Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **28**, 136-142.
- Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J. C., Rothman, J. E. (1989): Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic transport through the Golgi stack. *Cell* **58**, 329-336.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J., Gerisch, G. (1995): Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag. *Cell* **83**, 915-924.
- Martinez, O., Antony, C., Pehau-Arnaudet, G., Berger, E. G., Salamero, J., Goud, B. (1997): GTP-bound forms of rab6 induce redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1828-1833.
- Mehdy, M. C., Ratner, D., Firtel, R. A. (1983): Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Cell* **32**, 763-771.
- Melkonian, M., Becker, B., Becker, D. (1991): Scale formation in algae. *J. Electron. Microsc. Tech.* **17**, 165-178.
- Metchnikoff, E., (1893): Lectures on the comparative pathology of inflammation. (Reprinted 1968). Dover, New York.
- Mironov, A. A., Weidman, P., Luini, A. (1997): Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules. *J. Cell Biol.* **138**, 481-484.
- Mohrs., M. R., Janssen, K. P., Kreis, T., Noegel, A. A., Schleicher, M. (2000): Cloning and characterization of β -COP from *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 350-357.
- Monnat, J., Hacker, U., Geissler, H., Rauchenberger, R., Neuhaus, E.M., Maniak, M., Soldati, T. (1997): *Dictyostelium discoideum* protein disulfide isomerase, an endoplasmic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal. *FEBS Letters* **418**, 357-362.
- Müller, K., Gerisch, G. (1978): A specific glycoprotein as the target site of adhesion blocking Fab in aggregating *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **273**, 445-449.
- Muniz, M., Alonso, M., Hidalgo, J., Velasco, A. (1996): A regulatory role for cAMP-dependent protein kinase in protein traffic along the exocytic route. *J. Biol. Chem.* **271**, 30935-30941.

- Musch, A., Cohen, D., Rodriguez-Bolan, E. (1997): Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN. *J. Cell Biol.* **138**, 291-306.
- Nagao, K., Taguchi, Y., Arioka, M., Kadokurs, H., Takatsuki, A., Yoda, K., Yamasaki, M. (1995): *bfr1+*, a novel gene of *Schizosaccharomyces pombe* which confers brefeldin A resistance, is structurally related to the ATP-binding cassette superfamily. *J. Bacteriol.* **177**, 1536-1543.
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreiss, T. E., Warren, G. (1995): Characterization of a *cis*-Golgin matrix protein, GM130. *J. Cell Biol.* **131**, 1715-1726.
- Neer E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., Smith, T. F. (1994): The ancient regulatory-protein family of WD-40 repeat proteins. *Nature* **371**, 297-300.
- Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H. J. (1985): Clear background and high sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis* **6**, 427-448.
- Nickel, W., Masam, J., Gorgas, K., Ravazzola, M., Jenne, N., Helms, J. B., Wieland, F. T. (1998): Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTP γ S. *J. Cell Sci.* **111**, 3081-3090.
- Niewöhner, J., Weber, I., Maniak, M., Müller-Taubenberg, A., Gerisch, G. (1997): Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J. Cell Biol.* **28**, 349-361.
- Noegel, A. A., Welker, D. L., Metz, B. A. Williams, K. L. (1985): Presence of nuclear associated plasmids in the lower eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* **185**, 447-450.
- Noegel, A. A., Gersich, G., Stadler, J., Westphal, M. (1986): Complete sequence and transcript regulation of a cell adhesion protein from aggregating *Dictyostelium* cells. *EMBO J.* **5**, 1473-1476.
- Novikoff, P. M., Tulsiani, D. R., Touster, O., Yam, A., Novikoff, A. B. (1983): Immunocytochemical localization of alpha-D-mannosidase II in the Golgi apparatus of rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4364-4368.
- Ohashi, M., Huttner, W.B. (1994): An elevation of cytosolic protein phosphorylation modulates trimeric G-protein regulation of secretory vesicle formation from the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* **269**, 24897-24905.
- Orci, L., Tagaya, M., Amherdt, M., Perrelet, M., Donaldson, J. G., Lippincott-Schwartz, J., Klausner, R. D., Rothman, J. E. (1991): Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell* **64**, 1183-1195.
- Orci, L., Stames, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Söllner, T. H., Rothman, J. E. (1997): Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**, 335-349.
- Palmer, D.J., Helms, J. B., Beckers, C. J., Orci, L., Rothman, J.E. (1993): Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J. Biol.Chem.* **268**, 12083-12090.
- Pasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F., Cornier, M.J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.
- Pavel, J., Harter, C., Wieland, F.T. (1998): Reversible dissociation of coatamer: functional characterization of β/δ -coat protein subcomplex. *Proc. Natl. Sci. USA* **95**, 2140-2145.

- Pearse, B. M. (1976): Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **73**, 1255-1259.
- Pelham, H. R. B. (1991): Recycling of proteins between the endoplasmatic reticulum and Golgi complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 585-591.
- Pepperkok, R., Scheel, J., Horstmann, H., Hauri, H.P., Griffiths, G., Kreis, T.E. (1993): β -COP is essential for biosynthetic membrane transport from the endoplasmatic reticulum to the golgi complex *in vivo*. *Cell* **74**, 71-82.
- Pepperkok, R., Lowe, M., Burke, B., Kreis, T. E. (1998): Three distinct steps in transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein from the ER to the cell surface *in vivo* with differential sensitivities to GTP γ S. *J. Cell Sci.* **111**, 1877-1888.
- Pepperkok, R., Whitney, J. A., Gomez, M, Kreis, T. E. (2000): COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted Arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J. Cell Sci.* **113**, 135-144.
- Peter, F., Plutner, H., Zhu, H., Kreis, T. E., Balch, W. E. (1993): Beta-COP is essential for transport of protein from the endoplasmatic reticulum to the Golgi *in vitro*. *J. Cell Biol.* **122**, 1155-1167.
- Peyroche, A., Courbeyrette, R., Rambourg, A., Jackson, C. L. (2001): The ARF exchange factors Gea1p and Gea2p regulate structure and function in yeast. *J. Cell Sci.* **114**, 2241-2253.
- Piguet, V., Gu, f., Foti, M., Demaurex, N., Gruenberg, J., Carpentier, J.-L., Trono, D. (1999): Nef-induced CD4 degradation: A diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of β -COP in endosomes. *Cell* **97**, 63-73.
- Pimplikar, S. W., Simons, K. (1994): Activators of protein kinase A stimulate apical but not basolateral transport in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 19054-19059.
- Pitt, A., Mayorga, L. S., Schwartz, A. L., Stahl, P. D. (1992): Transport of phagosomal membranes to an endosomal compartment. *J. Biol. Chem.* **267**, 126-132.
- Poon, P. P., Cassel, D., Spang, A., Rotman, M., Pick, E., Singer, R. A., Johnston, G. C. (1999): Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *Embo J.* **18**, 555-564.
- Prinz, W. A., Grzyb, L., Veenhuis, M., Kahana, J. A., Silver, P. A., Rapoport T. A. (2000): Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmatic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **150**, 461-474.
- Pugsley, A. P. (1989): Protein targeting. Academic Press Inc. San Diego, New York.
- Raper, K. B. (1935): *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mould from decaying forest leaves. *J. Agr. Rec.* **50**, 135-147.
- Ripoche, J., Link, B., Yucel, J. K., Tokuyasu, K., Malhotra, V. (1994): Localization of Golgi membranes with reference to dividing nuclei in syncytial *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1878-1882.
- Rivero, F., Koppel, B., Peracino, B., Bozzaro, S., Siegert, F., Weijer, C. J., Schleicher, M., Albrecht, R., Noegel, A. A. (1996): Teh role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. *J. Cell. Sci.* **109**, 2679-2691.
- Rivero, F., Kuspa, A., Brokamp, R., Matzner, M., Noegel, A. A. (1998): Interaptin, an actin-binding protein of the α -actinin superfamily in *Dictyostelium discoideum*, is

- developmentally and cAMP-regulated and associates with intracellular membrane compartments. *J. Cell Biol.* **142**, 735-750.
- Rivero, F., Albrecht, R., Dislich, H., Bracco, E., Graciotti, L., Bozarro, S., Noegel, A. A. (1999): RacF1, a novel member of the Rho protein family in *Dictyostelium discoideum*, associates transiently with cell contact areas, macropinosomes, and phagosomes. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1205-1219.
- Robinson, M. S., Kreis, T. E. (1992): Recruitment of coat proteins onto Golgi membranes in intact and permeabilized cells: effects of brefeldin A and G towards protein activators. *Cell* **69**, 129-138.
- Rojo, M., Pepperkok, R., Emery, G., Kellner, R., Stang, E., Parton, R.G., Gruenberg, J. (1997): Involvement of the transmembrane protein p23 in biosynthetic protein transport. *J. Cell Biol.* **139**, 1119-1135.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., Anderson, R. G. (1992): Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682.
- Rothman, J. E., Wieland, F. T. (1996): Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-234.
- Sabatini, D. D., Kreibich, G., Morimoto, T., Adesnik, M. (1982): Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *J. Cell Biol.* **92**, 1-22.
- Saiki, R.K. (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Schekman, R., Mellman, I. (1997): Does COPI go both ways? *Cell* **90**, 197-200.
- Schlegel, A., Lisanti, M. P. (2001): Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopic novelty to biological launching pad. *J. Cell Physiol.* **186**, 329-337.
- Schleicher, M., Gerisch, G., Isenberg, G. (1984): New actin binding proteins from *Dictyostelium discoideum*. *EMBO J.* **3**, 2095-2100.
- Schneider, N., Schwartz, J.-M., Köhler, J., Becker, M., Schwarz, H., Gerisch, G. (2000): Golvesin-GFP fusions as distinct markers for Golgi and post-Golgi vesicles in *Dictyostelium* cells. *Biol. Cell* **92**, 495-511.
- Schreiner, T. (2000): Untersuchungen zur *in vivo* Funktion von Comitin, einem aktinbindenden Membranprotein aus *Dictyostelium discoideum*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Schwarz, E. C., Neuhaus, E. M., Kistler, C., Henkel, A. W., Soldati, T. (2000): *Dictyostelium* myosin IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis. *J. Cell Sci.* **113**, 621-633.
- Sciaky, N., Presley, P. J., Smith, C., Zaal, K. A., Cole, N., Moreira, J. E., Terasaki, M., Siggia, E., Lippincott-Schwartz, J. (1997): Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J. Cell Biol.* **139**, 1137-1155.
- Seastone, D. J., Lee, E., Bush, J., Knecht, D., Cardelli, J. (1998): Overexpression of a novel rho family GTPase, RacC, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2891-2904.
- Seastone, D. J., Zhang, L., Buczynski, G., Rebstein, P., Weeks, G., Spiegelman, G., Cardelli, J. (1999): The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **10**, 393-406.

- Semenza, J. C., Hardwick, K. G., Dean, N., Pelham, H. R. (1990): ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* **61**, 1349-1357.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A., Rothman, J. E. (1991): ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* **67**, 239-253.
- Serafini, T., Stenbeck, G., Brecht, A., Lottspeich, f., Orci, L., Rothman, J. E., Wieland, F. T. (1991): A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin. *Nature* **349**, 215-220.
- Shah, N., Klausner, R. D. (1993): Brefeldin A reversibly inhibits secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**,5345-5348.
- Simon, S. (1993): Translocation of proteins across the endoplasmatic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 581-588.
- Simpson, P. A., Spudich, J. A., Parham, P. (1984): Monoclonal antibodies prepared against *Dictyostelium* actin: Characterisation and interactions with actin. *J. Cell Biol.* **99**, 287-295.
- Stoorvogel, W., Oorschot, V., Geuze, H.J. (1996): A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes. *J. Cell Biol.* **132**, 21-33.
- Sohn, K., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Bremser, M., Lottspeich, F., Fiedler, K., Helms, J.B., Wieland, F.T. (1996): A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J. Cell Biol.* **135**, 1239-1248.
- Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Springer, S., Spang, A., Schekman, R. (1999): A primer on vesicle budding. *Cell* **97**, 145-148.
- Springer, S., Chen, E., Duden, R., Marzioch, M., Rowley, A., Hamamoto, S., Merchant, S., Schekman, R. (2000): The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **97**, 4034-4039.
- Stratford, C. A., Brown, S. S. (1985): Isolation of an actin-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **100**, 727-735.
- Sussman, R. R., Sussman, M. (1969): Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **56**, 53-55.
- Sutoh, K. (1993): A transformation vector for *Dictyostelium discoideum* with a new selectable marker bsr. *Plasmid* **30**, 150-154.
- Tamesvari, L. A., Bush, J. M., Peterson, M. D., Novak, K. D., Titus, M. A., Cardelli, J. A. (1996): Examination of the endosomal and lysosomal pathways in *Dictyostelium discoideum* myosin I mutants. *J. Cell Sci.* **109**, 663-673.
- Tanigawa, G., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Helms, J. B., Rothman, J. E. (1993): Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J. Cell Biol.* **123**, 1365-1371.
- Terasaki, M., Chen, L. B., Fujiwara, K. (1986): Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J. Cell Biol.* **103**, 1557-1568.
- Terasaki, M. (1990):Recent progress on the structural interactions of the endoplasmatic reticulum. *Cell Motil. Cytoskel.* **15**, 71-75.

- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretical transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Turi, T. G., Rose, J. K. (1995): Characterization of a novel *Schizosaccharomyces pombe* multidrug resistance transporter conferring brefeldin A resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 410-418.
- Vieira, J., Messing, J. (1982): The pUC plasmid, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.
- Vogel, J. P., Lee, J. N., Kirsch, D. R., Rose, M. D., Sztul, E. S. (1993): Brefeldin A causes a defect in secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 3040-3043.
- Voorn-Brouwer, T., Kragt, A., Tabak, H. F., Distel, B. (2001): Peroxisomal membrane proteins are properly targeted to peroxisomes in the absence of COPI- and COPII-mediated vesicular transport. *J. Cell Sci.* **114**, 2199-2204.
- Waters, M. G., Serafini, T., Rothman, J. E. (1991): Coatamer: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349**, 248-251.
- Watts, D. J., Ashworth, J. M. (1970): Growth of myxamoebae of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 171-174.
- Weiner, O. H., Murphy, J., Griffiths, G., Schleicher M., Noegel, A. A. (1993): The actin-binding protein Comitín (p24) is a component of the Golgi Apparatus. *J. Cell Biol.* **123**, 23-34.
- Westphal, M., Jungbluth, A., Heidecker, M., Mühlbauer, B., Heizer, C., Schwarz, J. M., Marriot, G., Gerisch, G. (1997): Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion. *Curr. Biol.* **7**, 176-183.
- Whitney, J. A., Gomez, M., Sheff, D., Kreis, T. E., Mellman, I. (1995): Cytoplasmic coat proteins involved in endosome fuction. *Cell* **83**, 703-713.
- Wieland, F., Harter, C. (1999): Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 440-446.
- Williams, C., Newell, G. (1976): A genetic study of aggregation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* **82**, 287-307
- Witke, W. Dissertation Ludwig-Maximillians-Universität München 1991.
- Wong E. F. S., Brar, S. K., Sesaki, H., Yang, C., Siu, C-H. (1996): Molecular cloning and characterization of DdCAD-1, a Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **271**, 16399-16408.
- Yumura, S., Fukui, Y. (1983): Filopodelike projections induced with dimethyl sulfoxide and their relevance to cellular polarity in *D. discoideum*. *J. Cell Biol.* **66**, 857-865.
- Zerial, M., Stenmark, H. (1993): Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 613-620.
- Zhang, G. F., Staehlin, L. A. (1992): Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells. *Plant. Physiol.* **99**, 1070-1083.
- Zhao, L.Y., Helms, J.B., Brugger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., Brunner, J., Wieland, F.T. (1997): Direct and GTP-dependent interaction of ADP-ribosylation factor1 with coatamer subunit beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4418-4423.
- Zimmerberg, J. (2000): Are the curves in the right places? *Traffic* **1**, 366-368.

7 Abstract

Intracellular transport occurs predominantly through several transport vesicles. The COPI vesicle coat consists of the β -COP protein, six additional protein components and the ARF1 protein. The COPI coated vesicles are involved in anterograde and retrograde transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi-apparatus as well as in the intra-Golgi transport system.

We have isolated a cDNA of 2738 bp length, coding for the 102 kDa *D. discoideum* β -COP protein. Comparison of the β -COP protein sequences from rat, fruit fly and yeast with *D. discoideum* β -COP exhibits highest homology to rat β -COP. The *D. discoideum* homolog though is considerably smaller due to a shortened variable region that is thought to form a linker between the highly conserved N- and C-terminal domains. The *D. discoideum* β -COP is encoded by a single gene which is localized on chromosome 4. The RNA transcript is present throughout development and increases slightly during aggregation.

For localization studies of the β -COP protein we used a GFP- β -COP fusion protein. We generated *D. discoideum* cells in which this GFP- β -COP fusion protein is expressed constitutively. The fusion protein is strongly enriched in the Golgi-apparatus and is also detectable in vesicles distributed all over the cells. Subcellular membrane fractionation experiments confirmed the Golgi localization and in addition indicate the presence of the protein on endosomes and lysosomes. β -COP distribution in *D. discoideum* was not brefeldin A sensitive, which is most likely due to the presence of a brefeldin A resistance gene. However, upon DMSO treatment a reversible disassembly of the Golgi-apparatus can be observed. A fragmentation of the Golgi-apparatus can also be observed under hypo- or hyperosmotic conditions and leads to a redistribution of the GFP- β -COP containing structures into the endoplasmic reticulum. Remarkably the Golgi localization of GFP- β -COP reemerged after prolonged incubation times in hypo- or hypertonic medium. This confirms the β -COP involvement in anterograde and retrograde transport between Golgi-apparatus and endoplasmic reticulum and verifies the proteins functionality. The GFP- β -COP protein does not seem to be involved in phagocytosis nor is it associated with phagosomes.

We generated anti-peptide- β -COP antibodies which show a perinuclear staining or a staining of large vesicular structures, respectively. Only one of the antibodies detects the endogenous β COP and the GFP-fusion protein in Western-Blot.

The GFP- β -COP expressing cells show an impaired development due to a depleted expression of the psA protein and a reduced expression of the csA protein. Additionally a reduction in size of the cell aggregates and fruiting bodies of the GFP- β -COP cells can be observed. The latter aspects seem to be due to the insertion of the GFP- β -COP vector sequences into the psA gene sequence which encodes a cell adhesion protein during late development.

Erklärung:

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

Köln, im September 2001

Teilpublikationen:

Mohrs, M. R., Janssen, K.-P., Kreis, T., Noegel, A. A., Schleicher, M. (2000):

Cloning and characterization of β -COP from *Dictyostelium discoideum*.

Eur. J. Cell Biol. **79**, 350-357.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Martina Regina Mohrs
Geburtsdatum: 2.7.1970
Geburtsort: Solingen

Schulbildung

1976-1989 Abschluß: Abitur an der Landrat-Lucas-Schule in
Leverkusen-Opladen

Hochschulstudium, Promotion

Oktober 1992-Januar 1997 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-
Universität in Frankfurt am Main und an der Universität zu
Köln

September 1994 Diplom-Vorprüfung in Biologie

Januar 1997 Diplomprüfung in Biologie mit den Schwerpunkten
Biochemie, Botanik, Pharmakologie und Toxikologie

Februar 1997-April 1998 Diplomarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-
Planck-Gesellschaft Köln
Thema: Charakterisierung eines Transaktivationsystems in
Arabidopsis thaliana

seit Juni 1998 praktische Durchführung der Dissertation bei Frau Prof.
Dr. A. A. Noegel am Institut für Biochemie I der
Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Ziel
der Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität zu Köln
Thema: Identifizierung und Charakterisierung von β -COP in
Dictyostelium discoideum

Danksagung

Diese Seite möchte ich dazu nutzen, all denen herzlich zu danken, die auf verschiedene Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. A. A. Noegel möchte ich herzlich für die interessante Themenstellung, die fachliche Betreuung, die zahlreichen Vorschläge und Anregungen sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft danken. Insbesondere möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeit auf einem internationalen Kongreß vorzustellen und danke ihr für ihr Verständnis in menschlichen Grenzsituationen.

Frau Priv. Doz. Dr. Sabine Waffenschmidt und Herrn Prof. Dr. Michael Melkonian danke ich für die freundliche Bereitschaft die jeweiligen Koreferate zu übernehmen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Labor 14 Kollegen bedanken; insbesondere sind hier Frau Rosi O. Blau-Wasser, Frau Dr. Monika Knuth, Herr Dipl. Biol. Michael Leichter, Herr Dr. Alfred Lautwein und Herr Dr. Thomas Schreiner zu nennen. Sie standen nicht nur mit ihrer fachlichen Hilfs- und Diskussionsbereitschaft zur Verfügung, sondern auch für die vielen amüsanten Laborspäße.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre in den letzten Jahren. Bei Herrn Rolf Müller möchte ich mich ausdrücklich für seine tatkräftige Unterstützung bedanken. Mein Dank gilt aber auch Frau Dipl. Chem. Claudia Pikzack, Frau Dr. Claudia Herr, Heidrun Dislich, Maria Stumpf, Berthold Gassen und Herrn Dr. Francisco Rivero Crespo.

Frau Bärbel Bock, Frau Sonja Winninger und Herrn Roberto Campanella, den „guten Geistern“ der Arbeitsgruppe, danke ich für die Bereitstellung der vielen Liter Medium, Puffer und Agarplatten, die die Durchführung dieser Arbeit verschlungen hat.

Danken möchte ich ganz besonders meinen Eltern Ingrid und Antonius Mohrs, die die Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr erleben konnten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Brigitte und Werner Giebel, meinen Freunden und meiner Schwester Ele für deren Zuspruch und Unterstützung.

Mein Dank gilt auch meiner vierhufigen Weggefährtin, die mir immer zur Seite stand.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Felix Giebel. Die Auflistung der Punkte für die ich ihm danke würde nahezu unendlich werden. Same Same.