

**FUNKTIONELLE ANALYSE
DER LC-FACS IN
*DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM***

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Biologie / Chemie
der Universität Kassel**

vorgelegt von:
Katharina Elisabeth Freifrau von Löhneysen

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, den März 2003

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	ZUSAMMENFASSUNG	4
3	EINLEITUNG	5
3.1	DICTYOSTELIUM, EIN MODELLORGANISMUS	5
3.2	ENDOCYTOSE, EINE DEFINITION	6
3.2.1	PHAGOCYTOSE	7
	Rezeptoren	7
	Internalisierung des gebundenen Partikels	8
3.2.2	PINOCYTOSE	8
	Clathrin-abhängige	8
	Clathrin unabhängige Makropinocytose	10
3.3	DER TRANSIT	11
3.4	EXOCYTOSE	14
3.5	FETTSÄUREN UND MEMBRANKRÜMMUNG	15
3.6	AUFGABENSTELLUNG	18
4	ERGEBNISSE	20
4.1	LC-FACS, DAS GENPRODUKT VON <i>FCSA</i>	20
4.1.1	ANALYSE DER HOMOLOGIE AUF AMINOSÄUREEBENE	20
4.1.2	PROTEIN DOMÄNENANALYSE	21
4.1.3	MEMBRANASSOZIATION	23
4.1.4	LOKALISATION IN VEGETATIVEN <i>DICTYOSTELIUM</i> ZELLEN	24
4.1.5	GFP ZELLINIEN	25
4.2	MIKROSKOPIE	26
4.2.1	LC-FACS-GFP	26
4.2.2	KOLOKALISATION MIT ZELLORGANELLEN	27
4.2.3	KOLOKALISATION MIT MARKERPROT. FÜR DIE SPÄTE ENDOCYTOSE UND F-AKTIN	28
4.2.4	KOLOKALISATION MIT DYNAMIN, PROTONENPUMPE UND LYSOSOMALEN PROTEINEN	31
4.2.5	AUFNAHME FLUORESZIERENDER ENDOCYTOSEMARKER	34
4.2.6	PHAGOCYTOSE FLUORESZIERENDER PARTIKEL	35
4.3	ENDOCYTOSE ASSAYS MIT TRIACSIN C	36
4.4	MANIPULATION DER LC-FACS EXPRESSION	37
4.4.1	UNTERDRÜCKUNG DER LC-FACS EXPRESSION DURCH <i>PTGS</i>	37
4.4.2	LC-FACS „ <i>KNOCK-OUT</i> “	37
	Transformation des „Knock-Out“ Konstruktes in Ax2	37
	Southernblot-Analyse	38
4.4.3	„ <i>RESCUE</i> “ UND ÜBEREXPRESSION DER LC-FACS	40
4.4.4	PHÄNOTYP DER „ <i>KNOCK-OUT</i> “ ZELLINIE	42
	Expressionsmuster während der Entwicklung	42
	Cytokinese	43
	Endocytose	43
	Enzymsekretion	45
	pH-Verlauf während der Endocytose	46
	Fettsäureaufnahme (<i>C</i> ₁ -BODIPY <i>C</i> ₁₂)	49

Aufnahme von langkettigen Fettsäuren aus Endosomen	51
5 DISKUSSION	52
5.1 LC-FACS ZEIGT DIE GRÖBTE HOMOLOGIE ZU PROTEINEN AUS SÄUGERZELLEN	52
5.2 DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER LC-FACS	52
5.3 LC-FACS LOKALISIERT AUF ENDOSOMEN UND VESIKELN	53
5.4 VERÄNDERUNG DER LC-FACS EXPRESSIONSRATE	56
5.4.1 LC-FACS „ <i>KNOCK-OUT</i> “	56
5.4.2 EXPRESSION DER LC-FACS IM <i>FCSA</i> HINTERGRUND: „ <i>RESCUE</i> “ UND ÜBEREXPRE.	57
5.5 DIE LC-FACS EXPRESSION HAT KEINEN EINFLUß AUF DIE ENTWICKLUNG	57
5.6 PHÄNOTYP DER NULLMUTANTE IN VEGETATIVEN ZELLEN	57
5.7 LC-FACS PROTEINE SIND AN DER ENDOCYTOSE BETEILIGT	58
5.8 DIE LC-FACS BEEINFLUßT DEN PH-WERT IN ENDOS. UND IHRE RETENTIONSZEIT	58
5.9 IMPORT VON FETTSÄUREN	62
6 MATERIAL	65
6.1 GERÄTE	65
6.1.1 MIKROSKOPE	65
6.1.2 PIPETTIERHILFEN	65
6.1.3 ZENTRIFUGEN	66
6.1.4 SONSTIGE GERÄTE	66
6.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	67
6.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	68
6.3.1 GROB- UND FEINCHEMIKALIEN	68
Fluoreszenzfarbstoffe	71
Antibiotika	71
Antikörper	71
Enzyme	72
Nukleinsäuren	72
Kits und Reagenziensysteme	74
Längen- und Größenstandards	75
6.4 COMPUTER PROGRAMME, INTERNETSEITEN, UND DATENBANKEN	75
6.5 PUFFER UND LÖSUNGEN	76
6.6 MEDIEN	79
6.6.1 WACHSTUMSMEDIEN FÜR <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i>	79
6.6.2 WACHSTUMSMEDIEN FÜR BAKTERIEN	80
6.7 BIOLOGISCHES MATERIAL	81
6.7.1 BAKTERIENSTÄMME	81
6.7.2 <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i>	82
7 METHODEN	83
7.1 PRÄPARATION VON NUKLEINSÄUREN	83
7.1.1 PLASMIDPRÄPARATION AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	83
Plasmidminipräparation (Birnboim & Doly, 1979)	83
Plasmidmaxipräparation	83
7.1.2 PRÄPARATION GENOMISCHER DNA AUS <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i>	83
Mini-Präparation (Barth et al., 1998)	83
Maxi- Präparation	84
7.1.3 AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN	84

7.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	85
7.2.1 POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)	85
7.2.2 KLONIERUNG EINES PCR PRODUKTS	86
7.2.3 ENDONUKLEOLYTISCHE SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUK.	87
7.2.4 DEPHOSPHORYLIERUNG	88
7.2.5 ERZEUGUNG VON „BLUNT-ENDS“	88
S1-Nuklease	88
Klenow-Fragment	88
7.2.6 LIGATION VON DNA	88
7.2.7 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA	89
7.2.8 GELELUTION	89
7.2.9 KLONIERUNGEN	90
LC-FACS RNAi Konstrukt	90
LC-FACS „Knock-out“-Konstrukt	90
LC-FACS GFP-Konstrukte	91
LC-FACS Expressionskonstrukt	91
7.2.10 SOUTHERNBLOTANALYSE	91
Southern-Blot (Southern, 1975)	91
Radioaktive Markierung von DNA („Oligo-Labeling“)	92
Hybridisierung (hohe Stringenz)	92
7.2.11 TRANSFORMATIONSTECHNIKEN	94
Transformation von E.coli (DH5 α und JM 105)	94
Transformation kompetenter Zellen	94
Blau-Weiß Screen	95
7.2.12 TRANSFORMATION VON <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i>	95
Elektroporation	95
Klassische Transformation	96
Subklonierung von Transformanden	96
7.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	97
7.3.1 ZELLPFLEGE	97
Anzucht von Dictyostelium discoideum in axenischem Medium	97
Anzucht von Dictyostelium discoideum in KA-Suspension	97
Entwicklung auf Filtern	97
Sporengewinnung und Konservierung	97
7.4 MIKROSKOPIE	98
7.4.1 FIXIERUNG UND PRÄPARATION VON ZELLEN (HUMBEL & BIEGELMANN, 1992)	98
7.4.2 IMMUNFLUORESZENZ	98
Nukleinsäurefärbung mit DAPI	98
Fluoreszierende Partikel	99
C1-BODIPY C12	99
Einbetten fixierter Zellen (Dauerpräparate)	99
7.4.3 FLUORESZENZMIKROSKOPIE LEBENDER ZELLEN	100
7.5 ENDOCYTOSE ASSAYS	100
7.5.1 PHAGOCYTOSE	100
7.5.2 PINOCYTOSE	101
7.5.3 TRANSIT	101
7.5.4 FETTSÄUREAUFNAHME	102
7.5.5 TRITC / BODIPY- ASSAY	102
7.6 PH-WERT -MESSUNG	103
7.6.1 FITC / TRITC TRANSIT ASSAY	103
7.6.2 NEUTRALROT	103
7.7 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	104
7.7.1 PROTEINQUANTIFIZIERUNG MIT BCA (SMITH <i>ET AL.</i> , 1985)	104
7.7.2 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (LAEMMLI, 1970)	104
Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen	104

Gelfärbung mit Coomassie-Blau	105
7.7.3 WESTERN-TRANSFER ANALYSE	105
Westernblot	105
Immunologischer Nachweis von Proteinen	106
7.7.4 MEMBRANASSOZIATION VON PROTEINEN	106
Präparation von Endosomen aus Dictyostelium discoideum	106
Mechanismus der Membranbindung von Proteinen (Schneider et al., 2000)	107
7.7.5 EXKRETION LYSOSOMALER PROTEINE	107
8 BIBLIOGRAPHIE	109
9 ANHANG	125
9.1 GENOMISCHE SEQUENZ DES FÜR DIE LC-FACS KODIERENDEN <i>FCSA</i> GENS	125
9.2 GENOMISCHE REGION DES LC-FACS GENS NACH INSERTION DER BLASTICIDIN-KASSETTE DURCH INTEGRATION DES „KNOCK-OUT“-KONSTRUKTES	128

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ARF	ADP Ribosylierungs-Faktor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninic Acid
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat p-Toluidinsalz
bidest	doppeltdestilliertes Wasser
C1-BODIPY C12	4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoic acid
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BS	Blasticidin
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cy3	Indocarbocyanin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLSM	Confokales Laser Scanning Mikroskop
cm	Zentimeter
CRAC	cytosolischer Regulator von Adenylylcyclase in Dictyostelium
DAPI	(4',6-Diamidino-2-phenylindol)
ddNTP	Didesoxyribonukleotide, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP
DMSO	Dimethylsulfoxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide, dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure, Natriumsalz
EGTA	Ethylenbis(oxyethylennitrolo)-tetraessigsäure
EP-Puffer	Elektroporationpuffer
EtBr	Ethidiumbromid
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
fmol	Femtomol
g	Gramm
G418	Neomycinderivat
GEF	„Guanosine exchange factor“
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
IgG	Immunglobulin G

IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
KA	Klebsiella aerogenes
kb	Kilobasen
kb	Kilobasenpaare
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LC-FACS	Long chain fatty acyl Coenzyme A-Synthetase
LPA	Lysophosphatidsäure
M	molar
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper
MBq	Megabequerel
mcs	poly-Linker, multi cloning site
mg	Milligramm
MHC	„ <i>major histocompatibility complex</i> “, Haupthistokompatibilitäts-Komplex, Proteine, die die immunologische Individualität ausmachen
min	Minute
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar
[v/v]	Volumenprozent
[w/v]	Gewichtsprozent
μ F	Mikrofarad
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
ms	Millisekunde
mS	Millisievert
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NSF	N-ethylmaleimid sensitiver Faktor
OD	optische Dichte

ORF	offener Leserahmen („ <i>open reading frame</i> “)	
p.a.	Reinheitsgrad „per analysi“	
PA	Phosphatidsäure	
PAA	Polyacrylamid	
PCIA	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol; 25:24:1	
PEG	Polyethylenglycol	
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration	
PKA C	pikomolar	
PKA	cAMP abhängige Proteinkinase A (aus <i>Dictyostelium discoideum</i>)	
PNPP	p-Nitrophenylphosphat	
PN- α -Mannosid	p-Nitrophenylphosphat- α -Mannosid	
PTGS	Post Transcriptinal Gene Silencing	
Pu	Purinbase	
Py	Pyrimidinbase	
REMI	Restriktionsendonuklease vermittelte Integration	
Rm	regulatorische Untereinheit von PKA	
RNA	Ribonukleinsäure	
RNAi	Ribonukleinsäure Interferenz	
RT	Raumtemperatur	
s	Sekunde	
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
SNAP	lösliches NSF bindendes Protein	
SNARE	NSF bindender Proteinrezeptor (v & t SNAREs, v = Vesikel, t = Ziel)	
Std.	Stunde	
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	
TM	Transmembrandomäne	
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	
TRITC	Tetramethylrhodamineisothiocyanate	
U	Enzymeinheit	
ÜN	über Nacht	
Upm	Umdrehungen pro Minute	
UTR	untranslatierte Region	
V	Volt	
Vol.	Volumenanteil	
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galaktopyranosid	

2 ZUSAMMENFASSUNG

Das *Dictyostelium discoideum* Gen *fcsA* kodiert ein 75 kDa großes Protein. Es kann durch Homologieanalysen der Aminosäuresequenz zu den „*long-chain fatty acyl-CoA*“ Synthetasen gerechnet werden, die langkettige Fettsäuren durch die kovalente Bindung von Coenzym A aktivieren und damit für diverse Reaktionen in Stoffwechsel und Molekül-Synthese der Zelle verfügbar machen.

Die hier untersuchte *D. discoideum* LC-FACS lokalisiert als peripher assoziiertes Protein an der cytosolischen Seite der Membran von Endosomen und kleiner Vesikel. sind. Bereits kurz nach der Bildung in der frühen sauren Phase kann die Lokalisation der LC-FACS auf Endosomen gezeigt werden. Sie dissoziiert im Laufe ihrer Neutralisierung und kann auf späten Endosomen, die vor ihrer Exocytose stehen nicht mehr nachgewiesen werden. Ein Teil der kleinen die in der gesamte Zelle verteilten kleinen Vesikel zeigt eine Kolo-kalisation mit lysosomalen Enzymen. Trotz des intrazellulären Verteilungsmusters, die eine Beteiligung dieses Proteins an der Endocytose nahelegt, konnte kein signifikanter Rückgang der Pino- und Phagocytose-Rate in LC-FACS Nullmutanten beobachtet werden. Der endocytotische Transit ist in diesen Zellen etwas verlängert, außerdem zeigen die Endosomen einen erhöhten pH-Wert, was zu einer weniger effektiven Prozessierung der α -Mannosidase führt.

Die Funktion der LC-FACS ist die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren aus dem Lumen der Endosomen.

3 EINLEITUNG

3.1 *DICTYOSTELIUM*, EIN MODELLORGANISMUS

Dictyostelium discoideum wurde 1935 von K.B. Raper isoliert und beschrieben (Raper, 1935). *D. discoideum* ist ein einfacher Eukaryot, der der monophyletischen Gruppe der *Mycetozoa* zugeordnet wird (Baldauf & Doolittle, 1997).

Das natürliche Habitat der im vegetativen Zustand einzelligen Amöben ist der Waldboden, wo die Zellen sich von Bakterien ernähren. Bei Nahrungsmangel treten die Zellen in die Entwicklungsphase ein (siehe Abb. 1), wobei sich ca. 10^5 Amöben chemotaktisch zusammenfinden, eine Pseudoplasmodium bilden und schließlich nach ca. 24 Std. einen reifen Fruchtkörper ausbilden. Ein solcher Fruchtkörper besteht aus zwei Zelltypen, die sich während der „Slug“-Phase der Entwicklung differenzieren (Loomis, 1982). Etwa 80% der Zellen entwickeln zu Sporen, die zusammen in einem Sporenkopf sitzen, der von den Cellulose stabilisierten Stielzellen getragen wird (Kyriazi & Brown Jr, 1976). Sporen überdauern extreme Temperaturen, Trockenheit und Nahrungsmangel, bis schließlich bei besseren Lebensbedingungen erneut Amöben aus ihnen schlüpfen.

Bezüglich Morphologie und Physiologie weisen vacuolisierte Stielzellen Parallelen mit pflanzlichen Zellen auf, vegetative Amöben hingegen sind ähnlich den Makrophagen von Säugern (Mutzel, 1995).

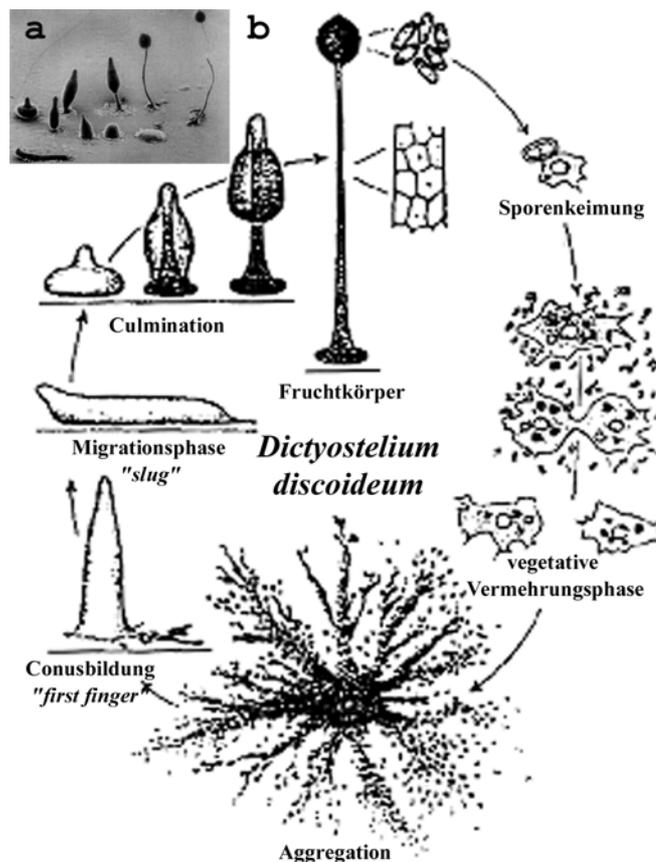


Abb. 1: Darstellung des Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum*.

(a) Aufnahmen mit dem Rasterelektronen-Mikroskop von M.G. Grimson und R.L. Blanton, Texas Tech. University und

(b) die schematische Darstellung von Gerisch, 1965.

Die Endocytose-Maschinerie von *D. discoideum* gilt als eine der effektivsten (Thilo, 1985). Laborstämme von *Dictyostelium discoideum* tragen drei Mutationen, die es den Zellen ermöglichen, in axenischen Medium zu wachsen (Clarke & Kayman, 1987). Der

für die Experimente in dieser Arbeit verwendete *D. discoideum*-Stamm Ax2-214 ist ein Abkömmling des Freilandisolates NC4 (Raper, 1935), der nicht nur auf Bakterien, sondern auch axenisch in Flüssigkultur wachsen kann (Watts & Ashworth, 1970) und eine 60fach höhere Pinocytoserate als NC4 hat (Aguado-Velasco & Bretscher, 1999). Die Amöben haben eine stark erhöhte Pino- und Phagocytoserate, die zwei bis zehnmal höher ist als die von Makrophagen oder neutrophile Granulocyten (Thilo, 1985). Es gibt eine Reihe von Unterschieden zwischen den Endocytosemechanismen in *D. discoideum* und anderen professionellen Phagocyten, die Übereinstimmungen sind jedoch so groß (Janssen & Schleicher, 2001; Maniak, 2002), daß sich diese Amöben modellhaft zur Erforschung der Endocytose gut eignen.

3.2 ENDOCYTOSE, EINE DEFINITION

Endocytose bezeichnet die Aufnahme von Material aus dem umgebenden Medium in die Zelle. Unter dem Begriff „Endocytose“ werden Phago- und Pinocytose zusammengefaßt, wobei Phagocytose die Aufnahme von Partikeln, Pinocytose die Internalisierung von Flüssigkeiten bezeichnet. An der Plasmamembran wird das zu endocytierende Material mit Membran umhüllt und die so gebildeten Vesikel in das Zellinnere entlassen. Diese sogenannten Endosomen sind Teil des Endocytose-Netzwerks aus Transportvesikeln, Lysosomen und anderen Kompartimenten. In Abb. 2 sind die unterschiedlichen Mechanismen der Endocytose schematisch dargestellt (Marsh, 2001).

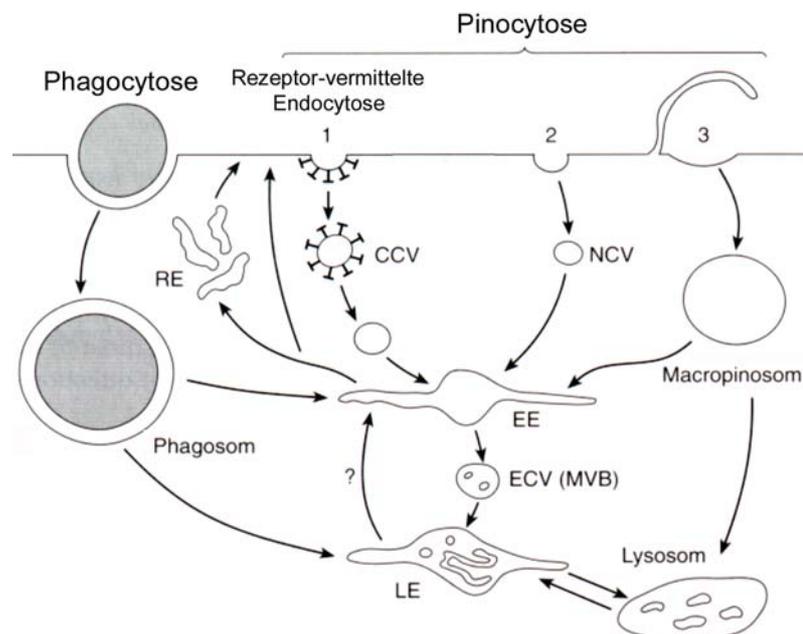


Abb. 2: Schematische Darstellung grundlegender Prozesse der Endocytose. Neben der Phagocytose sind drei weitere Endocytosemechanismen aufgeführt. Neben der Rezeptor-vermittelten Endocytose (1) über Stachelsaumvesikel (CCV), die Pinocytose über Clathrin-freie Vesikel (2, NCV) und die Aufnahme großer Flüssigkeitsvolumina durch Makropinocytose (3). Abgebildet sind außerdem die für die Endocytose essentiellen Organellen wie das frühe Endosom (EE), Recycling-Endosomen (RE), späte Endosomen (LE), Transportvesikel (ECV) und „multi vesicular bodies“ (MVB), sowie Lysosomen. Abbildung entnommen und verändert aus (Marsh, 2001).

Alle eukaryotischen Zellen sind zur Endocytose befähigt, wobei verschiedene Endocytosemechanismen viele unterschiedliche Funktionen erfüllen: Membranrecycling und Transport, Modulation der Plasmamembran-Zusammensetzung, sowie Sortierung von Proteinen und Lipiden. Die Endocytose dient bei freilebenden Einzellern vor allem der

Ernährung der Zelle, in mehrzelligen Organismen sind die von ihr erfüllten Funktionen hingegen vielfältiger. Hier ist sie an der Zell-Zell-Kommunikation (Marsh, 2001), der Abwehr von Pathogenen durch Zellen des Immunsystems (Nossal, 1997; Klein, 1998), der Entfernung von Zelltrümmern apoptotischer Zellen und der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität beteiligt (Marsh, 2001).

Im folgenden werden zunächst Phago- und Pinocytose genauer beschrieben, gefolgt von einer Darstellung der Reifung von Endosomen in *Dictyostelium discoideum* von der Internalisierung an bis hin zur Exocytose.

3.2.1 PHAGOCYTOSE

Wahrscheinlich können alle Eukaryoten Zellen mit Ausnahme von Hefe Partikel mittels Phagocytose aufnehmen. Soll ein Partikel phagozytiert werden, so muß dieser zunächst von der Zelle bemerkt werden, die daraufhin gezielt diverse Prozesse, wie die Reorganisation des Aktincytoskeletts und die Bereitstellung von Membran, in Gang setzen muß, die zur Internalisierung dieses Objektes führen. Damit diese Vorgänge innerhalb der Zelle koordiniert ablaufen können, ist eine Signaltransduktionsmaschinerie nötig. Zu den an der Signalübermittlung beteiligten Molekülen zählen Tyrosin- und andere Kinasen, kleine GTPasen, Membranlipide und Calcium (Caron & Hall, 2001).

Phagocytose kann prinzipiell in drei Schritte unterteilt werden: Die Bindung des zu internalisierenden Partikels an die phagozytierende Zelle, die Umhüllung des Objektes mit Membran und schließlich die Reifung des so gebildeten Phagosoms (Caron & Hall, 2001).

REZEPTOREN

Die Phagocytose eines Partikels beginnt mit seiner Bindung an einen Rezeptor. Phg1p ist der erste beschriebene Phagocytoserezeptor in *D. discoideum*, der molekularbiologisch untersucht wurde. Sein Fehlen führt zu einem selektiven Defekt in der Aufnahme von *Escherichia coli* nicht aber von *Klebsiella aerogenes* (Cornillon *et al.*, 2000). In höheren Eukaryoten werden Phagocytose-Rezeptoren vor allem in speziellen Zellen der Immunabwehr wie Makrophagen, neutrophilen Granulocyten und Monocyten exprimiert (Kwiatkowska & Sobota, 1999). Bei Wundheilung und Entzündungen werden Zelltrümmer und Mikroorganismen aus dem Zellverband entfernt (Brown, 1995). Körperfremde Substanzen können durch Anlagerung von Opsoninen, wie Antikörpern, Komplementproteinen oder Fibronektinen, für die Phagocytose durch Abwehrzellen markiert werden (Aderem & Underhill, 1999). Komplementprotein dekorierte Partikel werden von spezifischen (CR) Rezeptoren (May & Machesky, 2001), Immunglobuline von Fc-Rezeptoren gebunden (Daeron, 1997) und so als zu phagozytierende Objekte erkannt. Neben professionellen Phagocyten sind auch Zellen anderer Gewebe in der Lage zu phagozytieren, wenn auch mit geringerer Effizienz. Die Bandbreite der exprimierten Rezeptoren ist in diesen Zellen allerdings geringer (Caron & Hall, 2001). Zum Beispiel können Endothelzellen apoptotische Lymphocyten (Hess *et al.*, 1997) und Zellen des Harnblasenepithels beschädigte Erythrocyten phagozytieren (Wakefield & Hicks, 1974).

INTERNALISIERUNG DES GEBUNDENEN PARTIKELS

Im Anschluß an die initiale Bindung eines Partikels an einen Rezeptor beginnt das Aktin-Cytoskelett die Membran um das Objekt herum zu schieben, dabei bilden sich immer neue Rezeptor-Liganden Paare (Griffin & Silverstein, 1974; Griffin *et al.*, 1975). In *D. discoideum* ist dieser Reißverschluß-Mechanismus von der Signalübertragung heterotrimerer G-Proteine abhängig (Peracino *et al.*, 1998). Stabilisiert wird der Komplex vom F-Aktin-bindende Protein Talin, dessen „*Knock-Out*“ in Defekten in der Bindung von Partikeln und damit der Phagozytose resultiert (Niewöhner *et al.*, 1997).

Abgesehen von Aktin sind an den initialen Schritten der Phagosomenbildung weitere Cytoskelettproteine beteiligt. Hier findet sich sowohl in *D. discoideum* (Maniak *et al.*, 1995), als auch in professionellen Phagozyten von Säugern (Didichenko *et al.*, 2000), die Cytoskelettkomponente Coronin. Dieses Protein begünstigt die Bildung von Aktin-filamenten und kann als Dimer auch für deren Vernetzung sorgen (Goode *et al.*, 1999).

Nur solange ausreichend Membran vorhanden ist, kann Endocytose stattfinden, weshalb in Leukozyten des Hamsters ständig Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren (Hackam *et al.*, 1998). An den Pseudopodien, die das zu phagozytierende Objekt zu umschließen beginnen, kommt es vermehrt zur Verschmelzung von Vesikeln mit der Plasmamembran. Diese gezielte Lokalisation der Exocytose spricht für ihre Funktion in der Bereitstellung von Membran für die Endocytose (Bajno *et al.*, 2000; Booth *et al.*, 2001).

An der Abschnürung von Phagosomen in Makrophagen der Maus ist Amphiphysin beteiligt (Morrissette *et al.*, 1999), das zum einen die Membranausdehnung reguliert und zum anderen Dynamin 2 rekrutiert (Gold *et al.*, 1999; Gold *et al.*, 2000).

Nach der Abtrennung von der Plasmamembran beginnt die Reifung des Endosoms, die in Makrophagen in den Lysosomen endet (Racoosin & Swanson, 1993). Anders als in Makrophagen, deren Endosomen innerhalb von 15 min einen sauren pH-Wert erreichen und diesen auch beibehalten (Swanson & Watts, 1995), erfolgt in *D. discoideum* nach einer schnellen Ansäuerung eine langsame Neutralisierung des Vesikellumens, die Voraussetzung für die Exocytose nicht verwertbaren Materials ins umgebende Medium ist (Maniak, 1999). Dieser endocytische „Transit“ wird später detaillierter beschrieben.

3.2.2 PINOCYTOSE

Pinocytose bezeichnet die Aufnahme von Flüssigkeiten und löslichen Substanzen aus der Umgebung der Zelle. Sie kann in zwei Kategorien unterteilt werden, nämlich: Clathrin-abhängige und von Clathrin unabhängige Endocytose.

CLATHRIN-ABHÄNGIGE

Einige Proteine, Hormone, Signal- und andere Biomoleküle werden ähnlich wie Partikel erst nach ihrer Bindung an einen Rezeptor in die Zelle aufgenommen. Ihr Transport in die Zelle erfolgt in Clathrin umhüllten Vesikeln (CCV). CCV, auch Stachelsaumvesikel genannt, werden nicht nur an der Plasmamembran gebildet, sondern auch am *trans*-Golgi, von wo aus sie Stoffe gezielt zu Lysosomen oder sekretorischen Vesikeln des Endocytose-Netzwerks transportieren (Liu *et al.*, 2001).

Die grundlegenden molekularen Aspekte der Clathrin-abhängigen Endocytose sind konserviert, auch wenn in verschiedenen Geweben und Zelltypen zum Teil andere Isoformen der beteiligten Proteine exprimiert werden (De Camilli & Takei, 1996; Cao *et al.*, 1998). Zwei Proteinkomplexe stellen den Hauptbestandteil der Proteinhülle von CCV dar: Clathrin und Adaptorproteine (AP) (Pishvae & Payne, 1998). In Abb. 3 ist der Ablauf der CCV-Bildung schematisch dargestellt. Postuliert wird ein AP-Docking-Faktor, der an den cytoplasmatischen Teil der Rezeptoren bindet und AP rekrutiert. So verbände er den sich bildenden Clathrinkäfig mit den Rezeptoren (Chang *et al.*, 1993; Mallet & Brodsky, 1996; Seaman *et al.*, 1996). Das wachsende Gitternetz aus Clathrin bewirkt bereits eine Eindellung der Membran, die als „coated pit“ bezeichnet wird und einen Durchmesser von ca. 100 nm misst. Sie bilden sich häufig an bestimmten Stellen („hot spots“) der Zelloberfläche (Gaidarov *et al.*, 1999).

Für die Loslösung von CCV von der Membran sind Dynamin (Takei *et al.*, 1996) und Amphiphysin (Wigge *et al.*, 1997; Takei *et al.*, 1999) entscheidende Faktoren. In *Dictyostelium discoideum* wurde ein Gen für ein Dynamin homologes Protein beschrieben: *dymA*. Fehlt der Amöbe das entsprechende Genprodukt Dynamin A, führt dies zu einer Vielzahl von Phänotypen, zu denen morphologischen Veränderungen der Endosomen, Mitochondrien und Zellkerne zählen (Wienke *et al.*, 1999).

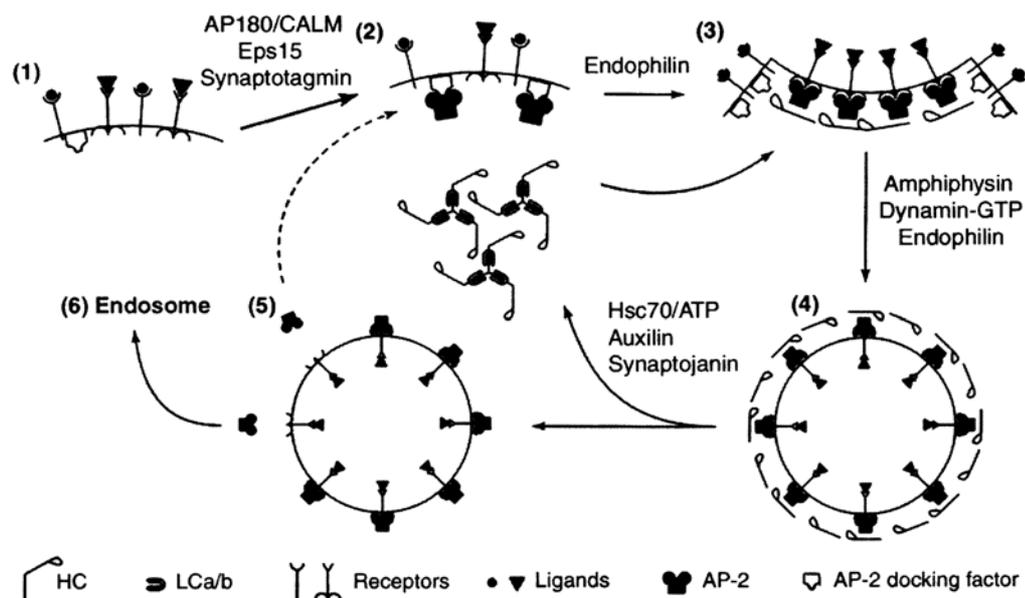


Abb. 3: Schematische Darstellung der Prozesse, die zur Zusammensetzung eines Stachelsaumvesikels (CCV) führen. (1) Plasmamembran Rezeptoren ohne eigene Bindungsstelle für Adaptorproteine (AP) benötigen für dessen Bindung einen sog. „Docking“-Faktor. Rezeptoren, die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind, so wie beispielsweise EGF-Rezeptoren werden nur nach der Bindung ihrer Liganden internalisiert, während die Aufnahme von Nahrungsrezeptoren in der Regel ligandenunabhängig ist. Bestimmte Proteine (Eps15, AP180, Synaptotagmin) ermöglichen die Bildung des AP-Komplexes (2), der in seiner dephosphorylierten Form Clathrin rekrutieren kann und so einen „coated pit“ bildet (3). GTP-Hydrolyse von Dynamin und anderen Faktoren wie Endophilin und Amphiphysin wird die mechanische Kraft bereitgestellt, die das Vesikel von der Membran ablöst (4). Nach der Internalisierung erfolgt die Dissoziation der Hüllkomponenten (5), die dadurch erneut zur Vesikelbildung herangezogen werden können. Phosphorylierung der Clathrin-Bindungsstelle von AP verhindert die Zusammensetzung von Hüllproteinen im Cytoplasma. (6) Das vom Clathrinkäfig befreite Vesikel kann nun zum Beispiel mit Endosomen fusionieren.

HC: Schwere Kette von Clathrin, LC: Leichte Kette; Abbildung entnommen und verändert aus: (Liu *et al.*, 2001).

In *Dictyostelium discoideum* Zellen, die kein Clathrin synthetisieren können, sinkt die Aufnahme von Flüssigphasenmarker um bis zu 80%, ohne dabei die Phagozytose zu beeinträchtigen (O'Halloran & Anderson, 1992; Ruscetti *et al.*, 1994). Die Beteiligung von CCV an der Pinocytose muß allerdings indirekt sein, denn Berechnungen von Thilo *et al.* zu Folge, müssen die Pinosomen in *D. discoideum* im Schnitt einen Durchmesser von 0,6 µm haben; damit sind sie sechs mal größer als CCV (Thilo & Vogel, 1980). Stachelsaumvesikel lokalisieren in *D. discoideum* in Kernnähe, wo sich auch der Golgi-Apparat befindet (O'Halloran & Anderson, 1992). Es liegt also nahe, hier eine Rolle bei der Vesikelknospung zu vermuten, zumal es in Zellen ohne Clathrin zu Defekten in der Sortierung und Sekretion von lysosomalen Enzymen kommt (Ruscetti *et al.*, 1994). Amöben ohne funktionelles Clathrin sind außerstande, bei Nahrungsmangel in die Entwicklung einzutreten, zusätzlich sind Defekte in der Osmoregulation beobachtbar (O'Halloran & Anderson, 1992).

CLATHRIN UNABHÄNGIGE MAKROPINOCYTOSE

Verschiedene Formen Clathrin- unabhängiger Endocytose sind bekannt, unter ihnen die Aufnahme kleiner Volumina über Caveolae bis hin zur Bildung von Vesikeln von einem Durchmesser von 0,2 -10 µm durch Makropinocytose (Marsh, 2001).

Makropinocytose ermöglicht Zellen, größere Mengen an Flüssigkeit aus dem extrazellulären Medium aufzunehmen. Pinosomen in Säugerzellen, die einen Durchmesser von 0,2 µm überschreiten, werden als Makropinosomen definiert (Swanson & Watts, 1995). Makropinocytose kommt hauptsächlich in Phagozyten des Säuger Immunsystems vor, wo sie grundlegend für die Internalisierung und Präsentation von Antigenen ist (Norbury *et al.*, 1997). In *Dictyostelium discoideum* Laborstämmen, die in axenischem Medium wachsen, dient die Makropinocytose der Ernährung der Zelle. Sie wird auch als Phagozytose ohne Stimulus durch die Bindung eines Partikels angesehen (Maniak, 1999; Maniak, 2001).

Phago- und Makropinocytose sind in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich. Beide benötigen Motorproteine und eine zeitlich und örtlich begrenzte, kontrollierte Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts. In Säugerzellen werden Makropinosomen an „*membrane ruffles*“ gebildet (Dowrick *et al.*, 1993). An diesen Falten in der Plasmamembran wird bei Fusion Flüssigkeit in Vesikel eingeschlossen; das internalisierte Volumen ist dabei mehr oder weniger dem Zufall überlassen. In *Dictyostelium discoideum* sind ähnliche Membranausstülpungen zu beobachten, sie münden in Trichter-förmigen Invaginationen der Plasmamembran, an deren Ende sich Makropinosomen abschnüren (Hacker *et al.*, 1997). Phago- und Makropinocytose in *D. discoideum* sind Aktin-abhängige Prozesse (Hacker *et al.*, 1997) und werden durch das Fehlen von Coronin auf ähnliche Weise in ihrer Effektivität reduziert (Maniak *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 1997). *D. discoideum* Zellen, die das Motorprotein Myosin I nicht exprimieren, bilden zwar übermäßig viele „*membrane ruffles*“, jedoch ohne diese zu schließen und so ein Endosom ins Zellinnere zu entlassen (Novak *et al.*, 1995). Die Ausbildung dieser „*membrane ruffles*“ erfordert die Bereitstellung von Membran, die in Säugerzellen vermutlich von CCV angeliefert wird (Bretscher & Aguado-Velasco, 1998). Diese Funktion von CCV wäre auch eine plausible Erklärung für den dramatischen Rückgang der Pinocytoserate in *D. discoideum* Zellen, der durch Fehlen von Clathrin ausgelöst wird (O'Halloran & Anderson, 1992; Ruscetti *et al.*, 1994).

3.3 DER TRANSIT

Nach Abschluß der Endosomenbildung an der Plasmamembran konvergieren Pino- und Phagocytose. Nach mathematischen Berechnungen von Aubry *et al.* werden in *Dictyostelium discoideum* für den endocytischen Transits mindestens neun Kompartimente benötigt (Aubry *et al.*, 1995). Dabei helfen verschiedene Proteine Vesikel, die sich in unterschiedlichen Stadien der Endosomenreifung befinden, von einander zu unterscheiden (Abb. 4).

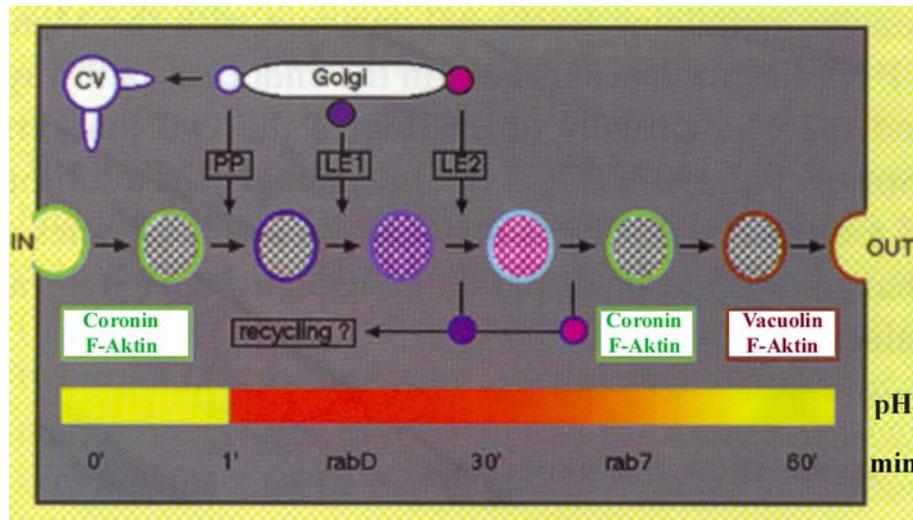


Abb. 4: Schematische Darstellung der Verteilung der verschiedenen Proteine, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten an Endosomen oder in ihrem Lumen zu finden sind. Angegeben sind die Zeitpunkte nach der Internalisierung in Minuten und der pH-Verlauf (Farbcode). Die schnelle Ansäuerung nach einer Minute geht mit der Dissoziation von Aktin und Coronin einher. Beide finden sich mit zunehmender Neutralisierung erneut auf den Endosomen. Markerprotein für späte Endosomen ist Vacuolin. Kleine GTPasen, RabD und Rab7 lokalisieren auf unterschiedlich reifen Endosomen. Die GTPase Rab7 lokalisiert auf Postlysosomen, Lysosomen und späten Phagosomen (Rupper *et al.*, 2001). Ein Rab7-, „Knock-Out“ verkürzt die saure Phase, und Endosomen werden zu früh exocytiert (Buczynski *et al.*, 1997). CV: kontraktile Vacuole, PP: vacuoläre H^+ -ATPase, LE: lysosomale Enzyme; Abbildung entnommen und verändert aus (Maniak, 1999).

Im Laufe der Reifung werden die Endosomen mit Hilfe von Mikrotubuli und den Motorproteinen Kinesin und Dynein bidirektional transportiert und dabei auch stark verformt. Der Zusatz von Nocodazol läßt die Mikrotubuli stark in der Länge schrumpfen, führt aber zu keinen Defekten in der Endocytose von *D. discoideum*. Im Gegensatz dazu inhibiert der Einsatz der Droge Latrunculin A durch die Verhinderung der Aktinpolymerisation die Makropinocytose vollständig (Konzok *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2002).

Auf naszierenden Endosomen in *Dictyostelium discoideum* findet sich Coronin und F-Aktin (Maniak, 1999). Viele Aktin-bindende Proteine dissoziieren ebenso schnell von der Endosomenoberfläche (Maniak, 2002) wie Aktin selbst (Peracino *et al.*, 1998) und ermöglichen der nun nicht mehr umhüllten Membran die Fusion mit anderen Vesikeln und Endocytose-Kompartimenten. Die zahlreichen Fusions- und Fissions-Ereignisse, die im Verlauf der Endosomenreifung in *Dictyostelium discoideum* stattfinden, sind in Abb. 5 schematisch dargestellt. Die im folgenden Text in Klammern stehenden Nummern beziehen sich auf diese Abbildung. Mit fortschreitender Reifung des Endosoms verändern sich die Fusionspräferenzen, so erlangt es erst im Laufe der fortschreitenden Veränderung ihrer Membranbestandteile die Fähigkeit zur Fusion mit reiferen endosomalen Organellen (Desjardins *et al.*, 1997).

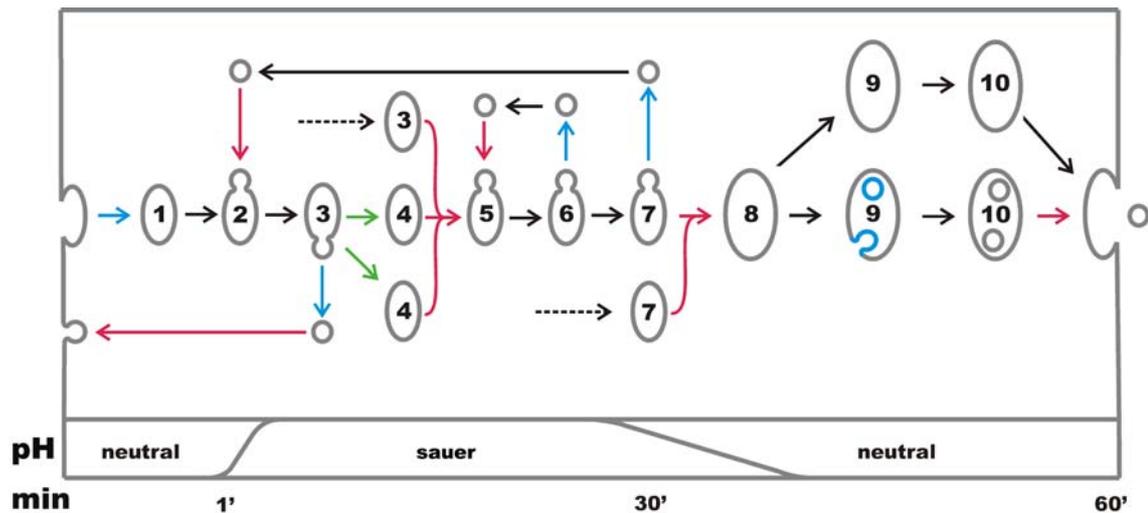


Abb. 5: Schematische Abbildung der Fusions- und Fissionsereignisse im Laufe der Endosomenreifung in *D. discoideum* von der Internalisierung (links) bis zur Exocytose (rechts). Die Reifung der Endosomen (schwarze Pfeile) wird durch die fortlaufenden Nummern und die Zeitskala im unteren der Grafik, sowie dem pH-Verlauf ausgedrückt. Zum einen erhalten Endosomen Material durch die Fusion mit Vesikeln (rote Pfeile), zum anderen wird ihr Volumen/Oberfläche beispielsweise durch die Knospung von Vesikeln (blaue Pfeile) verändert. Unterbrochene Pfeile gehören zu Endosomen, die aus anderen Prozessen parallel zum dargestellten Endocytoseweg stammen und an der homotypischen Fusionen partizipieren. In der neutralen Phase kann es zu Invaginationen und Vesikelbildung in den späten Endosomen kommen und so zur Bildung von „multi vesicular bodies“. Abbildung entnommen und verändert aus (Maniak, 2003).

Kurz nach der Bildung eines neuen Endosoms an der Plasmamembran (#2) bringen Vesikel die vacuoläre H^+ -ATPase (Clarke *et al.*, 2002), die das Lumen innerhalb einer Minute ansäuert (Maniak, 2001). Diese Vesikel sammeln sich an der Peripherie neuer Phagosomen (Schneider *et al.*, 2000; Clarke *et al.*, 2002; Neuhaus *et al.*, 2002); sie stammen hauptsächlich von späten Endosomen (#7). Der Anteil *de novo* synthetisierter Protonenpumpen, die vom Golgi-Apparat zu Endosomen gelangen wird als gering eingestuft (Clarke *et al.*, 2002). Dieses Enzym lokalisiert vor allem auf der kontraktile Vacuole, deren tubuläres Membrangeflecht die gesamte Zelle durchzieht (Fok *et al.*, 1993; Heuser *et al.*, 1993). Zusammen mit der Protonenpumpe findet sich hier und auf frühen Endosomen auch RabD, ohne das keine korrekte Lokalisation der Protonenpumpe stattfindet (Bush *et al.*, 1996).

Bereits während der ersten fünf Minuten reduziert sich die Größe von Makropinosomen (#3) durch Vesikelknospung, ihr Inhalt wird dabei ankonzentriert (Jenne *et al.*, 1998; Neuhaus *et al.*, 2002). Diese Vesikel gehen möglicherweise direkt zurück zur Plasmamembran und stellen damit der erste Schritt des Membranrecyclings dar (de Chastellier *et al.*, 1983; Neuhaus & Soldati, 2000). Zum gleichen Zeitpunkt teilen sich große Makropinosomen (#3 → #4 + #4) in kleinere Vacuolen auf (Maniak, 2003). Ein frühes Endosom durchläuft außerdem unabhängig von seinem Inhalt homotypische Fusionen (#3 + #4 → #5) (de Chastellier *et al.*, 1983; Clarke *et al.*, 2002). LvsB („large volume sphere“) erscheint hier als negativer Regulator, entsprechende Nullmutanten haben ungewöhnlich große saure Endosomen (Harris *et al.*, 2002). Die Fähigkeit, mit neuen Endosomen zu fusionieren, geht 20 min nach der Internalisierung verloren (Clarke *et al.*, 2002).

Gleichzeitig mit oder kurz nach der Ansäuerung können zersetzende Enzyme im Vesikellumen nachgewiesen werden (Souza *et al.*, 1997). Die ersten lysosomalen Enzyme, die schon nach ca. 3 min in Endosomen gefunden werden, haben eine GlcNAc-1-P-Glycosylierung. Sie werden später (nach ca. 15 min) durch eine weitere Sorte von Enzymen ersetzt wird, die eine Mannose-6-P Modifikation tragen (Clarke *et al.*, 2002). Da in Endosomen selten die Anwesenheit von Enzymen beider Klassen beobachtet werden konnte (Souza *et al.*, 1997), müssen in diesem Stadium (#5, #6) Recyclingvorgänge von statten gehen und homotypische Fusion ausgeschlossen sein. Dieser Recyclingprozeß durchläuft möglicherweise mehrere Zyklen (Gotthardt *et al.*, 2002). Auch bei diesen heterotypischen Fusionen spielt die kleine GTPase Rab7 eine regulatorische Rolle (Buczynski *et al.*, 1997). Im weiteren Verlauf der Reifung erhalten Endosomen (#5) integrale Membranproteine (Karakesisoglou *et al.*, 1999; Janssen *et al.*, 2001; Gotthardt *et al.*, 2002): die lysosomalen Transmembranproteine LmpA (Karakesisoglou *et al.*, 1999), B und C, die zur CD36/LIMP-II-Familie zählen (Janssen *et al.*, 2001). Während LmpA verstärkt auf sauren Endosomen lokalisiert, ist die Kinetik von LmpB und C genau umgekehrt; ihre Konzentration steigt bis zur neutralen Phase stetig an (Gotthardt *et al.*, 2002). Die lysosomale Proteine enthaltenden Transport-Vesikel können vom Golgi-Apparat kommen oder von etwas reiferen Endosomen (#6, durch retrograden Transport).

Von späteren Endosomen (#7) schnüren sich Vesikel ab, die die vacuoläre H⁺-ATPase enthalten (Nolta *et al.*, 1994; Rauchenberger *et al.*, 1997), die retrograd zu frühen Endosomen (#2) transportiert werden. Lysosomale Enzyme werden ebenfalls mittels retrograden Transportes von späten zu frühen Endosomen gebracht, ein Prozeß der von rab7 kontrolliert wird (Buczynski *et al.*, 1997). Durch die Vesikelknospung kommt es zur Reduktion des Umfangs und Wasser wird aus den Endosomen hinausgedrückt und so der Inhalt konzentriert (Jenne *et al.*, 1998; Maniak, 2001; Neuhaus *et al.*, 2002). Im Zuge dessen erhöht sich auch die Dichte von endosomalen Membranproteinen, wie p80 (Ravanel *et al.*, 2001).

Die Entfernung der aktiven Protonenpumpe von der Endosomenoberfläche ermöglicht die Neutralisierung des Lumens und leitet so eine weitere Phase homotypischer Fusionen ein. Werden *D. discoideum* Zellen mit nicht verdaubaren Hefe- oder Latexpartikeln inkubiert, so enthalten neugebildete Phagosomen typischerweise nur ein Partikel, das eng von Membran umschlossen ist. Nach ca. 20 min werden „geräumigere“ Phagosomen sichtbar, deren Membran oft mehr als ein Partikel weniger eng umhüllt. Aus dieser Beobachtung kann auf homotypische Fusion von Phagosomen (#7 + #7 → #8) geschlossen werden (de Chastellier *et al.*, 1983; Rupper *et al.*, 2001). Hierbei ist anscheinend der pH-Wert der Phagosomen von entscheidender Bedeutung. Die Zugabe von PI3-K Inhibitoren zu Wildtypzellen (Mills *et al.*, 1999) bzw. ein Doppel-„Knock Out“ der zwei *D. discoideum* PI3-Kinasen Homologe (PIK1/PIK2), oder das Fehlen von Proteinkinase B (PKB/Akt) führt dazu, daß nach zwei Stunden noch immer keine Endosomen mit mehreren Bakterien zu beobachten sind. Die Phagosomen mit einzelnen eingeschlossenen Bakterien weisen außerdem einen deutlich niedrigeren pH-Wert auf, verglichen mit Phagosomen aus Wildtypzellen. Die artifizielle Erhöhung des pH-Werts rettet diesen Phänotyp (Rupper *et al.*, 2001). Inhibierung der Protonenpumpe stimuliert Fusionsereignisse, denn sie resultiert in der Bildung ungewöhnlich großer Vacuolen in der Zelle (Temesvari *et al.*, 1996).

Nach diesem Reifestadium (#8) kommen homotypische Fusionen nicht mehr vor, möglicherweise weil eine Reihe von Proteinen wie Coronin (Rauchenberger *et al.*, 1997), Scar (Seastone *et al.*, 2001) und Arp 2/3 (Insall *et al.*, 2001) zu diesem Zeitpunkt durch eine erneute Bildung einer F-Aktin Hülle rekrutiert werden und die Membran der neutralen Endosomen zum Cytosol hin abschirmen (Rauchenberger *et al.*, 1997). Ein Markerprotein das als letztes auf späten Endosomen lokalisiert ist Vacuolin. Sein Fehlen führt zur Bildung von ein bis zwei sehr großen neutralen Vacuolen, anstatt zehn bis zwanzig in Wildtypzellen (Jenne *et al.*, 1998). Es handelt sich hierbei möglicherweise um einen negativen Regulator der späten homotypischen Fusion.

In der späten Phase (#9, #10) bilden sich durch die Invagination der Endosomenmembran innere Vesikel (Neuhaus *et al.*, 2002). Solche Endosomen werden als „*multi vesicular bodies*“ bezeichnet. In *D. discoideum* wird Discoidin I, ein endogenes Lektin, daß mit der Substratadhäsion der Zellen in Verbindung gebracht wird, wird über „*multi vesicular bodies*“ sezerniert (Barondes *et al.*, 1985), da der Inhalt der Endosomen (#10) ins umgebene Medium abgegeben wird. Diese Endosomen entleeren nicht unbedingt ihren gesamten Lumeninhalt in das Medium (Neuhaus *et al.*, 2002). Die Exocytose stellt das letzte Fusionsereignis im anterograden Transport von Endosomen durch die Zelle dar, und kann als finaler Schritt des Membranrecyclings betrachtet werden.

3.4 EXOCYTOSE

Zwischen Endo- und Exocytose herrscht ein Gleichgewicht (Klein & Satre, 1986). Die für die *D. discoideum* Zelle nicht verwertbaren Substanzen werden zusammen mit einem Teil der lysosomalen Enzyme mittels Exocytose ins umgebende Medium abgegeben. Andere zersetzende Enzyme mit Mannose-6-Phosphat Modifikation werden zum gleichen Zeitpunkt ausgeschieden, vielleicht aber über spezielle Vesikel (Dimond *et al.*, 1981).

Bevor in *Dictyostelium discoideum* ein Endosom mit der Plasmamembran fusionieren kann, muß die vacuoläre H⁺-ATPase aus der Membran verschwunden sein (Temesvari *et al.*, 1996) und der pH-Wert des Lumens neutral sein (Aubry *et al.*, 1993; Aubry *et al.*, 1993). In Säugerzellen kann die Exocytose lysosomaler Enzyme durch eine artifizielle Erhöhung des pH-Wertes stimuliert werden; daß hier die Neutralisierung *in vivo* den auslösenden Faktor darstellt, wird angenommen (Tapper & Sundler, 1990; Tapper & Sundler, 1995).

Ist das post-lysosomale Endosom an der Plasmamembran angelangt, verharrt es minutenlang ohne erkennbare Bewegung; in dieser Phase erfolgt vermutlich das Andocken an die Membran. Die Exocytose selbst ist in *D. discoideum* ein Aktin-abhängiger Prozeß (Rauchenberger *et al.*, 1997), der sehr schnell von statten geht (Maniak, 1999; Clarke *et al.*, 2002). In der Plasmamembran verbleiben einige Bereiche, die vorübergehend frei von Aktin und Cytoskelettproteinen sind. Sie sind wahrscheinlich der Ort einer vorangegangenen Exocytose (Jenne *et al.*, 1998).

3.5 FETTSÄUREN UND MEMBRANKRÜMMUNG

Biologische Membranen bestehen hauptsächlich aus Proteinen und Lipiden (Phospholipide, Glykolipide und bei tierischen Zellen zusätzlich Cholesterin), die auch die Eigenschaften der Membran wie Fluidität und Krümmung bestimmen.

Phospholipide (PA) tragen zwei Acylgruppen und eine Phosphorylgruppe, an die durch Veresterung ein oder mehrere Alkohole substituiert sind, die die Kopfgruppe darstellen. Typische Alkohole sind Serin, Cholin, Glycerin oder Inositol. Ist an das Glycerin nur eine Fettsäure gebunden, bezeichnet man sie als Lysophosphatide (LPA). Glykolipide leiten sich meist von Sphingosin ab und tragen als Kopfgruppe einen oder mehrere Zucker, wie Glucose oder Galactose. Die Kettenlänge und der Sättigungsgrad der Fettsäuren ist ein wichtiger Faktor, der die Fluidität einer Membran beeinflusst. Je mehr *cis*-Doppelbindungen enthalten sind, desto niedriger ist der Schmelzpunkt. In eukaryotischen Zellen wird die Fluidität hauptsächlich durch Cholesterin bestimmt. Die Entfernung von Cholesterin verhindert in Säugerzellen die Bildung von sekretorischen Vesikeln am Golgi-Apparat (Wang *et al.*, 2000) und blockiert auch die CCV Freisetzung an „coated pits“ (Rodal *et al.*, 1999; Subtil *et al.*, 1999).

Membranlipide mit völlig gesättigten Fettsäuren bilden eine zylindrische Form. Eine Doppelbindung sorgt für ein Abknicken der Kohlenstoffkette, die dadurch mehr Platz einnimmt. Sind die Fettsäuren voluminöser als die Kopfgruppe, so wird eine Kegelform („*cone-shaped*“) gebildet. Einem umgekehrten Kegel („*inverted-cone-shape*“) entsprechen solche Membranlipide, deren Kopfgruppe voluminöser ist, es handelt sich hierbei meist um Lysophosphatide. Die Zusammensetzung einer Membran entscheidet über ihre Form. Bestehen sie nur aus zylindrischen Lipiden, so sind sie planar, während die Anwesenheit von kegelförmigen Lipiden zu einer Krümmung führt.

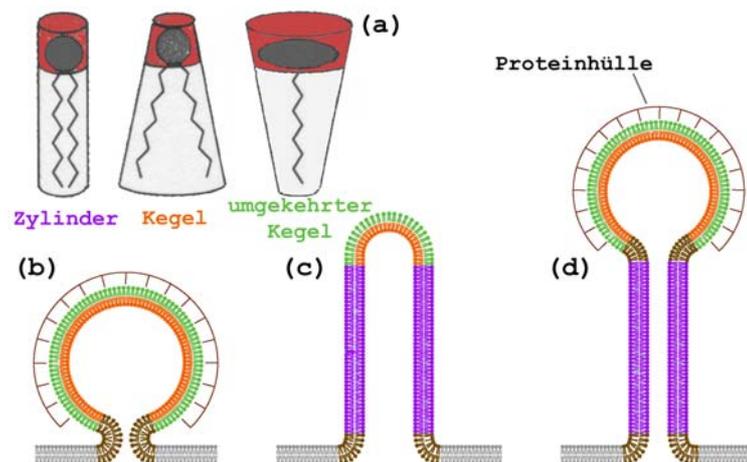


Abb. 6: (a) Schematische Darstellung der drei möglichen geometrischen Formen, die Membranlipide einnehmen können. Abbildung entnommen und verändert aus (Lee, 2000). Lipide unterschiedlicher Geometrie befinden sich in Membranbereichen, die verschieden starke Krümmung aufweisen: (b) Vesikelknospung an planaren Membranen, (c) tubuläre Struktur und (d) Vesikelbildung an tubulären Membranen. Violett: planare Membran hier befinden sich vermehrt Zylindrische Lipide; Grün: Bereiche mit positiver Krümmung, hauptsächlich „*inverted-cone-shape*“ Lipide; Orange: negative Membrankrümmung, vor allem Lipide mit „*cone-shape*“. Abbildung entnommen und verändert aus (Barr & Shorter, 2000) und (Huttner & Schmidt, 2002).

Die erforderliche Verformung bei der Vesikelknospung und Abkapselung kann durch die Lipidkomposition hervorgerufen oder zumindest unterstützt werden. Die gezielte Veränderung der Lipidzusammensetzung kann Fusion und Fission kontrollieren, wie in Experimenten mit humanen Zellen, in denen die Menge der Lysophosphatide verändert wurde, gezeigt werden konnte (Chernomordik *et al.*, 1995; Chernomordik *et al.*, 1998).

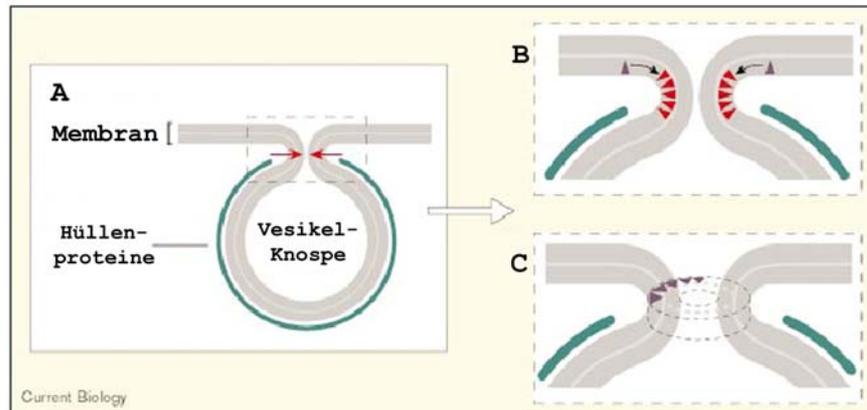


Abb. 7: Schematische Darstellung der beiden theoretischen Modelle einer Lipiddoppelschicht am „Genick“ eines Vesikels. Hüllenproteine werden am naszierenden Vesikel (A) rekrutiert. Ein freies Vesikel entsteht, wenn die Vesikelmembran fusioniert und sich so von der Donormembran trennt (rote Pfeile). Am Genick ist die Krümmung der Membran extrem und kann (B) durch die gezielte Umsetzung von Membranlipiden der umgekehrten Kegelform (rote Dreiecke) in kegelförmige (blaue Dreiecke) realisiert werden. Hier ist aber auch die gegensätzliche Krümmung möglich (C). Dieses Modell erfordert am Vesikelgenick die Anwesenheit von Lipiden der umgekehrten Kegelform. Abbildung entnommen und verändert aus (Barr & Shorter, 2000).

Am „Genick“ eines Vesikels ist die Krümmung am stärksten (Barr & Shorter, 2000). Diese extreme Krümmung erfordert eine bestimmte Lipidzusammensetzung vor allem kegelförmige Membranlipide. Eine gezielte Veränderung der Lipidzusammensetzung kann durch die Aktivität von bestimmten Enzymen realisiert werden. Lipasen können den Übergang von PA in LPA katalysieren, indem sie eine der Fettsäureketten abspalten. Die umgekehrte Reaktion ist *in vivo* wahrscheinlich tatsächlich Teil des Vesikelfreisetzenden Mechanismus. Für diese Reaktion sind aktivierte Fettsäuren nötig, die eine essentielle Komponente bei der Abschnürung von COP Vesikel darstellen (Ostermann *et al.*, 1993). Zwei Enzyme wurden identifiziert, die LPA acylieren und so PA synthetisieren, deren Aktivität entscheidend für die Freisetzung von Vesikeln in Säugerzellen ist: Endophilin I (Schmidt *et al.*, 1999) und CtBP/BARS. Beide Proteine weisen die gleiche Substratspezifität auf. Die Inkubation von Golgi-Membranen mit Cytosol und CtBP/BARS resultiert in der Freisetzung von Vesikeln unterschiedlichen Durchmessers (50-90 nm) (Weigert *et al.*, 1999).

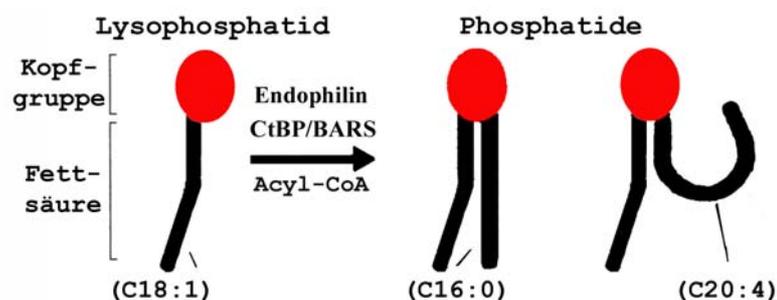


Abb. 8: Schematische Darstellung der Acyltransferaseaktivität der beiden Proteine Endophilin I und CtBP/BARS. Abbildung entnommen und verändert aus (Barr & Shorter, 2000).

Endophilin I transferiert die mehrfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure (C20:4) an LPA und ändert so die Geometrie des betreffenden Membranlipids von „*cone-shaped*“ zu „*inverted-cone-shape*“. Als Substrat wird von diesem Enzym auch die einfach ungesättigte Ölsäure (C18:1) akzeptiert, doch nur die Übertragung von Arachidonsäure resultiert in der Freisetzung von Mikrovesikeln (SLMV) in neuroendokrinen Zellen. Das Fehlen von Endophilin führt im Gehirn der Ratte zur Unterdrückung der Bildung von Mikrovesikeln (Ringstad *et al.*, 1999). SLMV sind kleine Vesikel mit einem Durchmesser von 50-90 nm (Leube *et al.*, 1994), daher müssen sie auch eine starke Membrankrümmung aufweisen, die durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren realisiert werden kann. Die Transferaseaktivität allein reicht jedoch nicht aus, um SLMVs von der Plasmamembran abzutrennen, zusätzlich wird Dynamin I benötigt (Schmidt *et al.*, 1999). Endophilin bindet und rekrutiert Dynamin zum naszierenden Vesikel (Ringstad *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1999). Dynamine galten lange als die Proteine, die durch die Hydrolyse von GTP die mechanische Energie für das Abschnüren von Vesikeln von Membranen bereitstellt (Sweitzer & Hinshaw, 1998). Der von Dynamin gebildete „Kragen“ kann *in vitro* durch dessen Hydrolyse von GTP gestreckt (Kozlov, 1999; Stowell *et al.*, 1999) oder auch zugeschnürt werden (Sweitzer & Hinshaw, 1998). Eine Mutation, die die Hydrolyse *in vivo* verhindert, resultiert allerdings in einer gesteigerten Endocytose. Die Autoren vermuten daher für Dynamin eher eine Rolle in der Signaltransduktion, als in der Fission direkt (Sever *et al.*, 1999). Schmidt *et al.* postulieren, daß Endophilin I durch die Bindung von Dynamin I aktiviert wird, die Enzymaktivität steigert und die Fission bedingt (Schmidt *et al.*, 1999). Ein ähnliches Zusammenspiel könnte auch für die anderen Isoformen von Dynamin und Endophilin gelten. So wie Endophilin I und Dynamin I in denselben Geweben exprimiert wird, finden sich Endophilin II und III zusammen mit Dynamin II bzw. III in den gleichen Zelltypen (Ringstad *et al.*, 1997).

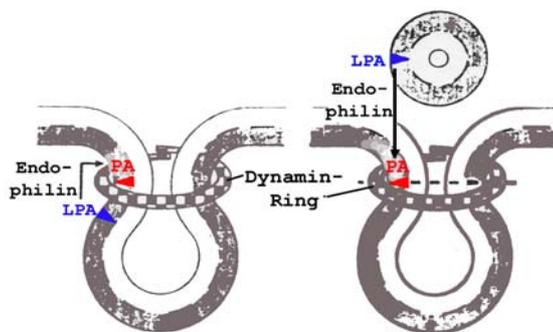


Abb. 9: Schematische Darstellung der Endophilinaktivität bei der Bildung von synaptischen Vesikeln. Endophilin acyliert LPA (blaue Dreiecke) zu PA (rote Dreiecke). Abbildung entnommen und verändert aus (Schmidt *et al.*, 1999).

Also sind verschiedene Faktoren, die das Genick des Vesikels destabilisieren, für die Dynamin unterstützte Fission von Vesikeln mitverantwortlich (Kozlov, 2001). Die von Enzymen verursachte lokale Veränderung der Lipidkomposition, die zum einen zu einer Krümmung der Membran führt, zum anderen aber auch deren Fluidität beeinflussen kann. Welche dieser Faktoren welchen Anteil an der Fission *in vivo* haben und in wie weit sie getrennt voneinander oder auch zusammen wirken ist letztlich nicht geklärt.

3.6 AUFGABENSTELLUNG

In dieser Arbeit sollen Lokalisation und Funktion des LC-FACS Proteins aus *Dictyostelium discoideum* untersucht werden, deren Aminosäure-Sequenz vor allem Homologien zu „*Long-chain fatty-acyl*“-CoA-Ligasen / Synthetasen (EC 6.2.1.3) aufweist. Solche Enzyme katalysieren die Bildung von Fettsäure-CoA über einen zweistufigen Prozeß (Groot *et al.*, 1976). Im ersten Schritt der Synthese kommt es zur Bildung des Zwischenproduktes Acyladenylat und Pyrophosphat (Bar-Tana *et al.*, 1973), im zweiten Syntheseschritt wird das gebundene AMP gegen Coenzym A ausgetauscht; Fettsäure-CoA und AMP werden freigesetzt. Enzyme dieser Klasse sind oft in ihrer Aktivität vom Magnesium als Cofaktor abhängig (Bar-Tana *et al.*, 1973).

katalytische Aktivität:

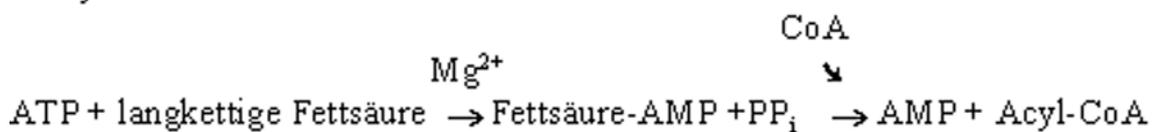


Abb. 10: Reaktionsschema der katalytischen Aktivität von Fettsäure-CoA Ligasen

„*Long-chain fatty-acyl*“-CoA-Ligasen (EC 6.2.1.3) sind Enzyme, die langkettige Fettsäuren (Kettenlänge $C > 10$) durch die kovalente Bindung von Coenzym A aktivieren, und sie so unter anderem für die Synthese von zellulären Lipiden oder ihre Degradation über die β -Oxidation in der Zelle verfügbar machen (Waku, 1992; DiRusso *et al.*, 1999). In Säugerzellen hängen eine Reihe von Prozessen von der Verfügbarkeit von Fettsäure-CoA und damit von LC-FACS-Enzymen ab, dazu zählen der Energiestoffwechsel (β -Oxidation) und die Regulation der Aktivität und Lokalisation bestimmter Proteine. Menschen verfügen über mehrere LC-FACS-Enzyme, die in den unterschiedlichen Geweben verschieden exprimiert werden. FACL 4 wird vor allem im Gehirn exprimiert. Das X-chromosomal vererbte Alport-Syndrom und unspezifische mentale Retardierung kann auf das Fehlen dieses Enzyms zurückgeführt werden, ohne daß jedoch der dahinterstehende Mechanismus geklärt und FACL 4 funktionell eingeordnet wurde (Piccini *et al.*, 1998; Vitelli *et al.*, 1999; Meloni *et al.*, 2002; Longo *et al.*, 2003). Viele LC-FACS Enzyme sind als Teil des Energiestoffwechsels an Membranen der Mitochondrien (Uchiyama *et al.*, 1996) oder Peroxisomen zu finden (Mannaerts & van Veldhoven, 1996). Eine Acyl-CoA Synthetase aus Rattenleber lokalisiert sowohl an der äußeren Mitochondrienmembran (Norum *et al.*, 1966; Garland *et al.*, 1970) als auch in Peroxisomen (Shindo & Hashimoto, 1978; Krisans *et al.*, 1980). Biochemische Analysen ergaben, daß es sich hierbei um dieselbe LC-FACS handelt (Tanaka *et al.*, 1979), dieser Befund konnte immunologisch untermauert werden (Miyazawa *et al.*, 1985). Die Expression dieses Enzyms kann durch die Inkubation der Zellen in Fettsäure reichem Medium gesteigert werden, was zusätzlich für ihre Funktion im Energiestoffwechsel spricht (Suzuki *et al.*, 1990).

Die N-terminale Acylierung vor allem mit Palmitat und / oder Myristinsäure ist eine der Möglichkeiten Proteine an Membranen zu binden, und so auch deren intrazelluläre Lokalisation zu bestimmen. Während Myristylierung von Proteinen cotranslational erfolgt und dauerhaft ist, ist die posttranslationale Bindung von Palmitinsäure reversibel. Dies ermöglicht es, die Lokalisation von Proteinen durch Acylierung oder Deacylierung innerhalb der Zelle zu verändern. Wie viele und in welcher Kombination Fettsäuren gebunden werden, entscheidet darüber an welche Membran das Protein assoziiert. Die ko-

valente Bindung von Myristinsäure (C14:0) dirigiert das Protein zu Endosomen und dem ER, zusätzlich mit Palmitat (C16:0) acylierte Proteine können auf Endosomen und der Plasmamembran nachgewiesen werden. Doppelte Palmitoylierung führt zu einer Lokalisation am Golgi-Apparat und der Plasmamembran (McCabe & Berthiaume, 1999).

Die Aktivität von bestimmten Enzymen hängt von Fettsäure-CoA ab. Verschiedenen Dehydrogenasen aus *Saccharomyces cerevisiae* und Säuger werden durch Acylierung inhibiert (Berthiaume *et al.*, 1994). Palmitoyl-CoA inhibiert Citrat-Hydrogenase und Glutamat-Dehydrogenase *in vitro* (Lai *et al.*, 1993) und beeinflusst auch die Aktivität verschiedener anderer Enzyme in Ratten Mikrosomen. Diese regulatorische Wirkung ist abhängig von ATP und kann bei nicht-hydrolysierbarem Palmitoyl-CoA nicht beobachtet werden. daraus läßt sich schließen, daß auch hier eine Acylierung des Proteins im aktiven Zentrum stattfindet (Fulceri *et al.*, 1995).

In *Escherichia coli* kodiert das *fadD* Gen für eine Fettsäure-CoA Ligase, die für den Import extrazellulärer Fettsäuren bei gleichzeitiger Aktivierung verantwortlich ist (Faergeman & Knudsen, 1997). In *Saccharomyces cerevisiae* existieren vier bekannte Gene für Fettsäure aktivierende Enzyme (Johnson *et al.*, 1994). Zwei dieser Enzyme (Faa1p und Faa4p) sind essentiell für den Import von Fettsäuren (Faergeman *et al.*, 2001). Zellen, die diese beiden Proteine nicht exprimieren, zeigen nicht nur einen verkleinerten endogenen Pool von Fettsäuren, sondern auch eine verminderte β -Oxidation. Faergeman *et al.* konnten außerdem zeigen, daß zumindest eines der beiden Proteine Teil der Transkriptionsregulation der peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidase (POX1) und von *FAA2* ist (Faergeman *et al.*, 2001).

Abgesehen von ihrer Rolle als oxidierbarer Energiespeicher, erfüllen Fettsäure-CoA auch regulatorische Funktionen. Aktivierte Fettsäuren (Fettsäure-CoA) werden auch mit Vesikel-Transport in Verbindung gebracht. Fettsäure-CoA dient als Cofaktor für ein Golgi-Protein, das im Vesikeltransport zwischen den Golgi-Cisternen ein Rolle spielt (Glick & Rothman, 1987). In *in vitro* Experimenten in zellfreien Systemen konnte gezeigt werden, daß nicht hydrolysierbares Palmitoyl-CoA die Knospung von Clathrin-freien Vesikeln am Golgi-Apparat unterbindet; aktivierte Fettsäuren werden also für die Vesikelbildung benötigt (Pfanner *et al.*, 1989).

Neben der Lokalisation der hier untersuchten *D. discoideum* LC-FACS, sollte ihre Funktion untersucht werden. Da sie verstärkt auf Endosomen vorkommt könnte sie an der Vesikelbildung innerhalb des Endocytose-Netzwerks beteiligt sein.

Die LC-FACS wurde im Zuge der Generierung monoklonaler Antikörper gefunden. Wie in (Maniak *et al.*, 1995) beschrieben, wurden endosomale Proteine angereichert, analog zur magnetischen Fraktionierung von Phagosomen aus Makrophagen (Lutz *et al.*, 1993) oder Pinosomen aus *Dictyostelium discoideum* (Nolta *et al.*, 1994). *D. discoideum* Zellen wurden mit Eisenpartikeln gefüttert, die in Endosomen aufgenommen wurden. Nach Aufschluß dieser Zellen wurden die Partikel enthaltenden Endosomen mit Hilfe der magnetischen Eigenschaften des Eisens vom Rest des Zellhomogenats getrennt (Maniak *et al.*, 1995). Diese isolierte Endosomenfraktion wurde zur Immunisierung von Mäusen verwendet; unter den Antikörper exprimierenden Hybridoma-Zellklonen konnte die Linie 221-457-5 identifiziert werden. In Endosomenfraktionen ist das entsprechende Protein -die LC-FACS- angereichert, wie Western-Blot Analysen mit mAb 221-457-5 und Proteinextrakten aus *D. discoideum* ergaben.

4 ERGEBNISSE

4.1 LC-FACS, DAS GENPRODUKT VON *FCSA*

4.1.1 ANALYSE DER HOMOLOGIE AUF AMINOSÄUREEBENE

Der ORF des *fcsA* Gens von *Dictyostelium discoideum* umfaßt 2004 bp, die für die 667 Aminosäuren der LC-FACS kodieren (Abb. 14, b). Das kalkulierte Molekulargewicht des Proteins beträgt 74,5 kDa; der errechnete Isoelektrische Punkt liegt bei pI 5,95 (<http://us.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>).

Die genomische Region in *D. discoideum* umfaßt von Start- bis Stopcodon 2888 bp (Contig JAX4a57d03.026, <http://genome.imb-jena.de>) und besteht aus fünf Exons:

I: 25 bp, II: 24 bp, III: 135 bp, IV: 150 bp und V: 1671 bp,

und vier Introns:

I: 179 bp, II: 122 bp, III: 167 bp, IV: 480 bp (siehe auch Anhang A).

Eine Datenbankrecherche auf Aminosäureebene ergab Homologien zu LC-FACS-Proteinen verschiedener Organismen, die in Tab. 1 beispielhaft aufgeführt sind. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz reicht von 30% in Einzellern bis hin zu 45% in Ratte.

	Organismus	Gen	AS Identität	AS Ähnlichkeit
Pflanzen	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LACS6	43 %	60 %
	<i>Brassica napus</i>	FACL1	43 %	61 %
Säuger	<i>Homo sapiens</i>	ACS5	41 %	59 %
	<i>Rattus norvegicus</i>	FACL5	45 %	61 %
	<i>Mus musculus</i>	FACL5	45 %	61 %
Metazoen	<i>Chaenocephalus aceratus</i>	(LCFACS)	39 %	58 %
	<i>Drosophila melanogaster</i>	CG3961	40 %	60 %
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Y65B4BL.5	39 %	60 %
Einzeiler	<i>Plasmodium falciparum</i>	PFL1880w.	35 %	57 %
	<i>Trypanosoma brucei</i>	ACS3	32 %	48 %
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FAA2	35 %	54 %
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SPBC18 H10.02	30 %	48 %

Tab. 1: Sequenzhomologien auf Aminosäureebene der *D. discoideum* LC-FACS mit Proteinen anderer Spezies: LACS6 (TrEMBL entry-name Q8LKS6), 701 AS (Hayashi *et al.*, 2002; Shockey *et al.*, 2002); FACL1 (TrEMBL entry-name Q96338), 699 AS (Fulda *et al.*, 1997); ACS5 (Swiss-Prot Acc.Nr. Q9ULC5, Entry name LCFE_Human) 683 AS (Yamashita *et al.*, 2000); FACL5 (auch ACS5 Swiss-Prot Acc.Nr.O88813) 683 AS (Oikawa *et al.*, 1998); FACL5 (TrEMBL AccNr. Q8JZR0) 683 AS (Strausberg, 2002); Protein: LC-FACS (kein Genname, TrEMBL AccNr. QQ98TV4), 697 AS (Grove, 2000); CG3961 (TrEMBL AccNr. Q95R88) Protein SD01152p, 691 AS (Stapelton, 2001); Y65B4BL.5 (TrEMBL AccNr. Q9N302), 719 AS, (1998); PFL1880w. (AccNr. AAN36462), 792 AS, (Gardner *et al.*, 2002); ACS3 (TrEMBL entry-name Q9U402) 702 AS (Jiang *et al.*, 2000); FAA2 (TrEMBL AccNr. QP39518) 744 AS (Harrington *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1994); SPBC18H10.02, (TrEMBL AccNr. O60135), 676 AS, (Lyne, 1998).

Zu Beginn dieser Arbeit war noch keine LC-FACS aus *Dictyostelium discoideum* beschrieben worden. Eine Homologiesuche auf Aminosäureebene in der *Dictyostelium*-Datenbank ergab nur einen Treffer. Die Homologie der LC-FACS mit diesem als putativen Ligase beschriebenen Protein (AAM09358.1) beträgt allerdings nur 22 %.

4.1.2 PROTEIN DOMÄNENANALYSE

Mit Hilfe von Datenbanken (<http://us.expasy.org>) wurde eine Analyse der Aminosäure-Sequenz durchgeführt, die eine Zugehörigkeit zu AMP-bindenden Enzymen ergab. Diese Protein -Familie vereint Enzyme, die ATP abhängig AMP kovalent an ihr Substrat binden; zu ihnen zählen Luciferasen, Langkettigen-Fettsäuren-CoA-Ligasen (EC 6.2.1.3), Acetyl-CoA-Synthetasen und verschiedene nah verwandte Synthetasen (Schroder, 1989).

Die Region AS 234-245 (LlyTSGSTGnPK) wurde als AMP-bindende Domäne identifiziert, wobei groß geschriebene Buchstaben identische AS, klein geschriebene ähnliche AS darstellen.

Die hier untersuchte LC-FACS enthält in ihrer Aminosäuresequenz außerdem einen 25 AS lange Bereich der als Signatur Motiv für Fettsäure-CoA-Synthetasen gilt, sieben dieser AS sind für die Substratspezifität verantwortlich (Black *et al.*, 1997).

Signatur Seq.	AS 1	DGWLHTGD I GXWPXGXLKI IDRKK	AS 25
LC-FACS	AS 494	DGWIHTGD I GRWNEGTLS IDRKK	AS 518

Abb. 11: Vergleich des Signaturmotivs für Fettsäure-CoA Ligasen in LC-FACS Enzymen mit der Sequenz der *D. discoideum* LC-FACS, Aminosäureaustausch an den rot hervorgehobenen Stellen kann zu Veränderungen in der Substratspezifität führen (Black *et al.*, 1997).

Die hier rot dargestellten Aminosäuren sind diejenigen, die bei einer Mutationsanalyse als für die Substratspezifität verantwortlichen identifiziert wurden, sie gelten somit auch als Fettsäurebindungs-Motiv (Black *et al.*, 1997; Black *et al.*, 2000). Innerhalb dieser sieben Aminosäuren gibt es zwischen der LC-FACS-Aminosäureabfolge und der von den Autoren gefundenen Sequenz eine Abweichung, das Lysin (AS 19 Sig.-Seq.) ist durch ein Serin ersetzt worden. Welche Substratspezifität hinsichtlich Kettenlänge oder Sättigungsgrad der zu bindenden Fettsäuren die hier untersuchte LC-FACS hat, wurde nicht untersucht.

Der Antikörper gegen LC-FACS wurde gegen ein auf Phagosomen angereichertes Antigen generiert, es bestand daher die Möglichkeit, daß es sich die der LC-FACS um ein Transmembranprotein handeln könnte. Daher wurde mit Hilfe des Programms TMpred (<http://www.ch.embnet.org>) nach Transmembran-Domänen in der Aminosäure-Sequenz gesucht. Das Programm postulierte drei solcher Domänen, woraus zwei Modelle konstruiert wurden, von denen die in der folgenden Abbildung beschriebenen als am wahrscheinlichsten errechnet wurden:

```

2 possible models considered, only sign. TM used
-----> STRONGLY preferred model: N-term. outside
3 strong TM helices, total score : 3078
# from   to length score orientation
1 136 155 (20) 990 o-i
2 291 310 (20) 1414 i-o
3 546 562 (17) 674 o-i
-----> alternative model
3 strong TM helices, total score : 2534
# from   to length score orientation
1 132 155 (24) 860 i-o
2 287 310 (24) 1051 o-i
3 543 563 (21) 623 i-o
    
```

Helices in brackets are considered insignificant.
 A "+" preference of this orientation.
 A "++" strong pref. of this orientation.

inside->outside		outside->inside	
132- 155 (24)	860	136-155(20)	990 +
(246- 270 (25)	6 ++)		
291- 310 (20)	1414 ++	287-310 (24)	1051
(403- 422 (20)	362 +)	(400-418 (19)	235)
543- 563 (21)	623	546-562 (17)	674

Abb. 12: TMPred Berechnungsergebnis für LC-FACS

PSORT Kalkulationen (<http://www.psорт.nibb.ac.jp/cgi-bin/runpsort.pl>) hingegen ergaben, daß es sich bei der LC-FACS mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein peripheres Protein handelt, diese Ergebnisse sind in Abb. 13 gezeigt.

```

ALOM: Klein et al's method for TM region allocation
Init position for calculation: 1
Tentative number of TMS(s) for the threshold 0.5: 1
Number of TMS(s) for threshold 0.5: 0
PERIPHERAL Likelihood = 0.95 (at 287)
ALOM score: -0.43 (number of TMSs: 0)
    
```

Abb. 13: PSORT Berechnungsergebnis für LC-FACS.

Ob es sich bei dem hier zu untersuchenden Protein tatsächlich um ein in der Membran verankertes handelt, wurde im folgenden Experiment überprüft. Die folgende schematische Darstellung des LC-FACS-Proteins faßt die beschriebenen Ergebnisse der Datenbankrecherchen zusammen, in Abb. 14 (b) ist die Aminosäuresequenz vollständig aufgeführt, identifizierte Domänen sind farbig hervorgehoben.

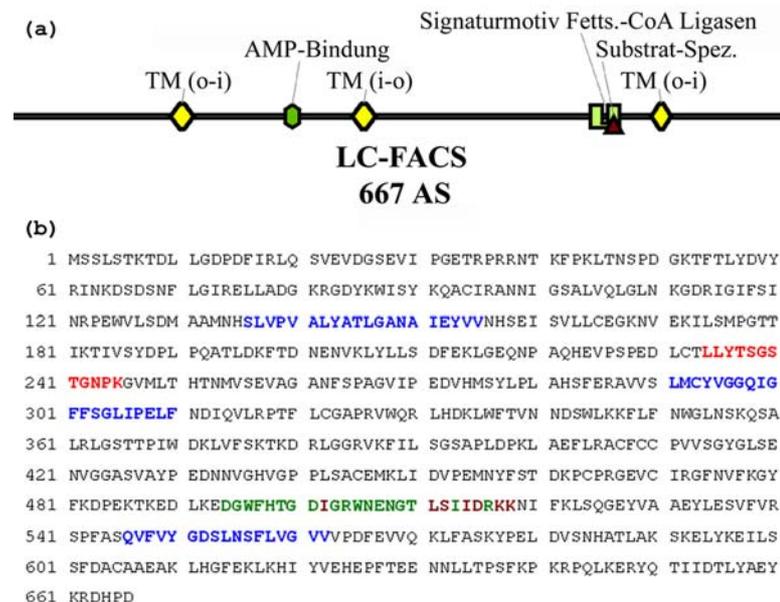


Abb. 14: (a) Schematische Darstellung der LC-FACS mit putativen Transmembrandomänen (TM), AMP-Bindungsstelle (AMP-Bindung) und Signatur Sequenz für langkettige Fettsäuren. (b): vollständige Aminosäuresequenz der LC-FACS: postulierte Transmembrandomänen (blau), AMP-Bindungsstelle (rot), Signaturmotiv für Fettsäure-CoA Ligasen (grün) darin enthalten auch die Aminosäuren, die die Substratspezifität bestimmen (braun).

4.1.3 MEMBRANASSOZIATION

Die Analyse der Aminosäuresequenz (<http://www.expasy.ch>) der LC-FACS ergab vier hydrophobe Bereiche, von denen drei als putative Transmembran-Domänen identifiziert wurden.

Ein Membranassoziations-Experiment wurde nach dem Protokoll von Schneider *et al.* durchgeführt (Schneider *et al.*, 2000), um zu klären, ob es sich bei LC-FACS um ein membranständiges oder peripheres Protein handelt.

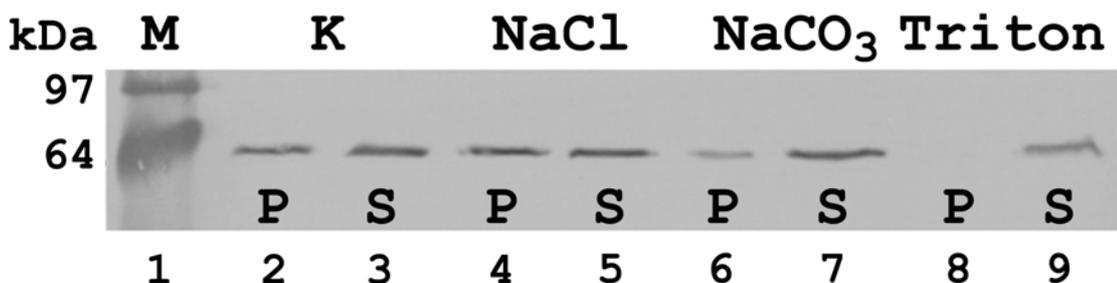


Abb. 15: Membranbindung der LC-FACS; Ax2 Zellen wurden aufgeschlossen (Passage durch Nucleopore Filter, Porengröße 5 µM) und das resultierende Homogenat bei 1.000 g zentrifugiert. Aliquots des postnucleäre Überstands wurden mit Homogenisationspuffer (K, Kontrolle), Salz (NaCl, Endkonz. 1 M) oder Detergenz (Triton, Endkonz. 1%) versetzt, bzw der pH-Wert auf 11,5 erhöht (Na₂CO₃, Endkonz. 100 mM) und nach Inkubation bei 10.000 g zentrifugiert. Überstände (S) und Sedimente (P) wurden mit einem Western-Blot analysiert (mAb 221-457-5).

Bei einem Membranassoziations-Experiment wird eine zu untersuchende Membranfraktion unter unterschiedlich stringenten Bedingungen inkubiert und anschließend durch Zentrifugation gelöst von weiterhin membrangebundenen Proteinen getrennt. Integrale Proteine, die fest in der Membran verankert sind, gehen nur durch Zugabe von Triton in den Überstand über, da dieses Detergenz die Membran vollständig auflöst. Proteine, die durch hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen peripher an der Membran gebunden sind, lösen sich von dieser durch Zugabe von hohen Salzkonzentrationen bzw. der Erhöhung des pH-Wertes.

Der Anteil der LC-FACS, der durch Zentrifugation mit 10.000 g pelletiert werden konnte, stieg nicht durch die Zugabe von NaCl, verglichen mit der Kontrolle (nur Homogenisationspuffer) an. Durch die Erhöhung des pH-Werts erfolgte eine Dissoziation des Proteins von der Membran. LC-FACS verhält sich also wie ein peripher assoziiertes Protein.

Eine Zentrifugation bei 100.000 g nach der Inkubation der Endosomenfraktion Aliquots mit Salz, Natriumcarbonat, Triton sowie der Kontrolle ergab ein etwas anderes Verteilungsmuster. Nahezu das gesamte Protein (LC-FACS) in der Kontrolle und der NaCl-Probe konnte pelletiert werden, und ging erst nach Zugabe von Na₂CO₃ größtenteils in den Überstand (nicht gezeigt). Eine Erklärung dafür wäre, daß bei 10.000 g noch kleine Vesikel und Membranbruchstücke im Überstand verblieben. Die Spuren, wo der Überstand von Kontrolle bzw. von der mit NaCl inkubierten Fraktion aufgetragen worden war (Abb. 15), könnten also noch membrangebundenes LC-FACS-Protein enthalten. Es kann davon ausgegangen werden, daß nur ein kleiner Anteil der LC-FACS im Cytosol gelöst ist, während der überwiegende Teil mit Membranen sedimentiert.

4.1.4 LOKALISATION IN VEGETATIVEN *DICTYOSTELIUM* ZELLEN

Neben der vollständigen cDNA der LC-FACS stand zu Beginn der Arbeit ein gegen dieses Protein gerichteter monoklonaler Antikörper (mAb 221-457-5) zur Verfügung.

Mit Hilfe des Programms PSORT wurde die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Lokalisation der LC-FACS wie folgt kalkuliert:

73.9 %: Cytoplasmatisch

13.0 %: Mitochondrial

8.7 %: Nucleär

4.3 %: Vesikel des sekretorischen Systems

Um die Lokalisation des LC-FACS-Proteins in *D. discoideum* zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Experimente durchgeführt, vegetative *D. discoideum* Wildtypzellen (Ax2) wurden mit mAb 221-457-5 angefärbt.

Zu erkennen sind in Abb. 16 rot angefärbte Ringe in der Zelle und zusätzlich im Cytoplasma verteilte körnige Punkte. Die beobachteten „Ringe“ entsprechen in ihrer Anzahl und Größe zellulären Endosomen. Eine endosomale Lokalisation des Proteins, gegen das mAb 221-457-5 gerichtet ist, konnte also angenommen werden. Dagegen könnte es sich bei den Punkten unterschiedlicher Größe um Vesikel, Mitochondrien oder Peroxisomen handeln. Alternativ könnte es sich auch um einen starken Hintergrund, der durch Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen Proteinen zustande gekommen wäre, handeln.

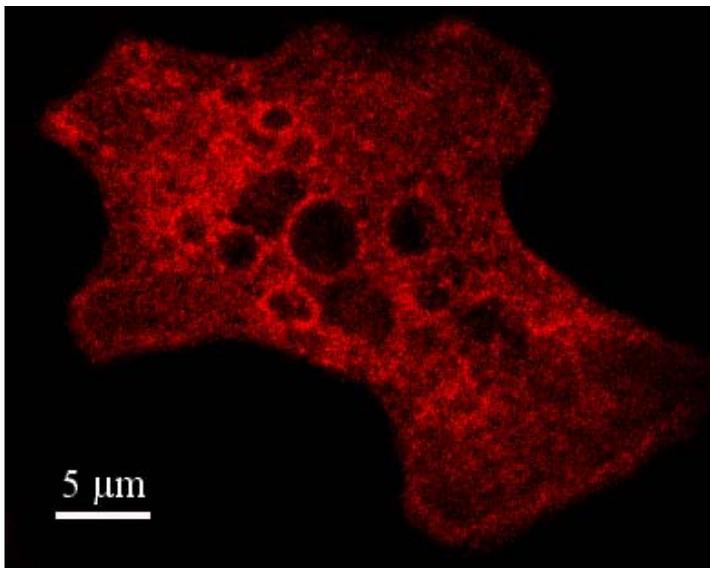


Abb. 16:

Lokalisation der LC-FACS in Ax2, Immunfluoreszenz von Wildtypzellen mit mAb 221-457-5.

Bei genauer Betrachtung erscheint die Dekoration der Vacuolen mit LC-FACS nicht als geschlossener Ring, sondern bildet vielmehr ein lückenhaftes Muster roter Punkte unterschiedlicher Größe und Farbintensität. Die LC-FACS ist demnach nicht gleichmäßig über die Endosomenmembran verteilt.

4.1.5 GFP ZELLINIEN

Um Kolokalisation zweier verschiedener Proteine nachzuweisen, wurden Immunfluoreszenz-Experimente durchgeführt, unter Verwendung von Ziellinien, die GFP-Fusionsproteine exprimieren und so die entsprechenden Zellkompartimente und / oder Organellen, in denen die Fusionsproteine lokalisiert sind, markieren. Fixiert man diese Zellen und verwendet in der anschließenden Immunfluoreszenz TRITC oder Cy3 gekoppelte Sekundärantikörper, können die Kanäle im CLSM relativ gut voneinander getrennt werden, da die Emissionsspektren von GFP, TRITC und Cy3 sich kaum überlappen.

Neben den bereits etablierten GFP-Expimierern, wie beispielsweise Vacuolin B-GFP (Jenne *et al.*, 1998), oder mito-GFP war es nötig, auch Zellen zur Verfügung zu haben, die LC-FACS-GFP translatieren; dadurch wurde es möglich, die Immunfluoreszenz-Experimente nicht nur mit GFP markierten Zellen und dem LC-FACS-Antikörper durchzuführen, sondern auch die komplementären Versuche, also die Färbung verschiedener Kompartimente mit Hilfe von Antikörpern und der Nachweis der LC-FACS Lokalisation durch GFP, um so die gewonnenen Erkenntnisse über die Lokalisation der LC-FACS weiter untermauern zu können.

Die komplette cDNA der LC-FACS wurde vor (5') den ORF (Plasmid #48) bzw. direkt hinter (3') den ORF von GFP (Plasmid #68) in ein Expressionsplasmid kloniert (Plasmid #1). Die resultierenden Vektoren #291 und #302 wurden in *Dictyostelium discoideum* Zellen transformiert, auf G418-Resistenz selektiert und grün fluoreszierende Klone ausgewählt.

Gesamtprotein dieser Klone wurden im Western-Blot mit mAb 211-457-5 analysiert, um sicherzustellen, daß die Fluoreszenzmarkierung tatsächlich vom rekombinanten Volllänge-GFP-Fusionsprotein herrührt. Erwartet wurden für das Fusionsprotein ein Molekulargewicht von etwa 105 kDa, während das endogene Protein wie bereits beschrieben, bei etwa 75 kDa laufen sollte.

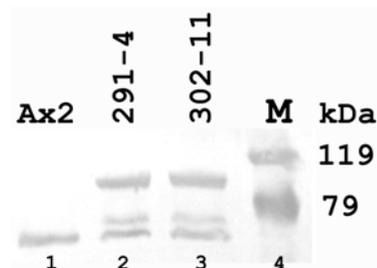


Abb. 17: Western-Blot Analyse von Gesamtprotein aus Wildtypzellen (Ax2) und den Klonen 291-4 und 302-11 mit mAb 221-457-5. Beide exprimieren Fusionsproteine aus LC-FACS und GFP (291-4 GFP N-terminal fusioniert, 302-11GFP C-terminal). In Spur 1, in der Gesamtprotein aus Ax2 aufgetragen worden war, nur eine Bande bei ca. 75 kDa für das endogene LC-FACS-Protein detektiert werden. In den Spuren 2 und 3 sind zwei zusätzliche Banden bei etwa 80 kDa bzw 105 kDa zu erkennen, die von der Expression rekombinanter Proteine herrühren. Proteinlängenstandard (M) in Kilodalton (kDa)

Auf dem in Abb. 17 gezeigten Western-Blot konnten Banden nachgewiesen werden, die in ihrer Laufhöhe den erwarteten Proteingrößen entsprechen. Neben dem erwünschten GFP-Fusionsprotein, das in der Höhe von ca. 105 kDa lief (≈ 75 kDa LC-FACS plus ≈ 30 kDa GFP) ist in den Spuren 2 und 3 noch eine weitere Bande zu sehen, die etwas oberhalb von 75 kDa lief, es handelt sich hierbei vermutlich um ein Abbauprodukt des Fusionsproteins. Der Klon 291-4 wurde im Folgenden, soweit nicht anders angegeben für die Immunfluoreszenzexperimente verwendet.

4.2 MIKROSKOPIE

4.2.1 LC-FACS-GFP

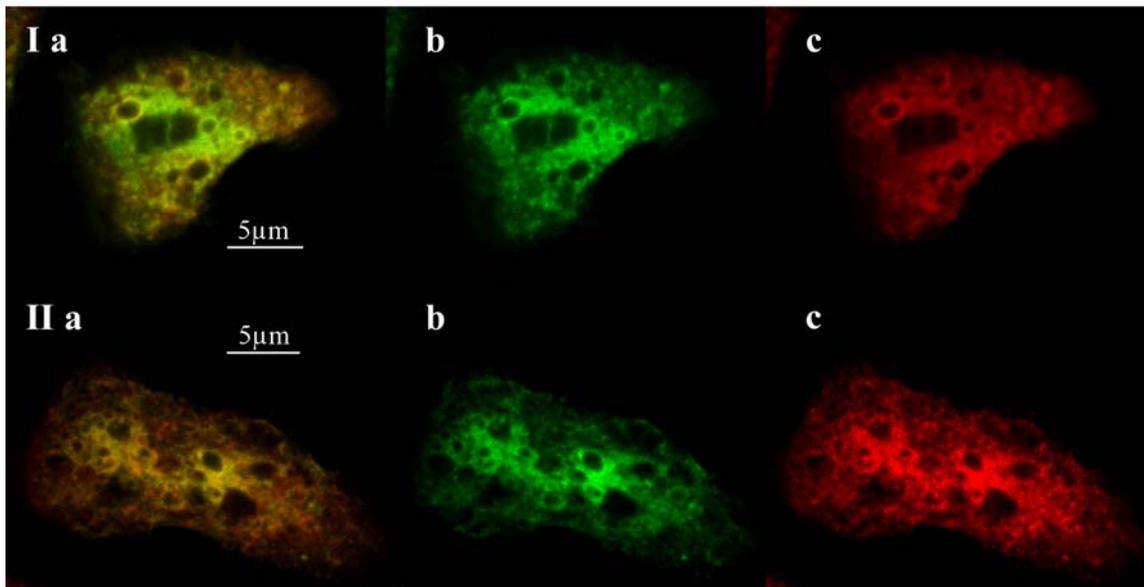


Abb. 18: Immunfluoreszenz Bilder von vegetativen Zellen des Klon 291-4 mit mAb 221-457-5 gegen LC-FACS (I c) und mAb 264-449-2 gegen GFP (II c). I a, II a Überlagerungsbilder, I b, II b LC-FACS-GFP.

In Abb. 18 (I b, II b) sind GFP markierte Strukturen zu erkennen, die dem bereits beschriebene LC-FACS Lokalisationsmuster entsprechen. Dies war unabhängig davon, ob LC-FACS C- oder N-terminal an GFP fusioniert worden war. Das GFP-Muster war außerdem unabhängig vom genetischen Hintergrund, da auch GFP-Fusionsprotein exprimierende LC-FACS⁻Zellen die gleiche GFP Verteilung aufwiesen (nicht gezeigt). Die Markierung mit Antikörpern gegen GFP bzw LC-FACS zeigt in den Überlagerungsbildern (Abb. 18, I a, II a) eine nahezu vollständige Übereinstimmung. Im Zentrum der Zelle ist ein Bereich sichtbar (Abb. 18, I a), der ausschließlich grün gefärbt ist, dies hat seine Ursache vermutlich darin, daß der Antikörper nicht bis in die Zellmitte diffundierte.

Alle verwendeten LC-FACS GFP-Fusionsprotein exprimierenden Zellen zeigten in Immunfluoreszenz Experimenten eine vollständige Übereinstimmung des GFP-Signals mit der Färbung, die von Antikörpern sowohl gegen GFP als auch gegen die LC-FACS verursacht wird (Abb. 18). Die Fusion mit GFP ändert also die Lokalisation des Proteins nicht und kann deshalb genauso wie die Antikörperfärbungen austauschbar für Kollaborationsstudien mit anderen Proteinen oder GFP-Konstrukten verwendet werden.

4.2.2 KOLOKALISATION MIT ZELLORGANELLEN

Wie bereits in der Einleitung beschrieben kommen Fettsäure aktivierende Enzyme sowohl im Cytosol, am Endoplasmatischem Retikulum (ER) sowie in Peroxisomen und Mitochondrien vor. Es lag also nahe, eine Kolokalisation mit eben diesen Zellkompartimenten zu untersuchen, obgleich bei der Sequenzanalyse keine bekannten Signalsequenzen oder Signalpeptide gefunden werden konnten.

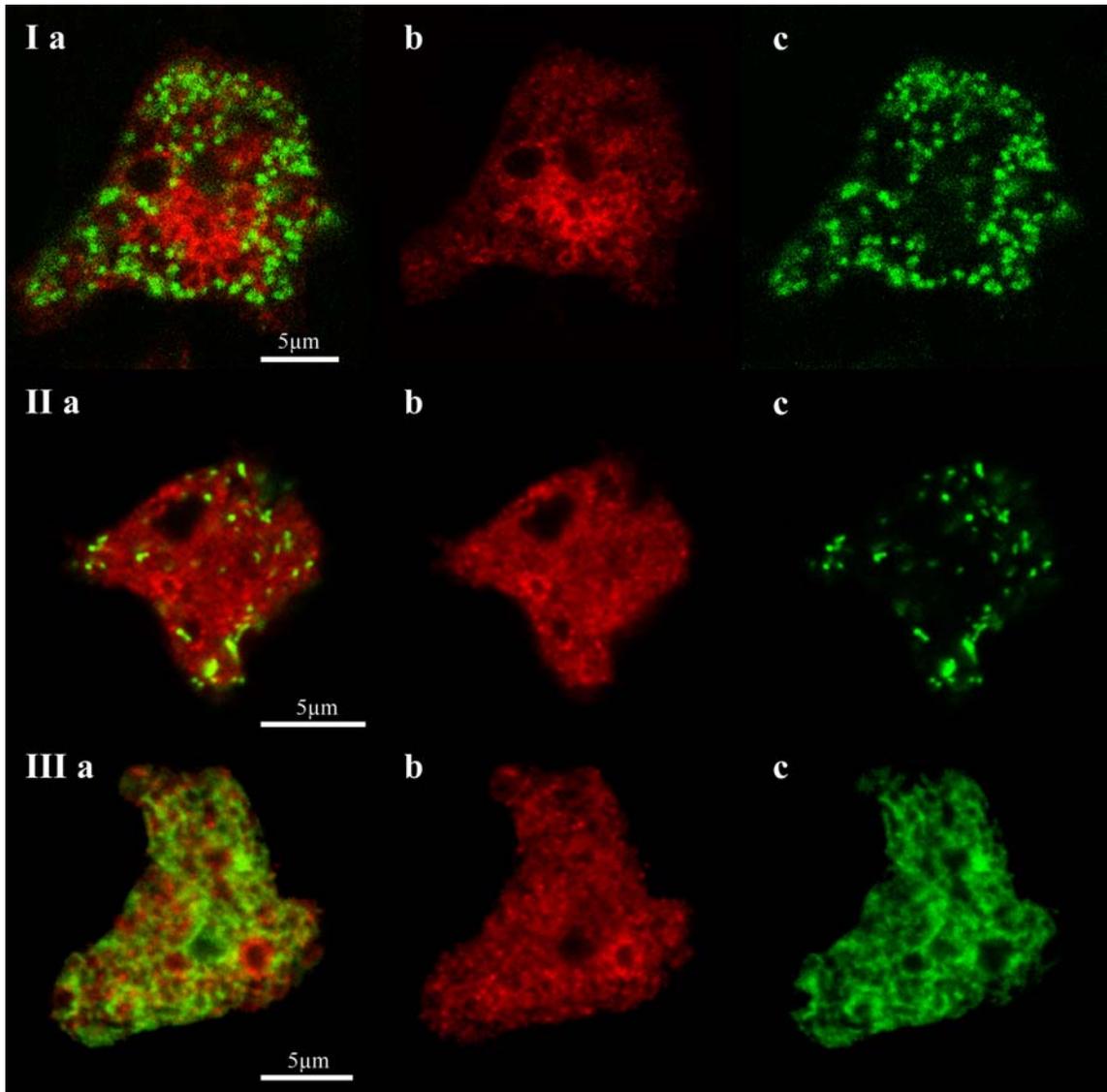


Abb. 19: Intrazelluläre Lokalisation der LC-FACS in verschiedenen GFP-Fusionsprotein exprimierenden *D. discoideum* Stämmen. I: GFP markierte Mitochondrien (I c), II: GFP-SKL markierte Peroxisomen (II c), III: GFP-HDEL markiertes ER (III c) (Monnat *et al.*, 1997), a: Überlagerungsbilder; I b, II b, III b mAb 221-547-5.

Der verwendete mito-GFP Stamm exprimiert ein mit einer mitochondrialen *Leader*-Sequenz versehenes GFP (M. Maniak, pers. Mitteilung). In Abb. 19 (I c) erscheint die Fluoreszenz in grünen kompakten Körpern, die über die gesamte Zelle, insbesondere in den Randbereichen, verteilt sind. Ähnlich verhält es sich beim Peroxi-GFP. Hier war die Peroxisomen spezifische Zielsequenz SKL an GFP gekoppelt worden (M. Maniak, pers. Mitteilung), wodurch wiederum ein punkartiges Muster entstand (Abb. 19, II c). Die von GFP-HDEL (Monnat *et al.*, 1997) verursachte Fluoreszenzmarkierung (Abb. 19,

III c) zeigt verzweigte, tubuläre Strukturen, die sich dicht durch die gesamte Zelle ziehen. Die HDEL-Sequenz ist ein ER-Retentionssignal und führt zur Markierung des ER durch GFP. Zusammen mit der bereits beschriebenen LC-FACS-Färbung (Abb. 19 I b, II b, III b) ergibt sich in den Überlagerungsbildern (Abb. 19, I a, II a, III a) keine Kolokalisation von LC-FACS mit Mitochondrien, Peroxisomen oder dem ER. LC-FACS-GFP Fusionsprotein exprimierende Zellen wurden mit Antikörpern gegen in Mitochondrien bzw. ER lokalisierende Proteine gefärbt. Das Ergebnis, daß sich zwischen der Lokalisation der LC-FACS und Mitochondrien bzw. ER keine Übereinstimmung feststellen läßt, konnte durch diese komplementären Immunfluoreszenz-Experimente bestätigt werden (nicht gezeigt). Damit konnte ausgeschlossen werden, daß die hier untersuchte LC-FACS weder Teil der β -Oxidation oder des Energiestoffwechsels in Mitochondrien oder Peroxisomen ist, noch im ER lokalisiert, wo auch andere Fettsäure-CoA-Ligase zu finden sind (Lazo *et al.*, 1990) und ein Teil der *de novo* Fettsäuresynthese stattfindet (Ivessa *et al.*, 1997).

4.2.3 KOLOKALISATION MIT MARKERPROTEINEN FÜR DIE SPÄTE ENDOCYTOSE UND F-AKTIN

Das von LC-FACS-GFP-Fusionsproteinen gebildete Verteilungsmuster, ebenso wie die Antikörpermarkierung in vegetativen *D. discoideum* Zellen legen eine endosomale Lokalisation des Proteins nahe. Die Kolokalisation der LC-FACS mit bekannten Endocytose Markerproteinen in der Immunfluoreszenz wurde untersucht, um diese Hypothese zu überprüfen. Coronin wird auf Endosomen nach und nach durch Vacuolin ersetzt, Vacuolin und Coronin dienen als Marker für aufeinanderfolgende Stadien der späten Endocytose. Während der neutralen Phase bis hin zur Exocytose ist auf diesen Kompartimenten auch F-Aktin nachweisbar (Rauchenberger *et al.*, 1997).

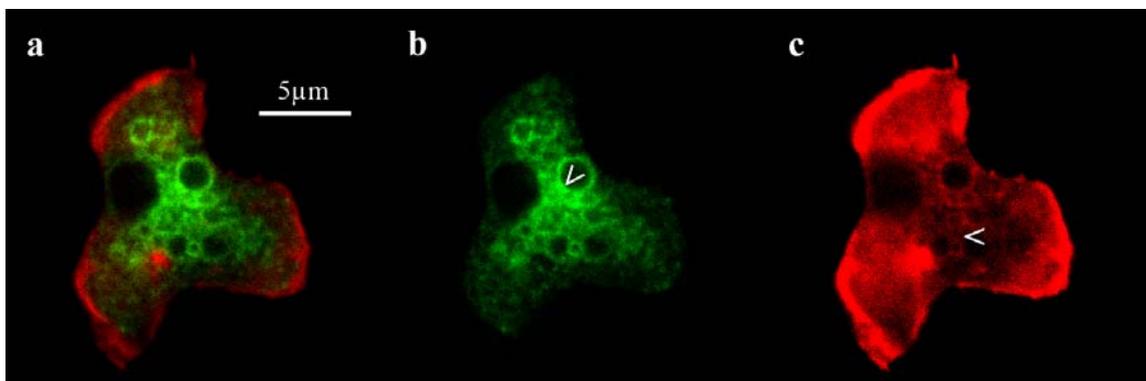


Abb. 20: Kolokalisation von LC-FACS und F-Aktin. Phalloidin-Färbung (c) von LC-FACS -GFP exprimierenden Zellen (b), Überlagerungsbild (a). Es handelt sich bei den schwachen roten Ringen nicht aber um die GFP Fluoreszenz, die in den roten Kanal überstrahlt. Dies wird dadurch deutlich, daß das stärkste GFP Signal (b, Pfeil) im roten Kanal nicht zu sehen ist. Die Überlagerung beider Kanäle ergibt auf Grund der sehr schwachen TRITC-Fluoreszenz keine Gelbfärbung der Strukturen, die sonst in Überlagerungsbildern eine Kolokalisation anzeigen.

Erwartungsgemäß färbt Phalloidin-TRITC vor allem das cortikale Cytoskelett, wo F-Aktin angereichert wird. Es wurden aber auch - sehr viel weniger intensiv - fluoreszierende Ringe sichtbar (Abb. 20, c). Von den drei übereinander angeordneten Ringen (Abb. 20, c, Pfeil) zeigt nur der untere eine Entsprechung im Muster der LC-FACS-GFP Markierung (Abb. 20, b). Hier kann eine Kolokalisation angenommen werden.

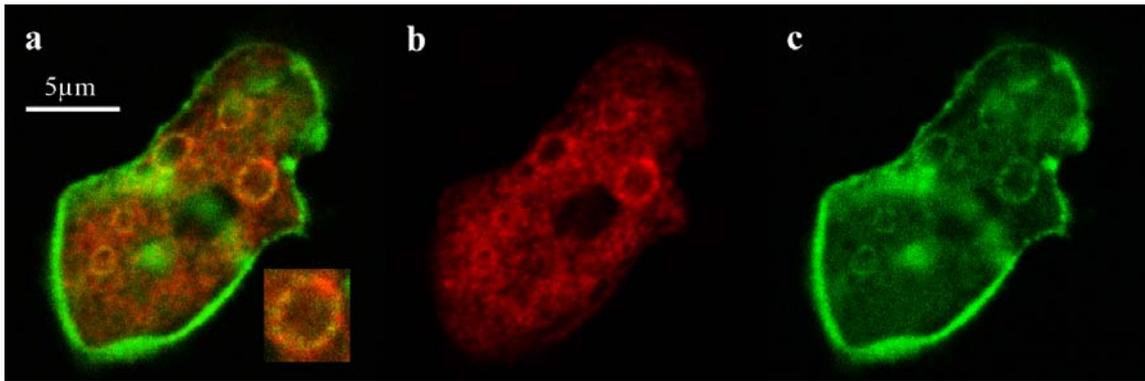


Abb. 21: Kolokalisation von Coronin und LC-FACS. Immunfluoreszenz von Coronin-GFP exprimierenden Zellen (c) mit mAb 221-457-5 gegen LC-FACS (b); Im Überlagerungsbild (a) ist eine partielle Kolokalisation beider Proteine auf ringförmigen Strukturen zu sehen. Auf den Endosomenmembranen ergibt sich ein scheckiges Muster (a, Vergrößerung).

In Abb. 21 (c) ist die intrazelluläre Verteilung von Coronin-GFP zu erkennen. Es ist sowohl an der Zellperipherie angereichert, sowie diffus verteilt im Cytoplasma lokalisiert. Das GFP-Muster entspricht dem von Rauchenberger *et al.* beschriebenen, nach dem die Ringe als späte Endosomen identifiziert werden können (Rauchenberger *et al.*, 1997). Verglichen mit dem bekannten Verteilungsmuster der LC-FACS (Abb. 21, b) im Überlagerungsbild (Abb. 21, a), ergibt sich daraus eine Kolokalisation der LC-FACS mit Coronin auf Endosomen. Auch bei diesem Experiment (Abb. 21, b) ist die Proteinhülle aus LC-FACS nicht gleichmäßig über das Endosom verteilt; zusammen mit Coronin-GFP (Abb. 21, c) ergibt sich auf der Endosomenmembran ein geschecktes Muster (Abb. 21, a, Inset). Diese an einen Flickenteppich erinnernde Verteilung von Proteinen in verschiedene Domänen der dem Cytosol zugewandten Membranoberfläche, wurde auch schon für Coronin und Vacuolin beschrieben (Rauchenberger *et al.*, 1997). Alle mit Coronin dekorierten Endosomen enthalten auch LC-FACS in ihrer Proteinhülle, Coronin und LC-FACS sind also teilweise kolokalisiert.

Coronin wird auf den Endosomen sukzessive durch Vacuolin ersetzt, bis kurz vor der Exocytose eine starke Proteinhülle aus Vacuolin das Kompartiment umgibt (Abb. 22, c, f).

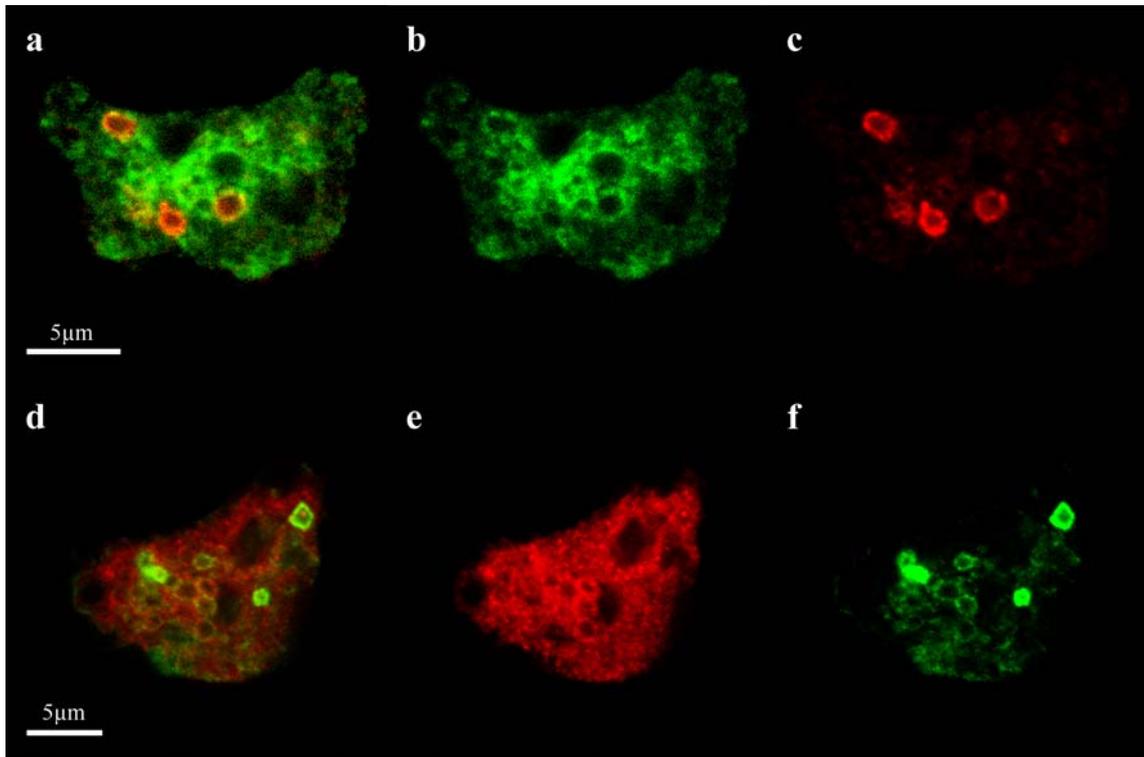


Abb. 22: Kolokalisation von LC-FACS mit Vacuolin, Immunfluoreszenz von LC-FACS-GFP exprimierenden Zellen (b), die mit mAb 221-1-1 inkubiert wurden, um Vacuolin zu markieren (c); Vacuolin-GFP exprimierenden Zellen (f) mit mAb 221-457-5 markierter LC-FACS (e); Überlagerungsbilder (a, d). Endosomen, die eine dicke Vacuolinhülle tragen sind frei von LC-FACS (a, b, Pfeile). Sie werden als späte Endosomen interpretiert (a, d).

Unabhängig davon, ob Vacuolin B GFP-markiert oder mit Hilfe eines Vacuolin B spezifischen monoklonalen Antikörpers nachgewiesen wurde, findet sich das Protein angereichert auf späten Endosomen (Jenne *et al.*, 1998).

Späte Endosomen sind offenbar frei von LC-FACS, während weniger reife Endosomen mit weniger dicker Vacuolinhülle auch LC-FACS-Protein tragen (Abb. 22, b, e). Mit Vacuolin zeigt LC-FACS also ebenfalls eine partielle Übereinstimmung. Die Lokalisation von LC-FACS auf späten Endosomen konnte durch die Übereinstimmungen mit F-Aktin, Coronin und Vacuolin nachgewiesen werden, damit ist eine Beteiligung der LC-FACS in der Endocytose von der neutralen Phase an anzunehmen. Wie in Abb. 21 sind auch bei den Immunfluoreszenz-Bildern mit Vacuolin Punkte und ringförmige Strukturen zu erkennen, die nur mit LC-FACS bedeckt sind.

4.2.4 KOLOKALISATION MIT DYNAMIN, PROTONENPUMPE UND LYSOSOMALEN PROTEINEN

Dynamamin A zeigt in der Immunfluoreszenz eine punktartige Verteilung, die als Vesikel interpretiert wurden. Ordnen sie sich um Endosomen, so sind diese nahezu immer Vacuolin B positiv (Wienke *et al.*, 1999). Die Autoren postulieren daher für Dynamamin A eine Funktion in der Membrantransport-Prozessen in der späten Endocytose (Endosomen / Lysosomen).

Es war kein Antikörper gegen Dynamamin A verfügbar, ein Dynamamin A-GFP exprimierender *Dictyostelium discoideum* Stamm (Wienke *et al.*, 1999) wurde uns aber freundlicherweise von D. J. Manstein zur Verfügung gestellt.

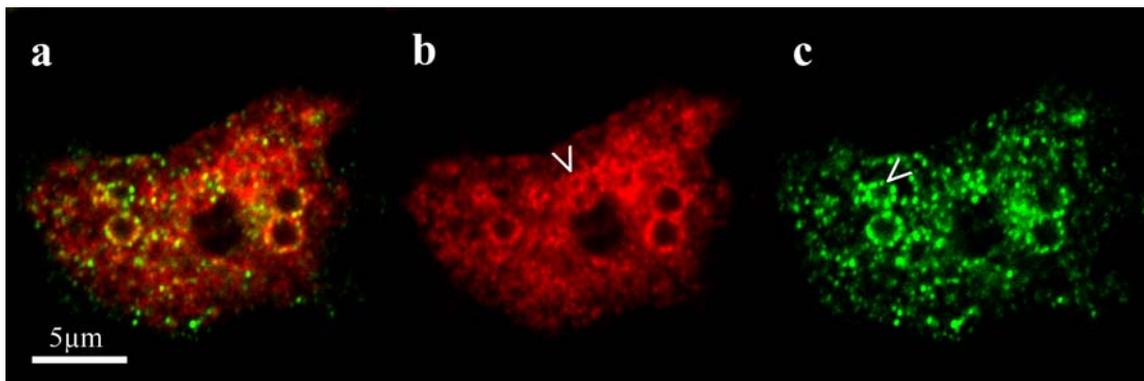


Abb. 23: Immunfluoreszenz Dynamamin-GFP exprimierender Zellen (c) mit mAb 221-547-5 zur Markierung von LC-FACS (b). Im Überlagerungsbild (a) ist eine partielle Kolokalisation auf ringförmigen Strukturen zu erkennen.

Das von Dynamamin-GFP gebildete Muster besteht hauptsächlich aus Punkten, die entweder über gesamte Cytoplasma verteilt sind (Abb. 23, c), oder aber ringförmig angeordnet sind. Möglicherweise fusionieren diese Vesikel gerade mit einem, größeren Endosom oder schnüren sich von diesem ab. Im Überlagerungsbild zeigt sich, daß die ringförmigen Strukturen zum Teil beide Proteine gleichzeitig tragen. Es war bereits vermutet worden, daß es sich bei den punktartigen Strukturen, die der LC-FACS-Antikörper markiert, um kleine Vesikel handeln könne. Diese Vermutung konnte durch das beschriebene Immunfluoreszenz-Experiment untermauert werden, obgleich hier die Kolokalisation auf die späten Endosomen beschränkt ist. Auch hier finden sich von Dynamamin-GFP markierte Bereiche (Abb. 23, c, Pfeil), die der Antikörper gegen LC-FACS nicht detektiert, umgekehrt gibt es auch LC-FACS-Antikörper gefärbte Bereiche ohne Dynamamin-GFP-Markierung (Abb 23, b, Pfeil). Die diffus im Cytoplasma verteilten Punkte zeigen keine Übereinstimmungen der beiden Proteine. Diese Vesikel konnten ebenso wie bei den Immunfluoreszenz-Experimenten mit den anderen Markern der späten Endocytose noch nicht zugeordnet werden. Es könnte sich dabei um frühe, saure Endosomen handeln, daher wurde in LC-FACS -GFP exprimierenden Zellen die H^+ -ATPase mit mAb 221-35-2 markiert (Nolta *et al.*, 1991).

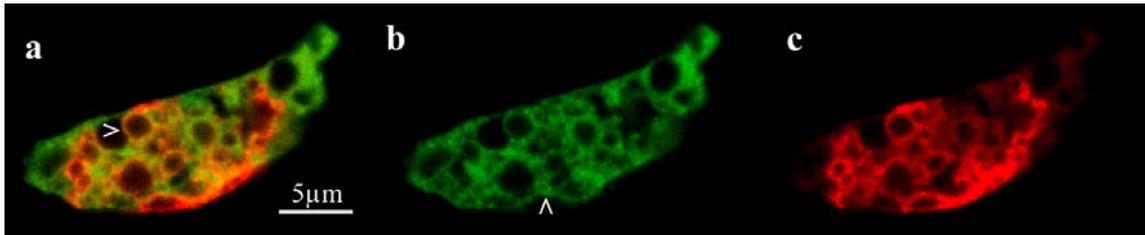


Abb. 24: Immunfluoreszenz LC-FACS -GFP exprimierender Zellen (b) mit gegen die vacuoläre H^+ -ATPase (A-Untereinheit) gerichteten mAb 221-35-2 (c). Im Überlagerungsbild (a) ist eine Kolo-kalisation beider Proteine auf ringförmigen Strukturen zu erkennen (a, Pfeil). Bereiche, die LC-FACS -GFP markiert sind, aber frei von der Protonenpumpe sind, können beobachtet werden (b, Pfeil), wie solche, die ausschließlich H^+ -ATPase positiv sind.

Wie in Abb. 24(c) zu erkennen ist, markiert der H^+ -ATPase-Antikörper Vesikel verschiedener Größe sowie tubuläre Strukturen in der Zelle, die nicht mit dem GFP-Muster zur Deckung gebracht werden können (Abb. 24, b), hierbei handelt es sich um das Netzwerk der kontraktilen Vacuole (Gabriel *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2002). Es sind aber auch Kompartimente erkennbar, auf denen LC-FACS und H^+ -ATPase gemeinsam zu finden sind. Diese von beiden Proteinen besetzten Vesikel können als saure Endosomen interpretiert werden. Wie bei den Immunfluoreszenz- Experimenten mit den Markerproteinen der späten Phase der Endocytose, sind auch hier ringförmige Strukturen sichtbar, die mit LC-FACS-GFP markiert wurden, die der H^+ -ATPase-Antikörper jedoch nicht anfärbt.

Weitere Proteine, die in Zusammenhang mit Endocytose in *Dictyostelium discoideum* gebracht wurden, sind LmpA, LmpB und LmpC (Temesvari *et al.*, 2000; Janssen *et al.*, 2001), die Homologie zur CD36/LIMPII Familie in Säugern aufweisen, also zu lysosomalen integralen Membran-Proteinen. Bereits 5 min nach Zugabe von Flüssigphasenmarker (TRITC-Dextran) zum Medium, sind 80% der TRITC markierten Pino-somen positiv für LmpA, nur auf einem kleineren Teil kann LmpB und LmpC nachgewiesen werden (Janssen *et al.*, 2001). Diese Proteine können daher ebenfalls als Marker für die frühe, saure Phase der Endocytose betrachtet werden.

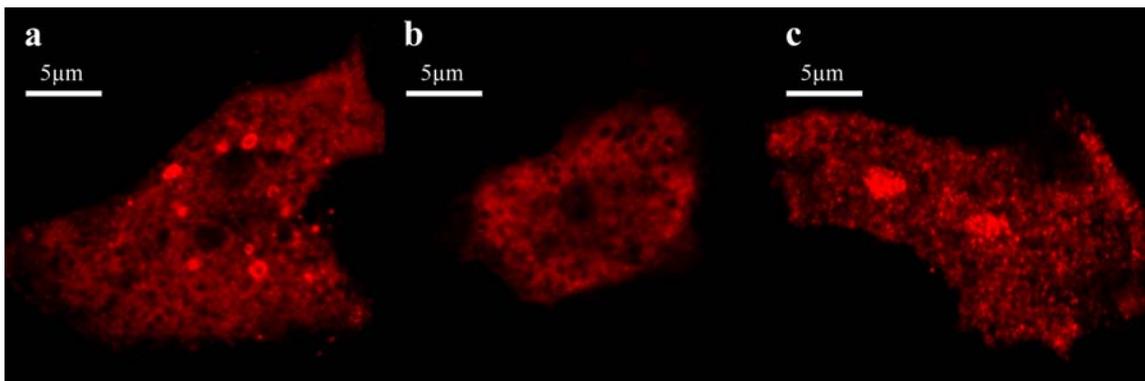


Abb. 25: Intrazelluläre Lokalisation der Proteine LmpA (a, mAb #3417), LmpB (b, mAb #7656) und LmpC (c, mAb #7454) in vegetativen Ax2 Zellen.

Die gegen LmpA gerichteten Antikörper markierten Strukturen (Abb. 25, a), die denjenigen ähneln die durch den LmpB Antikörper detektiert wurden (Abb. 25, b), mit dem Unterschied, daß einige der Ringe eine deutlich stärkere Färbung zeigen. Das von LmpC-Antikörper gebildete Muster besteht hingegen aus diffus verteilten Punkten, die wahrscheinlich ebenso Vesikel darstellen.

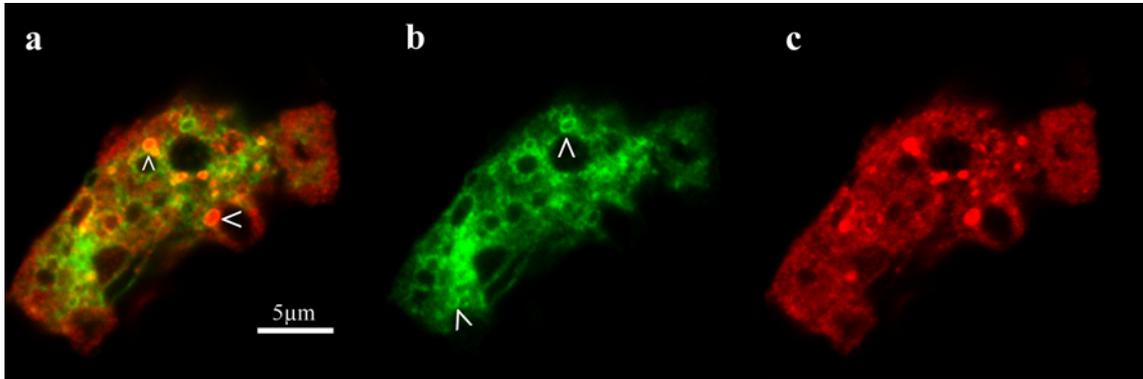


Abb. 26: Kolokalisation von LC-FACS-GFP (b) mit LmpA (c, mAb #3417), Überlagerungsbild (a). Die beiden Bereiche in der Mitte der Zelle stimmen in Anzahl, Form und Größe mit Zellkernen überein.

Die Überlagerung der Fluoreszenz Kanäle von LC-FACS-GFP und TRITC (LmpA) zeigt wiederum eine teilweise Übereinstimmung der Lokalisation beider Proteine, vor allem bei den von LmpA stark gefärbten Vesikeln (Abb. 26, a, Pfeile). Auch in dieser Immunfluoreszenz gab es LC-FACS-GFP markierte Ringe, die nicht mit vom Antikörper detektierten zur Deckung gebracht werden können (Abb. 26, b, Pfeile). Keinerlei Kolokalisation konnte mit LC-FACS und LmpB oder LmpC festgestellt werden (nicht gezeigt).

4.2.5 AUFNAHME FLUORESZIERENDER ENDOCYTOSEMARKER

Die Immunfluoreszenz-Experimente haben Kolokalisation von LC-FACS und Proteinen, die als Endocytosemarker betrachtet werden, gezeigt und erlauben eine vorläufige Einordnung des Proteins sauren, sowie späten Endosomen. Um den Befund, daß es sich bei den Ringen tatsächlich um Endosomen handelt kinetisch zu untermauern, wurden LC-FACS-GFP exprimierende Zellen zusammen mit Flüssigphasenmarker (TRITC-Dextran) inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten im CLSM aufgenommen. Nach ungefähr 15 min konnte TRITC-Dextran in GFP-dekorierten Kompartimenten nachgewiesen werden (Abb. 27, a). Makro- und Mikropinosomen fusionieren oft schnell nach der Internalisierung mit bereits existierenden Endosomen.

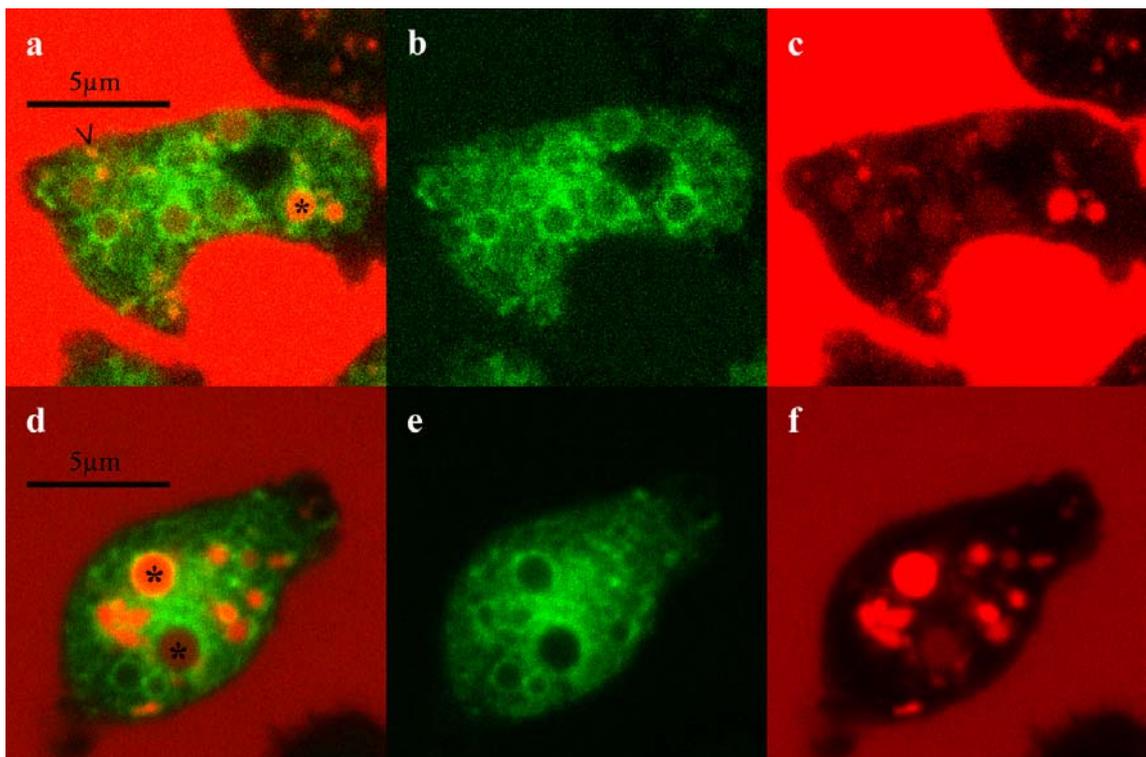


Abb. 27: Lebende LC-FACS -GFP exprimierende Zellen (b, d) wurden mit TRITC-Dextran (c, f) enthaltendem Medium inkubiert und mit dem CLSM zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen. 14 min (a, b, c) nach Zugabe des Flüssigphasenmarkers ist bereits im Überlagerungsbild (a, Stern) ein LC-FACS-GFP markiertes Endosom mit TRITC-Dextran-Medium gefüllt. Ein kleines Pinosom ist GFP und TRITC positiv (a, schwarzer Pfeil). Die Fluoreszenzintensität des TRITC-Dextrans in LC-FACS-GFP markierten Endosomen variiert (d, Sterne). Dieses Experiment wurde viermal durchgeführt; hier sind repräsentative CLSM Aufnahmen gezeigt.

Zwischen Aufnahme und Exocytose kann als Folge von Membranrecycling (Maniak, 2001) eine zunehmende Konzentration des Fluoreszenzmarkers in den reifenden Endosomen beobachtet werden, die auch in Abb. 27 klar durch die zunehmende Intensität der TRITC-Fluoreszenz innerhalb der Zellen erkennbar ist. Bei $t = 60$ min ist die Intensität in einigen Endosomen deutlich höher als im umgebenden Medium bei $t = 14$ min kann hingegen nur eine maximal mit dem Medium vergleichbar starke Fluoreszenz in Vesikeln beobachtet werden (Abb. 27, a Stern). Auch in weiteren LC-FACS-GFP umhüllten Kompartimenten ist TRITC-Dextran zu erkennen, allerdings in schwächerer Konzentration verglichen mit dem Medium. Eine Verdünnung der TRITC-Dextran Konzentration in der Vacuole kommt zustande, wenn kleine TRITC positive Pinosomen mit größeren und älteren Vacuolen fusionieren, die vor der Zugabe von TRITC zum Medi-

um gebildet wurden. In Abb. 27(a) ist zu erkennen, daß diese kleine Vesikel zum Teil auch GFP markiert sind. Abb. 28 zeigt dies deutlicher. Mehrere TRITC und GFP positive Pinosomen sammeln sich an der Peripherie einer größeren Vakuole. Die Vesikel müssen zum Teil älter sein, als das Makropinosom um das sie sich sammeln, da in ihrem Lumen bereits ankonzentriertes Medium zu sehen ist (Abb. 28, c Pfeil). Daneben ist ein Makropinosom zu sehen, das sich offenbar gerade erst gebildet hat. Hier ist keinerlei GFP Markierung zu erkennen.

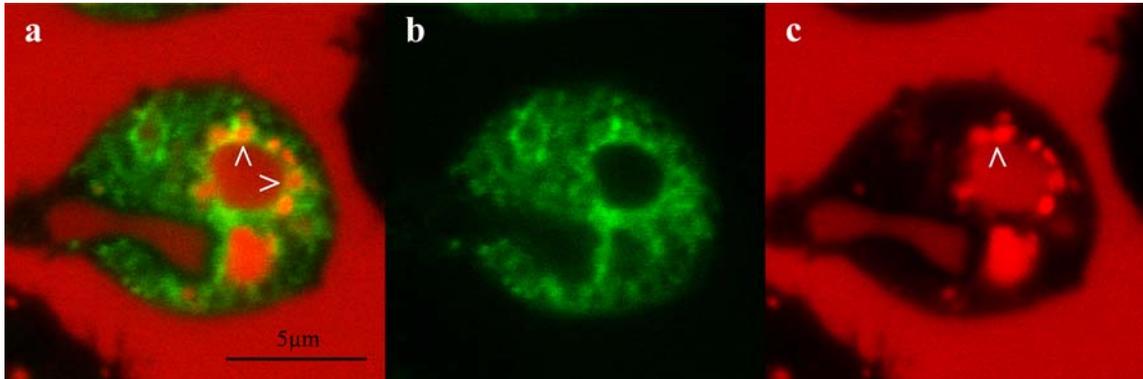


Abb. 28: Die hier abgebildete Zelle wurde wie in Abb. 27 beschrieben behandelt und 48 min nach Zugabe von TRITC mit dem CLSM aufgenommen. TRITC und GFP positive Vesikel sind am Rand des älteren Makropinosoms zu sehen (a, Pfeile).

4.2.6 PHAGOCYTOSE FLUORESZIERENDER PARTIKEL

Nachdem die LC-FACS auf an der Pinocytose beteiligten Vesikeln lokalisiert, lag es nahe, zu überprüfen zu welchem Zeitpunkt nach der Aufnahme phagozytierte Partikel in LC-FACS dekorierte Endosomen zu finden sind.

Bereits 5 min nach Zugabe von fluoreszierenden Latex-Partikeln zum Medium hatten bereits 20-30% der Zellen einen solchen Partikel aufgenommen. Von diesen waren etwa zwei Drittel in GFP positiven Vesikeln zu finden (Abb. 29, a). Diese Beobachtung spricht für eine frühe Beteiligung der LC-FACS an der Phagozytose.

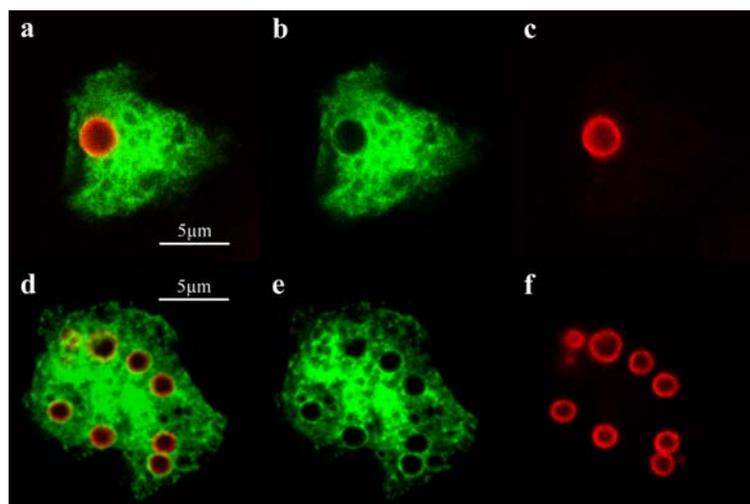


Abb. 29: Lebende LC-FACS -GFP exprimierende Zellen (b, d) wurden mit fluoreszierenden Latexpartikeln (c, f) inkubiert und mit dem CLSM zu verschiedenen Zeitpunkten (14 min: a, b, c; 60 min: d, e, f) aufgenommen. Bereits 5 min nach Zugabe der Latexpartikel ist ein solcher Partikel in einem LC-FACS-GFP markierten Phagosom (Überlagerungsbild, a).

4.3 ENDOCYTOSE ASSAYS MIT TRIACSIN C

Die Immunfluoreszenz-Experimente und die mit Hilfe des CLSMs dokumentierte Aufnahme von Flüssigphasenmarker bzw. fluoreszierenden Latex-Partikeln zeigen LC-FACS auf Phagosomen. Ob aber LC-FACS-Enzyme funktionell an der Endocytose beteiligt sind, sollte durch den Einsatz von TriacsinC festgestellt werden. Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven Inhibitor diese Enzymklasse (Hartman *et al.*, 1989).

Zunächst wurden Phagocytose-Assays durchgeführt, in den die Aufnahme TRITC-markierten Hefen quantitativ vermessen wurde. Während kein Effekt auf die Pinocytose beobachtet werden konnte (nicht gezeigt), ist bei einer Konzentration von 10 μM Triacsin C eine ca. fünffache Reduktion der Phagocytose feststellbar (Abb.30, b). Eine Konzentration des Inhibitors von 0,1 μM oder 1 μM bewirkt einen geringen Rückgang in der Aufnahme von Partikeln von ca. 15% verglichen mit unbehandelten Wildtypzellen.

Um zu verfolgen wie lange die Passage von aufgenommenem Medium durch die Zelle von Internalisierung bis Exocytose dauert, werden vegetative *D. discoideum* Zellen in einem „pulse-chase“-Experiment mit Flüssigphasenmarker (TRITC-Dextran) enthaltendem Medium 15 min inkubiert und anschließend die Abnahme der zellinternen Fluoreszenz verfolgt. Im Transit zeigt Triacsin C keinen Effekt auf die Exocytose des Flüssigphasenmarkers.

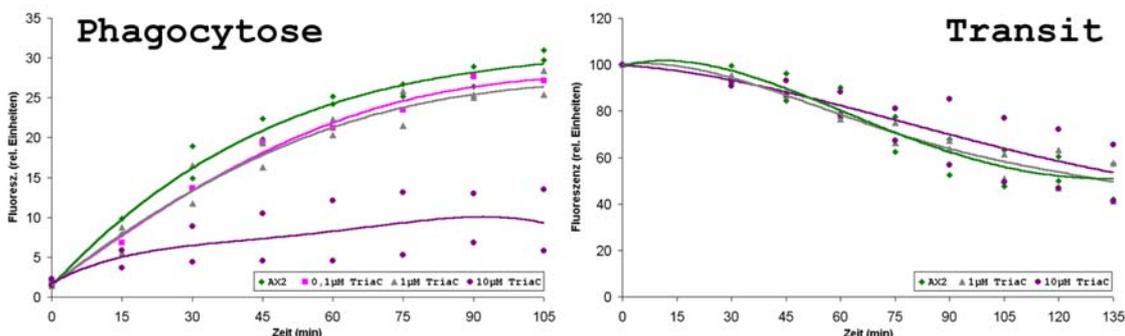


Abb. 30: Messung der Phagocytoserate und der Länge des endocytischen Transits in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des LC-FACS Inhibitors Triacsin C (ohne Zusatz, 0,1 μM , 1 μM bzw. 10 μM). Vegetative Ax2 Zellen wurden in Schüttelkultur angezogen, dann mit TRITC-markierten Hefen versetzt. Die Aufnahme der zugesetzten Hefepartikel wurde zwei Std. lang dokumentiert (Phagocytose, a). Die Abnahme der intrazellulären TRITC-Fluoreszenz wurde 135 min lang verfolgt (Transit, b).

4.4 MANIPULATION DER LC-FACS EXPRESSION

Spezifischere Erkenntnisse über Funktion und Bedeutung eines Proteins lassen sich durch dessen Überexpression einerseits und die Unterbrechen des Leserahmens des entsprechenden Gens („*Knock-Out*“) andererseits gewinnen, wobei aus den resultierenden Phänotypen Rückschlüsse gezogen werden.

4.4.1 UNTERDRÜCKUNG DER LC-FACS EXPRESSION DURCH *PTGS*

Zunächst wurde versucht, die Expression der LC-FACS über *Post Transkriptional Gene Silencing (PTGS)* zu unterdrücken. Zu diesem Zweck waren ein Vektor konstruiert worden, der ein 500 bp langes Stück der LC-FACS cDNA in *antisense* Orientierung enthielt (Plasmid #288). Dasselbe Fragment in *sense* Orientierung diente als Kontrolle (Plasmid #289). Nach Transformation in *Dictyostelium discoideum*, konnten allerdings keine Klone mit deutlich reduzierter LC-FACS Proteinmenge ausgemacht werden. Ein weiterer Ansatz war die Transkription eines artifiziellen RNAi-Konstrukts (Martens *et al.*, 2002) unter Kontrolle des Aktin 8- Promotors (Plasmid #314). Auch hierdurch konnte keine effiziente Reduktion des Genproduktes erreicht werden (nicht gezeigt).

4.4.2 LC-FACS „*KNOCK-OUT*“

TRANSFORMATION DES „KNOCK-OUT“ KONSTRUKTES IN AX2

Eine die Blasticidin-Resistenz-Kassette enthaltendes LC-FACS „*knock-out*“-Konstrukt einer Größe von 2,9 kb wurde verwendet, um durch homologe Rekombination den Leserahmen des endogenen LC-FACS-Gens mittig im ORF in Ax2 zu unterbrechen, und so eine LC-FACS-Nullmutante zu schaffen.

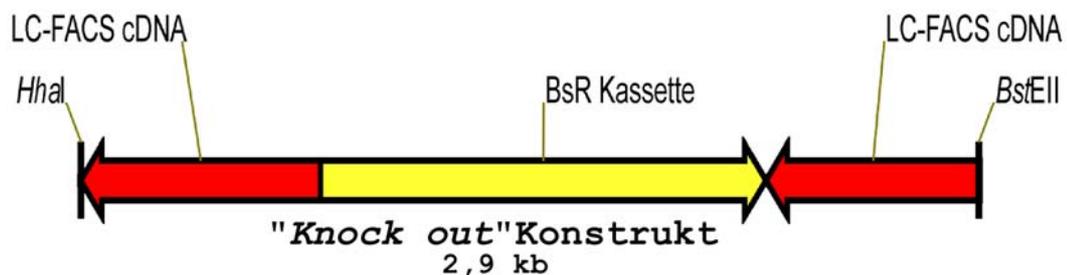


Abb. 31: Schematische Darstellung des „*Knock-out*“-Konstruktes. Die die Resistenz-Kassette (Bs^R -Kassette, gelb) flankierenden LC-FACS cDNA Fragmente (rot) haben eine Länge von 708 bp („*downstream*“ von Bs^R) bzw 799 bp („*upstream*“ von Bs^R). Eingezeichnet sind die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HhaI* und *BstEII*.

Nach Transformation des „*Knock-out*“-Konstrukts in *Dictyostelium discoideum* Wildtyp-Zellen führte zu mehreren resistenten Subklonen, die isoliert werden konnten und die mit Hilfe von Western-Blot Analysen mit mAb 221-457-5 auf ihre LC-FACS Expression hin überprüft wurden. Eine Expression des LC-FACS Genproduktes im Klon KO #8 konnte mit Western-Transfer Analyse (Abb. 36) nicht mehr nachgewiesen werden.

Der Klon KO #8 wurde einem weiteren Test auf LC-FACS -Protein unterzogen. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz Untersuchungen sollte gezeigt werden, ob der Antikörper mAb 221-457-5 in KO #8 Zellen noch Strukturen markiert, die dem in Ax2 Zellen gefärbten Muster entsprechen.

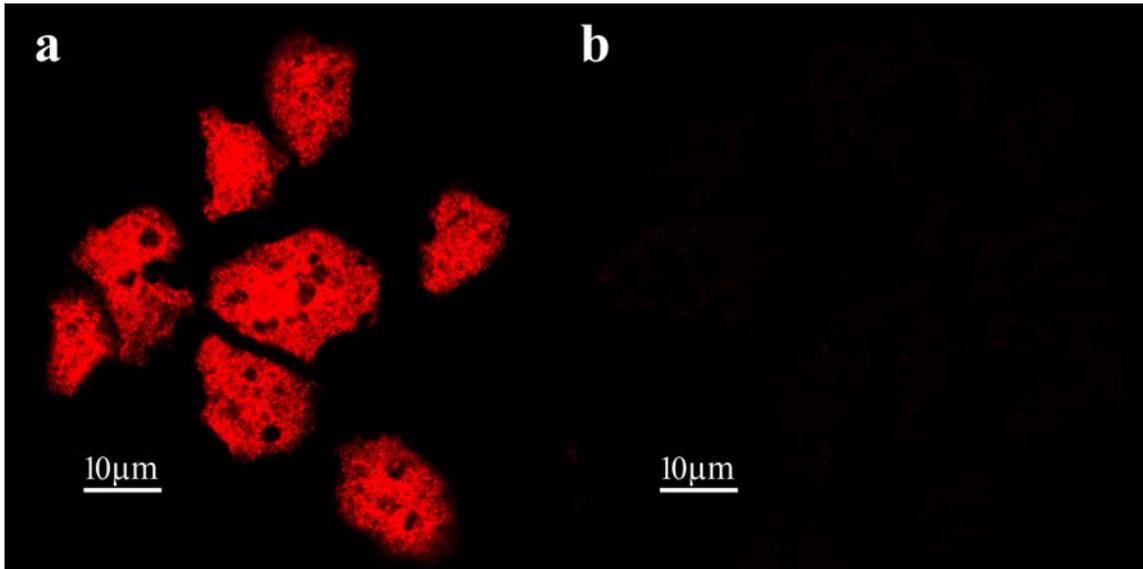


Abb. 32: Immunfluoreszenz von Ax2 (a) und KO #8 (b) mit mAb 221-457-5 zur Überprüfung der LC-FACS Expression. Beide Immunfluoreszenzen an Ax2 und KO #8 Zellen sind unter gleichen Bedingungen angefertigt worden. Die Aufnahmen mit derselben Einstellung des CLSMs in Bezug auf Pinhole und Empfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors.

Abb. 32 (a) ist erneut eine Immunfluoreszenz von Wildtypzellen mit mAb 221-457-5 abgebildet; zu erkennen sind die bereits beschriebenen intrazellulären Muster aus verschieden großen ringförmigen Strukturen und diffus verteilten Punkten. Die rote Fluoreszenz in Abb. 32 (a) erscheint überstrahlt, jedoch sind nur unter diesen Bedingungen in der korrespondierenden Immunfluoreszenz von LC-FACS⁻Zellen (Abb. 32, b) überhaupt noch Zellen zu erkennen. Die schwache Antikörpermarkierung ist sicherlich auf unspezifischen Kreuzreaktionen des Antikörpers zurückzuführen.

SOUTHERNBLOT-ANALYSE

Es mußte gezeigt werden, ob in Klon KO #8 mit dem LC-FACS „Knock-out“-Konstrukt das richtige Gen unterbrochen worden war. Außerdem war sicherzustellen, daß die transformierte DNA an keinem anderen Ort des Genoms integriert worden war. Beides konnte durch eine Southerblot-Analyse überprüft werden.

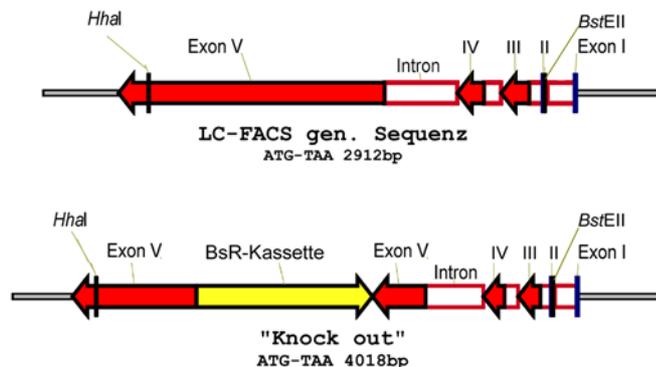
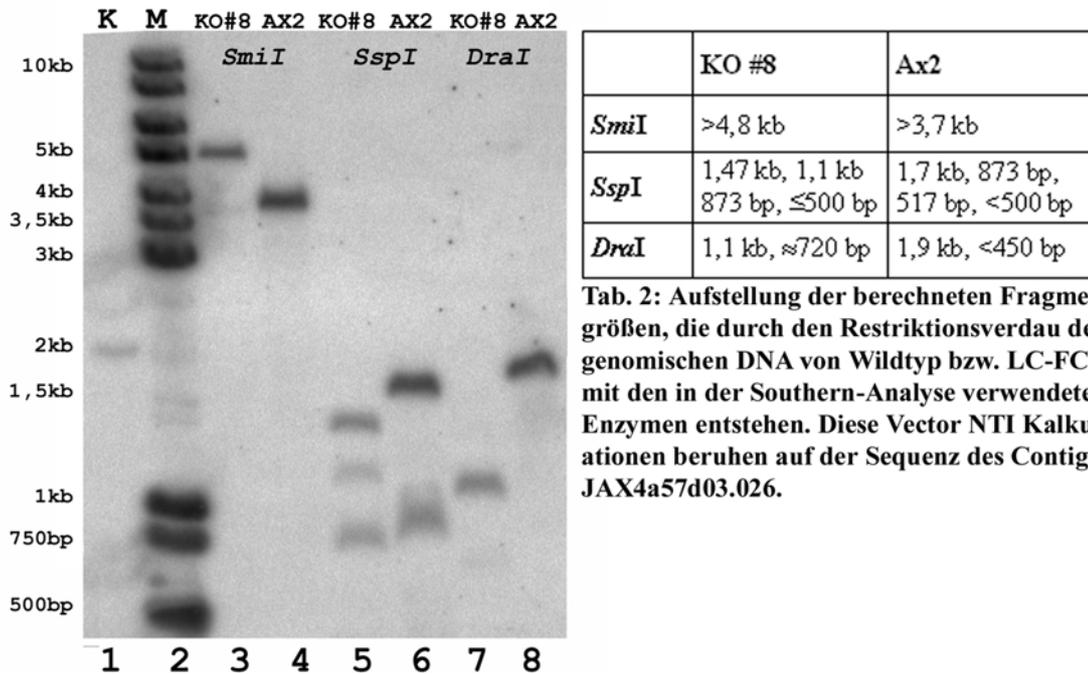


Abb. 33: Schematische Darstellung der genomischen Region des LC-FACS Gens in Ax2 (a) und KO #8 (b) nach erfolgreicher Insertion des „Knock-out“-Konstruktes. Kodierende Sequenzen sind rot dargestellt (Exons I-V), Intronsequenzen weiß. Die Resistenz-Kassette (BsR-Kassette, gelb) ist ebenso eingezeichnet wie die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HhaI* und *BstEII*. Die Darstellung entspricht in der Orientierung dem des Contigs JAX4a57d03.026, auf dem der LC-FACS ORF ca. 500 bp vor dem 3' Ende beginnt.

Verglichen wurde die Größe der DNA Fragmente nach einem Restriktionsverdau der genomischen DNA von Ax2 und KO-#8 mit jeweils einem der folgenden Enzyme: *SmiI*, *SspI* und *DraI*. Als Sonde wurde ein 2 kb PCR Produkt, das dem ORF von LC-FACS entspricht, verwendet.



Tab. 2: Aufstellung der berechneten Fragmentgrößen, die durch den Restriktionsverdau der genomischen DNA von Wildtyp bzw. LC-FACS mit den in der Southern-Analyse verwendeten Enzymen entstehen. Diese Vector NTI Kalkulationen beruhen auf der Sequenz des Contigs JAX4a57d03.026.

Abb. 34: Southern-Blot Analyse von genomischer DNA aus Wildtyp (AX2) und LC-FACS (KO #8). Die präparierte DNA wurde jeweils mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*SmiI*, *SspI* und *DraI*) inkubiert und auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Nach der Übertragung der Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde (2 kb cDNA der LC-FACS). Die in Tab. 2 aufgeführten Fragmentlängen wurden mit VectorNTI berechnet (s. Anhang). Die auf dem Southern-Blot sichtbaren Banden stimmen mit dem kalkulierten Fragmentgrößen in Tab. 2 überein, obgleich die Laufhöhe der Fragmente nicht immer exakt mit der Berechnung korrespondiert. Dies kann auf Salzeffekte zurückzuführen sein, und darauf, daß die für *D. discoideum* typische AT-reiche Abschnitte ein leicht anderes Laufverhalten zeigen. Die in Spur 1 als Kontrolle aufgetragene DNA-Menge entspricht ≈4 ng (Plasmid #302 x *SalI*, ORF LC-FACS) Der Southern-Blot wurde über Nacht exponiert. K: Kontrolle; M: DNA Längensstandard

Als Kontrolle -in Spur 1- diente der Vektor #302, der zuvor mit *SalI* inkubiert worden war, um die enthaltene LC-FACS cDNA von 2 kb auszuschneiden. Der 487,5 kb lange genomische Contig JAX4a57d03.026, auf dem die vollständige kodierende Sequenz für LC-FACS liegt, endet 542 bp hinter dem Startcodon. Die LC-FACS kodierende Region liegt also auf dem letzten Stück des Contigs kurz vor seinem 3'Ende (s. Anhang).

450 bp "downstream" der in Abb. 33 eingezeichneten *HhaI* Schnittstelle liegt eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SmiI*. Bis zum 3'Ende des Contigs gibt es keine weitere *SmiI* Schnittstelle, genauso wenig wie innerhalb der Blastocidin-Kassette. Es ergibt sich also nur ein Fragment, auf das die Sonde hybridisieren kann. Das von der Sonde detektierbare Fragment aus der genomischen DNA von Ax2 muß also mindestens 3,7 kb, das aus der von KO #8 mindestens 4,8 kb groß sein. Dieser Unterschied von ca. 1,1 kb entspricht genau der Differenz in der Länge beider genomischer Regionen in Ax2 und KO #8 von Start- bis Stop-Codon des LC-FACS Gens (s. Abb. YX). Die Blastocidin-Kassette ist zwar ca. 1,4 kb groß, für die Klonierung in

den Leserahmen der LC -FACS cDNA waren jedoch 271 bp aus dem Vektor entfernt worden. Das *SmiI* Fragment aus Ax2 lief im Gel in der Höhe der 5 kb Bande des Längenstandards, dies läßt darauf schließen, daß eine weitere *SmiI* Erkennungssequenz ca. 200 bp in 3' Richtung nach dem Ende des Contigs im Genom liegt.

Die Spuren 5 und 6 enthielten mit *SspI* geschnittene genomische DNA aus KO #8 bzw. Ax2. In Spur 6 sind Banden in der erwarteten Größe von 1,7 kb und 873 bp zu erkennen. Ein Signal bei ca. 500 bp kann nur erahnt werden. Tatsächlich befinden sich in der fraglichen genomischen Region zwölf *SspI*-Schnittstellen, zehn davon befinden sich zwischen dem 5' Ende des vierten Introns (zwischen Exon IV und Exon V) und dem 3' Ende des Contigs, also derjenigen Region, die auch nach Insertion des „*Knock-Out*“-Konstrukts unverändert bleibt. Einige befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu einander, so daß die resultierenden Fragmente unter 20 bp, bzw. ca. 200-500 bp lang sind. Fragmente dieser Größe wurden nicht auf die Southern-Membran übertragen. Allerdings könnten diese Schnittstellen der Grund für die Unschärfe der kleineren Bande bei ca. 900 bp sein. Sollte der Verdau nicht immer vollständig gewesen sein, ergäben sich zusätzliche Banden einer Größe von 710-739 bp und 911 bp.

Die *SspI* geschnittene genomische DNA aus KO #8 zeigt in Spur 5 drei Banden, deren Laufhöhen mit der theoretischen Kalkulation (Vector NTI, s. Anhang) übereinstimmen. Die Fragmente von 517 bp und kleiner sind wie bei Ax2 nicht zu sehen. Die Bande bei ca. 900 bp erscheint nur in Spur 6 verschmiert. Die DNA Konzentration in der verwendeten Präparation aus KO #8 lag etwas niedriger als die der genomischen DNA aus Ax2, wie auch an der unterschiedlichen Intensität vergleichbarer Banden (z.B. Spuren 3 und 4).

Mit *DraI* verdaute Ax2 DNA ergab nur zwei Fragmente, die mit der LC-FACS Sonde hybridisieren konnte: 1885 bp und 718 bp; die kleinere Bande ist schwach zu erkennen. In der Sequenz der Blasticidin Kasette liegen sieben Schnittstellen für *DraI*, auf diese nur von innerhalb der Kasette stammenden Fragmente (≤ 733 bp) konnte die Sonde nicht hybridisieren.

Die Sonde detektierte die erwarteten, jedoch keine zusätzlichen Banden. Das LC-FACS „*Knock-out*“-Konstrukt war also ausschließlich an der gewünschten Stelle integriert worden und hat das offenbar in Einzel-Kopie vorliegende *FcsA* Gen unterbrochen.

4.4.3 „*RESCUE*“ UND ÜBEREXPRESSION DER LC-FACS

Nach der Eliminierung des LC-FACS Genproduktes, sollte zur weiteren Funktionsanalyse auch die Überexpression von LC-FACS untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der Vektor #306, der die cDNA enthält, in Ax2 Zellen transformiert. Nach erfolgreicher Transformation sollten die Zellen zusätzlich zur endogenen Kopie des Gens, ein oder mehrere weitere unter der Kontrolle des konstitutiven Aktin15-Promotors exprimieren und so die LC-FACS Proteinmenge erhöhen. Die einzelnen Klone wurden mit einem Western-Blot auf Expressionsstärke hin überprüft.

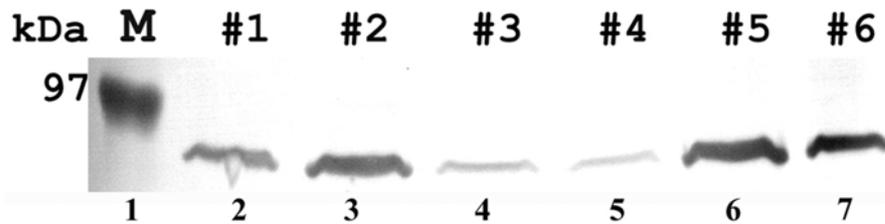


Abb. 35: Western-Blot Analyse von Gesamtprotein der mit Vektor #302 transformierten Ax2 Zellen (#1-#6). Zur Überprüfung der LC-FACS Expressionsstärke wurde dieser Western-Blot mit mAb 221-547-5 inkubiert. In allen Spuren waren identische Zelläquivalente aufgetragen worden. Proteinlängenstandard (M) in Kilodalton (kDa)

In Abb. 35 ist ein Western-Blot gezeigt der unter Verwendung des Antikörpers mAb 221-457-5 angefertigt wurde. In allen Spuren war Gesamtprotein von $7,5 \times 10^5$ Zellen aufgetragen worden. Die stärksten Signale sind in den Spuren 6 und 7 zu sehen, etwas schwächer ist die Bandenfärbung in den Spuren 2 und 3, am wenigsten intensiv sind die Signale der Klone #3 und #4.

Obwohl auf diesem Blot keine Kontrolle in Form von Ax2 Gesamtprotein aufgetragen worden war, konnten die Klone #1, #2, #5 und #6 als Überexprimierer identifiziert werden, da sie eine deutlich erhöhte Bandenintensität im Vergleich zu den Banden der Klone #3 und #4 zeigen. Es wird davon ausgegangen, daß alle Klone noch die intakte endogene LC-FACS Genkopie tragen.

Sollte eine Nullmutante einen veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, müßte bewiesen werden, daß das Fehlen des betroffenen Gens ursächlich ist. Um dies zu belegen, wurde das LC-FACS-Gen in KO #8 durch Transformation des Expressionsplasmids #302 rekombinant exprimiert. Der Nachweis des rekombinanten LC-FACS Proteins in den so erhaltenen „rescue“-Klonen erfolgte durch eine Western-Blot Analyse mit mAb 221-457-5.

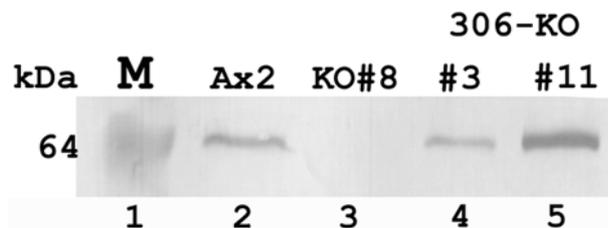


Abb. 36: Western-Blot Analyse von Gesamtzellhomogenat von Wildtyp (Ax2) LC-FACS⁻ (KO #8) und den „rescue“- Klonen 306-KO-#3 und 306-KO-#11 mit mAb 221-547-5, um die Expressionsstärke der LC-FACS zu untersuchen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit BCA-Pierce gemessen und gleiche Proteinmengen aufgetragen. Proteinlängenstandard (M) in Kilodalton (kDa).

In Abb. 36 ist ein Western-Blot abgebildet, auf dem die unterschiedliche Expression von rekombinantem LC-FACS-Protein in den „rescue“-Klonen 306-KO #3 und 306-KO #11 und des endogenen Proteins in dem als Wildtyp verwendeten Ax2 Stamm an Hand der Signalstärke verglichen wurde. Klon #3 exprimiert ungefähr halb so viel, Klon #11 mindestens doppelt soviel LC-FACS, -bezogen auf die Gesamtproteinmenge-exprimiert wie Ax2. In Spur 3 ist keinerlei Signal zu erkennen, wodurch nachgewiesen ist, daß die für die Transformation verwendeten KO #8 Zellen nach wie vor LC-FACS - Nullmutanten waren. Im Weiteren wird der oben beschriebene KO #8 Stamm auch als LC-FACS⁻-Stamm, LC-FACS Nullmutante oder *fcsA⁻* bezeichnet.

Die Western-Blot Analyse erlaubte zwar eine Einschätzung der LC-FACS Expression der unterschiedlichen Stämme, allerdings kann keine Aussage über die Homogenität innerhalb eines Klons gemacht werden. Eine Immunfluoreszenz mit diesen Zellen zeigte, daß Ax2 Zellen erwartungsgemäß gleichmäßig LC-FACS exprimieren, ebenso wie Zellen des Klons 306-KO#11. 306-KO#3 Zellen sind hingegen trotz erneuter Subklonierung sehr uneinheitlich. Die Produktion des rekombinanten Proteins umfaßt eine Expressionsstärke vergleichbar mit Klon#11 (ca. 5% der Zellen) bis zu einer Stärke, die ungefähr 30% der Wildtyp-Menge entspricht (ca. 60% der Zellen, Abb. 37). Mit den 306-KO Klonen standen nun vier Zelllinien mit unterschiedlich starker LC-FACS-Expression zur Verfügung.

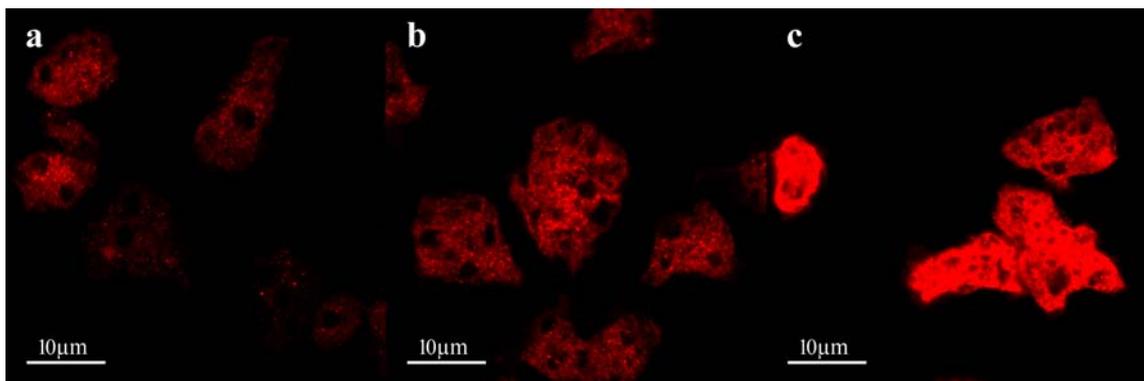


Abb. 37: Immunfluoreszenz mit Antikörper mAB 221-457-5 markierten Zellen der Stämme Ax2 (b), 306-KO#3 (a) und 306-KO#11 (c). KO#8 Zellen, die in diesen Versuch parallel behandelt wurden, sind hier nicht gezeigt, da bei der gewählten Einstellung des CLSMs (Empfindlichkeit der Photodetektoren) keinerlei Fluoreszenzmarkierung zu sehen war.

4.4.4 PHÄNOTYP DER „KNOCK-OUT“ ZELLINIE

EXPRESSIONSMUSTER WÄHREND DER ENTWICKLUNG

Durch das Fehlen von Nahrung treten die Zellen in die Entwicklungsphase ein, in der sie keinerlei Endosomen mehr enthalten, abgesehen von Autophagosomen, die vor allem in Prästielzellen häufig vorkommen (Maeda & Takeuchi, 1969; de Chastellier & Ryter, 1977). In Präsporen- und Sporenzellen hingegen kommen weitere Arten von Vacuolen hinzu (Hohl & Hamamoto, 1969; Maeda & Takeuchi, 1969; Gregg & Badman, 1970). Der KO #8-Stamm zeigte keinerlei Veränderungen in der Entwicklung verglichen mit Ax2. Sollte die LC-FACS ausschließlich Teil der Endocytosemaschinerie von *Dictyostelium discoideum* sein, so müßte ihre Expression im Laufe der Entwicklung zurückgehen. Dies wurde mit einem Western-Blot überprüft (Abb. 38). Es ist eine leichte Reduktion der LC-FACS Expression zu erkennen, vergleicht man vegetative Zellen (Spur 2) mit solchen, die schon 3 Std. hungern. Bis zum Abschluß der Fruchtkörperbildung nach ca. 24 Std. sinkt die Expression weiter auf ca. 50%.

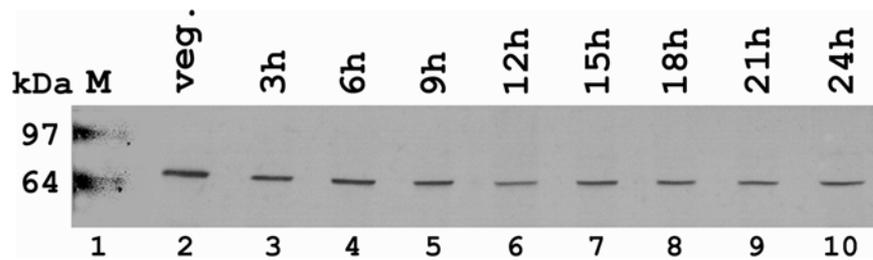


Abb. 38: Western-Blot Analyse von vegetativen (veg.) und sich in der Entwicklung befindenden (3 h-24 h) Ax2 Zellen mit mAb 221-457-5 zur Überprüfung der LC-FACS Expression. Zellen wurden zur Entwicklung auf Filtern ausgebracht und alle drei Stunden Proben genommen, aus denen Gesamtproteinextrakt hergestellt wurde, der dann mit einer SDS -PAGE aufgetrennt wurde. Alle Extrakte waren zuvor so eingestellt worden, daß sie die gleiche Proteinkonzentration enthielten. Die Schwäche der Bandenfärbung in Spur 6 (12 Std.) ist eher auf einen Fehler bei der Proben-auftragung zurückzuführen, als auf eine tatsächliche, kurzfristige Reduktion der LC-FACS Expression.

CYTOKINESE

Die durchschnittliche Zellgröße blieb von dem Fehlen der LC-FACS unberührt, auch eine Auszählung der Nuklei zeigte nur einen geringen Unterschied in den Ziellinien Ax2 und KO #8: Wildtyp Zellen haben durchschnittlich 1,35 Kerne pro Zelle, LC-FACS⁻ hingegen 1,46 Kerne pro Zelle; dies ist eine Differenz von nur 8,1%. Da die Nullmutante keinerlei Wachstumsdefekte (siehe unten) zeigte, wurde diese Beobachtung nicht weiter verfolgt.

Kerne/Zelle	1	2	3	4	5
Ax2 n = 349	71 % 251	22,9 % 80	3,7 % 13	1,4 % 5	0
KO #8 n = 383	66,4 % 257	26,1 % 101	4,1 % 16	2,8 % 11	0,5 % 2

Tab. 3: Auszählung der Kerne in Wildtyp (Ax2) und LC-FACS-Nullmutante (KO #8). Vegetative Zellen wurden fixiert und mit DAPI gefärbt. Die so Markierten Kerne wurden am Fluoreszenz-mikroskop ausgezählt.

ENDOCYTOSE

Die LC-FACS Nullmutante zeigte zunächst keinen offensichtlichen Phänotyp in der Entwicklung oder der Kernzahl, die auf eine Störung in der Cytokinese hindeuten würde. *D. discoideum* ernährt sich durch die Phagozytose von Bakterien. Die Größe der Fraßhöfe in auf Agar ausplattierten *Klebsiella aerogenes*-Rasen wurde vermessen. Im Vergleich zu Ax2 ergab sich keine Differenz. Auch die Generationszeit in KA-Suspension zeigte keinen Unterschied zwischen den Stämmen. Die Generationszeit wurde auch in axenischem Medium gemessen und mit Wildtyp verglichen, wobei keine Abweichung festgestellt werden konnte (nicht gezeigt).

Phagocytose und Pinocytose

Wegen der Lokalisation der LC-FACS auf Endosomen wurden entsprechende Versuche, beginnend mit Phagocytose-Assays, durchgeführt. Wie in Abb. 39 (a) zu erkennen ist, es konnte keine verminderte Partikelaufnahme in KO #8 verglichen mit Ax2 Zellen festgestellt werden.

Analog zur Messung der Phagocytoserate wurde auch die Aufnahme des Flüssigphasenmarkers über die Zeit verfolgt. Die Aufnahme von Flüssigphasenmarker (TRITC-Dextran) ist in *fcsA*⁻ etwas geringer vergleicht man sie mit der von Wildtypzellen, jedoch konnte dies nicht mit der nötigen statistischen Signifikanz gezeigt werden.

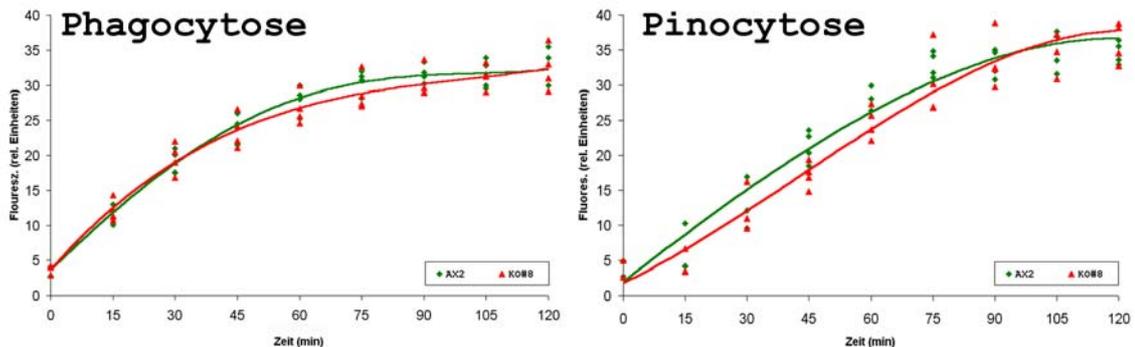


Abb. 39: Graphische Darstellung der Endocytoserate (n=3): KO #8 (grau) und Ax2 Zellen (schwarz) wurden in Schüttelkultur in axenischem Medium inkubiert und bis zu einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro ml wachsen gelassen. 10 ml dieser Zellsuspension wurden dann mit TRITC-markierten Hefen (Phagocytose, a) bzw Flüssigphasenmarker TRITC-Dextran (Pinocytose, b) versetzt und deren Aufnahme mit einem Fluorimeter zwei Std. lang dokumentiert.

Transit

In einen Transit-Assay kann die Passage des aufgenommenen TRITC-Dextrans durch die Zelle verfolgt werden. Die als Zeitpunkt $t = 0$ min definierte Probe wurde dann 100% gesetzt.

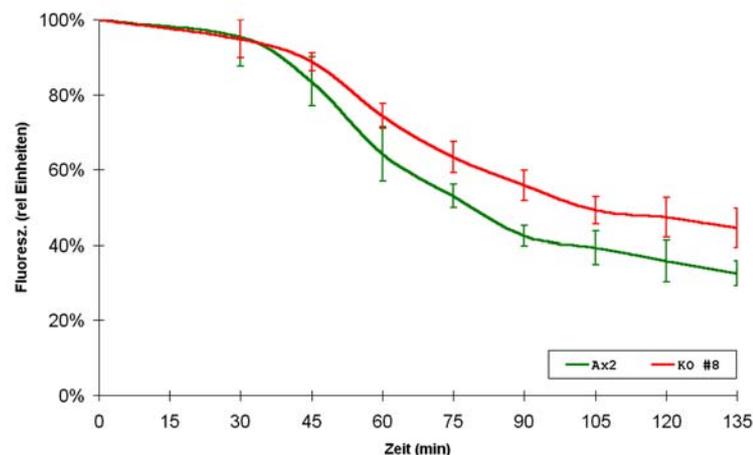


Abb. 40: Vergleich des endocytischen Transits von TRITC-Dextran in Ax2 (grün) und KO #8 (rot). Graphische Darstellung des Durchschnitts aus vier unabhängigen Assays ($t = \text{min}$ nach „chase“). Hierzu wurden Zellen in axenischem Medium unter Schüttel inkubiert. *D. discoideum* Zellen wurden in „pulse-chase“-Experimenten mit Flüssigphasenmarker enthaltendem Medium 15 min inkubiert und anschließend die Abnahme der zellinternen Fluoreszenz 135 min lang in markerfreiem Medium quantitativ gemessen.

Der Transit von aufgenommenem Medium von Endo- bis Exocytose dauert in Ax2 Zellen mindestens 60 min. Da die Messung erst nach 15 min „pulse“ mit Flüssigphasenmarker beginnt, ist in diesen Assays eine deutlich meßbaren Abnahme der TRITC-Dextran Fluoreszenz bereits nach ca. 45 min zu erwarten. Zu diesem Zeitpunkt begannen die durchschnittlichen Meßwerte von Ax2 und KO #8 zu divergieren (Abb. 40). Während Ax2 Zellen nach 60 min bereits knapp ein Drittel des aufgenommenen Markers ausgeschieden hatten, waren zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich noch etwa 74% des TRITC-Dextrans in LC-FACS⁻-Zellen vorhanden. Zwischen t = 60 min und t = 135 min ergibt sich eine mittlere Differenz von 11% zwischen den Meßwerten beider Stämmen. Dies bedeutet eine zeitliche Verzögerung des Transits in KO #8. Der Transit ist in diesen Zellen also um ca. 15 min verlängert.

ENZYMSEKRETION

Eine Reihe lysosomaler Enzyme werden von *Dictyostelium discoideum* Zellen während der vegetativen Wachstumsphase ins extrazelluläre Medium abgegeben, darunter auch α -Mannosidase und Saure Phosphatase. Diese Enzyme repräsentieren zwei unterschiedliche Klassen lysosomaler Proteine, die in verschiedenen Vesikeln lokalisieren. Die Sekretion dieser beiden Enzyme ist unabhängig von der Exocytose unverdaulicher Nahrungsreste (Dimond *et al.*, 1981) und erfolgt mit unterschiedlicher Kinetik, Dimond *et al.* postulieren daher einen unterschiedlichen Mechanismus.

Die Aktivität beider Enzyme kann bestimmt werden, indem man Substrate verwendet, deren Spaltprodukt (p-Nitrophenol, $\lambda=420\text{nm}$) nach der enzymatischen Reaktion photometrisch bestimmbar ist. Zellen wurden durch Zentrifugation gerettet und die Enzymaktivität in Zellen und Medium getrennt gemessen.

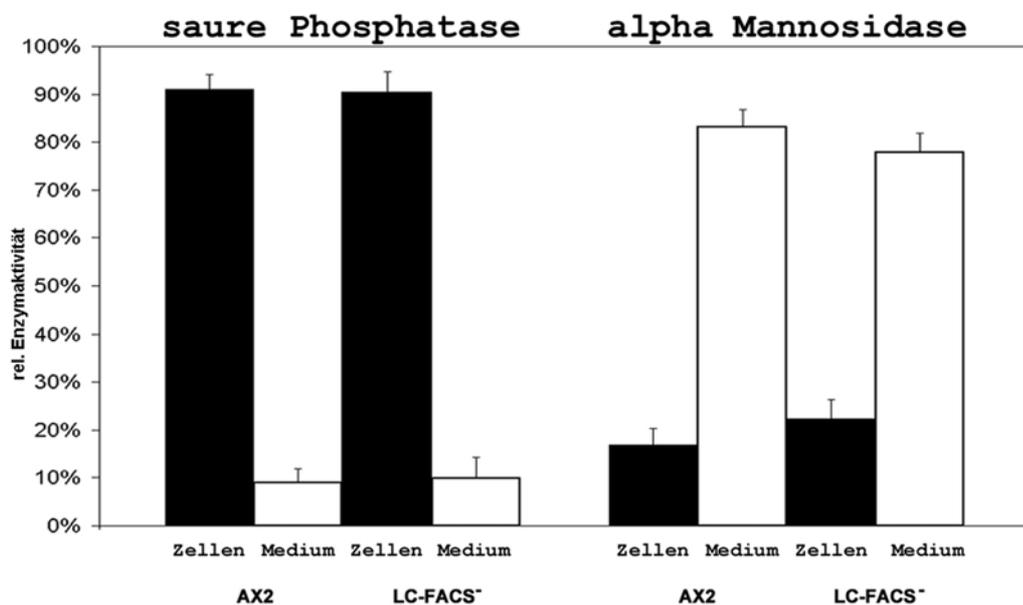


Abb. 41: Enzymsekretion von Wildtyp (Ax2) und KO #8 (LC-FACS⁻): Die Zellen der beiden zu untersuchenden Stämme wurden in Schüttelkultur bis zu einer Dichte von $4-6 \times 10^6$ Zellen pro ml wachsen gelassen. Pro Messung wurde jeweils ein ml der Kulturen durch Zentrifugation gerettet. Der Überstand (Medium) wurde abgenommen, das Zellpellet (Zellen) in 1 ml Tritonlösung gelöst, wobei die Zellen lysieren. Von beiden Fraktionen wurden dann je 100 μl mit Puffer und Substrat versetzt, 30 min inkubiert und nach Stoppen der Reaktion mit Na_2CO_3 im Photometer vermessen. Beide Meßwerte zusammen entsprechen 100% der jeweiligen relativen Enzymaktivität.

Wie in Abb. 41 zu erkennen ist, verhalten sich Wildtyp und Mutante bei der Sekretion der Sauren Phosphatase nahezu identisch; ca. 90% des Enzyms verbleiben in den Zellen, nur ca. 10% werden sezerniert. Etwas anders verhält es sich bezüglich der α -Mannosidase, wenn die Differenz hier auch nur klein ist. Der Großteil dieses Proteins wird ins umgebene Medium abgegeben, ungefähr ein Sechstel verbleibt intrazellulär. KO #8 Zellen sezernieren etwas weniger (78%) als Ax2 (83%).

pH-VERLAUF WÄHREND DER ENDOCYTOSE

pH-Wert Veränderungen während des Transits

In den Transit-Assays wurden neben TRITC-Dextran auch der pH-Wert-sensitive Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran beim „pulse“ verwendet. Dieser Farbstoff fluoresziert umso stärker, je höher der pH-Wert ist. Der Quotient aus den Meßwerten der FITC- und TRITC- Fluoreszenz einer Probe ($t=0$ min, $t=30$ min, ... etc) ergibt ein pH-Wert Äquivalent und macht es so möglich Aussagen über den pH-Wert der Flüssigphasenmarker enthaltenden Endosomen zu treffen. Der Vergleich der Werte von Ax2 und KO #8 zeigte in drei von vier Fällen, daß KO #8 Zellen zwar einen vergleichbaren pH-Verlauf zeigen wie der Wildtyp, die pH-Kurve allerdings auf einem etwas höherem Niveau liegt (nicht gezeigt).

Die pH-Wert Veränderung während des endocytischen Transits in einzelnen Zellen kann sichtbar gemacht werden, indem man Zellen in TRITC/FITC-Dextran haltigem Medium kultiviert und im CLSM zu verschiedenen Zeiten aufnimmt. Im Überlagerungsbild erscheinen dann saure Endosomen rot und neutralisierte gelb.

Neben den sauren Vesikeln sind zu den abgebildeten Zeitpunkten in KO#8 Zellen auch schon vereinzelt neutrale Endosomen zu erkennen (Abb. 42). In Ax2 Zellen waren erste gelbe Vesikel erst durchschnittlich 4 min später zu sehen, dies spricht für eine verfrühte neutrale Phase in LC-FACS⁻.

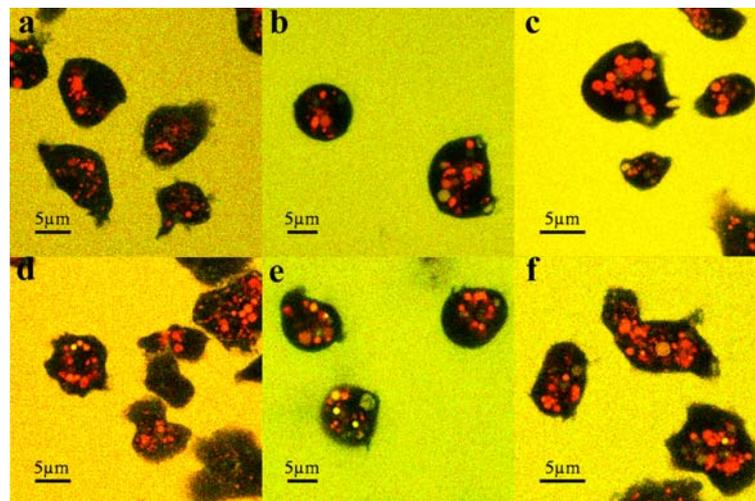


Abb. 42: Neutralisierung von Endosomen in Ax2 (a, b, c) und KO #8 (d, e, f): Vegetative *D. discoideum* Zellen wurden auf Objektträgern mit Medium inkubiert, das sowohl TRITC-Dextran als auch den pH sensitiven Flüssigphasenmarker FITC-Dextran enthielt. Neutrale Kompartimente erscheinen im Überlagerungsbild gelb. Die übereinander abgebildeten CLSM Aufnahmen (a+d, b+e, c+f) wurden jeweils parallel zum gleichen Zeitpunkt nach Zugabe der Fluoreszenzmarker gemacht (a+d: 31 min, b+e: 25 min, c+f: 21 min). Gezeigt sind Bilder dreier unabhängiger Experimente. Die mit dem CLSM aufgenommenen Zellen waren zwar zufällig ausgewählt worden, stellen aber dennoch nur eine sehr kleine Stichprobe dar. Die im Text beschriebenen Beobachtungen konnten in reproduzierten Experimenten erneut gemacht, statistisch aber nicht untermauert werden.

Durch eine Auszählung aller neutralen Vesikel in KO#8 und Ax2 Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten im CLSM dokumentiert worden waren, konnte kein Unterschied zwischen den beiden Stämme festgestellt werden.

pH-Wert Messung mit Neutralrot

Es war also nötig, eine andere Methode zu finden, um diesen vermeintlichen Phänotyp auf andere Weise experimentell zu bestätigen. Deshalb wurde ein Neutralrot-Assay zur Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes entwickelt. Bei Neutralrot handelt es sich um einen Farbstoff, der im nur unprotonierten Zustand frei durch Membranen diffundieren kann, im sauren Milieu sinkt mit dem pH-Wert auch die Fluoreszenz.

Als Kontrolle diente hier eine Suspension von Ax2 Zellen, die 20 min vor Zugabe von Neutralrot mit 50 mM NH_4Cl inkubiert wurde. Die Zugabe von Ammoniumchlorid erhöht den pH-Wert von Endosomen/Lysosomen, abhängig von der verwendeten Endkonzentration und dem pH-Wert des Mediums, von $\text{pH} = 5,7$ auf $6,2$ (Cardelli *et al.*, 1989). In Abb. 43 sind die Ergebnisse der Neutralrot-Messungen zusammenfassend gezeigt.

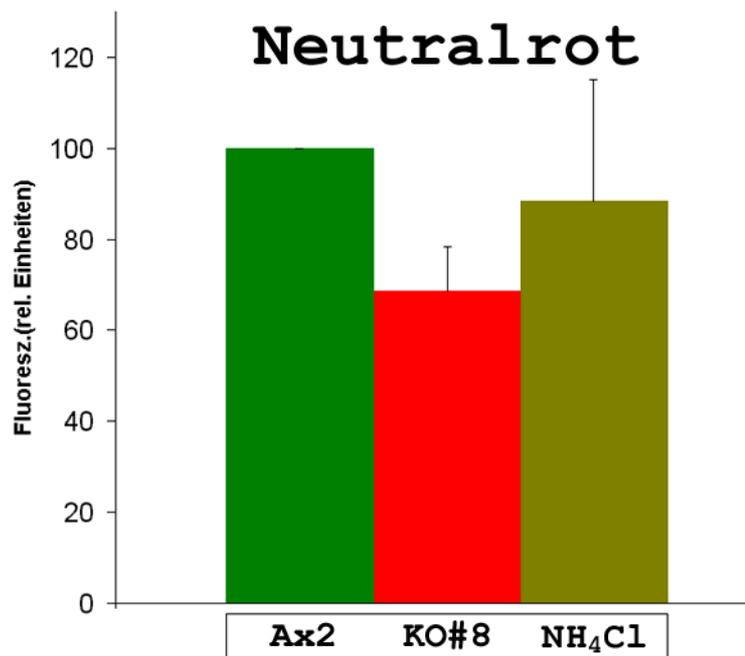


Abb. 43: Messung des intrazellulären pH-Wert mit Hilfe von Neutralrot in Ax2 und KO #8 Zellen: Graphische Darstellung von sechs unabhängigen Assays, als Kontrolle dienten Ax2 Zellen, denen 15 min vor Beginn der Messung 50 mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl) zugegeben worden war. Die Fluoreszenz von AX2 wurde 100% gesetzt, alle anderen darauf bezogen. Parallel zu den Neutralrotmessungen wurden von allen verwendeten Kulturen Proben genommen und ihr Proteingehalt mit BCA-Pierce bestimmt.

Die Differenz zwischen Ax2 und KO #8 ist deutlich. Wildtyp Zellen, die mit Ammoniumchlorid inkubiert worden waren zeigen ebenfalls einen niedrigeren pH-Wert in diesen Messungen, die Meßwerte zeigen aber auch starke Schwankungen, wie an den in Abb. 43 eingezeichneten Fehlerbalken zu erkennen ist.

pH-Wert abhängige α -Mannosidase Prozessierung

α -Mannosidase wird als 140 kDa Polypeptid synthetisiert und wird in eine reife 58 kDa und eine 80 kDa Einheit zerlegt. Auch die kurzlebige 80 kD Zwischenstufe wird in Lysosomen zu einem 60 kDa Enzym proteolytisch prozessiert (Mierendorf *et al.*, 1985; Wood & Kaplan, 1985). Beide Prozessierungen sind pH-Wert abhängig; mit zunehmend neutralem pH-Wert in den Lysosomen sinkt die Rate der reifen Enzymformen (60 und 58 kDa) (Cardelli *et al.*, 1989).

Ist in den Endosomen in LC-FACS⁻ Zellen der pH-Wert höher, sollte sich dies demzufolge auch durch verminderte Enzymaktivität der α -Mannosidase bemerkbar machen, deren Gesamtaktivität in Zellen und Medium gemessen wurde. Die Messungen wurden analog zu oben erläuterten Enzym-Sekretions Experimenten gemacht. Abb. 44 zeigt die relative Enzymaktivität der α -Mannosidase in Wildtyp und KO #8. Die LC-FACS-Nullmutante weist nur ca. 75% der Aktivität des Wildtyps auf. Nachdem es bereits mehrere Hinweise auf einen erhöhten pH-Wert in den Lysosomen von KO#8 gab, liegt es nahe, einen neutraleren pH-Wert als Erklärung für die Differenz der beiden *Dictyostelium discoideum* Stämme bezüglich dieser Glycosidase Aktivität heranzuziehen.

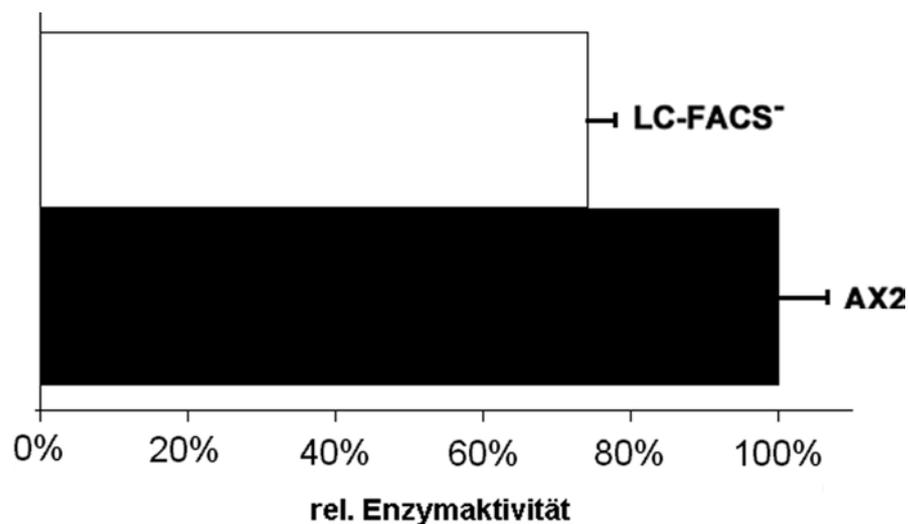


Abb. 44: Graphische Darstellung der relativen Enzymaktivität von α -Mannosidase in Wildtyp (Ax2) und KO #8 Zellen: gezeigt sind die Ergebnisse von drei (KO #8) bzw. fünf (Ax2) unabhängigen Messungen. Von allen Proben wurden BCA-Proteinbestimmungen durchgeführt und die Meßwerte der Enzymaktivität entsprechend normiert. Wiederum wurde der durchschnittliche Ax2-Wert gleich 100% gesetzt.

FETTSÄUREAUFNAHME (C_1 -BODIPY C_{12})

Um die *in vivo* Funktion der LC-FACS weiter zu untersuchen, wurden langkettige fluoreszierende Fettsäuren dem die Medium zugegeben.

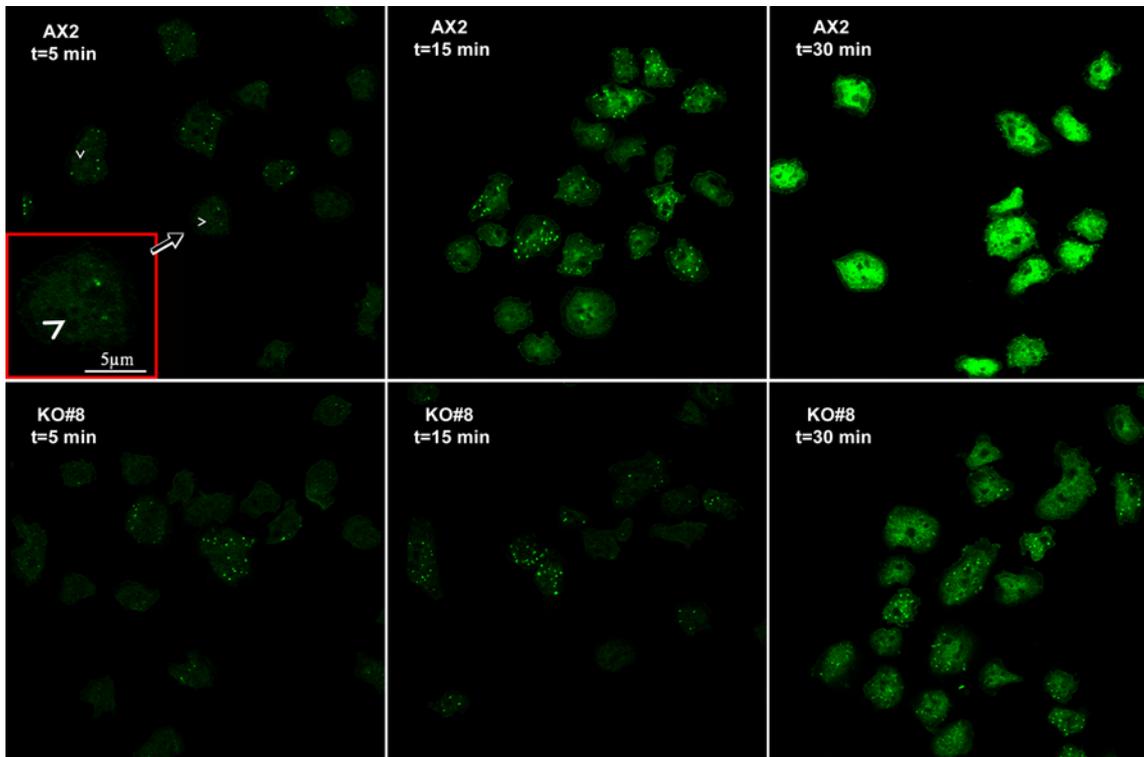


Abb. 45: CLSM -Aufnahmen von mit C_1 -BODIPY C_{12} inkubierten Ax2- und KO #8-Zellen: Vegetative Zellen wurden aus Schüttelkultur auf Objektträger pipettiert und 30 min zum Absetzen stehen gelassen. Als Fettsäureanalogon diente hier fluoreszierendes C_1 -BODIPY C_{12} , das nach dem Absetzen zu den Zellen gegeben wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 15 min, ...) wurden Zellen fixiert und unter gleichen Bedingungen abgebildet. In Wildtypzellen können bereits nach 5 min Endosomen entsprechende Strukturen beobachtet werden (Ax2 5 min, Pfeile). Die Seitenlänge entspricht in allen sechs Bildern 125,24 μm . Der rot umrahmte Ausschnitt zeigt die Vergrößerung derjenigen Zelle, auf die der Pfeil zeigt.

5 min nach Zugabe des Fluoreszenzmarkers C_1 -BODIPY C_{12} sind die Mengen an aufgenommenen in Wildtyp und Mutante noch nahezu identisch. Innerhalb der folgenden 10 min ($t=15$ min) beginnen die beiden Stämme bezüglich ihrer C_1 -BODIPY C_{12} -Aufnahme deutliche Unterschiede zu zeigen. Nach 30 min ist in KO#8 nur etwa halb so viel Fluoreszenz in den Zellen zusehen, wie bei Ax2. Diese Differenz wurde von der Mutante auch nach längerer Inkubation nicht aufgeholt (nicht gezeigt).

Der Weg der aufgenommenen langkettigen Fettsäuren in den Zellen kann verfolgt werden. Zunächst zeigt sich ein punkartiges Fluoreszenz-Muster, hierbei handelt es sich wohl um Lipidtröpfchen. Frei im Cytoplasma gelöste Fettsäuren sind in der Lage sich spontan zu Micellen oder Lipidtröpfchen zusammenzufinden (McArthur *et al.*, 1999). Eine schwache Färbung von ringförmigen Strukturen ist erkennbar, die in Form und Größe der von Endosomen entsprechen. Innerhalb der nächsten 15 min werden über die gesamte Zelle verteilte tubuläre Strukturen sichtbar, die vermutlich das ER repräsentieren. Zentrale Bereiche, die in Form und Anzahl dem Golgi-Apparat entsprechen, können beobachtet werden, ebenso wie eine Grünfärbung der Plasmamembran. Die Fluoreszenz-Markierung der beschriebenen Strukturen nimmt in ihrer Intensität stetig zu; nach 30 min sind auch die Ringe deutlicher zu sehen.

Die Aussagekraft dieser CLSM Aufnahmen ist in so fern beschränkt, als das sie nur eine grobe Abschätzung der Unterschiede in den Fettsäure-Aufnahmeraten der beiden Stämme erlaubt. Aus diesem Grund wurde analog zum Pinocytose-Assay ein BODIPY-Assay etabliert, um die Differenz zwischen den Stämmen genauer quantifizieren zu können. Neben Ax2 und KO#8 wurden auch die Klone 306-KO#3 sowie 306-KO#11 in diesen Experimenten untersucht.

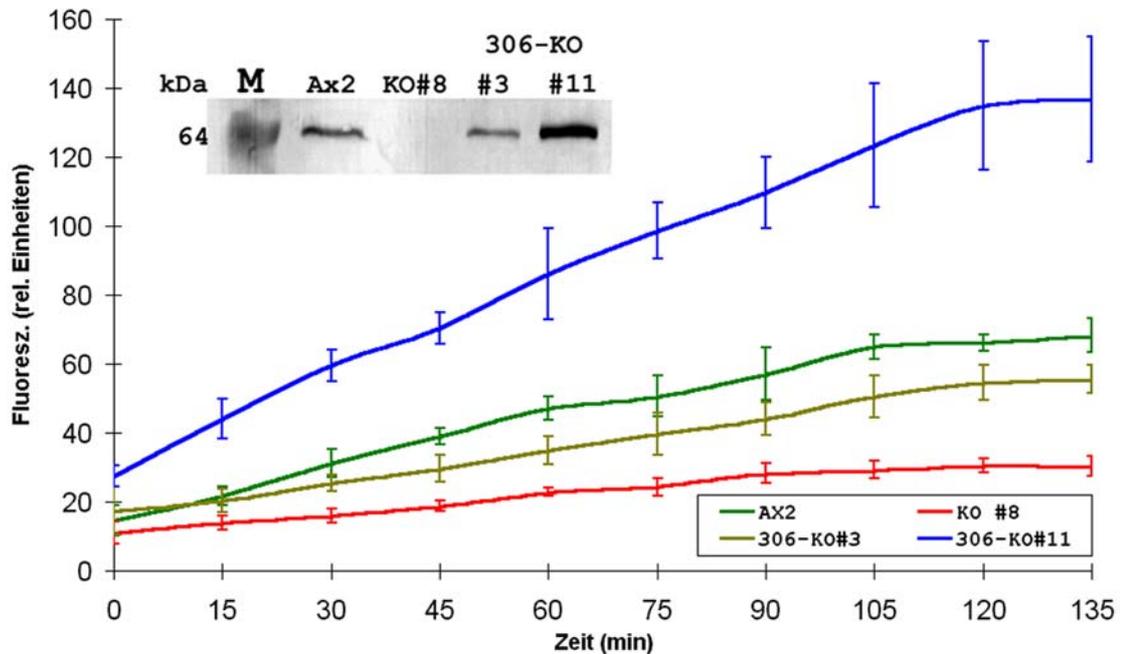


Abb. 46: Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in Ax2 (grün), KO #8 (rot), 306-KO-#3 (hellgrün) und 306-KO-#11 (blau): um die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren quantitativ vermessen zu können, wurden vegetative Zellen mit C₁-BODIPY C₁₂ versetzt und dessen Aufnahme in Fluorimeter 135 min lang verfolgt. Gezeigt sind die durchschnittliche Meßwerte von drei unabhängigen Assays.

In Abb. 47 ist die durchschnittliche C₁-BODIPY C₁₂-Aufnahme der verschiedenen untersuchten Stämme gezeigt. Wildtypzellen nehmen das Fettsäureanalogon kontinuierlich auf und verfünffachen dessen Menge innerhalb des vermessenen Zeitraums von 135 min. Die Aufnahmerate in Klon 306-KO#11 ist etwas mehr als doppelt so schnell wie in Ax2, die von Klon 306-KO#3 beträgt nur 60% des Wildtypwertes. Die durchschnittlichen Meßwerte der LC-FACS Nullmutante ergeben die geringste Aufnahmerate Sie beträgt bezogen auf Ax2 39%. Die Aufnahme von C₁-BODIPY C₁₂ zeigt eine direkte Korrelation mit der Expressionsrate von LC-FACS, wie in Abb. 46 (Inset) zu sehen. Während die Nullmutante nur ca. 40% der Menge, die von Wildtyp Zellen aufgenommen worden war, internalisierte, konnte in 306-KO#3 dieser Phänotyp zum Teil (\approx 60% von Ax2) gerettet werden; der als Überexprimierer der LC-FACS ausgesuchte Klon 306-KO#11 nahm in der gleichen Zeit die doppelte Menge an C₁-BODIPY C₁₂ auf.

AUFNAHME VON LANGKETTIGEN FETTSÄUREN AUS ENDOSOMEN

Da die Morphologie der C₁-BODIPY C₁₂ gefärbten Kompartimente und die Verteilung der LC-FACS in den Zellen nicht übereinstimmte, war unklar auf welchem Wege die Fettsäuren ins Zellinnere gelangen. Sollte die Aufnahme über Endosomen erfolgen, sollte dies mit Hilfe von Cytochalasin A zu zeigen sein. Diese Droge vermindert dosisabhängig die Endocytose durch die Depolymerisation vom F-Aktin (Maniak *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 1997).

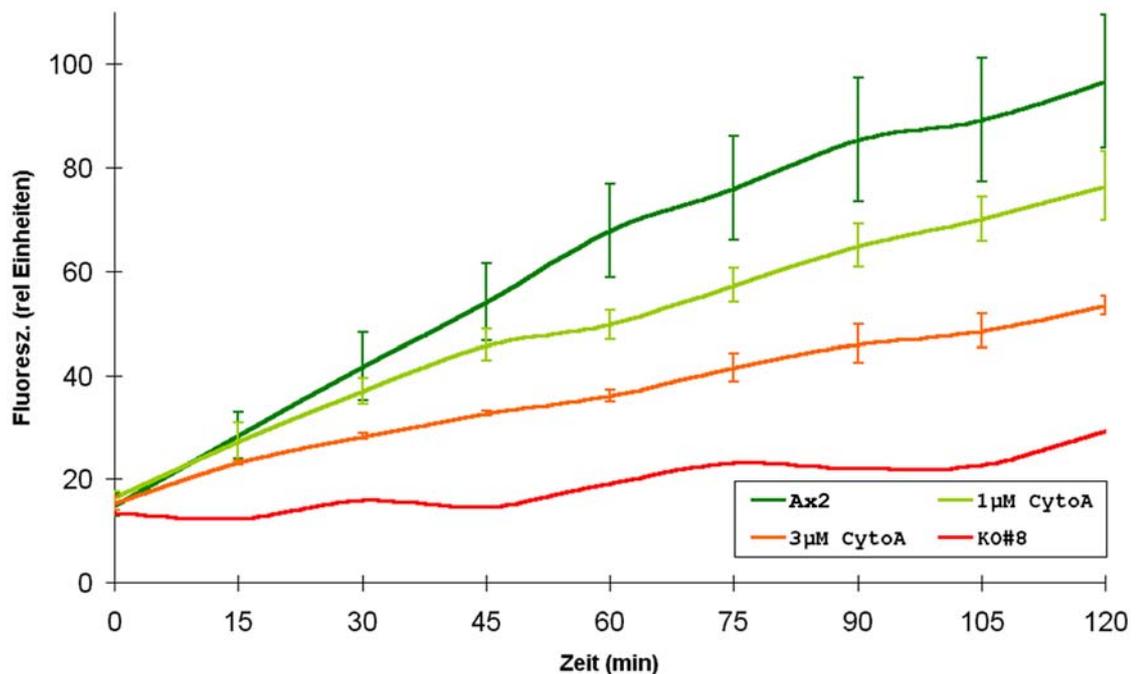


Abb. 47: Aufnahme langkettiger Fettsäure aus Endosomen. Fünfzehn Minuten vor Beginn der Messung wurden Ax2 Kulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cytochalasin A (1 μ M, 3 μ M) versetzt und unter Schütteln inkubiert. Mit der Zugabe von C₁-BODIPY C₁₂ zu den Kulturen startete der Assay, in dem die Aufnahme des fluoreszierenden Fettsäureanalogons 120 min mit dem Fluorimeter verfolgt wurde. Gezeigt sind die durchschnittlichen Meßwerte dreier unabhängiger Assays.

Abb. 47 zeigt die graphische Darstellung der Meßergebnisse von drei durchgeführten Assays. Unbehandelte Wildtypzellen nahmen die größte Menge des fluoreszierenden Fettsäureanalogons auf. Der Zusatz von 1 μ M Cytochalasin A zu Ax2 Zellen führt zu einer Verminderung der C₁-BODIPY C₁₂ Aufnahme. Die Steigerung der Drogenkonzentration auf 3 μ M verstärkt diesen Effekt. In einer der Messungen wurde auch ein KO #8 Kultur mit vermessen, die die geringste Aufnahmerate zeigten.

5 DISKUSSION

5.1 LC-FACS ZEIGT DIE GRÖßTE HOMOLOGIE ZU PROTEINEN AUS SÄUGERZELLEN

Das in dieser Arbeit untersuchte *Dictyostelium discoideum* Protein LC-FACS zeigt Homologien zu Fettsäure-CoA-Ligasen aus verschiedenen Organismen (Tab. 1). Die Übereinstimmung auf Aminosäureebene mit LC-FACS Enzymen aus einzelligen Organismen wie *Trypanosoma brucei* und *Schizosaccharomyces pombe* fällt mit 32% bzw. 30% niedrig aus; die Homologie zu einem Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* beträgt 35%. Die größte in den Datenbanken gefundene Homologie zeigt sich zu Fettsäure-CoA-Ligasen aus Säugetieren wie Ratte und Maus (45%), sowie zu Enzymen der LC-FACS Familie aus Pflanzen (43%). Dazwischen liegen die Übereinstimmungen mit Proteinen aus *Drosophila melanogaster* (40%) und *Caenorhabditis elegans* (39%). *D. discoideum* Proteine, wie zum Beispiel β -COP (Mohrs *et al.*, 2000), sind solchen aus höher entwickelten Organismen häufig ähnlicher als Proteinen aus anderen einzelligen Eukaryoten. Beruhend auf dem Vergleich von morphologischen, physiologischen und molekularen Eigenschaften, ordnen Loomis *et al.* *Dictyostelium discoideum* phylogenetisch zwischen Bäckerhefe, Spaltheife und Fadenwurm ein (Loomis & Smith, 1990; Loomis & Smith, 1995).

5.2 DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER LC-FACS

Die fundamentalen Prozesse der Lipidsynthese und des Energiestoffwechsels werden in *Dictyostelium discoideum* vermutlich ähnlich wie in anderen Eukaryoten ablaufen. Fettsäure-CoA Ligasen / Synthetasen Enzyme katalysieren dabei einen grundlegenden Schritt: die für weitere Reaktionen wichtige Aktivierung durch die kovalente Bindung von Coenzym A (Waku, 1992; DiRusso *et al.*, 1999). Die am Energiestoffwechsel beteiligten Enzyme sind daher in Mitochondrien (Norum *et al.*, 1966; Garland *et al.*, 1970; Uchiyama *et al.*, 1996) oder Peroxisomen lokalisiert (Shindo & Hashimoto, 1978; Krisans *et al.*, 1980) (Mannaerts & van Veldhoven, 1996). Die hier untersuchte LC-FACS zeigte keinerlei Koloakalisation mit diesen Organellen (Abb. 19). Eine direkte Rolle im Energiestoffwechsel der Zelle kann damit ausgeschlossen werden. Die von der LC-FACS esterifizierten Fettsäuren könnten aber dennoch zu den Organellen des Energiestoffwechsels transportiert werden und dort im Verlauf der β -Oxidation hydrolysiert werden

Phospholipide werden im ER synthetisiert, entsprechend lokalisieren dort auch Fettsäure-aktivierende Enzyme (McArthur *et al.*, 1999), wie beispielsweise eine humane Palmityl-CoA-Synthetase (Lazo *et al.*, 1990). Hier findet auch die post-translationelle Modifikation von Proteinen statt, zu denen auch die Acylierung zählt (McArthur *et al.*, 1999; McCabe & Berthiaume, 1999). Eine Lokalisation der LC-FACS an Membranen des ER Netzwerks konnte nicht gezeigt werden (Abb. 19). Ebensowenig ist das Protein im Cytosol gelöst. Dies läßt eine direkte Beteiligung an der Synthese von Lipiden, die zum Teil auch im Cytoplasma stattfindet, unwahrscheinlich erscheinen.

Mitglieder der LC-FACS Familie sind häufig membranständige Proteine (Sleeman *et al.*, 1998; Meloni *et al.*, 2002). Auch die hier untersuchte LC-FACS lokalisiert an Membranen von Endosomen und Vesikeln. In der Aminosäuresequenz der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *D. discoideum* LC-FACS wurden mit Hilfe des Programms TMPred hydrophobe Bereiche gefunden (Abb. 12), bei denen es sich um Transmembrandomänen handeln könnte. Eine Überprüfung der Membranbindung ergab jedoch lediglich eine periphere Membranassoziation durch ionische Wechselwirkungen (Abb. 15), wie durch das Programm PSORT vorhergesagt (Abb. 13). Möglicherweise resultiert die Lokalisation der LC-FACS auch aus ihrer Bindung an ein weiteres membranständiges Protein.

5.3 LC-FACS LOKALISIERT AUF ENDOSOMEN UND VESIKELN

Da die LC-FACS nie an der Plasmamembran oder auf naszierenden Endosomen von *D. discoideum* nachgewiesen werden konnte, und *FcsA* Zellen keinerlei Defekte in der Aufnahme von Partikeln oder Flüssigphasenmarkern zeigen (Abb. 39), kann davon ausgegangen werden, daß sie bei der Bildung von Endosomen keine Rolle spielt. Innerhalb der ersten fünf Minuten nach der Internalisierung von Phagosomen befindet sich die LC-FACS an deren Membran (Abb. 29), auf Makropinosomen konnte sie nie so früh nachgewiesen werden. Hier konnte ihre Lokalisation erst ca. 15 min nach der Aufnahme gezeigt werden (Abb. 27). Zu diesem Zeitpunkt ist die F-Aktinhülle um die Endosomen bereits verschwunden (Peracino *et al.*, 1998) zusammen mit anderen Cytoskelettproteinen wie DAip1 (Konzok *et al.*, 1999), Arp2/3 (Insall *et al.*, 2001) und Coronin (Maniak *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 1997; Maniak, 1999). Die schnelle Dissoziation der Cytoskelettproteine ermöglicht die Fusion mit Vesikeln, die zum Beispiel die vacuoläre H⁺-ATPase zu diesen frühen Endosomen bringen (Clarke *et al.*, 2002). Diese Protonenpumpe verbleibt auf Endosomen bis zur neutralen Phase, die ungefähr 45 min nach der Internalisierung beginnt (Aubry *et al.*, 1993; Maniak, 2001). Mit steigendem pH-Wert sinkt zeitgleich die Konzentration der H⁺-ATPase in der Membran ab (Nolta *et al.*, 1994). Diese Protonenpumpe ist ebenfalls integraler Bestandteil der kontraktilen Vacuole, deren tubulo-vesikuläre Strukturen aber von denen des Endocytose Netzwerkes strikt getrennt bleiben (Gabriel *et al.*, 1999). Die tubulären Strukturen der kontraktilen Vacuole sind frei von LC-FACS. Die Kolokalisation der LC-FACS mit der Protonenpumpe ist auf Endosomen beschränkt (Abb. 24), die dementsprechend als frühe, saure Endosomen angesprochen werden können.

Sowohl die Färbung mit Antikörpern als auch die GFP-Fusionskonstrukte zeigten im gesamten Cytoplasma verteilte LC-FACS dekorierte Vesikel. Die Hypothese, es könnte sich dabei um Transportvesikel handeln, sollte durch Immunfluoreszenz Experimente mit Dynamin-GFP exprimierenden Zellen überprüft werden (Abb. 23). Die Verteilungsmuster von Dynamin A und LC-FACS ähneln einander, beide lokalisieren auf Endosomen und Vesikeln (Wienke *et al.*, 1999). Die im Cytoplasma verteilten kleinen Vesikel sind jedoch nur in sehr wenigen Fällen positiv für beide Proteine. Es ist schwer vorstellbar, daß es für die Kolokalisation einen physiologischen Grund gibt, wenn höchstens 1% der Vesikel beide Proteine tragen. Diese scheinbare Kolokalisation kann dadurch zustande gekommen sein, daß nah zusammen liegende LC-FACS bzw. Dynamin A positive Vesikel nicht mehr getrennt dargestellt werden konnten.

Zeitgleich mit den ersten lysosomalen Enzymen erhalten Endosomen auch integrale Membran-Glycoproteine, darunter LmpA ein *D. discoideum* CD36 / LIMPII Homolog (Karakesisoglou *et al.*, 1999). Humane LIMPII Proteine finden sich immer in lysosomalen / endosomalen Vesikeln (Vega *et al.*, 1991). In *D. discoideum* sind alle drei Lmp-Proteine auf Makropinosomen und Lysosomen präsent (Janssen *et al.*, 2001). Die LmpA Konzentration ist auf frühen Endosomen hoch und nimmt bis zur neutralen Phase hin kontinuierlich ab. Genau gegensätzlich verhält sich die Kinetik von LmpB und LmpC (Gotthardt *et al.*, 2002), weshalb LmpA in separaten Vesikeln transportiert werden muß. Zwischen LmpB- und LmpC- positiven Vesikeln (Janssen *et al.*, 2001) und der LC-FACS Lokalisation ergab sich keinerlei Übereinstimmung. Eine Teilkolokalisation von LmpA mit einer COPI Komponente (β -COP) konnte nachgewiesen werden, die allerdings auf Vacuolen beschränkt ist und sich nicht auf die frei im Cytoplasma befindlichen Vesikeln erstreckt (Karakesisoglou *et al.*, 1999). Somit kann davon ausgegangen werden, daß LmpA nicht in COPI Vesikeln transportiert wird, die auch den retrograden Transport durch die drei Kompartimente des Golgi-Apparates und zum ER vermitteln (Reilly *et al.*, 2001; Paulsson *et al.*, 2002) und einen Durchmesser zwischen 100-200 nm haben (Simon *et al.*, 1998). Fusionen zwischen GFP und β -COP markieren in *D. discoideum* den Golgi-Apparat sowie außerdem im Cytoplasma verteilte Vesikel (Mohrs *et al.*, 2000). LmpA kolokalisiert auf endosomalen Vacuolen zum Teil mit LC-FACS, nicht aber auf Vesikeln, deren Durchmesser unterhalb 650 nm liegt (Abb. 26). Es konnte also auch mit dem Antikörper gegen LmpA keine Identifizierung der LC-FACS dekorierten kleinen Vesikel erreicht werden. Es handelt sich wahrscheinlich auch nicht um COPI Vesikel, deren Knospung von der Donormembran zwar auch Fettsäure-CoA benötigt (Ostermann *et al.*, 1993), dessen Synthese aber nicht auf die Aktivität der LC-FACS zurückzuführen ist. Diese Vesikel werden am Golgi-Apparat gebildet, wo die LC-FACS nicht nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt).

Aus den Immunfluoreszenz Experimente mit den drei *D. discoideum* LIMP Proteinen und Dynamin A kann geschlossen werden, daß es sich bei den im Cytoplasma verteilten LC-FACS positiven Vesikeln nicht um CCV, Lmp-Proteine transportierende oder COP-Vesikel handelt. Eine Kolokalisation mit glycosylierten lysosomalen Enzymen konnte jedoch gezeigt werden (N. Pawolleck, pers. Mitteilung). Diese Proteine werden zunächst vom rauhen ER zum Golgi-Apparat transportiert, wo sie durch Glycosylierung modifiziert werden. Dieser Transport erfolgt in COPII Vesikeln. Die LC-FACS befindet sich jedoch nicht ER (Abb. 19), daher erscheint es auch wenig wahrscheinlich, daß LC-FACS positive Vesikel ($\varnothing \approx 100$ -200 nm) COPII Vesikel sind. COPII Vesikel benötigen auch kein Fettsäure-CoA für ihre Abtrennung von Membranen des ER (Barlowe *et al.*, 1994). Nach ihrer Modifikation gelangen die lysosomalen Enzyme in COPI Vesikeln zu den Endosomen. Ein Großteil der zersetzenden Enzyme in Endosomen wird recycelt (Souza *et al.*, 1997; Gotthardt *et al.*, 2002; Neuhaus *et al.*, 2002). Es könnte sich bei den LC-FACS positiven Vesikeln also um diejenigen handeln, die lysosomalen Enzyme retrograd von reiferen zu frühen Endosomen transportieren. Diese Hypothese kann mit allen mikroskopischen Beobachtungen in Einklang gebracht werden. Vesikel, sowie ihre Donor- und Zielkompartimente sind LC-FACS positiv. Außerdem konnte gezeigt werden, daß sich LC-FACS dekorierte Vesikel um größere Endosomen sammeln, wohl um mit ihnen zu fusionieren (Abb. 28). Auf Grund der unterschiedlichen Fluoreszenzintensität im Lumen der Vesikel bzw. des Endosoms, kann davon ausgegangen werden, daß die Vesikel von späteren Endosomen stammen, deren Inhalt bereits eine Ankonzentration erfahren hat, und das Endosom, an dessen Peripherie sie sich sammeln, einem früheren Reifestadium zugeordnet werden muß.

Coronin und F-Aktin zeigen ein weitgehend übereinstimmendes Verteilungsmuster und sind zeitgleich auf Endosomen mit Beginn der neutralen Phase zu finden (Rauchenberger *et al.*, 1997). Daher kann geschlossen werden, daß es sich bei den Vacuolen, auf denen sowohl Coronin bzw. F-Aktin, als auch LC-FACS nachgewiesen werden konnte, um späte Endosomen handelt (Abb. 21, 20). Die Distribution von LC-FACS auf den Membranen ist nicht gleichmäßig. Am fleckenartigen Muster, der Lokalisation von Coronin und LC-FACS (Abb. 21) ist zu erkennen, daß die beiden Proteine verschiedene Bereiche derselben Membran besetzten. Membranen sind nicht nur Zell- oder Kompartimentbegrenzungen, die als Lösungsmittel für bestimmte Proteine dienen (Singer & Nicolson, 1972), vielmehr sind die Lipide in ihr ungleich verteilt (van Meer, 1989) und bilden zum Teil funktionelle Einheiten: Sogenannte Mikrodomänen oder „*lipid rafts*“, die bestimmte Proteine spezifisch binden oder selektiv ausschließen (Simons & Ikonen, 1997). Die „Sortierung“ von Coronin und LC-FACS könnte auf solche Mikrodomänen zurückzuführen sein, die eine unterschiedliche Affinität zu diesen Proteinen aufweisen. Späte Endosomen in Säugerzellen enthalten ein besonderes Lipid in ihrer dem Lumen zugewandten Membranschicht: die stark hydrophobe Lysobisphosphatsäure (LBPA), die auch Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) genannt wird (Schmid & Cullis, 1998). Es handelt sich um ein kegelförmiges Lipid, das essentiell für die Invagination der Endosomenmembran und damit für die Bildung von „*multi vesicular bodies*“ ist (Kobayashi *et al.*, 1999). In einigen der so entstandenen Vesikel ist LBPA das vorherrschende Lipid, in anderen Phosphatidyl-inositol-3-Phosphat. Auf diese Weise können möglicherweise Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität zu diesen Lipiden voneinander getrennt und in verschiedene innere Vesikel sortiert werden (Piper & Luzio, 2001). Kobayashi *et al.* konnten nachweisen, daß die Sortierung eines Rezeptors und von Mannose-6-Phosphat modifizierten lysosomalen Enzymen in engem Zusammenhang mit den LBPA reichen Domänen steht (Kobayashi *et al.*, 1998). In Membranen von lysosomalen und postlysosomalen Endosomen in *Dictyostelium discoideum* ist BMP ebenfalls stark angereichert, macht dort bis zu 40% der Vesikelmembran aus und verschwindet aber größtenteils mit Beginn der neutralen Phase (Nolta *et al.*, 1994). BMP ist spezifisch für Membranen des Endocytose-Netzwerkes (Rodriguez-Paris *et al.*, 1993). Eine Untersuchung mit einem Antikörper (6C4), gerichtet gegen dieses endo/lysosomale Lipid (Kobayashi *et al.*, 1998), brachte keine verwertbaren Ergebnisse (nicht gezeigt). Andere Fettsäure spezifische Antikörper standen nicht zur Verfügung, daher kann über den Grund für die Trennung von Coronin bzw. LC-FACS auf der Membran keine fundierte Aussage gemacht werden.

Vacuolin gilt als der zeitlich letzte Marker der Endocytose in *D. discoideum*. Die Coronin-Hülle um Endosomen wird dünner und sukzessive durch Vacuolin ersetzt. Es bildet eine Hülle um Endosomen, die bis zur Exocytose stetig dicker wird. Diese beiden Proteine markieren also aufeinanderfolgende Endosomenstadien (Rauchenberger *et al.*, 1997). Vacuolin und LC-FACS wurden zwar zusammen auf Endosomen gefunden, auf Endosomen, die bereits eine sehr intensive Vacuolinfärbung zeigen, kann aber keine LC-FACS mehr nachgewiesen werden (Abb. 22). Wienke *et al.* hatten bereits eine Kolokalisation von Dynamin A und Vacuolin auf Endosomen gezeigt (Wienke *et al.*, 1999). Eine Kolokalisation der Proteine Dynamin A und LC-FACS konnte nur auf diesen Kompartimenten nachgewiesen werden (Abb. 23). Somit kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei den LC-FACS und Dynamin A positiven Strukturen um die gleichen späten Endosomen handelt, die auch eine Kolokalisation von Vacuolin und LC-FACS zeigten. Eine zunehmend dickere Proteinhülle schützt die Endosomen nicht nur vor Fusionen mit Vesikeln, sondern behindert sicherlich auch ihre Knospung. Zu einem Zeitpunkt, zu dem eine dicke Vacuolinschicht die Vesikelknospung und damit

auch den retrograden Transport verhindert, ist die LC-FACS bereits von der Endosomenoberfläche verschwunden. Die ist ein weiteres Indiz dafür, daß die LC-FACS mit Hilfe von retrograden Vesikeln zusammen mit anderen Proteinen, wie zum Beispiel auch LmpA, vollständig recycelt wird.

Zusammenfassend ergibt sich ein zeitliches Profil der LC-FACS Dekoration auf Endosomen und Vesikeln, die in Abb. 48 dargestellt ist.

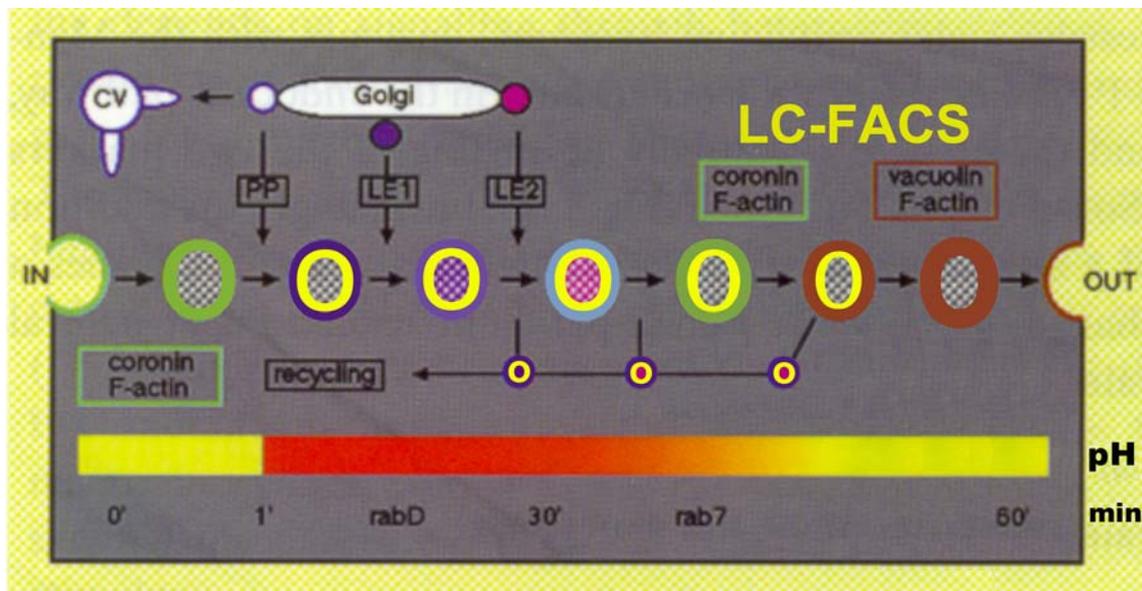


Abb. 48: Schematische Darstellung der LC-FACS Lokalisation auf Endosomen in *D. discoideum*. Dargestellt sind der Zeitliche Ablauf (min) und die Veränderungen im pH-Wert der Vesikel (Farbcode). Abbildung entnommen und verändert aus (Maniak, 1999).

5.4 VERÄNDERUNG DER LC-FACS EXPRESSIONSRATE

Der Versuch, die Expression der LC-FACS durch die Transformation von „sense“ und „antisense“ Fragmenten zu unterdrücken oder zumindest zu vermindern, blieb ebenso erfolglos, wie der Einsatz eines artifiziiellen RNAi Konstruktes. Anders als Discoidin (Martens *et al.*, 2002) kann die Expression der LC-FACS nicht auf diese Weise beeinflusst werden. Daher wurden genetische Nullmutanten und Expressions-Zelllinien hergestellt.

5.4.1 LC-FACS „KNOCK-OUT“

Die Generierung einer LC-FACS Nullmutante sollte weitere Erkenntnisse über die Funktion der LC-FACS liefern. Die erfolgreiche Unterbrechung des entsprechenden Gens durch ein „Knock-Out“ Konstrukt konnte durch einen Southern-Blot bestätigt werden (Abb. 34). Das durch die Hybridisierung mit einer radioaktiven LC-FACS Sonde resultierende Bandenmuster zeigte außerdem, daß es sich bei *fcsA* um ein „single-copy“ Gen handelt und das transformierte Konstrukt an keiner anderen Stelle in das Genom integriert wurde. Ein Western-Blot bestätigte diese Ergebnisse, da mit dem Antikörper in Proteinextrakten aus KO #8 keine LC-FACS spezifische Banden mehr zu detektieren waren (Abb. 36). Parallele Immunfluoreszenz Experimente mit diesem Antikörper und KO #8 bzw. Wildtyp Zellen zeigten in der Nullmutante nur eine sehr schwache diffuse Färbung, die auf unspezifische Kreuzreaktionen zurückgeführt werden kann (Abb. 32). Es konnte bewiesen werden, daß es sich bei KO#8 tatsächlich um einen *fcsA*⁻ Stamm handelt.

5.4.2 EXPRESSION DER LC-FACS IM *FCSA*⁻ HINTERGRUND: „RESCUE“ UND ÜBEREXPRESSION

Die Expression der rekombinanten LC-FACS könnte ebenfalls Erkenntnisse über die Funktion der LC-FACS bringen, daher wurden Expressions-Plasmide konstruiert, die den vollständigen ORF unter der Kontrolle des konstitutiven Aktin15-Promotors tragen.

Die Western-Blot Analyse zeigt für einen der „rescue“-Klone eine Expression, die ca. 50% der endogenen entspricht. Die LC-FACS Menge in einer weiteren dieser Zelllinien liegt bei ca 200% verglichen mit Ax2 (Abb. 36). In Immunfluoreszenz Experimenten wurde festgestellt, daß die Zellen des Überexprimierers das Protein relativ gleichmäßig stark exprimieren. Der andere Klon war bezüglich der LC-FACS sehr inhomogen (Abb. 37). Die Expressionsstärke der Zellen verglichen mit Wildtyp reichte von 30% bis 200%; Homogenität innerhalb der Population konnte auch durch mehrmaliges Subklonieren nicht erreicht werden.

5.5 DIE LC-FACS EXPRESSION HAT KEINEN EINFLUß AUF DIE ENTWICKLUNG

Vacuolin lokalisiert ausschließlich auf Endosomen und ist in seiner Funktion wohl auf Endocytose beschränkt (Jenne *et al.*, 1998). In hungernden *D. discoideum* sind keine Endosomen vorhanden (de Chastellier & Ryter, 1977), dementsprechend kommt Expression von Vacuolin mit dem Beginn der Entwicklung zum Erliegen. Vacuolin⁻ Zellen zeigen auch erwartungsgemäß keinen offensichtlichen Entwicklungsphänotyp (Jenne *et al.*, 1998). Die LC-FACS Expression geht in den ersten 3 Std. hingegen nur leicht zurück und sinkt bis zur Ausbildung der Fruchtkörper weiter auf ca. 50% (Abb. 38). LC-FACS konnte ebenfalls auf Endosomen nachgewiesen werden, die Identität der kleinen LC-FACS dekorierten Vesikel konnte aber nicht vollständig geklärt werden. Für die *fcsA*⁻ Zelllinie konnte kein Entwicklungsphänotyp gezeigt werden, die Zellen aggregieren und durchlaufen die Entwicklung zu reifen Fruchtkörpern mit lebensfähigen Sporen in der gleichen Zeit wie Wildtyp-Zellen. Anders als Vacuolin ist LC-FACS offenbar nicht exklusiv an der Endocytose, sondern auch an anderen Prozessen beteiligt, da es auch während der Entwicklung weiter exprimiert wird. Sollte die LC-FACS also an der Zelldifferenzierung partizipieren, so ist ihre Rolle entweder nicht von entscheidender Bedeutung oder sie kann durch ein anderes Protein ersetzt werden. Durch Immunfluoreszenz Experimente mit Wildtypzellen konnte die intrazelluläre Lokalisation der LC-FACS in unterschiedlichen Entwicklungsstadien nicht aufgeklärt werden. Für die Sortierung der Zellen im Culminationsstadium und die Bildung von Sporenzellen ist Clathrin-abhängiger Vesikeltransport essentiell (Niswonger & O'Halloran, 1997). Es kann postuliert werden, daß auch andere Vesikel an diesen Vorgängen in der Zelldifferenzierung partizipieren, die möglicherweise LC-FACS positiv sind.

5.6 PHÄNOTYP DER NULLMUTANTE IN VEGETATIVEN ZELLEN

Vegetative *fcsA*⁻ Zellen zeigen keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen. Entscheidende Unterschiede die Größe der Zellen betreffend, konnten zwischen *fcsA*⁻ und Ax2 nicht festgestellt werden, daher können sie in Endocytose Assays auch direkt miteinander verglichen werden. Zusammen mit der nur leicht höheren Tendenz zur Mehrkernigkeit (Tab. 3), kann davon ausgegangen werden, daß durch das Fehlen der LC-FACS kein Schaden in der Zellteilung verursacht wird.

FcsA⁻ Zellen haben eine Generationszeit, die mit der von Ax2 übereinstimmt. Weder in axenischen Medium noch in Bakteriensuspension oder auf *Klebsiella aerogenes* Rasen lassen sich Unterschiede zwischen den beiden Stämmen feststellen. Die Generationszeit ergibt sich aus der Fähigkeit der Zellen, sich zu teilen und sich durch Endocytose ausreichend zu ernähren.

5.7 LC-FACS PROTEINE SIND AN DER ENDOCYTOSE BETEILIGT

Triacsin C ist ein kompetitiver Inhibitor von LC-FACS Enzymen (Hartman *et al.*, 1989). Der Einsatz dieser Droge in Pinocytose Assay (Abb. 30) und „pulse-chase“ Experimenten zur Evaluierung des endocytischen Transits zeigte keine Effekte (nicht gezeigt), die Phagozytose von Hefen konnte jedoch dosisabhängig vermindert werden (Abb. 30). Dies deutet daraufhin, daß LC-FACS Enzyme an der Partikelaufnahme beteiligt sind, oder aber die Droge auf andere Art die Phagozytose negativ beeinflusst. Die Tatsache, daß kein Einfluß auf die Aufnahme oder Retentionszeit von Flüssigphasenmarker festgestellt werden konnte, läßt zweierlei Interpretationen zu: Entweder sind in diesen Prozessen keine LC-FACS Enzyme beteiligt, oder sie werden von dieser Droge nicht inhibiert.

Die LC-FACS lokalisiert auf frühen Phagosomen (Abb. 29). Ihre Aktivität ist aber offenbar nicht von entscheidender Bedeutung für die Partikelaufnahme. *FcsA*⁻ zeigt keinen Phagozytose Phänotyp (Abb. 39), weshalb die Verringerung der Phagozytoserate durch Triacsin C nicht auf eine Hemmung der hier untersuchten LC-FACS zurückgeführt werden kann. Es ist bekannt, daß Triacsin C verschiedene LC-FACS Enzyme unterschiedlich effektiv inhibiert (Hartman *et al.*, 1989), so inhibiert es die *de novo* Synthese von Glycerin und Triacyl- und Diacylglyceriden und Phospholipiden, nicht aber die Reacylierung von Lysophosphatidylsäuren oder die Acylierung von Phospholipiden in Fibroblasten (Igal *et al.*, 1997). In *D. discoideum* könnte somit ein weiteres Enzym aus der LC-FACS Familie für die Phagozytose benötigt und in den Versuchen mit Triacsin C gehemmt worden sein.

Eine Verminderung der Aufnahme von Flüssigphasenmarker in der LC-FACS Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp konnte nicht festgestellt werden. In axenisch wachsenden *D. discoideum* Laborstämmen macht Makropinocytose den Großteil der Flüssigkeitsaufnahme aus (Hacker *et al.*, 1997). LC-FACS zeigte keine Lokalisation auf naszierenden oder sehr frühen Makropinosomen.

5.8 DIE LC-FACS BEEINFLUßT DEN PH-WERT IN ENDOSOMEN UND IHRE RETENTIONSZEIT

FcsA⁻ zeigt wie Vacuolin Nullmutanten keine Veränderungen in der Generationszeit und der Aufnahme von Flüssigkeiten oder Partikeln. In LC-FACS⁻ wurde eine Verlängerung des Transits von Flüssigphasenmarker gemessen (Abb. 40). Das in diesen Experimenten gemessene pH-Wert Äquivalent in Endosomen lag in *fcsA*⁻ reproduzierbar höher als bei Wildtyp-Zellen. Diese Werte entziehen sich allerdings aufgrund großer Streuung einer statistischen Analyse. Eine Verlängerung der neutralen Phase, die in einer verminderten Aktivität von zersetzenden Enzymen resultiert, könnte zu einer Verzögerung der Exocytose führen. Tatsächlich konnte mehrfach eine etwas verfrühte Neutralisierung von Endosomen in *fcsA*⁻ Zellen gezeigt werden (Abb. 42). Dieses

Ergebnis beruht zwar auf der Beobachtung einzelner Zellen, unterstützt aber dennoch die Annahme, das Fehlen der LC-FACS führe zu einer verfrühten Neutralisierung. Entsprechend dem Phänotyp von Vacuolin Nullmutanten, deren verspäteter Übergang zur neutralen Phase in einer Verlängerung der Retentionszeit von Flüssigphasenmarker resultiert (Jenne *et al.*, 1998), sollte eine verfrühte Neutralisierung der Endosomen, zu einer verfrühten Exocytose führen. Dies ist in *fcsA*⁻ Zellen jedoch nicht der Fall. Sie zeigen eine verspätete Exocytose; die neutrale Phase in *fcsA*⁻ ist also nicht nur verfrüht, sondern auch verlängert.

Der intrazelluläre pH-Wert wurde auch mit Hilfe der Neutralrot-Fluoreszenz gemessen, um die Daten aus den Transit-Assays zu bestätigen. Ax2 Zellen, die mit Ammoniumchlorid versetzt waren, sollten einen niedrigeren pH-Wert haben (Cardelli *et al.*, 1989) und wurden daher als Kontrolle verwendet, ebenso wie unbehandelte Wildtypzellen, deren pH-Wert parallel vermessen wurde (Abb. 43). Die Wirkung des Ammoniumchlorids zeigte sich erwartungsgemäß in einem neutraleren pH-Wert, obgleich diese Meßwerte starken Schwankungen unterlagen. Diese Meßmethode erscheint geeignet, Aussagen über den pH-Wert in Endosomen zu machen. Ein erhöhter pH-Wert in *FcsA*⁻ Zellen konnte bestätigt werden. Er lag sogar noch oberhalb dessen, was in Ammoniumchlorid behandelten Zellen gemessen wurde.

Eine Konsequenz eines veränderten pH-Werts in Lysosomen die verminderte Prozessierung von dieser Glycosidase ist, die im zunehmend neutralen Milieu weniger effizient wird (Cardelli *et al.*, 1989). *FcsA*⁻ Zellen zeigen eine deutlich niedrigere Aktivität von α -Mannosidase. Es liegt nahe, diese um 25% verminderte Aktivität (Abb. 44) auf den niedrigeren pH-Wert zurückzuführen. Die Ergebnisse dieser Experimente untermauern ebenfalls die Hypothese das Fehlen der LC-FACS führe zu einem erhöhten pH-Wert in Endosomen / Lysosomen in *D. discoideum*.

In *Lvs B*⁻ Zellen zeigt sich ein ähnlicher Phänotyp wie in *fcsA*⁻. Es läßt sich keine Veränderung in Pino- oder Phagocytoserate nachweisen und der Transit ist mit dem in Wildtypzellen vergleichbar. Auffällig sind hingegen die vergrößerten sauren Endosomen und die verstärkte Sekretion (+50%) von α -Mannosidase (Harris *et al.*, 2002). Harris *et al.* haben den pH-Wert in den Endosomen ihrer Mutante zwar nicht gemessen, dennoch kann angenommen werden, daß auch hier pH-Wert, proteolytische Prozessierung des 80 kDa Intermediates und anschließende Sekretion der reifen 58 kDa Glycosidase in engem Zusammenhang stehen. In diesem Falle zeigten *Lvs B* Nullmutanten und *FcsA*⁻ bezüglich pH-Wert und Sekretion komplementäre Phänotypen.

D. discoideum Zellen sezernieren lysosomale Enzyme in das umgebende Medium (Ashworth & Quance, 1972; Every & Ashworth, 1973), darunter auch α -Mannosidase und saure Phosphatase. Letztere wird zum Großteil in den Zellen zurückgehalten, während bis zu 90% der α -Mannosidase Aktivität im Medium gemessen werden. Saure Phosphatase und α -Mannosidase sind Repräsentanten der beiden Klassen lysosomaler Enzyme, die in getrennten Vesikeln transportiert (Souza *et al.*, 1997) und im Laufe der Endosomenreifung mehrmals recycelt werden (Gotthardt *et al.*, 2002). Da Enzyme beider Klassen nicht zusammen in Endosomen vorkommen (Souza *et al.*, 1997), müssen diejenigen Enzyme, die sich zuerst in Endosomen befinden, bereits aus deren Lumen entfernt / recycelt worden sein, bevor das zweite Set lysosomaler Proteine angeliefert wird.

Die Aktivitäten beider Enzyme wurde in den Zellen und dem umgebenen Medium separat vermessen. Die saure Phosphatase wird in Wildtyp- und LC-FACS⁻-Zellen mit gleicher Effektivität in den Zellen zurückgehalten, nur ca. 10% werden sekretiert (Abb. 41). Das Recycling dieser Enzymklassen bleibt also vom Fehlen der LC-FACS scheinbar unberührt. Dies schließt ihre funktionelle Beteiligung an dieser Form des Vesikeltransportes nicht zwangsläufig aus. Das Enzym gehört zum ersten Set zersetzender Enzyme. Selbst wenn die fehlende Aktivität der LC-FACS zu einer Verschlechterung der Effektivität des retrograden Transportes der Phosphatase führte, kann die Zeit bis zur Exocytose dennoch ausreichend sein, so daß -auch bei einer Verzögerung- die Recyclingrate zum Zeitpunkt der Exocytose wieder auf Wildtyp-Niveau angelangt. Leichte Differenzen konnten bei der Sekretion der α -Mannosidase festgestellt werden: *FcsA⁻* Zellen sezernieren etwas weniger als Ax2 (Abb. 41). Sollten lysosomale Enzyme tatsächlich nicht über die Exocytose von Endosomen ins Medium abgegeben werden, wie von Dimond *et al.* angenommen (Dimond *et al.*, 1981), müßte es in *fcsA⁻* zu einer Verschlechterung des entsprechenden Vesikeltransportes kommen, der die Enzyme abseits des Endocytose-Netzwerks zur Plasmamembran bringt, wo sie dann sekretiert würden. Eine plausiblere Erklärung ist jedoch, daß hier erneut die Verzögerung der Exocytose zum Tragen kommt. Der gemessene Unterschied ist gering, paßt aber in der Größenordnung zu der verminderten Exocytose, die in den Transit-Assays gemessen wurde. In diesem Falle wäre der gleiche, schwache Phänotyp auf unterschiedliche Weise festgestellt und so bestätigt worden.

Im Zusammenhang mit der Veränderung des endosomalen Milieus in Säugerzellen steht auch die Bildung von COP Vesikeln. Sie werden in Abhängigkeit vom endosomalen pH-Wert gebildet und sind für den Transport von frühen zu späten Endosomen verantwortlich (Aniento *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1997). Daß COP Vesikel *D. discoideum* nicht nur am Golgi-Apparat, sondern auch an Endosomen gebildet werden, ist nicht belegt. Die Kollokalisierung von COP Proteinen und endosomalen Markern (Janssen *et al.*, 2001), kann sowohl von Golgivesikeln herrühren, die mit den Endosomen fusioniert haben, als auch von naszierenden COP Vesikeln, die gerade an der dieser Membran gebildet werden. Eine weniger effektive Vesikelbildung, hervorgerufen durch die Veränderung des pH-Werts, könnte auch eine weitere Erklärung für den verzögerten Transit in *fcsA⁻* sein. LC-FACS könnte also, ohne auf COP Vesikeln zu lokalisieren, ihre Knospung an Endosomen beeinflussen.

Sollte es sich bei den LC-FACS positiven Vesikeln tatsächlich um solche Vesikel handeln, die den retrograden Transport lysosomaler Enzyme zwischen Endosomen in verschiedenen Reifungsstadien vermitteln, könnte hier eine Erklärung für die Verlängerung der Retentionszeit von Flüssigphasenmarker liegen. Da diverse Vesikel Fettsäure-CoA für die Trennung von ihrer Donormembran benötigen (s. Einleitung I 6), könnte das Fehlen der LC-FACS Aktivität in *fcsA⁻* Zellen zu einem weniger effektiven Recycling der lysosomalen Enzyme führen, und so eine Verzögerung der Exocytose verursachen.

Sowohl Pino- als auch Phagocytose benötigen die lokal begrenzte Reorganisation des Aktin Cytoskeletts, sie wird aber von zum Teil unterschiedlichen Signaltransduktions-Mechanismen kontrolliert, bei denen Lipide wichtige Mediatoren darstellen (Cardelli, 2001).

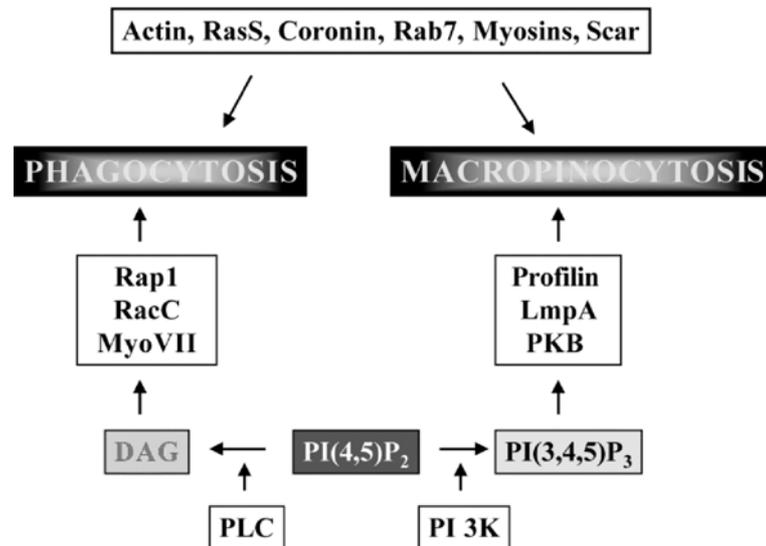


Abb. 49: Gegenüberstellung der für die beiden Endocytoseprozesse Phagozytose und Makropinocytose wichtigen Proteine in *D. discoideum*. Von zentraler Bedeutung ist hier PIP_2 , das einerseits von Phospholipase C (PLC) gespalten werden kann und so Diacylglycerol (DAG) und IP_3 freisetzt, oder durch PI3-K erneut phosphoryliert werden kann zu PIP_3 . DAG und IP_3 aktivieren Rap1 und sorgen so letztlich zu einer Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration, die die Phagozytose einleitet. Über PIP_3 , PKB, Profilin und LmpA wird die Makropinocytose stimuliert. Abbildung entnommen aus (Cardelli, 2001).

In *Dictyostelium discoideum* sind zwei Isoformen von Profilin (I+II) bekannt (Haugwitz *et al.*, 1991), deren Fehlen zu einer verminderten Makropinocytose führt, sowie zu einer Verlängerung der Retentionszeit von Flüssigphasenmarker, Defekten in der Exocytose, aber auch zu einer zwei- bis dreimal effektiveren Phagozytose (Temesvari *et al.*, 2000). Wird im pI / pII Hintergrund das *lmpA* Gen unterbrochen, resultiert dies in einer Reversion des Profilin-Null Phänotyps (Karakesisoglou *et al.*, 1999). Die Eliminierung der intakten *lmpA* Genkopie in Wildtyp *Dictyostelium discoideum* Zellen verursacht einen Rückgang der Pinocytose-Rate um 75% und verlängert den Transit, hat aber keinerlei Einfluß auf die Phagozytose (Temesvari *et al.*, 2000). Es konnte zwar keine direkte Interaktion zwischen LmpA und Profilin oder Aktin gezeigt werden, eine spezifische Bindung von PIP_2 und LmpA war jedoch nachgewiesen worden. Phosphatidyl-Inositol gilt wiederum als einer der Hauptregulatoren von Profilin (Ostrander *et al.*, 1995) und so auch indirekt von F-Aktin. Profiline binden ebenfalls PIP_2 (Sohn *et al.*, 1995; Lambrechts *et al.*, 1997) und verhindern so auch dessen Hydrolyse durch PLC (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1990). Profiline aktivieren außerdem PI3-Kinasen (Singh *et al.*, 1996; Bhargavi *et al.*, 1998). Für CD36, zu dem LmpA eine gewisse Homologie besitzt (Janssen *et al.*, 2001) konnte die Bindung von langkettigen Fettsäuren gezeigt werden (Abumrad *et al.*, 1993; Baillie *et al.*, 1996). Profilin und LmpA sind also Ziele von Regulationsmechanismen, die zumindest teilweise von Phospholipiden gesteuert werden. In diesem Zusammenhang kann auch die hier untersuchte LC-FACS gesehen werden, deren Fehlen dazu führen könnte, daß die Verfügbarkeit von langkettigen Fettsäuren vermindert wird. Dies könnte in einem Mangel an Phosphatidyl-Inositol resultieren und so eine Verzögerung Signaltransduktion verursachen, die letztlich zu einer Verlängerung des Transits führt.

5.9 IMPORT VON FETTSÄUREN

Für den Import von Fettsäuren in die Zelle werden zwei Modelle postuliert: Fettsäuren diffundieren durch die Plasmamembran oder ein Proteinkomplex vermittelt ihre Aufnahme (Faergeman *et al.*, 2001), *in vivo* findet beides vermutlich parallel statt, wenn auch die Esterifizierung mit CoA als die treibende Kraft bei der Internalisierung von Fettsäuren angesehen wird (McArthur *et al.*, 1999). Verschiedene Fettsäure-Translokasen wurden gefunden, die Fettsäuren durch Membranen transportieren. In Ratten Adipozyten beispielsweise gibt es ein CD36 Homolog, das in der Plasmamembran lokalisiert und Fettsäuren zu binden vermag (Abumrad *et al.*, 1993; Baillie *et al.*, 1996). Dort findet sich auch ein weiteres Protein: FATP („*fatty acid transport protein*“) (Schaffer & Lodish, 1994; Stuhlsatz-Krouper *et al.*, 1998). FATP aus Maus ist eine Fettsäure-CoA-Synthetase und verbindet die Aktivierung und Aufnahme von Fettsäuren. Sie lokalisiert an der Plasma- und weiteren intrazellulären Membranen (Coe *et al.*, 1999). Auch der Import freier Fettsäure aus dem Cytoplasma in Mitochondrien wird in Säugerzellen über einen Transportkomplex aus Porinen und LC-FACS Enzymen vermittelt (Kerner & Hoppel, 2000). In *Saccharomyces cerevisiae* wurden gleich mehrere Proteine Faa1p und Faa4p („*fatty acid activator*“) identifiziert, deren „*Knock-Out*“ zu einer Verminderung der intrazellulären Fettsäurekonzentration führt (Faergeman *et al.*, 2001); ihre Lokalisation in der Zelle ist nicht bekannt (Knoll *et al.*, 1994). Bei allen anderen hier aufgezählten Beispielen von Proteinen, die für den Import extrazellulärer Fettsäuren in die Zellen zuständig sind, handelt es sich um Proteine, die an der Plasmamembran nachgewiesen wurden. Die LC-FACS konnte nie dort beobachtet werden.

Die hier untersuchte LC-FACS lokalisiert auf Endosomen und ist ebenfalls ein wichtiger Faktor beim Import von Fettsäuren. *FcsA⁻* und Wildtypzellen, die mit einem fluoreszierenden Fettsäureanalogon inkubiert worden waren, zeigen bereits 15 min nach dessen Zugabe einen Unterschied, der im Laufe der Inkubationszeit immer deutlicher zu Tage tritt (Abb. 44). Zum einen ist die Fluoreszenzintensität in LC-FACS Nullmutanten viel schwächer, zum anderen ist die Markierung der gefärbten Kompartimente in *fcsA⁻* Zellen verzögert. Innerhalb der ersten 5 min sind Lipidtropfen zu sehen und in Wildtypzellen eine schwache Markierung der Plasmamembran. Da diese Lipidtropfen auch in *FcsA⁻* Zellen sichtbar sind, gelangen langkettige Fettsäuren offenbar auch ohne die Aktivität der LC-FACS in die Zelle, wenn auch mit geringerer Effizienz. Fettsäuren können auch durch die Plasmamembran diffundieren und von dort aus entweder mit Hilfe von Fettsäure bindenden Proteinen zu den verschiedenen Zellkompartimenten wie ER, Mitochondrien, dem Golgi-Apparat oder Lipidtröpfchen transportiert werden, wo sie von Enzymen der LC-FACS-Familie aktiviert werden (zusammenfassend in: McArthur *et al.*, 1999).

Um die Fettsäure Aufnahme in *D. discoideum* Zellen quantitativ messen zu können, wurde analog zur Pinocytose ein Assay entwickelt. In diesen Experimenten wurden der Fettsäure-Import in Abhängigkeit der LC-FACS Expressionsstärke untersucht. Die Aufnahme langkettigen Fettsäuren geht in *FcsA⁻* Zellen stark zurück und korreliert mit der LC-FACS Expression der verschiedenen Zelllinien (Abb. 45). Die rekombinante Expression der LC-FACS im *FcsA⁻* Hintergrund führt zu einer Rettung des Fettsäure-Import Phänotyps. Dies ist der Beweis, daß das Fehlen der LC-FACS tatsächlich die Ursache für den Rückgang der Fettsäure Aufnahme in *FcsA⁻* Zellen ist. LC-FACS ist am Import von langkettigen Fettsäuren entscheidend beteiligt und verbindet wie FATP (Coe *et al.*, 1999), Faa1p und Faa4p Aufnahme und Aktivierung miteinander (Faergeman *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2002). Anders als bei diesen Proteinen kann bei der LC-FACS aus-

geschlossen werden, daß sie den Import der Fettsäuren an der Plasmamembran vermittelt, da dieses Protein nie dort nachgewiesen werden konnte. In humanen Adipocyten konnte ein FATP identifiziert werden. Schaffer *et al.* erwähnen, daß FATP möglicherweise nicht an der Plasmamembran von Adipocyten lokalisiert, sondern auf Endosomenartigen Strukturen, die nahe an der Zellperipherie liegen (Schaffer & Lodish, 1994).

Obgleich der spontane Wechsel der Fettsäure von der dem Medium zugewandten Membranschicht zur cytoplasmatischen („flip-flop“) ein schneller Prozeß ist, sind Proteine anscheinend für Import und Regulation der Fettsäure-Aufnahme *in vivo* von größerer Bedeutung (Schaffer, 2002). Es könnte also alternativ oder zusätzlich zur hier untersuchten LC-FACS eine unbekannte Fettsäure-Translokase in *D. discoideum* existieren, deren Aktivität für den Fettsäuren-Import in KO #8 Zellen verantwortlich ist. Experimente mit Zellen haben gezeigt, daß die Aufnahme von Fettsäure mit der Ansäuerung des Cytosols einher geht, wie für das „flip-flop“-Modell vorhergesagt (Hamilton, 1998). In Sphaeroplasten von *Escherichia coli* ist der Import der langkettigen Palmitinsäure unter Beteiligung von Fettsäure-CoA Synthetasen an der Plasmamembran (Kameda, 1986; Mangroo & Gerber, 1993) an den gleichzeitigen Einstrom von Protonen gekoppelt (Kameda *et al.*, 1987). Sollte die hier untersuchte LC-FACS ebenfalls Teil eines solchen (postulierten) Fettsäure / H⁺ Cotransporters sein, könnte ihre Aktivität zur Neutralisierung von Endosomen in *D. discoideum* beitragen, indem Fettsäuren zusammen mit Protonen aus dem Endosomenlumen geschleust werden. In *fcsA*⁻ Zellen konnte aber ein erhöhter pH-Wert in Endosomen gezeigt werden. Der Widerspruch könnte dadurch erklärt werden, daß der Ausstrom von Protonen durch den LC-FACS vermittelten Transport der Fettsäuren durch die Endosomenmembran, in *fcsA*⁻ Zellen durch eine erhöhte Anzahl von Fettsäuren, die ohne LC-FACS Aktivität nun vermehrt mit Hilfe des „flip-flop“-Mechanismus die Membran durchqueren, überkompensiert wird.

Die Fluoreszenz-Markierung durch das Fettsäureanalogon stimmt nicht völlig mit der Lokalisation der LC-FACS überein. Es werden auch Strukturen markiert, die in Größe und Anzahl Endosomen entsprechen, sie sind in Wildtypzellen nach 5 min bereits schwach zu erkennen. Durch den Einsatz der Aktin depolymerisierenden Droge Cytochalasin A in den Fettsäure-Import Assays konnte bewiesen werden, daß Fettsäuren in *D. discoideum* über Endosomen aufgenommen werden. Cytochalasin A hemmt dosisabhängig die Endocytose (Maniak *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 1997). Einerseits nehmen LC-FACS⁻ Zellen bei normaler Pinocytoserate, deutlich weniger langkettige Fettsäuren auf als der Wildtyp, andererseits führt eine durch Depolymerisation von F-Aktin verursachte verminderte Pinocytose bei unveränderter LC-FACS Expression zu einem Rückgang der Aufnahme des Fettsäureanalogons (Abb. 47). Daraus kann geschlossen werden, daß die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren durch die hier untersuchte LC-FACS über Endosomen erfolgt. Die Expression der LC-FACS in den verwendeten Zellen wurde per Western-Blot Analyse überprüft, und war in allen Fällen auf vergleichbarem Niveau. Der Effekt der Droge ist also auf verminderte Endocytose zurückzuführen, da kein Einfluß von Cytochalasin A auf die LC-FACS Expression gezeigt werden konnte. Dadurch wurde gezeigt, daß LC-FACS funktionell am Fettsäure Import in *D. discoideum* beteiligt ist.

Von den Endosomen aus werden die von LC-FACS aktivierten Fettsäuren offenbar schnell abtransportiert, da sie sich nicht an der Endosomenmembran konzentrieren und andere intrazelluläre Kompartimente früher und intensiver gefärbt erscheinen. Die aufgenommenen Fettsäuren werden nach und nach in allen Membranen der Zelle sichtbar, in *FcsA*⁻ ist dies zeitlich verzögert.

Die funktionelle Beteiligung der LC-FACS am Import langkettiger Fettsäuren kann als bewiesen betrachtet werden. Sie könnte eine Komponente eines in der Membran verankerten Proteinkomplexes sein, der die Fettsäure Aufnahme vermittelt. Auf diese Weise könnte LC-FACS an die Membran gebunden sein, ohne selbst ein Transmembranprotein zu sein

6 MATERIAL

6.1 GERÄTE

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Binokular	Zeiss, Göttingen
Blot-Kammern	MPI Martinsried
Coulter Counter	Coulter electronics, Krefeld
Elektrophorese-Kammern	MPI Martinsried
Fluoreszenz-Spektr-Photometer	Kontron Instruments
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-70°C)	Heraeus, Osterode
GelDoc II	Biometra, Göttingen
Gelkammern	Metallwerkstatt, Universität Kassel
GenePulser [®]	Bio-Rad, Kanada
Glaswaren	Schott, Mainz
Glaspipetten	Hirschmann, Deutschland
Hamiltonspritze	Hamilton, Schweiz
Heizblock	Werkstatt, MPI Martinsried
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Kühlschränke (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Küvetten (Quarz)	Hellma, Müllheim
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA, Staufen im Breisgau

6.1.1 MIKROSKOPE

-Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen
-Fluoreszenzmikroskop (invers), DM IRB	Leica, Bensheim
-CLSM, TCS SP2	Leica, Bensheim

6.1.2 PIPETTIERHILFEN

Multipette [®]	Eppendorf, Hamburg
-Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald
-Accu Jet	Brand, Wertheim/Main
Pipetten (2 µl; 20 µl; 200 µl; 1.000 µl)	Gilson, Frankreich

6.1.3 ZENTRIFUGEN

-Biofuge 15	Heraeus, Osterode
-Biofuge stratos	Heraeus, Osterode
-Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
-MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
-Rotina/R	Hettich, Tuttlingen
-Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen
-Ultrazentrifuge Airfuge	

6.1.4 SONSTIGE GERÄTE

Mikrowelle	Daewoo, Korea
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main
PCR-Thermocycler PCR-Express	Hybaid, Heidelberg
pH-Meter 523	WTW
Phosphorimager	Raytest, Straubenhardt
- BAS Kasette	Fuji, Japan
Photometer Ultrospec 3000pro	Amersham Pharmacia, Freiburg
Powersupplies	-Amersham Pharmacia, Freiburg -Werkstatt, MPI Martinsried
Schüttelinkubatoren Lab Shaker	Adolf Kühner AG, Schweiz
Schwenkplatte	B. Braun, Melsungen
Speed Vac Concentrator	Eppendorf, Hamburg
Sterilbänke	Holten, Dänemark
Thermo-Mixer	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie	Bender & Hohbein AG, Schweiz
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	B. Braun, Melsungen

6.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

3MM Papier	Whatman, Göttingen
Costar-Platten (24-Loch)	Sarstedt, Nümbrecht
Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbadeb Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen (Ø 18 mm)	Assistent
Deckgläschen (50 mm x 50 mm)	Assistent
<i>Einmalhandschuhe:</i>	
-Nitril	Ansell, Belgien
-Latex	Servoprax GmbH, Wesel
Einmalküvetten (1 ml, 2 ml)	Schütt, Göttingen
Einwegtücher	Kimberly-Clark, England
Einwegspritzen	B. Braun, Melsungen
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, Kanada
Falconröhrchen (15 ml; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Nukleopore Membran (0,45 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Injektionsnadeln	B.Braun AG, Melsungen
Objektträger	Mentzelgläser
Parafilm M	American National Can, USA
Petrischalen (Ø 10 cm; Ø 5 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Gilson, Frankreich
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (0,45 µm, 0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen
<i>Transfermembranen:</i>	
-Nitrocellulose PROTRAN®	Schleicher & Schuell, Dassel
-Nylon ROTI-Nylon® plus	Roth, Karlsruhe

6.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

6.3.1 GROB- UND FEINCHEMIKALIEN

Die aufgeführten Chemikalien haben, soweit nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad p.a. .

[α - ³⁵ P]dATP (40MBq)	Hartman,Analytic, Braunschweig
(30%ige Acrylamid-Stammlösung)	Roth, Karlsruhe
Agarose Standard	Eurobio
APS	Roth, Karlsruhe
Bacto–Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
BCIP	Roth, Karlsruhe
Benzamidin	Roth, Karlsruhe
Blasticidin S	ICN, Eschwege
C ₁ -BODIPY [®] 500/510 C ₁₂	Molecular-Probes, Niederlande
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Brillant-Blau R 250	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Deisenhofen
Cytochalasin	Sigma, Deisenhofen
DEPC	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
DTT	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Fischgelatine	Amersham Life Science, Freiburg

FITC Dextran (64 kDa)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formamid	Roth, Karlsruhe
Gelvatol Typ II	Sigma, Deisenhofen
Geneticin (G418)	ICN, Eschwege
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, England
HEPES	Roth, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (KAc)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (blotting grade)	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (NaCO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxidplätzchen (NaOH)	Roth, Karlsruhe
NBT	Roth, Karlsruhe
N-Laurylsarcosin	USB, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PCIA	Roth, Karlsruhe

Penicillin/Streptomycin [10.000 U/ml]	Gibco BRL, Eggenstein
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt
PIPES	Roth, Karlsruhe
PNPP	Roth, Karlsruhe
PN- α -Mannosid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease-Pepton	Oxoid, England
Rotiphorese [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Sephadex G50	Amersham Pharmacia, Freiburg
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Krefeld
TEMED	Roth, Karlsruhe
TriacsinC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
TRITC Dextran (64 kDa)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TRITC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Typanblau	merck, Darmstadt
Tween [®] 20	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe

FLUORESZENZFARBSTOFFE

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), Absorption _{max} 358 nm, Emission _{max} 461 nm	Sigma, Deisenhofen
C ₁ -BODIPY [®] 500/510 C ₁₂ Absorption _{max} 500 nm, Emission _{max} 510 nm	Molecular Probes, Niederlande
IR-beads, Ø: 1,621 µm Absorption _{max} 633 nm, Emission 650-750 nm	Polyscience, Warrington, USA
TRITC-Dextran Absorption _{max} 544 nm, Emission _{max} 574 nm	Sigma, Deisenhofen
FITC-Dextran Absorption _{max} 480 nm, Emission _{max} 520 nm	Sigma, Deisenhofen
TRITC Absorption _{max} 544 nm, Emission _{max} 574 nm	Sigma, Deisenhofen
Phalloidin-TRITC Absorption _{max} 544 nm, Emission _{max} 574 nm	Molecular Probes, Niederlande

ANTIBIOTIKA

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Geneticin (G418)	ICN, Eschwege
Blasticidin S	ICN, Eschwege
Penicillin / Streptomycin	Gibco BRL ,Eggenstein

ANTI-KÖRPER*Monoklonale Antikörper*

anti-Coronin	mAb 176-3-6 (de Hostos <i>et al.</i> , 1991)
anti-GFP	mAb 264-449-2 (Chemicon)
anti-H ⁺ -ATPase (A-Untereinheit)	mAb 221-35-2 (Rauchenberger <i>et al.</i> , 1997)
anti-LC-FACS	mAb 221-457-5 (diese Arbeit)
anti-mitochondriales Porin	mAb 70-100-1 (Troll <i>et al.</i> , 1992)
anti-Proteindisulfidisomerase	mAb 221-135-1 (Monnat <i>et al.</i> , 1997)
anti-Vacuolin	mAb 221-1-1 (Rauchenberger <i>et al.</i> , 1997), mAb 263792, mAb 264-285-2
anti-talin	(Maniak, unveröffentlicht) mAb 227-341-4

anti-lysosomales Protein	mAb 221-342-5, mAb 221-450-6, <i>common Ag 1</i>
anti-ribosomales Protein	mAb 220-266-1
<i>Polyklonale Antikörper</i>	
anti-LimpA	mAb #3417 (Janssen <i>et al.</i> , 2001)
anti-LimpB	mAb #7656 (Janssen <i>et al.</i> , 2001)
anti-LimpC	mAb #7454 (Janssen <i>et al.</i> , 2001)
IgG, Ziege anti Maus, TRITC konjugiert	Dianova, Hamburg
IgG, Ziege anti Maus, alkalische Phosphatase konjugiert	Dianova, Hamburg
IgG, Ziege anti Maus, Cy3 konjugiert	Dianova, Hamburg
IgG, Ziege anti Kaninchen, Cy3 konjugiert	Dianova, Hamburg

ENZYME

Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Restriktionsenzyme (+ jeweilige Reaktionspuffer)	Hybaid, Freiburg MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
CIP („ <i>Calf Intestinal Phosphatase</i> “)	NEB, Schwalbach/Taunus
T4-DNA Ligase	Hybaid, Freiburg MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Hybaid, Freiburg MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pwo-Polymerase („ <i>proof reading</i> “)	Hybaid, Freiburg
Klenow-Fragment	Hybaid, Freiburg MBI Fermentas, St. Leon-Rot

NUKLEINSÄUREN*Plasmide*

Die in Klammern gesetzten Nummern beziehen sich auf die Numerierung im Plasmid-Buch der Abteilung Zellbiologie, Universität Kassel.

pDEX-RH (#1)	Expressionsvector (Aktin-15 Promotor)
pDNEOII	Expressionsvector (Aktin-6 Promotor)
pGEM [®] -T Easy	Promega Corporation, USA
pT7Blue	Novagen

A15gfp w/o ATG (#48)	Plasmid für die C-terminale Fusion von GFP
pdNEO-gfp (#68)	Plasmid für die N-terminale Fusion von GFP
Bs ^R in piC 20R (#286)	Plasmid mit <i>EcoRV</i> flankierter Blasticidin Resistenz Kasette
457-FAL-19 (#287)	den Vollständigen ORF von LC-FACS enthalten der Vector
LC-FACS sense (#288)	500 bp langes ORF Fragment der LC-FACS enthaltener Vector (in „sense“ Orientierung)
LC-FACS antisense (#289)	500 bp langes ORF Fragment der LC-FACS enthaltener Vector (in „antisense“ Orientierung)
KO-457 (#290)	„Knock Out“ Vector
#48-L (#291)	Expressionsplasmid LC-FACS -GFP
Tclon <i>HaeIII</i> (LC-FACS) (#292)	T-cloning Vector, enthält kompletten ORF der LC-FACS (PCR Prod. Ampl. mit <i>HaeIII</i> Primern)
Tclon <i>SalI</i> (LC-FACS) (#293)	T-cloning Vector, enthält kompletten ORF der LC-FACS (PCR Prod. ampl. mit <i>SalI</i> Primern)
ΔH 457 (#294)	Plasmid #287 ohne <i>HincII</i> site im Polylinker
#68-L (#302)	Expressionsplasmid GFP-LC-FACS
pDEX-LC-FACS (#306)	Expressionsvector LC-FACS
Neo-RNAi (#314)	Plasmid mit artifiziellem RNAi Konstrukt von LC-FACS

Oligonukleotide

Die in Klammern gesetzten Nummern beziehen sich auf die Numerierung im Plasmid-Buch (Oligos) der Abteilung Zellbiologie, Universität Kassel.

Das *SalI*-Primerpaar wurde für die Amplifizierung des LC-FACS ORFs aus dem Plasmid 457-FAL-19 (#287) verwendet. Zur späteren Klonierung in pdNEO-gfp (#68) wurde den komplementären Bereichen (unterstrichen) die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SalI* (kursiv, fett) angefügt.

5' *SalI* #68 (#43) TCG ***CGT CGA CAA A***ATGTC AAG

3' *SalI* #68 (#44) CCG ***AGT CGA CTT***ATA CGT CTG

Das *HaeIII*-Primerpaar wurde für die Amplifizierung des LC-FACS ORFs aus dem Plasmid 457-FAL-19 (#287) verwendet. Zur späteren Klonierung in A15gfp w/o ATG (#48) wurde den komplementären Bereichen (unterstrichen) die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *HaeIII* (kursiv, fett) angefügt; der 3' Primer enthält kein Stop-Codon.

5' *HaeIII* #48 (#46) CAG ***GCC ACA***TGT CAA GCC

3' *HaeIII* #48 (#47) CAG ***GCC ACT***ACG TCT GGA TG

LÄNGEN- UND GRÖßENSTANDARDS*Proteingrößenstandard*

Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Seeblue™ Pre Stained standarts	Novex, USA
Proteingrößenstandard	Serva

DNA-Längenstandard

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

6.4 COMPUTER PROGRAMME, INTERNETSEITEN, UND DATENBANKEN

http://www.csm.biol.tsukuba.ac.jp/cDNAproject.html :	cDNA-Datenbank, Japan
http://genome.imb-jena.de/dictyostelium/ :	gen. DNA-Datenbank, Jena
http://www.uni-koeln.de/dictyostelium/ :	gen. DNA-Datenbank, Köln
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ :	BLAST-Suche, Nukleotid- und Proteinsequenzen
http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta/lalign.htm :	LALIGN, Sequenzvergleich
http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html :	Multalign, Sequenzvergleich
http://www.expasy.ch :	Protein Domänen Berechnung
http://www.psорт.nibb.ac.jp/cgi-bin/runpsорт.pl :	Lokalisationsberech. für Proteine

Vector NTI: InforMax, Inc., North Bethesta, USA

6.5 PUFFER UND LÖSUNGEN

Alle hier genannten Puffer und Lösungen wurden mit sterilem bidest. H₂O angesetzt.

10 x TBE-Puffer	1 M	Tris-HCl, pH 8,3
	0,83 M	Borsäure
	10 mM	EDTA
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0) (Malchow <i>et al.</i> , 1972)	2 mM	Na ₂ HPO ₄
	15 mM	KH ₂ PO ₄
EP-Puffer	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	50 mM	Saccharose
	H ₂ O ad 1 l	
	mit konz. HCl auf pH 6,1 einstellen und sterilfiltrieren	
DNA-Auftragspuffer	5 x DNA BlueRun™ der Firma Hybaid	
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/10 ml	
Lösung I (für Plasmidpräparation)	25 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	10 mM	EDTA
	15 %	Saccharose
Lösung II (für Plasmidpräp.)	200 mM	NaOH
	1 mM	SDS
Lösung III pH 4,6 (für Plasmidpräp.)	3 M	NaAc
TES-Puffer	10 mM	Tris-Cl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
	0,1 % [w/v]	SDS
	30 µg/ml	RNase A
	H ₂ O ad 1 l	
10 x PBS-Puffer (pH 7,4)	160,1 g	NaCl
	15,3 g	Na ₂ HPO ₄ (2 H ₂ O)
	4,02 g	KCl
	3,82 g	KH ₂ PO ₄
	H ₂ O ad 1 l	

PBS/Glycin	100 mM	Glycin
	in 1 x PBS lösen	
PBG	0,5 % [w/v]	BSA
	0,045 % [w/v]	Fischgelatine
2 x HBS	4,0 g	NaCl
	0,18 g	KCl
	0,05 g	NaH ₂ PO ₄
	2.5 g	HEPES
	0,5 g	Glucose
	mit NaOH auf pH 7,05 einstellen,	
	H ₂ O ad 250 ml, sterilfiltrieren, auf -20 °C lagern	
TfB I-Puffer	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl ₂
	10 mM	CaCl ₂
	30 mM	Kaliumacetat
	15% [v/v]	Glycerin
	pH mit 0,2 M Essigsäure auf 5,8 einstellen, sterilfilt.	
TfB II-Puffer	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂
	15 % [v/v]	Glycerin
	pH mit NaOH auf 7,0 einstellen, sterilfilt.	
10 x SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	0.2 M	Tris-HCl
	6,7 %	SDS
	28,9 % [v/v]	Glycerin
	16,7 % [v/v]	β-Mercaptoethanol
	10 mg/100 ml Bromphenolblau	

10 x Protein-Laufpuffer	0,25 M	Tris
	1,9 M	Glycin
	1 % [w/v]	SDS
	H ₂ O ad 1 l	
SDS-Sammelgelpuffer (pH 6,8) (4 x Tris-HCl/SDS-Puffer)	0,5 M	Tris
	14 mM	SDS
SDS-Trenngel-Puffer (pH 8,8) (4xTris-HCl/SDS)	1,5 M	Tris
	14 mM	SDS
Semidry-Transferpuffer (pH 8,2 - 8,4)	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin
	0,04 % [w/v]	SDS
	20 % [v/v]	Methanol
	H ₂ O ad 1 l	
Blocking-Lösung	5 % [w/v]	Milchpulver
in 1 x PBS lösen, optional eine Spatelspitze NaN ₃ zugeben		
Carbonatpuffer (pH 10,5) (BCIP Substratpuffer)	100 mM	Na ₂ CO ₃
20 x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat
Coomassie-Färbelösung	45 % [v/v]	Ethanol
	10 % [w/v]	Essigsäure
	0,5 % [w/v]	Brillant Blau R-250
Coomassie-Entfärbelösung	10 % [v/v]	Methanol
	15 % [v/v]	Essigsäure

6.6 MEDIEN

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Medien mit deionisiertem H₂O angesetzt und bei 120°C autoklaviert; nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden gegebenenfalls Antibiotika hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte auf 4°C.

6.6.1 WACHSTUMSMEDIEN FÜR *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*

AX-Medium (pH 6,7)	2,5 g Bacto-Trypton
(Watts and Ashworth, 1970)	2,5 g Pepton aus Casein
	5,0 g Proteose-Pepton
	5,0 g Hefeextrakt
	10,0 g Glucose
	1,2 g KH ₂ PO ₄
	0,35 g Na ₂ HPO ₄ (x 2 H ₂ O)
	H ₂ O ad 1 l
G₀-Medium	wie AX-Medium
+ Penicillin/Streptomycin, auf eine Endkonzentration von [100 U/ml].	
G₁₀-Medium	wie G ₀ -Medium
	+ Geneticin (G418), auf eine Endkonzentration von [10 µg/ml].
G₂₀-Medium	wie G ₀ -Medium
	+ Geneticin (G418), auf eine Endkonzentration von [20 µg/ml].
B₁₀-Medium	wie G ₀ -Medium
	+ Blastidicin S, auf eine Endkonzentration von [10 µg/ml].
B₂₀-Medium	wie G ₀ -Medium
	+ Blastidicin S, auf eine Endkonzentration von [20 µg/ml].
KA-Platten	mit <i>Klebsiella aerogenes</i> bewachsene SM-Platte
	Die Platten werden nach Ausplattieren von KA-Suspension auf 30°C inkubiert.

SM-Agarplatten (pH 6,5)	15 g Bacto-Agar
(Sussman, 1951)	10 g Pepton
	10 g Glucose
	1 g Hefeextrakt
	1 g MgSO ₄ (x 7 H ₂ O)
	2,2 g KH ₂ PO ₄
	1 g K ₂ HPO ₄
	H ₂ O ad 1 l
	pro Platte werden 20 ml benötigt
Phosphat-Agarplatten (pH 6,0)	15 g Bacto-Agar
	mit Soerensen-Phosphatpuffer auf 1 l
	auffüllen.
MES-HI-5-Medium (pH 7,2)	5,0 g Hefeextrakt
	10,0 g Glucose
	10,0 g Proteose-Pepton
	1,32 g MOPS
	H ₂ O ad 1 l
6.6.2 WACHSTUMSMEDIEN FÜR BAKTERIEN	
LB-Medium (pH 7,0)	10 g Bacto-Trypton
	5 g Hefeextrakt
	5 g NaCl
	H ₂ O ad 1 l
LB_{Amp}-Medium	wie LB-Medium
	+ 50 µg/ml Ampicillin
LB-Agar	wie LB-Medium
	+13 g Agar-Agar
LB_{Amp}-Agar	wie LB-Agar
	+ 50 µg/ml Ampicillin

M9-Medium (Minimalmedium)	850 ml	H ₂ O
	100 ml	10 x M9-Salze (s. u.)
	2 ml	1 M MgSO ₄
	10 ml	20 % [w/v] Glucose
	0,1 ml	1 M CaCl ₂
	1 ml	1 % [w/v] Thiamin

H₂O ad 1 l. Alle Lösungen mit Ausnahmen von Glucose und Thiamin (stattdessen sterilfiltriert) werden zuvor autoklaviert.

10 x M9-Salze (pH 7,4)	60 g	Na ₂ HPO ₄
	30 g	KH ₂ PO ₄
	5 g	NaCl
	10 g	NH ₄ Cl
	H ₂ O ad 1 l, autoklavieren	

6.7 BIOLOGISCHES MATERIAL

6.7.1 BAKTERIENSTÄMME

Escherichia coli JM105

Escherichia coli DH5 α

Klebsiella aerogenes (Williams & Newell, 1976)

6.7.2 *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*

- Ax-214** Axenisch (Watts & Ashworth, 1970) und auf Bakterien wachsender Abkömmling des Freilandisolates NC4 (Raper, 1935).
- Cor⁻** Abkömmling von AX2, der kein Coronin exprimiert, Klon HG1569 (de Hostos *et al.*, 1993).
- VacB⁻** Abkömmling von AX2, der kein Vacuolin B exprimiert, Klon 9II12 (Jenne *et al.*, 1998).
- LimpA⁻** Abkömmling von AX2, der kein DdLIMP exprimiert, Klon T2.25 (Temesvari *et al.*, 2000).
- KO#8** Abkömmling von AX2, der kein LC-FACS exprimiert (diese Arbeit).
- 306-AX-#5** Abkömmling von Ax2, der nach Transformation mit dem Plasmid pDEX-LC-FACS (#306), LC-FACS unter der Kontrolle des vegetativen Actin-15-Promotors exprimiert. Die Klone 306-KO-#6 und #6 wurden nach Western-Blot-Analyse als Überexprimierer identifiziert (diese Arbeit).
- 306-KO-#11** Abkömmling von KO#8, der nach Transformation mit dem Plasmid pDEX-LC-FACS (#306), LC-FACS unter der Kontrolle des vegetativen Actin-15-Promotors exprimiert. Der Klon 306-KO-#11 wurde nach Western-Blot-Analyse als Überexprimierer identifiziert (diese Arbeit).
- 306-KO-#3** Abkömmling von KO#8, der nach Transformation mit dem Plasmid pDEX-LC-FACS (#306), LC-FACS unter der Kontrolle des vegetativen Actin-15-Promotors exprimiert. Der Klon 306-KO-#3 wurde nach Western-Blot-Analyse als LC-FACS Exprimierer („*rescue*“ Klon) identifiziert (diese Arbeit).
- Cor-GFP** Abkömmling von AX2, der zusätzlich das Fusionsprotein Coronin-GFP exprimiert (Maniak *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 1997).
- 13C13** Abkömmling von AX2, der zusätzlich das Fusionsprotein VacuolinB-GFP exprimiert (Rauchenberger *et al.*, 1997).
- Dyn-GFP** Abkömmling von AX2, der zusätzlich das Fusionsprotein Dynamin-GFP exprimiert (Wienke *et al.*, 1999).
- mito-gfp** Abkömmling von AX2, der zusätzlich ein Fusionsprotein aus der mitochondrialen Leadersequenz und GFP exprimiert, so daß die Mitochondrien GFP markiert sind (Maniak, unveröffentlicht).
- SKL-GFP** Abkömmling von AX2, der zusätzlich ein Fusionsprotein aus der Leadersequenz SKL und GFP exprimiert, so daß die Peroxisomen GFP markiert sind (Maniak, unveröffentlicht).
- HDEL-GFP** Abkömmling von AX2, der zusätzlich ein Fusionsprotein aus der Leadersequenz HDEL und GFP exprimiert, so daß das Endoplasmatische Retikulum GFP markiert ist (Maniak, unveröffentlicht).
- 291-AX-4** Abkömmling von AX2, der zusätzlich das Fusionsprotein LC-FACS-GFP exprimiert (diese Arbeit).

7 METHODEN

7.1 PRÄPARATION VON NUKLEINSÄUREN

7.1.1 PLASMIDPRÄPARATION AUS *ESCHERICHIA COLI*

PLASMIDMINIPRÄPARATION (BIRNBOIM & DOLY, 1979)

1,5 ml LB_{amp}-Medium wurden mit entsprechenden Bakterien beimpft, ÜN inkubiert und daraufhin bei 5.000 Upm geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II und vorsichtigem Mischen wurde für fünf Minuten bei RT inkubiert, um die Zellen möglichst vollständig zu lysieren. Eine weitere fünf minütige Inkubation erfolgte nach Vermischung mit 150 µl Lösung III auf Eis, wodurch sowohl Proteine, als auch genomische DNA ausgefällt wurden. Nun wurde bei ca. 12.500 g 20 min (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für eine weitere Extraktion von Proteinen mit 300 µl Phenol/Chloroform versetzt. Nach kräftigem Schütteln wurde 10 min. bei 14.000 Upm (RT) zentrifugiert und der wässrige Überstand in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,8 Vol. eiskaltem Ethanol gefällt. Wiederum wurde bei 12.500 g 20 min. (4°C) zentrifugiert, anschließend das Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen und in der Speed-Vac getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl bidest gelöst.

PLASMIDMAXIPRÄPARATION

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA in reiner Form wurde das QIAGEN Plasmid-Midi-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Präparation erfolgte dabei nach Herstellervorschriften unter Verwendung der mitgelieferten Lösungen.

Bei dieser Art der Präparation wurde die DNA zusätzlich über eine Anionenaustauscher-Säule gereinigt. Aus einer 30 ml Bakterienkultur konnten so ca. 100 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Die Ausbeute der Präparation wurde entweder mittels Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt oder aber photometrisch bestimmt.

7.1.2 PRÄPARATION GENOMISCHER DNA AUS *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*

MINI-PRÄPARATION (BARTH ET AL., 1998)

Die zu untersuchenden *Dictyostelium* Zellen wurden in Mikrotiterplatten (z.B. Costar 24-well) oder 5 ml Petrischalen kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (5 min 4.000 Upm) und einmal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Dann wurden sie in 300 µl TES-Puffer resuspendiert (ausreichend für ca. 5×10^6 Zellen) und für 10 min bei -80°C eingefroren. Nachdem die Zellen auf Eis langsam aufgetaut waren, wurden 30 µg Proteinase K (gelöst in TE) hinzu gegeben. Nach 30-40 min Inkubation bei 37°C wurde dann einmal mit PCIA extrahiert und der wäßrige Überstand mit Ethanol gefällt. Die Ausbeute betrug etwa bei ca. 0.3 µg und war damit für einen Restriktionsverdau ausreichend.

TES-PUFFER:	10 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	1 mM	EDTA
	0.1%	SDS
	30 µg/ml	RNaseA

MAXI- PRÄPARATION

Die axenisch gewachsenen *D. discoideum* Zellen wurden bei 1.700 Upm für 10 min zentrifugiert und einmal mit eiskaltem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in Lysepuffer resuspendiert, wobei für 1×10^8 Zellen ca. 10-15 ml Puffer benötigt wurden. Der Zellsuspension wurde danach tropfenweise eine 10%ige NP40-Lösung zugegeben (bis max. 1% v/v) und anschließend vorsichtig geschüttelt. Dadurch wurden die Zellen zum Platzen gebracht, ohne daß die Zellkerne zerstört wurden. Das Lysat wurde für 15-20 min bei 4.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde anschließend abgossen und das weißliche Zellkernpellet vorsichtig in SDS-Lysepuffer aufgenommen (ca. 1 ml pro 1×10^8 Zellen). Es folgte eine Inkubation im Wasserbad für 2-4 h bei 60°C. Nach einer zweimaligen Extraktion mit 1 Vol. PCIA wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Vol. 8M LiCl und 2.5 Vol. eiskaltem Ethanol gefällt. Nachdem die DNA für 15-30 min bei 10.000 Upm zentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen worden war, wurde das leicht luftgetrocknete Pellet in 200-500 µl TE pH 8.0 + 0.1µg/µl RNaseA aufgenommen.

Die Qualität der präparierten DNA wurde durch Restriktionsverdau mit den *HindIII* und *EcoRI* überprüft. Die geschnittene DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Restriktionsfragmente mit Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht. Waren die Banden scharf und stimmten in ihrer Größe mit den in der Literatur beschriebenen (Frankel *et al.*, 1977) überein, wurde sie mit einem Tropfen Phenol versetzt und für weitere Experimente aufbewahrt. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte immer bei 4°C.

7.1.3 AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN

Hohe Salzkonzentrationen entfernen die Hydrathülle von Nukleinsäuren. Unter diesen Bedingungen binden diese an Glasoberflächen und können so von dem umgebenden Lösungsmittel getrennt werden. Auf diesem Prinzip beruht die Glasmilch-Aufreinigung.

Glasmilchaufreinigungen wurden mit dem QiaEX II-Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben und mit den mitgelieferten Lösungen. Die Methode kam bei der Aufreinigung von Restriktionsverdauen („Entsalzung“) und bei der Elution von DNA aus Agarose-Gelen zum Einsatz.

7.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

7.2.1 POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)

Die PCR (Saiki *et al.*, 1988) ermöglicht es DNA Fragmente, deren Sequenz zumindest teilweise bekannt ist, in großem Umfang zu amplifizieren. Hierzu werden je zwei kurze Oligonukleotide (Primer) benötigt, die - nach Aufschmelzen der Matrizen-DNA-gegenläufig an die äußeren Regionen der zu vermehrende Sequenz hybridisieren. Der dadurch entstehende kurze DNA-Doppelstrang dient der Taq-Polymerase als Startpunkt für die Neusynthese.

So ist es möglich zum einen, ausreichende Mengen einer bestimmten Sequenz zu synthetisieren, um sie zu klonieren oder zu sequenzieren, zum anderen dient die hohe Sensitivität und Spezifität auch zur Detektion geringer DNA Mengen.

Reaktionsansatz: x μ l Matrizen DNA (ca. 100 ng)

1 μ l 5'Primer (25 pM/ μ l)

1 μ l 3'Primer (25 pM/ μ l)

5 μ l 10x PCR-Puffer (+ x mM MgCl₂)

5 μ l dNTP Mix (jeweils 2 mM)

2 μ l Taq-Polymerase

ad 50 μ l H₂O

Das folgende PCR Programm wurde je nach Zusammenstellung der Primer entsprechend modifiziert und ist daher nur als Grundlage für die tatsächlich verwendeten Programme zu verstehen.

Da allen PCR-Primern für die Amplifikation LC-FACS jeweils eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease am 5'Ende angefügt wurde, können die Oligonukleotide zunächst nicht vollständig auf die Matrizen-DNA hybridisieren. Erst nachdem einige Zyklen der PCR gelaufen sind, befinden sich genügend auch von den Erkennungssequenzen flankierte Amplifikate im Reaktionsansatz, auf die die Primer vollständig hybridisieren können, und somit ermöglichen die Bindungstemperatur zu erhöhen.

PCR Programm „*touch down*“:

1 x Schritt 1: 3 min 95°C (Denaturierung der DNA)

5 x Schritt 2.1: 30 s 95°C (Denaturierung der DNA)

30 s 50°C (Bindung der Primer)

80 s 72°C (Elongation)

25 x Schritt 2.2: 30 s 95°C (Denaturierung der DNA)

30 s 55°C (Bindung der Primer)

80 s 72°C (Elongation)

Kühlen der Proben auf 8°C.

Die Taq-Polymerase wurde durch eine Extraktion mit 1 Vol. Phenol/Chloroform entfernt, die DNA mit Ethanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen; die Polymerase könnte sonst nach einer Restriktionsverdau die entstehenden „klebrigen“ Enden mit komplementären Nukleotiden auffüllen und somit eine Klonierung des PCR Produktes stark erschweren. Um das gefällte PCR Produkt von verbliebenen Primern, Nukleotiden und der Matrizen-DNA zu trennen, wurde stets eine Auftrennung in einem Agarosegel mit anschließender Gelelektion durchgeführt.

7.2.2 KLONIERUNG EINES PCR PRODUKTS

Wird eine DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten, so verbleibt eine Phosphatgruppe an den 3'-Enden der Restriktionsfragmente, dieser Phosphatrest wird von der alkalischen Phosphatase entfernt, da ohne ihn die Ligase nicht in der Lage ist die kovalente Bindung zu katalysieren. Die Religation eines geschnittenen Vektors wird so unterbunden.

Den Restriktionsverdauen der Vektoren wurde 1 µl SAP zugesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch eine anschließende Extraktion mit Phenol/Chloroform, Fällung und Waschen der DNA mit Ethanol wurden sowohl die Restriktionsendonukleasen, als auch die alkalische Phosphatase deaktiviert. Die so geschnittene und gereinigte Vektor-DNA konnte dann in einer Ligation eingesetzt werden.

„Proofreading“- Polymerasen erzeugten diese A-Überhänge nicht. Es war jedoch möglich, sie nachträglich durch 10 min Inkubation mit herkömmlicher Taq-Polymerase und dATP bei 72°C anzufügen. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe der im Kit enthaltenen Reagenzien.

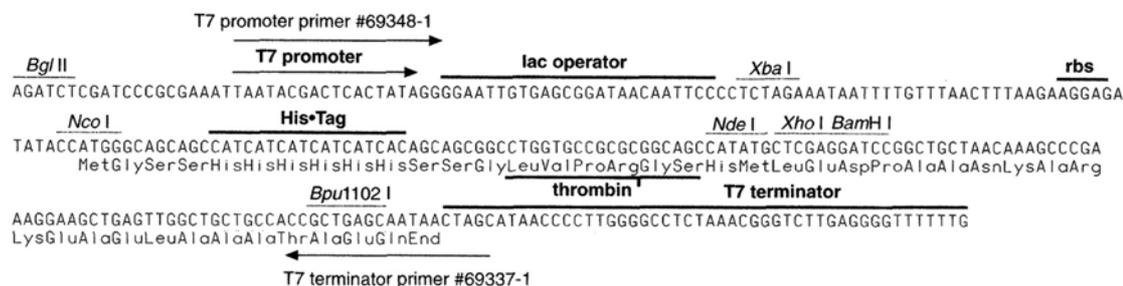


Abb. 50: Darstellung der Polylinkerregion von pGEM[®]-T Easy.

Das durch Gelelektion gereinigte PCR-Produkt sollte im dreifachen molaren Überschuss dem Ligationsansatz zugegeben werden:

Ligationsansatz: 1 µl T4 Ligase Puffer (10 x)
 1 µl pGEM[®]-T Easy Vektor (50 ng)
 x µl PCR-Produkt
 1 µl T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)
 ad 10µl H₂O bidest

bei 14,6°C ÜN inkubieren.

Rekombinante Klone können mit Hilfe des Blau-Weiss-Screens identifiziert werden.

7.2.4 DEPHOSPHORYLIERUNG

Wird eine DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten, so verbleibt eine Phosphatgruppe an den 3'-Enden der Restriktionsfragmente, dieser Phosphatrest wird von der alkalischen Phosphatase entfernt, da ohne ihn die Ligase nicht in der Lage ist die kovalente Bindung zu katalysieren. Die Religation eines geschnittenen Vektors wird so unterbunden.

Den Restriktionsverdauen der Vektoren wurde 1 µl SAP zugesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch eine anschließende Extraktion mit Phenol/Chloroform, Fällung und Waschen der DNA mit Ethanol wurden sowohl die Restriktionsendonukleasen, als auch die alkalische Phosphatase deaktiviert. Die so geschnittene und gereinigte Vektor-DNA konnte dann in einer Ligation eingesetzt werden.

7.2.5 ERZEUGUNG VON „BLUNT-ENDS“

S1-NUKLEASE

Mit der S1-Nuklease (MBI-Fermentas) wurde überhängende einzelsträngige DNA vollständig abgebaut. Dabei wurde das vom Hersteller gelieferte Puffersystem benutzt und die empfohlene Temperatur und Inkubationszeit eingehalten.

KLENOW-FRAGMENT

Mit Hilfe der 5'-3' Polymeraseaktivität des Klenow-Fragmentes der *E.coli* DNA-Polymerase konnten 5' überstehende Enden aufgefüllt werden. Dazu wurde die DNA zusammen mit Klenow-Puffer (MBI-Fermentas), je 20mM dNTPs und Klenow-Fragment (ca. 4 U/µg DNA) bei 37°C für 30-60 min inkubiert. Anschließend wurde eine Phenolextraktion durchgeführt.

7.2.6 LIGATION VON DNA

Wird eine DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten, so verbleibt eine Phosphatgruppe an den 3'-Enden der Restriktionsfragmente, dieser Phosphatrest wird von der alkalischen Phosphatase entfernt, da ohne ihn die Ligase nicht in der Lage ist die kovalente Bindung zu katalysieren. Die Religation eines geschnittenen Vektors wird so unterbunden.

Den Restriktionsverdauen der Vektoren wurde 1 µl SAP zugesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch eine anschließende Extraktion mit Phenol/Chloroform, Fällung und Waschen der DNA mit Ethanol wurden sowohl die Restriktionsendonukleasen, als auch die alkalische Phosphatase deaktiviert. Die so geschnittene und gereinigte Vector-DNA konnte dann in einer Ligation eingesetzt werden.

Der Ansatz wurde vier bis sechs Stunden bei 16°C, oder ÜN bei 14°C inkubiert.

7.2.7 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA

DNA Fragmente unterschiedlicher Größe wurden in 0,8%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarose (0,8 g/100 ml) wurde in 1 x TBE aufgekocht und mit 5 µl/100 ml EtBr-Lösung versetzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurde die flüssige Agarose in horizontale, zuvor abgedichtete, Gelkammer mit einem Probenkamm gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Kammer mit 1 x TBE-Puffer gefüllt.

Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/3 Vol. DNA-Auftragspuffer vermischt und in die Probenaschen pipettiert. Je nach Größe der Fragmente wurde 1-12 Stunden bei einer Spannung von 70- 85 Volt aufgetrennt. Die Banden können sichtbar gemacht werden, da das zwischen den Basen der DNA interkalierte EtBr unter UV- Licht (366 nm) orange fluoresziert. Die Dokumentation erfolgte gegebenenfalls mit GelDoc II.

7.2.8 GELELUTION

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde nach der „Riemann-Spezial“ Methode (Weichenban, 1991) durchgeführt.

Ein ca. 4 cm² großes Whatman 3MM Papier wurde mit einer umgedrehten 200 µl Pipettenspitze in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß befestigt, in dessen Boden zuvor ein kleines Loch gestochen wurde. Dieses wurde daraufhin in ein anderes 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt.

Das Gelstück, welches das gewünschte DNA Fragment enthält, wurde aus dem Gel herausgeschnitten und auf das festgesteckte Whatman 3MM Papier gelegt, das in der folgenden Zentrifugation als Filter dient. Während der 30 sekundigen Zentrifugation bei 14.000 Upm (RT) wird die Flüssigkeit in das untere 1,5 ml Reaktionsgefäß gedrückt, die Agarose hingegen bleibt am Filter hängen und verbleibt somit im oberen Gefäß.

Die aufgefangene Lösung wurde mit 1/10 3 M NaAc versetzt, auf Eis gekühlt und die DNA mit Ethanol gefällt. War trotz des Filters eine zu große Menge an Agarose in der DNA-Lösung verblieben, so wurde vor der Fällung eine Phenolextraktion durchgeführt.

Hohe Salzkonzentrationen entfernen die Hydrathülle von Nukleinsäuren. Unter diesen Bedingungen binden diese an Glasoberflächen und können so von dem umgebenden Lösungsmittel getrennt werden. Auf diesem Prinzip beruht die Glasmilch-Aufreinigung.

Glasmilchaufreinigungen wurden mit dem QiaEX II-Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben und mit den mitgelieferten Lösungen. Die Methode kam bei der Aufreinigung von Restriktionsverdauen („Entsalzung“) und bei der Elution von DNA aus Agarose-Gelen zum Einsatz.

7.2.9 KLONIERUNGEN

LC-FACS RNAi KONSTRUKT

Um die endogene Expression der LC-FACS zu unterdrücken, wurde ein Vector konstruiert, der ein artifizielles RNAi-Konstrukt nach Martens *et al.* (Martens *et al.*, 2002) unter Kontrolle des Aktin-6 Promotors enthält.

Zu diesem Zweck wurden zwei PCR-Produkte amplifiziert. Mit den Primern 5'RNAi *Bgl*III und 3'RNAi *Kpn*I wurde zunächst ein ca. 710 bp langes Fragment des LC-FACS ORFs amplifiziert (*template*: Plasmid 457-FAL-19, #287), mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl*III und *Kpn*I „klebrige“ Enden erzeugt und in pdNEOII kloniert, der zuvor mit *Bam*HI und *Kpn*I linearisiert worden war. Das so entstandene Zwischen-Plasmid NeoFrI wurde mit den *Eco*RI und *Bgl*III erneut linearisiert. Ein zweites PCR-Produkt wurde aus Plasmid 457-FAL-19 (#287) amplifiziert mit den Primern 5'RNAi *Bgl*III und 3'RNAi *Eco*RI. Dieses ca. 1150 bp große Fragment des LC-FACS ORFs wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Bgl*III inkubiert und in das linearisierte Plasmid NeoFrI einkloniert. Der so entstandene Vector Neo-RNAi (#314) enthält zwei unterschiedlich lange Fragmente, die in gegenläufiger Orientierung kloniert wurden. Die nach der Transformation in *D. discoideum* transkribierte RNA sollte sich in eine „stem-loop“ Konformation falten, wobei der Stil ca.710 bp lang und die darauf sitzende Schlaufe ca. 440 b lang wäre.

LC-FACS „KNOCK-OUT“-KONSTRUKT

Aus dem Plasmid 457-FAL-19 (#287) mußte zunächst die *Hinc*II Erkennungssequenz aus dem Poly-Linker entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde der Vektor mit *Sal*I geschnitten und der linearisierte Vektor anschließend über eine Gelelektion aufgereinigt. Nach der Entfernung der 5'-Überhänge wurde der Vektor religiert.

Das so konstruierte Plasmid ΔH-457 (#294) hat noch zwei *Hinc*II Schnittstellen, die mittig innerhalb der LC-FACS cDNA liegen. Nach einem präparativen Restriktionsverdau mit *Hinc*II wurde das noch ca. 5 kb große Fragment gereinigt.

Aus dem Plasmid #286 wurde die *Bs*^R-Kassette mit *Eco*RV ausgeschnitten und gereinigt. Diese 1,4 kb große Kassette wurde mit dem 5 kb Vektor Fragment zusammen legiert. Der so entstandene Vektor KO-457 (#290) konnte mit *Bst*EII und *Hin*6I (*Hha*I) geschnitten werden, und das 2,9 kb große KO-LC-FACS-Konstrukt gewonnen werden.

Dieses Konstrukt wurde verwendet, um durch homologe Rekombination den Leserahmen des endogenen LC-FACS Gens in AX2 zu unterbrechen, und so eine LC-FACS-Nullmutante zu schaffen.

LC-FACS GFP-KONSTRUKTE

Um die Lokalisation der LC-FACS und Kollokalisierungen mit anderen Proteinen feststellen zu können, wurden zwei GFP-LC-FACS Konstrukte konstruiert (jeweils hinter einen Actin 6 Promotors):

N-terminale GFP-LC-FACS Fusion

Unter Verwendung des *SalI*-Primerpaares wurde aus dem Plasmid 457-FAL-19 (#287) mit einer „*proof-reading*“ Taq-Polymerase die LC-FACS cDNA amplifiziert. Das resultierende 2 kb große PCR-Produkt wurde gereinigt und in pGEM[®]-T Easy kloniert; nach der Transformation in JM105 wurden die positiven Klone über den Blau-Weiss-Test identifiziert.

Die cDNA wurde mit einem präparativen Restriktionsverdau mit *SalI* aus dem *T cloning* Vektor geschnitten und nach einer Aufreinigung in das bereits mit *SalI* linearisierte Plasmid pdNEO-gfp (#68) einkloniert.

C-terminale GFP-LC-FACS Fusion

Analog zu der oben beschriebenen Klonierung wurde auch die C-terminale GFP-LC-FACS Fusion konstruiert. Hier wurde allerdings das *HaeIII*-Primerpaar zur Amplifikation der LC-FACS cDNA verwendet. Der 3' Primer enthielt kein STOP-Codon, da sonst kein Volllänge-Fusionsprotein hätte exprimiert werden können.

Da die cDNA „*in frame*“ mit der GFP kodierenden DNA eingefügt worden war, konnte dadurch gezeigt werden, daß nach einer Transformation in *Dictyostelium* Zellen, diese ein Volllänge-Fusionsprotein der entsprechenden Größe exprimierten, was durch einen Western-Blot nachgewiesen wurde.

LC-FACS EXPRESSIONSKONSTRUKT

Aus dem Plasmid 457-FAL-19 (#287) wurde in einem präparativen Restriktionsverdau mit *EcoRI* die komplette cDNA von LC-FACS ausgeschnitten, gereinigt und mit einem zuvor mit *EcoRI* linearisierten pDEX-RH (#1) hinter den vegetativen Actin15-Promotor ligiert.

7.2.10 SOUTHERNBLOTANALYSE

SOUTHERN-BLOT (SOUTHERN, 1975)

Beim Southern-Transfer wird eine in Agarosegel aufgetrennte DNA auf eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran übertragen. Mit komplementären DNA- oder RNA-Sonden können dann durch Hybridisierung spezifische DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Bevor die präparierte genomische DNA aus *D. discoideum* für die Southern-Blot Analyse verwendet wird, ist die Qualität der DNA zu überprüfen. Sie wird mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *EcoRI* inkubiert und die resultierenden Fragmente (Agarose-Gel) mit denen in der Literatur (Cockburn & Firtel, 1975) verglichen.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht dokumentiert, anschließend für 30 min in Denaturierungspuffer und danach für 30min in Neutralisierungspuffer inkubiert und zuletzt kurz in 20 x SSC geschwenkt. Der Kapillar-Transfer erfolgte über Nacht von unten (20 x SSC-Reservoir) durch das Gel hindurch nach oben in eine Nylon-Transfermembran. Auf dieser lag ein Stapel Papiertücher auf den ein max. 1 kg schweres Gewicht gelegt wurde.

Nach dem Abbau des Blots wurde die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt und getrocknet. Die irreversible Bindung der DNA an die Membran erfolgte mittels UV Licht (256 nm; 0,125 J/cm², *UV-Crosslinking*). Blots konnten trocken bei -20° gelagert werden.

RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA („OLIGO-LABELING“)

Zur radioaktiven Markierung wurde die sogenannte „*Oligo-Labeling*“-Methode benutzt, die auf der Polymeraseaktivität des Klenow-Fragmentes basiert. An denaturierte DNA wurden dabei vollständig randomisierte Hexamere hybridisiert, wodurch ein kurzer Doppelstrang entstand, der von der Klenow-Polymerase als Replikationsstartpunkt benutzt wurde. Bei der folgenden Polymerisation wurden radioaktive Nukleotide (hier α -³²P-ATP) eingebaut. 0,5-1 μ g DNA wurden für 5min bei 95°C denaturiert und zu folgendem Reaktionsgemisch gegeben:

10 μ l	OLB-MIX
2 μ l	BSA
5 μ l	α - ³² P-ATP
2 U	Klenow-Fragment (MBI-Fermentas)
ad 50 μ l H ₂ O	

Dieser Reaktionsmix wurde für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurden 50 μ l Phenol-gesättigtes TE zugegeben und die freien Nukleotide mit Hilfe einer Sephadex G25 Säule abgetrennt. Die aufgereinigte, markierte DNA wurde vor der Benutzung für 5-10 min bei 95°C denaturiert und anschließend zur Hybridisierung benutzt.

OLB-Mix:	200 mM	Tris/HCl, pH7.5
	25 mM	MgCl ₂
	10 mM	β -Mercaptoethanol
	1 M	HEPES, pH6.6
	13.5 U	Hexamere (MBI-Fermentas)
	je 0.25 mM	dCTP, dGTP, dTTP

HYBRIDISIERUNG (HOHE STRINGENZ)

Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre überführt. Es erfolgte eine Prähybridisierung in 10-15 ml Hybridisierungslösung bei 37-42°C für 30-60 min. Anschließend wurde die Lösung entfernt und 10-15 ml frischer Hybridisierungspuffer in die Röhre gegeben. Die ³²P-markierte Sonde wurde denaturiert (90-95°C; 5 min) und direkt in den Puffer gegeben. In dieser Lösung wurde der Blot über Nacht im Hybridisierungsofen bei 37-42°C (DNA Sonden 37°C, RNA Sonden 42°C) unter Drehen inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die radioaktive Sonde mit dem Puffer abgegossen und 2 x SSC 0.1%SDS Waschpuffer I zugegeben. Der Blot wurde mit diesem Puffer für 20 min bei 37-42°C gewaschen und anschließend mit 0.2 x SSC 0.1% SDS Waschpuffer II für 15 min bei 37-48°C inkubiert. Dann wurde der Blot in Frischhaltefolie gewickelt und auf einer Imager-Platte exponiert. Die Exponierung erfolgte je nach Strahlungsintensität für 5-48 Std..

Hybridisierungslösung:	50%	Formamid
	5 x	SSC
	1%	Sarcosyl
	4 mM	EDTA
	1%	SDS
	5 x	100 x Denhardt
		0.12 M Na-Phosphat-Puffer pH 6.8
100 x Denhardt	10 g	Ficoll 400
	10 g	Polyvinylpyrrolidon
	10 g	BSA
		ad 500 ml Aqua bidest, sterilfiltriert, -20°C
Waschpuffer I:	2 x	SSC
	0.1%	SDS
Waschpuffer II:	0.2 x	SSC
	0.1%	SDS
Andere verwendete Hybridisierungsbedingungen:		
„High-SDS“ Hybridisierungspuffer	7%	SDS
	50%	Formamid, deionisiert
	5 x	SSC
		50 mM Na ₃ PO ₄ pH 7.0
	0.1%	N-Lauroylsarcosin
	2%	Boehringer Blocking Reagent
Hybridisierung bei 30-40°C		
Puffer für „low-abundance“ Sequenzen:	6 x	SSC
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	5 x	Denhardt
	0.5%	SDS
		Hybridisierung bei 30-40°C

7.2.11 TRANSFORMATIONSTECHNIKEN

TRANSFORMATION VON E. COLI (DH5 α UND JM 105)

Herstellung kompetenter Zellen mit CaCl₂-Methode (Dagert & Ehrlich, 1979)

Mit einer Übernachtskultur (1 ml) des betreffenden *E. coli* Stammes wurde eine 50 ml Hauptkultur in LB angeimpft und bis zu einer OD₆₅₀ von 0.3 bis 0.5 bei 37°C unter Schütteln wachsen gelassen. Die Bakteriensuspension wurde für 10 min bei 4.000 Upm bei 4°C zentrifugiert und das Pellet anschließend in 50 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach 15-30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert und in 5 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ aufgenommen, Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15% hinzugefügt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 100-200 μ l der auf Eis vorsichtig aufgetauten Bakteriensuspension mit der gewünschten Plasmidmenge/Ligation vermischt und auf Eis für 40 min inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 90 s, die Zellen wurden kurz auf Eis gestellt und zur Resistenzausbildung mit 1 ml LB-Medium für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (4 min 4.000 Upm), die Zellen in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

Herstellung kompetenter Zellen mit Mehr-Ionen-Technik (Hanahan, 1983)

5 ml M9-Medium wurden mit einem entsprechenden *E. coli* Stamm angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (280 Upm) inkubiert. Ausgehend von dieser Kultur wurden 100 ml LB-Medium beimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₅₅₀ von 0,3 bis 0,4 erreicht war. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt, geerntet (5.100 g, 5 min, 4°C, Hettich Rotina/R) und in 15 ml eiskaltem Tfb I-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 10-15 min auf Eis inkubiert und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml gekühltem Tfb II-Puffer aufgenommen und erneut 15 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend konnten die Zellen für die Transformation eingesetzt werden oder wurden bis zu ihrer Verwendung in Aliquots von 200 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

TRANSFORMATION KOMPETENTER ZELLEN

Je nach Qualität der kompetenten Zellen werden pro Transformation 100-200 μ l eingesetzt.

Eine adäquate Menge kompetenter Zellen wird langsam auf Eis aufgetaut und mit 10-100 ng des zu transferierenden Plasmids versetzt und vorsichtig gemischt. An einer 40 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 90 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und dann sofort wieder auf Eis gestellt. Die Suspension wurde in 1ml vorgewärmtes LB-Medium pipettiert und 30-60 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden vorsichtig 1 min bei 3.000 Upm abzentrifugiert und das Medium bis auf ca. 200 μ l abgenommen. Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgespatelt und ÜN bei 37°C bebrütet.

BLAU-WEIß SCREEN

Der Blau-Weiß Screen ist eine Methode, die es in der Regel vereinfacht, rekombinante Klone unter den Transformanten auffindig zu machen. Man benötigt zum Klonieren seines Inserts ein Plasmid, das einen Teil des β -Galaktosidasegens (*lacZ α*) trägt, in den der Poly-Linker integriert ist, und einen Bakterienstamm, der ebenfalls für diese Methode geeignet ist. Ein solcher Stamm muß entsprechend eine Teildeletion im β -Galaktosidasegen haben. Wird der Lactosepromotor durch Lactose oder ein Substratanalogon induziert, so wird auch *lacZ α* transkribiert. Zur Translation einer funktionsfähigen Enzymuntereinheit kommt es meist jedoch nur, wenn der Leserahmen nicht durch ein integriertes Insert unterbrochen wird.

Als Induktor diente IPTG, 50 μ l IPTG (20 mg/ml) wurden kurz vor dem Ausplattieren zu der Zellsuspension pipettiert und durch Schnippen gemischt. Auf der Agarplatte wurden außerdem zuvor 40 μ l X-Gal ausgespatelt. Es handelt sich dabei um ein weiteres farbloses Substratanalogon, das, wenn es von einer aktiven β -Galaktosidase gespalten wird, als blauer Farbstoff ausfällt. Rekombinante Klone sind als weiße Kolonien identifizierbar.

7.2.12 TRANSFORMATION VON *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*

ELEKTROPORATION

Die zu transformierenden Zellen wurden entweder in *KA*-Suspension bis zu einer Dichte von 5×10^6 /ml, oder in axenischen Medium bis $1-2 \times 10^6$ /ml wachsen gelassen. In Bakteriensuspension gewachsene Zellen müssen zunächst dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen werden. Das heißt, die Zellen werden geerntet, und das Zellpellet dann in Puffer aufgenommen und wieder zentrifugiert, alle Angaben in Upm beziehen sich auf die Rotina 48R Zentrifuge (Hettich): 1.500 Upm, 10 min, 4°C

1.200 Upm, 10 min, 4°C

900 Upm, 15 min, 4°C

Abgesehen von diesen Waschschritten, unterscheidet sich die Transformation nicht von der axenisch gewachsener Zellen.

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Dichte der Kulturen festgestellt, und pro Transformation 2×10^7 Zellen/ml mit Medium in ein Falconröhrchen gegeben und 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden daraufhin durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 1.500 Upm (4°C) geerntet. Die Zellen wurden erst in entsprechendem Volumen Phosphatpuffer, dann zweimal mit eiskaltem EP-Puffer gewaschen: 1.500 Upm, 10 min, 4°C.

Die Zellen wurden nun in je 600 μ l (pro 2×10^7 Zellen) aufgenommen, mit 15-20 μ g DNA versetzt, resuspendiert und in gut gekühlte Elektroporationsküvetten pipettiert. Diese wurden verschlossen und samt Inhalt zehn Minuten auf Eis gestellt.

Gene Pulser® Standardparameter:	time Konstante	ca. 1 ms
	μ F	10
	kV	1

Die Küvetten wurden nacheinander in den Gene Pulser® gestellt; mit jedem Transformationsansatz wurden drei Elektroporationen durchgeführt, wobei zwischen den Schüssen die Küvetten eine Minute auf Eis gestellt wurden.

In die vorbereiteten Petrischalen (\varnothing 10cm) wurden jeweils 8 μ l 100 mM CaCl₂ und 8 μ l 100 mM MgCl₂ (beide Lösungen sterilfiltriert) pipettiert und die Zellen nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis in diesen 16 μ l Tropfen hinein pipettiert. Die Zellen wurden zur Regeneration 15 min bei RT stengelassen. 10 ml G0-Medium wurden zugegeben und die Zellen durch Schwenken verteilt. Einen Tag später wurde dieses Medium abgenommen und die Zellen mit dem entsprechenden Medium unter Selektionsdruck gesetzt. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium mit den toten Zellen abgenommen und erneuert.

KLASSISCHE TRANSFORMATION

Bei der Calcium-Phosphat-Methode (Nellen *et al.*, 1984) wird durch Calcium präzipitierte DNA mit Hilfe eines Glycerinschocks in die Zellen eingebracht. Dazu wurden 10 ml einer axenischen *D. discoideum* Kultur bei einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml in Petrischalen überführt. Nachdem sich die Zellen 10-20 min bei Raumtemperatur abgesetzt hatten, wurde das Medium abgenommen und durch 10ml MOPS-Medium ersetzt. Nach 30 min Inkubation wurde das Medium wiederum abgenommen und das Ca-Phosphat-Präzipitat (s.u.) vorsichtig auf die Zellen aufgetropft. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei 22°C, bevor 10ml MOPS-Medium vorsichtig über die Zellen geschichtet wurden und die Platte für 3 Std. bei 22°C inkubiert wurde. Im Anschluß wurde das Medium abgenommen und der Glycerinschock durchgeführt. Dafür wurden 2 ml 18% Glycerinlösung in HBS-Puffer vorsichtig vom Rand der Platte bei leicht gekippter Petrischale auf die Zellen gegeben und für 5min dort belassen. Anschließend wurde die Glycerinlösung vollständig abgenommen und durch DD20-Medium ersetzt. Nach 24 Std. wurde das axenische Medium durch das betreffende Selektionsmedium ersetzt (FM, G418 10 μ g/ml oder Blasticidin S 10 μ g/ml). In der ersten Woche nach der Transformation erfolgte der Medienwechsel alle zwei Tage, nach Erscheinen der ersten Klone reichte ein Wechsel des axenischen Mediums im Abstand von vier Tagen aus.

HERSTELLUNG DES CA-PHOSPHAT-PRÄZIPITATES

10-20 μ g Plasmid-DNA wurden in einem sterilen Reagenzglas mit 600 μ l 1x HBS verdünnt. Anschließend wurden unter starkem Vortexen 38 μ l 2M CaCl₂ zugegeben und der Ansatz für 25 min bei Raumtemperatur belassen.

SUBKLONIERUNG VON TRANSFORMANDEN

Eine möglichst dichte KA-Suspension wurde derart mit Zellen der Transformationsplatte beimpft, daß die Konzentration bei ca. 100 Zellen /100 μ l Suspension betrug. Davon wurden 100 μ l auf einer SM-Platte ausplattiert und diese bei 22°C bebrütet. Da die *Klebsiellen* schneller wachsen als die *Dictyostelium* Zellen, war zuerst ein Bakterienrasen zu sehen. Es wurde solange inkubiert, bis *Dictyostelium* Kolonien auf diesem Rasen deutlich sichtbar wurden und einen Durchmesser von 1cm erreicht hatten. Vom Rand jener Kolonien wurden mit einem Zahnstocher vegetative Zellen entnommen und in eine Costar-Platte mit G0-Medium überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen ein Selektivmedium ausgetauscht. Deutlich abgegrenzte Einzelklone können mit einer sterilen Pasteurpipette auch direkt von der Transformationsplatte auf eine Costar-Platte überführt werden, allerdings ist dann nicht mehr garantiert, monoklonale Kolonien zu erhalten.

7.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

7.3.1 ZELLPFLEGE

ANZUCHT VON DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM IN AXENISCHEM MEDIUM

Dictyostelium Zellen wurden bei 22°C unter Dauerlicht in Petrischalen oder Kolben angezogen. Um für ausreichende Belüftung zu sorgen, wurden Kolben stets nur zu einem Drittel mit Medium gefüllt und auf einem Schüttler bei 150 Upm bebrütet. Die Verdoppelungszeit beträgt ca. 8 Std. Die Zellen wachsen exponentiell bis zu einer Dichte von $9 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ / Zellen pro ml und treten dann in die stationäre Phase ein. Nach einigen Tagen beginnen die Zellen sowohl aus Nährstoffmangel als auch durch die Akkumulation von Abbauprodukten abzusterben.

Dictyostelium discoideum Zellen, die ein GFP-Fusionprotein exprimieren wurden in axenischem Medium (Ashworth & Watts, 1970) und wie beschrieben (Brink *et al.*, 1990) kultiviert.

ANZUCHT VON DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM IN KA-SUSPENSION

Eine KA-Platte (Ø 10cm) wurde mit 20 ml Phosphatpuffer gründlich ab gespült und die Suspension in einen sterilen Kolben gegeben. Der einzige Unterschied zur Anzucht in axenischem Medium besteht darin, daß die Generationszeit bei ca. 4 Std. (Ax2) liegt und die Zellen erst ab einer Zelldichte von ca. 3×10^7 /ml in die stationäre Phase eintreten.

ENTWICKLUNG AUF FILTERN

D. discoideum Zellen wurden in Soerensen-Phosphatpuffer auf vorbereitete (5 min in Aqua bidest. gekochte) schwarze Nitrocellulosefiltern ausgebracht. Diese lagen in einer feuchten Kammer, die aus einer mit zwei Lagen Soerensen-Phosphatpuffer getränkten Whatman 3MM ausgelegten großen Petrischale (Sarstedt) bestand. Pro Filter (Durchmesser 5cm) wurden 5×10^7 *D. discoideum* Zellen ausgebracht. Die Entwicklung erfolgte bei 22°C. Nach 12-13 Std. wurde der Entwicklungszustand der aggregierten Zellen optisch überprüft und die Aggregate geerntet. Dazu wurden die Zellen mit einem Spatel vom Filter abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, gewaschen und mit Soerensen-Phosphatpuffer auf eine Dichte von 5×10^4 Zellen /µl eingestellt. Die so gewonnenen Proben können mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert werden.

SPORENGEWINNUNG UND KONSERVIERUNG

Axenisch gewachsene Zellen wurden zweimal mit einem 1/2- bis 1/3-Volumen kaltem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und auf eine Dichte von $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden pro Phosphat-Agarplatte je 500 µl ausplattiert und die Platten bei 22°C inkubiert. Innerhalb von zwei Tagen entwickelten sich die Zellen und bildeten Fruchtkörper. Die Sporen und Stiele wurden mit 3 ml Soerensen-Phosphatpuffer pro Platte ab gespült und die so erhaltene Suspension in 1 ml Aliquots in Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Zum Animpfen einer neuen Kultur wurde ein Aliquot bei Raumtemperatur ange-taut und 100-200 µl in eine Petrischale mit AX-Medium gegeben.

7.4 MIKROSKOPIE

7.4.1 FIXIERUNG UND PRÄPARATION VON ZELLEN (HUMBEL & BIEGELMANN, 1992)

300 µl einer Suspension von 1×10^6 Zellen/ml in AX-Medium wurden auf ein HCl-gereinigtes Deckglas (Ø 18 mm) gebracht. Nach Absitzen der Zellen für 45 min wurde das Medium abgesaugt, sofort 300 µl Pikrinsäure/Paraformaldehyd-Fixativ zugegeben und für 30 min abgedeckt in einer feuchten Kammer fixiert. Das Deckglas wurde durch Eintauchen in 10 mM PIPES, pH-Wert 6,0 und PBS/Glycin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen nach erneutem Waschen mit 300 µl PBS/Glycin (5 min) 10 min mit 70% [v/v] Ethanol nachfixiert und daraufhin erneut gewaschen.

Pikrinsäure/Paraformaldehyd-Fixativ:

0,2 g Paraformaldehyd wurden in 3,5 ml Wasser nach Zugabe von vier Tropfen 2 M NaOH und Erwärmen auf 40°C gelöst. Anschließend wurden 5 ml 20 mM PIPES, pH 6,0 und 1,5 ml gesättigte Pikrinsäure-Lösung zugegeben. Der pH-Wert des Fixativs wurde auf 6,0 eingestellt.

7.4.2 IMMUNFLUORESZENZ

Es wurde daraufhin zweimal 5 min mit 300 µl PBS/Glycin, zweimal 15 min mit 300 µl PBG gewaschen und mit einem Antikörper enthaltenden Hybridoma-Kulturüberstand (Primärantikörper) über Nacht bei Raumtemperatur in der abgedeckten feuchten Kammer inkubiert.

Nach Entfernen des Primärantikörpers wurde 6 x 5 min mit 300 µl PBG gewaschen und daraufhin 2 Std. bei Raumtemperatur mit einem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Maus IgG konjugiert mit CY3) in einer 1:1.000 Verdünnung in PBG inkubiert. Nach Entfernung des Sekundärantikörpers wurde 2 x 5min mit PBG und 2 x 5min mit PBS gewaschen

Alle Antikörperlösungen wurden vor Gebrauch 5 min bei 14.000 Upm in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Die Puffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert.

Im CLSM wurde GFP über einen Argon-Laser (488 nm) und CY3 über einen Helium-Neon-Laser (543 nm) angeregt.

NUKLEINSÄUREFÄRBUNG MIT DAPI

Mit Pikrinsäure/Paraformaldehyd fixierte Zellen (s.o.) wurden zweimal 5 min mit 300 µl PBS/Glycin, zweimal 15 min mit 300 µl PBG gewaschen. Nach der Zugabe von 300 µl DAPI Lösung wurden die Zellen ÜN im Dunkeln inkubiert, nach gründlichem Waschen mit PBS wurden die Zellen eingebettet.

7.4.3 FLUORESZENZMIKROSKOPIE LEBENDER ZELLEN

Zur Beobachtung von lebenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde auf einem Deckglas (50 mm x 50 mm) ein Plastikring, mit einem Innendurchmesser von 40 mm mit Paraffin dicht befestigt und 1 ml Zellen (5×10^5 bis 1×10^6 Zellen / ml) in AX-Medium auf das Deckglas pipettiert. Nach Absitzen der Zellen für 30 min wurde das Deckglas auf dem Tisch des inversen Fluoreszenzmikroskops befestigt und mikroskopiert.

7.5 ENDOCYTOSE ASSAYS

Alle hier beschriebenen Assays wurden im Fluorimeter vermessen. Dieses war 30 min vor Beginn des Assays einzuschalten, die verwendete Küvette wurde ebenfalls 30 min mit Soerensen-Phosphatpuffer gefüllt („vorquellen“).

Die zu testenden Zellen sollten mindestens fünf Generationszeiten in Schüttelkultur gehalten werden und mindestens 24 Std. vor Beginn der Messungen in GO-Medium überführt worden sein.

PRÄPARATION VON TRYPANBLAU

Trypanblau wurde in 20 mM Citratpuffer, 150 mM NaCl enthaltend, bis zu einer Endkonzentration von 2 mg/ml gelöst. Der pH wurde mit HCl auf 4,5 eingestellt. Nach ca. 30 min Rühren wurde die resultierende dunkel blaue Lösung zunächst durch einen Faltenfilter und dann durch 0,45 µm Filter filtriert.

7.5.1 PHAGOCYTOSE

Die zu testenden Zellen werden auf eine Dichte von 2×10^6 /ml in 10 ml Gesamtvolumen eingestellt und in einen zuvor silanisierten 25 ml Kolben überführt. Das Assay beginnt mit der Zugabe von TRITC markierten Hefen (s.u.), die in der Zellsuspension im Verhältnis zu den *Dictyostelium* Zellen in sechsfachen Überschuß vorliegen sollen.

Sofort nach Zugabe der Hefen wurde je 1ml der Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl Trypanblau gegeben. Diese Mischung dann 3 min auf einem Rüttler gemischt, und dann bei 2.500 Upm geerntet. Der Überstand abgenommen und das resultierende Zellpellet in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert und sofort im Fluorimeter vermessen.

Alle 15 min wurde eine Probe genommen und vermessen.

Fluorimetereinstellungen: excitation 544 nm
 emission 574 nm
 Voltage 500-700 V
 response 4 s

PRÄPARATION TRITC - MARKIERTEN HEFEZELLEN

Fünf Gramm Hefen wurden in 50 ml PBS resuspendiert und 30 min unter Rühren gekocht. Nach fünfmaligen Waschen in PBS und zweimaligen Waschen in Soerensen-Phosphatpuffer wurde die Zelldichte auf 10^9 /ml eingestellt; diese Zellen können bei -20°C gelagert werden.

Das Pellet von 2×10^{10} wurde in 20 ml 50 mM Na_2HPO_4 (pH 9,2) resuspendiert, 2mg TRITC (in DMSO gelöst) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden solange in Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen, bis die Lösung nach der Zentrifugation nahezu klar war. Die Zellsuspension wurde auf 10^9 Zellen/ml eingestellt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

7.5.2 PINOCYTOSE

Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von 5×10^6 /ml wachsen gelassen. 10 ml davon wurden in einen zuvor silanisierten 25 ml Kolben überführt. Das Assay beginnt mit der Zugabe von TRITC-Dextran (60-70 kDa, Endkonzentration 2 mg/ml), sofort im Anschluß wurde je 1 ml der Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 μl Trypanblau gegeben. Diese Mischung durch Schwenken gemischt, dann bei 2.500 Upm abzentrifugiert und einmal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und das resultierende Zellpellet in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert und sofort im Fluorimeter vermessen.

Alle 15 min wurde eine Probe genommen und vermessen.

Fluorimetereinstellungen: excitation 544 nm
 emission 574 nm
 Voltage 700 V
 response 4 s

7.5.3 TRANSIT

Von der zu testenden Zellkultur wurden 10^8 Zellen durch Zentrifugation (600 g, 3 min) geerntet. Das resultierende Zellpellet wird schnell aber vorsichtig in 10 ml AX Medium (4 mg/ml TRITC-Dextran, 0,4 mg/ml FITC-Dextran) resuspendiert und in einen zuvor silanisierten 25ml Kolben überführt. 15 min nach Zugabe der Flüssigphasenmarker wurden die Zellen bei 500 g per Zentrifugation geerntet und in axenisches Medium überführt. Sofort wurde je 1 ml der Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 μl Trypanblau gegeben, um die extrazelluläre Fluoreszenz zu überdecken. Diese Mischung durch Schwenken gemischt, und dann bei 2.500 Upm abzentrifugiert. Der Überstand abgenommen und das resultierende Zellpellet in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer vorsichtig mit der Pipette resuspendiert und sofort im Fluorimeter vermessen.

Bei diesem Assay werden sowohl TRITC- als auch FITC- Fluoreszenz jeder Probe nacheinander vermessen. Der Quotient aus den Meßwerten der FITC- und TRITC-Fluoreszenz zu einem bestimmten Zeitpunkt ergibt ein pH Wert Äquivalent und macht es so möglich Aussagen über den pH-Wert der Flüssigphasenmarker enthaltenden Endosomen, gemittelt über alle Zellen der Probe.

TRITC-Fluorimetereinstellungen: excitation 544 nm
 emission 574 nm
 Voltage 700 V
 response 4 s

FITC-Fluorimetereinstellungen: excitation 480 nm
 emission 520 nm
 Voltage 700 V
 response 4 s

7.5.4 FETTSÄUREAUFNAHME

Die Vermessung der Aufnahme von Langkettigen Fettsäuren erfolgte analog zum Pinocytose Assay (s.o.) mit Hilfe von C₁-BODIPY[®] 500/510 C₁₂.

Die Messung startete mit Zugabe von C₁-BODIPY[®] 500/510 C₁₂ (Endkonzentration 15 µM, BSA 15 µM).

Fluorimetereinstellungen: excitation 488 nm
 emission 510 nm
 Voltage 400 V
 response 4 s

7.5.5 TRITC / BODIPY- ASSAY

Entsprechend dem Pinocytose-Protokoll wurde auch dieses Assay durchgeführt. Zum TRITC-Medium wurde zusätzlich C₁-BODIPY[®] 500/510 C₁₂ (Endkonzentration 15 µM, 15 µM BSA) zugegeben. Um bei jeder entnommenen Probe sowohl die Aufnahme von Fettsäuren als auch die Pinocytoserate messen zu können, wurde das Fluorimeter wie im FITC / TRITC Transit Assay umgestellt. Die Fluoreszenz von C₁-BODIPY[®] 500/510 C₁₂ (Anregung 488 nm, Emission 510 nm) streut nicht in das Emissionsspektrum von TRITC-Dextran, daher konnten beide Fluoreszenzmarker im selben Assay vermessen werden.

Zweck der zeitgleichen Messung war es festzustellen, ob die Aufnahme des Fettsäureäquivalentes C₁-BODIPY[®] 500/510 C₁₂ über die Endosomen- und nicht über die Plasmamembran erfolgt. Wie bereits beschrieben (Hacker *et al.*, 1997) hemmt Cytochalasin A die Pinocytose durch Depolymerisierung von Aktinfilamenten (Jay & Elson, 1992), während das Lösungsmittel (DMSO) allein keine Auswirkungen zeigt.

7.6 PH-WERT -MESSUNG

7.6.1 FITC / TRITC TRANSIT ASSAY

Dividiert man die zusammen gehörenden Meßwerte der Fluoreszenz von FITC- und TRITC-Dextran eines Transit Assays ergibt sich ein pH-Äquivalent. Über die Zeit des Assays (120 min) kann so der pH Anstieg in Endosomen von der Endocytose bis zur Exocytose dokumentiert werden.

7.6.2 NEUTRALROT

Eine weitere Methode zur Methode zur Ermittlung des pH-Werts in Endosomen ist die Messung der Fluoreszenz von Neutralrot. Neutralrot fluoresziert wenn es protoniert wird; je höher der pH-Wert, desto niedriger also die Fluoreszenz.

Anders als im Transit-Assay wird hier allerdings der pH-Wert der gesamten Zellen in der Probe gemessen, da Neutralrot im nicht-protonierten Zustand durch alle Membranen diffundieren kann. Nach der Protonierung kann das Molekül keine Membran mehr passieren.

Die Fluoreszenz von Neutralrot steigt mit steigendem pH-Wert.

Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von 5×10^6 /ml wachsen gelassen. 10 ml davon wurden in einen zuvor silanisierten 25 ml Kolben überführt. 10 min nach der Zugabe von Neutralrot wurde analog zum Pinocytose-Assay (s.o.) gemessen.

Fluorimetereinstellungen:

- excitation 541 nm
- emission 600 nm
- Voltage 700 V
- response 8 s

Von jeder zu messenden Zellsuspension wurde eine Probe gezogen und der Proteingehalt quantifiziert; die Meßwerte entsprechend dem Proteingehalt normiert.

Die Meßwerte der Mutanten-Zelllinien wurden zu AX2 (=100%) ins Verhältnis gesetzt.

Als Kontrolle diente hier eine Suspension von AX2 Zellen der 20 min vor Zugabe von Neutralrot 50 mM NH_4Cl zugegeben wurde, das die frühe Ansäuerung der Endosomen nach der Aufnahme vermindert. Die Zugabe von Ammoniumchlorid erhöht also den pH-Wert von Endosomen / Lysosomen, abhängig von der verwendeten Endkonzentration und dem pH des Mediums, um bis zu 0,7 (Cardelli *et al.*, 1989)

7.7 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

7.7.1 PROTEINQUANTIFIZIERUNG MIT BCA (SMITH *ET AL.*, 1985)

Zur Proteinquantifizierung wurde das Reagenziensystem „*BCA Protein Assay Reagent Kit*“ der Firma PIERCE, USA verwendet.

Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde das „*Test Tube Procedure; Standard Protocol*“ durchgeführt, das bei einem Proteingehalt von 20-2.000 µg/ml ausreichend genaue Ergebnisse liefert.

7.7.2 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (LAEMMLI, 1970)

Zur Auftrennung von Proteinproben wurden immer 12%ige diskontinuierliche denaturierenden PAA-Gele verwendet. Es folgte entweder eine Coomassiefärbung, oder aber die Proteine wurden mit einem Blotting-Verfahren auf eine Membran überführt, um bestimmte Proteine immunologisch nachweisen zu können. Als Auftragspuffer wurde ein entsprechendes Volumen Laemmli-Puffer (6 x) verwendet.

HERSTELLUNG VON SDS-POLYACRYLAMIDGELEN

Zunächst wurden Glasplatten der benötigten Größe (20 cm x 20 cm; 18 cm x 14 cm) und die dazugehörigen Abstandhalter mit Ethanol gründlich gereinigt. Die Abstandhalter haben eine Dicke von 1,5 mm und wurden an den Seiten und am unteren Ende zwischen den Glasplatten durch Metallklammern befestigt. Außen wurde mit 1,5%iger Agarose abgedichtet. Da es sich um diskontinuierliche Gele handelte mußten die Gele in zwei Schritten gegossen werden, zunächst das untere Trenngel und nach dessen vollständiger Polymerisation das obere Sammelgel.

Folgende Reagenzien wurden in Becherglas pipettiert und durch Schwenken gründlich vermischt:

Trenngel:	17,6 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 30% / 0,8%
	10,7 ml	Tris/SDS 1,5 M, pH 8,8
	13,6 ml	H ₂ O
	216 µl	EDTA 200 mM
	10,7 µl	TEMED

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 480 µl APS (20%) gestartet und das noch flüssige Gel zwischen die Glasplatten gegossen bis ca. 5 cm unter den oberen Rand. Damit eine gerade, luftblasenfreie Grenzfläche entsteht, wurde mit Ethanol überschichtet. Wenn das Trenngel fest geworden war, wurde der Alkohol abgegossen und die Sammelgel-Lösung in einem frischen Becherglas angesetzt:

Sammelgel:	1,8 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 30% / 0,8%
	4 ml	Tris/SDS 0,5M, pH 6,8
	10,1 ml	H ₂ O
	80 µl	EDTA 200 mM
	8 µl	TEMED

Nach Zugabe von 240 µl APS (20%) wurde durch Schwenken erneut gemischt und die Lösung auf das bereits feste Trenngel gegossen. Möglichst ohne Luftblasen einzuschließen, wurde der Probenkamm zwischen die Glasplatten geschoben. Nach ca. ein bis zwei Stunden kann der Kamm und der untere Abstandhalter gezogen und das Gel verwendet werden.

Die Elektrophorese wurde nach Auftragen der Proben und des Längenstandards bei 30-60 V gestartet und solange laufen gelassen, bis die Proben sich an der Trennfläche ankonzentriert hatten, daraufhin wurde die Spannung auf bis zu 200 V erhöht. Je nach Größe der zu trennenden Proben war der Gellauf nach 90-120 min beendet.

GELFÄRBUNG MIT COOMASSIE-BLAU

Die Glasplatten wurden vorsichtig entfernt und das Gel in eine Plastikschaale mit Coomassie-Färbelösung gelegt und auf einem Schwenker mindestens eine Stunde stehengelassen, bis das Gel ein dunkles Blau angenommen hat. Dann wurde die Lösung durch Coomassie-Entfärbelösung ersetzt; zur schnelleren Entfärbung des Gels wurden Zellstofftücher mit in die Schale gegeben, die die sich aus dem Gel lösende Farbe aufsaugen. Das Gefäß wurde verschlossen und solange geschwenkt, bis das Gel wieder durchsichtig war. Die Proteinbanden verlieren hierbei nicht ihre blaue Farbe, so daß sie nun deutlich zu sehen sind. Das Gel wurde zweimal mit Wasser gewaschen, auf ein Whatman 3MM Papier gelegt und gegebenenfalls mit GelDoc II dokumentiert. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 1-2 µg Protein pro Bande.

Sowohl Coomassie-Färbelösung, als auch die Entfärbelösung können mehrmals verwendet werden.

7.7.3 WESTERN-TRANSFER ANALYSE

WESTERNBLOT

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran mittels Elektroblot stellt eine effiziente Methode dar. Die negativ geladenen Proteine werden dabei an einer Nitrocellulosemembran gebunden. Verwendet wurde eine „*Semidry*“-Blotapparatur (von Keutz, Reiskirchen).

Auf den unteren Teil der Blot-Kammer wurden drei etwa der Größe des Gels entsprechende Whatman 3MM Papiere gelegt und mit Transferpuffer getränkt. Auf diese Lage wurde blasenfrei das Gel und darauf zwei mit Transferpuffer getränkte Nitrocellulosemembranen gelegt. Den Abschluß bildeten wieder drei Lagen Whatman 3MM. Der Transfer wurde je nach Größe des Blots für 1-1.5 Std. bei 100-150 mA durchgeführt. Danach wurde die Nitrocellulosemembran kurz mit 1 x PBS gewaschen.

Transferpuffer:	25 mM	Tris/HCl pH 8.4
	190 mM	Glycin
	20%	Methanol
	0.002%	SDS

IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN

Ein Western-Blot wurde zunächst in Blockierungslösung für 30 min bei RT inkubiert. Diese Lösung wurde verworfen und frische Blockierungslösung mit dem primären Antiserum in entsprechender Verdünnung zugegeben und möglichst über Nacht bei 4°C oder für mindestens 4 Std. bei RT inkubiert. Danach wurde dreimal für je 10 min bei RT mit PBST₂ gewaschen und der Sekundärantikörper (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) in Blockierungslösung zugegeben. Nach mindestens 2 Std. Inkubation bei RT wurde wieder dreimal mit PBST₂ gewaschen. Für die Detektion mit alkalischer Phosphatase wurde in Substratpuffer für 10 min umgepuffert und der Blot mit frischem Substratpuffer+BCIP (Endkonzentration. 0.2mg/ml) entwickelt.

Blockierungslösung:	5%	Milchpulver
	0.2%	Tween-20
	ad 50 ml PBS +	
PBST ₂ :	1 x PBS + 0.2% Tween-20	
Substratpuffer:	100 mM	Na ₂ CO ₃
	0.2 g/l	BCIP

7.7.4 MEMBRANASSOZIATION VON PROTEINEN

PRÄPARATION VON ENDOSOMEN AUS DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM

Um die Endosomen aus *Dictyostelium discoideum* Zellen zu isolieren und möglichst sauber aufzureinigen, mußten die Zellen zunächst aufgeschlossen und der resultierende Rohextrakt fraktioniert werden.

3 x 10⁸ Zellen wurden geerntet (300 g, 5 min), einmal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und schließlich in 1ml Soerensen-Phosphatpuffer aufgenommen.

Nach Zugabe von 2 ml 1,5x Homogenisationspuffer (HP) wurde die Zellsuspension mit einer sterilen Spritze durch eine Nucleoporemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm gepreßt. Mit dem Phasenkontrastmikroskop wurde zwischendurch die Effektivität des Zellaufschlusses überprüft, waren keine intakten Zellen mehr zu sehen wurde der Rohextrakt 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert(20min, 1.000g, 4°C). Der Überstand bei 10.000 g 30 min (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl 1 x HP resuspendiert und stellt die Endosomenfraktion dar.

1,5 x HP-Puffer	30 mM Tris/Cl, pH 7,4
	2 mM DTT
	4 mM EGTA
	2 mM EDTA
	5 mM Benzamidin
	30% (w/v) Saccharose

MECHANISMUS DER MEMBRANBINDUNG VON PROTEINEN (SCHNEIDER ET AL., 2000)

Die Membranfraktion (hier: Endosomenfraktion, s.o.) wurde in fünf gleiche Teile geteilt und in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Vier dieser Aliquots werden mit je einem Volumenäquivalent 1 x HP (Kontrolle), 1 x HP (+2 mM NaCl), 1 x HP (+0,2 M Na₂CO₃, pH-Wert=11) oder 1 x HP (2% Triton X-100) versetzt und auf Eis 2 Std. inkubiert. Direkt daran anschließend wurden diese vier Proben bei 10.000 g oder 100.000 g 30 min zentrifugiert.

Die Überstände wurden vorsichtig und möglichst vollständig abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Sedimente in einem dem Überstand entsprechenden Volumen 1 x HP gelöst.

Mit Hilfe der Westernblotanalyse kann die Art der Membranbindung von Proteinen beurteilt werden, wenn man die Verteilung des jeweiligen Proteins in verschiedenen Fraktionen (Sediment / Überstand) betrachtet.

Proteine mit Transmembrandomänen sind so fest verankert, daß sie erst durch Zugabe von Triton in den Überstand übergehen, während peripher assoziierte sich Proteine schon durch erhöhte Salzkonzentration und / oder alkalischeren pH-Wert von der Membran lösen.

7.7.5 EXKRETION LYSOSOMALER PROTEINE

In *Dictyostelium discoideum* werden lysosomale Proteine nicht mit den Endosomen bei der Exocytose vollständig ausgeschieden, sondern zu gewissen Teilen recycelt. Während ca 80% der α -Mannosidase (Glycosylase) sezerniert werden, verbleiben an die 70% der sauren Phosphatase (Hydrolase) in der Zelle (Dimond *et al.*, 1981).

Durch den Vergleich der Enzymaktivitäten in Kulturüberstand und Zellpellet (gesamt = 100%) kann eine Aussage über die Sekretion gemacht werden

Saure Phosphatase (E.C. 3.1.3.2)

Dieses Enzym spaltet bei niedrigem pH das synthetische Substrat p-Nitrophenylphosphat in eine anorganisches Phosphat und p-Nitrophenol. Da p-Nitrophenol unter alkalischen Bedingungen als gelbes Nitrophenolatanion vorliegt, kann es durch photometrische Messungen quantifiziert werden.

Nach Dimond *et al.* (Dimond *et al.*, 1981) wurde das Experiment wie folgt durchgeführt:

KOMPONENTEN	STAMMLÖSUNG	μL IM TEST	ENDKONZ. IM TEST
Puffer pH 5.0 mit Na-Acetat und EDTA	37 mM 1 mM	500	36,30 mM 0,98 mM
PNPP	16,7 mM	in Puffer gelöst	16,40 mM
Probe		10	$2,5 \times 10^5$ Zelläquivalente

Tab. 4: Zusammensetzung der Reagenzien zur Bestimmung der Enzymaktivität der Sauren Phosphatase.

Die Zugabe der Probe startete die Reaktion, die für 30 min bei 35°C inkubiert wurde. Durch den Zusatz von 500 μl 1 M Na_2CO_3 wurde die Reaktion beendet und der pH-Wert der Lösung alkalisch, so daß die photometrische Messung von p-Nitrophenol $\lambda=420$ nm erfolgen konnte, gemessen wurde gegen Puffer.

α -Mannosidase (E.C. 3.2.1.24)

Ist die Phosphatgruppe der p-Nitrophenylphosphates durch ein Mannosid ersetzt, so kann dieses als Substrat für die α -Mannosidase verwendet werden, auch hier entsteht als Spaltprodukt p-Nitrophenol, das auf die selbe Weise wie im oben beschriebenen Assay für die Saure Phosphatase vermessen werden konnte.

KOMPONENTEN	STAMMLÖSUNG	μL IM TEST	ENDKONZ. IM TEST
Puffer pH 5.0 mit Na-Acetat und	5 mM	500	4,2 mM
PNP- α -Mannosid	5 mM	in Puffer gelöst	4,2 mM
Probe		100	$2,5 \times 10^5$ Zelläquivalente

Tab. 5: Zusammensetzung der Reagenzien zur Bestimmung der Enzymaktivität der α -Mannosidase.

Diese Enzymaktivitäts-Messung erfolgte analog zum oben beschriebenen Assay für Saure Phosphatase

8 BIBLIOGRAPHIE

- (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. The *C. elegans* Sequencing Consortium. *Science* 282, 2012-8.
- Abumrad, N. A., el-Maghrabi, M. R., Amri, E. Z., Lopez, E. und Grimaldi, P. A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 268, 17665-8.
- Aderem, A. und Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623.
- Aguado-Velasco, C. und Bretscher, M. S. (1999). Circulation of the plasma membrane in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell* 10, 4419-27.
- Aniento, F., Gu, F., Parton, R. G. und Gruenberg, J. (1996). An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J Cell Biol* 133, 29-41.
- Ashworth, J. M. und Quance, J. (1972). Enzyme synthesis in myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* during growth in axenic culture. *Biochem J* 126, 601-8.
- Ashworth, J. M. und Watts, D. J. (1970). Metabolism of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* grown in axenic culture. *Biochem. J.* 119, 175-182.
- Aubry, L., Klein, G., Martiel, J. L. und Satre, M. (1993). Kinetics of endosomal pH evolution in *Dictyostelium discoideum* amoebae - study by fluorescence spectroscopy. *J. Cell Sci.* 105, 861-866.
- Aubry, L., Klein, G. und Satre, M. (1993). Endo-lysosomal acidification in *Dictyostelium discoideum* amoebae - effects of two endocytosis inhibitors - caffeine and cycloheximide. *Eur. J. Cell Biol.* 61, 225-228.
- Aubry, L., Klien, G., Martiel, J. und Sartre, M. (1995). Modelling of fluid phase endocytosis kinetics in the amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. A multicompartemental approach. *Acta Biotheor* 43, 319-333.
- Baillie, A. G., Coburn, C. T. und Abumrad, N. A. (1996). Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol* 153, 75-81.
- Bajno, L., Peng, X. R., Schreiber, A. D., Moore, H. P., Trimble, W. S. und Grinstein, S. (2000). Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J Cell Biol* 149, 697-706.
- Baldauf, S. L. und Doolittle, W. F. (1997). Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12007-12.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M. und Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895-907.

- Barondes, S. H., Haywood-Reid, P. L. und Cooper, D. N. (1985). Discoidin I, an endogenous lectin, is externalized from *Dictyostelium discoideum* in multi-lamellar bodies. *J. Cell Biol.* *100*, 1825-1833.
- Barr, F. A. und Shorter, J. (2000). Membrane traffic: do cones mark sites of fission? *Curr Biol* *10*, R141-4.
- Bar-Tana, J., Rose, G., Brandes, R. und Shapiro, B. (1973). Palmitoyl-coenzyme A synthetase. Mechanism of reaction. *Biochem J* *131*, 199-209.
- Bar-Tana, J., Rose, G. und Shapiro, B. (1973). Palmitoyl-coenzyme A synthetase. Isolation of an enzyme-bound intermediate. *Biochem J* *135*, 411-6.
- Barth, C., Fraser, D. J. und Fisher, P. R. (1998). A rapid, small-scale method for characterization of plasmid insertions in the *dictyostelium* genome. *Nucleic Acids Research* *26*, 3317-3318.
- Berthiaume, L., Deichaite, I., Peseckis, S. und Resh, M. D. (1994). Regulation of enzymatic activity by active site fatty acylation. A new role for long chain fatty acid acylation of proteins. *J Biol Chem* *269*, 6498-505.
- Bhargavi, V., Chari, V. B. und Singh, S. S. (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase binds to profilin through the p85 alpha subunit and regulates cytoskeletal assembly. *Biochem Mol Biol Int* *46*, 241-8.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. A. (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* *7*, 1513-1523.
- Black, P. N., DiRusso, C. C., Sherin, D., MacColl, R., Knudsen, J. und Weimar, J. D. (2000). Affinity labeling fatty acyl-CoA synthetase with 9-p-azidophenoxy nonanoic acid and the identification of the fatty acid-binding site. *J Biol Chem* *275*, 38547-53.
- Black, P. N., Zhang, Q., Weimar, J. D. und DiRusso, C. C. (1997). Mutational analysis of a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *J Biol Chem* *272*, 4896-903.
- Booth, J. W., Trimble, W. S. und Grinstein, S. (2001). Membrane dynamics in phagocytosis. *Semin Immunol* *13*, 357-64.
- Bretscher, M. S. und Aguado-Velasco, C. (1998). EGF induces recycling membrane to form ruffles. *Curr Biol* *8*, 721-4.
- Brink, M., Gerisch, G., Isenberg, G., Noegel, A. A., Segall, J. E., Wallraff, E. und Schleicher, M. (1990). A *Dictyostelium* Mutant Lacking an F-Actin Cross-Linking Protein, the 120-Kd Gelation Factor. *J Cell Biol* *111*, 1477-1489.
- Brown, E. J. (1995). Phagocytosis. *Bioessays* *17*, 109-17.
- Buczynski, G., Bush, J., Zhang, L., Rodriguez-Paris, J. und Cardelli, J. (1997). Evidence for a recycling role for Rab7 in regulating a late step in endocytosis and in retention of lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* *8*, 1343-60.
- Bush, J., Temesvari, L., Rodriguez-Paris, J., Buczynski, G. und Cardelli, J. (1996). A role for a Rab4-like GTPase in endocytosis and in regulation of contractile vacuole structure and function in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* *7*, 1623-38.

- Cao, H., Garcia, F. und McNiven, M. A. (1998). Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 9, 2595-609.
- Cardelli, J. (2001). Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide- based processes, biochemically distinct. *Traffic* 2, 311-20.
- Cardelli, J. A., Richardson, J. und Miers, D. (1989). Role of acidic intracellular compartments in the biosynthesis of Dictyostelium lysosomal enzymes. The weak bases ammonium chloride and chloroquine differentially affect proteolytic processing and sorting. *J Biol Chem* 264, 3454-63.
- Caron, E. und Hall, A. (2001). Phagocytosis. In *Endocytosis*, M. Marsh, ed. (Oxford, New York, pp. 58-78.
- Chang, M. P., Mallet, W. G., Mostov, K. E. und Brodsky, F. M. (1993). Adaptor self-aggregation, adaptor-receptor recognition and binding of alpha-adaptin subunits to the plasma membrane contribute to recruitment of adaptor (AP2) components of clathrin-coated pits. *Embo J* 12, 2169-80.
- Chernomordik, L., Leikina, E., Cho, M. S. und Zimmerberg, J. (1995). Control of baculovirus gp64-induced syncytium formation by membrane lipid composition. *J Virol* 69, 3049-58.
- Chernomordik, L. V., Frolov, V. A., Leikina, E., Bronk, P. und Zimmerberg, J. (1998). The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. *J Cell Biol* 140, 1369-82.
- Clarke, M. und Kayman, S. C. (1987). The axenic mutations and endocytosis in Dictyostelium. *Methods Cell Biol* 28, 157-76.
- Clarke, M., Kohler, J., Arana, Q., Liu, T., Heuser, J. und Gerisch, G. (2002). Dynamics of the vacuolar H(+)-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of Dictyostelium cells. *J Cell Sci* 115, 2893-905.
- Clarke, M., Kohler, J., Heuser, J. und Gerisch, G. (2002). Endosome fusion and microtubule-based dynamics in the early endocytic pathway of dictyostelium. *Traffic* 3, 791-800.
- Cockburn, A. und Firtel, R. A. (1975). Mapping of the genome of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum with restriction endo nucleases. In *J. Cell Biol.*, pp. 74a.
- Coe, N. R., Smith, A. J., Frohnert, B. I., Watkins, P. A. und Bernlohr, D. A. (1999). The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 274, 36300-4.
- Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., Bruckert, F. und Cosson, P. (2000). Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* 275, 34287-92.
- Daeron, M. (1997). Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 15, 203-34.
- Dagert, M. und Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene* 6, 23-8.

- De Camilli, P. und Takei, K. (1996). Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Neuron* *16*, 481-6.
- de Chastellier, C. und Ryter, A. (1977). Changes of the cell surface and of the digestive apparatus of *Dictyostelium discoideum* during the starvation period triggering aggregation. *J Cell Biol* *75*, 218-36.
- de Chastellier, C., Ryter, A. und Thilo, L. (1983). Membrane shuttle between plasma membrane, phagosomes, and pinosomes in *Dictyostelium discoideum* amoeboid cells. *Eur J Cell Biol* *30*, 233-43.
- de Hostos, E. L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R. und Gerisch, G. (1991). Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *Embo J* *10*, 4097-104.
- de Hostos, E. L., Rehfuß, C., Bradtke, B., Waddell, D. R., Albrecht, R., Murphy, J. und Gerisch, G. (1993). *Dictyostelium* mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. *J. Cell Biol.* *120*, 163-173.
- Desjardins, M., Nzala, N. N., Corsini, R. und Rondeau, C. (1997). Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci* *110*, 2303-14.
- Didichenko, S. A., Segal, A. W. und Thelen, M. (2000). Evidence for a pool of coronin in mammalian cells that is sensitive to PI 3-kinase. *FEBS Lett* *485*, 147-52.
- Dimond, R. L., Burns, R. A. und Jordan, K. B. (1981). Secretion of lysosomal enzymes in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* *256*, 6565-6572.
- DiRusso, C. C., Black, P. N. und Weimar, J. D. (1999). Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Prog Lipid Res* *38*, 129-97.
- Dowrick, P., Kenworthy, P., McCann, B. und Warn, R. (1993). Circular ruffle formation and closure lead to macropinocytosis in hepatocyte growth factor/scatter factor-treated cells. *Eur J Cell Biol* *61*, 44-53.
- Every, D. und Ashworth, J. M. (1973). The purification and properties of extracellular glycosidases of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J* *133*, 37-47.
- Faergeman, N. J., Black, P. N., Zhao, X. D., Knudsen, J. und DiRusso, C. C. (2001). The Acyl-CoA synthetases encoded within FAA1 and FAA4 in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular Utilization. *J Biol Chem* *276*, 37051-9.
- Faergeman, N. J. und Knudsen, J. (1997). Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* *323*, 1-12.
- Fok, A. K., Clarke, M., Ma, L. und Allen, R. D. (1993). Vacuolar H(+)-ATPase of *Dictyostelium discoideum*. A monoclonal antibody study. *J Cell Sci* *106*, 1103-13.
- Frankel, G., Cockburn, A. F., Kindle, K. L. und Firtel, R. A. (1977). Organization of the ribosomal RNA genes of *Dictyostelium discoideum*. Mapping of the transcribed region. *J Mol Biol* *109*, 539-58.

- Fulceri, R., Gamberucci, A., Scott, H. M., Giunti, R., Burchell, A. und Benedetti, A. (1995). Fatty acyl-CoA esters inhibit glucose-6-phosphatase in rat liver microsomes. *Biochem J* 307, 391-7.
- Fulda, M., Heinz, E. und Wolter, F. P. (1997). Brassica napus cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase. *Plant Mol Biol* 33, 911-22.
- Gabriel, D., Hacker, U., Kohler, J., Muller-Taubenberger, A., Schwartz, J. M., Westphal, M. und Gerisch, G. (1999). The contractile vacuole network of Dictyostelium as a distinct organelle: its dynamics visualized by a GFP marker protein. *J Cell Sci* 112, 3995-4005.
- Gaidarov, I., Santini, F., Warren, R. A. und Keen, J. H. (1999). Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol* 1, 1-7.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M. und Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature* 419, 498-511.
- Garland, P. B., Yates, D. W. und Haddock, B. A. (1970). Spectrophotometric studies of acyl-coenzyme A synthetases of rat liver mitochondria. *Biochem J* 119, 553-64.
- Glick, B. S. und Rothman, J. E. (1987). Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature* 326, 309-12.
- Gold, E. S., Morrisette, N. S., Underhill, D. M., Guo, J., Bassetti, M. und Aderem, A. (2000). Amphiphysin II α , a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis. *Immunity* 12, 285-92.
- Gold, E. S., Underhill, D. M., Morrisette, N. S., Guo, J., McNiven, M. A. und Aderem, A. (1999). Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* 190, 1849-56.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., Machesky, L. M., Baldassare, J. J. und Pollard, T. D. (1990). The actin-binding protein profilin binds to PIP₂ and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science* 247, 1575-8.
- Goode, B. L., Wong, J. J., Butty, A. C., Peter, M., McCormack, A. L., Yates, J. R., Drubin, D. G. und Barnes, G. (1999). Coronin promotes the rapid assembly and cross-linking of actin filaments and may link the actin and microtubule cytoskeletons in yeast. *J Cell Biol* 144, 83-98.
- Gotthardt, D., Warnatz, H. J., Henschel, O., Bruckert, F., Schleicher, M. und Soldati, T. (2002). High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. *Mol Biol Cell* 13, 3508-20.
- Gregg, J. H. und Badman, W. S. (1970). Morphogenesis and ultrastructure in Dictyostelium. *Dev Biol* 22, 96-111.

- Griffin, F. M., Jr., Griffin, J. A., Leider, J. E. und Silverstein, S. C. (1975). Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med* *142*, 1263-82.
- Griffin, F. M., Jr. und Silverstein, S. C. (1974). Segmental response of the macrophage plasma membrane to a phagocytic stimulus. *J Exp Med* *139*, 323-36.
- Groot, P. H., Scholte, H. R. und Hulsmann, W. C. (1976). Fatty acid activation: specificity, localization, and function. *Adv Lipid Res* *14*, 75-126.
- Gu, F., Aniento, F., Parton, R. G. und Gruenberg, J. (1997). Functional dissection of COP-I subunits in the biogenesis of multivesicular endosomes. *J Cell Biol* *139*, 1183-95.
- Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Sjolín, C., Schreiber, A. D., Trimble, W. S. und Grinstein, S. (1998). v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 11691-6.
- Hacker, U., Albrecht, R. und Maniak, M. (1997). Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* *110*, 105-12.
- Hamilton, J. A. (1998). Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res* *39*, 467-81.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* *166*, 557-80.
- Harrington, A., Schwarz, E., Slonimski, P. P. und Herbert, C. J. (1994). Subcellular relocation of a long-chain fatty acid CoA ligase by a suppressor mutation alleviates a respiration deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* *13*, 5531-8.
- Harris, E., Wang, N., Wu Wl, W. L., Weatherford, A., De Lozanne, A. und Cardelli, J. (2002). *Dictyostelium* LvsB mutants model the lysosomal defects associated with Chediak-Higashi syndrome. *Mol Biol Cell* *13*, 656-69.
- Hartman, E. J., Omura, S. und Laposata, M. (1989). Triacsin C: a differential inhibitor of arachidonoyl-CoA synthetase and nonspecific long chain acyl-CoA synthetase. *Prostaglandins* *37*, 655-71.
- Haugwitz, M., Noegel, A. A., Rieger, D., Lottspeich, F. und Schleicher, M. (1991). *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J Cell Sci* *100*, 481-9.
- Hayashi, H., De Bellis, L., Hayashi, Y., Nito, K., Kato, A., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I. und Nishimura, M. (2002). Molecular Characterization of an Arabidopsis Acyl-Coenzyme A Synthetase Localized on Glyoxysomal Membranes. *Plant Physiol* *130*, 2019-2026.
- Hess, K. L., Tudor, K. S., Johnson, J. D., Osati-Ashtiani, F., Askew, D. S. und Cook-Mills, J. M. (1997). Human and murine high endothelial venule cells phagocytose apoptotic leukocytes. *Exp Cell Res* *236*, 404-11.
- Heuser, J., Zhu, Q. und Clarke, M. (1993). Proton pumps populate the contractile vacuoles of *Dictyostelium amoebae*. *J Cell Biol* *121*, 1311-27.
- Hohl, H. R. und Hamamoto, S. T. (1969). Ultrastructure of spore differentiation in *Dictyostelium*: the prespore vacuole. *J Ultrastruct Res* *26*, 442-53.

- Humbel, B. M. und Biegelmann, E. (1992). A preparation protocol for postembedding immunoelectron microscopy of Dictyostelium discoideum cells with monoclonal antibodies. *Scanning Microsc.* 6, 817-825.
- Huttner, W. B. und Schmidt, A. A. (2002). Membrane curvature: a case of endofeelin'. *Trends Cell Biol* 12, 155-8.
- Igal, R. A., Wang, P. und Coleman, R. A. (1997). Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA. *Biochem J* 324, 529-34.
- Insall, R., Muller-Taubenberger, A., Machesky, L., Kohler, J., Simmeth, E., Atkinson, S. J., Weber, I. und Gerisch, G. (2001). Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* 50, 115-28.
- Ivessa, A. S., Schneiter, R. und Kohlwein, S. D. (1997). Yeast acetyl-CoA carboxylase is associated with the cytoplasmic surface of the endoplasmic reticulum. *Eur J Cell Biol* 74, 399-406.
- Janssen, K. P., Rost, R., Eichinger, L. und Schleicher, M. (2001). Characterization of CD36/LIMPII homologues in Dictyostelium discoideum. *J. Biol. Chem.* 276, 38899-910.
- Janssen, K. P. und Schleicher, M. (2001). Dictyostelium discoideum: a genetic model system for the study of professional phagocytes. Profilin, phosphoinositides and the Imp gene family in Dictyostelium. *Biochim Biophys Acta* 1525, 228-33.
- Jay, P. Y. und Elson, E. L. (1992). Surface Particle Transport Mechanism Independent of Myosin- II in Dictyostelium. *Nature* 356, 438-440.
- Jenne, N., Rauchenberger, R., Hacker, U., Kast, T. und Maniak, M. (1998). Targeted gene disruption reveals a role for vacuolin B in the late endocytic pathway and exocytosis. *J Cell Sci* 111, 61-70.
- Jiang, D. W., Ingersoll, R., Myler, P. J. und Englund, P. T. (2000). Trypanosoma brucei: four tandemly linked genes for fatty acyl-CoA synthetases. *Exp Parasitol* 96, 16-22.
- Johnson, D. R., Knoll, L. J., Levin, D. E. und Gordon, J. I. (1994). Saccharomyces cerevisiae contains four fatty acid activation (FAA) genes: an assessment of their role in regulating protein N- myristoylation and cellular lipid metabolism. *J Cell Biol* 127, 751-62.
- Kameda, K. (1986). Partial purification and characterization of fatty acid binding protein(s) in Escherichia coli membranes and reconstitution of fatty acid transport system. *Biochem Int* 13, 343-50.
- Kameda, K., Suzuki, L. K. und Imai, Y. (1987). Transport of fatty acid is obligatory coupled with H⁺ entry in spheroplasts of Escherichia coli K12. *Biochem Int* 14, 227-34.
- Karakesisoglou, I., Janssen, K. P., Eichinger, L., Noegel, A. A. und Schleicher, M. (1999). Identification of a suppressor of the Dictyostelium profilin-minus phenotype as a CD36/LIMP-II homologue. *J Cell Biol* 145, 167-81.
- Kerner, J. und Hoppel, C. (2000). Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1486, 1-17.

- Klein, G. und Satre, M. (1986). Kinetics of fluid-phase pinocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. *Biochem Biophys Res Commun* 138, 1146-52.
- Klein, J. (1998). *Immunology* (Boston: Blackwell Scientific Publication).
- Knoll, L. J., Johnson, D. R. und Gordon, J. I. (1994). Biochemical studies of three *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA synthetases, Faa1p, Faa2p, and Faa3p. *J Biol Chem* 269, 16348-56.
- Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G. und Gruenberg, J. (1999). Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* 1, 113-8.
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G. und Gruenberg, J. (1998). A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392, 193-7.
- Konzok, A., Weber, I., Simmeth, E., Hacker, U., Maniak, M. und Muller-Taubenberger, A. (1999). DAip1, a *Dictyostelium* homologue of the yeast actin-interacting protein 1, is involved in endocytosis, cytokinesis, and motility. *J Cell Biol* 146, 453-64.
- Kozlov, M. M. (1999). Dynamin: possible mechanism of "Pinchase" action. *Biophys J* 77, 604-16.
- Kozlov, M. M. (2001). Fission of biological membranes: interplay between dynamin and lipids. *Traffic* 2, 51-65.
- Krisans, S. K., Mortensen, R. M. und Lazarow, P. B. (1980). Acyl-CoA synthetase in rat liver peroxisomes. Computer-assisted analysis of cell fractionation experiments. *J Biol Chem* 255, 9599-607.
- Kwiatkowska, K. und Sobota, A. (1999). Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays* 21, 422-31.
- Kyriazi, H. T. und Brown Jr, R. M. (1976). An ultrastructural study of differentiation in *D. d.* with special emphasis on cellulose stalk synthesis. *Plant Physiol* 57, 3.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lai, J. C., Liang, B. B., Jarvi, E. J., Cooper, A. J. und Lu, D. R. (1993). Differential effects of fatty acyl coenzyme A derivatives on citrate synthase and glutamate dehydrogenase. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 82, 331-8.
- Lambrechts, A., Verschelde, J. L., Jonckheere, V., Goethals, M., Vandekerckhove, J. und Ampe, C. (1997). The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences. *Embo J* 16, 484-94.
- Lazo, O., Contreras, M., Yoshida, Y., Singh, A. K., Stanley, W., Weise, M. und Singh, I. (1990). Cellular oxidation of lignoceric acid is regulated by the subcellular localization of lignoceroyl-CoA ligases. *J Lipid Res* 31, 583-95.
- Lee, A. G. (2000). Membrane lipids: it's only a phase. *Curr Biol* 10, R377-80.
- Leube, R. E., Leimer, U., Grund, C., Franke, W. W., Harth, N. und Wiedenmann, B. (1994). Sorting of synaptophysin into special vesicles in nonneuroendocrine epithelial cells. *J Cell Biol* 127, 1589-601.

- Liu, S.-H., Mallet, W. G. und Brotzky, F. M. (2001). Clathrin-mediated endocytosis. In *Endocytosis*, M. Marsh, ed. (Oxford, New York: Oxford University Press), pp. 1-25.
- Longo, I., Frints, S. G., Fryns, J. P., Meloni, I., Pescucci, C., Ariani, F., Borghgraef, M., Raynaud, M., Marynen, P., Schwartz, C., Renieri, A. und Froyen, G. (2003). A third MRX family (MRX68) is the result of mutation in the long chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4) gene: proposal of a rapid enzymatic assay for screening mentally retarded patients. *J Med Genet* *40*, 11-7.
- Loomis, W. F. (1982). *The development of Dictyostelium discoideum*. (New York: Ac. Press).
- Loomis, W. F. und Smith, D. W. (1990). Molecular phylogeny of *Dictyostelium discoideum* by protein sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 9093-7.
- Loomis, W. F. und Smith, D. W. (1995). Consensus phylogeny of *Dictyostelium*. *Experientia* *51*, 1110-5.
- Lutz, D. A., Chen, X. M. und McLaughlin, B. J. (1993). Isolation of the phagocytic compartment from macrophages using a paramagnetic, particulate ligand. *Anal Biochem* *214*, 205-11.
- Maeda, Y. und Takeuchi, I. (1969). Cell differentiation and fine structures in the development of the cellular slime molds. *Dev Growth Differ* *11*, 232-45.
- Malchow, D., Nagele, B., Schwartz, H. und Gerisch, G. (1972). Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* *28*, 136-142.
- Mallet, W. G. und Brodsky, F. M. (1996). A membrane-associated protein complex with selective binding to the clathrin coat adaptor AP1. *J Cell Sci* *109*, 3059-68.
- Mangroo, D. und Gerber, G. E. (1993). Fatty acid uptake in *Escherichia coli*: regulation by recruitment of fatty acyl-CoA synthetase to the plasma membrane. *Biochem Cell Biol* *71*, 51-6.
- Maniak, M. (1999). Endocytic transit in *Dictyostelium discoideum*. *Protoplasma* *210*, 25-30.
- Maniak, M. (2001). Fluid-phase uptake and transit in axenic *Dictyostelium* cells. *Biochim Biophys Acta* *1525*, 197-204.
- Maniak, M. (2001). Macropinocytosis. In *Endocytosis*, M. Marsh, ed. (Oxford, New York: Oxford University Press), pp. 78-93.
- Maniak, M. (2002). Conserved features of endocytosis in *Dictyostelium*. *Int Rev Cytol* *221*, 257-87.
- Maniak, M. (2003). Fusion and fission events in the endocytic pathway of *dictyostelium*. *Traffic* *4*, 1-5.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J. und Gerisch, G. (1995). Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* *83*, 915-24.
- Mannaerts, G. P. und van Veldhoven, P. P. (1996). Functions and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Ann N Y Acad Sci* *804*, 99-115.

- Marsh, M. e. a. (2001). Endocytosis, M. Marsh, ed. (New York: Oxford University Press Inc., New York).
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T. L., Postlethwait, P. und Nellen, W. (2002). RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol Biol Cell* 13, 445-53.
- May, R. C. und Machesky, L. M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114, 1061-77.
- McArthur, M. J., Atshaves, B. P., Frolov, A., Foxworth, W. D., Kier, A. B. und Schroeder, F. (1999). Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res* 40, 1371-83.
- McCabe, J. B. und Berthiaume, L. G. (1999). Functional roles for fatty acylated amino-terminal domains in subcellular localization. *Mol Biol Cell* 10, 3771-86.
- Meloni, I., Muscettola, M., Raynaud, M., Longo, I., Bruttini, M., Moizard, M. P., Gomot, M., Chelly, J., des Portes, V., Fryns, J. P., Ropers, H. H., Magi, B., Bellan, C., Volpi, N., Yntema, H. G., Lewis, S. E., Schaffer, J. E. und Renieri, A. (2002). FAACL4, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X- linked mental retardation. *Nat Genet* 30, 436-40.
- Mierendorf, R. C., Jr., Cardelli, J. A. und Dimond, R. L. (1985). Pathways involved in targeting and secretion of a lysosomal enzyme in Dictyostelium discoideum. *J Cell Biol* 100, 1777-87.
- Mills, I. G., Jones, A. T. und Clague, M. J. (1999). Regulation of endosome fusion. *Mol Membr Biol* 16, 73-9.
- Miyazawa, S., Hashimoto, T. und Yokota, S. (1985). Identity of long-chain acyl-coenzyme A synthetase of microsomes, mitochondria, and peroxisomes in rat liver. *J Biochem (Tokyo)* 98, 723-33.
- Mohrs, M. R., Janssen, K. P., Kreis, T., Noegel, A. A. und Schleicher, M. (2000). Cloning and characterization of beta-COP from Dictyostelium discoideum. *Eur J Cell Biol* 79, 350-7.
- Monnat, J., Hacker, U., Geissler, H., Rauchenberger, R., Neuhaus, E., Maniak, M. und Soldati, T. (1997). Dictyostelium discoideum protein disulfide isomerase, an endoplasmatic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal. *FEBS Lett.* 418, 357-362.
- Morrisette, N. S., Gold, E. S., Guo, J., Hamerman, J. A., Ozinsky, A., Bedian, V. und Aderem, A. A. (1999). Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against novel components of macrophage phagosomes. *J Cell Sci* 112, 4705-13.
- Mutzel, R. (1995). Molecular Biology, growth and development of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum (Basel: Birkhäuser Verlag), pp. 1103-1109.
- Nellen, W., Silan, C. und Firtel, R. A. (1984). DNA-mediated transformation in Dictyostelium. In *Molecular Biology of Development*, E. H. Davidson und R. A. Firtel, eds. (New York: A.R. Liss), pp. 633-645.
- Neuhaus, E. M., Almers, W. und Soldati, T. (2002). Morphology and Dynamics of the Endocytic Pathway in Dictyostelium discoideum. *Mol Biol Cell* 13, 1390-407.

- Neuhaus, E. M. und Soldati, T. (2000). A myosin I is involved in membrane recycling from early endosomes. *J Cell Biol* 150, 1013-26.
- Niewöhner, J., Weber, I., Maniak, M., Muller-Taubenberger, A. und Gerisch, G. (1997). Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J Cell Biol* 138, 349-61.
- Niswonger, M. L. und O'Halloran, T. J. (1997). Clathrin heavy chain is required for spore cell but not stalk cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Development* 124, 443-51.
- Nolta, K. V., Padh, H. und Steck, T. L. (1991). Acidosomes from *Dictyostelium*. Initial biochemical characterization. *J Biol Chem* 266, 18318-23.
- Nolta, K. V., Rodriguez-Paris, J. M. und Steck, T. L. (1994). Analysis of successive endocytic compartments isolated from *Dictyostelium discoideum* by magnetic fractionation. *Biochim Biophys Acta* 1224, 237-46.
- Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G. und Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 27, 280-8.
- Norum, K. R., Farstad, M. und Bremer, J. (1966). The submitochondrial distribution of acid:CoA ligase (AMP) and palmityl-CoA:carnitine palmityltransferase in rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 22, 797-804.
- Nossal, S. G. J. V. (1997). Das Immunsystem. *Spektrum der Wissenschaft SPEZIAL* 2, 6-15.
- Novak, K. D., Peterson, M. D., Reedy, M. C. und Titus, M. A. (1995). *Dictyostelium* myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. *J Cell Biol* 131, 1205-21.
- O'Halloran, T. J. und Anderson, R. G. (1992). Clathrin heavy chain is required for pinocytosis, the presence of large vacuoles, and development in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* 118, 1371-7.
- Oikawa, E., Iijima, H., Suzuki, T., Sasano, H., Sato, H., Kamataki, A., Nagura, H., Kang, M. J., Fujino, T., Suzuki, H. und Yamamoto, T. T. (1998). A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes. *J Biochem (Tokyo)* 124, 679-85.
- Ostermann, J., Orci, L., Tani, K., Amherdt, M., Ravazzola, M., Elazar, Z. und Rothman, J. E. (1993). Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell* 75, 1015-25.
- Ostrander, D. B., Gorman, J. A. und Carman, G. M. (1995). Regulation of profilin localisation in *Saccharomaces cerevisiae* by phosphoinositide metabolism. *J. Biol. Chem.* 270, 27045-27050.
- Paulsson, K. M., Kleijmeer, M. J., Griffith, J., Jevon, M., Chen, S., Anderson, P. O., Sjogren, H. O., Li, S. und Wang, P. (2002). Association of tapasin and COPI provides a mechanism for the retrograde transport of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 277, 18266-71.

- Peracino, B., Borleis, J., Jin, T., Westphal, M., Schwartz, J. M., Wu, L., Bracco, E., Gerisch, G., Devreotes, P. und Bozzaro, S. (1998). G protein beta subunit-null mutants are impaired in phagocytosis and chemotaxis due to inappropriate regulation of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 141, 1529-37.
- Pfanner, N., Orci, L., Glick, B. S., Amherdt, M., Arden, S. R., Malhotra, V. und Rothman, J. E. (1989). Fatty acyl-coenzyme A is required for budding of transport vesicles from Golgi cisternae. *Cell* 59, 95-102.
- Piccini, M., Vitelli, F., Bruttini, M., Pober, B. R., Jonsson, J. J., Villanova, M., Zollo, M., Borsani, G., Ballabio, A. und Renieri, A. (1998). *FACL4*, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. *Genomics* 47, 350-8.
- Piper, R. C. und Luzio, J. P. (2001). Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* 2, 612-21.
- Pishvaee, B. und Payne, G. S. (1998). Clathrin coats--threads laid bare. *Cell* 95, 443-6.
- Racoosin, E. L. und Swanson, J. A. (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J Cell Biol* 121, 1011-20.
- Raper, K. B. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agric. Res.* 50, 135-147.
- Rauchenberger, R., Hacker, U., Murphy, J., Niewöhner, J. und Maniak, M. (1997). Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Curr. Biol.* 7, 215-218.
- Ravel, K., de Chasse, B., Cornillon, S., Benghezal, M., Zulianello, L., Gebbie, L., Letourneur, F. und Cosson, P. (2001). Membrane sorting in the endocytic and phagocytic pathway of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Cell Biol* 80, 754-64.
- Reilly, B. A., Kraynack, B. A., VanRheenen, S. M. und Waters, M. G. (2001). Golgi-to-endoplasmic reticulum (ER) retrograde traffic in yeast requires Dsl1p, a component of the ER target site that interacts with a COPI coat subunit. *Mol Biol Cell* 12, 3783-96.
- Ringstad, N., Gad, H., Low, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O. und De Camilli, P. (1999). Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 24, 143-54.
- Ringstad, N., Nemoto, Y. und De Camilli, P. (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8569-74.
- Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B. und Sandvig, K. (1999). Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10, 961-74.
- Rodriguez-Paris, J. M., Nolte, K. V. und Steck, T. L. (1993). Characterization of lysosomes isolated from *Dictyostelium discoideum* by magnetic fractionation. *J Biol Chem* 268, 9110-6.
- Rupper, A., Grove, B. und Cardelli, J. (2001). Rab7 regulates phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 114, 2449-60.

- Rupper, A. C., Rodriguez-Paris, J. M., Grove, B. D. und Cardelli, J. A. (2001). p110-related PI 3-kinases regulate phagosome-phagosome fusion and phagosomal pH through a PKB/Akt dependent pathway in Dictyostelium. *J Cell Sci* 114, 1283-95.
- Ruscetti, T., Cardelli, J. A., Niswonger, M. L. und O'Halloran, T. J. (1994). Clathrin heavy chain functions in sorting and secretion of lysosomal enzymes in Dictyostelium discoideum. *J Cell Biol* 126, 343-52.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Sambrook, j., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual* (New York: Cold Spring Harbour Press).
- Schaffer, J. E. (2002). Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E239-46.
- Schaffer, J. E. und Lodish, H. F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79, 427-36.
- Schmid, S. L. und Cullis, P. R. (1998). Membrane sorting. Endosome marker is fat not fiction. *Nature* 392, 135-6.
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B. und Soling, H. D. (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401, 133-41.
- Schneider, N., Schwartz, J. M., Kohler, J., Becker, M., Schwarz, H. und Gerisch, G. (2000). Golvesin-GFP fusions as distinct markers for Golgi and post-Golgi vesicles in Dictyostelium cells. *Biol Cell* 92, 495-511.
- Schroder, J. (1989). Protein sequence homology between plant 4-coumarate:CoA ligase and firefly luciferase. *Nucleic Acids Res* 17, 460.
- Seaman, M. N., Sowerby, P. J. und Robinson, M. S. (1996). Cytosolic and membrane-associated proteins involved in the recruitment of AP-1 adaptors onto the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 271, 25446-51.
- Seastone, D. J., Harris, E., Temesvari, L. A., Bear, J. E., Saxe, C. L. und Cardelli, J. (2001). The WASp-like protein scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in Dictyostelium. *J Cell Sci* 114, 2673-83.
- Sever, S., Muhlberg, A. B. und Schmid, S. L. (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* 398, 481-6.
- Shindo, Y. und Hashimoto, T. (1978). Acyl-Coenzyme A synthetase and fatty acid oxidation in rat liver peroxisomes. *J Biochem (Tokyo)* 84, 1177-81.
- Shockey, J. M., Fulda, M. S. und Browse, J. A. (2002). Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme a synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol* 129, 1710-22.

- Simon, J. P., Morimoto, T., Bankaitis, V. A., Gottlieb, T. A., Ivanov, I. E., Adesnik, M. und Sabatini, D. D. (1998). An essential role for the phosphatidylinositol transfer protein in the scission of coatmer-coated vesicles from the trans-Golgi network. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 11181-6.
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569-72.
- Simpson, F., Hussain, N. K., Qualmann, B., Kelly, R. B., Kay, B. K., McPherson, P. S. und Schmid, S. L. (1999). SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat Cell Biol* *1*, 119-24.
- Singer, S. J. und Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* *175*, 720-31.
- Singh, S. S., Chauhan, A., Murakami, N. und Chauhan, V. P. (1996). Profilin and gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Biochemistry* *35*, 16544-9.
- Sleeman, M. W., Donegan, N. P., Heller-Harrison, R., Lane, W. S. und Czech, M. P. (1998). Association of acyl-CoA synthetase-1 with GLUT4-containing vesicles. *J Biol Chem* *273*, 3132-5.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* *150*, 76-85.
- Sohn, R. H., Chen, J., Koblan, K. S., Bray, P. F. und Goldschmidt-Clermont, P. J. (1995). Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin. *J Biol Chem* *270*, 21114-20.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* *98*, 503-17.
- Souza, G. M., Mehta, D. P., Lammertz, M., Rodriguez-Paris, J., Wu, R., Cardelli, J. A. und Freeze, H. H. (1997). Dictyostelium lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J Cell Sci* *110*, 2239-48.
- Stowell, M. H., Marks, B., Wigge, P. und McMahon, H. T. (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol* *1*, 27-32.
- Stuhlsatz-Krouper, S. M., Bennett, N. E. und Schaffer, J. E. (1998). Substitution of alanine for serine 250 in the murine fatty acid transport protein inhibits long chain fatty acid transport. *J Biol Chem* *273*, 28642-50.
- Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M. A., Keen, J. H. und McGraw, T. E. (1999). Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6775-80.
- Suzuki, H., Kawarabayasi, Y., Kondo, J., Abe, T., Nishikawa, K., Kimura, S., Hashimoto, T. und Yamamoto, T. (1990). Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* *265*, 8681-5.
- Swanson, J. und Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biology* *5*, 424-428.

- Sweitzer, S. M. und Hinshaw, J. E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93, 1021-9.
- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. und De Camilli, P. (1996). The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol* 133, 1237-50.
- Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V. und De Camilli, P. (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 1, 33-9.
- Tanaka, T., Hosaka, K., Hoshimaru, M. und Numa, S. (1979). Purification and properties of long-chain acyl-coenzyme-A synthetase from rat liver. *Eur J Biochem* 98, 165-72.
- Tapper, H. und Sundler, R. (1990). Role of lysosomal and cytosolic pH in the regulation of macrophage lysosomal enzyme secretion. *Biochem J* 272, 407-14.
- Tapper, H. und Sundler, R. (1995). Glucan receptor and zymosan-induced lysosomal enzyme secretion in macrophages. *Biochem J* 306, 829-35.
- Temesvari, L., Zhang, L., Fodera, B., Janssen, K. P., Schleicher, M. und Cardelli, J. A. (2000). Inactivation of *ImpA*, encoding a LIMPII-related endosomal protein, suppresses the internalization and endosomal trafficking defects in profilin-null mutants. *Mol Biol Cell* 11, 2019-31.
- Temesvari, L. A., Rodriguez-Paris, J. M., Bush, J. M., Zhang, L. und Cardelli, J. A. (1996). Involvement of the vacuolar proton-translocating ATPase in multiple steps of the endo-lysosomal system and in the contractile vacuole system of *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* 109, 1479-95.
- Thilo, L. (1985). Quantification of endocytosis-derived membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 822, 243-66.
- Thilo, L. und Vogel, G. (1980). Kinetics of membrane internalization and recycling during pinocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1015-9.
- Trigatti, B. L. und Gerber, G. E. (1995). A direct role for serum albumin in the cellular uptake of long-chain fatty acids. *Biochem J* 308, 155-9.
- Troll, H., Malchow, D., Muller-Taubenberger, A., Humbel, B., Lottspeich, F., Ecke, M., Gerisch, G., Schmid, A. und Benz, R. (1992). Purification, functional characterization, and cDNA sequencing of mitochondrial porin from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 267, 21072-21079.
- Uchiyama, A., Aoyama, T., Kamijo, K., Uchida, Y., Kondo, N., Orii, T. und Hashimoto, T. (1996). Molecular cloning of cDNA encoding rat very long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 271, 30360-5.
- van Meer, G. (1989). Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol* 5, 247-75.
- Vega, M. A., Segui-Real, B., Garcia, J. A., Cales, C., Rodriguez, F., Vanderkerckhove, J. und Sandoval, I. V. (1991). Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J Biol Chem* 266, 16818-24.

- Vitelli, F., Piccini, M., Caroli, F., Franco, B., Malandrini, A., Pober, B., Jonsson, J., Sorrentino, V. und Renieri, A. (1999). Identification and characterization of a highly conserved protein absent in the Alport syndrome (A), mental retardation (M), midface hypoplasia (M), and elliptocytosis (E) contiguous gene deletion syndrome (AMME). *Genomics* 55, 335-40.
- Wakefield, J. S. und Hicks, R. M. (1974). Erythrophagocytosis by the epithelial cells of the bladder. *J Cell Sci* 15, 555-73.
- Waku, K. (1992). Origins and fates of fatty acyl-CoA esters. *Biochim Biophys Acta* 1124, 101-11.
- Wang, Y., Thiele, C. und Huttner, W. B. (2000). Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* 1, 952-62.
- Watts, D. J. und Ashworth, J. M. (1970). Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* 119, 171-174.
- Weichenban, D. (1991). Fast recovery of DNA from agarose gels by centrifugation through blotting paper. *Trends Genet* 7, 109.
- Weigert, R., Silletta, M. G., Spano, S., Turacchio, G., Cericola, C., Colanzi, A., Senatore, S., Mancini, R., Polishchuk, E. V., Salmona, M., Facchiano, F., Burger, K. N., Mironov, A., Luini, A. und Corda, D. (1999). CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature* 402, 429-33.
- Wickens, M. (1990). How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem Sci* 15, 277-81.
- Wienke, D. C., Knetsch, M. L., Neuhaus, E. M., Reedy, M. C. und Manstein, D. J. (1999). Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* 10, 225-43.
- Wigge, P., Kohler, K., Vallis, Y., Doyle, C. A., Owen, D., Hunt, S. P. und McMahon, H. T. (1997). Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 8, 2003-15.
- Williams, K. L. und Newell, P. C. (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mould *D.d.* using complementation analysis. *Genetics* 82, 287-307.
- Wood, L. und Kaplan, A. (1985). Transit of alpha-mannosidase during its maturation in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol* 101, 2063-9.
- Yamashita, Y., Kumabe, T., Cho, Y. Y., Watanabe, M., Kawagishi, J., Yoshimoto, T., Fujino, T., Kang, M. J. und Yamamoto, T. T. (2000). Fatty acid induced glioma cell growth is mediated by the acyl-CoA synthetase 5 gene located on chromosome 10q25.1-q25.2, a region frequently deleted in malignant gliomas. *Oncogene* 19, 5919-25.
- Zou, Z., DiRusso, C. C., Ctrnacta, V. und Black, P. N. (2002). Fatty acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Directed mutagenesis of FAT1 distinguishes the biochemical activities associated with Fat1p. *J Biol Chem* 277, 6.

9 ANHANG

9.1 GENOMISCHE SEQUENZ DES FÜR DIE LC-FACS KODIERENDEN *fcsA* GENS

JAX4a57d03.026 (ges. 487.577 bp)

Der genannte Contig geht noch 483.651 bp „downstream“ in 5'Richtung weiter. Das *fcsA* Gen liegt auf dem letzten Stück des Contigs, der 541 bp „upstream“ des ORF von LC-FACS endet.

Contig-Sequenz des Klons **JAX4a57d03.026**, der die kodierende Region für die LC-FACS enthält (3930 bp am 3'Ende), aufgeführt ist hier die komplementäre Basenabfolge, damit der ORF in der „richtigen“ Orientierung gelesen werden kann.

grün,: kodierende Sequenz LC-FACS Exons

kursiv: Erkennungsseq. für Restriktionsenzyme *SmiI*, *DraI*, *SspI*

blau: Anfang / Ende einer Intronsequenz, Splicing Erkennungs-Seq.

braun PolyA-Signal (Wickens, 1990)

```

1 tttccaaaa ttattatatt cctttaatat ccttttttaa ttaattctat caacacattt
61 taaatattat aaaatataat taaattaaaa tttttttttt tcttcagtta ttaactcaaa
   DraI SspI
121 tattattaaa agatataaaa taagaaaaat aaattaaaag atataaatat aagaaatacc
   SspI
181 ataaaacata taaacaaaat attgtcataa acaaaatatt gttataaaaat ttttaatacat
   SspI SspI
241 aaataactat aaacaactcc caaaatacac cacacattgc agttgttttt ttaaatttca
   DraI
301 aatttgatat taattttgaa aaattttttt acacaaaaaa taaaaatota tttttattttt
361 aatttttttt tttttatttt ttttttttat ttaatttttt tttatttttt ttttttttat
421 tttttttttt tttcaaattt tcactatcct tttttttttt tttctttttt ttttttttta
481 tttttatttt aatatcaaat tctctttttt tattttttatt tttcattgta atataatttt
541 ataaatgtca agcctttcaa caaaaacagg taattaatta ttaattaaat attattaatt
   Exon I SspI
601 aaatatttaa tattcttctt tactaaaata aatgaaaaaa aaaaaataa aaaaaataaa
   SspI SspI
661 aaataaaaa aaaaaataaa aaaaaaaaaa tataaaaact ttaaataata tacatatata
   DraI
721 attttattgt aataaaatta attatataga tttacttggt gaccagatt ttgtatgtat
   Exon II
781 tttttactaa aataaataaa agtcaaaaa gtctaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
841 aaaaaacat tttttatact aactttatta ctataattac acaattgttt gaattttatt

```

901 ttagatccgt cttcaaagtg ttgaagtaga cggtagtgaa gttataccag gcgaaactag
961 accaagaaga aactactaat tcccaaaatt aacaaattca ccagacggta aaacctttac

Exon III

1021 cttgtatgat gtttataggt atgtattttt aaaaaataa aaaaaaaaaat aaataaataa
DraI

1081 taataataat aatataaat aaagttttta tgattattaa attctaatat ttttcaataa
SspI

1141 taaataaatt taaagaataa ataaagattc agattcaaac ttttaggta ttcgtgaatt
DraI PolyA-Signal

1201 attagcagat ggcaaaagag gtgattacaa atggatttct tataaacaag catgcattag

Exon IV

1261 agcaataac attggttcag ctttagttca attaggttta aataaggtag atagaagaaa
DraI PolyA-Signal

1321 tattttaata ttgtgttttc acaataat tttttatttt tttttatttt tttcttttct
SspI SspI

1381 tttttttttt attttctttt ttcaaaacac ttttctcttt tttttttttt tttcaaaaca
1441 ctttgттаат cactcaaaaa aaaaaaccgc aactaaatca aatatcgggg aaaaaagggt
1501 tttttttttt ttta aatttttttt ttttttttgt gaaacgatga aaatcccaa gatatttttt
DraI

1561 ttaaaatttg ataaaaagtt aattgatttt aaaaaaaaaa aaaaattttg tgcaccaacc
DraI DraI

1621 ccacaccatt ttgggttttt tttttttttt ttttaataca attataaata tctaaatctt
1681 ttttcaatta attaatttta tttattttta ttttatttat tattaacatt taacttatta
1741 ctttaataat ttataaataa taaatgataa ataaaaatta aataagggtg atagaattgg
1801 tattttttca attaatagac cagaatgggt ttatcagat atggcagcaa tgaatcattc
1861 actgtacca gttg cattat atgcaacatt aggtgccaat gcaattgaat atgttgttaa
1921 tcattcagag atttcagtac ttttatgtga aggtaaaaaat gttgaaaaga ttctttcaat
1981 gccaggtaca accattaata caattgtcag ttatgatcca ttaccacaag caacattaga

Exon V

2041 taaattcaag gataatgaaa acgttaaact ttacctctta tcagattttg aaaaattggg
2101 tgaacaaaat ccagcccaac atgaagtccc atcaccagaa gatttatgta cattacttta
2161 cacctctggt tcaactggta atccaaaggg tgtaatgtta actatacaa atatggctag
2221 tgaagttgca ggtgccaaact ttcaccagc aggtgtaatt ccagaggatg ttcatatgtc
2281 atactccca ttggctcact catttgaacg tgccgctcgtt tcattgatgt gttatggtgg
2341 tggtcaaatt ggtttcttct ctggtttaat tccagagtta ttcaacgata tccaagtttt
2401 acgtccaacc tttttatgtg gtgccccaaag agtatggcaa cgtcttcacg acaaactttg
2461 gttactgtc aacaatgata gttggttaaa gaaattcctc ttcaattggg gtctcaactc
2521 taacaatct gcattaagac ttggttcaac cactccaatt tgggataaat tggttttctc
2581 aaaaacaaag gatagacttg gtggctcgtg taaattcatc ctttccggtt ccgctccatt

2641 ggatccaaaa ttagccgaat tcttacgtgc ttgtttctgt tgtccagtcg tctctggtta
 2701 tggctctctct gaaaatgtag gtgggtgcctc tgttgcttat ccagaagata acaatgtagg
 2761 tcatgttggg ccaccactca gtgcctgtga aatgaaatta atcgacgttc cagagatgaa
 2821 ctatttctct actgataaac catgtccaag aggtgagggt tgtattcgtg gtttcaacgt
 2881 tttcaaaggt tactttaagg atccagaaaa gaccaaagaa gatctcaaag aagatggttg
 2941 gttcataact ggtgatattg gtcggtggaa tgaaaatggt accctctcaa tcattgatcg
 3001 taagaaaaat atcttcaaat tatctcaagg tgaatacgtt gccgccgaat atttggaatc

Exon V *SspI*

3061 tgttttcggt cgttcacat ttgcctctca agtatttgtc tatggtgatt cattaatatg
 3121 tttcttgggt ggtgttgcg taccagattt tgaagttgtc caaaaattat tcgcttccaa
 3181 atatccagaa ctgatgttt caaacatgc aaccctcgca aatcaaaag aactctacaa
 3241 agaaatttta tcaagtttcg atgcttgcgc tgccgaagcc aaattacatg gttttgaaaa
 3301 attaaaacat atctacgtag aacatgaacc attcactgag gaaaacaatt tattaactcc
 3361 atcattcaaa ccaagagac cacaactcaa agaaagatat caaaccatta ttgataacct
 3421 ttatgctgaa tacaacgtg atcatccaga cgtataaatc ttcttgtatt tttttaaatc

DraI

3481 tctattaatc taaaaaaaa aaaaaaaaa attaaaaaat aaaaaaaaaac aaaaaaaaa
 3541 aataatataa aaaaaaaaa aaacaaaaaaaa aaaaaaaaa aggatctatt cttattaaac
 3601 ttcattttac actttttatt tttttttat ttttattttt tttttttttt ttttttttt
 3661 ttggactttt cacatccaaa ataggtgaaa aaattaataa aaattttcca aattttccat

SmiI

3721 ttaaatttgg gtaaacagag acattggtca tgtagaaaa gaagtgcctat ttattgttgt

DraI

3781 tgttgtgggt gataaatggt ttgatggtaa attggttgtt gttgaaattg tggttggaat
 3841 tgtggttgaa attgtggttg aaattgtggt tgaaattgtg gttggaattg tggttggaga
 3901 tattgtggta aaacaaagga aatattttgt g

SspI

DraI: 11 sites TTT|AAA,AAA|TTT

N1: 62	N4: 1051	N7: 1510	N10: 3476
N2: 293	N5: 1152	N8: 1563	N11: 3723
N3: 703	N6: 1300	N9: 1591	

Smi I: 1 site ATTT|AAAT,TAAA|TTTA

N1: 3723

Ssp I: 12 sites AAT|ATT,TTA|TAA

N1: 66	N4: 218	N7: 612	N10: 1330
N2: 122	N5: 591	N8: 1129	N11: 3051
N3: 201	N6: 605	N9: 1322	N12: 3924

9.2 GENOMISCHE REGION DES LC-FACS GENS NACH INSERTION DER BLASTICIDIN-KASSETTE DURCH INTEGRATION DES „*KNOCK-OUT*“-KONSTRUKTES

grün: kodierende Sequenz LC-FACS Exons

kursiv: Erkennungsseq. für die Restriktionsenzyme *SmiI*, *DraI*, *SspI*

blau: Anfang / Ende einer Intronsequenz, Splicing Erkennungs-Seq.

türkis: Blasticidin Resistenz Kasette

```

1 tttccaaaa ttattatata cctttaatat ccttttttaa ttaattctat caacacattt
61 taaatattat aaaatataat taaattaaaa tttttttttt tcttcagtta ttaactcaaa
   DraI SspI
121 tattattaaa agatataaaa taagaaaaat aaattaaaag atataaatat aagaaatacc
   SspI
181 ataaaacata taaacaaaat attgtcataa acaaaatatt gttataaaat tttaatacat
   SspI SspI
241 aaataactat aaacaactcc caaaatacac cacacattgc agttgttttt ttaaatttca
   DraI
301 aatttgatat taattttgaa aaattttttt acacaaaaaa taaaaatcta tttttattttt
361 aatttttttt tttttatttt ttttttttat ttaatttttt tttatttttt ttttttttat
421 tttttttttt tttcaaattt tctactatctt tttttttttt tttctttttt ttttttttta
481 tttttatttt aatatcaaat tctctttttt tattttttatt tttcattgta atataatttt
541 ataaatgtca agcctttcaa caaaaacag taattaatta ttaattaaat attattaatt
   Exon I SspI
601 aatattaa tattcttctt tactaaaata aatgaaaaaa aaaaaataaa aaaaataaaa
   SspI SspI
661 aaataaaaa aaaaaataaa aaaaaaaaaa tataaaaact ttaaataata tacatatata
   DraI
721 attttattgt aataaaatta attatataga tttacttggg gaccagatt ttgtatgtat
   Exon II
781 ttttactaa aataaataaa agtcaaaaa gtctaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
841 aaaaaaacat tatttatact aactttatta ctataattac acaattgttt gaatttattt
901 tagatccgt cttcaaagtg ttgaagtaga cggtagtgaa gttataccag gcgaaactag
961 accaagaaga aactactaat tcccaaaatt acaaaattca ccagacggta aaacctttac
   Exon III
1021 cttgtatgat gtttataggt atgtattttt aaaaaaataa aaaaaaaat aaataaataa
   DraI
1081 taataataat aatataaaat aaagttttta tgattattaa attctaatat ttttcaataa
   SspI
1141 taaataaatt taaagaataa ataaagattc agattcaaac tttttaggta ttogtgaatt
   DraI Exon IV

```

1201 attagcagat ggcaaaagag gtgattacaa atggatttct tataaacaag catgcattag
1261 agcaataac attggttcag ctttagttca attaggttta aataaggtag atagaagaaa

DraI

1321 tattttaata ttgggttttc acaataatt tttttatttt tttttatttt tttcttttct
SspI SspI
1381 tttttttttt attttctttt ttcaaaacac ttttctcttt tttttttttt tttcaaaaca
1441 ctttgттаат cactcaaaaa aaaaaaccgc aactaaatca aatatcgggg aaaaaagggт
1501 ttttttttta aaattttttt ttttttttgt gaaacgatga aaatcccaa gatatttttt

DraI

1561 ttaaaatttg ataaaaagtt aattgatttt aaaaaaaa aaaaattttg tgcaccaacc
DraI DraI
1621 ccacaccatt ttgggttttt tttttttttt ttttaataca attataaata tctaaatctt
1681 ttttcaatta attaatttta tttattttta ttttatttat tattaacatt taacttatta
1741 ctttaataat ttataaataa taaatgataa ataaaaatta aataagggтg atagaattgg
1801 tattttttca attaatagac cagaatgggt ttatcagat atggcagcaa tgaatcattc
1861 acttgtacca gttgcatтat atgcaacatt aggtgccaat gcaattgaat atgттgttaa
1921 tcattcagag atтcagtac ttttatgtga aggtaaaaat gttgaaaaga ttctttcaat
1981 gccaggtaca accattaaaa caattgtcag ttatgatcca ttaccacaag caacattaga

Exon V

2041 taaattcaag gataatgaaa acgttaaact ttaccttтta tcagattttg aaaaattggg
2101 tgaacaaaat ccagcccaac atgaagtccc atcaccagaa gatttatgta cattacttta
2161 cacctctggт tcaactggta atccaaaggg tgtaatgtta gatatcogag togncnnnn
2221 nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnttttac atgtaatgca tatatttatc ttcaccattc
2281 aaaatgtact gtaaataata aattttttta atatatttga tttttttgat agaaaaaaaa

DraI

2341 aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaaat taaaataact taataattat taagatttaa

DraI

2401 aaaaaaaa ttaaaaaaa aagaaaatat tagatttatta caacaatttg tttttttatt

SspI

2461 atttattaaa taatttagaa acattttctg tgaacaattg atggacgacc agtcgncn
2521 nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnntttt acatgtaatg catatattta tottcaccat
2581 tcaaaatgta ctgtaaataa taaattttt aaatatattt gatttttttg atagaaaaaa

DraI

2641 aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa attaaaataa ottaataatt attaagattt

DraI

2701 aaaaaaaaaa aattaaaaaa aaaagaaat attagattat tacaacaatt tgттttttta

SspI

2761 ttattttatta aataatttag aacatttttc tgtgaacaat tgatggacga ccogagctog

Blasticidin Resistenz Kasette (1,4kb)

2821 agatctagat ttcgatgaat tcgagctctt aatttcgggt atatttgagt ggaatgagtt

4861 gtaaacagag acattggtca tgtagaaaaa gaagtgctat ttattgttgt tgttgtggtt
 4921 gataaatggt ttgatggtaa attggttggt gttgaaattg tggttggaat tgtggttgaa
 4981 attgtggttg aaattgtggt tgaaattgtg gttggaattg tggttggaga tattgtggta
 5041 aaacaaagga aatattttgt g

SspI**DraI: 18 sites** TTT|AAA,AAA|TTT

N1: 62	N7: 1510	N13: 2701
N2: 293	N8: 1563	N14: 3434
N3: 703	N9: 1591	N15: 3473
N4: 1051	N10: 2309	N16: 3490
N5: 1152	N11: 2399	N17: 4606
N6: 1300	N12: 2611	N18: 4853

Smi I: 1 site ATTT|AAAT,TAAA|TTTA

N1: 4853

Ssp I : 14 sites AAT|ATT,TTA|TAA

N1: 66	N6: 605	N11: 2429
N2: 122	N7: 612	N12: 2731
N3: 201	N8: 1129	N13: 4181
N4: 218	N9: 1322	N14: 5054
N5: 591	N10: 1330	

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Maniak für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz, seine Betreuung dieser Arbeit, allgemeine Albernheiten und ein kollegiales Verhältnis.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Nellen möchte ich für die Übernahme des Coreferates, Prof. Dr. Mireille Schäfer und Dr. habil. Jürgen Oberstraß für ihre Bereitschaft in der Promotionskommission mitzuwirken, danken

Harald Rühling danke ich für seine Hilfe am CLSM, bei Abbildungen in Sachen Photoshop und sonstigen Computerangelegenheiten.

Den Kollegen im FB 19 im Allgemeinen und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zellbiologie im Besonderen danke ich für ein freundliches, angenehmes Arbeitsklima und Kollegialität, was beweist, daß Arbeit und Spaß durchaus koexistieren können.

Frau Dr. Beate Schnell gilt mein ausdrücklicher, überschwenglicher, nicht enden wollender Dank. Sie hat sich zwischendurch immer geduldig mein Gejammer angehört, meine Manuskripte kritisch gelesen und mir und meiner Arbeit viel Zeit geopfert. Ohne sie, ihren Anregungen und ihrer Geduld wäre diese Arbeit sicherlich nicht in dieser Form zustande gekommen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie meinen Dank aussprechen: Meinen Eltern und meiner Schwester, da sie mich stets unterstützt haben und nie einen Zweifel daran aufkommen ließen, daß ich das schon alles schaffen würde und meiner Nichte Medea, die es immer in kürzester Zeit schaffte meine Laune zu verbessern, auch wenn ich extrem genervt war.