
**Interaktive Netzwerke zur Regulation des
Wachstums-Differenzierungs-Übergangs
bei *Dictyostelium discoideum***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich 18 – Naturwissenschaften
der Universität Kassel

vorgelegt von

Karsten Riemann

aus Hessisch Lichtenau

Hess. Lichtenau, im November 2005

**Interaktive Netzwerke zur Regulation des
Wachstums-Differenzierungs-Übergangs
bei *Dictyostelium discoideum***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. *rer. nat.*)
im Fachbereich 18 – Naturwissenschaften
der Universität Kassel

vorgelegt von

Karsten Riemann

aus Hessisch Lichtenau

Hess. Lichtenau, im November 2005

Erster Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Nellen

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Markus Maniak

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

„gdt1, a new signal transduction component for negative regulation of the growth-differentiation transition in *Dictyostelium discoideum*“, Zeng et al., *Mol Biol Cell*. 2000 Mai, 11 (5): 1631-43

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt und andere als die in dieser 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.

Hess. Lichtenau, im November 2005

Karsten Riemann

ES GIBT VIELE WEGE.
MANCHE KREUZEN SICH,
MANCHE LIEGEN DICHT BEIEINANDER,
DOCH ALLE ENDEN AM GLEICHEN ZIEL.
AUCH DIE UMWEGE.

Irina Rauthmann

*1958, deutsche Aphoristikerin und Lyrikerin

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Warum <i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus?.....	1
1.2	Allgemeine Mechanismen der Signaltransduktion.....	5
1.2.1	Struktur und Funktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren	6
1.2.2	Heterotrimere G-Proteine	7
1.2.3	Der GTPase-Zyklus.....	8
1.2.4	Ras-Proteine	10
1.2.5	MAP-Kinase Kaskaden	11
1.3	Signaltransduktion bei <i>Dictyostelium discoideum</i>	14
1.3.1	Die cAMP-Rezeptoren von <i>D. discoideum</i>	14
1.3.2	Die G-Proteine von <i>D. discoideum</i>	16
1.3.3	Modulierende Proteine des GTPase-Zyklus:.....	20
1.3.4	Ras-Proteine von <i>D. discoideum</i>	21
1.3.5	Bekannte extrazelluläre Faktoren.....	23
1.4	Die Regulation der Discoidin-Expression in <i>D. discoideum</i>	28
1.4.1	Regulation der Discoidin-Expression durch cAMP-Rezeptoren	28
1.4.2	Regulation der Discoidin-Expression durch G-Proteine	29
1.4.3	Aktuelles Modell	31
2.	EXPERIMENTELLER TEIL	34
2.1	Material	34
2.1.1	Enzyme	34
2.1.2	Antibiotika	34
2.1.3	Monoklonale Antikörper	34
2.1.4	Polyklonale Antikörper	35
2.1.5	Kits	35
2.1.6	Chemikalien	35
2.1.7	Kulturmedien.....	37
2.1.8	Puffer und Lösungen.....	39
2.1.9	Bakterienstämme	42
2.1.10	Plasmide	42

2.1.11	Oligonukleotide	42
2.1.13	Geräte	43
2.2	Zellbiologische Methoden für <i>Dictyostelium discoideum</i>	46
2.2.1	Axenisches Wachstum	46
2.2.2	Wachstum unter Selektionsdruck	46
2.2.3	Wachstum in Bakteriensuspension	47
2.2.3.1	Herstellung von KA-Platten (<i>Klebsiella aerogenes</i>)	47
2.2.3.2	Wachstum und Entwicklung auf <i>Klebsiella</i> -Rasen	48
2.2.3.3	Die Gewinnung von <i>Dictyostelium</i> -Einzelklonen („Reklonierung“) ..	48
2.2.3.4	Wachstum in <i>Klebsiella aerogenes</i> -Suspension	48
2.2.4	Langzeitlagerung von <i>Dictyostelium discoideum</i>	49
2.2.4.1	Einfrieren in DMSO	49
2.2.4.2	Lagerung von Sporen	49
2.2.5	Transformation von <i>Dictyostelium discoideum</i>	50
2.2.5.1	Die Ca-Phosphat-Methode (Nellen <i>et al.</i> , 1984)	50
2.2.5.2	Die Elektroporation	50
2.2.6	Spezielle Experimente mit <i>Dictyostelium discoideum</i>	51
2.2.6.1	Entwicklung auf Filtern	51
2.2.6.2	Entwicklung in Phosphatpuffer	52
2.2.6.3	Messung der Discoidin-Expression bei vegetativem Wachstum	53
2.2.6.4	Messung der Discoidin-Expression bei axenischem Wachstum	54
2.2.6.5	Überprüfung der Discoidin-Repression durch Folat	54
2.2.6.6	Überprüfung der Calcium-Repression	55
2.2.6.7	Colonyblot	55
2.2.6.8	Überprüfung der Discoidin-Regulation durch die Bakteriendichte ...	56
2.3	Molekularbiologische Methoden	57
2.3.1	Präparation von Nukleinsäuren	57
2.3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	57
2.3.1.2	Präparation von chromosomaler DNA aus <i>Dictyostelium</i>	59
2.3.1.3	Präparation von gesamt-RNA aus <i>Dictyostelium</i>	60
2.3.2	DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen	61
2.3.2.1	„Filtermethode“ nach Weichenhan (Weichenhan, 1991)	61
2.3.2.2	Aufreinigung mit dem Nucleotrap™ Kit (Macherei und Nagel)	62

2.3.2.3	Aufreinigung aus LM-Agarose	63
2.3.2.4	„Phenol Freeze“	63
2.3.3	Klonierung von DNA-Fragmenten (Standard-DNA-Techniken)	64
2.3.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	64
2.3.3.2	Dephosphorylierung von DNA	64
2.3.3.3	Ligation von DNA.....	64
2.3.3.4	Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	65
2.3.3.5	Erzeugung von blunt ends	65
2.3.3.6	Transformation von <i>E. coli</i>	65
2.3.3.7	Plasmidsequenzierung	67
2.3.3.8	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	68
2.3.3.9	Klonierung von PCR-Fragmenten mit dem T-Cloning-Kit.....	70
2.3.3.10	Blot-Verfahren und Hybridisierung	70
2.3.3.11	Schnelle Hybridisierung von Bakterien-Klonen	74
2.3.4	Proteinchemische Methoden.....	75
2.3.4.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	75
2.3.4.2	„Western-blot“ („Semi-dry-blotting“)	76
2.3.4.3	Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	76
2.3.4.4	Proteinquantifikation mit Amidoschwarz	77
2.3.4.5	Immunodetektion mit enzymgekoppelten Antikörpern	77
2.3.5	REMI-Mutagenese (Kuspa&Loomis, 1992).....	78
3.	ERGEBNISSE	80
3.1	Neu etablierte zellbiologische Methoden.....	80
3.1.1	Messung der PSF-Konzentration im Medium („PSF-Assay“)	80
3.1.2	Überprüfung der Discoidin-Regulation durch die Bakteriendichte	84
3.1.3	Messung des PSF-Rezeptors	84
3.2	Die Mutante 11-1.....	86
3.3	Die Mutante 10-1.....	93
3.4	Die Mutante Gdt-1	109
3.4.1	Einleitung	109
3.4.2	Weiterführende Experimente mit der gdt1-Mutante.....	112
3.5	Die Mutante rasS.....	125
3.5.1	Einleitung	125

3.5.2	Experimente mit der rasS-Mutante.....	125
3.6	Die Mutante aimless.....	130
3.6.1	Einleitung	130
3.6.2	Die Discoidin-Expression von aimless	131
3.7	Verschiedene <i>Dictyostelium</i> Mutanten	137
4.	DISKUSSION	144
4.1	<i>D. discoideum</i> – ein relevanter Modellorganismus?	144
4.1	Growth-differentiation transition - GDT	144
4.1.1	Komponenten der GDT & Discoidin-Regulation	146
4.1.2	Der Stellenwert von PSF – Bewertung des PSF-Assays	151
4.1.3	Beurteilung der REMI-Methode.....	152
5.	LITERATURVERZEICHNIS	155

Abkürzungsverzeichng

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat(e)
DTT	Dithiotreit
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalacopyranoside
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
lacZ	β-Galactosidase-Gen
LiAc	Lithiumacetat
M	Molar

Abkürzungen

mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NaAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCIA	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PEG	Polyethylenglykol
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
SM	Standard-Medium
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen (weight/volume)
X-Gal	5-Bromo-4-chlore-3-indolyl- β -D-galaktosid
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Die Signaltransduktion in niederen und höheren Zellen gehört zu einem der intensivsten beforschten, molekularen Mechanismen. Wie gelangt ein externer Stimulus in die Zelle, bzw. wie wird das entsprechende Signal von der Zelloberfläche in das Zellinnere übertragen? Welche Proteine, die in die Signaltransduktion involviert sind, benötigt die Zelle um auf diesen Stimulus zu reagieren – und wie reagiert die Zelle letztendlich auf dieses extrazelluläre Signal? In den letzten Jahren wurde deutlich, dass diese interaktiven Netzwerke hochkomplex sind und für die molekularbiologische Forschung nur dann einsehbar werden, wenn gezielt Mutanten hergestellt werden, die z.B. Rezeptoren oder interzelluläre Komponenten nicht mehr vorweisen können.

Die Erforschung der Signaltransduktionsprozesse ist mittlerweile aus den Laboren der Grundlagenforschung auch in die molekularbiologischen Labors der pharmazeutischen Forschung übertragen worden. Aktuell wurden in den letzten Jahren mehrere Substanzen entwickelt, die z.B. für die Bekämpfung von bösartigen Tumoren geeignet sind, und diese Substanzen zeichnen sich dadurch aus, dass sie Komponenten der Signaltransduktion blockieren, bzw. Botenstoffe der Neoangiogenese aus dem Serum entfernen und so den Tumor „aushungern“.

In *Dictyostelium discoideum* sind bereits zahlreiche Signaltransduktionskomponenten beschrieben worden und es finden sich die bekannten Systeme, wie z.B. Transmembranrezeptoren, G-Proteine oder ras-Proteine, die man aus anderen Organismen kennt wieder. Auch MAP-Kinase-Kaskaden sind vorhanden und verschiedene extrazelluläre Signalstoffe, wie z.B. cAMP, PSF oder CMF sind bekannt und teilweise charakterisiert.

Dictyostelium discoideum eignet sich aus diesen Gründen und aus Gründen der biochemischen und zellbiologischen Verfügbarkeit dazu, Prozesse der Signalerkennung und deren Weiterleitung zu den Effektorproteinen zu erforschen.

Das Primärziel dieser Arbeit war es, möglichst eine neue Komponente in einem der bereits bekannten Signalwege der Discoidin-Regulation durch Mutagenesen zu zerstören, um diese anschließend beschreiben und charakterisieren zu können.

Zusammenfassung

Dazu wurde die sog. REMI-Mutagenese am neu gegründeten Labor der Universität Kassel etabliert und ferner die Zellkulturtechnik von *D. discoideum* für den Routineeinsatz eingearbeitet.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Arbeit war das Screening bereits bekannter Zelllinien, die durch einen auffälligen Phänotyp nach einer Mutagenese isoliert worden waren. Dieses Screening sollte mit Western-blot-Analysen des sog. Discoidin-Proteins durchgeführt werden. Zusätzlich sollten neue Methoden entwickelt werden, die es möglich machen die Interaktionen während des vegetativen Wachstums vom *Dictyostelium* in *Klebsiella*-Suspension zu beschreiben.

1 EINLEITUNG

1.1 Warum *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus?

Erstmals beschrieben wurde der einfache Eukaryont *Dictyostelium discoideum* von Raper im Jahre 1935 (Raper *et al.*, 1935). Morphologisch wird *Dictyostelium* zu der Gruppe der Mycetozoa gezählt, die u.a. die plasmodialen (*Myxogastria*) und zellulären Schleimpilze (*Dictyostelia*) einschließt. Die *Dictyostelium discoideum* Amöbe lebt in der Natur auf Waldboden, wo sich der Einzeller durch Phagozytose von Bakterien und Hefen ernährt.

Eine Besonderheit von *Dictyostelium discoideum* stellt sicherlich sein Lebenszyklus dar: Wird die Nahrungsquelle entzogen, oder es kommt zu einem ungünstigen Verhältnis von Nahrung zu eigener Zelldichte, verlassen die Amöben die sog. vegetative Wachstumsphase und durchlaufen anschließend einen Entwicklungszyklus an dessen Ende ein Fruchtkörper steht, der aus ca. 100.000 Zellen gebildet wird. Dieser Fruchtkörper ist in der Lage widrige Lebensumstände zu überdauern (Gerisch *et al.*, 1975; s. Abb. 1-1)

Die Bildung des Fruchtkörpers aus einer so großen Anzahl an Zellen erfordert eine sehr genaue Abstimmung und Kommunikation zwischen den einzelnen Amöben. Zu Beginn der Entwicklungsphase starten einige Amöben als Reaktion auf den drohenden Nahrungsverlust mit der Sekretion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Dadurch werden andere Zellen in unmittelbarer Umgebung dazu stimuliert ebenfalls mit der Sekretion von cAMP zu beginnen (Konijn *et al.* 1968; Firtel, 1996).

Die cAMP-Sekretion erfolgt keineswegs kontinuierlich, sondern gerade in der frühen Phase der Entwicklung erfolgt eine pulsartige Ausschüttung dieses extrazellulären Signalstoffes. Dadurch entstehen auf eng begrenztem Raum Pulse von cAMP, die sich von einem Zentrum aus kreisförmig ausbreiten. Dem so entstehenden cAMP-Konzentrationsgefälle können die Amöben chemotaktisch zum Zentrum hin folgen, was unter normalen Umständen zur Aggregation von ca. 10^5 - 10^6 Zellen führt (Gerisch *et al.*, 1975; Devreotes, 1989).

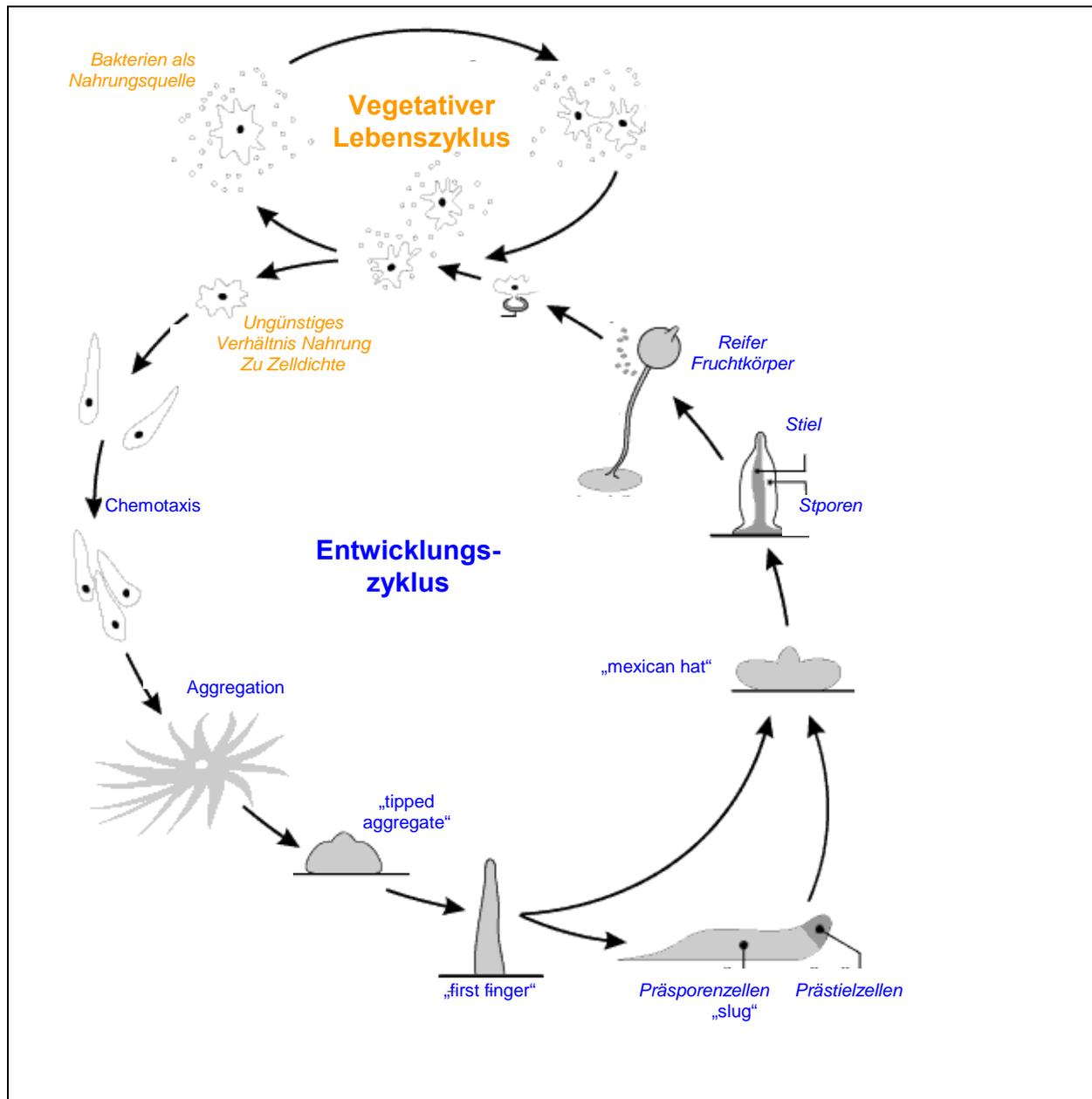


Abb. 1-1: Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*.

Die mit blauer Schrift gekennzeichneten Abschnitte beschreiben den Entwicklungszyklus von *D. discoideum*, der vegetative Lebenszyklus ist mit gelber Schrift hervorgehoben.

(Modifizierte Kopie der Homepage Universität Kassel Abteilung Genetik / <http://www.uni-kassel.de/fb19/genetics/projects/devcyc.gif>)

Nachdem die Zellen ein erstes Zellaggregat geformt haben, differenzieren sie sich vornehmlich in zwei, nur durch genetische Marker unterscheidbare Zelltypen: Prästielzellen und Präsporenzellen (Bonner&Slifkin, 1949; Firtel, 1995). Nach Abschluss dieser Differenzierung formt das Aggregat einen sogenannten "Slug", der

es den Zellen erlaubt, für kurze Zeit, chemo- und phototaktisch ein geeignetes Substratum für die weitere Differenzierung zum fertigen Fruchtkörper zu erreichen. Der Slug enthält in seinem vorderen Teil Prästielzellen (ca. 15-20% des gesamten Slugs), der hintere Teil wird von Präsporenzellen ausgefüllt.

Nachdem sich der Slug einige Millimeter über das Substratum bewegt hat, beginnt die sogenannte Kulmination. Während der Kulmination durchläuft *Dictyostelium discoideum* mehrere deutlich voneinander abgegrenzte Entwicklungsabschnitte, in deren Verlauf sich die Prästielzellen in vakuolisierte, stabile Stielzellen differenzieren und so den Stiel bilden. Die Präsporenzellen werden durch die Stielbildung langsam zum oberen Ende des Stieles gezogen, indem die Prästielzellen konstant durch die Präsporenmasse nach unten wandern.

Am Ende der Entwicklungsschritte differenzieren sich die Stielzellen. Diese vakuolisieren, umgeben sich mit einer Cellulosematrix und sterben ab. Im fertig differenzierten Fruchtkörper bilden diese Zellen den Fuß des Fruchtkörpers (Basalplatte), den Stiel und den Sporenkopf. Die späteren Sporen entwickeln sich aus den Präsporenzellen, die als Dauerformen an der Spitze des Fruchtkörpers lokalisiert sind. Diese Sporen können natürliche und physikalische Einflüsse und Nahrungsentzug überdauern, und können durch Wind oder andere natürliche Vorgänge an einen Ort gebracht werden, an dem die Amöbe keimt und so den Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum* schließt.

Dictyostelium weist also sowohl einen vegetativen Lebensabschnitt auf, in dem die Zellen als Einzeller leben, als auch einen multizellulären Entwicklungsabschnitt. Dies macht es möglich, beide Lebensformen (mono- oder multizellulär) zu erforschen, bzw. für die Erforschung bestimmter Signal- und Kommunikationsformen zu nutzen. Neben diesem Punkt hat *Dictyostelium* als Modellorganismus noch weitere Vorteile vorzuweisen:

Dictyostelium ist relativ leicht sowohl auf festen Nährmedien, als auch in Flüssigkultur, wie z.B. axenischem Medium oder Bakterien-Suspension zu kultivieren. Die Zellen verdoppeln sich je nach Kulturmedium alle 3-8 Stunden, was es ermöglicht innerhalb von 1 bis 4 Tagen ausreichend Zellmaterial für Experimente

zu erhalten. Zusätzlich liefert *Dictyostelium* eine "natürliche" Lagerungsmöglichkeit nämlich in Form von Sporen, die über mehrere Jahre bei 4°C gelagert werden können (eine Ausnahme dabei bilden Mutanten, die einen Defekt während der Entwicklung aufweisen).

Die *Dictyostelium*-Amöbe verfügt über einen haploiden Phänotyp! Somit führen Gen-Mutationen direkt zur phänotypischen Ausbildung. Um genetische Veränderungen durchführen zu können, wurde eine effiziente Transformationsmethode etabliert (Calciumchlorid-Methode, Nellen *et al.*, 1984), was z.B. das gezielte Zerstören oder Verändern von Genen durch homologe Rekombination ermöglicht. Auch Methoden der Mutagenese sind mit *Dictyostelium* durchführbar, besonders die sog. REMI-Methode (Kuspa&Loomis, 1992) hat in den letzten Jahren zu einer großen Anzahl neu isolierter Gene geführt. Zusätzlich sind eine Reihe von Vektorsystemen etabliert, die u.a. extrazellulär steuerbare Promotoren enthalten und somit die Expression von Fremd- oder *Dictyostelium*-Proteinen in unterschiedlichen Expressionsstärken ermöglichen.

Dictyostelium discoideum ist als Modellorganismus für viele Bereiche der entwicklungsbiologischen Grundlagenforschung anwendbar. Zu den Forschungsgebieten gehören Zellmotilität (Aktin/Myosin), Chemotaxis und Signaltransduktion, aber auch Vorgänge während des multizellulären Lebensabschnitts (Zell-Zell-Interaktion) rücken in das Interesse der Forschung. Die leichte Handhabung im Labor und die Sequenzierung des *Dictyostelium*-Genoms erleichtern zusätzlich die Arbeit mit diesem Organismus.

1.2 Allgemeine Mechanismen der Signaltransduktion

Zellen kommunizieren untereinander und reagieren auf äußere Einflüsse. Die Signale, die eine Zelle dabei wahrnimmt können physikalischer (Licht, Temperatur, Elektrizität, Magnetismus) oder chemischer Natur (einfache organische Verbindungen bis hin zu komplexen Proteinen) sein. Aber Zellen reagieren nicht nur auf Signale, sondern sie sind auch in der Lage, selbst solche zu produzieren und an ihre Umgebung abzugeben, um so zum Beispiel mit anderen Zellen zu kommunizieren.

Bei der Kommunikation zwischen Zellen werden extrazelluläre Signale in intrazelluläre Reaktionen umgesetzt. Als Signalstoffe dienen dabei die unterschiedlichsten Moleküle, neben einfachen und komplexen organischen Substanzen (Steroide, Acetylcholin, cAMP, Glutamat) können sekretierte Proteine oder kleine Peptide für die Übermittlung von Botschaften von Zelle zu Zelle genutzt werden.

Neben der Bindung des Signals im Inneren der Zelle durch nukleäre Rezeptoren (Hormonrezeptoren; Mangelsdorf *et al.*, 1995), kommt der Bindung des Botenstoffes an Transmembranrezeptoren eine große Bedeutung zu. Diese Gruppe von Rezeptoren bindet den Botenstoff an der extrazellulären Seite der Zelle und setzt eine intrazelluläre Signalkette in Gang, die zum Beispiel eine definierte biochemische Reaktion der Zelle auslöst. Die Weiterleitung des Signals durch die Membran in das Innere der Zelle bis hin zum Zellkern wird über z.T. interagierende Signalketten gewährleistet, die in der Regel aus mehreren Komponenten bestehen. Der erste Schritt ist dabei stets der Empfang des Signals durch einen spezifischen Rezeptor. Auch wenn bereits viele Elemente der zellulären Signaltransduktion bekannt sind und z.T. komplexe Mechanismen in der Zelle beschrieben wurden, sind wahrscheinlich große Teile der molekularen Signaltransduktion noch nicht aufgeklärt bzw. nicht verstanden. Doch schon jetzt finden neuere Forschungsergebnisse Einzug in die moderne Medizin, was besonders bei der Behandlung von Tumoren oder der Volkskrankheit Diabetes in den kommenden Jahren zu großen Fortschritten führen kann.

1.2.1 Struktur und Funktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Transmembranrezeptoren sind sogenannte integrale Membranproteine, die die Membran durchspannen. Der Rezeptor gliedert sich in eine extrazelluläre Domäne, einen Strukturanteil, der die Membran durchspannt und in einen cytosolischen Bereich.

Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors bindet mit hoher Spezifität einen oder mehrere Liganden. Durch eine Konformationsänderung wird das Signal durch die Membran in das Innere der Zelle geleitet. Hier stehen grundsätzlich zwei Mechanismen zur Weiterleitung des Signals zur Verfügung: Durch spezifische Wechselwirkungen mit einem Effektorprotein wird dieses aktiviert und leitet seinerseits das Signal weiter – bestes Beispiel für diese Möglichkeit sind die G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die cytosolische Domäne des Rezeptors über eine eigene enzymatische Aktivität verfügt, wobei es sich häufig um eine Tyrosinkinase-Aktivität handelt (Yarden&Ullrich,1988).

Zur Gruppe der Rezeptoren, die über keine eigene enzymatische Aktivität verfügen, zählen diejenigen, die eine G-Protein vermittelte Signalübertragung bewirken. Diese Rezeptoren können das durch einen extrazellulären Liganden übermittelte Signal nur durch die Interaktion mit einem heterotrimeren Komplex aus sog. G-Proteinen im Inneren der Zelle weiterleiten (Dohlman *et al.*, 1991). So sind diese Systeme z.B. für die Weiterleitung eines Lichtreizes oder aber die Empfindung eines Geschmackes verantwortlich (Strader *et al.*, 1994). Häufig wird dieser Typ von Rezeptor auch als Sieben-Helix-Transmembranrezeptor oder als Serpentin-Rezeptor bezeichnet, was einen Hinweis auf die Struktur dieses Rezeptortyps gibt. Durch die Isolation verschiedener bekannter Rezeptoren konnte man nach Homologievergleichen sieben, zwischen 20-25 Aminosäuren lange Abschnitte identifizieren, die besonders hydrophobe Seitenketten aufweisen. Von diesen sog. Transmembrandomänen nimmt man an, dass sie die Membran in Form von α -Helices durchspannen und begrenzende, hydrophobe Aminosäuren diese Strukturen in der Membran fixieren. Extra- und intrazelluläre Loops, die einen eher hydrophilen Charakter aufweisen, verbinden die einzelnen Transmembrandomänen und zeigen besondere Merkmale: In den extra- und intrazellulären Loops findet man häufig konservierte Cysteinreste, von denen man annimmt, dass sie über Disulfidbrücken einzelne Loops miteinander

verbinden und somit die Struktur stabilisieren und formgebend wirken. Die extrazellulären Regionen weisen außerdem Glykosilierungssignale (Asn-X-Ser/Thr) auf, was die Variabilität der Ligandenbindungsstelle vervielfacht. Die intrazellulären Loops, insbesondere der C-Terminus, verfügen über posttranslationale Modifizierungen in Form von Palmitoylierung. Diese Modifikation dient höchstwahrscheinlich der Membranverankerung des C-Terminus (Strader *et al.*, 1994).

Detaillierte Informationen über die Struktur der extra- und intrazellulären Domänen sind derzeit noch nicht vorweisbar, da sich Röntgenstrukturanalysen auf Grund des hydrophoben Membrancharakters als schwierig gestalten (Muller, 2000).

1.2.2 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine interagieren mit dem cytoplasmatischen Bereich der Sieben-Helix Transmembranrezeptoren (Hepler *et al.*, 1992). Das gemeinsame Strukturmerkmal ist der Aufbau des Komplexes aus drei verschiedenen Untereinheiten, die bei höheren Eukaryonten durch große Genfamilien kodiert werden (Simon *et al.*, 1991; Kaziro *et al.*, 1991).

Die größte Untereinheit stellt die alpha-Untereinheit mit einer Masse von 39-46 kDa dar, die über eine GTP-Bindungsstelle verfügt. Die G-beta Untereinheit weist eine Größe von ca. 37 kDa auf und die G-gamma Untereinheit ist ca. 8 kDa groß. Die G-Proteine werden anhand der Sequenzen ihrer G-alpha Untereinheit in vier Klassen unterteilt. Man unterscheidet die Gs-Familie (Bindung an Hormonrezeptoren), die Gi-Familie (mit inhibitorischem Effekt auf die Adenylatzyklase), die Gq- und G12-Subfamilie (Hepler *et al.*, 1992).

Alle Funktionen der G-Proteine sind eng an die innere Seite der Zellmembran gebunden, was durch die Modifikation mit Membranankern (Myristoylierung oder Prenylierung) an die G-alpha und an den beta/gamma Komplex gewährleistet wird (Spiegel *et al.*, 1991). In ihrem inaktiven Zustand liegen die G-Proteine als heterotrimerer Komplex vor und die freie G-Nukleotid Bindestelle der alpha-Untereinheit ist durch GDP besetzt. Durch Bindung des Liganden an die extrazelluläre Seite des Rezeptor wird dieser aktiviert und der Rezeptor bindet den G-Protein-Komplex. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung der alpha-

Untereinheit und zur Abdissoziation des gebundenen GDPs. Die freie Bindungsstelle wird sofort durch GTP, das in der Zelle in hohen Konzentrationen vorliegt besetzt. Durch die GTP-Bindung dissoziiert der Komplex vom Rezeptor ab und teilt sich in die aktivierte G-alpha Untereinheit und einen Komplex aus G-beta/gamma auf. Beide "Untereinheiten" können nun das Signal auf verschiedene Effektormoleküle weitergeben, wobei es sich sowohl um ein inhibitorisches- als auch aktivierendes Signal handeln kann (Birnbaumer, 1992). Dabei sind zahlreiche Effektoren denkbar - so kann es z.B. zur Beeinflussung von Membran-Kanälen kommen oder aber Phospholipasen, die in den Fettmetabolismus involviert sind, werden reguliert. Möglich ist auch die Aktivierung von Second-Messenger produzierenden Proteinen, wie z.B. der Adenylatzyklase, die das cyclische Adenosinmonophosphat produziert (Tang&Gilman, 1992), oder aber die Guanylatzyklase, die z.B. bei der Vermittlung eines Lichtreizes eine wichtige Funktion besitzt (Baylor, 1996).

Mit der Hydrolyse des gebundenen GTPs durch die intrinsische GTPase Aktivität der alpha-Untereinheit wird die G-alpha-Untereinheit inaktiviert und erhöht dadurch seine Affinität zum beta/gamma-Komplex. Dieser wird gebunden und damit die Signalweiterleitung terminiert.

1.2.3 Der GTPase-Zyklus

Proteine, die der Superfamilie der regulatorischen GTPasen angehören, wie z.B. Angehörige der heterotrimeren G-Proteine oder aber Proteine der ras-Familie, durchlaufen einen zyklischen Ablauf funktionell unterschiedlicher Zustände (Bourne *et al.*, 1990).

Grundsätzlich kann man die aktive, GTP gebundene Form und eine inaktive, mit GDP assoziierte Form unterscheiden. Die Bindung von GTP führt zum Übergang in die aktive Form, die GTP-Hydrolyse, durch die intrinsische GTPase-Aktivität wieder zur Inaktivierung des Proteins. Während der unterschiedlichen Phasen und deren Übergänge tritt das G-Protein mit verschiedenen anderen Proteinen in Wechselwirkung, die unter Umständen die Aktivität der GTPase regulieren können. Wie stark ein Signal durch die GTPase weitergeleitet wird hängt vom Verhältnis von aktiver zu inaktiver Form ab und dieser Anteil aktiver GTPase wird durch mindestens vier verschiedene Prozesse beeinflusst:

I. Die Geschwindigkeit, mit der das gebundene GDP abdissoziiert wird von spezifischen Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEFs) erhöht. Für heterotrimere G-Proteine stellt in der Regel der Rezeptor den GEF dar (Boguski et al, 1993).

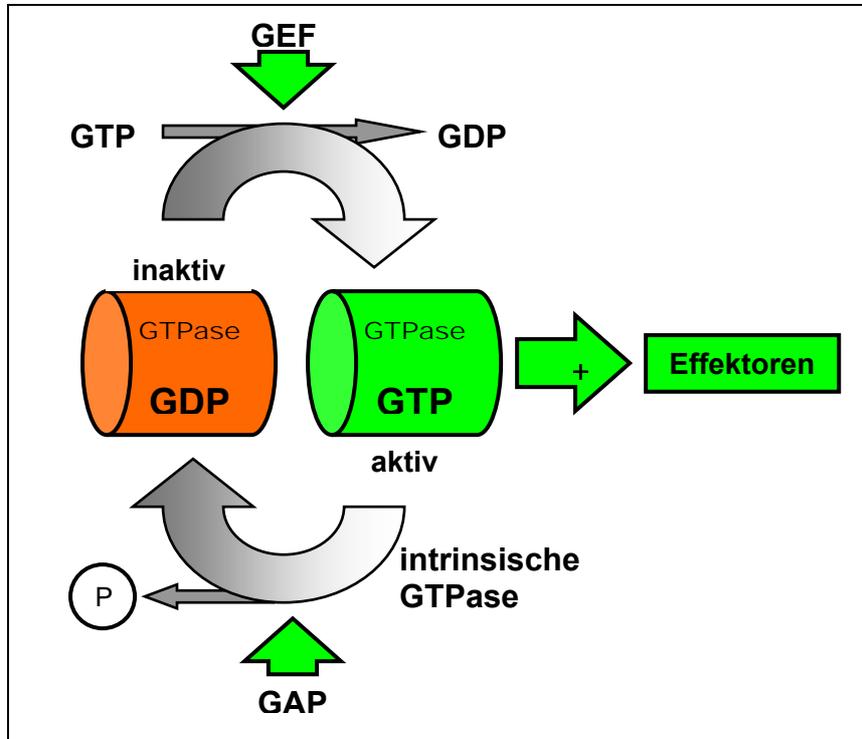


Abb. 1-2: Der GTPase-Zyklus.

Dargestellt ist die Funktion der regulatorischen GTPasen. Die GTP-gebundene Form stellt die aktive Form der GTPase (z.B. ein G-Protein) dar. Diese Form kann auf andere Effektoren einwirken. Die GDP-gebundene Form stellt die inaktive Form der GTPase dar. Durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) oder Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEFs) kann die Aktivität der GTPasen reguliert werden.

II. Die Abdissoziation des GDP kann durch spezifische Guaninnucleotid-Dissoziationsfaktoren (GDIs) inhibiert werden. Dadurch wird der inaktive Zustand der GTPase verlängert, bzw. die Signalweiterleitung blockiert.

III. Als dritter Faktoren wirken sog. GTPase-aktivierende-Proteine (GAPs), die die intrinsische GTPase Aktivität um ein vielfaches steigern können (Lamarche *et al.*, 1994). Mit Hilfe dieser GAPs kann die Signalweiterleitung stark abgeschwächt oder aber abgeschaltet werden.

IV. Einen nicht unerheblichen Einfluss besitzt die intrinsische GTPase-Aktivität der GTPase selbst, da sich Proteine dieser Familie in ihrer Aktivität stark unterscheiden können.

Die Stärke oder aber auch die Geschwindigkeit, mit der ein Signal über regulatorische GTPasen weitergeleitet wird, kann also von verschiedenen Faktoren modelliert werden, und aus einem einfachen "An/Aus-Schalter" kann so ein feinreguliertes System zur Signalweiterleitung werden. Außerdem hat die Zelle so die Möglichkeit über die verschiedenen Effektorproteine in die Signalweiterleitung einzugreifen und so die Signalstärke an z.B. unterschiedliche äußere Bedingungen anzupassen.

1.2.4 Ras-Proteine

Ras-Proteinen (auch p21-Proteine genannt) kommt besondere Bedeutung bei der Regulation von Wachstums- und Differenzierungsvorgängen in der Zelle zu. Diese Proteine verarbeiten Signale, die sie z.B. von Rezeptor-Tyrosinkinasen erhalten und geben diese an verschiedene Effektorsysteme weiter. Auch aktivierte, sonst an G-Protein gekoppelte Rezeptoren können Signale an das Ras-System weiterleiten (van Biessen *et al.*, 1995). Ras-Proteine werden heute in verschiedene Subfamilien eingeteilt, die durch eine Größe von 16-25kDa, eine intrinsische GTPase-Aktivität und eine Membranverankerung durch Lipidanker charakterisiert werden. Man unterteilt die Proteine der Ras-Superfamilie in die Ras/Rap-, die Rho/Rac-, die Rab-, die Ran- und die Arf-Familie (Boguski *et al.*, 1993).

Trotz einer großen Anzahl an isolierten Ras-Proteinen ist noch nicht viel über die direkten Effektoren dieser Proteine bekannt. Zu dem wohl populärsten Effektorprotein eines Ras-Proteins gehört die sog. raf-Proteinkinase (Daum *et al.*, 1994). Diese Ser/Thr-spezifische Protein-Kinase bindet an aktiviertes Ras-Protein und wird dadurch vom Cytoplasma an die innere Zellmembran lokalisiert. Raf selbst wird durch diesen Vorgang stimuliert und kann spezifisch das Signal an den MAP-Kinase-Weg weiterleiten (Daum *et al.*, 1994). Ein anderer Effektor des Ras-Proteins ist das Produkt des ksr-Gens (Kinase Suppressor of Ras - Gen), das eine hohe Homologie zum Raf-Protein aufweist (Downward, 1995) und für die Modulation des

Ras-Signales auf den MAP-Kinase-Weg verantwortlich zu sein scheint (Joneson, *et al.*, 1998).

Eine vollständige Übersicht der durch Ras-Proteine vermittelten Funktionen würde den Rahmen diese Arbeit sprengen, was die Bedeutung dieser GTPasen unterstreicht. An Ras-Proteinen laufen Signale unterschiedlichen Ursprungs zusammen, werden dort "verrechnet" und an Effektoren weitergeleitet. Ras-Proteine sind demnach multifunktionelle Signalproteine, die nicht nur lineare Signalabläufe steuern, sondern die im Mittelpunkt eines Netzwerks aus unterschiedlichen Signalketten stehen (Burgering, 1995).

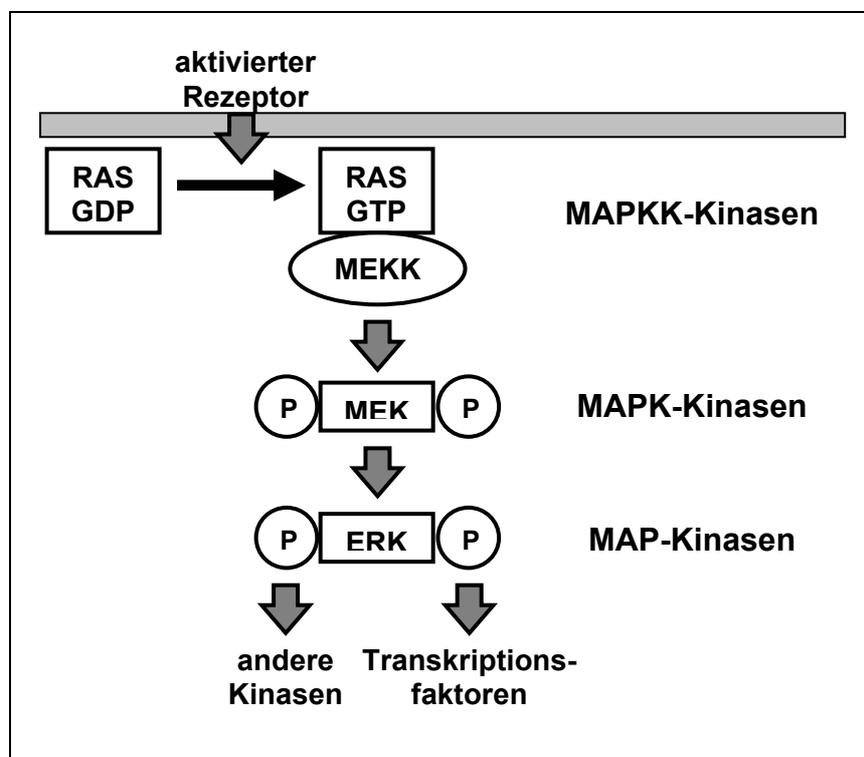


Abb. 1-3: Verbindung zwischen ras-Aktivität und MAP-Kinase-Kaskade..

Schematisch dargestellt ist die Funktionsweise einer MAP-Kinase und deren Stimulation durch das membrangebundene ras-Protein.

1.2.5 MAP-Kinase Kaskaden

Signale, die zur Regulation des Zellwachstums oder der Zelldifferenzierung dienen, werden in der Zelle häufig durch eine Kaskade hintereinandergeschalteter

Proteinkinasen weitergeleitet. Proteine der ras-Familie leiten Signale membranassoziiert weiter und sorgen durch die Phosphorylierung nachgeschalteter Tyrosinkinasen dafür, dass dieses Signal einen Weg in das Zellinnere z.B. bis in den Zellkern findet. Damit einher geht häufig die Aktivierung von regulatorischen Proteinen, die z.B. den Stoffwechsel entscheidend beeinflussen können (Cano *et al.*, 1995). Durch den sequenziellen Ablauf der Signalweiterleitung wird das Signal verstärkt, da ein einzelner Rezeptor eine große Anzahl an Kinasen aktivieren kann, die ihrerseits das selbe Potential besitzen. Das Signal kann aber auch an verschiedenen Stellen durch interagierende Faktoren verstärkt oder abgeschwächt werden, wodurch es zu einer feinen Modulierung der Reizweiterleitung kommen kann.

Die Schlüsselproteine, die ein Signal in das Zellinnere bis in den Zellkern transportieren können sind die sog. MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinase, häufig auch ERK = „extrazellulär regulierte Kinase“), die am Ende des MAPK-Weges in der Zelle stehen und denen in der Regel zwei weitere Proteinkinasen vorgeschaltet sind. Als konservierte Aminosäuresequenz enthalten alle MAP-Kinasen die TxY Sequenz, die durch die MAPK-Kinasen phosphoryliert werden (Crews *et al.*, 1992). Aktivierte MAP-Kinasen, die zu den Serin/Threonin-Kinasen gezählt werden, translozieren z.T. in den Zellkern und sind dort in die Regulation der Expression verschiedener Gene involviert (Seth *et al.*, 1992). Zu den Substraten von ERK gehören z.B. die ribosomale-S6-Kinase, der Transkriptionsfaktor myc oder die Phosphatase SHP6 (Cano *et al.*, 1995). Zu einer zweiten Gruppe von MAP-Kinasen gehören die "Stress-aktivierten-Protein-Kinasen" (SAPKs´) und die JNKs´ (Jun-N-Terminus-Kinasen) aus Mensch, die den N-terminalen Bereich des Transkriptionsfaktors Jun phosphorylieren (Davis, 1994; Kyriajis *et al.*, 1994).

Die MAPK-Kinasen, die den MAP-Kinasen vorgeschaltet sind, werden häufig auch als MEK-Kinasen (MAP/ERK-Kinase) bezeichnet und phosphorylieren sowohl den Tyr- als auch den Thr-Aminosäurerest der oben genannten konservierten Sequenz der MAP-Kinase. Den MAPK-Kinasen sind schließlich die MAPKK-Kinasen (MAP-Kinase-Kinase-Kinasen / MEKK) vorgeschaltet, bei denen es sich um Ser/Thr-spezifische Proteinkinasen handelt. Als prominenter Vertreter kann hier die raf1-Kinase angeführt werden, die durch ras-Proteine aktiviert wird (Daum *et al.*, 1994).

Für die MAP-Kinase-Kaskaden hat sich bisher ein sehr komplexes Bild ergeben. Es scheint mehrere parallele Wege in der Zelle zu geben, die durch unterschiedliche externe Signale aktiviert werden können. Man kann auch davon ausgehen, dass sich diese Wege untereinander modulieren und die Zelle somit ein sehr fein reguliertes System zu Verfügung hat, mit dem zahlreiche Vorgänge in der Zelle gesteuert werden können (Blumer *et al.*, 1994; Cano *et al.*, 1995). Deutlich wird auch, dass diese Kaskaden während der Evolution konserviert wurden, da man ähnliche MAP-Kinase Kaskaden in Mensch, Pflanzen und Hefen findet.

1.3 Signaltransduktion bei *Dictyostelium discoideum*

1.3.1 Die cAMP-Rezeptoren von *D. discoideum*

An *Dictyostelium discoideum* wurden intensive Untersuchungen an mehreren isolierten cAMP-Rezeptoren (sog. "cARs") durchgeführt. Bisher konnten aus dieser Genfamilie vier verschiedene cAMP-spezifische Rezeptoren identifiziert werden (cAR1-cAR4; Zusammenfassungen in Parent&Loomis, 1996; Loomis, 1996; Firtel, 1995). Die vier bekannten Rezeptoren werden während des vegetativen Wachstums und der Entwicklungsprozesse von *D. discoideum* zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich stark exprimiert (Klein *et al.*, 1988; Saxe *et al.*, 1991; Saxe *et al.* 1993; Johnson *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1993; Louis *et al.*, 1994). Wie bereits bei anderen Organismen beschrieben, gehören auch die cAMP-Rezeptoren von *D. discoideum* zu den Transmembranrezeptoren, die mit heterotrimeren G-Proteinen wechselwirken (Dohlman *et al.*, 1991; Strader *et al.*, 1994) und obwohl diese Rezeptoren aus *D. discoideum* untereinander zu 60% identisch sind, werden sie im Rahmen der Entwicklung sequenziell exprimiert und weisen eine unterschiedliche Affinität zu cAMP auf (Kim *et al.*, 1998).

cAR1

Die mRNA des cAMP-Rezeptors cAR1 ist annähernd über den gesamten Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum* hinweg nachweisbar (mit Ausnahme des Sporenstadiums). Das cAR1-Gen gehört zu den sog. "Prestarvation-Genen" (Rathi *et al.*, 1991), weswegen die Expression in der Wachstumsphase durch die Wahrnehmung von PSF (Prestarvation Faktor) induziert wird (Burdine&Clarke, 1995).

Durch cAMP-Pulse der frühen Entwicklungsphase erreicht die Expression von cAR1 ein Maximum etwa fünf Stunden nach Beginn des Entwicklungszyklus. Das cAR1-Transkript weist zu diesem Zeitpunkt eine Größe von ca. 1,9kb auf und ist in geringen Mengen bis hin zur Kulmination, also einem der späten Entwicklungsschritte nachweisbar. Nach ca. 6 Stunden tritt ein weiteres cAR1-Transkript auf, welches jedoch durch den selben Genlokus kodiert wird. Durch einen veränderten 5'-untranslatierten Bereich weist diese mRNA eine Größe von ca. 2,1kb

auf. Die Expression von cAR1 zu diesem Zeitpunkt wird durch eine kontinuierliche, extrazelluläre Konzentration an cAMP gewährleistet (Saxe *et al.*, 1991).

Da die Expression des cAR1 Rezeptors bereits durch PSF induziert wird, ist er in der Lage, die ersten cAMP-Signale der frühen Entwicklungsschritte, die auf das vegetative Wachstum hin folgen wahrzunehmen. *Dictyostelium discoideum* Klone mit einer Deletion des cAR1-Lokus können nicht aggregieren, da sie die zu Beginn der Aggregation niedrigen cAMP Mengen nicht wahrnehmen können. Somit erfolgt keine Aktivierung der AdenylatzyklaseA und die Zellen sekretieren kein cAMP, um den Impuls weiterzuleiten. Dies hat zur Folge, dass die Zellen nicht in der Lage sind, sich zu einem Zellaggregat zu vereinigen, da die cAMP induzierte Chemotaxis ausbleibt (Sun *et al.*, 1991; Pupillo *et al.*, 1992) und das „Startsignal“ zur Entwicklung somit nicht wahrgenommen wird. Hohe, künstlich hervorgerufene Konzentration an cAMP können allerdings diesen Phänotypen supprimieren und zur Ausbildung von Fruchtkörpern führen (Sun *et al.*, 1991).

cAR3

Die Deletion eines weiteren cAMP-Rezeptors - cAR3 - führt zu keinem morphologisch erkennbaren Phänotyp. Die Expression von cAR3 erreicht ein Maximum etwa 9 Stunden nach Start der Entwicklungsprozesse und ist ausschließlich auf Präsporenzellen begrenzt (Yu *et al.*, 1996). Durch die Deletion von cAR1 und cAR3 in einer Zelllinie konnte gezeigt werden, dass die Funktion beider Rezeptoren zum Teil redundant ist und die cytoplasmatische Seite beider Rezeptoren möglicherweise mit den selben G-Proteinen wechselwirkt (Insall *et al.*, 1994). cAR3 ist somit für die cAMP-Signalverarbeitung späterer Entwicklungsschritte verantwortlich.

cAR2

Mutanten mit einer Deletion des cAMP-Rezeptors cAR2 aggregieren normal, können aber die Entwicklung bis zum fertig ausgebildeten Fruchtkörper nicht vollenden und formen daher nur sog. "mounds", die als Zellhaufen sichtbar werden (Saxe *et al.*, 1993). Die Expression des cAR2-Gens beginnt ca. 10 Stunden nach Einsetzen der Entwicklung und ist bis zum Ende der Kulmination ausschließlich in Prästielzellen detektierbar (Saxe *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996).

cAR4

Ebenso wie cAR2 wird auch der vierte cAMP-Rezeptor - cAR4 - in Prästielzellen exprimiert.

Die Expression dieses Rezeptors ist in einem Zeitraum von "Tip"-Elongation und später Kulmination nachweisbar (Louis *et al.*, 1994). CAR4 Mutanten zeigen abnorme "Slugs" und Fruchtkörper, was einen Hinweis darauf gibt, dass cAR4 für die Zelldifferenzierung während der späten Entwicklung verantwortlich ist (Louis *et al.*, 1994).

In der Zusammenfassung der Merkmale der bisher in *D. discoideum* isolierten cAMP-Rezeptoren wird deutlich, dass alle vier Rezeptoren zwar cAMP als Liganden aufweisen, jedoch das Ergebnis der Signalwahrnehmung zu unterschiedlichen Antworten der Zelle führt. So dienen cAMP-Pulse als Signal für die frühe Kulmination, der die Chemotaxis der Zellen vorausgeht. In der späteren Entwicklung steuert das Zellaggregat die Differenzierung des Fruchtkörpers, indem nur ausgewählte Zellen die kontinuierliche Konzentrationen an cAMP wahrnehmen können. Durch die differentielle Expression der Rezeptoren während des Lebenszyklus und der unterschiedlichen Affinität der cARs´ zu cAMP hat die Zelle die Möglichkeit auf ein identisches Signal hin, gezielt dem Lebenszyklus entsprechend zu antworten.

1.3.2 Die G-Proteine von *D. discoideum*

Bisher konnten aus *Dictyostelium discoideum* dreizehn verschiedene G-Protein-Untereinheiten isoliert werden. Dabei wurde von elf Alpha-Untereinheiten (Brzostowski *et al.*, 2002), einer Gamma-Untereinheit (Zhang *et al.*, 2001) und einer Beta-Untereinheit berichtet (Lilly *et al.*, 1993) . Wie auch bei den cAMP-Rezeptoren ist das Expressionsmuster der G-Proteine während des Entwicklungszyklus unterschiedlich.

G α 1

G α 1 wird in vegetative wachsenden Zellen exprimiert und kann über den gesamten Zeitraum des Entwicklungszyklus hinweg nachgewiesen werden (Kumagai *et al.*, 1989). Eine Deletion von G α 1 zeigt keine morphologischen Auswirkungen, die Zellen können die einzelnen Entwicklungsschritte durchlaufen, um einen vollständigen Fruchtkörper zu bilden. Als wichtiger Effektor der G α 1-Untereinheit hat sich die PhospholipaseC aus *D. discoideum* erwiesen, die PIP2 (Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat) in IP3 (Inositol-1,4,5-triphosphat) und DAG (Diacylglycerol) hydrolysiert (Berridge, 1993; Dharmawardhane *et al.*, 1994; Bominaar *et al.*, 1991, Bominaar *et al.*, 1993; Bominaar *et al.*, 1994). Die aktivierte G α 1 Untereinheit fundiert dabei als Inhibitor der PLC, was die darauf folgenden Signalwege DAG -> PKC (ProteinkinaseC) und IP3 -> Ca²⁺ (Ca²⁺ Speicher des Endoplasmatischen Retikulums) ebenso beeinflussen dürfte.

G α 2

Zu den G-Protein-Mutanten mit einem leicht erkennbaren Phänotyp gehören die Mutanten der G α 2 Untereinheit. Diese zeigen keine Aggregation oder Differenzierungsprozesse, die Entwicklung ist demnach in einem frühen Stadium unterbrochen. Wie gezeigt werden konnte, ist die Signalübertragung durch extrazelluläres cAMP unterbrochen (Firtel, 1991), d.h. das extrazelluläre Signal wird nicht an die AdenylatzyklaseA, die Guanylatzyklase oder die PhospholipaseC weitergegeben. G α 2 wurde daher als der Bindungspartner von cAR1 und cAR3 identifiziert und ist für die cAMP-abhängige Signalweiterleitung zu den oben genannten Effektorproteinen verantwortlich (Kumagai *et al.*, 1991). Das G-Protein wird bereits während des vegetativen Wachstums exprimiert und erreicht seine maximale Expressionsstärke zwischen 3 und 10 Stunden nach Einsetzen der Entwicklung (Parent *et al.*, 1996).

G α 3

Auch G α 3 Deletionen führen zu einem Stopp während der Entwicklung, wenn diese Zellen nicht mit zusätzlichem exogenen cAMP kultiviert werden. Die Expression

einiger Gene, die für die cAMP-Signalweiterleitung in der frühen Entwicklung verantwortlich sind (cAR1, PDE und ACA) ist stark herabgesetzt oder nicht mehr nachweisbar. Damit gehört $G\alpha 3$ zu den Genen, die für die frühe und in gewissem Sinne auch für die späte Entwicklung essentiell sind, da über $G\alpha 3$ vermutlich Signale zur Expressionentwicklungsspezifischer Gene vermittelt werden (Brandon *et al.*, 1997).

$G\alpha 4$

Das $G\alpha 4$ Gen zeigt ein ungewöhnliches Expressionsmuster im Laufe der Entwicklung. Man findet eine schwache Expression während des vegetativen Wachstums, keine nachweisbare mRNA während der Aggregation, aber eine maximale Expression während des "mound"-Stadiums (Hadwiger *et al.*, 1992; Hadwiger *et al.*, 1991). Mit diesem Expressionsmuster ist auch der Phänotyp von $G\alpha 4$ -Deletionen korrelierbar: Vegetative Zellen wachsen im Vergleich zum Wildtyp langsamer, aggregieren dann aber normal und zeigen einen abnormen Phänotypen während der späten Entwicklung mit nur wenigen lebensfähigen Sporen (Hadwiger *et al.*, 1992).

Es konnte nachgewiesen werden, dass $G\alpha 4$ mit Rezeptoren wechselwirkt, die für die Folat-Erkennung während verschiedener Wachstumsphasen verantwortlich sind (Hadwiger *et al.*, 1994). Die Signalweiterleitung des cAMP-Systems ist allerdings von $G\alpha 4$ unabhängig. Neuere Ergebnisse zeigen, dass $G\alpha 4$ an der Weitergabe von Signalen beteiligt ist, die für die Zelldifferenzierung während der späten Entwicklung verantwortlich sind, die zur Bildung von Präsporenzellen führen (Hadwiger *et al.*, 1999).

$G\alpha 5$

Die G-Protein Untereinheit $G\alpha 5$ wird erst während der späteren Stadien der Entwicklung (Slug-Stadium) exprimiert. Wie $G\alpha 4$ ist auch $G\alpha 5$ an der Zelldifferenzierung von Präsporenzellen beteiligt und Deletionen dieser Untereinheit führen zu einer verzögerten Bildung des "Tip" (Hadwiger *et al.*, 1991; Hadwiger *et al.*, 1996).

G α 7 / G α 8

Deletionen der Untereinheiten G α 7 und G α 8 führen zu keinen nennenswerten phänotypischen Abnormalitäten, obwohl beide G-Proteine während des gesamten Entwicklungszyklus in unterschiedlicher Stärke exprimiert werden (Wu *et al.*, 1994). Strukturelle Besonderheiten weist die Primärstruktur von G α 8 auf: Der Untereinheit fehlt das sog. "TCATDT-Motiv", das bei allen bisher gefundenen G-Proteinen hoch konserviert ist. Außerdem weist der C-Terminus fünfzig zusätzliche Aminosäuren mit langen Asparagin-Wiederholungen auf (Wu *et al.*, 1994).

G β

Eine Besonderheit im Vergleich zu anderen höheren Organismen, weist *Dictyostelium discoideum* bei der G-Protein β -Untereinheit auf. Alle Daten deuten darauf hin, dass *Dictyostelium* nur über eine β -Untereinheit verfügt, die mit allen bisher isolierten α -Untereinheiten wechselwirkt (Lilly *et al.*, 1993). Die Untereinheit ist zu 90% identisch zur β -Untereinheiten von *C. elegans* oder *Drosophila* und wird während des vegetativen Wachstums und der Entwicklung stark exprimiert. Die β -Untereinheit von *Dictyostelium* ist nicht essentiell für Zellzyklus und Wachstum, allerdings zeigen G β -Mutanten keine Aggregation oder Entwicklungsprozesse. Wie auch bei Deletionen von G α 2 fehlt die Expression entwicklungsabhängiger Gene vollständig (Lilly *et al.*, 1993). Für G β konnte gezeigt werden, dass diese Untereinheit an der Signalweiterleitung während der Chemotaxis und Phagozytose beteiligt ist - G β -Mutanten zeigen bei diesen Vorgängen eine abnorme Regulation des Aktin-Cytoskeletts (Peracino *et al.*, 1998).

G γ

Zu γ -Untereinheiten fehlen zur Zeit noch Daten, da diese Untereinheit bisher nicht isoliert werden konnte. Ob die β -Untereinheit also mit einer einzelnen oder einer Familie von γ -Untereinheiten einen Komplex eingeht, muss noch gezeigt werden.

1.3.3 Modulierende Proteine des GTPase-Zyklus:

Seit ras-abhängige Signaltransduktionsmechanismen mehr in den Vordergrund gerückt sind, ist man bemüht, auch bei *Dictyostelium discoideum* die entsprechenden homologen Proteine zu isolieren, die modulierend in die Funktionen der GTPasen eingreifen. Bisher sind erst wenige GTPase-modulierende Proteine in *D. discoideum* charakterisiert worden und die Funktion dieser Komponenten ist leider erst wenig aufgeklärt.

Zu den in *Dictyostelium* bekannten Guanin-Austauschfaktoren (GEF) gehören aimless (aleA; Insall *et al.*, 1996), darlin (darA; Vithalani *et al.*, 1998), RasGEFB (Wilkins *et al.*, 2000) und Armadillo (Vithalani *et al.*, 1998). Circa. 25 weitere homologe Gene liegen - erkannt durch das *Dictyostelium*-Genomprojekt - als Sequenzdaten vor (Wilkins&Insall, 2001; Wilkins *et al.*, 2005).

Darlin wurde als ein Protein mit einer Größe von 88kDa identifiziert, das verschiedene GTPasen wie z.B. racE (Larochelle *et al.*, 1996) bindet und diese wahrscheinlich in ihrer Funktion beeinflusst. Ob Darlin auch über diese GTPasen seine Wirkung auf die zelluläre Aggregation ausübt, ist bisher unklar. Armadillo ist nicht, wie aus anderen Organismen bekannt für Cytokinese, Pinozytose, Phagozytose oder die Entwicklung verantwortlich, allerdings gibt es Anzeichen dafür, dass Armadillo für die Modulation des cAMP-Response über einen bisher nicht aufgeklärten Signalweg in der frühen Entwicklung verantwortlich ist (Vithalani *et al.*, 1998).

Zu den funktionell gut charakterisierten GEF's gehört RasGEFB (Wilkins *et al.*, 2000). Interessanterweise enthält die RasGEF-Sequenz außerhalb der GEF-Domäne keine weiteren, für diesen Typ von Protein bei anderen Organismen üblichen Domänen, wie z.B. PH oder SH-Domänen. Dies könnte darauf hinweisen, dass *Dictyostelium*-RasGEF Proteine, wie z.B. GefB nur auf sehr wenige Signale reagieren können, da ihnen Bindungsstellen für Signalmoleküle, wie z.B. cAMP oder Bindungsstellen für andere Effektor-Protein fehlen. RasGEFB wird maximal zwischen 8 und 14 Stunden nach Start der Entwicklungsprozesse exprimiert. *Dictyostelium* Zellen, die keine RasGEFB exprimieren können, sind nicht in der Lage einen Slug zu formen.

Für die Gruppe der GTPase-aktivierenden Proteine (GAP) wurden bereits mehrere Proteine beschrieben. Mit Hilfe der PCR konnte ein rhoGAP homologes Protein aus *Dictyostelium discoideum* isoliert werden (Lancaster *et al.*, 1994). Das Protein mit dem Namen DdRacGAP (Ludbrook *et al.*, 1997) zeigt starke Homologien zu anderen rhoGAP-Proteinen aus Mensch und verfügt über eine SH3- und Pleckstrin-Domäne. Über die Funktion dieses Proteins gibt es bisher keine Daten.

Ein weiteres Protein aus dieser Familie ist DGAP1, das aus *Dictyostelium discoideum* isoliert werden konnte (Faix *et al.*, 1996). Die Deletion dieses Proteins führt zu einem schnelleren Wachstum auf Bakterien und die Formierung von Fruchtkörpern mit zahlreichen "tips". Man nimmt an, dass DGAP1 mehrere Aufgaben zukommen, wozu die Regulation der Phagozytose von Bakterien und Funktionen während der Mitose zählen (Faix *et al.*, 1996).

Proteine mit einer homologen Funktion wie die GDIs´ aus anderen Organismen konnten bisher aus *D. discoideum* nicht isoliert werden.

1.3.4 Ras-Proteine von *D. discoideum*

Aus *D. discoideum* wurden bereits mehrere Ras-homologe Proteine isoliert und charakterisiert. Zu der Familie der Ras/Rap-Homologen gehören die Proteine rasD, rasG, rasB, rasS, rasC und rap1.

Für rasB sind bisher keine Daten über Funktion und Wechselwirkungspartner bekannt, gut charakterisiert ist neben der Sequenz das Expressionsmuster: RasB wird während des vegetativen Wachstums und während der ersten acht Stunden der Entwicklung exprimiert (Daniel *et al.*, 1993).

RasC akkumuliert zwischen vier und zwölf Stunden nach Einsetzen der Entwicklung (Daniel *et al.*, 1994). Ebenso wie rasC scheint rasS entwicklungspezifisch zu sein, denn die mRNA wird erst vier Stunden nach Einsetzen der Entwicklung nachgewiesen und ist bereits nach weiteren vier Stunden nicht mehr nachweisbar (Daniel *et al.*, 1994).

Für rasD und rasG sind zahlreiche Daten gesammelt worden. RasG kann bereits während des vegetativen Wachstums nachgewiesen werden und erfährt in den ersten drei Stunden der Entwicklung eine weitere Expressionssteigerung. Danach

wird die mRNA und das Protein schnell bis unter die Nachweisgrenze abgebaut (Robbins *et al.*, 1989; Khosla *et al.*, 1990; Robbins *et al.*, 1992). *D. discoideum* Zellen, die eine dominant negative Form von rasG exprimieren zeigen ein verlangsamtes Wachstum auf Bakterien und produzieren mit dem Einsetzen der Entwicklung nur wenige, kleine Aggregate. Es wird daher angenommen, dass rasG in die Regulation des vegetativen Wachstums von *Dictyostelium discoideum* involviert ist. Das GTPase soll dabei für die Weiterleitung von Signalen verantwortlich sein, die von Rezeptoren für Nahrungsmittel ausgehen und für die Inhibition der AdenylatzyklaseA verantwortlich sind (Thiery *et al.*, 1992; Khosla *et al.*, 1996).

Das ras-Homolog rasD weist eine hohe Ähnlichkeit zu rasG auf, zeigt aber ein abweichendes Expressionsmuster. RasD ist in vegetativen Zellen nachweisbar und akkumuliert mit dem Start der Entwicklung, dabei kann rasD nur in Prästielzellen des "Slugs" nachgewiesen werden. Mit dem Auftreten von frühen "Kulminaten" wird rasD schnell abgebaut (Reymond *et al.*, 1984). Die Überexpression von dominant aktiven Mutationen (erhöhte GTPase-Aktivität) von rasD in *Dictyostelium*-Zellen führt zur Anhäufung von Aggregaten mit zahlreichen "Tips" und einer Blockade der weiteren Entwicklung in diesem Stadium (Reymond *et al.*, 1986). Außerdem kommt es zu einer Veränderung des Expressionsmusters von cAMP-abhängigen Genen wie z.B. cAR1 (Luderus *et al.*, 1992). In einer aktuellen Arbeit wird gezeigt, dass rasD und rasB verschiedene Aufgaben von rasG übernehmen können. Dazu wurden Vektoren mit den entsprechenden ras-Proteinen mit rasG-Promotoren in rasG-Mutanten transformiert. Es zeigte sich, dass bestimmte Aufgaben, wie z.B. Cytokinese übernommen werden können, bestimmte Kombinationen aber fatale Effekte auf die Zellen haben (Khosla *et al.*, 2000).

Zu den isolierten GTPasen aus *Dictyostelium* gehört auch das sog. rap1-Gen (Ddrap1), das eine hohe Homologie zu menschlichen GTPasen des selben Typs aufweist (Robbins *et al.*, 1990). Rap1 nimmt Einfluss auf die Regulation der Zellmorphologie, bzw. die Aktivität des Cytoskeletts (Rebstein *et al.*, 1993; Rebstein *et al.*, 1997) und ist maßgeblich an der Kontrolle des Phagozytose-Vorgangs beteiligt (Seaston *et al.*, 1999).

Neben GTPasen der Ras/Rap-Gruppe wurden auch zahlreiche Homologe der Rho/Rac-Familie aus *Dictyostelium discoideum* isoliert (Bush *et al.*, 1993). Wie auch für rap1 konnte für einige Mitglieder dieser Familie der Einfluss auf Cytokinese und Phagozytose gezeigt werden (Laroche *et al.*, 1996; Seastone *et al.*, 1998). Ebenso konnten mehrere rab-Homologe Gene aus *D. discoideum* durch cDNA-Screens mit konservierten Sequenzen isoliert werden (Bush *et al.*, 1993; Dragoi *et al.*, 1998).

1.3.5 Bekannte extrazelluläre Faktoren

Wie auch andere Organismen kommunizieren *Dictyostelium discoideum* Zellen über extrazelluläre Botenstoffe miteinander, die sie zu bestimmten Zeitpunkten ihres Lebenszyklus selbst produzieren und sekretieren. Zu diesen Substanzen gehören einfache Verbindungen, wie Ammonium (Hopper *et al.*, 1993) oder das zyklische Adenosinmonophosphat (Konijn *et al.*, 1968; Firtel, 1996), aber auch komplexe Polypeptide wie das Glykoprotein CMF (Mehdy *et al.*, 1985; Gomer *et al.*, 1991), das 40kDa große *countin* Protein (Brock&Gomer, 1999), der *prestarvation*-Faktor PSF (Clarke *et al.*, 1988; Rathi *et al.*, 1991) und die Sporen-Differenzierungs-Faktoren SDF-1 und SDF-2 (Anjard *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1999). Jeder dieser Faktoren hat entscheidende Auswirkungen auf Wachstums- und Entwicklungsvorgänge im Lebenszyklus von *D. discoideum*, daher sollen die für diese Arbeit wichtigen Faktoren kurz vorgestellt werden.

PSF

In den achtziger Jahren wurde gezeigt, dass einige *Dictyostelium*-Proteine während bestimmter Lebensstadien vermehrt synthetisiert werden (Loomis, 1975; Cardelli, *et al.*, 1985). Zu diesen Proteinen gehört auch das Discoidin-I-Protein (Loomis *et al.*, 1985; Clarke *et al.*, 1987). Schon in den ersten Veröffentlichungen wurde herausgestellt, dass die Expression von Discoidin und auch anderen Proteinen (z.B. α -Manosidase und β -Galaktosidase-2) durch die Zelldichte von *D. discoideum* im Vergleich zur Nahrungsquelle (Bakterien) im umgebenden Medium reguliert wird (Clarke *et al.*, 1987; Clarke *et al.*, 1988). Mittels Northern-blot Analysen wurde nachgewiesen, dass nicht nur die Enzymaktivität ansteigt, sondern direkt die

Expression dieser Gene erhöht wird. Die Zelldichte reguliert also die Expression unterschiedlicher Gene zu einem definiertem Zeitpunkt (Rathi *et al.*, 1991).

Mit der Beobachtung der Discoidin-Expression in unterschiedlichen Wachstumsmedien (axenisches Medium oder Bakteriensuspensionen verschiedener Dichte) und mit Hilfe von Mischexperimenten von PSF-haltigen Puffern mit frischen Puffern wurde ein löslicher, extrazellulärer Faktor postuliert – der *Prestarvation-Faktor PSF* (Clarke *et al.*, 1988). Mit dem Prestarvation Faktor wurde auch ein neuer Teil des Lebenszyklus von *D. discoideum* erkannt, nämlich eine Phase des Wachstums, die der später einsetzenden Entwicklung (s. Lebenszyklus *Dictyostelium*) vorangestellt ist. Vor dem Verbrauch der Nahrungsquelle erkennt *Dictyostelium* bereits den drohenden Nahrungsmangel (Starvation), und bereitet die später anschließenden Entwicklungsprozesse (Development) vor.

Dies bedeutet auch, dass möglicherweise als „entwicklungsspezifisch“ bezeichnete Proteine u.U. auch durch ein vorher bereits vorhandenes „Hungersignal“ induziert werden und somit nicht als entwicklungsspezifisch, sondern als „prestarvation“-abhängig zu bezeichnen sind (Clarke *et al.*, 1987&1988; Rathi&Clarke, 1992). Weiter noch liegt die Annahme nahe, dass Komponenten der cAMP Signalwege eine initiale Induktion durch eben dieses Signal erfahren müssen, was durch Northern-blot Analysen nachgewiesen werden konnte (Rathi&Clarke, 1992). So wird der cAMP-Rezeptor cAR1 und die Phosphodiesterase durch PSF induziert. PSF scheint also diesen Signalweg zu etablieren, bevor sich dieser durch eine positive Rückkopplung selbst amplifiziert.

Während der Prestarvation-Phase erkennt *Dictyostelium discoideum*, dass die Nahrungsquelle bei weiterem Wachstum aufgebraucht wird und daher die Initiierung der Entwicklung erfolgen muss. Dies geschieht anscheinend über die kontinuierliche Sekretion von PSF durch die Zelle selbst, d.h. die PSF Konzentration im umgebenden Medium wächst konstant im Verhältnis zur Zelldichte (PSF wird nicht abgebaut, sondern liegt stabil vor (Burdine&Clarke, 1995)). Gleichzeitig zur Sekretion des Prestarvation Faktors ermittelt die Zelle das Verhältnis PSF zu eigener Zelldichte und leitet daraus direkt die Expression verschiedener Prestarvation-Gene her. Die Anwesenheit von Bakterien im umgebenden Medium wirkt dabei inhibierend auf die Fähigkeit der Zelle auf PSF zu reagieren. Somit ist die Reaktion der Amöbe auf PSF nicht auf eine bestimmte Zelldichte beschränkt, sondern eher auf ein bestimmtes

Verhältnis von Bakteriendichte, PSF und eigener Zelldichte im Medium (Clarke *et al.*, 1988). Der eigentliche „prestarvation-response“ (die Induktion der PSF-spezifischen Gene) erfolgt drei bis vier Generationen vor dem Ende des exponentiellen Wachstums (Clarke *et al.*, 1988; Rathie *et al.*, 1991).

Um auszuschließen, dass PSF und CMF (siehe unten) identische Faktoren sind, wurde eine CMF-Antisense Mutante auf ihre Fähigkeit hin überprüft, PSF zu sekretieren. Da die Zellen auch ohne CMF-Protein dem Entwicklungsstand entsprechende Prestarvation-Gene induzieren können, nimmt man an, dass CMF und PSF in der Tat zwei unterschiedliche Faktoren sind (Clarke *et al.*, 1992; Clarke&Gomer, 1995). Ferner wurde gezeigt, dass die Produktion von PSF mit dem Einsetzen der Entwicklung (wenn man diesen Zeitpunkt genau festlegen kann) schnell stagniert.

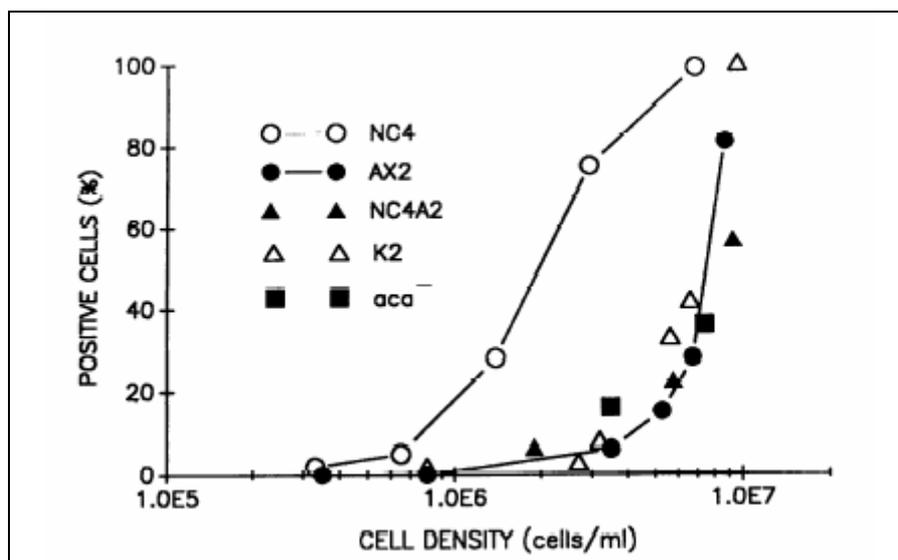


Abb. 1-4: Dichteabhängige Induktion der DiscoidinI-Expression in verschiedenen Dictyostelium-Stämmen.

Dargestellt ist der Anteil an positiven Zellen, die Discoidin bei der angegebenen Zelldichte exprimieren. Dabei fällt auf, dass der axenische Stamm Ax2 eine verzögerte Reaktion auf das im Medium vorliegende PSF aufweist.

Entnommen aus: . Burdine, V. & Clarke, M. (1995). Genetic and physiologic modulation of the prestarvation response in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell*, **6**, S. 311-325. (Abbildung 2, Seite 314).

Die biochemische Aufreinigung des PSF-Faktors stellt ein großes Problem dar. Zwar gelingt es, den Faktor bis zu 50fach anzureichern, aber mit dieser Anreicherung geht auch ein Großteil der Aktivität verloren (Clarke *et al.*, 1992; Burdine&Clarke, 1995). Biochemische Untersuchungen lassen aber den Schluss zu, dass es sich um ein ca. 70kDa großes Glykoprotein handelt, das im Gegensatz zu CMF nicht hitzestabil ist (Rathi *et al.*, 1991; Clarke&Gomer, 1995). Der Faktor liegt aber im Medium einer *Dictyostelium*-Kultur stabil vor, und wird weder durch die anwesenden Bakterien, noch durch *Dictyostelium* selbst abgebaut (Burdine&Clarke, 1995). Konditionierte Puffer, die von allen Zellbestandteilen getrennt sind und auf Eis gelagert werden, sind für mehrere Tage ohne Verlust aktiv (pers. Beobachtung&pers. Kommunikation Clarke, Wetterauer).

Bereits in den ersten Arbeiten zu PSF wurde gezeigt, dass auch DiscoidinI zu den sog. Prestarvation-Genen gehört, und somit bei noch ausreichendem Nahrungsangebot induziert wird. Unterschiede konnten dabei zwischen dem Wildtyp NC4 und den axenischen Stämmen Ax3, bzw. Ax4 gezeigt werden.

Die Discoidin-Expression beider Stämme wurde bei exponentiellem Wachstum in *Klebsiella*-Suspension untersucht (siehe Abb. 1-4). Unterschiede zeigten sich bei der entwickelten PSF-Aktivität (sekretiertes PSF) und bei der Antwort der Zellen auf identische Konzentrationen von PSF im umgebenden Medium (Discoidin-Expression). Hier wurde gezeigt, dass im Vergleich zu Wildtypzellen axenische *Dictyostelium*-Zelllinien 2-3 mal mehr PSF-Aktivität sekretieren, jedoch nur langsam auf extrazelluläres PSF reagieren (Burdine&Clarke, 1995). Der Stamm NC4 dagegen steigert seine Discoidin-Expression kontinuierlich, während axenische Zellen eher verzögert, dann aber mit stärkerer Steigung reagieren. Die Mutation(en), die zum axenischen Wachstum nötig sind, sind also mit der Veränderung der Discoidin-Expression und der Sekretion von PSF-Aktivität gekoppelt.

CMF

Eine herausragende Eigenschaft biologischer Systeme ist ihre Fähigkeit sich selbst in Strukturen zu organisieren und dabei eine bestimmte Zellzahl einzuhalten. Die Zelldichte wird dabei häufig über extrazelluläre Faktoren bestimmt, die von ausgewählten Zellen sekretiert werden.

Dictyostelium discoideum Zellentreten bei Nahrungsmangel in der Entwicklungszyklus ein und geben dabei „Hungersignal“ an ihre Umgebung ab, den sog. *conditioned media factor* CMF (Gomer *et al.*, 1991). CMF wird ausschließlich von hungernden Zellen abgegeben und ist bei vegetativ wachsenden Zellen nicht nachweisbar. Das 80kDa große Protein hat keine Ähnlichkeit mit anderen bekannten, sekretierten Proteinen und wird von *Dictyostelium* sowohl in das umgebende Medium abgegeben, als auch gleichzeitig gemessen (Clarke&Gomer, 1995). Die Funktion von CMF scheint in der Koordination der hungernden Zellen zu liegen. Ohne den CMF-Mechanismus würden einzelne, hungernde Zellen zu ineffektiven Zellverbänden und Fruchtkörpern aggregieren. CMF bewirkt, dass die Zellen erst mit der Bildung von Fruchtkörpern beginnen, wenn ausreichend viele Zellen in der nahen Umgebung ebenfalls hungern und damit auf die Aggregation vorbereitet sind. Das CMF essentiell für den Eintritt in die Entwicklung ist, wurde mit Hilfe einer CMF-Antisense-Mutante gezeigt, die ohne die Zugabe von rekombinanten CMF nicht zur Aggregation in der Lage ist (Jain *et al.*, 1992).

Der Wirkungsmechanismus von CMF liegt in der Beeinflussung der cAMP Signalprozesse (Yuen *et al.*, 1995, Van Haastert&Gomer, 1996). Der Ca^{2+} Influx wird stimuliert, AdenylatzyklaseA und Guanylatzyklase werden ohne die Anwesenheit von CMF stark inhibiert, bzw. nicht ausreichend aktiviert. CMF beeinflusst scheinbar den cAMP Signalweg über cAR1 und $G\alpha 2$ indem die Lebenszeit des $G\alpha 2$ -GTP Komplexes (aktive Form) prolongiert wird (Brazill *et al.*, 1997) und somit das Signal (cAMP) in ausreichender Stärke weitergeleitet werden kann. Des weiteren gibt es Hinweise darauf, dass dieser Einfluss von CMF über einen weiteren G-Protein gekoppelten Rezeptor stattfindet. Als Kandidat wurde $G\alpha 1$ ermittelt, da $G\alpha 1$ Mutanten ebenfalls keine CMF-vermittelte Steuerung der GTPase-Aktivität von $G\alpha 2$ aufweisen (Brazill *et al.*, 1998). Somit ist $G\alpha 1$ eine Komponente des CMF-Signalweges (Jain&Gomer, 1994; Deery&Gomer, 1999). Eine weitere Komponente dieser Signalkette ist die PhospholipaseC, die eine $G\beta$ -abhängige Aktivierung durch CMF erfährt (Brazill *et al.*, 1998). Nach dem bestehenden Modell setzt CMF die GTPase-Aktivität von $G\alpha 2$ über einen Signalweg bestehend aus CMF-Rezeptor/ $G\alpha 1$ + $G\beta$ /PLC/IP3 herab und kann auf diesem Wege die Intensität (Dauer)

des cAMP-Signales in der Zelle erhöhen, das die Voraussetzung für den Beginn der Aggregation darstellt (Brazill *et al.*, 1998).

CMF ist also ein Faktor, der essentiell für die Etablierung des cAMP Systems in der Zelle ist, was später die Aggregation einzelner Amöben steuert (Yuen *et al.*, 1995; van Haastert & Gomer, 1996).

1.4 Die Regulation der Discoidin-Expression in *D. discoideum*

Was ist Discoidin?

Die Discoidin-Genfamilie wurde bereits 1974 beschrieben (Simpson *et al.*, 1974). Die Produkte dieser Gene sind an der Wechselwirkung zwischen *Dictyostelium*-Zelle und Substratum beteiligt (Tsang *et al.*, 1981, Devine *et al.*, 1982; Poole *et al.*, 1981). Mutation (oder auch Antisense-Transformanten; Crowley *et al.*, 1985), die diese Genfamilie betreffen, beeinflussen das Strömungsverhalten der Zellen während der frühen Entwicklung. Genauer betrachtet stellen alle Discoidin-Vertreter N-Acetylgalactosamin-bindende Lectine dar, die als funktionelle Gruppe die Aminosäuresequenz Gly-Arg-Gly-Asp (RGDH) aufweisen, welche auch beim Fibronectin vorkommt (Springer *et al.*, 1984). Discoidin dient also als ein Protein, welches für den Zell-Zell und Zelle-Substratum-Kontakt nötig ist und wird daher von den Zellen bereits während des Wachstums gebildet und an der Zelloberfläche präsentiert (Clarke *et al.*, 1987). Andere Ergebnisse zeigen jedoch, dass Discoidin Proteine auch cytoplasmatisch vorliegen und Funktionen bei der Zellmorphologie und Aggregation ausüben (Alexander *et al.*, 1992).

1.4.1 Regulation der Discoidin-Expression durch cAMP-Rezeptoren

Bisher konnte nur für die cAMP-Rezeptoren cAR1 und cAR3 ein Einfluss auf die Discoidin Regulation beschrieben worden (Blusch *et al.*, 1995; Endl *et al.*, 1996). Der Rezeptor cAR1 unterstützt die Induktion der cAMP abhängigen Gene der frühen Entwicklungsphase. Für DiscoidinI konnte der genau umgekehrte Fall nachgewiesen werden - über cAR1 wird durch extrazelluläres cAMP die DiscoidinI Expression reprimiert (Blusch *et al.*, 1995). Im Gegensatz zur bekannten Redundanz einiger Elemente der cAMP-Signalweiterleitung kann im Falle der Discoidin Regulation der

cAR3 Rezeptor die Aufgabe von cAR1 nicht übernehmen. Höchstwahrscheinlich bewirkt cAR1 eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} Spiegels und vermittelt so die Repression von Discoidin (Endl *et al.*, 1996). Es ist bereits bekannt, dass extrazelluläres cAMP den Influx von Ca^{2+} in die Zelle bewirkt. Dieser Effekt wird über die Rezeptoren cAR1, cAR2 und cAR3 vermittelt (Milne *et al.*, 1993; Schlatterer *et al.*, 1994). Im Fall der Discoidin-Regulation scheint es sich ebenso um einen durch cAR1 vermittelten Effekt zu handeln, allerdings kann keine genaue Aussage darüber gemacht werden, ob cAR1 direkt an der Signalweiterleitung zum Membrantransporter hin beteiligt ist oder aber nur für die Expression eines oder mehrerer Faktoren sorgt, die diesen Vorgang vermitteln (Endl *et al.*, 1996).

1.4.2 Regulation der Discoidin-Expression durch G-Proteine

Von den zehn bekannten G-Proteinen wurden bisher drei Untereinheiten auf ihre Funktion in der Discoidin-Regulation überprüft. Wie bereits unter Kapitel 1.4.1 erwähnt, ist der cAMP-Rezeptor cAR1 an der Repression der Discoidin Expression beteiligt (Blusch *et al.*, 1995). Da bekannt ist, dass die $G\alpha 2$ Untereinheit an diesen Rezeptor bindet (Kumagai *et al.*, 1989), wurde $G\alpha 2$ einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Überraschenderweise zeigte sich, dass $G\alpha 2$ nicht in den reprimierenden Signalweg über cAMP und cAR1 involviert ist, sondern für die vollständige Induktion der Discoidin-Expression verantwortlich ist (Endl *et al.*, 1996). $G\alpha 2$ Mutanten zeigen nur eine basale Discoidin-Induktion, die auf PSF zurückzuführen ist, aber keine weitere entwicklungsabhängige Induktion von Discoidin (Blusch *et al.*, 1995). Durch pharmakologische Untersuchungen konnte ferner gezeigt werden, dass durch die Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle und der damit einhergehenden Aktivierung der ProteinkinaseA die Funktion von $G\alpha 2$ überbrückt werden kann (Endl, 1994; Endl *et al.*, 1996). Dies zeigt, dass intrazelluläres cAMP zu den Hauptinduktoren der Discoidin-Expression gehört.

Auch die $G\alpha 1$ Untereinheit wurde auf ihren Einfluss für die Discoidin-Regulation überprüft. Diese Untereinheit scheint für eine reprimierende Funktion auszuüben, jedoch kann kein direkter Zusammenhang zu dem oben geschilderten cAMP/cAR1-Signalweg hergestellt werden, was eine weitere Signalkaskade oder eine Vernetzung verschiedener Signalwege denkbar macht. (Endl, 1994)

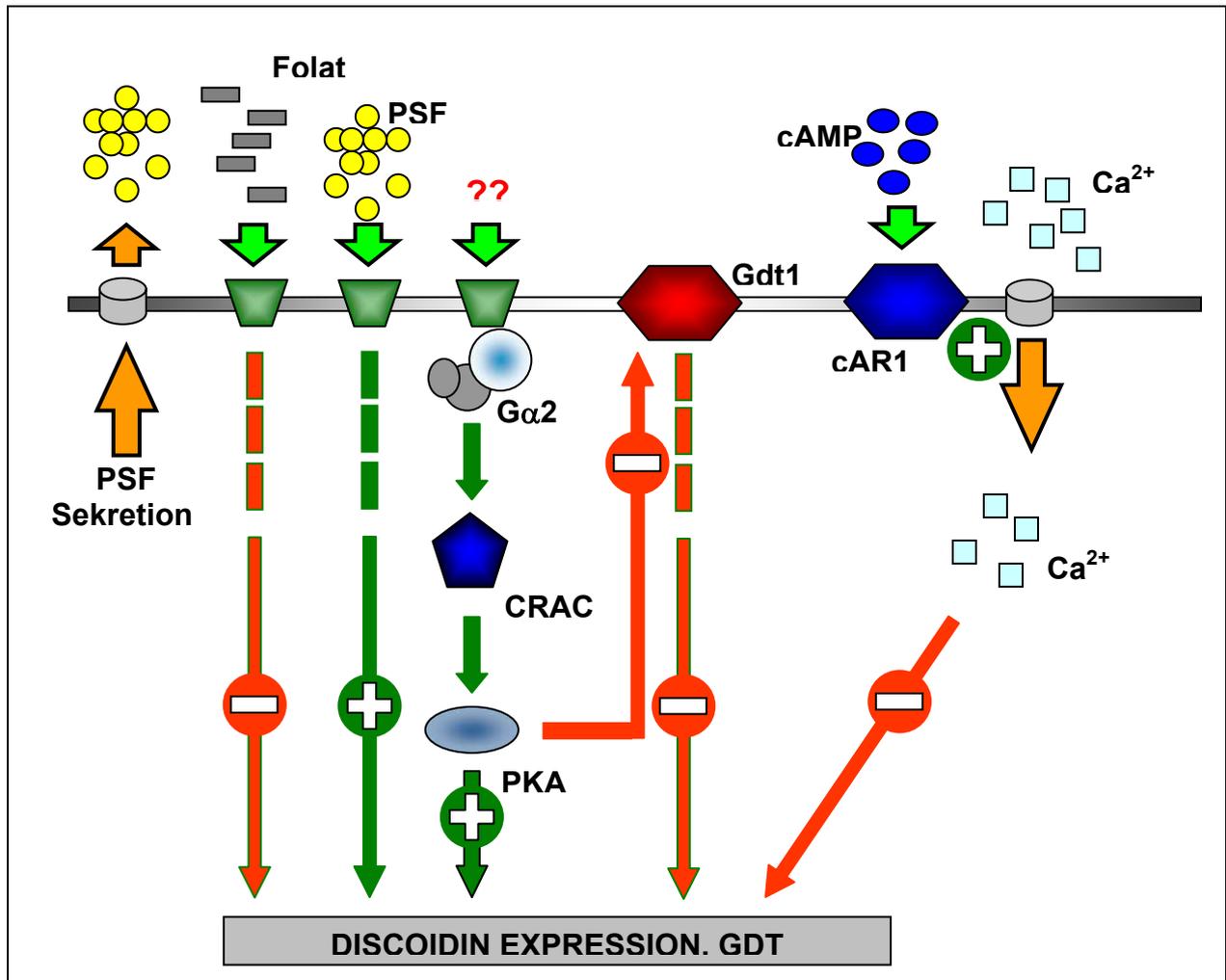


Abb. 1-5: Aktuelles Modell der Regulation der Discoidin-Expression.:

Dargestellt sind die bekannten Mechanismen und Komponenten, die einen Einfluss auf die Expression des Discoidin-Gens haben. Als extrazelluläre Faktoren sind Folat, PSF, und cAMP beschrieben. Folat wirkt reprimierend auf die Discoidin-Expression und kann über bisher unbekannte Mechanismen die Wirkung des stimulierenden Faktors PSF aufheben. cAMP bindet an den cAR1-Rezeptor und bewirkt wahrscheinlich eine Influx von Ca²⁺ in die Zelle, was zu einer Reprimierung der Discoidin-Expression führt. Eine Signalkaskade über einen bisher unbekannten Rezeptor leitet ein aktivierendes Signal über das G-Protein Gα2, CRAC (cytosolic activator of adenylyclase) und PKA in die Zelle. Zwischen diesem Signalweg und der aktivierenden Wirkung des Rezeptors gdt1 gibt es eine Verbindung, die eine Inaktivierung von gdt1 via PKA vermittelt (siehe Abschnitt 1.4.3). PSF (prestarvation factor) wird von den *Dictyostelium* Zellen während des vegetativen Wachstums kontinuierlich Sekretiert und reichert sich im Kulturmedium an. Dies führt schließlich zum sog. „prestarvation-response“, wodurch verschiedene Gene aktiviert werden – darunter auch Discoidin. Die für die PSF-Wahrnehmung, bzw. für die PSF-Sekretion nötigen Komponenten sind nicht bekannt..

Die einzige bei *Dictyostelium* vorkommende G β -Untereinheit wurde ebenfalls analysiert und einer pharmakologischen Untersuchung unterzogen. Für G β konnte während des Wachstums und der Entwicklung eine starke Discoidin-Expression gezeigt werden, was mit der fehlenden Repression durch Folat begründbar ist (Endl, 1994). Die G β -Daten sind allerdings nicht ausreichend verifiziert worden und Konflikte mit bereits publizierten Daten konnten nicht vollständig diskutiert werden.

1.4.3 Aktuelles Modell

Aus den bisher publizierten Daten zur Regulation der Discoidin-Expression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und der Möglichkeit Mutanten zu analysieren, die einen Defekt während des Übergangs von Wachstum zu Differenzierung/Entwicklung („gdt“: Growth differentiation transition) vorweisen, wurde ein Modell entwickelt, das diese Mechanismen beschreibt.

Der Beginn und die Steigerung der Discoidin-Expression kann - nach den vorliegenden Erkenntnissen - als ein Marker für den Aufbruch der *Dictyostelium*-Amöbe von einem Zustand des Wachstums und der Vermehrung hin zu Entwicklungsprozessen gelten, an deren Ende ein Fruchtkörper mit Sporen steht. Discoidin gehört dabei zu den sogenannten „Prestarvation-Genen“, die bereits vor der eigentlichen Kumulation der Zellen induziert werden. Welche Rolle die Discoidin-Proteine dabei spielen ist unklar - Fakt ist aber, dass mit diesem „Marker“ eine Methode gegeben ist, mit der man den Prozess des Überganges - den Wechsel von vegetativem Wachstum hin zur Entwicklung recht genau darstellen kann, lange bevor die Nahrungsquelle erschöpft sein wird!

Das aktuelle Modell berücksichtigt drei extrazelluläre Faktoren:

1. PSF wird durch *Dictyostelium* kontinuierlich gebildet und dient der Zelle dazu, ihre eigene Zelldichte im Bezug zur Nahrungsquelle zu evaluieren (siehe Abschnitt 1-3-5). Der Rezeptor für PSF und die beteiligten Signalkomponenten der Zelle sind bisher nicht beschrieben, allerdings die Wirkung von PSF auf die Discoidin-Expression - hierbei handelt es sich um einen stimulierenden Signalweg. Mit der Akkumulation von PSF im Medium steigert sich auch kontinuierlich die Discoidin-Expression.

2. Zu dem unter 1. beschriebenen Signalweg gibt es einen konkurrierenden Mechanismus, der durch Folat vermittelt wird. Folat wird in der Regel durch Bakterien sekretiert, die sich im umgebenden Medium befinden. Folat wirkt reprimierend auf die Discoidin-Expression und dies sowohl unter axenischen, als auch vegetativen Bedingungen. In hohen Konzentrationen kann Folat die Wirkung von PSF aufheben (Burdine&Clarke, 1995). Die Komponenten der Folat-vermittelten Discoidin-Repression sind noch nicht geklärt.
3. Ein weiterer Signalweg, der ebenfalls reprimierend wirkt, wird durch den Influx von Ca-Ionen in die Zelle vermittelt. Dieser Influx von Calcium wird über den cAR1-Rezeptor vermittelt, der selbst wiederum extrazelluläres cAMP bindet, welches der dritte beschriebene Faktor ist.

Neben der Regulation durch extrazelluläre Faktoren sind noch zwei Mechanismen der Discoidin-Regulation beschrieben, ein Signalweg wird durch einen – bis jetzt unbekannt – Rezeptor+Ligand stimuliert. Das Signal wird dann in der Zelle zuerst durch das G-Protein $G\alpha 2$ weitergeleitet (Endl *et al.*, 1996) und dann an des CRAC-Protein (Insall *et al.*, 1994) weitervermittelt (zwischen geschaltete Komponenten sind natürlich nicht auszuschließen, sind aber nicht beschrieben). CRAC ist als der cytosolische Aktivator der Adenylatzyklase aus *Dictyostelium discoideum* beschrieben (Insall *et al.*, 1994) und wird für die Aktivierung der AdenylatzyklaseA in der Zelle benötigt. Durch die Bildung von cAMP wird dann im Anschluss die ProteinkinaseA (PKA) aktiviert, die wiederum für die Expression des Discoidin-Gens benötigt wird. Allerdings konnte gezeigt werden, dass ACA nicht für die Aktivierung der Discoidin-Expression benötigt wird, daher wird die Aktivität einer weiteren Adenylatzyklase angenommen (Endl, 1994).

Dieser aktivierende Signalweg scheint eine Verbindung zu einer anderen bekannten Komponente aus *Dictyostelium* aufzuweisen: dem membrangebundenen Protein gdt1. Gdt1 wurde im Rahmen einer REMI-Mutagenese isoliert. Die Mutante gdt1 weist eine extrem hohe Discoidin-Expression auf und beginnt bei Wachstum auf *Klebsiella*-Rasen bereits im Fraßrand mit der Aggregation. Bisher nimmt man an, dass gdt1 den „prestarvation-response“ inhibiert und den Übergang von Wachstum zur Entwicklung kontrolliert.

Erste Daten deuten an, dass gdt1 durch PKA phosphoryliert und damit inaktiviert werden kann .(Endl, 1994; Zeng, 1998; Zeng *et al.*, 2000a+b).

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Material

2.1.1 Enzyme

Restriktionsenzyme	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot und GibcoBRL, Eggenstein
RNaseA	Boehringer Mannheim, Mannheim
Proteinase K	Boehringer Mannheim, Mannheim
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T7 RNA-Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
SP6 RNA-Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Superscript™ RNaseH ⁻	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
1kB DNA-Leiter	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
100bp DNA-Leiter	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Taq DNA-Polymerase	Eigenpräparation, Abt. Genetik
Alkalische Phosphatase (SAP)	USB
RNase Inhibitor (RNasin)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.1.2 Antibiotika

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Geneticin (G418)	Sigma, Deisenhofen
Blasticidin	ICN, Arora
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Amphotericin	Serva, Heidelberg
Kanamycin	Gibco BRL, Eggenstein

2.1.3 Monoklonale Antikörper

α Discoidin 80-52-13	(Wetterauer <i>et al.</i> , 1993)
IgG, Ziege-anti-Maus gekoppelt mit alkalischer Phosphatase	Dianova, Hamburg
IgG, Ziege-anti-Maus gekoppelt mit Peroxidase	Dianova, Hamburg
IgG, Ziege-anti-Hase gekoppelt	

mit alkalischer Phosphatase	Dianova, Hamburg
IgG2 α p-ERK2 (E-4)	Santa Cruz Biotechnology

2.1.4 Polyklonale Antikörper

IgG, α ERK (K-23)	Santa Cruz Biotechnology
--------------------------	--------------------------

2.1.5 Kits

T7 Sequencing™ Kit	Pharmacia, Freiburg
T-Cloning Kit	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Nucleotrap Elutions Kit	Macherey-Nagel, Düren
JETsorb DNA Extraction Kit	Genomed
Nucleobond™ AX	Macherey-Nagel, Düren

2.1.6 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, besitzen die Chemikalien den Reinheitsgrad p.a..

[α - ³⁵ S]dATP (40MBq)	Hartmann Analytic, Braunschweig
β -Mecaptoethanol	Fluka, Deisenhofen
AccuGel 40%	National diagnostics, USA
Acrylamid Protogel 30%	National diagnostics, USA
Agarose Sea Kem	FMC Bioproducts, USA
Ammoniumperoxidisulfat	Merck, Darmstadt
Aceton	Fluka, Deisenhofen
Bacto-Pepton	DIFCO, Augsburg
Bacto-Trypton	DIFCO, Augsburg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Fluka, Deisenhofen
BSA	Roth, Karlsruhe
Calcimycin (A23187)	Calbiochem
Chloroform	Fluka, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
dATP	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dCTP	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dGTP	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

dTTP	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DTT	Roth, Karlsruhe
EDTA	Fluka, Deisenhofen
Essigsäure 100%	Fluka, Deisenhofen
Ethanol >99,8%	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut p.a.	Riedel de Haen, Seelze
Ethanol absolut	Fluka, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Fluka, Deisenhofen
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Formaldehyd 36%	Riedel de Haen, Seelze
Formamid	Roth, Karlsruhe
D(+) Glucose (wasserfrei)	Fluka, Deisenhofen
Glycerin , wasserfrei 99,5 %	Fluka, Deisenhofen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, England
HEPES	Fluka, Deisenhofen
IPTG	bts, St. Leon-Rot
Isoamylalkohol	Fluka, Deisenhofen
Isopropanol	Fluka, Deisenhofen
Kaliumacetat (KAc)	Riedel de Haen, Seelze
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka, Deisenhofen
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Fluka, Deisenhofen
Methanol (Methylalkohol)	Fluka, Deisenhofen
Methylenblau	Roth, Karlsruhe
MOPS	Fluka, Deisenhofen
Natriumacetat (NaAc)	Fluka, Deisenhofen
Natrium-Azid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (NaCO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka, Deisenhofen

Natrium-Citrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxidplättchen	Fluka, Deisenhofen
PCR-Puffer	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Polyethylenglycol 6000	Roth, Karlsruhe
Repel-Silan	Pharmacia, Freiburg
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Riedel de Haen, Seelze
Sephadex (G25, G50)	Pharmacia, Freiburg
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Krefeld
TEMED	Biomol, Hamburg
Tris	Riedel de Haen, Seelze
Triton-X-100	Serve, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
X-Gal	bts, St. Leon-Rot
Xylenxyanol	Fluka, Deisenhofen

2.1.7 Kulturmedien

AX-Medium	0,5g Bacto tryptone
(Watts&Ashworth, 1970)	0,5g Peptone aus Casein
	1g Proteose Peptone
	1g Hefe Extrakt
	2g Glucose
	0,24g KH_2PO_4
	0,09g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	ad 200ml H_2O ; pH 6,5; autoklavieren

Experimenteller Teil

G ₀ -Medium	AX-Medium 50µg/ml Ampicillin 100U Penicillin 100µg Streptomycin 0,25µg/ml Amphotericin
FM-Medium	19,19g FM-Medium (Gibco) 800ml H ₂ O 10ml NaHCO ₃ pH-Wert auf 6,5 einstellen ad 1000ml H ₂ O; autoklavieren
LB (Lauria-Bertani)-Medium	10g Bacto-Trypton 5g Hefe-Extrakt 5g NaCl ad 1000ml H ₂ O; pH 7,0
LB-Agar	9g Agar ad 1000ml H ₂ O; autoklavieren 10ml 20% Maltose 10ml 1M MgSO ₄
LB _{amp} -Platten	wie LB-Agar, vor dem Gießen der Platten Medium auf ca. 55°C herabkühlen und dann 50µg/L Ampicillin hinzugeben
SM-Platten	13g Agar 10g Bacto-Peptide 10g Glucose 1g Hefe-Extrakt 1g MgSO ₄ 2,2g KH ₂ PO ₄ 1,3g K ₂ PO ₄ *3H ₂ O ad 1000ml H ₂ O; pH 6,5

2.1.8 Puffer und Lösungen

DEPC-Wasser	0,1% DEPC über Nacht inkubieren, anschließend autoklavieren
TBE-Puffer	90mM Tris-Borat 2 mM EDTA
TE-Puffer	10mM Tris-HCl 1 mM EDTA gewünschten pH-wert einstellen
Phosphatpuffer, pH 6,7	56,5ml 1M KH_2PO_4 43,5ml 1M K_2HPO_4
EP-Puffer	10mM Na_2HPO_4 50mM Saccharose ad 1000ml H_2O mit HCl auf pH 6,1 einstellen und sterilfiltrieren
DNA-Auftragspuffer	70 % Glycerin 120mM EDTA Spatelspitze Bromphenolblau Spatelspitze Xylenyanol
Folat (für Zellkultur)	100mM Folat 12mM Phosphatpuffer, pH 6,7 mit NaOH titrieren, bis sich das Folat löst; sterilfiltrieren

Experimenteller Teil

Lösung I	25mM Tris-HCl, pH 7,4 10mM EDTA 15 % Saccharose
Lösung II	200mM NaOH 1mM SDS
Lösung III	3M NaAc, pH 4,7
Lösung D (für RNA-Präparation)	4mM Guanidinium-Thiocyanat 25mM Natriumcitrat 0,1M β -Mercaptoethanol 0,5% Sarcosyl
PBS-Puffer (10x; pH 7,3)	160,12g NaCl 15,3g Na_2HPO_4 (2 H_2O) 4,02g KCl 3,82g KH_2PO_4 ad 1000ml mit H_2O
Laemmli-Puffer (6x)	7ml 4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8 3ml Glycerin 1g SDS 0,93g DTT 1,3mg Bromphenolblau
Proteinlaufpuffer (5x)	15,1g Tris 72 g Glycin 5g SDS ad 1000ml mit H_2O

4xSDS-Sammelpuffer (pH 8,8)	1,5M TrisHCl 14mM SDS
4xSDS-Trenngel-Puffer (pH 6,8)	0,5M Tris 14mM SDS
Semidry-Blotpuffer (pH 8,2 - 8,4)	5,8g Tris 2,92g Glycin 0,38g SDS 200ml Methanol ad 1000ml mit H ₂ O
SDS-Lysepuffe	0,7% SDS 25mg/ml Proteinase K gelöst in TE pH 8,0
Na-Carbonatpuffer	100mM Na ₂ CO ₃ pH 10,6 einstellen
Coomassie-Färbelösung	10% Essigsäure Spartelspitze Coomassie Brilliant blue G250
Coomassie-Entfärbelösung	5% Methanol 7% Essigsäure
Kernlysepuffer	30mM HEPES, pH 7,5 10mM Mg(OAc) ₂ 10mM NaCl 10% Succrose sterilfiltrieren, bei +4°C oder -20°C lagern

MOPS – Medium: 5,0g Hefeextrakt
10,0g Glucose
10,0g Proteose-Pepton
1,3g MOPS
ad 1000ml H₂O; autoklavieren

2xHBS: 4,0g NaCl
0,18g KCl
0,05g NaH₂PO₄
2,5g HEPES
0,5g Glucose
pH 7,05 mit NaOH einstellen
ad 250ml H₂O; sterilfiltrieren

Glycerinlösung: 5,0ml 2xHBS
20% (v/v) Glycerin
ad 10ml H₂O

2.1.9 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α F', endA1, hsdR17, r_k-m_k+, supE44, thi-I, recA1, gyrA, val^f, relA1, α (lacZYA-argF)₁₆₉, (α 80lacZ α M15)

Klebsiella aerogenes (Williams&Newell, 1976)

2.1.10 Plasmide

Gem3z (Promega), Gem7z (Promega), pDNeo2, pUCbsrDBam, pGEM-T (Promega)

2.1.11 Oligonukleotide

SP6 5'-GATTTAGGTGACACTATAG

T7 5'-AATACGACTCACTATAG

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

3mm Papier	Whatman, Göttingen
Einmalhandschuhe	Roth, Karlsruhe, Beiersdorf AG
Einmalküvetten (1 ml)	Brand, Wertheim/Main, Sarstedt, Nümbrecht
Einwegtücher	Kimberly-Clark, England
Einwegspritzen	B.Braun AG, Melsungen
Falconröhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Filter (HAWP 0,45µm Porengröße)	Millipore, Eschborn
Injektionsnadeln	B.Braun AG, Melsungen
Parafilm M	American Can™, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Schütt, Göttingen
PCR-Reaktionsgefäße	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Schütt, Göttingen
Sterilfilter (0,22µm, 0,45µm)	Millipore, Eschborn
Transfermembranen Parablot NCP	Mecherey & Nagel, Düren
Skalpelle	C.Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen
Costar-Platte	Schütt, Göttingen

2.1.13 Geräte

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Binokular	Olympus, Hamburg
BioLogic® (incl. Software)	Bio-Rad, Kanada
E.A.S.Y.	Herolab, Wiesloch
Floureszenzmikroskop	Leitz, Wetzlar
Gelkammern	Metallwerkstatt, Universität GH Kassel
Geltrockner	Bachofer, Reutlingen
GenePulser®	Bio-Rad, Kanada
GeneQuant®	Pharmacia, Freiburg
GradiFrac	Pharmacia, Freiburg
Heizblock	Elektronikwerkstatt, Universität GH Kassel
Heizplatte	IKA, Staufen im Breisgau
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen

Experimenteller Teil

Kamera Nikon F-70	Nikon
Kameraobjektiv Af Micro Nikkor 60mm	Nikon
Magnetrührer	Bachofer, Reutlingen
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikrowelle (1100 Watt)	Panasonic, England
Mikrowelle (800 Watt)	Unirop-Warenvertrieb GmbH, Deutschland
Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
Multipette®	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main
PCR-Maschine Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Personal Computer und Software	Universität GH Kassel, Abteilung Genetik
pH-Meter 320	achofer, Reutlingen
Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald
Accu Jet®	Brand, Wertheim/Main
Pipetten (20µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (2µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Gilson, Langenfeld
Phosphorimager	Raytest, Straubenhardt
Photometer Uvikon 930	Kontron Instruments, Neufahrn
Powersupplies	
-Power Pac 3000	Bio-Rad, Kanada
-EPS 3500	Pharmacia, Freiburg
Schüttelinkubator	Infors AG, Schweiz
Schwenkplatte REAX 3	Heidolph, Deutschland
Speed Vac Concentrator	Savant, USA
Sterilbank	Galaire, Italien
Sterilbank Mikroflow	Nunc, Wiesbaden
Ultraschallprozessor UP200S	Dr. Hielscher GmbH, Stansdorf
Vortex Genie	Bender Hohbein AG, Deutschland
Waagen	Satorius, Göttingen
Wasserbad Julabo F25	Schütt, Göttingen
Zentrifugen	
- Avanti™ 30	Beckmann, München
- Rotoren (F0650, C1015, F2402)	Beckmann, München

- Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen
- Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall, Bad Homburg
- Rotor SS34	Sorvall, Bad Homburg
- Appligene	Appligene, Frankreich
- BiofugeA	Haraeus, Osterode
- Mikrocen 13	Herolab, Wiesloch
- Mikrofuge Lite Centrifuge	Beckmann, München
- Centrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg

2.2 Zellbiologische Methoden für *Dictyostelium discoideum*

2.2.1 Axenisches Wachstum

Unter axenischem Wachstum von *D. discoideum* versteht man das Wachstum der Zellen in bakterienfreiem Medium (Watts&Ashworth, 1970).

Axenische Stämme von *Dictyostelium discoideum*, die Abkömmlinge des Wildtyp-Isolates NC4 (Raper, 1935) darstellen, sind durch rezessive Mutationen (Watts und Ashworth, 1970) in der Lage, in bakterienfreiem Flüssigmedium (AX-Medium) zu wachsen. Axenische Stämme können trotzdem auch Bakterien als Nahrungsquelle nutzen. In dieser Arbeit werden die drei axenischen Stämme Ax2, Ax3 und Ax4 benutzt, die in verschiedenen Laboren gezüchtet wurden.

Axenische Stämme werden in Petrischalen verschiedener Größe kultiviert. Dazu werden die am Boden haftenden Zellen mit axenischem Medium überschichtet. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit muss das Medium zwei- bis dreimal pro Woche gewechselt werden. Um größere Zellzahlen zu erhalten, kann *D. discoideum* auch unter Schütteln in sterilen Erlenmeyer-Kolben kultiviert werden. Dazu wird wie bei der Kultivierung in Petrischalen eine konstante Temperatur von 22°C eingehalten und der Kolben bei 160-180Upm geschüttelt.

Die Generationszeit von axenischen Stämmen in AX-Medium beträgt in der Regel zwischen 7 und 9 Stunden. In Schüttelkultur kann eine Dichte von ca. 3×10^7 Zellen pro ml Medium erreicht werden.

Um das axenische Medium vor bakteriellen Kontaminationen zu schützen, kann dem Medium eine Mischung aus verschiedenen Antibiotika und Fungiziden zugesetzt werden. Das sog. „G₀-Medium“ enthält Ampicillin (50mg/l), Penicillin/Streptomycin (10000U/ml) und Amphotericin (0,25mg/l).

2.2.2 Wachstum unter Selektionsdruck

Um transformierte *Dictyostelium discoideum* Klone selektieren zu können, werden in dieser Arbeit drei verschiedene Selektionsmethoden verwendet.

Bei der Uracilselektion wird eben diese Aminosäure als auxotrophe Marke benutzt. Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Selektion dient der *D. discoideum* Stamm DH1, der ein Abkömmling des axenischen Stammes Ax4 ist und eine Deletion im *pyr5-6*-Gen (Kuspa&Loomis, 1992; Kalpaxis *et al.*, 1991) aufweist. Das Genprodukt von *pyr5-6* codiert für ein Enzym des Biosyntheseweges des Uracils - DH1 Zellen

können daher auf einem Uracil-Mangelmedium (FM-Medium) nicht wachsen. Durch die Transformation mit einem Plasmid, das das *pyr5-6* Gen hinter einem geeigneten Promotor enthält (z.B. DIV2; Kuspa&Loomis, 1992), kann die Zelle selbst wieder Uracil herstellen und auf FM-Medium überleben.

Die zweite Selektionsmethode stellt das Aminoglykosid Geneticin (G418) dar, das dem jeweiligen axenischen Medium in einer Konzentration von 10-50µg/ml zugesetzt wird. Geneticin inhibiert die pro- und eukaryotische Proteinbiosynthese. Durch die Transformation mit einem Plasmid, das als Resistenzgen die Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase hinter einem konstitutiven *Dictyostelium*-Promotor enthält, kann man transformierte Zellen selektieren.

BlasticidinS dient als dritter genetischer Marker. Hierbei handelt es sich um ein Nukleosid, das die pro- und eukaryotische Translation unterbindet. BlasticidinS wird dem Medium in einer Konzentration von 5-10µg/ml zugesetzt und erlaubt die Selektion von transformierten Zellen mit Hilfe des *bsr*-Gens, das für die BlasticidinS-Deaminase codiert. Auch hier muss das *bsr*-Gen hinter einem konstitutiven *Dictyostelium*-Promotor platziert werden.

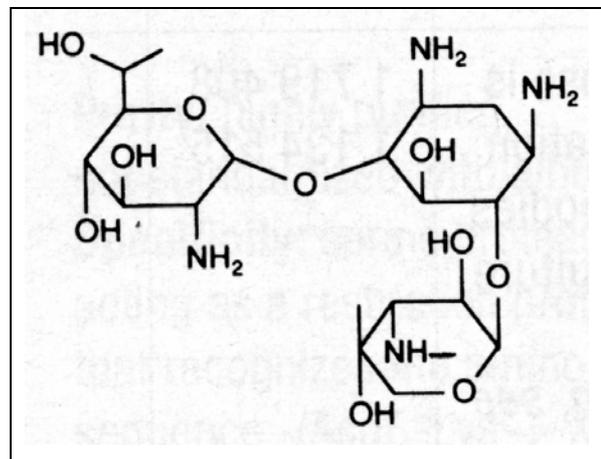


Abb. 2-1: Strukturformel von BlasticidinS:

2.2.3 Wachstum in Bakteriensuspension

2.2.3.1 Herstellung von KA-Platten (*Klebsiella aerogenes*)

Klebsiella aerogenes wird auf SM-Platten kultiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden, kann man *Klebsiella* auf SM-Platten selektieren, die 300-400µg/ml Cobald-Chlorid enthalten. Von diesen Platten wird der *K. aerogenes*-Rasen mit 1-2ml Phosphatpuffer ab gespült. Je 100-200µl der Suspension werden dann auf vorgetrocknete SM Platten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgt über Nacht bei 37°C und einen Tag bei Raumtemperatur. Optional kann man die Platten auch zwei bis drei Tage bei Raumtemperatur inkubieren.

2.2.3.2 Wachstum und Entwicklung auf *Klebsiella*-Rasen

Klebsiella-Platten (KA-Platten) können dazu genutzt werden, *D. discoideum* zu kultivieren. Dazu werden einige Mikroliter einer *D. discoideum*-Suspension (axenische Kultur oder Bakteriensuspension) auf den KA-Rasen getropft, oder aber Klone die bereits auf KA-Platten inkubiert wurden mit einem Zahnstocher auf den Bakterien-Rasen überimpft (dabei sollten Zellen vom Wachstumsrand oder Sporen genutzt werden). Die Klone werden nach 3-6 Tagen Inkubation bei 22°C sichtbar. Auf diese Weise gewachsene *Dictyostelium discoideum* Klone können zur Stammhaltung für 3-4 Wochen bei 4°C gelagert werden.

2.2.3.3 Die Gewinnung von *Dictyostelium*-Einzelklonen („Reklonierung“)

Benötigt man aus einer *Dictyostelium*-Kultur Einzelklone (z.B. nach einer Transformation und erfolgreichen Selektion), muss man die Zellen vereinzeln und auf SM-Platten ausbringen. Handelt es sich um eine axenische Kultur, werden die Zellen zentrifugiert und einmal mit Phosphatpuffer gewaschen. Die Zellen werden dann mit Phosphatpuffer auf ca. 1000 Zellen/ml verdünnt und 50-100µl dieser Suspension gemeinsam mit 100-200µl KA-Suspension auf eine vorgetrocknete SM-Platte ausplattiert. Einzelklone werden nach 3-5 Tagen Inkubation bei 22°C sichtbar.

2.2.3.4 Wachstum in *Klebsiella aerogenes*-Suspension

Für einige Experimente ist das axenische Wachstum ungeeignet, da es nicht die ursprüngliche Lebensweise (oder besser: „Ernährungsweise“) von *D. discoideum* widerspiegelt. Daher kann man als eine weitere Kultivierungs-Methode das Wachstum in einer Bakterien-Suspension aus *Klebsiella aerogenes* nutzen.

Für eine Standard-KA Suspension wird je eine KA-Platte mit 30ml Phosphatpuffer abgespült und die Bakterien gut resuspendiert. Die Zelldichte beträgt dann ca. 10^{10} Bakterien/ml.

Die Bakterien-Suspension kann nun auf verschiedene Art und Weise angeimpft werden: *Dictyostelium discoideum* aus axenischer Schüttelkultur oder aus einer Petrischale mit axenischem Medium wird einmal mit Phosphatpuffer gewaschen und dann zu den Bakterien gegeben, allerdings sollte man so gewachsene Zellen vor weiteren Experimenten mindestens über Nacht in Bakterien inkubieren, um so sicher zu stellen, dass diese Zellen wirklich bakteriell wachsen (und nicht axenisch).

Dictyostelium Klone, die auf KA-Platten kultiviert wurden, werden mit einer Impföse oder einem Zahnstocher abgenommen und zu der Suspension gegeben.

Wie beim axenischen Wachstum muss eine konstante Temperatur von 22°C eingehalten, und der Kolben gleichmäßig bei 130-180upm geschüttelt werden. Auf diese Art kultivierte *D. discoideum*-Zellen habe eine Generationszeit von 2.5 bis 5 Stunden und können je nach Dichte der KA-Suspension leicht einen Zelltiter von $3\text{-}4 \times 10^7$ Zellen/ml erreichen.

2.2.4 Langzeitlagerung von *Dictyostelium discoideum*

2.2.4.1 Einfrieren in DMSO

D. discoideum Zellen werden in axenischem Medium bis zu einer Dichte von $3\text{-}5 \times 10^6$ Zellen/ml inkubiert. Die Zellen werden dann bei 1.700Upm zentrifugiert und mit einer Dichte von 5×10^7 Zellen/ml in axenischem Medium plus 5% DMSO (v/v) resuspendiert. Je 1ml dieser Suspension wird in ein Einfrierröhrchen (Nunc 2.2ml) überführt und bei -80°C eingefroren.

Um auf diese Art gelagerte Zellen wieder aufzutauen, wird das Röhrchen auf Eis inkubiert und anschließend die Suspension mit 10-20ml AX-Medium gewaschen. Nach diesem Waschschrift werden die Zellen in eine 10ml Petrischale überführt, oder aber in eine KA-Suspension gegeben. Wichtig ist, dass kein Geruch von DMSO wahrnehmbar ist, lebende Zellen sollten nach 1-3 Tagen erkennbar sein.

Alternativ dazu können die gefrorenen Zellen leicht angetaut werden (nur oberer Rand) und mit eine Pasteur-Pipette auf eine KA-Platte gespritzt werden. Nichtaufgetaute Zellen können weiter bei -80°C gelagert werden.

2.2.4.2 Lagerung von Sporen

D. discoideum Sporen können bei 4°C für ca. 1 Jahr gelagert werden. $1\text{-}3 \times 10^7$ *Dictyostelium discoideum*-Zellen werden dazu auf Phosphat-Agar Platten ausplattiert und für mindestens 24 Stunden bei 22°C entwickelt. Die entstandenen reifen Fruchtkörper werden dann in den Petrischalendeckel abgeklopft und wieder in Einfrierröhrchen (Nunc 2.2ml) überführt. Um *D. discoideum* Sporen keimen zu lassen, kann man sie auf KA-Platten ausbringen, oder aber in einer Petrischale mit AX-Medium inkubieren.

2.2.5 Transformation von *Dictyostelium discoideum*

Zur Transformation von *D. discoideum* stehen zwei Methoden zur Verfügung:

2.2.5.1 Die Ca-Phosphat-Methode (Nellen et al., 1984)

Bei der Ca-Phosphat-Methode wird durch Calcium präzipitierte DNA mit Hilfe eines Glycerinschocks in die Zellen eingebracht. Dazu werden 10ml einer axenischen *D. discoideum* Kultur bei einer Dichte von ca. 2×10^6 Zellen/ml (exponentielles Wachstum) in Petrischalen überführt. Nachdem sich die Zellen 10-20 min. bei Raumtemperatur abgesetzt haben, wird das Medium abgenommen und durch 10ml MOPS-Medium ersetzt. Nach 30 Minuten Inkubation wird das MOPS Medium entfernt und das Ca-Phosphat-Präzipitat (s.u.) vorsichtig auf die Zellen aufgetropft. Es folgt eine Inkubation von 20min., bevor 10ml MOPS-Medium vorsichtig über die Zellen geschichtet werden und die Platte für 3h bei 22°C belassen wird.

Im Anschluss wird das Medium abgenommen und der Glycerinschock durchgeführt. Dafür werden 2ml Glycerinlösung vorsichtig vom Rand der Platte bei leicht gekippter Petrischale auf die Zellen gegeben und für 5-9 Minuten dort belassen. Anschließend wird die Glycerinlösung vollständig abgenommen und durch DD20-Medium ersetzt.

Nach ca. 24h wird das axenische Medium durch das betreffende Selektionsmedium ersetzt (FM, G418 20µg/ml oder BlasticidinS 5µg/ml). In der ersten Woche nach der Transformation erfolgt der Medienwechsel jeweils nach 2 Tagen, nach Erscheinen der ersten Klone reicht ein Wechsel des Mediums von 4 Tagen aus.

Herstellung des Ca-Phosphat-Präzipitates:

Zwischen 10 und 20µg Plasmid-DNA wird in einem sterilen Reagenzglas mit 600µl 1xHBS verdünnt. Anschließend werden unter starkem Vortexen 38µl 2M CaCl₂ zugegeben und der Ansatz für 25min bei Raumtemperatur belassen.

2.2.5.2 Die Elektroporation

Dictyostelium discoideum Zellen werden bis zu einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml axenisch kultiviert. Pro Transformationsansatz werden 2×10^7 Zellen abgenommen und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Es folgt eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten, ebenso sollten alle nachfolgend benutzten Lösungen eiskalt sein.

Anschließend werden die Zellen für 10 Minuten bei 1700upm zentrifugiert und das axenische Medium abgenommen. Die Zellen werden dann je einmal mit Phosphatpuffer und einmal mit Elektroporationspuffer gewaschen (10 Minuten bei 1700upm zentrifugieren und im Waschpuffer durch Schütteln resuspendieren).

Nach dem letzten Waschschrift werden je 2×10^7 Zellen in 800 μ l Elektroporationspuffer aufgenommen und gemeinsam mit 20 μ g der zu transformierenden DNA in eine eiskalte Elektroporations-Küvette (4mm) gegeben. Es folgt eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten. Anschließend werden die Zellen nochmals aufgewirbelt und die Elektroporation bei 1kV und 25 μ F durchgeführt. Hierbei sollten Zeitkonstanten zwischen 3 und 4 erreicht werden. Nach der Elektroporation werden die Zellen für weitere 15 Minuten in der Küvette auf Eis inkubiert.

In eine Petrischale werden dann nebeneinander 8 μ l 100mM CaCl₂ und 8 μ l 100mM MgCl₂ gegeben und anschließend die Zellen aus der Küvette zu diesen Tropfen gegeben. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur werden die Zellen mit DD20 Medium überschichtet und für ca. 24h in diesem Medium belassen. Anschließend werden die Zellen mit axenischem Medium (meist G0-Medium) überschichtet und für eine Nacht ohne Selektionsdruck inkubiert. Am Folgetag wird das Medium vorsichtig abgenommen und durch das entsprechende Selektionsmedium ersetzt.

2.2.6 Spezielle Experimente mit *Dictyostelium discoideum*

2.2.6.1 Entwicklung auf Filtern

Um die verschiedenen Entwicklungsstadien von *Dictyostelium discoideum* beobachten zu können, kann man *Dictyostelium* Zellen von ihrer Nahrungsquelle trennen und auf speziellen, schwarzen Filtern (wegen besserer Darstellbarkeit) den Entwicklungsprozess durchlaufen lassen.

Um die Filter (Millipore) für das Entwicklungs-Assay benutzen zu können, müssen diese zunächst vorbereitet werden. Dazu werden die Filter in Phosphatpuffer gegeben und für 5 Minuten gekocht. Anschließend werden die Filter in eine Petrischale gelegt, die vorher mit zwei Lagen Whatman-Papier ausgelegt wird. Das Whatman-Papier ist ebenfalls mit Phosphatpuffer getränkt. Während der Entwicklung

von *Dictyostelium discoideum* ist darauf zu achten, dass die hohe Luftfeuchtigkeit erhalten bleibt, weswegen die Petrischale immer geschlossen sein sollte.

Pro Filter (Durchmesser 5cm) werden ca. 1×10^7 *D. discoideum*-Zellen benötigt. Je nach Kultivierungs-Methode von *D. discoideum* wird wie folgt vorgegangen:

1. Axenisches Wachstum: Die Zelldichte der betreffenden Kultur wird bestimmt und pro Filter 1×10^7 Zellen für 10 min bei 1700Upm zentrifugiert. Anschließend wird das Medium abgegossen und die Zellen in Phosphatpuffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt werden die Zellen in 200 μ l Phosphatpuffer gründlich resuspendiert und können nun auf den Filter getropft werden.
2. Wachstum in KA-Suspension: Um *D. discoideum* Zellen von den Bakterien trennen zu können, müssen diese bei Geschwindigkeiten zentrifugiert werden, bei denen sich die Bakterien nur schwach absetzen. Dazu wird ein ausreichendes Kulturvolumen in ein Falcon-Tube überführt und für 10 Minuten bei 1700Upm zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend vorsichtig abgenommen und die Zellen in Phosphatpuffer resuspendiert. Es folgen 10 Minuten Zentrifugation bei 1100Upm und nachdem der Überstand durch frischen Phosphatpuffer ersetzt wurde, weitere 15 Minuten Zentrifugation bei 950Upm. Nach diesem letzten Waschschrift, werden die Zellen in 10ml Phosphatpuffer resuspendiert und die Gesamtzellzahl bestimmt. Die *D. discoideum* Zellen werden dann erneut bei 1700Upm für 10 Minuten zentrifugiert und in einer Konzentration von $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml in Phosphatpuffer aufgenommen. Auch hier muss wieder sehr gründlich resuspendiert werden. Diese Methode der Trennung von *D. discoideum*-Zellen und *Klebsiella*-Bakterien wird im folgenden in dieser Arbeit als „Differenzielle Zentrifugation“ bezeichnet.

Die gewaschenen Zellen werden nun vorsichtig auf die vorbereiteten Filter getropft und bei 22°C entwickelt (Newell *et al.*, 1969).

2.2.6.2 Entwicklung in Phosphatpuffer

Eine andere Methode, um die Discoidin-Expression bei der Entwicklung von *D. discoideum* zu überprüfen, stellt die Entwicklung in Phosphatpuffer dar. Die *D. discoideum* Zellen stammen für dieses Assay in der Regel aus *Klebsiella*-

Suspension, allerdings ist dieser Versuch theoretisch auch aus axenischem Medium heraus möglich.

D. discoideum Zellen bei einer Dichte von nicht mehr als $1-2 \times 10^6$ werden durch differentielle Zentrifugation von den Bakterien getrennt. Nachdem die Gesamtzellzahl ermittelt ist, werden die Zellen in einer Dichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml in Phosphatpuffer aufgenommen und bei 22°C und 160-180Upm inkubiert. Als Standard-Wert für die Discoidin-Expression in der Entwicklung wird in dieser Arbeit eine Inkubation in Phosphatpuffer von vier Stunden benutzt. Zur Ernte der Zellen, werden diese bei 4000Upm zentrifugiert und das trockene Pellet in 1x Proteinauftrags-Puffer (Laemmli-Puffer) aufgenommen und lysiert.

2.2.6.3 Messung der Discoidin-Expression bei vegetativem Wachstum

Um die Discoidin-Expression bei vegetativem Wachstum überprüfen zu können, muss man *D. discoideum*-Zellen in *Klebsiella*-Suspension kultivieren, da diese eine natürliche Nahrungsquelle darstellen. Dafür müssen die Zellen, wenn sie aus einer axenischen Kultur stammen, zuerst an das Wachstum in Bakterien-Suspension angepasst werden. Dazu werden die *D. discoideum*-Zellen durch Zentrifugation vom axenischen Medium getrennt und anschließend in der *Klebsiella*-Suspension aufgenommen. Die *Dictyostelium*-Vorkultur sollte eine Dichte von weniger als 1×10^6 Zellen/ml aufweisen. Alternativ dazu kann man die *Klebsiella*-Suspension auch mit *D. discoideum*-Zellen animpfen, die von einer bereits bewachsenen KA-Platte stammen. Dazu werden die Zellen vom Wachstumsrand des Klonen mit einem Zahnstocher abgenommen und in die Suspension gegeben. Auch das Animpfen der Vorkultur mit Sporen ist durchführbar. Die Vorkultur wird über Nacht bei 22°C und 160-180Upm inkubiert. Am nächsten Tag kann nun die Hauptkultur mit der gewünschten Dichte an *D. discoideum* angeimpft werden. Die Proben werden dann bei der geforderten Dichte geerntet. Dazu werden die Zellen wieder durch differentielle Zentrifugation von den *Klebsiella*-Bakterien befreit und das trockene Zellpellet in 1x Proteinauftrags-Puffer aufgenommen.

In dieser Arbeit werden die verschiedenen *D. discoideum* Klone bei einer Dichte von 5×10^5 , 1×10^6 und 3×10^6 Zellen/ml auf ihre Discoidin-Expression überprüft, wobei die Hauptkultur zu Beginn auf eine Dichte von $2-3 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt wird.

2.2.6.4 Messung der Discoidin-Expression bei axenischem Wachstum

Um Zellen in axenischem Medium auf ihre Discoidin-Expression hin zu überprüfen, wird in dieser Arbeit ein Standard verwendet, der einem Wachstum über Nacht in axenischem Medium bis zu einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml entspricht. Die Zellen werden bei dieser Zelldichte bei 1700Upm zentrifugiert und das trockene Pellet in 1xProteinauftrags-Puffer aufgenommen.

Falls sich der betreffende Klon noch nicht in einer axenischen Kultur befindet, z.B. als Klon auf einer KA-Platte, muss dieser zuerst an die axenischen Bedingungen gewöhnt werden. Dazu wird eine kleine Petrischale (5cm) oder aber ein Kultur-Topf einer Costar-Platte (Schütt) mit axenischem G_0 -Medium gefüllt. Um ausreichend viele Zellen zu erhalten, nimmt man dann mit einem Zahnstocher am Wachstumsrand der KA-Platte Material ab. Falls man mit *D. discoideum* Zellen arbeitet, die Fruchtkörper bilden können, kann man auch Sporenköpfe abnehmen und zu dem vorbereiteten Medium geben. Nach ein bis zwei Nächten sind in der Regel genug Zellen vorhanden, um das Kulturvolumen zu vergrößern, oder aber eine Schüttelkultur zu inokulieren.

2.2.6.5 Überprüfung der Discoidin-Repression durch Folat

Die Discoidin-Expression in axenischem Medium kann durch die Zugabe von Folat reprimiert werden (Endl, 1994). Dazu werden *Dictyostelium discoideum* Zellen an axenisches Wachstum in Schüttelkultur angepasst.

Um das Folat-Assay zu starten, wird der entsprechende *D. discoideum* Klon in axenischem Medium kultiviert, das 1mM gelöstes Folat enthält, und in diesem Medium für mehrere Nächte kultiviert. Allerdings darf die Kultur eine Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml während dieser Zeit nicht überschreiten, da die Repression ab dieser Zelldichte unwirksam wird (pers. Mittlg. Nellen). Daher müssen die Zellen einmal täglich verdünnt und mit neuem Folat versetzt werden.

In dieser Arbeit wird die Discoidin-Expression verschiedener Mutanten nach einer und zwei Nächten unter Folat-Einfluß in axenischem Medium überprüft. Dafür werden die Zellen nach der gewünschten Zeit bei 4000Upm zentrifugiert und in 1xProteinauftrags-Puffer aufgenommen.

2.2.6.6 Überprüfung der Calcium-Repression

Die Induktion der Discoidin-Expression im Laufe der Entwicklung in Phosphatpuffer kann durch die Erhöhung der Calcium-Konzentration in der Zelle reprimiert werden (Blusch *et al.*, 1994).

Um diese Repression messen zu können, wird der betreffende *D. discoideum* Klon in *Klebsiella*-Suspension bis zu einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Durch differentielles Zentrifugieren werden die *Dictyostelium* Zellen von den Bakterien befreit und bei einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in Phosphatpuffer resuspendiert. Diese Suspension wird auf zwei Kolben verteilt, wobei der Kontroll-Kolben nur mit 1mM CaCl_2 versetzt wird. Der zweite Kolben enthält neben 1mM CaCl_2 die Ionophore *Calcimycin*TM aus *Streptomyces charteusensis* (Reed *et al.*, 1972) in einer Konzentration von 10 μM . Die beiden Kolben werden dann bei 22°C und 180Upm geschüttelt und die Zellproben zum gewünschten Zeitpunkt entnommen.

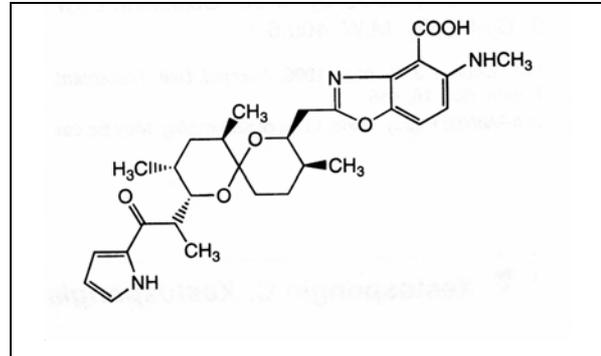


Abb. 2-2: Strukturformel von Calcimycin (Reed *et al.*, 1972).

2.2.6.7 Colonyblot

Mit Hilfe des Colonyblots kann man die Discoidinexpression einzelner *D. discoideum* Klone in den verschiedenen Stadien des Wachstums und der Entwicklung beobachten. Ein *D. discoideum* Klon, der vorher auf eine KA-Platte überimpft wurde, oder aber eine KA-Platte, die der Reklonierung dient, wird vorsichtig auf einen passenden Nitrocellulose-Filter übertragen. Dazu wird der Filter auf die Platte gelegt und leicht angedrückt, um Luftblasen zu eliminieren. Anschließend wird der Filter, der nun das gesamte Zellmaterial (Bakterien+*Dictyostelium*) enthält vorsichtig abgezogen

Der Filter wird dann mit seiner zellfreien Seite auf eine mit Trockeneis gekühlte Aluminiumplatte gelegt und dort für 10-15 Minuten inkubiert. Bei dieser Prozedur werden die *Dictyostelium* Zellen eingefroren, wodurch sie platzen – die Proteine bleiben aber weiterhin auf der Nitrocellulose-Membran haften. Anschließend wird die Aluminiumplatte vom Trockeneis

genommen und nachdem der Filter aufgetaut ist, wird dieser vorsichtig in eine Petrischale überführt. Nun wird der Filter dreimal mit 1xNCP gewaschen, bis keine *Klebsiella*-Bakterien mehr auf dem Filter haften. Der Filter wird dann für 30min mit einer 1xNCP+3%BSA-Lösung



Abb. 2-3: Beispiel für Colonyblot-Experimente. Dargestellt sind zwei Colonyblot-Experimente. Der Blot links und in der Mitte zeigt den Colonyblot nach Entwicklung durch BCIP (siehe Text). Der Blot rechts zeigt zusätzlich die Färbung mit Ponceau-S.

auf einem Taumler blockiert und anschließend der anti-Discoidin-Antikörper (1:5000 v/v) zugegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wird der Filter dreimal mit 1xNCP gewaschen und anschließend für mindestens 3 Stunden mit dem Sekundärantikörper (GaMAP; Dianova, Hamburg; 1:2500 v/v) inkubiert. Nach der Inkubation wird einmal mit 1xNCP und zweimal mit Natriumcarbonatpuffer (100mM, pH10.2) gewaschen. Die Farbentwicklung wird in Natriumcarbonatpuffer, dem eine Spatelspitze BCIP zugegeben wurde durchgeführt. Ist die Entwicklung ausreichend, wird mit Wasser abgestoppt und sofern gewünscht mit PonceauS eine Gegenfärbung auf Gesamtprotein vorgenommen.

2.2.6.8 Überprüfung der Discoidin-Regulation durch die Bakteriendichte

Die Bakteriendichte hat direkten Einfluss auf die Discoidin-Regulation bei vegetativem Wachstum (Burdine&Clarke, 1995). Um *Dictyostelium discoideum* Mutanten auf diesen Regulationsmechanismus hin zu überprüfen, lässt man die jeweiligen Mutanten in *Klebsiella*-Suspensionen verschiedener Dichte wachsen.

Dazu wird der betr. *D. discoideum* Stamm über Nacht in Bakterien-Suspension kultiviert. Diese Vorkultur wird am nächsten Tag mit frischer KA-Suspension derart verdünnt, dass die Zelldichte bei Ansetzen der eigentlichen Testkolben ca. 1×10^6 Zellen/ml beträgt (damit wird verhindert, dass zuviel Kulturvolumen der Vorkultur in

die Hauptkultur gegeben wird). Für die Hauptkulturen wird zuerst eine 3x*Klebsiella*-Suspension angesetzt (dies entspricht 10ml Phosphatpuffer pro Platte). Ein Teil dieser Suspension wird dann mit Phosphatpuffer verdünnt, so dass eine 1.5x und 0.5x*Klebsiella*-Suspension entsteht. Von dem jeweiligen *D. discoideum* Stamm werden nun je drei Hauptkulturen mit einer Dichte von $0.5-1 \times 10^5$ *Dictyostelium*-Zellen/ml bei unterschiedlicher KA-Konzentration angesetzt. Diese Kolben werden über Nacht kultiviert und am nächsten Tag bei $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml durch differentielle Zentrifugation geerntet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation von Nukleinsäuren

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

NucleobondTM Maxi-Präparationen (Macherey und Nagel)

Zur Gewinnung großer Mengen an Plasmid-DNA werden *E.coli*. Transformanten in 50-100ml LB Medium unter Selektionsdruck über Nacht bei 37°C und 220upm inkubiert. Die Kultur wird am nächsten Tag zentrifugiert (Hettich Rotana, 10 min, 4000upm) und das Pellet in 4ml Puffer S1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 4ml Puffer S2 wird die vorsichtig gemischte Suspension für 5min bei RT inkubiert (alkalische Lyse der Bakterien nach Birnboim&Doly, 1979). Durch Zugabe von 4ml eiskaltem Puffer S3 und anschließender Inkubation auf Eis für 5-10min. kommt es zur Ausfällung von Proteinen und chromosomaler DNA. Der Überstand wird nun zur vollständigen Abtrennung der gefällten Bestandteile für mind. 30min bei 14.000upm und 4°C zentrifugiert und anschließend der gewonnene Überstand nochmals unter den selben Bedingungen für 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wird dann auf eine mit 2ml Puffer N2 (Abhängig von der Säulengröße) äquillibrierte Anionenaustauscher-Säule aufgetragen. Nachdem der Überstand durch die Säule gelaufen ist, wird zweimal mit je 4ml Puffer N3 gewaschen und anschließend die Plasmid-DNA mit 4ml Puffer N5 eluiert. Das Eluat wird durch Zugabe von 0.7 Vol. Isopropanol gefällt und für 30min bei 14.000upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol

gewaschen. Das getrocknete Pellet wird im gewünschten Volumen (in der Regel 200µl) TE pH8.0 oder Wasser aufgenommen.

S1: 50mM Tris/HCl, 10mM EDTA, 100µg/ml RNaseA, pH 8,0

S2: 200mM NaOH, 1% SDS

S3: 2,8M KAc, pH 5,1

N2: 100mM Tris/H₃PO₄, 15% Ethanol, 400mM KCl, pH 6,3

N3: 100mM Tris/H₃PO₄, 15% Ethanol, 900mM KCl, pH 6,3

N5: 100mM Tris/H₃PO₄, 15% Ethanol, 1000mM KCl, pH 8,5

Plasmidpräparation durch alkalischer Lyse (Birnboim&Doly, 1979)

Eine Alternative zur Plasmid-Aufreinigung mittels Kit stellt die alkalische Lyse dar (Birnboim&Doly, 1979). Dazu werden die *E.coli* Transformanten analog zu 2.3.1.1 kultiviert und zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wird nun in 2ml Lösung 1 aufgenommen und die alkalische Lyse durch Zugabe von 4ml Lösung 2 eingeleitet. Nach vorsichtigem Mischen folgt eine Inkubation bei RT für 5-10min. Nach dieser Zeit werden 3ml Lösung 3 zugegeben, vorsichtig gemischt und für 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wird diese Suspension wie unter 2.3.1.1 beschrieben zentrifugiert. Der klare Überstand wird nun durch Zugabe von 0.7 Vol. Isopropanol gefällt und für 30min bei 4°C und 14.000upm zentrifugiert. Nachdem das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in einer Vakuumpumpe angetrocknet wurde, wird es in 200-400µl TE pH 8.0 oder Wasser aufgenommen. Diese Plasmid-Präparation enthält allerdings noch große Mengen an bakterieller RNA und an Proteinen. Um die Aufreinigung zu verbessern, wird die Plasmid-DNA mit 50µg RNaseA/ml bei 37°C für 30min inkubiert. Anschließend wird mit 1 Vol. PCIA extrahiert und der wässrige Überstand durch Zugabe von 1/10 Vol 8M LiCl und 2.5 Vol. eiskaltem Ethanol gefällt. Die Plasmid-DNA wird dann zentrifugiert, gewaschen und anschließend getrocknet (s.o.). Das gewonnene Zellpellet wird wieder in 200-400µl TE oder Wasser aufgenommen.

<u>Lösung 1:</u>	Tris-HCl pH 7.4	25mM
	EDTA pH 7.4	10mM
	Saccharose	15%
<u>Lösung 2:</u>	NaOH	0.2M
	SDS	1%
<u>Lösung 3:</u>	NaAc pH 4.7	3M

Plasmid-Mini-Präparationen

Die Vorgehensweise und die Puffer bei Plasmid-Mini-Präparationen entspricht der unter 2.3.1.1 beschriebenen Methodik. 1ml einer *E.coli*-Kultur wird für 10s bei 14.000upm zentrifugiert. Das Kulturmedium wird vollständig abgenommen und die Zellen in 100µl Lösung 1 resuspendiert. Es folgt die alkalische Lyse durch Zugabe von 200µl Lösung 2 und nach einer 5minütigen Inkubation bei RT die Zugabe von 150µl Lösung 3. Die Suspension wird für 5min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 14.000upm zentrifugiert. Der klare Überstand wird anschließend durch Zugabe von 1ml eiskaltem Ethanol gefällt (optional kann vorher eine Extraktion mit PCIA erfolgen). Die Präparation wird für 15 Minuten bei 14.000upm zentrifugiert und nach Abnehmen des Überstandes mit 70% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wird anschließend in 40µl Wasser oder TE aufgenommen.

2.3.1.2 Präparation von chromosomaler DNA aus *Dictyostelium*

Maxi-Präparation

Die axenisch gewachsenen *D. discoideum* Zellen werden bei 1700upm für 10min zentrifugiert und einmal mit eiskaltem Phosphatpuffer gewaschen. Das Zellpellet wird in Lysepuffer ohne NP40 resuspendiert, wobei man für 1×10^8 Zellen ca. 10-15ml Puffer benötigt. Der Zellsuspension wird dann tropfenweise eine 10%ige NP40-Lösung zugegeben (bis max. 1% v/v) und anschließend vorsichtig geschüttelt. Durch diese Prozedur werden die Zellen zerstört, ohne jedoch die Zellkerne zu zerstören. Das Lysat wird dann für 15-20min bei 4000upm und 4°C zentrifugiert. Der klare

Überstand wird anschließend abgegossen und das weißliche Zellkernpellet vorsichtig in SDS-Lysepuffer aufgenommen (pro 1×10^8 Zellen ca. 1ml). Es folgt eine Inkubation im Wasserbad für 2-4 Stunden bei 60°C. Nach einer zweimaligen Extraktion mit 1 Vol. Phenol/Chloroform, wird die DNA durch Zugabe von 1/10 Vol. 8M LiCl und 2.5 Vol. eiskaltem Ethanol gefällt. Nachdem die DNA für 15-30min bei 8000upm zentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen worden ist, wird das leicht luftgetrocknete Pellet in 200-500µl TE pH8.0 + 0.1µg/µl RNaseA aufgenommen. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgt immer bei 4°C.

Mini-Präparation (Barth et al., 1998)

Die zu untersuchenden *Dictyostelium* Zellen werden in Mikrotiterplatten (z.B. Costar 24 well) kultiviert. Die Methode ist auch anwendbar bei einer vollgewachsenen 5ml Petrischale. Die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet (1-3s 14.000upm oder für 10min bei 4.000upm) und einmal mit Phosphatpuffer gewaschen. Die Zell-Pellet werden dann in 300µl TES-Puffer resuspendiert (ausreichend für ca. 5×10^6 Zellen) und für 10 Minuten bei -80°C eingefroren. Anschließend lässt man die Zellen auf Eis langsam auftauen und gibt dann 30µg ProteinaseK (gelöst in TE oder TES) hinzu. Nach 30-40 Minuten Inkubation bei 37°C wird dann einmal mit PCIA extrahiert und der wässrige Überstand mit Ethanol gefällt. Bei der Präparation aus einer Mikrotiterplatte erreicht man eine Ausbeute von ca. 0.3µg, was für einen Restriktionsverdau ausreichend ist.

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

2.3.1.3 Präparation von gesamt-RNA aus *Dictyostelium*

Für RNA Präparationen sollten ausschließlich dafür besonders vorgesehene Puffer verwendet werden, außerdem sollte man darauf achten, dass möglichst bei 4°C oder auf Eis gearbeitet wird. Zum Schutz vor RNasen wird außerdem grundsätzlich mit Handschuhen gearbeitet. Je nach Versuchsansatz sollte man für die RNA-

Präparation zwischen 3×10^6 bis 1×10^7 Zellen bereitstellen. Die Zellen werden aus ihren jeweiligen Wachstumsbedingungen geerntet und ggf. mit Phosphatpuffer gewaschen (10 min bei 1.800upm; 4°C Hettich Rotana). Das zentrifugierte Zellpellet wird in Lösung D aufgenommen und mit einer Pipette mehrmals aufgesaugt. Das Volumen an Lösung D sollte so gewählt werden, dass eine Entkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml resultiert. Die Zellen werden durch den Puffer lysiert und es entsteht eine hochviskose Suspension. Diese wird in ein Eppendorfgefäß (1,5ml) überführt und 1/10 Vol. Natriumacetat pH4,7 zugegeben. Dann werden 0,7 Vol. Phenol/Chloroform zugegeben und kräftig gevortext. Die so entstandene Emulsion wird für 30 min. auf Eis inkubiert und kann für mehrere Tage bei 4°C gelagert werden, ohne dass nennenswerte Degradationsprodukte entstehen. Zur Trennung der Phasen wird für 10 min. bei 14.000upm zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nun wird die RNA durch Zugabe von 1 Vol Isopropanol gefällt und bei -20°C für mindestens 1 Stunde präzipitiert. Die so gefällte RNA wird für 10-20 min. bei 14.000upm zentrifugiert und einmal mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wird kurz angetrocknet und kann dann in DEPC-Wasser aufgenommen, oder aber direkt in 37%igen Formamid resuspendiert werden. Pro 1×10^7 Zellen sollten dabei ca. 100µl Wasser oder Formamid gewählt werden, um eine ausreichende Lösung der RNA zu gewährleisten.

2.3.2 DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen

2.3.2.1 „Filtermethode“ nach Weichenhan (Weichenhan, 1991)

Nach dem Restriktionsverdau wird die geschnittene DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und die gewünschte Bande unter UV-Licht (366nm) aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wird dann in eine Konstruktion aus zwei 1,5ml Eppendorfgefäßen überführt. Diese Konstruktion enthält Whatman-Papier 3MM über die der Agaroseblock zentrifugiert wird. Das Papier hält dabei die Agarose zurück und trennt so den flüssigen Bestandteil ab, der sich nach 1min Zentrifugation bei 14.000upm im unteren Eppendorfgefäß sammelt. Diese wässrige Lösung kann dann ggf. gefällt werden, um eine höhere Konzentration der DNA zu erreichen.

2.3.2.2 Aufreinigung mit dem Nucleotrap™Kit (Macherei und Nagel)

Das Nucleotrap™Kit kann für die Aufreinigung von Nukleinsäuren bei unterschiedlichen Bedingungen (z.B. nach einer PCR) ohne die Verwendung von Phenol genutzt werden. Das Elutionsvolumen beträgt nach der Aufreinigung zwischen 20-40µl. Unter Hochsalzbedingungen (chaotrope Salz) binden Nukleinsäuren ohne den schützenden Wasserkomplex an Glasoberflächen und können so von dem umgebenden Lösungsmittel getrennt werden.

Um ein DNA-Fragment aus einem Agarosegel zu eluieren wird nach der Gelelektrophorese die betreffende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Dabei sollte darauf geachtet werden, einen möglichst kleinen Agaroseblock zu erhalten. Pro 100mg Agaroseblock wird dann 300µl Lösung NT1 zugegeben. Bei Agarosekonzentrationen über 2% sollte diese Menge verdoppelt werden. Die Nucleotrap-Suspension wird dann kurz homogenisiert und pro µg DNA ca. 4µl zu der Agarose-NT1-Suspension hinzugegeben. Erfahrungswerte zeigen allerdings, dass zu große Mengen an Nucleotrap-Suspension die Ausbeute stark herabsetzen können (pers. Mittl. Beate Schnell). Die Suspension wird dann kurz gevortext und für mind. 10 min. bei 50°C inkubiert, um die Agarose chemisch zu zersetzen. Die Ausbeute an gebundener DNA kann durch regelmäßiges Vortexen während dieser Inkubationszeit erhöht werden. Nach der Inkubationszeit wird die Suspension für 60s bei 14.000 upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wird zweimal mit je 500µl Puffer NT2 und anschließend wieder zweimal mit Puffer NT3 gewaschen (resuspendieren; 60s. 14.000 upm; Überstand verwerfen). Nach dem letzten Waschschrift sollte ein weiteres mal kurz zentrifugiert werden und der klare Überstand mit einer Pipette vorsichtig, aber vollständig abgenommen werden. Das Pellet wird dann für 10-15 min. bei RT getrocknet, wobei man die Verwendung einer Speed-Vac nicht in Betracht ziehen sollte, um höhere Ausbeuten zu erzielen. Um die aufgereinigte DNA wieder von ihrer Matrix zu lösen, gibt man anschließend die gewünschte Menge an TE (Niedrigsalzbedingung) zu dem getrockneten Pellet hinzu und inkubiert nach der Resuspendierung für 10 min. bei RT. Danach wird kurz zentrifugiert und der wässrige Überstand vorsichtig abgenommen. Eine wiederholte Elution steigert die Ausbeute, daher hat sich folgendes Rezept bewährt:

Das getrocknete Pellet wird 2-3 mal mit je 50µl TE pH 8,0 bei 50°C eluiert und der Überstand gesammelt. Anschließend erfolgt eine DNA-Präzipitation mit 1/10 Vol. 8M LiCl und 2,5 Vol. Ethanol. Nach der abschließenden Zentrifugation und einem Waschschrift mit 70% Ethanol erzielt man so bis zu zehn mal höhere Ausbeuten, als vom Hersteller angegebenen (pers. Mittl. Beate Schnell).

2.3.2.3 Aufreinigung aus LM-Agarose

Die gängig im Labor verwendete Agarose schmilzt erst bei relativ hohen Temperaturen und ist daher für die hier beschriebene Methode nicht geeignet. Daher verwendet man sog. LM (low-melting) Agarose, die bereits bei 50°C vollständig gelöst ist. Wenn man über eine geeignete Elektrophoreskammer verfügt, kann man die Aufreinigung aus einem Agarosegel beginnen, das aus normaler Agarose besteht (ansonsten muss das ganze Gel aus LM-Agarose hergestellt werden). Nach einer ausreichenden Auftrennung schneidet man kurz vor der aufzureinigenden DNA-Bande einen kleinen Agaroseblock aus dem Gel heraus und gießt in diese Öffnung ausreichend LM-Agarose. Nach dem Verfestigen lässt man das Gel solange weiterlaufen, bis sich die gewünschte DNA-Bande in der LM-Agarose befindet. Dann nimmt man den LM-Agaroseblock vorsichtig aus dem Gel heraus und überführt diesen in ein Eppendorfgefäß. Dann fügt man soviel TE oder Wasser hinzu, so dass eine Agarose-Endkonzentration von weniger als 0,5% entsteht. Nach kurzem Vortexen wird die Agarose solange bei 50°C inkubiert, bis sich diese vollständig gelöst hat. Zur Aufreinigung der Nukleinsäuren wird nun zweimal mit je einem Volumen Phenol (nicht Phenol/Chloroform!) extrahiert. Der wässrige Überstand wird abschließend mit Ethanol/LiCl oder aber Isopropanol/NaAcetat gefällt und das getrocknete Pellet im gewünschten Volumen aufgenommen.

Die Aufreinigung mit LM-Agarose hat im Rahmen meiner Experimenten im Vergleich zu den gängigen anderen Methoden immer hohe Ausbeuten erbracht. Allerdings wurden öfters Probleme bei anschließenden Ligationen beobachtet. Dies wird auf schwer zu entfernende Borat-Salze zurückgeführt (pers. Mit. Dr. Oberstraß).

2.3.2.4 „Phenol Freeze“

Nach der Auftrennung im Agarosegel wird die betreffende DNA-Bande ausgeschnitten. Der Agaroseblock wird möglichst gut zerkleinert und durch eine

engmaschige Gaze gedrückt. Die Suspension wird in ein Eppendorf überführt und mit 200µl Phenol (Tris pH8,4 gesättigt) extrahiert und bei -80°C oder auf Trockeneis eingefroren. Diese Suspension wird dann anschließend für mind. 15min. bei 14.000upm zentrifugiert und der wässrige Überstand danach noch zweimal mit 1Vol. PCIA extrahiert. Anschließend erfolgt eine LiCl/Ethanol-fällung, Um die DNA ausreichend anzukonzentrieren.

2.3.3 Klonierung von DNA-Fragmenten (Standard-DNA-Techniken)

Die Zusammensetzung der Lösungen und die Durchführung der einzelnen Techniken entspricht, soweit nicht anders angegeben, denen von *Sambrook et al.*(1989).

2.3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgt unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Dafür wird der entsprechende, mitgelieferte Puffer benutzt und die empfohlene Temperatur eingehalten. Plasmid-DNA wird für 1-3 Stunden mit 1-2U Restriktionsendonuklease pro µg DNA inkubiert, genomische DNA wird für 4-18 Stunden mit ca. 5-10U Enzym pro µg DNA verdaut

2.3.3.2 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation von geschnittenen Vektoren zu vermeiden, wird enzymatisch die Phosphatgruppe am 5'-Ende entfernt. Dazu verwendet man die alkalische Phosphatase aus Krabben (SAP) deren Vorteil in einer hohen Aktivität und einer gute Stabilität liegt. Die Phosphatase kann entweder direkt in den Restriktionsverdau gegeben werden (2-4U), oder aber anschließend hinzugegeben werden. Dazu wird der Ansatz mit 1-2U Enzym für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und danach eine Hitzeinaktivierung bei mind. 75°C für 15 Minuten durchgeführt.

2.3.3.3 Ligation von DNA

Zur Ligation von DNA-Fragmenten oder Vektoren wird die T4 DNA-Ligase (Mbi) im mitgelieferten Puffersystem verwendet. Dazu wird die DNA in einem möglichst kleinen Volumen über Nacht bei $14-18^{\circ}\text{C}$ inkubiert und kann dann direkt in Bakterien transformiert werden. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren wird das Fragment in einem vierfachen Überschuss zum Ligationsansatz hinzugegeben.

Werden blunt-ends ligiert, wird dem Ligationspuffer zusätzlich PEG-8000 (5% w/v) zugegeben und mit 2-3U Ligase ligiert. Bei der Ligation von sticky-ends sind 0,2-1U Ligase ausreichend.

2.3.3.4 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Agarose wird in einer Konzentration von 0,4% bis 1,8% in kalten Tris-Borat-Puffer gegeben und in der Mikrowelle vorsichtig aufgekocht. Nachdem sich die gesamte Agarose gelöst hat, wird 0,5µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und die Agarose in den vorgesehenen, horizontalen Gelträger gegossen. Als Laufpuffer dient ebenfalls Tris-Borat-Puffer. Vor dem Gelauftrag wird die DNA mit 1/5 Volumen 5xDNA-Ladepuffer gemischt und dann vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmaßstab dient 1kB DNA-Leiter (Mbi) oder 100bp-Leiter (Mbi). Nach der Elektrophorese bei konstanter Spannung wird das Gel mit dem EASY-System unter UV-Licht (256nm) dokumentiert.

2.3.3.5 Erzeugung von blunt ends

Zur Erzeugung von blunt ends aus sticky ends stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

Mit der S1-Nuclease (Mbi) wird die einzelsträngige DNA vollständig abgebaut. Dabei wird das vom Hersteller gelieferte Puffersystem benutzt und die empfohlene Temperatur und Inkubationszeit eingehalten.

Mit Hilfe der 5'→3' Polymeraseaktivität des Klenow-Fragmentes der *E.coli* DNA-Polymerase kann das 5' überstehende Ende aufgefüllt werden. Dazu wird die DNA zusammen mit Klenow-Puffer (Mbi), je 20mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP und Klenow-Fragment (ca. 4U/µg DNA) bei 37°C für 30-60 Minute inkubiert. Anschließend sollte eine Phenol-Extraktion durchgeführt werden.

2.3.3.6 Transformation von *E. coli*

CaCl₂-Methode (Dagert&Ehrlich, 1979)

Mit einer Übernachtskultur des betreffenden *E. coli* Stammes wird eine 50ml Hauptkultur in LB-Medium angeimpft (1ml) und bis zu einer OD₆₅₀ von 0,3 bis 0,5 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wird dann für 10min bei

4.000upm (Hettich, 4°C) zentrifugiert und das Pellet anschließend in 50ml eiskaltem 50mM CaCl₂ resuspendiert. Nach 15-30min Inkubation auf Eis werden die Zellen wieder zentrifugiert und in 5ml eiskaltem 50mM CaCl₂ aufgenommen. Nach weiteren 30min auf Eis sind die Zellen bereits transformations-kompetent, jedoch erzielt man bessere Ergebnisse, wenn die Zellen für 1-2 Nächte bei –80°C inkubiert werden.

Zur Transformation werden 100-200µl Bakteriensuspension mit der gewünschten Plasmidmenge vermischt und auf Eis für 10-30min inkubiert. Dann wird die Suspension bei 42°C für 90s „geschockt“ und anschließend 1000µl LB-Medium hinzugegeben. Nachdem die Zellen für 30-60min bei 37°C geschüttelt worden sind, wird kurz zentrifugiert (14.000upm; 5s) und der Überstand fast vollständig verworfen. In der Restflüssigkeit werden die Zellen resuspendiert und dann auf Selektionsmedium ausplattiert.

Um die kompetenten Bakterien Zellen zu lagern, wird Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15-20% hinzugegeben und die Suspension aliquotiert. Die Lagerung erfolgt dann bei –80°C. Zur Benutzung der Zellen müssen diese vorsichtig auf Eis aufgetaut werden.

Elektroporation

Die Elektroporation von Bakterien erbringt eine hohe Ausbeute an Transformanten, die in dieser Arbeit vor allem für Plasmid-rescues genutzt wurde. Bei der Elektroporation muss darauf geachtet werden, dass das Volumen der zu transformierenden DNA nicht mehr als 1/10 des Transformationsansatz überschreitet. Auch eine zu große DNA-Menge verringert die Transformationseffizienz deutlich, daher sollten pro Elektroporation nicht mehr als 10µg DNA transformiert werden.

Eine 100ml Hauptkultur (LB-Medium) wird mit 2-4ml Bakterien-Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₅₀ von 0,4 bis 0,5 bei 37°C inkubiert. Dann werden die Zellen für 20min auf Eis gestellt und anschließend bei 4.000upm (Hettich; 4°C) zentrifugiert. Die Zellen werden dann zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und anschließend in 1ml eiskaltem Wasser aufgenommen – die Zellen sind nun von Salzen freigewaschen und können elektroporiert werden. Um die Zellen längere Zeit zu lagern gibt man 15-20% Glycerin hinzu und friert Aliquots von 100µl bei –80°C ein.

Für die Transformation gibt man 100µl Zellsuspension zusammen mit der zu transformierenden DNA in eine eiskalte 2mm Elektroporationsküvette (Bio-Rad). In dieser Küvette inkubiert man die Zellen für 20-30min auf Eis. Die Elektroporation erfolgt dann bei 4kV und 25µF, wobei eine Zeitkonstante zwischen 2-3 erreicht wird. Die transformierten Zellen werden dann mit 1ml LB-Medium in ein Eppendorfgefäß überführt und für 30-60min bei 37°C inkubiert. Nachdem man die Zellen kurz zentrifugiert und den Überstand abgegossen hat, kann man die Bakterien in der Restflüssigkeit resuspendieren und ausplattieren.

„Blue/White“-Test

Einige Vektoren verfügen über ein „Polylinker“, der von einem veränderten, bakteriellen β -Galaktosidase-Gen umgeben ist. Der Leserahmen des β -Galaktosidase-Gens ist bei intaktem (leerem) Polylinker ununterbrochen ablesbar und liefert funktionelle β -Galaktosidase. Wird in den Polylinker ein DNA-Fragment integriert, wird der Leserahmen der β -Galaktosidase unterbrochen und die Bakterien (Laborstämme, die keine endogene β -Galaktosidase besitzen, z.B. DH5 α) zeigen keine β -Galaktosidase-Aktivität.

Um diese Aktivität schnell sichtbar zu machen wird kurz vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes IPTG als Induktor des β -Gal-Promotors und X-Gal als Substrat der β -Galaktosidase auf dem LB-Agar ausplattiert. X-Gal liefert nach Spaltung durch β -Galaktosidase einen blauen Farbstoff, der den Bakterienklon auf den ersten Blick als Träger eines Vektors ohne zusätzliches Fragment erscheinen lässt.

2.3.3.7 Plasmidsequenzierung

Plasmide können mittels Kettenabbruch-Methode nach alkalischer Denaturierung sequenziert werden (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierung wird mit dem T7-Sequenzier-Kit von der Firma Pharmacia durchgeführt, wobei für pUC-Derivate Revers- bzw. Forward-Primer verwendet und für pGem-Derivate SP6, bzw. T7-Primer benutzt werden.

Für die Denaturierung werden 1-5µg DNA auf ein Volumen von 36µl mit Wasser aufgefüllt und durch Zugabe von 4µl 2M NaOH denaturiert. Nach einer Inkubation von 15min bei Raumtemperatur wird die DNA durch Zugabe von 4µl 2M NaAcetat

(pH 4,7) und 110µl eiskaltem Ethanol präzipitiert. Die DNA wird 15-30min bei 4°C zentrifugiert (14.000upm) und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen.

Nach der Trocknung des DNA-Pellets wird dieses in 15µl Wasser aufgenommen. 5pmol des zugegebenen Primers werden dann für 20min bei 37°C in 1xHybridisierungspuffer hybridisiert. Nach einer abschließenden Inkubation für 10min bei Raumtemperatur kann das Plasmid sequenziert werden.

Zum Hybridisierungsansatz wird 3µl „Labeling mix“, 1µl ³⁵S-dATP und 2µl T7-Polymerase zugegeben. Dieser Ansatz wird gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit werden die Terminationsgemische (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP je 2,5µl) auf vier Eppendorfgefäße verteilt und bei 37°C vorgewärmt. Zu diesen Ansätzen werden je 4,5µl des Hybridisierungsgemisches hinzupipetiert und für weitere 5min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit gibt man 5µl Stoppmix hinzu – die Ansätze können nun auf einem Gel analysiert werden.

Für das denaturierende Acrylamid-Gel wird der mit TEMED und APS gestartete Polymerisationsmix zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach 1h ist dieses Gel verwendbar und wird dazu in der vertikalen Gelelektrophorese-Apparatur für 30min bei konstant 40W vorinkubiert. Auf das vortemperierte Gel können nun die verschiedenen Terminationsgemische aufgetragen werden. Die Gelelektrophorese erfolgt bei konstant 40W.

<u>Acrylamid-Sequenzgel:</u>	32g	Harnstoff
	7,5ml	10xTBE
	10ml	Protogel 40% (19:1 Acrylamid:Bisacrylamid)
	Harnstoff im Wasserbad bis max. 40°C lösen	
	ad 75ml	H ₂ O
	Reaktion starten mit 80µl TEMED und 150µl 10% APS	

2.3.3.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert DNA in vitro (Saiki *et al.*, 1988). Durch die Verwendung einer hitzeresistenten Taq-Polymerase (Chien *et al.*, 1976) können die unterschiedlichen Reaktionsschritte der PCR (Denaturierung, Annealing und

Polymerisation) kontinuierlich durchgeführt werden. Die jeweiligen Reaktions-Bedingungen müssen für die Amplifizierung verschiedener DNA-Fragment immer neu ermittelt werden, da meistens die Primer-Zusammensetzung, oder aber das Template variieren. Ein typischer Reaktionsansatz hat folgende Zusammensetzung:

1ng-0,1µg	DNA
50pmol	Primer-Paar
100µM	dNTP-MIX
5µl	10xPCR-Puffer (Mbi; 1-2,5mM MgCl ₂)
2-3µl	Taq-Polymerase
ad 50µl	H ₂ O

Die eigentliche Reaktion wird mit einem Thermo-Cycler durchgeführt, wobei die Anzahl der Zyklen und die Temperaturen der einzelnen Schritte an die jeweilig PCR-Reaktion angepasst werden müssen. In der Regel hat eine PCR-Reaktion zwischen 25 und 30 Zyklen, wobei die Denaturierung bei 92-95°C durchgeführt wird und die Polymerisation bei 72°C stattfindet.

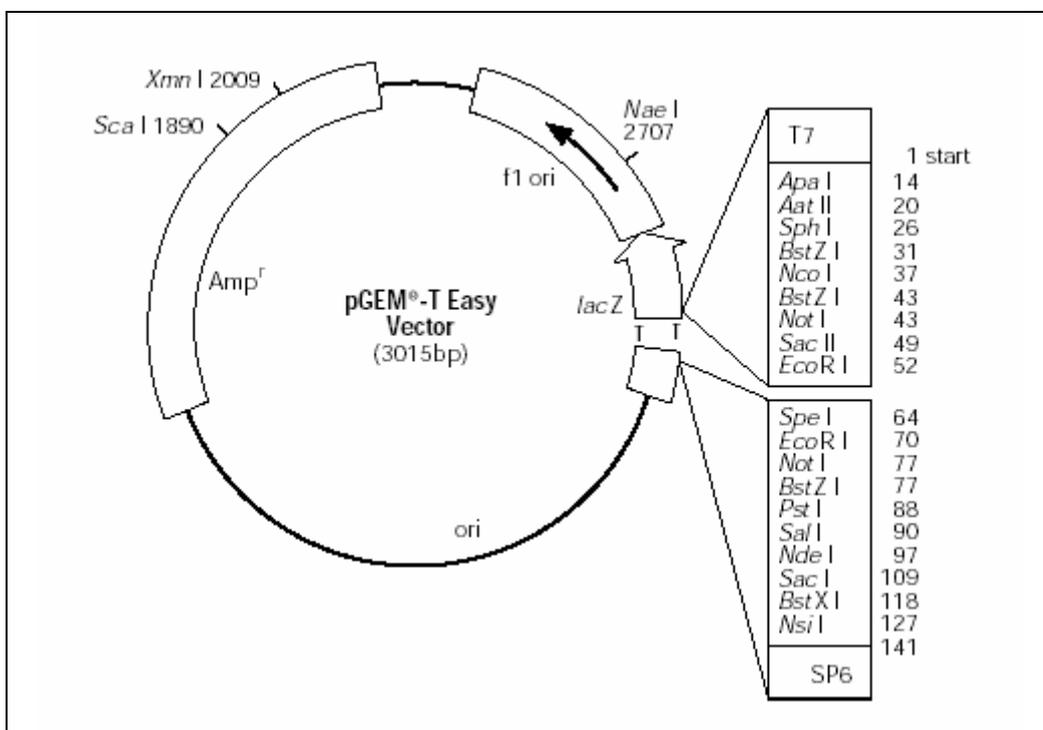


Abb. 2-4: Restriktionskarte und Map von pGEM-T Easy.

2.3.3.9 Klonierung von PCR-Fragmenten mit dem T-Cloning-Kit

Um PCR-Fragment effektiv zu klonieren, kann die sog. „T-Cloning“ Methode angewendet werden. Diese Methode basiert auf einer Aktivität der Taq-Polymerase, die in den meisten Fällen an das 3'-Ende des amplifizierten Stranges ein Adenin-Nukleotid anhängt. Dieses „einzelsträngige“ Nukleotid kann sich mit einem freien Thymidin-Nukleotid des Vektors paaren. Die Verwendung dieser „sticky ends“ führt zu einer hohen Ausbeute von klonierten PCR-Fragmenten und erlaubt es dem Anwender ohne die Benutzung von Restriktionsendonukleasen PCR-Fragmente zu klonieren.

Für eine Standard-Ligation wird folgende Reaktion mit den im Kit mitgelieferten Reagenzien pipettiert:

5µl	2xRapid Ligation Buffer
1µl	pGEM-T Easy™ Vektor (0,5µg/µl)
1µl	T4 DNA Ligase (3U/µl)
ad 10µl	PCR-Produkt und deionisiertes Wasser

Die Ligation wird anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und kann dann transformiert werden. Um eine höhere Ausbeute zu erlangen, kann die Ligation auch bei 4°C über Nacht inkubiert werden

2.3.3.10 Blot-Verfahren und Hybridisierung

„Southern“ Transfer

Beim Southern Transfer wird eine in Agarosegel aufgetrennte DNA auf eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran übertragen (Southern, 1975). Mit komplementären DNA- oder RNA-Sonden können dann durch Hybridisierung spezifische DNA-Fragmente nachgewiesen werden.

Nach der Gelelektrophorese wird das Gel unter UV-Licht dokumentiert und anschließend für 30min in Denaturierungspuffer inkubiert. Nach der Denaturierung wird das Gel für 30min in Neutralisationspuffer geschwenkt und anschließend kurz in 20xSSC getaucht. Der eigentliche Transfer erfolgt über Nacht von unten (20xSSC-Reservoir) durch das Gel hindurch nach oben in einen Stapel Papiertücher. Um den

Vorgang zu unterstützen, wird auf den Papierstapel ein max. 1kg schweres Gewicht gelegt.

Nach dem Abbau des Blots wird die Membran kurz in 2xSSC geschwenkt. Die irreversible Bindung der DNA an die Membran erfolgt mittels UV Licht (256nm; 0,125J/cm²). Falls der Blot nicht sofort benutzt werden soll, kann dieser trocken bei – 20° gelagert werden.

Hybridisierung von DNA-Blots

Der Blot wird kurz mit 2xSSC angefeuchtet und in eine Hybridisierungsröhre überführt. Zwischen Blot und Glaswand sollten dabei keine Luftblasen auftreten und falls der Blot zu groß ist, muss eine engmaschige Gaze benutzt werden.

Dann sollte der Blot in 10-15ml Hybridisierungslösung bei 42°C für 30-60min prähybridisiert werden. Anschließend wird der Puffer entfernt und 10-15ml frischer Hybridisierungspuffer in die Röhre gegeben. Die ³²P-markierte Sonde wird denaturiert (90-95°C; 5min) und direkt in den Puffer gegeben. Der Blot wird in dieser Lösung über Nacht im Hybridisierungssofen bei 42°C inkubiert. Nach der ausreichend langer Inkubation wird die radioaktive Sonde mit dem Puffer abgegossen und frischer Hybridisierungspuffer zugegeben. Der Blot wird mit diesem Puffer für 30min gewaschen und anschließend noch 2-3 mal mit Waschpuffer für je 30min inkubiert. Alle Waschschrirte erfolgen bei 42°C, wobei man nach den Waschen des Blotes messen sollte, ob die Strahlung deutlich abnimmt. Dann kann der Blot in Frischhaltefolie gewickelt werden und auf einer Imager-Platte exponiert werden. Die Exponierung erfolgt je nach Strahlenintensität für 5-48h.

Hybridisierungslösung:

- 50% Formamid
- 2x SSC
- 1% Sarcosyl
- 4mM EDTA
- 0,1% SDS
- 4% 100xDenhardt
- 0,12M Na-Phosphatpuffer pH 6,8

<u>Waschpuffer:</u>	50%	Formamid
	2x	SSC
	1%	Sarcosyl
	2mM	EDTA
	0,2%	SDS
	0,12M	Na-Phosphatpuffer pH 6,8

„Northern“ Transfer

Beim „Northern“-Transfer wird RNA in einem denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylon- oder Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend kann dieser Blot benutzt werden, um spezifisch die RNA einzelner Gene zu zeigen.

Zur Herstellung des denaturierenden Gels wird 0,72g Agarose in 44ml Wasser gegeben und aufgeköcht. Nach der Abkühlung auf unter 60°C werden 10ml 40% Formaldehyd und 6ml RNA-Gelpuffer zugegeben und die Lösung anschließend in das vorbereitete Gelbett gegossen. Die gewünschte Menge RNA wird in der Speed-Vak getrocknet und in 10µl RNA-Probepuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen werden die Proben für 5min bei 95°C denaturiert und dann auf das mit RNA-Laufpuffer überschichtete Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 4°C bei konstanter Spannung. Anschließend wird das Gel unter UV-Licht dokumentiert und kurz in H₂O geschwenkt. Der Blotaufbau und die Weiterbehandlung des Blots erfolgt dann wie bereits unter 3.3.1 beschrieben.

Hybridisierung von RNA-Blots

Bei der Hybridisierung des Northern-blots muss die Temperatur an die jeweiligen Bedingungen angepasst werden. Dabei sollten man für RNA-RNA-Hybridisierungen Temperaturen von ca. 55°C und bei der Hybridisierung von DNA auf RNA Temperaturen von 37-42°C benutzen. Ansonsten entspricht die Hybridisierungsprozedur der bereits beschriebenen Hybridisierung von Souther-blots.

Radioaktive Markierung von DNA (Oligo-Labeling)

Zur radioaktiven Markierung kann die sog. „Oligo-labeling“-Methode benutzt werden, die wieder auf der Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragmentes basiert. An

denaturierte DNA werden dabei vollständig randomisierte Hexamere hybridisiert, wodurch ein kurzer Doppelstrang entsteht, der von der Klenow-Polymerase als Replikationsstartpunkt benutzt wird. Bei der folgenden Polymerisation werden dann radioaktive Nukleotide (hier α - ^{32}P -ATP) eingebaut.

0,5-1 μg DNA wird für 5min bei 95°C denaturiert und zu folgendem Reaktionsgemisch gegeben:

10 μl OLB-MIX
 5 μl α - ^{32}P -ATP
 2U Klenow-Fragment (Mbi)
 ad 50 μl H₂O

Dieser Reaktionsmix wird für 1h bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden wird 100 μl Phenol-gesättigtes TE zugegeben und die freien Nukleotide mit Hilfe einer Sephadex G50 Säule abgetrennt. Die aufgereinigte, markierte DNA wird vor der Benutzung für 5-10min bei 95°C denaturiert und kann dann zur Hybridisierung benutzt werden.

<u>OLB-Mix:</u>	200mM	Tris/HCl, pH7,5
	25mM	MgCl ₂
	10mM	β -Mercapthoethanol
	1M	HEPES, pH6,6
	13,5U	Hexamere (Mbi)
	0,25mM	dCTP, dGTP, dTTP

Radioaktive Markierung von RNA (in vitro Transkription)

Verschiedene Vektoren (hier: pGem) verfügen über Transkriptionsstartpunkte für die SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase, die für *in vitro* Transkriptionen genutzt werden können. Dafür wird die Plasmid-DNA mit einem Restriktionsenzym an der gewünschten Stelle geschnitten („run-off“) und entweder über ein Agarose-Gel aufgereinigt, oder aber nur Phenol-Extrahiert. Die vorbereitete DNA muss vor der Benutzung Ethanolgefällt werden und wird dann für folgendem Reaktionsmix verwendet:

1-5µg	Template-DNA
10µl	IVT A
10µl	IVT B
10µl	rNTP-Mix
1µl	RNA-Polymerase (Mbi)
1µl	RNasin (Mbi)
2-5µl	- ³² P-UTP
ad 50µl DEPC-Wasser	

Nach 30-60min Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 100µl Phenol-gesättigtem TE beendet und die überzähligen Nukleotide mit einer Sephadex G50 Säule abgetrennt. Vor der Hybridisierung wird die RNA kurz bei 95°C denaturiert.

IVT A:	100mM Na-Phosphatpuffer pH 7,7
IVT B:	40mM MgCl ₂ , 20mM Spermidin
rNTP-Mix:	je 5mM ATP, GTP, CTP und UTP

2.3.3.11 Schnelle Hybridisierung von Bakterien-Klonen

Will man schnell viele Bakterien-Klone auf Vektoren mit dem gewünschten, klonierten Fragment überprüfen, kann man Bakterien die auf eine Nylonmembran transferieren wurden dort aufschließen. Anschließend wird die gesamte bakterielle DNA auf dieser Membran gebunden und mit einer spezifischen Sonde hybridisiert.

Die Bakterien wachsen über Nacht bei Selektionsdruck auf einer LB-Platte. Auf diese Platte wird dann ein zugeschnittener Nylonfilter gelegt und vorsichtig angedrückt. Gleichzeitig legt man zwei kurze Stücke Klarsichtfolie auf den Labortisch und gibt auf das erste Stück Folie 10ml Denaturierungspuffer und auf das Zweite 10ml Neutralisierungspuffer. Der Nylonfilter wird mit den transferierten Bakterien vorsichtig abgezogen und mit der bakterienabgewandten Seite in die Denaturierungslösung gelegt. Nach 5-10min Inkubation überführt man den Filter in die Neutralisierungslösung. Nach diesem Schritt wird der Nylonfilter kurz in 2xSSC geschwenkt und kann dann als DNA-Blot weiterverwendet werden.

Färbelösung geschwenkt. Nicht gebundener Farbstoff wird dann mit Entfärbelösung aus dem Gel gewaschen. Dieser Vorgang dauert mehrere Stunden und kann mit in den Puffer gelegten Schaumstoffstücken unterstützt werden.

Eine schnelle, aber nicht sehr angenehme Methode ist die Coomassie-Färbung bei höheren Temperaturen. Dazu wird das Gel für 10-20min bei 60°C im Wasserbad in Färbelösung gefärbt (vorsicht: Methanol). Hierbei muss auf ausreichende Schwenkbewegung geachtet werden, da sonst das Gel ungleichmäßig gefärbt wird. Der Entfärbeschritt wird bei 40°C durchgeführt und dauert so nur zwischen 1-2h.

Färbelösung: 0,1% Coomassie-Blau R-250
 50% Methanol
 10% Essigsäure
Entfärbelösung: 10% Essigsäure

2.3.4.4 Proteinquantifikation mit Amidoschwarz

Zur Proteinquantifikation kann die Amidoschwarz-Methode benutzt werden. Wie bei allen Proteinquantifikationen muss hierbei gleichzeitig eine Eichgerade gegen BSA (1-30µg) erstellt werden. Dazu wird die Proteinprobe in 500µl Amidoschwarz-Lösung aufgenommen, wobei das Volumen der Proteinprobe nicht mehr als 1/50 ausmachen sollte. Die Mischung wird dann für 5min bei 10.000upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird nun vorsichtig mit 500µl Waschlösung gewaschen und anschließend die Waschlösung vollständig entfernt. Das Pellet (nicht antrocknen lassen) wird dann in 100µl 0,1N NaOH resuspendiert und bei 615nm gegen NaOH oder Wasser vermessen.

2.3.4.5 Immunodetektion mit enzymgekoppelten Antikörpern

Bei der Immunodetektion sind zwei verschiedene Puffersysteme anwendbar. Sowohl für alkalische-Phosphatase, als auch für Peroxidase-gekoppelte Antikörper ist das PBS-System verwendbar. Das NCP-Puffersystem eignet sich jedoch nur für alkalische-Phosphatase-gekoppelte Antikörper.

Der entsprechende Western-blot wird zunächst ohne Antikörper in Blocking-Lösung für 30min inkubiert. Diese Lösung wird verworfen und frische Blocking-Lösung mit dem primären Antikörper zugegeben. Die Inkubationszeit in dieser Lösung sollte

mindestens 4-8h betragen. Nach der Inkubation wird 3 mal für je 10min mit PBS-T gewaschen und danach der Sekundärantikörper (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase oder Peroxidase), gelöst in PBS zugegeben. Der Blot kann nach mind. 2h Inkubation wieder 2-3 mal mit PBS-T gewaschen werden. Vor der Detektion mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern sollte dann ein Waschschrift mit PBS erfolgen. Für die Detektion mit alkalischer Phosphatase wird in Substratpuffer für 10min umgepuffert und dann der Blot mit frischem Substratpuffer+BCIP (Spatelspitze) entwickelt.

Blocking-Lösung: 5% BSA oder Milchpulver
 0,2 % Tween-20
 ad 1000ml mit Phosphatpuffer +
 Spatelspitze NaN₃

PBS-T: 1xPBS + 0,2% Tween-20

Susbstratpuffer: 100mM Na₂CO₃
 0,2g/L BCIP

2.3.5 REMI-Mutagenese (Kuspa&Loomis, 1992)

Transformation

Bei der REMI-Mutagenese kommt es, wie bereits in der Einleitung beschrieben zu einem zufälligen Einbau von linearisierter Plasmid-DNA in das *Dictyostelium* Genom. Dieser Vorgang wird durch Restriktionsendonukleasen unterstützt, die zusammen mit der DNA transformiert werden.

Für die Mutagenese wird der betreffende *Dictyostelium* Klon kultiviert und für die Elektroporation gewaschen. Die Zellen werden dann zusammen mit 10-20µg Plasmid-DNA, die vorher mit BamHI linearisiert wird in die vorgekühlte Küvette gegeben (z.B. DIV2 oder pUCbsrΔBam). Nach 10min Inkubation auf Eis werden 150U DpnII zugegeben und die Zellsuspension kurz vermischt. Die Transformation wird dann mittels Elektroporation durchgeführt. Nach ca. 10 Tagen können die

Transformanten auf *Klebsiella*-Rasen vereinzelt werden und so sowohl der Discoidin-, als auch der Wachstumsphänotyp überprüft werden.

Plasmid-Rescue

Um die flankierenden DNA-Bereiche um den Integrationsort zu isolieren muss ein sog. „Rescue“ durchgeführt werden. Dazu sollte vorher ein Southern-blot durchgeführt werden, der klarstellt, ob es sich nur um eine einzelne Integration handelt und wie groß das zu erwartende Plasmid ist. Dafür überprüft man in der Regel Restriktionsenzyme, die nicht im transformierten Vektor schneiden. Nach der Präparation der genomischen DNA werden 10-15µg dieser DNA in einem Volumen von 100-150µl mit dem gewünschten Restriktionsenzym verdaut. Der Verdau wird phenolextrahiert und gefällt, um dann in einem Volumen von 50-100µl über Nacht ligiert zu werden. Dazu sollten ca. 10U T4-Ligase eingesetzt werden. Diese Ligation wird gefällt und zwei mal mit 70% Ethanol gewaschen, um anschließend in Bakterien elektroporiert zu werden. Als Kontrolle sollte dabei unverdaute, genomische DNA, linearisierter Transformationsvektor und Wasser ebenfalls transformiert werden, da dieses System sehr anfällig für DNA-Kontaminationen ist.

3. ERGEBNISSE

3.1 Neu etablierte zellbiologische Methoden

3.1.1 Messung der PSF-Konzentration im Medium („PSF-Assay“)

Zu Beginn dieser Arbeit, stand für die Messung des „Prestarvation Factors“ (PSF; Burdine&Clarke, 1995) keine gängige Methode zur Verfügung, um die Konzentration an PSF in einer *Klebsiella*-Suspension verschiedener *Dictyostelium* Mutanten zu bestimmen. Da der Faktor PSF bisher biochemisch noch nicht charakterisiert worden ist und auch keine Mutanten zur Verfügung stehen, die einen Defekt der PSF-Produktion aufweisen, musste für die Konzentrationsdarstellung im Medium eine Methode angewendet werden, die eine relative Aktivität des konditionierten Puffers in Vergleich zur frischen *Klebsiella*-Suspension darstellen kann.

Mehrere Faktoren beeinflussen wahrscheinlich die Aktivität einer *Klebsiella*-Suspension – die für eine Bestimmung relevanten Faktoren sind hierbei die Qualität und Bakteriendichte der *Klebsiella*-Suspension und natürlich die Zelldichte des jeweiligen *Dictyostelium* Klons. Daher wurde folgender grundlegender Ablauf für ein sog. „PSF-Assay“ etabliert und in zahlreichen Experimenten standardmäßig durchgeführt:

Die Messung des „Prestarvation-Factor“ im Kultur-Medium beinhaltet generell zwei Schritte: Der erste Schritt ist die Gewinnung des jeweiligen konditionierten Kulturmediums, das später dazu genutzt wird eine neue *Klebsiella*-Suspension für den zweiten Schritt des PSF-Assays herzustellen. Dieser zweite Schritt ist die eigentliche Messung *in vivo*, die durch einen *Dictyostelium* Stamm ermöglicht wird, der die β -Galaktosidase identisch zum Discoidin-Gen exprimiert. Entscheidend für die Darstellung reproduzierbarer Ergebnisse ist eine kontrollierte Zellkulturtechnik, die besonderen Augenmerk auf die Zelldichte von *Dictyostelium* in *Klebsiella*-Suspension richtet, da bei zu hohen Zelldichten erste Schritte der *Dictyostelium* Entwicklung eingeleitet werden könnten und tote, lasierte Zellen das Kulturmedium unspezifisch verunreinigen könnten.

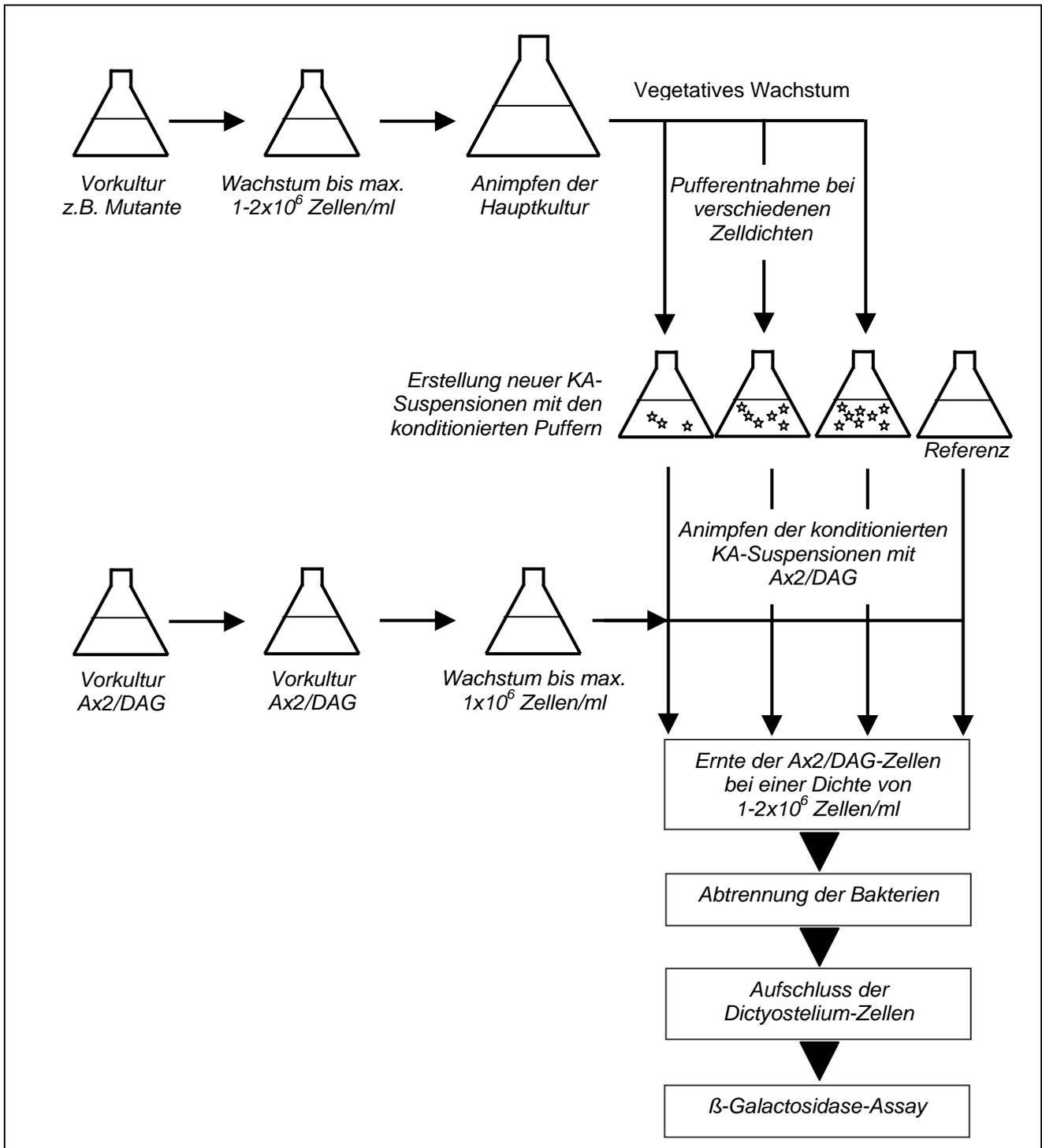


Abb. 3-1 : Schematischer Ablauf eines PSF-Assays.

Dargestellt ist der schematische Ablauf des Assays für einen beliebigen *Dictyostelium* Stamm. Als erster Schritt werden konditionierte Puffer hergestellt, die dann in einem zweiten Schritt mit Hilfe eines Teststammes gegen eine Referenzkultur getestet wird. Die relative Quantifizierung erfolgt mittels β -Galactosidase-Assay und Darstellung der Pufferaktivität gegen den Referenzwert.

Jedes PSF-Assay benötigt 1-2 Tage Vorlauf, d.h. alle *Dictyostelium* Zellen müssen vorab an das vegetative Wachstum adaptiert werden. Dazu werden die Zellen entweder von KA-Platten gepickt, oder gewaschen aus axenischem Medium in frische *Klebsiella*-Suspension überführt. Diese Vorkultur sollte über Nacht inkubiert werden, wobei darauf zu achten ist, dass eine Zelldichte von mehr als $2\text{-}3 \times 10^6$ Zellen/ml nicht überschritten wird.

Schritt 1: Herstellung des konditionierten Puffers

Mit vegetativ wachsenden Vorkulturen der zu testenden *Dictyostelium* Stämme (z.B. Mutante mit entsprechendem Wildtyp) werden als Übernachtskulturen in *Klebsiella*-Suspension angesetzt. Die Dichte dieser Übernachtskulturen sollte so gewählt werden, dass die Zelldichte am kommenden Morgen bei ca. $1\text{-}2 \times 10^6$ Zellen/ml liegt. Die jeweiligen Hauptkulturen werden dann am nächsten Tag mit frischer *Klebsiella*-Suspension inkubiert. Dazu wird soviel Volumen der Vorkulturen gewählt, so dass die Hauptkulturen bei einer Zelldichte von $2\text{-}3 \times 10^5$ Zellen/ml starten. Will man verschiedene *Dictyostelium* Stämme miteinander vergleichen, müssen die Hauptkulturen die gleiche Zelldichte zum Start aufweisen und mit einer identischen *Klebsiella*-Suspension kultiviert werden. Zusätzlich sollte man auch darauf achten, dass die *Klebsiella*-Suspension bei Start der Hauptkultur bereits die gewünschte Inkubationstemperatur aufweist.

Um die konditionierten Medien zu ernten, werden diese bei 10000Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in sterile Falcon-Tubes überführt. Die gereinigten Medien werden dann auf Eis gelagert, und sollten – falls sie mehr als 1-2 Tage aufbewahrt werden sollen - mit einem $0,45\mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert werden.

Um den PSF-Gehalt in diesen Puffern zu messen, werden diese Puffer später dafür genutzt, um neue *Klebsiella*-Suspensionen herzustellen. Dazu werden die KA-Platten nicht – wie gewohnt – mit 10ml Phosphatpuffer pro Platte abgewaschen, sondern es wird eine 10fach konzentrierte KA-Suspension hergestellt, d.h. die KA-Platten werden mit 1ml eiskaltem Phosphatpuffer pro Platte abgewaschen. Danach werden die konditionierten Puffer in einem Wasserbad auf die gewünschte Temperatur erwärmt und dann dazu genutzt um die 10fach konzentrierte KA-Suspension auf ein

normales Verhältnis zu verdünnen. Ebenso wird die 10fach konzentrierte Suspension genutzt, um 2-3 Kulturkolben als Referenz vorzubereiten, dazu wird nicht mit konditioniertem Puffer verdünnt, sondern mit frischem Phosphatpuffer.

Schritt 2: Bestimmung des PSF im konditionierten Puffer

Für die Darstellung der PSF-Konzentration im Medium steht theoretisch eine einfache Methode zur Verfügung: *Dictyostelium* Zellen (z.B. Ax2) werden in dem konditionierten Puffer inkubiert, bis die Kulturen eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml erreicht haben. Die Zellen werden dann durch differentielle Zentrifugation von den Bakterien getrennt und anschließend in einer definierten Konzentration in Laemmli-Puffer aufgenommen. Anschließend wird eine SDS-Page mit diesen Proben durchgeführt und der Western-blot mit α Discoidin-Antikörper inkubiert. In diesem Fall könnte man eine Abschätzung der Discoidin-Expression gegen die Expression in den Referenzkolben vornehmen. Allerdings ist eine genaue Quantifizierung in diesem Falle nicht möglich!?

Daher wurde für das PSF-Assay eine andere Methodik etabliert. Als „PSF-Sensor“ diente zwar wieder der Discoidin-Promotor, allerdings wurde ein *Dictyostelium* Stamm genutzt, der das Enzym β -Galaktosidase durch den Discoidin-Promotor gesteuert exprimiert (Ax2/DAG, zur Verfügung gestellt von Birgit Wetterauer).

Um den PSF-Gehalt indirekt über die Discoidin-Expression messen zu können, wird Ax2/DAG mit einer frischen *Klebsiella*-Suspension über Nacht an bakterielles Wachstum adaptiert. Mit dieser Vorkultur werden die konditionierten Suspensionen und die Referenzkolben mit frischem Puffer bei gleicher Dichte von $2-5 \times 10^4$ Zellen/ml angeimpft. Die Zellen werden dann bei 22°C und 160-180Upm über Nacht kultiviert.

Die Ernte der Zellen erfolgt in der Regel am nächsten Tag bei $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml durch differentielle Zentrifugation. Nachdem die Gesamtzellzahl einer jeden Probe bestimmt ist, wird das Zell-Pellet in Z-Puffer aufgenommen, so dass eine Konzentration von genau 1×10^7 Zellen pro Milliliter Assay entsteht. Pro Assay werden dann 5×10^6 Zellen in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und die Zellen wie folgt weiterbehandelt: 10 Minuten sonifizieren bei 100% Leistung im Wasserbad; 10 Minuten in flüssigem Stickstoff einfrieren; 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren. Die so aufgeschlossenen Zellen werden dann bei 14000Upm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, in das bereits 0,2

Volumen Z-Puffer+4mg/ml ONPG vorgelegt wurden. Der Reaktionsansatz wird anschließend für 4h bei 37°C inkubiert. Als Null-Probe für die photometrische Messung wird eine Reaktion mitgeführt, die keine Zellen enthält. Die Auswertung der Proben erfolgt am Photometer oder in einem ELISA-Reader bei 420nm gegen die Null-Probe.

3.1.2 Überprüfung der Discoidin-Regulation durch die Bakteriendichte

Die Bakteriendichte hat direkten Einfluss auf die Discoidin-Regulation bei vegetativem Wachstum (Burdine&Clarke, 1995). Um *Dictyostelium discoideum* Mutanten auf diesen Regulationsmechanismus hin zu überprüfen, lässt man die jeweiligen Mutanten in *Klebsiella*-Suspensionen verschiedener Dichte wachsen.

Dazu wird der betreffende *D. discoideum* Stamm über Nacht in Bakterien-Suspension kultiviert. Diese Vorkultur wird am nächsten Tag mit frischer KA-Suspension derart verdünnt, dass die Zelldichte bei Ansetzen der eigentlichen Testkolben ca. 1×10^6 Zellen/ml beträgt (damit wird verhindert, dass zuviel Kulturvolumen der Vorkultur in die Hauptkultur gegeben wird). Für die Hauptkulturen wird zuerst eine $3 \times$ *Klebsiella*-Suspension angesetzt (dies entspricht 10ml Phosphatpuffer pro Platte). Ein Teil dieser Suspension wird dann mit Phosphatpuffer verdünnt, so dass eine $1.5 \times$ und $0.5 \times$ *Klebsiella*-Suspension entsteht. Von dem jeweiligen *D. discoideum* Stamm werden nun je drei Hauptkulturen mit einer Dichte von $0.5-1 \times 10^5$ *Dictyostelium*-Zellen/ml bei unterschiedlicher KA-Konzentration angesetzt. Diese Kolben werden über Nacht kultiviert und am nächsten Tag bei $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml durch differentielle Zentrifugation geerntet. Anschließend kann die Discoidin-Expression mittels Western-blot dargestellt werden.

3.1.3 Messung des PSF-Rezeptors

Mit Hilfe des folgenden Assays kann man die Affinität und Menge des bisher unbekanntes PSF-Rezeptors indirekt messen. Dazu wird ein konditioniertes Medium mit gewaschenen Zellen inkubiert und das im Medium verbleibende PSF gemessen. Um das konditionierte Medium herzustellen wird Ax2 oder Ax4 in *Klebsiella*-Suspension bis zu einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml kultiviert. Die Suspension wird bei 10000Upm zentrifugiert und der klare Überstand in ein steriles Falcon-Tube überführt. Bis zum eigentlichen Test kann dieses Medium problemlos bis zu einer

Woche auf Eis gelagert werden. Der zu testende *D. discoideum* Stamm wird an das vegetative Wachstum in einer Vorkultur adaptiert und damit eine 100ml Hauptkultur inokuliert. Diese Hauptkultur wird bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml durch differentielle Zentrifugation geerntet und die Gesamtzellzahl bestimmt. Die Zellen werden dann nochmals zentrifugiert und in einer Dichte von 5×10^7 Zellen/ml in eiskaltem Phosphatpuffer resuspendiert. Zeitgleich werden vier kleine Erlenmeyer-Kolben vorbereitet – jeder Kolben wird mit 10ml konditioniertem Puffer gefüllt und auf Eis gut gekühlt. Die einzelnen Kolben werden anschließend mit folgendem Puffer aufgefüllt:

	Phosphatpuffer	10x <i>Klebsiella</i>	<i>Dictyostelium</i> in Phosphatpuffer 5×10^7 Zellen/ml
Kontrolle	2 ml	-	-
Kontrolle+<i>Klebsiella</i>	1 ml	1 ml	-
<i>Dictyostelium</i>	1 ml	-	1 ml
<i>Dictyostelium</i>+<i>Klebsiella</i>	-	1 ml	1ml

Die einzelnen Puffer werden dann auf Eis für 20-30 Minuten leicht geschüttelt und anschließend bei 4000upm in einer Kühlzentrifuge für 15 Minuten zentrifugiert. Die so gewonnenen Puffer und die verbleibende Restaktivität im Medium kann dann mit Hilfe eines PSF-Assays vermessen werden.

3.2 Die Mutante 11-1

Die Mutante 11-1 wurde von Ingrid Endl im Rahmen einer REMI-Mutagenese isoliert und für die weitere Bearbeitung bei -80°C gelagert. Phänotypisch zeigte die Mutante bei Wachstum auf *Klebsiella aerogenes* Platten keine Entwicklungsstadien (agg-) und im Colonyblot war keine Discoidin Expression nachweisbar (Endl, 1994). Diese Mutante soll nun im Rahmen dieser Arbeit eingehend molekularbiologisch untersucht werden, um das betreffende Gen zu isolieren, das durch die REMI- Mutagenese zerstört wurde.

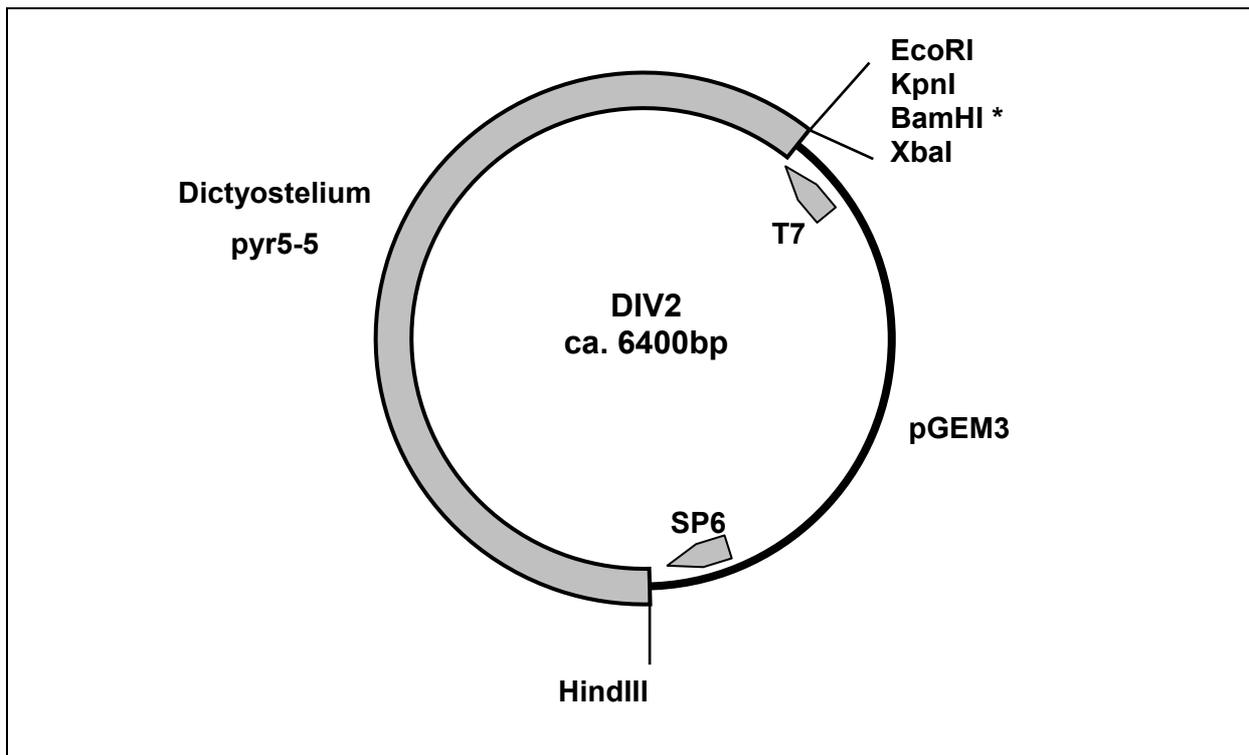


Abb. 3-2: Karte des Vektors DIV2 (Kuspa&Loomis, 1992).

Dargestellt ist die Karte von DIV2, der für REMI Mutagenesen in pyr5-6 defizienten *Dictyostelium* Stämmen genutzt werden kann. Angegeben sind die wichtigsten Restriktionsschnittstellen und die Lage der zur Sequenzierung nutzbaren Primer (T7&SP6). Der Vektor setzt sich aus pGEM3 (Promega) und dem pyr5-6 Gen aus *Dictyostelium* zusammen.

Zunächst wurden die Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut und vom Lagerungsmedium gereinigt. Nach mehrtägiger Kultivierung in axenischem Medium ohne Selektionsdruck wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen für 10 Tage in F0 Medium inkubiert. Die überlebenden Zellen wurden dann auf *Klebsiella aerogenes* Platten rekloniert, so dass sich einzelne Klone entwickeln konnten. Nach 4-7 Tagen Inkubation wurden die vereinzelt Klone sichtbar, die ausschließlich

einen agg- Phänotyp aufwiesen, was auf eine erfolgreiche Selektion hinwies. Ein ausgewählter *Dictyostelium* Klon wurde dann wieder in eine Petrischale überführt und – in F0-Medium inkubiert - für weitere Experimente als Stammkultur gehalten.

Aus den Zellen dieser Stammkultur wurde nach weiterer Zellvermehrung genomische DNA isoliert und gemeinsam mit dem Wildtyp Ax2 eine erste Southern-blot Analyse durchgeführt. Es war bekannt, dass die REMI-Mutagenese mit dem Plasmid DIV2 (Kuspa&Loomis, 1992) durchgeführt wurde, das vor der Transformation mit BamHI linearisiert wurde (Endl, 1994). Dem Transformationsansatz wurde damals als Restriktionsendonuklease BamHI zugesetzt (siehe Material&Methoden).

Um sinnvolle Restriktionsenzyme zu bestimmen, die für einen nachfolgenden Plasmid-Rescue genutzt werden können, wurden für den Southern Blot Enzyme getestet, die keine Schnittstelle im DIV2-Vektor aufweisen. Daher wurde die genomische DNA beider Zelllinien mit den Restriktionsendonukleasen BglIII, bzw. ClaI verdaut und anschließend ein Southern-blot durchgeführt. Als radioaktive Sonde wurde pGEM3 benutzt, da dieser im Vektor DIV2 enthalten ist und so ein Nachweis des Integrationsplasmides möglich ist (Kuspa&Loomis, 1992).

Der in Abbildung 3-3 dargestellte Southern-blot zeigt, dass bei der REMI-Mutagenese ein einzelnes DIV-2 Plasmid in das Genom von DH1 integriert worden war (Single-Copy-Insertion). Der

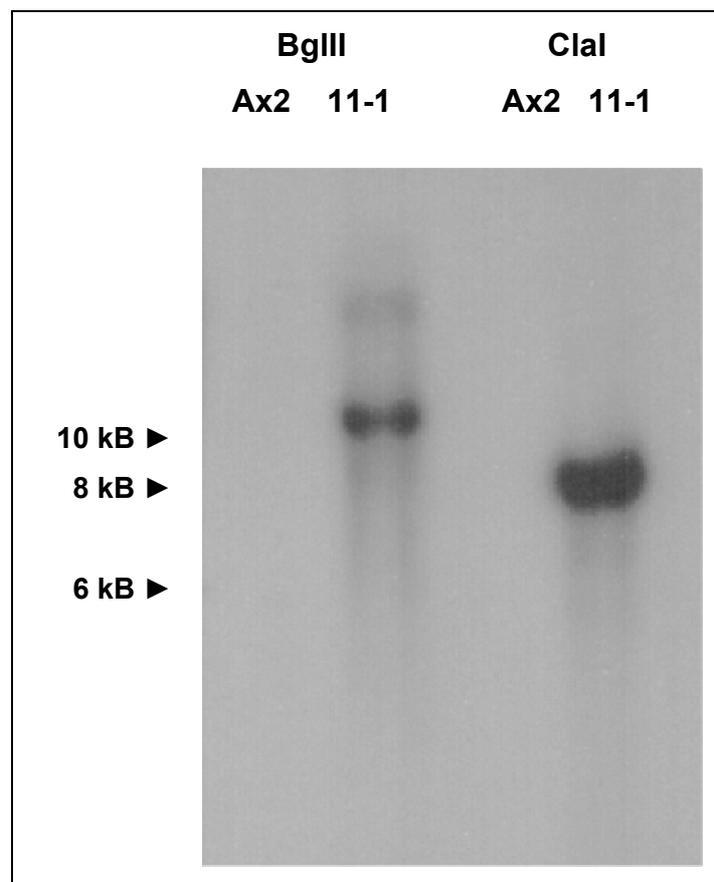


Abb. 3-3: Southern blot der REMI Mutante 11-1 im Vergleich zum Wildtyp Ax2.

Genomische DNA der *Dictyostelium* Stämme Ax2 und 11-1 wurde mit den Restriktionsenzymen BglIII, bzw. ClaI verdaut und auf einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt. Der anschließend durchgeführte Southern-blot wurde mit radioaktiv markiertem pGEM3z-Plasmid (Promega) inkubiert und der Röntgenfilm nach 48h Exposition entwickelt.

Ergebnisse

Restriktionsverdau mit BglII erbrachte ein genomisches Fragment von ca. 11kB, während durch den Verdau mit ClaI eine genomische Bande bei ca. 8 kB entstand. Vergleicht man diese Größen mit der Plasmid-Karte von DIV2 (Größe 6,4 kB), ergäben dies bei Plasmid-Rescues genomische Fragmente des Insertionsortes von ca. 4.500, bzw. rund 1.500 Basenpaaren.

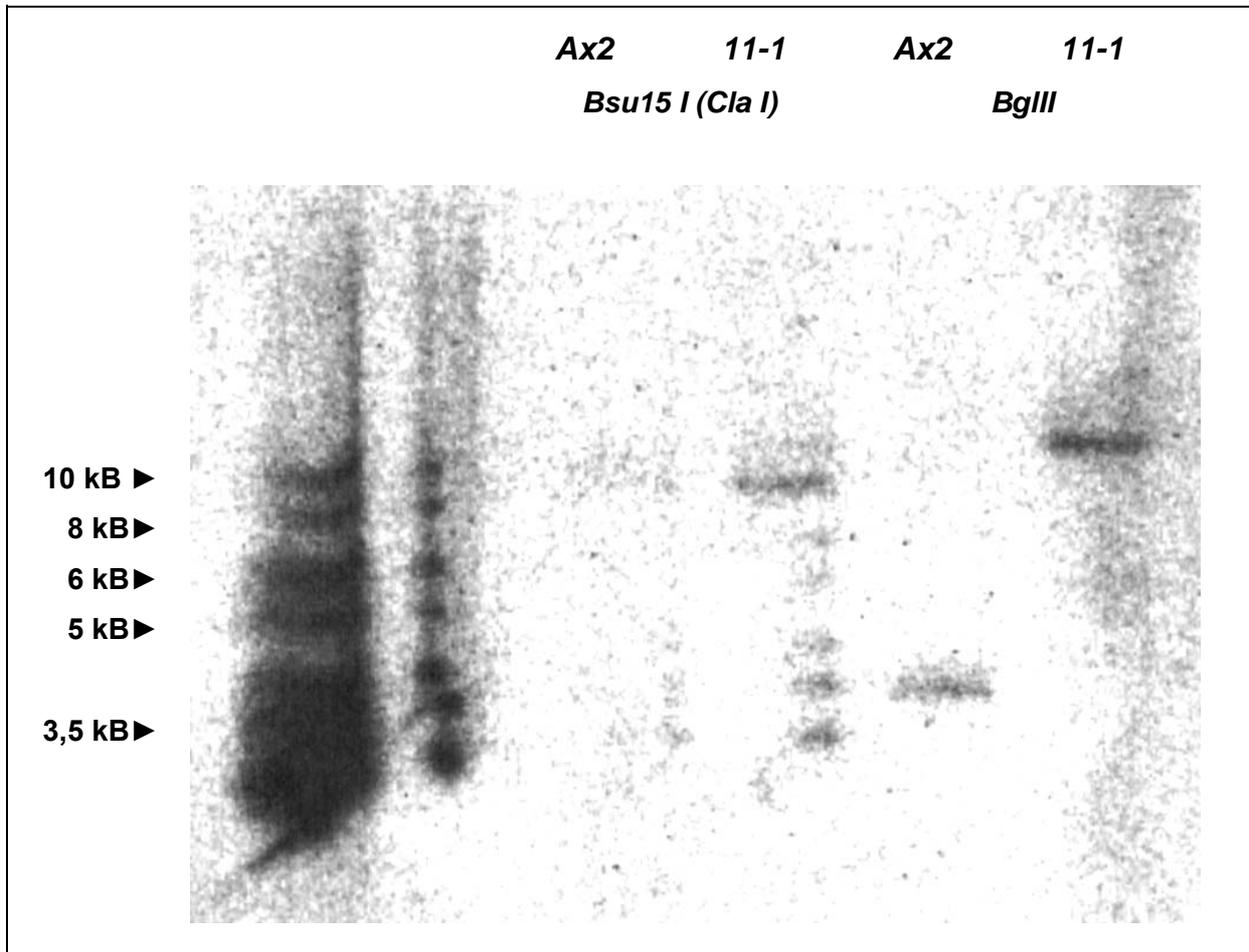


Abb. 3-4: „SHIFT“ des CRAC Signals im Southern-blot der Mutante 11-1.

Genomische DNA der *Dictyostelium* Stämme Ax2 und 11-1 wurde mit den Restriktionsenzymen BglII, bzw. ClaI verdaut und auf einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt. Der anschließend durchgeführte Southern-blot wurde mit radioaktiv markiertem genomischen CRAC-Fragment aus *pKR05* (s. Text) inkubiert.

Im Anschluss an den Southern-blot wurde ein Plasmid-Rescue durchgeführt (siehe Material&Methoden). Die genomische DNA der 11-1 Mutante wurde mit BglII verdaut und der aufgereinigte Restriktionsansatz nach Religation in *E.coli* Zellen elektroporiert. Dieser Transformationsansatz wurde auf mehrere LB_{amp}-Platten

verteilt und für sieben Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die mitgeführten Negativkontrollen (Wasser und nicht religierte DNA) zeigten nach Auswertung keine transformierten Bakterienklone. Die Transformation des BglII-Verdau ergab rund 50 Bakterienklone.

Von 30 dieser Klone wurden Plasmid-Minipräparationen angefertigt und die gewonnenen Plasmide anschließend mit BglII verdaut. Einer der Klone mit einer Größe von mehr als 10 kB (erwartete Größe lt. Southern-blot ca. 11kB) wurde einer weiterführenden Restriktionskartierung unterzogen. Diese Kartierung konnte zweifelsfrei den Vektor DIV2 mit den enthaltenen Elementen pyr5-6 und pGEM3 nachweisen (wichtig für anschließende Sequenzierung). Ebenso wurde ein genomisches Fragment identifiziert, das eine Größe von ca. 3500 Basenpaaren aufwies. Das charakterisierte Plasmid erhielt die Bezeichnung pKR05 und wurde anschließend sequenziert (T7-Primer). Die gewonnene DNA-Sequenz des genomischen Inserts wurde dann mit der EMBL-Datenbank verglichen und ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit einem Bereich des 3'-Endes des *dagA*-Locus (CRAC) aus *Dictyostelium discoideum* (Insall *et al.*, 1994). Bedauerlicherweise wurde also ein bereits bekanntes Gen aus *D. discoideum* bei der von Endl durchgeführten REMI-Mutagenese getroffen.

Da die Möglichkeit besteht, bei einem Plasmid-Rescue kontaminierende DNA Fragment zu klonieren, wurden nun weitere Experimente durchgeführt, um zweifelsfrei festzustellen, dass der *dagA* Locus das betroffene Gen darstellt. Dazu wurde ein Southern-blot konzipiert, der einen „Shift“ der CRAC-spezifischen Bande zeigen sollte (Insertion des DIV-2 Vektors in den *dagA*-Locus). Für das Experiment wurde genomische DNA von *Dictyostelium Ax2* und der Mutante 11-1 mit BglII bzw. ClaI verdaut. Die Restriktionsverdau wurden im Agarose-Gel aufgetrennt und der anschließend durchgeführte Southern-blot mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde inkubiert. Als Sonde wurde diesmal ein Teil des CRAC-Inserts aus pKR05 benutzt, das vorab in der Restriktionskartierung von pKR05 identifiziert werden konnte. Dazu wurde pKR05 mit BamHI und anschließend mit ClaI verdaut. Dadurch entsteht ein rund 1.000bp großes DNA-Fragment, das den 5'-flankierenden Bereich des Insertionsortes darstellt (s. Abbildung 3-5).

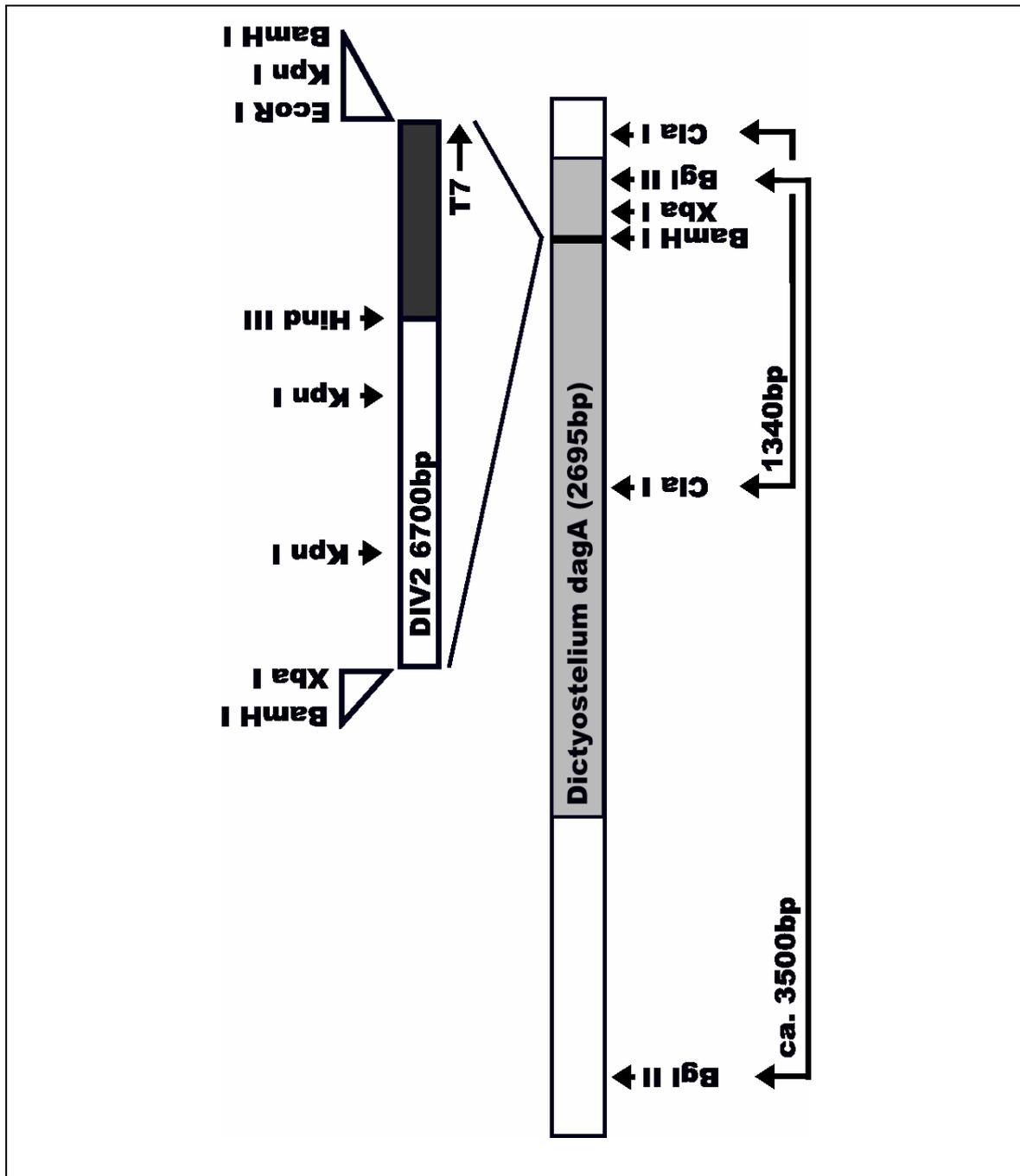


Abb. 3-5: Modell des *dagA*-Locus (CRAC) der *Dictyostelium* Mutante 11-1.

Das Modell wurde mit Hilfe der im Text beschriebenen Southern-blots und der Plasmid-Rescues erstellt. Dargestellt sind die wichtigsten Restriktions-Schnittstellen und der Ort der Integration von *DIV2* im CRAC-Locus. Die dargestellten Fragmente (*Cla*I, *Bgl*III) bezeichnen die in den Southern-blots detektierten genomischen Fragmente (s. Text)

Der präparative Verdau wurde im Agarosegel aufgetrennt, und das Fragment nach Gelelution aufgereinigt und radioaktiv markiert.

In Abbildung 3-4 ist das Ergebnis des Experimentes dargestellt. Der *dagA* Locus weist zwei Schnittstellen für *Clal* auf: eine interne Schnittstelle und eine weitere im 3'-Bereich. Daraus resultiert im Wildtyp ein Fragment von ca. 1.340bp (Daten aus *Dictyostelium* Genbank). Dieses Fragment konnte im Southern-blot (Abb. 3-4) zwar nicht nachgewiesen werden, jedoch erscheint in der Mutante 11-1 bei ca. 8,5kB eine Bande. Diese resultiert aus der Integration des DIV2 Plasmides (6,7kB) in das interne *Clal* Fragment des *dagA* Locus (ca. 1,4kB).

Deutlich wird die Integration auch durch die Darstellung des *BglII* Verdau. Der *dagA* Locus verfügt über eine singuläre *BglII* Schnittstelle im 3'-Bereichs des Gens. Durch den Verdau mit *BglII* entsteht somit im Wildtyp Ax2 ein ca. 3,6kB großes genomisches Fragment. Dieses Fragment wird durch die Integration von DIV2 auf mehr als 10kB vergrößert. Die Möglichkeit einer zweiten *BglII* Schnittstelle - 3' gelegen der bekannten, internen Schnittstelle - konnte durch die Restriktionskartierung von pKR05 ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe dieses Southern-blots konnte zweifelsfrei demonstriert werden, dass am *dagA*-Locus eine Insertion des ca. 6,7kB großen DIV2-Vektors stattgefunden hatte.

In einem abschließenden Versuch sollte nun überprüft werden, ob mit Hilfe des Plasmides pKR05, dass alle nötigen Elemente für eine *Dictyostelium*-Transformation beinhaltet, eine Rekonstruktion des 11-1 Phänotyps im Wildtyp ermöglicht wird. Dazu wurde der Vektor pKR05 mit *BglII* präparativ Verdaut und in den *pyr5-6* defizienten *Dictyostelium* Klon DH1 transformiert. Der Transformationsansatz wurde für zwei Wochen auf F0 Medium inkubiert und die selektierten Klone anschließend auf *Klebsiella*-Platten ausgebracht. Mehr als 90% der wachsenden Klone zeigten keine Aggregationsstadien und auch im Colonyblot wurden keine Unterschiede zwischen der Mutante 11-1 und den Klonen aus dem Knock-out Experiment beobachtet (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Die auf *Klebsiella aerogenes* vereinzelt Klone wurden anschließend wieder in Flüssigmedium (F0) überführt um ausreichend Zellen für genomische DNA zu erhalten. Die gewonnene DNA wurde dann für einen weiteren Southern-blot verwendet, durch den überprüft werden sollte, ob pKR5 in das *Dictyostelium* Genom integriert hatte. Dafür wurde die genomische DNA von 4

Disruption-Klonen mit HindIII und BamHI doppelverdaut und anschließend ein Southern-blot durchgeführt. Als radioaktive Sonde diente diesmal DIV2.

Durch den Verdau mit den zwei Restriktionsenzymen wurde das Plasmid DIV2 aus dem Integrationsort gelöst (BamHI) und gleichzeitig einmal geschnitten (HindIII), wodurch theoretisch zwei Fragmente (3650bp, 2950bp) entstehen. Diese zwei Fragmente konnten im Southern-blot der Disruption-Klone nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-6).

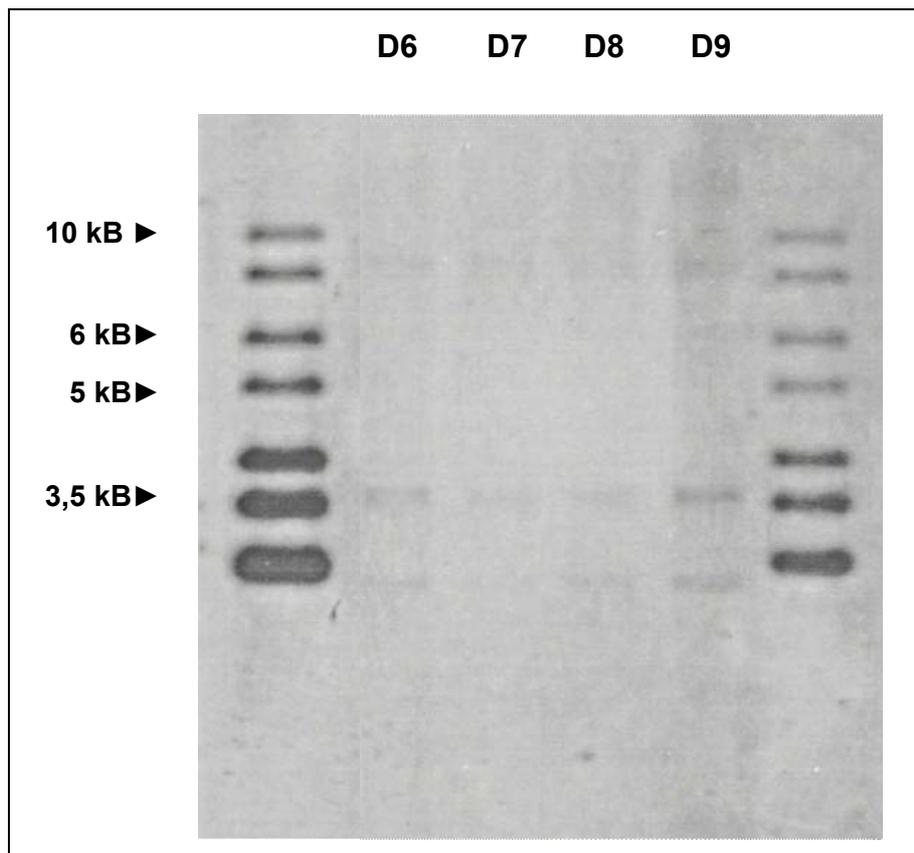


Abb. 3-6: Southern-blot der Disruption-Zelllinien D6-D9 (Disruption mit *pKR05* in *DH1*) im Vergleich zu *Ax2*.

Genomische DNA der *Dictyostelium* Stämme *Ax2* und D6-D9 wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI+HindIII verdaut und auf einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt. Der anschließend durchgeführte Southern-blot wurde mit radioaktiv markiertem DIV2 Vektor inkubiert. Der Röntgenfilm wurde nach 24h entwickelt.

3.3 Die Mutante 10-1

Ein Ziel dieser Arbeit war es, mittels REMI-Mutagenese neue *Dictyostelium* Mutanten zu isolieren, die Veränderungen in der Discoidin Regulation aufweisen. Dazu wurden 28 verschiedene REMI-Mutagenesen mit dem Wildtyp AX2 und dem Plasmid pUCbsr (Sutoh, 1993) durchgeführt. Das Plasmid wurde vor der Transformation mit *Bam*HI verdaut und aufgereinigt. Als Restriktionsenzym-Zusatz wurde den Elektroporationen *Dpn*II zugesetzt, da dieses Enzym die 4 inneren Basen von *Bam*HI erkennt. Im Rahmen des Screenings der 10. Mutagenese wurde ein Klon isoliert, der durch das Fehlen an Aggregaten und späteren Entwicklungsstadien identifiziert wurde (agg-). Mit einem ersten Colonyblot konnte eine leichte Überexpression des Discoidin-Proteins vermutet werden, die in Abbildung 3-7 dargestellt ist (vergl. Ax2 mit 10-1 „mit“). Der Klon wurde in axenisches Medium überführt und mehrere Tage in einer Petrischale inkubiert. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurde für 10 Tage mit Blasticidin (BS10) selektiert. Die so gewonnene *Dictyostelium* Mutante bekam die Bezeichnung REMI 10-1 (Nr. 10/Klon 1).

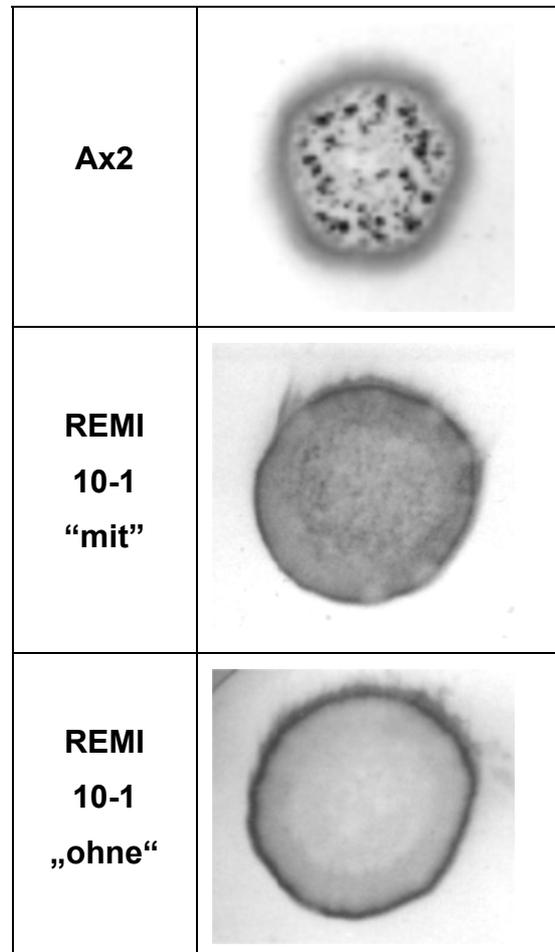


Abb. 3-7: Colonyblots der REMI-Mutanten 10-1 „mit“ und 10-1 „ohne“ im Vergleich zum Wildtyp Ax2.

Für eine erste Analyse der Mutante 10-1 wurde ausreichend genomische DNA aus 10-1-Zellen isoliert und diese jeweils mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen (*Hind*III, *Cla*I, *Xba*I) verdaut. Zum Vergleich wurden identische Restriktionsverdauungen mit genomischer DNA des Wildtyps Ax2 durchgeführt. Anschließend wurde die verdaute DNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Dieser Southern-blot wurde mit radioaktiv markiertem Plasmid pUCbsr (vorher mit *Bam*HI linearisiert) hybridisiert und

der gewaschene Blot anschließend auf einem Röntgenfilm exponiert. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt Abbildung 3-8.

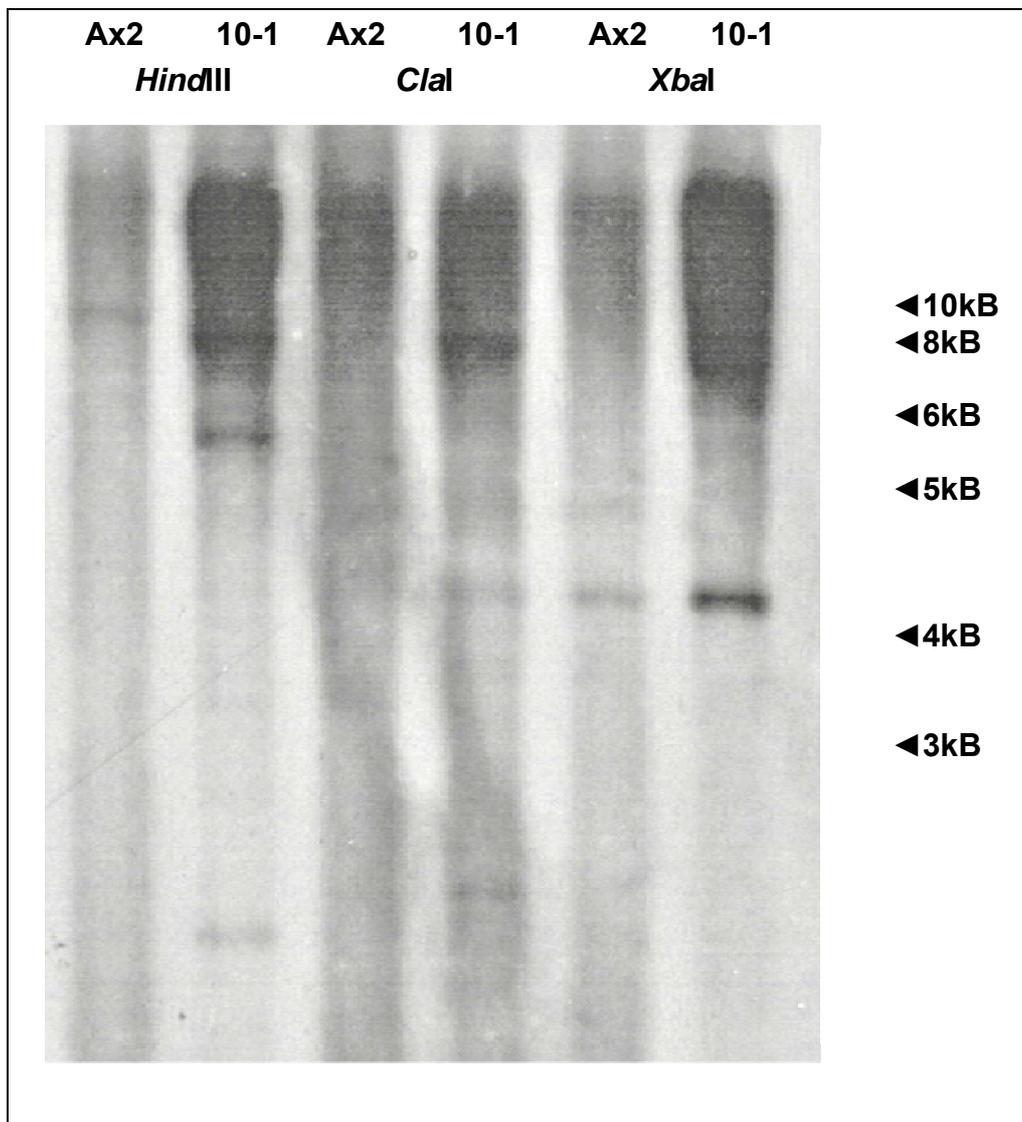


Abb. 3-8 Southern-blot Analyse der Mutante 10-1.

Genomische DNA von Ax2 und 10-1 wurde jeweils mit HindIII, Clal und Xbal verdaut, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Für die Southern-blot Analyse wurde das Plasmid pUCbsr radioaktiv markiert und der Blot mit dieser Probe hybridisiert.

Da als radioaktive Probe das Plasmid pUCbsr (Sutoh, 1993) verwendet wurde, mussten durch die Integration des Plasmids in das Genom von Ax2 im Southern-blot zusätzliche Signale entstehen, die im Wildtyp nicht erscheinen sollten. Der Restriktionsverdau mit HindIII spaltet das integrierte Plasmid pUCbsr in zwei

Fragmente (3,2kB des pUC118-Anteils und rund 1,4kB bsr-Kassette, (s. Abbildung 3-9). Im Southern-blot waren diese beiden Fragmente nachweisbar.

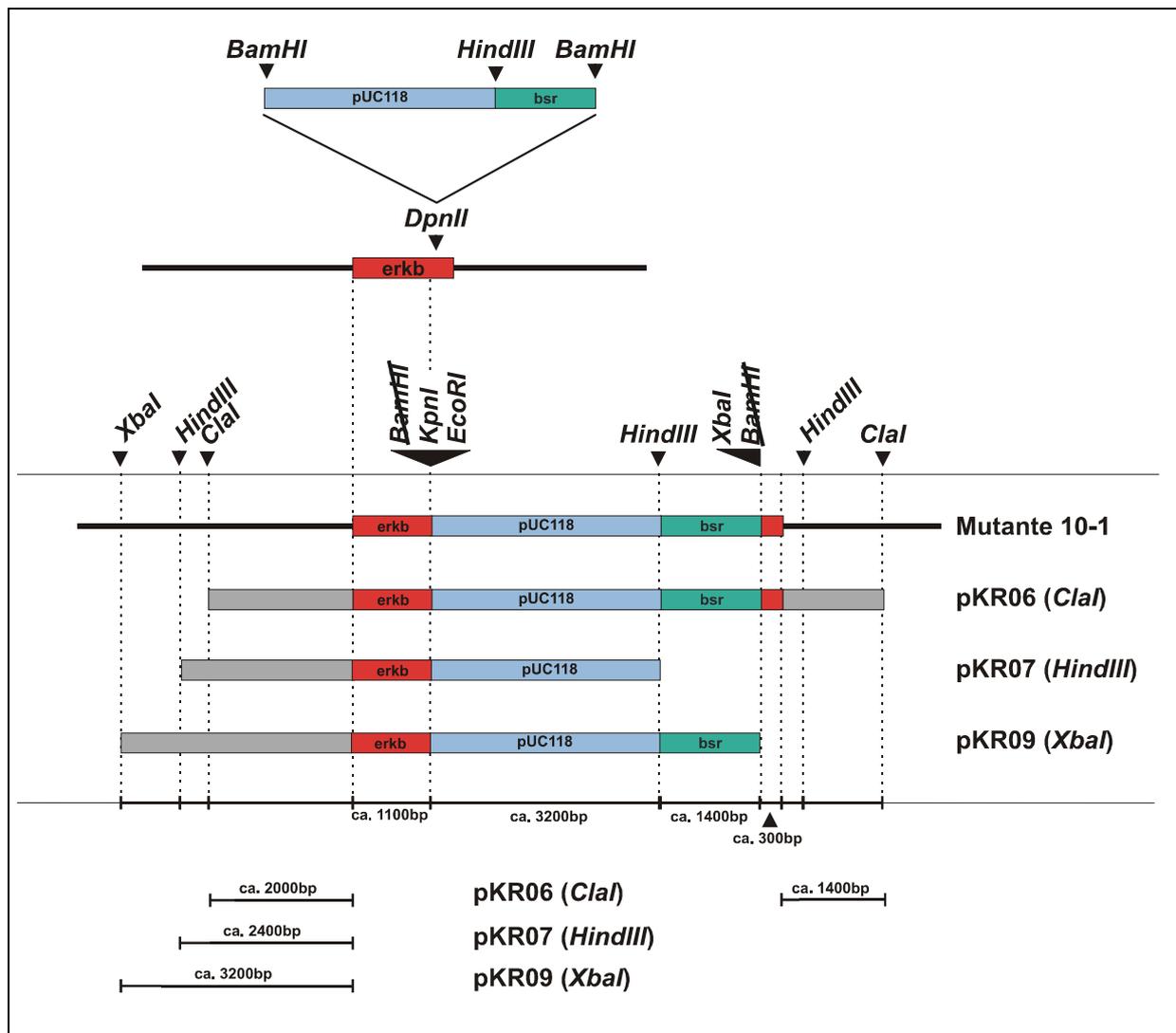


Abb. 3-9 Schematische Darstellung des Integrationsortes der Mutante 10-1.

Das Gen ErkB verfügt über zahlreiche DpnII-Schnittstellen. An Position 1077 (Basenpaar) wurde das Plasmid pUCbsr (vorab mir BamHI linearisiert) in das Genom von *Dictyostelium* integriert. Durch Plasmid-Rescues mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen (*ClaI*, *HindIII* und *XbaI*) wurden abschließend drei Plasmide hergestellt, die z.T. mehr als 3kB genomische DNA der Mutante 10-1 enthalten.

Es entstand ein Fragment mit einer Größe von ca. 5,5 kB und ein weiteres mit einer Größe von ca. 7,5kB. Die Restriktionsendonuklease *ClaI* hat im Plasmid pUCbsr keine Schnittstelle. Somit hat man die Möglichkeit sowohl den 5'-, als auch den 3'-

Bereich des Integrationsortes zu untersuchen, wenn man im Rahmen eines Rescues *Clal* verwenden würde. Im Southern-blot erschien in der Mutante 10-1 ein Signal bei ca. 7,5 bis 7,8kB. Erwartungsgemäß zeigte der Wildtyp Ax2 dieses Signal nicht. Der dritte Restriktionsverdau mit *Xbal* war in diesem Experiment leider nicht einschätzbar. Zwar konnte man 2 bis 3 Banden zwischen 7 und 9kB erahnen, diese konnten jedoch nicht genau bestimmt werden, da der Verdau mit *Xbal* nur ein Signal erwarten lässt. Auch eine stringentere, nachträgliche durchgeführte Reinigung des Blots ergab keine deutliche Aussagekraft.

Durch diesen Southern-blot konnte deutlich gemacht werden, welche ungefähren Plasmid-Größen bei einem Plasmid-Rescue mit der Mutante 10-1 zu erwarten waren, und ob diese noch in Bakterien zu vermehren waren. Die genomische DNA von *Dictyostelium* 10-1 wurde nun mit den bereits verwendeten Restriktionsendonukleasen verdaut und, wie in Material und Methoden beschrieben, ein Plasmid-Rescue durchgeführt. Die Anzahl an gewonnenen Bakterienklonen war dabei bei den drei verwendeten Nucleasen unterschiedlich: Der Rescue mit *HindIII* erbrachte rund 300 Klone, *Xbal* ca. 180 und *Clal* nur 30 Klone. Von jeweils 30 Bakterienklonen pro Rescue wurden Masterplatten angelegt und Plasmid-Minipräparationen durchgeführt.

Durch Restriktionskartierungen wurden abschließend 3 Plasmide aus der Mutante 10-1 isoliert: pKR06, das aus dem *Clal*-Rescue isoliert werden konnte, pKR07 (*HindIII*-Rescue) und pKR09 (*Xbal*-Rescue). Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10 zeigt die Kartierung von pKR06. Das Plasmid hat eine Größe von ca. 8kB und enthält sowohl 5'-, als auch 3'-flankierende Bereiche des Integrationsortes. Durch den Plasmidrescue konnten ca. 3100bp des 5'-flankierenden Bereichs und rund 1700bp des 3'-flankierenden Bereichs isoliert werden. Die Kartierung zeigte außerdem, dass das zur Mutagenese genutzte Plasmid pUCbsr vollständig in pKR06 enthalten ist und die Integration in Richtung 5'-Bereich->pUC118->bsr-Kassette->3'-Bereich stattgefunden haben muss. Durch die Integration wurde auch die *BamHI*-Schnittstelle in pUCbsr zerstört, was darauf deuten lässt, dass die Integration an einer genomischen *DpnII*-Erkennungsstelle stattgefunden hatte.

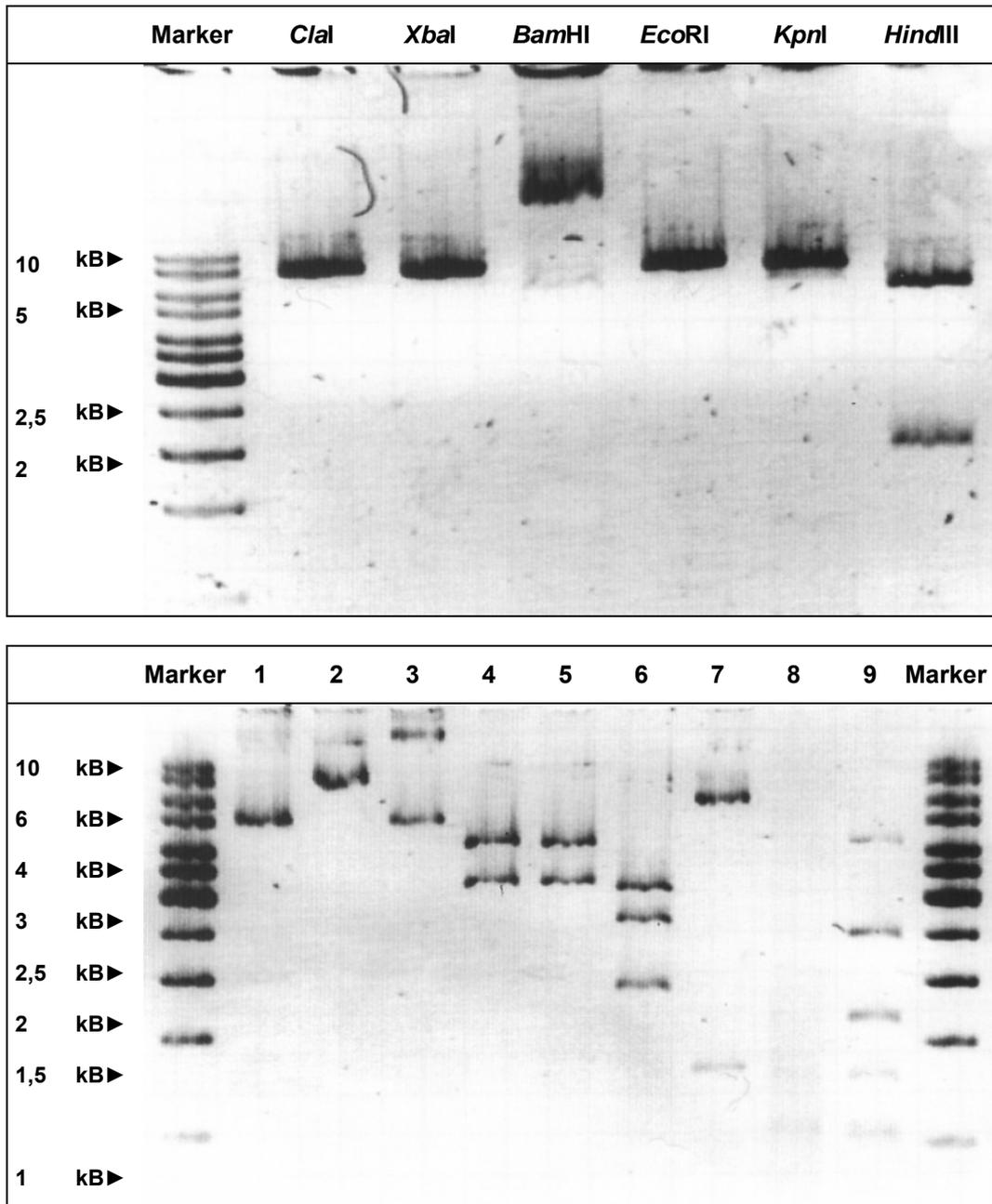


Abb. 3-10: Restriktionskartierung des Plasmides pKR06 (Plasmid-Rescue mit Clal aus der Mutante 10-1).

Die Restriktionsendonukleasen aus dem oberen Teil sind angegeben, die einzelnen Spuren des Agarose-Gels im unteren Teil: 1: unverdaut, 2: PstI, 3: BamHI, 4: XbaI+KpnI, 5: XbaI+EcoRI, 6: EcoRI+HindIII, 7: XbaI+Clal, 8: EcoRI+Clal, 9: EcoRI+XbaI+Clal

Die Plasmidrescues mit *HindIII* (pKR07) und *XbaI* (pKR09) enthalten ausschließlich 5'-flankierende, genomische Fragmente, da beide Restriktionsendonukleasen in pUCbsr eine Schnittstelle haben. pKR07 enthält ca. 3,5kb genomische DNA während

pKR09 sogar mehr als 4kb enthält. Die drei Plasmid-Rescues sind zusammenfassend in Abbildung 3-9 dargestellt.

Zeitgleich mit den ersten Charakterisierungen der Mutante 10-1 wurde dieser *Dictyostelium* Klon nochmals rekloniert, um sicher zu stellen, dass es sich um einen Einzelklon handelt. Dazu wurde 10-1 von einer *Klebsiella*-Masterplatte in Flüssigmedium überführt und dort für mehrere Tage unter Selektionsdruck inkubiert. Die so erhaltenen Zellen wurden dann wieder auf *Klebsiella*-Platten rekloniert (s. Material&Methoden). Im Rahmen dieser Reklonierung wurde ein weiterer Klon identifiziert, der sich phänotypisch von der bereits bekannten Mutante 10-1 unterscheidet. Während die ursprüngliche Mutante 10-1 noch wenige Aggregate vor allem in der Nähe des Fraßrandes aufweist, zeigte der neu identifizierte Klon keinerlei Kumulation von Zellen. Dargestellt ist dieser Unterschied in Abbildung 3-11: Die ursprüngliche Mutante 10-1 zeigt kurz hinter dem Fraßrand Aggregate und zusammenfließende Zellen, die neu klonierte *Dictyostelium* Mutante jedoch zeigt keinerlei Aggregation!

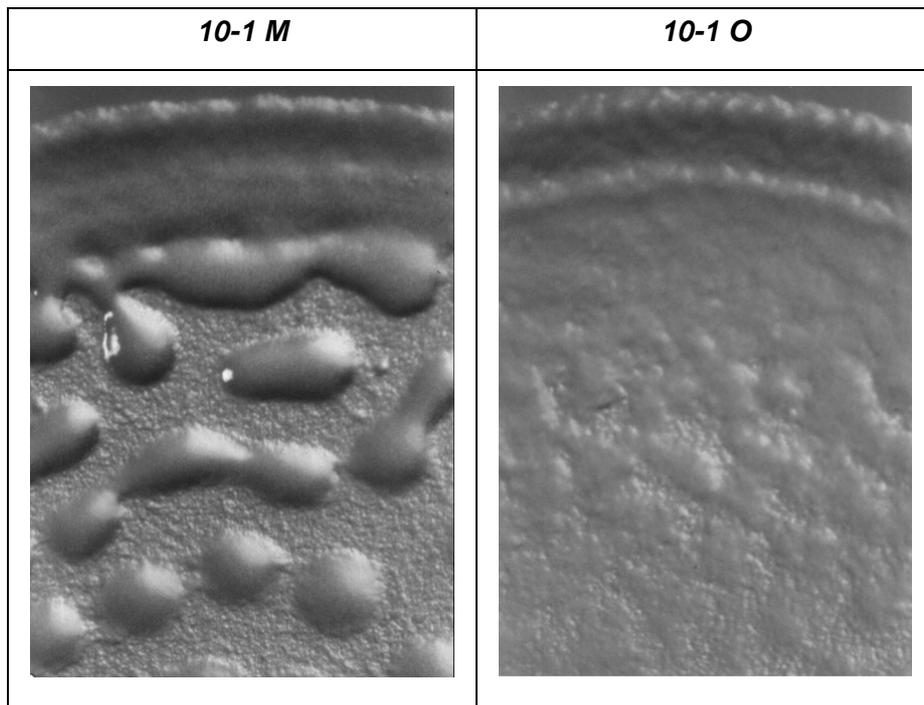


Abb. 3-11: Fraßrand der Mutanten 10-1M und 10-1O.

Dargestellt ist der Fraßrand der beiden erkb-Mutanten in 20facher Vergrößerung. Die fehlenden Aggregate der Mutante 10-1O dienen der Namensgebung („ohne“).

Um das Ergebnis zu verifizieren, wurden nach dem selben Schema drei weitere Reklonierungen mit der Ursprungsmutante vorgenommen und in jedem Experiment konnten Zelllinien isoliert werden, die im *Klebsiella*-Rasen keinerlei Aggregation aufwiesen. Auch das Verhältnis von Ursprungsmutante und neu klonierter Zelllinie ähnelte sich bei den insg. 4 Reklonierungen: auf 100 Klone im Colonyblot kamen jeweils rund 1-2 neue Klone. Rekloniert man die neue Zelllinie mehrmals, so findet man keine Ursprungsklone – die neue Zelllinie ist also stabil.

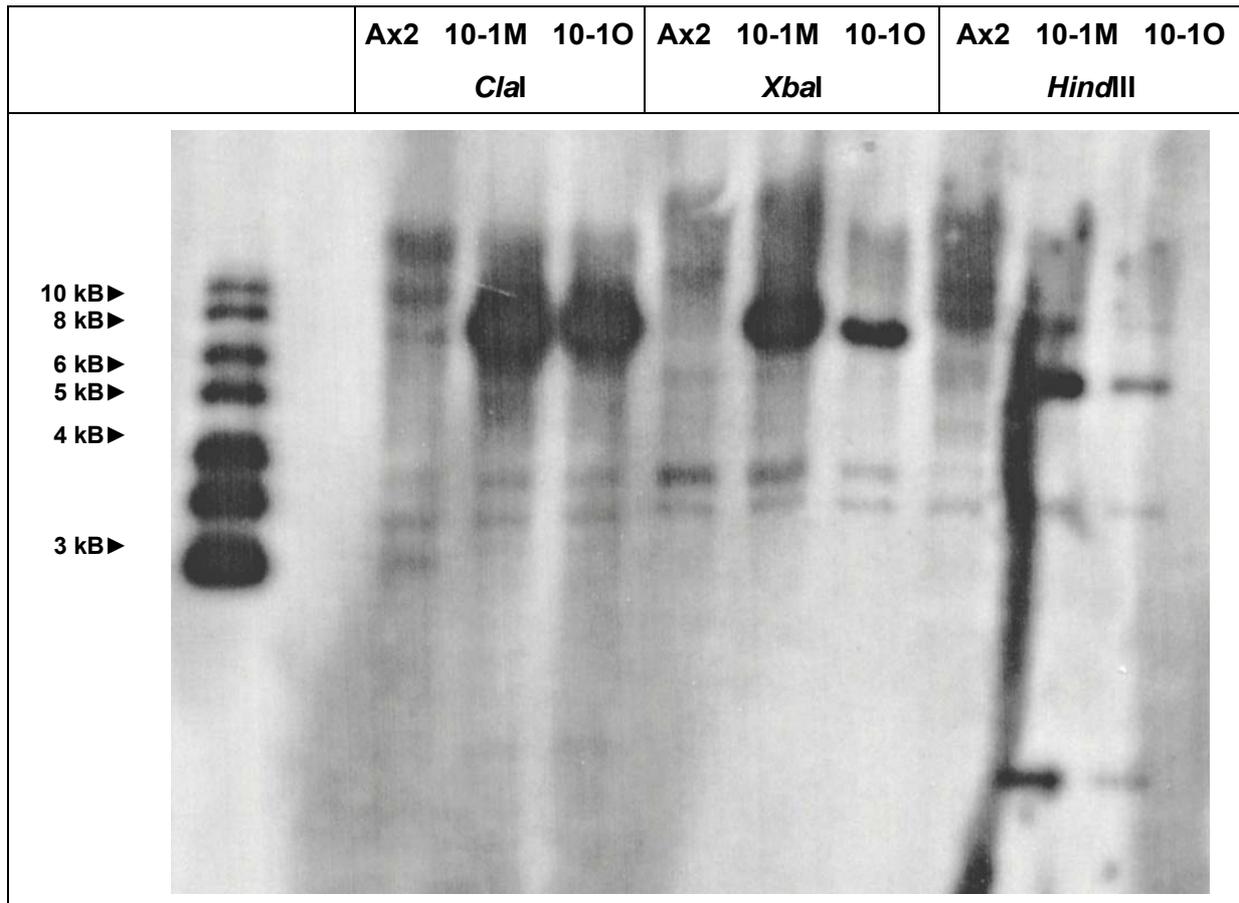


Abb. 3-12: Southern-blot der REMI Mutanten 10-1 im Vergleich zum Wildtyp Ax2.

Dargestellt ist das Ergebnis eines weiteren Southern-blots mit der Mutante 10-1, hier jedoch mit den beiden Subklonen 10-1M (Mit) und 10-1O (Ohne). Die genomische DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Der anschließend durchgeführte Southern-blot wurde mit radioaktiv markiertem pUCbsr-Plasmid hybridisiert. Der Blot konnte verdeutlichen, dass sich die beiden Subklone im Southern-blot gleichen.

In den weiteren Versuchen wurden die beiden Zelllinien als getrennte Mutanten behandelt: Die Ursprungsmutante 10-1 erhielt die Bezeichnung 10-1“M“ (für „Mit Aggregaten“) und die neu isolierte Zelllinie die Bezeichnung 10-1„O“ (für „Ohne Aggregat“). Das Verhältnis von 100:1 und die ersten Versuche mit der Mutante 10-1 machten es unwahrscheinlich, dass es sich um zwei unabhängige Mutanten (=REMI-Integrationen) handelte. Vielmehr musste man annehmen, dass es sich bei der Mutante 10-1“O“ um einen Subtyp der Mutante 10-1“M“ handelt, die z.B. durch Folgemutation oder Genregulationsmechanismen regelmäßig entstehen kann. Um jedoch sicherzustellen, dass es sich bei den beiden Zelllinien nicht um unabhängige REMI-Mutanten handelt, wurde nochmals ein Southern-blot Experiment durchgeführt. 10-1“M“ und 10-1“O“ Zellen wurden dazu unter Selektionsdruck vermehrt und genomische DNA isoliert. Wie schon im ersten Southern-blot mit der Zelllinie 10-1, wurden die Restriktionsendonukleasen *Clal*, *Xbal* und *HindIII* verwendet – als Referenz diente DNA von AX2-Zellen. Das Ergebnis der Hybridisierung mit radioaktiv markiertem pUCbsr-Plasmid ist in Abbildung 3-12 dargestellt. Im Southern-blot konnten mit der verwendeten Plasmidprobe – abgesehen von unterschiedlicher Signalstärke - keine Unterschiede dargestellt werden. Wie bereits im Southern-blot mit 10-1 erhält man mit *Xbal* oder *Clal* jeweils ein Signal bei ca. 8kb (s. auch Abbildung 3-8). Der Restriktionsverdau mit *HindIII* erzeugt zwei Signale durch die Schnittstelle im Integrationsplasmid pUCbsr. In den drei Verdauen konnten keine Unterschiede in der Anzahl der relevanten Signale gezeigt werden, was auf eine identische Anzahl an Integrationen hinweist. Auch gleichen sich die Größen der jeweiligen Banden im Southern-blot, was etwaige größere Deletionsereignisse ausschließt. Dieses Experiment ist somit ein erster, deutlicher Hinweis auf den selben Integrationsort, hervorgerufen durch den ursprünglichen REMI.

Interessanterweise gleichen sich aber nicht die Phänotypen der beiden Zelllinien. Neben der schon beschriebenen Unterschiede im Aggregationsverhalten, zeigt auch der Discoidin-Clonyblot von 10-1“O“ im Vergleich zu 10-1“M“ ein abweichendes Bild (s. Abbildung 3-7). Während 10-1“M“ eine durchgehende, deutliche Discoidin-Färbung aufweist, ist diese bei 10-1“O“ Zellen nur in der Nähe des Fraßrandes klar sichtbar und verliert sich zum Zentrum des Colonyblots.

Um vor weiteren Versuchen eine Klärung über den Integrationsort der 10-1 Mutanten zu erhalten, wurden zeitgleich zwei Experimente durchgeführt. Im ersten Experiment sollte mittels Sequenzierung ein Teil der DNA-Sequenz ermittelt werden, die durch die Plasmid-Rescues aus der Ursprungsmutante 10-1 gewonnen wurden. Ein zweites Experiment sollte zeigen, ob die Plasmid-Rescues wirklich den betroffenen Abschnitt des Genoms von 10-1 enthalten, der durch die REMI-Mutagenese betroffen ist.

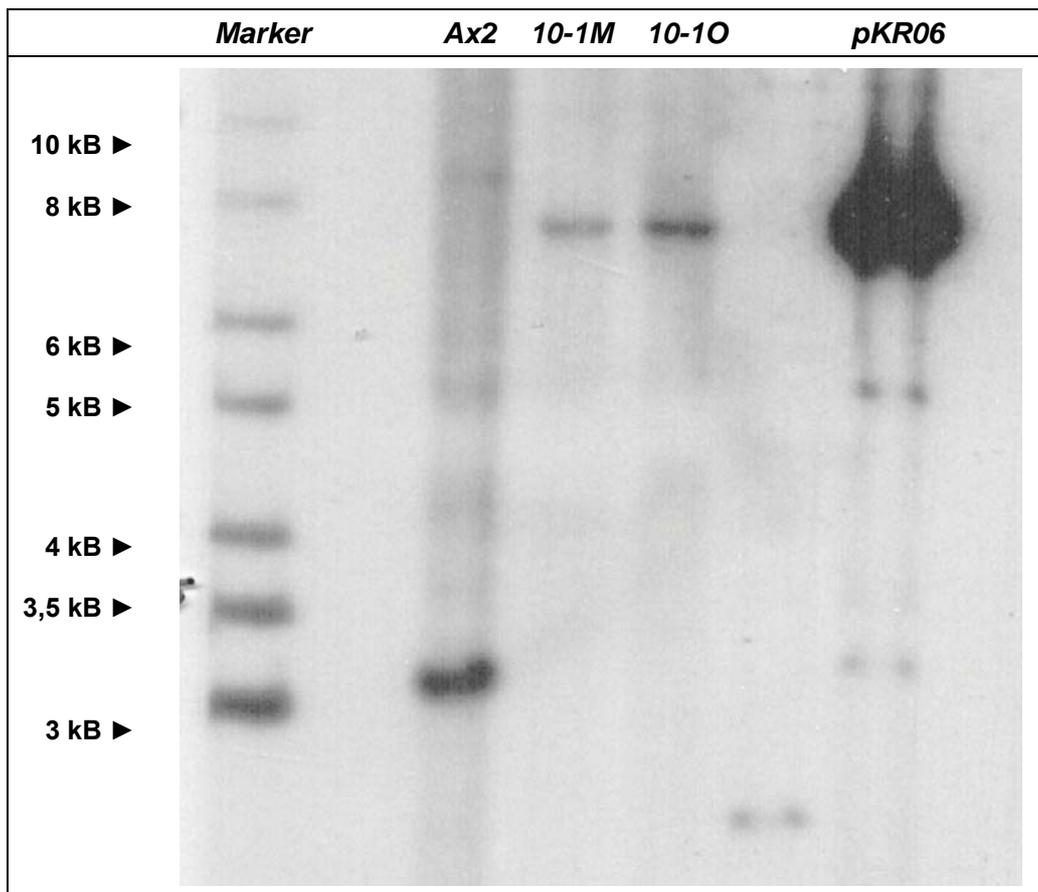


Abb. 3-13: Southern-blot zur Darstellung der Integration des Plamides pUCbsr in den erkb-Lokus („Shift-Experiment“).

Genomische DNA der angegebenen *Dictyostelium* Klone wurde mit Clal verdaut. Als Referenz wurde ebenfalls mit Clal verdautes Plasmid pKR6 im Agarosegel aufgetrennt. Als radioaktiv markierte Probe diente ein genomisches Fragment aus dem 5'-Bereich des erkb-Lokus.

Ergebnisse

Für die Sequenzierung wurde das Plasmid pKR06 (*Clal*-Rescue aus 10-1) linearisiert und mittels T7-Primer sequenziert. T7 bindet an pUC118 und ermöglichte in diesem Fall die Sequenzierung in Richtung genomisches Fragment.

Für das „Shift-Experiment“ (s. Material&Methoden) wurde aus pKR06 ein Fragment aus dem mittels Rescue gewonnen genomischen Insert kloniert. Hierzu wurde das Plasmid mit *Hind*III und anschließend *Bgl*II verdaut und ein dadurch entstehendes, ca. 2,7kB großes Fragment geluliert. Dieses Fragment wurde aufgereinigt und mittels Oligolabeling radioaktiv markiert. Der erforderliche Southern-blot für das „Shift“-Experiment wurde mit genomischer DNA von 10-1“M“, 10-1“O“ und Ax2 als Referenz vorbereitet. Die entsprechenden Proben wurde mit *Clal* verdaut. Als zusätzlicher Marker wurde pKR06 linearisiert. Die Proben wurden in einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran überführt. Dieser Southern-blot wurde dann mit dem radioaktiv markiertem genomischen Insert aus pKR06 inkubiert.

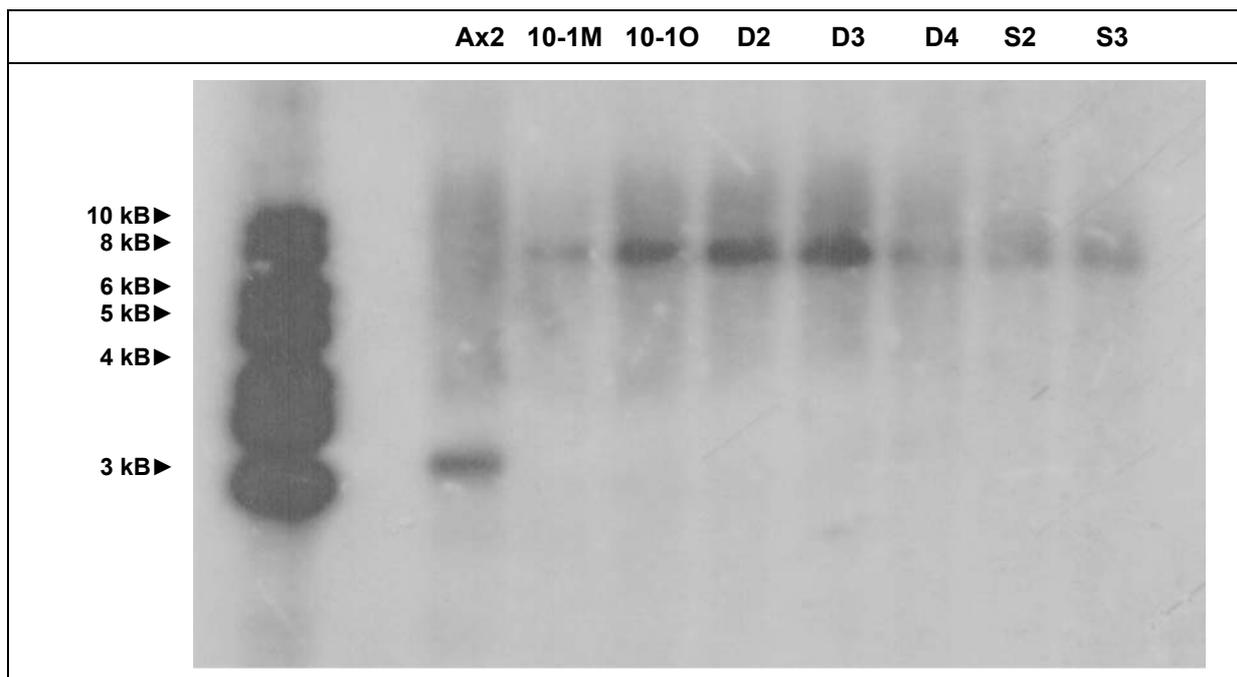


Abb. 3-14: Southern-blot der verschiedenen ERK-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Ax2.

Die aus den angegebenen Stämmen gewonnene genomische DNA wurde mit *Clal* verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Als Probe für den anschließend durchgeführten Southern-blot diente linearisiertes pUCbsr-Plasmid.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3-13 abgebildet. Ax2-DNA verdaut mit *Clal* ergibt in diesem Versuch eine Bande bei ca. 3,2 kB – dies gibt die genomische Situation im Wildtyp wieder. Bei den Mutanten 10-1M bzw. 10-1O ist deutlich die Integration des REMI-Plasmides pUCbsr nachvollziehbar. Hier wird das Wildtypfragment (3,2kB) auf ca. 7,8 kB vergrößert („Shift“). Man kann in diesem Southern-blot also direkt die Integration von pUCbsr (4,6kB) ablesen. Bestätigt wird die Integration zusätzlich durch die klare Abbildung des Plasmids pKR06, dessen Größe der des genomischen Fragments aus 10-1 entspricht. Somit konnte mit diesem Experiment nachgewiesen werden, dass pUCbsr innerhalb des 3,2 kB großen genomischen Fragmentes integriert wurde und das Plasmid pKR06 die entsprechenden flankierenden Bereiche dieses Genloci beinhaltet. Weiterhin kann man annehmen, dass sich die Mutanten 10-1M und 10-1O in ihrem betroffenen Gen gleichen.

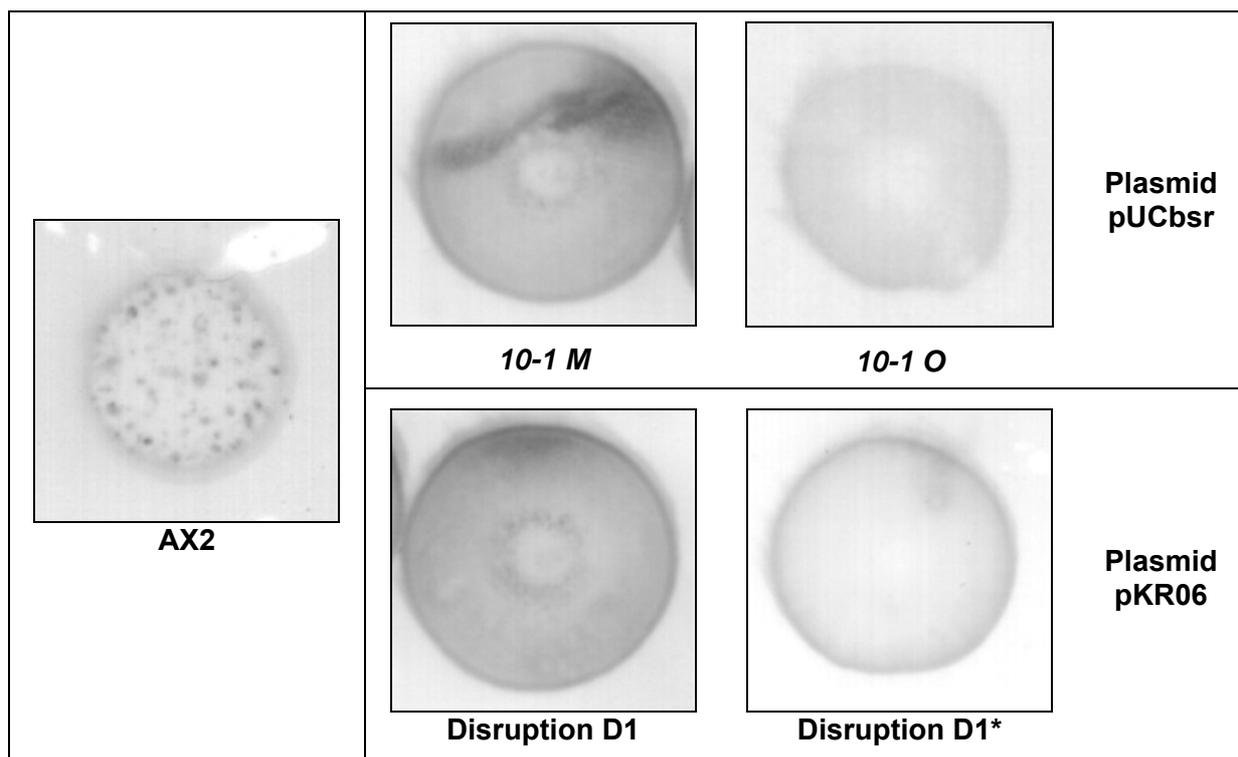


Abb. 3-15: Discoidin-Colonyblots verschiedener ERKB-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Ax2.

Durch die Färbung dargestellt ist die Discoidinexpression der verschiedenen Zelllinien. Bei der oberen Reihe (10-1M & 10-1O) handelt es sich um die ursprünglichen REMI-Klone, die mit dem Plasmid pUCbsr hergestellt wurden. Die untere Reihe zeigt die erkb-Mutanten, die mit pKR6 (*Clal*-Rescue aus der Ursprungsmutante 10-1) generiert wurde.

Die zeitgleich durchgeführte Sequenzierung erbrachte anschließend nach einer Datenbankanalyse auch die Information über den von der Integration betroffenen Genort. Leider konnte durch die REMI-Mutagenese kein neues Gen identifiziert werden, sondern es ergab sich eine 100%ige Übereinstimmung mit dem erkb-Gen, dass 1995 durch Segall isoliert und charakterisiert wurde (Segall, et al. 1995).

Eine genaue Restriktionskartierung und weitere durchgeführte Sequenzierungen erbrachten eine weitere Bestätigung der bereits vorliegenden Daten und eine Auskunft über den genauen Integrationsort (Daten hier nicht gezeigt). Das linearisierte pUCbsr-Plasmid wurde in den erkb-Locus an Position 1077 integriert. An dieser Position befindet sich im Gen eine *DpnII*-Schnittstelle. Eben dieses Enzym wurde auch bei der REMI-Mutagenese verwendet. Durch den Plasmid-Rescue mit *Clal* (pKR06) konnte das vollständige erkb-Gen isoliert werden und zusätzlich noch genomische Fragmente im 5´&3´-Bereich (s. Abbildung 3-9). Die Größe des genomischen Inserts von pKR06 sollte es möglich machen, mit diesem Plasmid ein Genedisruption im Wildtyp Ax2 durchzuführen. Dieser Versuch wäre der entgeltliche Beleg erbracht, dass die Integration von pKR06 an der genannten Position für den entstehenden Phänotyp der Mutante 10-1 verantwortlich ist.

Um das Genedisruption durchzuführen musste zuerst Plasmid-DNA von pKR06 mit einem *dam*-defizienten Bakterienstamm hergestellt werden, da sich die *Clal*-Schnittstelle im genomischen Fragment von pKR06 als methylase-empfindlich herausstellte. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde mit *Clal* linearisiert und einem Agarosegel aufgetrennt. Nur die lineare DNA wurde aus dem Gel eluiert und aufgereinigt. Mittels Elektroporation wurden diese Plasmid-DNA in Ax2-Zellen eingebracht (s. Material&Methoden). Nach zwei Wochen Selektion in BS10-Medium wurden die Klone auf *Klebsiella*-Platten ausgebracht und für einige Tage inkubiert. Das durchgeführte Genedisruption hatte scheinbar zu 100% funktioniert, da alle Klone auf den *Klebsiella*-Platten den 10-1-Phänotyp aufwiesen. Entgegen einer vorhergehenden Annahme jedoch, handelte es sich ausschließlich um den bereits bekannten 10-1“M“-Phänotypen, also genau den Phänotypen, der als Ausgangsklon aus dem REMI 10 isoliert wurde. Daher wurden nun 3 der Genedisruption-Klone (D1-D3) einer Subklonierung unterzogen. Dafür wurden die Klone jeweils in BS10-Medium zurückgeführt und für 14 Tage in Petrischalen inkubiert. Dann wurden die

Zellen abgewaschen und in *Klebsiella*-Suspension überführt. Anschließend wurden jeweils rund 50 Klone auf SM-Platten ausgebracht. Diese Platten wurden solange inkubiert, bis die Klone eine Größe von ca. 1cm aufwiesen. Die Auswertung dieser Platten ergab wieder das Ergebnis, dass bereits von der Ursprungsmutante bekannt war: Auf ca. 100 „M“-Phänotypen konnten nun jeweils 1-2 Klone isoliert werden, die den glatten „O“-Phänotyp aufwiesen! Die weitere Subklonierung dieser neuen Klone nach der selben Methodik ergab dann einen stabilen „O“-Phänotyp.

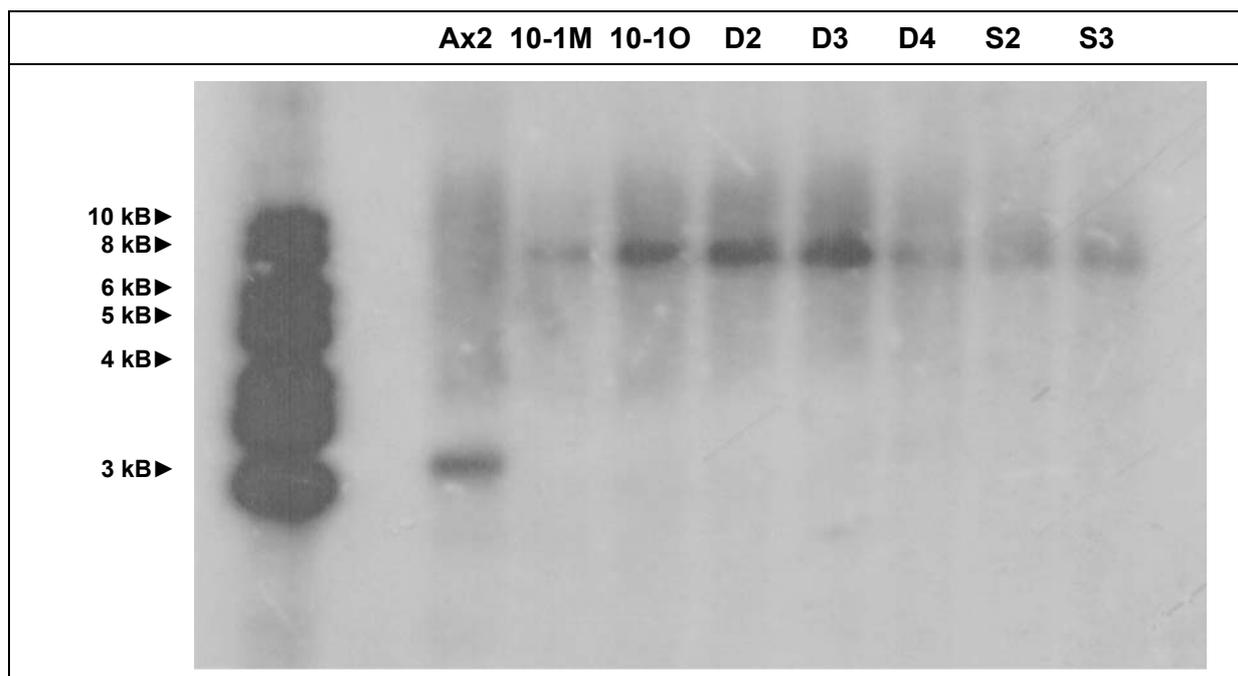


Abb. 3-16: Southern-blot der verschiedenen ERK-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Ax2.

Die aus den angegebenen *Dictyostelium* Zelllinien gewonnene genomische DNA wurde mit *Cla*I verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Als Probe für den anschließend durchgeführten Southern-blot diente ein erkb-PCR Fragment (s. Text).

In Abbildung 3-15 sind die Ergebnisse der Colonyblots mit den verschiedenen Mutanten dargestellt. Als Referenz ist der Wildtyp Ax2 angegeben, in der oberen Reihe die Mutanten der REMI-Mutagenese und in der unteren Reihe die Colonyblots des mit pKR06 durchgeführten Genedisruption. Um das Genedisruption auch auf genomischer Basis nochmals zu überprüfen wurde in einem anschließenden Experiment ein Southern-blot mit den REMI-Mutanten und den neu generierten Klonen des Genedisruptions durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA aus den einzelnen Klonen isoliert und mit *Cla*I verdaut. Die Restriktionsansätze wurden im

Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran überführt. Als radioaktive Probe diente diesmal nicht pUCbsr sondern ein über PCR amplifiziertes DNA Fragment, das dem erkb-Gen entsprach. Dazu wurden Primer angefertigt die komplementär zum 5´ bzw. 3´-Ende des erkb-Gens waren. Als Template für die PCR-Reaktion diente genomische DNA aus Ax2. Das so erhaltene 1,2 kb große DNA-Fragment wurde vor der Weiterverarbeitung auf einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend geleluiert. Mittels Oligolabeling wurde die aufgereinigte DNA radioaktiv markiert und mit dem Southern-blot hybridisiert.

Das Ergebnis dieses Versuchs gibt Abbildung 3-16 wieder. Aufgetragen sind der Wildtyp Ax2 und die bereits charakterisierten Klone 10-1M und 10-1O. D2, D3 und D4 sind Klone des mit pKR06 durchgeführten Genedisruptions, die einen „M“-Phänotypen aufweisen. Die Klone S2 und S3 sind Subklone der Disruptions D2 bzw. D3 und weisen den stabilen „O“-Phänotyp auf.

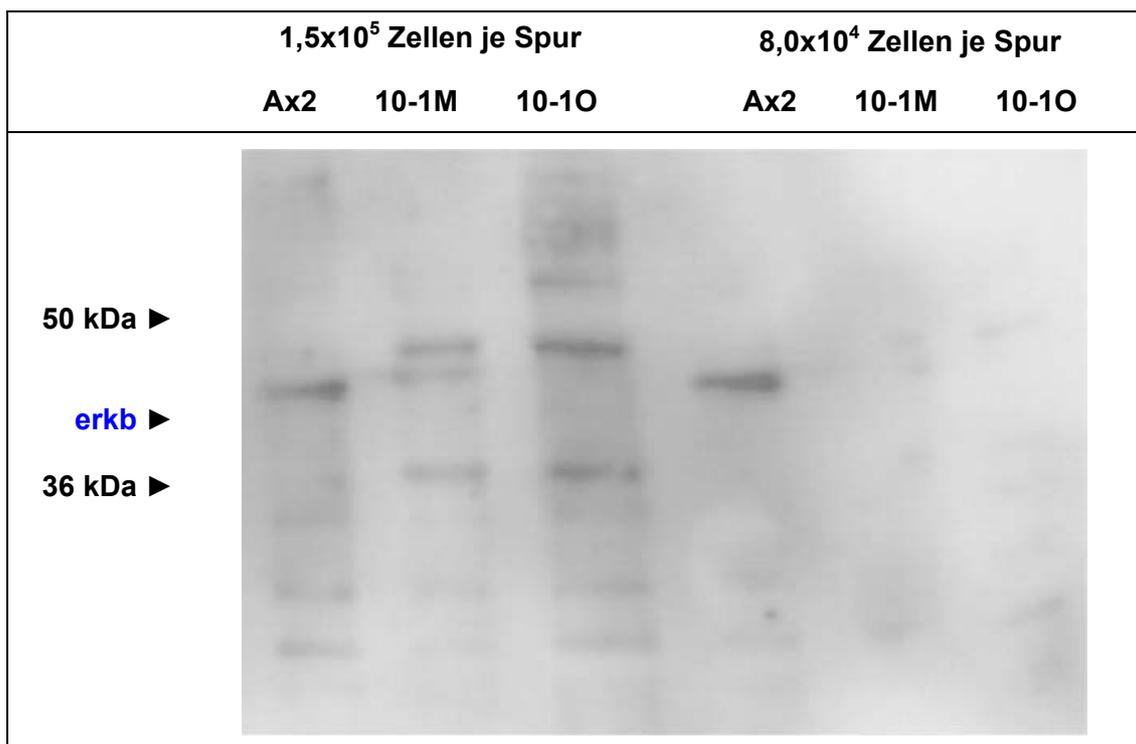


Abb. 3-17: Darstellung des erkb-Signals im Western-blot.

Die angegebene Menge an Zellen von axenisch wachsenden Zellen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und der anschließend durchgeführte Western-blot mit α ERKB-Antikörper inkubiert (s. Text). In den Mutanten 10-1M und 10-1O konnte kein ERKB-Signal nachgewiesen werden.

Für alle Mutanten konnte wieder gezeigt werden, dass die 3,2 kB-Bande des erkb-Locus durch die Integration von pUCbsr auf fast 8 kB vergrößert wird. Die 7 gezeigten Mutanten weisen also alle den „Shift“ im erkb-Locus auf und der Phänotyp steht direkt im Zusammenhang mit dem defekten erkb-Gen.

In einem nächsten Schritt sollte nun geklärt werden, ob die 10-1 Mutanten noch erkb-Protein bilden, bzw. ob noch eine mRNA in den Mutanten nachweisbar ist. Da die Integration nahe des 3'-Endes des Gens stattgefunden hatte, ist durchaus denkbar, dass eine ggf. verkürzte mRNA gebildet wird und auch ein unvollständiges Protein entsteht. Dies würde dann auch ein Erklärungsansatz für die wenigen, kleinen Aggregate im 10-1“M“ darstellen, da die Literatur die erkb-Mutante als eine absolut aggregationsdefiziente Zelllinie beschreibt (Segall *et al.*, 1996).

Für die Western-blot Analyse wurden Ax2, 10-1M und 10-1O Zellen in axenischem Medium inkubiert. Eine jeweils ausreichende Zellmenge wurde entnommen und mit Phosphatpuffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließend vom Phosphatpuffer bereitet und in SDS-Laemmli-Puffer

resuspendiert und vollständig lysiert. Das Puffervolumen wurde dabei so gewählt, dass eine Endkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml entstand. Wie in 3-17 dargestellt wurden die Zelllysate auf einer SDS-Page aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Die Hybridisierung wurde mit einem α -erkb-Antikörper

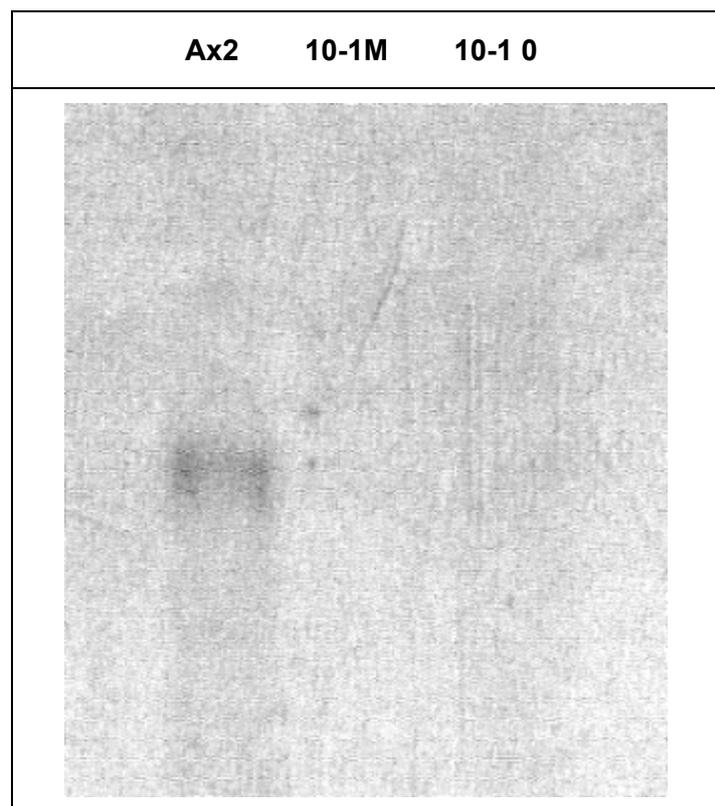


Abb. 3-18: Northern-blot der Mutanten 10-1 M und O im Vergleich zum Wildtyp Ax2.

Aus axenisch wachsenden Zellen wurde RNA isoliert und diese im Gel aufgetrennt. Mit Hilfe einer radioaktive Sonde (s. Text), konnte kein Signal in den Mutanten 10-1M&10-1O nachgewiesen werden.

durchgeführt, der mir freundlicherweise von Mineko Maeda zur Verfügung gestellt wurde. Als Sekundärantikörper wurde ein α -Maus mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Antikörper verwendet. Das Ergebnis des Experiments ist in Abbildung 3-17 dargestellt. Um ein ggf. sehr schwaches Signal nicht zu übersehen wurden zwei unterschiedliche Proteinmengen aufgetragen – $1,5 \times 10^5$ Zellen und 8×10^4 Zellen pro Spur als empfohlene Proteinmenge. Unabhängig von der Zellmenge war im Zellysate von Ax2-Zellen ein deutliches Signal bei rund 40 kDa detektierbar, dies entspricht der erwarteten Größe des erkB-Proteins (42kDa). Während bei der größeren Proteinmenge erwartungsgemäß noch falschpositive Proteinbanden zwischen 50 und 30 kDa darstellbar sind, ergibt sich für die niedrigere Proteinkonzentration ein klares Bild. Hier konnte in den 10-1-Lysaten kein erkB-Protein nachgewiesen werden, auch falschpositive Banden sind nicht detektierbar. Das Experiment wurde nochmals mit höherer Antikörperkonzentration durchgeführt – auch dieser Versuchsansatz ergab ein identisches Ergebnis.

Da das erkB-Protein in den 10-1-Mutanten nicht nachweisbar war, sollte mit Hilfe eines Northern-blots eine mögliche mRNA nachgewiesen. Dafür wurde aus Ax2 und den beiden Mutanten nach axenischem Wachstum RNA isoliert (s. Material&Methoden). Die aufgereinigte RNA wurde quantifiziert und in einem denaturierendem Formaldehydgel aufgetrennt. Anschließend wurde die RNA auf eine Membran transferiert und fixiert. Die Hybridisierung wurde anschließend mit der radioaktiv markierten Probe des vorhergehenden Versuchs durchgeführt, da dieses erkB-Fragment das vollständige Gen enthält und so auch ggf. auftretende RNA-Fragmente nachweisbar wären.

In Abbildung 3-18 sind die Ergebnisse dieses Experiments dargestellt. Nach mehreren stringenten Waschschritten konnten recht deutliche Hintergrundsignale entfernt werden. Auf dem Northern Blot blieb dabei nur eine Bande zu sehen, die sich als mögliches erkB-Signal erweisen sollte. In den beiden anderen RNA-Spuren der Mutanten 10-1M und 10-1O konnte dieses Signale nicht detektiert werden. Auch bei vorab nicht stringenter Reinigung des Blots, konnten keine starken Signale in der RNA der Mutanten ermittelt werden. Somit kann angenommen werden, dass in der Mutante 10-1 weder ein funktionelles erk-Protein, noch die zur Translation erforderliche RNA vorliegt.

3.4 Die Mutante Gdt-1

3.4.1 Einleitung

Um zelluläre Komponenten zu isolieren, die an der Regulation der Discoidin-Expression beteiligt sind, wurden zahlreiche REMI-Mutagenesen mit *Dictyostelium discoideum* durchgeführt und mit der Colonyblot-Methode nach Klonen gesucht, die eine Discoidin-Fehlregulation aufweisen.

Einer der isolierten Klone („*EMIP*OS 2-9“ oder „2-9“) verfügt im Colonyblot über eine deutliche Discoidin-Überexpression (Endl, 1994). Im Gegensatz zum Wildtyp (DH1) exprimiert die Mutante 2-9 bereits Discoidin-Protein unter vegetativen Wachstumsbedingungen, nachweisbar z.B. im Colonyblot mit der Discoidin-Anfärbung im Fraßrand (vegetative Zone). Zusätzlich aggregieren 2-9 Zellen nahe am Fraßrand und z.T. sogar schon im intakten Bakterienrasen, wodurch ein unregelmäßiger Fraßrand entsteht (s. Abbildung 3-20). Die 2-9 Mutante wurde eingehend charakterisiert und das betroffene Gen isoliert (GDT1 / growth-differentiation transition; Endl, 1994; Zeng, 1998; Zeng *et al.*, 2000a+b).

Das Gdt1 Gen kodiert für ein 175,3 kDa großes Protein, das – gestützt auf computergestützte Homologievergleiche – wahrscheinlich in der Zellmembran lokalisiert ist. Eine Sequenzanalyse mit dem EMBL TMpred Programm gab Hinweise auf vier mögliche Transmembrandomänen (TM1 – TM4), zusätzlich gaben Western-blot Daten Hinweise auf eine mögliche Membranlokalisation (Zeng, 1998; Zeng *et al.*, 2000a).

Ebenfalls durch Homologievergleiche wurde eine putative Serin/Threonin Kinase am C-terminalen Ende des Proteins ermittelt, für die jedoch noch keine *in vitro* Ergebnisse vorliegen. Eine sog. „RGD-Sequenz“ (Arg-Gly-Asp) in einer der extrazellulären Domänen lässt die Vermutung zu, dass gdt1 für die Vermittlung der Zell-Substrat-Adhäsion verantwortlich ist (Suzuki, *et al.*, 1986; Zeng, 1998) – eingehende Untersuchungen zu dieser Thematik stehen noch aus.

Die starke Discoidin-Expression in Gdt1-Mutanten wird durch die Unterbrechung eines Signalweges erreicht, der wahrscheinlich parallel zum bereits bekannten G α 2-CRAC-PKA Weg verläuft (End *et al.*, 1996). Dies konnte mit Hilfe verschiedener Doppelmutanten, die diesen PKA-Signalweg betreffen gezeigt werden: Eine Deletion der katalytischen Untereinheit der ProteinkinaseA führt zu einem quantitativen Verlust der Discoidin-Expression.

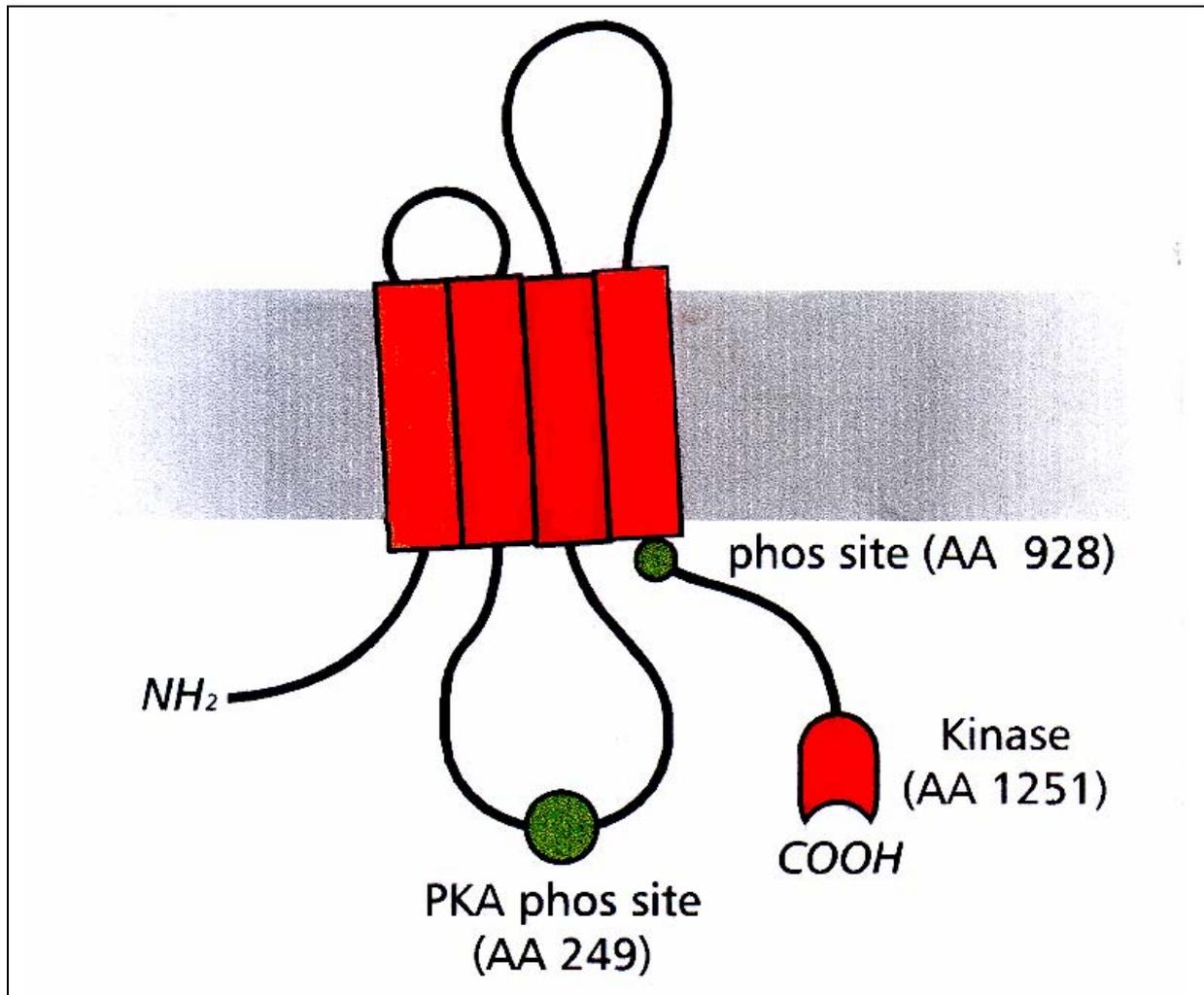


Abb. 3-19: Strukturmodell und Membranlokalisierung von Gdt1.

Dargestellt ist die angenommene Tertiärstruktur von gdt1, die durch computergestützte Homologievergleiche ermittelt wurde. Die Konsensussequenzen der möglichen PKA-Phosphorylierungsstellen sind als Kreise dargestellt. Am C-terminalen Ende ist die putative Proteinkinase eingezeichnet. (weitere Erläuterungen s. Text)

Wird in dieser Mutante zusätzlich gdt1 ausgeschaltet, kommt es wieder zur beobachteten starken Discoidin-Expression der gdt1-Mutante (Endl, 1994; Primke *et al.*, 2000). Gdt1 verfügt also über einen dominanten Phänotyp und ist in der Lage den Discoidin-Phänotyp der PKA-Deletionen zu supprimieren. Das gleiche Ergebnis konnte mit einer $G\alpha 2/gdt1$ -Dopplemutante wiederholt werden, was ein weiteres Indiz für einen parallelen Weg darstellt (Zeng, 1998; Zeng *et al.*, 2000a). Durch Homologiesuche wurden im gdt1-Gen zwei putative PKA-Phosphorylierungsstellen postuliert (RFRNSL und KHRKRLSQ), die an den Aminosäure-Positionen 249 und 928 in den intrazellulären Loops zu finden sind. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten

wurden die Domänen, die diese Strukturen enthalten untersucht (Zeng, 1998; Zeng *et al.*, 2000b). Ein rekombinantes Peptid, das eine dieser beiden möglichen Phosphorylierungsstellen beinhaltete konnte durch rekombinante PKA-C *in vitro* phosphoryliert werden, was die Vermutung nahe legt, dass der PKA-Signalweg und gdt1 interagieren. Diskutiert wird momentan die Inaktivierung von gdt1 durch aktive PKA, wodurch eine quantitative Expressionssteigerung von Discoidin mit dem Einsetzen der Entwicklung ermöglicht wird (Zeng *et al.*, 2000b).

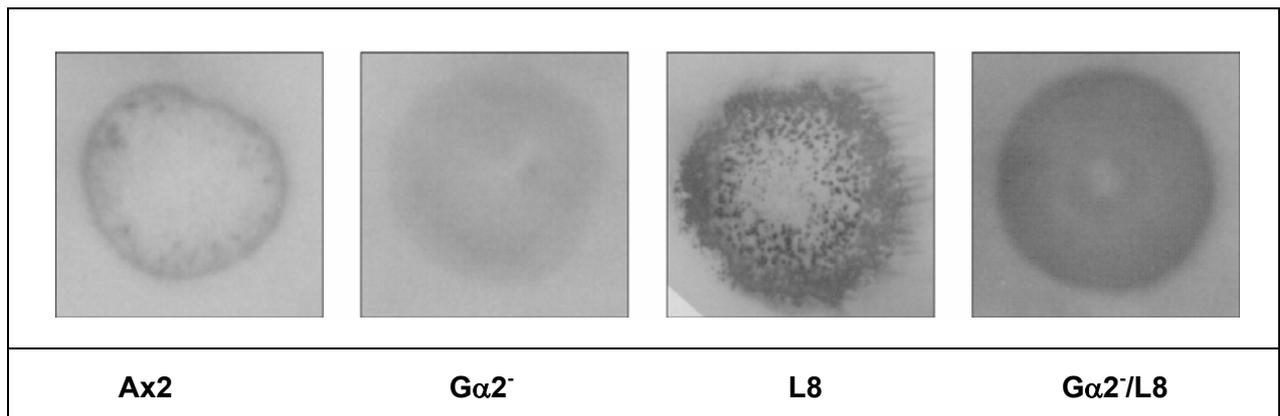


Abb. 3-20: Colonyblots verschiedener Dictyostelium Klone.

Dargestellt sind Ax2 (Wildtyp), eine Zelllinie mit einer Deletion des G-Proteins $G\alpha 2$, die Mutante L8 (gdt1 Deletion in Ax2) und die Doppelmutante $G\alpha 2/L8$.

Die betreffenden Klone wurden auf einem *Klebsiella* Rasen aufgebracht und für mehrere Tage inkubiert. Mit Hilfe eines Colonyblots wurde das Expressionsmuster des Discoidin-Proteins sichtbar gemacht.

3.4.2 Weiterführende Experimente mit der *gdt1*-Mutante

Mit den folgenden Experimenten sollte gezeigt werden, ob *gdt1* in die Mechanismen der PSF-Regulation involviert ist, bzw. ob *gdt1* möglicherweise Funktionen bei der Wahrnehmung des Nahrungsmittelangebotes übernimmt. So kann die Discoidin-Überexpression z.B. auf eine zu hohe Sekretion von PSF (oder eines anderen extrazellulären Faktors) zurückzuführen sein, oder aber *gdt1* könnte als Bakterienrezeptor dienen, der im aktiven Zustand an der bakterienvermittelten Repression von Discoidin beteiligt ist.



Abb. 3-21: Time-Course Experiment mit den *Dictyostelium* Mutanten *Ga2*, *L8* und der Doppelmutante *Ga2/L8*.

Die betreffenden *Dictyostelium* Klone wurden in *Klebsiella*-Suspension inkubiert und bei den Zelldichten 5×10^5 Zellen/ml, 1×10^6 Zellen/ml und 3×10^6 Zellen/ml geerntet. Die *Dictyostelium* Zellen wurden gewaschen und jeweils 5×10^5 Zellen auf einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der anschließend durchgeführte Western-blot wurde mit α Discoidin Antikörper inkubiert und die Signale mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Spuren 1-3: Zellextrakte *L8*; Spuren 4-7: Zellextrakte *Ga2*; Spuren 7-9: Zellextrakte *Ga2/L8*

Spuren 1, 4, 7 (Zelldichte): 5×10^5 Zellen/ml; Spuren 2, 5, 8 1×10^6 Zellen/ml; Spuren 3, 6, 9: 3×10^6 Zellen/ml

Um zu überprüfen, ob die Discoidin-Expression mit wachsender Zelldichte in einer *Klebsiella aerogenes*-Suspension zunimmt, wurden Proben von *Dictyostelium* Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen entnommen. Dazu wurden *L8*-Zellen (*gdt1* Deletion in Ax2), bzw. *2-9*-Zellen (*gdt1*-Deletion in DH1) in einer Standard-KA-Suspension über Nacht inkubiert und am nächsten Tag mit frischer KA-Suspension auf eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml verdünnt. Die Zellen wurden in dieser Suspension unter Schütteln inkubiert und Proben bei 5×10^5 Zellen/ml, 1×10^6 Zellen/ml und 3×10^6 Zellen/ml entnommen. Zusätzlich wurden bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml *Dictyostelium* Zellen geerntet und die gewaschenen Amöben für 4h in Phosphatpuffer bei einer Dichte von 1×10^7

Zellen/ml inkubiert (Entwicklungsbedingungen). Als weiterer Standardwert wurden Zellen geerntet, die über Nacht bis zu einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml in axenischem Medium gewachsen waren. Die *Dictyostelium* Zellen wurden von der KA-Suspension, bzw. vom axenischen Medium freigeschwemmt und identische Zellmengen auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Der angefertigte Western-blot wurde mit α Discoidin-Antikörper entwickelt und das Ergebnis ist in Abbildung 3-22 dargestellt.

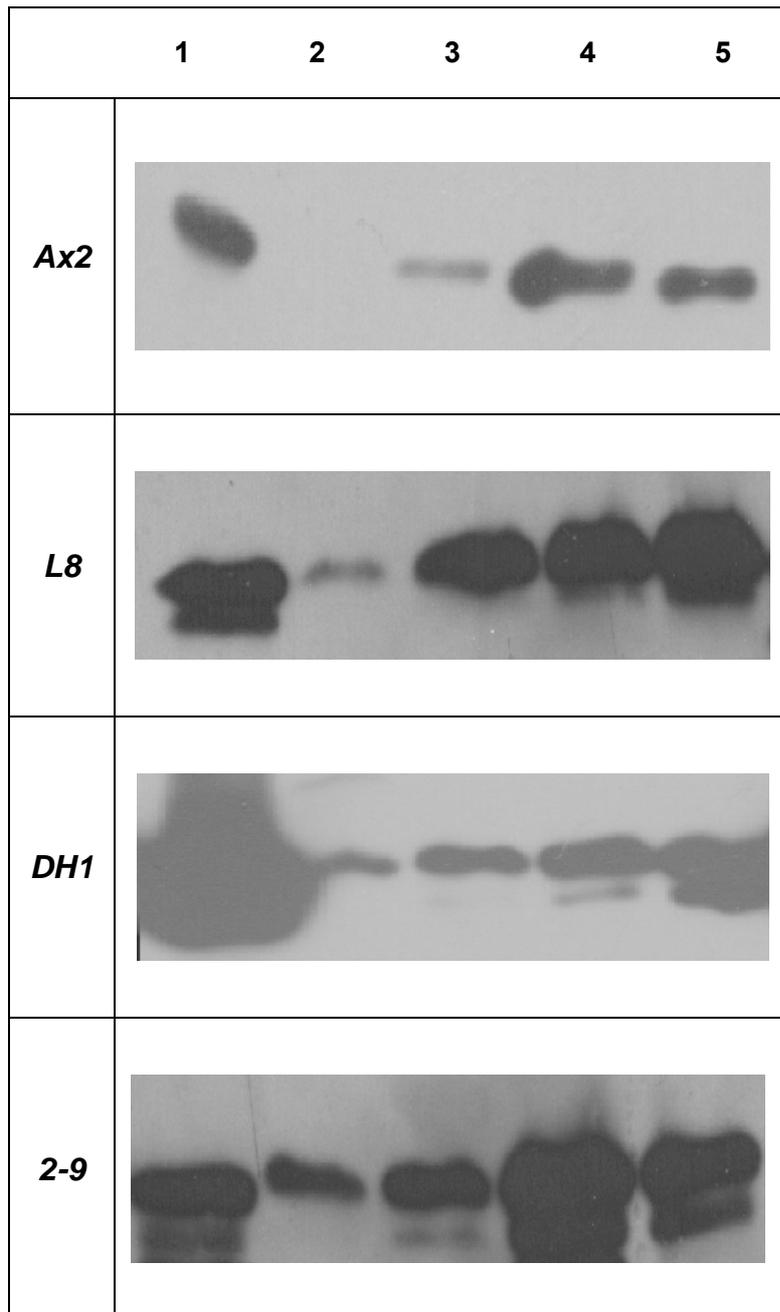


Abb. 3-22: Expressionsmuster von Gdt1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Die angegebenen *Dictyostelium* Zelllinien wurden unter verschiedenen Wachstumsbedingungen inkubiert und nach der Ernte vom Nährmedium getrennt. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden auf einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und der anschließend durchgeführte Western-blot mit α Discoidin-Antikörper inkubiert. Die Discoidin-Expression wurden mit Chemolumineszenz (ECL) sichtbar gemacht.

1: axenisches Wachstum
 2-4: vegetatives Wachstum
 jeweils Ernte bei
 2: 5×10^5 Zellen/ml
 3: 1×10^6 Zellen/ml
 4: 3×10^6 Zellen/ml
 5: 4h Entwicklung in Phosphatpuffer

Unterschiede im Expressionsmuster und in der Expressionsstärke konnten bereits beim Vergleich der zwei Zelllinien (DH1/Ax2) festgestellt werden. Während Ax2 erst ab einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml einen leichten Anstieg der Discoidin-Promotoraktivität zeigte, war bei DH1-Zellen schon bei niedriger Dichte (5×10^5 Zellen/ml) ein Signal erkennbar. Die beiden Laborstämme und die daraus generierten Mutanten haben also an sich schon ein divergentes Discoidin-Expressionsmuster, jedoch ist die Beobachtung im Verlauf der Expressionssteigerung bei vegetativem Wachstum vergleichbar. Die Menge an darstellbarem Discoidin-Protein nahm kontinuierlich zu und auch die Steigerung der Discoidin Expression unter Entwicklungsbedingungen wurde deutlich (vergl. Spur 3, vegetativ 1×10^6 Zellen/ml und Spur 5). Diese Beobachtungen waren auch für die gdt1 Mutanten zutreffend, nur wurden hier deutlich größere Mengen an Discoidin Protein nachgewiesen. Der Vergleich Ax2/L8 zeigte bereits eine Discoidin Expression bei einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml für die gdt1 Mutante und im weiteren Verlauf des Wachstums eine extreme Zunahme des Discoidin Proteins in der gdt1-Zelle. Die Mutante 2-9 zeigte ebenfalls die erwartete starke Discoidin Expression, hier wurde bei einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml ein Discoidin Menge detektiert, die der des Wildtyps DH1 bei einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml in Klebsiella Suspension entspricht. Beide gdt1 Mutanten hatten bei einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml mehr Discoidin Protein akkumuliert als die jeweiligen Wildtypstämme zu irgendeinem Zeitpunkt des vegetativen Wachstums erreichten. Die gdt1 Mutation im DH1 Hintergrund scheint dabei (entsprechend Ax2/DH1) noch mehr Discoidin zu exprimieren, als die entsprechende Mutation im Ax2-Hintergrund. Nicht vergleichbar sind die unter axenischen Bedingungen nachgewiesenen Expressionslevels. Diese waren bei unabhängigen Experimenten für die jeweiligen Stämme nicht wiederholbar, zeigten aber immer starke Discoidin-Expression.

Konditionierter Puffer Zelldichte ($\times 10^6$ Zellen/ml)	Ax2			L8			frisch 0,5
	0,5	1,0	3,0	0,5	1,0	3,0	
Mittelwert 1. Assay	0,13	0,12	0,31	0,19	0,21	0,24	0,03
relative Pufferaktivität	4,33	4,00	10,33	6,33	7,00	8,00	1
Mittelwert 2. Assay	0,15	0,24	0,19	0,17	0,15	0,23	0,04
relative Pufferaktivität	3,75	6,00	4,75	4,25	3,75	5,75	1
Mittelwert 3. Assay	0,20	0,32	0,34	0,19	0,22	0,34	0,06
relative Pufferaktivität	3,33	5,33	5,67	3,17	3,67	5,67	1
Durchschnittliche relative Pufferaktivität	3,81	5,11	6,92	4,58	4,81	6,47	1,00
<i>Standardabweichung</i>	<i>0,50</i>	<i>1,02</i>	<i>2,99</i>	<i>1,61</i>	<i>1,90</i>	<i>1,32</i>	

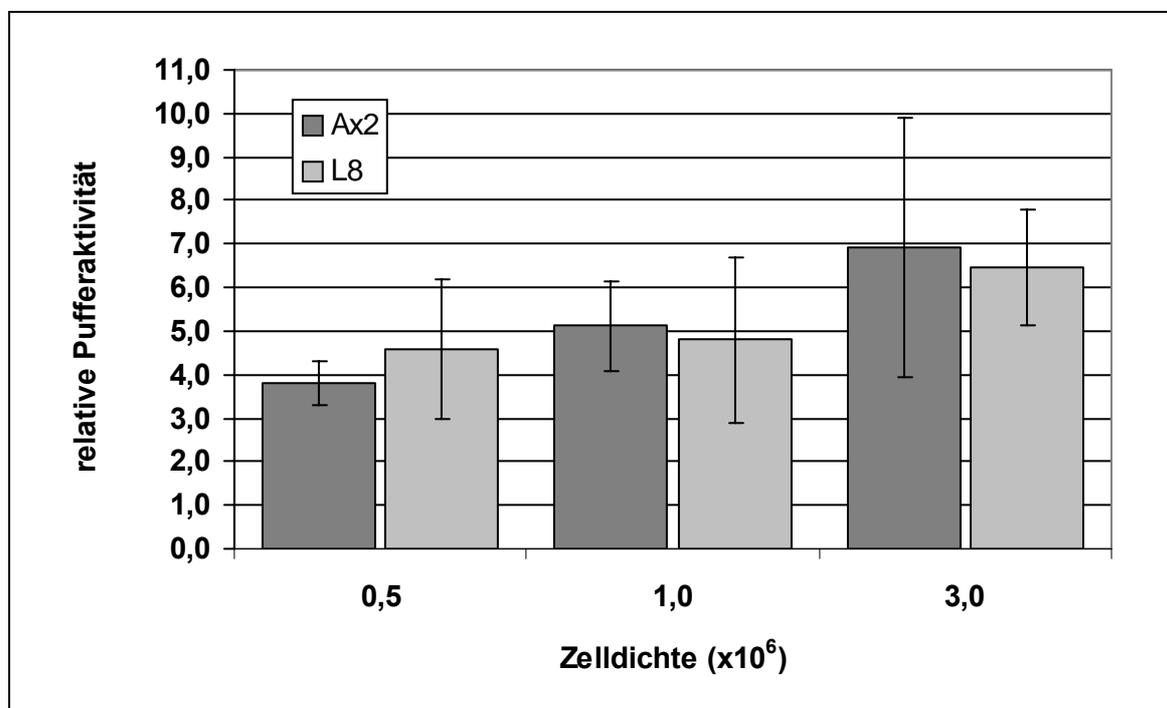


Abb. 3-23: Vergleich der PSF-Sekretion von Ax2 und L8.

Mit jeweils drei unabhängig durchgeführten PSF-Assays (siehe Abschnitt 3-1-1) wurde die Aktivität in Puffern, die durch Ax2, bzw. L8 konditioniert wurden gemessen. Die Zelldichte bezeichnet den Zeitpunkt, zu dem der jeweilige konditionierte Puffer geerntet wurde. Die relative Pufferaktivität ergibt sich aus dem Aktivitätszuwachs im Vergleich zu nicht konditioniertem Puffer (*Klebsiella*-Suspension mit frischem Phosphatpuffer).

Da *gdt1*-Zellen nachweislich verfrühte Entwicklungsstadien aufweisen (Zeng, 1998), ist es denkbar, dass der Phänotyp der *gdt1*-Mutanten einem fehlerhaften „Prestarvation-response“ zu Grunde liegt. Dabei sind verschiedene Denkmodelle möglich:

- *Gdt1*-Mutanten sekretieren zu viel PSF oder andere zu diesem Zeitpunkt benötigte Faktoren in das sie umgebene Medium. Dadurch exprimieren diese Zellen entwicklungsabhängige Gene zu früh, bzw. zu stark, was die hohe Discoidin-Expression und das Vorhandensein von Entwicklungsstadien bereits während des vegetativen Wachstums erklärt.
- Bei *gdt1* handelt es sich um einen Rezeptor, der für die Wahrnehmung von Bakterien verantwortlich ist und somit maßgeblich an der Signalvermittlung des Nahrungsangebotes beteiligt ist.
- Es ist vorstellbar, dass *gdt1* der Rezeptor für einen der induzierenden Faktoren während des vegetativen Wachstums (z.B. PSF) ist. Dabei käme dem Rezeptor eine grundsätzlich reprimierende Funktion zu, der seine Aktivität mit zunehmender Bindung des Liganden verliert.
- *Gdt1*-Zellen könnten eine fehlerhafte „Verrechnung“ von Bakterienangebot und umgebenen konditionierenden Faktoren aufweisen und daher frühzeitig mit dem Eintritt in die Entwicklung beginnen, bzw. so regulierte Gene verfrüht induzieren.

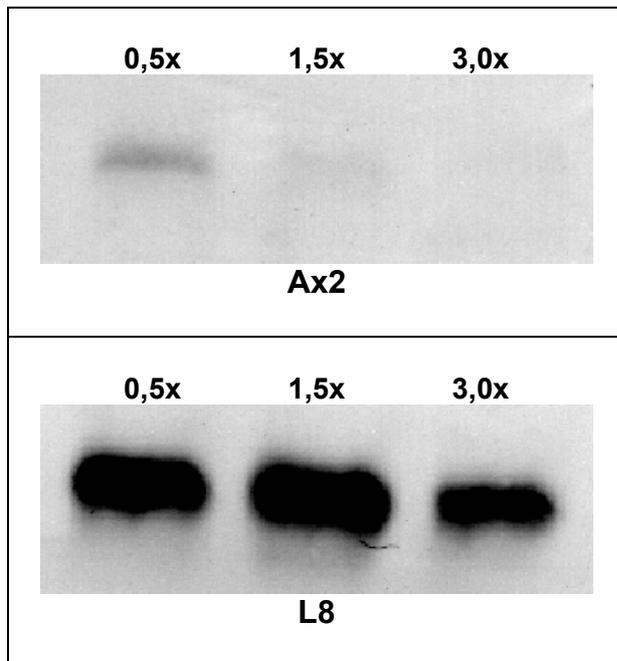
Um diese Möglichkeiten für *gdt1*-Mutanten genauer zu interpretieren, sollte die PSF-Aktivität verschiedener *Klebsiella*-Suspensionen bestimmt werden. Ax2 bzw. L8 Zellen wurden dafür in einer *Klebsiella*-Suspension inkubiert und bei einer Zelldichte von 5×10^5 , 1×10^6 und 5×10^6 Zellen/ml die konditionierten Puffer geerntet. Die gereinigten Puffer wurden für PSF-Assays benutzt und in drei unabhängigen Experimenten die Pufferaktivität bestimmt. Die Assays wurden mit einem ELISA-Reader vermessen und die erhaltenen Werte in relative Pufferaktivitäten umgerechnet. Die Aktivität der Kontrollmessung (frische *Klebsiella*-Suspension) wurde dafür auf 1 gesetzt.

Abbildung 3-23 zeigt die Zusammenfassung der drei unabhängig durchgeführten PSF-Assays. Das Bakterienmedium beider Zelllinien wurde kontinuierlich durch *Dictyostelium* konditioniert. Dies wurde aus dem durchschnittlichen Anstieg der Promotoraktivität bei Messung des am stärksten konditionierten Puffer (3×10^6 Zellen/ml) im Vergleich zu den schwächer konditionierten Puffern deutlich: die Steigerung entsprach beim Wildtyp Ax2 dem 1,8fachen, der durch L8 Zellen konditionierte Puffer bewirkte durchschnittlich eine 1,4fache Aktivitätserhöhung. Messbar war dabei besonders die Steigerung vom schwach konditionierten Puffer (5×10^5 Zellen/ml) hin zur stark konditionierten *Klebsiella*-Suspension. Die Aktivitätssteigerung des mittleren Puffers (1×10^6 Zellen/ml) im Vergleich zum schwach konditionierten Puffer fiel eher gering aus. Beachtlich war auch die signifikante Konditionierung des Puffers, der bei niedriger Zelldichte (5×10^5 Zellen/ml) geerntet wurde. Die Puffer beider *Dictyostelium* Stämme führten in diesem Fall durchschnittlich zu einer 4fachen Aktivitätssteigerung des Discoidin-Promotors im Teststamm.

Der Vergleich der beiden *Dictyostelium*-Stämme Ax2 und L8 erbrachte allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Fähigkeit, eine *Klebsiella*-Suspension bei vegetativem Wachstum zu konditionieren, die jeweilige Pufferaktivität war zu den gemessenen Zelldichten vergleichbar. Die Mutante L8 sekretiert also nicht mehr PSF, bzw. konditionierende Faktoren als der Wildtyp Ax2.

Im nächsten Experiment wurde untersucht, ob *gdt1*-Zellen das sie umgebene Nahrungsangebot fehlinterpretieren. Dazu wurden drei *Klebsiella*-Suspensionen unterschiedlicher Dichte ($\times 0,5$ / $\times 1$ / $\times 3$) hergestellt und Ax2 und L8 Zellen über Nacht in diesen Puffern inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml geerntet und von den Bakterien getrennt. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden auf einer 12%igen SDS-PAGE aufgetragen und die Discoidin Expression immunologisch bestimmt (Western-blot).

Für beide *Dictyostelium* Stämme konnte die Regulation der Discoidin Expression durch die umgebende Bakteriendichte gezeigt werden. Ax2 zeigte in der Standard-*Klebsiellad*-Suspension (x1) die bereits bekannte schwache Bande, die bei Verringerung der Bakteriendichte stärker wurde. In der 3fach konzentrierten Bakteriensuspension konnte für Ax2 bei einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml kein Discoidin-Protein nachgewiesen werden. Die L8 Mutante zeigte ebenfalls eine



Abnahme der Discoidin Expression bei höherem Nahrungsangebot (x0,5 -> x3), der Unterschied war jedoch nicht so eindeutig wie für Ax2, was auf die relativ hohe Expression zurückzuführen war („Hintergrundleuchten“). Entgegen einer ersten Annahme (Zeng, 1998) scheint gdt1 also kein Rezeptor für Bakterien darzustellen, der für die Regulation der Discoidin-Expression verantwortlich ist. Gdt1-Mutanten nehmen die Dichte der sie umgebenden Bakteriensuspension war.

Abb. 3-24: Rezeptortest mit Ax2 und der Gdt1-Mutante L8.

Beide *Dictyostelium* Klone wurden in frisch hergestellter *Klebsiella*-Suspension entsprechender Dichte (0,5 – 3,0x) über Nacht inkubiert und am nächsten Tag bei einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml geerntet. Die *Dictyostelium* Zellen wurden von den Bakterien freigewaschen und anschließend jeweils 1×10^6 Zellen auf einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der angefertigte Western-blot wurde mit α Discoidin-Antikörper inkubiert und die Protein-Banden mit dem ECL-System sichtbar gemacht.

Um die Rezeptormenge, bzw. Rezeptoraffinität von Ax2 und gdt1-Zellen zu bestimmen, wurde nun ein Adsorptionsexperiment durchgeführt (siehe Abschnitt 3-1-3). Dafür wurde eine von Ax4 Zellen konditionierte *Klebsiella*-Suspension bei einer Dichte von $5-6 \times 10^6$ Zellen/ml geerntet. Die Schüttelkultur wurde zentrifugiert und der klare Überstand nach Filtration auf

Eis aufbewahrt - dieser Lösung dient als konditionierter Testpuffer. Die *Dictyostelium* Klone Ax2 und L8 wurden über Nacht in frischer *Klebsiella*-Suspension inkubiert und exakt bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml durch differentielle Zentrifugation von den

Bakterien getrennt. Die Wachstumsdauer in Suspension bis zu diesem Zeitpunkt war bei beiden Kulturen nahezu identisch. Jeweils 1×10^8 *Dictyostelium* Zellen wurden dann in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 2000upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nun 10 ml des konditionierten Testpuffers hinzugegeben.

	Verbleibende Aktivität (%)		Durchschnitt	Standardabw.
	1. Test	2. Test		
Nicht adsorbierter Puffer	100,0	100,0	100,0	
Adsorbiert durch Ax2	74,1	78,8	76,5	3,3
Adsorbiert durch L8	67,5	56,2	61,8	8,0

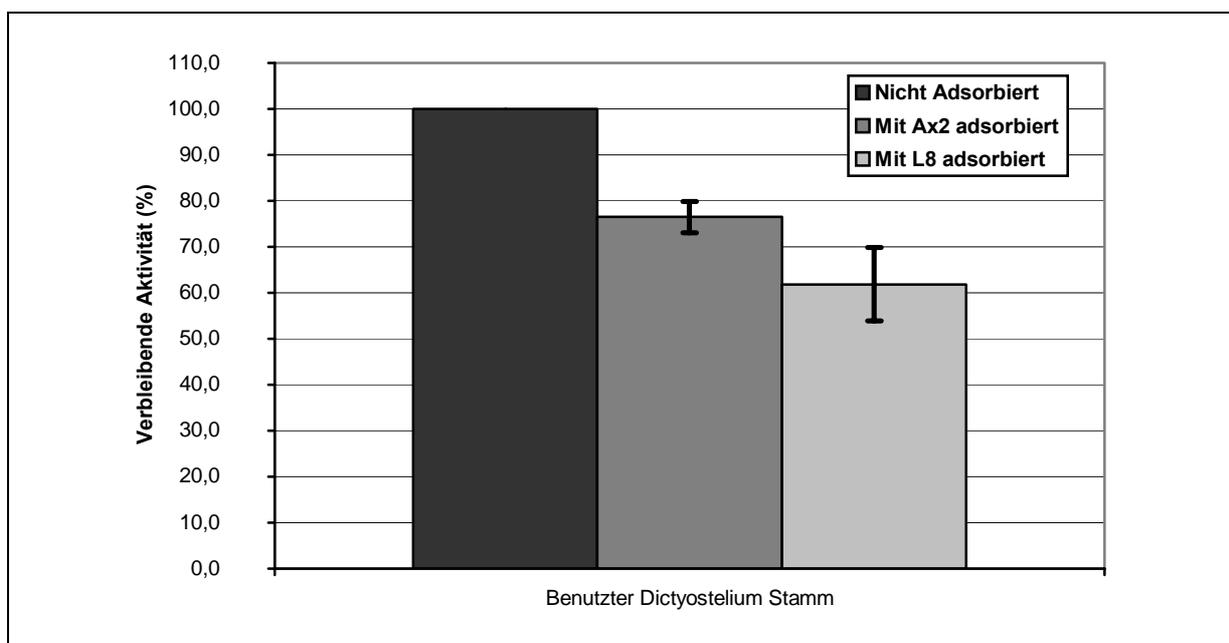


Abb. 3-25: Aktivitätsabnahme eines konditionierten Puffers nach Adsorptionsexperiment.

Dictyostelium Zellen (Ax4) wurden bis zu einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in *Klebsiella*-Suspension inkubiert um einen konditionierten Puffer zu erhalten. Ax2 und L8 Zellen wurden im klaren Überstand dieses konditionierten Mediums inkubiert und die Menge an adsorbierter PSF-Aktivität bestimmt. Die Grafik zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Zelldichte zu diesem Zeitpunkt betrug 1×10^7 *Dictyostelium* Zellen/ml. Nach 20 Minuten Inkubation unter Schütteln bei 4°C wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand bis zur Weiterverwendung wieder auf Eis aufbewahrt. Um den Gehalt an

verbleibender Aktivität in den verschiedenen Puffern zu messen, wurden die Lösungen benutzt, um jeweils frische *Klebsiella*-Suspensionen herzustellen. In diesen Suspensionen wurden über Nacht DAG-Zellen bis zu einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml inkubiert und eine PSF-Assay durchgeführt. Durch das Wachstum in konditioniertem Puffer zeigten die DAG-Zellen eine starke Induktion des Discoidin-Promotors und damit auch eine steigende β -Galaktosidase-Aktivität.

Durch die Inkubation von gewaschenen, logarithmisch wachsenden *Dictyostelium* Zellen mit konditionierten Puffern konnte eine signifikante Abnahme der induzierenden Wirkung des Puffers gemessen werden. Dabei wurde angenommen, dass durch den Waschprozess alle Rezeptoren ihre Liganden, wie z.B. PSF verloren hatten. Die freien Rezeptoren binden im zugegebenen Puffer anschließend wieder ihren jeweiligen Faktor. Durch die Trennung mittels Zentrifugation wurde den Puffer so ein Teil seiner Aktivität entzogen.

Die Aktivitätsabnahme wurde in zwei unabhängigen Experimenten überprüft (PSF-

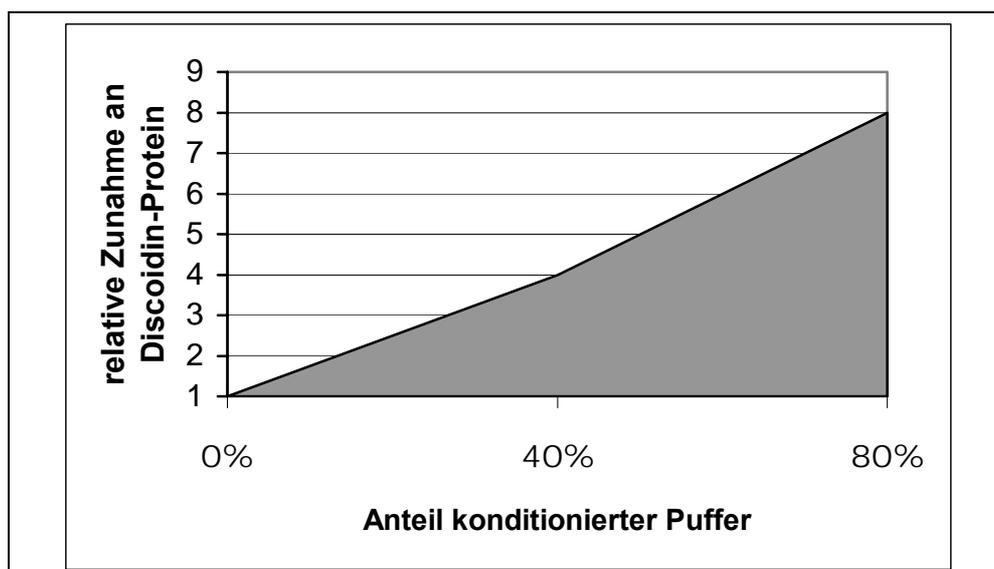


Abb. 3-26: Zunahme der Discoidin-Promotor Aktivität bei steigendem Anteil an konditioniertem Puffer.

Eine mit Ax4 konditionierte *Klebsiella* Suspension wurde gewaschen und der klare Überstand zur Herstellung von frischen 1xKA Suspensionen verwendet. Dabei wurde der konditionierte Puffer in verschiedenen Mischverhältnissen eingesetzt (0-80%). Die Aktivität des Puffers und die damit einhergehende Steigerung der Discoidin-Promotor Aktivität wurde bestimmt.

Assay) und die gewonnen Puffer mindestens doppelt vermessen. Die Aktivität, die in

unbehandeltem, konditioniertem Puffer gemessen wurde, wurde auf 100 Prozent gesetzt. Die übrigen Werte wurden in Relation zum unbehandelten Puffer gesetzt und in prozentuale Werte umgerechnet. Für den Wildtyp Ax2 konnte eine Abnahme der im Puffer enthaltenen Aktivität zwischen 21,2 und 25,9% bestimmt werden. Dies entsprach einer durchschnittlichen verbleibenden Aktivität von 76,5%. Für die gdt1 Mutante ergab sich ein deutlich größeres Adsorptionsvermögen. Die L8-Zellen entnahmen dem Puffer zwischen 32,5 und 43,8% relativer Aktivität, was einer Abnahme um durchschnittlich 38,3% entsprach (verbleibende Aktivität 61,8%). Der erhöhte Aktivitätsverlust eines konditionierten Puffers durch Inkubation mit L8-Zellen war in diesem Experiment im Vergleich zum Wildtyp Ax2 signifikant.

In einem abschließenden Experiment sollte nun die Zunahme des Discoidin-Proteins in *Dictyostelium* Zellen als Reaktion auf extrazelluläre Faktoren bestimmt werden. Dafür wurde Puffer geerntet, der von Ax4-Zellen über Nacht bis zu einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml konditioniert wurde. Von diesem Puffer wurden mit Phosphatpuffer Verdünnungsreihen hergestellt, so dass eine Reihe von 100% bis 0% Phosphatpuffer in Schritten zu 20% zur Verfügung stand. Jeweils 10ml dieser Puffers wurde dann in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und 2,5ml einer Suspension aus *Klebsiella* und Ax2-, bzw. L8-Zellen hinzugegeben. Die Suspension wurde dabei so gewählt, dass eine Endkonzentration im Kolben von $2-3 \times 10^4$ *Dictyostelium* Zellen/ml in einer 1xKA-Suspension entstand. Am nächsten Tag wurden die Schüttelkulturen exakt bei 1×10^6 Zellen/ml geerntet und von den Bakterien freigewaschen. Die so erhaltenen *Dictyostelium* Zellen wurden in Laemmli Puffer aufgenommen, so dass eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ μ l entstand. Diese Suspension wurde darauffolgend verdünnt (jeweils 1:1 mit Laemmli-Puffer) und jeweils 10 μ l der *Dictyostelium* Suspension in Folge auf einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach Inkubation mit α -Discoidin-Antikörper wurde die Promotoraktivität in den verschiedenen Suspensionen abgeschätzt

Erwartungsgemäß reagierten die Ax2-Zellen auf die steigende Menge an konditionierenden Faktoren mit wachsender Discoidin-Promotoraktivität. Dabei schien die Promotoraktivität stufenlos anzusteigen. Um eine genauere Aussage über die Aktivitätszunahme machen zu können, wurden die Proteinproben bei 0%, 40%

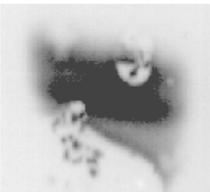
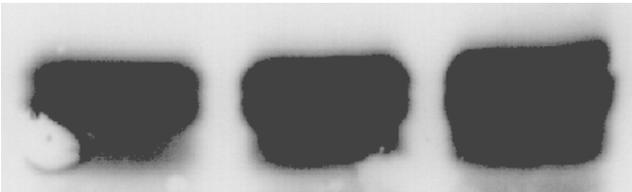
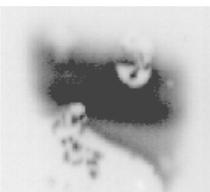
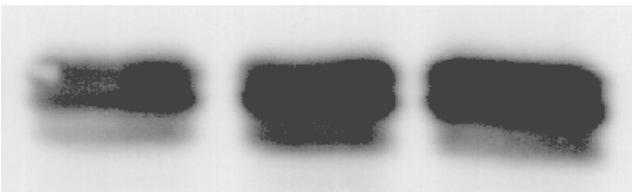
t_0 vegetatives Wachstum	Inkubation in Phosphatpuffer			
	1 Stunde	2 Stunden	3 Stunden	
				Ax2 <u>ohne</u> Ionophore
				Ax2 <u>mit</u> Ionophore
				L8 <u>ohne</u> Ionophore
				L8 <u>mit</u> Ionophore

Abb. 3-27: Einfluss von Calcium-Influx in die Zelle auf die Discoidin Expression unter Entwicklungsbedingungen.

Vegetativ wachsende *Dictyostelium* Zellen (Ax2 und L8) wurden bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml geerntet und von den Bakterien getrennt. Die gewaschenen Zellen wurden bei einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in Phosphatpuffer+1mM CaCl_2 unter Schütteln inkubiert (Entwicklungsbedingungen). Zellproben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und auf einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Der anschließend durchgeführte Western-blot wurde mit α Discoidin-Antikörper inkubiert. Der Einfluss von Calcium-Influx in die Zelle wurde durch Zugabe einer Calcium-Ionophore (Calcineurin; Sigma) untersucht.

und 80% nochmals auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Diese Verdünnungsreihe wurde nach dem Western-blot ausgewertet und so eine relative Mengenabschätzung vorgenommen.

Es zeigte sich (Blot hier nicht gezeigt), dass Zellen, die im Vergleich zu *Dictyostelium* Zellen in unkonditionierten Puffern (frische KA-Suspension) gewachsen waren bis zu

acht mal weniger Discoidin-Protein exprimierten, als Ax2-Zellen die in *Klebsiella*-Suspension wuchsen, die 80%ig konditionierten Puffer enthielt. Zellen, die in Puffer gewachsen waren, der 40% an konditionierten Puffer enthält, zeigten eine ungefähr vierfach höhere Discoidin-Menge als Zellen aus frischem Puffer. Trägt man diese Beobachtung grafisch auf, so erhält man die in Abbildung 3-26 gezeigte nahezu lineare Abhängigkeit. Für gdt1 konnten diese Beobachtungen nicht in ähnlicher Form nachvollzogen werden. In zwei unabhängigen Experimenten konnte für L8-Zellen zwar eine Regulation mit steigender Puffer-Konzentration gemacht werden, allerdings fehlt die lineare Steigerung, die von Ax2-Zellen beobachtet werden konnte (Blot hier nicht gezeigt). Durch die hohe Menge an Discoidin-Protein in der L8-Zelle wurde eine genaue Bestimmung mit dieser Methode unmöglich gemacht. Daher wurde für gdt1-Zellen von einer relativen Quantifizierung der Discoidin-Expression abgesehen.

Als abschließender Test wurde ein Calcium-Assay durchgeführt. Mit Hilfe dieses Assays kann festgestellt werden, ob der Influx von Calcium in die Zelle die Discoidin-Expression inhibieren kann. Dazu wurden Ax2 und L8 über Nacht in *Klebsiella*-Suspension inkubiert und am nächsten Morgen bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml geerntet. Die Bakterien wurden durch differentielle Zentrifugation abgetrennt und die so gewaschenen *Dictyostelium* Zellen in Phosphatpuffer resuspendiert. Dabei wurde eine Dichte von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und dem Phosphatpuffer 1mM CaCl_2 beigefügt. Pro Zelllinie wurden so je zwei Kulturkolben vorbereitet, wobei je einem Kolben die Calcium-Ionophore „Calcineurin“ (siehe Material&Methoden) beigefügt wurde. Anschließend wurden die Zellen in diesem Kolben inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Identische Zellmengen wurden am Ende des Experimentes auf einer SDS-Page aufgetrennt und die Menge an Discoidin-Protein mit Hilfe eines Western-blots sichtbar gemacht. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3-27 dargestellt.

Betrachtet man zunächst die Testreihen, die ohne Ionophore durchgeführt wurden, so wird deutlich, dass die gdt1-Mutante bereits nach einer Stunde Entwicklung eine sehr deutliche Steigerung in der Discoidin-Expression aufweist. Dies konnte in diesem Experiment für den Wildtyp Ax2 erst nach mehr als 2 Stunden Entwicklung gezeigt werden. Die Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den beiden

Zelllinien waren aber auch schon aus den vorhergehenden Experimenten bekannt. Das Experiment zeigt aber auch, dass sowohl bei Ax2, als auch bei L8 die Inhibition der Discoidin-Expression durch Calcium-Influx gegeben ist. Fügt man dem Phosphatpuffer Ionophore bei, so wird im Wildtyp kein Discoidin-Protein gebildet. In der Mutante L8 scheint die Steigerung im Vergleich zum Ionophoren-freien Medium nicht mehr so stark auszufallen (vergl. 1h vs. 3h). Auffällig ist aber, dass trotz Ionophore auch weiterhin Discoidin akkumuliert wird, wenn auch in einem sehr geringen Maße. Die Beurteilung dieses Ergebnisses fällt jedoch etwas schwer, da – wie auch schon im vorhergehenden Experiment bemängelt – die „natürliche“ Discoidin-Expression in *gdt1*-Mutanten extrem hoch ist.

3.5 Die Mutante rasS

3.5.1 Einleitung

RasS wurde 1994 isoliert und ergänzte die Familie der ras-Proteine aus *Dictyostelium discoideum*, die bis zu diesem Zeitpunkt aus den GTPasen rasD, rasG und rasB bestand. (Daniel *et al.*, 1993&1994, Reymond *et al.*, 1984, Robbins *et al.*, 1989).

Die rasS mRNA ist während des gesamten Lebenszyklus von *Dictyostelium* nachweisbar, kumuliert jedoch stark während der Entwicklung, was auf eine Funktion zum Zeitpunkt des multizellulären Wachstums hinweist (Daniel *et al.*, 1994). Das Protein besteht aus 194 Aminosäuren und ist zu 60% identisch mit den bereits isolierten Proteinen rasD und rasG aus *Dictyostelium*. Homologievergleiche zu humanem ras erbrachten eine Übereinstimmung von 50% (Daniel *et al.*, 1994).

Dictyostelium Mutanten, die eine Mutation im rasS-Gen aufweisen zeigen ein ungewöhnliches Bewegungsverhalten. Die Zellen bewegen sich rund 3fach schneller über das Medium als die entsprechende Wildtypzelle. Ebenso betroffen sind Phago- und Endozytose, sowie das Aussehen der Zelle, das auffällig viele Elongationen aufweist (Chubb *et al.*, 2000). Derzeit wird mit computergestützter 3D Mikroskopie untersucht, welcher Mechanismus dieser Zellmorphologie zu Grunde liegt (Chubb *et al.*, 2002).

3.5.2 Experimente mit der rasS-Mutante

Um zu untersuchen, ob rasS in die Signaltransduktion früher Entwicklungsprozesse oder des vegetativen Wachstums involviert ist, wurden die zur Verfügung gestellten Zelllinie im Labor kultiviert. Der Klon wies ein Gene-Disruption des rasS Gens im Wildtyp Ax2 auf und konnte mittels Blasticidin-Resistenz selektiert werden. Nach mehreren Tagen Selektion in axenischem Medium (BS10) wurden die Zellen auf *Klebsiella*-Platten rekloniert. Einzelklone wurden für einen Colonyblot auf neue *Klebsiella*-Platten überführt. Bereits im Colonyblot konnte im Vergleich zum Wildtyp Ax2 eine starke Discoidin-Färbung gezeigt werden (Blot hier nicht gezeigt). Um eine quantitative Bestimmung der Discoidin-Expression in der rasS-Mutante durchführen zu können, wurde ein selektierter rasS-Einzelklon an das vegetative Wachstum in *Klebsiella*-Suspension adaptiert. Mit einer Übernachtskultur wurde dann eine frische

Ergebnisse

Bakterien-Suspension angeimpft und Proben bei unterschiedlichen Zelldichten von entnommen ($0,5 \times 10^6$, 1×10^6 und 3×10^6 Zellen/ml Suspension).

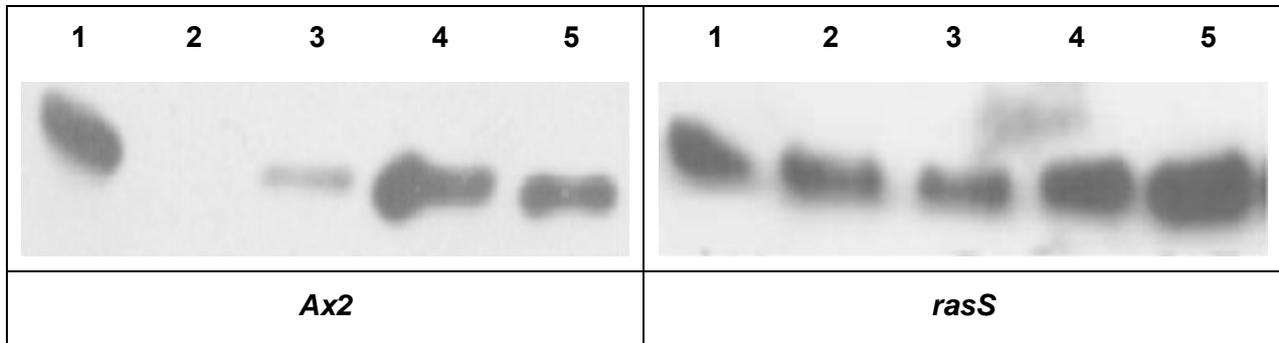


Abb. 3-28: Expressionsmuster der rasS-Mutante im Vergleich zum Wildtyp Ax2.

Die *Dictyostelium* Zelllinien Ax2 und rasS wurden unter verschiedenen Wachstumsbedingungen inkubiert und nach der Ernte vom Nährmedium getrennt. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden auf einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und der anschließend durchgeführte Western-blot mit α Discoidin-Antikörper inkubiert. Die Discoidin-Expression wurden mit Chemolumineszenz (ECL) sichtbar gemacht.

Spur 1: axenisches Wachstum (Ernte bei 1×10^6 Zellen/ml)

Spuren 2-4: Wachstum in *Klebsiella* Suspension, Ernte bei 5×10^5 Zellen/ml (2); 1×10^6 Zellen/ml (3) und 3×10^6 Zellen/ml (4)

Spur 5: Discoidin Expression nach 4h Entwicklung in Phosphatpuffer bei 1×10^7 Zellen/ml

Bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml wurden zusätzlich *Dictyostelium* Zellen entnommen, um diese in Phosphatpuffer unter Entwicklungszellen zu testen. Die *Dictyostelium* Zellen in Suspension wurden von den Bakterien Zellen getrennt und in Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Zellen für das Entwicklungs-Assay wurden dann bei einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in Phosphatpuffer angesetzt und weitere 4 Stunden unter Schütteln inkubiert, bevor auch diese Zellen in Laemmli aufgenommen wurden (siehe auch Material&Methoden). Zeitgleich zum vegetativen Wachstum in *Klebsiella*-Suspension wurden Ax2&rasS-Zellen in axenischem Medium unter schütteln inkubiert und bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml geerntet. Alle Zellproben wurden in Laemmli-Puffer lysiert und anschließend in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrocellulose transferiert (Western-blot) und dieser Blot über Nacht mit α Discoidin-Antikörper inkubiert. Der Blot wurde am nächsten Tag mit Sekundärantikörper inkubiert und die Discoidin-Expression mittels Chemolumineszenz dargestellt.

In Abbildung 3-28 ist das Ergebnis dieses Experiments dargestellt. Im Vergleich zum Wildtyp Ax2 zeigte sich bei nahezu allen Zelldichten, bzw. Wachstumsbedingungen eine stärkere Discoidin-Expression in der Mutante rasS. Während *Dictyostelium*-Ax2 bei einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml noch keine Discoidin-Expression aufweist, ist in der Mutante rasS bereits ein Signal vorhanden (jeweils Spur 2). Auch die Signalstärke bei höherer Zelldichte ist im Vergleich zu Ax2 aus dem Western-blot ablesbar (jeweils Spuren 3+4). Beide *Dictyostelium* Klone zeigten eine Kumulation des Discoidin-Proteins mit steigender Zelldichte. Auch die erwartete, vielfache Signalsteigerung während der Inkubation unter Entwicklungsbedingungen ist deutlich erkennbar und fällt auch hier für die Mutante rasS stärker aus (vergl. jeweils Spur 3 und 5). Kein deutlicher Unterschied kann bei Wachstum in axenischem Medium nachgewiesen werden.

Die Deletion des rasS-Gens in *Dictyostelium discoideum* führt also zu einer erhöhten Discoidin-Expression während des vegetativen Wachstums in Bakteriensuspension. Um eine genauere Information zu erhalten wie rasS in die Discoidin-Expression involviert ist, wurde als nächstes Experiment ein PSF-Assay durchgeführt. Dazu wurden *Klebsiella*-Suspensionen mit Ax2, bzw. rasS inkubiert, um auf diese Weise konditionierte Puffer zu erhalten, die wiederum genutzt wurden, um frische Bakteriensuspensionen herzustellen. Diese Puffer wurden dann mit Ax2-DAG inkubiert, um so das enthaltene PSF (bzw. die konditionierenden Faktoren) zu „vermessen“ (siehe Abschnitt 3-1-1).

In drei unabhängigen Experimenten - es wurden jeweils frische, konditionierte Puffer hergestellt und diese anschließend ausgewertet – wurde der PSF-Gehalt in den verschiedenen Bakteriensuspensionen ermittelt. Dazu wurde Ax2, bzw. rasS über Nacht in *Klebsiella*-Suspension inkubiert und am nächsten Morgen eine Hauptkultur mit diesen Zellen angeimpft und inkubiert. Bei den unterschiedlichen Zelldichten (5×10^5 , 1×10^6 und 3×10^6 Zellen/ml) wurde ein Teil der Suspension entnommen und sorgfältig von Bakterien- und *Dictyostelium* Zellen gereinigt. Mit diesen Puffern wurden neue *Klebsiella*-Suspensionen hergestellt, die dann zur Inkubation mit Ax2-DAG genutzt wurden. Der Teststamm wurde bis zu einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml

Ergebnisse

in diesen Suspensionen inkubiert und anschließend von den Bakterien gereinigt. Diese *Dictyostelium* Zellen wurden dann für das β -Galaktosidase weiterverarbeitet.

Konditionierter Puffer Zelldichte ($\times 10^6$ Zellen/ml)	Ax2			rasS			frisch
	0,5	1,0	3,0	0,5	1,0	3,0	
Mittelwert 1. Assay	0,16	0,17	0,30	0,23	0,30	0,61	0,15
relative Pufferaktivität	1,07	1,13	2,00	1,53	2,00	4,07	1
Mittelwert 2. Assay	0,10	0,10	0,14	0,08	0,17	0,21	0,07
relative Pufferaktivität	1,43	1,43	2,00	1,14	2,43	3,00	1
Mittelwert 3. Assay	0,10	0,10	0,14	0,08	0,15	0,31	0,07
relative Pufferaktivität	1,43	1,43	2,00	1,14	2,14	4,43	1
Durchschnittliche relative Pufferaktivität	1,31	1,33	2,00	1,27	2,19	3,83	1,00
<i>Standardabweichung</i>	<i>0,21</i>	<i>0,17</i>	<i>0,00</i>	<i>0,23</i>	<i>0,22</i>	<i>0,74</i>	

Abb. 3-29a: Auswertung von drei PSF-Assays mit der Mutante rasS im Vergleich zum Wildtyp Ax2.

In der Tabelle dargestellt sind drei unabhängige PSF-Assays, die mit der Mutante rasS und dem Wildtyp Ax2 durchgeführt wurden (siehe Abschnitt 3-1-1). Mit jedem konditionierten Puffer wurden jeweils drei Testkulturen inkubiert. Aus der Vermessung dieser drei Assays im ELISA-Reader ergibt sich der Mittelwert des konditionierten Puffers.

Die Aktivität ergibt sich aus der Relation zur Kultur, die mit frischem Puffer inkubiert wurde. Die Aktivität dieses Assays wurde als 1 angenommen. Die Standardabweichung wurde jeweils zwischen den drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Die Abbildung 3-29a+b zeigen die Auswertung dieser drei Experiment. Die relative Pufferaktivität von Ax2 reicht von 1,07 (1×10^5 Zellen/ml) bis 2 (3×10^6 Zellen/ml). Auffällig bei den drei Testreihen war die nur geringe Aktivitätssteigerung bei der Erhöhung der Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml nach 1×10^6 Zellen/ml für den Wildtyp Ax2. Erst bei einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml war eine deutliche Aktivitätssteigerung messbar. Abbildung 3-29b gibt die Ergebnisse grafisch wieder. Die Steigerung der Pufferaktivität für die Mutante rasS fiel hingegen deutlich stärker aus. Hier reichte die Spanne von 1,14 (5×10^5 Zellen/ml) bis zum 4,4fachen des frischen Puffers (hier bei 3×10^6 Zellen/ml). Im Gegensatz zum Wildtyp Ax2 hatte sich die durchschnittliche Pufferaktivität von der niedrigen bis hin zur hohen Zelldichte mehr als verdreifacht. Neben der deutlichen Steigerung der Pufferaktivität war auch

quantitativ mehr PSF in der Bakteriensuspension nachweisbar, die durch die rasS Mutante konditioniert wurde. Die relative Aktivität der Ax2-Suspension betrug bei höchster Zelldichte 2,0, während für die rasS-Suspension eine relative Aktivität von 3,83 ermittelt wurde. Die statistische Bewertung dieser Daten zeigte, dass der Unterschied zwischen den beiden *Dictyostelium* Zelllinien signifikant ist.

Die Mutation von rasS in *Dictyostelium discoideum* bewirkt eine stärkere Konditionierung des umgebenden Mediums während des vegetativen Wachstums in *Klebsiella aerogenes*. Dies kann dann als logische Folge zu einer erhöhten Discoidin-Expression führen, die im ersten Experiment nachgewiesen wurde.

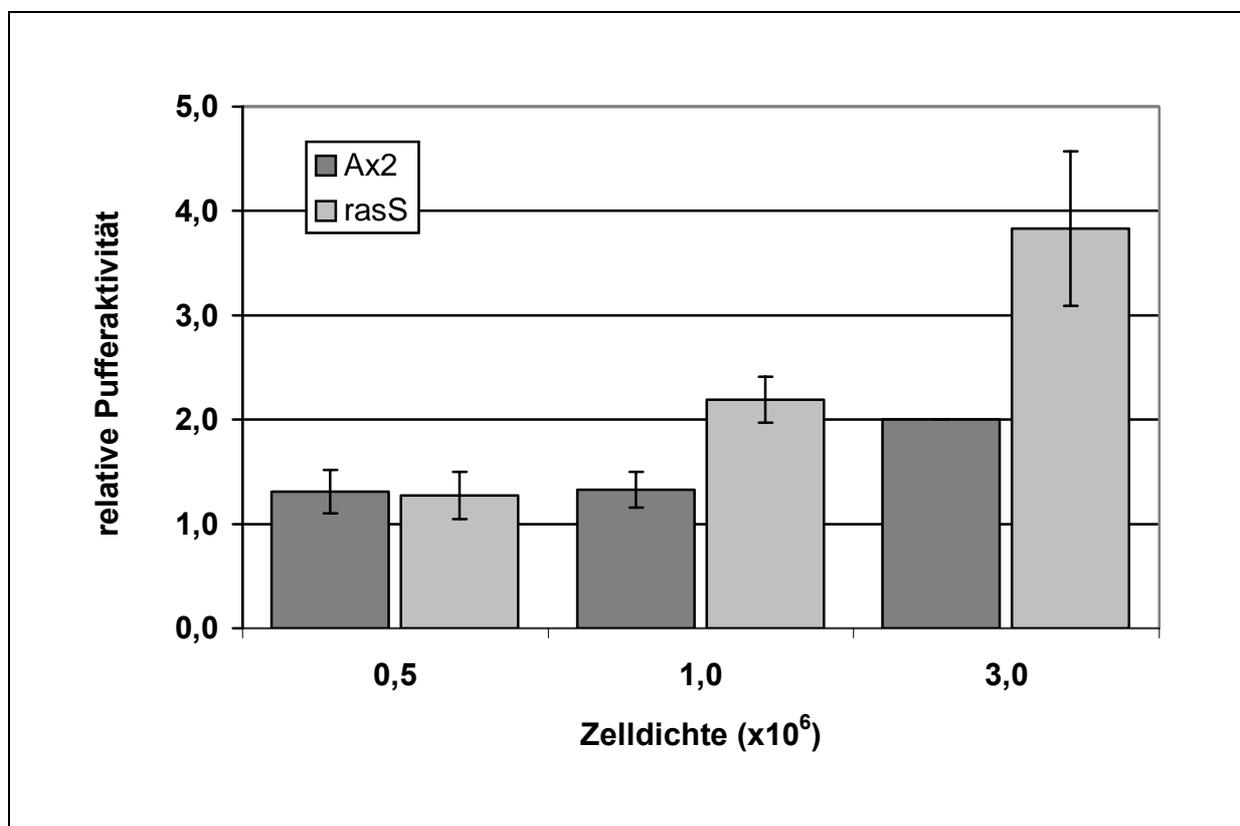


Abb. 3-29b: Vergleich der relativen Pufferaktivität von rasS im Vergleich zu Ax2.

In der Abbildung sind grafisch die tabellarischen Daten aus Abbildung 3-29a wiedergegeben. Im Experiment konnte gezeigt werden, dass die Mutante rasS das umgebende Nährmedium signifikant stärker konditioniert als der entsprechende Wildtyp Ax2.

3.6 Die Mutante *aimless*

3.6.1 Einleitung

Das *aimless*-Gen (*aleA*) aus *Dictyostelium discoideum* wurde erstmals 1996 beschrieben und erhielt seinen Namen durch die Beobachtung, dass *aimless*-Mutanten zwar eine normale Zellbewegung aufwiesen, aber über keinerlei zielgerichtete Taxis auf eine cAMP-Quelle hin verfügten (Insall *et al.*, 1996). Die *aimless*-Mutante wurde mit Hilfe eines REMI-Screens isoliert, und wies als auffälligen Phänotyp den Verlust jeglicher Entwicklungsstadien auf. Nach Isolierung des betroffenen Gens konnte über Homologievergleiche gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz über hohe Ähnlichkeit zu *Sos* aus *Drosophila* (Bonfini *et al.*, 1992) und humanen *hSos1* (Chardin *et al.*, 1993) verfügte, die zu der Familie der RasGEF-Proteine gehören. Die Zuordnung von *aimless* zu dieser Proteinfamilie wurde durch das Vorhandensein einer konservierten katalytischen Domäne gestützt, die für diesen Typ von Proteinen typisch ist (Boguski *et al.*, 1993). Allerdings besitzt *aimless* im Gegensatz zu vielen anderen RasGEF-Proteinen neben diesem konservierten Bereich keine weiteren Strukturmerkmale wie zum Beispiel PH- oder SH3-Domänen (Wilkins & Insall, 2001).

Die *Aimless* mRNA ist bereits während des vegetativen Wachstums nachweisbar und die Expression wird mit dem Beginn der Entwicklungsprozesse um mehr als 80% gesteigert (Insall *et al.*, 1996). *AleA* ist in der Zelle für die Aktivierung der AdenylatzyklaseA als Reaktion auf einen extrazellulären cAMP-Puls verantwortlich. *Aimless*-Mutanten zeigen zwar eine normale Guanylatzyklaseaktivität, jedoch ist die G-Protein vermittelte ACA-Aktivierung nicht nachweisbar. Dadurch wird die Sekretion von cAMP durch die Zelle unterbunden, und die Bildung eines cAMP-Gradienten in einer *aimless*-Kolonie bleibt aus. Die Zellen sind sozusagen „stumm“. Alle Gene, die für die Signalweiterleitung als Reaktion auf extrazelluläres cAMP notwendig sind, konnten über Northern-blot Analysen in normalen Mengen nachgewiesen werden (Insall *et al.*, 1996). Dies machte deutlich, dass das *aimless*-Gen wahrscheinlich nicht an der cAMP-abhängigen Expressionsinduktion der entwicklungsregulierten Gene beteiligt ist.

3.6.2 Die Discoidin-Expression von *aimless*

Um ersten Daten der Discoidin-Expression in *aimless*-Mutanten zu gewinnen, wurde ein Colonyblot gemeinsam mit dem Wild-Typ DH1 angefertigt. Dazu wurden wie unter Material und Methoden beschrieben beide Klone aus axenischem Medium (DH1 aus F₀+URA-Medium und *aimless* aus F₀-Medium) auf eine *Klebsiella*-Platte getropft und bei 23°C inkubiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit in KA-Suspension, bzw. auf KA-Platten festgestellt werden, dies deckt sich mit den Daten von Insall et al., 1996 (Daten hier nicht gezeigt).

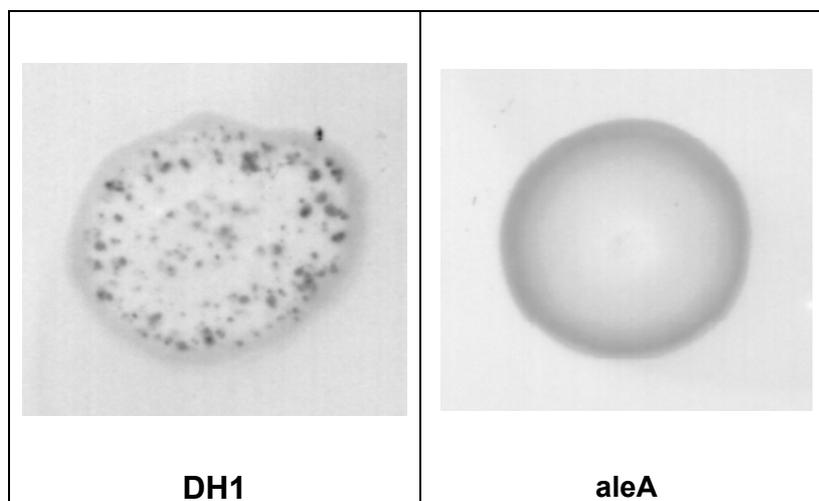


Abb. 3-30: Colonyblot der *aimless*-Mutante (*aleA*) im Vergleich zum Wildtyp DH1.

Die Klone wurden auf einen *Klebsiella*-Rasen vereinzelt und anschließend 5-7 Tage inkubiert. Die Färbung stellt das Discoidin-Protein dar.

Discoidin-Protein wurde wie in Material&Methoden beschrieben mittels Colonyblot sichtbar gemacht. Im Vergleich zum Wildtyp scheint die Färbung für die *aimless*-Mutante leicht stärker zu sein, was auf eine schwache Discoidin-Überexpression hinweist. Die Ponceau-Färbung zeigte keinen auffälligen Unterschied bei der Betrachtung des Fraßrandes, bzw. bei der Breite der vegetativen Wachstumszone (Daten hier nicht gezeigt).

Um genauere Angaben zur Discoidin-Expression in einer *AleA*-Mutante machen zu können wurde daher eine Wachstumsreihe in einer Standard-*Klebsiella*-Suspension durchgeführt, um die Expression von Discoidin bei verschiedenen Wachstumsdichten (5×10^5 , 1×10^6 und 3×10^6 Zellen/ml), bzw. bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (axenisch und Entwicklung in Phosphatpuffer) durch Western-blot Analysen zu überprüfen. Die beiden *Dictyostelium* Stämme wurden in *Klebsiella*-Suspension inkubiert und zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet. Identische Zellzahlen wurden auf einer SDS-PAGE getrennt und der anschließend

durchgeführte Western-blot mit α Discoidin-Antikörper inkubiert. Der Blot wurde mit dem ECL^R-System entwickelt.

Trotz einer etwas stärkeren Färbung im Colonyblot konnte bei diesem Experiment keine erhöhte Discoidin-Expression ermittelt werden. Die Expressionsstärken zu den einzelnen Zeitpunkten zeigten keine Unterschiede.

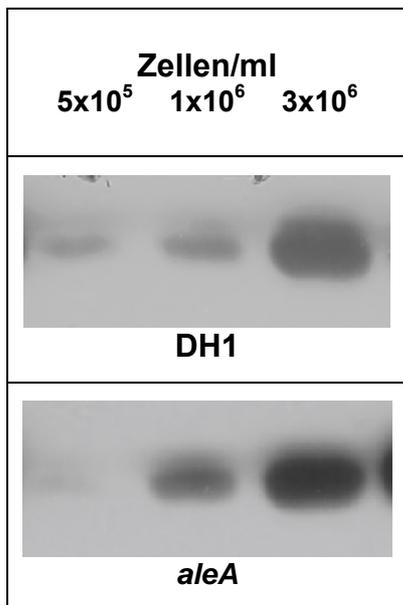


Abb. 3-31: Discoidin-Expression der aimless-Mutante (aleA) unter vegetativen Wachstumsbedingungen.

Mit den beiden Zelllinien wurde eine Wachstumsreihe unter vegetativen Bedingungen durchgeführt. Zu den angegebenen Zelldichten wurden die Zellen der *Klebsiella*-Suspension entnommen. Das Signal stellt das zu diesem Zeitpunkt exprimierte Discoidin-Protein dar.

Trotz dieses Ergebnisses sollte die Aimless-Mutante weiteren Tests unterzogen werden, um eine mögliche Interaktion des cAMP-Informationssystems mit den postulierten Discoidin-Signalwegen auszuschließen. Als weiterer Test wurde daher die Discoidin-Repression durch Folat in der aimless-Mutante untersucht. Dazu wurden axenisch wachsende DH1- und aimless-Zellen für zwei Nächte bei einer Zelldichte zwischen 5×10^5 1×10^6 Zellen/ml kultiviert. Die DH1-Suspension wurde dafür in F₀+URA-Medium inkubiert, für die AleA-Mutante wurde der Selektionsdruck mit F₀-Medium aufrechterhalten. Die Zellen wurden auf zwei Kolben verteilt und jeweils ein Kolben mit 1mM Folat versetzt

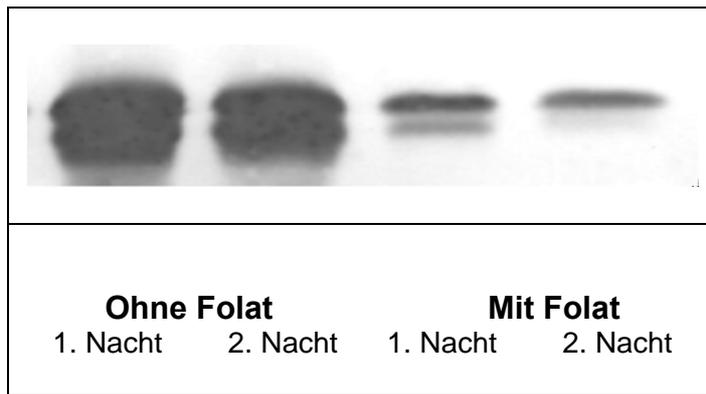


Abb. 3-33: Test auf Folat-Regulation in axenischen Medium.

Aimless Zellen wurden für zwei Nächte in axenischem Medium bei einer Zelldichte von weniger als 1×10^6 Zellen/ml inkubiert. Eine Kultur wurde zusätzlich mit 1mM gelöstem Folat versetzt. Zur Auswertung wurden je 5×10^5 Zellen in Leammie-Puffer gelöst und auf einer 12%igen SDS PAGE aufgetrennt. Der anschließende Western Blot wurde mit α Discoidin Antikörper inkubiert und die Färbung mittels NCP-Färbung sichtbar gemacht.

einen Vergleich der DH1- und AleA-Proben wurde bei diesem Experiment verzichtet, da die ohnehin starke Discoidin-Expression in axenischem Medium einen genauen quantitativen Vergleich unmöglich machte.

Im folgenden Experiment wurde dann die Sekretion von PSF (konditionierende Faktoren) durch aimless-Zellen überprüft. Dazu wurden mit aimless und DH1 mehrere unabhängige PSF-Assays durchgeführt (siehe Abschnitt 3-1-1). Die Auswertung der Ergebnisse ist in Abbildung 3-32 dargestellt. Die *Dictyostelium* Zellen wurden in Standard-*Klebsiella* Suspension inkubiert und die Puffer zu den betreffenden Zeitpunkten geerntet. Die enthaltene Aktivität wurde mehrfach bestimmt und die DAG-Assays mit einem ELISA-Reader ausgewertet. Die Aktivität des parallel durchgeführten Assays mit frischer KA-Suspension (frischer Puffer) wurde mit 1 (1fach) bewertet und die Assays mit konditioniertem Puffer in Relation zu diesem Puffer gesetzt.

Wie erwartet zeigte der Wildtyp DH1 die bekannte Folat-Repression (Daten hier nicht gezeigt). Ein nahezu identisches Bild ergab sich für die *aimless*-Mutante, die bereits nach 24 Stunden eine deutliche Reduktion des Discoidin-Proteins aufwies (vergleiche Spur 1 und Spur 3, Abbildung 3-33). Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde das detektierte Signal nochmals schwächer, allerdings stellte dies keinen deutlichen Unterschied zur 24h-Probe dar (vergleiche Spur 3 und Spur 4, Abbildung 3-33). Auf

Konditionierter Puffer Zelldichte ($\times 10^6$ Zellen/ml)	DH1			AleA			Frisch 0,5
	0,5	1,0	3,0	0,5	1,0	3,0	
Mittelwert 1. Assay	0,13	0,12	0,15	0,06	0,17	0,26	0,06
relative Pufferaktivität	2,17	2,00	2,50	1,00	2,83	4,33	1
Mittelwert 2. Assay	0,07	0,05	0,18	0,08	0,08	0,08	0,06
relative Pufferaktivität	1,17	0,83	3,00	1,33	1,33	1,33	1
Mittelwert 3. Assay	0,03	0,05	0,06	0,04	0,03	0,06	0,02
relative Pufferaktivität	1,50	2,50	3,00	2,00	1,50	3,00	1
Mittelwert 4. Assay	0,07		0,10	0,07		0,14	0,06
relative Pufferaktivität	1,17		1,67	1,17		2,33	1
Durchschnittliche relative Pufferaktivität	1,50	1,78	2,54	1,38	1,89	2,75	1,00
<i>Standardabweichung</i>	<i>0,47</i>	<i>0,86</i>	<i>0,63</i>	<i>0,44</i>	<i>0,82</i>	<i>1,26</i>	

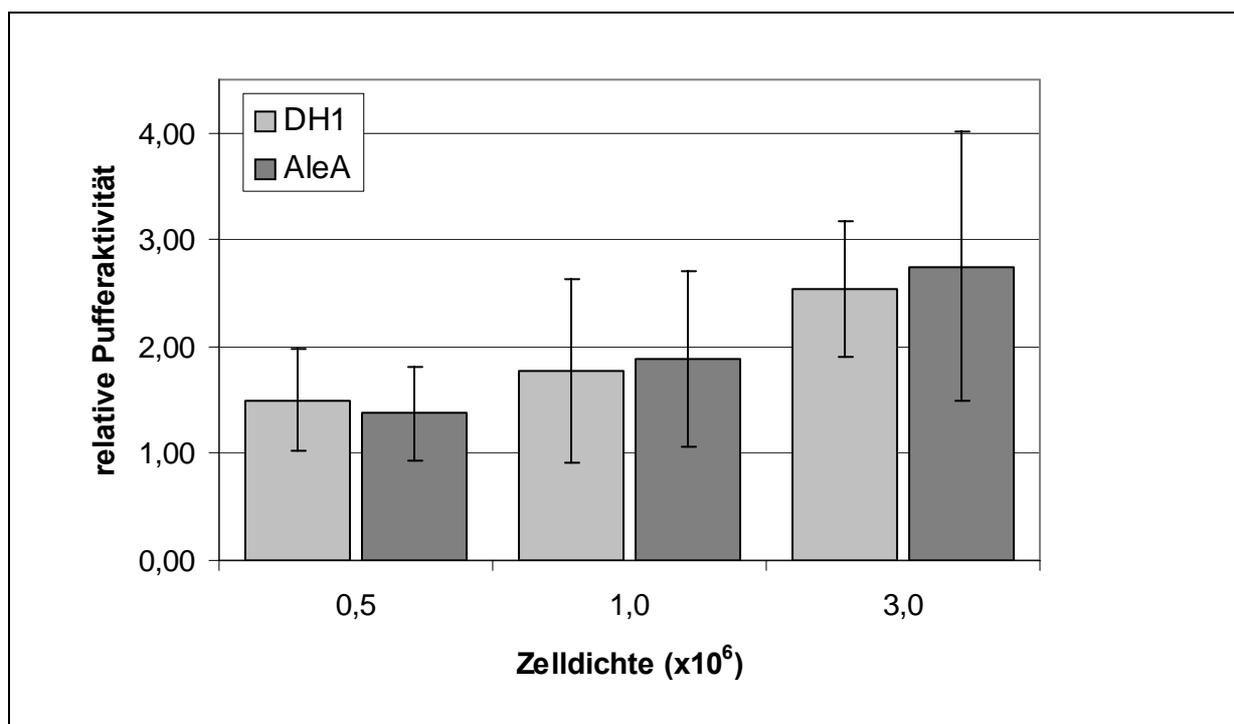


Abb. 3-32: Vergleich der PSF-Sekretion von DH1 und AleA.

Mit jeweils vier unabhängig durchgeführten PSF-Assays wurde die PSF-Aktivität in Puffern, die durch DH1, bzw. AleA konditioniert wurden, gemessen. Die Zelldichte bezeichnet den Zeitpunkt, zu dem der jeweilige konditionierte Puffer geerntet wurde. Die relative Pufferaktivität ergibt sich aus dem Aktivitätszuwachs im Vergleich zu nicht konditioniertem Puffer.

Für die *aimless*-Mutante konnte nach Auswertung von drei unabhängigen DAG-Assays keine signifikant erhöhte oder erniedrigte PSF-Aktivität im Puffer nachgewiesen werden.

Die Zunahme der Aktivität in den verschieden stark konditionierten Puffern steigt kontinuierlich mit dem Zellwachstum an. Der Wildtyp-Puffer (DH1) weist bei niedriger Zelldichte (5×10^5 Zellen/ml) eine Aktivität von durchschnittlich 1,5 auf und verfügt abschließend bei hoher Zelldichte über eine PSF-Aktivität von 2,54. Dies entspricht einer Steigerung von rund 169%. Für die *aimless*-Mutante wurde eine Steigerung von ca. 199% bestimmt, wobei die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bei niedriger Zelldichte mit 1,38 etwas niedriger lag. Die Aktivität bei hoher Zelldichte entsprach einem relativen Wert von 2,75, was über dem Wildtyp-Wert lag. Die Zusammenfassung der Standardabweichungen erbrachte jedoch keine Signifikanz für den höheren Wert.

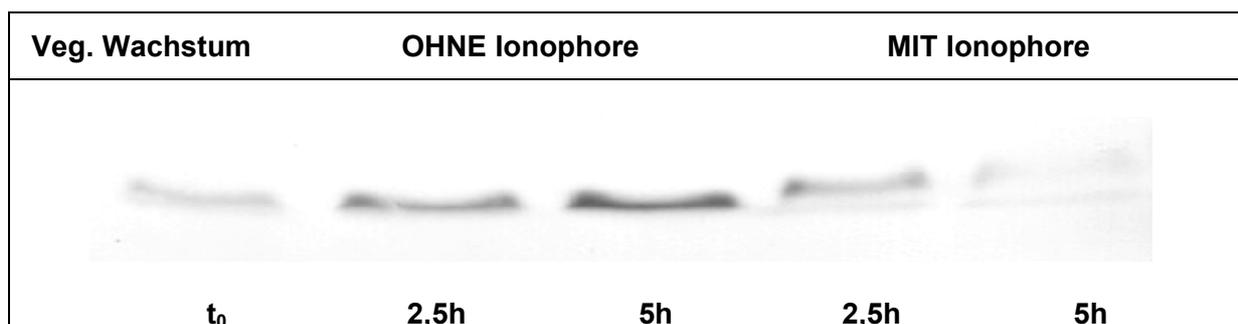


Abb. 3-34: Einfluss von Calcium-Influx auf die Discoidin Expression unter Entwicklungsbedingungen.

Vegetativ wachsende *Dictyostelium* Zellen (*aimless*) wurden bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml geerntet und von den Bakterien getrennt. Die gewaschenen Zellen wurden bei einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in Phosphatpuffer+1mM CaCl₂ unter Schütteln inkubiert (Entwicklungsbedingungen). Zellproben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und auf einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Der anschließend durchgeführte Western-blot wurde mit α Discoidin-Antikörper inkubiert. Der Einfluss von Calcium-Influx in die Zelle wurde durch Zugabe einer Calcium-Ionophore (Calcineurin; Sigma) untersucht.

In einem abschließenden Experiment wurde die *aimless*-Mutante einem Calcium-Assay unterzogen. Wie schon für das Folat-Assay wurde auf einen quantitativen Vergleich DH1/AleA verzichtet, da die Discoidin-Expression unter Entwicklungsbedingungen zu hoch war. *Aimless* Zellen wurden bis zu einer Dichte

von 1×10^6 Zellen/ml in einer Standard-*Klebsiella* Suspension inkubiert und anschließend von den Bakterien freigewaschen. Die so geernteten Zellen wurden bei einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in Phosphatpuffer+1mM CaCl_2 entwickelt (Inkubation für 4h), wobei ein Kolben Calcium-Ionophore enthielt. Proben wurden zum Zeitpunkt t_0 (Ernte aus *Klebsiella*-Suspension) und nach 2,5 und 5 Stunden Inkubation unter Entwicklungsbedingungen entnommen. Anschließend wurden identische Zellmengen (5×10^5 Zellen) auf einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und ein α -Discoidin-Western-blot durchgeführt. Die Zusammenfassung dieses Experimentes ist in Abbildung 3-34 dargestellt.

Aimless zeigte unter Entwicklungsbedingungen eine Induktion der Discoidin-Expression. Nach 2,5 Stunden konnte eine Steigerung detektiert werden, die nach 5 Stunden Inkubation weiter zugenommen hatte. Im Gegensatz dazu wurde unter Einfluss der Calcium-Ionophore keine Aktivitätssteigerung des Discoidin-Promotors gemessen. Zwar erfolgte eine leichte Zunahme des Proteins, jedoch war nach 5 Stunden Inkubation ein deutlicher Rückgang des Discoidin-Proteins zu erkennen.

3.7 Verschiedene *Dictyostelium* Mutanten

Mit der Etablierung der REMI-Mutagenese (Kuspa&Loomis, 1992) konnte eine große Bandbreite an *Dictyostelium discoideum* Mutanten charakterisiert werden. Um weitere Komponenten zu bestimmen, die in die Discoidin-Regulation involviert sind, wurden einige dieser REMI Mutanten einem Standard-Screening unterzogen. Dazu wurden die einzelnen *D. discoideum* Mutanten auf *Klebsiella*-Rasen rekloniert und jeweils ein Einzelklon in axenisches Medium überführt. Nach 4-10 Tagen Inkubation unter Selektionsdruck wurden die gewaschenen *Dictyostelium* Zellen in *Klebsiella*-Suspension überführt und für 10-18 Stunden an diese Nahrungsquelle gewöhnt.

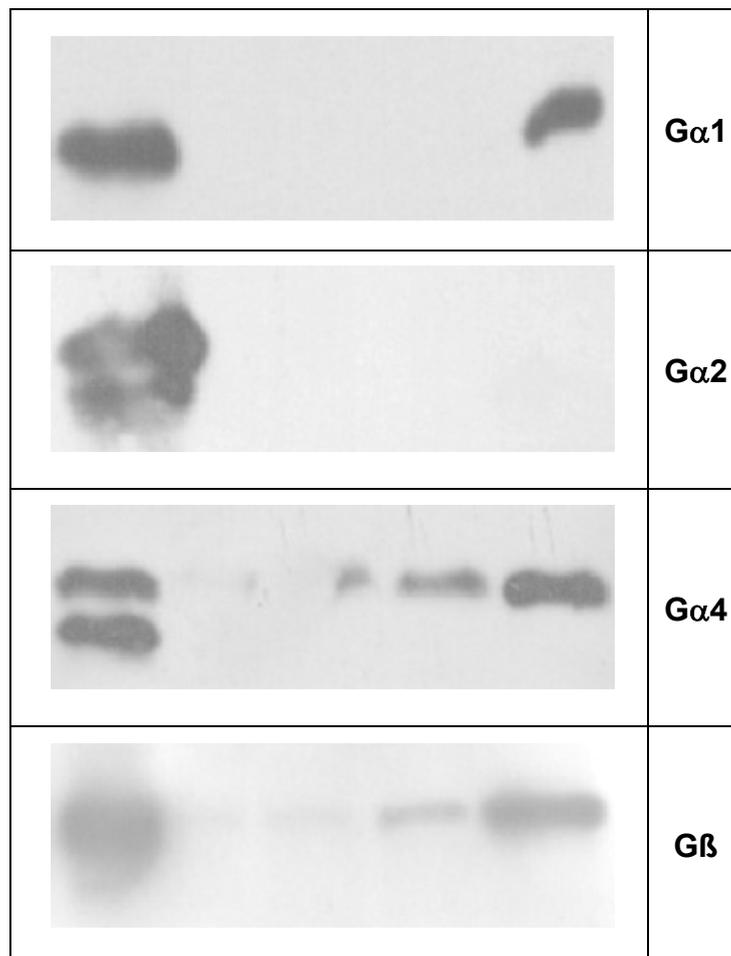


Abb. 3-35: G-Protein Mutanten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.

Die Zelllinien wurden wie im Text beschrieben inkubiert und der durchgeführte Western-blot mit α Discoidin-Antikörper inkubiert.

Mit dieser Vorkultur wurden am Folgetag Hauptkulturen in *Klebsiella*-Suspension beimpft. Die Zelldichte dieser Hauptkulturen wurde verfolgt und *Dictyostelium* Zellen bei einer Dichte von 5×10^5 , 1×10^6 und 3×10^6 Zellen/ml geerntet. Zusätzlich wurden Zellen unter Entwicklungs- und axenischen Bedingungen inkubiert. Die gewaschenen *Dictyostelium* Zellen wurden in Laemmli-Puffer lysiert und jeweils 1×10^6 Zellen auf einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der anschließend durchgeführte Western-blot wurde mit α Discoidin-Antikörper inkubiert und das Discoidin-Protein mit dem ECL-System sichtbar gemacht.

In Abbildung 3-35 ist die Discoidin-Expression einiger im Labor verfügbarer Mutanten, die Deletionen oder Mutationen in bekannten G-Proteinen aufweisen (vergl. Einführung in Signaltransduktion/G-Proteine) dargestellt. Die Experimente wurden ausschließlich zur qualitativen Darstellung der Discoidin-Expression in diesen Mutanten durchgeführt, da z.T. die entsprechenden Wildtypen nicht zur Verfügung standen und somit ein quantitativer Vergleich nicht möglich war. Vielmehr sollte gezeigt werden, ob unter bestimmten Wachstumsbedingungen (axenisch oder vegetativ), bzw. bei unterschiedlichen Zelldichten eine Auffälligkeit bestand.

In drei unabhängigen Experimenten wurde die Discoidin-Expression der $G\alpha 1$ -Mutante (Kumagai *et al.*, 1989) zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Wie in Spur 1 (axenisches Wachstum) und Spur 5 (Entwicklungsbedingungen) dargestellt ist, zeigte die $G\alpha 1$ -Mutante den Bedingungen entsprechend Discoidin-Protein. Kein Discoidin konnte unter vegetativen Bedingungen nachgewiesen werden (vergl. Spur 2-4). Die $G\alpha 1$ -Mutante scheint also keine Discoidin-Expression aufzuweisen, bzw. war ggf. die Sensitivität des Assays nicht hoch genug. Diese Beobachtungen wurden bereits in ähnlicher Form von Endl beschrieben (Endl, 1994).

Für die einzige bekannte β -Untereinheit aus *D. discoideum* (Lilly *et al.*, 1993) wurden die bereits vorliegenden Ergebnisse z.T. bestätigt (Endl, 1994). Das Expressionsmuster der $G\beta$ -Mutante erschien im Western-blot normal, was belegte, dass die qualitative Discoidin-Expression $G\beta$ -unabhängig ist. Sowohl die dichteabhängige Regulation während vegetativem Wachstums (Spuren 2-4), als auch die axenische Discoidin-Expression (Spur 1) war vorhanden. Überführte man vegetativ wachsende $G\beta$ -Zellen in hoher Dichte in Phosphatpuffer, zeigte die

Mutante im Vergleich zum vegetativen Wachstum eine deutliche Induktion der Discoidin-Expression (Spur 5).

Für die $G\alpha 2$ -Mutante (Kumagai *et al.*, 1991; Parent *et al.*, 1996) konnten die bereits beschriebenen RNA-Daten auch auf Protein-Ebene bestätigt werden (Endl, 1994; Blush *et al.*, 1994). Sowohl bei vegetativem Wachstum in *Klebsiella*-Suspension (Spuren 2-4), als auch unter Entwicklungsbedingungen (Spur 5) zeigte die $G\alpha 2$ -Mutante kein Discoidin-Protein. Die schwache PSF-abhängige Discoidin-Expression von $G\alpha 2$ -Zellen (Blush *et al.*, 1994), konnte auf Proteinebene im Western-blot nicht nachgewiesen werden. Dass die $G\alpha 2$ Mutante keinen vollständigen Verlust der Discoidin-Expression aufwies, wurde aus der Induktion unter axenischen Bedingungen (Spur 1) ersichtlich. Unter diesen Bedingungen kam es bereits bei sehr geringen Zelldichten (1×10^4 Zellen/ml) zu einer deutlichen Discoidin-Expression (hier nur Expression bei 1×10^6 Zellen/ml gezeigt).

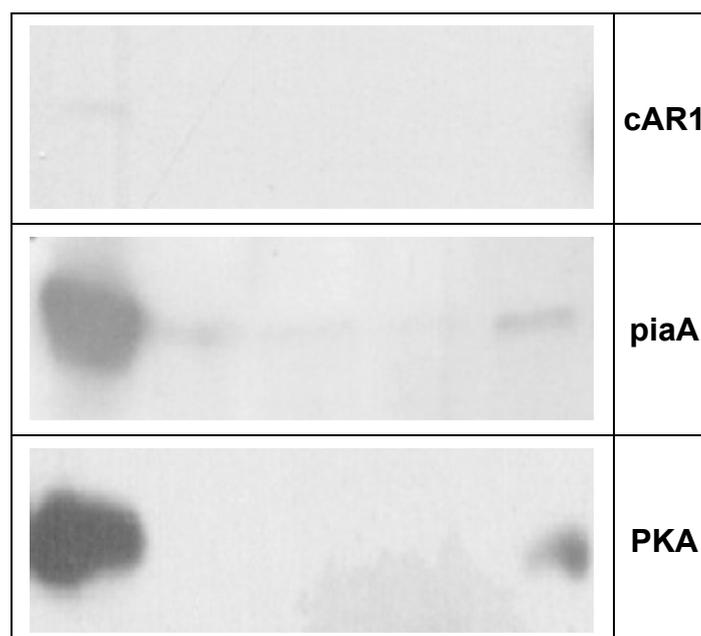


Abb. 3-36: Dictyostelium Mutanten mit schwacher oder fehlender Discoidin-Expression.

Die Zelllinien wurden wie im Text beschrieben inkubiert und der durchgeführte Western-blot mit α Discoidin-Antikörper inkubiert.

Als letzte GTPase wurde die G α 4-Mutante (Hadwiger *et al.*, 1992; Hadwiger *et al.*, 1991) untersucht. Diese *D. discoideum* Zellen zeigten ein normales quantitatives Discoidin-Expressionsmuster. Sowohl bei vegetativen Bedingungen (Spuren 2-4), als auch in axenischem Medium konnte Discoidin-Protein nachgewiesen werden (Spur 1). Die Protein-Menge nahm in *Klebsiella*-Suspension kontinuierlich zu und konnte unter Entwicklungsbedingungen nochmals gesteigert werden (Spuren 2-3; vergl. Spur 3 und 5).

Die Ergebnisse der Discoidin-Screens weiterer charakterisierter Mutanten sind in Abbildung 3-36 wiedergegeben. Die Mutanten IH1 (cARI) weist eine Deletion des frühen cAMP-Rezeptors cARI auf (Klein *et al.*, 1988 Saxe *et al.*, 1991). Der Transmembranrezeptor ist für die Induktion der Discoidin-Expression im Rahmen der frühen entwicklungs-abhängigen Expressions-Induktion verantwortlich. Ebenso ist cAR1 für die später folgende Repression durch kontinuierliches, extrazelluläres cAMP erforderlich (Vauti *et al.*, 1990; Rathi, 1991; Blusch *et al.*, 1995; Endl *et al.*, 1996). Auf Proteinebene, zeigte die Mutante nahezu einen kompletten Verlust des Discoidin-Proteins (Spuren 1-5). Das in Spur 1 gezeigte schwache Discoidin-Signal unter axenischen Bedingungen war in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten das einzig nachweisbare Discoidin-Protein. Die Mutante cARI zeigte keine nachweisbare Discoidin-Expression unter vegetativen Bedingungen (Spuren 2-4) und konnte unter Entwicklungsbedingungen kein Discoidin-Protein exprimieren (Spur 5). Eine weitere interessante Beobachtung konnte auch bei der pkA⁻ Mutante gemacht werden, die über eine Deletion der katalytischen Domäne der ProteinkinaseA verfügt (Véron *et al.*, 1988; Simon *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 1992; Firtel, 1996; Dammann *et al.*, 1998). Auch bei dieser Mutante konnte keine Discoidin-Expression während des vegetativen Wachstums nachgewiesen werden, es erfolgte aber eine entwicklungsabhängige Induktion. Auch die Discoidin-Expression bei axenischem Wachstum ist im Vergleich zur cAR1-Mutante stark. Die entwicklungsabhängige Induktion wurde unter diesen Bedingungen bisher nicht beschrieben, das Experiment wurde zweimal mit dem identischen Ergebnis wiederholt, und der Phänotyp der Mutante auf *Klebsiella*-Rasen überprüft.

Unter Standardbedingungen wurde auch die Mutante piaA (Pianissimo) untersucht (Chen, *et al.*, 1997). Dieses 130kDa große Protein ist neben CRAC (Insall *et al.*,

1994; Wang *et al.*, 1999) ein weiterer cytosolischer Regulator der AdenylatzyklaseA(Pitt, *et al.*, 1992). Da bereits gezeigt werden konnte, dass CRAC an der Induktion der Discoidin-Expression beteiligt ist (Endl, 1994; Endl *et al.*, 1996), und sowohl CRAC, als auch *piaA* ähnliche Funktionen ausführen, wäre es denkbar, dass auch *Pianissimo* in die Discoidin-Regulation involviert ist. CRAC-Mutanten zeigten auf RNA-Ebene keine Discoidin-Expression bei vegetativem Wachstum und nur eine schwache Induktion mit dem Einsetzen der Entwicklung.

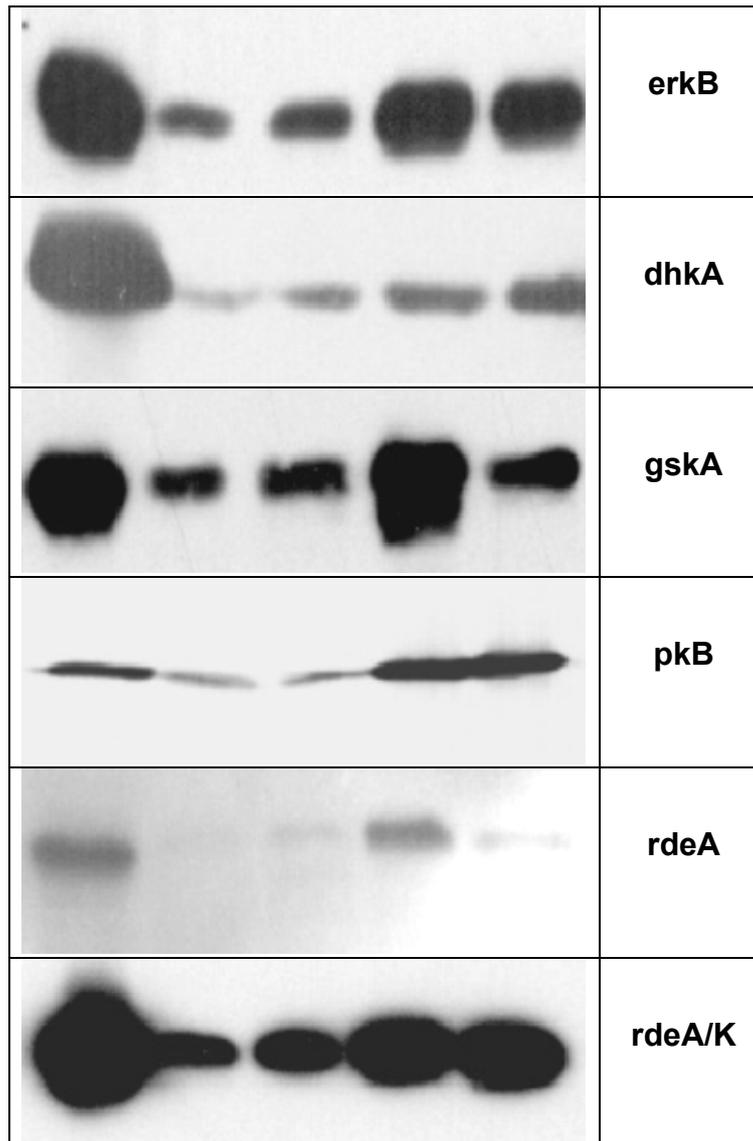


Abb. 3-37: Übersicht verschiedener Dictyostelium Mutanten.

Die gezeigten Zelllinien wurden wie im Text beschrieben inkubiert und der durchgeführte Western-blot mit α Discoidin-Antikörper inkubiert.

Für die *Pianissimo*-Mutante ergab sich ein etwas abweichendes Bild, denn hier sind – im Gegensatz zur CRAC-Mutante geringe Mengen an Discoidin-Protein während des Wachstums in *Klebsiella*-Suspension nachweisbar (Spuren 2-4). Auch eine schwache Induktion unter Entwicklungsbedingungen war vorhanden (Spur 5). Allerdings konnte kein Anstieg der Discoidin-Expression mit steigender Zelldichte nachgewiesen werden. Pianissimo-Mutanten zeigten also eine schwache, unregulierte Discoidin-Expression während des vegetativen Wachstums, allerdings sind Unterschiede bei schwacher Expression nur schwer erkennbar.

Unter Standardbedingungen wurde auch die Mutante *piaA* (Pianissimo) untersucht (Chen, *et al.*, 1997). Dieses 130kDa große Protein ist neben CRAC (Insall *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1999) ein weiterer cytosolischer Regulator der AdenylatzyklaseA (Pitt, *et al.*, 1992). Da bereits gezeigt werden konnte, dass CRAC an der Induktion der Discoidin-Expression beteiligt ist (Endl, 1994; Endl *et al.*, 1996), und sowohl CRAC, als auch *piaA* ähnliche Funktionen ausführen, wäre es denkbar, dass auch Pianissimo in die Discoidin-Regulation involviert ist. CRAC-Mutanten zeigten auf RNA-Ebene keine Discoidin-Expression bei vegetativem Wachstum und nur eine schwache Induktion mit dem Einsetzen der Entwicklung. Für die *Pianissimo*-Mutante ergab sich ein etwas abweichendes Bild, denn hier sind – im Gegensatz zur CRAC-Mutante geringe Mengen an Discoidin-Protein während des Wachstums in *Klebsiella*-Suspension nachweisbar (Spuren 2-4). Auch eine schwache Induktion unter Entwicklungsbedingungen war nachweisbar (Spur 5). Allerdings konnte kein Anstieg der Discoidin-Expression mit steigender Zelldichte nachgewiesen. Pianissimo-Mutanten zeigten also eine schwache, unregulierte Discoidin-Expression während des vegetativen Wachstums, allerdings sind Unterschiede bei schwacher Expression nur schwer erkennbar.

Als Beispiel für verschiedene Mutanten, die keine qualitativen Besonderheiten aufwiesen, sind in Abbildung 3-37 weitere charakterisierte Mutanten gezeigt. Die einzelnen Zelllinien wurden wie zu Beginn des Kapitels beschrieben unter verschiedenen Wachstumsbedingungen inkubiert und die Menge an Discoidin-Protein durch einen Western-blot abgeschätzt.

Gezeigt sind *Dictyostelium* Zellen, die eine Deletion im *erkB*-Locus aufweisen (hier der Stamm 174; Segall *et al.*, 1995). Die Mutante zeigt ein qualitativ normales

Expressionsmuster mit einem Anstieg während des vegetativen Wachstums und einer starken Expression unter axenischen- und Entwicklungsbedingungen. Ein weiteres Beispiel ist das membrangebundene Protein DhkA-Protein (Dictyostelium-Histidin-Kinase A; Wang *et al.*, 1996; Loomis *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999), das hohe Homologien zu anderen Zwei-Komponenten-Histidin-Kinasen aufweist. GskA-Mutanten von *Dictyostelium*, ein Homologes der Glykogen-Synthetase, zeigen Aggregate mit wenigen Sporen und eine hohen Anzahl an Stielzellenzellen (Harwood *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden das dieses Protein aus *Dictyostelium* über cAR3 reguliert wird und in Prozesse involviert ist, die das Verhältnis von Präsporen- und pstB- Zellen regulieren. Auch diese Mutante zeigte im Discoidin-Screen eine unauffällige Discoidin-Regulation (Harwood *et al.*, 1995; Plyte *et al.*, 1999).

Ebenso eine normale Discoidin-Expression zeigte die Mutante pkB (ProteinkinaseB aus *D. discoideum*). Dieses Protein wurde bei der Suche nach (PI)-3,4,5-triphosphat bindenden Enzymen identifiziert und hat eine Masse von 55kDa (Tanaka *et al.*, 1999). In weiterführenden Arbeiten wurde PKB als cytoplasmatisches Protein identifiziert, das aktiviert durch extrazelluläres cAMP zur Plasmamembran transloziert wird (PKB enthält eine PH-Domäne). Dabei leitet PKB vor allem Signale weiter, die zu Veränderungen im Cytoskelett führen und somit die Bewegung der Zelle auf extrazelluläre Signale hin veranlasst (Meili *et al.*, 1999). Das rdeA-Protein aus *Dictyostelium* gehört zur Gruppe der Phospho-Transfer-Proteine, die eigene Phosphatgruppen auf zugehörige Effektorproteine übertragen und diese damit aktivieren (Saxe *et al.*, 1986; Chang *et al.*, 1998). RdeA überträgt in *Dictyostelium* wahrscheinlich eine Phosphatgruppe auf das RegA-Protein (eine Phosphodiesterase) als Reaktion auf extrazelluläres cAMP (Thomason *et al.*, 1999). RdeA/K ist die gleiche Mutante, die mit einem Vektor transformiert wurde, der große Mengen der katalytischen Untereinheit der PKA herstellt (Anjard *et al.*, 1998). Die PKA ist damit ständig aktiv (weil nicht genug regulatorische Untereinheiten bereitgestellt werden) und führt somit auch zu großen Mengen an Discoidin-Protein.

4. DISKUSSION

4.1 *D. discoideum* – ein relevanter Modellorganismus?

D. discoideum weist einen einfachen Lebenszyklus auf und verfügt mit rund 34Mb und geschätzten 12.500 Genen über ein relativ kleines Genom (Eichinger *et al.* 2005). Die geschätzte Anzahl an Genen liegt nur knapp unter der von *D. melanogaster*, was *D. discoideum* - auch auf Grund seiner biochemischen und zellbiologischen Verfügbarkeit - zu einem attraktiven Modellorganismus gemacht hat. Komponenten der Signaltransduktion, die man von *D. discoideum* kennt, sind auch in höhere Organismen übertragbar. So wurden durch das *Dictyostelium*-Genomprojekt Analysen möglich, die zeigen, dass höhere Eukaryonten und *Dictyostelium* eine ganze Reihe von vergleichbaren Proteinen aufweisen. Darunter auch G-Proteine, G-Proteine gekoppelte Rezeptoren und Proteine mit SH2-Domänen (Williams *et al.*, 2005). Einige Modelle, die in *Dictyostelium* entwickelt wurden, konnten in Säugetier-Modellen bestätigt werden – Zusammenfassungen zu diesen Themen sind in aktuellen Publikationen dargestellt (Kimmel&Parent, 2003; Williams&Harwood, 2003 und Iijima *et al.*, 2002).

Dictyostelium discoideum ist ein Eukaryont, der es möglich macht, Mechanismen der Signaltransduktion zu erforschen, die einen relevanten Beitrag zur Analyse von Chemotaxis, Zell-Zell-Interaktion und Genexpression leisten können.

4.1 Growth-differentiation transition - GDT

Dictyostelium Zellen bestimmen permanent das sie umgebende Nahrungsangebot. *Dictyostelium* ernährt sich von Bakterien (hier: *Klebsiella aerogenes*) und kann auch – wenn die sog. axenischen Mutationen vorliegen – im mit Proteinen und Kohlenhydraten angereicherten Flüssigmedium überleben. Sobald aber das Nahrungsangebot zur Neige geht, schaltete der *Dictyostelium*-Lebenszyklus auf „Langzeitüberleben“ um, und versucht mit der Ausbildung von Sporen den drohenden Nahrungsverlust zu überdauern, bis sich die Umgebungsparameter wieder positiv ändern. Dieser Punkt des „Umschaltens“ macht die Discoidin-Gene interessant, denn sie scheinen ein Marker dafür zu sein, dass die Zelle den Weg des Wachstums verlassen hat (vegetatives Wachstum) und sich nun auf den

multizellulären Lebensabschnitt vorbereitet. Generell kann man also den Lebenszyklus von *Dictyostelium* in vier Bereiche unterteilen:

1. Die vegetative Wachstumsphase: hier liegt ein ausreichendes Nahrungsangebot vor und die Zellen vermehren sich ungehindert.
2. „Prestarvation“-Phase: hier hat die Zelldichte der *Dictyostelium* Amöben bereits einen Dichte erreicht, in der zwar noch ausreichend Nahrungsangebot vorliegt, allerdings wird es für die Zellen absehbar, dass nach weiteren Vermehrungszyklen das Nahrungsangebot zur Neige geht. Die Zellen sekretieren während ihres vegetativen Wachstums kontinuierlich PSF und können so ihre eigene Zelldichte im Vergleich zum vorliegenden Nahrungsangebot verrechnen. Als Konsequenz dieser Verrechnung beginnt die Zelle mit der Expression der sog. „prestarvation“- Gene. Zu einem der ersten Gene gehört dabei DiscoidinI (Clarke *et al.*, 1987, Clarke *et al.*, 1988; Burdine&Clarke, 1995).
3. Aggregations-Phase: wachsen die Zellen nun weiter, beginnen die *Dictyostelium* Amöben mit der Sekretion eines weiteren konditionierenden Faktors, dem CMF („conditioned media faktor“, Gomer *et al.*, 1991; Yuen *et al.*, 1995). Dieser Faktor ist essentiell, um die Komponenten der extrazellulären cAMP-Mechanismen zu etablieren und anschließend die Aggregation zu initiieren (Yuen *et al.*, 1995). Im Rahmen der Aggregationsphase wird auch die Discoidin-Expression weiter gesteigert.
4. Kulminationsphase: im Rahmen der Kulmination sind die *Dictyostelium* Zellen endgültig in den multizellulären Lebensabschnitt eingetreten, an dessen Ende ein überdauernder Fruchtkörper stehen wird. Die Discoidin-Produktion wird im späten Abschnitt durch extrazelluläres cAMP und steigende Ca²⁺-Konzentrationen in der Zelle wieder vermindert (Vauti *et al.*, 1990; ; Blusch *et al.*, 1995).

5.

Zwischen der sog. „Presarvation“-Phase und der Aggregations-Phase vollzieht die Zelle den Schritt von Wachstum zur Entwicklung, dieser Schritt hat die Bezeichnung „growth-differentiation-transition“ (GDT).

Die Discoidin-Expression variiert mit den einzelnen Stadien des Lebenszyklus von *D. discoideum* und ist somit ein exzellenter Marker für den Beginn des „GDT“. Derzeit

sind drei homologe Discoidin I-Gene beschrieben, die durch ein einzelnes Discoidin II-Gen ergänzt werden (Tsang *et al.*, 1981). Die Funktion der Discoidin-Proteine ist bisher nicht vollständig geklärt – zunächst wurde angenommen, dass eine lektinartige Struktur auf eine Funktion im Rahmen der Zell-Zell-Adhäsion hinweisen würde (Rosen *et al.*, 1973), allerdings stellte sich heraus, dass es sich bei den Discoidin-Proteinen um cytoplasmatische Komponenten handelt, die an der zytoskeletalen Organisation während der Aggregation beteiligt sind. (Alexander *et al.*, 1992)

Bisher wurden verschiedene Gene beschrieben, die an der Regulation des Wachstums-Differenzierungs-Überganges beteiligt sind. Diese haben - neben der bereits bekannten ProteinkinaseA (PKA), die auch im aktuellen Modell der Discoidin-Regulation eine wichtige Funktion übernimmt – eine aktivierende Funktion im Rahmen des GDT. Zu diesen Genen gehört die Proteinkinase YakA und das *Dictyostelium* TRAP1- Gen. YakA-Mutanten sind nicht in der Lage zu aggregieren, da wichtige „prestarvation“-Gene nicht ausreichend exprimiert werden können (Souza *et al.*, 1998). TRAP1 transloziert bei steigender Zelldichte aus dem Cytosol in die Mitochondrien und scheint ein „Checkpoint“ beim Übergang von Wachstum zur Differenzierung zu sein (Tsuyoshi *et al.*, 2004).

Neben diesen positiven Regulatoren sind auch Komponenten bekannt, die den Übergang in die Entwicklungsphase inhibieren. Eines dieser Proteine ist PufA. PufA gehört zur Familie der Translationsregulatoren und ist ein Translationsinhibitor der PKA-mRNA. PufA wird selbst durch YakA downreguliert (Souza *et al.*, 1999).

4.1.1 Komponenten der GDT & Discoidin-Regulation

Das derzeitige Modell der Discoidin-Regulation beschreibt nicht nur die Regulation der Expression dieses Gens, sondern kann auch mit dem Punkt des GDT gleich gesetzt werden. Discoidin gehört zu den ersten Genen, das bei sich abzeichnendem Nahrungsmangel aktiviert wird. Entsprechend interpretiert befindet sich diese Zelle bereits in Rahmen ihres Lebenszyklus auf dem Weg hin zur Differenzierung, denn wenige Zellteilungen nach der Aktivierung der „prestarvation“-Gene (zu denen auch Discoidin gehört) ist der Punkt zum Entwicklungsabschnitt bereits überschritten. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe Abbildung 1-5) sind mehrere

Komponenten beschrieben, die einen Einfluss auf die Discoidin-Regulation haben und die im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiterführend unter dem Gesichtspunkt des „prestarvation-response“ untersucht wurden.

Gdt1

Gdt1 ist wahrscheinlich ein Transmembranprotein, das inhibitorisch auf den Übergang von Wachstum zu Differenzierung wirkt und somit auch für eine „normale“ Discoidin-Expression mitverantwortlich ist (Zeng *et al.*, 2000; Zeng, 1998). Klar ist, dass der „prestarvation-response“ in *Dictyostelium* von zwei Faktoren hauptsächlich abhängig ist: dies ist die eigene Zelldichte von *Dictyostelium* und die Menge an vorliegendem Nahrungsangebot. Es ist möglich, dass gdt1 ein für die Kalkulation von eigener Zelldichte (gemessen durch PSF) und/oder vorliegender Bakteriendichte wichtiges Protein ist. Die erste Annahme, gdt1 könne direkt an der Messung des PSF in Funktion eines Rezeptors involviert sein, (Zeng, 1998), kann hier nicht bestätigt werden. Auch L8-Zellen, die kein gdt1-Protein bilden können, weisen eine deutliche Antwort auf PSF auf. Dies wird am deutlichsten bei der Regulation der Discoidin-Expression (siehe Abbildung 3-22): Zwar weisen gdt1-Zellen einen sehr hohen Discoidin-Level auf, jedoch ist eine klare Akkumulation von niedriger Zelldichte ($1\text{-}3 \times 10^5$ Zellen/ml) hin zu hoher Dichte (3×10^6 Zellen/ml) festzustellen. Postuliert man gdt1 als einzigen PSF-Rezeptor, so würde man diesen Response nicht detektieren können, da eine Aktivierung der „prestarvation“-Gene nicht stattfinden würde, wahrscheinlich wäre sogar ein Phänotyp denkbar, der nicht aggregieren kann. Hinzu kommt, dass mit Hilfe eines Rezeptor-Tests (siehe Abschnitt 3-1-3) dargestellt werden konnte, dass auch Zellen ohne gdt1-Membranprotein dem konditionierten Puffer PSF entziehen können (siehe Abbildung 3-25). In diesem Experiment weisen L8-Zellen eine höhere Affinität für den konditionierten Puffer auf – die Pufferaktivität nahm nach der Inkubation mit Ax2-Zellen um 23,5% ab, während die identische Anzahl an L8-Zellen dem Puffer sogar 38,2% der enthaltenen Aktivität entnahm. Da sich die Standardabweichungen der Ergebnisse für beide *Dictyostelium* Stämme nicht überschneiden, scheint dieses Ergebnis relevant zu sein. Schwierig fällt allerdings die Interpretation dieses Ergebnisses. Denkbar wäre eine Interaktion des membrangebundenen gdt1 mit dem Rezeptor für PSF, um an diesem Rezeptor eine Desensibilisierung herbeizuführen. Das Vorgang der „rezeptor desensitization“ ist für

den cAMP-Rezeptor cAR1 aus *Dictyostelium* bereits beschrieben worden. In diesem Fall wird der Rezeptor phosphoryliert und weist danach eine geringere Affinität zu cAMP auf (Xiao *et al.*, 1999).. Ein möglicher Gedankengang wäre eine Inhibition des PSF-Rezeptors durch aktives gdt1 während des vegetativen Wachstums bei ausreichendem Nahrungsangebot. Sobald aber genug konditionierende Faktoren im umgebenden Medium vorliegen und die Expression der „prestarvation“-Gene gestartet wird, und damit auch eine aktivierte ProteinkinaseA vorliegt, wird dieser inhibitorische Weg durch die Deaktivierung von gdt1 durch PKA unterbrochen. Die Affinität des PSF-Rezeptors erreicht wieder ein Maximum und es kann ein verstärkter „prestarvation-response“ durch die Zelle entwickelt werden. Diese Hypothese würde auch die starke Discoidin-Expression der gdt1-Mutante bei niedriger Zelldichte erklären, da hier ein nicht desensibilisierter PSF-Rezeptor schon sehr wenig PSF mit hoher Affinität binden könnte und so bereits zu einem frühen Zeitpunkt die Expression der „prestarvation“-Gene ermöglichen kann (Zeng *et al.*, 2000). Gdt1 scheint jedenfalls keine Funktion als Rezeptor im Bezug auf Wahrnehmung von PSF oder Bakteriendichte zu haben. Wie in Abbildung 3-24 dargestellt, sind L8-Zellen durchaus in der Lage, die Bakteriendichte im umgebenden Medium zu erkennen (siehe Abschnitt 3-1-2 und Abbildung 3-24). Die Discoidin-Produktion in 3fach konzentrierter *Klebsiella*-Suspension ist niedriger als in Standard- (1x) oder verdünnter (x0,5) Suspension (siehe Abbildung 3-24). Zwar ist dieses Ergebnis nicht so klar, wie für den Wildtyp Ax2, zeigt aber das die Wahrnehmung des Nahrungsangebotes in L8-Zellen nicht durch die Mutation betroffen ist. Ebenso unberührt ist die Sekretion von PSF durch gdt1-Mutanten (hier L8). Die durchgeführten PSF-Assays zeigten keine erhöhte Aktivität im Kulturmedium des Teststammes (siehe Abbildung 3-23). Gdt1 scheint also zusammenfassend keine direkte Funktion bei der Wahrnehmung von konditionierenden Faktoren wie PSF wahrzunehmen, und auch die Nahrungsmenge (Bakteriendichte) wird durch einen anderen Mechanismus ermittelt. Trotzdem scheint gdt1 eine Art „Schalter“ darzustellen, der in letzter Instanz für den Übergang von Wachstum zu Entwicklung verantwortlich ist, indem er diesen Schritt unter bestimmten Bedingungen verhindert. Vor Kurzem wurden weitere homologe Gene zu gdt1 beschrieben (Chibalina *et al.*, 2005). Hier wurde durch REMI-Mutagenese eine Mutante isoliert, die ähnlich der gdt1-Mutanten bereits aggregiert, bevor der Bakterienrasen auf KA-Platten

verbraucht wurde. Da das klonierte Gen starke Homologien zu *gdt1* aufwies, erhielt diese neue Komponente die Bezeichnung *gdt2*. Wie auch in *gdt1*-Zellen ist die Discoidin-Expression selbst bei ausreichendem Nahrungsangebot und/oder niedriger Zelldichte beachtlich hoch, und auch für *gdt2* kann angenommen werden, dass es sich hierbei um ein Membranprotein handelt. Mit den konservierten Bereichen aus zwei *gdt*-Genen wurde zusätzlich eine Datenbankanalyse durchgeführt. Im Rahmen dieser Analyse konnten mindestens sechs weitere *gdt*-homologe Gene identifiziert werden (Chibalina *et al.*, 2005).

RasS

Neben der Mutante *gdt1* wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente mit der Mutante *Dictyostelium-rasS* durchgeführt. RasS wurde 1994 isoliert und ergänzt die Familie der *ras*-Proteine aus *Dictyostelium discoideum*. RasS ist wahrscheinlich für Mechanismen der Phago- und Endozytose verantwortlich und hat auch Aufgaben im Rahmen der Chemotaxis. RasS-Zellen zeigen ein ungewöhnliches Bewegungsverhalten, da sie sehr schnell (rund 3fach schneller) über das Medium migrieren können (Daniel *et al.*, 1994). Die *rasS* Mutante exprimiert während des Wachstums in Bakterien-Suspension mehr Discoidin-Protein als der Wildtyp Ax2, dies konnte für verschiedene Zelldichten während des vegetativen Wachstums nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-28). PSF-Assays zeigten, dass Zellen die kein *rasS*-Protein vorweisen, deutlich mehr PSF an das umgebende Kulturmedium abgeben, als der Wildtyp (siehe Abbildung 3-29a+b). Abgesehen von den Aktivitätsmessungen der niedrigen Zelldichte (5×10^5 Zellen/ml), die nahezu identisch war, lagen die Werte für den Wildtyp Ax2 zwischen 40-48% unter denen der *rasS*-Mutante. Diese Werte konnten in drei unabhängig durchgeführten PSF-Assays bestätigt werden. RasS ist also eine Komponente die wahrscheinlich in die Mechanismen der PSF-Sekretion involviert ist. Warum gerade dieses *ras*-Protein eine Funktion bei der PSF-Sekretion hat, oder ob die höhere PSF-Konzentration im Medium nur eine Folgerscheinung der Mutation darstellt, lässt sich an dieser Stelle nicht klären. Hier sind weitere Experimente notwendig. In weiterführende Untersuchungen sollte neben *rasS* auch *rasGefB* miteinbezogen werden (Wilkins *et al.*, 2000). GefB gehört zu den sog. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (guanine nucleotide exchange factors (GEFs)) und weist einen ähnlichen Phänotyp wie die

Mutante rasS auf (Wilkins et al., 2000). Eine neuere Arbeit beschreibt die rasS/GefB-Doppelmutante, und stellt heraus, dass GefB höchstwahrscheinlich den Aktivator von rasS darstellt (King&Insall, 2003).

Adenylatzyklase X?

AdenylatzyklaseA (ACA) aus *Dictyostelium* wird bereits als „prestarvation“-Gen exprimiert und ist für die cAMP-Produktion während der frühen Entwicklung zuständig (Pitt et al., 1992; Burdine&Clarke, 1995). Für die rezeptorvermittelte Aktivierung (cAR1) der ACA ist der cytosolische Aktivator der ACA (CRAC) und die G-Protein-Untereinheit $\beta\gamma$ notwendig (Wang et al., 1999). Die Aktivierung der Discoidin-Expression in der späten Wachstumsphase erfolgt über einen bisher unbekanntem Rezeptor, das G-Protein $\alpha 2$ und ebenfalls CRAC. Allerdings konnte gezeigt werden, dass *Dictyostelium* Zellen, die über keine AdenylatzyklaseA verfügen, trotzdem eine normale Discoidin-Aktivierung durchführen können. Aus diesem Grund wird die Existenz einer weiteren – bisher nicht isolierten – Adenylatzyklase postuliert (ACX; Endl, 1994; Endl et al., 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die sog. „aimless“-Mutante (aleA) aus *Dictyostelium* Tests unterzogen, um weitere Hinweise auf die ACX zu finden. Das Aimless-Gen gehört zu den Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (rasGEF) und wird für die G-Protein vermittelte Aktivierung der AdenylatzyklaseA benötigt (Wilkins & Insall, 2001). *Aimless*-Mutanten sind nicht in der Lage wichtige entwicklungspezifische Gene zu Beginn der Entwicklung zu aktivieren, da die intrazelluläre cAMP-Konzentration nicht ausreichend ist (Insall et al., 1996). Sollte die Aktivierung der Discoidin-Expression unabhängig von der AdenylatzyklaseA sein, so müssten Aimless-Zellen eine normale Discoidin-Expression vorweisen können. In Abbildung 3-30 kann man bereits im Colonyblot-Experiment sehen, dass Discoidin normal gebildet wird und kurz hinter dem Wachstumsrand im Blot darstellbar ist. Allerdings bildet Aimless keine Fruchtkörper oder Aggregate. Somit erscheint der Colonyblot im Bezug auf des Discoidin-Expressionsmuster normal, vermisst aber die üblichen Fruchtkörper. Eine genauere Aussage konnte durch die Wachstumskurve in *Klebsiella*-Suspension gemacht werden (siehe Abbildung 3-31). Die Stärke der Discoidin-Expression im Vergleich zum Wildtyp DH1 ist hier zu allen Zelldichten nahezu identisch – Aimless Mutanten verfügen also über eine normale Discoidin-

Aktivierung trotz nicht vorhandener ACA-Aktivität. Dies bestätigt nochmals die Hypothese einer AdenylatzyklaseX, die für die Discoidin-Expression via PKA verantwortlich ist.

4.1.2 Der Stellenwert von PSF – Bewertung des PSF-Assays

Ein Großteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem sog. „prestarvation-response“ von *Dictyostelium discoideum* und dem Zeitpunkt oder der Phase des Übergangs von Wachstum zur Entwicklung (GTD). Interessanterweise konnte der sog. „prestarvation factor“ (PSF) bisher nur postuliert und indirekt beschrieben werden (Clarke *et al.*, 1987, Clarke *et al.*, 1988). Auch wurde bisher noch kein PSF-Rezeptor isoliert, oder gar Signaltransduktions-Komponenten, die für die Weiterleitung des PSF-Signals nötig sind?! Fest steht aber, dass in der *Klebsiella*-Suspension einer vegetativ wachsenden *Dictyostelium* Kultur ein Faktor kumuliert, der in der Lage ist, die Expression spezifischer, für die ersten Schritte in Richtung Entwicklung entscheidender Gene zu aktivieren, lange bevor die Nahrungsquelle *Klebsiella* versiegt. Ein wichtiger Vertreter dieser frühen Gene ist der cAMP-Rezeptor cAR1 (Rathi&Clarke, 1992).

Das System des „prestarvation-response“ beinhaltet zwei entscheidende Faktoren. Der erste Faktor ist die Menge an vorliegendem PSF im Medium, der zweite Faktor ist die Dichte, bzw. Qualität der vorliegenden Nahrungsmenge – in dieser Arbeit wurde dafür *Klebsiella aerogenes* in Phosphatpuffer gewählt. Erstaunlicherweise ist die Dichte von *Dictyostelium* im Kulturmedium nicht entscheidend, denn auch Zellen, die in einer niedrigen Dichte (z.B. 1×10^6 Zellen/ml) in einem bereits konditionierten Puffer wachsen (siehe PSF-Assay) reagieren sehr schnell auf das PSF im Medium, obwohl ihre eigene Dichte noch keinen „prestarvation-response“ nötig machen würde. Somit scheint PSF, das wahrscheinlich ein 70kDa großes Glykoprotein darstellt, der Faktor zu sein, der für die Messung der eigenen Dichte im Medium – sei es nun eine Standard-KA-Suspension oder eine konzentrierte Suspension - verantwortlich ist. Die Konzentration an PSF im Medium setzt die *Dictyostelium* Zelle wahrscheinlich mit ihrer eigenen Dichte gleich. Dem gegenüber steht aber ein weiterer Signalweg, der die Dichte der Bakteriensuspension beurteilt und an die vegetativ wachsende *Dictyostelium* Zelle weiterleitet. Die Antwort auf extrazellulär vorliegendes PSF kann durch eine hohe Bakteriendichte verhindert werden, auch in

hohen Konzentrationen vorliegendes Folat, das von Bakterien abgegeben wird, kann diese Antwort verhindern. Das beste Beispiel für diesen Mechanismus ist der in dieser Arbeit entwickelte „Rezeptortest“ (siehe 3-1-2): *Dictyostelium* Zellen wachsen in drei unterschiedlich konzentrierten *Klebsiella*-Suspensionen. Trotz identisch vorliegender PSF-Konzentrationen im Medium wird aber die Expression des Discoidin-Gens in der hochkonzentrierten KA-Suspension noch nicht aktiviert, während eine niedrig konzentrierte KA-Suspension schon bei niedrigen Zelldichten eine Discoidin-Expression nicht mehr verhindern kann.

Somit scheint das Verhältnis von PSF zur Bakteriendichte der entscheidende, auslösende Faktor für den Start des „prestation response“ zu sein. Allerdings ist das Signal „Bakteriendichte“ anscheinend dominant gegenüber dem kontinuierlich ausgedehnten PSF.

Diese Faktoren machten auch die Arbeit zum Thema PSF-Assay sehr schwierig, da die Qualität der *Klebsiella*-Suspension entscheidend für den Ausgang des Experimentes ist. Verschiedene Zelllinien sind auch nur dann miteinander vergleichbar, wenn die zu testenden *Dictyostelium* Stämme parallel und unter identischen Wachstumsbedingungen (Bakteriendichte!) kultiviert wurden. Dies erklärt auch, warum bei drei unabhängig durchgeführten PSF-Assays mit dem selben *Dictyostelium* Klon unterschiedlich Messwerte im Bezug auf die Aktivität der β -Galaktosidase des Teststammes Ax2-DAG vorliegen können. Erst die relative Aktivität des konditionierten Puffers im Vergleich zur zeitgleich mitgeführten frischen *Klebsiella*-Suspension kann relevante Ergebnisse liefern, die dann in mehreren Testreihen validiert werden müssen.

4.1.3 Beurteilung der REMI-Methode

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war die Etablierung der REMI-Mutagenese, um neue Mutanten zu identifizieren, die in die Regulation der Discoidin Expression involviert sind. Neben der bereits vorliegenden und hier beschriebenen Mutante 11-1 (siehe Abschnitt 3-2) wurde durch selbst durchgeführte Mutagenesen mit *Dictyostelium* Ax2 die REMI-Mutante 10-1 isoliert (siehe Abschnitt 3-3). Die REMI-Mutagenese stellt eine relativ einfache Methode dar, um in *Dictyostelium* Gene zu

zerstören und diese in zwei Arbeitsschritten (Darstellung im Southern-blot und anschließend Plasmid-rescue) zu isolieren.

Leider wurden im Rahmen dieser Arbeit keine neuen Komponenten der Discoidin-Regulation isoliert, sondern die Mutante 11-1 konnte zweifelsfrei als Disruption des *dagA*-Locus (CRAC; Insall *et al.*, 1994) identifiziert werden und die Mutante 10-1 wurde durch die Integration des Plasmid pUCbsr in den *erkB*-Locus (Segall, et al. 1995) erzeugt. Zusätzlich zeigte sich bei der Mutante 10-1 ein instabiler Phänotyp, der an dieser Stelle nicht erklärt werden kann. Durch die molekularbiologische Analyse wurde aber deutlich gemacht, dass beide Zelllinien („mit“/„ohne“) den identischen Gendefekt im *erbB*-Locus haben. Wahrscheinlich besteht in der Mutante 10-1“M“ noch eine sehr geringe Restaktivität des *erkB*-Proteins, da die Integration des pUCbsr-Plasmides im 3'- Bereich des Gens theoretisch noch eine Transkription möglich macht. Obwohl keine *erkB*-RNA nachgewiesen werden konnte, kann mit diesem Experiment eine solche nicht zu 100% ausgeschlossen werden. Möglicherweise bedingen dann Folgemutationen den stabilen Phänotyp der Zelllinie 10-1“O“. Aber dies können an dieser Stelle nur Vermutungen sein.

Diese eher unbefriedigenden Ergebnisse stellen auch gleichzeitig den großen Nachteil der REMI-Mutagenese dar. Mit steigender Zahl an isolierten Genen, die in die Signaltransduktion von *Dictyostelium* involviert sind, wird es schwerer werden, bereits bekannte Mutationen vor der Durchführung von weiteren molekularbiologischen Schritten zu identifizieren. Im äußersten Fall kann dies zu mehreren Wochen Laborarbeit führen, die dann zu isolierte Mutanten führen, die bereits bekannt sind (z.B. 11-1 und 10-1).

Dabei stellt die Beurteilung des Phänotyps eines transformierten *Dictyostelium* Klons nach Mutagenese die größten Probleme dar und erfordert viel Erfahrung mit dem Organismus *Dictyostelium*, was meistens dazu führt, dass man nur grobe Auffälligkeiten, z.B. die aggregations-defiziente *Dictyostelium* Mutante identifiziert. Gerade diese Mutationen sind es aber, die oftmals schon in der Literatur beschrieben sind, da sie Funktionen während der Akkumulation auf das bekannte cAMP-Signal wahrnehmen (z.B. *cAR1* oder *Gα2*), oder aber zu den „prestarvation“ Genen gehören. Auch das Screening der ausplattierten Klone mit dem Discoidin-Colonyblot führt nicht immer zum Erfolg. Auch hier fallen vorwiegend extreme Mutationen auf,

also die Mutante, die gar kein Discoidin exprimiert, oder aber im Gegenteil die Mutante mit einer deutlichen Überexpression. Um aber Mutanten zu identifizieren, die z. B. eine qualitative Discoidin-Fehlfunktion bei verschiedenen Bakteriendichten aufweisen, sollten theoretisch Wachstumsexperimente in *Klebsiella*-Suspension unternommen werden, die anschließend im Western-blot ausgewertet werden müssten.

Das Problem der REMI-Mutagenese im Bezug auf die Discoidin-Regulation ist also die Gefahr von Redundanzen und die Genauigkeit des Detektionssystems für Mutanten (hier: Colonyblot). Um dieses Problem zu umgehen wurden auch REMI-Mutagenesen durchgeführt, die nicht den Wildtyp Ax2 zur Mutagenese nutzen, sondern eine bereits bekannte Mutante nochmals einer Mutagenese unterzogen (Ergebnisse hier nicht gezeigt). In diesem Falle wurde die Mutante 11-1, nachdem ihre Mutation als *dagA* identifiziert worden war, in verschiedenen REMI-Mutagenesen genutzt. Grundgedanke dieses Ansatzes ist der Versuch den Phänotyp der kein Discoidin exprimierenden Zelle durch einen weitere Mutation in eine Discoidin-exprimierende Zelllinie umzuwandeln – mit anderen Worten: eine Suppressor-Mutation zu identifizieren. Leider gelang es nicht, Mutante zu isolieren, die im Hintergrund von 11-1 Discoidin exprimieren können. Dies liegt wahrscheinlich an der Wahl des *Dictyostelium*-Stämmen, da das CRAC-Protein eine ähnlich zentrale Stellung bei der Discoidin-Regulation einnimmt wie die ProteinkinaseA. Um die oben beschriebenen Probleme der REMI-Mutagenese zu umgehen, könnte diese Methode aber möglicherweise Erfolg bringen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Alexander, S., Sydow, L.M., Wessels, D. & Soll, D.R. (1992). Discoidin proteins of *Dictyostelium* are necessary for normal cytoskeletal organization and cellular morphology during aggregation. *Differentiation*, **51**, S. 149-161.

Anjard, C., Zeng, C., Loomis, W.F. & Nellen, W. (1998). Signal transduction pathways leading to spore differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.*, **193**, S. 146-155.

Anjard, C., Chang, W.T., Gross, J. & Nellen, W. (1998). Production and activity of spore differentiation factors (SDFs) in *Dictyostelium*. *Development*, **125**, S. 4067-4075.

Aubry, L., Maeda, M., Insall, R., Devreotes, P.N. & Firtel, R.A. (1997). The *Dictyostelium* mitogen activated protein kinase ERK2 is regulated by ras and cAMP-dependent protein kinase (PKA) and mediates PKA function. *J. Biol. Chem.*, **272**, S. 3883-3886.

Barth, C., Fraser, D.J. & Fisher, P.R. (1998). A rapid, small scale method for characterization of plasmid insertions in the *Dictyostelium* genome. *Nucleic Acids Res.*, **26**, S. 3317-1118.

Baylor, D. (1996). How photons start vision. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, S. 560-565.

Birnbaumer, L. (1992). Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimer as well as alpha subunits. *Cell*, **71**, S. 1069-1072.

Birnboim, H.C. & Doly, J.A. (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant Plasmid-DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, S. 1513-1523.

Blumer, K.J. & Johnson, G.L. (1994). Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, S. 236-240.

Blusch, J., Alexander, S. & Nellen, W. (1995). Multiple signal transduction pathways regulate discoidinI expression in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation*, **58**, S. 253-260.

Boguski, M.S. & McCormick, F. (1993). Proteins regulating *Ras* and its relatives. *Nature*, **366**, S. 643-653.

Bominaar, A.A., Van der Kaay, J. & Van Haastert, P.J.M. (1991). Dynamics and function of the inositolcycle in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genetics*, **12**, S. 19-24.

Bominaar, A.A. & Van Haastert, P.J.M. (1993). Chemotactic antagonists of cAMP inhibit *Dictyostelium* phospholipase C. *J. Cell Science*, **104**, S. 181-185.

- Bominaar, A.A. & Van Haastert, P.J.M.** (1994). Phospholipase C in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.*, **297**, S. 189-193.
- Bonner, J.T. & Slifkin, M.K.** (1949). A study of control of differentiation: The proportions of stalk and spore cells in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Amer. J. Bot.*, **36**, S. 727-734.
- Bonfini, L., Karlovich, C.A., Dasgupta, C. & Bannerjee, U.** (1992). The son of sevenless gene product: A putative activator of *ras*. *Science*, **255**, S. 603-606.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F.** (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **348**, S. 125-132.
- Brandon, M.A. & Podgorski, G.J.** (1997). G alpha 3 regulates the cAMP signaling system in *Dictyostelium*. *Mol Biol. Cell*, **8**, S. 1677-1685.
- Brazill, D.T., Gundersen, R. & Gomer, R.H.** (1996). A cell-density sensing factor regulates the lifetime of a chemoattractant-induced G alpha-GTP conformation. *FEBS Lett.*, **404**, S. 100-104.
- Brazill, D.T., Lindsey, D.F., Bishop, J.D. & Gomer, R.H.** (1998). Cell-density sensing mediated by a G-protein-coupled receptor activating phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, **273**, S. 8161-8168.
- Brock, D.A. & Gomer, R.H.** (1999). A cell counting factor regulating structure size in *Dictyostelium*. *Genes&Development*, **13**, S. 1960-1969.
- Brzostowski, J.A., Johnson, C. & Kimmel, A.R.** (2002). G α -mediated inhibition of developmental signal response. *Curr. Biol.*, **12**, S. 1199-1208.
- Burdine, V. & Clarke, M.** (1995). Genetic and physiologic modulation of the prestarvation response in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell*, **6**, S. 311-325.
- Burgering, B.M.T. & Bos, J.L.** (1995). Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, S. 18-22.
- Bush, J., Franek, K. & Cardelli, J.** (1993). Cloning and characterisation of seven novel *Dictyostelium discoideum* *rac*-related genes belonging to the *rho* family of GTPases. *Gene*, **136**, S. 61-68.
- Bush, J., Franek, K., Daniel, J., Spiegelman, G.B., Weeks, G. & Cardelli, J.** (1993). Cloning and characterization of five novel *Dictyostelium discoideum* *rab*-related genes. *Gene*, **136**, S. 55-60.
- Cano, E. & Mahadevan, L. C.** (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, S. 117-122.

- Cardelli, J.A., Knecht, D.A., Wunderlich, R. & Dimond, R.L.** (1985). Major changes in gene expression occurring during at least four stages of development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.*, **110**, S. 147-156.
- Chang, W.T., Thomason, P.A., Gross, J.D. & Newell, P.C.** (1998). Evidence that the RdeA protein is a component of a multistep phosphorelay modulating rate of development in *Dictyostelium*. *EMBO J.*, **17**, S. 2809-2819.
- Chardin, P., Camonis, J.H., Gale, N.W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wickler, M.H. et al.** (1993). Human Sos1: A guanine nucleotide exchange factor for *Ras* that binds to *GRB2*. *Science*, **260**, S. 1338 – 1343.
- Chen, M.Y., Long, Y. & Devreotes, P.N.** (1997). A novel cytosolic regulator, *pianissimo*, is required for chemoattractant receptor an G-protein-mediated activation of the 12 transmembrane domain adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *Genes&Development*, **11**, S. 3218-3231.
- Chien, A., Edgar, D.B., & Trela, J.M.** (1976). Desoxyribonucleic acid polymerase from extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.*, **127**, S. 1550-1557.
- Chibalina MV, Anjard C, Insall RH.** (2005). Gdt2 regulates the transition of *Dictyostelium* cells from growth to differentiation. *BMC Dev Biol.*;4:8.
- Clarke, M., Kayman, S.C. & Riley, K.** (1987). Density-dependent induction of discoidin-I synthesis in exponentially growing cells of *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation*, **34**, S. 79-87.
- Clarke., M., Yang, J. & Kayman, S.C.** (1988). Analysis of the prestarvation response in growing cells of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Gen.*, **9**, S. 315-326.
- Clarke, M., Dominguez, N. Yuen, I.S. & Gomer, R.H.** (1992). Growing and starving *Dictyostelium* cells produce distinct density-sensing factors. *Dev. Biol.*, **152**, S. 403-406.
- Clarke, M. & Gomer, R.H.** (1995). PSF and CMF, autocrine factors, that regulate gene expression during growth and early development of *Dictyostelium*. *Experientia*, **52**, S. 1124-1134.
- Crews, C.M., Alessandrini, A. & Erikson, R.L.** (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase, that phosphorylates the ERK gene product. *Science*, **258**, S. 478-480.
- Crowley, T.E., Nellen, W., Gomer, R.H. & Firtel, R.A.** (1985). Phenocopy of discoidin I-minus mutants by antisense transformation in *Dictyostelium*. *Cell*, **43**, S. 633-641.
- Chubb, J.R., Wilkins, A., Thomas, G.M. & Insall, R.H.** (2000). The *Dictyostelium* *RasS* protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J. Cell Sci.*, **113**, S. 709-719.

- Chubb, J. R., Wilkins, A., Wessels, D.J., Soll, D.R. & Insall, R.H.** (2002). Pseudopodium dynamics and rapid cell movement in *Dictyostelium* Ras pathway mutants. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **53**(2), S. 150-162.
- Dagert, M. & Ehrlich, S.D.** (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, **6**, S. 23-28.
- Daniel, J., Spiegelmann, G.B. & Weeks, G.** (1993). Characterization of a third *ras* gene, *rasB*, that is expressed throughout the growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Oncogene*, **8**, S. 1041-1057.
- Daniel, J., Bush, J., Cardelli, J, Spiegelmann, G.B. & Weeks, G.** (1994). Isolation of two novel *ras* genes in *Dictyostelium discoideum*; evidence for a complex, developmentally *ras* gene subfamily. *Oncogene*, **9**, S. 501-508.
- Dammann, H., Traincard, F., Anjard, C., van Bemmelen, M.X.P., Reymond, C. & Véron, M.** (1998). Functional analysis of the catalytic subunit of *Dictyostelium* PKA *in vivo*. *Mech. Dev.*, **72**, S. 149-157.
- Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H.W., Troppmair, J. & Rapp, U.R.** (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem. Sci*, **19**, S. 474-480.
- De Gunzburg, J. & Veron, M.** (1982). A cAMP-dependent protein kinase is present in differentiating *Dictyostelium discoideum* cells. *EMBO J.*, **1**, S. 1063-1068.
- Deery, W.J. & Gomer, R.H.** (1999). A putative receptor mediating cell-density sensing in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.*, **274**, S. 34476-34482.
- Devine, J.M., Tsang, A.S. & Williams, J.G.** (1982). Differential expression of the members of discoidin I multigene family during growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Cell*, **4**, S. 793-800.
- Devreotes, P.N.** (1989). *Dictyostelium discoideum* a model system for cell-cell interactions in development. *Science*, **245**, S. 1054-1058.
- Dharmawardhane, S., Cubitt, A.B., Clarke, A.M. & Firtel, R.A.** (1994). Regulatory role of the G alpha 1 subunit in controlling cellular morphogenesis in *Dictyostelium*. *Development*, **120**, S. 3549-3561.
- Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J.** (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Ann. Rev. Biochem.*, **60**, 653-688.
- Downward, J.** (1995). KSR: a novel player in the *ras*-pathway. *Cell*, **83**, S. 831-834.
- Dragoi, I.A. & O'Halloran, T.J.** (1998). Cloning and characterization of a *Dictyostelium* gene encoding a small GTPase of the *rab11* family. *J. Cell. Biochem.*, **70**, S. 29-37.

Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sugang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P, Fey P, Pilcher K, Chen G, Saunders D, Sodergren E, Davis P, Kerhornou A, Nie X, Hall N, Anjard C, Hemphill L, Bason N, Farbrother P, Desany B, Just E, Morio T, Rost R, Churcher C, Cooper J, Haydock S, van Driessche N, Cronin A, Goodhead I, Muzny D, Mourier T, Pain A, Lu M, Harper D, Lindsay R, Hauser H, James K, Quiles M, Madan Babu M, Saito T, Buchrieser C, Wardroper A, Felder M, Thangavelu M, Johnson D, Knights A, Loulseged H, Mungall K, Oliver K, Price C, Quail MA, Urushihara H, Hernandez J, Rabbinowitsch E, Steffen D, Sanders M, Ma J, Kohara Y, Sharp S, Simmonds M, Spiegler S, Tivey A, Sugano S, White B, Walker D, Woodward J, Winckler T, Tanaka Y, Shaulsky G, Schleicher M, Weinstock G, Rosenthal A, Cox EC, Chisholm RL, Gibbs R, Loomis WF, Platzer M, Kay RR, Williams J, Dear PH, Noegel AA, Barrell B, Kuspa A. (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **435(7038)**, S. 43-57.

Endl, I. (1994). Die Expression der Discoidin I-Genfamilie und ihre Kontrolle durch Signaltransduktionswege in *Dictyostelium discoideum*. Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Endl, I., Konzok, A. & Nellen, W. (1996). Antagonistic Effects of signal transduction by intracellular and extracellular cAMP on gene regulation in *Dictyostelium*. *Moll. Biol. Cell*, **7**, S. 1-8.

Faix, J. & Dittrich, W. (1996). DGAP1, a homologue of rasGTPase activating proteins that controls growth, cytokinesis, and development in *Dictyostelium*. *FEBS Lett.*, **394**, S. 251-257.

Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, T.A. & Bourne, H.R. (1994). cAMP and $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G-proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, S. 7851-7854.

Firtel, R.A. (1995). Integration of signal information in controlling cell fate decisions in *Dictyostelium*. *Genes&Development*, **9**, S. 1427-1444.

Firtel, R.A. (1996). Interacting signaling pathways controlling multicellular development in *Dictyostelium*. *Curr. Opin. Genet. Devel.*, **6**, S. 545-554.

Gaskins, C., Maeda, M. & Firtel, R.A. (1994). Identification and functional analysis of a developmentally regulated extracellular signal-regulated kinase in *Dictyostelium discoideum*. *Moll. Cell. Biol.*, **14**, S. 6996-7012.

Gaskins, C., Clark, A.M., Aubry, L., Segall, J.E. & Firtel, R.A. (1996). The *Dictyostelium* MAP kinase ERK2 regulates multiple, independent developmental pathways. *Genes&Development*, **10**, S. 118-128.

- Gerisch, G., Fromm, H., Huesgen, A. & Wick, U.** (1975). Control of cell-contact sites by cyclic AMP pulses in differentiating *Dictyostelium* cells. *Nature*, **255**, S. 547-549.
- Gomer, R.H., Yuen, I.S. & Firtel, R.A.** (1991). A secreted 80×10^3 M_r protein mediates sensing of cell density and the onset of development in *Dictyostelium*. *Development*, **112**, S. 269-278.
- Hadwiger, J.A., Wilkie, T.M., Strathmann, M. & Firtel, R.A.** (1991). Identification of *Dictyostelium* G alpha genes expressed during multicellular development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, S. 8213-8217.
- Hadwiger, J.A. & Firtel, R.A.** (1992). Analysis of G alpha 4, a G-protein subunit required for multicellular development in *Dictyostelium*. *Genes Dev.*, **6**, S. 38-49.
- Hadwiger, J.A., Lee, S. & Firtel, R.A.** (1994). The G alpha subunit G alpha 4 couples pterin receptors and identifies a signaling pathway that is essential for multicellular development in *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, S. 10566-10570.
- Hadwiger, J.A., Natarajan, K. & Firtel, R.A.** (1996). Mutations in the *Dictyostelium* heterotrimeric G protein alpha subunit G alpha 5 alter the kinetics of tip morphogenesis. *Development*, **122**, S. 1215-1224.
- Hadwiger, J.A. & Srinivasan, J.** (1999). Folic acid stimulation of the Galpha4 G-protein-mediated signal transduction pathway inhibits anterior prestalk cell development in *Dictyostelium*. *Differentiation*, **64**, S. 195-204.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, S. 557-580.
- Hanks, S.K. & Quinn, A.M.** (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.*, **200**, S. 38-62.
- Harwood, A.J., Hopper, N.A., Simon, M.N., Bouzid, S., Véron, M. & Williams, J.G.** (1992). Multiple roles for cAMP-dependent protein kinase during *Dictyostelium* development. *Dev. Biol.*, **149**, S. 90-99.
- Harwood, A.J., Plyte, S.E., Woodgett, J., Strutt, H. & Kay, R.R.** (1995). Glycogen synthase kinase 3 regulates cell fate in *Dictyostelium*. *Cell*, **80**, S. 139-148.
- Hepler, J.R. & Gilman, A.G.** (1992). G proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, S. 383-387.
- Hopper, N.A., Harwood, H.J., Bouzid, S., Véron, M. & Williams, J.G.** (1993). Activation of the prespore and spore cell pathway of *Dictyostelium* differentiation by cAMP-dependent protein kinase and evidence for its upstream regulation by ammonia. *EMBO J.*, **12**, S. 2459-2466.

Iijima M., Huang Y.E., Devreotes P. (2002). Temporal and spatial regulation of chemotaxis. *Dev Cell.*, (4), S. 469-478.

Insall, R.H., Soede, R.D., Schaap, P. & Devreotes, P.N. (1994). Two cAMP receptors activate common signaling pathways in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell*, **5**, S. 703-711.

Insall, R.H., Kuspa, A., Lilly, P.J., Shaulsky, G., Levin, L.R., Loomis, W.F. & Devreotes, P.N. (1994). CRAC, a cytosolic protein containing a pleckstrin homology domain, is required for receptor and G-protein-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Cell. Biol.*, **126**, S. 1537-1545.

Insall, R.H., Borleis, J & Devreotes, P.N. (1996). The *aimless* RasGEF is required for processing of chemotactic signals through G-protein-coupled receptors in *Dictyostelium*. *Curr. Biol.*, **6**, S. 719-729.

Jain R., Yuen, I.S., Taphouse, C.R. & Gomer, R.H. (1992). A density-sensing factor controls development in *Dictyostelium*. *Genes. Dev.*, **6**, S. 390-400.

Jain R. & Gomer, R.H. (1994). A developmentally regulated cell surface receptor for a density-sensing factor in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.*, **269**, S. 9128-9136.

Johnson, R.L., Van Haastert, P.J.M., Kimmel, A.R., Saxe, C.L., Jastorff, B. & Devreotes, P.N. (1992). The cyclic nucleotide specificity of three cAMP receptors in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.*, **267**, S. 4600-4607.

Johnson, R.L., Saxe, C.L. III, Gollop, R., Kimmel, A.R. & Devreotes, P.N. (1993). Identification and targeted gene disruption of cAR3, a cAMP receptor subtype expressed during multicellular stages of *Dictyostelium* development. *Genes Dev.*, **7**, S. 273-282.

Joneson, T., Fulton, J.A., Volle, D.J., Chaika, O.V., Bar-Sagi, D. & Lewis, R.E. (1998). Kniase suppressor of ras inhibits the activation of extracellular ligand-regulated (ERK) mitogen-activated protein (MAP) kinase by growth factors, activated ras and ras-effectors. *J. Biol. Chem.*, **273**, S. 7743-7748.

Kalpaxis, D., Zundorf, I., Werner, H., Reindl, N., Boy-Marcotte, E., Jaquet, M. & Dingermann, T. (1991). Positive selection for *Dictyostelium discoideum* mutants lacking UMP synthase activity based on resistance to 5-fluoroorotic acid. *Mol. Gen. Genet.*, **225**, S. 429-500.

Khosla, M., Robbins, S.M., Spiegelmann, G.B. & Weeks, G. (1990). Regulation of *DdrasG* gene expression during *Dictyostelium* development. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, S. 918-922.

Khosla, M., Spiegelmann, G.B. & Weeks, G. (1996). Overexpression of an activated *rasG* gene during growth blocks the initiation of *Dictyostelium* development. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, S. 4156-4162.

- Khosla, M., Spiegelmann, G.B., Insall, R. & Weeks, G.** (2000). Functional overlap in the Dictyostelium RasG, RasD and RasB proteins. *J. Cell Sci.*, in Druck.
- Klein, P.S., Sun, T.J., Saxe, C.L. III, Kimmel, A.R., Johnson, R.L. & Devreotes, P.N.** (1988). A chemop attractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*. *Science*, **241**, S. 1467-1472.
- Kaziro, Y., Itho, H., Kozasa, T., Nakafuko, M. & Satho, T.** (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **60**, 349-400.
- Kim, JY., Borleis, JA. & Devreotes, PN.** (1998). Switching of chemoattractant receptors programs development and morphogenesis in Dictyostelium. *Dev. Biol.*, **197**, 117-128.
- Kimmel A.R. & Parent C.A.** (2003). The signal to move: *D. discoideum* go orienteering. *Science*, **6(5625)**:1525-1527.
- King, J. & Insall, R.H.** (2003). Parasexual genetics of *Dictyostelium* gene disruptions: identification of a ras pathway using diploids. *BMC Genet.*; **(1)**, S. 12.
- Knetsch, M., Epskamp, S.J.P., Schenk, P.W., Wang, Y., Segall, J.E. & Snaar-Jagalska, B.E.** (1996). Dual role of cAMP and involvement of both G-proteins and ras in regulation of ERK2 in *Dictyostelium discoideum*. *EMBO J.*, **15**, S. 3361-3368.
- Kolman, M.F., Futey, L.M. & Egelhoff, T.T.** (1996). *Dictyostelium* myosin heavy chain kinase A regulates myosin localization during growth and development. *J. Cell. Biol.*, **132**, S. 101-109.
- Konijn, T.M., Barkley, D.S., Chassy, B.M. & Bonner, J.T.** (1968). cAMP: a naturally occurring acrasin in the cellular slime molds. *Am. Natl.*, **102**, S. 225-233.
- Kosaka, C & Pears, C.J.** (1997). Chemoattractants induce tyrosine phosphorylation of ERK2 in *Dictyostelium discoideum* by diverse signalling pathways. *Biochem. J.*, **324**, S. 347-352.
- Kumagai, A., Pupilo, M., Gundersen, R., Maiké-Lye, R., Devreotes, P.N. & Firtel, R.A.** (1989). Regulation and Funktion of G-alpha protein subunits in Dictyostelium. *Cell*, **57**, S. 265-275.
- Kumagai, A., Hadwiger, J.A., Pupillo, M. & Firtel, R.A.** (1991). Molekular genetic analysis of two G alpha protein subunits in Dictyostelium. *J. Biol. Chem.*, **266.**, S. 1220-1228.
- Kuspa, A. & Loomis, W.F.** (1992). Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, S. 8803-8807.

- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, S. 680-685.
- Lamarche, N. & Hall, A.** (1994). GAPs for rho-related GTPases. *Trends Gen.*, **12**, S. 436-440.
- Lancaster, C.A., Taylor-Harris,, P.M., Self, A.J., Brill, S., van Erp, H.E. & Hall, A.** (1994). Charakterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPase. *J. Biol. Chem.*, **269**, S. 1137-1142.
- Larochelle, D.A., Vithalani, K.K. & De Lozanne, A.** (1996). A novel member of the *rho* family of small GTP-binding proteins is specifically required for cytokinesis. *J. Cell. Biol.*, **133**, S. 1321-1329.
- Luderus, M.E., Kesbeke, F., Knetsch, M.L., Van Driel, R., Reymond, C.D & Snaar-Jagalska, B.E.** (1992). Ligand-independent reduction of cAMP receptors in *Dictyostelium discoideum* cells over-expressing a mutated *ras* gene. *Eur. J. Biochem.*, **208**, S. 235-240.
- Luo, Q., Michaelis, C. & Weeks, G.** (1995). Cyclin B and Cdc2 expression and Cd2 kinase activity during *Dictyostelium* differentiation. *DNA Cell. Biol.*, **14**, S. 901-908.
- Lilly, P., Wu, L., Welker, D.L. & Devreotes, P.N.** (1993). A G-protein beta-subunit is essential for *Dictyostelium* development. *Genes Dev.*, **7**, S. 986-995.
- Loomis, F.W.** (1975). The development of *Dictyostelium discoideum*. Academic Press, New York.
- Loomis, F.W.** (1996). Genetic networks that regulate development in *Dictyostelium* cell. *Microbiological Reviews*, **Mar.**, S. 135-150.
- Loomis, W.F., Shaulsky, G. & Wang, N.** (1997). Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. *J. Cell Sci.*, **110**, S. 1141-1145.
- Louis, J.M., Ginsburg, G.T. & Kimmel, A.R.** (1994). The cAMP receptor cAR4 regulates axial patterning and cellular differentiation during late development of *Dictyostelium*. *Genes Dev.*, **8**, S. 2086-2096.
- Ludbrook, S.B., Eccleston, J.F. & Strom, M.** (1997). Cloning and characterization of a rhoGAP homolog from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.*, **272**, S. 15682-15686.
- Maeda, M., Aubry, L., Insall, R., Gaskins, C. Devreotes, P.N. & Firtel, R.A.** (1996). Seven helix chemoattractant receptors transiently stimulate mitogen-activated protein kinase in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.*, **271**, S. 3351-3354.
- Maeda, M. & Firtel, R.A.** (1997). Activation of the mitogen-activated protein kinase ERK2 by the chemoattractant folic acid in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.*, **272**, S. 23690-23695.

- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. & Evans, R.M.** (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, S. 835-839.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R. Murphy, J. & Gerisch, G.** (1995). Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag. *Cell*, **83**, S. 915-924.
- Mehdy, M.C. & Firtel, R.A.** (1985). A secreted factor and cyclic AMP jointly regulate cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, S. 705-713.
- Meili, R., Ellsworth, C., Lee, S., Reddy, T.B., Ma, H. & Firtel, R.A.** (1999). Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in *Dictyostelium*. *EMBO J.*, **18**, S. 2092-2105.
- Milne, J.L. & Devreotes, P.N.** (1993). The surface cyclic AMP receptors, cAR1, cAR2 and cAR3, promote Ca^{2+} influx in *Dictyostelium discoideum* by a G alpha 2-independent mechanism. *Mol. Biol. Cell*, **4**, S. 283-292.
- Muller, G.** (2000). Towards 3D structures of G protein-coupled receptors: a multidisciplinary approach. *Curr Med Chem. Sep*;7(9):861-88.
- Nellen, W., Silan, C. & Firtel, R.A.** (1984). DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, S. 2890-2898.
- Newell, P.C., Telser, A. & Sussman, M.** (1969). Alternative developmental pathways determined by environmental conditions in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Bacteriol.*, **100**, S. 763-768
- Nuckolls, G.H., Osherov, N., Loomis, W.F. & Spudich, J.A.** (1996). The *Dictyostelium* dual-specificity kinase splA is essential for spore differentiation. *Development*, **122**, S. 3295-3305.
- Parent, C.A. & Devreotes, P.N.** (1996). Molecular genetics of signal transduction in *Dictyostelium*. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, S. 411-440.
- Peracino, B., Borleis, J., Jin, T., Westphal, M., Schwartz, J.M., Wu, L., Bracco, E., Gerisch, G., Devreotes, P. & 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**, S. 1529-1537.
- Pitt, G.S., Milona, N., Borleis, J., Lin, K.C., Reed, R.R. & Devreotes, P.N.** (1992). Structurally distinct and stage-specific adenylyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell*, **69**, S. 305-315.

- Plyte, S.E., O'Donovan, E., Woodgett, J.R. & Harwood, A.J.** (1999). Glycogene synthase kinase-3 (GSK-3) is regulated during *Dictyostelium* development via the serpentine receptor cAR3. *Development*, **126**, S. 325-333.
- Poole, S. Firtel, R.A., Lamar, E. & Rowekamp, W.** (1981). Sequence and expression of the discoidin I gene family in *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.*, **153**, S. 273-289.
- Primpke, G., Iassonidou, V., Nellen, W. & Wetterauer, B.** (2000). Role of cAMP-dependent protein kinase during growth and early development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.*, **221**, S. 101-111.
- Pupillo, M. Insall, R. , Pitt, G.S. & Devreotes, P.N.** (1992). Multiple cyclic AMP receptors linked to adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell.*, **3**, S. 1229-1234.
- Raper, K.B.** (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agric. Res.*, **50**, S. 135-147.
- Rathi, A., Kayman, S.C. & Clarke, M.** (1991). Induction of gene expression in *Dictyostelium* by prestarvation factor, a factor secreted by growing cells. *Dev. Gen.*, **12**, S. 82-87.
- Rathi, A. & Clarke, M.** (1992). Expression of early developmental genes in *Dictyostelium discoideum* is initiated during exponential growth by an autocrine-dependent mechanism. *Mech. Dev.*, **36**, S. 173-182.
- Ravid, S. & Spudich, J.A.** (1992). Membrane-bound *Dictyostelium* myosin heavy chain kinase: a developmentally regulated substrate-specific member of the protein kinase C family. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, S. 5877-5881.
- Rebstein, P.J., Weeks, G. & Spiegelmann, G.B.** (1993). Altered morphology of vegetative amoebae induced by increased expression of the *Dictyostelium* *ras*-related gene *rap1*. *Dev. Genet.*, **14**, S. 347-355.
- Rebstein, P.J., Cardelli, J., Weeks, G. & Spiegelmann, G.B.** (1997). Mutational analysis of the role of *rap1* in regulating cytoskeletal function in *Dictyostelium*. *Exp. Cell Res.*, **231**, S. 276-283.
- Reed, P.W. & Lardy, H.A.** (1972). A23187: a divalent cation ionophore. *J. Biol. Chem.*, **247**, S. 6970-6977.
- Reymond, C.D., Gomer, R.H., Mehdy, M.C. & Firtel, R.A.** (1984). Developmental regulation of a *Dictyostelium* gene encoding a protein homologous to mammalian *ras* protein. *Cell*, **39**, S. 141-148.
- Reymond, C.D., Gomer, R.H., Nellen, W., Theibert, A., Devreotes, P.N. & Firtel, R.A.** (1986). Phenotypic changes induced by a mutated *ras* gene during the development of *Dictyostelium* transformants. *Nature*, **323**, S. 340-343.

Robbins, S.M., Williams, J.G., Jermyn, K.A., Spiegelman, G.B. & Weeks, G. (1989). Growing and developing *Dictyostelium* cells express different *ras* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, S. 938-942.

Robbins, S.M., Suttor, V.V., Weeks, G. & Spiegelman, G.B. (1990). A *ras*-related gene from the lower eukaryote *Dictyostelium* that is highly conserved relative to human *rap* genes. *Nucleic Acids Res.*, **18**, S. 5265-5269.

Robbins, S.M., Williams, J.G., Spiegelman, G.B. & Weeks, G. (1992). Cloning and characterization of the *Dictyostelium discoideum rasG* genomic sequence. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1130**, S. 85-89.

Rosen, S.D., Kafka, J.A., Simpson, D.L. & Barondes, S.H. (1973)., Developmentally regulated carbohydrate-binding proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**, S. 2554-2557.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, S. 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor N.Y..

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, S. 5463-5468.

Saxe, C.L. III & Firtle, R.A. (1986). Analysis of gene expression in rapidly developing mutants of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.*, **115**, S. 407-414.

Saxe, C.L. III, Johnson, R.L., Devreotes, P.N. & Kimmel, A.R. (1991). Multiple genes for cell surface cAMP receptors in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.*, **12**, S. 6-13.

Saxe, C.L. III, Johnson, R.L., Devreotes, P.N. & Kimmel, A.R. (1991). Expression of a cAMP receptor gene of *Dictyostelium* and evidence for a multigene family. *Genes Dev.*, **5**, S. 1-8.

Saxe, C.L. III, Ginsburg, G.T., Louis, J.M., Johnson, R., Devreotes, P.N. & Kimmel, A.R. (1993). CAR2, a prestalk cAMP receptor required for normal tip formation and late development of *Dictyostelium discoideum*. *Genes Dev.*, **7**, S. 262-272.

Saxe, C.L. III, Yu, Y., Jones, C., Baumann, A. & Haynes, C. (1996). The cAMP receptor cAR2 is restricted to a subset of prestalk cells during *Dictyostelium* development and displays unexpected DIF-1 responsiveness. *Dev. Biol.*, **174**, S. 202-213.

- Schlatterer, C., Gollnik, F., Schmidt, F., Meyer, R. & Knoll, G.** (1994). Challenge with high concentrations of cyclic AMP induces transient changes in the cytosolic free calcium concentration in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Sci.*, **107**, S. 2107-2115.
- Schuster, S.S., Noegel, A.A., Oehm, F., Gerisch, G. & Simon, M.I.** (1996). The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system in *Dictyostelium*. *EMBO J.*, **15**, S. 3880-3890.
- Seastone, D.J., Lee, E., Bush, J., Knecht, D. & Cardelli, J.** (1998). Overexpression of a novel *rho* family GTPase, *racC*, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell*, **9**, S. 2891-2904.
- Seastone, D.J., Zhang, L., Buczynski, G., Rebstein, P., Weeks, G., Spiegelman, G. & Cardelli, J.** (1999). The small M_r *ras*-like GTPase *rap1* and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell*, **10**, S. 393-406.
- Segall, J.E., Kuspa, A., Shaulsky, G., Ecke, M., Maeda, M., Gaskins, C., Firtel, R.A. & Loomis, W.F.** (1995). A MAP kinase necessary for receptor-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Cell. Biol.*, **128**, S. 405-413.
- Seth, A., Gonzales, F., Gupta, S., Raden, D.L. & Davis, R.J.** (1992). Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **267**, S. 24796-24804.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P. & Gautam, N.** (1991). Diversity of G-proteins in signal transduction. *Science*, **252**, S. 802-808.
- Simon, M.N., Driscoll, D., Mutzel, R., Part, D., Williams, J. & Veron, M.** (1989). Overexpression of the regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase blocks the differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *EMBO J.*, **8**, S. 2039-2043.
- Simon, M.N., Pelegrini, O., Véron, M. & Kay, R.R.** (1992). Mutation of protein kinase-A causes heterochronic development of *Dictyostelium*. *Nature*, **356**, S. 171-172.
- Simpson, D.L., Rosen, S.D. & Barondes, S.H.** (1974). Discoidin, a developmentally regulated carbohydrate-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. Purification and characterization. *Biochemistry*, **13**, S. 3487-3493.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, S. 503-517.
- Spiegel, A.M., Backlund, P.S., Butrynski, J.E., Jones, T.L.Z. & Simons, W.F.** (1991). The G-protein connection: molecular basis of membrane association. *Trends Biochem. Sci.*, **16**, S. 338-341.

- Springer, W.R., Cooper, D.N. & Barondes, S.H.** (1984). DiscoidinI is implicated in cell-substratum attachment and ordered cell migration of *Dictyostelium discoideum* and resembles fibronectin. *Cell*, **39**, S. 557-564.
- Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R. & Underwood, D.** (1994). Structure and function of G-protein coupled receptors. *Ann. Rev. Biochem.*, **63**, S. 101-132.
- Sun, T.J. & Devreotes, P.N.** (1991). Gene targeting of the cAMP receptor cAR1 in *Dictyostelium*. *Genes Dev.*, **5**, S. 572-582.
- Souza, G.M., Lu, S. & Kuspa, A.** (1998). YakA, a protein kinase required for the transition from growth to differentiation in *Dictyostelium*. *Development*, **125**, S. 2291-2302.
- Souza, G.M., da Silva, A.M. & Kuspa A.** (1999). Starvation promotes *Dictyostelium* development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway. *Development*, **14**, S. 3263-3274.
- Sutoh K.** (1993). A transformation vector for *dictyostelium discoideum* with a new selectable marker bsr. *Plasmid*, **2**, S. 150-154.
- Suzuki, S., Oldberg, A., Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D. & Rouslathi, E.** (1986). Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin. *EMBO J.*, **4**, S. 19-24.
- Tanaka, K., Adachi, H., Konishi, H., Iwamatsu, A., Ohkawa, K., Shirai, T., Nagata, S., Kikkawa, U. & Fukui, Y.** (1999). Identification of protein kinase B (PKB) as a phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate binding protein in *Dictyostelium discoideum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, S. 368-372.
- Tang, W.J. & Gilman, A.G.** (1992). Adenylyl cyclases. *Cell*, **70**, S. 869-872.
- Towbin, H., Staehlin, T. & Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, S. 4350-4354.
- Thiery, R., Robbins, S., Khosla, M., Spiegelmann, G.B. & Weeks, G.** (1992). The effects of expression of an activated *rasG* mutation on the differentiation of *Dictyostelium*. *Biochem. Cell. Biol.*, **70**, S. 1193-1199.
- Thomason, P.A., Traynor, D., Stock, J.B. & Kay, R.R.** (1999). The RdeA-RegA system, a eukaryotic phospho-relay controlling cAMP breakdown. *J. Biol. Chem.*, **274**, S. 27379-27384.
- Tsang, A.S., Devine, J.M. & Williams, J.G.** (1981). The multiple subunits of discoidin I are encoded by different genes. *Dev. Biol.*, **84**, S. 212-217.

- Tsuyoshi, M., Amagai, A. & Maeda, Y.** (2004). Translocation of the *Dictyostelium* TRAP1 homologue to mitochondria induces a novel prestarvation response. *J Cell Sci.*, **117**, S. 5759-5770.
- Van Biesen, T., Hawes, B.E., Luttrell, D.K., Krueger, K.M., Touhara, K. Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell., L.M. & Lefkowitz, R.L.** (1995). Receptor-tyrosine-kinase- and G β -mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature*, **376**, S. 781-784.
- Van Haastert, P.J. & Gomer, R.H.** (1996). The cell density factor CMF regulates the chemoattractant receptor cAR1 in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.*, **134**, S. 1543-1549.
- Vauti, F., Morandini, P., Blush, J., Sachse, A. & Nellen, W.** (1990). Regulation of the Discoidin Iy gene in *Dictyostelium discoideum*: Identification of individual promotor elements mediating induction of transcription and repression by cyclic AMP. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, S. 4080-4088.
- Véron, M., Mutzel, R., Lacombe, M.L., Simon, M.N. & Wallet, V.** (1988). cAMP-dependent protein kinase from *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.*, **9**, S. 247-258.
- Vithalani, K.K., Parent, C.A., Thorn, E.M., Penn, M., Larochele, D.A., Devreotes, P.N. & De Lozanne, A.** (1998). Identification of *darlin*, a *Dictyostelium* protein with Armadillo-like repeats that binds to small GTPases and is important for the proper aggregation of developing cells. *Mol. Biol. Cell*, **9**, S. 3095-3106.
- Wanner, R. & Wurster, B.** (1990). Cyclic GMP-activated protein kinase from *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **2**, S. 179-184.
- Wang, N., Shaulsky, G., Escalante, R. & Loomis, W.F.** (1996). A two-component histidine kinase gene that functions in *Dictyostelium* development. *EMBO J.*, **15**, S. 3890-3898.
- Wang, N., Soderbom, F. Anjard, C., Shaulsky, G. & Loomis, W.F.** (1999). SDF-2 induction of terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum* is mediated by the membrane-spanning sensor DhkA. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, S. 4750-4756.
- Wang, B., Shaulsky, G. & Kuspa, A.** (1999). Multiple developmental roles for CRAC, a cytosolic regulator of adenylyl cyclase. *Dev. Biol.*, **208**, S. 1-13.
- Wang, Y., Liu, J. & Segall, J.** (1998). MAP kinase function in amoeboid chemotaxis. *J. Cell Sci.*, **111**, S. 373-383.
- Wang, Y. & Segall, J.** (1998). The *Dictyostelium* MAP kinase DdERK2 functions as a cytosolic protein in complexes with its potential substrates in chemotactic signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **6**, **244**, S. 149-55.
- Watts, D.J. & Ashworth, J.M.** (1970). Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem.J.*, **119**, S. 171-174.

- Weichenhan, D.** (1991). Fast recovery of DNA from agarose gels by centrifugation through blotting paper. *Trends Genet.*, **7**, S. 109.
- Wetterauer, B.W., Salger, K., Morandini, P. & MacWilliams, H.** (1993). Mutants of *Dictyostelium discoideum* with defects in the regulation of discoidin I expression. *Dev. Biol.*, **159**, S. 184-195
- Wilkins, A., Chubb, J.R. & Insall, R.H.** (2000). A novel *Dictyostelium* RasGEF is required for normal endocytosis, cell motility and multicellular development. *Curr. Biol.*, **10**, S. 1427-1437.
- Wilkins, A. & Insall, R.H.** (2001). Small GTPases from *Dictyostelium*: lessons from a social amoeba. *Trends Gen.*, **17**, S. 41-48.
- Wilkins, A., Szafranski, K., Fraser, D., Bakthavatsalam, D. Müller, R., Fisher, P., Glöckner, G., Eichinger, L. Noegel, A. & Insall, R.H.** (2005). The *Dictyostelium* genome encodes numerous RasGEFs with multiple biological roles. *Genome Biology.*, **6**, R68.
- Williams H.P. & Harwood A.J.** Cell polarity and *Dictyostelium* development. *Curr Opin Microbiol.*, (**6**), S. 621-627.
- Williams, K.L. & Newell, P.C.** (1976). A genetic study of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics*, **82**, S. 287-307.
- Williams, G.W., Noegel, A.A & Eichinger L.** (2005). Manifestation of multicellularity: *Dictyostelium* reports in . *Trends Genet.*,**21(7)**, S. 392-98.
- Wu, J., Michel, H., Dent, P., Haystead, T., Hunt, D.F. & Sturgill, T.W.** (1993). Activation of MAP kinases by a dual specificity kinase. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, **28**, S. 219-225.
- Wu, L., Gaskins, C., Zhou, K., Firtle, R.A. & Devreotes, P.N.** (1994). Cloning and targeted mutations of G alpha 7 and G alpha , two developmentally regulated G-Protein alpha-subunit genes in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell*, **5**, S. 691-702.
- Xiao, Z., Yao, Y., Long, Y. & Devreotes, P.** (1999). Desensitization of G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem.*, (**3**), S. 1440-1448.
- Yarden, Y. & Ullrich, A.** (1988). Growth factor receptor tyrosin kinases. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, S. 443-478.
- Yu, Y., Charles, L. & Saxe, C.L. III** (1996). Differential distribution of cAMP receptors cAR2 and cAR3 during *Dictyostelium* development. *Dev. Biol.*, **173**, S. 353-356.
- Yuen, I.S., Jain, R., Bishop, J.D., Lindsey, D.F., Deery, W.J., Van Haastert, P.J. & Gomer, R.H.** (1995). A density-sensing factor regulates signal transduction in *Dictyostelium*. *J. Cell. Biol.*, **129**, S. 1251-1262.

Zhang, N., Long, Y. & Devreotes, PN. (2002). *Gg* in *Dictyostelium*: Its role in localization of Gβγ to the membrane is required for chemotaxis in shallow gradients. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 3204-3213.

Zeng, C. (1998). Molecular analysis of the growth-differentiation-transition in *Dictyostelium*. Promotionsarbeit, Fachbereich 19 der *Universität Kassel*.

Zeng, C., Anjard, C., Riemann, K., Konzok, A. & Nellen, W. (2000). *Gdt1*, a new signal transduction component for negative regulation of the growth-differentiation-transition in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell*, in press.

Tabellarischer Lebenslauf
KARSTEN RIEMANN (Stand 11/2006)

Persönliche Daten

Name: Karsten Riemann
Geburtsdatum/ -ort: 19.01.1969 in Kassel
Familienstand: verheiratet / 2 Kinder

Schulbildung:

1975 – 81 Grundschule und Förderstufe der Freiherr-vom-Stein Schule
Hess. Lichtenau
1981 – 88 Gymnasiale Oberstufe der Freiherr-vom-Stein Schule Hess. Lichtenau
Juni 1988 Abschluss Abitur

Wehrdienst:

1988 – 1990 Soldat auf Zeit

Studium

1990 – 1995 Studium Biologie an der Technischen Universität zu Braunschweig
Schwerpunkt: molekulare Genetik
1995 Abschluss Diplom Biologe

Beruflicher Werdegang:

1995 – 2000 Wissenschaftlicher Angestellter an der Universität Kassel;
Abteilung Genetik Prof. Nellen.
Abgestrebter Abschluss: Dr. rer. nat.

2000 - 2002 Tätig als Clinical Research Associate für europäische
Zulassungsstudien / Onkologie
AVENTIS Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden

Seit 2003 Medical Manager Field / Onkologie
SANOFI-AVENTIS Deutschland GmbH, Berlin

