

Untersuchungen zur *in-vivo* Funktion von Interaptin,
einem aktinbindenden Protein aus
Dictyostelium discoideum

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Markus Wasen

aus Düren

Köln

2001

Berichterstatter: Frau Prof. Dr. A. A. Noegel
 Herr Prof. Dr. H. W. Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Dezember 2001

Danksagung

Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel möchte ich danken für die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. H.W. Klein möchte ich danken für die freundliche und spontane Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Besonderer Dank gilt

Herrn Dr. F. Rivero-Crespo für die interessante Themenstellung, die Betreuung der Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft, zahlreiche fachliche Ratschläge und seine Anleitungen zur Mikroskopie,

Herrn Dr. M. Macht für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen und seine Hilfe bei der Interpretation der Spektren,

und den Herren Dr. A. Hasse, Dipl. Biol. M. Leichter und B. Gassen für ihre Hilfe in der Zellkultur.

Herrn Rolf Müller, Frau Heidrun Dislich, Frau Rosi Blau, Frau Kathrin Meier und Frau Maria Stumpf danke ich für die ausgezeichnete technische Unterstützung.

Meinen Mitdoktoranden Frau Dipl. Chem. Claudia Pikzack, Herrn Somesh Bagavalli, Frau Dipl. Biol. Martina Mohrs und Frau Dr. Monika Knuth danke ich für die ständig freundliche Arbeitsatmosphäre, ihre kollegiale Unterstützung und die andauernde Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch allen anderen Kollegen und Kolleginnen des Instituts.

Allen Freunden und Bekannten danke ich für ihr Interesse und Verständnis sowie den Ausgleich, den sie zum Laboralltag schufen. Meinen Eltern danke ich dafür, daß sie mir diese Ausbildung ermöglichten.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Frau Edith Wasen, die mir mit viel Liebe und Verständnis zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus	7
1.2	Das Zytoskelett	9
1.3	Aktinbindende Proteine in <i>Dictyostelium discoideum</i>	11
1.4	Proteine der α -Actinin-Familie	12
1.5	Interaptin	12
1.6	Zielsetzung	13
2	Material	14
2.1	LaboraAusstattung	14
2.1.1	Labormaterialien	14
2.1.2	Laborgeräte	15
2.1.3	Kits	17
2.1.4	Enzyme, Antikörper und Inhibitoren	17
2.2	Chemikalien, Reagenzien und Puffer	19
2.2.1	Chemikalien	19
2.2.2	Puffer und andere Lösungen	21
2.3	Medien	23
2.3.1	Medien für <i>E. coli</i> -Kulturen	23
2.3.2	Medien für <i>Dictyostelium discoideum</i> -Kulturen	24
2.4	Bakterien- und <i>Dictyostelium discoideum</i> -Stämme	25
2.5	Vektoren	26
2.6	Mikroskopie	26
2.7	Computer & Software	27
3	Methoden	28
3.1	Kultur von <i>Dictyostelium discoideum</i>	28
3.1.1	Anzucht in Flüssigmedium	28
3.1.2	Anzucht auf SM-Agarplatten	28
3.1.3	Sporengewinnung	29
3.1.4	Einfrieren/Auftauen von <i>Dictyostelium discoideum</i>	29
3.1.5	Entwicklung von <i>Dictyostelium</i> auf Phosphatagarplatten	30
3.2	Molekularbiologische Methoden	30

3.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im Mikromaßstab	30
3.2.1.1	„Boiling Prep”	30
3.2.1.2	Mikropräparation von Plasmid-DNA	31
3.2.1.3	Midi-Plasmidpräparation gemäß Macherey & Nagel	31
3.2.2	Präparation chromosomaler DNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i> . .	32
3.2.3	DNA-Gelelektrophorese	33
3.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
3.2.5	Southern-Blot Analyse	34
3.2.6	Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	35
3.2.7	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	36
3.2.8	Herstellung radioaktiv markierter DNA	36
3.2.8.1	Chromatographie durch Sephadex G-50 Chromatographie- säulen	37
3.2.9	Nachweis von DNA-Fragmenten mit radioaktiv markierten Sonden .	37
3.2.10	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	38
3.2.11	<i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	38
3.2.11.1	Verdau mit Restriktionsendonukleasen	38
3.2.11.2	Phosphatase-Behandlung	39
3.2.11.3	Überführung überstehender Enden in glatte Enden	39
3.2.11.4	Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten	40
3.2.12	Polymerase-Kettenreaktion	40
3.2.13	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	41
3.2.13.1	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	41
3.2.13.2	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen	41
3.2.13.3	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroporation	41
3.2.13.4	Transformation von chemokompetenten <i>E. coli</i>	42
3.2.14	Dauerkulturen von <i>E. coli</i>	42
3.2.15	Transformation von <i>Dictyostelium discoideum</i>	42
3.3	Proteinchemische und immunologische Methoden	43
3.3.1	Aufreinigung monoklonaler Antikörper	43
3.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
3.3.3	Färbung von Acrylamidgelen mit Coomassie-Blau	45
3.3.4	Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen („Western- Blot”)	45
3.3.4.1	Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Halbtrocken-Ver- fahren	45
3.3.4.2	Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Naßverfahren . .	46
3.3.4.3	Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen . . .	47
3.3.5	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Membranen . .	47
3.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
3.3.7	Aufschluß von <i>Dictyostelium discoideum</i> -Zellen und Fraktionierung	48
3.3.8	Kopplung von Antikörpern an CNBr-Sepharose	49

3.3.9	Immunpräzipitation von Interaptin aus <i>Dictyostelium discoideum</i> -Extrakten	49
3.4	Zellbiologische Methoden	50
3.4.1	Fixierung von <i>Dictyostelium</i> -Zellen	50
3.4.2	Fixierung von phagozytierenden <i>Dictyostelium discoideum</i>	51
3.4.3	Fixierung entwickelter <i>Dictyostelium discoideum</i>	52
3.4.4	Quetschpräparate von Slugs auf agarbeschichteten Deckgläsern	52
3.4.4.1	Einbettung von fixierten Zellen in Gelvatol	52
3.4.5	Phototaxis	53
3.4.6	Wachstumsbestimmungen von <i>Dictyostelium</i>	53
3.4.6.1	Wachstumskurven unter Normalbedingungen	53
3.4.6.2	Wachstum in Bakteriensuspension	54
3.4.6.3	Fraßhofbestimmungen	55
3.4.7	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Phagozytose von Hefen durch <i>Dictyostelium discoideum</i>	55
3.4.8	Phagozytoseassay mit TRITC-markierten Hefen	55
3.4.9	Untersuchung der Sporenkeimung	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Erzeugung von $abpD^{++}$	57
4.1.1	Konstruktion des Überexpressionsvektors	57
4.1.2	Verifizierung der homologen Rekombination zu $abpD^{++}$	57
4.1.3	Immunfluoreszenz an <i>Dictyostelium discoideum</i>	59
4.2	Charakterisierung der $abpD^{-}$ - und $abpD^{++}$ -Mutanten	61
4.2.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen	61
4.2.2	Entwicklung von <i>D. discoideum</i> -Mutanten auf Phosphatagarplatten	61
4.2.3	Vergleich des Wachstums auf <i>Klebsiella aerogenes</i> -Rasen	62
4.2.4	Phagozytoseassay von $abpD^{++}$ und $abpD^{-}$ mit TRITC-markierten Hefen	64
4.2.5	Phototaxis von AX-2, $abpD^{++}$ und $abpD^{-}$	64
4.2.6	Sporenkeimungsstudien	68
4.2.7	Wachstum von AX-2, $abpD^{++}$ und $abpD^{-}$	68
4.2.7.1	Wachstum unter Standardbedingungen	68
4.2.7.2	Wachstum unter phagozytotischen Bedingungen in Schüttelkultur	69
4.2.7.3	Wachstumskurven unter osmotischem Stress	70
4.2.7.4	Wachstumskurven bei erhöhter und erniedrigter Temperatur	73
4.3	Slugmischexperimente	74
4.3.1	Mischexperimente von AX-2 mit anderen Stämmen	76
4.3.2	Mischexperimente von $abpD^{-}$ mit anderen Stämmen	81
4.3.3	Mischexperimente von $abpD^{++}$ mit anderen Stämmen	82
4.4	Fluoreszenzuntersuchungen phagozytischer <i>Dictyostelium</i> -Zellen	85
4.5	Charakterisierung der Interaptin-Antikörper	88

4.6	Intrazelluläre Verteilung von Interaptin	90
4.7	Präzipitation von Interaptin	90
4.7.1	Expression von C ₅ -HisTag-Protein und Chelatchromatographie . . .	91
4.7.2	Immunpräzipitation von Interaptin mit CNBr-Sepharose-gekoppeltem Interaptin-Antikörper	91
4.7.2.1	Reinigung der Interaptin-Antikörper	91
4.7.2.2	Immunpräzipitation von Interaptin	91
4.8	Immunfluoreszenz an Säugerzellen	93
5	Diskussion	96
5.1	Schaffung einer Interaptin-überexprimierenden Mutante abpD ⁺⁺	96
5.2	Charakterisierung von abpD ⁺⁺ und abpD ⁻	97
5.3	Slugmischexperimente	100
5.4	Charakterisierung der Interaptinantikörper	102
5.4.1	Immunpräzipitation von Interaptin	103
5.5	Immunfluoreszenz in COS-7-Zellen	103
	Bibliographie	105

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABD	Aktinbindungsdomäne
AMP	Adenosinmonophosphat
amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
bsr	Blasticidinresistenz
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA (revers von mRNA transkribierte DNA)
D. discoideum	<i>Dictyostelium discoideum</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
IgG	Immunglobulin(e) G
kB	Kilobasen (1000 Basen(paare))
kDa	Kilodalton (1 Da = 1 atomare Gewichtseinheit)
min	Minute(n)
MOPS	[Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
OD	optische Dichte, gelegentlich Wellenlängenangabe in [nm] angefügt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte NaCl-Lösung (vgl. Material & Methoden)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Rotationen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RRZ	Regionales Rechenzentrum der Universität zu Köln (auch RRZ Köln)
RT	Raumtemperatur

sek	Sekunde(n)
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
WWW	World Wide Web (auf Grafik basierender Teil des Internet)

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

In dieser Arbeit angegebene Produktbezeichnungen sowie Firmennamen werden ohne Gewährleistung der freien Verwendbarkeit benutzt und können eingetragene Warenzeichen sein.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

Dictyostelium discoideum, eine Amöbe aus der Klasse der Myxomyceten, wurde erstmalig von Raper 1935 beschrieben [Raper (1935)] und ist heute ein weit verbreiteter Modellorganismus zur Untersuchung des Zytoskeletts und zytoskelett-assoziiierter Proteine. Als Forschungsobjekt hat *Dictyostelium* einige Vorzüge: Die Amöben sind einfach in axenischem Medium kultivierbar, zeigen Differenzierungsvorgänge von überschaubarer Komplexität und sind darüberhinaus vielen molekularbiologischen Methoden zugänglich. Dieser eukaryotische Organismus weist zusätzlich in Bezug auf Chemotaxis, Pseudopodienbildung, Phagozytose sowie zellulären Transport Gemeinsamkeiten mit motilen Zellen höherer Organismen, wie zum Beispiel den Leukozyten und Granulozyten, auf.

Die natürlicherweise im Waldboden lebenden Amöben ernähren sich phagozytotisch von Bakterien und vermehren sich vegetativ. Bei Nahrungsmangel wird ein asexueller Entwicklungszyklus durchlaufen, in deren Verlauf keine Zellteilung mehr erfolgt. Durch den Nahrungsmangel ausgelöst schütten die Zellen das Chemoattraktans cAMP aus. Unter seinem Einfluß aggregieren etwa 100000 Zellen zu einem Pseudoplasmodium („Slug“), der eine distinguierte Polarisierung besitzt [Klein *et al.* (1988), Dormann *et al.* (2000), Tang *et al.* (2001)]. Die Zellen differenzieren sich in diesem Stadium in zwei Zelltypen, die Prä-Stielzellen und die Prä-Sporenzellen [Ginsburg *et al.* (1995), Williams *et al.* (1993)]. Das Pseudoplasmodium kann eine Migrationsphase von mehreren Stunden Dauer durchlaufen, in der es phototaktisches und chemotaktisches Verhalten auf der Suche nach einem geeigneten Standort zeigt [Fisher *et al.* (1981), Xiao *et al.* (1997), Traynor *et al.* (2000), Palsson

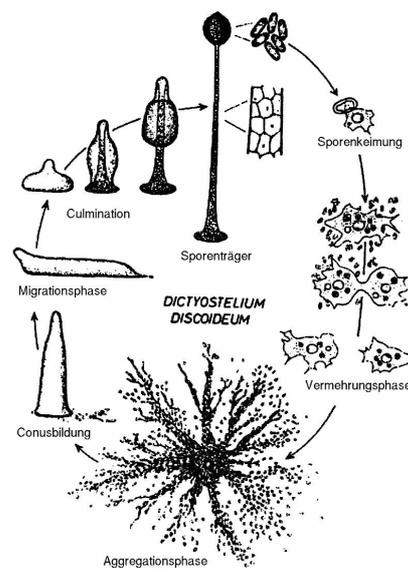


Abbildung 1.1: Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum* [nach: Gerisch (1965)]. Aus Sporen schlüpfen unter günstigen Bedingungen Amöben, die sich phagozytotisch von Bakterien ernähren und vegetativ vermehren. Die Zellen aggregieren bei Nahrungsmangel und bilden ein Pseudoplasmodium („Slug“), welches eine Wanderungsphase durchlaufen kann und dabei chemo-, photo- und thermotaktisches Verhalten zeigt. Nach ca. 18 Stunden beginnt die Kulminationsphase, in deren Verlauf die Sporen vom wachsenden Stiel nach oben getragen werden. Bei Berührung der Sporenkapsel werden die Sporen freigesetzt, keimen aus und beginnen einen neuen Zyklus.

et al. (2000)]. Nach ca. 18 Stunden beginnt die Kulminationsphase, in deren Verlauf die Sporenzellen von den zahlreicheren Stielzellen nach oben getragen werden. Die Stielzellen und die Hüllzellen des Sporenkopfes bilden eine durch Celluloseeinlagerung verstärkte Zellwand [Maree *et al.* (2001)]. Bei Berührung platzt der Sporenkopf auf und setzt die Sporen frei, die unter günstigen Bedingungen auskeimen und einen neuen Zyklus beginnen können.

Die bei der Zelldifferenzierung von *Dictyostelium*-Zellen im Pseudoplasmodium beteiligten Proteine sind seit langem Gegenstand der Untersuchung. Es sind viele Proteine an diesem Prozeß beteiligt, deren Rolle von der Aggregation der Zellen [Fair *et al.* (1990), Clark *et al.* (1995), Soede *et al.* (1994), Vithalani *et al.* (1998)] über die genregulatorische Wirkung entwicklungssteuert exprimierter Proteine [Mu *et al.* (1998), Loomis (1998), Yu *et al.* (1996)] bis hin zu spezifisch in bestimmten Zelltypen des Slugs exprimierter Proteine reicht [Saxe *et al.* (1996), Tsujioka *et al.* (2001)]. Es wurde berichtet, daß die Zellen innerhalb eines Slugs einen Sortierungsvorgang durchlaufen, bei dem bestimmte Zellen bevorzugt die Prä-Sporenpositionen besetzen [Ennis *et al.* (2000), Weeks *et al.* (2000)].

1.2 Das Zytoskelett

Eukaryotische Zellen besitzen ein aus filamentären Strukturen aufgebautes Zytoskelett, das an vielen elementaren Prozessen, wie zum Beispiel Zellmotilität, Formgebung, Phagozytose oder Zytokinese, beteiligt ist [Mitchison *et al.* (1996), van Oudenaarden *et al.* (1999), Picart *et al.* (2000)]. Man unterteilt diese Strukturen nach Durchmesser und Zusammensetzung der Filamente in Mikrofilamente, intermediäre Filamente und Mikrotubuli.

Die verschiedenen Filamente setzen sich aus unterschiedlichen Proteinen zusammen, haben jedoch ein allen gemeinsames Bauprinzip. Sie entstehen durch die Polymerisation von monomeren Proteinen, ein Prozeß, der durch eine Vielzahl an extra- und intrazellulären Signalen nach Bedarf reguliert wird. Spezielle akzessorische Proteine greifen in das Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation ein.

Mikrotubuli Die größten Strukturen des Zytoskeletts bilden die röhrenförmigen Mikrotubuli mit einem Durchmesser von ca. 25 nm, die die gesamte Zelle ausgehend vom Mikrotubuli-Organisationszentrum durchziehen. Aufgebaut werden sie durch heterodimere Untereinheiten von α - und β -Tubulin, die von einer Vielzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen sowie GTP-abhängig reguliert Protofilamente bilden [Moritz *et al.* (2000)]. Je 13 Protofilamente bilden zusammen einen Mikrotubulus, dessen Enden mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten auf- bzw. abgebaut werden. Das schnell wachsende Ende zeigt dabei zur Zellperipherie [Wiese *et al.* (2000)].

Das Mikrotubulisystem ist als eine Art Wegesystem an vielen Transportprozessen der Zelle beteiligt, z.B. von Vesikeln und Organellen mit Hilfe von Motorproteinen wie Dynein und Kinesin, [Huang *et al.* (1999), Rice *et al.* (1999)]. Der Spindelapparat, der während der Mitose die Chromosomen in der Äquatorialplatte organisiert und auf die Tochterzellen verteilt, wird aus Mikrotubuli aufgebaut [Mandelkow *et al.* (1995)].

Intermediärfilamente Das Intermediärfilamentsystem wird von einer sehr heterogenen Gruppe von elongierten Proteinen aufgebaut. Die Proteine lassen sich in drei Klassen unterteilen: Zytokeratine, Vimentin und Vimentin-ähnliche Proteine sowie Lamine. Alle Proteine dieser Familie enthalten eine α -helikale zentrale Domäne. Durch die Assoziation zweier Monomere ergeben sich Protofilamente, die sich zusammenschließen und etwa 10 nm dicke, äußerst schwer lösliche Intermediärfilamente bilden. Ihnen wird als funktionelle Bedeutung Beteiligung an der mechanischen Stabilität der Zelle zugesprochen [Franke (1993)].

Mikrofilamente Die Mikrofilamente mit einem Durchmesser von 5-6 nm bestehen aus Aktin, einem Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, und durchziehen die gesamte Zelle in einem feinen Netz. Im Zellinneren spricht man dabei von „stress fibers“, während das unter der Zellmembran liegende Netzwerk als Cortex bezeichnet wird. Aktin kommt in allen eukaryotischen Zellen mit einem Anteil am Gesamtproteingehalt von bis zu 50 % vor.

Aktin polymerisiert *in vitro* bei einer kritischen Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ unter dem Einfluß von mono- und divalenten Kationen wie K^+ und Mg^{2+} und unter ATP-Verbrauch zu filamentösem Aktin (F-Aktin).

Durch Anlagerung dieser Ionen an globuläres Aktin kommt es zu einer Konformationsänderung, die in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt die Bildung von Aktintrimeren ermöglicht. Die Verlängerung zu Filamenten erfolgt an beiden Enden, jedoch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Das schnellwachsende Ende wird als (+)-Ende bezeichnet, das langsame wachsende entsprechend als (-)-Ende.

Die Konzentration in Nicht-Muskelzellen liegt bei etwa $100 \mu\text{M}$, von denen etwa die Hälfte in polymerer Form vorliegt. Da bei den herrschenden Konzentrations- und ionischen Bedingungen in der Zelle eine vollständige Polymerisation des Aktins erfolgen würde, wird dieser Prozeß durch eine Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen reguliert [Satiropoulos *et al.* (1999)]. *In vivo* sind als wichtige Initiatoren bei der Organisation des Aktinzytoskeletts Proteine des Arp2/3-Komplexes gefunden worden [Machesky *et al.* (1999)].

Entlang der Aktinfilamente können sich die Myosine unter Energieverbrauch (ATP-Hydrolyse) bewegen [Ikonen *et al.* (1997), Mernall *et al.* (1998)]. Diese Motorproteine spielen dabei in Nicht-Muskelzellen eine wichtige Rolle bei intrazellulären Bewegungsvorgängen [Corrie *et al.* (1999), Ma *et al.* (2001)]. Von Myosin V wurde Beteiligung an vesikulärem Transport nachgewiesen [Evans *et al.* (1998), Tabb *et al.* (1998)]. In *Dictyostelium* ist Myosin II bei Zellteilungsvorgängen beteiligt [De Lozanne *et al.* (1987), Burridge *et al.* (1975), Baker *et al.* (1998)].

1.3 Aktinbindende Proteine in *Dictyostelium discoideum*

Bei der Regulation der Polymerisation und Depolymerisation der Aktinfilamente sind viele –insbesondere aktinbindende– Proteine beteiligt.

Man unterscheidet dabei zwischen den G-Aktin-bindenden Proteinen, den F-Aktin-bindenden Proteinen sowie den membranassoziierten Proteinen. Zur ersten Gruppe gehören in *Dictyostelium* Profilin [Haugwitz *et al.* (1991)] und CAP [Gottwald *et al.* (1996)], die G-Aktin in einem 1:1-Komplex binden und damit aus dem Gleichgewicht G-Aktin/F-Aktin entfernen. An die (+)-Enden der Filamente bindet eine andere Gruppe von Proteinen, zu denen in *D. discoideum* zum Beispiel Cap 32/34 gehört [Eddy *et al.* (1996)]. Proteine wie Gelsolin und Severin depolymerisieren das F-Aktin, eine unerläßliche Funktion für die Umorganisation des Zytoskeletts. Sie fragmentieren die Filamente zunächst in kleinere Abschnitte und binden anschließend an das (+)-Ende der Fragmente, so daß diese für eine weitere Anlagerung von Monomeren nicht zur Verfügung stehen. Membranassoziierte aktinbindende Proteine wie Ponticulin [Hitt *et al.* (1994), Wuestehube *et al.* (1990)], Talin [Kreitmeier *et al.* (1995)] und Hisactophilin [Hanakam *et al.* (1996)] verbinden den Aktin-cortex mit der Plasmamembran, während Comitinin das Aktinzytoskelett mit intrazellulären Membranen des Golgi-Apparates verbindet sowie vermutlich an Transportvorgängen beteiligt ist [Weiner *et al.* (1993), Schreiner (2000)]. Eine solche Rolle wird auch dem Interaptin zugesprochen [Rivero *et al.* (1998)].

Eine weitere Klasse aktinbindender Proteine sind die Filament-quervernetzenden Proteine. Man unterscheidet zwischen denen, die Aktinfilamente zu parallelen Bündeln binden, wie zum Beispiel Fimbrin [De Arruda *et al.* (1990)], oder zu orthogonalen Netzwerken. Zu letzteren gehören Proteine wie die Filamine [Hartwig *et al.* (1975)], Spektrin [Brenner *et al.* (1975), Fath *et al.* (1997)] und α -Actinin [Noegel *et al.* (1987)]. Diese Proteine besitzen entweder zwei Aktin-Bindedomänen, oder es dimerisieren zwei Monomere mit je einer Aktin-Bindedomäne, so daß zur Quervernetzung zwei Bindungsstellen zur Verfügung stehen.

1.4 Proteine der α -Actinin-Familie

Inzwischen sind viele Proteine bekannt, die eine der Aktinbindungsdomäne des α -Actinin ähnliche Domäne besitzen. Sie werden in einer Superfamilie zusammengefaßt. Es sind sowohl von *Dictyostelium discoideum* als auch von Säugern Mitglieder dieser Familie beschrieben worden.

Zu den in *Dictyostelium discoideum* beschriebenen Proteinen gehören unter anderem α -Actinin [Noegel et al. (1987)], Filamin (ABP-120, gelation factor) [Eichinger et al. (1996)], Cortexilin I und II [Faix et al. (1996)], Fimbrin [Prassler et al. (1997)], ein Fimbrin-ähnliches Protein [Hock et al. (1987)] sowie ein Spektrin-ähnliches Protein [Bennett et al. (1988)]. In Säugern sind unter anderem Dystrophin [Hammonds (1987)] und Dystonin [Brown et al. (1995)] beschrieben worden.

Sie zeigen einen modularen Aufbau mit einer normalerweise am N-Terminus lokalisierten konservierten F-Aktin-Bindungsdomäne (ABD) [Matsudaira (1991)]. Daran schließt sich eine Stäbchen- oder „rod“-Domäne an, die bei den einzelnen Mitgliedern der Familie stark variieren kann und regulatorische oder organisatorische Funktion besitzt. Als Funktionen für diese Domänen wurden unter anderem Oligomerisierung, Membranassoziation, Calciumregulation und Bindungen an andere Proteine beschrieben. Der modularisierte Aufbau der Proteine erlaubt eine weitreichende funktionelle Spezialisierung.

1.5 Interaptin

Interaptin wurde erstmals von Rivero et al. beschrieben [Rivero et al. (1998)]. Es besitzt eine N-terminale Aktinbindungsdomäne mit Ähnlichkeit zu Aktinbindungsdomänen anderer Proteine der α -Actininfamilie. Sie erstreckt sich über die ersten 255 Aminosäuren (Met-1 bis Leu-255). Eine zentrale „rod“-Domäne (1180 Aminosäuren, ab Lys-417 bis Gln-1598) schließt sich nach einer Serin-reichen Sequenz an. Für diese Domäne wird eine Stäbchenform mit *coiled-coil*-Struktur vorausgesagt. Sie besitzt eine gewisse Ähnlichkeit (bis maximal 49%, meist um 23%) mit Proteinen aus der Myosinfamilie. Dies deutet auf strukturelle Verwandtschaft mit Myosinen hin, die ebenfalls *coiled-coil*-Strukturen besitzen. Der C-terminale Bereich (ca. 120 Aminosäuren) besitzt einen hohen Anteil (41,5%) hydrophober und unpolarer Aminosäuren. In den Datenbanken befindet sich kein Protein mit einer Homologie zu dieser Sequenz. Es wird vermutet, daß dieser Sequenzbereich

funktionelle Bedeutung für die in Immunfluoreszenzuntersuchungen nachgewiesene Assoziation von Interaptin an Membranen besitzt, insbesondere an die Nukleusmembran und Membranen des endoplasmatischen Retikulums

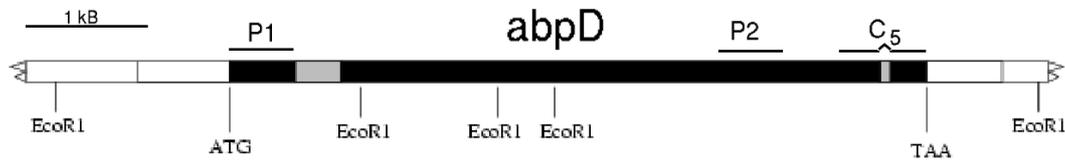


Abbildung 1.2: Struktur des Interaptingens *abpD*, wie sie von *Rivero et al.* 1998 veröffentlicht wurde. ATG bezeichnet die Position des Startcodons, TAA das Stopcodon. EcoRI kennzeichnet Schnittstellen des Restriktionsenzym *EcoRI*. Hellgrau unterlegt sind die beiden Introns.

Das Interaptigen *abpD* befindet sich in einfacher Kopie auf dem Chromosom 4 und besteht aus insgesamt 5710 Basen (Abb. 1.2). In seiner genomischen Organisation besitzt das Gen zwei Introns (hellgrau), die 417 bzw. 82 Basen umfassen. Die verbleibenden 5211 Basen kodieren 1737 Aminosäuren. Interaptin besitzt damit ein berechnetes Gewicht von 204,3 kDa.

1.6 Zielsetzung

Über die *in vivo*-Funktion von Interaptin ist bisher nur sehr wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher eine Interaptin-überexprimierende Mutante geschaffen werden. Durch die einfachere Handhabung der Zellen in axenischem Medium können so leichter größere Proteinmengen gewonnen werden, die eine genauere biochemische Analyse des Proteins ermöglichen werden. Die Charakterisierung der überexprimierenden Mutante und der Vergleich mit der Interaptin-defizienten Mutante sowie dem Wildtyp sollen Rückschlüsse auf die Funktion von Interaptin ermöglichen. Mit Hilfe der Immunpräzipitation sollen potentielle Bindungspartner von Interaptin gefunden werden. Durch Transformation von Fusionsproteinen zwischen einzelnen Interaptindomänen und GFP soll die intrazelluläre Proteinverteilung und die Funktionalität dieser Domänen näher bestimmt werden. Durch Mischexperimente soll herausgefunden werden, ob, und wenn ja, in welcher Weise, Interaptin-exprimierende Zellen auf die Organisation und die Differenzierung der Zellen im *Slug* einwirken.

Kapitel 2

Material

2.1 Laborausstattung

2.1.1 Labormaterialien

Cellophan, Dry ease	Novex
Corexröhrchen (15 ml und 50 ml)	Corex
Cryoröhrchen (1,8 ml und 2,2 ml)	Nunc
Deckgläschen (Glas), (Ø12, 18 und 55 mm)	Assistent
Elektroporationsküvetten, 2 mm Elektrodenabstand	Bio-Rad
Hybridisierungsröhren	Hybaid
Kanülen (steril, 18G-27G)	Terumo, Microlance
Kunststoffküvetten (Halbmikro)	Hellma
Kunststoff-Einmalpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner
Kunststoff-Einmalspritzen steril (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Amefa, Omnifix
Micropipetten, 1-20 μ l, 10-200 μ l, 100-1000 μ l	Gilson
Micropipettenspitzen (einmal), 200 μ l und 1000 μ l	Greiner
Nitrocellulosemembranen, BA85	Schleicher und Schuell
Nucleopore-Filter	Nucleopore
Nylonmembran, Biodyne B	Gelman Science
Objektträger (Glas)	Assistent
Parafilm	American National Can
Pasteurpipetten, 145 mm und 230 mm	Brand, Volec
PCR Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Biozym

Petrischalen (Ø35 mm, 60 mm, 100 mm)	Falcon
Petrischalen (Ø90 mm x 17 mm)	Greiner
Quarzküvetten	Hellma, Perkin Elmer
Reaktionsgefäß, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,2 ml	Sarstedt
Röntgenfilme X-omat AR-5, 18 × 24 mm, 535 × 43 mm	Kodak
Skalpell Nr. 10, 11, 15, 21	Feather
Sterilfilter, 0,2 µm und 0,45 µm	Gelman Science
Sterilfilter, 150 ml, Porengröße 0,22 µm	Falcon
Whatman-Filterpapier 3MM	Whatman
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Nunc
Zellkulturschalen, Multiwell (6, 24 und 96 Wells)	Nunc
Zentrifugationsröhrchen, 15 ml und 50 ml ("Falcons")	Greiner

2.1.2 Laborgeräte

Chromatographiesäulen (leer)	BioRad
Eismaschine	Ziegra
Elektrophorese Transformatoren, Power-pac 200, -300	Bio-Rad
Elektroporationsgerät Gene Pulser	Bio-Rad
Fraktionssammler, Modell 2128	BioRad
Fraktionssammler, RediFrac	Pharmacia Biotech
Gel-Dokumentationsgerät	MWG-Biotech
Heizblöcke DIGI-Block JR	neoLab
Heizblöcke Dri-Block DB x 20	Techne
Hybridisierungsöfen	Hybaid
Inkubatoren	
CO ₂ -Inkubator, BBD 6220, BB 6220	Heraeus Instruments
CO ₂ -Inkubator, WTC Binder	Biotran
Inkubator, Microbiologischer	Heraeus Instruments
Inkubator mit Schüttler, Lab-Therm	Kuehner
Kühlschränke	Liebherr
Magnetrührgerät MR 3001 K	Heidolph
Mikroskope	
Fluoreszenzmikroskop DMR	Leica

Fluoreszenzmikroskop 1X70	Olympus
Konfokales Laser Scan Mikroskop DM/IRBE	Leica
Lichtmikroskop CH 30	Olympus
Lichtmikroskop CK 2	Olympus
Lichtmikroskop DMIL	Leica
Stereomikroskop SZ-4045 TR	Olympus
PCR-Maschine PCR-DNA Engine PTC-2000	MJ Research
Peristaltikpumpe P1	Pharmacia Biotech
Plattengießmaschine	Technomat
pH-Meter 766	Knick
Röntgenfilmentwicklungsmaschine FPM-100A	Fujifilm
Rüttler Lab-Shaker	Kühner
Rüttler Lab-Therm	Kühner
Schüttler	GFL
Semi-Dry Blotapparatur Trans-Blot SD	Bio-Rad
Sonifiziergerät Ultra Turrax T25 basic	IKA Labortechnik
Speedvac concentrator DNA 110	Savant
Spektralphotometer Ultraspec 2000, UV/visible	Pharmacia Biotech
Tiefkühlschränke/-truhen (-20°C)	Liebherr, Siemens
Tiefstkühltruhen (-80°C)	Nunc
Ultrazentrifugen	
Optima TLX	Beckman
Optima L-70k	Beckman
Ultrazentrifugenrotoren	
TLA 45	Beckman
SW 41	Beckman
UV-Aufflichtgerät TFS-35 M	Faust
UV-Transilluminator	MWG Biotech
Vortex REAX top	Heidolph
Wasserbad	GFL
Zentrifugen (Mikrozentrifugen)	
Zentrifuge 5414	Eppendorf
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf

Zentrifuge Sigma	B.Braun Biotech Instruments
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments
Zentrifugen (Tischkühlzentrifugen, langsam)	
Zentrifuge CS-6R	Beckman
Zentrifuge RT 7	Sorvall
Zentrifuge Allegra 21R	Beckman
Zentrifugen (Tischkühlzentrifugen, schnell)	
Beckman Avanti J 25	Beckman
Sorvall RC 5 C plus	Sorvall
Zentrifugenrotoren	
JA-10	Beckman
JA-25,50	Beckman
SLA-1500	Sorvall
SLA-3000	Sorvall
SS-34	Sorvall
TLA 45	Beckman

2.1.3 Kits

Nucleobond AX 100 und AX 500	Macherey-Nagel
NucloSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel
NucloSpin Plus	Macherey-Nagel
pGEM T-easy-Vector System I	Promega
Stratagene Prime [®] It II	Stratagene
Original TA Cloning [®]	Invitrogen

2.1.4 Enzyme, Antikörper und Inhibitoren

Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase	Roche
DNase I (Desoxyribonuklease)	Sigma
Lysozym	Sigma
Klenow-Fragment	Life Technologies
Proteinase K	Sigma

Restriktionsendonukleasen	Amersham, Gibco-BRL, New England Biolabs, Roche
RNase A (Ribonuklease)	Sigma
T ₄ -DNA-Ligase	Gibco-BRL
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Roche
<u>Primäre Antikörper</u>	
<i>anti</i> -GFP-Antikörper mAk K3-184-2	unveröffentlicht
<i>anti</i> -Interaptin-Antikörper mAk 220-60-10	<i>Rivero et al.</i> , 1998
<i>anti</i> -Interaptin-Antikörper mAk 234-451-9	unveröffentlicht
<i>anti</i> -Interaptin-Antikörper mAk 234-151-1	unveröffentlicht
<i>anti</i> -Interaptin-Antikörper mAk 234-360-2	unveröffentlicht
<u>Sekundäre Antikörper</u>	
Ziege- <i>anti</i> -Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege- <i>anti</i> -Maus-IgG, Cy3-Konjugat	Sigma
<u>Inhibitoren</u>	
Aprotinin	Sigma
Complete® Inhibitoren Cocktail	Roche
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
<u>Antibiotika</u>	
Ampicillin	Grünenthal
Blasticidin S	ICN
Dihydrostreptomycinsulfat	Sigma
Geneticin (G418)	Gibco-BRL
Kanamycin	Sigma
Tetracyclin	Sigma

2.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

2.2.1 Chemikalien

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)	National Diagnostics
Agar-Agar (BRC-RG)	Biomatic
Agarose (Elektrophoresis Grade)	Gibco
Aminosäuren	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Pepton	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Borsäure	Merck
5-Brom-4-chlor-3-indazol- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth
Bromphenolblau, Natriumsalz	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Chloroform	Riedel-de Haen
Coomassie-Brillant-Blau G250	Roche
Coomassie-Brillant-Blau R250	Serva
p-Cumarsäure	Fluka
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Merck
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylenglycolbis[2-aminoethylether]-N,N,N',N'-tetra- essigsäure (EGTA)	Sigma
Essigsäure 98-100%	Riedel-de Haen
Ethanol	Riedel-de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
FCS (Fötales Kälberserum)	Biochrom, Gibco
Fischgelatine	Sigma
Formaldehyd	Sigma

Formamid	Merck
Gelatine	Sigma
Glucose	Merck
Glycerin	Riedel-de Haen
Glycin	Degussa
Harnstoff	Gerbu
Heringssperma	Roche
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES)	Biomol
Hefeextrakt	Oxoid
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogentriphosphat	Merck
Imidazol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Loewe Biochemica
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel-de Haen
MOPS, [Morpholino]propansulfonsäure	Gerbu
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumdeoxycholat	Sigma
<i>tri</i> -Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Riedel-de Haen
Nukleotide	Roche, Sigma
Pepton	Oxoid
Phenol	Roth

Phosphorsäure	Merck
Polyethylenglycol 4000	Merck
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Sigma
Polyvinylglykol MW 10000	Sigma
Ponceau-S Konzentrat	Sigma
Saccharose	Fluka
Salzsäure 32%ig	Fluka
Sephacryl S300	Pharmacia
Sephadex G50	Pharmacia
Sorbitol	Fluka
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Trichloressigsäure	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Fluka, Riedel-de Haen
Triton X-100 (Octylphenylpoly(ethylenglykoether))	Merck
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid (30%ige Lösung)	Merck
Yeast Nitrogen Base	Difco
Xylencyanolblau	Fluka

Radioaktive Chemikalien

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

Alle hier nicht explizit aufgeführten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Fluka, Merck, Riedel-de Haen, Roth, Serva oder Sigma bezogen.

2.2.2 Puffer und andere Lösungen

Hier nicht aufgeführte Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden angegeben.

Hepes-Phenol:

1 kg (10,6 mol) Phenol wird im Wasserbad bei etwa 60°C geschmolzen und mit gleichem Volumen 1 M HEPES pH 7,5 äquilibriert. Aliquots werden bei -20°C aufbewahrt.

10× NCP-Puffer (pH 8,0)

12,1 g (0,1 mol) Tris/HCl, 87,0 g (1,5 mol) NaCl und 5,0 ml Tween 20 werden mit Wasser auf 1 l Volumen aufgefüllt.

PBG pH 7,4

0,5% Rinderserumalbumin und 0,1% Gelatine werden in 1× PBS gelöst und der pH eingestellt.

PBS pH 7,2 und pH 8,0

Eine Lösung aus 30 mM KH_2PO_4 und 150 mM NaCl wird mit 70 mM Na_2HPO_4 auf einen pH von 7,2 (bzw. pH 8,0) eingestellt und durch Autoklavieren sterilisiert.

10× MOPS (pH 7,0/pH 8,0)

41,9 g (0,2 mol) MOPS, 16,7 ml 3 M Natriumacetatlösung und 20 ml 0,5 M EDTA-Lösung werden mit Essigsäure und/oder NaOH auf den gewünschten pH eingestellt und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

20× SSC

SSC-Puffer (20fach) besteht aus einer 3 M NaCl-Lösung, die 0,3 M Natriumzitat enthält.

1,2 M Phosphatpuffer (pH 6,8)

Eine 1,2 M Na_2HPO_4 -Lösung wird mit 1,2 M NaH_2PO_4 -Lösung im Verhältnis 2:1 gemischt.

Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0) [Malchow *et al.*, 1972]

2 mM Na_2HPO_4

15 mM KH_2PO_4

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl-Lösung

1 mM EDTA-Lösung (pH 8)

Tris-Phenol

1 kg (10,6 mol) Phenol wird im Wasserbad bei etwa 60°C geschmolzen und mit gleichem Volumen 1 M Tris/HCl pH 8,0 äquilibriert. Aliquots werden bei -20°C aufbewahrt.

10× Tris/Boratpuffer pH 8,3 (TBE-Puffer)

108 g (0,9 mol) Tris, 55 g (0,9 mol) Borsäure und 7,4 g (20 mmol) EDTA werden mit Wasser auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt und der pH-Wert mit HCl eingestellt.

50× Tris/Acetatpuffer pH 8,0 (TAE-Puffer)

242 g (2 mol) Tris, 57,1 ml 16,6 M Essigsäure (Eisessig) und 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung werden mit Wasser auf 1 l Volumen aufgefüllt.

2.3 Medien

Alle verwendeten Medien wurde mit deionisiertem Wasser, das über eine Ionenaustauscheranlage (Millipore) gefiltert wurde, angesetzt und bei 120°C autoklaviert. Antibiotika wurden nach Abkühlen auf etwa 50°C zugesetzt. Das Gießen von Kulturplatten wurde mittels einer halbautomatischen Plattengießmaschine durchgeführt.

2.3.1 Medien für *E. coli*-Kulturen

LB-Medium

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

SOC-Medium

20 g Bacto-Trypton,
5 g Hefeextrakt,
0,5 g (0,85 mmol) NaCl,
20 mM Glucose,
auffüllen auf 1 l Wasser.

Der pH-Wert wird jeweils mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Für Agarplatten wird den Medien 0,9% Agar Agar und, für Antibiotikaplatten, 50 µg/l Ampicillin oder Kanamycin zuge-

setzt. Zur Blau/Weiß-Selektion von *E. coli*-Transformanten benutzte Farbindikatorplatten werden unmittelbar vor Gebrauch mit 50 μl 0,1 M IPTG-Lösung sowie 90 μl X-Gal-Lösung (200 mg/10 ml Dimethylformamid) bestrichen.

2.3.2 Medien für *Dictyostelium discoideum*-Kulturen

Kulturmedium (pH 6,7) [Watts et al.(1970)]

14,3 g Pepton,
18 g (0,1 mol) Maltose,
0,616 g (3,5 mmol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$,
0,486 g (3,6 mmol) KH_2PO_4 ,
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Dieses Medium wird in der vorliegenden Arbeit auch als AX-2-Medium bezeichnet.

Salzlösung [Bonner et al.(1947)]

10 mM NaCl, 10 mM KCl, 2,7 mM CaCl_2

Phosphatagarplatten (pH 6,0)

15 g Agar Agar mit Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0) auf 1 l auffüllen

SM-Agarplatten (pH 6,5)

10 g Agar Agar,
10 g Pepton,
10 g (55 mmol) Glucose,
1 g Hefeextrakt,
1 g (4,1 mmol) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$,
2,2 g (16,2 mmol) KH_2PO_4 ,
1 g (5,7 mmol) K_2HPO_4 ,
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Wasseragarplatten

10 g Agar Agar
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

2.4 Bakterien- und *Dictyostelium discoideum*-Stämme

Bakterienstämme

<i>E. coli</i> JM 83	<i>Messing und Vieira, 1992</i>
<i>E. coli</i> JM 109	<i>Yanisch-Perron et al., 1985</i>
<i>E. coli</i> XL 1 blue	<i>Bullock et al., 1987</i>
<i>E. coli</i> BL 21 (DE)	<i>Studier und Moffat, 1986</i>
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Williams und Newell, 1976</i>

Dictyostelium discoideum-Stämme

AX2-214	Axenisch und auf Bakterienrasen wachsender Abkömmling von NC 4, in dieser Arbeit als AX-2 bezeichnet [<i>Raper (1935)</i>]
abpD ⁻	Interaptin-defiziente Mutante von AX-2 [<i>Rivero et al. (1998)</i>]
abpD ⁺⁺	Interaptin-überexprimierende Mutante von AX-2 [diese Arbeit]
abpD ⁻ -actGFP	Interaptin-defiziente Mutante, welche ein Fusionsprotein zwischen GFP und Aktin exprimiert [diese Arbeit]
abpD ⁻ -C ₅ GFP	Interaptin-defiziente Mutante, welche ein Fusionsprotein zwischen GFP und dem als C ₅ bezeichneten C-Terminus von Interaptin exprimiert [diese Arbeit]
abpD ⁺⁺ -actGFP	Interaptin-überexprimierende Mutante von AX-2, die ein Fusionsprotein zwischen GFP und Aktin exprimiert [diese Arbeit]
AX2-C ₅ GFP	AX-2-Mutante, die ein Fusionsprotein zwischen GFP und dem als C ₅ bezeichneten C-Terminus von Interaptin exprimiert [diese Arbeit]
csA ⁻ /abpD ⁻	doppelt-defiziente Mutante von AX-2, der sowohl Interaptin als auch das contact-site-A Protein fehlt [<i>Müller et al. (1978)</i> , und <i>Noegel et al. (1986)</i>]

GHR	Filamin-defiziente Mutante von AX-2 [<i>Eichinger et al.</i> (1996)]
myo ⁻	Myosin-defiziente Mutante von AX-2 [<i>Jung et al.</i> (1996)]
AX-2-actGFP	Mutante von AX-2, die ein an Aktin fusioniertes GFP exprimiert [<i>Westphal</i> (1997)]

2.5 Vektoren

pBluescript SK(-)	<i>Harper et al.</i> (1988)
pDEX-RM	<i>Faix et al.</i> (1990)
pEGFP C1/2/3	Fa. Clontech
pGEM-T Easy	Fa. Promega
pGEM 3 Z	Fa. Promega
pDex-bsr NSXS	Geschenk von <i>H. Dislich</i> und <i>F. Rivero</i>
pUC 118	Geschenk von <i>F. Rivero</i>

2.6 Mikroskopie

Zur konventionellen Immunfluoreszenzmikroskopie sowie zur Beobachtung von DAPI-markierten Zellen wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Leica DMR) mit einem 100x Neofluar-Objektiv verwendet. Bilder wurden mit einer gekühlten Photomultiplier-Kamera (CCD-Kamera SensiCam, PCO) aufgenommen. Mit diesem Mikroskop wurden auch verschiedene Entwicklungsstadien von *D. discoideum* untersucht, jedoch mit einem 2,5x oder 5x-Objektiv.

Lichtmikroskopische Untersuchungen an *D. discoideum* wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Olympus 1X70) durchgeführt.

Zur Beobachtung der intrazellulären Verteilung von Interaptin sowie für Phagozytose- und Sluguntersuchungen wurde ein inverses konfokales LaserScan-Mikroskop der Fa. Leica (Leica DM/IRBE) verwendet, das optische Schnitte durch die Präparate erlaubt. Zur Untersuchung einzelner Zellen wurden ein 63 x Ölimersionsobjektiv (PL APO 63x/1,32-0,6/ Öl) verwendet, für Untersuchungen an Slugs ein 16x-Ölimersionsobjektiv. Das Gerät besitzt einen Krypton- und einen Argon-Laser, die Anregungen bei verschiedenen Wellenlängen erlauben. Der Spektralbereich des Detektors läßt sich durch die mitgelieferte Software

computerunterstützt dem Emissionsbereich des zu untersuchenden Präparates anpassen. Kreuzanregungen durch die beiden Laser werden so vermieden. Die Daten wurden mit der Bildverarbeitungssoftware (TCS NT V1.6.551) der Fa. Leica aufbereitet.

2.7 Computer & Software

Die Aufbereitung der DNA-Sequenzierungsdaten und der Abgleich der DNA-Sequenzen wurden auf den Workstations des Regionalen Rechenzentrums der Universität zu Köln durchgeführt. Die verwendete Software ist ein Paket der Universität von Wisconsin (GCG-Sequencing Package [*Devereux et al.* (1984)]).

Für Abgleiche mit anderen als den auf den Rechnern des RRZ Köln zur Verfügung stehenden Datenbanken wurden die im WWW angebotene Software der Universität Jena (*Dictyostelium* Genome Sequencing Project) und der japanischen Universität Tsukuba (*Dictyostelium* cDNA Project) benutzt.

Auswertung der Wachstumskurven, der Phototaxisexperimente, Fraßhofuntersuchungen und Phagozytostests wurden mit MS-Excel® 7.0 (Fa. Microsoft) und StarOffice 5.2 (Fa. Sun Microsystems) vorgenommen.

Bilder und Graphiken wurden mit der Leica TCS NT V1.6.551-Software (Fa. Leica), CorelDraw V8.0 (Fa. Corel), Adobe Photoshop (Fa. Adobe) und freier Software (Gimp V1.2, Xfig 3.2, ImageMagick 5.3.1) bearbeitet.

Western-Blots und SDS-Gele wurde mit Hilfe eines AGFA-SnapScan 1236s (Fa. AGFA) und XSane 0.74 (freie Software) eingescannt.

Der zur Erstellung dieser Arbeit verwendete Texteditor war GNU-Emacs 20.7.1, der Textsatz stammt von L^AT_EX 3.14159.

Verwendete Betriebssysteme waren verschiedene UNIX-Derivate auf den Workstations des RRZ Köln, Microsoft Windows® NT 4.0 sowie bei der Erstellung dieser Arbeit SuSE-Linux 7.2 Professional.

Kapitel 3

Methoden

3.1 Kultur von *Dictyostelium discoideum*

3.1.1 Anzucht in Flüssigmedium

AX-2 und Transformanten werden aus Vorkulturen, Sporen oder von SM-Agarplatten in AX2-Medium angeimpft. Um letztere von *Klebsiella aerogenes* zu befreien, wird zum Medium ein Antibiotikum gegeben, entweder Dihydrostreptomycin (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Tetracyclin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die Generationszeit beträgt für AX-2 in Schüttelkultur bei 21°C und 160 rpm 8-11 Stunden.

Zellen für zellbiologische Untersuchungen werden bis zu einer Dichte von maximal 5×10^6 Zellen/ml angezogen, da ab dieser Zelldichte das axenische Wachstum in eine stationäre Phase übergeht.

3.1.2 Anzucht auf SM-Agarplatten

Zum Klonieren und für die mittelfristige Lagerung (max. 2 Monate) werden SM-Platten verwendet. Auf die auf 21°C angewärmten und oberflächlich angetrockneten Platten werden 100 μl Salzlösung pipettiert, in die mittels einer Impföse von einer *Klebsiella aerogenes*-Rasen enthaltenden SM-Platte *Klebsiella aerogenes* aufgebracht werden. Zusammen mit *Dictyostelium discoideum*-Zellen werden diese ausgestrichen und etwa 3 Tage bei 21°C inkubiert. Die Kolonien der *Dictyostelium discoideum* zeigen sich als klare Fraßhöfe im dichten Bakterienrasen.

Klone können mittels Impföse auf neue Platten überführt oder in Flüssigkulturen angezogen werden.

3.1.3 Sporengewinnung

Axenisch gewachsene Zellen werden geerntet (Zentrifugieren bei 2000 rpm, 4°C, Sorvall RT-7), zweimal mit 4°C kaltem Soerensen-Puffer gewaschen und in einer Dichte von 1×10^8 Zellen in Soerensen resuspendiert. 500 μ l werden auf Phosphatagarplatten ausplattiert und bei 21°C inkubiert. Nach 48 Stunden sind die Zellen fertig entwickelt und bilden Fruchtkörper.

Die Sporen werden mittels einer benetzten Impföse geerntet und in kaltem Soerensen-Puffer aufgenommen. Zu je 1 ml in Einfrierröhrchen (Nunc, 2,2 ml) aliquotiert werden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Reaktivierung der Zellen wird ein Aliquot auf Raumtemperatur aufgetaut und in 30 ml AX2-Medium gegeben. Nach etwa 3 Tagen bei 21°C und 160 rpm sind die Zellen bis auf eine Dichte von 5×10^6 angewachsen.

3.1.4 Einfrieren/Auftauen von *Dictyostelium discoideum*

Zur Konservierung von *Dictyostelium discoideum* werden 900 μ l einer axenisch gewachsenen, möglichst dichten Schüttelkultur ($2 - 5 \times 10^6$) in ein Einfrierröhrchen (Nunc, 2,2 ml) gegeben. Dazu werden je 100 μ l Pferdeserum (Oxoid) und DMSO pipettiert und die Suspension auf Eis gekühlt (ca. 1 h). Anschließend werden die Zellen für weitere 2 h bei -20°C eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Wiederanzucht eingefrorener Zellen wird ein Aliquot angetaut und so schnell wie möglich in 10 ml gekühltes AX2-Medium überführt, bei 2000 rpm (4°C, Sorvall RT-7) zentrifugiert und in 10 ml frischem AX2-Medium aufgenommen. Diese werden in eine Petrischale gegeben und bei 21°C inkubiert. Nach wenigen Stunden sind die Zellen angewachsen, und es kann Antibiotikum zugesetzt werden. Ein erster Wechsel des Mediums erfolgt nach 12 Stunden, um tote Zellen zu entfernen.

3.1.5 Entwicklung von *Dictyostelium* auf Phosphatagarplatten

1×10^7 axenisch gewachsene *Dictyostelium discoideum*-Zellen werden zweimal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und in höchstens 1 ml Soerensenpuffer aufgenommen. Sie werden auf eine Phosphatagarplatte gegeben, verteilt und im sterilen Luftstrom getrocknet. Dieser Zeitpunkt gilt als t_0 .

Nach der gewünschten Entwicklungszeit bei 21°C können die Stadien der Entwicklung dokumentiert und weiter verarbeitet werden. Dazu werden die Zellen mit Soerensen-Puffer abgespült und vorsichtig zentrifugiert (4°C, 780 x g, 2 min).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Mikromaßstab

3.2.1.1 „Boiling Prep“

Dieses Verfahren ist geeignet, eine große Anzahl von Versuchsansätzen parallel zu bearbeiten [Holmes *et al.*(1981)]. Die Methode beruht darauf, daß Zellwandmaterial und chromosomale DNA beim Erhitzen auf annähernd 100°C koagulieren und abzentrifugiert werden können, während Plasmid-DNA und RNA löslich sind und daher im Überstand bleiben.

1,5 ml Bakterien-Übernachtskultur werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm Eppendorfszentrifuge), mit 200 μ l STET-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 10 μ l Lysozymlösung (10 mg/ml in Tris/HCl pH 8) bei RT lysiert (2 min).

Die Zelltrümmer werden bei 13000 rpm (Eppendorfszentrifuge) pelletiert. Das Pellet wird entfernt, der Überstand mit 20 μ l 3 M Natriumacetat-Lösung pH 7,0 versetzt, geschüttelt und 500 μ l 96%iges Ethanol hinzugegeben.

Nach 10 min bei -20°C wird die ausgefallene Plasmid-DNA pelletiert (13000 rpm, 4°C, Eppendorfszentrifuge), der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und 10 min luftgetrocknet (alternativ 30 sek in einer Speedvac bei mittlerer Wärme).

Das Pellet wird in 30-50 μ l TE-Puffer oder Wasser, je nach Weiterverwendung, aufgenommen.

STET-Puffer

0,1 M NaCl

10 mM Tris/HCl pH 9,0

1 mM EDTA pH 8,0

5 % Triton X-100

3.2.1.2 Mikropräparation von Plasmid-DNA

1,5 ml Bakterien-Übernachtskultur werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm Eppendorfszentrifuge), der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Es werden 200 µl Lösung II zugegeben, durch mehrfaches Umkippen gemischt und 1-2 min bei RT inkubiert.

200 µl Lösung III werden zugesetzt, durch leichtes Schütteln gemischt und bei 13000 rpm (Eppendorfszentrifuge) 8 min zentrifugiert.

Der Überstand wird vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol versetzt. Nach 10 min Inkubation bei -20°C wird die Plasmid-DNA durch Zentrifugation bei 4°C (13000 rpm, Eppendorf-Kühlzentrifuge) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem zentrifugieren bei 4°C wird das Pellet vom Überstand befreit, luftgetrocknet und in ca. 50 µl TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

Lösung II

1% SDS

200 mM NaOH

Lösung III

3 M Kaliumacetat

3.2.1.3 Midi-Plasmidpräparation gemäß Macherey & Nagel

Das „Nucleobond AX-100“-Kit der Fa. Macherey&Nagel (Düren) kann dazu verwendet werden, sehr reine Plasmid-DNA in größeren Mengen zu gewinnen.

Dazu werden 50-250 ml Übernachtskultur einer Bakteriensuspension abzentrifugiert (Sorvall R7, 3200 rpm, 1 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Lösung A1 aufgenommen. Diese Lösung enthält RNase. Dazu werden 5 ml Lösung A2 gegeben und durch vorsichtiges Umschütteln vermischt (~ 1 min, bis eine klare, viskose Lösung entsteht. Dazu werden 5 ml Lösung A3 pipettiert und erneut geschüttelt.

Nach Filtration durch einen mit Wasser angefeuchteten Faltenfilter wird das Filtrat über eine Nucleobond AX 100-Säule chromatographiert, mit Waschpuffer N3 gewaschen und mit 5 ml Elutionspuffer N5 eluiert. mit dem 0,7-0,8fachen des Volumens Isopropanol versetzt und 10 min zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SA-25 Rotor, 10000 rpm, 4°C). Das Pellet wird in 200 μ l Wasser aufgenommen und mit 200 μ l 4 M LiCl-Lösung sowie 10 μ l 1M Tris/HCl pH 7,5 versetzt, gemischt und die DNA mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol gefällt. Nach zentrifugieren (10 min, 13000 rpm, Eppendorfkühlzentrifuge) wird das Pellet luftgetrocknet (5-10 min) und je nach DNA-Menge in 50-300 μ l Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

3.2.2 Präparation chromosomaler DNA aus *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum besitzt einen hohen Gehalt an RNA und Kohlenhydraten, welche bei der Reinigung zur Vermeidung von Kontamination der chromosomalen DNA vorher abgetrennt werden müssen. Chromosomale DNA wird daher aus angereicherten Zellkernen isoliert [Noegel *et al.* (1985)].

Dictyostelium discoideum Zellen werden mit kaltem Wasser von einer dicht bewachsenen SM-Agarplatte geerntet und bei 720 x g zwei Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird mit kaltem Wasser gewaschen, um Reste von *Klebsiella aerogenes* zu entfernen. Die Zellen werden mit NLB-Puffer lysiert, welcher die Zellmembranen, nicht aber die Kernmembran angreift, resuspendiert und bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellkerne werden in 1 ml TE-Puffer aufgenommen und mit 50 μ l 10%iger SDS-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 10 μ l einer Proteinase K-Lösung (100 μ g/ml) wird die Reaktionsmischung 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch zweifache Extraktion mit wassergesättigtem Phenol werden restliche Proteine und RNA entfernt. Zur Entfernung des Phenols wird einmal mit CHCl_3 extrahiert.

Zur DNA-Präzipitation wird das zweifache Volumen 96%iges Ethanol und ein Zehntel des Volumens 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 pipettiert. Die gefällte, fädige DNA wird mit einem Glasstab unter leichtem Rühren aus der Lösung gezogen und mit reinem Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung (ca. 5 min) wird die chromosomale DNA in TE-Puffer gelöst und bei 4-7°C im Kühlschrank gelagert.

NLB-Puffer:

10 mM Magnesiumacetat

10 mM NaCl

30 mM Hepes pH 7,5

10% Saccharose

2% Nonident P 40

3.2.3 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund ihrer vom Molekulargewicht abhängigen unterschiedlichen Ladung und damit ihrer Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegelmatrix [*Sambrook et al.* (1989)].

Je nach Auftrennungsziel und Verwendung des Gels werden 0,6 - 2%ige Agarosegele in TBE- oder TAE-Puffer als Gel- und Laufpuffer eingesetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgt horizontal in Flachbett-Gelapparaturen verschiedener Größe (7,5 cm × 8 cm; 11,5 cm × 14 cm; 13 cm × 19 cm) bei einer Spannung von 10-12 V/cm.

Den Proben wird vor dem Auftragen ein Zehntel ihres Volumens an DNA-Probenpuffer zugesetzt. Zur Visualisierung der Fragmente unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) wird den Gelen beim Gießen 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid beigemischt. Zur Größenbestimmung der Fragmente elektrophoriert man einen geeigneten Größenstandard mit.

Die Dokumentation erfolgt photographisch mittels eines Videodokumentationssystems.

DNA-Probenpuffer

40% Saccharose

0,5% Natriumdodecylsulfat

0,25% Bromphenolblau

in TE Puffer

DNA-Größenstandards

1 kB DNA-Leiter (Gibco BRL): 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126,
6108, 5090, 4072, 3054, 1636, 1018, 506,
396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75 Bb

λ -HindIII-Marker: 21230, 5148, 4973, 4268, 3530, 2030,
1900, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 Bp

3.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die mit Restriktionsenzymen verdaute DNA in 0,6-2%igen Agarosegelen in TAE-Puffer aufgetrennt. Das Gelstück mit der durch die Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbaren zu isolierenden Fragmentbande wird mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das Gelstück wird in ein präpariertes 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. In den Boden dieses Reaktionsgefäßes wurde zuvor ein kleines Loch gestochen und dieses mit einem Pfropfen aus silanisierter Glaswolle verschlossen.

Die Flüssigkeit kann durch Zentrifugieren aus dem Agarosegel eluiert werden, da letzteres von der Glaswolle zurückgehalten wird. Dazu wird das Reaktionsgefäß in ein größeres, 1,5 ml- Reaktionsgefäß gestellt und zweimal für 1 min bei 3000 x g zentrifugiert. Das Eluat wird noch einmal bei 13000 x g für 1 min zentrifugiert, um eventuell vorhandene Reste des Agarosegels zu pelletieren. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wird mit dem 2,5fachen Volumen 96%igem Ethanol unter Zusatz von 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 gefällt, sedimentiert (13000 x g, 15 min, 4°C) und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die so gereinigte DNA wird in 10-20 μ l Wasser aufgenommen.

3.2.5 Southern-Blot Analyse

Das als Southern-Blot bezeichnete Verfahren dient dazu, die in Agarosegelen nach Größe aufgetrennte DNA auf Nylonmembranen zu transferieren [*Southern* (1975)]. Durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Proben (vgl. Kap. 3.2.8) können spezifische Fragmente identifiziert werden.

Hierzu wird genomische DNA in 300 μ l Volumen ü.N. mit Restriktionsenzymen verdaut. Danach wird die DNA mit 660 μ l 96%igem Ethanol und 30 μ l 3 M Natriumacetat pH 5,2 für

2 Stunden bei -20°C gefällt und durch Zentrifugation bei $13000 \times g$ und 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach kurzem Lufttrocknen wird die DNA in $20 \mu\text{l}$ Wasser aufgenommen, mit $2 \mu\text{l}$ DNA-Probenpuffer versetzt in einem 0,6-0,8%igen Agarosegel elektrophoriert. Parallel läßt man einen Größenmarker mitlaufen.

Um eine gute Auftrennung der Fragmente zu erreichen, wird die Elektrophorese für etwa 17 h bei 35 V durchgeführt (Stromdichte $\sim 3 \text{ V/cm}$). Das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel wird zusammen mit einem Lineal fotografiert (UV-Licht, $\lambda = 302 \text{ nm}$, Videodokumentationssystem), um eine spätere Größenbestimmung der Signale zu ermöglichen.

Anschließend wird das Gel für 20 min in Denaturierungspuffer und für weitere 20 min in Neutralisierungspuffer inkubiert. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgt in 20x SSC-Lösung über einen Zeitraum von 18 Stunden durch Kapillarkräfte. Dabei wird das Gel auf zwei in 20x SSC-Lösung getränkte 3MM Whatman-Filterpapiere gelegt, die papierchromatographischen Kontakt zu einem SSC-Lösungsreservoir haben. Das Gel wird mit der mit Wasser befeuchteten und anschließend mit 20x SSC-Lösung benetzten Nylonmembran luftblasenfrei bedeckt. Darüber werden zwei Lagen 3MM Whatman-Filterpapier und ein etwa 7 cm dicker Stapel saugfähiges Papier gedeckt. Das Ganze wird gleichmäßig mit einem Gewicht beschwert (ca. 600 g).

Nach dem Transfer wird die Nylonmembran kurz in 2x SSC-Lösung inkubiert, zweimal im UV-Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt und bis zur weiteren Verwendung bei RT im Dunkeln aufbewahrt.

Denaturierungspuffer

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

Neutralisierungspuffer

1,5 M NaCl

0,5 M Tris/HCl pH 7,5

3.2.6 Isolierung der Gesamt-RNA aus *Dictyostelium discoideum*

Bei sämtlichen Arbeiten mit RNA werden Handschuhe getragen und stets sterile Plastikgefäße, autoklavierte Mikropipettenspitzen und autoklavierte Lösungen verwendet, um Kontamination der Proben mit RNase zu vermeiden.

1×10^8 Zellen werden von Phosphatagarplatten mit 15 ml eiskaltem Wasser geerntet und mit 50 mMol Hepes-Puffer pH 7,5 gewaschen. Die *Dictyostelium discoideum*-Zellen werden in 5 ml 50 mMol Hepes-Puffer pH 7,5 resuspendiert und durch Zugabe von 1 ml 10%iger

SDS-Lösung und 100 μ l DEPC unter heftigem Schütteln 1 min lysiert. Die Suspension wird sofort mit dem zweifachen Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Das Phenol wurde dazu mit HEPES-Puffer pH 7,5 gesättigt (vgl. Kap. 2.2.2) und mit gleichem Volumen Chloroform versetzt. Zur schnelleren Phasentrennung wird die Probe bei 5000 x g 5 min zentrifugiert. Die Extraktion wird sofort wiederholt, bis keine Interphase mehr erkennbar ist. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 10 M LiCl-Lösung und dem zweifachen Volumen Ethanol wird die RNA zwei Stunden bei -20°C gefällt. Sie wird dann bei 5000 x g und 4°C 30 min pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und kurz getrocknet. In Wasser aufgenommen wird sie aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.7 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA verwendet man 1,2%ige Agarosegele [Lehrach *et al.* (1977)]. Dazu werden 2,4 g Agarose mit 20 ml 10x MOPS-Puffer pH 8 und 148 ml Wasser zum Sieden erhitzt. Sobald die Temperatur unter 65°C gefallen ist, setzt man 32 ml 36%iger Formaldehydlösung zu und gießt das Gel.

Die Auftrennung der RNA erfolgt in einer Flachbettgelelektrophoresekammer (12,5 cm x 21 cm). Dazu wird die RNA-Probe mit 1/3 des Volumens RNA-Puffer vermischt und 5 min bei 68°C denaturiert. Nach Zugabe von 5 μ l RNA-Farbmarker werden die Proben aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei einer Spannung von 35 V.

RNA-Puffer

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

RNA-Farbmarker

50% Saccharose
0,25% Bromphenolblau
in Wasser

3.2.8 Herstellung radioaktiv markierter DNA

Stratagene Prime[®]It II Kit wird zur Herstellung radioaktiv markierter DNA verwendet. Die vom Hersteller vorgeschlagene Vorgehensweise wird benutzt.

Dazu werden 0,1 bis 0,3 μ g DNA-Fragmente auf ein Gesamtvolumen von 24 μ l mit Wasser verdünnt. Dazu werden 10 μ l Random-Oligonucleotide-Primer (wird zusammen mit dem Kit geliefert) pipettiert, und die DNA durch 5 min Erhitzen auf 95°C denaturiert. Anschließend werden 10 μ l 5 x dATP-Primerpuffer (ebenfalls im Kit enthalten) zugesetzt,

5 μl α -³²P-ATP-Lösung und 1 μl Klenow-Enzym (5 U/ μl (Kit)) dazugegeben und die Mischung für 10 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 μl Stop-Mix (auch im Kit) wird die Reaktion gestoppt, mit 100 μl TE-Puffer pH 8,0 verdünnt und die Lösung auf eine 0,9 ml Sephadex G-50 Säule (s. Kap. 3.2.8.1) gegeben. Durch Zentrifugation bei 3000 rpm (Sorvall RT-7, 2 min) werden die freien Nukleotide durch die Säule abgetrennt und die radioaktiv markierte DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Durch Erhitzen auf 100°C für 10 min wird die DNA denaturiert und auf Eis gekühlt.

3.2.8.1 Chromatographie durch Sephadex G-50 Chromatographiesäulen

Diese Technik wird dazu verwendet, hochmolekulare DNA durch Gelfiltration von leichteren Molekülen zu trennen [*Sambrook et al.* (1989)]. In diesem speziellen Fall diente sie zur Abtrennung radioaktivmarkierter DNA von freien radioaktiven Nukleotiden (α -³²P-ATP). 30 g Sephadex G-50 gießt man langsam in 250 ml TE-Puffer pH 8,0 und läßt sie ü.N. quellen. Am nächsten Tag wird der Überstand dekantiert und durch das gleiche Volumen frischen TE-Puffer ersetzt. Die Suspension wird autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

Zur Präparation einer Chromatographiesäule wird Sephadex G-50 in eine 1-ml Einmal-Plastikspritze, deren Auslaßöffnung mit einem Pfropfen silanisierter Glaswolle verschlossen wurde, gegeben. Durch Zentrifugation bei 3000 rpm (2 min, Sorvall RT-7) wird der Puffer abgetrennt und die Säule fester gepackt. Insgesamt verwendet man so viel Sephadex G-50, bis das Volumen der gepackten Säule 0,9 ml beträgt. Die Säule wird unmittelbar verwendet.

3.2.9 Nachweis von DNA-Fragmenten mit radioaktiv markierten Sonden

Die hier angeführten Hybridisierungsbedingungen entsprechen im wesentlichen der von *Mehdy* beschriebenen Technik [*Mehdy* (1985)].

Die mit 2x SSC-Lösung angefeuchtete Nylonmembran wird dazu in eine Glashybridisierungsröhre überführt und mit 10 ml Hybridisierungspuffer 30 min bei 37°C in einem Hybridisierungssofen zur Vorhybridisierung inkubiert. Der Hybridisierungspuffer wird zur Vermeidung späterer unspezifischer Bindungen der radioaktiven Sonde mit 1 ml denaturiertem Heringssperma (200 μl) versetzt. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde (s. Kap. 3.2.8) wird die Membran ü.N. in einem Rotationsofen bei 37°C inkubiert.

Die radioaktive Lösung wird abgegossen und die Membran zweimal kurz mit Waschpuffer

abgespült. Anschließend wird die Membran zweimal je eine halbe Stunde mit Waschpuffer bei 37°C unter Schütteln gewaschen. Nach dem Trocknen wird die Membran in Polyethylenfolie gepackt und mit einem Röntgenfilm in einer mit Verstärkerfolie versehenen Filmkassette bei -70°C exponiert.

Hybridisierungspuffer

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

Waschpuffer

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

Denhardt's Reagenz

2% Ficoll 400
2% Polyvinylpyrolidin
2% Rinderserumalbumin (BSA)

3.2.10 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA und RNA wird in wässriger Lösung spektralphotometrisch bestimmt. Eine OD von 1,0 entspricht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einzelsträngiger RNA [Sambrook *et al.* (1989)].

Über den Grad der Verunreinigung mit Proteinen und Phenolen lässt sich mit Hilfe des Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ eine Aussage machen: beträgt der Wert des Quotienten 1,8 oder mehr, so kann man von einer reinen DNA- bzw. RNA-Lösung ausgehen.

3.2.11 *In vitro*-Rekombination von DNA

3.2.11.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit einem Restriktionsenzym erfolgt in dem vom Enzymhersteller empfohlenen Restriktionspuffersystem und unter der angegebenen Temperatur. Je μg DNA werden 2-10 U eingesetzt (jeweils gemäß enzyspezifischer Herstellerempfehlungen).

Plasmid-DNA wird 1-3 Stunden verdaut, chromosomale DNA ü.N.. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.2.11.2 Phosphatase-Behandlung

Damit die DNA-Ligase kohäsive oder auch glatte Enden von DNA-Fragmenten ligieren kann, muß jeweils die 5'-ständige Phosphatgruppe entfernt werden. Um eine Religation des linearisierten Vektors zu verhindern, wird die 5'-Phosphatgruppe mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) hydrolysiert. Linearisierte Vektor-DNA (5-10 μg) werden in einem 50 μl Ansatz mit 3 U alkalischer Phosphatase in CIAP-Puffer bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach Ende der Reaktion wird das Enzym durch Erhitzen auf 70°C (10 min) deaktiviert und die DNA durch Zusatz des 2,5fachen Volumens Ethanol gefällt.

10x CIAP-Puffer pH 9,0

0,5 M Tris/HCl

10 mM MgCl_2

1 mM ZnCl_2

10 mM Spermidin

3.2.11.3 Überführung überstehender Enden in glatte Enden

Viele Restriktionsenzyme erzeugen kohäsive Enden mit einem 3'- oder 5'-überstehenden Ende. 5'-DNA-Überhänge können mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I unter Zusatz von Nukleotiden aufgefüllt werden. Der 3'-Überhang kann von der T_4 -Polymerase in Abwesenheit von Nukleotiden abgebaut bzw. unter Zusatz von Nukleotiden zu einem glatten Ende aufgefüllt werden.

Der Reaktionsansatz für das Klenow-Fragment setzt sich folgendermaßen zusammen:

1 μg DNA, 2 μl 10x NT-Puffer, 2 μl d(ATP/GTP/TTP/CTP) (je 1 mM) und 1 U Klenow-Enzym werden auf 20 μl mit Wasser aufgefüllt.

Der Reaktionsansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch zehnminütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Die DNA wird mit DNA-Probenpuffer in einem Agarosegel aufgetrennt und aus diesem isoliert (vgl. Kap 3.2.4).

Für die T₄-Polymerase setzt sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

1 µg DNA, 2 µl 10x T₄-Polymerase-Puffer, je 5 mM und 1 U T₄-Polymerase werden auf 18 µl mit Wasser aufgefüllt und 2 min bei 37°C inkubiert. Dann erfolgt die Zugabe von 2 µl d(ATP/GTP/TTP/CTP) (je 5 mM), und die Mischung wird weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Es wird einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol gefällt.

3.2.11.4 Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten

Die T₄-Polymerase katalysiert die Ligation von DNA-Fragmenten und entsprechend linearisierter Vektor-DNA unter ATP-Verbrauch.

Zur Verknüpfung zweier glatter Enden wird die Reaktion für 24 h bei 21°C, zur Verbindung kohäsiver (überhängender) Enden 12-16 h bei 8°C inkubiert. Ein Reaktionsansatz besteht für die Ligation kleinerer Fragmente (<1000 Bp) in einen Vektor aus einem 10fachen molaren Überschuß Fragment-DNA, dem vom Enzymhersteller bereitgestellten Ligationspuffer und der T₄-Polymerase in der herstellerseitig empfohlenen Menge. Für die Ligation großer (>3000 Bp) Fragmente setzt man die doppelte molare Menge Fragment-DNA ein. Fragmente in mittlerer Länge wurden in einem Verhältnis von etwa 5:1 eingesetzt. In der Regel wurde die Vektor-DNA dephosphoryliert eingesetzt.

3.2.12 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann bei Wahl geeigneter Oligonucleotide zur *in-vitro*-Amplifikation von DNA-Abschnitten verwendet werden [Saiki *et al.* (1992)]. Dazu werden eine doppelsträngige DNA-Vorlage (Matrize) und zwei den zu amplifizierenden Abschnitt begrenzende Oligonucleotide (Primer) einer kontinuierlichen Abfolge von Denaturierungen, Primer-Hybridisierungen und DNA-Polymerisierungen unterworfen. Die Reaktion wird in einem Thermocycler durchgeführt, unter Zusatz von Nukleotidtriphosphaten und einer hitzeresistenten Polymerase, der *Taq*-Polymerase [Chein *et al.* (1976)]. An den Enden können die Oligonucleotide einen Überhang aus wenigen nicht-hybridisierenden Nucleotiden haben, mit deren Hilfe beispielsweise Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen eingeführt werden können.

3.2.13 Transformation von *E. coli*-Zellen

3.2.13.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen (chemokompetent) werden 0,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* in 50 ml LB-Medium bei 37°C und 250 rpm inkubiert, bis die OD₆₀₀ zwischen 0,4-0,6 lag. Die Bakterien werden pelletiert (10 min, 4°C, 4000 rpm, Beckman Avanti J25, JA-25.50-Rotor) und in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 2 ml dieser Lösung aufgenommen, mit 20% Glycerol versetzt und in Aliquots zu je 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.13.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

1 l LB-Medium wird mit 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* angeimpft und bei 37°C und 250 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ungefähr 0,5 erreicht ist. Die Zellen werden auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Das Pellet wird im halben Volumen autoklavierten kalten Wassers resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Verfahren wiederholt man so oft, bis das Gesamtvolumen unter 50 ml reduziert ist. Dann werden die Zellen mit 25 ml 15%igem autoklavierten Glycerin resuspendiert, erneut zentrifugiert (3000 rpm, 4°C) und das Zellpellet in 1-2 ml 15%igem Glycerin aufgenommen. Aliquots zu je 50 µl werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

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

Zur Transformation wird ein Aliquot Zellen (ca. 50 µl Zellsuspension) auf Eis angetaut, mit 1 µg Plasmid-DNA oder 7-8 µl eines Ligationsansatzes versetzt und durch sanftes Schnippen vermischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wird das Gemisch in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und die Zellen bei 200 Ω, 2,5 kV, 25 µF transformiert. Nach einer weiteren Minute auf Eis werden die Zellen unter Zusatz von 1 ml SOC-Medium vorsichtig aus der Küvette pipettiert und bei 37°C für 45 min inkubiert. 50 bzw. 300 µl werden auf entsprechende Selektionsagarplatten ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert.

3.2.13.4 Transformation von chemokompetenten *E. coli*

Ein Aliquot der Zellen wird auf Eis angetaut und mit 1-5 μg Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes versetzt und durch sanftes Schnippen vermischt. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen für 90 sek auf 42°C erhitzt und sofort danach wieder auf Eis gekühlt. Nach weiteren 2 min auf Eis werden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 45 min und 37°C inkubiert. Aliquots von 100 und 500 μl werden auf entsprechende Selektionsagarplatten ausplattiert.

3.2.14 Dauerkulturen von *E. coli*

Dazu wird eine Übernachtkultur der Bakterien in LB-Selektionsmedium herangezogen, mit 10% DMSO versetzt und gut gemischt. Diese Mischung wird bei -80°C eingefroren.

3.2.15 Transformation von *Dictyostelium discoideum*

Das Transfizieren von *Dictyostelium discoideum* mit DNA wurde nach dem von *P. K. Howard* entwickelten Verfahren vorgenommen [*Howard et al.* (1988)].

Dictyostelium discoideum-Zellen werden bis zu einer Dichte von $2\text{-}3 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert und 5×10^7 Zellen durch Zentrifugation bei 720 x g geerntet. Sie werden zweimal mit kaltem Soerensen-Phosphatpuffer und einmal mit kaltem Elektroporationspuffer gewaschen.

Man resuspendiert die Zellen in 500 μl eiskaltem Elektroporationspuffer und überführt sie in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette. Nach Zusatz von 15-30 μg der jeweiligen Plasmid-DNA werden die Zellen bei 200 Ω , 0,9 kV, 3 μF und abgeschaltetem externen Widerstand transformiert.

Danach verteilt man die Zellen auf zwei Petrischalen und läßt sie für 10 min bei 21°C absitzen. Anschließend tropft man je Schale 500 μl einer 1 mM CaCl_2 / 1 mM MgCl_2 -Lösung zu und schüttelt die Schalen leicht bei ca. 50 rpm für 10 min.

Es werden 10 ml AX2-Medium zugesetzt und die Zellen bei 21°C inkubiert. Nach wenigen Stunden (2-3 h, maximal ü.N.) wird durch Zugabe von geeigneten Antibiotika ein Selektionsdruck erzeugt.

Ein erster Mediumwechsel erfolgt nach 72 h, dann alle weiteren 48 h, wobei die Konzentration des Antibiotikums zunehmend erhöht werden kann.

Elektroporationspuffer:

50 mM Saccharose

10 mM Kaliumphosphat pH 6,1

3.3 Proteinchemische und immunologische Methoden

3.3.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Zur Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Kulturüberständen der Antikörper-produzierenden Hybridomazellen werden 45 Teile Überstand unter ständigem Rühren bei 4°C mit 55 Teilen kalter gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung versetzt und weiter ü.N. gerührt. Das Präzipitat wird bei 8000 x g abzentrifugiert (20 min, 4°C) und der Niederschlag in ca. 50-100 ml 100 mM Tris/HCl-Lösung pH 8,9 gelöst und ü.N. gegen 100 mM Tris/HCl-Lösung pH 8,9 dialysiert. Das Dialysat wird erneut zentrifugiert (8000 x g, 20 min, 4°C) und das Pellet verworfen. Der Überstand wird mit fester NaCl auf 3 M NaCl gebracht und auf eine mit Waschpuffer äquilibrierte Protein A-Sepharosesäule geladen (1 ml Protein-A-Sepharose CL4B, Pharmacia Biotech). Das Eluat wird aufgefangen und erneut auf die Säule aufgetragen. Man läßt das Eluat ü.N. über die Säule zirkulieren.

Am nächsten Tag wird die Säule mit Waschpuffer so lange gewaschen, bis das Eluat eine OD_{280} unter 0,1 aufweist. Dann werden die Antikörper mit 0,1 M Zitronensäure pH 3,1 eluiert, wobei jede Fraktion sofort mit 50 μl vorgelegter 2 M Tris/HCl pH 9,0 neutralisiert wird. Die Fraktionen mit einer OD_{280} zwischen 0,5 und 1 werden ebenso gepoolt wie die mit einer OD_{280} größer als 1. Fraktionen, die weniger Protein enthalten, werden verworfen. Die Säule wird mit 0,1 M Zitronensäure pH 3,0 regeneriert und mit Waschpuffer äquilibriert. Für denselben Antikörper kann dieselbe Säule mehrfach verwendet werden. Lagerung erfolgt bei 4°C unter Waschpuffer, dem 0,1% Natriumazid zugesetzt wird.

Waschpuffer

100 mM Tris/HCl pH 8,9

3 M NaCl

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese [Lämmli *et al.*(1970)] wurden 6 bis 15%ige Polyacrylamidgele in einer Größe von 7,5 cm x 10 cm x 0,5 cm mit einem 5%igen Sammelgel verwendet. Zu den aufzutrennenden Proteingemischen wurden je nach Bedarf unterschiedliche Mengen 5 x SDS-Probenpuffer gegeben und die Mischung 5 min aufgekocht.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung zwischen 100 und 190 V in einer mit SDS-Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer. Als Gewichtsstandard diente ein geeignetes Gemisch von Proteinen verschiedener, bekannter Molekülmassen.

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Proteine entweder mit Coomassie-Blau (vgl. Kap. 3.3.3) gefärbt oder durch die „Western-Blot“-Methode auf Nitrocellulosemembranen (s. Kap. 3.3.4) transferiert.

	Trenngel					Sammelgel
	6%	8%	10%	12%	15%	5%
Acrylamid 30:0,8 [ml]	11,9	15,8	19,7	23,6	30	3,4
H ₂ O [ml]	31,3	27,4	23,5	19,6	13,2	14,3
1,5 M Tris/HCl pH 8,8 [ml]	16	16	16	16	16	2
10% SDS [μ l]	590	590	590	590	590	200
TEMED [μ l]	23	23	23	23	23	8
10% APS [μ l]	165	165	165	165	165	80

5 x SDS-Probenpuffer

2,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6,5
 4,0 ml 10%iges Natriumdodecylsulfat (SDS)
 2,0 ml Glycerin
 1,0 ml 14,3 M β -Mercaptoethanol
 200 μ l 10% Bromphenolblau-Lösung

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer

0,25 mol Tris
 1,9 mol Glycin
 1% Natriumdodecylsulfat (SDS)
 in 1 l Wasser

Molekülmassenstandards

LMW-Marker (Pharmacia) [kDa]: 94, 67, 43, 30, 20,1, 14,4

HMW-Marker (Pharmacia) [kDa]: 212, 170, 116, 76, 53

3.3.3 Färbung von Acrylamidgelen mit Coomassie-Blau

Fertige SDS-Acrylamid-Proteingele werden für mindestens 15 min in eine Färbelösung gelegt und geschüttelt. Nicht gebundener Farbstoff wird durch Schütteln in Entfärbelösung entfernt. Dabei wird die Lösung mehrfach gewechselt.

<u>Coomassie-Färbelösung</u>	<u>Entfärbelösung</u>
0,1% Coomassie-Brilliant-Blau R 250	10% Ethanol
50% Methanol	7% Essigsäure
10% Essigsäure	

Lösung wird vor Gebrauch filtriert.

3.3.4 Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen („Western-Blot“)

3.3.4.1 Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Halbtrocken-Verfahren

Proteine mit einem Molekulargewicht unter 100 kDa wurden mit dem Semi-Dry-Transfer-Verfahren (Halbtrocken-Transfer) auf Membranen übertragen. Dazu wird das Gel auf eine mit Anodenpuffer II befeuchtete Nitrocellulosemembran überführt und auf zwei mit Anodenpuffer II getränkte 3 MM Whatman-Filterpapiere gelegt. Auf die Anode wird ein in Anodenpuffer I getränktes 3 MM Whatman-Filterpapier gelegt.

Der Stapel mit dem Gel wird blasenfrei auf das Filterpapier auf der Anode der Blotkammer gelegt. Der Stapel wird mit zwei weiteren, in Kathodenpuffer getränkten 3 MM Whatman-Filterpapieren überschichtet. Dann wird die Kammer mit der Kathode verschlossen und der Transfer über 30-45 min bei 10 V durchgeführt.

Anodenpuffer I

300 mM Tris/HCl pH 10,4
0,05% Natriumdodecylsulfat
10% Methanol
in Wasser

Anodenpuffer II

25 mM Tris/HCl pH 10,4
0,05% Natriumdodecylsulfat
10% Methanol
in Wasser

Kathodenpuffer

40 mM Aminocaprylsäure
25 mM Tris/HCl pH 9,4
0,05% Natriumdodecylsulfat
10% Methanol
in Wasser

3.3.4.2 Transfer auf Nitrocellulosemembranen im Naßverfahren

Besonders für große Proteine (>150 kDa) ist das Semi-Dry-Verfahren nicht sehr effizient. Daher werden größere Proteine im Naßverfahren transferiert.

Auf eine aus einem Drahtnetz bestehende Anode werden zwei mit Transferpuffer getränkte 3 MM Whatman-Filterpapiere gelegt. Darauf werden die Nitrocellulosemembran und das Proteingel blasenfrei aufgezogen. Das Gel wird mit zwei weiteren 3 MM Whatman-Filterpapieren abgedeckt und mit der Kathode zusammengedrückt. Um eine gleichmäßige Druckverteilung zwischen Membran und Gel zu gewährleisten, wird unmittelbar an den Elektroden je ein Plastikschwamm mit eingebunden.

Der Transfer erfolgt in einer mit Transferpuffer gefüllten BlotKammer ü.N. bei 4°C und 15-20 V. Dabei wird der Puffer ständig gerührt, um lokale Erhitzungen zu vermeiden.

Transferpuffer

190 mM Glycin
25 mM Tris/HCl pH 9,4
0,02% Natriumdodecylsulfat
10% Methanol

3.3.4.3 Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Nach erfolgtem Blot werden die Proteine reversibel mit Ponceau-S-Farbstoff gefärbt. Dies soll einerseits die Kontrolle über die Effizienz des Blottens gewährleisten, andererseits auch die Möglichkeit bieten, den Gewichtsmarker zu kennzeichnen.

Die Nitrocellulosefilter werden dazu für 1-5 min in Ponceau-Färbelösung gelegt und geschüttelt. Anschließend werden sie kurz unter fließendem Wasser abgespült. Sobald Proteinbanden sichtbar werden, werden die Banden des Gewichtsmarkers mit Kugelschreiber dauerhaft markiert und gewöhnlich ihre Spur abgeschnitten. Die vollständige Entfärbung der Membran erfolgt durch mehrfaches Waschen mit PBS-Puffer.

Ponceau-S Färbelösung

2 g Ponceau S-Farbstoff, gelöst in

100 ml 3% Trichloressigsäure

3.3.5 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Membranen

Die Nitrocellulosemembranen nach einem erfolgten Western-Blot werden für mindestens 2 h bei RT oder ü.N. bei 4°C in einer Lösung von 4% Magermilchpulver in PBS geschüttelt, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Dann wird die Membran kurz mit etwas PBS abgespült und eine Antikörperlösung in geeigneter Verdünnung oder direkt Hybridomaüberstand zu der Membran gegeben und für 1 bis 16 Stunden bei RT inkubiert. Die Membran wird mindestens fünfmal mit viel PBS gewaschen, um die Primärantikörperlösung vollständig zu entfernen. Die Inkubation mit Zweitantikörper wird für eine Stunde durchgeführt, der in PBS geeignet verdünnt wird. Die Zweitantikörperlösung wird durch mindestens sechsfaches Waschen mit PBS gründlich abgespült.

Die Membran wird mit der Proteinseite nach oben auf eine Cellophanfolie gelegt und mit einem Papiertuch sanft trockengetupft. Darauf wird 1 ml Luminollösung pipettiert und verteilt. Nach 2 min wird die Lösung abgetupft, Cellophanfolie glatt auf die Membran gelegt und der Blot in einer mit Verstärkerfolie beschichteten Röntgenkassette mit einem Röntgenfilm exponiert. Die Dauer der Exponierung hängt von der Konzentration der Proteine auf der Membran und der Güte der Antikörper ab und beträgt zwischen wenigen Sekunden und über 30 Minuten. Nach Ablauf dieser Zeit ist das in der Luminollösung vorhandene Wasserstoffperoxid umgesetzt oder zerfallen.

Luminollösung

2 ml 1M Tris/HCl pH 8,0

200 μ l 3-Aminonaphtylhydrazid (0,25 M in DMSO)

89 μ l p-Cumarsäure (0,1 M in DMSO)

18 ml Wasser

6,1 μ l 30%ige H₂O₂-Lösung

3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Lösungen wird nach der von *M.M. Bradford* beschriebenen Methode durchgeführt [*Bradford (1976)*]. Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant-Blau an Proteine. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs verschiebt sich dabei von 465 nm nach 595 nm. Zur Erstellung einer Eichkurve wird Rinderserumalbumin verwendet.

33 μ l Proteinlösung werden mit 33 μ l Wasser verdünnt und 1 ml Bradford-Reagenz (Sigma) hinzugesetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT wird die Extinktion bei 595 nm spektralphotometrisch bestimmt.

3.3.7 Aufschluß von *Dictyostelium discoideum*-Zellen und Fraktionierung

Diese Methode ist eine Abwandlung der von *Prassler* beschriebenen Methode [*Prassler et al. (1997)*].

$1-2 \times 10^8$ *Dictyostelium discoideum*-Zellen in axenischem Wachstum werden geerntet und zweimal mit 4°C kaltem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Die vom Medium befreiten Zellen werden in 1 ml auf Eis gekühltem TMKS-Puffer, dem ein Protease-Inhibitor-Cocktail (10 μ g/ml jedes Inhibitors) zugesetzt wurde, aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen werden durch dreimaliges Pressen durch einen Nucleopore-Filter (Ø der Poren 5 μ m) geöffnet. Die Zerstörung der Zellen erfolgt mechanisch durch Scherkräfte. Die Vollständigkeit der Lyse wird unter dem Mikroskop beurteilt.

Das Lysat wird sofort auf Eis gekühlt. Die Fraktionierung erfolgt durch Zentrifugation bei 100000 x g und 4°C für eine Stunde. Danach befinden sich die Membranbestandteile und

Kerne im Pellet, während zytosolische Proteine im Überstand gelöst bleiben. Der Überstand wird abgenommen und das Sediment zweimal mit je 1 ml eiskaltem TMKS-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 100000 x g und 4°C für 15 min). Dann wird das Sediment in 1 ml eiskaltem TSA-Puffer, der mit 0,1% Triton X-100 versetzt wird, resuspendiert und erneut für 1 h bei 4°C und 100000 x g zentrifugiert. Membranassoziierte Proteine werden dabei gelöst, während stark hydrophobe Proteine (wie die meisten transmembranalen Proteine) sowie schwere Bestandteile (Mitochondrien, Lysosomen, Kerne etc.) im Sediment verbleiben.

TMKS-Puffer

50 mM Tris/HCl pH 7,4
5 mM Mg Cl₂
25 mM KCl
250 mM Saccharose

TSA-Puffer

100 mM Tris/HCl pH 8,0
140 mM NaCl
0,02% NaN₃
Protease-Inhibitor-Cocktail (kurz vor Gebrauch zugeben, 10 µg/ml jedes Inhibitors)

3.3.8 Kopplung von Antikörpern an CNBr-Sepharose

Die Kopplung von Antikörpern (in dieser Arbeit der mAk-260-60-10 *anti*-Interaptin-Antikörper) an CNBr-aktivierte Sepharose (Pharmacia Biotech) erfolgt gemäß der vom Hersteller angegebenen Vorschrift. Bindungsstellen, die nach der Antikörperkopplung unbesetzt sind, werden mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0 abgesättigt.

3.3.9 Immunpräzipitation von Interaptin aus *Dictyostelium discoideum*-Extrakten

Zur Immunpräzipitation werden 1×10^8 abpD⁺⁺-Zellen wie unter Kap. 3.3.7 beschrieben geerntet, aufgeschlossen und fraktioniert.

Der Überstand im zweiten Fraktionierungsschritt enthält die gelösten, *in vivo* membranassoziierten Proteine, und darunter auch Interaptin (vgl. Ergebnisse, Kap. 4.6). Dieser Überstand (ca. 1 ml) wird mit 20-40 µl suspendierter Antikörper-gekoppelter Sepharose versetzt und für mindestens 1 h im Kühlraum (4-7°C) langsam im Rotationsschüttler geschüttelt.

Die Sepharose wird anschließend pelletiert (Biofuge Fresco, 1000 rpm, 30 sec, 4°C) und

mit 200 μl TSA-Puffer gewaschen (zu TSA-Puffer vgl. Kap. 3.3.7). Je 30 μl Sepharosebeads werden mit 5 μl SDS-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und auf ein Acrylamidgel aufgetragen (vgl. Kap. 3.3.2).

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Fixierung von *Dictyostelium*-Zellen

Zum Nachweis der intrazellulären Verteilung von Proteinen werden Zellen fixiert und mit monoklonalen Antikörpern markiert. Anschließend wird die Verteilung des primären Antikörpers mit einem Zweitantikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, sichtbar gemacht. Zellkerne werden mit dem Farbstoff 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) markiert.

Zur Fixierung wird eine Methode verwendet, die erfahrungsgemäß das Zytoskelett der Zellen weitgehend intakt läßt.

Zellen der Wachstumsphase werden bis zu einer Zelldichte von etwa 2×10^6 angezogen und geerntet. Dazu werden die Zellen abzentrifugiert (4 min, 780 x g, 4°C) und mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Mit Soerensen-Puffer werden die Zellen auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Zellen im Entwicklungsstadium spült man von Phosphatagarplatten mit Soerensen-Puffer ab und trennt sie durch mehrfaches Pipettieren durch eine kleine Pipettenspitze voneinander. Die Zellen werden zentrifugiert, gewaschen und ebenfalls auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml mit Soerensen-Phosphatpuffer eingestellt.

Je 200 μl dieser Zellsuspension werden auf Deckgläser (\varnothing 18 mm) pipettiert, die auf eine mit Parafilm ausgelegte ebene Fläche gelegt wurden. Die Zellen läßt man 15 min absitzen und zieht den Puffer dann vorsichtig ab. Die Zellen werden entweder mit 200 μl kaltem Methanol überdeckt und für 15 min bis 30 min bei RT inkubiert, oder die Deckgläser werden für 10 min in -20°C kaltes Methanol eingelegt.

Die fixierten Deckgläser werden vom Methanol befreit und die Zellen mit PBS rehydratisiert. Der Puffer wird mindestens einmal gewechselt, um Reste des Methanols zu beseitigen.

3.4.2 Fixierung von phagozytierenden *Dictyostelium discoideum*

Um *Dictyostelium discoideum*-Zellen während des Vorgangs der Phagozytose zu fixieren, werden Zellen aus axenischem Wachstum geerntet (4 min, 780 x g, 4°C), mit Soerensen-Puffer gewaschen und auf eine Dichte von etwa 1×10^6 Zellen/ml mit Soerensen eingestellt. Die Zellen werden für eine Stunde in diesem Puffer geschüttelt (160 rpm, 21°C).

200 μ l der Zellsuspension werden auf Deckgläser (\emptyset 18 mm) pipettiert, die auf eine mit Parafilm ausgelegte ebene Fläche gelegt wurden. Die Zellen läßt man 15 min absitzen und zieht den Puffer dann vorsichtig ab. Die Zellen werden mit 200 μ l PBS-Puffer überdeckt. Man pipettiert 0,5 μ l einer Suspension von Hitze-inaktivierter, TRITC-markierter Hefe hinzu, verteilt sie vorsichtig und verdunkelt die Zellen.

Nach 20 min bei 21°C wird der Puffer entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und sofort Methanol hinzupipettiert (ca. 200 μ l). Nach 30 min Inkubation bei 21°C im Dunkeln wird das Methanol entfernt und die Zellen mit PBS für 10 min rehydratisiert. Der Puffer wird mindestens einmal gewechselt, um Reste des Methanols zu beseitigen.

TRITC-markierte Hefe

Für die Markierung von Hefen wird ein Pellet von 1×10^{10} -hitzegetöteter Hefe-Zellen (vgl. unten) in 20 ml 50 mM Na_2HPO_4 pH 9,2 resuspendiert, dem 2 mg TRITC (Sigma) zugesetzt wurden. Die Hefen werden für 30 min bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen mindestens zweimal mit 50 mM Na_2HPO_4 pH 9,2 und viermal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Aliquots von 1×10^9 -Zellen/ml werden bei -20°C eingefroren.

Hitzegetötete Hefe

5 Gramm Trockenhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma) werden in 50 ml PBS-Puffer in einem 100 ml Erlenmeyerkolben resuspendiert und unter Rühren für 30 min in einem kochenden Wasserbad inkubiert.

Danach werden die Zellen geerntet und fünfmal mit PBS-Puffer und zweimal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Letztlich werden die Zellen in einer Konzentration von etwa 10^9 Zellen/ml in Soerensen-Puffer aufgenommen und in 1 ml-Aliquots bei -20°C eingefroren.

3.4.3 Fixierung entwickelter *Dictyostelium discoideum*

Zur Fixierung von *Dictyostelium discoideum* in multizellulären Entwicklungsstadien werden Zellen von *D. discoideum* wie in Kap. 3.1.5 beschrieben auf Phosphatagarplatten entwickelt. Ist das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht, so werden die Zellen, Slugs oder Fruchtkörper zweimal mit je 1 ml kaltem Methanol vorsichtig abgespült und in ein 2,2 ml-Reagiergefäß pipettiert. Vorzugsweise ist eine Pipette mit möglichst großer Öffnung zu verwenden, damit die Zellaggregate wenig mechanischer Beanspruchung beim Pipettiervorgang ausgesetzt sind und nicht auseinandergerissen werden.

Das Reagiergefäß wird in horizontaler Position auf einem Rotationsschüttler bei 10-20 rpm und RT 1 h geschüttelt. Anschließend wird die Zellsuspension in Aliquots zu je 200 μ l auf Deckgläser pipettiert, die auf einer ebenen, mit Parafilm ausgelegten Fläche liegen. Nach 15 min sind die Präparate abgesessen und das Methanol kann abgezogen werden. Die Zellen werden mit wenig PBS überschichtet und rehydratisiert. Nach 10 min wird das PBS abgezogen und die Präparate wie unter Kap. 3.4.4.1 beschrieben auf Objektträger aufgezogen.

3.4.4 Quetschpräparate von Slugs auf agarbeschichteten Deckgläsern

Deckgläschen (rund, \varnothing 12 mm oder \varnothing 18 mm, oder viereckig, 18 mm x 18 mm) werden auf eine angewärmte Phosphatagarplatte gelegt und mit heißer, 1:10 verdünnter Phosphatagarlösung dünn überzogen. Auf diese Platte gibt man 1×10^7 axenisch gewachsene *Dictyostelium discoideum*-Zellen und läßt sie sich ca. 15 h ü.N. bei 21°C entwickeln.

Die Deckgläser mit den Slugs (bzw. Fruchtkörpern bei längerer Entwicklungsdauer) werden vorsichtig abgenommen, auf einer mit Parafilm ausgelegten ebenen Fläche abgelegt und mit ca. 300 μ l eiskaltem Methanol fixiert. Nach 15 min saugt man das Methanol ab und rehydratisiert das Präparat mit PBS-Puffer.

3.4.4.1 Einbettung von fixierten Zellen in Gelvatol

Nach Fixierung von Zellen oder Zellaggregaten werden die Präparate auf Objektträger in Gelvatol eingebettet. Dazu werden $\sim 100 \mu$ l umfassende Tropfen Gelvatol auf einen Objektträger pipettiert (je nach Größe der Deckgläser 2 oder 3). Die fixierten Präparate werden

mit einem angelegten Papiertuch durch Kapillarwirkungen des Papiers von ihrer Flüssigkeit weitgehend befreit und mit der Präparatseite luftblasenfrei auf das Gelvatol gelegt. Die Trocknung erfolgt ü.N. bei RT im Dunkeln, um fluoreszierende Marker vor Licht zu schützen.

3.4.5 Phototaxis

Dictyostelium discoideum werden von einer dicht bewachsenen Petrischalenkultur abgespült und in einer Schüttelkultur mit 30 ml AX2-Medium angesetzt. Nach 48 h werden die Zellen auf 1×10^6 /ml verdünnt und weitere 24 h in der Schüttelkultur belassen.

Die Zellen werden geerntet, zweimal mit Soerensen Phosphatpuffer gewaschen und 10^6 Zellen in maximal 30 μ l Soerensenpuffer aufgenommen. In die Mitte von frischen (am Vortag gegossenen) Wasseragarplatten werden mittels 1-ml-Micropipettenspitzen leichte Ringe gedrückt. In diese gibt man je 5×10^5 Zellen und läßt sie leicht antrocknen. Bei der Kontrolle werden mehrere Mutanten neben dem Wildtyp auf einer Platte aufgetragen. Die Platten werden mit schwarzer Plastikfolie umhüllt und mit Hilfe eines Skalpell ein schmaler (1-2 mm) Lichtschlitz (außer bei der Dunkelkontrolle) über die gesamte Höhe des Plattenturms geschnitten. Der Stapel wird waagrecht bei 21°C für 48 h gelagert.

Anschließend wird der Lichtschlitz auf den Platten markiert, die Folie abgenommen und ein Nitrocellulosefilter glatt auf jede Agarplatte gelegt. Nach 2 min wird der Filter abgezogen und mit Färbelösung angefärbt, mit etwas Wasser abgespült und mit Entfärbelösung gewaschen. Die entwickelten Filter werden luftgetrocknet und ausgewertet.

Färbelösung: 0.1% Amidoschwarz in 25% Isopropanol, 10% Essigsäure,
 64,9% Wasser

Entfärbelösung: 25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 65% Wasser

3.4.6 Wachstumsbestimmungen von *Dictyostelium*

3.4.6.1 Wachstumskurven unter Normalbedingungen

Zur Sicherstellung einer statistisch repräsentativen Messung setzt man jede Mutante in mindestens 2, eher 3-4 Proben an. Als Standard dienen AX-2-Zellen, die jeweils mitvermesen werden. Das Medium wurde jeweils für alle Kulturen aus nur einer frisch autoklavierten Vorratsflasche entnommen, um gleiche Bedingungen für alle Proben zu gewährleisten.

Zur Bestimmung von Wachstumskurven von *Dictyostelium discoideum* unter Normalbedingungen werden Zellen in einer bestimmten Dichte (6×10^3 bis 1×10^5 Zellen/ml) in AX2-Medium (15 ml) angesetzt und bei 21°C und 160 rpm inkubiert. In regelmäßigen Abständen (12-14 Stunden mit gelegentlichen Zwischenmessungen) bestimmt man die Zelldichte, bis die Zellzahl wieder sinkt (d.h., daß das axenische Wachstum beendet ist und das stationäre Stadium beginnt).

Wachstum bei veränderter Temperatur Die Inkubation der Zellen erfolgte zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit bei 27°C in einem Inkubator. Für die Bestimmung der Wachstumskurven bei 15°C befanden sich die Proben in einem Inkubator, der im Kühlraum aufgestellt war. Alle Proben wurden jeweils mit 160 rpm geschüttelt.

Wachstum bei veränderten osmotischen Bedingungen Zur Bestimmung der Wachstumskurven bei verschiedenen osmotischen Bedingungen wird das Medium zusätzlich auf 30 mM NaCl oder 115 mM Sorbitol gebracht. Inkubation erfolgt jeweils bei 21°C und 160 rpm.

3.4.6.2 Wachstum in Bakteriensuspension

D. discoideum-Zellen werden dazu aus axenischer Kultur geerntet und zweimal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Die Zelldichte wird bestimmt und die benötigte Menge Zellen in 15 ml einer Suspension von *Klebsiella aerogenes* in Soerensen-Puffer ($OD_{600} = 10^8$) gegeben. Die Zellen werden wie im Kap. 3.4.6.1 beschrieben inkubiert und gezählt.

Herstellung der *Klebsiella aerogenes*-Suspension

Zellen aus einer 3 l Übernachtskultur von *Klebsiella aerogenes* in LB-Medium werden durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend werden die Bakterien in ca. 500 ml Soerensen-Puffer resuspendiert und autoklaviert. Bei der abgetöteten Bakteriensuspension wird die OD_{600} bestimmt. Anschließend wird sie aliquotiert (je 50 ml) und bei -20°C gelagert.

Für die Phagocytosewachstumskurven wird die benötigte Menge Bakterien aufgetaut und mit Soerensen-Phosphatpuffer auf eine ungefähre theoretische $OD_{600} = 6,0$ eingestellt. Dazu wird die Lösung entsprechend verdünnt und zurückgerechnet.

3.4.6.3 Fraßhofbestimmungen

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit von *D. discoideum* auf einem Bakterienrasen von *Klebsiella aerogenes* werden Bakterien auf SM-Agarplatten ausgestrichen (vgl. Kap. 3.1.2).

In die Mitte der Platte werden entweder 1-2 μl einer axenisch wachsenden Flüssigkultur von *Dictyostelium discoideum* pipettiert, oder es werden von einer mit *Dictyostelium* bewachsenen SM-Agarplatte mittels eines sterilen Zahnstochers aus dem Fraßrand einer Kolonie Zellen übertragen.

Die Platte wird bei 21°C für bis zu 10 Tage inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen (ca. alle 12 Stunden) wird der Durchmesser des im Regelfall runden Fraßhofes der neu wachsenden *Dictyostelium*-Kolonie mit einem Lineal ausgemessen. Bei leichter Abweichung von der ideal-runden Form wird der Durchmesser in mehreren Richtungen gemessen und gemittelt. Sind die Abweichungen sehr groß (zum Beispiel wegen Unregelmäßigkeiten des Bakterienrasens), so werden die Platten verworfen.

3.4.7 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Phagozytose von Hefen durch *Dictyostelium discoideum*

D. discoideum aus einer axenisch gewachsenen Flüssigkultur werden geerntet (780 x g, 4°C, 2 min), zweimal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und auf eine Dichte von ungefähr 5×10^5 Zellen/ml im gleichen Puffer eingestellt.

Ein Deckglas (\varnothing 18 mm) wird mit etwas Siliconfett auf einen Kunststoffring etwas geringeren Durchmessers geklebt und 400 μl der Zellsuspension in die Vertiefung gegeben.

Nach 10-15 min sind die Zellen abgesessen und werden unter einem inversen konfokalen LaserScan-Mikroskop fokussiert. Dann wird 1 μl einer TRITC-markierten Hefesuspension (vgl. Kap. 3.4.2) zu der Lösung gegeben und sofort unter dem Mikroskop beobachtet. Die Hefezellen sinken schnell auf das Deckglass ab, und phagozytierende *D. discoideum* können beobachtet werden. Der Vorgang wird durch eine Serie von Bildern dokumentiert.

3.4.8 Phagozytoseassay mit TRITC-markierten Hefen

Diese Methode beruht auf einer von *Maniak* vorgeschlagenen Änderung der ursprünglich von *Hed* beschriebenen Methode [*Maniak et al.* (1995), *Hed* (1986)].

Dictyostelium discoideum-Zellen werden bis zu einer Dichte von $2\text{-}3 \times 10^6$ Zellen/ml in axenischem Medium über mindestens 5 Generationen herangezogen (mehr als 80 h, Schüttelkultur). Die Zellen werden bei RT geerntet (zentrifugieren bei 2000 rpm, Sorvall RT-7, 2 min) und in frischem AX2-Medium in einer Dichte von 2×10^6 bei 21°C aufgenommen. 10 ml dieser Suspension werden in einen 30 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit dem fünffachen Überschuß TRITC-markierter Hefe versetzt (das entspricht 100 μ l Hefesuspension, deren Präparation in Kapitel 3.4.2 beschrieben wurde). Die Zellen werden bei 160 rpm und 21°C inkubiert. Als Hintergrund dienen *Dictyostelium discoideum*, denen keine Hefen zugesetzt werden.

Zu ausgewählten Zeitpunkten (0, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 min) wird jeweils eine 1 ml-Probe gezogen und mit 100 μ l Trypan-Blau-Lösung gemischt. Die Probe wird 3 min geschüttelt, anschließend die Zellen pelletiert und der Überstand vorsichtig, aber vollständig entfernt. Das Pellet wird in 1 ml Soerensen-Puffer resuspendiert und sofort in einem Fluorimeter vermessen (Anregungswellenlänge: 544 nm, Emissionswellenlänge 574 nm).

3.4.9 Untersuchung der Sporenkeimung

Zur Untersuchung der Keimfähigkeit von *Dictyostelium*-Sporen werden Zellen auf Phosphatagarplatten entwickelt (Kap. 3.1.3).

Die Sporen werden frisch geerntet in Soerensen-Puffer aufgenommen und gezählt. SM-Agarplatten werden mit *Klebsiella aerogenes* bestrichen und je 200 Sporen auf der Platte verteilt. Nach 2 bis 3 Tagen sind die ersten Kolonien von *Dictyostelium discoideum* als durchscheinende Punkte im dichten Bakterienrasen zu erkennen.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Erzeugung von $abpD^{++}$

4.1.1 Konstruktion des Überexpressionsvektors

Zur Konstruktion des Überexpressionsvektors wurde ein DNA-Fragment vor dem *abpD*-Promotor sowie ein Fragment der codierenden Sequenz von *abpD* zusammen mit dem A15P-Aktin-Promotor sowie der in *Dictyostelium* exprimierten Blasticidin-Resistenzkassette (*bsr*) in mehreren Schritten in einen pUC-19-Vektor kloniert. Der A15P-Aktin-Promotor und die *bsr*-Kassette wurden unmittelbar vor das Startcodon ATG des *abpD*-Gens kloniert (vgl. Abb. 4.1 b.).

Durch homologe Rekombination des mittels Elektroporation in AX-2-Zellen eingeführten Vektors soll es zur Insertion der Blasticidinkassette vor das natürliche *abpD*-Gen kommen. (Abb. 4.1 c.).

Der A15P-Promotor soll in seiner Position vor dem Startcodon des *abpD*-Gens auf dieses einwirken, wodurch Interaptin in hoher Konzentration in jeder Phase des Lebens von $abpD^{++}$ -Zellen exprimiert werden soll.

4.1.2 Verifizierung der homologen Rekombination zu $abpD^{++}$

Um die erfolgreiche Rekombination zu beweisen, wurde ein Southern-Blot mit genomischer DNA von AX-2 und $abpD^{++}$ angefertigt, bei der als Sonde der als P1 bezeichnete Sequenzteil verwendet wurde (vgl. Abb. 1.2). Im Southern-Blot ist die Verschiebung der endogenen Bande der AX-2-Spur bei 2,9 kB auf etwa 1 kB bei der $abpD^{++}$ -Spur zu sehen,

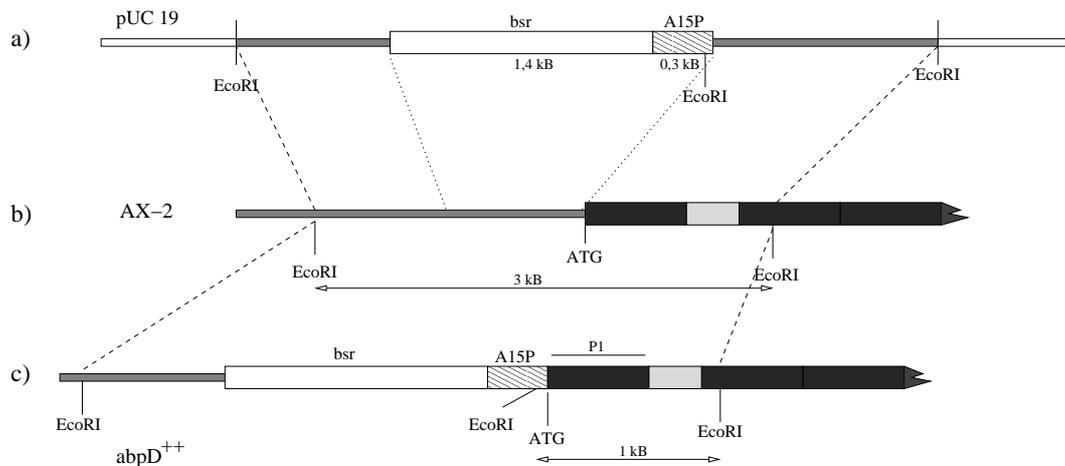


Abbildung 4.1: Schematische Übersicht über die Konstruktion von *abpD*⁺⁺. Die schmalen, grauen Streifen stellen genomische Sequenz von *Dictyostelium* AX-2 dar. Die breiten, schwarzen Streifen deuten die kodierende Sequenz des Interaptgens an, der breite hellgraue Bereich das erste Intron. a: Konstrukt des pUC 19 Vektors mit dem Promotor A15P (schraffiert) und der Blastizidin-Resistenzkassette bsr (weiß); b: Organisation des *abpD*-Wildtyp-Gens; c: Struktur des homolog rekombinierten *abpD*⁺⁺-Gens

der der durch die Insertion einer zusätzlichen EcoRI-Restriktionsschnittstelle im Bereich des Startcodons erwarteten entspricht (Abb. 4.2).

Ein Northern-Blot (Abb. 4.3) wurde angefertigt, um die Expression auf RNA-Ebene zu

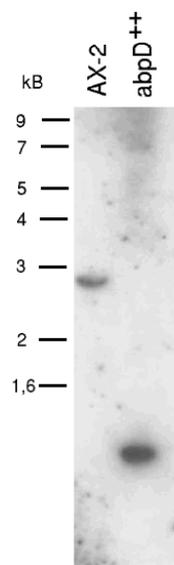


Abbildung 4.2: Southern-Blot. Genomische *Dictyostelium*-DNA aus AX-2 sowie *abpD*⁺⁺, enzymatisch verdaut mit EcoRI, wurde mit Sonde P1 hybridisiert. Die endogene Bande bei 2,9 kB (AX-2) wurde durch eine 1 kB-Bande ersetzt (*abpD*⁺⁺).

beweisen. Dazu wurde RNA aus AX-2-Zellen bei t_0 und t_{12} sowie aus $abpD^-$ -Zellen bei t_{15} zusammen mit RNA aus drei Klonen von $abpD^{++}$ -Zellen isoliert und im Northern-Blot mit der Sonde P2 (vgl. Abb. 1.2) hybridisiert.

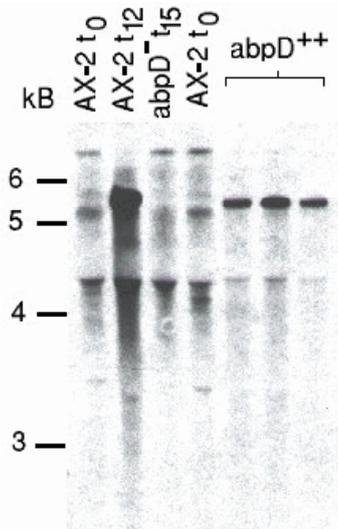


Abbildung 4.3: Northern-Blot mit je 30 μg Gesamt-RNA aus AX-2 t_0 , AX-2 t_{12} , $abpD^-$ t_{15} und $abpD^{++}$, hybridisiert mit Sonde P2.

Die intensive Bande bei 5,4 kB, die bei AX-2 t_{12} sichtbar ist, jedoch bei AX-2 t_0 und $abpD^-$ t_{15} fehlt, gehört zur RNA des Interaptins. Bei allen drei $abpD^{++}$ -RNAs ist eine etwas kleinere Bande vorhanden. Da der genaue Transkriptionsstart von *abpD* nicht bekannt ist, fehlen wahrscheinlich nicht-translatierte Regionen. Die RNA dieser Zellen wurde bei t_0 isoliert, was beweist, daß diese Zellen außerhalb des normalen Zeitraumes Interaptin im einzelligen Stadium exprimieren.

Bei den AX-2- und $abpD^-$ -Zellen ist ebenfalls eine Bande bei etwa 5,2 kB sichtbar. Das hierzu gehörende Protein ist vermutlich eine Spleißvariante von Interaptin, der die Aktin-Bindungsdomäne zumindest teilweise fehlt.

Die Resistenz der $abpD^{++}$ -Zellen gegen Blasticidin belegt das Vorhandensein und die Funktionalität der insertierten *bsr*-Kassette. In Western-Blots wurden die Transformanten untersucht und die Expression von Interaptin festgestellt.

4.1.3 Immunfluoreszenz an *Dictyostelium discoideum*

Zur Verifizierung der subzellulären Verteilung von Interaptin wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen an AX-2, $abpD^-$ und $abpD^{++}$ vorgenommen.

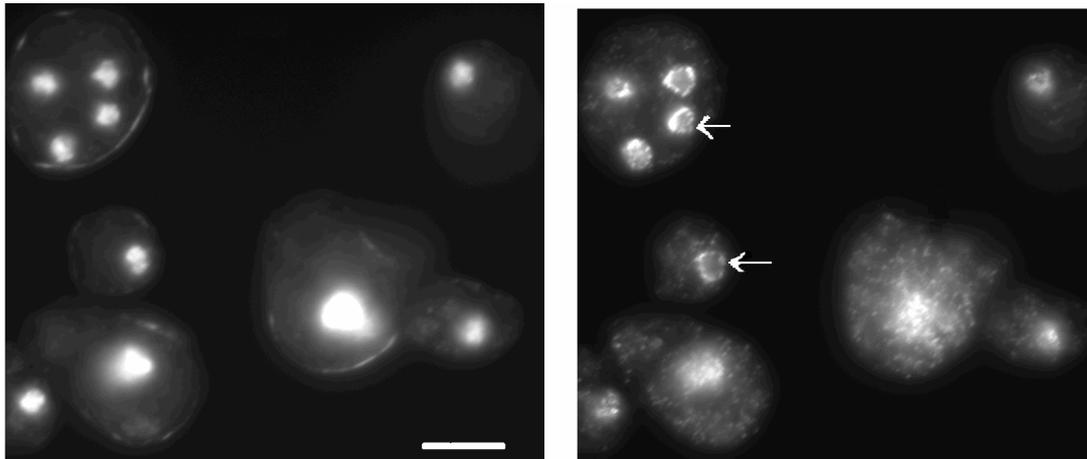


Abbildung 4.4: Immunfluoreszenzaufnahme von Methanol-fixierten abpD⁺⁺-Zellen mit mAk-260-60-10 als primärem Antikörper und einem Cy3-markierten Zweitantikörper. Links: DAPI-Färbung der Zellkerne. Rechts: Cy3-Färbung von Interaptin. Pfeile bezeichnen Interaptinaggregation an der Nukleusmembran. Balken: 5 μm

Abbildung 4.4 zeigt abpD⁺⁺-Zellen. Die subzelluläre Verteilung von Interaptin zeigt eine deutliche Aggregation um die Zellkerne herum (Pfeile). Diese Lokalisierung spricht für eine Bindung an Zellmembranen und/oder das endoplasmatische Retikulum in Zellkernnähe.

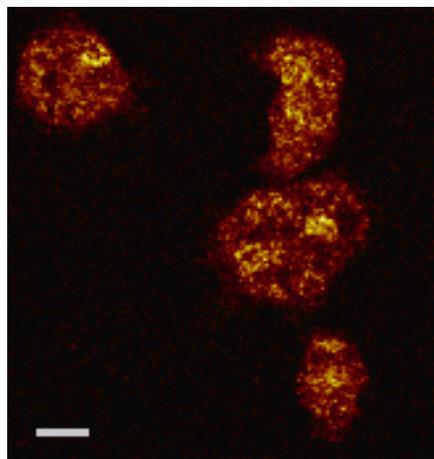


Abbildung 4.5: Immunfluoreszenzaufnahme von AX-2-Zellen mit CY3-Färbung von Interaptin. Balken: 5 μm

Eine vesikuläre Verteilung findet sich über die Zelle verstreut, zusätzlich zu einer sehr schwachen zytosolischen Färbung. Eine Zellmembranfärbung fehlt. Die Hauptmenge des Interaptins aggregiert an die Nukleusmembran sowie an die Membranen des endoplasmatischen Retikulums.

AX-2-Zellen zeigten eine schwache Färbung, die relativ lange Belichtungszeiten erforderte. Diese Fluoreszenz könnte auf die konstitutiv exprimierte Interaptinvariante zurückzuführen sein. Die Verteilung entspricht der bei abpD⁺⁺ gefundenen (Abb. 4.5).

4.2 Charakterisierung der abpD⁻- und abpD⁺⁺-Mutanten

4.2.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Zellen von abpD⁻ und abpD⁺⁺, die in Flüssigschüttelkultur angezogen werden, weisen in Form und Größenverteilung keine augenfälligen Unterschiede auf. Auch im Vergleich mit dem Wildtyp AX-2 sind visuell keine auffallenden morphologischen Unterschiede einzeln lebender Zellen zu bemerken.

4.2.2 Entwicklung von *D. discoideum*-Mutanten auf Phosphatagarplatten

Zum Vergleich der Entwicklung von AX-2 sowie der Interaptin überexprimierenden Mutante abpD⁺⁺ und der Interaptin-defizienten Mutante abpD⁻ wurden die Zellen auf Phosphatagarplatten entwickelt und ihr Entwicklungsstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten dokumentiert (Abb. 4.6).

Die Zellen von AX-2 haben nach 15 h ihre Aggregationsphase abgeschlossen (mounds) und beginnen sich zu Slugs zu formieren. Die Mutante abpD⁺⁺ ist geringfügig weiter fortgeschritten, da schon mehr Aggregate die typische „Hütchenform“ beginnender Slugs zeigen. Die abpD⁻-Mutante hingegen ist deutlich fortgeschrittener in ihrem Entwicklungsstadium. Hier sind praktisch alle Aggregate bereits im Slugstadium elongiert.

Nach 23 h sind die Verhältnisse bezüglich des Zeitunterschieds ähnlich. Während die Zellen des Wildtyps teilweise kulminieren, um Sporen auszubilden, ist dieser Prozeß bei den abpD⁻-Mutanten überwiegend abgeschlossen. Die Interaptin-überexprimierende Mutante abpD⁺⁺ hat ebenfalls größtenteils den Entwicklungszyklus abgeschlossen und Fruchtkörper gebildet.

Ein Vergleich der Größe und Form der Fruchtkörper aller drei Arten zeigt, daß die Größenverteilung beim Wildtyp AX-2 gleichmäßiger erscheint als bei beiden Mutanten. Besonders bei abpD⁻ sind häufig kleinere und unregelmäßig verteilte Fruchtkörper zu beobachten.

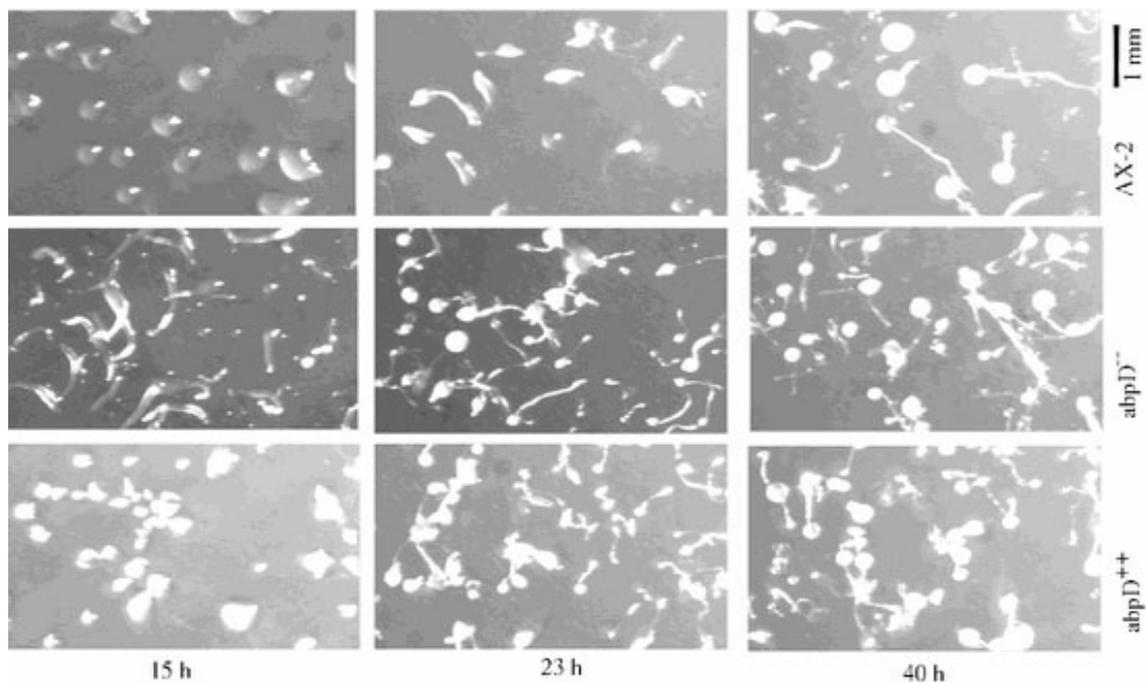


Abbildung 4.6: Vergleich der Entwicklung von AX-2, abpD⁻ und abpD⁺⁺ auf Phosphatagarplatten. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ ausgewählt aus vier unabhängig durchgeführten und dokumentierten Experimenten.

4.2.3 Vergleich des Wachstums auf *Klebsiella aerogenes*-Rasen

Sporen der Stämme AX-2, abpD⁻ und abpD⁺⁺ wurden auf mit *Klebsiella aerogenes* bewachsenen Agarplatten ausplattiert und die Bildung der Fraßhöfe dokumentiert. Es fällt auf, daß die Interaptin-defiziente Mutante abpD⁻ im gleichen Zeitraum erheblich größere Fraßhöfe als sowohl der Wildtyp wie auch die Interaptin-überexprimierende Mutante abpD⁺⁺ bildet.

Fünf Tage nach Ausplattierung der Sporen haben die Kolonien des Wildtyps und abpD⁺⁺ einen durchschnittlichen Durchmesser von 3-4 mm, wobei die Kolonien der Interaptin-überexprimierenden Mutante eine etwas größere Varianz aufweisen (Abb. 4.7, S. 63). Ihre Kolonien zeigen unregelmäßigere Hofgrößen (1-4 mm), was in diesem Fall auch auf eine unregelmäßigere Keimung hindeuten könnte. Die Kolonien der defizienten Mutante abpD⁻ hingegen haben bereits Durchmesser von ca. 1 cm, was im Schnitt der dreifachen Größe entspricht.

Dieser Befund wurde quantitativ gemessen (Abb. 4.8). Die Interaptin-überexprimierende

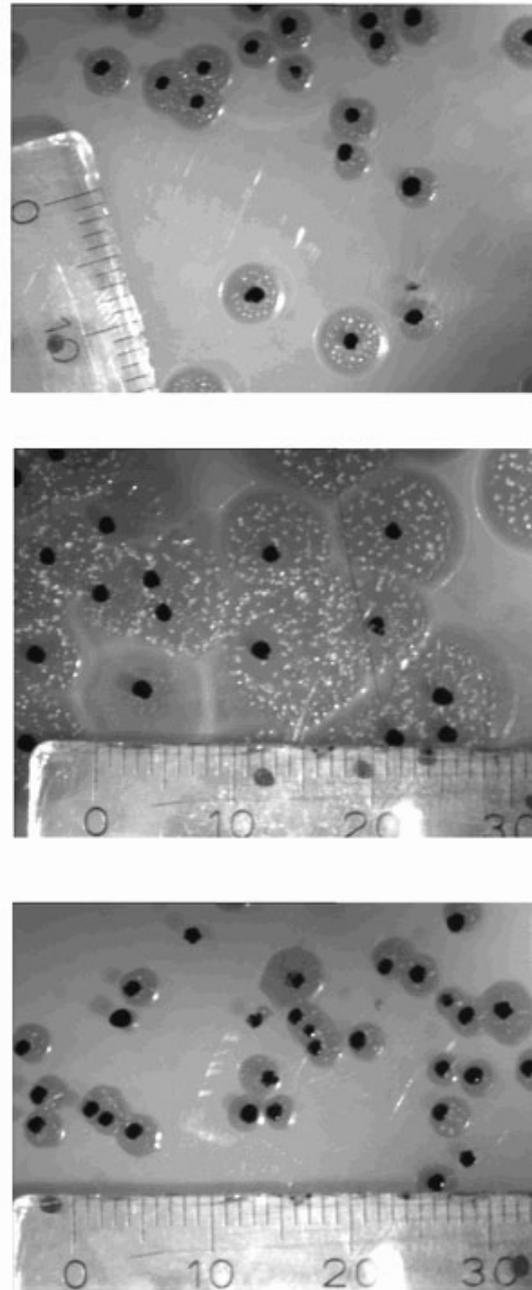


Abbildung 4.7: Kolonien von *D. discoideum* Wildtyp AX-2, *abpD*⁻ und *abpD*⁺⁺ (von oben). Die Bilder entstanden 5 Tage nach Ausplattierung von Sporen. Ein Lineal im jeweils unteren Bildbereich zeigt die Größenverhältnisse. Die schwarzen Markierungen dienen zur Kennzeichnung einzelner Kolonien.

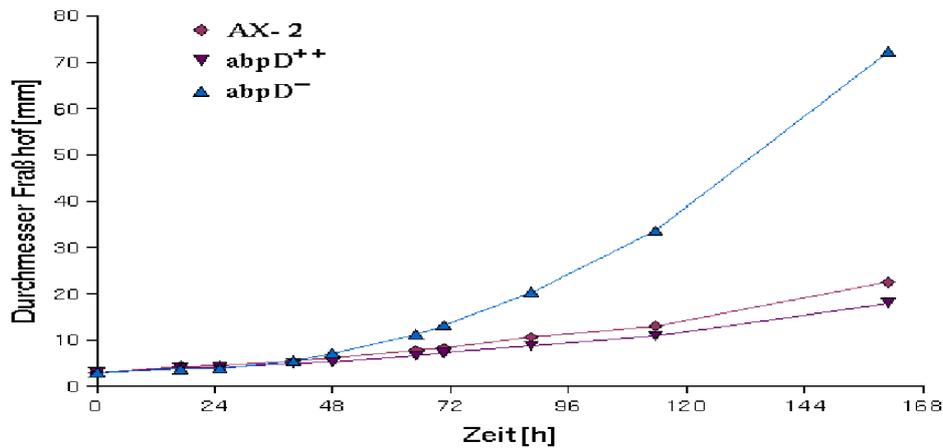


Abbildung 4.8: Bestimmung des Durchmessers von Fraßhöfen. Jeweils eine Kolonie entwickelte sich in der Mitte einer mit *Klebsiella aerogenes* bewachsenen SM-Agarplatte. Der Durchmesser in mindestens drei Richtungen wurde bestimmt und gemittelt. Die Kurven zeigen die gemittelten Werte von 10 Messungen für jeden Stamm.

Mutante $abpD^{++}$ und der Wildtyp AX-2 entwickeln sich praktisch gleich, während die Kolonien der Interaptin-defizienten Mutante $abpD^{-}$ im gleichen Zeitraum etwa den dreifachen Durchmesser erreichen. Umgerechnet bedeutet das eine etwa achtmal so große Fläche.

4.2.4 Phagozytoseassay von $abpD^{++}$ und $abpD^{-}$ mit TRITC-markierten Hefen

Im Phagozytoseassay mit TRITC-markierten Hefen wird die Fluoreszenz der von den *Dicystelium*-Zellen aufgenommenen Hefe gemessen. In der Abb. 4.9 wurden die Messungen von je zwei Proben aus zwei unabhängigen Experimenten gemittelt und auf den größten Extinktionswert normiert (letzter Messwert von AX-2 entspricht 100%). Die Fluoreszenz der beiden Mutanten $abpD^{++}$ und $abpD^{-}$ ist etwas geringer als die des Wildtyps und liegt bei etwa 80% für $abpD^{++}$ und bei ca. 73% für die Interaptin-defiziente Mutante. Aufgrund apparativer Voraussetzungen sowie versuchsimmanenter Fehler liegen die Abweichungen im Fehlerrahmen.

4.2.5 Phototaxis von AX-2, $abpD^{++}$ und $abpD^{-}$

In Phototaxisexperimenten zeigte sich, daß Slugs der Interaptin-überexprimierenden Mutante $abpD^{++}$ durchschnittlich die weitesten Entfernungen (17,5 mm) zurücklegten (Tab. 4.1

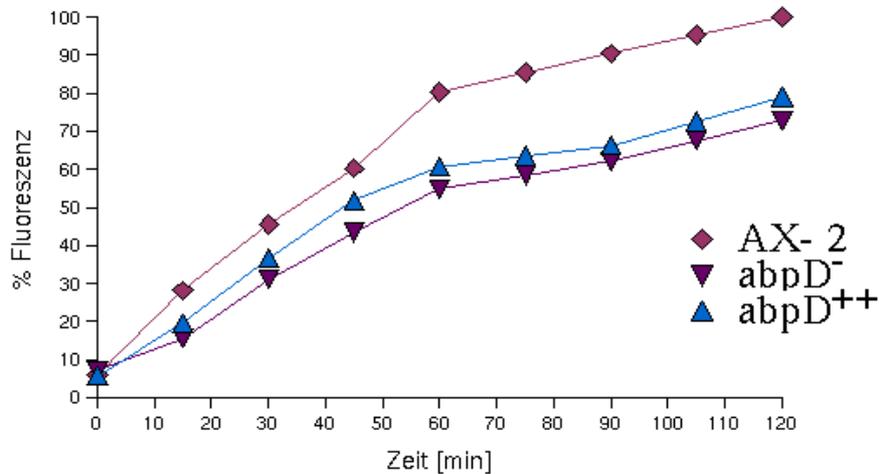


Abbildung 4.9: Typisches Beispiel für einen Phagozytoseassay von AX-2, abpD⁻ und abpD⁺⁺ mit TRITC-markierten Hefen über einen Zeitraum von 2 Stunden.

und Abb. 4.10). Auch Slugs von abpD⁻ krochen im Schnitt (ca. 14 mm) weiter als die des Wildtyps (ca. 9 mm).

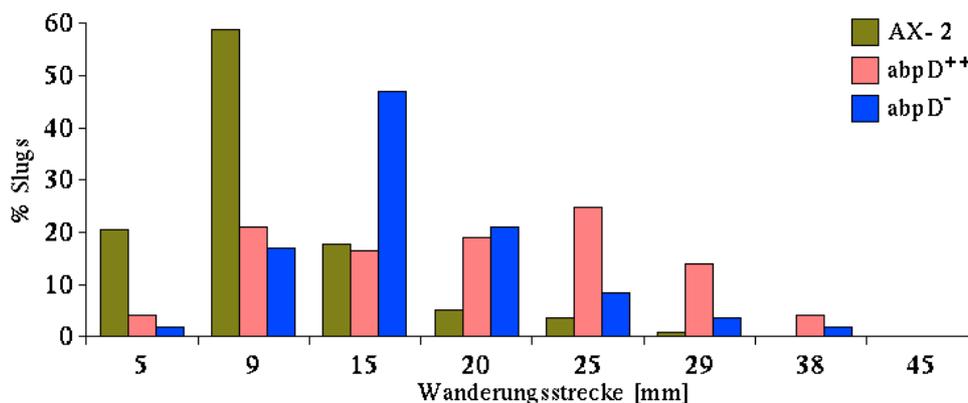


Abbildung 4.10: Bestimmung der zurückgelegten Strecke während des Phototaxisversuchs. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Slugs, die eine Entfernung bis zu dem auf der Abszisse angegebenen Bereich zurücklegten. Die Anzahl der ausgezählten Slugs betrug für den Wildtyp 136, für abpD⁻ 166 und für abpD⁺⁺ 201. Es wurden nur solche Slugs berücksichtigt, deren Spuren eindeutig identifizierbar waren.

Besonders bei der Mutante abpD⁻ wiesen einige Kriechspuren ständige Richtungsänderungen auf, die für die Streckenmessung berücksichtigt wurden.

AX-2-Slugs weisen einen Streuwinkel um die Ideallinie von 43° auf. Im Vergleich dazu kriechen Slugs der defizienten Mutante mit einer erheblich breiteren Streuung von über 60° in Richtung Licht, während die Interaptin-überexprimierende Mutante einen offensichtli-

	Wanderung (\emptyset)[mm]	Winkel zur Ideallinie	Streuwinkel
AX-2	8,68	21,45°	42,9°
abpD ⁺⁺	17,53	16,16°	32,3°
abpD ⁻	14,3	30,54°	61,1°

Tabelle 4.1: Durchschnittliche Wanderungsentfernung und Winkelabweichung von der Ideallinie. Der Streuwinkel entspricht dem doppelten Abweichungswinkel.

chen Vorteil besitzt, da sie durchschnittlich innerhalb eines Streuwinkels von 32° bleibt (Tab. 4.1).

Eine genauere Betrachtung zeigt, daß 70% der Slugs von abpD⁺⁺ einen maximalen Abweichungswinkel von 20° haben, und nur etwa 7% der Slugs haben Winkel von mehr als 40°. Dabei handelte es sich um solche mit sehr kurzen Wanderungstrecken (Tab. 4.2 und Abb. 4.11).

Stamm	Winkelabweichung				
	< 0-10°	< 11-20°	< 21-30°	< 31-40°	< >40°
AX-2	32	24	16	12	16
abpD ⁺⁺	35	35	14	9	7
abpD ⁻	22	17	17	10	34

Tabelle 4.2: Prozentuale Angabe der Winkelverteilung bei der Phototaxis. Zahlen wurden auf ganze Prozent gerundet.

Über die Hälfte der Slugs des Wildtyps zeigt Abweichungen von höchstens 20°. Auch hier sind unter den 16% Slugs mit Winkeln größer als 40° viele mit sehr kurzen Wanderungstrecken.

Die abpD⁻-Mutante zeigt eine breitere Verteilung bezüglich der Abweichung, und auffallend ist die besonders große Zahl derjenigen Slugs, die große Winkel zur Ideallinie haben. Etwa ein Drittel aller Slugs hat Winkel größer als 40°. Unter der 20°-Abweichung bleiben nur 39% der Slugs, was in etwa zwei Dritteln der Zahl des Wildtyps entspricht.

Die Korrelation der Meßwerte wurde untersucht. Die Werte der AX-2-Slugs liegen schwerpunktmäßig bei geringeren Entfernungen und kleinen Winkeln (Abb. 4.11, S. 67). Die Meßwerte der abpD⁻-Mutante streuen über einen breiten Winkel- und Streckenbereich,

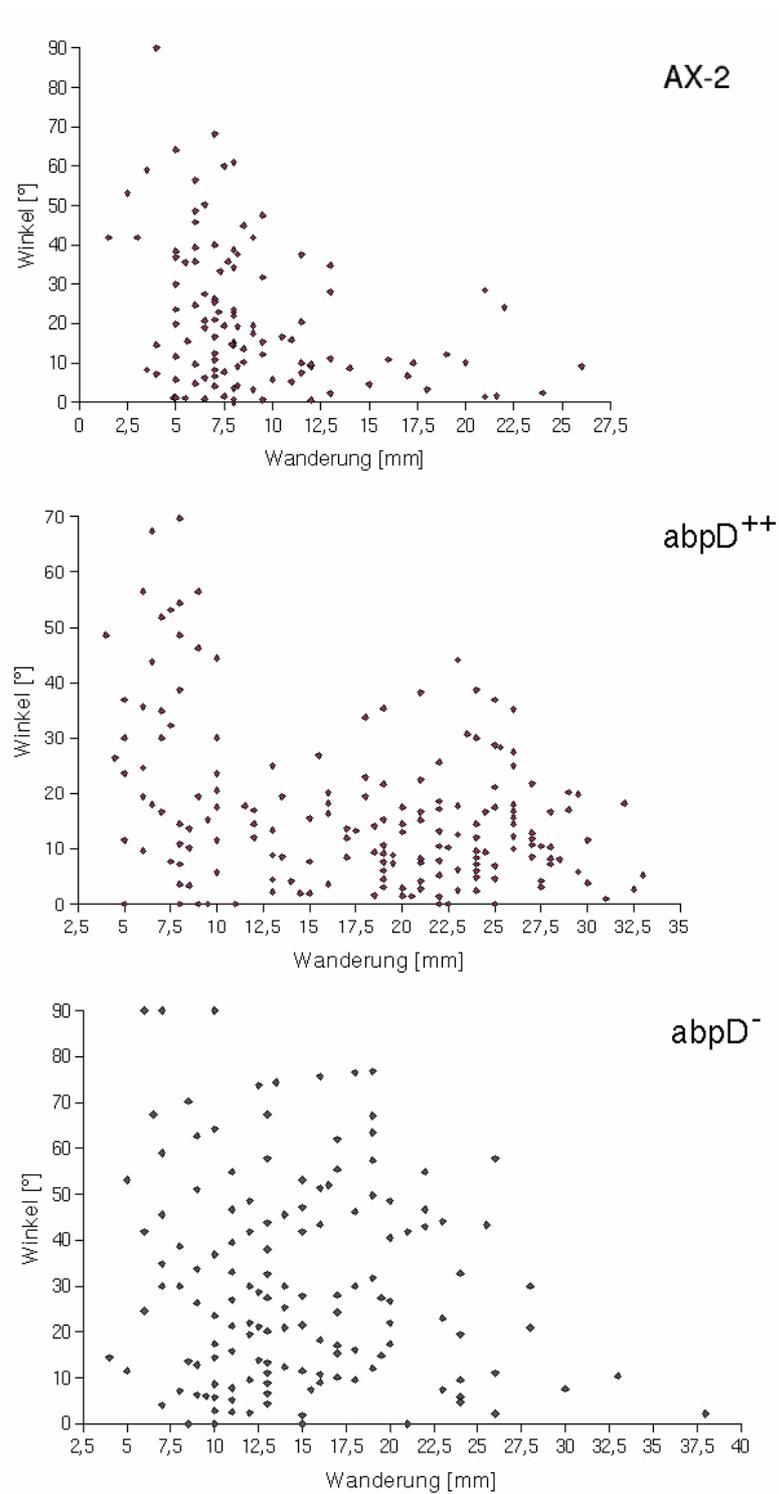


Abbildung 4.11: Die Diagramme zeigen die Meßwerte der Phototaxis von AX-2, abpD⁺⁺ und abpD⁻ in einer Auftragung des Winkels gegen die Wanderungsstrecke.

während die abpD⁺⁺-Slugs zwei Häufungszonen zeigen. Slugs aus abpD⁺⁺-Zellen, die relativ kurze Strecken wanderten, zeigen die größten Abweichungen von der Ideallinie, während die Slugs mit mittleren und großen Strecken innerhalb eines relativ schmalen Streuwinkels bleiben.

4.2.6 Sporenkeimungsstudien

Da festgestellt wurde, daß sich die Fruchtkörper bei den hier untersuchten Stämmen in ihrem Erscheinungsbild voneinander unterscheiden (vgl. Kap. 4.2.2), sollte untersucht werden, ob die jeweils gebildeten Sporen Unterschiede in ihrer Keimfähigkeit besitzen.

In Sporenkeimungsexperimenten wurde untersucht, ob die gebildeten Sporen bei abpD⁻ und abpD⁺⁺ bezüglich ihrer Keimfähigkeit Unterschiede zum Wildtyp aufweisen.

Stamm	ausgekeimte Sporen (%)
AX-2	58,42 ± 9,2
abpD ⁺⁺	82,35 ± 5,7
abpD ⁻	64,65 ± 13,4

Tabelle 4.3: Prozentuale Angabe der ausgekeimten Sporen. Es wurden jeweils 200 Sporen ausplattiert und die entstandenen Kolonien ausgezählt. Die Zahlen sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten.

Die Keimfähigkeit von Sporen der Interaptin-defizienten Mutante abpD⁻ ist in etwa mit der des Wildtyps vergleichbar (Tabelle 4.3). Sie liegen beide bei 61%. Jedoch scheint die Interaptin-überexprimierende Mutante eine erheblich höhere Zahl keimungsfähiger Sporen bilden zu können (ca. 82%).

Ob die auch bei abpD⁺⁺ beobachtete Fruchtkörperheterogenität zu einer vom Wildtyp abweichenden Menge an gebildeten Sporen führt wurde hier nicht weiter untersucht.

4.2.7 Wachstum von AX-2, abpD⁺⁺ und abpD⁻

4.2.7.1 Wachstum unter Standardbedingungen

Für die Interaptin-defiziente Mutante abpD⁻ wurden keine auffallenden Abweichungen von der Wachstumsgeschwindigkeit des Wildtyps erwartet, da Interaptin erst im Laufe

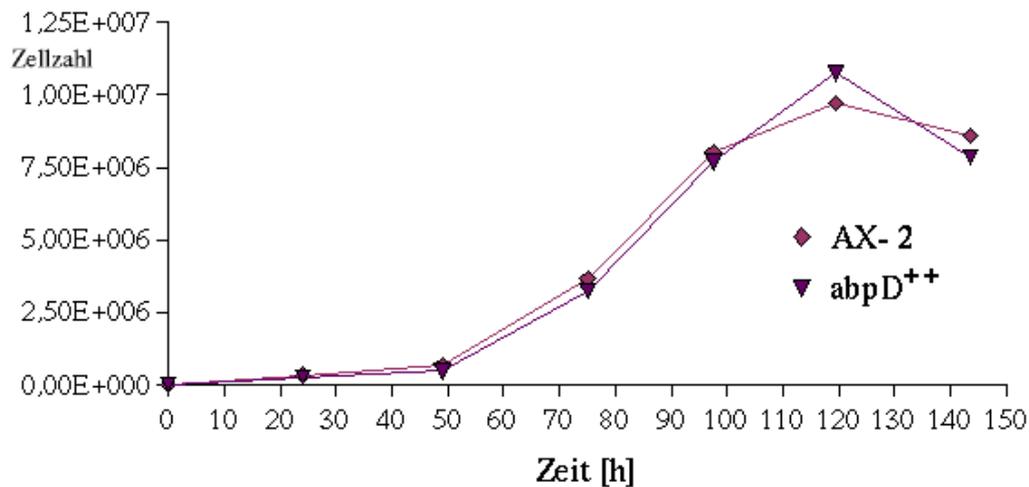


Abbildung 4.12: Wachstum unter Standardbedingungen. Die Kurven repräsentieren die Meßwerte zweier unabhängiger Experimente; der Kurvenverlauf entspricht im wesentlichen den Messungen von vier Versuchsreihen. Die Zellen wurden bei 21°C und 160 rpm inkubiert.

der Entwicklung (nach ca. 9-12 h) exprimiert wird [Rivero *et al.*(1998)]. Hier sollte untersucht werden, wie sich in einzeln lebenden Zellen laufend synthetisiertes Interaptin auf den normalen Zellzyklus auswirkt.

Es gibt keine nennenswerten Unterschiede im Wachstum der zwei untersuchten Stämme AX-2 und abpD⁺⁺ (Abb. 4.12). Das Wachstum verläuft praktisch identisch. Damit ist der Nachweis erbracht, daß überexprimiertes Interaptin keine negativen Auswirkungen auf den normalen Zellzyklus von *Dictyostelium discoideum* hat. Die Verdopplungszeiten schwanken in den einzelnen Experimenten zwischen 9-12 h.

4.2.7.2 Wachstum unter phagozytotischen Bedingungen in Schüttelkultur

Aufgrund der Beobachtung, daß Kolonien von AX-2, abpD⁻ und abpD⁺⁺ auf *Klebsiella aerogenes*-Rasen unterschiedlich schnell wachsen, lag es nahe, das Wachstum auch unter phagozytotischen Bedingungen zu untersuchen.

Die Zellen wurden dazu in Schüttelkultur mit hitzegetöteten *Klebsiella aerogenes* als Nahrungsgrundlage herangezogen.

Die Interaptin-defiziente Mutante abpD⁻ scheint sowohl gegenüber dem Wildtyp wie auch gegenüber dem abpD⁺⁺-Typ einen klaren Vorteil zu haben. Sie erreicht deutlich höhere Zelldichten (ca. 1,5fach) in kürzerer Zeit. Bereits nach ca. 50 Stunden erreicht die Zelldichte

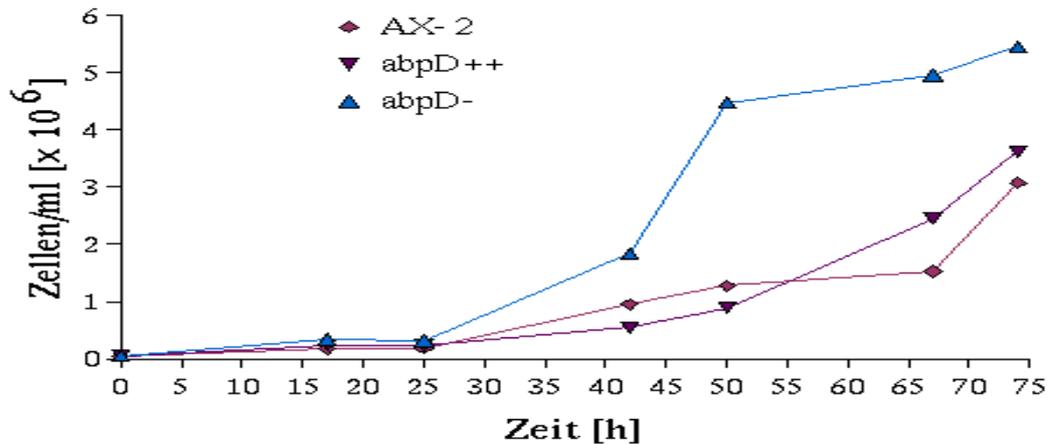


Abbildung 4.13: Wachstum von AX-2, abpD⁻ und abpD⁺⁺ unter phagozytotischen Bedingungen. Es sind typische Kurven aus zwei gemittelten, unabhängigen Experimenten dargestellt. Es wurden keine Messwerte nach 75 h erhoben, da bereits zu diesem Zeitpunkt die Konzentration an Bakterien derart gering war, daß für weitere Messungen nicht mehr von einheitlichen Bedingungen ausgegangen werden konnte.

bei abpD⁻ Werte, die über den maximalen Werten des Wildtyps (nach 75 Stunden erreicht) liegen.

Die Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen, die bei diesen Stämmen auch auf *Klebsiella aerogenes*-Rasen gemacht wurden (vgl. Kap. 4.2.3). Die Zellen der Mutante abpD⁺⁺ wachsen in etwa vergleichbar mit dem Wildtyp (Verdopplungszeiten 6,75 h). Die defiziente Mutante zeigt gegenüber den beiden anderen Stämmen ein um 7,5% beschleunigtes Wachstum.

4.2.7.3 Wachstumskurven unter osmotischem Stress

Zur Untersuchung des Wachstums unter osmotischem Stress wurde axenisches Medium mit 30 mM NaCl und in einer weiteren Versuchsreihe mit 115 mM Sorbitol angereichert und Wildtypzellen, abpD⁺⁺ sowie abpD⁻ (nur NaCl) in geringer Dichte angesetzt.

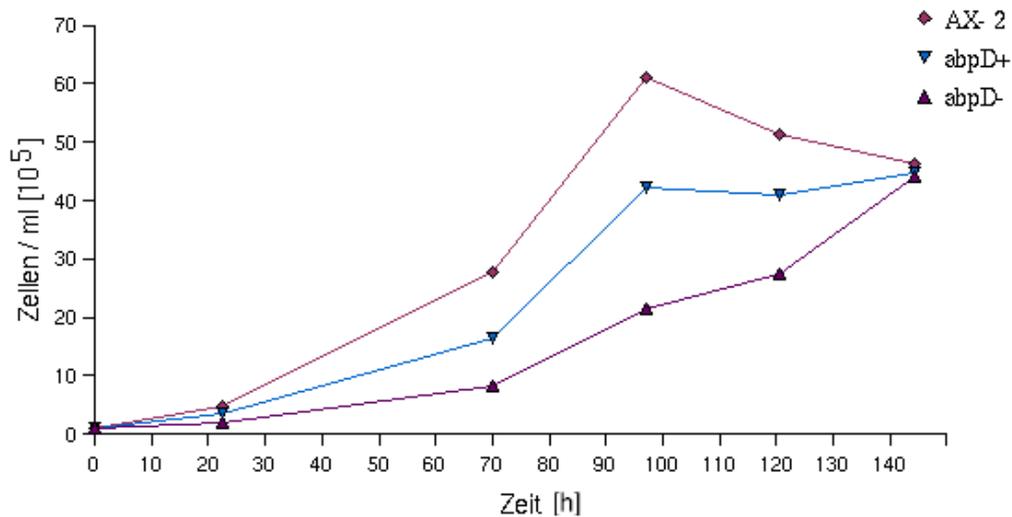


Abbildung 4.14: Die Kurven repräsentieren typische Werte beim Wachstum unter Zusatz von 30 mM NaCl zum AX2-Medium. Die Zellen wurden bei 21°C und 160 rpm inkubiert.

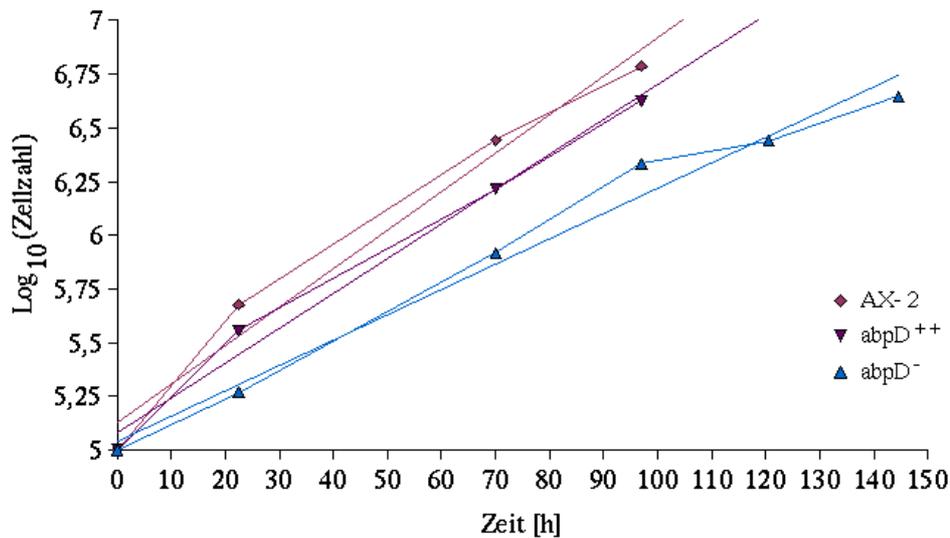


Abbildung 4.15: Logarithmische Auftragung der Zellzahlen aus den Wachstumskurven unter Zusatz von 30 mM NaCl zum Nährmedium. Die Meßwerte der logarithmischen Wachstumsphase (Abb. 4.14) wurden aufgetragen und die Ausgleichsgrade mittels linearer Regression berechnet.

Der Wildtyp und die Interaptin-überexprimierende Mutante abpD⁺⁺ können etwas höhere Zelldichten als die defiziente Mutante abpD⁻ erreichen (Abb. 4.14). Die Verdopplungszeiten liegen für alle drei Stämme bei etwa 20 h (Abb. 4.15).

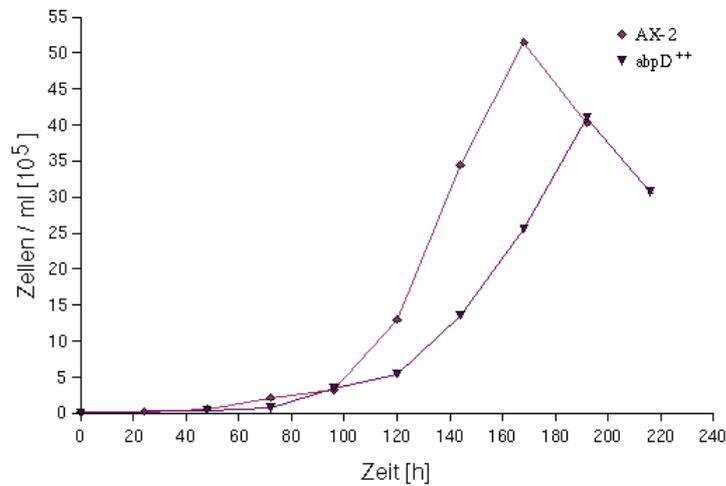


Abbildung 4.16: Die Kurven repräsentieren typische Werte beim Wachstum unter Zusatz von 115 mM Sorbitol zum AX2-Medium. Die Zellen wurden bei 21°C und 160 rpm inkubiert.

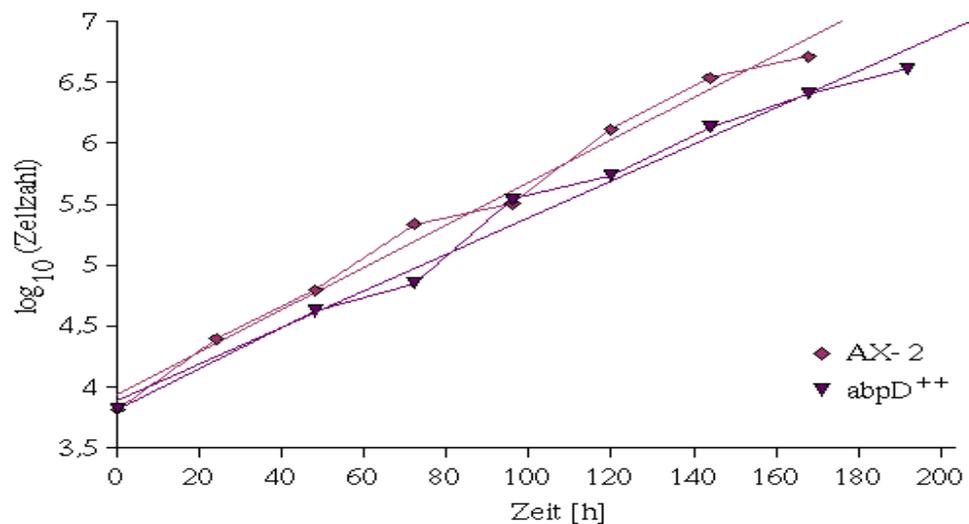


Abbildung 4.17: Logarithmische Auftragung der Zellzahlen aus den Wachstumskurven unter Zusatz von 115 mM Sorbitol zum Nährmedium. Die Meßwerte der logarithmischen Wachstumsphase (Abb. 4.16) wurden aufgetragen und die Ausgleichsgrade mittels linearer Regression berechnet.

Der Wildtyp sowie abpD⁺⁺ erreichen eindeutig eine Phase stationären Wachstums. Die geringen Unterschiede in der maximalen Zelldichte sind nicht ausreichend, um von einer generell höheren Dichte bei AX-2 auszugehen.

In logarithmischer Auftragung der Zellzahlen (Abb. 4.15) ist zu sehen, daß die Verdopp-

lungszeiten von AX-2 und abpD⁺⁺ sehr ähnlich sind, während die Mutante abpD⁻ geringfügig langsamer ist (Verdopplungszeiten AX-2/abpD⁺⁺: ca. 20 h, abpD⁻: ca. 21 h).

Insgesamt sind jedoch alle drei Stämme gegenüber normalen Bedingungen benachteiligt.

Auch mit 115 mM Sorbitol als Zusatz zum Medium erreichen AX-2 und abpD⁺⁺ eine stationäre Phase bei vergleichbarer maximaler Zelldichte (Abb. 4.16). Ein Vorteil einer Zellsorte ist nicht erkennbar, jedoch sind die Zellen im Vergleich zum Wachstum in normalem AX2-Medium geringfügig verlangsamt; ihre Verdopplungszeiten liegen bei 12-13 h. (vgl. Abb. 4.17 und Abb. 4.12).

4.2.7.4 Wachstumskurven bei erhöhter und erniedrigter Temperatur

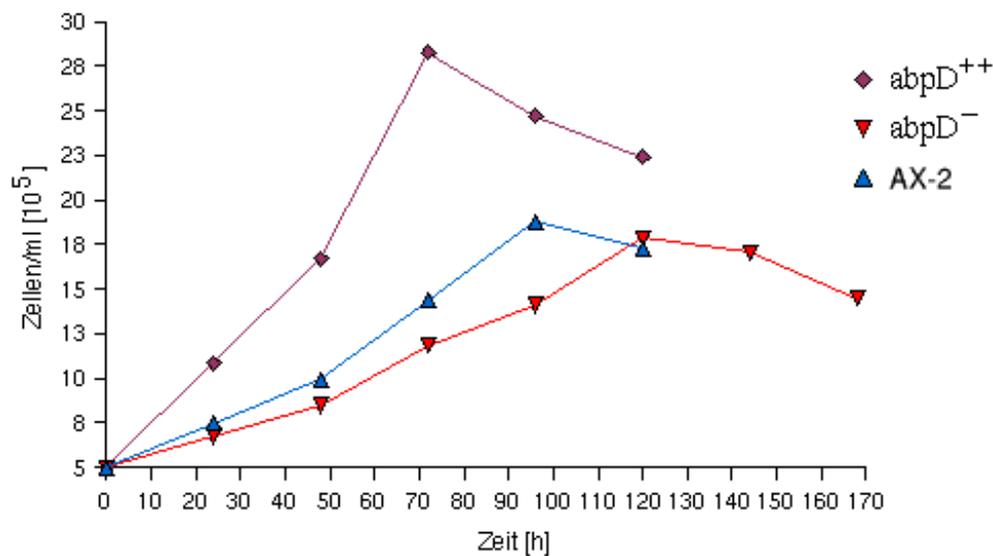


Abbildung 4.18: Wachstumskurven von drei Stämmen (AX-2, abpD⁻ und abpD⁺⁺) bei erhöhter Temperatur von 27°C. Es sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten aufgetragen.

Wie in Abschnitt 4.2.7.1 gezeigt, besitzt Interaptin bei Standardtemperatur keinen Einfluß auf das Wachstum von vereinzelt lebenden Zellen in Schüttelkultur. Es schien jedoch interessant zu untersuchen, ob Interaptin einen Einfluß auf das Wachstum bei vom Optimum abweichenden Temperaturen haben könnte. Dazu wurden Wachstumsexperimente bei erhöhter (27°C) und erniedrigter (15°C) Temperatur durchgeführt.

Bei 27°C wachsen der Wildtyp und die defiziente Mutante abpD⁻ in etwa gleich schnell,

während die Interaptin-überexprimierende Mutante $abpD^{++}$ schneller wächst (Abb. 4.18). Die Verdopplungszeiten der Zellen liegen jedoch erheblich über denen bei Standardtemperatur (Abb. 4.19). So verdoppeln sich die AX-2-Zellen etwa alle 50 h, was etwa einer Vervierfachung der normalen Zeiten bedeutet. Die Interaptin-defiziente Mutante $abpD^{-}$ benötigt sogar fast 60 h, also eine fünffach längere Zeit als unter normalen Temperaturbedingungen. Die Interaptin-überexprimierende Mutante $abpD^{++}$ hingegen weist Ver-

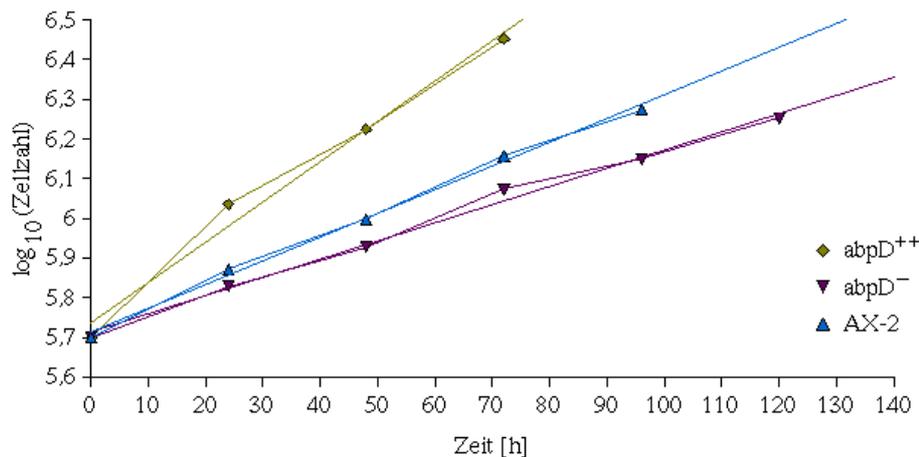


Abbildung 4.19: Logarithmische Auftragung der Meßwerte aus Abb. 4.18 (27°C). Die Ausgleichsgeraden der Werte der axenischen Wachstumsphase wurden mittels linearer Regression errechnet.

dopplungszeiten von etwa 35 h auf. Dies entspricht immerhin noch einer dreifach längeren Zeitspanne, ist damit aber schneller als der Wildtyp und fast doppelt so schnell wie $abpD^{-}$. Bei 15°C sind keine Unterschiede zwischen den Stämmen bezüglich ihrer Wachstumsgeschwindigkeit erkennbar. Allerdings sind die Wachstumsgeschwindigkeiten stark verlangsamt gegenüber derjenigen unter der Normaltemperatur von 21°C (ca. 24 h und damit etwa verdoppelt (vgl. Abb. 4.21, S. 75)).

4.3 Slugmischexperimente

Rivero et al. zeigten, daß Interaptin entwicklungsreguliert und cAMP-induziert exprimiert wird [*Rivero et al.* (1998)]. Zusätzlich weist die Expression von Interaptin eine distinguierte regionale Verteilung auf. Es wird überwiegend in der Spitzenregion („Tip“) und dem hintersten Rand von Slugs, im Bereich der „upper“ und „lower cups“ genannten Region (vgl. Abb. 1.1) und in der Spitze der reifen Fruchtkörper exprimiert.

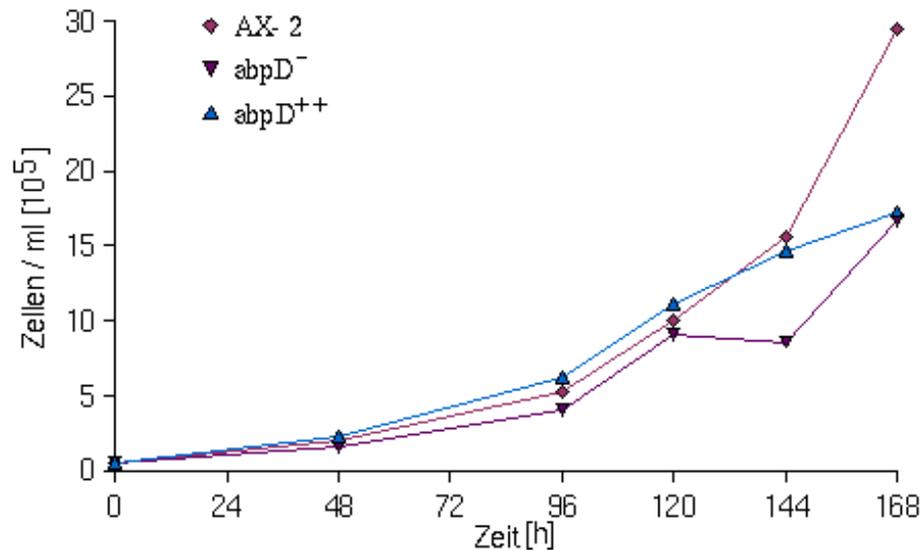


Abbildung 4.20: Wachstumskurven von drei Stämmen (AX-2, $abpD^-$ und $abpD^{++}$) bei erniedrigter Temperatur von 15°C . Die Kurven entsprechen den Mittelwerten aus vier unabhängigen Experimenten, woraus sich auch die höheren Endwerte bei Ax-2 bzw. das Fehlen eines klaren Plateaus bei den Stämmen erklärt. Sie sind auf die Mittelung mehrerer Experimente und nicht auf das tatsächliche Fehlen eines Plateaus zurückzuführen.

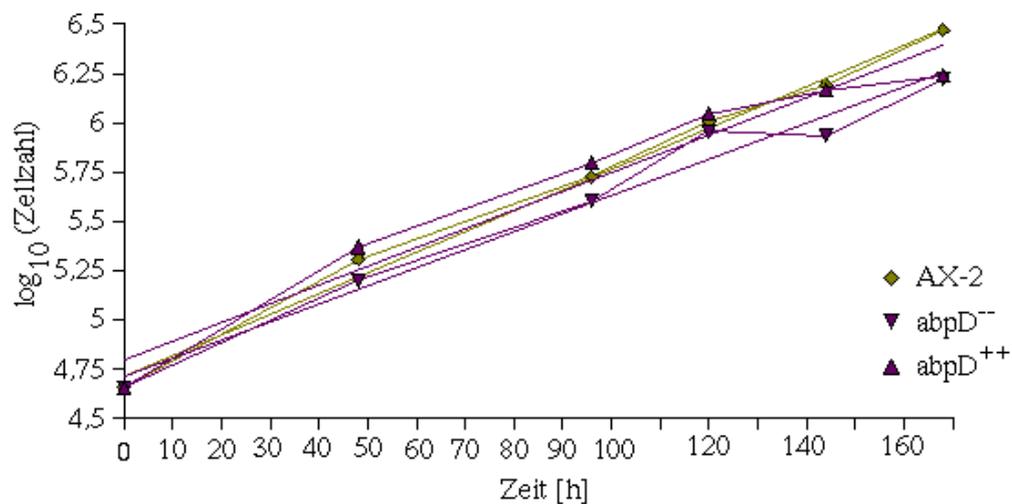


Abbildung 4.21: Logarithmische Auftragung der Messwerte aus Abb. 4.20 (15°C). Die Ausgleichsgeraden der Werte der axenischen Wachstumsphase wurden mittels linearer Regression errechnet.

In Mischexperimenten sollte geklärt werden, ob Interaptin-defiziente oder -überexprimierende Zellen in Gemischen untereinander und in Mischung mit AX-2-Zellen eine distinktierte Verteilung in Slugs einnehmen, oder ob sie statistisch verteilt sind. Zudem sollte

untersucht werden, ob die membranassoziierte Domäne des Interaptins für die Lokalisation im Slug eine entscheidende Rolle spielt.

Als Marker für den jeweils in geringerer Konzentration zugesetzten Stamm wurde Aktin-GFP unter dem Einfluß des Aktin-15-Promotors gewählt. Dieses Protein wird über den gesamten Lebenszyklus von *Dictyostelium* exprimiert und ist stabil nach Fixierung von Zellen und Slugs. Zellen, die Aktin-GFP exprimieren, sind aufgrund ihrer Fluoreszenz auch in Slugs gut identifizierbar.

Um ein optimales Mischungsverhältnis zu bestimmen, wurden mehrere Proportionen getestet. Die besten Ergebnisse wurden mit einem Verhältnis von 95% unmarkierten zu 5% markierten Zellen erzielt.

4.3.1 Mischexperimente von AX-2 mit anderen Stämmen

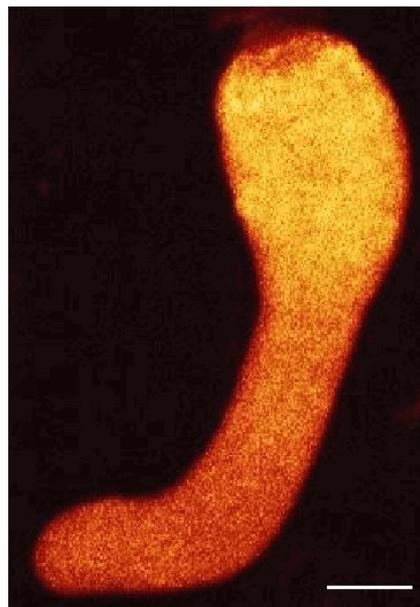


Abbildung 4.22: Slugs aus einer Mischung von 95% AX-2 und 5% AX-2-actGFP. Die Aktin-GFP exprimierenden Zellen erscheinen in diesem Bild rot-orange und sind statistisch über den Slug verteilt. Die Bilder wurden mit einem Leica Laser Scan Mikroskop DM/IRBE (16x-Ölimmersionsoobjektiv) gewonnen. 20-25 konfokale Schnittebenen im Abstand von 1,5 bis 2,4 μm wurden gescannt und anschließend softwareunterstützt übereinander geblendet. Balken: 100 μm

Zuerst wurde in Mischexperimenten von AX-2-Zellen mit AX-2-actGFP untersucht, ob die Expression von Aktin-GFP einen Einfluß auf die Verteilung von derartigen Zellen in Slugs hat.

Wie in Abbildung 4.22 deutlich wird, sind die transfizierten Zellen statistisch über den Slug verteilt. Das Fusionsprotein, das sie in jedem Entwicklungsstadium exprimieren, hat offenbar keinen Einfluß auf ihre Position im Slug.

In Mischexperimenten von AX-2 mit $abpD^-$ sollte geklärt werden, ob die Interaptin-defizienten Zellen aus der Spitzenregion verdrängt werden, da sie nicht in der Lage sein sollten, die Aufgaben der Wildtypzellen mangels Interaptin gleichwertig zu übernehmen.

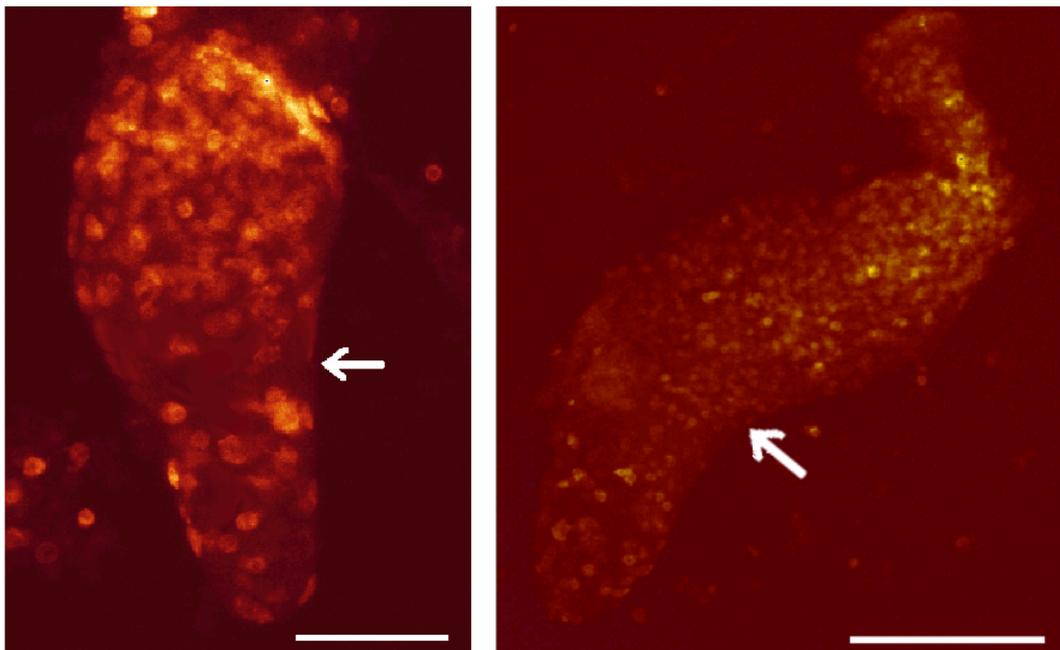


Abbildung 4.23: Slugs aus einer Mischung von 95% AX-2 und 5% $abpD^-$ -actGFP. Die beiden Pfeile kennzeichnen den Bereich unmittelbar hinter dem vorderen „Tip“-Bereich. Es sind praktisch keine der Interaptin-defizienten Zellen dort zu finden. Die Aufnahmen wurden wie in Abb. 4.22 beschrieben gewonnen. Balken: 100 μ m

Nach der Transfektion von $abpD^-$ mit Aktin-GFP wurden Mischungen von AX-2-Zellen mit dem neuen Stamm $abpD^-$ -actGFP angesetzt. In Slugs aus dieser Mischung wurden Interaptin-defiziente Zellen aus dem Bereich unmittelbar hinter der verjüngten Spitze verdrängt. Der Großteil der $abpD^-$ -actGFP-Zellen befindet sich im hinteren Bereich des Hauptkörpers (Abb. 4.23).

Analog zu den oben angestellten Überlegungen müßten bei Mischungen von AX-2 und $abpD^{++}$ letztere in den Regionen angereichert werden, in denen *Rivero et al.* (1998) eine überwiegende Expression nachwies.

Die $abpD^{++}$ -Zellen sind besonders in der Region unmittelbar hinter der Slugspitze angerei-

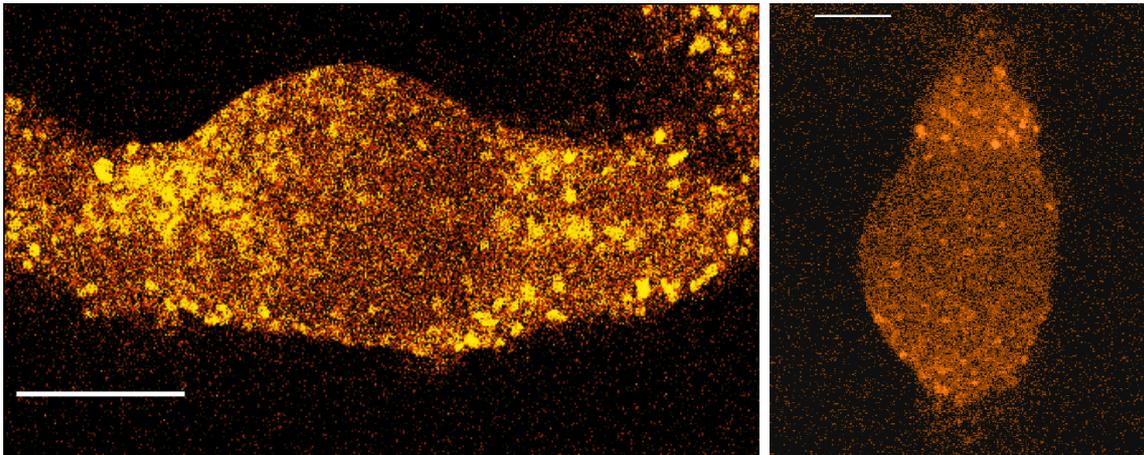


Abbildung 4.24: Schnitt durch Slugs, die sich aus einer Mischung aus 95% AX-2-Zellen und 5% Zellen von $abpD^{++}$ -actGFP entwickelt haben. Die $abpD^{++}$ -actGFP-Zellen erscheinen leuchtend orange. Bilder wurden gewonnen wie in Abb. 4.22 beschrieben. Anschließend wurden zwei ausgewählte Schnittebenen übereinandergeblendet. Balken: 100 μm

chert, wo der Slug in den breiten Hauptkörper übergeht, sowie am hinteren Ende des Slugs (Abbildungen 4.24). Interaptin wird im gesamten Spitzenbereich sowie am hinteren Slugende exprimiert. Allerdings ist die Verteilung der Interaptin-überexprimierenden Zellen in diesem Slug an der Spitze etwas breiter verteilt.

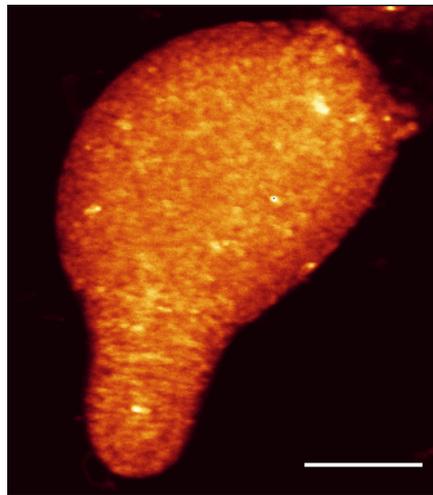


Abbildung 4.25: Slug aus unvermischten AX2-C₅GFP-Zellen. Die Slugs weisen eine statistische Verteilung der leuchtenden Zellen auf. Bilder wurden wie in Abb. 4.22 beschrieben gewonnen. Balken: 100 μm

Diese Verteilung konnte auch bei Slugs mit einem Anteil von 10% $abpD^{++}$ festgestellt werden. Sie ist also nicht auf einen zu geringen Anteil an überexprimierenden Zellen zu-

rückzuführen.

Da die Funktion der Membranbindungsdomäne des Interaptin unbekannt ist, wurden defiziente Zellen mit der C₅-Domäne des Interaptin transfiziert. Zur Visualisierung war GFP an das N-terminale Ende des Fragments fusioniert. Es sollte so untersucht werden, ob durch diesen Teil des Interaptins die funktionelle Aufgabe insoweit wiederhergestellt werden konnte, daß diese Zellen in den Regionen des Slugs vorhanden sein würden, die, wie oben gezeigt, bevorzugt Interaptin-exprimierende Zellen enthalten.

Der Einfluß von C₅-GFP in AX-2 auf die Slugbildung wurde zu Kontrollzwecken zuerst durchgeführt.

Die Slugs besitzen ein normales Aussehen, und auch die Morphologie der Slugs sowie der Fruchtkörper weist keine Auffälligkeiten auf. Die Verteilung der leuchtenden Zellen ist statistisch über den Slug verteilt (Abb. 4.25). In Slugs aus einer Mischung von AX-2-Zellen mit AX2-C₅GFP-Zellen ist zu sehen, daß eine deutliche Anreicherung der mit GFP markierten Zellen in der vorderen Region nahe der Spitze auftritt (Abb. 4.26). Bemerkenswert

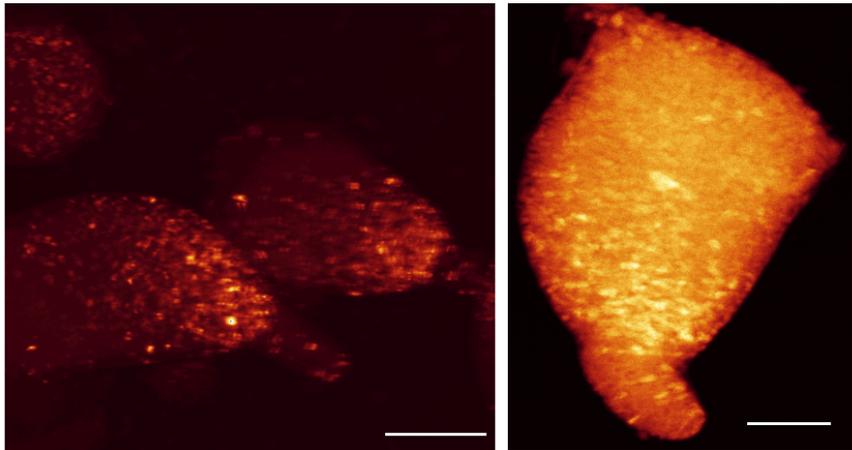


Abbildung 4.26: Slugs aus AX-2 und AX2-C₅GFP. Eine deutliche Anreicherung der C₅-GFP-exprimierenden Zellen in die vordere Region des Hauptkörpers ist erkennbar. Die Zellen dringen nicht in die Spitzenregion ein. Bilder wurden wie in Abb. 4.22 beschrieben gewonnen. Balken: 100 μ m

ist, daß die AX2-C₅GFP-Zellen am hinteren Ende der Slugs praktisch nicht vorkommen. Im linken Bild 4.26 ist links oben ein Aggregat zu sehen, bei dem die Zellen noch statistisch verteilt sind. In den daneben sichtbaren Slugs ist die Verteilung hingegen sehr bestimmt und nicht zufällig.

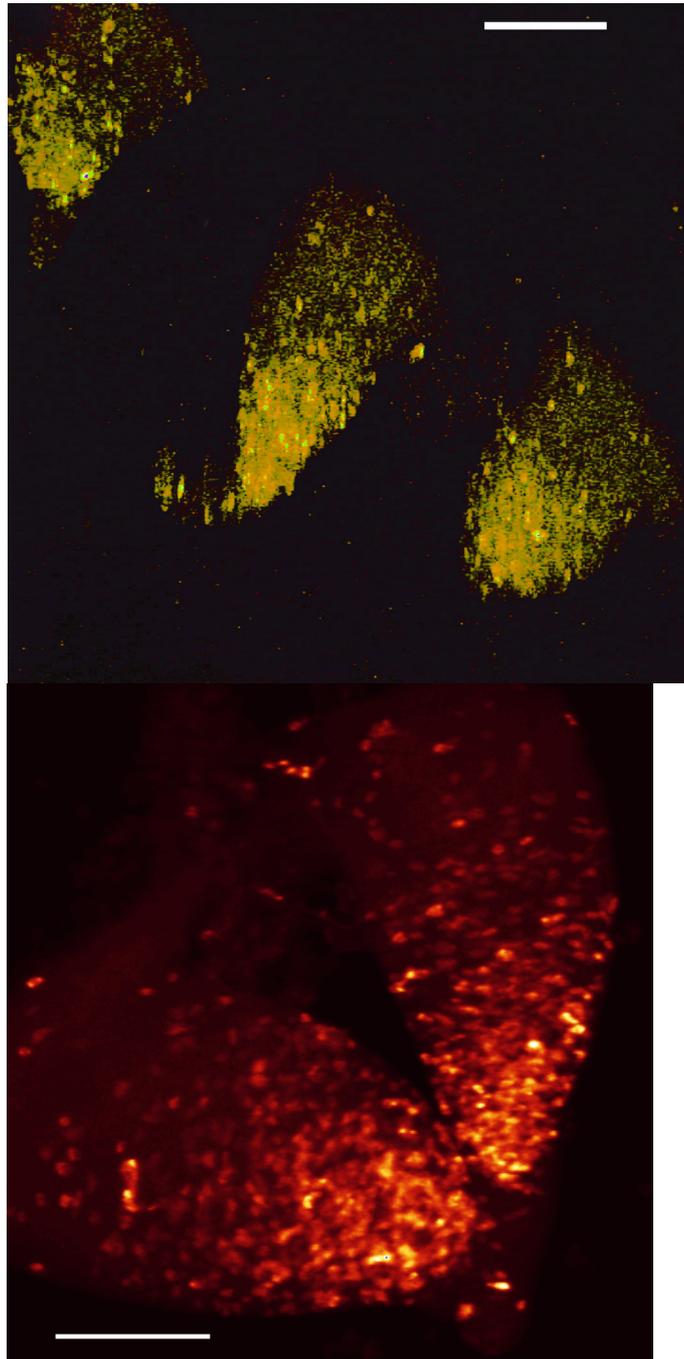


Abbildung 4.27: Drei bzw. zwei Slugs aus 95% AX-2- und 5% $abpD^-$ -C₅GFP-Zellen. Jeweils der vordere Hauptkörperbereich enthält den überwiegenden Teil der C₅-GFP-exprimierenden Zellen. Bilder wurden wie in Abb. 4.22 beschrieben gewonnen. Balken: 100 μ m

In Mischungen mit 5% C₅-GFP-haltigen abpD⁻-Zellen reichern sich diese in der vorderen Slugregion sowie am hinteren Rand an (Abb. 4.27).

Der für Interaptin-exprimierende Zellen typische Bereich im Übergang zur „Tip“-Region enthält die meisten der abpD⁻-C₅GFP-Zellen. Auch im vorderen Bereich des Hauptkörpers finden sich noch relativ viele dieser Zellen. Im hinteren Hauptkörper- und dem vordersten „Tip“-Bereich sind dagegen praktisch keine C₅-GFP-haltigen Zellen.

Die Verteilung entspricht im wesentlichen der bei AX-2/AX2-C₅GFP gefundenen.

4.3.2 Mischexperimente von abpD⁻ mit anderen Stämmen

In Mischungen von abpD⁻ mit 5% Zellen anderer Stämme sollte überprüft werden, wie die regionale Verteilung der Interaptin-überexprimierenden Zellen, aber auch der C₅-exprimierenden Zellen erfolgt.

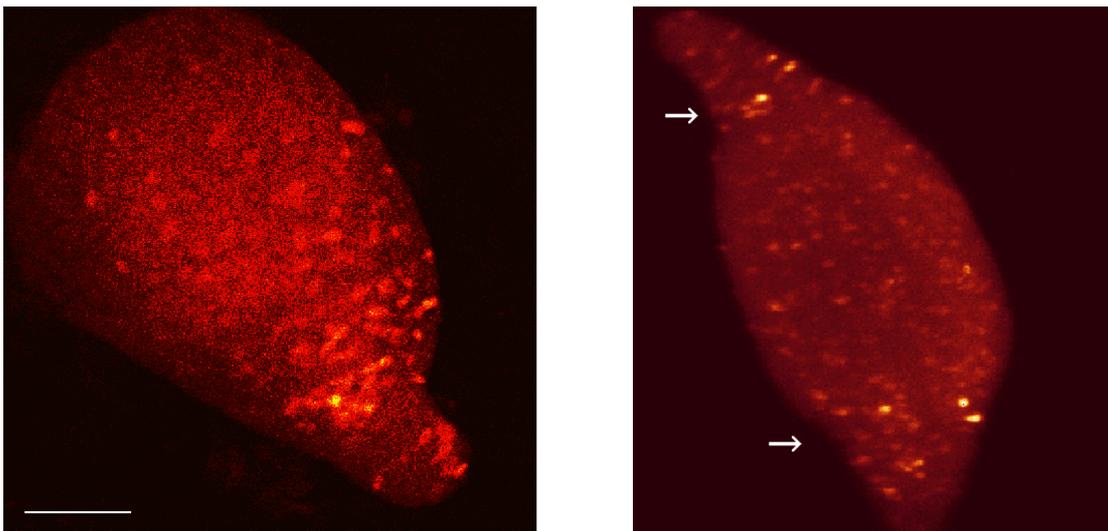


Abbildung 4.28: a: Schnitt durch einen Slug, der sich aus einer Mischung aus 95% abpD⁻-Zellen und 5% Zellen von abpD⁻-C₅GFP entwickelt hat. Letztere erscheinen orange leuchtend im Bild und sind im vorderen Bereich des Slugs angereichert. b: Spätstadium eines Slugs aus einer Mischung von 95% abpD⁻-Zellen und 5% Zellen von abpD⁻-C₅GFP. Bilder wurden wie in Abb. 4.22 beschrieben gewonnen. Balken: 100 µm

In Mischungen von abpD⁻ und abpD⁻-C₅GFP tritt eine deutliche regionale Verteilung der C₅-GFP-exprimierenden Zellen hervor (Abb. 4.28 a.). Sie sind vor allem im vorderen Drittel des Slugs zu finden, insbesondere in einer Bande unmittelbar an der Grenze zwischen Spitze und Hauptkörper.

Auch im Spätstadium, kurz vor der Kulminationsphase, ist eine Häufung der C_5 -exprimierenden Zellen im oberen und unteren „cup“-Bereich festzustellen (Abb. 4.28 b., Pfeile). Einige wenige $abpD^-$ - C_5 GFP-Zellen sind über den gesamten Bereich des Fruchtkörpers verteilt.

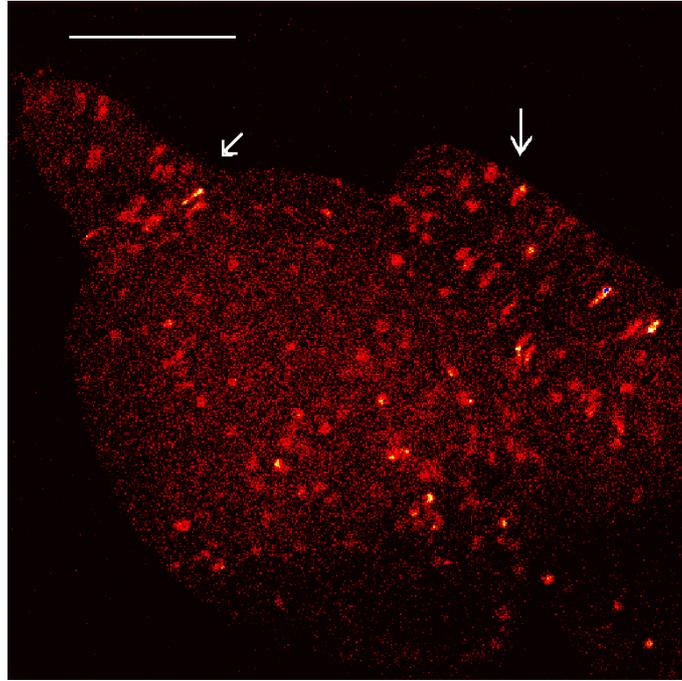


Abbildung 4.29: Schnitt durch einen Fruchtkörper, der sich aus einer Mischung aus 95% $abpD^-$ -Zellen und 5% Zellen von $abpD^{++}$ -actGFP entwickelt hat. Im rechten oberen Bereich ist die Spitze eines weiteren Fruchtkörpers zu erkennen (rechter Pfeil). Bilder wurden wie in Abb. 4.22 beschrieben gewonnen. Balken: 50 μ m

In Mischungen von $abpD^-$ und $abpD^{++}$ -actGFP findet eine Regionalisierung der Interaptin-überexprimierenden Zellen statt. Sie reichern sich in Fruchtkörpern im Bereich der „lower-cup“ und unmittelbar unterhalb der Spitze an (Abb. 4.29, linker Pfeil).

4.3.3 Mischexperimente von $abpD^{++}$ mit anderen Stämmen

Zur Kontrolle wurden Mischungen von $abpD^{++}$ und AX-2-actGFP angesetzt, bei denen eine annähernd statistische Verteilung letzterer erwartet werden durfte. Wie Abbildung 4.30 verdeutlicht ist dies der Fall. Die Aktin-GFP exprimierenden Zellen sind statistisch verteilt, und eine regionale Häufung oder spezifische Lokalisation der AX-2-actGFP-Zellen ist nicht feststellbar.

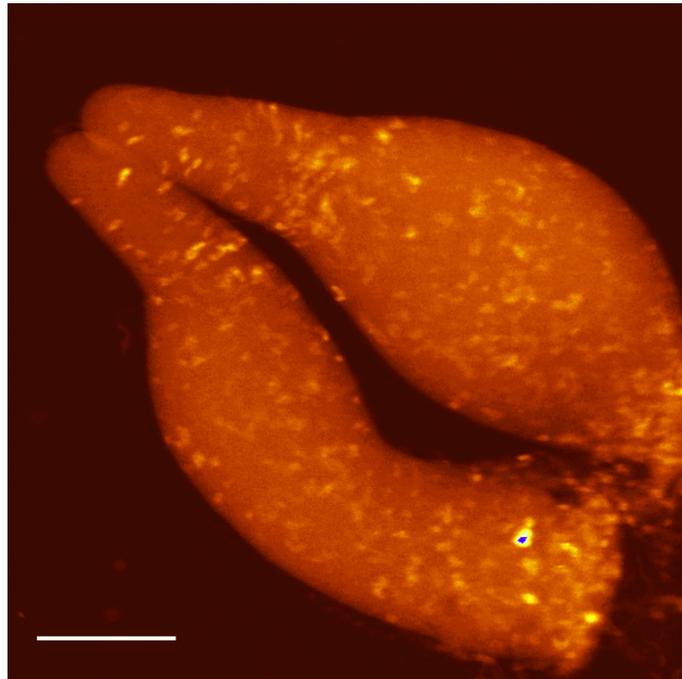


Abbildung 4.30: Zwei Slugs aus 95% $abpD^{++}$ und 5% AX-2-actGFP-Zellen. Die leuchtenden, Aktin-GFP exprimierenden Zellen sind über den gesamten Slugkörper verteilt und weisen keine regionale Häufung auf. Bilder wurden wie in Abb. 4.22 beschrieben gewonnen. Balken: 100 μm

Mit Aktin-GFP transfizierte Interaptin-überexprimierende Zellen in $abpD^{++}$ -Zellen verteilen sich statistisch im Slug (Abb. 4.31).

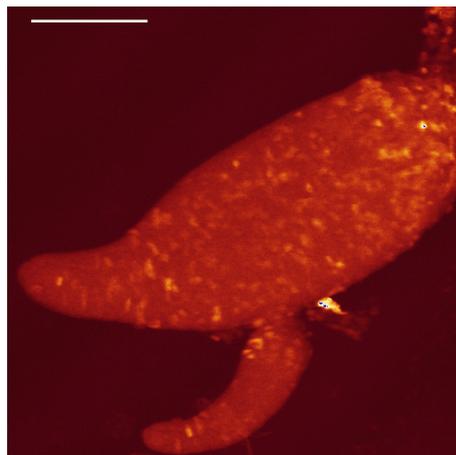


Abbildung 4.31: Slug aus 95% $abpD^{++}$ und 5% $abpD^{++}$ -actGFP. Die leuchtenden transfizierten Zellen sind gleichmäßig im Slug verteilt. Bilder wurden wie in Abb. 4.22 beschrieben gewonnen. Balken: 100 μm

Es gibt keine offensichtlich bevorzugte regionale Lokalisation der $abpD^{++}$ -actGFP-Zellen. Daraus abzuleiten ist, daß die Expression des Aktin-GFP-Fusionsproteins keine Auswirkungen auf die regionale Verteilung im Slug besitzt, die von Aktin-GFP herrühren könnte. In Mischungen von Interaptin-überexprimierenden Zellen mit Zellen des defizienten Stammes würde man einen ähnlichen Verdrängungsprozeß der $abpD^{-}$ -Zellen erwarten, wie er bereits in Kapitel 4.3.1 (S. 77) bei Mischungen mit AX-2-Wildtypzellen gefunden wurde.

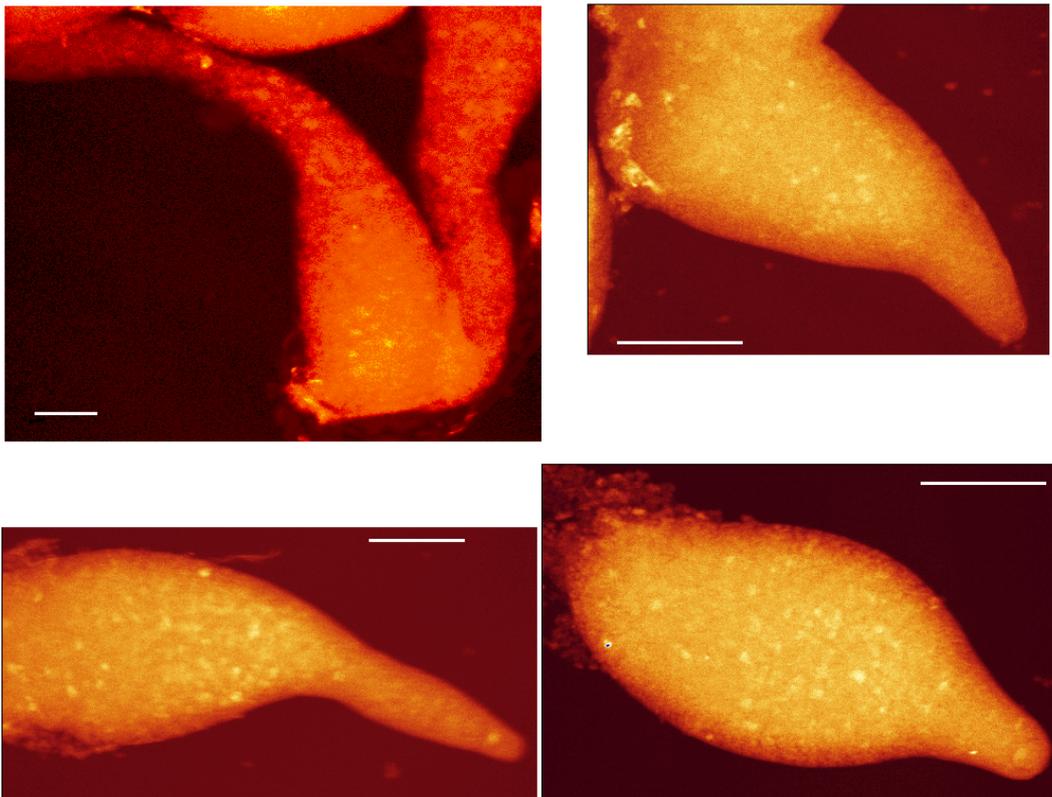


Abbildung 4.32: Bilder von Slugs, die sich aus einer Mischung aus 95% $abpD^{++}$ -Zellen und 5% Zellen von $abpD^{-}$ -actGFP entwickelt haben. Bilder wurden wie in Abb. 4.22 beschrieben gewonnen. Balken: 100 μ m

Wie Abbildung 4.32 verdeutlicht, werden die $abpD^{-}$ -actGFP-Zellen aus der Spitzenregion verdrängt. Man findet sie in einer breiten Verteilung im Hauptkörper. Die Spitzenregion wird ausschließlich von $abpD^{++}$ -Zellen gebildet.

In Kapitel 4.3.1 (S. 79) wurde gezeigt, daß sich $abpD^{-}$ -C₅GFP-Zellen in überwiegend aus AX-2-Wildtypzellen bestehenden Slugs in der Region des oberen „cup“-Bereichs unmittelbar hinter der vordersten Spitzenregion anreichern.

Werden diese Zellen mit Interaptin-überexprimierenden Zellen gemischt und entwickelt, so

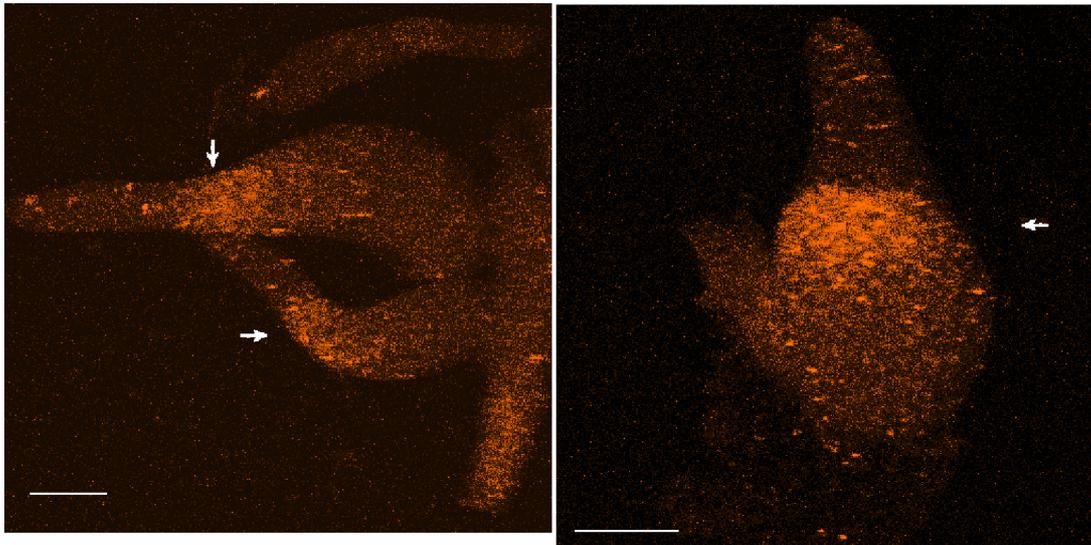


Abbildung 4.33: Bilder von Slugs aus einer Mischung von $abpD^{++}$ und $abpD^{-}$ -C₅GFP. Die Slugs auf dem linken Bild sind wenige Stunden jünger als der Slug rechts. Die Pfeile zeigen auf die Halsregion der Slugs, in denen $abpD^{-}$ -C₅GFP-Zellen angereichert sind. Slugs im linken Bild sind wenige Stunden jünger als die auf dem rechten. Bilder wurden wie in Abb. 4.22 beschrieben gewonnen. Balken: 100 μ m

reichern sich die GFP-markierten Zellen hinter der Spitzenregion in einer ziemlich scharf begrenzten Region an.

Die grundsätzliche Verteilung der Zellen scheint somit unverändert geblieben zu sein.

Werden AX2-C₅GFP-Zellen mit $abpD^{++}$ gemischt, so bildeten sich Slugs, bei denen die AX2-C₅GFP-Zellen nur am hinteren Ende zu finden waren.

Abbildung 4.34 zeigt einen solchen Slug, bei dem im vorderen (Spitzen-)Bereich nur sehr wenige und im überwiegenden Teil des Hauptkörpers einige statistisch verteilte GFP-markierte Zellen zu finden sind. Eine Häufung von AX2-C₅GFP-Zellen findet sich am hinteren, mittleren Ende des Slugs.

4.4 Fluoreszenzuntersuchungen phagozytierender *Dictyostelium*-Zellen

Da zwischen den Stämmen AX-2, $abpD^{++}$ und $abpD^{-}$ Unterschiede im Wachstum unter phagozytotischen Bedingungen bestehen (vgl. Kap. 4.2.7.2), sollte in Fluoreszenzuntersuchungen festgestellt werden, ob Interaptin an diesen Prozessen sichtbar beteiligt ist.

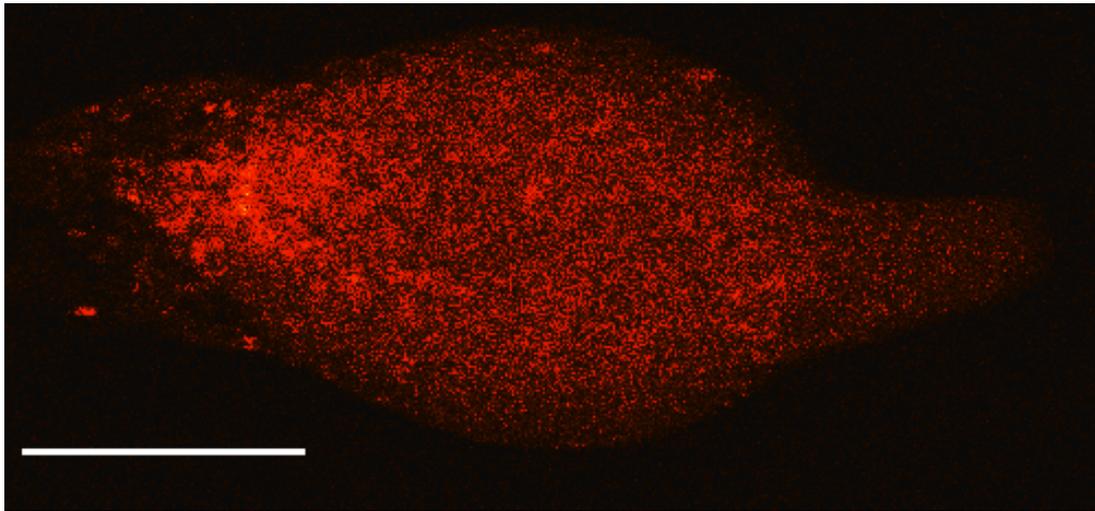


Abbildung 4.34: Slug aus einer Mischung von 95% $abpD^{++}$ und 5% AX2- C_5GFP . AX2- C_5GFP -Zellen finden sich vor allem am hinteren Ende (links im Bild). Balken: 100 μm

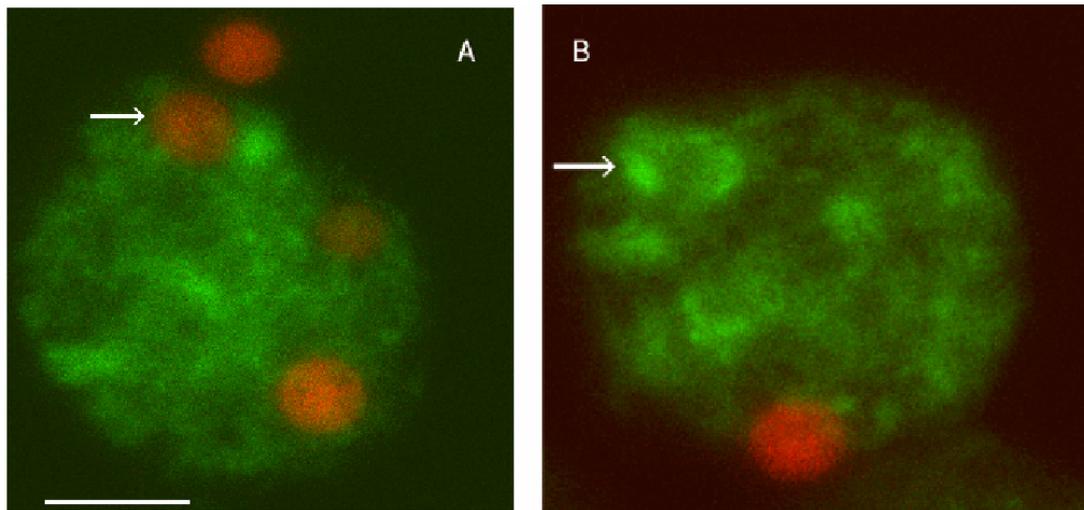


Abbildung 4.35: Bilder von phagozytierenden $abpD^{-}$ - C_5GFP -Zellen. TRITC-markierte Hefezellen als Futter erscheinen rot. Der Pfeil in A zeigt eine unvollständig aufgenommene Hefe. Der Pfeil in Bild B zeigt die Kernmembran. Bilder entstanden aus einer Überlagerung von zwei Aufnahmen: zuerst Anregung des GFP mit Argon-Laser (488 nm), anschließend Anregung des TRITC mit Krypton-Laserlicht (568 nm). Balken: 5 μm

Es wurden daher Versuche mit $abpD^{-}$ - C_5GFP -Zellen und $abpD^{++}$ -actGFP durchgeführt, bei denen möglicherweise bereits Änderungen im Zytoskelett bei phagozytotischer Nahrungsaufnahme feststellbar wären.

In Abbildung 4.35 sind zwei phagozytierende $abpD^-$ - C_5 GFP-Zellen zu sehen. Bei beiden ist keine Anreicherung des C_5 -GFP-Fragments von Interaptin an die eingeschlossenen Hefen zu erkennen. Die kreisförmigen Aggregationen entsprechen den nukleusnahen Aggregaten des endoplasmatischen Retikulums (Pfeil in B).

Der Pfeil in A zeigt eine Hefezelle, die noch nicht vollständig umschlossen worden ist. Es ist, wie bei den anderen vollständig umschlossenen Hefen, keine Anreicherung des Fusionskonstruktes an die Phagosomen erkennbar.

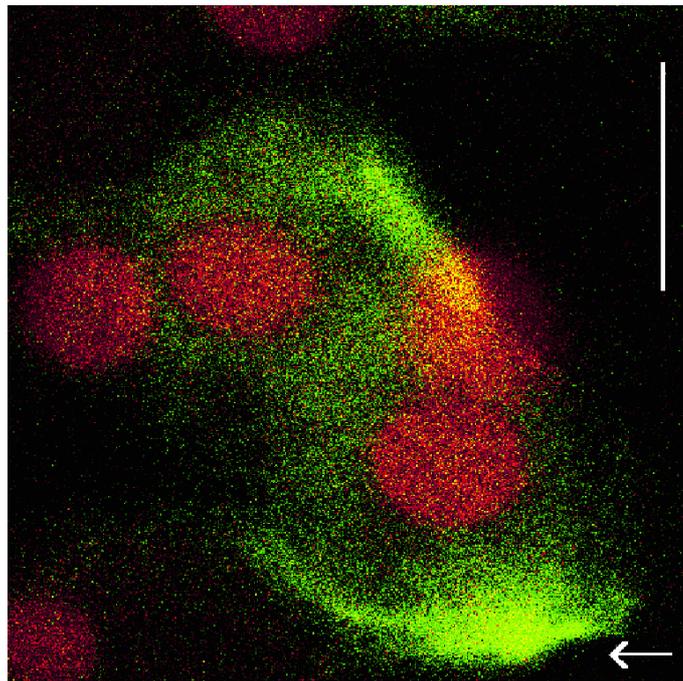


Abbildung 4.36: $abpD^{++}$ -actGFP-Zellen mit phagozytierten TRITC-markierten Hefen. Die Hefen erscheinen rötlich, das Aktin-GFP grün. Es wurden zwei konfokale Schnitte durch die Zelle gelegt und nacheinander mit zwei Laserfrequenzen (488 nm für GFP, 568 nm für Cy3) die Fluoreszenz angeregt. Das Bild zeigt die Überlagerung beider Einzelbilder. Balken: 5 μ m

Die in Abbildung 4.36 abgebildete $abpD^{++}$ -actGFP-Zelle hat mehrere Hefen phagozytisch aufgenommen. Eine Grundfärbung des Cytoskelettbereichs mit Aktin-GFP ist erkennbar, ebenso eine Anreicherung an der vorderen Zellmembran (Pfeil).

4.5 Charakterisierung der Interaptin-Antikörper

Es stehen mehrere Interaptin-Antikörper zur Verfügung, die gegen unterschiedliche Domänen von Interaptin gerichtet sind. Die monoklonalen Antikörper 234-151-1 und 234-154-9 sind gegen die aktinbindende Domäne gerichtet, während der 260-60-10 ein Epitop aus dem vorderen Bereich der rod-Domäne erkennt.

Bisher durchgeführte Experimente mit dem mAk-260-60-10 zeigten, daß dieser Antikörper außer Interaptin ein weiteres Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 160 kDa erkennt. Vermutlich handelt es sich bei dem Protein von 160 kDa um eine Spleißvariante oder ein verkürztes Interaptin.

Zur genaueren Charakterisierung dieses zweiten Proteins wurden Western-Blots mit Proteinextrakten von AX-2, $abpD^-$, myo^- und GHR angefertigt. Die erhaltenen Blots wurden mit mAk-260-60-10 und mAk-234-151-1 inkubiert und mit Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper entwickelt (Abb. 4.37). Der mAk-234-151-1 erkennt bei AX-2 t_0 , myo^- und

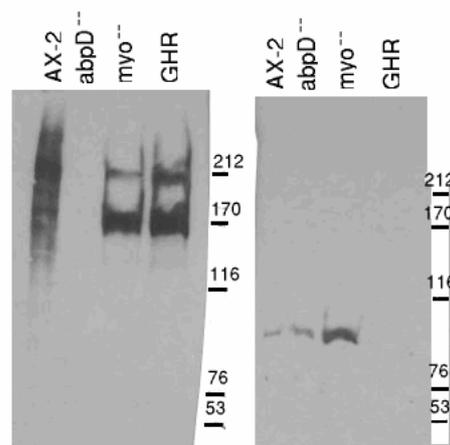


Abbildung 4.37: Western-Blot von AX-2 t_{15} , $abpD^-$, myo^- und GHR mit mAk-260-60-10 (links) und AX-2 t_0 , $abpD^-$, myo^- und GHR mit mAk-234-151-1 (rechts). Gewichtsmarker sind mit ihrem Molekulargewicht in [kDa] eingetragen.

$abpD^-$ ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht um 90 kDa, welches bei der Spur der Filamin-defizienten Mutante GHR fehlt. Es könnte sich bei dem detektierten Protein also um Filamin handeln.

Der mAk-260-60-10 erkennt bei AX-2 t_{15} , myo^- und GHR je zwei Banden, die beide bei $abpD^-$ fehlen. Es handelt sich dabei um Interaptin (obere Bande, 200 kDa) und die

konstitutiv exprimierte, alternativ gespleißte Variante des Interaptins (untere Bande, bei 160 kDa).

In Westernblots mit Proteinextrakten aus AX-2 (nach 15 h Entwicklungszeit), GHR- und $abpD^-$ -Zellen, die mit den monoklonalen Antikörpern 234-154-9 (Abb. 4.38, links) und 234-151-1 (Abb. 4.38, rechts) als primärem Antikörper inkubiert wurden, erkennen beide Antikörper sowohl Interaptin (bei 200 kDa) in den Spuren GHR und AX-2 t_{15} wie auch eine weitere Proteinbande bei ca. 90 kDa. Diese fehlt bei der Mutante GHR. Es könnte sich demnach bei diesem Protein um Filamin handeln, bei dem öfter ein nicht dem Molekulargewicht entsprechendes Laufverhalten im SDS-Gel beobachtet wurde (*Knuth*, persönliche Mitteilung).

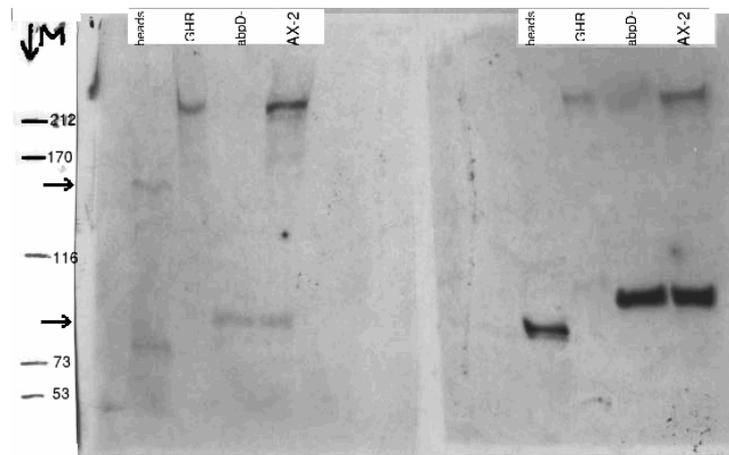


Abbildung 4.38: Western-Blots von Zellextrakten verschiedener Stämme mit unterschiedlichen Antikörpern. Die Spuren der Blots enthalten (von links): Sepharosebeads mit gekoppeltem mAk-260-60-10 nach Immunpräzipitation aus $abpD^{++}$, GHR, $abpD^-$ und AX-2. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: Links: mAk-234-154-9. Rechts: mAk-234-151-1. Gewichtsmarker sind mit ihrem Molekulargewicht in [kDa] eingetragen.

Das SDS-Acrylamidgel zu diesem Blot wurde mit der 1,5fachen Menge an Protein beladen und der Film über Nacht belichtet. Dennoch sind die Banden vor allem beim mAk-234-154-9 sehr schwach.

Der mAk-234-154-9 und der mAk-134-151-1 sind daher als Antikörper sowohl für den eindeutigen Interaptinnachweis im Western-Blot als auch zur Immunpräzipitation von Interaptin nicht geeignet.

Der mAk-260-60-10 ist für den Interaptinnachweis geeignet, erkennt jedoch auch eine Spleißvariante von 160 kDa.

4.6 Intrazelluläre Verteilung von Interaptin

Werden die einzelnen Zellfraktionen von *Dictyostelium discoideum* im Western-Blot mit dem mAk-260-60-10 untersucht, so findet man das Interaptin in der Membranfraktion.

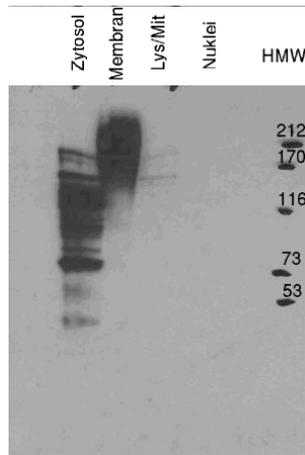


Abbildung 4.39: Western-Blot von *Dictyostelium*-Proteinfraktionen mit mAk-260-60-10. Die Spuren enthalten (von links nach rechts): Zytosol, Membranfraktion, Lysosomen/Mitochondrien, Zellkerne

Der Großteil des Interaptins erscheint in der Membranfraktion in einer intensiven Bande bei den erwarteten 200 kDa. Es treten zudem etliche Degradationsprodukte auf. Im Zytosol finden sich viele Degradationsprodukte. In der Kernfraktion befindet sich kein Interaptin.

4.7 Präzipitation von Interaptin

Es wurde geplant, potentielle Bindungspartner von Interaptin durch Kopräzipitation zu finden. Da das C-terminale Ende mit der potentiellen Membranbindungsdomäne funktionell am ehesten als Kontaktdomäne für einen Bindungspartner in Frage kommt, sollte versucht werden, bakteriell exprimierte Interaptinfragmente zur Kopräzipitation zu nutzen.

Dazu wurde die als C₅ bezeichnete Domäne (vgl. Abb. 1.2) in pET- und pGEX-Vektoren kloniert und in Bakterien exprimiert.

4.7.1 Expression von C₅-HisTag-Protein und Chelatchromatographie

Mit dem pGEX-Vektor konnte bei 37°C und bei 22°C keine Expression in einer prominenten Bande im SDS-Acrylamidgel festgestellt werden. Daher wurde nurmehr mit dem pET-Vektor exprimiert.

Bei Fraktionierung des Zellaufschlusses der bei 37°C gewachsenen und induzierten *E. coli* in lösliche und unlösliche Proteine befand sich das C₅-Fragment wie erwartet überwiegend in der Membranfraktion.

Eine Aufreinigung über eine Nickel-Chelatsäule gelang nicht. Das Protein bindet nur schlecht an das Säulenmaterial, so daß sich bei den Waschschritten bereits sehr viel Protein im Durchlauf findet.

Insgesamt ist keine Aufreinigung auf diesem Wege möglich. Es findet keine signifikante Anreicherung des überexprimierten Proteins statt.

Auf eine eingehendere Variation der chromatographischen Bedingungen wurde verzichtet, da die Immunpräzipitation des vollständigen Interaptins mit einem potentiellen Bindungspartner aus Interaptin-überexprimierenden *abpD*⁺⁺-Zellen mit Hilfe des mAk-260-60-10 erfolgversprechender erschien.

4.7.2 Immunpräzipitation von Interaptin mit CNBr-Sepharosegekoppeltem Interaptin-Antikörper

4.7.2.1 Reinigung der Interaptin-Antikörper

Die Aufreinigung der Antikörper mAk-260-60-10 erfolgte wie in Kapitel *Methoden* (S. 43) beschrieben.

In den beiden Spuren 1 und 2 des SDS-Gels sind die aufgereinigten Antikörper aufgetragen (Abb. 4.40). Alle Proben sind in nicht-reduzierendem Probenpuffer auf das Gel geladen worden, so daß die schweren und leichten Ketten des IgGs zusammen erscheinen. In Spur 3 ist eine Probe aus dem sich der Ammoniumsulfatfällung anschließenden Dialyseschritt aufgetragen. Sie ist stark überladen, daher erscheint die Bande mit den Antikörpern bei zu kleinem apparentem Molekulargewicht.

4.7.2.2 Immunpräzipitation von Interaptin

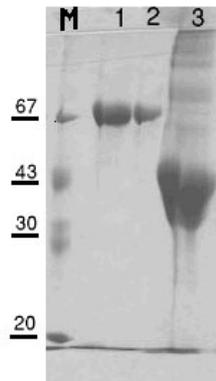


Abbildung 4.40: SDS-Acrylamidgel mit Proben aus der Antikörperaufreinigung von mAk-260-60-10. Die Proben wurden mit nicht-reduzierendem Probenpuffer versetzt. Folgende Auftragung: M: Molekulargewichtsmarker LMW; 1: gepoolte Fraktionen mit OD_{280} zwischen 0,5 und 1; 2: gepoolte Fraktionen mit OD_{280} größer als 1

Nach der Immunpräzipitation wurden die Proben in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen, aber nicht gekocht. Dadurch werden viele Schwefelbrücken nicht aufgetrennt, und es wurde erwartet, daß der Antikörper somit an die Sepharosebeads gekoppelt bleibt und nicht bzw. nur in geringen Mengen im Gel erscheint.

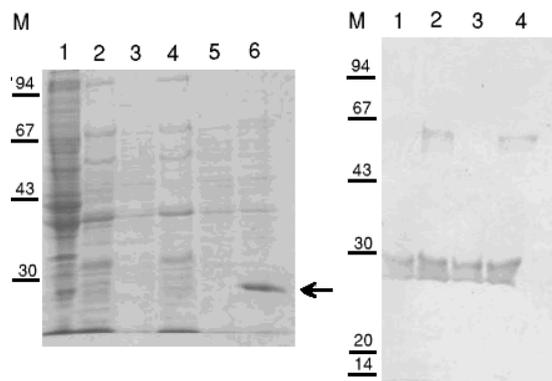


Abbildung 4.41: SDS-Acrylamidgel mit Proben der Immunpräzipitation aus $abpD^{++}$ -Aufschluß. Links: 1,2: Überstand und Pellet der ersten Ultrazentrifugation; 3, 4: Überstand und Pellet der zweiten Ultrazentrifugation; 5: Überstand nach Inkubation mit Sepharose-gekoppeltem Antikörper; 6: Sepharosebeads nach Immunpräzipitation Rechts: M: Gewichtsmarker LMW; 1 und 3: Sepharose-gekoppelter Antikörper, in reduzierendem Probenpuffer bei RT 10 min inkubiert; 2 und 4: Sepharose-gekoppelter Antikörper, in reduzierendem Probenpuffer bei 95°C 10 min inkubiert.

Es erscheint eine intensive Bande bei etwa 30 kDa, die zuerst für ein immunpräzipitiertes Protein gehalten werden musste (Spur 6, Pfeil). Im Western-Blot eines solchen Gels ist

Interaptin deutlich zu sehen (Abb. 4.42). Zwei Banden (ca. 200 kDa und 160 kDa) sind zu sehen (Spur 2). Im Überstand verbleibt noch ein großer Teil des Interaptins (Spur 1). Werden Sepharosebeads mit gekoppeltem Antikörper allein in Probenpuffer gegeben, so

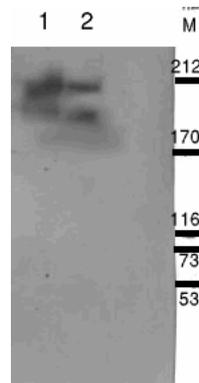


Abbildung 4.42: Western-Blot nach Immunpräzipitation von Interaptin. 1: Überstand nach der Inkubation mit Sepharose-gekoppelten Antikörpern. 2: Sepharosebeads mit gekoppeltem mAk-260-60-10 nach erfolgter Inkubation mit $abpD^{++}$ -Zellaufschluß (vgl. *Methoden*, 3.3.7)

ergibt sich ein Bild wie in Abbildung 4.41 rechts gezeigt.

Werden die Proben vor Auftragung auf das Gel bei RT inkubiert, so ist bei nachfolgender Coomassiefärbung erstaunlicherweise nur die leichte Kette der Antikörper zu sehen, nicht jedoch die schwere Kette (Spuren 1 und 3). Die Spuren 2 und 4 zeigen die gleichen Beads nach Erhitzen der Proben auf 95°C für 10 min. Hier sind, wie erwartet, beide Ketten der IgGs sichtbar.

Da außer der leichten Kette der Antikörper bei der Immunpräzipitation keine weitere Proteinbande sichtbar war, muß davon ausgegangen werden, daß potentielle Bindungspartner des Interaptin entweder nicht fest genug aggregieren, als daß sie in einem solchen Experiment präzipitiert werden könnten, oder daß ihre Konzentration zu gering ist, um ausreichend angefärbt zu werden.

4.8 Immunfluoreszenz an Säugierzellen

An verschiedenen Zelllinien von Säugern wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen mit dem Interaptinantikörper mAk-260-60-10 vorgenommen, um festzustellen, ob es ein Interaptin-Homologes in Säugern geben könnte.

Es wurden folgende Zelllinien getestet:

COS-7	Nierenfibroblasten aus <i>Cercopithecus aethiops</i> (Affe)
HEK 293	embryonale Nierenzellen aus <i>Homo sapiens</i> (Mensch)
C3H/10T $\frac{1}{2}$	Fibroblasten aus <i>Mus musculus</i> (Maus)

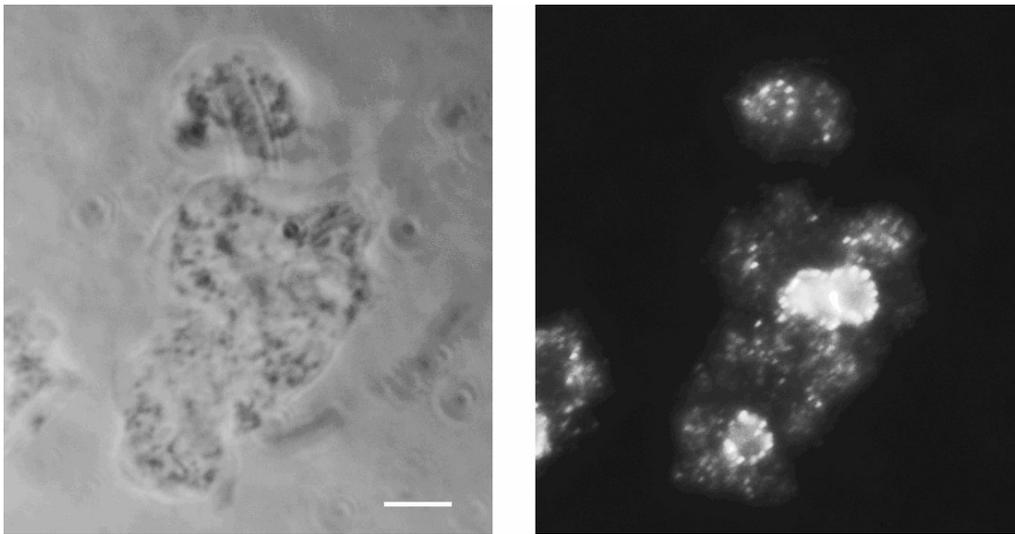


Abbildung 4.43: Immunfluoreszenzaufnahme von methanolfixierten HEK-Zellen mit Cy3-Färbung von Interaptin. Balken: 5 μm

Bei 10T $\frac{1}{2}$ -Zellen und HEK-Zellen ergab sich im wesentlichen das gleiche Bild (Abb. 4.43). Bei beiden Zelllinien wird ein Protein detektiert, dessen Lokalisation in der Nähe der Nukleusmembran Ähnlichkeiten zur Interaptinlokalisierung aufweist.

In Abweichung zu *Dictyostelium discoideum* findet man jedoch punktuell verstärkte Aggregate, die nicht nur in der Nukleusmembran liegen, sondern auch verteilt über den Zellkörper auftreten.

Bei COS-7-Zellen hingegen findet sich diese zelluläre Verteilung nicht. Statt dessen werden die Zell-Zell-Kontakte intensiv gefärbt. Es handelt sich dabei um eine auf die Kontaktbereiche der Zellmembranen beschränkte Lokalisation (Abb. 4.44).

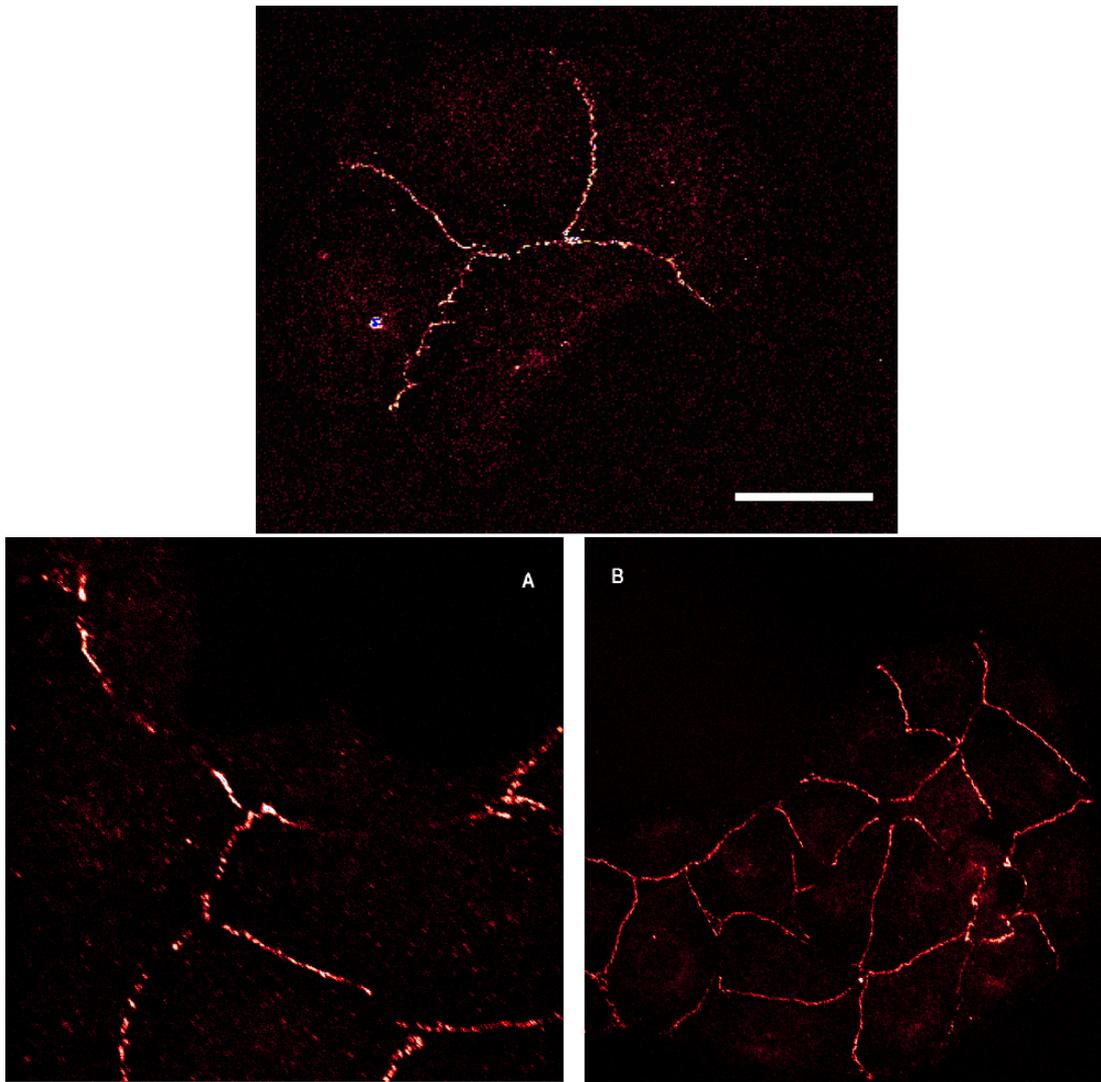


Abbildung 4.44: Immunfluoreszenzaufnahmen von methanolfixierten COS-7-Zellen mit CY3-Färbung von Interaptin. Balken: 5 μm

Kapitel 5

Diskussion

Die bisherigen Erkenntnisse zu Interaptin stammen aus genetischen Untersuchungen und Sequenzanalysen und aus Beobachtungen von *Ponte* im Rahmen der Untersuchung einiger Null-Mutanten Aktin-bindender Proteine, unter anderem der Interaptin-defizienten Mutante $abpD^-$ [*Rivero et al.* (1998), *Ponte et al.* (2000)].

5.1 Schaffung einer Interaptin-überexprimierenden Mutante $abpD^{++}$

Die Schaffung einer Interaptin-überexprimierenden Mutante $abpD^{++}$ gelang mit Hilfe eines targeting-Vektors durch homologe Rekombination des *abpD*-Gens. Durch Insertion des Aktin-15-Promotors in den Promotorbereich unmittelbar vor dem Startcodon wird Interaptin zu jedem Zeitpunkt des Entwicklungszyklusses von *Dictyostelium* exprimiert.

In Southern-Blots wurde nachgewiesen, daß die homologe Rekombination auf DNA-Ebene erfolgreich verlaufen war. Mit der Sonde P1 wird in der Mutante $abpD^{++}$ keine 2,9 kB große Bande detektiert, die der endogenen Bande entsprechen würde. Die durch die Insertion des Promotors neu eingeführte EcoRI-Schnittstelle verschiebt die mit dieser Sonde detektierbare Bande auf 1 kB, welche eindeutig identifiziert wurde.

Die Untersuchung der mRNA in Northern-Blots ergab, daß das Interaptin in der neuen Mutante $abpD^{++}$ auch im einzelligen Stadium (t_0) transkribiert wird. Mit der Sonde P2 konnten eine Bande bei 5,4 kB detektiert werden, die etwas kleiner ist als die endogene Bande beim Wildtyp AX-2. Vermutlich werden durch die Insertion des Aktin-15-Promotors

in den ursprünglichen Promotorbereich des *abpD*-Gens bestimmte Bereiche nicht mehr transkribiert, die jedoch auch in der endogenen Form nicht translatiert werden. Der genaue Transkriptionsstart des *abpD*-Gens ist unbekannt.

Eine weitere Bande bei 5,2 kB wurde bei AX-2 in verschiedenen Entwicklungsstadien gefunden (t_0 und t_{15}), nicht aber bei der Interaptin-defizienten Mutante *abpD*⁻ und bei der neuen Mutante *abpD*⁺⁺. Es handelt sich dabei um eine Spleißvariante des Interaptins mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 160 kDa (vgl. unten).

In Western-Blots konnte auf der Proteinebene eine den gesamten Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum* umfassende Expression von Interaptin festgestellt werden. Bei Fraktionierung des Zellsats in Zytosol, Zellkerne, Mitochondrien und Lysosomen sowie Zellmembranen findet sich der Großteil des Interaptins in der Membranfraktion.

Immunfluoreszenzuntersuchungen an einzelnen Zellen ermöglichten die Untersuchung der subzellulären Verteilung von Interaptin. Es findet sich vor allem an die Nukleusmembran sowie an die Membranen des endoplasmatischen Retikulums assoziiert wieder. Die Plasmamembran enthält jedoch kein Interaptin.

5.2 Charakterisierung von *abpD*⁺⁺ und *abpD*⁻

Entwicklung Vergleichende Untersuchungen zwischen AX-2, *abpD*⁺⁺ und *abpD*⁻ zeigen, daß es im einzelligen Stadium keine auffälligen morphologischen Unterschiede zwischen den Stämmen gibt. Da im normalen Lebenszyklus von *Dictyostelium* Interaptin erst im multizellulären Stadium, etwa neun Stunden nach Beginn der Aggregation, exprimiert wird, war mit einer Veränderung der Morphologie bei der defizienten Mutante *abpD*⁻ nicht zu rechnen. Bei *abpD*⁺⁺ könnte allerdings die Expression des Proteins zu einer morphologischen Veränderung führen, falls Interaptin in regulatorische Prozesse eingriffe. Dies scheint das Aussehen der Zellen betreffend nicht der Fall zu sein.

Der Entwicklungszyklus der drei Stämme wurde untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß es zu Unterschieden sowohl in der Geschwindigkeit der Entwicklung als auch zu morphologischen Unterschieden kommt. So zeigt die Interaptin-überexprimierende Mutante eine um etwa ein bis zwei Stunden beschleunigte Aggregation gegenüber dem Wildtyp, die defiziente Mutante sogar noch etwas mehr. Sie bildet bereits Slugs, während sich die Zellen des Wildtyps noch in der Aggregationsphase befinden. Wie von *Rivero et al.* festgestellt, weisen die *abpD*⁻-Zellen einen Defekt in ihrem Aggregationsverhalten auf [*Rivero et al.* (1998)]. Dies

könnte dazu führen, daß Aggregate kleiner bleiben und sich bereits früher zu Slugs und Fruchtkörpern entwickeln als der Wildtyp. Die Ausbildung der Fruchtkörper ist ebenfalls betroffen. So zeigen die Fruchtkörper der defizienten und der überexprimierenden Mutante eine ausgeprägtere Heterogenität. Wie *Ponte et al.* zeigten, ist die Ausbildung keimungsfähiger Sporen bei der defizienten Mutante $abpD^-$ beeinträchtigt [*Ponte et al.* (2000)]. Sie vermuteten, daß dies auf die Fruchtkörperheterogenität zurückzuführen sein könnte. In Keimungsstudien wurde untersucht, ob die Keimfähigkeit der Sporen durch das Fehlen oder die Überexpression von Interaptin beeinträchtigt sein würde. Es zeigte sich, daß die Sporen des Stammes $abpD^{++}$ eine um 30% erhöhte Keimungsfähigkeit gegenüber den Stämmen AX-2 und $abpD^-$ besitzen. Von den beiden letzteren keimen etwa gleich viele Sporen unter geeigneten Bedingungen aus (ca. 60% der ausplattierten Sporen). *Ponte et al.* berichteten, daß die Zahl der reifen Sporen pro Fruchtkörper bei $abpD^-$ um etwa 50% gegenüber dem Wildtyp reduziert ist. Hier wurde das Augenmerk auf die Zahl der keimungsfähigen Sporen gelegt. Ein Einfluß der Fruchtkörperheterogenität auf das Keimungsverhalten wurde hier nicht weiter untersucht.

Wachstum Interaptin wurde als potentiell membranassoziiertes Protein beschrieben [*Rivero et al.*(1998)]. Daher wurden Untersuchungen bezüglich des Wachstums in Flüssigkultur, der Phagozytose und des Verhaltens gegenüber osmotischem Streß durchgeführt.

Die Untersuchungen des Wachstums unter Standardbedingungen ergaben für den Stamm $abpD^{++}$ keine Unterschiede zum Wildtyp AX-2. Offenbar hat die Überexpression des Interaptins für die Amöben keinen für das Wachstum in Flüssigkultur merklichen Vor- bzw. Nachteil. Bei der Analyse der Generationszeiten unter osmotisch veränderten Bedingungen wurde festgestellt, daß bei Zugabe von 30 mMol NaCl zum Medium die Interaptin-defiziente Mutante im Vergleich mit AX-2-Zellen leicht benachteiligt ist, während $abpD^{++}$ ähnlich schnell wächst wie diese. Alle drei Stämme sind jedoch gegenüber Standardbedingungen benachteiligt. Beim Zusatz von Sorbitol zum Medium wurde der Wildtyp dagegen leicht gegenüber $abpD^{++}$ bevorzugt.

Osmotischer Streß beeinflusst das Zellvolumen und hat somit indirekt vermutlich eine Änderung des Aktin-Zytoskeletts zur Folge. Von Comitín wurde berichtet, daß sein Fehlen zu einer erheblichen Einschränkung des anterograden Transportweges zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat führt [*Schreiner* (2000)]. Bei Interaptin als einem potentiellen Bindeglied zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem

Aktinnetzwerk könnte ein solcher Einfluß vorstellbar sein. Die geringen beobachteten Unterschiede der Stämme abpD⁻ und abpD⁺⁺ zum Wildtyp Ax-2 könnten auf das Einwirken der konstitutiv exprimierten, verkürzten Interaptin-Spleißvariante zurückzuführen sein. In nachfolgenden Studien könnte die vollständige Ausschaltung der Promotorregion bzw. des ersten Introns des *abpD*-Gens ein genaueres Bild vermitteln. Ebenso sind die Unterschiede der drei Stämme beim Wachstum bei erhöhter oder erniedrigter Temperatur gering. Bei 27°C weisen die Amöben aller drei Stämme sehr verlängerte Generationszeiten auf. Die Interaptin-überexprimierende Mutante ist dabei etwas schneller als AX-2 und abpD⁻.

Bei Bestimmung des Wachstums unter phagozytotischen Bedingungen in Schüttelkultur wurde festgestellt, daß die Interaptin-defiziente Mutante sowohl kürzere Generationszeiten als auch insgesamt höhere Zelldichten erreicht als Zellen des Wildtyps und von abpD⁺⁺. Bisher ist ungeklärt, warum die vereinzelt lebenden Zellen diesen Vorteil genießen. In Phagozytoseassays konnte kein kurzzeitiger Geschwindigkeitsvorteil bei der Aufnahme von markierten Hefen gefunden werden. Untersucht man die Vermehrung auf mit *Klebsiella aerogenes* bewachsenen Agarplatten, so stellt man einen enormen Vorteil der Interaptin-defizienten Mutante fest. Vermutlich sind diese Zellen aufgrund ihres eingeschränkten Aggregationsverhaltens und ihres beeinträchtigten phototaktischen Verhaltens nicht in der Lage, großflächig zu aggregieren, sondern die gebildeten unregelmäßigen Aggregate und kleinere Slugs verirren sich bei unkontrollierten Wanderungen öfter an den Rand der abgefressenen Fläche. Dort sind jedoch weiterhin sehr gute Nahrungsbedingungen vorhanden, und die Zellen disaggregieren und leben erneut singular. Der Einfluß des in abpD⁺⁺ gebildeten Interaptins scheint stärker auf eine Organisation der Pseudoplasmodien hinzuwirken, so daß diese einen geregelten, zügigen Entwicklungszyklus durchlaufen. Es kriechen von abpD⁺⁺ und AX-2 offenbar mehr Zellen von den Randbereichen des abgefressenen Bakterienrasens zu Aggregaten zusammen, wodurch der Grenzbereich an *Dictyostelium* verarmt und sich die abgefressene Fläche entsprechend weniger schnell ausdehnt.

Phototaxis Da Interaptin ein im mittleren und späten Stadium des Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum* natürlicherweise exprimiert wird, wurde die Phototaxis von Slugs untersucht. Inzwischen sind etliche Proteine beschrieben, die im phototaktischen System von *Dictyostelium* eine regulatorische Rolle spielen [Darcy et al. (1994), Fisher et al. (1981), Fisher et al. (1997), Stocker et al. (1999), Bonner et al. (1994), Wilkins et al. (2000)]. Das phototaktische System spielt eine wichtige Rolle im Entwicklungszyklus

von *Dictyostelium discoideum*. Es wird vermutet, daß diese Fähigkeit einen evolutiven Vorteil in der natürlichen Umgebung der Amöben bedeutet, da die Wahrscheinlichkeit, Sporen über größere Distanzen verbreiten zu können, an der Oberseite der Blätter auf dem Waldboden erhöht ist [Newell et al. (1969)]. Eng verknüpft mit dem phototaktischen ist das thermotaktische System. Jedoch ist es trotz intensiver Bemühungen bisher nicht gelungen, einen Photorezeptor oder ein thermorezeptorisches Protein aus *Dictyostelium discoideum* zu isolieren.

In den im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Phototaxisexperimenten zeigte sich, daß auch Interaptin offenbar eng mit dem photoregulatorischen System von *Dictyostelium discoideum* verknüpft ist. Slugs aus $abpD^-$ zeigten eine deutliche Behinderung ihres phototaktischen Verhaltens. Sie wiesen im Vergleich mit Wildtyp-Slugs eine deutliche Abweichung von der Ideallinie zum Licht auf. Gleichzeitig war die Fähigkeit der Interaptin-überexprimierenden Mutante deutlich verbessert, im Verhältnis zu AX-2 lange Wege mit geringen Abweichungen zur Ideallinie zurückzulegen. Dies bedeutet einen Selektionsvorteil, wie Ponte et al. (2000) in anderem Zusammenhang zeigten. Die kurzen Wanderungstrecken von $abpD^-$ sowie deren „Umwege“ bedeuten einen klaren Nachteil im Bestreben, zum Licht und damit günstigeren Lebensbedingungen in ihrer natürlichen Umgebung zu gelangen.

Es wurde berichtet, daß die Zelldichte Einfluß auf das Migrationsverhalten der Slugs habe [Fisher et al. (1997)]. In dieser Arbeit vorgestellte Ergebnisse der Phototaxis wurden bei gleicher, relativ geringer Zelldichte vorgenommen. Die Zelldichte sollte demnach kaum Auswirkungen auf die hier untersuchten Slugs haben.

5.3 Slugmischexperimente

Die Verteilung von Interaptin-exprimierenden Zellen in Slugs des Wildtyps AX-2 wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht [Rivero et al. (1998)]. Dabei stellte sich heraus, daß im frühen Kulminationsstadium Interaptin-exprimierende Zellen vor allem in der Spitze jedoch auch verteilt über den entstehende Slug erscheinen. Im Verlauf des Migrationsstadiums sortieren sich diese Zellen gezielt in den vorderen Spitzenbereich sowie in das hintere Ende des Slugs. Diese Bereiche enthalten bevorzugt Prä-Stielzellen, während die Prä-Sporenzellen im Hauptkörper des Slugs zu finden sind. Der Slug ist allerdings keine durch feste Barrieren unterteilte Struktur, sondern Zellen migrieren während der Wanderungsphase des Slugs auch innerhalb desselben.

Es wurden daher $abpD^{++}$ und $abpD^{-}$ mit act-GFP transfiziert. Ihre Fähigkeit zur Slugbildung sowie die Fluoreszenz dieser wurde untersucht und keine Auffälligkeiten festgestellt. Ebenso wurde bei einem Aktin-GFP exprimierenden AX-2-Stamm keine Besonderheiten der Slugbildung detektiert.

In Mischungen des Stammes $abpD^{++}$ -actGFP mit einem Anteil von 5% in einem Slug aus AX-2-Zellen sortieren die Interaptin-reichen Zellen eindeutig in zwei distinguierte Bereiche des Slugs: zum einen in einen Bereich unmittelbar hinter der eigentlichen Spitzenregion, zum anderen an das hintere Ende des Slugs. Vor allem in der vorderen Region nahe der Spitze befinden sich Prä-Sporen-Zellen mit der größten Wahrscheinlichkeit, Sporen zu bilden. Die Übereinstimmung mit den immunmarkierten, Interaptin-exprimierenden AX-2-Zellen ist nicht gegeben. $abpD^{-}$ -actGFP-Zellen sortieren sich hingegen aus der Hinter-Spitzen-Region aus und sind über den gesamten Hauptkörper des Slugs verteilt.

Entsprechend wurde untersucht, wie sich AX-2- bzw. $abpD^{-}$ -Zellen in Slugs aus überwiegend Interaptin-überexprimierenden Zellen verhalten. Dabei stellte sich heraus, daß die AX-2-Zellen eine mehr oder weniger statistische Verteilung im Slug einnahmen, die defiziente Mutante $abpD^{-}$ jedoch größtenteils im Hauptkörper des Slugs angesiedelt waren.

Werden $abpD^{++}$ -actGFP-Zellen in geringer Konzentration mit $abpD^{-}$ -Zellen gemischt, so zeigt sich in Slugs eine Sortierung in die Regionen, aus denen die Zellen des „upper-“ und „lower cup“ hervorgehen. Dies konnte auch in Fruchtkörpern gezeigt werden. Hier sind allerdings auch einige Zellen des $abpD^{++}$ -Stammes über die gesamte Sporenkapsel verteilt. Die Funktion der membranassoziierten Domäne von Interaptin ist bislang nicht bekannt. Daher wurde die C-terminale Membranbindungsdomäne von Interaptin an GFP fusioniert und das Konstrukt in die drei in dieser Arbeit untersuchten Stämme transfiziert. Die Verteilung eines kleinen Anteils solcherart markierter Zellen in Slugs aus unmarkierten Zellen der drei Stämme wurde untersucht.

In Slugs, die nur aus AX2-C₅GFP-Zellen bestanden, wurde kein detektierbares Verteilungsmuster gefunden, was eine statistische Verteilung nahelegt. Die Slugbildung war auch nicht auffällig verändert. Man kann davon ausgehen, daß die Expression des Fusionskonstrukts keinen wesentlichen Nachteil für das Überleben der Zellen mit sich bringt. In Flüssigkultur ließen sich Zellen aller drei Stämme mit dem GFP-Fusionsprotein problemlos anziehen.

In Mischungen von 5% AX2-C₅GFP-Zellen in AX-2-Zellen ohne das Konstrukt wurde eine distinguierte Verteilung der AX2-C₅GFP-Zellen gefunden. Sie sortieren sich in einen Bereich des vorderen Hauptkörpers des Slugs, werden jedoch praktisch nicht am hinteren Slug-

ende oder in der „Tip“-Region detektiert. Eine ähnliche Lokalisation wurde bei Interaptin-überexprimierenden Zellen in Slugs aus AX-2 gefunden, wobei allerdings auch Zellen den hinteren Slugbereich besetzten. Die deutliche distinguierte regionale Verteilung deutet auf einen regulierten Organisationsmechanismus im Slug hin, bei dem die C-terminale Region des Interaptins eindeutig beteiligt ist. Die Zellen sind genetisch in der Lage, auch ein vollständiges Interaptin zu exprimieren, könnten also theoretisch jede Funktion in dem Slug übernehmen. Offenbar ist die frühe Expression von Interaptin im Sortierungsprozeß von entscheidender Bedeutung für das spätere Schicksal der Zelle.

In Slugs aus AX-2-Zellen, denen $abpD^-$ -C₅GFP-Zellen zugesetzt waren, findet man ebenfalls diese Verteilung in sehr definierter Form wieder. Dieser Sortierung von Zellen scheint ein Prozeß zugrunde zu liegen, bei dem die Membranassoziation von Interaptin eine Rolle im Regulationsprozeß spielt.

Werden $abpD^-$ -C₅GFP-Zellen einem Slug aus $abpD^-$ zugesetzt, so findet ebenfalls die erwähnte Regionalisierung statt, allerdings nicht in der gleichen Deutlichkeit. Es findet sich eine breitere Verteilung der markierten Zellen im Hauptkörper was auf einen Defekt im Rückkopplungsmechanismus der Regulation hindeutet. Interaptin scheint an einem Mechanismus beteiligt zu sein, der bei den nicht-involvierten Zellen zu einer Hemmung der Wanderung in die Prä-Stielzellen-Region führt.

Interessanterweise findet sich die distinguierte Verteilung in die vordere Halsregion der Slugs auch bei Mischungen aus $abpD^-$ -C₅GFP-Zellen in $abpD^{++}$ -Zellen wieder. Obwohl fast alle Zellen Interaptin exprimieren, reichern sich die den C-terminus exprimierenden Zellen in der Halsregion an. Dies ist ein weiteres Indiz für die funktionelle Bedeutung der membranassoziierten Domäne im Sortierungsprozeß der Slugs. Hierbei scheint es von einiger Wichtigkeit zu sein, daß der regulatorische, mittlere Teil von Interaptin nicht exprimiert werden kann. Mischt man nämlich AX2-C₅GFP-Zellen in $abpD^{++}$, so findet sich eine deutlich breitere, weniger augenfällige Verteilung. In solchen Slugs findet man hauptsächlich die GFP-exprimierenden Zellen am hinteren Rand der Slugs und weniger in der Halsregion.

5.4 Charakterisierung der Interaptinantikörper

Es wurden drei Antikörper gegen Interaptin untersucht. Zwei von diesen sind gegen die Aktin-Bindungsdomäne gerichtet (mAk-234-151-1 und mAk-234-154-9), einer gegen die „rod“-Domäne (mAk-260-60-10). In Western-Blots mit Zellaufschlüssen verschiedener Mu-

tanten wurde gezeigt, daß mAK-234-151-1 und mAk-234-154-9 Interaptin nicht eindeutig erkennen, sondern mit Filamin kreuzreagieren. Sie sind daher nicht zum Interaptinnachweis geeignet.

Der mAk-260-60-10 hingegen erkennt außer Interaptin selbst noch eine Spleißvariante von 160 kDa. Da der Transkriptionsstart von Interaptin nicht genau bekannt ist und aus genetischen Analysen eine Promotoraktivität des ersten Introns vermutet wird [Rivero, pers. Mitteilung], kann die Spleißvariante in beiden Mutanten, $abpD^{++}$ und $abpD^{-}$, exprimiert werden.

5.4.1 Immunpräzipitation von Interaptin

Mit dem mAk-260-60-10 wurde versucht, durch Kopplung des Antikörpers an CNBr-aktivierte Sepharose in einer Immunpräzipitation Interaptin und möglicherweise einen potentiellen Bindungspartner zu präzipitieren. Die Präzipitation von Interaptin gelang gut, jedoch wurde kein Bindungspartner isoliert. Es wurde in Coomassie-gefärbten Gelen ein Protein von 30 kDa entdeckt, bei dem zuerst vermutet wurde, daß es sich um einen potentiellen Bindungspartner handeln könnte. Es zeigte sich jedoch, daß es sich bei diesem Protein um die leichte Kette des Antikörpers handelte. Statistisch hätte man eine Kopplung beider Ketten an die Sepharose erwartet, wodurch sich unter annähernd nicht-reduzierenden Bedingungen nur wenig oder kein Protein von den Beads hätte lösen dürfen. Sollten dennoch die IgGs reduziert werden, so hätte man eine statistische Verteilung erwartet, womit beide Ketten in der Färbung sichtbar werden sollten. Dies war jedoch nicht der Fall; nur die leichte Kette wurde in der Coomassie-Färbung sichtbar. Die schwere Kette fand sich erst in Proben, bei denen die Sepharose-Beads in reduzierendem Probenpuffer aufgekocht wurden.

5.5 Immunfluoreszenz in COS-7-Zellen

Es wurden methanolfixierte Zellen verschiedener Säugetier-Zelllinien mit dem Interaptin-Antikörper mAk-260-60-10 inkubiert und die Präparate auf potentielle Fluoreszenz untersucht. In HEK 293-Zellen und $c3H/10T\frac{1}{2}$ -Zellen findet sich eine Immunfärbung, die auf ein Interaptin-ähnliches Protein hindeutet. Es wird ein Protein detektiert, dessen Lokalisation in Flecken nahe der Nukleusmembran ähnlich wie bei *Dictyostelium* gefunden wird. Es sind

weitere Untersuchungen nötig, um herauszufinden, ob es ein Interaptin-homologes Protein in Säugern gibt.

Eine spezifische subzelluläre Lokalisation wurde dagegen bei COS-7 Zellen gefunden. Der Interaptin-Antikörper erkennt spezifisch ein Protein aus den Zell-Zell-Kontakten dieser Nierenfibroblasten. Das beteiligte Protein konnte bisher nicht isoliert werden. Die Aufklärung der Identität dieses Proteins könnte zu einem weiteren Einblick in die Mechanismen der Zell-Zell-Kontakte von aggregierenden Zellen führen.

Literaturverzeichnis

- [1] Baker J.P., Titus M.A., Myosins: matching functions with motors, *Curr. Op. Cell Biol.*, 10, S. 80-86 (1998)
- [2] Bennett H., Condeelis J.S., Isolation of an immunoreactive analogue of brain fodrin that is associated with the cell cortex of *Dictyostelium amoebae*, *Cell Motil. Cytoskel.*, 11, S. 303-317 (1988)
- [3] Bonner J.T., Evidence for the formation of aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*, *J. Exp. Zool.*, 106, S. 1-26 (1947)
- [4] Bonner J.T., Williams J., Inhibition of cAMP-dependent protein kinase in *Dictyostelium* prestalk cells impairs slug migration and phototaxis, *Dev. Biol.*, 164(1), S. 325-327 (1994)
- [5] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-binding dye, *Anal. Biochem.*, 72, S. 248 (1976)
- [6] Brenner S.L., Korn E.D., Spectrin-actin interaction. Phosphorylated and dephosphorylated spectrin tetramer cross-links F-actin, *J. Biol. Chem.*, 254(17), S. 8620-8627 (1975)
- [7] Brown A., Bernier G., Mathieu M., Rossant J., Kothary R., The mouse *dystonia musculorum* gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1, *Nature Genet.*, 10, S. 301-306 (1995)
- [8] Burridge K., Phillips J.H., Association of actin and myosin with secretory granule membranes, *Nature*, 254, S. 526-529 (1975)
- [9] Clark E.A., Brugge J.S., Integrins and signal transduction pathways: The road taken, *Science*, 268, S. 233-239 (1995)
- [10] Corrie J.E.T., Brandmeier B.D., Ferguson R.E., Trentham D.R., Kendrick-Jones J., Hopkins S.C., van der Heide U.A., Goldman Y.E., Sabido-David C., Dale R.E., Criddle S., Irving M., Dynamic measurement of myosin light-chain-domain tilt and twist in muscle contraction, *Nature*, 400, S. 425-430 (1999)

-
- [11] Darcy P.K., Wilczynska Z., Fisher P.R., Genetic analysis of *Dictyostelium* slug phototaxis mutants, *Genetics*, 137(4), S. 977-985 (1994)
- [12] de Arruda M.W., Watson S., Lin C.S., Leavitt J., Matsudaira P., *J. Cell Biol.*, 111(3), S. 1069-1079 (1990)
- [13] De Lozanne A., Spudich J.A., Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination, *Science*, 236, S. 1086-1091 (1987)
- [14] Devereux J., Haeberli P., Smithies O., A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX, *Nucleic Acids Res.*, 12, S. 387-395 (1984)
- [15] Dormann D., Vasiev B., Weijer C.J., The control of chemotactic movement during *Dictyostelium* morphogenesis, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 355(1399), S. 983-991 (2000)
- [16] Eddy R.J., Han J., Sauterer R.A., Condeelis J.S., A major agonist-regulated capping activity in *Dictyostelium* is due to the capping protein, cap32/34, *Biochim. Biophys. Acta*, 1314(3) S. 247-259 (1996)
- [17] Eichinger L., Koppel B., Noegel A.A., Schleicher M., Schliwa M., Weijer K., Witke W., Janmey P.A., Mechanical perturbation elicits a phenotypic difference between *Dictyostelium* wild-type cells and cytoskeletal mutants, *Biophys. J.*, 70(2), S. 1054-1060 (1996)
- [18] Ennis H.L., Dao D.N., Pukatzki S.U., Kessin R.H., *Dictyostelium* amoebae lacking an F-box protein form spores rather than stalk in chimeras with wild type, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, S. 3292-3297 (2000)
- [19] Evans L.L., Lee A.J., Bridgman P.C., Mooseker M.S., Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport, *J. Cell Sci.*, 111, S. 2055-2066 (1998)
- [20] Faix J., Gerisch G., Noegel A.A., Constitutive overexpression of the contact site A glycoprotein enables growth-phase cells of *Dictyostelium discoideum* to aggregate, *EMBO J.*, 9(9), S. 2709-2716 (1990)
- [21] Faix J., Steinmetz M., Boves H., Kammerer R.A., Lottspeich F., Mintert U., Murphy J., Stock A., Aebi U., Gerisch G., Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin-bundling proteins with a parallel coiled-coil tail, *Cell*, 86, S. 631-642 (1996)
- [22] Fath K.R., Trimbur G.M., Burgess D.R., Molecular motors and spectrin matrix associate with Golgi membranes in vitro, *J. Cell Biol.*, 139, S. 1169-1181 (1997)
- [23] Fisher P.R., Genetics of phototaxis in a model eukaryote, *Dictyostelium discoideum*, *Bioessays*, 19(5), S. 397-407 (1997)

- [24] Fisher P.R., Smith E., Williams K.L., An extracellular signal controlling phototactic behavior by *Dictyostelium* slugs, *Cell*, 23(3), S. 799-807 (1981)
- [25] Gerisch G., Zellkontaktbildung vegetativer und aggregationsreifer Zellen von *Dictyostelium*, *Naturwissenschaften*, 48, S. 436-437 (1965)
- [26] Ginsburg G.T., Gollop R., Yu Y., Louis J.M., Saxe C.L., Kimmel A.R., The regulation of *Dictyostelium* development by transmembrane signalling, *J. Eukaryot. Microbiol.*, 42(3), S. 200-205 (1995)
- [27] Gottwald U., Brokamp R., Karakesisoglou O., Schleicher M., Noegel A.A., Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in *Dictyostelium discoideum* and characterization of its interaction with actin, *Mol. Biol. Cell*, 7(2), S. 261-272 (1996)
- [28] Hammonds R.G., Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domains of alpha-actinin, *Cell*, 51, S. 1 (1987)
- [29] Hanakam F., Albrecht R., Eckerskorn C., Matzner M., Gerisch G., Myristoylated and non-myristoylated forms of the pH sensor protein hisactophilin II: intracellular shuttling to plasma membrane and nucleus monitored in real time by a fusion with green fluorescent protein, *EMBO J.*, 15(12), S. 1935-2943 (1996)
- [30] Hartwig J.H., Stossel T.P., Isolation and properties of actin, myosin, and a new actinbinding protein in rabbit alveolar macrophages, *J. Biol. Chem.*, 250(14), S. 5696-5705 (1975)
- [31] Haugwitz M., Noegel A.A., Rieger D., Lottspeich F., Schleicher M., *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function, *J. Cell Sci.*, 100, S. 481-489 (1991)
- [32] Hed J., Methods for distinguishing ingested from adhering particles, *Meth. Enzymol.*, 132, S. 198-204 (1986)
- [33] Hitt A.L., Hartwig J.H., Luna E.J., Ponticulin is the major high affinity link between the plasma membrane and the cortical actin network in *Dictyostelium*, *J. Cell Biol.*, 126, S. 1433-1444 (1994)
- [34] Hock R.S., Condeelis J.S., Isolation of a 240-kilodalton actin-binding protein from *Dictyostelium discoideum*, *J. Biol. Chem.*, 262, S. 394-400 (1987)
- [35] Holmes D.S., Quigley M., A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids, *Anal. Biochem.*, 114(1), S. 193-197 (1981)
- [36] Howard P.K., Ahern K.G., Firtel R.A., Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*, *Nucleic Acids Res.*, 16(6), S 2613-2623 (1988)

- [37] Huang J.-D., Brady S.T., Richards B.W., Stenoien D., Resau J.H., Copeland N.G., Jenkins N.A., Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors, *Nature*, 397, S. 267-270 (1999)
- [38] Ikonen E., de Almeida J.B., Fath K.R., Burgess D.R., Ashman K., Simons K., Stow J.L., Myosin II is associated with Golgi membranes: identification of p200 as non-muscle myosin II on Golgi-derived vesicles, *J. Cell Sci.*, 110, S. 2155-2164 (1997)
- [39] Jung G., Wu X.F., Hammer J.A., *Dictyostelium* mutants lacking multiple classic myosin I isoforms reveal combinations of shared and distinct functions, *J. Cell Biol.*, 133, S. 305-323 (1996)
- [40] Klein P.S., Sun T.J., Saxe C.L.3rd, Kimmel A.R., Johnson R.L., Devreotes P.N., A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*, *Science*, 241(4872), S. 1467-1472 (1988)
- [41] Kreitmeier M., Gerisch G., Heizer C., Muller-Taubenberger A., A talin homologue of *Dictyostelium* rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant, *J. Cell Biol.*, 129(1), S. 179-188 (1995)
- [42] Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, S. 680-685 (1970)
- [43] Lehrach H., Diamond D., Wozney J.M., Boedtker H., RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination, *Biochemistry*, 16(21), S. 4743-4751 (1977)
- [44] Loomis W.F., Role of PKA in the timing of developmental events in *Dictyostelium* cells, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3) S. 684-694 (1998)
- [45] Ma S., Fey P., Chisholm R.L., Molecular Motors and membrane traffic in *Dictyostelium*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1525(3), S. 234-244 (2001)
- [46] Machesky L., Gould K.L., The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer, *Curr. Op. Cell Biol.*, 11, S. 117-112 (1999)
- [47] Malchow D., Droege W., Strominger J.L., Solubilization and partial purification of lymphocyte specific antigens in the chicken, *Eur. J. Immunol.*, 2(1), S. 30-35 (1972)
- [48] Mandelkow E., Mandelkow E.M., Microtubules and microtubule-associated proteins, *Curr. Op. Cell Biol.*, 7(1), S. 72-81 (1995)
- [49] Maniak M., Rauchenberger R., Albrecht R., Murphy J., Gerisch G., Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag, *Cell*, 83, S. 915-924 (1995)

-
- [50] Maree A.F., Hogeweg P., How amoeboids self-organize into a fruiting body: multicellular coordination in *Dictyostelium discoideum*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(7), S. 3879-3883 (2001)
- [51] Matsudaira P., Modular organization of actin crosslinking proteins, Trends Biochem. Sci., 16, S. 87-92 (1991)
- [52] Mehdy M.C., Firtel R.A., A secreted factor and cyclic AMP jointly regulate cell-type specific gene expression in *Dictyostelium discoideum*, Mol. Cell Biol., 5, S. 705-713 (1985)
- [53] Mehdy M.C., Ratner D., Firtel R.A., Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*, Cell, 32(3), S. 763-771 (1983)
- [54] Mernall V., Post P.L., Mooseker M.S., Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction, Science, 279, S. 527-533 (1998)
- [55] Messing J., Vieira J., A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double digest restriction fragments, Biotechnology, 24, S. 202-209 (1992)
- [56] Mitchison T.J., Cramer L.P., Actin-based cell motility and cell locomotion, Cell, 84, S. 371-379 (1996)
- [57] Moritz M., Braunfeld M.B., Guénebaut V., Heuser J., Agard D.A., Structure of the γ -tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation, Nat. Cell Biol., 2, S. 365-370 (2000)
- [58] Mu X., Lee B., Louis, J.M., Kimmel A.R., Sequence-specific protein interaction with a transcriptional enhancer involved in the autoregulated expression of cAMP receptor I in *Dictyostelium*, Development, 125(18), S. 3689-3698 (1998)
- [59] Müller K., Gerisch G., A specific glycoprotein as the target site of adhesion blocking Fab in aggregating *Dictyostelium*-cells, Nature, 274, S. 445-449 (1978)
- [60] Newell P.C., Telser A., Sussman M., Alternative developmental pathways determined by environmental conditions in the slime mold *Dictyostelium discoideum*, J. Bacteriol., 100, S. 763-768 (1969)
- [61] Noegel A., Gerisch G., Stadler J., Westphal M., Complete sequence and transcript regulation of a cell adhesion protein from aggregating *Dictyostelium*-cell, EMBO J., 5, S. 1473-1476 (1986)
- [62] Noegel A.A., Welker D.L., Metz B.A., Williams K.L., Presence of nuclear associated plasmids in the lower eucaryote *Dictyostelium discoideum*, J. Mol. Biol., 185(2), S. 447-450 (1985)

- [63] Noegel A.A., Witke W., Schleicher M., Calcium-sensitive non-muscle alpha-actinin contains EF-hand structure and highly conserved regions, *FEBS Lett.*, 221(2), S. 391-396 (1987)
- [64] van Oudenaarden A., Theriot J.A., Cooperative symmetry-breaking by actin polymerization in a model for cell motility, *Nat. Cell Biol.*, 1, S. 493-499 (1999)
- [65] Palsson E., Othmer H.G., A model for individual and collective cell movement in *Dictyostelium discoideum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(19) S. 10448-10453 (2000)
- [66] Picart C., Dalhaimer P., Discher D.E., Actin protofilament orientation in deformation of the erythrocytic membrane skeleton, *Biophys. J.*, 79(6), S. 2987-3000 (2000)
- [67] Ponte E., Bracco E., Faix J., Bozzaro S., Detection of subtle phenotypes: the case of the cell adhesion molecule csA in *Dictyostelium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(16), S. 9360-9365 (1998)
- [68] Ponte E., Rivero F., Fechheimer M., Noegel A.A., Bozzaro S., Severe developmental defects in *Dictyostelium* null mutants for actin-binding proteins, *Mech. Dev.*, 91, S. 153-161 (2000)
- [69] Prassler J., Stocker S., Mariott G., Heidecker M., Kellermann J., Gerisch G., Interaction of a *Dictyostelium* member of the plastin/fimbrin family with actin filaments and actin-myosin complexes, *Mol. Biol. Cell*, 8(1), S. 83-95 (1997)
- [70] Raper K.B., *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves, *J. Agr. Res.*, 50, S. 88-96 (1935)
- [71] Rice S., Lin A.W., Safer D., Hart C.L., Naber N., Carragher B.O., Cain S.M., Pechatnikova E., Wilson-Kubalek E.M., Whittaker M., Pate E., Cooke R., Taylor E.W., Milligan R.A., Vale R.D., A structural change in the kinesin motor protein that drives motility, *Nature*, 402, S. 778-784 (1999)
- [72] Rivero F., Kuspa A., Brokamp R., Matzner M., Noegel A.A., 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, S. 735-750 (1998)
- [73] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)
- [74] Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.D., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N., Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia, *Biotechnology*, 24, S. 476-480 (1992)

- [75] Saxe C.L.3rd, Yu Y., Jones C., Baumann A., Haynes C., The cAMP receptor subtype cAR2 is restricted to a subset of prestalk cells during *Dictyostelium* development and displays unexpected DIF-1 responsiveness, *Dev. Biol.*, 174(2), S. 202-213 (1996)
- [76] Schreiner T., Untersuchungen zur *in vivo*-Funktion von Comitín, einem aktinbindenden Protein aus *Dictyostelium discoideum*, Dissertation, Köln (2000)
- [77] Soede R.D., Insall R.H., Devreotes P.N., Schaap P., Extracellular cAMP can restore development in *Dictyostelium* cells lacking one, but not two subtypes of early cAMP receptors (cARs). Evidence for involvement of cAR1 in aggregative gene expression, *Development*, 120(7), S. 1997-2000 (1994)
- [78] Sotiropoulos A., Gineitis D., Copeland J., Treisman R., Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics, *Cell*, 98, S. 159-169 (1999)
- [79] Southern E.M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, 98(3), S. 503-517 (1975)
- [80] Stocker S., Hiery M., Marriott G., Phototactic migration of *Dictyostelium* cells is linked to a new type of gelsolin-related protein, *Mol. Biol. Cell*, 10(1), S. 161-178 (1999)
- [81] Tabb J.S., Molyneaux B.J., Cohen D.L., Kuznetsov S.A., Langford G.M., Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by Myosin V, *J. Cell Sci.*, 111, S. 3221-3234 (1998)
- [82] Tang L., Ammann R., Gao T., Gomer R.H., A cell number-counting factor regulates group size in *Dictyostelium discoideum* by differentially modulating cAMP-induced cAMP and cGMP Pulse sizes, *J. Biol. Chem.*, 276(29) S. 27663-27669 (2001)
- [83] Traynor D., Milne J.L., Insall R.H., Kay R.R., Ca²⁺ signalling is not required for chemotaxis in *Dictyostelium*, *EMBO J.*, 19(17), S. 4846-4854 (2000)
- [84] Tsujioka M., Yokoyama M., Nishio K., Kuwayama H., Morio T., Katoh M., Urushihara H., Saito T., Ochiai H., Tanaka Y., Takeuchi I., Maeda M., Spatial expression patterns of genes involved in cyclic AMP responses in *Dictyostelium discoideum* development, *Dev. Growth Differ.*, 43(3), S. 275-283 (2001)
- [85] Vithalani K.K., Parent C.A., Thorn E.M., Penn M., Larochelle D.A., Devreotes P.N., de Lozanne A., Identification of Darlin, a *Dictyostelium* protein with *armadillo*-like repeats that binds to small GTPases and is important for the proper aggregation of developing cells, *Mol. Biol. Cell*, 9, S. 3095-3106 (1998)
- [86] Watts D.J., Ashworth J.M., Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture, *Biochem. J.*, 119(2), S. 171-174 (1970)

- [87] Weeks G., Signalling molecules involved in cellular differentiation during *Dictyostelium* morphogenesis, *Curr. Opin. Microbiol.*, 3(6), S. 625-630 (2000)
- [88] Weiner O.H., Murphy J., Griffiths G., Schleicher M., Noegel A.A., The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus, *J. Cell Biol.*, 123, S. 23-34 (1993)
- [89] Westphal M., Jungbluth A., Heidecker M., Muhlbauer B., Heizer C., Schwartz J.M., Marriott G., Gerisch G., Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein, *Curr. Biol.*, 7(3), S. 176-183 (1997)
- [90] Wiese C., Zheng Y., A new function for the γ -tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap, *Nat. Cell Biol.*, 2, S. 358-364 (2000)
- [91] Wilkins A., Khosla M., Fraser D.J., Spiegelman G.B., Fisher P.R., Weeks G., Insall R.H., *Dictyostelium* RasD is required for normal phototaxis, but not differentiation, *Genes Dev.*, 14(11), S. 1407-1413 (2000)
- [92] Williams J., Hoper N., Early A., Traynor D., Harwood A., Abe T., Simon M.N., Veron M., Interacting signalling pathways regulating prestalk cell differentiation and movement during the morphogenesis of *Dictyostelium*, *Dev. Suppl.*, S. 1-7 (1993)
- [93] Williams K.L., Newell P.C., A genetic study of aggregation in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis, *Genetics*, 82(2), S. 287-307 (1976)
- [94] Wuestehube L.J., Chia C.P., Luna E.J., Indirect immunofluorescence localization of ponticulin in motile cells, *Cell Motil. Cytoskeleton*, 13(4), S. 245-263 (1990)
- [95] Xiao Z., Thang N., Murphy D.B., Devreotes P.N., Dynamic distribution of chemoattractant receptors in living cells during chemotaxis and persistent stimulation, *J. Cell Biol.*, 139(2), S. 365-374 (1997)
- [96] Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J., Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene*, 33(1), S. 103-119 (1985)
- [97] Yu Y., Saxe C.L.3rd, Differential distribution of cAMP receptors cAR2 and cAR3 during *Dictyostelium* development, 173(1), S. 353-356 (1996)

Zusammenfassung

Interaptin, ein 204 kDa großes Protein der α -Aktinin-Superfamilie aus *Dictyostelium discoideum*, ist mit der Kernmembran und dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert. Eine Interaptin-überexprimierende Mutante, $abpD^{++}$, wurde erzeugt und die homologe Rekombination verifiziert. Eine bereits existierende, jedoch nicht umfassend charakterisierte Interaptin-defiziente Mutante $abpD^{-}$ und der neue Stamm $abpD^{++}$ wurden zusammen mit dem Wildtyp AX-2 vergleichend charakterisiert. Im einzelligen Stadium sind unter pinozytotischen Bedingungen bei verschiedenen Temperaturen oder unter osmotischem Streß keine nennenswerten Unterschiede der drei Stämme beobachtet worden. Unter phagozytotischen Bedingungen konnte ein Vorteil der defizienten Mutante konstatiert werden. Bei Vergleichen des Wachstums auf Bakterienrasen, also unter phagozytotischen Bedingungen, zeigten die Interaptin-defizienten Zellen einen Wachstumsvorteil. Vermutlich sind Defekte im Aggregationsverhalten für dies verantwortlich. Slugs aus Interaptin-überexprimierenden Zellen zeigten eine verbesserte Phototaxis, während die $abpD^{-}$ -Mutante hier deutliche Defizite zeigte.

In Mischexperimenten wurden Slugs der drei verschiedenen Stämme mit Aktin-GFP transfiziert und die Sortierung der Interaptinmutanten im Slug untersucht. Interaptin-exprimierende Zellen reichern sich überwiegend in der Halsregion von Slugs an. Zellen dieser Bereiche gehören zu den Prä-Stiel-Zellen. AX-2-, $abpD^{++}$ - und $abpD^{-}$ -Zellen, denen die C-terminale Membranbindungsdomäne von Interaptin in einem Fusionskonstrukt mit GFP transfiziert wurde, zeigten ein ebensolches Sortierungsmuster, sogar in Slugs, die überwiegend aus Zellen der Interaptin-überexprimierenden Mutante $abpD^{++}$ bestanden. Es scheint daher gesichert, daß die Membranbindungsdomäne von Interaptin eine wichtige Rolle im Differenzierungsprozeß innerhalb eines Pseudoplasmodiums aus *Dictyostelium discoideum* spielt und entscheidend an der Lokalisation der Zelle im Slug beteiligt ist.

In Immunfluoreszenzuntersuchungen mit einem Interaptinantikörper an COS-7-Zellen wurde ein Protein detektiert, das spezifisch an Zell-Zell-Kontakten auftritt.

Abstract

Interaptin, a 204 kDa protein of the α -actinin-superfamily of *Dictyostelium discoideum*, is associated with the nuclear membrane and membranes of the endoplasmic reticulum. An interaptin-overexpressing mutant, $abpD^{++}$, was generated via homologous recombination. An already existing, but not yet fully characterized knock-out mutant, $abpD^{-}$, the newly constructed mutant $abpD^{++}$ and the wild-type strain AX-2 were characterized. In the single-cell state under pinocytotic conditions, at various temperatures or under osmotic stress no advantage or disadvantage of any strain was detected. However, when grown on a lawn of *Klebsiella aerogenes* or under phagocytotic conditions in shaking-culture, the knock-out mutant was found to have a considerable advantage in growth. This might be due to the defect in aggregation in this mutant. Slugs of the overexpressing mutant had a significant advantage in phototaxis, while this was impaired in the knock-out strain.

In cell sorting experiments cells of either strain were mixed with actin-GFP expressing cells of the other strains and developed to slugs. The distribution of the fluorescent cells was determined, and the interaptin-expressing cells were found to accumulate just behind the tip-region where pre-stalk cells are located. The C-terminal, membrane-associated domain of interaptin was fused to GFP, transfected into AX-2 and $abpD^{-}$ -cells, and cell sorting experiments were performed. The distribution pattern was found to be the same, even if the slug consisted mainly of interaptin overexpressing cells. The data suggest that interaptin is involved in cell-sorting and differentiation processes in *Dictyostelium*.

Immunofluorescence with an interaptin-antibody at COS-7-cells revealed a protein that is located only at cell-cell-contact plasmamembranes but not at contact-free membranes.

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten 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. Angelika A. Noegel betreut worden.

Köln, den 5.12.2001

M. Wasen