

Max Planck Institut für Biochemie
Abteilung Zellbiologie

**DMIF1 – ein Regulator der mitochondrialen
F1F0-ATPase in *Dictyostelium discoideum***

Annette Hüttig

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Oskar Nuyken
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Wolfgang Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf

Die Dissertation wurde am 07.07.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 06.09.2004 angenommen.

Abstract

Mit DMIF1 wurde erstmals in Dictyostelium ein zur Familie der mitochondrialen F1F0-ATPase-Inhibitoren zählendes Homolog gefunden. Diese verhindern die letale ATP-Verarmung durch Hemmung der ATP-Hydrolyse, der Umkehrreaktion der ATP-Synthase, die bei Zusammenbruch des Membranpotentials abläuft. Das helicale, hochgeladene DMIF1-Monomer hat eine N-terminale Targeting-Domäne, die den Transfer des im Zytoplasma gebildeten Precursors in die Mitochondrien bewirkt, wo das reife Protein durch Abspalten der Domäne nach einem modifizierten R-2-Motiv durch die Protease MPP entsteht. Sterische Störung der Targeting-Domäne durch die Fusion an GFP führt zum Transfer in die pericentrosomale Region, wo das ungefaltete Protein in Aggresomen degradiert wird. Die C-terminale Coiled coil-Domäne dient potentiell der Assemblierung zum inhibitorisch aktiven Dimer, helicale Bereiche der inhibitorischen Region zur Bildung des inaktiven Tetramers. Gemäß Restriktions- und Sequenzanalyse-Daten ist ein bisher nicht charakterisiertes homologes Protein DMIF2 wahrscheinlich.

The DMIF1 protein found in Dictyostelium is homologous to members of the F1F0-ATPase inhibitory protein family. Those inhibitors protect cells from uncontrolled ATP hydrolysis and thus from lethal ATP deprivation. Activation of the hydrolysis pathway, the reversed function of F1F0, is caused by membrane potential breakdown. The helical, highly charged DMIF1 protein monomer contains an N-terminal targeting domain to transfer the precursor, synthesized in the cytoplasm, to mitochondria. In the matrix the targeting domain is cleaved off by a mitochondrial protease MPP following an R-2 processing motif. Sterical blocking of the targeting domain by the reporter protein GFP fused to DMIF1 N-terminus targets the protein to aggresomes in the pericentrosomal region, where the unfolded protein is degraded. The inhibitory active homodimer is built by mutual interaction of the C-terminal Coiled-coil domain, whereas a helical part of the inhibitory domain serves as an interaction region to assemble the inactive homotetramer. According first data from restriction enzyme digestion experiments and DNA sequence analysis a putative inhibitory protein DMIF2, homologous to DMIF1, is presumed.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGEN UND TABELLEN	4
ABKÜRZUNGEN, BEGRIFFE, EINHEITEN	6
ZUSAMMENFASSUNG	10
EINLEITUNG	12
1 Grundlagen	12
1.1 Mitochondriale F1F0-ATPase – Bau und Funktion	12
1.2 Zielsteuerung, Prozessierung und Faltung mitochondrialer Proteine	17
1.3 <i>Dictyostelium discoideum</i> – ein Modellorganismus	23
1.4 Funktionsanalyse von Proteinen.....	26
ERGEBNISSE.....	28
2 Aufklärung und Analyse der DNA- und Protein-Sequenz	28
2.1 Isolierung der cDNA aus Phagenklonen	28
2.2 Analyse der DNA-Sequenz	30
2.3 Analyse der Proteinsequenz.....	32
3 Intrazelluläre Lokalisation von DMIF1	38
3.1 Die Verwendung von GFP als Markerprotein <i>in vivo</i>	38
3.2 DMIF1 in fixierten <i>Dictyostelium discoideum</i> - Zellen	43
3.3 DMIF1 lokalisiert im Grenzbereich zwischen innerer Membran & Matrix	59
4 Einfluss von GFP auf Zielsteuerung und Prozessierung.....	69
4.1 Hemmung der Abspaltung der Signalsequenz	69
4.2 Analyse des Expressionslevels in GFP-N-DMIF1 und GFP-C-DMIF1	74
5 Funktionsanalyse von DMIF1 in <i>Dictyostelium</i>.....	76
5.1 Inaktivierung von <i>dmif1</i> durch homologe Rekombination	76
5.2 Zellbiologische Charakterisierung der Transformanten	81

DISKUSSION	87
6 Sequenz, Motive und Struktur des DMIF1- Proteins	87
6.1 Sequenzähnlichkeit und Funktionshomologie.....	87
6.2 Proteindomänen und ihre Funktionen	89
7 Intrazelluläre Lokalisation.....	100
7.1 Mitochondriale Lokalisation.....	100
7.2 Centrosomales Targeting.....	101
8 Inhibitor- Homologe in <i>Dictyostelium</i> ?	103
9 Funktion des Inhibitors	105
9.1 Funktion unter Streßbedingungen und in pathologischen Prozessen	105
9.2 Physiologische Funktion des rekombinanten Inhibitors GFP-C-DMIF1	106
MATERIAL UND METHODEN.....	108
10 Material	108
10.1 Biologisches Material	108
10.2 Vektoren, Genbanken, Oligonukleotide, DNA-Fragmente	109
10.3 Enzyme und Kits für die Molekularbiologie	111
10.4 Antikörper.....	112
10.5 Protease-Inhibitoren.....	113
10.6 Antibiotika	113
10.7 Reagenzien, Chemikalien	113
10.8 Radiochemikalien.....	115
10.9 Standards.....	115
10.10 Medien, Puffer und andere Lösungen.....	116
10.11 Verbrauchsmaterial	119
10.12 Geräte und Zubehör.....	120
11 Methoden der Zell-Kultivierung	123
11.1 <i>Dictyostelium discoideum</i>	123
11.2 Bakterien	125
12 Molekularbiologische Methoden	125
12.1 cDNA-Bank Screening	125

12.2	Präparation von DNA und RNA	129
12.3	Chromatographie von DNA- und RNA-Fragmenten und Transfer auf Trägermembranen	135
12.4	Detektion mit DNA-Sonden.....	137
12.5	Enzymatische Reaktionen	142
12.6	Transformation von Bakterien.....	149
12.7	Transformation von <i>D. discoideum</i> und Selektion	153
13	Proteinchemische und - analytische Methoden.....	155
13.1	Gelelektrophorese	155
13.2	Transfer und Detektion von Proteinen	159
13.3	Expression rekombinanter Proteine in Bakterien und Aufreinigung	162
13.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	165
13.5	Aufreinigung von Mitochondrien und Präparation von Vesikeln	166
14	Immunologische und zellbiologische Methoden	168
14.1	Hybridoma-Gewinnung	168
14.2	Testen der Überstände und Klonieren der Hybridomzellen	170
14.3	Konservierung und Auftauen von Hybridomklonen	172
14.4	Bestimmung der AK-Klasse mit Diffusionstest	172
14.5	Aufreinigung von monoklonalen IgM-Antikörpern.....	173
14.6	Bestimmung von Pinozytoseraten	174
15	Mikroskopie.....	175
15.1	Fluoreszenz- und indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	175
15.2	Transmissionselektronenmikroskopie.....	177
16	Computerprogramme	181
16.1	Unter Windows.....	181
16.2	Unter UNIX.....	181
	LITERATURVERZEICHNIS	182

ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abbildung 1-1	Kopplung von Protonen-Gradienten und ATP-Synthese (Mitchell Hypothese).....	13
Abbildung 1-2	Schematischer Aufbau der F1F0-ATPase in Hefe.	14
Abbildung 1-3	Lokalisation mitochondrialer Targeting-Sequenzen im Protein.....	19
Abbildung 1-4	Entwicklungszyklus von <i>Dictyostelium discoideum</i>	24
Abbildung 2-1	Sequenzierungsstrategie.	29
Abbildung 2-2	DNA- und abgeleitete Proteinsequenz.	31
Abbildung 2-3	Konservierte Basen in Intronsequenzen.	32
Abbildung 2-4	Sequenzvergleich mit bekannten F1F0-ATPase-Inhibitoren.....	35
Abbildung 2-5	Ladungs- und Strukturprofil.....	37
Abbildung 3-1	GFP am N-Terminus - Konstruktion des Expressionsvektors.....	39
Abbildung 3-2	GFP am C-Terminus - Konstruktion des Expressionsvektors.....	40
Abbildung 3-3	Mitochondriale Lokalisation von GFP-C-DMIF1	41
Abbildung 3-4	Centrosomale Lokalisation von GFP-N-DMIF1.....	42
Abbildung 3-5	Lokalisation von GFP-N-DMIF1 in Vesikeln.....	43
Abbildung 3-6	Klonierungsstrategie und Fusionsprodukt GST-DMIF1	45
Abbildung 3-7	Induktions-Test.....	46
Abbildung 3-8	Expression von GST-DMIF1 in <i>E. coli</i>	47
Abbildung 3-9	Immunreaktion eines anti-DMIF1-mAk im Westernblot.....	48
Abbildung 3-10	Konstrukt zum Ak-Mapping.	49
Abbildung 3-11	Induktionstest mit dem verkürzten Protein GST-DMIF Δ 3	50
Abbildung 3-12	DMIF1, Tubulin und DNA in vegetativen Wildtypzellen.....	53
Abbildung 3-13	DMIF1, Tubulin und Porin in <i>GFP-C-DMIF1</i> -Zellen	54
Abbildung 3-14	DMIF1 und GFP in <i>GFP-C-DMIF1</i> -Zellen	55
Abbildung 3-15	DMIF1 und Porin in <i>GFP-N-DMIF1</i> - Zellen	56
Abbildung 3-16	DMIF1, Tubulin, GFP und DNA in <i>GFP-N-DMIF1</i> - und <i>GFP-MCS</i> -Zellen.	58
Abbildung 3-17	Ultradünne Kryoschnitte von Mitochondrien im TEM	60
Abbildung 3-18	Gewinnung und Aufbereitung von Mitochondrien aus <i>Dictyostelium</i> , inside out Vesikel ...	62
Abbildung 3-19	Westernblot zur Mitochondrien-Aufreinigung aus <i>AX2</i>	63
Abbildung 3-20	Immunmarkierung von Vesikeln aus mitochondrialen Membranen	64
Abbildung 3-21	Immunmarkierung von Kryo-Ultradünnschnitten von <i>GFP-N-DMIF1</i> -Zellen im TEM.....	66
Abbildung 3-22	Morphologie von Centrosomen und Mitochondrien.	67
Abbildung 3-23	Größenverhältnisse von Centrosomen im TEM.	68
Abbildung 3-24	Centrosom in Nachbarschaft zum Golgi-Apparat.....	68

Abbildung 4-1	Prozessierung von GFP-N-DMIF1 und GFP-C-DMIF1 - Erwartete Fragmente	70
Abbildung 4-2	Prozessierung des Präproteins durch Abspaltung der Targeting-Domäne.....	71
Abbildung 4-3	Prozessierung von DMIF1.	73
Abbildung 4-4	GFP-Fluoreszenz von fixierten GFP-N/C-DMIF1-Zellen.....	75
Abbildung 5-1	Konstruktion des Replacement Vektors.....	77
Abbildung 5-2	Organisation des Gens <i>dmif1</i> im Genom von <i>D. discoideum</i>	79
Abbildung 5-3	Genomischer Southernblot.	80
Abbildung 5-4	Wachstumsverhalten von Wildtyp- und Transformanten-Zellen auf <i>E.coli</i>	81
Abbildung 5-5	Wachstum in axenischer Suspension.....	82
Abbildung 5-6	Pinozytoserate.	85
Abbildung 5-7	Histogramm zur Anzahl der Kerne pro Zelle.....	86
Abbildung 6-1	Modell der DMIF1-Struktur.....	89
Abbildung 6-2	Amphiphilität und Helices in Targeting-Sequenzen mitochondrialer ATPase-Präproteine.92	
Abbildung 6-3	Konservierte Motive zur MPP-Prozessierung.	93
Abbildung 6-4	Screening von Prozessierungsmotiven und Schnittstellen in DMIF1.....	94
Abbildung 6-5	Inhibitorische Domänen in Inhibitorproteinen.....	97
Abbildung 6-6	Konformationsänderungen im Inhibitor durch pH Verschiebung	99
Abbildung 8-1	Sequenzvergleich von DMIF1 mit seinem Homolog DMIF2 und INH1	104
Abbildung 13-1	Aufbau eines 2-Phasen-Gels	157
Tabelle 1	Ähnlichkeitsanalyse verschiedener Inhibitor-Proteine- Analyse mit BESTFIT.....	36
Tabelle 2	Eigenschaften monoklonaler Antikörper aus Fusion 272.....	51
Tabelle 3	Semiquantifizierung der Expression des rekombinanten Proteins	75
Tabelle 4	Fragmentmuster im Southernblot	80
Tabelle 5	Bestimmung der Generationszeit aus der exponentiellen Wachstumsphase.....	83
Tabelle 6	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes	84
Tabelle 7	Targetingsequenzen mitochondrialer ATPase-Inhibitoren.....	90
Tabelle 8	DIG-Markierungsausbeute.....	141

ABKÜRZUNGEN, BEGRIFFE, EINHEITEN

2D	2- dimensional
³² P	radioaktives Phosphor-Isotop ³² P
A15P; A8T	Actin-15-Promotor; Actin-8-Terminator
AccNr	Accession Number
A(M/D/T)P	Adenosin-(Mono/Di/Tri)-Phosphat
Ak, mAk	Antikörper, monoklonaler Antikörper
ALDH	Alkoholdehydrogenase
ALKP	alkalische Phosphatase
äm	äußere Membran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ASU	SMP, mit Ammoniumsulfat und Harnstoff behandelt
AX	axenisch
BCA	Bicinchoninic Acid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat)-Toluidin-Salz
BFP	blue fluorescent protein
BSA	bovine serum albumin
Bsr	Blasticidin-Desaminase-Resistenz
cAMP	cyclisches AMP
cAR	cAMP-Receptor
cDNA	copy DNA, circular DNA
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CM	Carboxymethyl-
CP190	Centrosomales Protein 190
CPE	Chloroplastic Processing Enzyme
csA	Contact Site A protein
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.3.1]decan-4-yl}phenylphosphat
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
d(A/C/G/T/U/N)TP	desoxy-(Adenosin/Cytosin/Guanin/Thymidin/Uracil/Nucleotid)Tri-Phosphat
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
dH ₂ O	destilliertes H ₂ O
DIG	Digoxigenin
DL	Durchlauf
DMF	Dimethylformamid
DMIF1	<i>Dictyostelium mitochondriales</i> IF1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxy ribo nucleic acid
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DSI	Disulfidisomerase
DTE	Dithioerythrol
dTMP	Thymidine-5'-monophosphat
DTT	Dithiotreithol
E	Eluat
EB	Elution Buffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis[2-amino-ethylether]-N,N,N',N'-tetraessigsäure

ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EM	Elektronenmikroskop
EP	Electroporation, Electroporationspuffer
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetal calf serum
FRET	Fluoreszenz Energie Transfer
FS	flankierende Sequenz
fw	forward
G418	Geneticin
GAM	Goat anti Mouse
GAR	Goat anti Rabbit
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI-Anker	Glycosylated Phosphatidyl-Inositol Anker
GST	Gluthation-S-Transferase
H&L	Heavy & Light
HEPES	(N)-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HGPRT	Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase
Hsp	Heat Shock Protein
IgG	Immunglobulin G, M
iM	Innere Membran
IMP1	Inner/Intermediate Membrane Protease
IMS	Inter Membrane Space
IOV	"inside-out" vesicle
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
K _D	Dissoziationskonstante
LB	Luria-Bertani
LSM	Laser Scanning Microscope
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	Multiple Cloning Site
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MIP	Mitochondrial Inner Membrane Protease
mito	mitochondrial
MOPS	γ -[Morpholino]propansulfonsäure
MPI	Max Planck Institut
MPP	Matrix (Mitochondrial) Processing Peptidase
mRNA	Messenger RNA
MSF	mitochondriale Import-Stimulierungs-Faktor
mtDNA	mitochondriale DNA
mtHSP	mitochondriales Heat Shock Protein
MTOC	Microtubule Organizing Center
mTP	mitochondrial targeting peptide
N ² _{liq}	flüssiger Stickstoff
NA	Normalagar
NADH	Nicotinamid-Adenin-dinukleotid (reduziert)
NBT	4-Nitrotetrazolium-Chloridblau-Hydrat
NCP	Nitrocellulosepuffer
Neo	Neomycin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NP40	Nonidet P40
NTP's	Ribonucleosid-5'-Triphosphate
OctylPOE	Octyloligooxyethylen
OD	optical density
ORF	Open Reading Frame

PAG	Polyacrylamidgel
pAk	polyklonaler Antikörper
PB	Phosphatpuffer
PBF	Präsequenz-Binde-Faktor
PBG	phosphate buffered gelatine
PBS	phosphate buffered saline
PBSG	phosphate buffered saline mit Glycin
PBST	phosphate buffered saline mit Tween
PCR	polymerase chain reaction
PDI	Proteindisulfidisomerase
PEG	Polyethylenglycol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
P _i	inorganic Phosphate
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
polyA	DNA-Sequenz aus vielen Adeninresten
PP	Phosphatpuffer
ProtA	Protein A
Ψ	Membranpotential
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REMI	restriction enzyme mediated integration
rev	reverse
RNA	ribonucleic acid
RNAse	RNA-verdauendes Enzym
RPMI	Zellkulturmedium
RPMIoH	RPMI ohne HEPES
RSV	Right Site Vesicle
RT	Raumtemperatur
S65TGFP	GFP mit Serin65 in Threonin konvertiert
SAM	sheep anti mouse
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Seq	Sequenz
SMP	submitochondrial particle
SSC	Standard Saline Citrate
ssDNA	single stranded DNA
βGal	β-Galactosidase
SU, UE	Subunit, Untereinheit
tac	Promotor im Expressionsvector pGEX5X1
tag	Protein-Anhang
TBE	Trisborat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TBSTween	Tris buffered saline mit Tween
TCA	Tri chloric acid
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEM	Transmissions- Elektronen- Mikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIM	Translocase complex of Inner Membrane
T _M	Melting Temperature (Primer Schmelzpunkt)
TOM	Translocase complex of Outer Membrane

TPR	tetratricopeptide repeats
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol; (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
TRITC	tetramethyl rhodamine isothiocyanate
UE, SU	Untereinheit (subunit)
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge, Ultrazentrifugation
vlnr	von links nach rechts
Vol	Volumen
vv	Volume per Volume
W	Waschfraktion
wv	Weight per Volume
YFP	Yellow Fluorescent Protein

ZUSAMMENFASSUNG

Das in zahlreichen Organismen beschriebene mitochondriale Protein IF1 ist ein in der Kern-DNA kodiertes und im Zytoplasma synthetisiertes Protein, welches durch eine spezifische Erkennungssequenz am aminoterminalen Ende in die Mitochondrien dirigiert wird. Dort reguliert es als Inhibitor der F₁F₀-ATPase die ATP-Hydrolyse-Aktivität dieses Enzyms. Der Inhibitor gehört zu einer Proteinfamilie, die sequenziell ähnliche und funktionell gleiche Proteine in Organismen verschiedener taxonomischer Klassen vereint.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß mit DMIF1 ein zu diesen Inhibitoren homologes Protein in *Dictyostelium discoideum* existiert. Die cDNA des *dmif1*-Gens, welches auf dem Chromosom 6 kodiert ist und aus zwei Exons und einem Intron besteht, wurde aus einer Phagen-Expressionsbibliothek isoliert und sequenziert. DMIF1 ist ein hochgeladenes, α -helicales Protein mit einer mitochondrialen Targeting-Domäne am N-Terminus, einer sich anschließenden Prozessierungsstelle für die Mitochondriale Prozessierungs-Peptidase (MPP), einer inhibitorischen Region und einer Coiled Coil-Domäne am C-Terminus, die für die Bildung eines Homodimers und damit für die inhibitorisch aktive Form wichtig ist. Die Targeting-Domäne wird an der MPP-Prozessierungsstelle abgespalten, wodurch, analog zu anderen Inhibitoren, nach Chaperone-geregelter Faltung ein physiologisch aktives Protein entsteht.

DMIF1 wurde als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase in *E.coli* exprimiert, chromatographisch gereinigt und als Antigen zur Bildung monoklonaler Antikörper in Mäusen eingesetzt. Die Lokalisation des DMIF1-Proteins in den Mitochondrien der *Dictyostelium*-Zelle wurde immunologisch an fixierten Präparaten unter Verwendung dieser Antikörper bestätigt. Zur Bestimmung der Lokalisation in lebenden Zellen wurde das *dmif1*-Gen als Fusionsprotein mit GFP in *Dictyostelium* exprimiert und im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Dabei war die Anordnung des GFP zu DMIF1 von entscheidender Bedeutung für die Lokalisation. Mit GFP am C-Terminus von DMIF1 (GFP-C-DMIF1) zeigte das Fusionsprotein die erwartete Akkumulation in den Mitochondrien, während DMIF1 mit GFP am N-Terminus (GFP-N-DMIF1) neben einer starken Ansammlung im Zytoplasma und in geringer Menge in Vesikeln vor allem ringförmig um das Centrosom, aber nicht in den Mitochondrien zu finden war. Für die korrekte Zielsteuerung in die Mitochondrien ist offenbar die ungestörte räumliche Umgebung der N-terminalen Erkennungssequenz notwendig, welche bei GFP-N-DMIF1 nicht gegeben ist. Der spezifischen Lokalisation von GFP-N-DMIF1 am Centrosom liegt wahrscheinlich ein Degradationsprozeß des Proteins zugrunde, der in Aggresomen, und somit in der centrosomalen Umgebung abläuft.

Die intramitochondriale Lokalisation von DMIF1 und GFP-C-DMIF1 in Wildtyp- bzw. Transformanten-Zellen wurde durch Immunogold-Markierung mit Hilfe von monoklonalen anti-DMIF1-Antikörpern und anti-GFP-Seren im Transmissions-Elektronen-Mikroskop bestätigt. Die Identifizierung des Zielkompartimentes gelang jedoch nur durch immunologische Markierung von submitochondrialen Vesikeln im TEM. Demnach ist DMIF1 über die F1-Komponente der ATPase mit der inneren Membran assoziiert.

Die meisten mitochondrialen Präproteine werden nach ihrem Eintritt in die Mitochondrien prozessiert. Das bedeutet, daß die Erkennungssequenz an einer definierten Stelle durch MPP abgespalten wird. Für MPP-Spaltstellen sind mehrere Erkennungs- und Bindungsmotive bekannt, von denen das R-2-Motiv ein sehr verbreitetes ist. Anhand von Westernblotanalysen konnten für das rekombinante Protein GFP-C-DMIF1 Fragmente nachgewiesen werden, die einer Abspaltung gemäß einem leicht modifizierten R-2-Motiv entstammen können. Das bei GFP-N-DMIF1 auftretende Spaltungsmuster scheint dagegen auf einer unspezifischen Degradation des Fusionsproteins in Aggresomen bzw. im Zytoplasma zu beruhen. Diese These wird auch durch die ausschließlich mitochondriale Lokalisation der Mitochondrialen Prozessierungs-Peptidase gestützt.

Anhand von Knock out- Zellen sollte die Funktion von DMIF1 untersucht werden. Die Inaktivierung von *dmif1* mit einem Gene Replacement-Ansatz, die durch die Abwesenheit des DMIF1-Proteins im Westernblot nachgewiesen werden sollte, erschien zunächst erfolglos, da mit anti-DMIF1-Antikörpern in allen Antibiotika-resistenten Klonen ein Protein mit ca. 10 kDa erkannt wurde. Dieses Ergebnis wird einer Kreuzreaktivität der anti-DMIF1-Antikörper mit einem weiteren mitochondrialen Inhibitor-Homolog zugeschrieben. Für dessen Existenz gab es bereits Hinweise aus den Restriktionsanalysen des Wildtyp-Genoms, was durch eine spätere Analyse der *Dictyostelium*-Sequenzdatenbank bestätigt werden konnte. Das zu DMIF1 homologe Protein weist sowohl auf der Gen-Ebene als auch in der Proteinstruktur viele ähnliche Elemente auf, daher wird vorgeschlagen, dieses Protein analog zur Nomenklatur anderer Inhibitoren mit DMIF2 zu bezeichnen. Mit der Existenz eines zweiten Inhibitors ist das regulatorische System für die ATP-Hydrolase-Funktion der mitochondrialen F1F0-ATPase in *Dictyostelium* mit dem der Hefen oder höheren Pflanzen vergleichbar.

EINLEITUNG

1 Grundlagen

Mitochondrien werden häufig als "Kraftwerke der Zelle" bezeichnet, da in ihnen ein wesentlicher Teil am zellulären Gesamtaufkommen an ATP erzeugt wird. Ein Fokus der Mitochondrienforschung liegt auf den der ATP-Bildung zugrundeliegenden Prozessen wie der oxidativen Phosphorylierung. Für die Strukturaufklärung der beteiligten Enzymkomplexe sind neben klassischen spektroskopischen zunehmend auch Elektronen- und Kraftmikroskopische Methoden bedeutsam. Daneben finden molekularbiologische und proteinchemische Werkzeuge Anwendung, insbesondere bei der Analyse einer Reihe pathologischer Vorgänge, mit denen Mitochondrien in Zusammenhang gebracht werden. Für deren umfassendes Verständnis ist die Aufklärung der daran beteiligten Proteine und Gene essentiell. Aus der Proteinklasse der mitochondrialen ATPase-Inhibitoren, dem Thema dieser Arbeit, werden regelmäßig neue Homologe entdeckt, was die intensiven Aktivitäten auf diesem Gebiet belegt, auch hinsichtlich ihrer Rolle für Entstehung und Verlauf von Krankheiten. Wie die meisten mitochondrialen Proteine sind ATPase-Inhibitoren im Kern kodiert und werden somit außerhalb der Mitochondrien als zunächst nichtfunktionelle Präproteine synthetisiert. Fragen der Zielsteuerung (Targeting), Prozessierung, Faltung und Degradation von Proteinen sind damit auch von Interesse. Auf einige der genannten Aspekte, die grundlegend für diese Arbeit sind, soll im Folgenden etwas näher eingegangen werden.

1.1 Mitochondriale F₁F₀-ATPase – Bau und Funktion

Der Rezeptor für das in der Arbeit identifizierte inhibitorische Protein ist die mitochondriale ATP-Synthase. Das in der inneren Membran angesiedelte Enzym besteht aus einer hydrophilen katalytischen Untereinheit F₁, die in die Matrix hineinreicht, und einem membrangebundenen, hydrophoben Protonenkanal F₀. Homologe Komplexe sind die CF₁F₀-ATPase in der Thylakoidmembran der Chloroplasten (Böttcher und Gräber, 2000; Richter et al., 2000) und die F₁F₀-ATPase in der prokaryotischen Zytoplasmamembran (Groth, 2000).

1.1.1 ATP-Synthase oder ATPase ?

Die ATP-Synthase katalysiert die Synthese von ATP im Zuge der oxidativen Phosphorylierung. Die energetische Grundlage für diesen Prozeß bildet ein Protonengradient über der inneren Membran, der durch den Transport von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum (IMS) aufgebaut wird (Stryer, 1988). Dieser Transport erfolgt im Gegenzug

zum Elektronentransport durch die Enzyme der Atmungskette. Der Rückfluß der Protonen über den F₀-Protonenkanal in die Matrix treibt die Phosphorylierung von ADP am katalytischen F₁-Teil an. Der Protonenfluß führt dabei zur Freisetzung des an einem von drei katalytischen Zentren gebundenen ATP und ermöglicht so die weitere Bildung von ATP nach einer Reihe von Affinitäts- und Konformationsänderungen der Bindungszentren (Review Boyer, 2000). Nach der Chemiosmotischen Hypothese sind Phosphorylierung und Oxidation der Reduktionsäquivalente über den Protonengradienten gekoppelt (Mitchell, 1979; Abbildung 1-1). Die ATP-Synthese erfordert demzufolge ein geschlossenes Kompartiment, den Generator einer protonenmotorischen Kraft sowie eine vektoriell richtig angeordnete und über das Membranpotential (Ψ) mit einer Protonenpumpe gekoppelte ATP-Synthase.

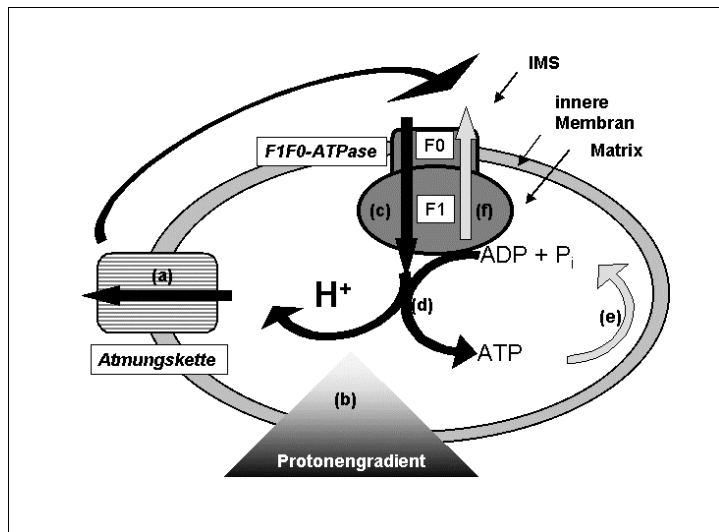


Abbildung 1-1 Kopplung von Protonen-Gradienten und ATP-Synthese (Mitchell Hypothese) – Prinzipielle Reaktionen. Die Enzyme der Atmungskette (a) transportieren Protonen in den Intermembranraum (IMS) und erzeugen somit einen Ladungs- und pH-Gradienten Ψ über der inneren Membran (b). Protonen fließen den Gradienten entlang über den F₀-Teil der ATP-Synthase in die Matrix zurück (c) und treiben dabei die Phosphorylierung von ADP an (d). Bei Zusammenbruch des Gradienten kehrt sich dieser Vorgang um (graue Pfeile): ATP wird hydrolysiert (e), und Protonen werden über die ATPase in den IMS gepumpt (f), was zur Rekonstitution von Ψ führen kann.

Im umgekehrten Modus wirkt das bifunktionale Enzym als Protonenpumpe und hydrolysiert ATP zur Gewinnung der dazu erforderlichen Energie. Deshalb wird die ATP-Synthase auch als H⁺-ATPase, F₁F₀-ATPase oder F₁-ATPase bezeichnet, wobei letzterer Begriff auch häufig für die isolierte, katalytisch aktive F₁-Untereinheit steht. Diese Reaktion wird bei Zusammenbruch des Ladungsgefälles durch Unterbrechung des geschlossenen Systems nach Membranruption (z.B. durch Behandlung mit Ultraschall), durch die Einwirkung von Entkopplern (z.B. Dinitrophenol macht die Membran für Protonen hochpermeabel, wodurch diese entgegen dem Gradienten in die Matrix gelangen) oder Sauerstoffmangel (z.B. bei Ischämien) induziert. Die ATP-Synthese und die ATP-Hydrolyse sind reversible Prozesse ($\text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$). Die Richtung der Reaktion hängt von subtilen lokalen Energie- und Konzentrations-Verhältnissen ab, von der protonenmotori-

Im umgekehrten Modus wirkt das bifunktionale Enzym als Protonenpumpe und hydrolysiert ATP zur Gewinnung der dazu erforderlichen Energie. Deshalb wird die ATP-Synthase auch als H⁺-ATPase, F₁F₀-ATPase oder F₁-ATPase bezeichnet, wobei letzterer Begriff auch häufig für die isolierte, katalytisch aktive F₁-Untereinheit steht. Diese Reaktion wird bei Zusammenbruch des Ladungsgefälles durch Unterbrechung des geschlossenen Systems nach Membranruption (z.B. durch Behandlung mit Ultraschall), durch die Einwirkung von Entkopplern (z.B. Dinitrophenol macht die Membran für Protonen hochpermeabel, wodurch diese entgegen dem Gradienten in die Matrix gelangen) oder Sauerstoffmangel (z.B. bei Ischämien) induziert. Die ATP-Synthese und die ATP-Hydrolyse sind reversible Prozesse ($\text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$). Die Richtung der Reaktion hängt von subtilen lokalen Energie- und Konzentrations-Verhältnissen ab, von der protonenmotori-

schen Kraft ($\Delta G_{H+Transport}$) einerseits und vom Konzentrationsverhältnis der Reaktanten ADP, P_i und ATP ($\Delta G_{ATP-Synthese}$) in der Matrix andererseits (Alberts et al., 1994).

1.1.2 Aufbau des Enzymkomplexes und seine Funktion als molekularer Motor

Die Zusammensetzung der F1- und F0-Komponenten aus den verschiedenen Typen von Untereinheiten ist in vielen Organismen weitgehend konserviert. Die Hauptbestandteile des F1-Teils sind die Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\varepsilon_1$, die des F0-Teils $a_1b_1c_{12}d_1$ (Abbildung 1-2). Das Enzym besitzt Nukleotidbindestellen in α und β , wobei nur letztere katalytisch agieren (Saraste, 1999). Die dreifach vorkommenden Untereinheiten β sind im Bau identisch, haben aber trotzdem verschiedene Bindungseigenschaften zu ATP, ADP und P_i , die sich zudem im Verlauf einer Syntheserunde verändern. Dies wird durch ihre unterschiedliche räumliche Stellung zur rotierenden γ -Untereinheit hervorgerufen (Nakamoto et al., 2000). Wahrscheinlich ist auch die Interaktion mit jeweils einer von zwei weiteren Untereinheiten δ und ε für dieses Verhalten verantwortlich. Weitere, mit dem Enzymkomplex assoziierte Untereinheiten wie e und g in Rind und Hefe (Belogradow et al., 1996) sowie i/j in Hefe (Arnold et al., 1999) haben strukturgebende Funktionen.

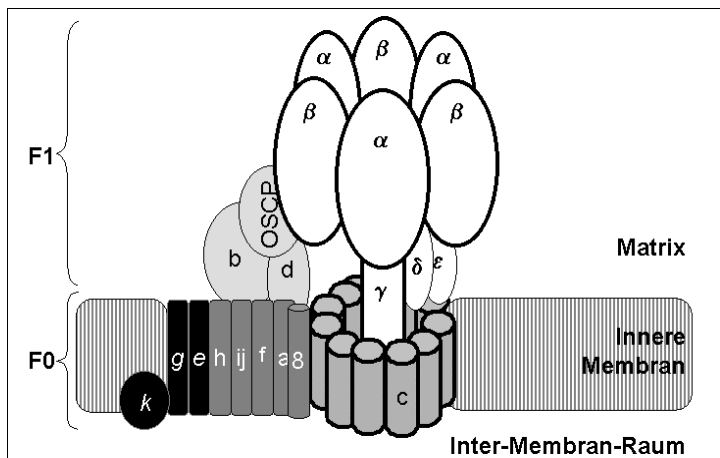


Abbildung 1-2 Schematischer Aufbau der F1F0-ATPase in Hefe (modifiziert nach Devenish et al., 2000). Der F1-Teil (weiß) wird aus den Untereinheiten $\alpha[3]$ und $\beta[3]$ sowie dem zentralen Stiel, bestehend aus $\gamma[1]$, $\delta[1]$ und $\varepsilon[1]$, gebildet. Der F0-Teil setzt sich aus dem Protonenkanal $c[9-12]$ (mittelgrau), einem Statorstiel (hellgrau) aus $b[1]$, OSCP[1] und $d[1]$ sowie weiteren, jeweils einmal vorkommenden Untereinheiten δ , a , f , i/j , h (dunkelgrau) zusammen. Die Untereinheiten e und g dienen der Dimerisierung des Enzymkomplexes (schwarz). Die Funktion von k ist unbekannt. Stöchiometrische Ziffern in eckigen Klammern.

Der F1F0-Enzym-Komplex arbeitet als molekularer Motor mit zwei verschiedenen Rotoren. Der F0-Rotor, dessen 12 c-Untereinheiten die Rotation gegenüber a durchführen, erhält seinen Antrieb aus der Protonenmotorischen Kraft. Der F1-Rotor, der aus der Untereinheit γ besteht und sich innerhalb des Statorzylinders $\alpha_3\beta_3$ dreht, kann die bei der ATP-Hydrolyse freigesetzte Energie in ein Drehmoment umwandeln, dessen Richtung umgekehrt ist zu dem von F0 erzeugten Drehmoment (Oster und Wang, 2000). Diese Rotation konnte im Mikroskop anhand der Bewegung fluoreszenzmarkierter

Aktinfilamente, die an die γ -Untereinheit gekoppelt waren, beobachtet werden (Kinosita et al. 1998). Treibt der F₀-Rotor mit seiner Drehung den F₁-Rotor zur Drehung im gleichem Drehsinn an, kann ATP gebildet werden. Jeder der Rotoren kann die Umkehrung der Drehrichtung des anderen Rotors und damit die Umkehrung seiner Funktion bewirken. Die Umkehrung der F₀-Drehrichtung führt zum Pumpen von Protonen, während die Umkehrung der F₁-Drehrichtung zur Funktionsumkehr der ATP-Hydrolase in eine ATP-Synthase führt. Diese Reversibilität findet ihre Bestätigung in der hohen Strukturähnlichkeit von F-ATPasen und V-ATPasen. Letztere arbeiten als Protonenpumpen in den kontraktilen Vakuolen, im Golgi-Apparat und den Lysosomen zur Erzeugung eines niedrigen pH-Wertes nach ähnlichen Mechanismen (Review Nelson und Harvey, 1999).

Die Untersuchung der Molekülarchitektur des ATPase-Komplexes war das Ziel unterschiedlicher experimenteller Ansätze. Eine gute Übersicht über Untersuchungen zur Organisation und Assemblierung des F₀-Komplexes in Hefe gibt das Review von Velours et al., (2000). Für die Aufklärung des bovinen F₀-Teils war der Einsatz Untereinheiten-spezifischer Antikörper zur Markierung von intakten Mitochondrien, von Mitoplasten (Mitochondrien ohne äußere Membran), von submitochondrialen Partikeln (SMP, "inside-out" Vesikel) und von ASU-Partikeln (SMP, durch Ammoniumsulfat und Harnstoff von F₁ befreit; Hekman et al., 1991; Belogradov et al., 1996) vor und nach Protease-Verdau erfolgreich. In einem anderen Ansatz wurden durch Kopplung von GFP an diverse Untereinheiten des Hefe-Komplexes Fusionsproteine gebildet, die die endogenen Proteine funktionell ersetzen konnten. Dadurch konnte die dynamische Interaktion einzelner Untereinheiten mittels Fluoreszenz-Energie-Transfer (FRET) beobachtet werden (Review Devenish et al., 2000). Schließlich wurde durch "Blue Native" Gel- Elektrophorese in Hefe nachgewiesen, daß der Komplex neben dem 500 kDa-Monomer ein dominierendes Homodimer von etwa 1 MDa bildet (Arnold et al., 1998). An Minus-Mutanten, die einige Untereinheiten nicht exprimieren und daher nur das Monomer bilden, konnte gezeigt werden, daß ein Dimer für eine normale Enzymaktivität der ATPase nicht zwingend notwendig ist - diese Mutanten wiesen die gleiche Aktivität auf wie Dimere bildende Zellen - das Dimer scheint jedoch stabiler gegenüber Proteolyse zu sein. Eine Dimerisierung wird auch für die bovine ATPase diskutiert (Cabezón et al., 2000b).

Die mitochondriale F₁F₀-ATPase setzt sich nur zu einem sehr geringen Teil aus mitochondrial kodierten Proteine zusammen. Die Lokalisation der einzelnen Gene – im Kern oder Mitochondrien - ist Organismus-spezifisch (für *D. discoideum*: Ogawa et al., 2000). In Hefe wie in *Dictyostelium* sind die zu F₀ beitragenden Gene ATP6, 8 und 9 mitochondrial kodiert. Die anderen F₀- sowie alle F₁-Komponenten sind, mit Ausnahme von ATP1 in *Dictyosteli-*

um, der α -Untereinheit von F₁, im Kern kodiert und müssen daher in die Mitochondrien transportiert werden (Kapitel 1.2).

1.1.3 Regulierende Proteine der ATPase – Inhibitoren und Stabilisatoren

Mitochondriale F₁F₀-ATPase-Inhibitoren, von denen einer in dieser Arbeit beschrieben wird, binden die mitochondriale ATPase bei Abwesenheit eines Protonengradienten, also im ATP-Hydrolyse-Modus, und hemmen so die ATP-Hydrolyse. Dies ist notwendig bei Ausfall der oxidativen Phosphorylierung, um einen für die Zelle gefährlichen ATP-Verlust durch die Hydrolyse-Aktivität des Enzyms und damit eine bis zum Zelltod führende Zellschädigung zu vermeiden (Green und Grover, 2000).

Der erste Vertreter der ATPase-Inhibitor-Familie wurde aus Mitochondrien von Rinderherzen gereinigt (Pullman und Monroy, 1963) und biochemisch analysiert. Seitdem hat man ähnliche Proteine aus verschiedenen Einzellern sowie aus stoffwechselaktiven Geweben von mehrzelligen Organismen gewonnen, so aus Leberzellen der Ratte (Cintron und Pedersen, 1979), Skelettmuskelzellen (Yamada et al., 1980) sowie aus Hefe (Ebner und Maier, 1977; Hashimoto et al., 1981b) und später die DNA-Sequenzen ermittelt (Kapitel 2.3.1). Ähnliche Inhibitoren wurden aus Chloroplasten (Nelson et al., 1972) und Bakterien (Nieuwenhuis und Bakkenist, 1977) erhalten. Durch systematisches Screening von Genbibliotheken wurden weitere homologe Gene in Organismen verschiedener taxonomischer Klassen identifiziert, u.a. im Menschen (Ichikawa et al., 1999), im Schwein (*Sus scrofa*, Wintero et al., 1999, Genbank NCBI), in der Spalthefe (*Schizosaccharomyces pombe*, Wood et al., 1999, Genbank NCBI), in Reis (*Oryza sativa*, Nakazono, et al., 2000), in der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*, Bevan et al., 2000; Nakamura et al., 2000, Genbank NCBI) und im Seidenspinner (*Bombyx mori*, Ogura et al., 2001, Genbank NCBI). Die beiden am besten charakterisierten Vertreter sind die aus Rind (Review Green und Grover, 2000) und Hefe. Die Proteinsequenz des reifen Hefe-Inhibitors wurde schon sehr früh durch Festphasen-Sequenzierung des gereinigten Proteins ermittelt (Matsubara et al., 1981), die der Präsequenz ebenso nach vorgeschalteter *in vitro* Translation (Yoshida et al., 1983a).

In Hefe existieren mit STF1 und STF2 neben dem Inhibitor INH1 weitere, die ATPase-Aktivität regulierende Proteine. Der auch 9K-Protein genannte Inhibitor STF1 (Matsubara et al., 1983) ist mit 51% identischen bzw. 67% ähnlichen Aminosäuren sehr homolog zu INH1, hat aber eine geringere Affinität zur ATPase. Das 15K-Protein STF2 (Hashimoto et al., 1984; Yoshida et al., 1984 und 1990) unterscheidet sich stärker in Sequenz und 3D-Struktur von INH1 und STF1 (Tagawa et al., 1986). INH1 und STF1 sowie Abschnitte von STF2 haben signifikante Ähnlichkeit mit der ϵ -Untereinheit der prokaryotischen F₁F₀-ATPase, die inhibie-

rend auf die bakterielle F1F0-ATPase wirkt und als der evolutionäre Ausgangspunkt für F1F0-ATPase-Inhibitor- und Regulatorproteine in vielen Organismen gilt. STF2 hat außerdem Ähnlichkeit mit der δ -Untereinheit der bovinen ATPase (Hashimoto et al., 1984; Solaini et al., 1997; Okada et al., 1986). Die Übereinstimmung zwischen den Inhibitoren verschiedener Organismen liegt in einer vergleichbaren Größenordnung wie die zwischen INH1 zu STF1, nur die Säuger-Inhibitoren sind noch stärker konserviert.

STF steht für stabilisierender Faktor. Im Gegensatz zu STF2, dem nur die Stabilisierung des Protein-Komplexes aus INH1 und ATPase, aber keine inhibitorische Wirkung zugeschrieben wird (Hashimoto et al., 1990b), hemmt STF1 die ATPase-Aktivität (Cabezón et al., 2002; Venard et al., 2003). Andere Autoren schließen eine inhibitorische Aktivität von STF1 zwar nicht aus, gehen aber bevorzugt von einer stabilisierenden Funktion von STF1 im Zusammenspiel mit STF2 aus, wobei das Zusammenwirken beider Faktoren effektiver sei als die Wirkung nur eines Faktors (Matsubara et al., 1983; Hashimoto et al., 1984, 1990a, 1990b). Ein kooperatives Verhalten wird auch für die Interaktion aller drei regulatorischen Proteine beschrieben – die gemeinsame Bindung von INH1, STF1 und STF2 an die ATPase beschleunigt die Deaktivierung des Enzyms (Tagawa et al., 1986), wobei dies keine unmittelbare Folge der Bindung des Inhibitors ist, sondern die Konversion des IF1-F1-Komplexes in eine inaktive Form erfordert (Schoupe et al., 1999). Hinsichtlich der Rezeptorstelle an der ATPase unterscheiden sich die inhibitorischen Proteine von dem ausschließlich stabilisierend wirkenden Faktor: STF2 bindet an die F0-Untereinheit, INH1 und STF1 dagegen an F1 (Hashimoto et al., 1987). In Experimenten *in vitro* wurde gefunden, daß der Hefe-Inhibitor INH1 sowohl an die α - als auch an die β - Untereinheit des Enzyms koppelt (Ichikawa et al., 1996), ebenso der Inhibitor aus *Candida utilis* (Dianoux und Hoppe, 1987). Bei dem Inhibitor aus Rind ist man unterschiedlicher Auffassung: Klein favorisiert die Bindung ausschließlich an β (Klein et al., 1980), andere an den Zwischenraum von α und β (Mimura et al., 1993; Hashimoto et al., 1995).

1.2 Zielsteuerung, Prozessierung und Faltung mitochondrialer Proteine

1.2.1 Untersuchung von Transportmechanismen

Etwa 99% aller mitochondrialen Proteine sind in der Kern-DNA kodiert und werden an freien Ribosomen im Zytoplasma als Präproteine synthetisiert (Lill et al., 1996). Das bedeutet, daß die Proteine zunächst in einer Vorläuferversion existieren, bestehend aus der für die künftige physiologische Bestimmung notwendigen Sequenz und einer zusätzlichen Targeting-Domäne, der Präsequenz. Die Präproteine durchlaufen von ihrer Synthese bis zur "Reife" einen mehrstufigen Prozeß: Sie werden in die Mitochondrien dirigiert, über die mitochon-

driale "Translokationsmaschinerie" auf die mitochondrialen Subkompartimente, d.h. die äußere Membran, die innere Membran, der Intermembranraum zwischen beiden Membranen und die Matrix verteilt (Kapitel 1.2.2), und schließlich durch die mitochondriale "Faltungsmaschinerie" und Prozessierung in den physiologisch aktiven Konformationszustand gebracht, wobei viele Proteine mit einer Reihe von zytosolischen und mitochondrialen Chaperonen interagieren (Kapitel 1.2.3, 1.2.4).

Die einzelnen Schritte von der Proteinsynthese bis zum Einbau in die mitochondrialen Kompartimente wurden im Wesentlichen an *Neurospora crassa* und Hefe aufgeklärt, laufen aber in höheren Pflanzen (Glaser et al., 1998) und Säugerzellen (Komiya und Mihara, 1996) nach sehr ähnlichen Mechanismen ab. Mit dem Ziel, die für Import und Prozessierung essentiellen Aminosäure-Reste bzw. Sequenz-Motive aufzudecken, werden sogenannte Passenger-Proteine, gekoppelt an ihre eigenen oder fremde Präsequenzen, natürlichen oder artifiziiellen Ursprungs, in nativer oder mutierter Form untersucht. Mutierte Proteine weisen struktur- oder ladungsverändernde Austausch einzelner Reste oder N- und C-terminale Verkürzungen auf. Nach ihrem Import werden diese Proteine entweder direkt in Extrakten von Mitochondrien oder nach gezieltem Protease-Verdau von Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln immunologisch nachgewiesen. Dadurch werden selektiv nur die außerhalb der jeweiligen Membran liegenden Moleküle abgebaut, und importierte Moleküle können von nicht importierten unterschieden werden (Allison und Schatz, 1986; Chaumont et al., 1990; Hekman et al., 1991; Tanudji et al., 1999). Ein weiterer Ansatz ist die Markierung von Proteinen mittels fluorochromer Moleküle wie GFP (zu GFP siehe Kapitel 1.4; Yano et al., 1997; Kanazawa et al., 1997). Einige genetische und biochemische Arbeitsansätze, die den Untersuchungen der Protein- Import- Maschinerie in *S.cerevisiae* zugrundeliegen, wurden von Kübrich und Kollegen in einer Übersicht zusammengestellt (Kübrich et al., 1995). Die gewonnenen Informationen konnten zu den folgenden Konzepten über mitochondriale Transportwege zusammengeführt werden (Lill et al., 1996; Neupert, 1997; Káldi und Neupert, 1998; Haucke und Lithgow, 1997).

Der allgemeine Importweg beschreibt nacheinander ablaufende Prozesse mit der Direktion des Proteins in die Matrix: **1)** Synthese der Präproteine an zytosolischen Ribosomen und Abgabe in das Zytosol. **2)** Transfer zu den Mitochondrien unter Assemblierung mit zytosolischen Faktoren zur Erhaltung der Importkompetenz und Vermeidung von Aggregation. **3)** Erkennung der Targeting-Domäne durch die Importrezeptoren an der Oberfläche der äußeren Membran. **4)** Initiierung des Transfers durch den Präprotein-Translokasekomplex der äußeren Membran TOM. **5)** Interaktion von Präprotein und Oberfläche der inneren Membran und Eintritt in den Translokasekomplex TIM, getriggert durch das Membranpotential

($\Delta\Psi$). **6)** Abschluß der Translokation durch TOM und TIM durch das ATP-abhängige mt-HSP70-Transport-System. **7)** Proteolytische Prozessierung von Prä-Proteinen, die Targetingsignale tragen durch MPP. **8)** Faltung in den physiologischen Konformationszustand mit Hilfe des mitochondrialen Chaperone-Systems (mt-Hsp70, mt-Hsp60, Co-Chaperone) in der Matrix.

Spezielle Transportwege haben die drei anderen mitochondrialen Kompartimente zum Ziel und werden entweder im Anschluß an den Transport in die Matrix oder unabhängig davon beschriften, d.h. unter Umgehung der Matrixpassage.

1.2.2 Targeting – Domäne, Import und Verteilung in Kompartimente

Vor ihrem Einbau in die Mitochondrien-Kompartimente müssen die Präproteine vom Zytosol in die Organellen transportiert werden. Targeting-Sequenzen sind dabei notwendige Signale, die der Zielerkennung beim Zuordnen mitochondrialer Proteine zu ihrem Bestimmungsort dienen. Bei 60% bis 70% der mitochondrialen Proteine findet sich eine solche Targeting-Sequenz an deren N-Terminus, von denen die überwiegende Mehrheit proteolytisch prozessiert wird. Interne Targeting-Sequenzen, also Signale innerhalb der Peptidkette, besitzen die meisten Proteine der TIM- und TOM-Komplexe (Neupert, 1997, Abbildung 1-3).



Abbildung 1-3 Lokalisation mitochondrialer Targeting-Sequenzen im Protein.

Bei Sequenzvergleichen der als mitochondrial dirigierend bekannten Peptide konnten keine konservierten Aminosäureabfolgen entdeckt werden. Trotzdem haben diese Peptide eine charakteristische Zusammensetzung. So enthal-

ten sie sehr viele basische Aminosäuren (Lysin (K) und Arginin (R)), mehr oder weniger alternierend dazu hydrophobe Reste wie Leucin (L) und Isoleucin (I) sowie einen hohen Anteil an Serin (S) und Threonin (T), aber keine oder nur sehr wenige saure Reste. Diese Zusammensetzung ermöglicht vielen Präsequenzen die Ausbildung einer mehr oder weniger „klassischen“ amphiphilen Helix in Membranen oder lipophiler Umgebung (Von Heijne, 1986). Das kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß ihre Funktion nicht durch die Sequenz sondern durch die Sekundärstruktur determiniert ist. Die in wäßrigem Milieu strukturlosen Peptide nehmen in Lipid-Micellen helicale Formen an. Die amphiphile Helix dient der Bindung an die mitochondrialen Importrezeptoren. Bedingung für ihre Erkennung ist ihre Präsentation an der Oberfläche des Proteins (Sjöling und Glaser, 1998).

Nach Bindung des Präproteins an Rezeptoren auf der äußeren Membran über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen (Haucke und Lithgow, 1997) wird es in die Mitochondrien durch eine Translokations-Maschinerie, bestehend aus den Haupt-Protein-Komplexe TOM und TIM (zur Nomenklatur: Pfanner et al., 1996), transportiert. TOM enthält zwei Gruppen von Rezeptoren, einer für die Bindung aminoterminaler positiv geladener Targeting-Domänen, und ein anderer für hydrophobe Proteine mit internen Targeting-Sequenzen. Ein kooperatives Zusammenspiel beider Rezeptortypen wird diskutiert (Káldi und Neupert, 1998; Haucke und Lithgow, 1997). Zum lateralen Transport dienen Importkanäle, sogenannte Translokations-Poren. Nach der Bindung am Rezeptor hängen der weitere Transportweg und Transportmechanismus von der Art der Signal-Sequenzen und damit vom Zielkompartiment ab. Folgende Varianten werden diskutiert:

(1) DAS PROTEIN TRÄGT NUR EINE N-TERMINALE TARGETING-SEQUENZ.

Proteine die in die Matrix transportiert werden sollen, treten unter Ausnutzung des Protonengradienten an den Kontaktstellen von äußerer und innerer Membran bzw. über bestimmte TIM-Proteine vollständig oder partiell in die Matrix ein. An der Matrixseite der inneren Membran interagiert ein Komplex aus einem peripheren TIM-Protein und mt-Hsp70 mit dem Präprotein und leitet dort das sich anschließende Faltungs- und Prozessierungsverfahren ein (Komponenten der "Faltungs- und Degradations-Maschinerie" siehe Kapitel 1.2.3, 1.2.4). Das Ergebnis ist ein reifes, also enzymatisch aktives Protein. Proteine der äußeren Membran und einige Proteine des Intermembranraumes werden direkt vom TOM-Komplex an ihren Bestimmungsort entlassen.

Für ein Protein mit einer N-terminalen Targeting-Sequenz und einer zweiten internen Signal-Sequenz, die sich häufig direkt anschließt, bestehen verschiedene Möglichkeiten der Verteilung, entsprechend der Funktionsweise der zweiten Signal-Sequenz (Abbildung 1-3).

(2) DAS PROTEIN TRÄGT SOWOHL EINE N-TERMINALE ALS AUCH EINE INTERNE TARGETING-SEQUENZ.

Diese Präproteine werden zunächst in die Matrix transportiert, wo ihre aminoternale Targeting-Domäne abgespalten wird. Daraufhin wird eine zweite Signal-Sequenz freigelegt, die das Protein in die innere Membran oder in den IMS rückdirigiert. Der Export in IM und IMS erfolgt nach vergleichbaren Mustern wie der Export von mitochondrial kodierten Proteinen, die an Ribosomen in der Mitochondrien-Matrix synthetisiert werden.

(3) DAS PROTEIN TRÄGT EINE N-TERMINALE TARGETING-SEQUENZ UND EINE INTERNE ANKER-SEQUENZ, DIE SELBST NICHT ALS TARGETING-SEQUENZ WIRKT.

Solche Proteine treten partiell in die innere Membran ein, werden aber durch die hydrophobe Ankersequenz, die an den TIM-Komplex bindet, am Weitertransfer gehindert, was als "Stop-Transfer-Mechanismus" bezeichnet wird. Die N-terminale Targeting-Sequenz wird in der Matrix prozessiert. Wird die Ankersequenz anschließend proteolytisch abgespalten, entsteht ein IMS-Protein (Lill et al., 1996).

(4) DAS PROTEIN HAT EINE INTERNE SIGNAL-SEQUENZ, ABER KEINE PROZESSIERBARE N-TERMINALE TARGETING-DOMÄNE.

Diese Proteine benutzen einen verkürzten Weg über den zweiten Typ von TIM-Translokase, der nachgeschaltete Faltungs- und Prozessierungsschritt entfällt und das Protein wird innerhalb der inneren Membran an seinen endgültigen Bestimmungsort verschoben.

1.2.3 Chaperone bei der Translokation und der Faltung von Proteinen

Beim Durchtritt des Präproteins durch die innere Membran und seiner Modifikation in der Matrix spielen Chaperone, Chaperonine und Proteasen eine bedeutende Rolle (Martin, 1997). Ein importiertes Präprotein wird an das mitochondriale Faltungs- und Degradationssystem weitergegeben, wo es während der Prozessierung kaskadiert diverse Bindungs- und Dissoziationsschritte über die Chaperone Hsp70, 60 und 10 durchläuft. Nach der Dissoziation des Präproteins vom mt-Hsp70-Komplex wird es durch Hsp60 unter ATP-Verbrauch und Regulation durch Hsp10 in seinen nativen Zustand gebracht. Hsp60 und Hsp10 sind essentiell für die korrekte Proteinfaltung sehr vieler mitochondrialer Proteine (Höhfeld und Hartl, 1994). Beispielsweise sind Defekte in Hsp60 für die falsche Faltung der β -Untereinheit der F1F0-ATPase verantwortlich, und Defekte in Hsp10 führen zur Mißfaltung der α -Untereinheit von MPP.

Für den vollständigen Durchtritt eines Präproteins durch die innere Membran werden derzeit zwei Modelle diskutiert (Voisine et al., 1999; Pilon und Schekman, 1999), bei denen mt-Hsp70-Moleküle eine zentrale Rolle einnehmen. Das "TRAPPING MODELL" ("BROWNIAN RATCHET MODELL") geht davon aus, dass das Polypeptid spontan, gemäß der Brownschen Bewegung, durch den Membrankanal diffundiert. Nach ATP-Hydrolyse wird der Komplex aus mt-Hsp70 und ADP stabil an das Peptid gebunden und dessen Rückwärtsbewegung unterbunden. Dieses Modell setzt voraus, dass mehrere mt-Hsp70-Moleküle nacheinander wie auf einer Perlenschnur mit dem Peptid interagieren. Das "PULLING-MODELL", in dem mt-Hsp70 als Motorprotein das Peptid aktiv durch den Kanal zieht, erfordert die temporäre Bindung von mt-Hsp70 über das TIM-Protein 44 an die trans-Seite des Kanals und trägt das Risiko, dass

das Protein bei einem Nukleotid-Austausch an Hsp70 und nachfolgender Ablösung des Chaperones zurückgleitet. Dieses Modell gilt als das wahrscheinlichere.

1.2.4 Matrix-Processing-Peptidase (MPP) und proteolytische Spaltstelle

Die Bildung einer nativen Proteinstruktur führt meistens über die proteolytische Abspaltung der Targeting-Domäne durch die intramitochondriale Protease MPP. Die Abspaltung der Targeting-Domäne erfolgt bereits bei der Interaktion des Präproteins mit dem Komplex aus TIM44 und mtHsp70 und findet noch vor der Übertragung des Proteins auf den Hsp60/10-Komplex ihren Abschluß. Der Faltungsprozeß wird durch die Abspaltung der Targeting-Domäne beschleunigt (Martin, 1997). Gewöhnlich ist das Enzym MPP in der Matrix lokalisiert (Säuger, Pilze). In höheren Pflanzen ist es jedoch als Teil des Cytochrom bc1-Komplexes direkt mit der inneren Membran assoziiert (Glaser et al., 1996; Sjöling und Glaser, 1998, Glaser und Dessi, 1999). Diese Tatsache wird als Indiz für die Prozessierung in der Frühphase des Transports gewertet. Die Affinität des Enzymdimers zu Präsequenzen ist etwa 30x höher als die des Monomers (Kojima et al., 1998).

MPP, eine Metalloendoprotease, besteht aus zwei nichtidentischen Untereinheiten, α -MPP und β -MPP, mit einer ungefähren Masse von je 50 kDa (Luciano und Géli, 1996). Das Enzym agiert durch Kooperation der beiden Untereinheiten (Luciano et al., 1997), wobei die Untereinheit α -MPP wahrscheinlich ein durch die Präsequenz gebildetes 3D-Motiv (Anastasi et al., 1993) erkennt und diese Präsequenz der katalytischen Untereinheit β -MPP präsentiert (Kitada et al. 1995). Für die Interaktion zwischen MPP und Präprotein kommen drei Mechanismen in Frage:

(1) DIE ELEKTROSTATISCHE ANZIEHUNG.

Aufgrund der Ladungsgegensätze wirken zwischen den sauren Resten von MPP und den basischen Resten in der Präsequenz elektrostatische Anziehungskräfte (Kitada und Ito, 2001).

(2) DIE ERKENNUNG SPEZIELLER MOTIVE.

MPP erkennt Prozessierungsstellen, die an bestimmten, die Schnittstelle umgebenden Positionen Arginin-Reste tragen, nämlich an den Positionen -2, -3 und/oder -10 relativ zur Schnittstelle. In manchen Fällen sind diese Arginine sogar essentiell für die Proteolyse. Der proximal zur Schnittstelle gelegene Argininrest (Positionen -2 oder -3) wird als Interaktionspartner der katalytischen Stelle von β -MPP diskutiert und ist sehr sensibel gegenüber Mutationen. Distal gelegene Arginin-Reste werden zur Erkennung durch die α -MPP-Untereinheit

benutzt. Aber die Existenz eines "R-2" oder "R-3"-Motivs allein erzwingt die Proteolyse noch nicht.

(3) DIE AUSBILDUNG BESTIMMTER SEKUNDÄRSTRUKTUREN.

Der N-Terminus bildet vermutlich eine für die Funktion bedeutende Sekundärstruktur. Deletionen der N-terminalen Domäne in Säuger- und Hefe-Präsequenzen führen zur Verminderung der Prozessierungseffizienz, vermutlich durch Reduktion der Anzahl basischer Aminosäuren, denen eine Konformationsstabilisierende Funktion zugeschrieben wird (Song et al., 1996). Da C-Termini von Präsequenzen, die eine hohe Affinität zu MPP haben, helical sind (Sjöling et al., 1994), während in Präsequenzen mit geringer Affinität diese Helixbereiche fehlen (Sjöling et al., 1996), wird eine helicale Struktur als proteolysekompetente Konformation festgestellt. Es wurden auch Präsequenzen proteolytisch angegriffen, die mehrere kurze α -Helices (<11 Reste) enthielten, die über kurze flexible Linker, oft nur aus einem Prolinrest oder Tripeptid bestehend, verbunden waren. Im Gegensatz dazu scheinen Sequenzen mit ausgedehnten Helix-Bereichen gegen Prozessierung inert zu sein. Die Flexibilität durch die Linker gewährleistet also eine prozessierungskonforme Präsentation der Schnittstelle in der MPP-Enzymtasche, gemäß dem "induced fit" Modell. Es ist somit naheliegend, daß die C-terminale Sekundärstruktur einer Präsequenz neben der amphiphilen Struktur des N-Terminus einen Einfluß auf die Prozessierung hat. Viele Untersuchungen mittels künstlicher Präsequenzen oder Präsequenzen mit deletierten C-Termini, bei denen trotz funktionierenden Targetings und Imports keine Proteolyse stattfand zeigen, daß die jeweiligen Signale für Erkennung, Import und Spaltung verschieden sind, die bei sehr langen Präsequenzen wie sie in höheren Pflanzen vorkommen sogar lokal getrennt vorliegen können (Review Sjöling und Glaser, 1998).

1.3 *Dictyostelium discoideum* – ein Modellorganismus

Das Untersuchungsobjekt *Dictyostelium discoideum* ist eine Bodenamöbe aus der taxonomischen Klasse der Acrasiomyceten, die aus Waldbodenproben in North Carolina isoliert wurde (Raper, 1935). Die Zellen ernähren sich phagozytisch von Bakterien und vermehren sich durch mitotische Zellteilung (vegetative oder Wachstums- und Vermehrungsphase, Loomis, 1975). Bei Nahrungsverknappung wird ein Entwicklungs- und Differenzierungsprogramm ausgelöst, das über die Ausbildung eines vielzelligen Pseudoplasmodiums zu überdauerungsfähigen Sporen führt (Abbildung 1-4).

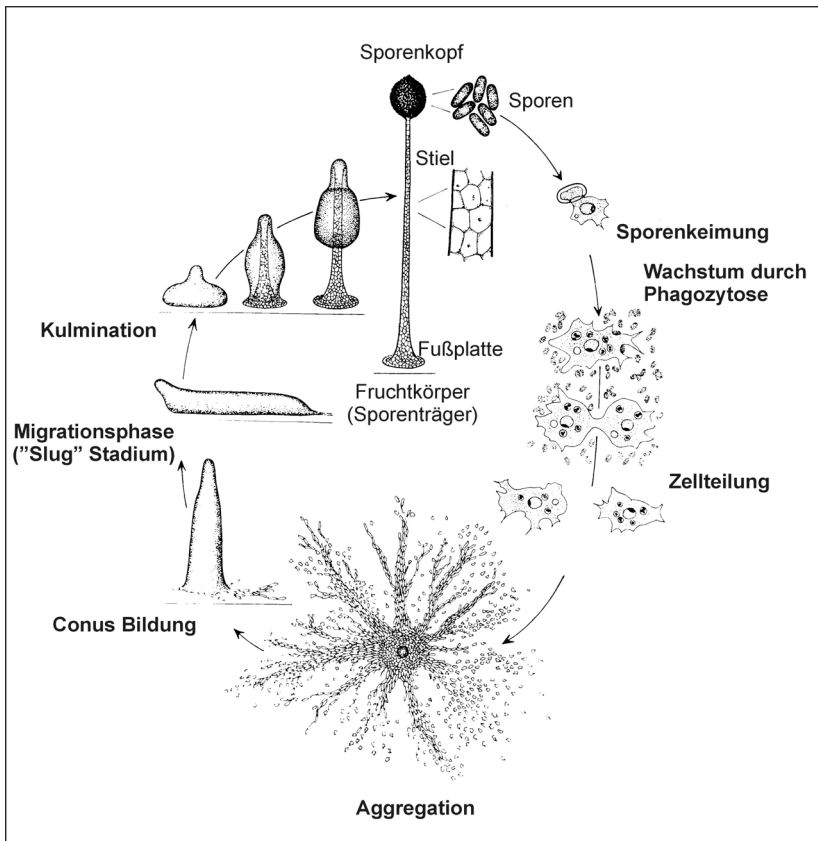


Abbildung 1-4 Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum* (aus Gerisch, 1965). Das Entwicklungsprogramm wird vom Beginn des Hungerns bis zur Ausbildung der Sporen in 24 Stunden durchlaufen.

Bei diesem Prozess spielt cAMP sowohl als intrazellulärer als auch als extrazellulärer Botenstoff eine zentrale Rolle (Reymond et al., 1995). *Dictyostelium*-Zellen sind einerseits in der Lage, cAMP mit Hilfe von cAMP-Rezeptoren (cAR) zu detektieren, was in der Zelle eine Signalkaskade induziert, und andererseits cAMP durch ein spezielles Sekretionssystem nach außen abzugeben (Gerisch et al., 1972). Einzelne Zellen beginnen, oszillatorisch cAMP zu sezernieren, wodurch andere Zellen sowohl zur eigen-

nen cAMP-Ausschüttung als auch zur positiv chemotaktischen Wanderung entlang des entstehenden Konzentrations-Gradienten in einem Spiralwellenmuster angeregt werden und Zellaggregate bilden (Gerisch, 1986; Reviews über Chemotaxis: Es und Devreotes, 1999; Parent et al., 1998; Manson und Segall, 1992, Firtel und Chung, 2000; Kriebel et al., 2003). Dafür ist sowohl eine eindeutige Zellpolarität und die Fähigkeit notwendig, auf den Konzentrationsgradienten mit einer gerichteten Bewegung zu reagieren (Chung et al., 2001; Firtel und Meili, 2000).

Das Pseudoplasmodium aus ca. 10^5 Zellen, die den Zell-Zell-Kontakt über die gesamte Zelloberfläche oder mittels des csA-Glykoproteins bevorzugt über die Zellspitzen (Beug et al, 1973; Coates und Harwood, 2001) herstellen, organisiert sich zu einem wurmartigen Körper. Dieser slug genannte Organismus weist bereits Merkmale der Differenzierung auf: Induziert durch morphogene Faktoren werden zelltypspezifische Gene selektiv exprimiert (Van Driessche et al., 2001; Gerisch, 1987). In den Zellen an der Spitze des slug wird eine Entwicklung zu Prästielzellen und in denen der mittleren und hinteren Bereiche zu Präsporen-

zellen ausgelöst. Der slug durchläuft eine Migrationsphase, in der er sich phototaktisch orientiert, im Licht aufrichtet und schließlich den Sporenträger mit Fußplatte, Stiel und Sporenkopf ausbildet. Die Prästielzellen vakuolisieren, ummanteln sich mit Zellulose und sterben schließlich ab. An dem so stabilisierten Stiel wandern die Präsporenzellen nach oben und bilden als Überdauerungsform Zellulose-ummantelte, stoffwechsellinaktive und gegenüber ungünstigen Bedingungen, insbesondere gegenüber extremen Temperaturen und Wassermangel, resistente Sporen. Diese können bei Verbesserung der Lage wieder zu vegetativen Amöben auskeimen.

Aus dem Wildtyp (Freilandisolat NC4, Raper, 1935) wurde durch Mutagenese ein Laborstamm gezüchtet, der sich auch in flüssigem Nährmedium, d.h. axenisch, kultivieren lässt – der Stamm AX2 (Watts und Ashworth, 1970). Diese Nahrungsgrundlage und kurze Generationszeit ermöglichen die einfache Anzucht großer Mengen an Zellmaterial unter definierten Bedingungen, wobei sich nahezu homogene Populationen mit annähernd synchroner Verhaltensweise der Individuen gewinnen lassen. Für biochemische Untersuchungen steht somit genügend Material zur Verfügung.

Der Eukaryont *Dictyostelium* enthält wesentliche partikuläre, membranöse, lösliche und filamentöse Strukturen einer tierischen Zelle: Kern, Centrosom, Ribosomen, Mitochondrien, Vakuolen, Lysosomen, Peroxisomen, Golgi-Apparat, Zytoplasmamembran, ER, Zytoplasma, Zytoskelett. Er durchläuft die zellbiologischen Prozesse des Wachstums und der Differenzierung, der Musterbildung, der Zellteilung, der Endo- und Exozytose, der Signaltransduktion, der Motilität, der Chemo-, Photo- und Thermotaxis und der Zell-Zell-Adhäsion. Darin zeigen die Zellen viele Gemeinsamkeiten mit höher entwickelten Organismen. So ergaben sich bezüglich der Aufnahme von Partikeln (Phagozytose) oder Flüssigkeiten (Pinozytose) Übereinstimmungen mit Säugerzellen (Maniak et al., 1995, Hacker et al., 1997). In ihren Bewegungsabläufen und dem chemotaktischen Verhalten ähneln die Zellen humanen Leukozyten und Makrophagen. Andererseits teilen sie Eigenschaften mit höheren pflanzlichen Zellen wie die Vakuolisierung der Stielzellen und die Ausbildung einer die Sporen und Stielzellen umgebenden Zellulosewand bei der Entwicklung. Das Prinzip der Konservierung der Funktion eines Proteins durch die Konservierung seiner Aminosäuresequenz lässt sich auch auf *D. discoideum* anwenden. Aus den in *Dictyostelium* erzielten Erkenntnissen lassen sich deshalb allgemeine Prinzipien ableiten und so auf die Vorgänge in höheren Organismen übertragen.

Diese Tatsachen begründen die zunehmende Bedeutung von *D. discoideum* als Modellsystem zur Untersuchung zellbiologischer Vorgänge. Daraus resultierte auch das Be-

dürfnis nach vollständiger Entschlüsselung seines Genoms. Die Sequenzierung des 34 Mb großen, auf 6 Chromosomen zu jeweils etwa 4-7 Mb verteilten (Cox et al., 1990; Loomis und Kuspa, 1997), sehr A-T-reichen (~77%) Genoms wurde im *D. discoideum* Genome Project vorangetrieben und ist mittlerweile abgeschlossen (<http://dicty.cmb.nwu.edu>).

1.4 Funktionsanalyse von Proteinen

Geeignete molekularbiologische Methoden, die Funktion eines Proteins zu untersuchen, sind die Ausschaltung des Gens oder die Unterdrückung der Expression, die Überexpression und die Mutation des Gens. Dazu bietet sich in *D. discoideum* die gezielte Manipulation einzelner Gene durch "Gene Targeting" mittels geeigneter Transformationsmethoden an (Nellen et al., 1984), die Punktmutationen ebenso wie die Verkürzung oder die vollständige Entfernung eines Gens aus dem Genom ermöglichen (Egelhoff et al., 1991; Schleicher, 1995). "Gene targeting" ist das Einbringen von einer *in vitro* veränderten Gensequenz durch homologe Rekombination mit ihrem genomischen Gegenstück (De Lozanne und Spudich, 1987; Witke et al., 1987). Im Gegensatz zur chemischen Mutagenese (Wallraff et al., 1986; André et al., 1989; Brink et al., 1990) läßt sich ein so gewonnener Phänotyp kausal auf das manipulierte Gen zurückführen. Wegen des haploiden Genoms von *D. discoideum* ist die Isolation der Rekombinanten vereinfacht, da der Phänotyp nicht durch das Produkt einer zweiten Genkopie beeinflußt wird.

Zur vollständigen Unterdrückung der Expression durch Inaktivierung des entsprechenden Gens werden zusätzliche DNA-Stücke in Form von Vektoren eingeführt ("Gene Disruption" in *Dictyostelium*: Witke et al., 1992; Cox et al., 1992; Haugwitz et al., 1994) oder endogene DNA-Abschnitte gegen inkomplette Sequenzen ausgetauscht ("Gene Replacement" in *Dictyostelium*: Manstein et al., 1989; de Hostos et al., 1993; Stoeckelhuber et al., 1996; Niewöhner et al., 1997). Eine weitgehende Reduktion der Translation kann durch Komplexierung der mRNA mit anti-mRNA ("anti sense RNA" Technik: Knecht et al., 1987; Haugwitz et al., 1994) erreicht werden. Mit REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) wurde eine weitere Methode zur Identifizierung neuer Gene und der Untersuchung ihrer Funktionen an *Dictyostelium* erfolgreich angewandt (Kuspa und Loomis, 1992). Die Überexpression eines artifiziellen Proteins zusätzlich zum endogenen Protein, aber auch die Expression im genetischen Hintergrund einer Minus-Mutante, erreicht man durch extrachromosomale (Leiting und Noegel, 1988) oder integrierende (Nellen et al., 1984) Expressionsvektoren.

Um solche Proteine *in vivo* sichtbar zu machen, werden fluoreszierende Markerproteine wie das GFP (Green Fluorescent Protein: Prasher et al., 1992) zur Fusion mit dem interessierenden Protein eingesetzt (in *Dictyostelium*: Fey et al., 1995; Maniak et al., 1995). Auf

diese Weise wird derzeit systematisch die intrazelluläre Lokalisation unbekannter Genprodukte aus humanen cDNA-Banken identifiziert (PROLOC: Hoja et al., 2000).

GFP aus der Meeresqualle *Aequorea victoria* ist ein aus 238 Aminosäuren bestehendes Protein, das eine 3D-Faß-Struktur aus antiparallelen β -Faltblättern und einem zentralen α -helicalen Heptapeptid bildet, das das Chromophor enthält (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996). GFP wird von dem Ca^{2+} -bindenden Äquorin (Kendall und Badminton, 1998), einem ebenfalls in dieser Qualle vorkommenden primären Photoprotein, *in vivo* gebunden. Diese Assoziation dient dem direkten Energietransfer von Äquorin auf GFP, wobei letzteres zur Fluoreszenz angeregt wird. Das Anregungsmaximum *in vitro* liegt bei 395 nm, das der Emission bei 508 nm (grün). Mittlerweile stehen eine Reihe von modifizierten GFP-Proteinen zur Verfügung, deren Exzitations- und Emissions-Wellenlängen verschoben sind (Review: Kendall und Badminton, 1998). Die Kombination dieser Varianten ermöglicht die synchrone aber getrennte Beobachtung mehrerer Proteine in einer Zelle. In dieser Arbeit wurde S65T-GFP eingesetzt, eine mutante GFP-Form, in deren Chromophor der Serin-Rest an der 65. Position durch Threonin ausgetauscht ist. Die Fluoreszenzintensität ist dadurch etwa 4 bis 6mal größer als im Wildtyp-GFP. Die Anregungswellenlänge ist von 395 nm (Blau) in den längerwelligen Bereich (489 nm) verschoben (Heim et al., 1995 und 1996). Dadurch erreicht man eine Reduzierung der Zellschädigung und des Bleicheffekts. Weitere fluorochrome Derivate sind YFP (Yellow Fluorescent Protein) und BFP (Blue Fluorescent Protein).

ERGEBNISSE

2 Aufklärung und Analyse der DNA- und Protein-Sequenz

2.1 Isolierung der cDNA aus Phagenklonen

Genbibliotheken, insbesondere Expressionsgenbanken, spielen für das Aufspüren unbekannter Gene eine bedeutende Rolle, so auch in dieser Arbeit für die Isolation des Gens *dmif1* in *D. discoideum*. Hier wurden zwei in λ gt11-Phagen konstruierte cDNA-Genbanken eingesetzt, die sich in einem Fall von poly(A)⁺-RNA aus vegetativen (t₀) AX2-Zellen und im anderen Fall von poly(A)⁺-RNA aus sich entwickelnden (t₄) AX3-Zellen ableiteten (zur Entwicklung von *Dictyostelium* siehe Kapitel 1.1; zur Genbank Kapitel 10.2.2). Die Bezeichnungen AX2 bzw AX3 stehen dabei für axenisch kultivierbare Laborstämme von *D. discoideum*. Zu Beginn erfolgte die Durchmusterung der Expressions-Banken mit monoklonalen Antikörpern zur Detektion einiger der exprimierten Proteine. Im weiteren Verlauf wurden die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen durch Hybridisierung mit einer DNA-Sonde identifiziert.

Der später zum Screening der Genbank verwendete monoklonale Antikörper mAk 236-173-2 aus der Hybridoma-Fusion 236/237 markiert in fixierten Zellen von *D. discoideum* neben perizellulären Höfen auch vesikelartige Strukturen innerhalb der Zellen. Mit dem Ziel, einige mit diesen Strukturen assoziierte unbekannte Proteine zu identifizieren, konnten durch das Durchmustern der t₀-Bank zunächst drei unabhängige Phagenklone isoliert werden (Klon F10 siehe Abbildung 2-1; Klone F9, F11 nicht gezeigt). Das jeweils im Phagengenom integrierte *Dictyostelium*-cDNA-Fragment wurde nach PCR-Amplifikation mit den Universal-Primern λ fw und λ rev sequenziert. Das Fragment F9 mit etwa 400 bp kodiert demnach für das ribosomale Protein S24; das Fragment F11 mit etwa 500 bp für das Enzym NADH-Oxidoreduktase. Beide Fragmente wurden, da beide Proteine bereits bekannt waren, nicht weiter untersucht.

Das mit etwa 600 bp größte Fragment F10 eines unbekanntes Proteins hat einen offenen Leserahmen (ORF) zur Kodierung von nominell 112 Aminosäuren. Es ist an beiden Enden durch synthetische Adapter bzw. Polylinker, mit Erkennungssequenzen für EcoRI, NotI und Sall, die durch die Konstruktion der λ gt11-t₀-cDNA-Bank eingebaut sind, begrenzt. Nach Entfernung der Polylinker durch Restriktionsverdau mit Sall wurde dieses Fragment radioaktiv mit [α -³²P]-dATP nach der „Random-Prime“-Methode markiert. Als Sonde wurde es in weiteren Screenings der t₀-Bank und zusätzlich einer t₄-Bank zur Suche nach Phagenklonen

mit längeren cDNA-Fragmenten eingesetzt. So konnten weitere 5 unabhängige Klone isoliert werden, von denen einer aus der t_4 -Bank (F68), die anderen aus der t_0 -Bank (F11/2, F18, F20 und F32) stammen. Die enthaltenen cDNA-Fragmente wurden wiederum mit den Universalprimern λfw und λrev sowie einigen internen Primern (p3, p5, p7, p9, p12) sequenziert (Abbildung 2-1).

Ein Teil der Klone stellte sich als defekt heraus, d.h. sie enthalten entweder Leserahmenverschiebungen (F32), sind im ORF unvollständig (F11/2, F20, F32), sind Mischklone (F18, F11/2) oder enthalten Basenaustausche innerhalb des ORF (F18).

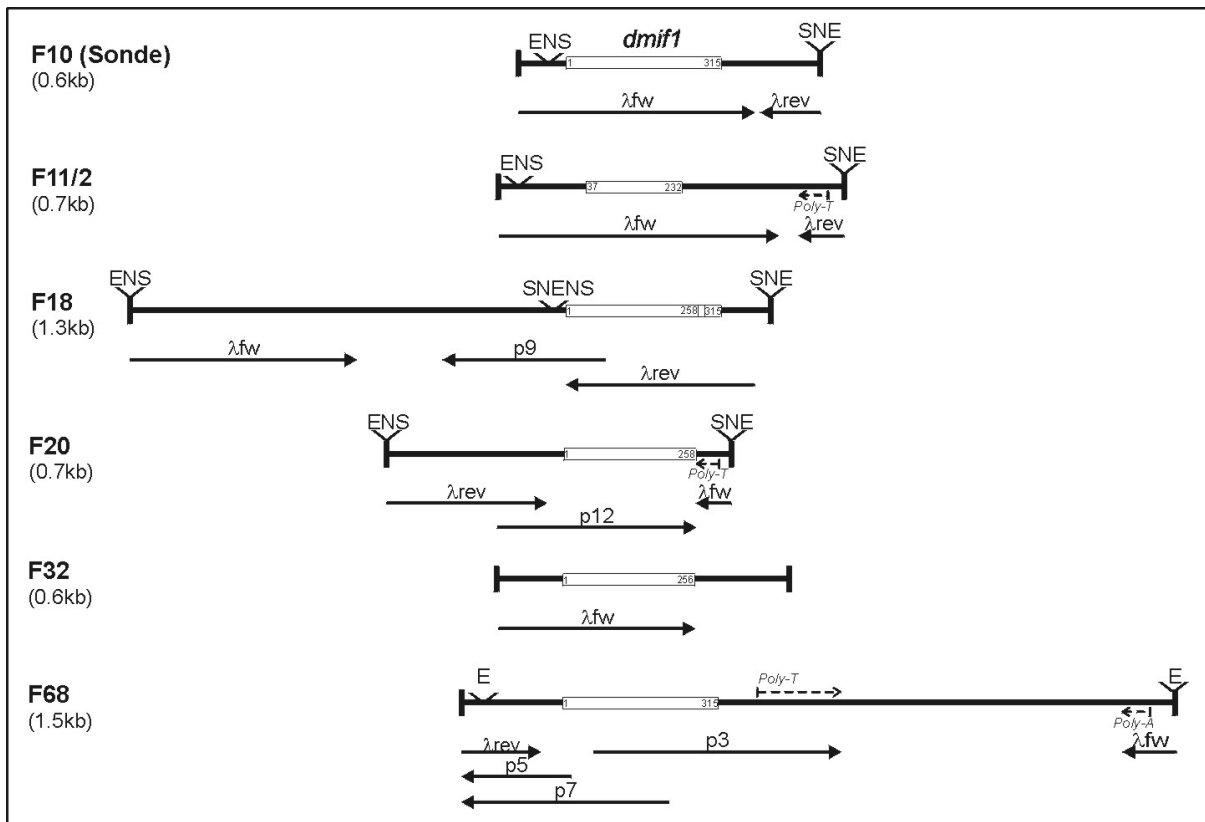


Abbildung 2-1 Sequenzierungsstrategie. Mit dem zuerst sequenzierten Klon F10 als Sonde wurden weitere 5 unabhängige Phagenklone identifiziert (F11/2 bis F68, schwarze Balken, Längenverhältnisse maßstabsgerecht). Die bei der Sequenzierung mit den Universalprimern (λfw und λrev) bzw. sequenzinternen Oligonukleotiden (p3, p5, p7, p9, p12) jeweils detektierten Bereiche sind als schwarz gefüllte Pfeile dargestellt; Regionen, aus denen das Protein DMIF1 abgeleitet wird, als weißer Kasten. Die Ziffern in den Kästen kennzeichnen die Nukleotide: A1 im Startkodon ATG ist das 1. Nukleotid, das letzte zur Proteinsequenz beitragende Nukleotid ist A315. ENS (am 5'-Ende) bzw. SNE (3'-Ende) stehen als Abkürzung für **E**coRI-**N**otI-**S**alI-Erkennungssequenzen in den synthetischen Adaptern (das Fragment F68 aus der t_4 -Bank enthält, konstruktionsbedingt, einen Linker mit nur einer EcoRI-Schnittstelle). Die Winkel markieren deren ungefähre Lage in der Sequenz. In manchen Phagenklonen wurden Poly-A/T-Bereiche identifiziert (gestrichelte Linien, deren Länge ungefähr dem detektierten Bereich entspricht).

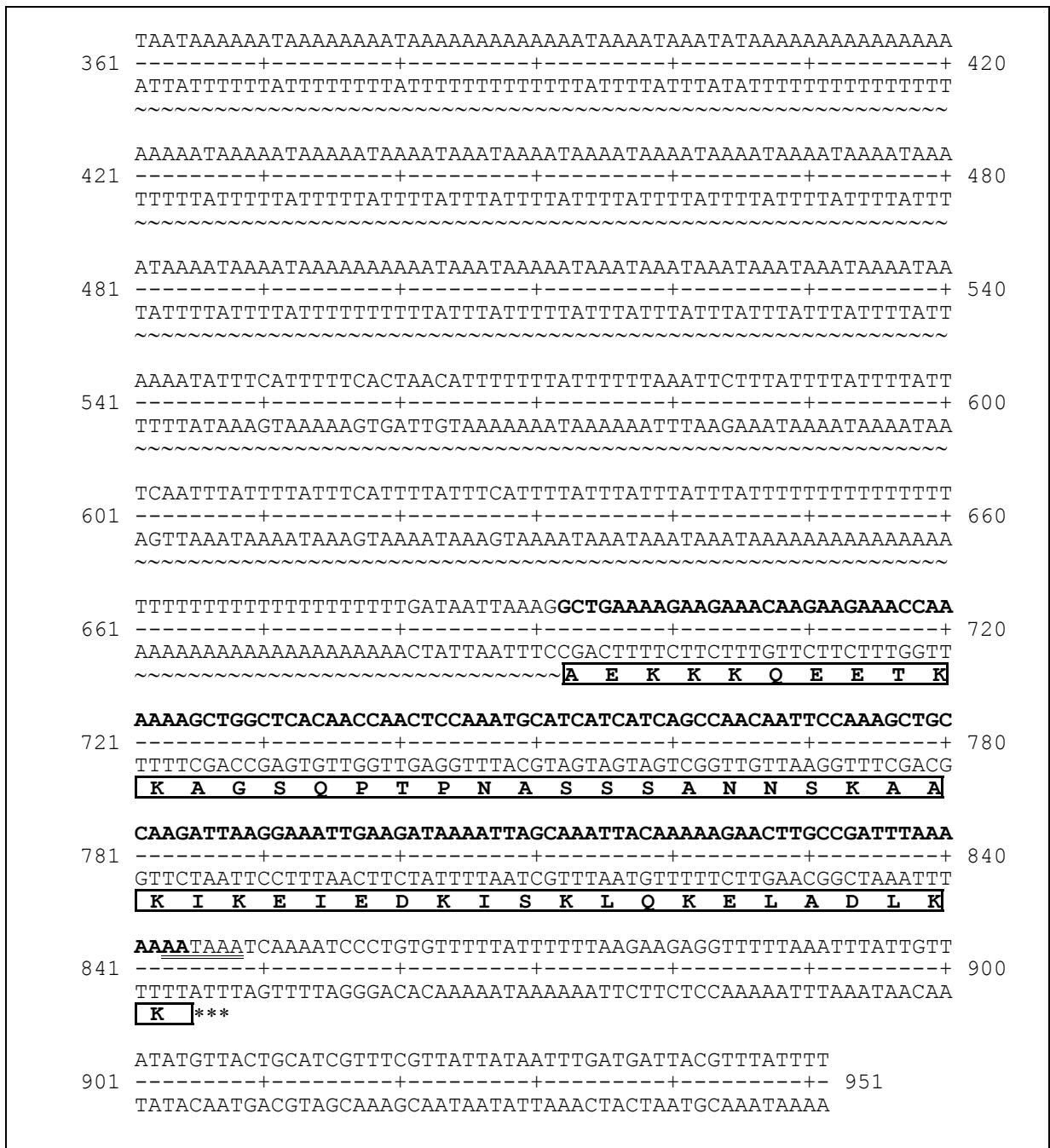


Abbildung 2-2 DNA- und abgeleitete Proteinsequenz: Der für die Proteinsequenz (eingerahmt) kodierende Leserahmen (fett) wird durch eine 296 bp lange Intronsequenz (Schlangenlinie) unterbrochen (Exon I: 162 bp, Exon II: 152 bp). Direkt am 5'UTR befindet sich eine, und 60 bp stromabwärts eine zweite potentielle Promotorsequenz (einfach unterstrichen), sowie in der Nähe des 3'-Endes ein Polyadenylierungs-Signal (doppelt unterstrichen), welches Teil des Stopkodons ist. Die cDNA-Klone F10 und F18 besitzen in 3'-Richtung zwei weitere potentielle Polyadenylierungssignale (nicht dargestellt).

Ein 296 bp langes AT-reiches Intron unterteilt den translatierbaren Bereich des DNA-Moleküls in zwei etwa gleich lange Stücke, die Exons I und II. Das Intron beginnt mit den Basen GT und endet mit AG. Dieser Bereich ist in allen Introns 100% konserviert und ist,

gemeinsam mit der Tatsache, daß dieser Sequenzbereich in der cDNA fehlt, ein eindeutiger Hinweis auf seine Existenz im hier untersuchten Gen. Die flankierenden Bereiche eines Introns sind nicht so konserviert, enthalten aber auch gehäuft bestimmte Basen (Abbildung 2-3A). Die in der *Dictyostelium*-Sequenz vorkommenden Abfolgen –ATG-GTA – und –AAG-GCT– (Abbildung 2-3B) weichen von dem am meisten verbreiteten Schema von Splice-Sequenzen teilweise ab.

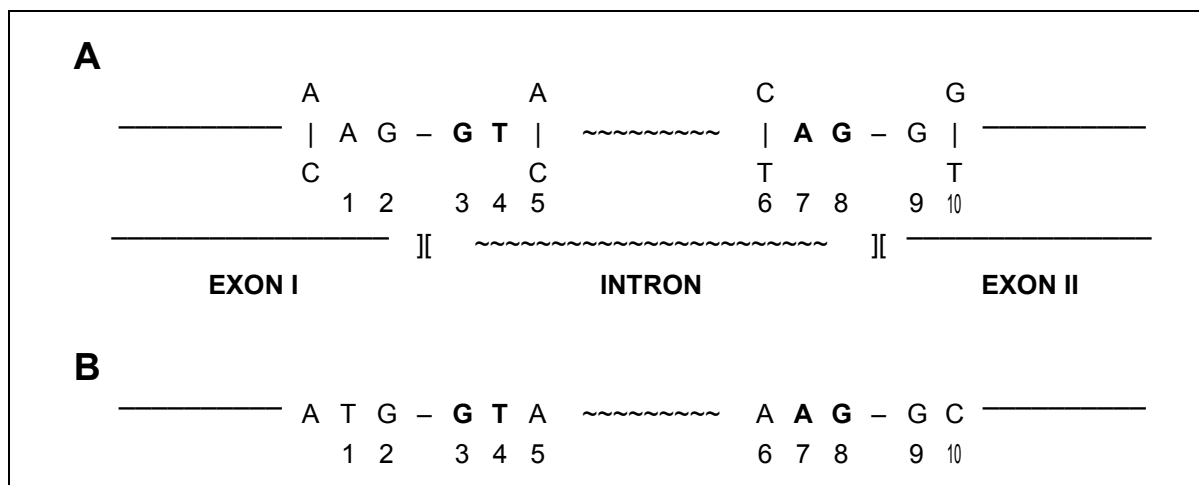


Abbildung 2-3 (A) Konservierte Basen in Intronsequenzen (aus Knippers 1997, modifiziert): ein Intron beginnt, nach der GT-AG-Regel, immer mit den Basen GT (Positionen 3 und 4, fett) und endet mit AG (Positionen 7 und 8, fett). Die weiteren vorangehenden und folgenden Basen kommen, entsprechend einer Untersuchung von mehreren Hundert Genen, unterschiedlich häufig vor: I. Basen vor dem Intronstart: Position 1: A → 60%, Position 2: G → 75%. II. Basen nach dem Intronstart: Position 5: A → 55%, C → 30%, Position 6: C → 74%, T → 21%. III. Basen nach dem Intronende: Position 9: G → 47%, Position 10: G → 32%, T → 38%. **(B) Exon-Intron-Grenzen im Gen von *D. discoideum***: Die konservierten Basen GT und AG werden hier neben verbreiteten Basen (Position 2: G → 75%, Position 5: A → 55%, Position 9: G → 47%) auch von Basen geringerer Häufigkeit eingerahmt (Position 1: T < 40%, Position 6: A < 5%, Position 10: C < 30%). Ein unterstützendes Indiz für dieses Intron im *Dictyostelium*-Gen *dmif1* ist seine Abwesenheit in der cDNA-Sequenz.

2.3 Analyse der Proteinsequenz

2.3.1 Das Genprodukt entspricht einem Inhibitor der mitochondrialen F1F0-ATPase

Die abgeleitete Proteinsequenz wurde mit Sequenzen aus verschiedenen Datenbanken (SwissProt, PIR, YeastDatabase, PDB, SPupdate, CDS) mit Hilfe der Analyseprogramme FASTA und BLASTP (Altschul et al., 1990, 1997) verglichen. Dabei ergaben sich Ähnlichkeiten mit einem mitochondrialen Protein, das inhibitorisch auf die ATPase-Funktion der mitochondrialen F1F0-ATP-Synthase wirkt (Abbildung 2-4).

Dieses inhibitorische Protein ist sowohl in Hefen (*Pichia jadinii*: Dianoux und Hoppe, 1987 und *Saccharomyces cerevisiae*: Matsubara et al., 1981, Yoshida et al., 1983a, Akashi et al., 1988; Ichikawa et al., 1990), in Trematoden (*Schistosoma mansoni*: Davis et al. 1995) und Nematoden (*Caenorhabditis elegans*: Spieth et al., 1993), in Säugerzellen (*Homo sapiens*: Ichikawa et al., 1999, *Rattus rattus*: Lebowitz und Pedersen, 1993, *Rattus norvegicus*: Samuel et al., 1995, *Mus musculus*: Yamada et al., 1997, *Bos taurus*: Frangione et al. 1981) als auch in Pflanzenzellen (*Solanum tuberosum*: Norling et al. 1990, *Oryza sativa*, Nakazono et al., 2000) beschrieben. Von einigen dieser Proteine wurde die Inhibitoraktivität auf die F1-ATPase direkt, bei manchen auch speziesübergreifend nachgewiesen (Hefe-IF1 auf Säuger-F1-ATPase: Hashimoto et al., 1984 und Cintron et al., 1979; Ratte-IF1 auf ATPase aus Ratte und Rind: Chan und Barbour, 1976). Weiterhin besteht eine etwas geringere Homologie zum Protein STF1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Matsubara et al., 1983), das neben seiner inhibitorischen Wirkung auf die F1F0-ATPase die Bindung zwischen Inhibitor und ATPase stabilisiert und folglich auch als stabilisierender Faktor bezeichnet wird. Die beiden anderen Vertreter der stabilisierenden Faktoren, STF2 (Hashimoto et. al, 1984; Yoshida et al., 1984 und 1990) und der kürzlich entdeckte potentielle neue Vertreter dieser Proteinfamilie in Hefe STF3 (Hong und Pedersen, 2002), sind strukturell deutlich verschieden von STF1.

Fast alle diese Proteine existieren in einer Vorläuferform, die aus dem Inhibitor und einer N-terminal anschließenden abspaltbaren Signaldomäne, der Targeting-Sequenz, besteht (Abbildung 2-4A). Mitochondriale Targeting-Sequenzen zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin sowie an Serin- und Threonin-Resten aus. Daneben sind einige hydrophobe Aminosäuren wie Leucin und Isoleucin und das (nahezu) vollständige Fehlen saurer Aminosäuren typisch. Trotz dieser charakteristischen Zusammensetzung erscheinen die Targeting-Domänen der aufgeführten Proteine nicht durchgängig sequenzkonserviert. Die sehr eng verwandten Spezies *R. rattus* und *R. norvegicus* beispielsweise zeigen darin eine größere Variabilität als die etwas entfernter verwandten Arten *M. musculus* und *R. norvegicus*, bei denen es sich um nahezu identische Signalsequenzen handelt. Die Targeting-Sequenz vieler mitochondrialer Proteine wird an ihrer sogenannten MPP-Schnittstelle durch eine spezielle Protease, der Matrix-Processierungs-Peptidase (MPP) von der Inhibitor-domäne proteolytisch abgetrennt. Das Programm MITOPROT (Claros und Vincens, 1996), das die Parameter i) Nettoladung der Gesamtsequenz, ii) Anzahl der basischen und sauren Aminosäuren in der analysierten Targetingregion und iii) hydrophobe Bereiche analysiert, bewertet einerseits die Exportfähigkeit eines Proteins in die Mitochondrien und schließt andererseits auf potentielle Prozessierungsstellen. Eine an den hier gezeigten Sequenzen durchgeführte Computeranalyse mit

MITOPROT ergab die C-terminal von den eingerahmt dargestellten Aminosäuren befindlichen potentiellen Prozessierungsstellen (Abbildung 2-4A, B). Allerdings zeigen sich Diskrepanzen zwischen den kalkulierten und den in der Literatur beschriebenen konservierten Spaltungsmotiven der Säugerproteine. Auch bei dem *D. discoideum* - Protein ist die mit MITOPROT vorhergesagte MPP-Schnittstelle F31 nicht identisch mit der anhand von Sequenzvergleichen mit den Hefe-Homologen abgeleiteten Schnittstelle G28. Eine Ausnahme bilden die Inhibitoren aus *Schistosoma mansoni* und *Caenorhabditis elegans*, die anscheinend keine klar definierte MPP-Schnittstelle haben. Die Sequenz des Inhibitors in *Pichia jadinii* ist offensichtlich nicht vollständig, weshalb keine Aussage möglich ist.

Die inhibitorisch wirkende Domäne (Abbildung 2-4B) aller dieser Proteine erscheint in vielen Bereichen identisch oder durch homolog substituierte Aminosäuren sehr ähnlich. Aufgrund ihrer funktionellen Gruppe wurden I-L-M, F-Y-W, E-D, R-K-H, S-T und N-Q als austauschbar angesehen (Stryer, 1994). Anhand von systematischen Untersuchungen am N- und C-terminal verkürzten Inhibitor von *Bos taurus* wurde festgestellt, daß für die inhibitorische Funktion eine minimale Inhibitorsequenz erforderlich ist (van Raaij et al., 1996). Allerdings ist deren exakte Zusammensetzung und Position aufgrund kontroverser Ergebnisse verschiedener Experimentatoren mit inkonsistenten Versuchsbedingungen bisher nicht eindeutig, was im Diskussionsteil detailliert erläutert ist.

Der C-Terminus (Abbildung 2-4C) ist mehr oder weniger variabel, enthält aber als grundlegende Struktur eine Coiled Coil- Domäne, die sich aus einer speziellen Abfolge von hydrophoben Aminosäuren nach dem Muster (I,L)6X(I,L)2X(I,L)3X(I,L)6X(I,L)2X(I,L) ergibt.

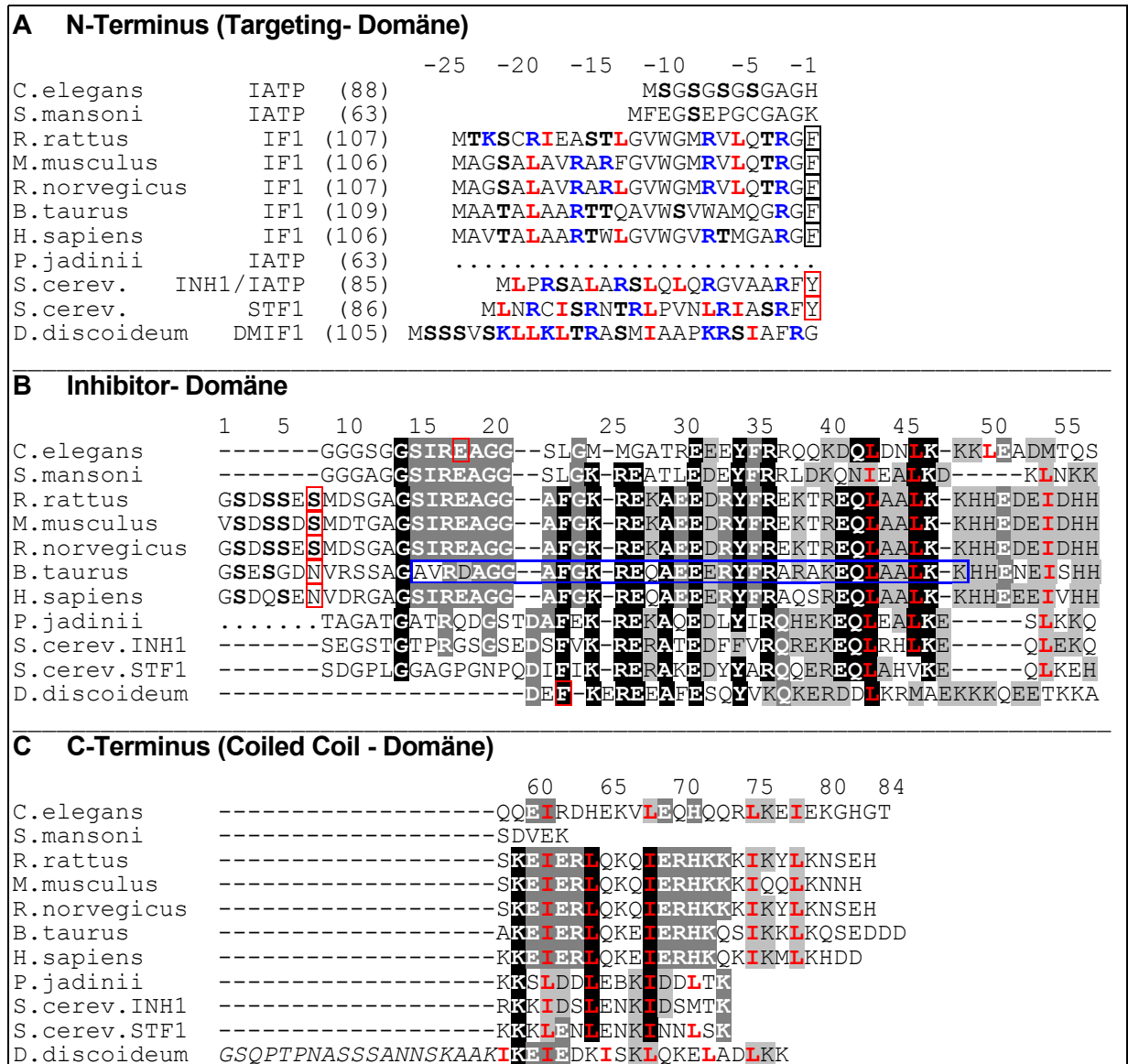


Abbildung 2-4 Sequenzvergleich mit bekannten F1F0-ATPase-Inhibitoren: Quelle (Organismus, links) mit in Datenbanken üblichen synonymen Proteinbezeichnungen (IF1, INH1, IATP) und Sequenzlänge (Ziffern in Klammern). Einige Herkunftsgewebe sind publiziert: Leber (*R. norvegicus*), Herz (*B. taurus*, *H. sapiens*). Ziffern über der Sequenz kennzeichnen Aminosäure-Numerierung in der *B. taurus*-Sequenz: Signalsequenz: negative Zahlen; reifes Protein: positive Zahlen. **(A)** N-terminale Signalsequenz: basische Reste Lys, Arg in blau; Ser/Thr-Reste in fett-schwarz; hydrophobe Reste Leu, Ile in rot. Mit dem Programm MITO-PROT kalkulierte Prozessierungsstellen sind rot eingerahmt, in Literatur beschriebene, davon differierende Stellen sind schwarz eingerahmt. **(B)** Inhibitor-Domäne: Darstellung konservierter Aminosäuren weiß auf schwarz (van Raaij et al., 1996). Weitere identische Reste: weiß auf dunkelgrau. Homolog substituierbare Reste (siehe Text oben): schwarz auf hellgrau. Striche zwischen Sequenzblöcken kennzeichnen Lücken, die für die Sequenzanpassung notwendig waren. Die minimale Inhibitorsequenz in *B. taurus* ist blau eingerahmt (A14-K47: van Raaij et al., 1996). Andere Autoren geben L42-H58 als minimale Inhibitorsequenz an (Zanotti et al., 2000; Kapitel 6.2.2). **(C)** C-Terminale Coiled Coil- Region: Konservierte und austauschbare Reste wie in (B). Ein Sequenzbereich im *D. discoideum*-Protein, der zur Coiled Coil-Struktur nicht beiträgt, konnte den anderen IF1-Sequenzen nicht zugeordnet werden (kursiv).

Die in den Inhibitor-Proteinen der meisten Organismen konservierten Regionen sind mit wenigen Abweichungen neben weiteren austauschbaren Resten auch im *Dictyostelium*-Vertreter vorhanden. Die weitestgehende Übereinstimmung des *Dictyostelium*-Proteins besteht dabei mit den Inhibitoren aus *S. cerevisiae* (INH1), aus *Picea jadinii* (IATP) und aus *H. sapiens* (IF1) (Tabelle 1). Mit 105 Aminosäure-Resten entspricht die Sequenzlänge des *Dictyostelium*-Proteins etwa der des humanen Homologs bzw. auch der anderer Säuger-Homologe mit mehr als 100 Aminosäure-Resten, während die Hefe-Proteine mit um die 85 Resten erheblich kürzer sind. Aufgrund dieser Homologie und in Anlehnung an den häufig verwendeten Begriff IF1 wird das Protein künftig **DMIF1** (*Dictyostelium* mitochondrial **IF1**) genannt (Genbank Acc.Nr. AF311910).

	(A) Säuger					(B) Hefen, <i>Dictyostelium</i>				(C) Rund-/Plattwürmer	
	IF1 <i>H.sapiens</i>	IF1 <i>B.taurus</i>	IF1 <i>M.musculus</i>	IF1 <i>R.rattus</i>	IF1 <i>R.norvegicus</i>	IATP <i>P.jadinii</i>	INH1 <i>S.cerevisiae</i>	STF1 <i>S.cerevisiae</i>	DMIF1 <i>D.discoideum</i>	IATP <i>C.elegans</i>	IATP <i>S.mansoni</i>
IF1 <i>H.sapiens</i>	-										
IF1 <i>B.taurus</i>	77/72 (106)	-									
IF1 <i>M.musculus</i>	75/70 (105)	70/62 (105)	-								
IF1 <i>R.rattus</i>	81/76 (95)	75/66 (97)	86/85 (105)	-							
IF1 <i>R.norvegicus</i>	78/74 (106)	74/65 (106)	94/93 (105)	92/92 (107)	-						
IATP <i>P.jadinii</i>	62/44 (58)	56/43 (60)	58/47 (58)	59/48 (62)	59/48 (62)	-					
INH1 <i>S.cerevisiae</i>	55/39 (76)	54/39 (60)	57/35 (73)	57/35 (73)	57/35 (73)	69/59 (61)	-				
STF1 <i>S.cerevisiae</i>	64/52 (46)	57/43 (46)	60/47 (51)	60/45 (51)	60/45 (51)	54/49 (61)	67/51 (69)	-			
DMIF1 <i>D.discoideum</i>	50/42 (40)	34/22 (64)	44/33 (39)	44/33 (39)	44/33 (39)	54/40 (36)	56/33 (36)	47/39 (36)	-		
IATP <i>C.elegans</i>	49/38 (84)	48/38 (85)	51/36 (69)	49/38 (80)	49/38 (80)	42/27 (55)	49/39 (43)	48/20 (61)	41/27 (52)	-	
IATP <i>S.mansoni</i>	68/56 (34)	59/48 (49)	68/59 (34)	68/59 (34)	68/59 (34)	56/44 (45)	49/37 (45)	49/35 (47)	42/23 (44)	71/65 (52)	-

Tabelle 1 Ähnlichkeitsanalyse verschiedener Inhibitor-Proteine mit BESTFIT: Zahlen (in %) vor/nach dem Schrägstrich kennzeichnen die ähnlichen/ identischen Aminosäuren, in Klammern die Anzahl der Aminosäuren der verglichenen Sequenzbereiche. Die dem Protein DMIF1 ähnlichsten Inhibitoren aus Mensch und Hefe sind grau unterlegt. Bei Einteilung der Organismen in Gruppen wie (A) Säuger, (B) Hefen und (C) Platt-/Rundwürmer weisen die Vertreter der Säuger mit 70–94% stärkere Ähnlichkeiten untereinander auf als die Mitglieder innerhalb der anderen Gruppen: (B) 47–69%, (C) 71%.

2.3.2 Sequenzcharakteristik und funktionelle Domänen von DMIF1

Das für DMIF1 errechnete Molekulargewicht von 13728 Da wurde nach Herstellung monoklonaler Antikörper gegen DMIF1 (Kapitel 3.2, 14) experimentell im Westernblot mit

einer Proteinbande bei ~10 kDa annähernd bestätigt (Abbildung 3-9). Der Grund für diese Größenabweichung ist in der Prozessierung der Targetingsequenz zu sehen (Kapitel 4.1). Bei pH 7 trägt das Protein insgesamt 26 positiv und 18 negativ geladene Gruppen. Der theoretische isoelektrische Punkt von 10.6 deklariert das nicht prozessierte Protein als sehr basisch. Den Hauptanteil trägt dazu der N-Terminus bei, der viele basische Aminosäuren (Lysin, Arginin) und keine sauren Reste enthält (Abbildung 2-4A, Abbildung 2-5A).

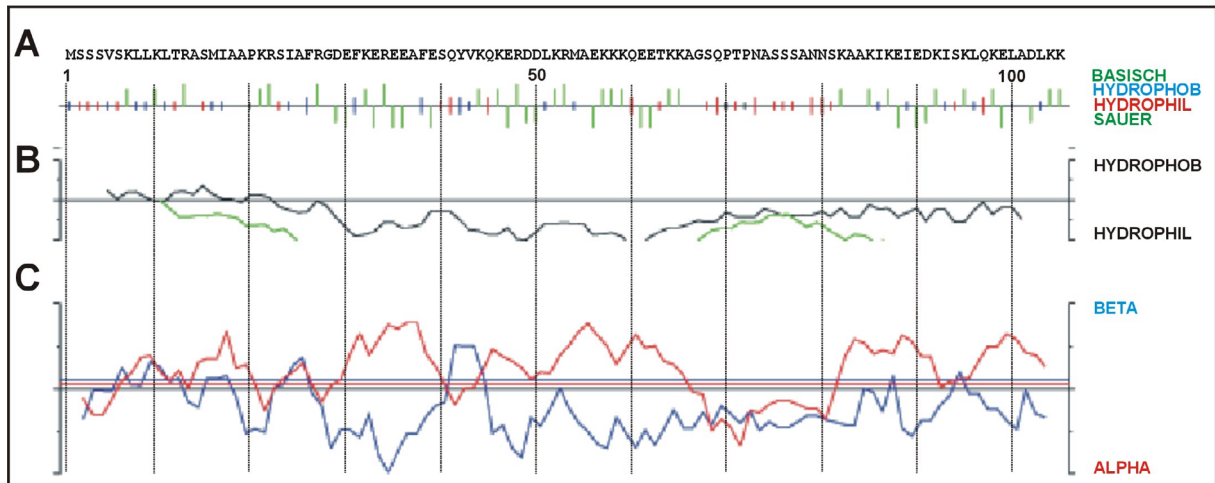


Abbildung 2-5 Ladungs- und Strukturprofil: (A) **Verteilung der Aminosäurereste:** hydrophobe (blau) und hydrophile (sauer - negativ geladen, grüner Balken nach unten; basisch - positiv geladen, grüner Balken nach oben; neutral - rot) Aminosäurereste. Auffällig ist der ausschließliche Anteil an basischen Resten am N-Terminus, während sie gemeinsam mit sauren Resten im restlichen Molekül gleichverteilt vorkommen. (B) **Hydrophobizitätsprofil** Die Sequenz besteht hauptsächlich aus hydrophilen Resten (schwarze Kurve nach Kyte Doolittle, 1982, grüne Abschnitte nach Goldman), die nur sporadisch mit einzelnen hydrophoben Aminosäuren, vor allem in der Signaldomäne am N-Terminus abwechseln. (C) **Sekundärstruktur:** Überwiegend α -helicale Struktur (nach Chou und Fasman, 1978), am C-Terminus mit einer Coiled Coil - Region (COILS, Lupas et al., 1991).

Vermutlich bildet die N-terminale Peptidkette, die einzelne hydrophobe Aminosäuren an definierten Positionen enthält, eine Struktur, die einer amphiphilen Helix ähnelt. In Kombination mit einer großen Zahl an Serin- bzw. Threoninresten hat diese Domäne theoretisch die Potenz, als mitochondriales Signalpeptid zu agieren, welches das Protein nach seiner Synthese in seine Zielorganellen, die Mitochondrien dirigiert. Die dominierende Struktur des restlichen Moleküls ist eine α -Helix, die mit Ausnahme der nur vereinzelt auftretenden hydrophoben Reste sehr hydrophil ist (Abbildung 2-5). Die letzten 30 Aminosäuren bilden eine Coiled Coil- Helix bestehend aus vier „Heptad Repeats“ (nach Analyseprogramm COILS von Lupas et. al, 1991).

Die Durchmusterung der Aminosäureabfolge nach sequenzdeterminierten Motiven ergab eine potentielle PKC-Phosphorylierungs- (T63) und eine Asn-N-Glykosylierungsstelle (N73). Bisher wurden in bekannten Inhibitorproteinen keine Evidenzen für posttranslationale

Modifikationen wie Glykosylierung oder Phosphorylierung gefunden. Diese Punkte wurden auch für DMIF1 nicht weiter untersucht.

3 Intrazelluläre Lokalisation von DMIF1

3.1 Die Verwendung von GFP als Markerprotein *in vivo*

Für den Nachweis, daß DMIF1 zu den intrinsischen Inhibitorproteinen der mitochondrialen F1F0-ATPase zu rechnen ist, ist der Datenbank-Vergleich (Kapitel 2.3.1) als einziges Kriterium unzureichend, insbesondere bei Beachtung der maximal 54% Ähnlichkeit. Deshalb sollte die Verteilung von DMIF1 in lebenden *Dictyostelium*-Zellen als weiteres Merkmal herangezogen werden. Dazu wurde DMIF1 als Fusionsprodukt mit dem fluoreszierenden Markerprotein GFP (**G**reen **F**luorescent **P**rotein, Prasher *et al.*, 1992) im AX2-Wildtypstamm exprimiert und über die Eigenfluoreszenz von GFP nach dessen Anregung im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) beobachtet.

3.1.1 Konstruktion von Plasmiden und Transformation von AX2-Zellen zur Expression von Fusionsproteinen aus DMIF1 und GFP

Es wurden rekombinante Proteine einerseits mit GFP (S65T: Heim und Tsien, 1996) am N-Terminus, andererseits mit GFP am C-Terminus von DMIF1 getestet. Dazu standen zwei, an zufälligen Loci des Genoms integrierende Derivate des *Dictyostelium*-Expressionsvektors pDEXRH (Faix, *et al.*, 1992) zur Verfügung: pDEXRH-N-GFP (Westphal *et al.*, 1997) und pDEXRH-C-GFP (Westphal, unveröffentlicht). In beiden Fällen wird das rekombinante Protein unter der Kontrolle des Aktin15- Promotors (Knecht *et al.*, 1986) aus *D. discoideum* permanent exprimiert. Die Vektoren enthalten eine Resistenzkassette für Geneticin (Abbildung 3-1A).

Im ersten Fall wurde die durch PCR an Phagenlysat mit den Primern pgfp-N1 (Clal) und pgfp-N2 (Clal) vermehrte *dmif1*-cDNA in die Clal-Stelle von pDEXRH-N-GFP ligiert und dadurch der Vektor pDEXRH-GFP-N-DMIF1 (Abbildung 3-1B) erhalten. Die richtige Orientierung des Inserts im Vektor wurde durch Amplifikation eines intermediären *gfp-dmif1*-Fragmentes mit einem *gfp*-internen (pgfp-11, Nukleotide 636-655 in GFP-Sequenz) und einem *dmif1*-internen Oligonukleotid (pgfp-N2) anhand der Fragmentlänge von ca 430 bp überprüft und durch die nachfolgende Sequenzierung bestätigt. Das fusionierte Produkt GFP-N-DMIF1 (~ 41 kDa) enthält das etwa 27 kDa große GFP und daran anschließend, verbunden über einen Linker aus 7 Aminosäureresten, das Protein DMIF1 (Abbildung 3-1C).

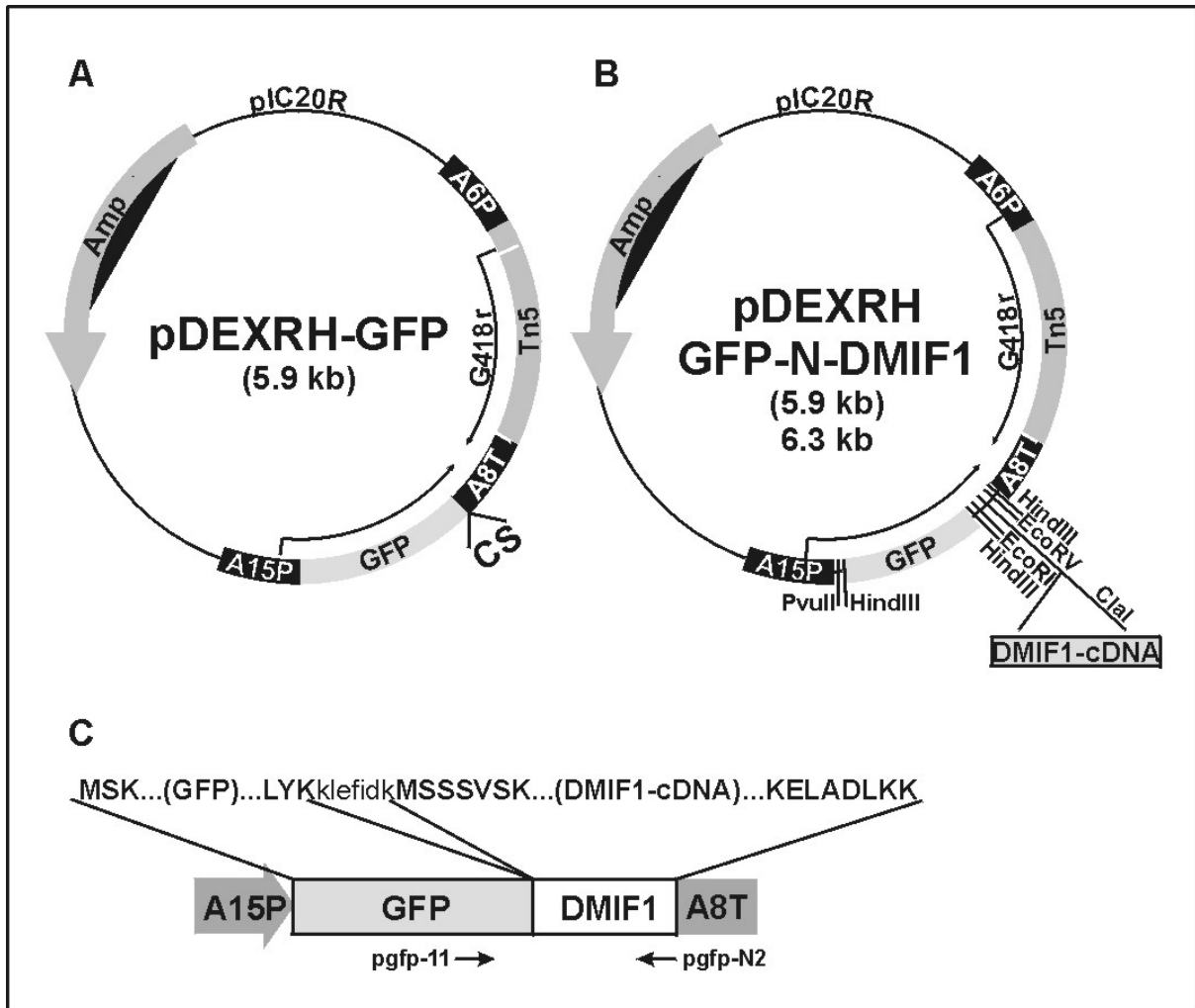


Abbildung 3-1 GFP am N-Terminus - Konstruktion des Expressionsvektors: (A) **Ausgangsplasmid pDEXRH-GFP:** Bei pDEXRH-N-GFP handelt es sich um ein von pIC20R abgeleitetes Plasmid, das neben einer Resistenzkassette für Ampicillin zur Klonierung und Selektion in Bakterien ein Geneticin (G418)-Resistenz-Gen (Tn5) zur Selektion in *Dictyostelium* enthält. Das Markerprotein GFP wurde über HindIII zwischen dem Aktin 15-Promotor und dem Aktin 8-Terminator eingebunden. (B) **Plasmid mit *dmif1*:** Die Klonierungsstelle (CS) enthält u.a. eine Erkennungssequenz für Clal, die zur Eingliederung von *dmif1* genutzt wurde, was zum Plasmid pDEXRH-N-GFP-DMIF1 führte. (C) **Fusionsprotein GFP-N-DMIF1:** Das resultierende Fusionsprotein enthält GFP am N-Terminus (jeweils die ersten und letzten paar Aminosäuren sind in fettgedruckten Großbuchstaben dargestellt) und DMIF1 am C-Terminus (fettgedruckte Großbuchstaben), die beide über einen Peptidlinker (kleine Buchstaben) miteinander verbunden sind. Die ungefähre Bindestelle der Oligonukleotide pGFP-11 und pGFP-N2 ist durch Pfeile gekennzeichnet. Diese Primer wurden zur Überprüfung der Orientierung des Inserts im Vektor mittels PCR verwendet. Die Größenangaben beziehen sich auf den Ursprungsvektor (in Klammern) und den nach Einbindung von *dmif1* erhaltenen Vektor (ohne Klammern).

Für das zweite Konstrukt wurde die *dmif1*-cDNA ohne Stop-Codon mit den Oligonukleotiden pgfp-C1 und pgfp-C2 amplifiziert und das PCR-Produkt zunächst in einen TA-Vektor zwischenkloniert (Abbildung 3-2A). Dabei wurde der A-Überhang am 3'-Ende des

PCR-Produktes, der durch die *Taq*-Polymerase erzeugt wird, genutzt. Das Insert wurde durch Restriktionsverdau mit *NruI* aus dem TA-Vektor isoliert und in die geöffnete und geglättete *EcoRI*-Stelle des Plasmids pDEXRH-C-GFP eingefügt. Der Orientierungstest am fertigen Vektor pDEXRH-GFP-C-DMIF1 (Abbildung 3-2B) erfolgte durch PCR mit den Primern *pgfp-69* und *pgfp-C1*. Zwischen den Proteinen GFP und DMIF1 in GFP-C-DMIF1 befindet sich ein Peptidlinker aus 8 Resten (Abbildung 3-2C).

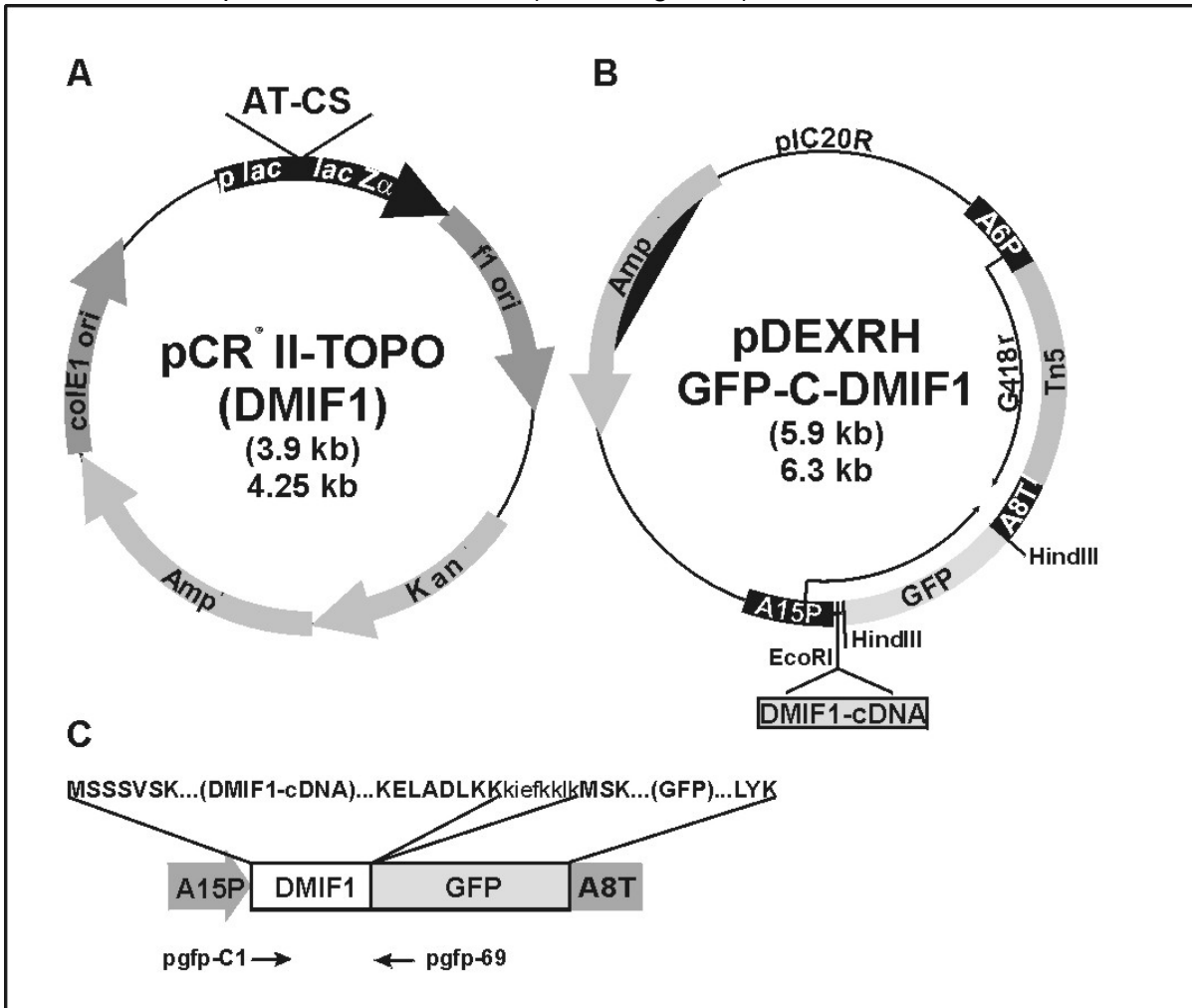


Abbildung 3-2 GFP am C-Terminus - Konstruktion des Expressionsvektors. (A) Intermediärer TOPO-Klonierungsvektor: Das Prinzip der AT-Klonierung ist beim Vektor pCR[®] II-TOPO (Invitrogen) verwirklicht: die durch die *Taq*-Polymerase während der PCR-Reaktion am Amplifikat erzeugten A-Überhänge werden mit Hilfe einer Topoisomerase mit den T-Überhängen im Vektor hybridisiert. Die Klonierung von *dmif1* in pCR[®] II-TOPO führte zum Plasmid pCR[®] II-TOPO-DMIF1. Das Plasmid enthält Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin sowie eine Kasette für die Expression des α -Peptids der β -Galactosidase. **(B) Plasmid mit *dmif1*:** Nach Isolation des Inserts aus dem TOPO-Vektor wurde *dmif1* blunt in pDEXRH-C-GFP ligiert (pDEXRH-C-GFP-DMIF1). **(C) Fusionsprotein GFP-C-DMIF1:** zeigt die Teilsequenz des Fusionsproteins und den Übergang (kleingedruckt) zwischen DMIF1 und GFP (fettgedruckte Großbuchstaben), die Pfeile kennzeichnen die Primerspezifitäten.

AX2-Zellen wurden mit den Plasmiden pDEXRH-N-GFP-DMIF1 und pDEXRH-C-GFP-DMIF1 durch Elektroporation (Kapitel 12.7) transformiert und mit Geneticin (G418, 10-20 µg/ml) unter Selektionsdruck gesetzt. Resistente Kolonien der so generierten Transformanten *GFP-C-DMIF1* und *GFP-N-DMIF1* wurden kloniert. Die Expression des rekombinanten GFP/DMIF1-Proteins wurde im Immunoblot mit dem monoklonalen anti-GFP-Antikörper 264-449-2 (Abbildung 4-2) sowie im Fluoreszenzmikroskop durch Anregung der GFP-Emission überprüft (Abbildung 3-3 bis Abbildung 3-5).

3.1.2 Die Lokalisation *in vivo* ist abhängig von der Lage von GFP im Fusionsprotein

3.1.2.1 Mitochondrien in GFP-C-DMIF1-Zellen

Wie die Fluoreszenz von *GFP-C-DMIF1*-transformierten Zellen im Laser Scanning Mikroskop (LSM) zeigt, akkumuliert das rekombinante Protein selektiv in den Mitochondrien (Abbildung 3-3). Dies bestätigt die Erwartung, die sich aufgrund der Sequenzhomologie zu den mitochondrialen F1F0-ATPase-Inhibitorproteinen ergibt.

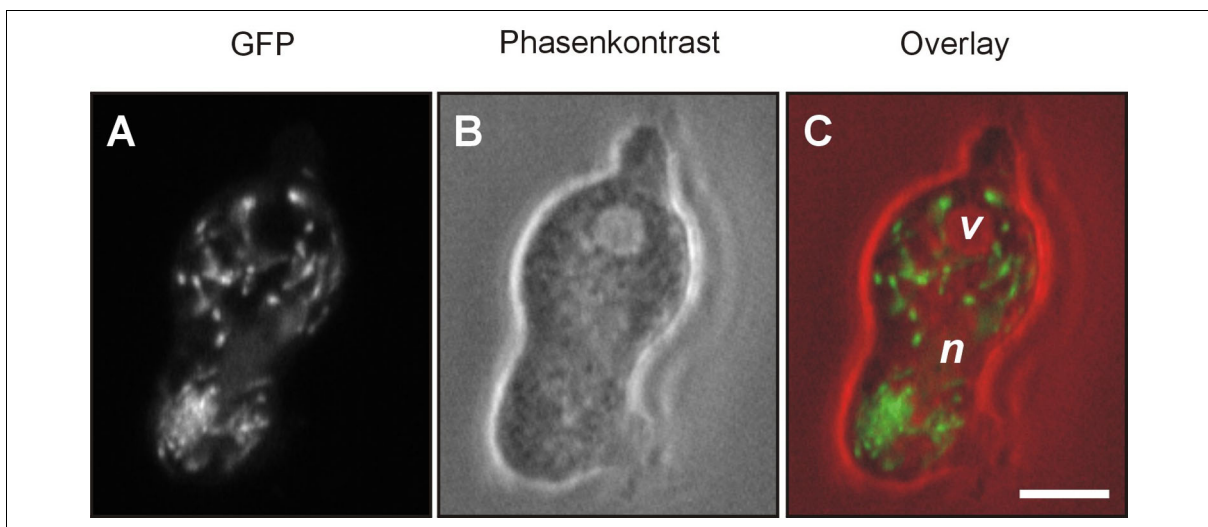


Abbildung 3-3 Mitochondriale Lokalisation von GFP-C-DMIF1 *in vivo*. (A) **GFP-Fluoreszenz:** Darstellung des rekombinanten Proteins GFP-C-DMIF1 durch das fluoreszierende Protein GFP in lebenden, vegetativen *GFP-C-DMIF1*-Zellen (Klon C4A-13) in Agar-Overlay-Technik. Das GFP-Signal ist auf die Mitochondrien beschränkt. Durch deren schnelle Bewegung wird neben den eigentlichen Organellen auch ihre Bewegungsbahn in Form von Lichtspuren aufgezeichnet. (B) **Durchlichtbild:** Zellgestalt. (C) **Überlagerung** von Fluoreszenzsignal (grün) und Durchlichtbild (rot). *n* Nukleus, *v* Vakuole. Balken 5 µm.

3.1.2.2 Centrosomen in GFP-N-DMIF1-Zellen

Überraschend dagegen war die sehr häufige Lokalisation von GFP-N-DMIF1 nahe des MTOC (microtubule organizing center = Centrosom). GFP war nicht mit den Mitochondrien assoziiert (Abbildung 3-4). Die Struktur am MTOC erscheint im konfokalen LSM hohl, d.h. GFP-N-DMIF1 tritt perizentrisch um die Centrosomen auf.

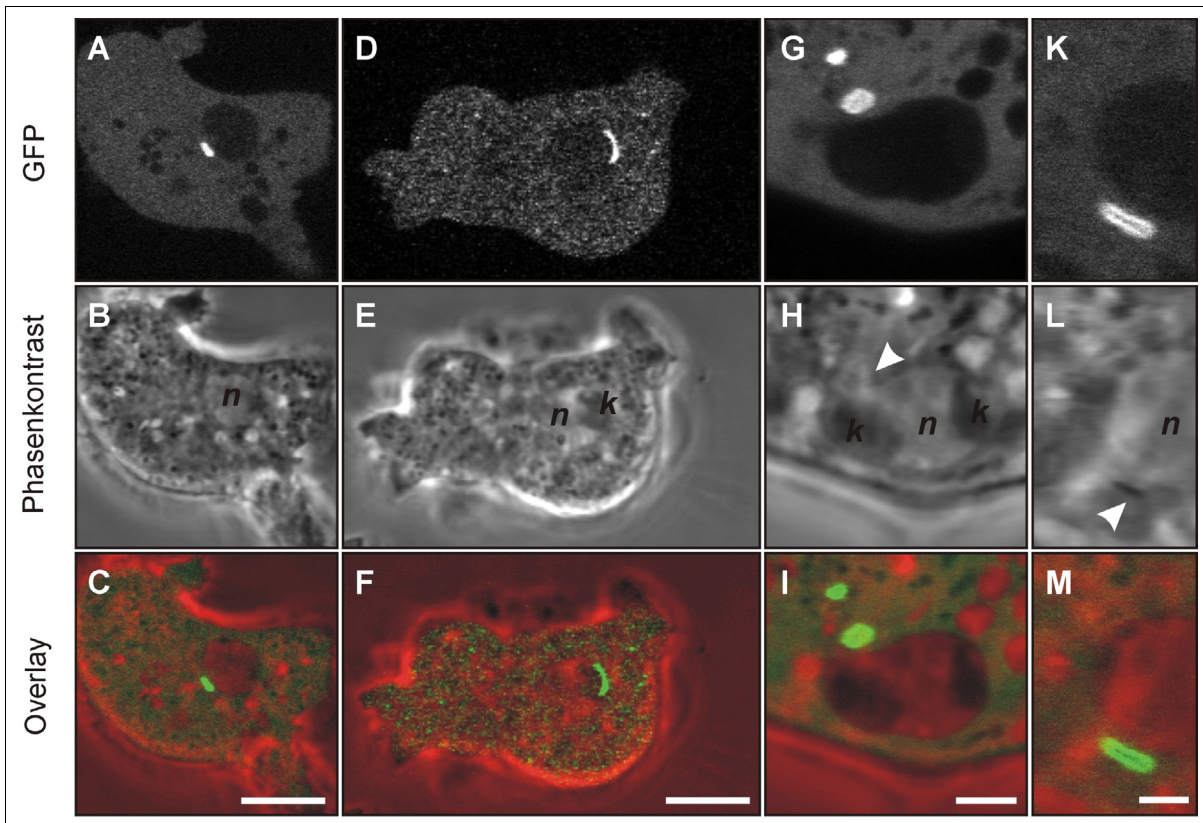


Abbildung 3-4 Centrosomale Lokalisation von GFP-N-DMIF1 (Klon N5-3): Mit GFP am N-Terminus von DMIF1 werden nicht die Mitochondrien sondern neben dem Zytoplasma vor allem Bereiche um die Centrosomen markiert. Die Erscheinungsform ist häufig länglich hohl (**G-I, K-M**), mitunter treten auch kompaktere Formen auf (**A-C**). Dieses unterschiedliche Erscheinungsbild rührt vermutlich von den verschiedenen Schnittebenen der gleichen schalenförmigen Struktur her. **Obere Reihe**: GFP-Signal. **Mittlere Reihe**: Zellgestalt im Phasenkontrast. **Untere Reihe**: Überlagerung von GFP-Fluoreszenz (grün) und Zellgestalt (rot). *n* Nucleus, *k* Kernkappen. Balken v.l.n.r. 1. und 2. Spalte 5 μm , 3. Spalte 2 μm , 4. Spalte 1 μm .

Eine weitere Erscheinungsform stellen Vesikel dar (Abbildung 3-5). Auffällig ist die starke Akkumulation im Zytoplasma, wo das Protein in der Regel homogen, zuweilen auch netzartig (Abbildung 3-16) verteilt erscheint. Dabei ist nicht geklärt, inwieweit das Signal vom intakten, d.h. vollständigen rekombinanten Protein oder von GFP-haltigen Fragmenten nach einem Abbau herrührt.

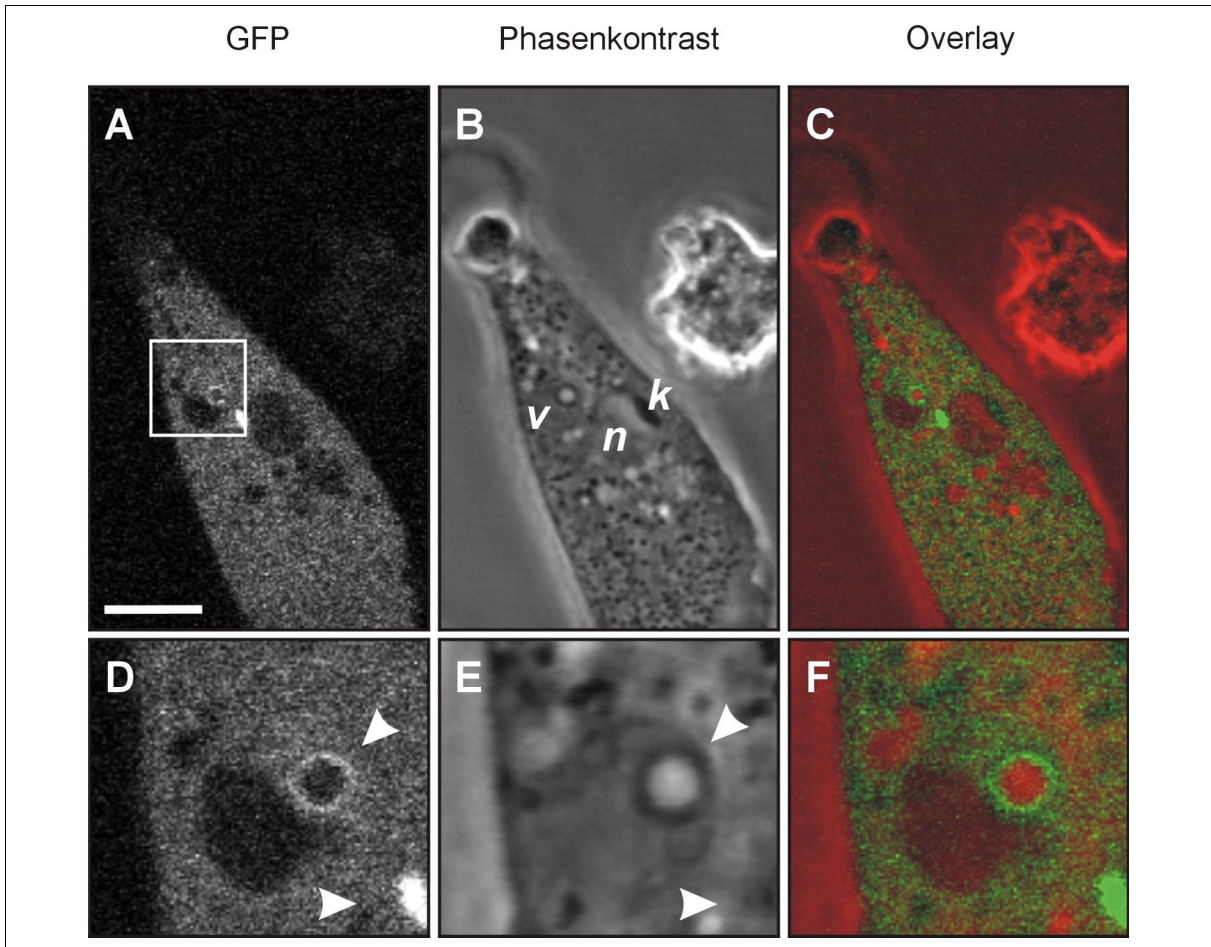


Abbildung 3-5 Lokalisation von GFP-N-DMIF1 in Vesikeln. *GFP-N-DMIF1*-Zellen (Klon N5-3): Obere Reihe: Das GFP-Signal findet sich neben den pericentrisomen auch in vesikelartigen Strukturen. Untere Reihe: Vergrößerung der Zelle aus der oberen Reihe. **Linke Reihe:** GFP-Signal (**A, D**). **Mittlere Reihe:** Phasenkontrastbild (**B, E**). **Rechte Reihe:** Überlagerung GFP-Fluoreszenz (grün) und Phasenkontrast (rot) (**C, F**). *n* Nukleus, *k* Kernkapsel, *v* Vakuole. Unterer Pfeil: pericentrosomaler Bereich. Oberer Pfeil: vesikelartige Hohlstruktur. Balken und Ausschnittbreite 4 μ m.

3.2 DMIF1 in fixierten *Dictyostelium discoideum* - Zellen

3.2.1 Expression von DMIF1 in *E.coli* und Verwendung als Antigen zur Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen DMIF1

Um mögliche Lokalisationsartefakte des rekombinanten Proteins aufgrund des doppelt so großen Molekulargewichtes von GFP gegenüber DMIF1 auszuschließen und festzustellen, welche der beiden durch die GFP-Fluoreszenz gezeigten Lokalisationen tatsächlich durch DMIF1 determiniert wird, sollten Immunmarkierungen am endogenen Protein in fixierten Wildtypzellen (*AX2*) vorgenommen werden. Dafür waren Antikörper gegen das *Dictyostelium*-Protein DMIF1 erforderlich. Zu deren Erzeugung wurde DMIF1 zunächst als rekomb-

binantes Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) in *E.coli* exprimiert (Smith and Johnson, 1988). Nach seiner Aufreinigung wurde das Protein als Antigen zur Immunisierung von Mäusen verwendet (Zur Herstellungsprozedur von Hybridomaklonen, die für die Produktion von monoklonalen Antikörpern erforderlich sind, siehe Kapitel 14). Die gewonnenen Antikörper wurden für Immunmarkierungen auf Zell-, Organell- und Proteinebene eingesetzt.

3.2.1.1 Klonierung von *dmif1*, Transformation von *E.coli* und Selektion

Die kodierende DNA-Sequenz für das Protein DMIF1 mit 318 bp Länge wurde am cDNA-Klon F68 mit den Primern *pgst-fw* und *pgst-rev* durch PCR amplifiziert. Durch Nutzung der eingeführten Erkennungssequenzen für BamHI und XhoI wurde das PCR-Produkt in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Bakterien-GST-Expressionsvektors pGEX5X1 kloniert und das Plasmid pGEX-GST-DMIF1 (Abbildung 3-6) erzeugt.

Der in pGEX5X1 enthaltene und unter Kontrolle des *lacI*-Repressors stehende *tac*-Promotor und das *lac*-Operon ermöglichen eine durch IPTG induzierbare hohe Expressionsrate und die Blau-Weiß-Selektion (α -Komplementation). Das resultierende Genprodukt enthält Glutathion-S-Transferase (GST: 26 kDa) mit einer sich C-terminal anschließenden Faktor-Xa-Schnittstelle (Erkennungssequenz: I-E-G-R↓X) sowie das über einen kurzen Linker aus 4 Aminosäuren (G-I-Q-K) gekoppelte Protein DMIF1 mit 105 Aminosäureresten (nach Sequenz ca. 14 kDa).

Mit dem Vektor pGEX-GST-DMIF1 wurden die beiden *E.coli*-Stämme JM109 und JM83 transformiert und daraus 7 Klone für einen Expressionstest ausgewählt. Die richtige Basenfolge wurde durch DNA-Sequenzierung mit zwei pGEX-Vektor-Primern ermittelt.

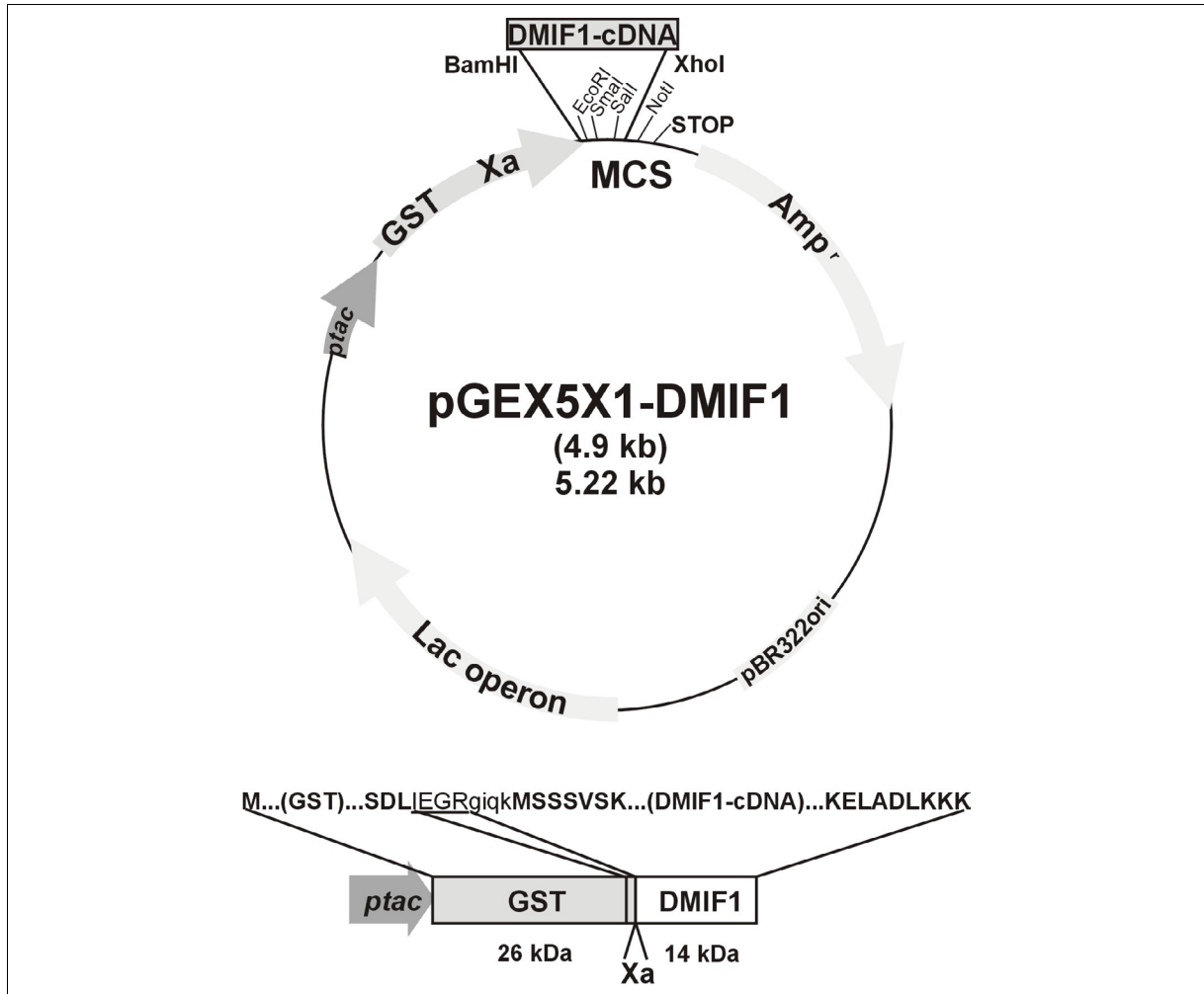


Abbildung 3-6 Klonierungsstrategie und Fusionsprodukt GST-DMIF1: Die Eingliederung der DNA-Sequenz *dmif1* in die BamHI- und XhoI-Stelle der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Vektors pGEX5X1 (4.9 kb) ergibt den Vektor pGEX-GST-DMIF1 (5.22 kb). Das Produkt ist ein Fusionsprotein aus GST und DMIF1 mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa.

3.2.1.2 Expression von GST-DMIF1 und Aufreinigung des Fusionsproteins

Einer exponentiell wachsenden *E.coli*- Schüttelkultur wurde IPTG zugefügt und somit der *tac*-Promotor aktiviert. Die Expression des Genproduktes der insgesamt über 4 Stunden induzierten Schüttelkulturen wurde durch stündliche Probenahmen verfolgt. Diese Gesamtzellhomogenat-Proben wurden nach elektrophoretischer Auftrennung für die Detektion im Proteingel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Abbildung 3-7 links) bzw. im Westernblot mit polyklonalem Serum gegen GST markiert (Abbildung 3-7 rechts).

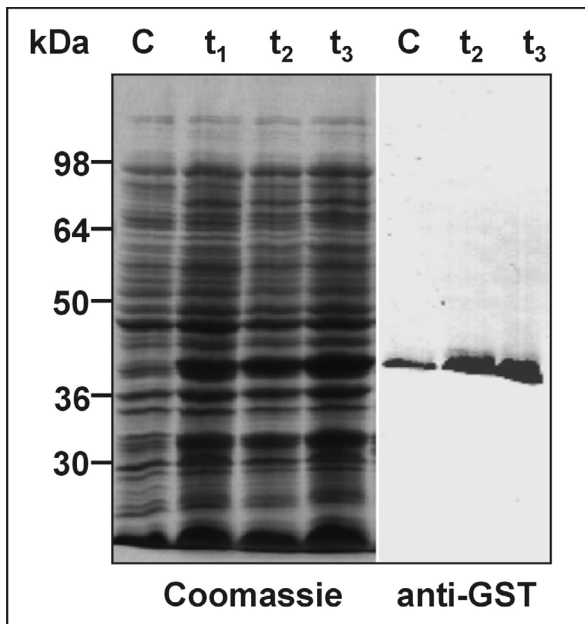


Abbildung 3-7: Induktions-Test: Die Induktion von GST-DMIF1 wurde mittels SDS-PAGE (links) und Westernblot (rechts) verfolgt. Das Fusionsprotein konnte mit einem GST-pAk (Connex) auf einer Bandenhöhe bei ~40 kDa nachgewiesen werden und entspricht damit der kalkulierten Größe. Gegenüber der nichtinduzierten Kontrolle (C) zeigt sich bereits nach einer Stunde eine deutliche Steigerung der Expression des rekombinanten Proteins, die im Zeitverlauf weiter zunimmt. SDS-PAGE 12%. Marker See Blue. Auftragung gleicher Zellzahlen ($4 \cdot 10^7$ Zellen pro Spur) bzw. Zelläquivalente.

Das von dem anti-GST-pAk als Einzelbande bei etwa 40 kDa erkannte Fusionsprotein war dabei mit zunehmender Induktionsdauer immer stärker exprimiert worden. Der *E.coli*- (JM109)-Klon F68-8-30 zeigte diese Tendenz besonders deutlich, weshalb er für die Expression zur Reinigung des GST-DMIF1-Fusionsproteins herangezogen wurde. Außerdem konnte ein degradierender Proteinabbau während der Induktionsdauer ausgeschlossen werden. Die Expression in JM83 erschien weniger effektiv (Daten nicht gezeigt).

Für die native Aufreinigung von GST-DMIF1 aus Bakterien sollte das Fusionsprodukt trotz hoher Expressionsraten größtenteils löslich vorliegen. Induktionen bei der für *E.coli* typischen Kultivierungstemperatur von 37°C führen dabei oft zur Bildung von Einschlußkörpern („inclusion bodies“), aus denen das gewünschte Protein nicht mehr nativ zu gewinnen ist. Erniedrigte IPTG-Konzentrationen, die Anwesenheit von Saccharose, die verstärkte Sauerstoffversorgung

und suboptimale Temperaturen von 28 - 30° C sind deshalb zur Produktion löslicher Fremdproteine oft besser geeignet (Review Schein, 1993). Beste Ergebnisse wurden bei 30°C und durch verlängerte Induktionszeiten von bis zu 24 h unter sonst gleichen Bedingungen wie im Induktionstest erreicht (Abbildung 3-8). Bei der Aufreinigung des rekombinanten Proteins durch Affinitätschromatographie nutzt man die große Bindungsaffinität von GST an ihr Substrat Glutathion, das immobilisiert an Sepharose 2B als Gelbett in einer Chromatographiesäule vorliegt. Die Elution von GST-DMIF1 erfolgt quantitativ durch einen Überschuß an reduziertem Glutathion.

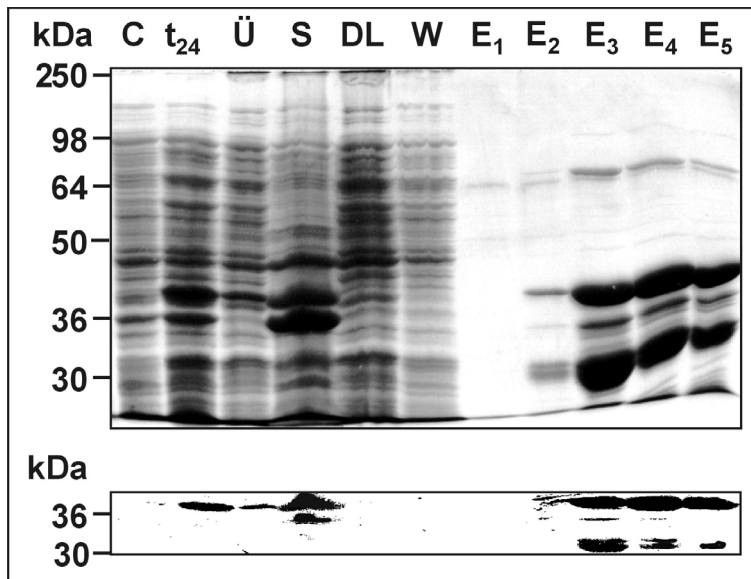


Abbildung 3-8 Expression von GST-DMIF1 in *E.coli*. Bild oben: SDS-PAGE (Gel 12%); Bild unten: Westernblot mit anti GST-pAk (Connex). **C:** Kontrolle: *E.coli* mit pGEX-DMIF1 transformiert, nicht induziert. **t₂₄:** Bakterienmaterial nach 24 Stunden Induktion mit IPTG bei 30°C. Danach wurden die Zellen in der French Press lysiert, mit Triton X100 weiter aufgeschlossen und 10 min mit 12000 x g bei 4°C zentrifugiert. **Ü:** Überstand des bei 12000 x g zentrifugierten Zell-Lysates (Material zum Beladen der Glutathion-Säule). **S:** Sediment nach Zentrifugation. **DL:** Durchlauf durch die Säule beim Beladen. **W:** Durchlauf durch die Säule beim Waschen. **E:** Elutionsfraktionen.

3-8). Dem SDS-Gel zufolge befindet sich darin auch ein erheblicher Anteil des rekombinanten Proteins voller Länge. Das spricht dafür, daß dieser Proteinanteil in Einschlußkörpern akkumulierte, die während der Lyse nicht aufgebrochen wurden.

Das aufgereinigte Fusionsprotein GST-DMIF1 wurde als Antigen zur Immunisierung von Mäusen für die anschließende Gewinnung monoklonaler Antikörper verwendet. Außerdem diente es als Antigen zum Test der Antikörper im ELISA.

3.2.2 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen DMIF1

Die nachfolgend beschriebenen Experimente befassen sich mit der Reaktion der in den Fusionen 271/272 erhaltenen mAk im Immunoblot und im ELISA, mit der Bestimmung ihrer Subklassen und der im Protein DMIF1 erkannten Epitope. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Das Eluat enthält neben dem gewünschten Produkt mit voller Länge von ~40 kDa erhebliche Mengen an zwei weiteren GST-haltigen Banden (36 und 30 kDa) sowie ein koelutierendes bakterielles dnaK-Protein mit einer Molekularmasse von 70 kDa (Sherman and Goldberg, 1992). Die offensichtlichen Degradationsprodukte erscheinen nicht während der Induktion (t₂₄-Fraktion) sondern erstmals nach der Lyse der Bakterien in der Partikelfraktion. Das bedeutet, daß das Protein nach dem Aufschluß der Zellen einem Abbau unterliegt. Die erwähnte Fraktion wurde durch Zentrifugation der lysierten Zellen als Sediment erhalten und enthält partikuläre Bestandteile (S in Abbildung

3.2.2.1 Reaktionstest mit den Proteinen DMIF1, GFP-N-DMIF1, GST-DMIF1 und GST

Hybridoma-Klone wurden aus zwei Mäusen erhalten, die mit verschiedenen Methoden immunisiert wurden (siehe Kapitel 14): mit Freund'schem Adjuvans (Fusion 271) und Alugel S (Fusion 272). Die von den Zellen produzierten mAk wurden im Immunoblot und im ELISA auf ihre Reaktion mit DMIF1 getestet. Für den ELISA-Test wurde das rekombinante GST-DMIF1-Protein auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Als Kontrollantigen diente ebenso immobilisiertes GST-Protein, das von PD Dr. H. Faix freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Es wurden nur Hybridomaklone weiterkultiviert, deren mAk mit GST-DMIF1 aber nicht mit der GST-Kontrolle reagierten. Die Selektion erfolgte hier auf Antikörper, die DMIF1 in seiner (weitgehend) nativen Form erkennen.

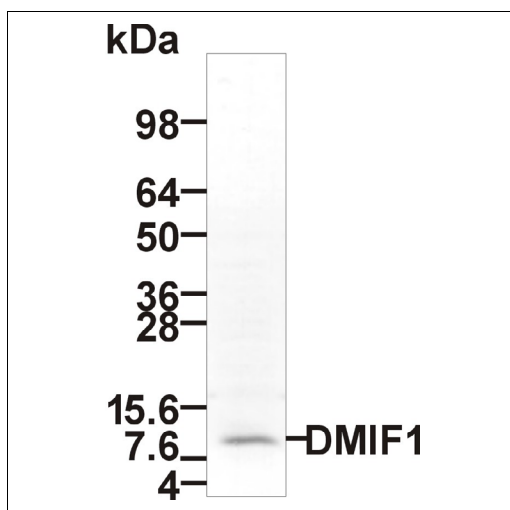


Abbildung 3-9 Immunreaktion eines anti-DMIF1-mAk im Westernblot. Denaturiertes AX2-Lysat, detektiert mit mAk 272-208-1. Marker: See Blue, Low Molecular Weight (Pharmacia), Schagger-Gel 16% (Kapitel 13.1.2).

Für den denaturierenden Ansatz im Westernblot wurden Membranstreifen mit AX2-Gesamtzell-Lysaten sowie den Lysaten von *GFP-N-DMIF1*-Transformanten (Klone N1-13, N2-4, N5-3) verwendet. Dazu wurde das Zellmaterial in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen geblottet. Hierbei wurde auf mAk-Klone selektioniert, die im AX2-Homogenat-Blotstreifen eine etwa 14 kDa-Bande (Abbildung 3-9) und im *GFP-N-DMIF1*-Blotstreifen neben der 14 kDa- eine weitere Bande bei ~ 41 kDa zeigten (vgl. Abbildung 4-2). Als tatsächliche DMIF1-Größe wurde in diesen Blots allerdings ~10 kDa ermittelt. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um das reife Protein, das um das Signalpeptid am N-Terminus verkürzt ist (siehe Kapitel 4.1). Aus der

Fusion 272 konnten 15 unabhängige Klone isoliert werden, während kein Antikörper aus der Fusion 271 eine Reaktion mit DMIF1 zeigte. Die Subklassenbestimmung erfolgte nach dem Diffusionstest nach Ouchterlony (Kapitel 14.4).

3.2.2.2 Bindestellen der mAk in DMIF1

Welche Epitope im DMIF1-Protein von den Antikörpern erkannt werden, konnte durch Bindungsstudien an einem um 2/3 verkürzten DMIF1-Peptid festgestellt werden (Abbildung 3-10). Ein 208 bp langes DNA-Stück am 3'-Ende von *dmif1* wurde entfernt, indem der Vektor pGEX-GST-DMIF1 (Klon F68-8-30) an der *dmif1*-internen HindIII-Restriktionsstelle und der XhoI-Klonierungsstelle aufgeschnitten wurde. Das linearisierte Plasmid wurde an den zuvor

geglätteten Enden religiert, was zum Plasmid pGEX-GST-DMIF1 Δ 3 führte. Das bisher existierende *dmif1*- Stop- Codon TAA wurde wegen der beim Glätten verursachten Verschiebung des Leserasters inaktiviert, so daß das nächste, im ORF liegende Stop-Kodon, nämlich eine pGEX-interne Sequenz (TGA) genutzt werden mußte. Neben der durch die Klonierungsstrategie erwünschten Verkürzung von DMIF1 führte die ORF-Verschiebung zur Expression eines Peptidlinkers am carboxyterminalen Ende aus weiteren 8 Aminosäuren, die nicht der *dmif1*-Sequenz entsprechen sondern vom Vektor abgeleitet sind. Das resultierende Protein GST-DMIF1 Δ 3 enthält (nach Abzug der zum Enzym GST und der Faktor Xa-Stelle beitragenden Aminosäuren und Berücksichtigung der zusätzlich eingeführten vektoriiellen Reste am C-Terminus) nur noch 45 anstelle der ursprünglich 109 DMIF1-Reste, die geschätzte Länge des gesamten Fusionsproteins GST-DMIF1 Δ 3 beträgt nun etwa 32 kDa.

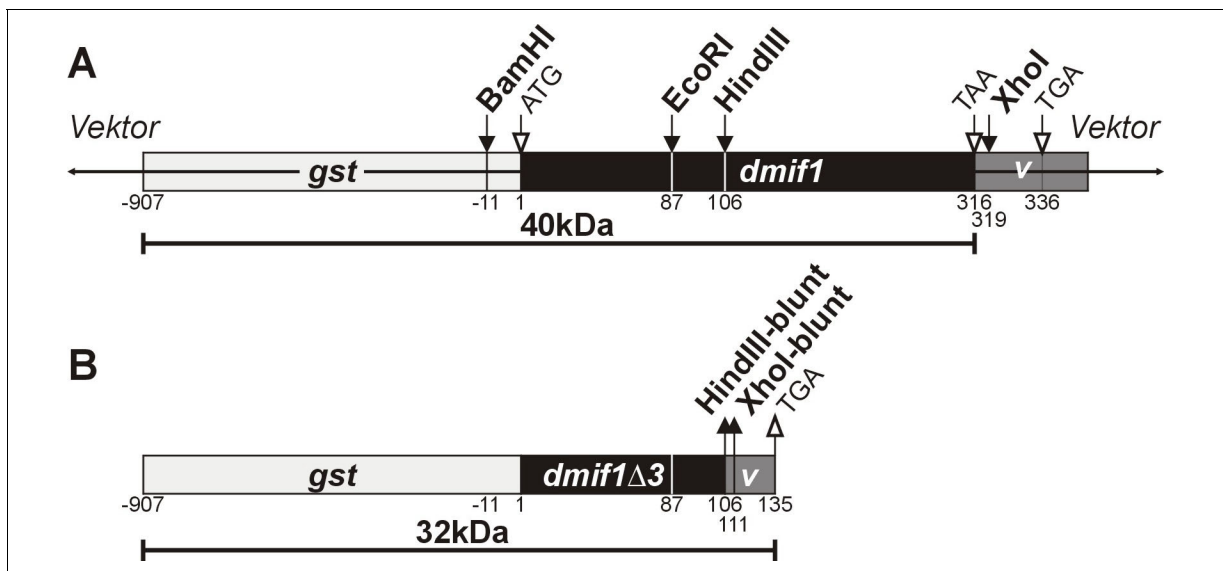


Abbildung 3-10 Konstrukt zum Ak-Mapping. (A) Im Ausgangsvektor pGEX-GST-DMIF1 wurde *dmif1* (schwarz unterlegt) an seiner internen HindIII-Stelle und der XhoI-Klonierungsstelle geschnitten, die Enden geglättet und religiert. **(B)** Der nun zu translatisierende DNA-Strang enthält neben der kodierenden Sequenz für GST (hellgrau) die um 205 bp verkürzte Sequenz *dmif1* Δ 3 (schwarz) und zusätzlich 24 bp aus dem stromabwärts liegenden Teil des Vektors (v, dunkelgrau). Translatierte Bereiche sind durch schwarze Linien mit Größenangaben für das resultierende Protein dargestellt, Ziffern kennzeichnen Basen-Nummerierung im Sequenzausschnitt. **TAA** ist das *dmif1*-interne, **TGA** das im Vektor enthaltene Stop-Signal. **ATG**, das Startkodon für *dmif1*, ist funktionslos wegen des zuvor aktivierten GST-Starts.

Bakterienzellen der Stämme JM109 und JM83 wurden mit dem Plasmid transformiert und einem Induktionstest unterworfen (siehe Kapitel 3.2.1.2). Die Klone Δ 3-109-7 bis Δ 3-109-10 (alle in JM109) waren ausreichend induzierbar (Abbildung 3-11A), zeigten aber ein Expressionsmaximum bereits nach kürzerer Zeit als in den ersten 6 h nach Induktionsbeginn. Bis zum Zeitpunkt t_{21} sank der Spiegel wieder erheblich ab. Das steht im Gegensatz zum Verhalten der Klone, die das vollständige Fusionsprotein GST-DMIF1 produzierten: die

Proteinmenge nahm hier zunächst kontinuierlich zu und blieb bis zum Ende der Induktion relativ konstant. Elektrophoretisch aufgetrennte und geblottete Homogenate von *E.coli*-Zellen, die das C-terminal verkürzte GST-DMIF1 Δ 3-Protein exprimierten und Homogenate von Zellen, die das vollständige Protein GST-DMIF1 exprimierten, wurden mit den zu testenden monoklonalen Antikörpern inkubiert (Abbildung 3-11B).

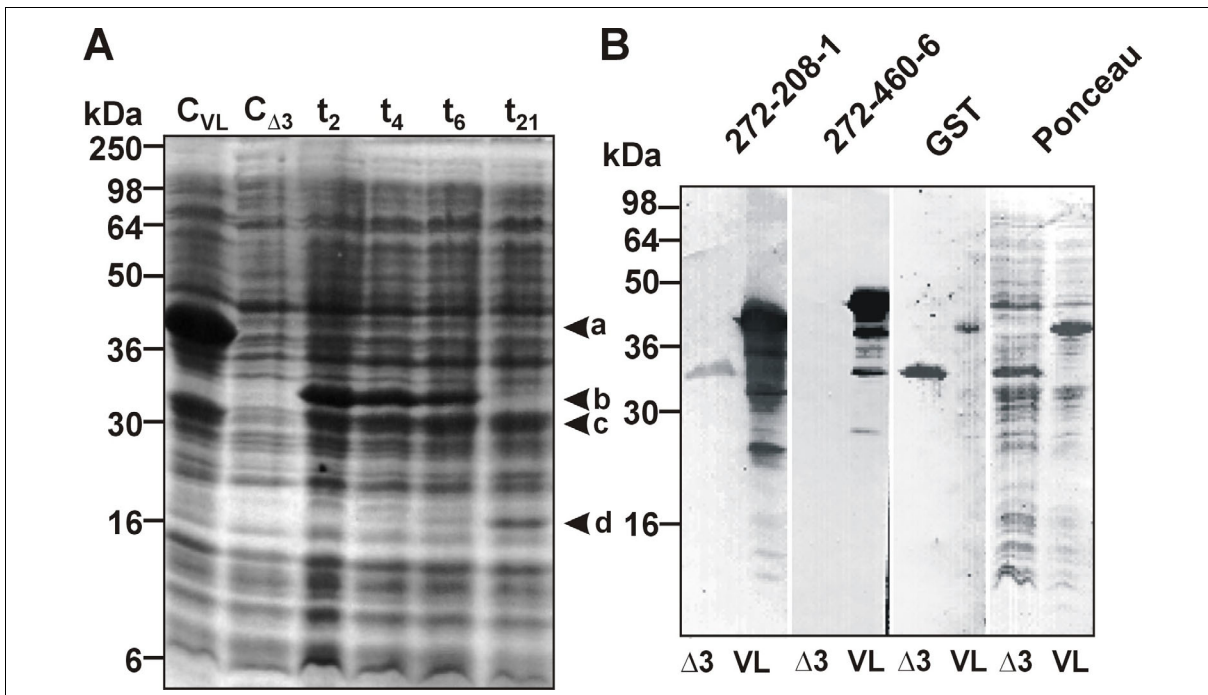


Abbildung 3-11 (A) Induktionstest mit dem verkürzten Protein GST-DMIF1 Δ 3. SDS-PAGE, 16%, Coomassie Blue Färbung: v.l.n.r. Kontrolle C_{VL} : *E.coli* Homogenat nach 24 h Induktion der Expression von pGEX-DMIF1 (Voll-Länge-Protein GST-DMIF1, ~40 kDa, Pfeil a); Kontrolle $C_{\Delta 3}$: *E.coli* Homogenat aus Zellen mit pGEX-GST-DMIF1 Δ 3 (verkürztes Protein) transformiert, ohne Induktion; t_x Expressionsprofil dieser Zellen nach 2, 4, 6 und 21 h Induktion mit IPTG (~32 kDa, Pfeil b). Die Banden bei ~30 kDa sind vermutlich Degradationsbanden, die beim Voll-Länge-Protein in ähnlicher Form auftreten (Pfeil c, siehe auch Abbildung 3-8). Auch die kleinere Bande (Pfeil d) könnte mit einem umfangreichen Abbau zusammenhängen, da gleichzeitig die Bande bei 32 kDa zum Zeitpunkt t_{21} verschwindet (Pfeil b). **(B) Antikörpermapping durch Western-Blot-Analyse.** Immunreaktion von anti-DMIF1-mAk auf Homogenate von *E.coli* Zellen, die pGEX-DMIF1 (Markierung VL) und das verkürzte Protein pGEX-DMIF1 Δ 3 (Markierung Δ 3) exprimieren. Exemplarisch sind die Reaktionen der Antikörperklone 272-208-1 und 272-460-6 (restliche Ak zusammengefasst in Tabelle 2) sowie die mit GST-mAk im Blot gezeigt (mAk 268-44-6). Gesamtproteinfärbung mit Ponceau S.

Antikörper, die GST-DMIF1 Δ 3 erkennen, binden demnach in einem Bereich zwischen Amino-Terminus und dem Aminosäurerest E35 (HindIII-Stelle im Gen). Alle anderen, die nur das vollständige Genprodukt GST-DMIF1 binden, erkennen ein Epitop stromabwärts von E35. Während der mAk 272-208-1 beide Proteine erkennt und sein Epitop sich somit am N-Terminus befindet, erkennt der mAk 272-460-6 nur die volle Länge, d.h. sein Epitop befindet sich in C-terminaler Richtung von E35. Die Ponceau S- Färbung wurde zur Beurteilung der

relativen Gesamtprotein-Mengen herangezogen: Trotz ausreichender Menge des Antigens GST-DMIF1 Δ 3 waren die Signale durch anti DMIF1-mAk erheblich schwächer als beim Protein voller Länge.

mAk-Nr.	Epitop	Subklasse	ELISA ^{***}	Western-Blot		
			GST-DMIF1	AX2	GFP-N-DMIF1	E.coli
272-208-1	N	IgG1	+	+	+	+
272-245-7	N	IgG1	+	+	+	+
272-250-7	?*	IgM	+	-	-	-
272-264-1	N	IgG1	+	+	+	+
272-329-4	N	IgG1	+	+	+	+
272-363-22	N	IgG1	+	+	+	+
272-374-1	?*	IgG1+IgM**	+	-	-	-
272-375-1	N	IgG1	+	+	+	+
272-383-4	N	IgG1	+	+	+	+
272-402-10	N	IgG1	+	+	+	+
272-433-6	N	IgG1	+	+	+	+
272-444-2	C	IgG1	+	+	+	+
272-450-16	?*	IgG1	+	+	+	-
272-455-8	?*	IgG1+IgG2a**	+	+	+	-
272-460-6	C	IgG1	+	+	-****	+

Tabelle 2 Eigenschaften monoklonaler Antikörper aus Fusion 272. Das jeweils im Protein DMIF1 erkannte Epitop in der N- oder C-terminalen Region wurde durch Antikörpermapping (siehe oben), die Subklasse durch den Ouchterlony Diffusionstest (Kapitel 14.4) bestimmt. Die Antikörper wurden im ELISA gegen das aufgereinigte Fusionsprotein GST-DMIF1 und im Western-Blot gegen denaturiertes Gesamtzell-Homogenat aus AX2-, GFP-N-DMIF1- und E.coli-Zellen getestet. * nicht bestimmbar, da Reaktion zu schwach oder DMIF1 nur nativ erkennbar, ** vermutlich Klongemische, *** positives Signal auf GST-DMIF1, negativ auf GST. **** Deutliche Reaktion auf GFP-C-DMIF1. Demnach konnten aus der Fusion nur 2 C-terminal bindende Ak-Klone isoliert werden (grau unterlegt).

3.2.3 Immunmarkierung in fixierten Zellen

3.2.3.1 DMIF1, GFP und Porin in fixierten Wildtyp- und GFP-C-DMIF1- Zellen

Mit den getesteten mAk wurden DMIF1-Markierungen sowohl an Wildtypzellen (AX2) als auch an den GFP-Transformanten GFP-N-DMIF1, GFP-C-DMIF1 und GFP-AX2 (M.Westphal) durchgeführt und mit Hilfe der durch Farbstoff-gekoppelte Sekundär-Antikörper erzeugten Fluoreszenz im LSM untersucht.

Anti-DMIF1-mAk binden unabhängig von ihrer jeweiligen DMIF1-Bindestelle sowohl in AX2-Zellen (Abbildung 3-12A, E) als auch in *GFP-C-DMIF1*-Zellen (Abbildung 3-13A) an Mitochondrien. Einzig die Fluoreszenz-Intensität erscheint bei den Transformanten in der Regel höher. Da es sich, relativ zum Wildtyp, um einen DMIF1-überexprimierenden Stamm handelt, entspricht diese Beobachtung der Erwartung. Daß die punktförmigen Objekte in *GFP-C-DMIF1*-Zellen tatsächlich Mitochondrien repräsentieren, wurde anhand der Markierung der äußeren mitochondrialen Membran mit Hilfe des anti-Porin-mAk 70-100-1 nachgewiesen (Troll et al. 1992, Abbildung 3-13F). Porin bildet in diesem Kompartiment einen Kanal für den Ionentransport. Durch Überlagerung der Lichtemission des Antikörpers mit den GFP-Signalen in *GFP-C-DMIF1*-Zellen (Abbildung 3-13G) konnten Objekte sichtbar gemacht werden, deren „grün leuchtendes Innere“ (welches GFP-C-DMIF1 repräsentiert) von einer rot fluoreszierenden „Hülle“ (welche mAk-gebundenes Porin repräsentiert) umgeben sind (Abbildung 3-13K). Weiter kann aus dieser Darstellung der Schluß gezogen werden, daß sich GFP-C-DMIF1 nicht in der äußeren Mitochondrienmembran befindet. Die monoklonalen Antikörper gegen DMIF1 zeigen in *GFP-AX2* ein vergleichbares Fluoreszenzbild wie in Wildtypzellen und *GFP-C-DMIF1*- Transformanten, nämlich die spezifische Markierung von Mitochondrien (Daten nicht gezeigt).

Polyklonale Antikörper gegen GFP, die in fixierten AX2-Zellen gar keine Struktur erkennen (Abbildung 3-14 F), binden in *GFP-C-DMIF1*-Zellen eindeutig und spezifisch an Mitochondrien, die demzufolge das rekombinante Protein bzw. zumindest dessen GFP-Anteil tragen (Abbildung 3-14C). Die gleichen Ak zeigen in *GFP-AX2*-Zellen eine strukturlöse Verteilung im Zytoplasma, was sich mit dem diffusen GFP- Fluoreszenzbild in lebenden wie in fixierten *GFP-AX2*-Zellen deckt (Daten nicht gezeigt). Mit Ausnahme einer bei starker GFP-Expression häufig auftretenden Akkumulation von GFP im Kern konnte weder eine mitochondriale noch irgendeine andere typische Anreicherung des reinen GFP beobachtet werden. Demnach ist auszuschließen, daß GFP für die spezifische Anreicherung des rekombinanten Proteins in den Mitochondrien verantwortlich ist.

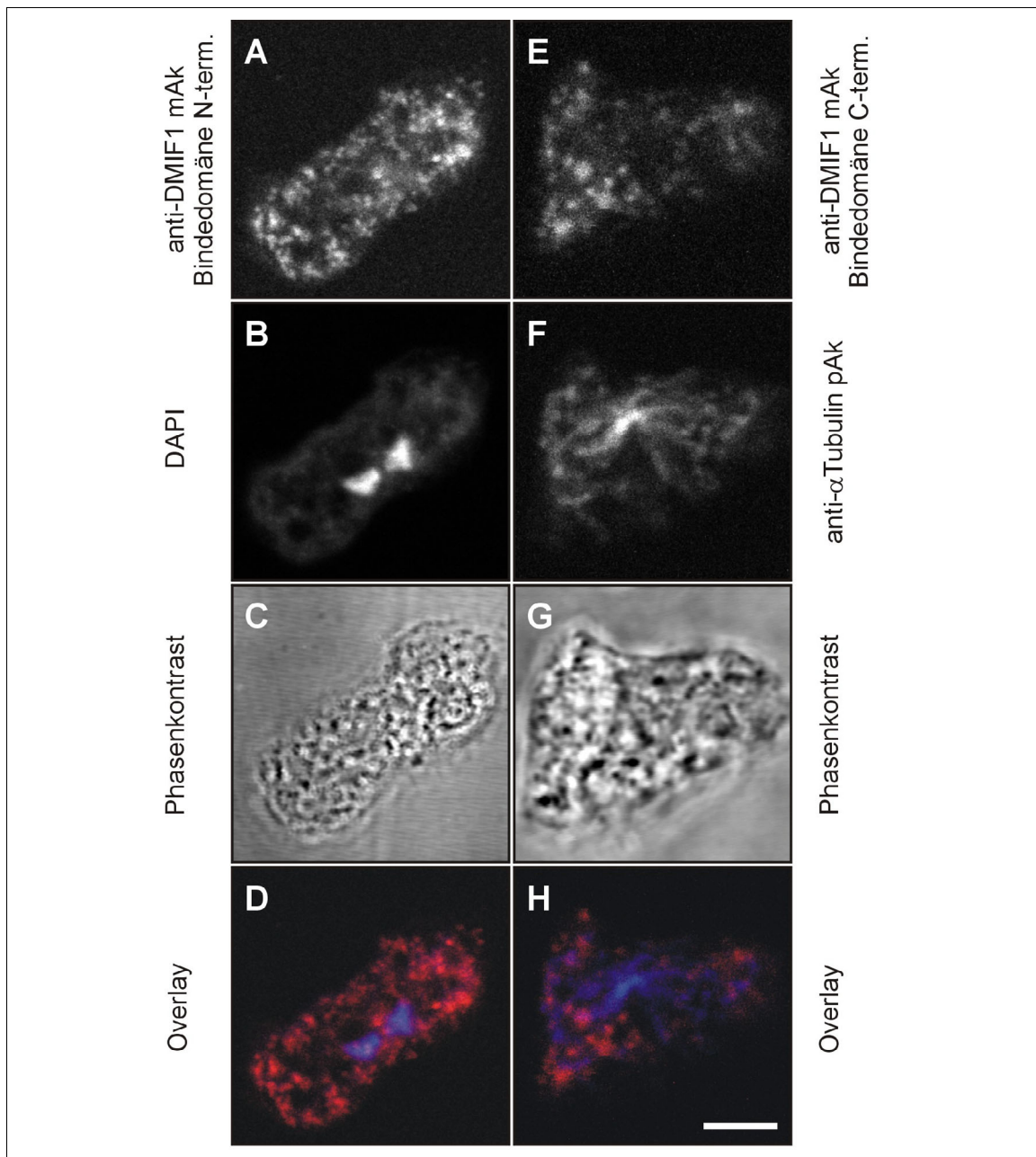


Abbildung 3-12 DMIF1, Tubulin und DNA in vegetativen Wildtypzellen (A) Mitochondrien (anti DMIF1 mAk 272-208-1). **(B)** Kerne (DAPI: in DNA interkalierender Farbstoff). **(C),(G)** Zellgestalt. **(D)** Überlagerung A, B. **(E)** Mitochondrien (anti DMIF1 mAk 272-444-2). **(F)** Mikrotubuli und Centrosom (anti α -Tubulin-Kaninchen-Serum polyklonal/GAR-CY5). **(H)** Überlagerung E, F. Sekundär-Antikörper: GAM-CY3 wenn nicht anders angegeben. Zellen AX2. LSM/Objektiv 63x/1.2 C-Apochromat-Wasserobjektiv. Balken 5 μ m.

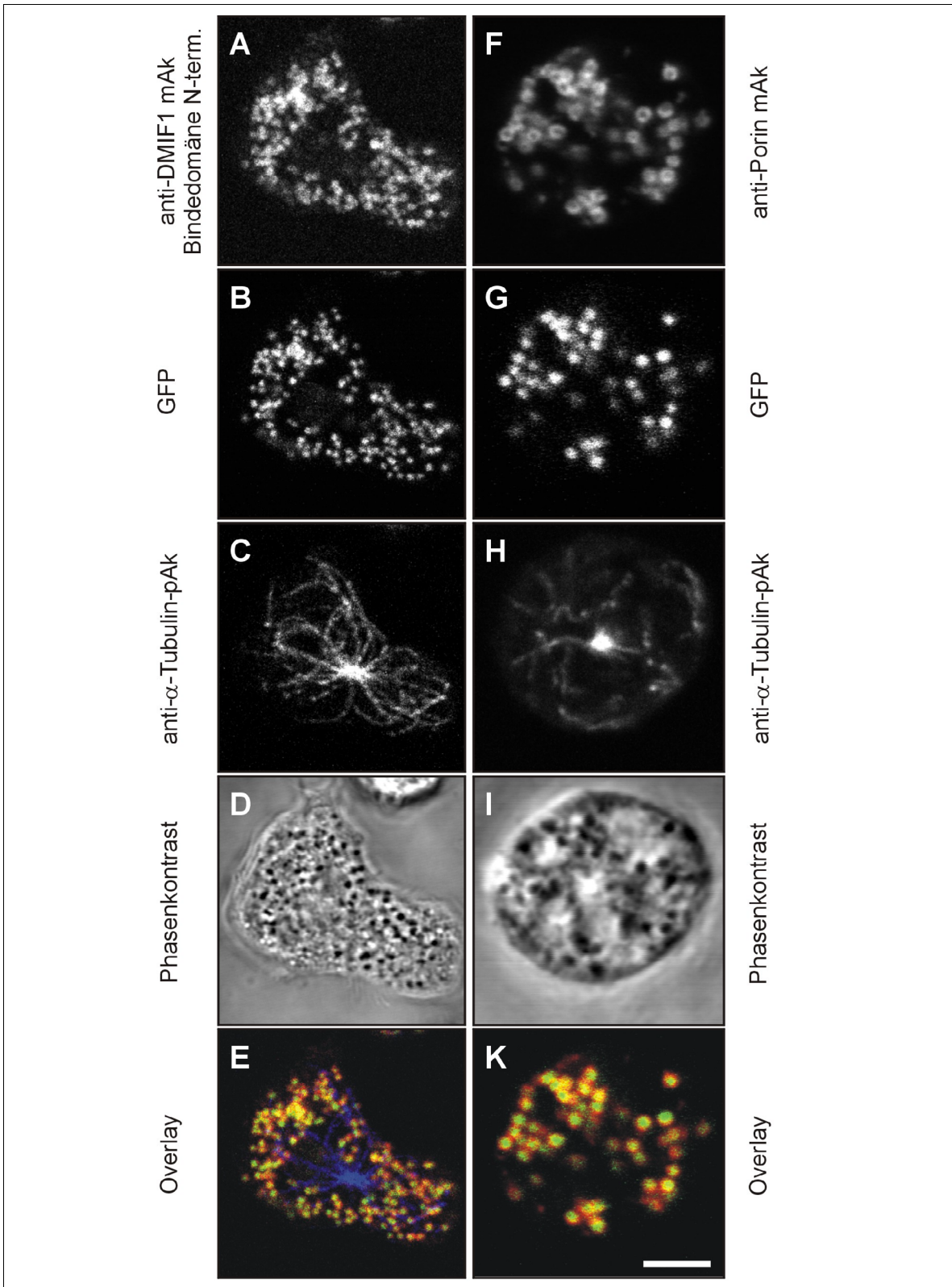


Abbildung 3-13 DMIF1, Tubulin und Porin in *GFP-C-DMIF1*-Zellen. (A) Mitochondrien (anti DMIF1 mAk 272-402-10/GAM-CY3). (B) Mitochondrien. (C) Mikrotubuli und Centrosom (anti- α -Tubulin pAk/GAR-CY5). (D), (I) Zellgestalt. (E) Überlagerung A,B,C. (F) Mitochondrien, äußere Membran (anti Porin mAk 70-100-1/GAM-CY5). (G) Mitochondrien. (H) Mikrotubuli (anti- α -Tubulin pAk/GAR-CY3). (K) Überlagerung F,G. Zellklon C1-5. LSM/Objektiv 63x/1.2 C-Apochromat-Wasserobjektiv (linke Reihe); 100x/1.3 Neofluar (rechte Reihe). Balken 5 μ m.

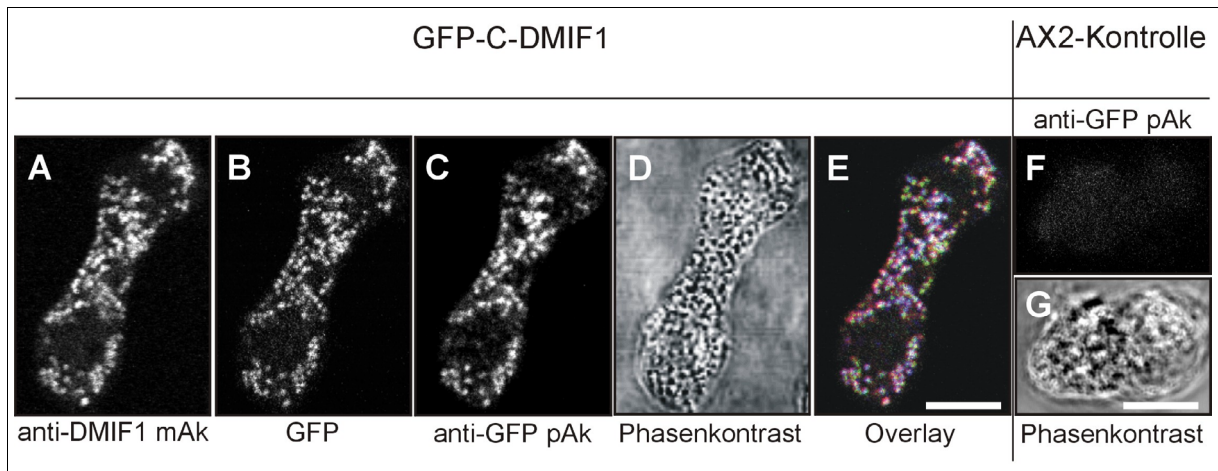


Abbildung 3-14 DMIF1 und GFP in GFP-C-DMIF1-Zellen. Mitochondrien. **(A)** anti-DMIF1-mAk 272-375-1/GAM-CY3. **(B)** GFP-Signal. **(C)** Polyklonales Kaninchenserum gegen GFP (pGFP, Clontech), Sekundär-Ak GAR-CY5. **(D)** Phasenkontrast. **(E)** Überlagerung von A bis C. Bei exakter Übereinstimmung addieren sich die Farben der 3 Kanäle zur Farbe Weiß. Verbliebene farbige punktförmige Objekte sind durch optische Verzerrungen hervorgerufen und repräsentieren in Wirklichkeit ebenso überlagerte Mitochondriensignale. **(F)** Negativkontrolle. Mit pGFP (Clontech)/GAR-CY3 inkubierte AX2-Zellen zeigen kein GFP-spezifisches Signal. **(G)** Phasenkontrastbild von F. Zellklon C1-5. LSM/Objektiv 63x/1.2 C-Apochromat-Wasserobjektiv. Balken 5 µm.

3.2.3.2 DMIF1, GFP und Porin in fixierten GFP-N-DMIF1-Zellen

Auch in *GFP-N-DMIF1*-Zellen werden Mitochondrien von mAk gegen Porin erkannt (Abbildung 3-15A). Mit anti-DMIF1-mAk ist das nur bei sehr schwacher Expression des rekombinanten Proteins möglich (Abbildung 3-15E, linke Zelle), da das Signal sonst wegen der starken Lichtemission im Zytoplasma, hervorgerufen durch die Immunmarkierung des dort akkumulierten rekombinanten Proteins, überstrahlt wird (Abbildung 3-15E, rechte Zelle). Im GFP-Kanal ist an gleicher Stelle kein Mitochondriensignal detektierbar, was zu dem Schluß führt, daß das Fusionsprotein GFP-N-DMIF1 im Gegensatz zum endogenen Protein DMIF1 dort nicht hingelangt.

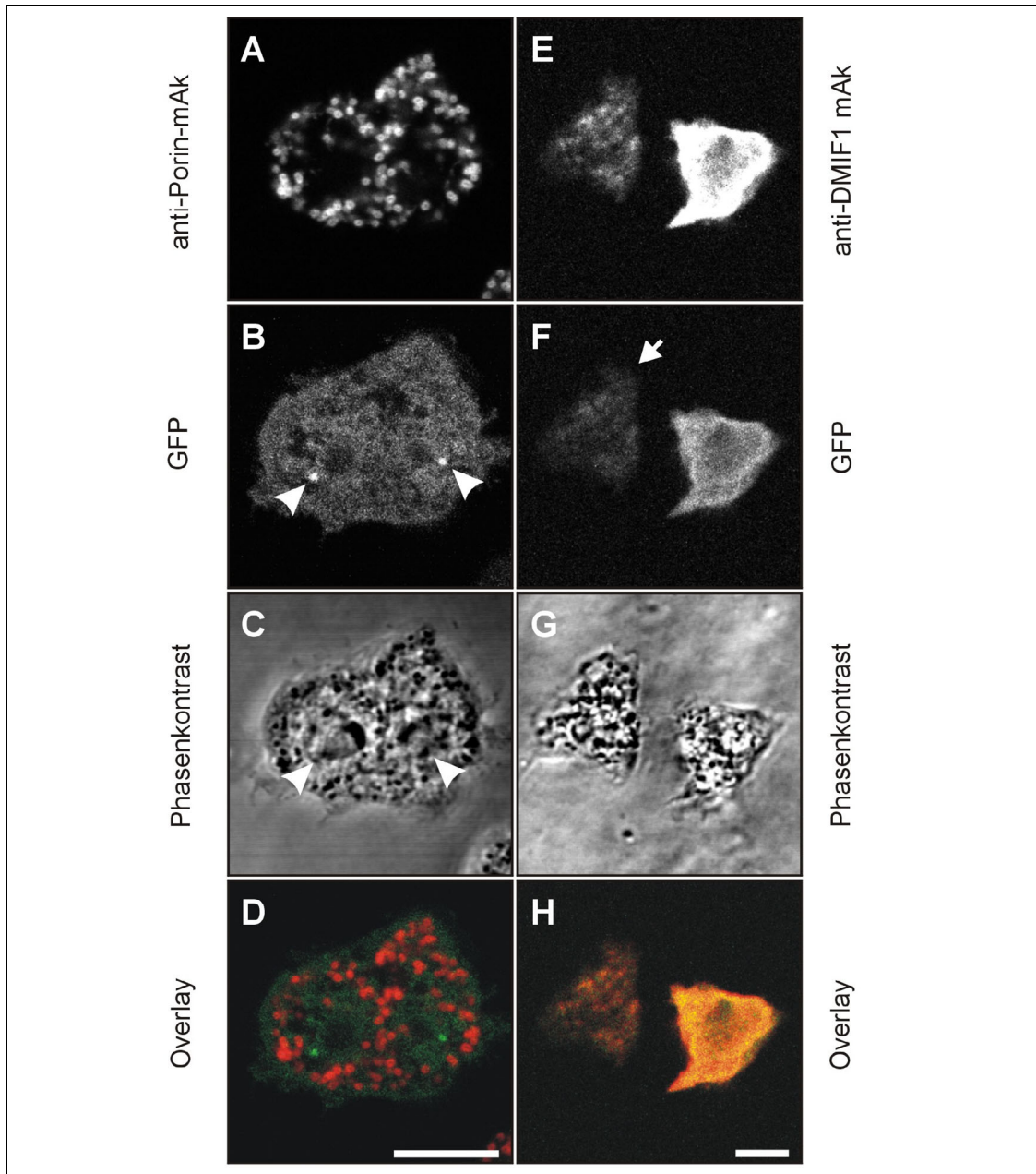


Abbildung 3-15 DMIF1 und Porin in GFP-N-DMIF1- Zellen. (A) anti-Porin-mAk 70-100-1/GAM-CY5. (B) GFP-Fluoreszenz: Neben zytoplasmatischen Ansammlungen befinden sich 2 punktförmige Objekte in unmittelbarer Kernnähe (vergleiche (C) Phasenkontrast). (D) Überlagerung von A und B. (E) In einer das Fusionsprotein GFP-N-DMIF1 schwach exprimierenden Zelle (links) sind mit dem anti-DMIF1-mAk 272-208-1/GAM-CY3 Mitochondrien detektierbar. Vor einem starken CY3-Fluoreszenzhintergrund im Zytoplasma (rechte Zelle), hervorgerufen durch die gleichzeitige Markierung des endogenen und des rekombinanten DMIF1, sind einzelne Organellen optisch nicht aufzulösen. (F) GFP-Signal: Weder bei schwacher noch starker Expression von GFP-N-DMIF1 können im GFP-Kanal Organellen detektiert werden. (G) Phasenkontrast. (H) Überlagerung von E und F. Zellklone: linke Reihe N1-13, rechte Reihe N5-3. LSM/Objektiv 100x/1.3 Neofluar. Balken 5 µm.

Die in lebenden Zellen als GFP-Fluoreszenz sichtbaren Höfe um die MTOC, die in fixierten Präparaten zu kompakten Einheiten kollabiert sind, werden weder von DMIF1-mAk (Abbildung 3-16A, F) noch von Ak gegen GFP (pAk: Abbildung 3-16H; mAk 264-449-2: Daten nicht gezeigt) erkannt. Das es sich hierbei tatsächlich um Centrosomen und nicht um dort zufällig auftretende Mitochondrien oder andere Organellen handelt, wurde anhand der Markierung der Mikrotubuli mit einem polyklonalen Antiserum gegen α -Tubulin überprüft (Abbildung 3-16C, α/β -Tubulin bilden die Hauptkomponenten von Mikrotubuli, der Ursprung Ak-markierter Tubulinfasern weist auf den Ort des Centrosoms). Die enge räumliche Beziehung der GFP-Signale zum Ausgangspunkt der Mikrotubuli (Abbildung 3-16B, G) sowie die regelmäßige Nähe zum Kern (siehe auch Lebendpräparate in Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5) spricht für die Zuordnung der Struktur zu den Centrosomen.

Auch hier bestätigt sich, daß die Darstellung der Mitochondrien mit DMIF1-Ak vor einem intensiven Fluoreszenzhintergrund im Zytoplasma schwierig ist: Bei mäßiger Fluoreszenzintensität sind noch einige distinkte Strukturen zu erkennen (Abbildung 3-16A), bei erhöhtem Signal ist das nicht mehr möglich (Abbildung 3-16F). Dabei ist es unerheblich, ob der verwendete Antikörper eine N-terminale oder C-terminale Domäne von DMIF1 erkennt (Daten nicht gezeigt).

Mitunter bilden *GFP-N-DMIF1*-Zellen im Zytoplasma DMIF1- immunreaktive netzartige Strukturen (Abbildung 3-16A). Aufgrund dieser Netzstruktur und weil der Transportweg für DMIF1 nach seiner Translation unbekannt war, wurde zunächst ein Zusammenhang mit dem ER vermutet. Deshalb wurden *Dictyostelium*-Zellen, die einen an GFP gebundenen ER-Marker exprimieren (Laborbezeichnung *GFP-MCS*; Dumontier et al., 2000; von Dr. H. Faix zur Verfügung gestellt) mit anti-DMIF1-Antikörpern markiert. Erwartungsgemäß zeigen diese Zellen bei der GFP-Anregung ein ER-typisches Netzwerk (Abbildung 3-16M). Die mit anti-DMIF1- mAk in solchen Zellen erzeugten Signale zeigen jedoch kein Netzwerk sondern ein eindeutiges mitochondriales Muster (Abbildung 3-16L).

In weiteren Kontroll-Experimenten wurden monoklonale Antikörper gegen ER-Proteine aus *D. discoideum* wie Calnexin (mAk 270-390-2, 270-349-1, M. Ecke) und Protein-Disulfid-Isomerase (mAk 159-387-4) zur Markierung von *GFP-N-DMIF1*-Zellen verwendet. Die Lokalisation der Antikörper konnte wie im vorangegangenen Experiment mit der zelleigenen GFP-Fluoreszenz nicht passend überlagert werden (Daten nicht gezeigt). Daher kann eine Lokalisation sowohl von DMIF1 als auch von *GFP-N-DMIF1* im ER ausgeschlossen werden.

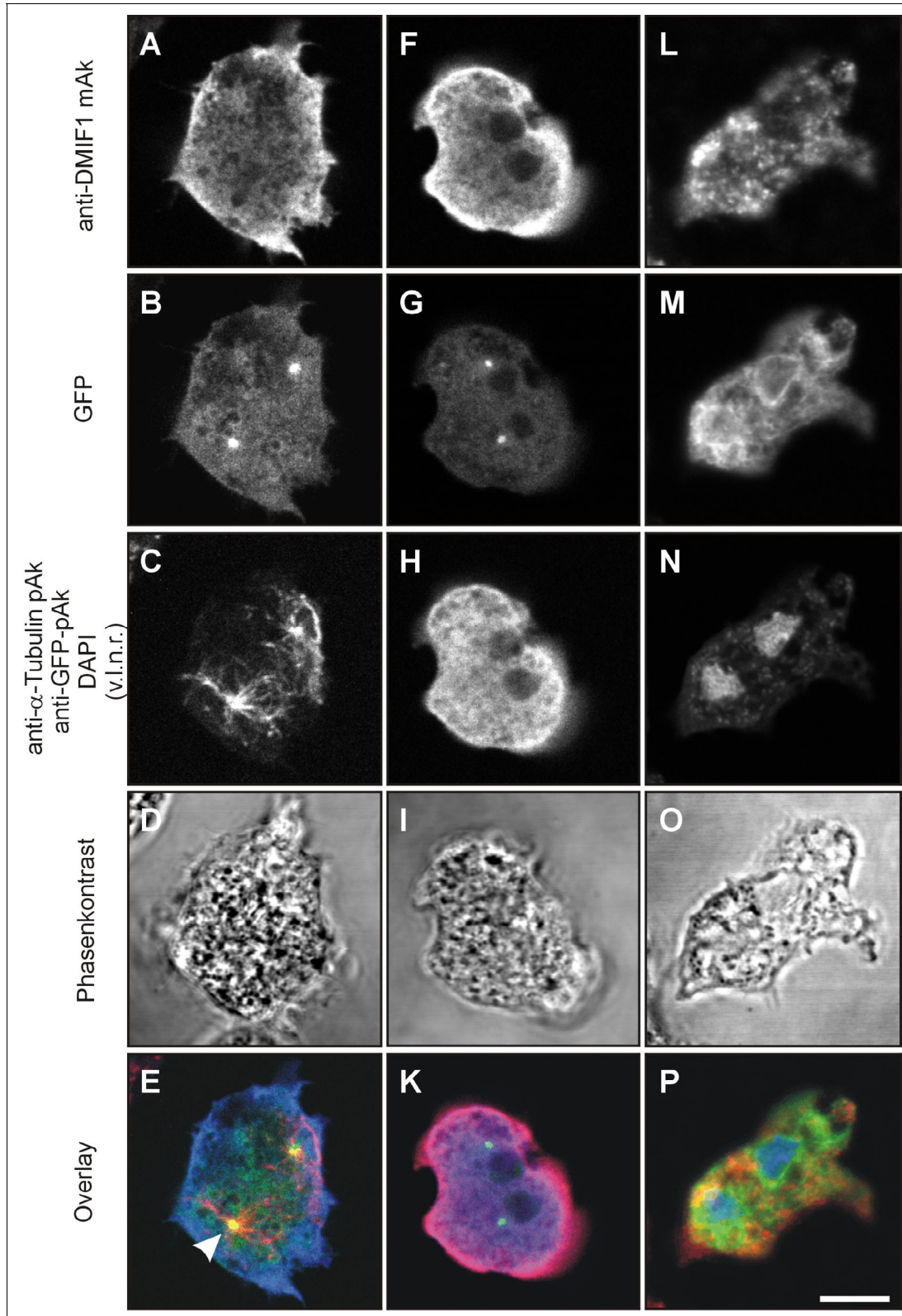


Abbildung 3-16 DMIF1, Tubulin, GFP, DNA in *GFP-N-DMIF1-IGFP-MCS*-Zellen.. Anti-DMIF1-mAk erkennen N-Terminus von DMIF1. Sekundär-Ak: GAM-CY3. **(A)** anti-DMIF1 mAk 272-402-10: diffuse Markierung **(F)** anti-DMIF1 mAk 272-375-1: diffuse Markierung **(L)** anti-DMIF1 mAk 272-208-1: Mitochondrien **(B)**, **(G)** GFP-Signal: Centrosomen **(M)** GFP-Signal: ER. **(C)** anti- α -Tubulin pAk/GAR-CY5. **(H)** anti-GFP-pAk (Clontech)/GAR-CY5 (Negativkontrolle siehe Abbildung 3-14F). **(N)** DAPI: Kern. **(D)**, **(I)**, **(O)** Zellgestalt. Überlagerung von A bis C **(E)**, F bis H **(K)** und L bis N **(P)**. Zellklone: N1-13 linke, mittlere Reihe, GFP-MCS rechts Balken 5 μ m.

3.3 DMIF1 lokalisiert im Grenzbereich von innerer Membran und Matrix

3.3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung von Wildtypzellen und GFP/DMIF1-Transformanten

Bisher konnte gezeigt werden, daß DMIF1 in Mitochondrien akkumuliert. Die folgenden Untersuchungen mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) dienen der Aufklärung der intramitochondrialen Lokalisation des Proteins.

Mitochondrien besitzen eine äußere und eine innere Membran, die den Intermembranraum begrenzen. Die Matrix im Innersten ist das vierte Kompartiment der Mitochondrien. Jedes dieser Kompartimente hat einen eigenen typischen Satz an Proteinen. Bisher untersuchte IF1-Proteine gehen eine Bindung mit der F1-Einheit der ATPase ein. Sie koppeln entweder an deren β -Untereinheit wie beim Rind (Klein et al., 1980) oder zwischen der α - und β -Untereinheit wie beim Hefe-Homolog (Mimura et al., 1993). Die hydrophile F1-Einheit bildet den katalytischen Teil des Enzyms, der in den Matrixraum hineinreicht, die hydrophobe F0-Einheit generiert den Protonenkanal, der in der inneren Membran angesiedelt ist.

Ultradünne Gefrierschnitte von Wildtyp-Zellen (AX2) und Transformanten (*GFP-N-DMIF1*: Klon N5-3; *GFP-C-DMIF1*: Klon C1-5) wurden mit einem monoklonalen IgG-Antikörper gegen DMIF1 (mAk 272-208-1) inkubiert und mit an Protein A gekoppelten Goldpartikeln im TEM sichtbar gemacht (Abbildung 3-17A, C und E, 15.2).

In allen Stämmen sind die Mitochondrien im Inneren markiert. Daß DMIF1 nicht in der äußeren Membran zu finden ist, war schon in Immunfluoreszenzpräparaten erkennbar (Abbildung 3-13) und wird durch Vergleich mit der Markierung von Porin im TEM besonders deutlich: hier sind die Goldpartikel dominierend in der Peripherie der Mitochondrien angereichert (Abbildung 3-17B). Es fällt auf, daß die Anzahl der DMIF1-markierenden Goldpartikel im *GFP-C-DMIF1*-Stamm erheblich höher ist als im Wildtyp. Das stimmt mit Immunfluoreszenzdaten überein und ist konsistent mit der Tatsache, daß *GFP-C-DMIF1*-Zellen das rekombinante Protein GFP-C-DMIF1 zusätzlich zum endogenen DMIF1 exprimieren. Besonders deutlich erkennt man eine Anreicherung der Goldpartikel entlang der inneren Membran, was sich im TEM-Bild wie Perlenschnüre darstellt (Abbildung 3-17A und C). Im Gegensatz zum *GFP-C-DMIF1*-Stamm zeigt der Stamm *GFP-N-DMIF1*, der das Fusionsprotein auch additiv zum normalen endogenen DMIF1 bildet, eine etwa gleiche Zahl markierender Goldpartikel wie der Wildtyp, was sich ebenfalls mit den Befunden aus der Fluoreszenzmikroskopie deckt. Dort konnte in den Mitochondrien von *GFP-N-DMIF1*-Zellen nur endogenes DMIF1, nicht aber GFP-N-DMIF1 nachgewiesen werden.

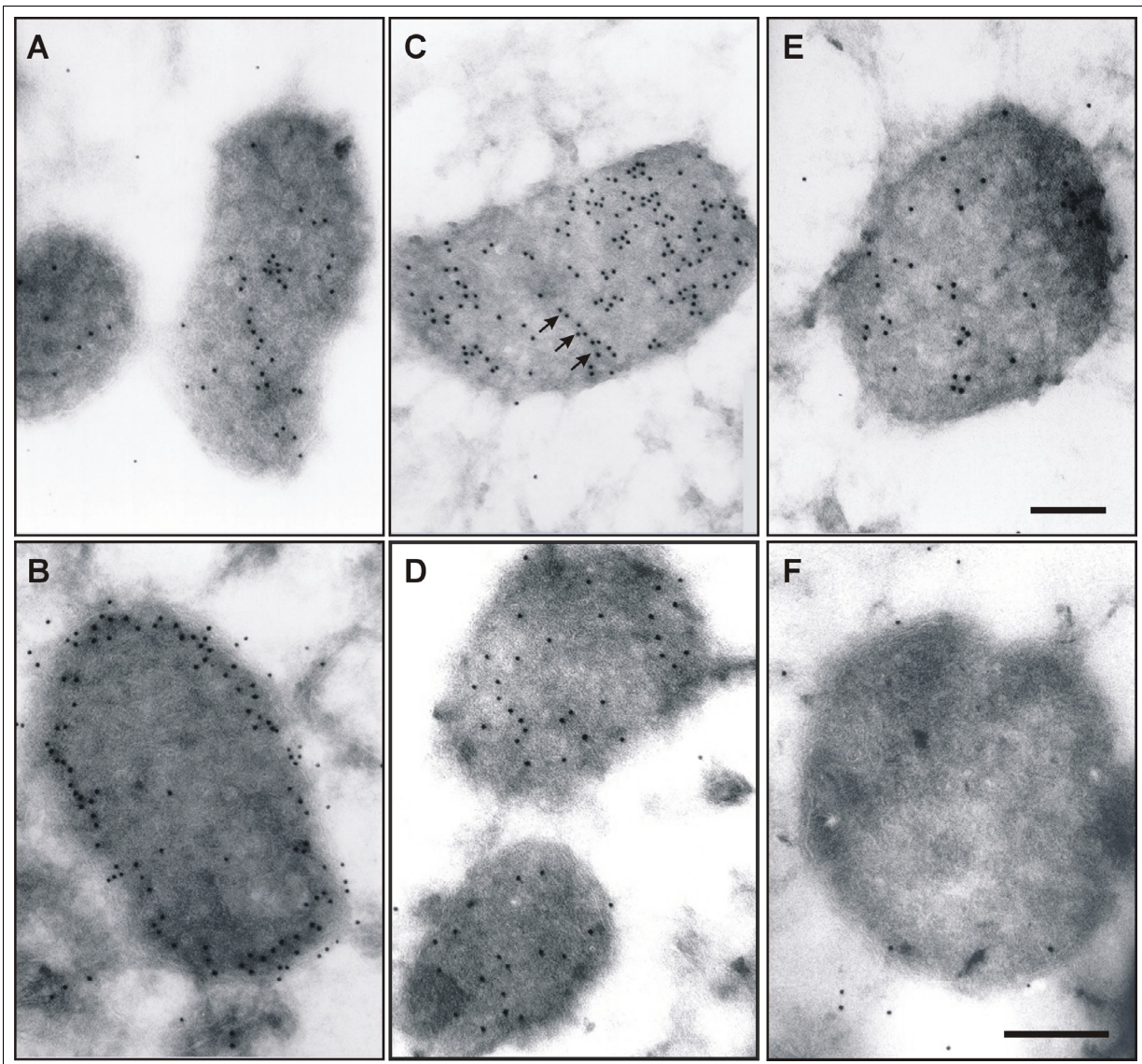


Abbildung 3-17 Ultradünne Kryoschnitte von Mitochondrien im TEM. Immunmarkierung von Mitochondrien in *D. discoideum* - Zellen. **(A)** DMIF1 in AX2. **(B)** Porin in AX2. **(C)** DMIF1 in *GFP-C-DMIF1* (Klon C1-5). Pfeile kennzeichnen den Verlauf eines der Tubuli. **(D)** GFP in *GFP-C-DMIF1* (Klon C1-5). **(E)** DMIF1 in *GFP-N-DMIF1* (Klon N5-3). **(F)** GFP in *GFP-N-DMIF1* (Klon N5-3). Monoklonale Primär-Ak (DMIF1: mAk 272-208-1; Porin: mAk 70-100-1) visualisiert mit Kaninchen-anti-Maus IgG (Sekundär-Ak) und Protein A-Gold; polyklonales Antiserum gegen GFP (Clontech), visualisiert mit Ak Ziege-anti-Kaninchen-Gold. Balken 0.2 µm (Balken in E gilt für alle Bilder außer F).

Auch mit polyklonalem Antiserum gegen GFP lassen sich in Zellen von *GFP-C-DMIF1* intramitochondriale Strukturen markieren (Abbildung 3-17D), während das in *GFP-N-DMIF1*-Zellen nicht der Fall ist (Abbildung 3-17F). Dort treten die Goldpartikel nur ganz vereinzelt an der Mitochondrienperipherie auf und akkumulieren vor allem im Zytoplasma, übereinstimmend mit dem GFP-Signal der Fluoreszenzpräparate.

3.3.2 DMIF1 bindet über seinen Rezeptor an die innere Membran

Auch wenn DMIF1 anscheinend an der inneren Membran lokalisiert ist, fällt die exakte Zuordnung der Markierung zu einem der drei möglichen intramitochondrialen Kompartimente schwer. Das hat vor allem zwei Gründe: *Dictyostelium discoideum* besitzt eine innere Membran vom Tubulus-Typ, deren Tubuli sehr kompakt aneinander lagern, so daß die Zuordnung der Markierung zu Matrix oder innerer Membran elektronenoptisch oft nicht eindeutig ist. Hinzu kommt, daß der Erhaltungszustand subzellulärer Strukturen bei der milden Fixierung, die eine Immunmarkierung an Kryoschnitten erlaubt, nicht optimal ist. Deshalb wurden die folgenden Markierungen an submitochondrialen Vesikeln, die aus aufgereinigten Mitochondrien präpariert waren, mit Hilfe der „Preembedding“-Technik (Kapitel 15.2.3.1) vorgenommen.

3.3.2.1 Präparation von submitochondrialen Vesikeln

Die Gewinnung von Mitochondrien aus AX2-Zellen und deren Anreicherung im Percoll-Gradienten erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Troll (Troll et al. 1992, Abbildung 3-18 A, Kapitel 13.5). Die Prozedur umfaßt im Wesentlichen eine Reihe fraktionierender Zentrifugationsschritte, die zu einer Aufreinigung der Mitochondrien durch weitgehende Abtrennung begleitenden Materials dient. Der letzte Schritt ist eine Zonen-Zentrifugation im Percollgradienten.

Ein Teil der von Percoll befreiten Mitochondrienfraktion wurde einer Behandlung mit Ultraschall unterzogen (Owen und Kaback, 1978; Thedinga, 1993). Durch diese Prozedur werden die Mitochondrien zerrissen. Die Doppelmembran wird in kleinere Membranstücke gespalten, die sich zu submitochondrialen Vesikeln schließen können. Oft besitzen solche Vesikel eine einfache Membran, die entweder aus der inneren oder äußeren Membran der Mitochondrien hervorgeht. Die Orientierung der Membranen hängt von der Richtung der Reassoziierung ab: es entstehen entweder "right side" Vesikel (RSV) mit der gleichen Orientierung der Kompartimente zueinander wie im intakten Mitochondrium, oder es entstehen "inside- out Vesikel (IOV), bei denen ehemals innere Kompartimente nach außen verlagert sind (Abbildung 3-18 B).

Ziel der Präparation ist es, die sehr eng aneinander liegenden Tubuli-Membranen zu separieren und somit die Matrix davon unterscheidbar zu machen, damit eine Aussage über die Lokalisation des DMIF1-Proteins gemacht werden kann.

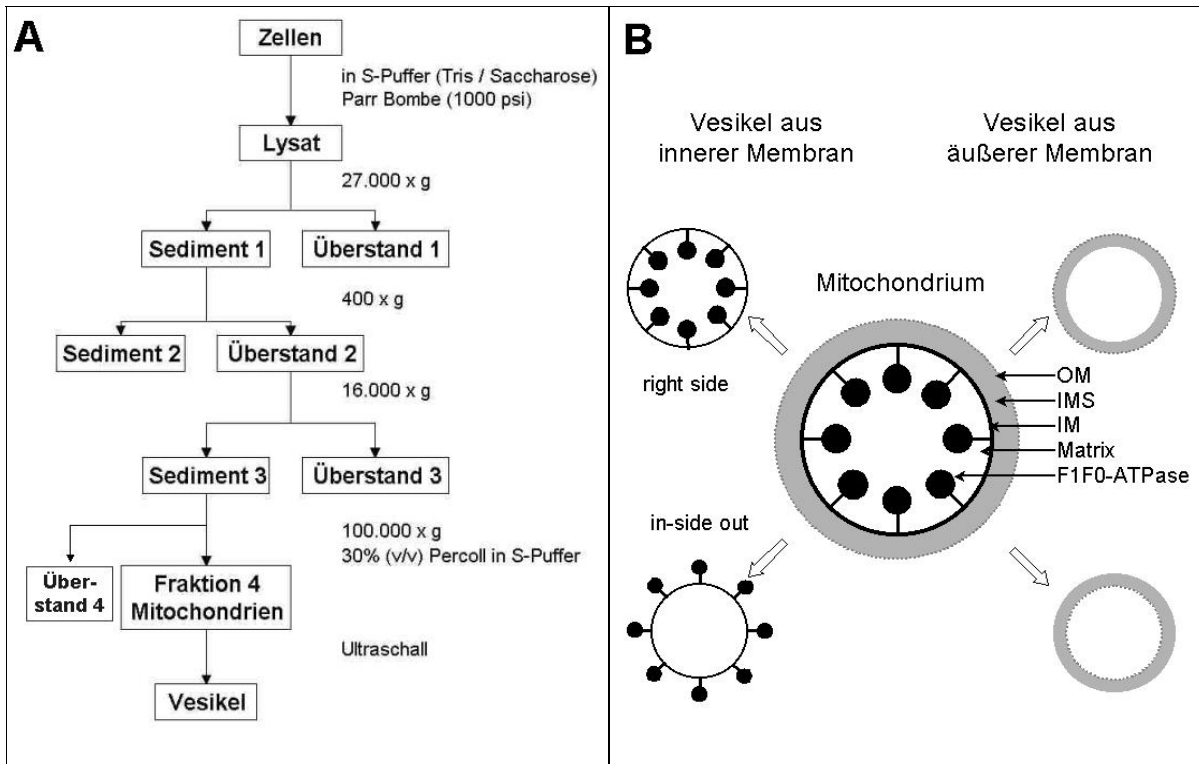


Abbildung 3-18 Gewinnung und Aufbereitung von Mitochondrien aus *Dictyostelium*-Zellen (A) Flußdiagramm für die Aufreinigungsprozedur mittels fraktionierender Zentrifugation. 1. Nach dem Zell-Aufschluß werden Zellpartikel und Bruchstücke (Sediment 1) bei 27.000xg von löslichen Bestandteilen (Überstand 1) abgetrennt. 2. Bei 400xg werden aus dem resuspendierten Pellet ungespaltene Zellen (Sediment 2) von kleineren Partikeln (Überstand 2, enthält u.a. Mitochondrien) separiert. 3. Die Mitochondrien werden aus dem Überstand 2 bei 16.000xg abzentrifugiert und so von weiteren kleineren Bruchstücken und Membranteilen abgetrennt. 4. Bei 100.000xg in einem Percollgradienten werden die Mitochondrien in einer Dichte-Fraktion angereichert. 5. Ultraschallbehandlung. **(B) Herstellung revertierter Vesikel - Prinzip von "right side" Vesikeln (RSV) und "inside-out" Vesikeln (IOV).** Behandlung von Mitochondrien mit Ultraschall führt zur Ruptur der Membranen und zu ihrer Reassemblierung in unterschiedlichen Modi. Im Modell sind die nach der Behandlung zu erwartenden Lokalisationen der F1F0-ATPase gekennzeichnet.

Der Aufreinigungsweg wurde durch Detektion der Fraktionen im Westernblot mit monoklonalen Antikörpern gegen DMIF1 (Abbildung 3-19A) und die β -Untereinheit der mitochondrialen F0F1-ATPase (Abbildung 3-19B) verfolgt. Im ersten Zentrifugationsschritt wurden die Mitochondrien nahezu quantitativ sedimentiert und im Verlauf der weiteren Aufreinigung von begleitenden Partikeln befreit. Der detektierte Anteil an DMIF1 im Sediment 2 ist auf unaufgebrochene Zellen und die darin enthaltenen Mitochondrien zurückzuführen.

DMIF1 wird fast quantitativ im Sediment 3 gefunden, es handelt sich also überwiegend um intakte Mitochondrien. Das Protein F1- β zeigte erwartungsgemäß ein sehr ähnliches Fraktionierungsverhalten wie DMIF1.

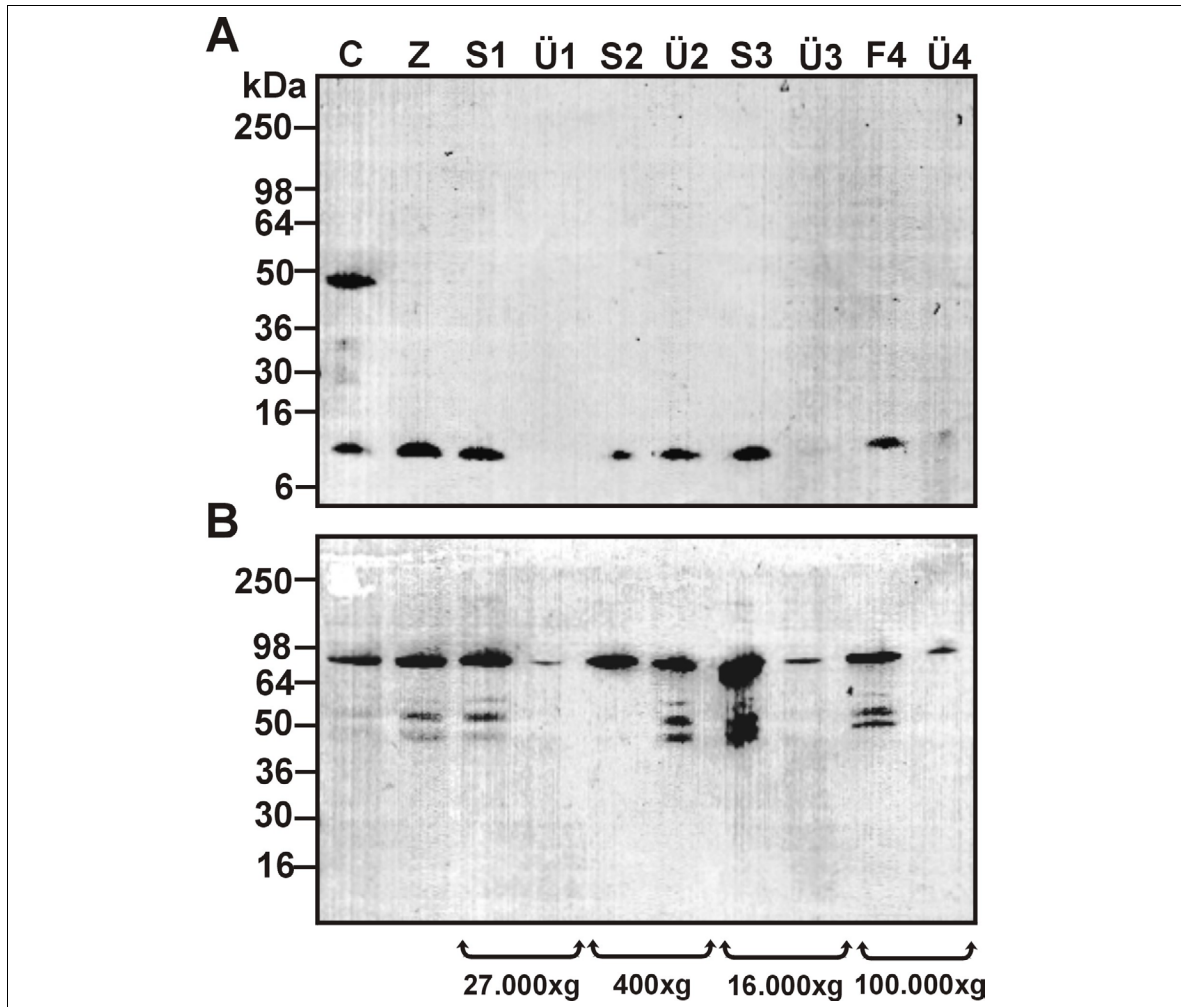


Abbildung 3-19 Westernblot zur Mitochondrien-Aufreinigung aus AX2: Alle während der Aufreinigung gewonnenen Fraktionen wurden als SDS-Proben auf einem 16%igen „Schägger“-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Übertragung auf eine Nitrozellulose-Membran mit mAk detektiert: **(A)** gegen DMIF1 (mAk 272-208-1). **(B)** gegen die β -Untereinheit von F1F0 aus *D.discoideum* (mAk 238-190-11). Die Fraktionen S_n repräsentieren die Sedimente 1-3, F_4 die Percollfraktion und \ddot{U}_n die zugehörigen Überstände 1-4. Ein Aliquot des Zellsedimentes (Z) wurde nach der Lyse durch die Parr-Bombe entnommen. Als Kontrolle C wurde das Zellpellet aus $7 \cdot 10^5$ Zellen der Transformante *GFP-C-DMIF1* (Klon C1-5) aufgetragen. Alle anderen Fraktionen entsprechen 10^6 Zellen bzw. Zelläquivalenten des Wildtyps AX2.

3.3.2.2 Submitochondriale Vesikel ("inside-out" Vesikel) im TEM

Die Bruchstücke von ultraschallbehandelten Mitochondrien wurden vor dem Fixieren mit monoklonalen Antikörpern gegen DMIF1 (Abbildung 3-20A, B), gegen F1- β als Marker der inneren Membran (Abbildung 3-20C) oder gegen Porin als Marker der äußeren Membran inkubiert (Abbildung 3-20D).

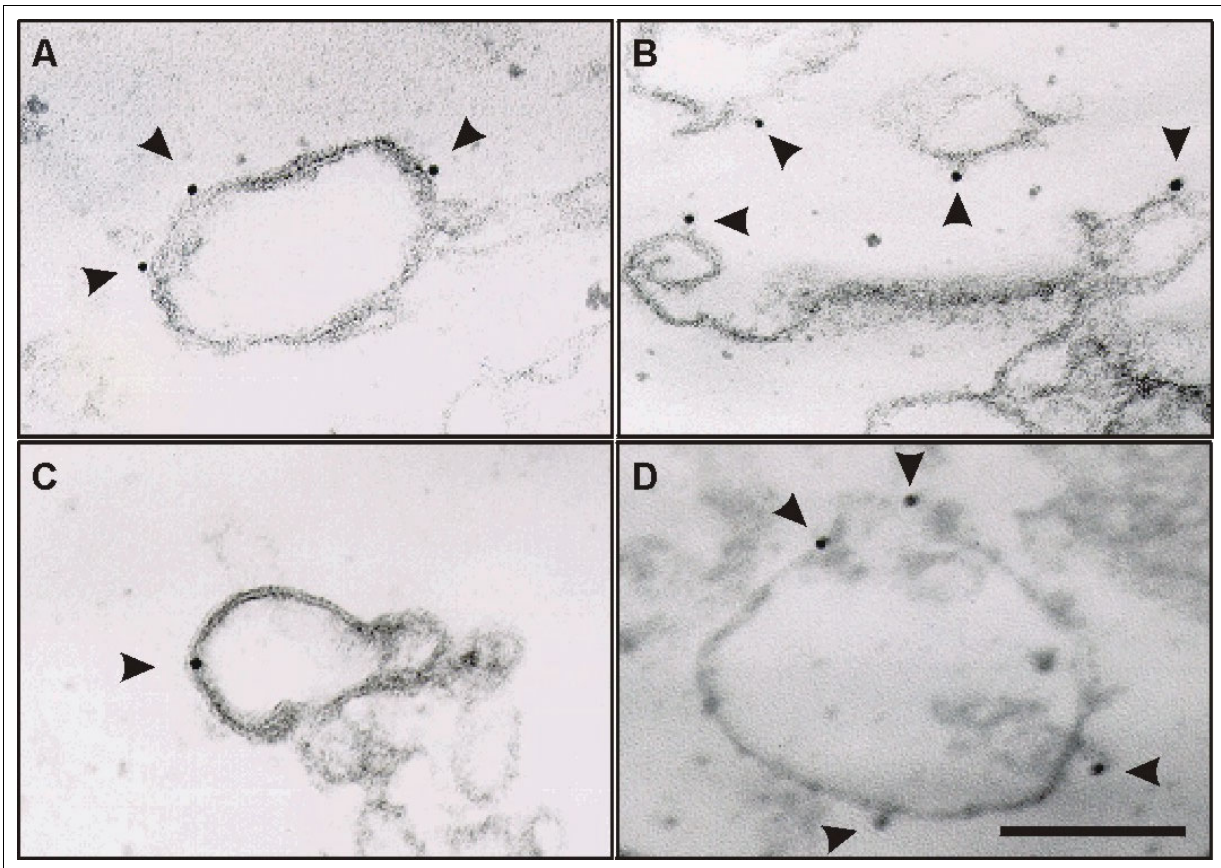


Abbildung 3-20 Immunmarkierung von Vesikeln aus mitochondrialen Membranen. Durch Ultraschallbehandlung von aufgereinigten Mitochondrien werden geschlossene und offene Membranstrukturen bestehend aus Einzel- oder Doppelmembranen erhalten. Markierung der Membranen mit anti-DMIF1-mAk 272-208-1 (A, B), anti-F1- β -mAk 238-190-11 (C) und anti-Porin-mAk 70-100-1 (D) und Detektion mit Kaninchen-anti-Maus Sekundär-Ak und Protein A-Gold. Bei der von anti-Porin-Antikörpern erkannten Struktur handelt es sich sehr wahrscheinlich um die äußere Mitochondrien-Membran. Eine Unterscheidung von IOV und RSV kann anhand der Befunde nicht getroffen werden. Dazu müsste eine Analyse des Lumens der Vesikel vorgenommen werden. Balken 2 μ m.

Der DMIF1-markierte IOV (Abbildung 3-20A), der augenscheinlich eine Doppelmembran besitzt, zeigt eine deutliche Assoziation von Goldpartikeln an seiner äußeren Membranseite (ehemals innere Membran). Die Markierung befindet sich in Distanz zur Membran, wie auf einem Stiel sitzend. Auch Vesikel mit Einzelmembranen oder nicht zirkulär geschlossene Membranteile zeigen diese Anlagerung an der Peripherie (Abbildung 3-20B). Auch der po-

tentielle Rezeptor für DMIF1, F1- β befindet sich in der vesikelbegrenzenden Membran (Abbildung 3-20C). Im Falle einer Lokalisation von DMIF1 in der Matrix erwartet man eine Anreicherung der Goldpartikel im Lumen von RSV oder gar keine Markierung, da die Matrix bei der Präparation entfernt wird.

Die Markierung der Membranen mit anti-DMIF1-Antikörpern spricht gegen die Lokalisation von DMIF1 in der Matrix. Andererseits erwartet man bei der Bindung an die Lipidmembran hydrophobe Domänen in der Proteinsequenz, die im Protein DMIF1 nicht vorhanden sind. Der beobachtete „Stiel“ ist ein Indiz für die Verbindung von DMIF1 mit der Membran über ein Linkerprotein, zum Beispiel die α - oder β -Untereinheit der F1F0-ATPase als Rezeptor. DMIF1 bindet wahrscheinlich über einen solchen Rezeptor an die innere Membran.

Für die relativ geringe Markierungsausbeute sind mehrere Gründe denkbar. Mitochondrienpräparationen sind häufig von Peroxisomen, Resten der Plasmamembran und des ER sowie Lysosomen begleitet. Der Anteil mitochondrialer Strukturen im Präparat ist daher gering (Parish, 1975). Enthaltene Lysosomen sind zudem nach einer Ultraschallbehandlung nicht mehr intakt, so daß lysosomale Proteasen zu Degradationen führen können. Weiterhin werden 95% aller Vesikel von Teilen der inneren Membran begrenzt, was durch deren viel größere Oberfläche relativ zur äußeren Membran hervorgerufen wird (Fleischer et al., 1974). Demnach war bei Vesikeln, die mit anti-Porin-Antikörpern markiert wurden, die beobachtete geringe Markierungseffizienz zu erwarten. Immundetektierbare Vesikel, die aus der Zytoplasma-Membran von *E.coli* generiert wurden, zeigten, daß die "right side" Konfiguration gegenüber der Ausbildung invertierter Vesikel bevorzugt zu sein scheint (Owen und Kaback, 1978). Für Porin-Markierungen an Vesikeln, die aus der äußeren Mitochondrienmembran bestehen, wäre das von Vorteil, für die Antigene der inneren Membran wie die F1F0-ATPase und DMIF1 ist es ein Nachteil für die Markierungsausbeute.

3.3.3 GFP-N-DMIF1 am Centrosom – ein Artefakt ?

Für die Untersuchung der Centrosomen (MTOC) im TEM wurden Kryopräparate von GFP-N-DMIF1-Zellen (Klon N5-3) mit monoklonalen Antikörpern gegen DMIF1 (mAk 272-208-1) und polyklonalem Serum gegen α -Tubulin inkubiert. Beide Antikörper wurden mit verschiedenen großen Goldpartikeln, gekoppelt an sekundäre Antikörper, detektiert. In Kryopräparaten schwer identifizierbaren Centrosomen sollten mit Hilfe der Tubulin-Darstellung erkannt und auf Anwesenheit von (GFP-N)-DMIF1-Protein untersucht werden. Mikrotubuli sind durch Antikörper gegen α -Tubulin gut darzustellen. Die so detektierten Centrosomen wurden durch DMIF1-Ak jedoch nicht markiert (Abbildung 3-21A, B). Bei der Detektion von Mitochondrien gab es mit dem gleichen Antikörper keine Schwierigkeiten (Abbildung 3-21C).

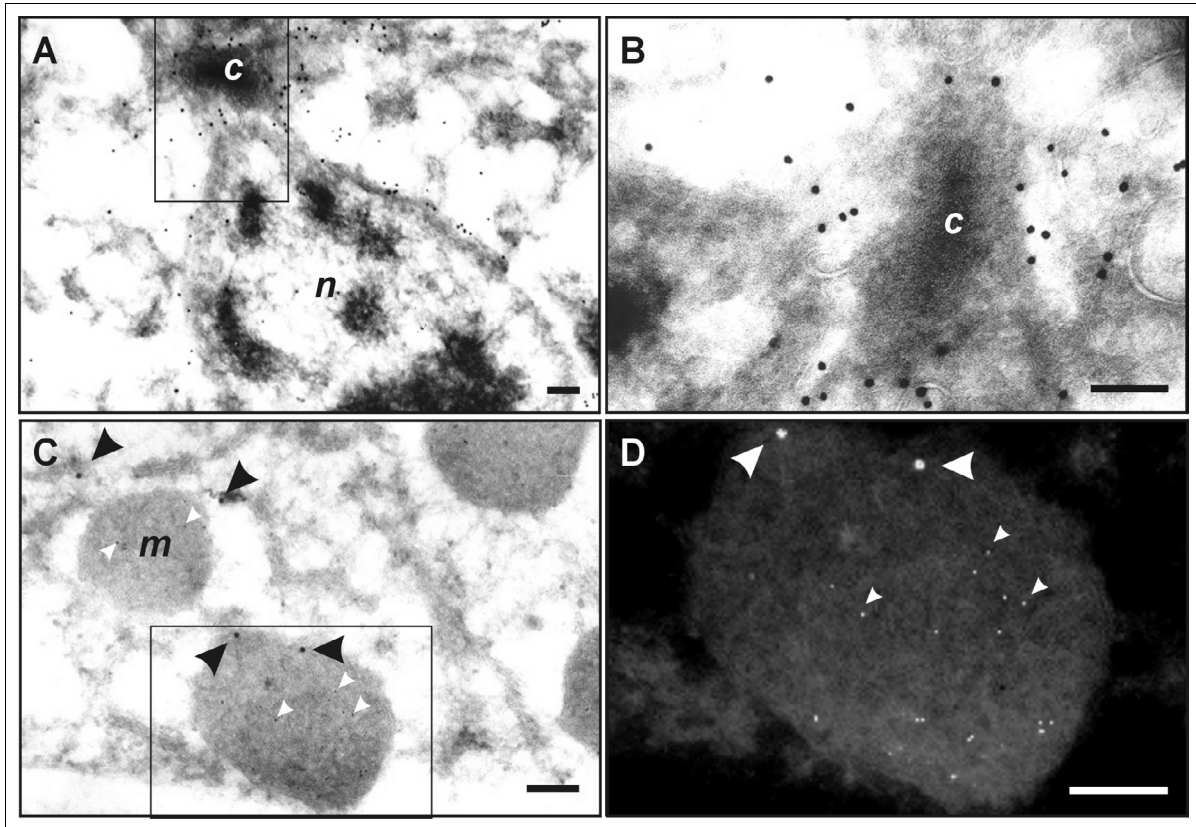


Abbildung 3-21 Immunmarkierung von Kryo-Ultradünnschnitten von *GFP-N-DMIF1*-Zellen im TEM. Doppelmarkierung mit anti-DMIF1 mAk (Durchmesser der Gold-Partikel 1nm) und anti- α -Tubulin-pAk (polyklonales Serum, Durchmesser der Gold-Partikel 15 nm). **(A)** An der Spitze des Kerns (n nucleus) befindet sich das Centrosom (c), welches von Mikrotubuli umgeben ist. Hier konnte kein GFP-N-DMIF1-Fusionsprotein lokalisiert werden. **(B)** 3fache Vergrößerung des Ausschnittes in A. **(C)** Intramitochondriale DMIF1-Markierung (weiße Pfeile), Mikrotubuli an der Peripherie (schwarze Pfeile). **(D)** 2fache Vergrößerung des Ausschnittes in C und inverse Abbildung zur besseren Darstellung der DMIF1-Markierung. Die Pfeile korrespondieren mit denen im Ausschnitt in C. Balken 0.2 μ m.

Der Nachweis von GFP als Bestandteil von GFP-N-DMIF1 in der centrosomalen Umgebung mittels polyklonalem anti-GFP-Serum blieb ebenfalls ergebnislos (Daten nicht gezeigt) und bestätigt die Daten aus der Fluoreszenzmikroskopie, obwohl in dieser Region eine durch GFP hervorgerufene Fluoreszenz eindeutig beobachtbar war. Eine Anreicherung von GFP-N-DMIF1 in der Centrosomen-Umgebung konnte demnach nicht nachgewiesen werden. Ebenso wenig wurde das Protein in den Mitochondrien mit anti-GFP-Serum gefunden (Kapitel 3.3.1, Abbildung 3-17F), stattdessen trat eine deutliche Akkumulation im Zytoplasma auf, was mit der GFP-Fluoreszenz in diesem Kompartiment übereinstimmt. Im Kontrollexperiment mit *GFP-C-DMIF1*-Zellen wurden wie erwartet mit anti-GFP-Serum innere Bereiche der Mitochondrien markiert (Abbildung 3-17E). Die Markierungsdichte war geringer als mit anti-DMIF1-Ak (Abbildung 3-17C), da letzterer neben dem rekombinanten auch das endogene Protein erkennt. Die Lokalisation von GFP in den Mitochondrien von *GFP-C-DMIF1*-

Zellen bestätigt den Übertritt des rekombinanten Proteins inklusive seines GFP-Anteils vom Zytosol in die Mitochondrien.

Der Bereich um die Centrosomen, der in lebenden *GFP-N-DMIF1*-Zellen durch GFP sichtbar gemacht wird, erscheint groß im Verhältnis zum eigentlichen MTOC. Auf der Suche nach morphologischen Besonderheiten in diesem Bereich wurden Zellen der Klone N1-13 und N5-3 in Glutaraldehyd/ Osmiumtetroxid fixiert, in EPON-Harz eingebettet und mit *AX2*- und *GFP-C-DMIF1*-Zellen im TEM verglichen (Abbildung 3-22). Hier ist zunächst der Eindruck einer deutlichen Vergrößerung der Centrosomen sowohl in *GFP-N-DMIF1*- als auch in *GFP-C-DMIF1*-Transformanten gegenüber Centrosomen in *AX2*-Zellen zu gewinnen.

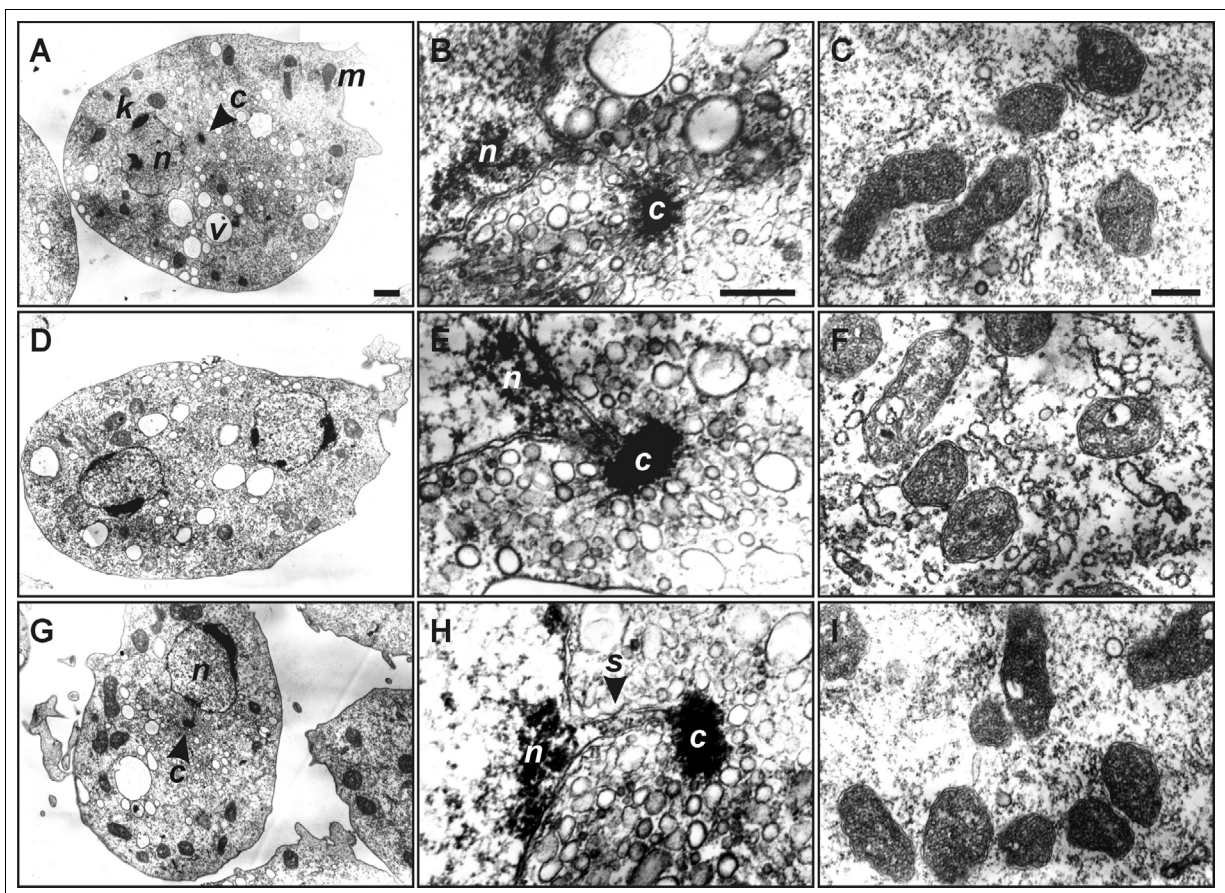


Abbildung 3-22 Morphologie von Centrosomen und Mitochondrien. Zellen von *AX2* (A-C), *GFP-C-DMIF1* (D-F) und *GFP-N-DMIF1* (G-I). EPON-Einbettung. **linke Reihe:** Übersichtsbild von Zellstrukturen: Kern (n, nucleus) mit Kernkappen (k), Vakuolen (v), Mitochondrien (m), Centrosomen (c). **mittlere Reihe:** Centrosomen befinden sich an einer stielartigen Struktur (s, Pfeile) an der Spitze des Kerns. **rechte Reihe:** Mitochondrien, Balken linke Reihe 1 μm , Balken mittlere und rechte Reihe 0,5 μm .

Entgegen diesem Erscheinungsbild ergab die Auswertung mehrerer TEM-Bilder, daß keine deutlich vergrößerten Centrosomen im Vergleich zur Kontrollgruppe (*AX2* und *GFP-*

AX2) auftraten, weder in *GFP-C-DMIF1*- Zellen noch in *GFP-N-DMIF1*-Zellen. Auch andere Zellbestandteile wiesen weder in Struktur noch Größe augenscheinliche Besonderheiten auf (Abbildung 3-23). Problematisch bei dieser semiquantitativen Auswertung sind die unterschiedlichen Schnittebenen durch die Centrosomen und die kleinen Fallzahlen.

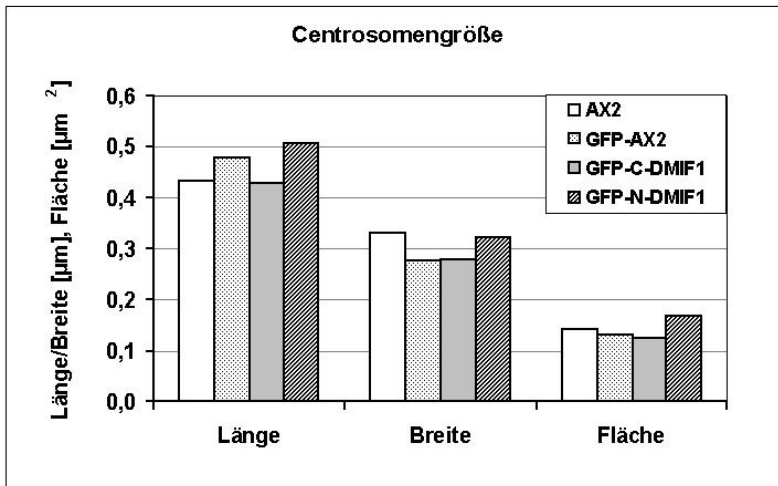


Abbildung 3-23 Größenverhältnisse von Centrosomen im TEM. Zellen von AX2, *GFP-AX2*, *GFP-C-DMIF1* (Klone C1-5 und C1B7), *GFP-N-DMIF1* (Klone N1-13 und N5-3). Simultanfixierung in Glutaraldehyd/ Osmiumtetroxid und EPON-Einbettung. Vermessung von Centrosomen in 1:20.000 bis 1:100.000 vergrößerten Abbildungen. Anzahl der Objekte: 6x AX2, 2x *GFP-AX2*, 5x *GFP-C-DMIF1* (2x Klon C1-5, 3x Klon C1B7), 11x *GFP-N-DMIF1* (9x Klon N1-13, 2x Klon N5-3).

Da das GFP-fluoreszente Material nicht direkt in die Centrosomen inkorporiert wird, wie bereits durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen wurde (Kapitel 3.1.2.2), sondern aus der sie umgebenden Region stammt, muß der Fokus für künftige Untersuchungen auf diesem Bereich liegen. In einigen TEM-Präparaten erscheint diese Region elektronendichter als in den Stämmen AX2 und *GFP-C-DMIF1* (Abbildung 3-24).

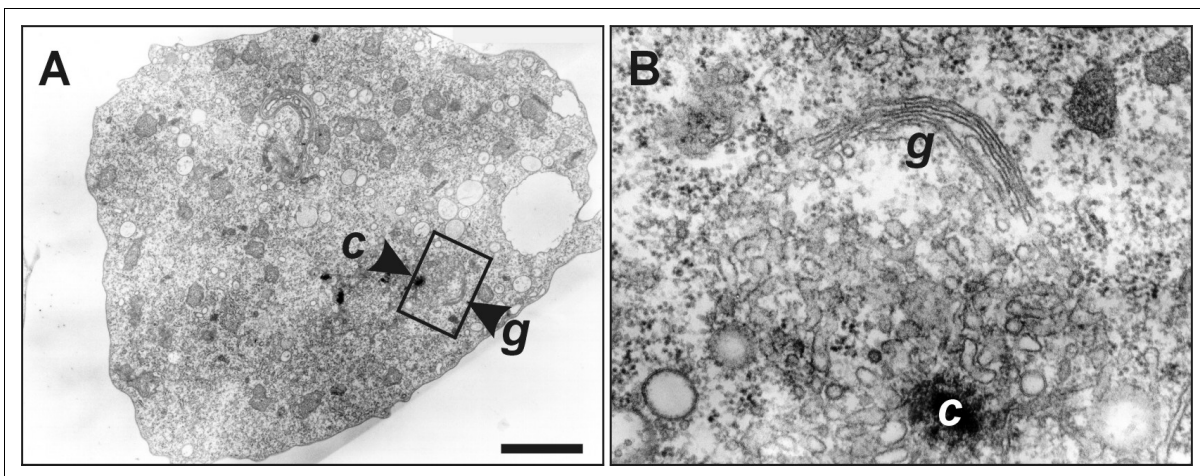


Abbildung 3-24 Centrosom in Nachbarschaft zum Golgi-Apparat. (A) Übersichtsbild einer *GFP-N-DMIF1*- Zelle (Klon N5-3) c: Centrosom, g Membranstapel des Golgi-Apparat. Balken 3 μm . (B) Vergrößerung des Fensters in A; horizontale Kantenlänge 3 μm .

4 Einfluss von GFP auf Zielsteuerung und Prozessierung

Während das Protein GFP-C-DMIF1 wie das endogene Protein DMIF1 in die Mitochondrien importiert wird, ist dies für das Protein GFP-N-DMIF1 offensichtlich nicht der Fall. Der einzige Unterschied zwischen beiden Proteinen besteht in der Anordnung des GFP. Viele kernkodierte Proteine, die für den Transport in die Mitochondrien bestimmt sind, werden im Zytoplasma synthetisiert und im ungefalteten Zustand zu den Organellen mit Hilfe von Targeting-Sequenzen dirigiert. Diese Sequenzen befinden sich am N-Terminus des Präproteins und werden in vielen Fällen nach dessen Translokation in die Mitochondrien durch sequenz- oder strukturspezifisch wirkende Proteasen wie z.B. die mitochondriale Processing Peptidase (MPP) abgespalten. Durch Faltung mit Hilfe von Chaperonen erhält das reife Protein seine physiologisch aktive Form. Es lag der Verdacht nahe, daß die Funktion im rekombinanten Protein GFP-N-DMIF1 durch die räumliche Nähe der Signalsequenz zu GFP und damit durch eine potentielle sterische Abdeckung der Erkennungsdomäne in zweierlei Hinsicht gestört ist: Entweder in Form einer Beeinträchtigung der Zielsteuerung und/oder durch die Hemmung der anschließenden Prozessierung des Präproteins. Für die Störung der Targeting-Funktion gibt es Daten aus der Fluoreszenz- und der Elektronen-Mikroskopie. Im Fluoreszenzmikroskop sind unter den vielen Mitochondrien von *GFP-N-DMIF1*-Zellen nach Anregung der GFP-Emission keine grün leuchtenden Mitochondrien detektierbar. Im Zytoplasma von EM-Präparaten sind sehr viele mit Goldpartikeln gekoppelte anti-GFP-Antikörper gebunden, in der Nähe von oder gar in den Mitochondrien jedoch nahezu keine.

Die Beeinträchtigung der Abspaltung der Signalsequenz durch Proteasen ist Gegenstand der im folgenden Kapitel beschriebenen Untersuchungen.

4.1 Hemmung der Abspaltung der Signalsequenz

Bei Abspaltung der Targeting-Domäne sollten aus dem knapp 14 kDa großen Präprotein zwei kleinere Fragmente entstehen. Anhand publizierter IF1-Proteine mit bekannten MPP-Spaltstellen kann auf eine potentielle MPP-Spaltstelle in DMIF1 bei G28 geschlossen werden. Die entstehenden Fragmente haben demnach ein Molekulargewicht von knapp 4 kDa für die Targeting-Domäne und geringfügig mehr als 10 kDa für das reife Protein.

Zellhomogenate von *GFP-N-DMIF1*, *GFP-C-DMIF1*, *GFP-AX2* und *AX2* wurden im Westernblot auf diese Fragmente hin analysiert. Es wurden verschiedene Antikörper gegen DMIF1 eingesetzt, deren Bindedomänen entweder dem ersten Drittel der Proteinsequenz (Bereich des Signalpeptides) oder dem C-terminalen Rest (Bereich des funktionsfähigen Proteins) zugeordnet werden, sowie Ak gegen GFP. Das erwartete Bandenmuster

(Abbildung 4-1) wurde in mehreren Immunoblots mit verschiedenen Antikörperkombinationen verglichen (ein Blot ist in Abbildung 4-2 dargestellt, weitere Daten nicht gezeigt).

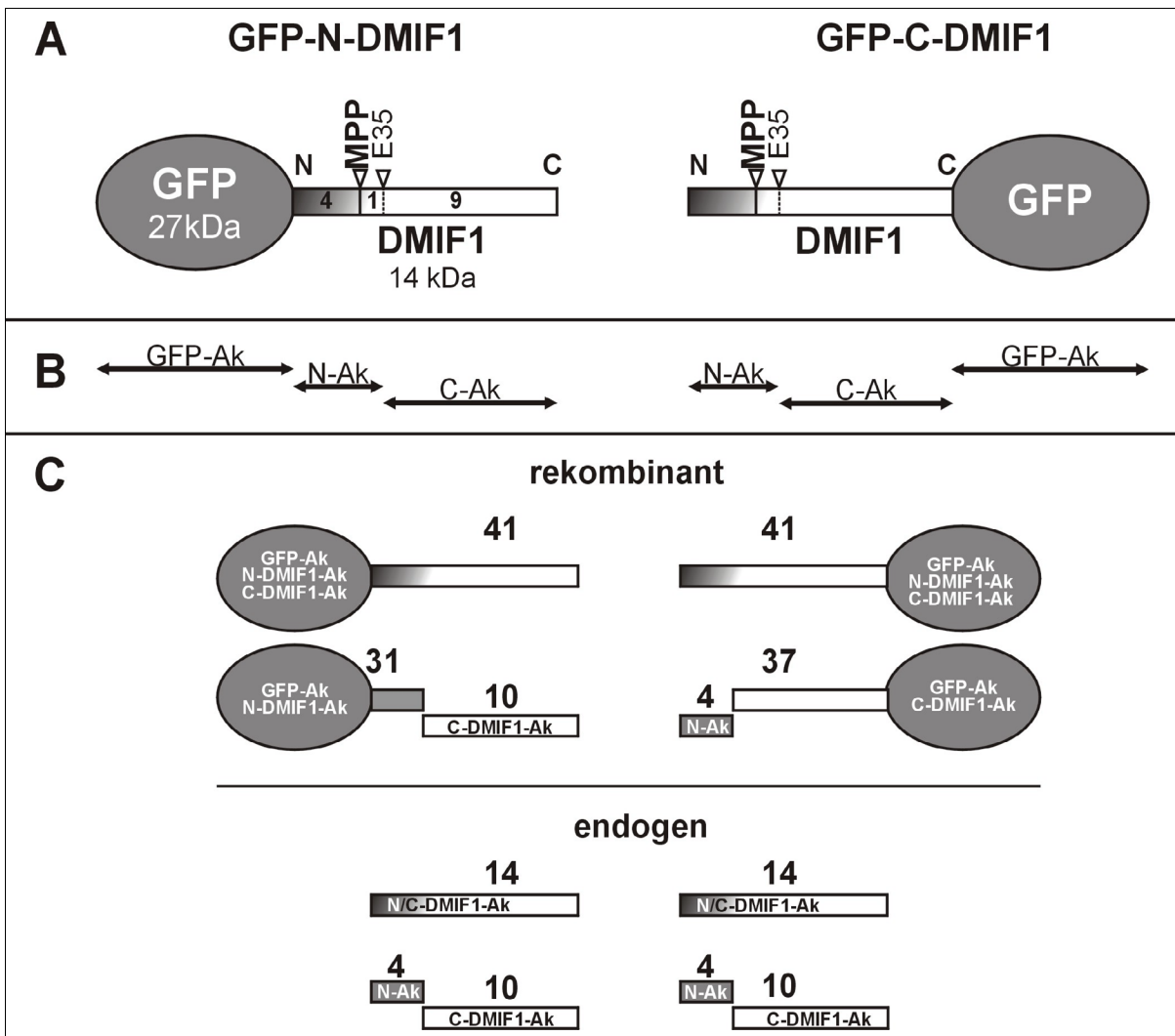


Abbildung 4-1 Prozessierung von GFP-N-DMIF1 und GFP-C-DMIF1 - Erwartete Fragmente. **(A)** Aufbau beider rekombinanten (Prä)Proteine mit hypothetischer MPP-Schnittstelle. E35 bezeichnet die Position der HindIII-Schnittstelle im zugehörigen Gen, die zur Konstruktion des C-terminal verkürzten Proteins GST-DMIF1 Δ 3 verwendet wurde (Kapitel 3.2.2.2). Ziffern kennzeichnen kalkulierte Fragmentgrößen. **(B)** Von den verwendeten Antikörpern erkannte Domänen im Protein. Anti-GFP-Ak (GFP-mAk 264-449-2, pAk Clontech), anti-DMIF1-mAk N-terminal bindend (N-Ak), anti-DMIF1-mAk C-terminal bindend (C-Ak). **(C)** Fragmente nach Prozessieren des DMIF1-Präproteins und zu erwartende Größen. Da alle Transformationen im genetischen Hintergrund von AX2 durchgeführt wurden, tragen alle Zellen sowohl das rekombinante als auch das endogene Protein.

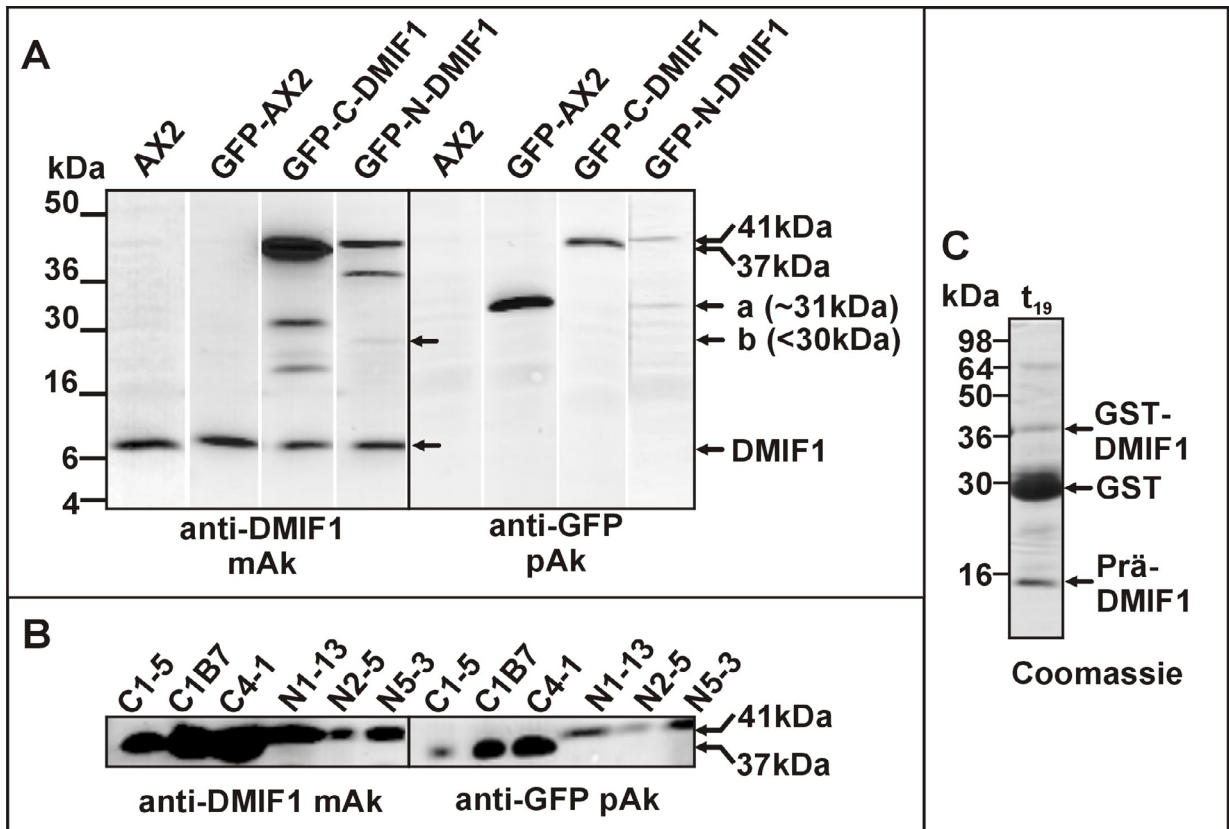


Abbildung 4-2 (A) Prozessierung des Präproteins durch Abspaltung der Targeting-Domäne. Westernblot mit anti-DMIF1- mAk 272-208-1 und pAk-GFP (Clontech) auf Zellhomogenaten von AX2, GFP-AX2, GFP-C-DMIF1 (Klon C1-5) und GFP-N-DMIF1 (Klon N5-3). Sehr schwache Banden in GFP-N-DMIF1-Zellen, die mit anti-GFP-pAk detektiert wurden, sind mit a und mit anti-DMIF1- mAk detektierte Banden mit b bezeichnet. 2-Phasen-SDS-PAGE 8.8%-14% (Kubis und Gros, 1997). Auftragung von Proteinen aus äquivalenten Zellzahlen ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ Spur). Marker See Blue (Biorad). **(B) Elektrophoretische Trennung von 37 kDa- und 41 kDa- Fragmenten** durch 2-Phasen-SDS-PAGE 6.6%-8.8%. GFP-C-DMIF1-Klone C1-5, C1B7 und C4-1; GFP-N-DMIF1- Klone N1-13, N2-5 und N5-3. Auftragung der Äquivalente von $2 \cdot 10^6$ Zellen/Spur, Detektion mit anti-DMIF1-mAk (272-208-1) und anti-GFP-pAk (Clontech). **(C) Präprotein** (Kapitel 3.2.1.2). Proteolytische Spaltung von GST-DMIF1 (40 kDa) durch FaktorXa an der spezifischen FaktorXa- Spaltstelle in die Spaltprodukte GST (26 kDa) und DMIF1 (14 kDa). t_{19} : 19 Stunden nach Zugabe des Enzyms weitgehende Spaltung (nach 43 Stunden komplette Spaltung, Daten nicht gezeigt). Das 70 kDa-Fragment ist das koeluierte *E.coli*-Streßprotein DnaK. SDS-PAGE 14%. Marker See Blue (Biorad).

Das reife 10 kDa-Protein scheint in der Tat aus dem 14 kDa-Precursor durch Abspaltung der Targetingsequenz hervorzugehen. Dies ist aus dem Vorliegen von 10 kDa-Fragmenten bei allen Zellstämmen zu schließen, was durch mehrere anti-DMIF1- Antikörper überprüft wurde (Abbildung 4-2A). Das unprozessierte DMIF1-Protein liegt als 14 kDa Referenz-Bande im Coomassie Blau-gefärbten SDS-PAGE vor (Abbildung 4-2C). Es wurde aus der proteolytischen Spaltung von GST-DMIF1 mit Faktor Xa-Protease erhalten. GST-DMIF1 wurde zuvor in *E.coli* exprimiert und durch Affinitäts-Chromatographie gereinigt (Kapitel

3.2.1.2). Das Präprotein wird in *E. coli* mangels mitochondrialem MPP-Enzym nicht prozessiert. In *Dictyostelium* wird die Targetingdomäne (4 kDa) offenbar abgespalten. Sie ließ sich allerdings mit keinem der vorhandenen Antikörper markieren. Auch gelang der simultane Nachweis von 10 kDa- und 14 kDa-Fragmenten nicht, was bedeutet, daß das DMIF1-Präprotein nach seiner Synthese effektiv prozessiert wird.

Das rekombinante Protein GFP-C-DMIF1 verhält sich ähnlich und ist, wie das endogene Protein, nicht in seiner unreifen Form nachweisbar. Dafür spricht, daß eine Proteinbande der Masse 37 kDa detektierbar war anstelle einer 41 kDa-Bande, die der vollen Länge des unprozessierten Proteins entspräche (Abbildung 4-2A, B). Das ist ebenfalls ein Indiz für eine sehr effektive Proteolyse an der vermuteten Schnittstelle durch mitochondriale Proteasen. Zusätzlich treten zwei, von anti-DMIF1-Antikörpern, aber nicht von anti-GFP-Serum detektierte Banden bei etwa 30 und 20 kDa auf, die nicht durch die Prozessierungs-Hypothese (Abbildung 4-1) erklärbar sind. Es wird ein proteolytischer Abbau in der Zelle angenommen.

Bei GFP-N-DMIF1 erscheint die Situation wie folgt: Eine 41 kDa- Bande, die der Größe nach mit dem Fusionsprodukt aus GFP und unprozessierten DMIF1 korrespondiert, konnte sowohl mit Antikörpern gegen DMIF1 als auch gegen GFP detektiert werden, wobei das von GFP-Ak stammende Signal sehr schwach ist. Auch das reife endogene DMIF1-Protein läßt sich durch anti-DMIF1-Ak als 10 kDa-Bande in allen vier untersuchten Stämmen nachweisen. Aus einer erfolgten Prozessierung von GFP-N-DMIF1 an der vorhergesagten Stelle würde auch ein 10 kDa Fragment hervorgehen, welches sich aber nicht vom endogenen Protein unterscheiden ließe. Außerdem wird ein signalschwaches 31 kDa- Fragment als potentielles Spaltprodukt von GFP-Antiserum gebunden (Abbildung 4-2A → a). Eine weitere schwache Bande tritt mit dem anti-DMIF1-Ak bei etwa 25 kDa auf (→ b), die sich nicht in das Prozessierungsschema einordnen läßt, ebenso wie ein signalstarkes Fragment bei 36 kDa. Möglicherweise sind diese Fragmente das Ergebnis von Abbauprozessen, die im Zytoplasma bei nicht richtig gefalteten oder ungenügend protektierten Proteinen verstärkt stattfinden. Auch in den Mitochondrien finden ständig Protein-Degradationen statt.

Für GFP-N-DMIF1 kann zusammengefaßt werden, daß eine Abspaltung der Targeting-Domäne möglicherweise stattfindet, da neben nicht erklärbaren auch die erwarteten Fragmente gebildet werden. Die auf diese Art prozessierte Proteinmenge ist aber sehr gering. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß die erhaltenen Fragmentgrößen zufällig sind und nicht von dieser Prozessierung herrühren. Dafür spricht, daß die Abspaltung der Signalsequenz durch das MPP-Enzym in den Mitochondrien stattfinden muß, dort aber nie GFP nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise befindet man sich aufgrund der geringen Proteinmenge, die ordnungsgemäß prozessiert wird, an der Nachweisgrenze im Fluoreszenz- oder TEM-Präparat. Was den Hauptanteil an GFP-N-DMIF1 betrifft, sprechen die

Daten gegen eine Prozessierung nach dem beschriebenen Modell. Bezüglich des erhaltenen Fragmentmusters war unerheblich, ob die Antikörper ihre Bindestellen in der N- oder C-terminalen Region des Proteins haben (Kapitel 3.2.2.2), d.h. die als „N-terminal bindend“ deklarierten Ak verhielten sich bei den beschriebenen Immunmarkierungen ebenso wie C-terminal bindende Ak (z.B. mAk 272-208-1). So wurde immer das gleiche Fragmentmuster gefunden. Diese Tatsache läßt sich gemäß Abbildung 4-3) erklären.

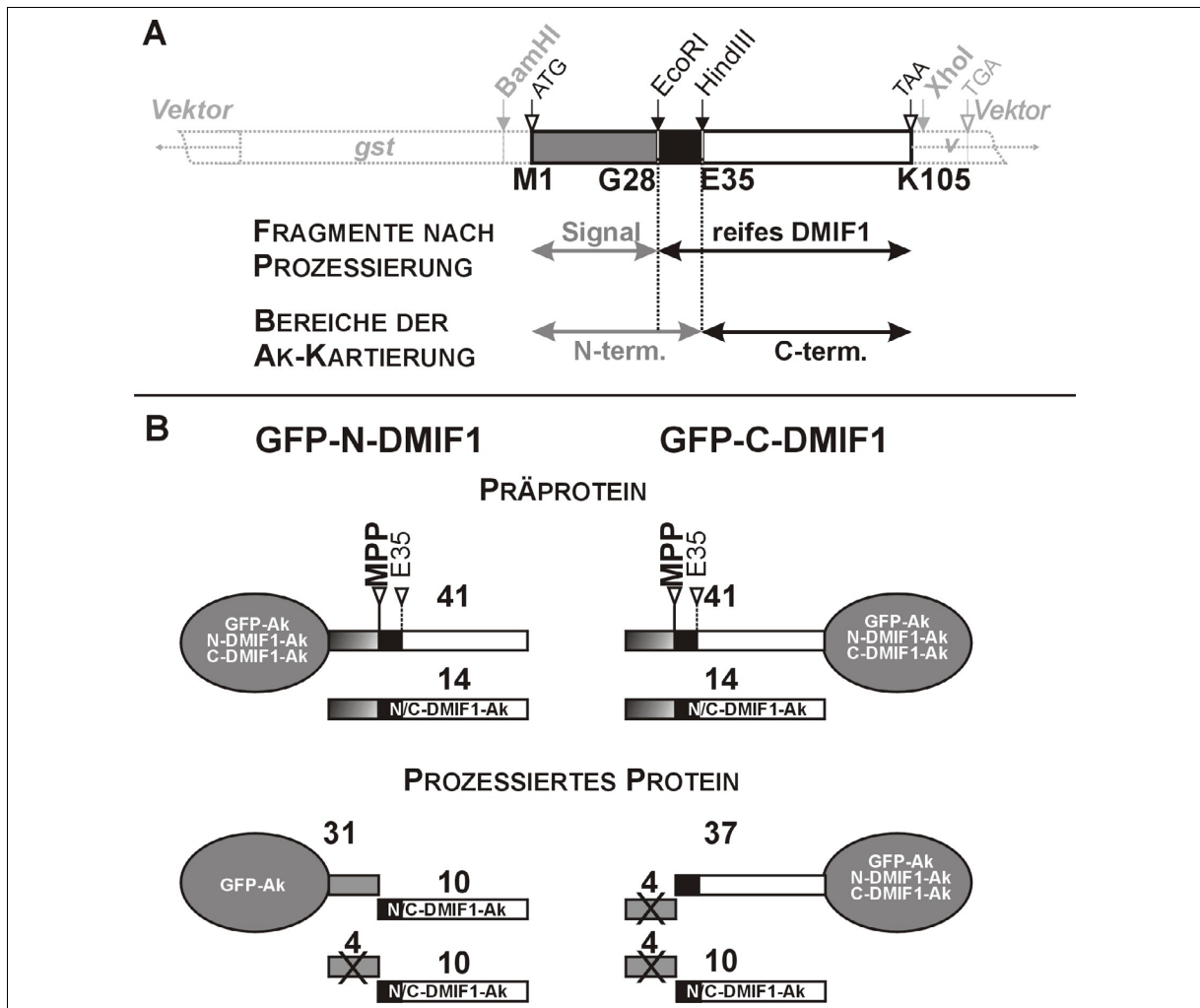


Abbildung 4-3 Prozessierung von DMIF1. **(A) Prozessierungs- und Kartierungsschema.** Bei der Ak-Kartierung (vgl. Kapitel 3.2.2.2) wurden N- („N-term.“) und C-terminale („C-term.“) Bereiche des Präproteins DMIF1 (in GST-DMIF1) und des C-terminal verkürzten Präproteins DMIF1 Δ 3 (in GST-DMIF1 Δ 3) getestet. Diese Bereiche sind nicht identisch mit den durch Prozessierung entstehenden Fragmenten („Signal“ und „reifes DMIF1“). Sogenannte „N-terminal bindende Ak“ erkennen deshalb u.U. den N-terminalen Bereich des reifen Proteins (schwarzer Kasten) und nicht die Targeting-Domäne (grauer Kasten). M1, G28, E35 und K105 kennzeichnen Aminosäuren an den jeweiligen Peptid-Übergängen. **(B) Kalkulierte Fragmentmuster nach einer Prozessierung.** In den Fragmenten sind die jeweils reagierenden Antikörper angegeben. Ziffern bezeichnen Fragmentgrößen in kDa.

Beim Kartieren der Ak wurde neben dem vollständigen Präprotein (M1-K105) ein C-terminal um 70 Aminosäuren verkürztes Protein (M1-E35) verwendet. Dieses Polypeptid enthält neben der MPP-Spaltstelle (G28) weitere 8 Aminosäuren des DMIF1-Proteins in C-terminaler Richtung (bis E35). Dieser Bereich (G28-E35) wird vermutlich von den verwendeten N-terminal bindenden Ak erkannt. Es gibt demzufolge keinen DMIF1-Ak aus der Fusion 272, der tatsächlich die Targetingdomäne erkennt. Das hat folgende Konsequenzen für das kalkulierte Fragmentmuster nach der Prozessierung:

(1) *GFP-N-DMIF1*: Die Targeting-Domäne von GFP-N-DMIF1 (4 kDa) ist nicht und das 31 kDa-Fragment nur mit anti-GFP detektierbar. Das 10 kDa-Spaltprodukt des endogenen und des rekombinanten Proteins ist mit allen anti-DMIF1-Ak erfaßbar.

(2) *GFP-C-DMIF1*. Die Targeting-Domäne von GFP-C-DMIF1 (4 kDa) wird nicht erkannt, das 10 kDa-Fragment und das 37 kDa-Fragment wird dagegen mit allen Ak gegen DMIF1 und GFP und letztere zusätzlich mit anti-GFP-Ak erkannt. Diese Ergebnisse stimmen mit den experimentellen Daten überein.

4.2 Analyse des Expressionslevels von GFP-N-DMIF1 und GFP-C-DMIF1

Die Analyse der DMIF1-Fragmente (Abbildung 4-2) durch SDS-PAGE ergab erheblich geringere Mengen des Proteins GFP-N-DMIF1 als GFP-C-DMIF1, obwohl gleiche Zellzahlen aufgetragen wurden. Der endogene Anteil war in beiden Stämmen annähernd gleich stark vorhanden, was eine wesentliche Beteiligung der Zellgröße an den unterschiedlichen Mengen an rekombinantem Protein ausschließt. Das Phänomen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die zur Transformation verwendeten GFP-Plasmide nicht nur an zufälligen Stellen sondern auch mit zufälligen Kopienzahlen ins Genom integrieren und so zu unterschiedlich starker Expression von GFP-N-DMIF1 bzw. GFP-C-DMIF1 führen. Um zu entscheiden, ob in einer Population das rekombinante Protein entweder von allen Zellen in geringer Menge oder aber von einem Teil der Zellen stark exprimiert wird, sind Westernblotdaten nicht geeignet (Abbildung 4-2B). Dafür wurde über die GFP-Emission im Fluoreszenzmikroskop der Anteil der Zellen in einer Population ermittelt, der das rekombinante Protein enthält und die relative Menge grob abgeschätzt. Fixierte Präparate von je drei unabhängigen *GFP-N-DMIF1*- und *GFP-C-DMIF1*-Klonen wurden ausgezählt und je nach ihrem Fluoreszenzverhalten den 3 groben Kategorien 'stark fluoreszierend', 'schwach fluoreszierend', 'nicht fluoreszierend' zugeordnet (Abbildung 4-4, Tabelle 3).

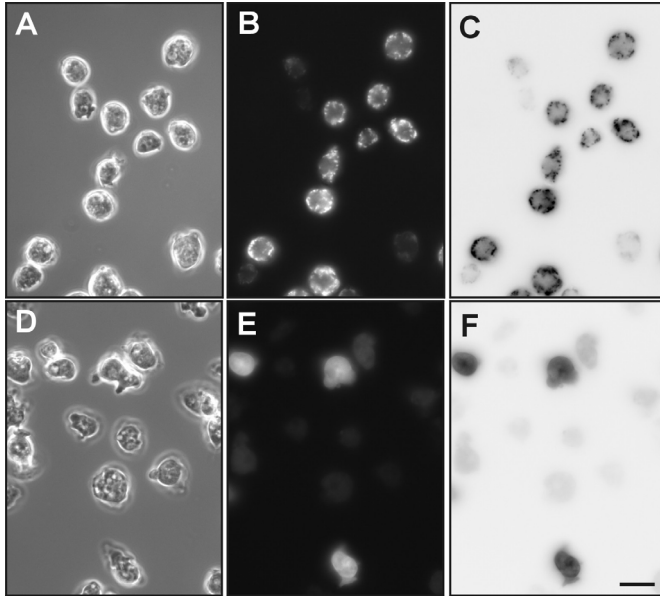


Abbildung 4-4 GFP-Fluoreszenz von fixierten GFP-N/C-DMIF1-Zellen. (Reihe oben) GFP-C-DMIF1 (Klon C1-5). (Reihe unten) GFP-N-DMIF1 (Klon N5-3). Links: Phasenkontrast. Mitte: GFP-Fluoreszenz. Rechts: Verdeutlichung der Fluoreszenz-Bereiche durch invertiertes Fluoreszenz-Bild. Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, Zeiss). Die gezeigten Zellen repräsentieren nicht die ermittelten statistischen Mittelwerte sondern stellen lediglich prinzipielle Unterschiede zwischen den beiden Stämmen dar. Balken 10 µm.

Während alle *GFP-C-DMIF1*-Zellen fluoreszierten, war das nur bei etwa 70% der *GFP-N-DMIF1*-Zellen der Fall. Bei diesen „Positiven“ war die Fluoreszenz bei 2/3 aller Exemplare sehr schwach (vgl. Abbildung 4-4F). Geringe Expression von *GFP-N-DMIF1* unterstellt, ist dies analog zu den Daten im Westernblot. Die Aussagekraft der auf dem Fluoreszenzsignal basierenden prozentualen Angaben über das Expressionsniveau von *GFP-C-DMIF1* und *GFP-N-DMIF1* wird aber durch die Tatsache eingeschränkt, daß GFP nur im richtig gefalteten Zustand Licht emittiert, während fehlgefaltetes GFP mit Antikörpern wie fluoreszenzfähiges GFP detektierbar sein sollte. Der Anteil GFP-fluoreszenter Zellen an GFP-Ak-markierten Zellen einer Population wurde jedoch nicht quantifiziert.

Zellstamm	Klon	GFP-Fluoreszenz		
		stark	schwach	keine
<i>GFP-C-DMIF1</i>	C1-5	83 %	17 %	0 %
	C1B7	82 %	18 %	0 %
	C4-1	92 %	8 %	0 %
	Mittel <i>GFP-C-DMIF1</i>	86 %	14 %	0 %
<i>GFP-N-DMIF1</i>	N1-13	9 %	50 %	41 %
	N2-5	6 %	70 %	24 %
	N5-3	4 %	75 %	21 %
	Mittel <i>GFP-N-DMIF1</i>	6 %	65 %	29 %

Tabelle 3 Semiquantifizierung der Expression des rekombinanten Proteins – Analyse anhand der GFP-Fluoreszenz. Der Anteil schwach, stark oder nicht fluoreszierender Zellen an der Gesamtzellzahl wurde in jeweils 3 unabhängigen Klonen anhand von fixierten Präparaten bestimmt. Dabei wurde die Fluoreszenz ohne Berücksichtigung der Lokalisation abgeschätzt.

5 Funktionsanalyse von DMIF1 in *Dictyostelium*

5.1 Inaktivierung von *dmif1* durch homologe Rekombination

Wegen des haploiden Genoms von *D. discoideum* ist es möglich, durch homologe Rekombination (De Lozanne und Spudich, 1987; Egelhoff et al., 1991) gezielt Gene auszuschalten oder veränderte Gene einzuführen und einen unmittelbaren Bezug zu den damit einhergehenden Defekten *in vivo* herzustellen. Dies ist der entscheidende Vorteil gegenüber der chemischen Mutagenese (Wallraff et al., 1986; André et al., 1989; Brink et al., 1990), bei der aufgrund der multiplen Veränderung an zufälligen Genorten kein direkter kausaler Zusammenhang zum Phänotyp hergestellt werden kann. Bei der homologen Rekombination kann das interessierende Gen durch Integration eines Vektors unterbrochen („gene disruption“), oder es können kodierende Teile des Gens gegen artifizielle Vektorsequenzen ausgetauscht werden („gene replacement“). In dieser Arbeit wurden Versuche zur Inaktivierung des *dmif1*-Gen durch „gene replacement“ durchgeführt und Überexprimierer von DMIF1 analysiert (Kapitel 5.2).

5.1.1 Mit „gene replacement“ wurde keine DMIF1-Minus-Mutante gefunden

Für das Vektor-Konstrukt wurde die kodierende Sequenz von *dmif1* inklusive des Introns und einiger flankierender Basen in beiden Richtungen (48 Basen in 5'UTR, 21 in 3'UTR) in die *Cl*I- und die *Xho*I-Stelle der multiplen Klonierungsstelle (MCS) von pSP72 (Klonierungsvektor, Promega, Abbildung 5-1A) integriert, wodurch das Plasmid pSP72-DMIF1 erhalten wurde. Die im pBsr2-Vektor (Abbildung 5-1B, Sutoh, 1993) enthaltene Bsr-Resistenzkassette konnte mit *Eco*RI und *Hind*III isoliert und in die internen *Eco*RI- und *Hind*III-Stellen von *dmif1* kloniert werden, was zum „Knockout“-Vektor pSP72-DMIF1-Bsr führte (Abbildung 5-1C). Die Bsr-Kassette enthält einen Actin-15-Promotor, das Blastocidin-Deaminase (*bsr*)-Gen und einen Actin-8-Terminator, so daß der Selektionsmarker permanent transkribiert wird und eine Selektion der *Dictyostelium*-Transformanten mit dem Antibiotikum Blastocidin ermöglicht. Die Leserahmen der Bsr-Kassette und des *dmif1*-Gens im fertigen Konstrukt verlaufen in der gleichen Richtung.

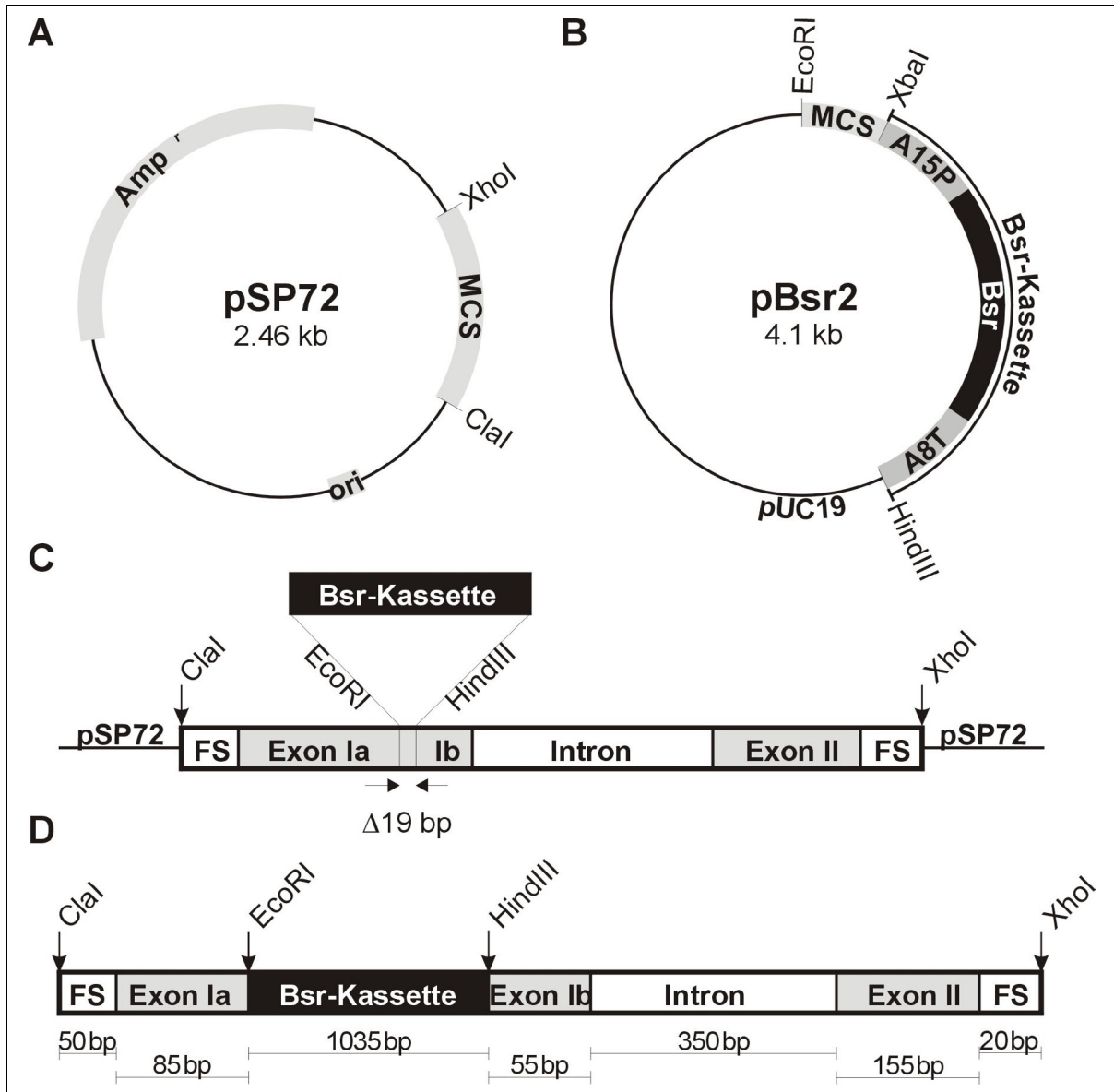


Abbildung 5-1 Konstruktion des Replacement Vektors. Die *dmif1*-DNA (Exons I und II) inklusive des Introns und flankierender Sequenzen (FS) wurde in einem Stück durch PCR an genomischer DNA mit den Primern **p181-fw (ClaI)** (48 bp vor ATG) bzw. **p208-fw (ClaI)** (21 bp vor ATG) und **p567-rev (XhoI)** (21 bp nach TAA-Stop) amplifiziert und über die eingeführten Schnittstellen in den Klonierungsvektor pSP72 (**A**) integriert. Aus dem pBsr-Vektor (**B**) wurde die Bsr-Kassette mit EcoRI und HindIII isoliert und über die internen EcoRI-HindIII-Stellen in *dmif1* kloniert (**C**). Dadurch wurden 19 bp aus der *dmif1*-Sequenz entfernt, was zu einer Verschiebung des Leserasters führt. Zur Transformation wurden sowohl der komplette zirkuläre als auch der linearisierte Vektor sowie das durch den partiellen Verdau des linearen Vektors isolierte Insert (**D**) verwendet.

Der erste Transformationsversuch von *Dictyostelium*-Zellen mit dem vollständigen pSP72-DMIF1-Bsr-Vektor erzeugte viele resistente Klone, die gegen DMIF1 gerichteten mAk reagierten jedoch weiterhin mit Homogenaten aus diesen Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Integration des Plasmids an einer beliebigen Stelle im Genom kann die Resistenz erklären,

wobei das *dmif1*-Gen nicht beeinträchtigt ist. Die Linearisierung der Plasmide durch vollständigen *Clal*-Verdau des Ringplasmids für den nächsten Transformationsversuch sollte die spezifische Rekombinations-Wahrscheinlichkeit erhöhen. Eine weitere Steigerung der Effizienz der Rekombination sollte durch die ausschließliche Verwendung des Inserts (Abbildung 5-1D), d.h. die DMIF1-Sequenz inklusive seiner flankierenden Regionen, aber ohne Vektorsequenz-Anteile erreicht werden. Das lineare DNA-Stück aus dem *Clal*-Verdau wurde mit *XhoI* partiell geschnitten und nach Aufreinigung zur Transformation benutzt. Auch diese beiden Ansätze führten nicht zu einem DMIF1- negativen Klon, denn in allen getesteten Transformanten wurden im Westernblot mit DMIF1-Ak weiterhin Proteinbanden auf der passenden Höhe detektiert (Daten nicht gezeigt). Ein vollständiger Verdau des fertigen Plasmids pSP72-DMIF1-Bsr mit *Clal* und *XhoI* zur Isolierung des kompletten Inserts (Abbildung 5-1D) konnte nicht mehr durchgeführt werden, da sich im Zuge der Klonierung, vermutlich mutationsbedingt, eine zweite Erkennungstelle für *XhoI* gebildet hatte. Der Verdau mit *Clal* und *XhoI* führte deshalb zu drei Fragmenten. Die genaue Position der zusätzlichen Schnittstelle konnte nicht aufgeklärt werden. Sie befindet sich gemäß der Verdautests sehr wahrscheinlich im Bereich des Aktin 8-Terminators, eine wegen ihres AT-Reichtums schwierig zu sequenzierende Region. Mit vorangegangenen Restriktionstests konnte ausgeschlossen werden, daß diese Schnittstelle bereits durch die Ausgangsplasmide eingeführt wurde.

Homologe Rekombinationen sind seltene Ereignisse, bei denen die Länge des zur Rekombination verwendeten DNA-Abschnitts für den Erfolg eine wesentliche Rolle spielt. Die mit 700 bp inklusiv aller flankierenden Bereiche recht kurze Sequenz von *dmif1* kann ein Grund für den mißlungenen Versuch zur Erzeugung einer DMIF1-Null-Mutante sein. Die „gene replacement“-Methode, die dauerhaft stabile Mutanten erzeugt, erfordert zudem die Duplizität des Rekombinationsereignisses im Gen. Für einen alternativen Versuch der Geninaktivierung bietet sich noch die Methode „Gene Disruption“ an. Im Gegensatz zum „Gene Replacement“-Verfahren erfordert diese Methode nur ein einzelnes Rekombinationsereignis, in dessen Verlauf der zirkuläre Vektor in das auszuschaltende Gen integriert wird. Die dabei eingeführte Resistenzkassette unterbricht das Gen, so daß bestenfalls die 5'-terminale Region, induziert durch ihren natürlichen Promotor, abgelesen wird. Durch Deletion eines Spleißsignals am Intronende kann zusätzlich die Modifikation der mRNA in ein translatierbares Transkript verhindert werden.

Eine weitere Erklärung, warum keine DMIF1-Null-Mutante entstanden ist, wäre das Vorliegen eines zweiten, homologen Gens. Dieser Frage wurde im folgenden Kapitel nachgegangen.

5.1.2 *dmif1* ist kein single copy Gen

Die Organisation des *dmif1*-Gens im haploiden Genom von *D. discoideum* wurde durch Southernblot-Analyse untersucht. Genomische AX2-DNA wurde mit Restriktionsenzymen gespalten und die Fragmente mit einer DIG-markierten cDNA-Sonde hybridisiert (Abbildung 5-2, vgl. Kapitel 2.1). Die Enzyme wurden so ausgewählt, daß sie in der kodierenden Region des bekannten Gen entweder einmal schneiden oder keine Erkennungssequenz in DMIF1 haben. Ergänzend wurden Enzyme verwendet, die mehrere Schnittstellen im kodierenden oder im bekannten flankierenden Bereich erkennen.

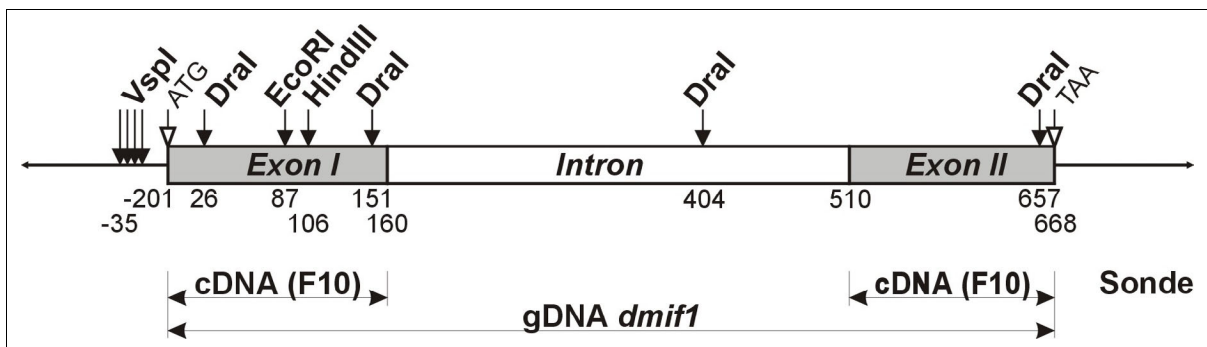


Abbildung 5-2 Organisation des Gens *dmif1* im Genom von *D. discoideum*. Lage der Restriktionsstellen im Gen. Regionen, die von der c-DNA-Sonde erkannt werden, sind mit "cDNA (F10)" über Pfeile markiert, der genomische DNA-Bereich (gDNA *dmif1*) umfaßt zusätzlich die Intronregion.

Restriktionen mit Enzymen ohne Schnittstelle im Gen sollten bei einem „Single Copy“ Gen nur eine Fragmentbande zeigen. In den meisten Fällen traten aber mehrere Banden auf. Intern einmal schneidende Restriktionsenzyme sollten zwei Banden erzeugen, wenn die Sonde, wie hier verwendet, den gesamten Bereich abdeckt. Tatsächlich werden aber im EcoRI-Ansatz 4 Banden und bei HindIII sogar 8 Banden detektiert (Abbildung 5-3 und Tabelle 4). Auch bei fast allen anderen Enzymen stimmt die Anzahl vorhergesagter und nachgewiesener Fragmente nicht überein. VspI (AsnI) schneidet in AT-reichen Bereichen (Erkennungssequenz AT↓TAAT), die die Gene häufig einrahmen. So können die ausgeschnittenen Fragmente das gesamte Gen mit nur sehr kurzen flankierenden Sequenzen enthalten. Die Sonde detektiert dementsprechend ein 0.75 kb-Fragment, das nur wenig größer als der kodierende Genbereich (einschließlich des Introns) ist. Die zusätzlich erscheinende Doppelbande und die übrigen Ergebnisse lassen auf die Existenz einer zweiten Kopie oder wahrscheinlicher auf ein homologes, nicht identisches Gen schließen. Für letzteres sprechen die verschiedenen großen Fragmente bei den internen Verdauen.

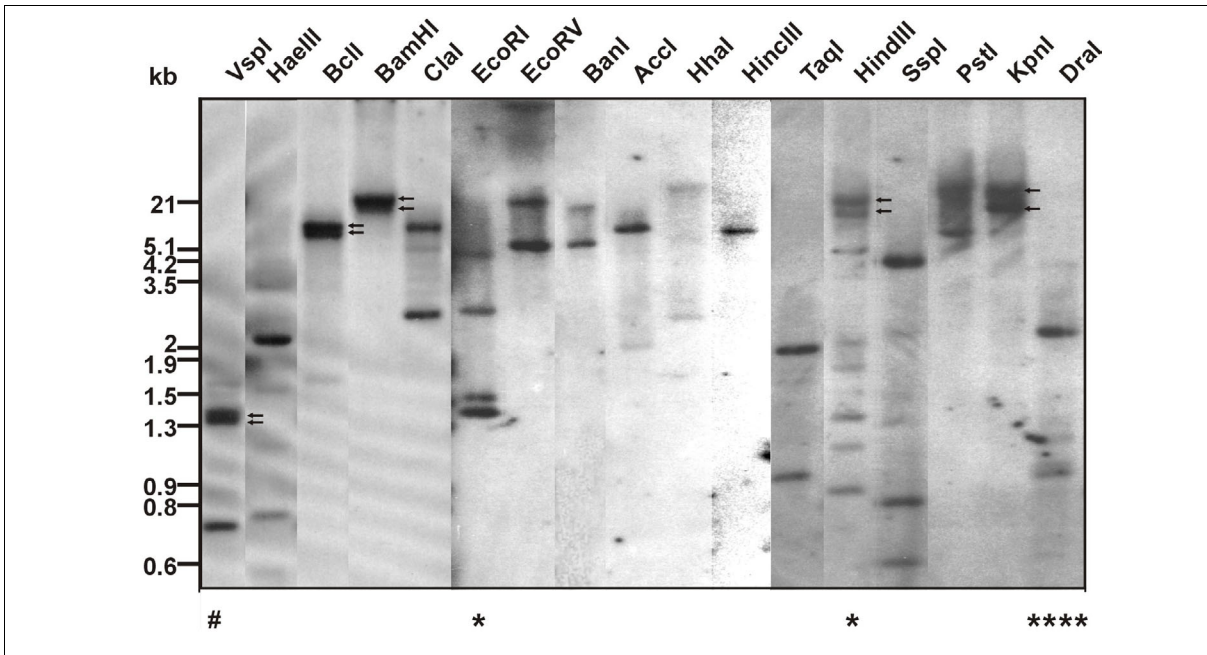


Abbildung 5-3 Genomischer Southernblot. Stringente Hybridisierung mit DIG-markierter, beide Exons erkennende Sonde F10. Im Gen schneidende Restriktionsenzyme sind entsprechend ihrer Schnitthäufigkeit mit einem bzw. vier Stern(en) markiert. VspI schneidet in der 5'UTR-flankierenden Region (#). Pfeile kennzeichnen Doppelbanden, die im Bild schlecht aufzulösen sind. Die entsprechenden DNA-Größen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Enzym	Anzahl der Banden		Größe der DNA- Fragmente in kb							
	Theorie	Experiment								
A	B	C	D							
EcoRI	2	4	5,1	3	1,6	1,4				
HindIII	2	5-(8)	20	21	5,2	(2,3)	(1,9)	1,4	(1,2)	0,9
DraI	5	2*	2,4	1,0						
VspI	1	3	1,35	1,3	0,75					
HaeIII	1	2	2,4	0,75						
BclI	1	2	16	14						
ClaI	1	2-(3)	16	(5)	3					
BamHI	1	2-(3)	19	18	(1,3)					
TaqI	1	2	2,2	1						
PstI	1	1-(2)	(22)	16						
KpnI	1	1-2	(22)	20						
EcoRV	1	2	20	5,2						
BanI	1	2	18	5,2						
Accl	1	1-(2)	8	(2,2)						
HincIII	1	1	7							
HhaI	1	(2)	(20)	(2,5)						
SspI	1	3	5,1	0,8	0,6					

Tabelle 4 Fragmentmuster im Southernblot. Reihe (A) Verwendete Restriktionsenzyme. (B) Theoretische Fragmentzahl, die sich bei Annahme eines einzelnen Gens ergibt. (C) Experimentelle Daten. (D) Größe der experimentellen Fragmente. Fragmente kleiner als 600 bp wurden im Gel nicht erfasst. Ziffern in Klammern zeigen schwache Banden an, die anderen sind eindeutig. Drei der durch DraI-Verdau erwarteten fünf Fragmente konnten nicht detektiert werden, vermutlich aufgrund des zu geringen Überlapps mit der Sonde bzw. wegen zu kleiner Fragmentgröße.

5.2 Zellbiologische Charakterisierung der Transformanten

Transformanten, die zusätzlich zum endogenen Protein DMIF1 auch das Fusionsprodukt aus DMIF1 und GFP exprimieren, sogenannte Überexprimierer, wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens, der Makropinozytose und der Kernzahl untersucht. Zellen von *AX2*, *GFP-N-DMIF1* und *GFP-C-DMIF1* wurden zunächst in axenischer Schüttelkultur bis zu einer Dichte von ungefähr $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml kultiviert und mit AX-Medium auf eine Arbeitsverdünnung von $2 \cdot 10^4$ Zellen/ml eingestellt.

5.2.1 Wachstumsverhalten unter adhärennten Bedingungen

Für die Bestimmung des Wachstumsverhaltens auf Agarplatten mit Bakterien, also unter adhärennten Bedingungen, wurden NA-Agar-Petrischalen mit *E.coli* B/2 bzw. SM- Agar-Petrischalen mit *K. aerogenes* ausgestrichen und nach Pelletierung der Dictyostelium-Zellsuspension und Resuspension mit je 10^4 Zellen in $10 \mu\text{l}$ durch Punktinokulation beimpft. Die Platten wurden ca. 5 Tage bei 22°C kultiviert. Als Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit wurde der Kolonie-Durchmesser bestimmt (Daten von *E.coli*- Platten: Abbildung 5-4).

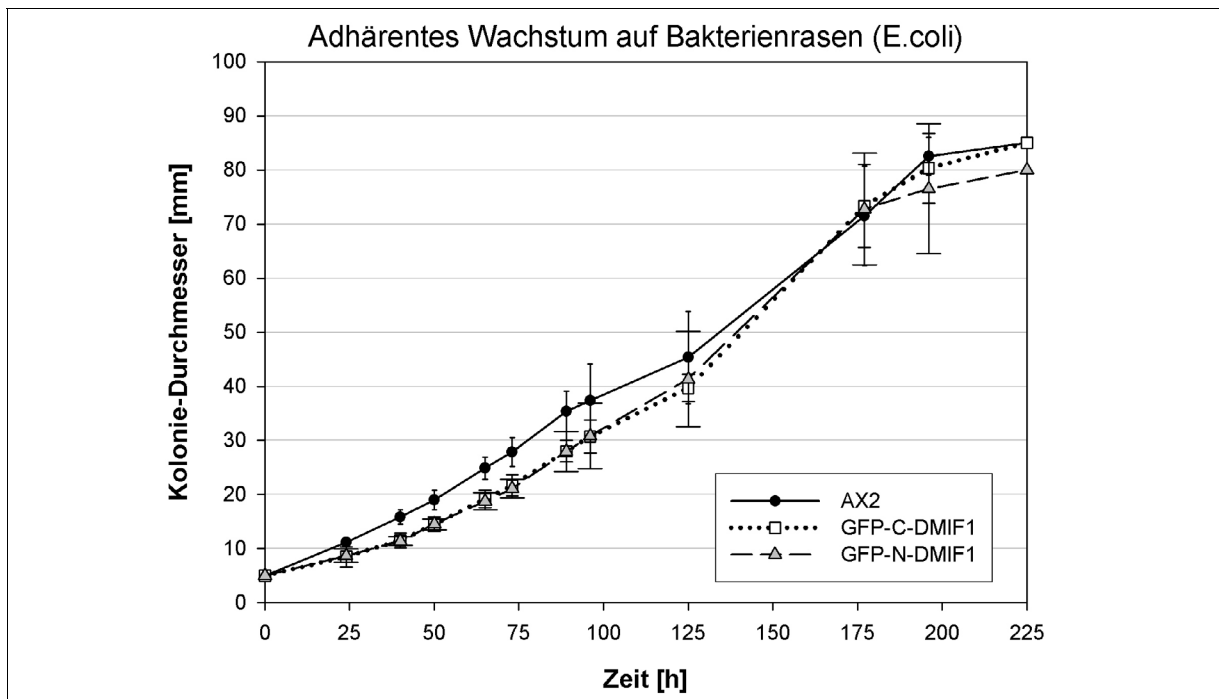


Abbildung 5-4 Wachstumsverhalten von Wildtyp- und Transformanten-Zellen auf *E.coli*- Rasen auf Normalagar. Bestimmung der Kolonie-Durchmesser aller Stämme zu gleichen Zeitpunkten, ausgehend vom Durchmesser von 5 mm beim Start. Die Mittelwerte und Standard-Fehler (SF) wurden aus jeweils 6 (*AX2*, *GFP-C-DMIF1*, Klon C1-5) bzw. 12 Einzelwerten (*GFP-N-DMIF1*, Klone N1-13, N5-3) bestimmt und im Zeitverlauf dargestellt (SF: Balken). Auf *K. aerogenes* (SM- Agar) wurde das gleiche Verhalten beobachtet, aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Alle Stämme zeigten übereinstimmendes Wachstumsverhalten, d.h. sie wuchsen mit vergleichbaren Raten und erreichten den Petrischalenrand zu ähnlichen Zeitpunkten. Außerdem konnten alle Stadien der Entwicklung beobachtet werden. Dies ist auf Agarplatten simultan möglich, da die Bakterien am Kolonierand verbraucht werden und der dadurch verursachte Hungerzustand ein Entwicklungsprogramm induziert (Stadien der Entwicklung siehe Kapitel 1.3). Morphologische Unterschiede der Stämme untereinander wurden in keinem dieser Stadien beobachtet (Bilder nicht gezeigt).

5.2.2 Wachstum in Suspension

Die oben aufgeführten Stämme und zusätzlich als zweiter Kontrollstamm *GFP-AX2*, ein GFP exprimierender Stamm im genetischen Hintergrund von *AX2*, wurden in axenischer Schüttelkultur über etwa 7 Tage bis zur stationären Phase gezüchtet und die Zelldichten über den gesamten Zeitraum bestimmt (Abbildung 5-5).

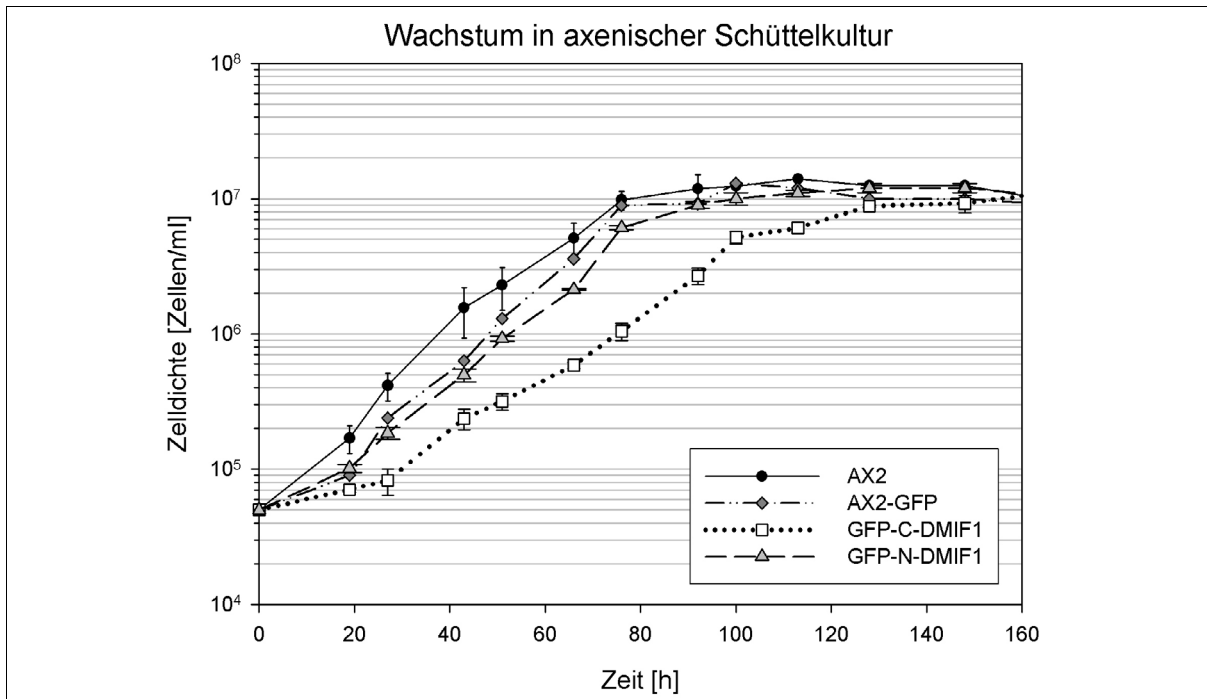


Abbildung 5-5 Wachstum in axenischer Suspension. Von den beiden DMIF1-Transformanten wurden jeweils 3 unabhängige Klone (*GFP-C-DMIF1*: C1-5, C1B7, C4-1; *GFP-N-DMIF1*: N1-13, N2-5, N5-3) in Einfachbestimmung zur Ermittlung der Zelldichten herangezogen, die *AX2*-Kontrolle war eine Doppel- und die *GFP-AX2*-Kontrolle eine Einfachbestimmung. Die Mittelwerte der Daten sind in Form der Symbole, die Standardfehler als Balken dargestellt.

Im Gegensatz zu den Zellen, die auf einer festen Unterlage kultiviert werden (Kapitel 5.2.1), zeigen in Schüttelkultur vermehrte Zellen Unterschiede im Wachstumsverhalten: *GFP-C-DMIF1*-Zellen haben eine etwa um 60 % verlängerte Verdopplungszeit, während die

anderen untersuchten Stämme in diesem Punkt dem Wildtyp ähnlich sind. Diese quantitative Aussage ist durch Ermittlung der Generationszeiten t_g aus der exponentiellen Wachstumsphase möglich (Tabelle 5).

Stamm	t_x [h]	t_y [h]	Δt [h]	Mittel n_x	Mittel n_y	Generationszeit t_g
AX2	19	66	47	$1.7 \cdot 10^5/\text{ml}$	$5.1 \cdot 10^6/\text{ml}$	9.6 h
GFP-AX2				$9 \cdot 10^4/\text{ml}$	$3.6 \cdot 10^6/\text{ml}$	8.8 h
GFP-N-DMIF1				$1 \cdot 10^5/\text{ml}$	$2.1 \cdot 10^6/\text{ml}$	10.7 h
GFP-C-DMIF1				$7.1 \cdot 10^4/\text{ml}$	$5.9 \cdot 10^5/\text{ml}$	15.3 h

Tabelle 5 Bestimmung der Generationszeit aus der exponentiellen Wachstumsphase.
 n_x , n_y Zelldichte bei t_x , t_y ; $\Delta t = t_y - t_x$.

Unterschiede in der Generationszeit könnten durch den unterschiedlichen Gehalt an DMIF1 hervorgerufen werden. Der Inhibitor bewirkt unter bestimmten Bedingungen (Matrix- $\text{pH} < 7$, $\Psi = 0$) die Hemmung der ATP-Hydrolyse. Dies wäre beispielsweise in ischämischen Zellen sinnvoll, in denen durch Sauerstoffmangelversorgung das Membranpotential zusammengebrochen ist und die ATP-Hydrolyse-Rate massiv zunehmen würde. Hier verhindert der Inhibitor eine kritische Verarmung an ATP in den Mitochondrien (Green und Grover, 2000). In Zellen mit einem erhöhten Spiegel an funktionellem Inhibitorprotein führt das Überangebot zu einer weitgehenden Hemmung der ATP-Hydrolyse, wodurch anderen energiezehrenden Stoffwechselprozessen wie beispielsweise der Zellteilung nur unzureichend Energie zur Verfügung steht. Darin könnte der Grund für die Unterschiede in der Generationszeit zu suchen sein. Doch die Befunde aus der Kultivierung auf Agarplatten lassen sich damit nicht erklären.

Eine andere Interpretationsmöglichkeit basiert auf der Zellgröße. Dem Augenschein im Mikroskop nach erscheinen Zellen von *GFP-C-DMIF1* geringfügig kleiner als die von *GFP-N-DMIF1* (Abbildung 4-4). Die damit verbundenen unterschiedlichen Zelloberflächen sollten Einfluß auf die Endozytose und damit auf die Nährstoffaufnahme haben. Bei Zellen, die adhären auf Bakterienrasen wachsen, spielt die Phagozytose die überwiegende Rolle. Axenische Zellen ernähren sich durch Aufnahme von gelösten Nährstoffen (Makropinozytose), und nur unter dieser Anzuchtbedingung tritt die Veränderung des Wachstumsverhaltens ein. Die Untersuchung der Pinozytoseaktivität in einem Assay lag deshalb nahe.

5.2.3 Bestimmung der Pinozytoserate

Bei der Messung der Makropinozytoserate wird die Internalisierung des Flüssigphasenmarkers TRITC-Dextran in die Zelle als Funktion der Zeit mit Hilfe eines Spektrofluorimeters bestimmt (Hacker et al., 1997). In Abhängigkeit von der aufgenommenen Menge an TRITC-Dextran verändert sich die intrazelluläre Fluoreszenzintensität und ergibt ein quantifizierbares Maß für die Pinozytose-Aktivität. Die Pinozytoserate wurde an *GFP-N-DMIF1*- und

GFP-C-DMIF1-Zellen im Vergleich zu *AX2* und *GFP-AX2* in einem Einzelassay ermittelt. Normiert auf die Zellzahl zeigen *GFP-N-DMIF1*-Zellen eine leicht erhöhte Pinozytoserate, *GFP-C-DMIF1*-Zellen und *AX2*-Zellen stimmen dagegen überein (Abbildung 5-6 links). Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge einer konstanten Zellzahl ermöglicht die Normierung der Daten auf den Proteingehalt (Tabelle 6). Dadurch werden zellgrößenbedingte Unterschiede beseitigt. Mit den Korrekturfaktoren wurden die Fluoreszenz-Signale neu berechnet und daraus die Pinozytoseraten ermittelt mit folgendem Ergebnis (Abbildung 5-6 rechts).

Stamm	Gesamtprotein-Gehalt [μg]	Proteingehalt/Zelle [μg]	Proteingehalt/Zelle Faktor zu <i>AX2</i>	Korrekturfaktor
<i>AX2</i>	633	$1,4 \cdot 10^{-4}$	1	1
<i>GFP-C-DMIF1</i>	683	$1,5 \cdot 10^{-4}$	1,07	0,93
<i>GFP-N-DMIF1</i>	1015	$2,3 \cdot 10^{-4}$	1,64	0,61
<i>GFP-AX2</i>	947	$2,1 \cdot 10^{-4}$	1,5	0,67

Tabelle 6 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes. BCA-Kit-Assay (Pierce). Messung von je zwei parallelen Zellkulturansätzen pro Stamm (*GFP-C-DMIF1*, Klon C1-5; *GFP-N-DMIF1*, Klon N5-3; *AX2*; *GFP-AX2*), jede in Doppelbestimmung von jeweils $4,5 \cdot 10^6$ Zellen.

Die auf den Proteingehalt normierten Pinozytose-Raten sind bei allen Stämmen sehr ähnlich. Dies führt zu dem Schluß, daß der zuvor beobachtete Effekt einer gesteigerten Pinozytose-Aktivität von *GFP-N-DMIF1*-Zellen tatsächlich durch Größenunterschied der Zellen hervorgerufen wird.

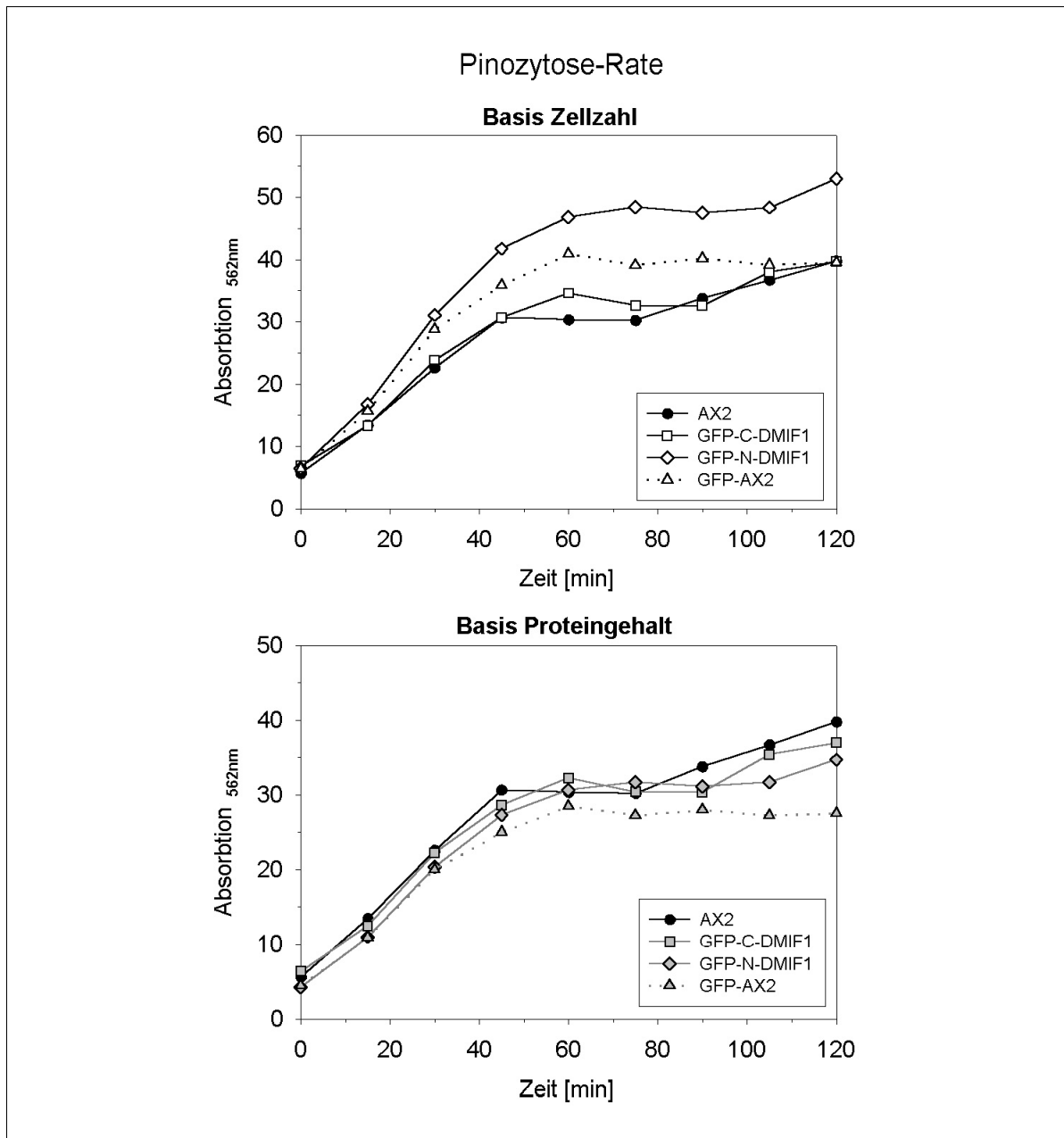


Abbildung 5-6 Pinozytoserate: Das Experiment an *GFP-N-DMIF1*- und *GFP-C-DMIF1*-Zellen im Vergleich zu *AX2* und *GFP-AX2* wurde bei gleicher Ausgangszelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml über einen Meß-Zeitraum von 135 min durchgeführt. Weitere Erklärungen im Text.

5.2.4 Kernzahl

Die unterschiedlichen Größen von *GFP-C-DMIF1*- und *GFP-N-DMIF1*-Zellen könnten aus einer Veränderung im Zellteilungsverhalten herrühren. Die Anzahl der Kerne gibt darüber erste Anhaltspunkte (Abbildung 5-7). Zur Beurteilung wurden je drei unabhängige Klone der *GFP-N-DMIF1*- und *GFP-C-DMIF1*-exprimierenden Stämme (C1-5, C1B7, C4-1; N1-

13, N2-5, N5-3) im Vergleich zu *AX2* und *GFP-AX2* ausgezählt. Die drei Klone jeder Gruppe stimmten weitgehend überein und wurden deshalb zusammengefaßt.

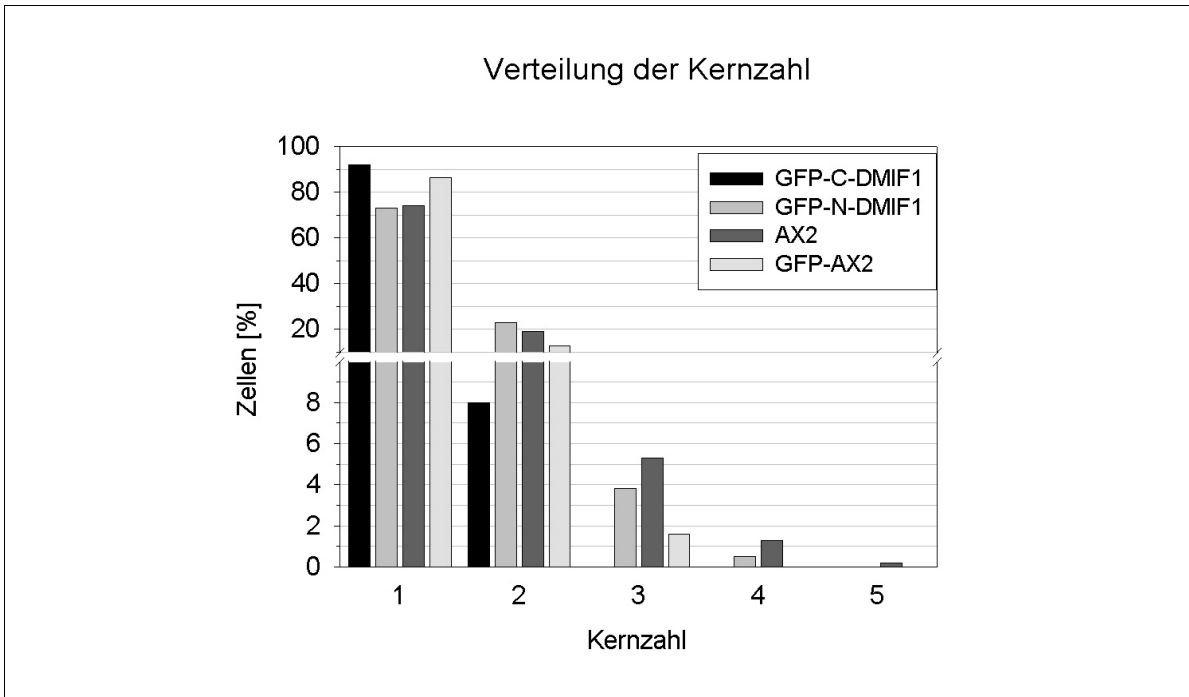


Abbildung 5-7. Histogramm zur Anzahl der Kerne pro Zelle. GFP-Transformanten *GFP-C-DMIF1* und *GFP-N-DMIF1* sowie *GFP-AX2* im Vergleich zum Wildtyp *AX2*.

Wildtypzellen haben zumeist 1 bis 2 Kerne pro Zelle (74% : 19%), 3 und mehr Kerne (7%) sind aber keineswegs ungewöhnlich. Für Zellen des *GFP-N-DMIF1*-Stamms wurde eine vergleichbare Verteilung festgestellt (73% : 23% : 4%). *GFP-C-DMIF1*-Zellen sind zu 92% einkernig, die restlichen 8% sind zweikernig. Das spricht eher für eine effizientere Cytokinese nach der Kernteilung, im Gegensatz zu ihrer in Kapitel 5.2.2 vermuteten Beeinträchtigung, und erklärt auch die geringeren Zellabmessungen.

DISKUSSION

Mit DMIF1 wird ein in *Dictyostelium discoideum* bisher unbekanntes Protein vorgestellt, das mit einem in mehreren Organismen beschriebenen mitochondrialen F1F0-ATPase-Inhibitor verwandt ist. Die Inhibitoren binden an die F1-Untereinheit der F1F0-ATPase und hemmen die ATP-Hydrolyse-Aktivität des Enzyms.

Einige der charakteristischen Eigenschaften von DMIF1 sind für ATPase-Inhibitoren typisch:

- DMIF1 wird als mitochondriales Protein in einer enzymatisch inaktiven Vorläuferversion (Präprotein), bestehend aus dem physiologisch relevanten Protein und einer Präsequenz synthetisiert. Die Präsequenz enthält Signalinformationen zur Direktion des Proteins in die Mitochondrien (Targeting), das reife Protein eine die ATPase bindende und inhibierende Region. Durch nachfolgende Abspaltung der Präsequenz (Prozessierung) wird das enzymatisch aktive Protein gebildet.
- DMIF1 ist über die ATPase mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert aber nicht selbst membrangebunden.

Andere Eigenschaften von DMIF1 finden sich nur bei einigen oder keinem der bekannten F1F0-ATPase-Inhibitoren:

- Das *dmif1*-Gen ist kein singuläres Gen im *Dictyostelium*-Genom. Diese Eigenschaft teilt DMIF1 mit pflanzlichen aber nicht mit Säuger-Inhibitoren.
- DMIF1 lokalisiert unter bestimmten Voraussetzungen am Centrosom. Diese Eigenschaft wird bisher erstmalig bei einem ATPase-Inhibitor beobachtet.

6 Sequenz, Motive und Struktur des DMIF1- Proteins

6.1 Sequenzähnlichkeit und Funktionshomologie

Funktionsverwandtschaft von Mitgliedern einer Proteinfamilie basieren auf der Konservierung ihrer Aminosäuresequenzen oder gleicher Molekülgeometrie. Oft liegen gleiche Molekülgeometrien in einer konservierten Aminosäureabfolge begründet, was letztlich durch einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung zu erklären ist. Beispiele für hoch konservierte Proteine sind Aktin und aktinbindende Proteine, die in sehr unterschiedlichen taxono-

mischen Klassen gleiche Zytoskelett-Funktionen erfüllen (Schleicher et al., 1988). Aktin in *Dictyostelium* stimmt in seiner Sequenz mit humanem Aktin zu 95% überein, diese wiederum ist identisch mit der des Aktins aus Maus, Kaninchen, Huhn oder Rind (Review Sheterline und Sparrow, 1995; Hennessey et al., 1993).

Aber auch weniger sequenzähnliche Proteine können gleiche Funktionen haben, was anhand der physiologischen Substituierbarkeit von Proteinen belegt werden kann. Seit langem werden Versuche durchgeführt, bei denen die Hemmung der F1F0-ATPase einer Spezies durch artfremde Inhibitorproteine *in vitro* gezeigt wird. IF1 aus der Ratte inhibiert neben der Ratten-ATPase auch die des Rindes. Säuger-ATPasen werden sogar durch den verwandtschaftlich weiter entfernten Hefe-Inhibitor gehemmt (Chan und Barbour, 1976; Cintron und Pedersen, 1979). Die physiologische Substituierbarkeit trifft jedoch nicht auf alle Inhibitor-ATPase-Paare gleichermaßen zu. Über einen aus Kartoffel isolierten Inhibitor wird berichtet, daß er zur effektiven Enzymhemmung des Hefe-F1-Teils imstande ist, während er das bovine Enzym nur in höheren Konzentrationen (Norling et al., 1990) oder gar nicht inhibiert und schon die Bindung an das Enzym sehr schwach ist (Polgreen et al., 1995). Der Vergleich der Sequenzen des Inhibitors aus Kartoffel mit dem aus der Hefe (26% identische Aminosäuren in einem Sequenzbereich mit 43 Resten) und dem Rind (23% identische Reste in einem Sequenzbereich mit 51 Resten) zeigen jedoch keine substantiellen Unterschiede, die das unterschiedliche Verhalten erklären könnten. Offenbar ist die Aminosäureabfolge allein nicht relevant, sondern sekundäre Strukturen des Proteins, auch außerhalb der Inhibitor-domäne, scheinen eine wesentliche Bedeutung zu haben. Daneben spielen experimentelle Details wie der pH-Wert eine entscheidende Rolle, wie in Kapitel 6.2.2 diskutiert wird.

Die Aminosäuresequenz von DMIF1 enthält im Vergleich mit bisher bekannten Inhibitoren 22% bis 42% identische bzw. 34% bis 56% ähnliche und substituierbare Reste (Kapitel 2.3.1). Dies allein ist jedoch nicht ausreichend für die Aussage, daß DMIF1 der Familie der mitochondrialen ATPase-Inhibitoren zuzuordnen ist. Die Homologie zu STF1, einem Inhibitor mit einer zusätzlichen stabilisierenden Funktion aus Hefe (Matsubara et al., 1983) und gewisse Ähnlichkeiten mit weiteren, recht heterogenen Proteinen unterstreichen die Problematik. Substituierungsversuche wie oben beschrieben wurden hier nicht durchgeführt. Die Hypothese, daß DMIF1 ein mitochondrialer Inhibitor ist, soll im Folgenden anhand des Molekülaufbaus und der Lokalisation des Proteins belegt werden. Da die besten Übereinstimmungen mit den Inhibitoren aus Hefe und Mensch erreicht werden, zu letzterem aber deutlich weniger Informationen erhältlich sind, werden sich viele der folgenden Ausführungen auf den Hefe-Inhibitor beziehen.

6.2 Proteindomänen und ihre Funktionen

Das DMIF1-Präprotein lässt sich funktionell in seine N-terminale Präsequenz, die sogenannte Targetingdomäne, und den C-terminal anschließenden Teil des reifen Proteins unterteilen (Abbildung 6-1B). Damit entspricht es dem generellen Bauplan der meisten mitochondrialen Proteine. Jeder dieser beiden Proteinabschnitte enthält typische, die Funktion des Abschnitts bestimmende Strukturen.

Experimentelle Daten zur Gesamtstruktur von DMIF1 sind bisher nicht verfügbar, anhand der Aminosäureabfolge können aber unter Verwendung verschiedener Kalkulations- und Analyseprogramme (MITOPROT: Claros und Vincens, 1996; PSORT: Nakai und Kanehisa, 1992; COILS: Lupas et al., 1991; GCG: Devereux *et al.*, 1984) gewisse Annahmen getroffen werden. Demnach besteht DMIF1 aus einer α -Helix mit einem amphiphilen Bereich am N-Terminus (Abbildung 6-1A). Die dominierende Struktur am C-Terminus ist eine Coiled Coil - Helix, die aus 4 „Heptad-Repeats“ besteht (COILS, Lupas et al., 1991). Es wird eine Doppel-Helix, aber kein Helix-Trimer vorhergesagt. (PAIRCOIL: Berger et al., 1995). In IF1_{Rind} und IF1_{Ratte} wurden ebenso Coiled Coil - Domänen am C-Terminus (H48 bis D84) gefunden (Raaij et al., 1996; Lebowitz und Pedersen, 1996). Die genannten Strukturen bedingen die funktionellen Bereiche des Proteins, wie im Folgenden erläutert wird.

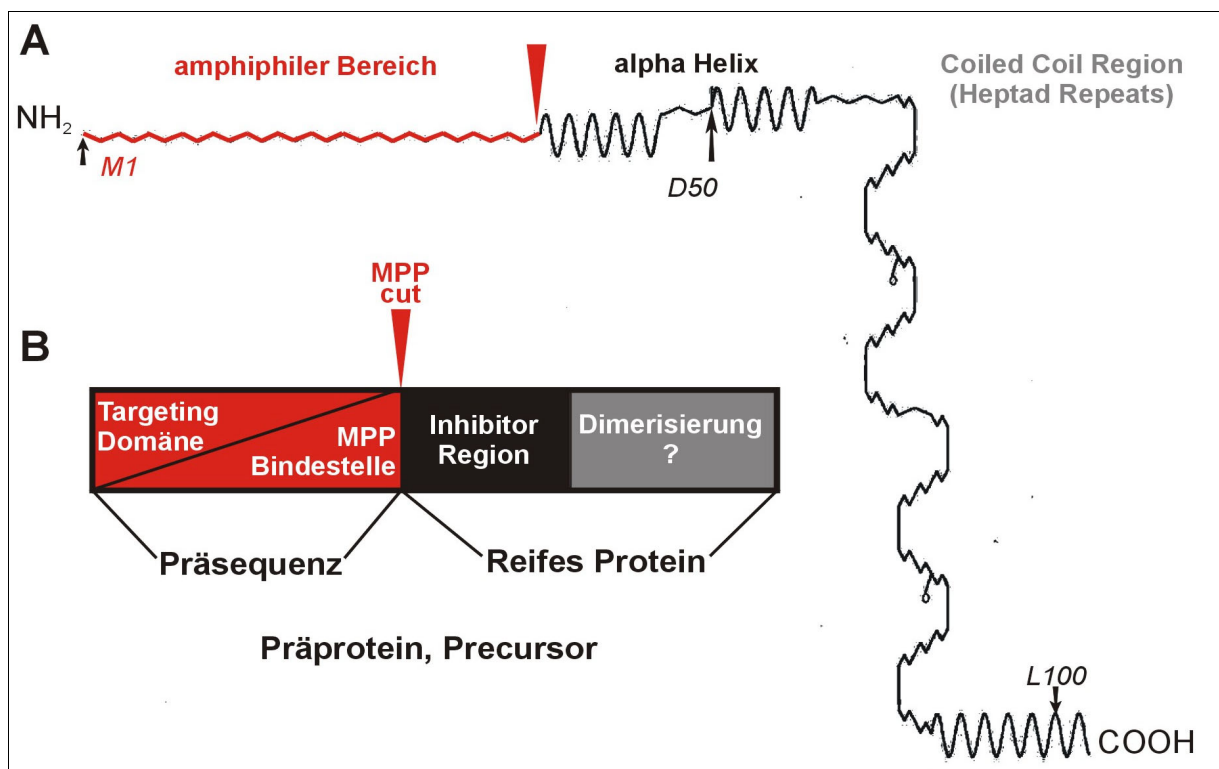


Abbildung 6-1 Modell der DMIF1-Struktur. **A** Kalkulation der Sekundärstruktur mittels GCG-Analyse (Plotstructure nach Chou-Fasman). Ausgewählte Aminosäure-Positionen sind gekennzeichnet (M1, D50, L100). **B** Einteilung der Proteinsequenz in funktionelle Bereiche.

6.2.1 Die Targetingdomäne und Prozessierung des Präproteins

Die mitochondriale Präsequenz trägt sowohl die Information zum Transport des Präproteins in die Mitochondrien an ihrem N-Terminus als auch ein MPP-Erkennungsmotiv sowie eine Prozessierungsstelle in ihrem C-terminalen Abschnitt (Hammen et al., 1996). Targetingsequenz, MPP-Binde- und Schnittstelle können überlappen oder räumlich getrennt vorliegen. Letzteres tritt insbesondere bei den etwas längeren pflanzlichen Präsequenzen auf (Sjöling und Glaser, 1998; Tabelle 7). Charakteristisch für alle Präsequenzen sind hohe Anteile an basischen Aminosäureresten: 3,5mal mehr Arginin und 1,5mal mehr Lysin als im Durchschnitt aller in Datenbanken hinterlegten Proteinsequenzen. Positiv geladene Arginin-Reste werden als Partner zur elektrostatischen Interaktion mit negativ geladenen Oberflächen des Importkomplexes angesehen (Haucke und Lithgow, 1997). Dazu kommen alternierende hydrophobe, (fast) keine sauren, und viele hydroxylierte Reste.

Organismus bzw. Gruppe	mTP aus Inhibitor	Sequenz-Länge [aa]		Anteil bestimmter Aminosäuren [%]			
		Bereich	Mittelwert	basisch	hydrophob	Ser	Thr
<i>D. discoideum</i>	DMIF1	28	-	21	32	21	4
Hefen	allgemein	20 – 60 ^[1] 9 – 121 ^[3]	32 ^[3]	k.A.	k.A.	13 ^[3]	k.A.
	INH1	23	23,5	17	26	9	-
	STF1	24		21	33	8	4
Säuger	allgemein	16 – 68 ^[3]	33 ^[3]			9 ^[3]	
	IF1 _{Rind}	25	25	8	20	4	12
	IF1 _{Ratte}	25		15	30	8	12
	IF1 _{Mensch}	25		11	26	-	12
Höhere Pflanzen	allgemein	13 – 85 ^[2] 18 – 77 ^[3]	40 ^[3]	k.A.	k.A.	17 ^[3]	k.A.
	IF1 _{Reis}	30	35	13	23	10	3
	IF2 _{Reis}	29		21	21	11	-
	IF1 _{Arab}	47		21	26	18	5

Tabelle 7 Targetingsequenzen mitochondrialer ATPase-Inhibitoren - Aminosäure-Zusammensetzung. Die Präsequenz von DMIF1 wurde mit denen von Inhibitoren aus Hefe (INH1) und Säugern (IF1) sowie mit der Präsequenz eines stabilisierenden Faktors aus Hefe (STF1) verglichen. mTP: mitochondriales Targeting-Peptid. [aa] Anzahl der Aminosäuren.^[1] [Neupert, 1997].^[2] In Pflanzen sind durchschnittlich 7 bis 9 Reste mehr als in Säugern, *N. crassa* oder Hefen zu finden [Sjöling und Glaser, 1998].^[3] Schneider et al., 1998.

Das Programm MITOPROT bewertet die Aminosäure-Zusammensetzung und das Hydrophobizitätsprofil eines Peptides bezüglich seiner Eignung als mitochondriale Targetingsequenz. Anhand dieser Analyse wird der N-terminale Abschnitt von DMIF1 als mitochondriales Targeting-Peptid angesehen (mTp, Tabelle 7). Das mTp-DMIF1 hat eine ähnliche Sequenzlänge und Zusammensetzung wie Präsequenzen von Säuger- oder Hefe-Inhibitoren. Auffällig ist der sonst nur für pflanzliche Präsequenzen typische hohe Gehalt an

Serin (Sjöling und Glaser, 1998). Säuger dagegen bevorzugen eher Threonin- als Serin-Reste, und in Hefezellen ist beides in geringerem Umfang vorhanden. Im Gegensatz zur Präsequenz ist das reife Protein DMIF1 den Inhibitoren aus Hefe und Mensch am ähnlichsten, wie im Ergebnisteil gezeigt wurde (Kapitel 2.3.1).

Diese Aminosäure-Zusammensetzung bildet die Voraussetzung dafür, daß die Targeting-Domäne eine amphiphile Struktur ausbilden kann, die der sequenzunspezifischen Erkennung beim Eintritt in die äußere Mitochondrienmembran dient (Abbildung 6-2). Ob zusätzlich eine Helixstruktur zwingend dafür erforderlich ist, wird kontrovers diskutiert. Während eine helicale Struktur im N-terminalen Bereich der Präsequenz von Alkoholdehydrogenase (ALDH) aus Rattenleber für deren Importierbarkeit essentiell erscheint (Hammen et al., 1996; Ni et al., 1999), war dies für eine Reihe anderer Proteine nicht zwingend. So wurden artifizielle Peptide hinsichtlich ihrer Importierbarkeit untersucht, im einen Fall mit, im anderen ohne die Fähigkeit zur Ausbildung einer solchen Helix-Struktur. Hefe-Cytochromoxidase IV (CoxIV), deren natürliche Targetingdomäne durch verschiedene artifizielle Präsequenzen, die einen ähnlichen Gehalt an basischen, hydrophoben und Serin-Resten wie Wildtyp-Targeting-Domänen aufwiesen, ersetzt wurde, wurde *in vivo* in Hefe-Mitochondrien importiert und sogar prozessiert. Im Gegensatz dazu wirkte ein höherer Gehalt an hydrophoben Resten auf den Import inhibierend (Allison und Schatz, 1986). In einem anderen Ansatz wurden einige dieser Peptide bezüglich ihrer Fähigkeit, in einen Phospholipid-Bilayer oder in Phospholipidvesikel zu integrieren untersucht, als Maß ihrer Amphiphilität. Peptide, die gemäß diesem Kriterium amphiphil waren, waren auch importkompetent, und fehlgeschlagenes Importieren war korreliert mit mangelnder Amphiphilität. Die von Allison und Schatz (1986) als importkompetent aber nicht-helical gefundenen Peptide zeigten dabei deutliche amphiphile Eigenschaften (Roise et al., 1988). Für den Transport in die Mitochondrien ist demnach regelmäßig Amphiphilität, aber wahrscheinlich nicht die Ausbildung einer Helix erforderlich. Nach dieser Hypothese ist der Import möglich, obwohl viele Targeting-Sequenzen keine perfekte amphiphile Helix aufweisen, wie auch das Targeting-Peptid von DMIF1. Das 18mer hat aber 7 hydrophobe Reste und alternierend 3 basische Reste, die seine Amphiphilität bedingen (Abbildung 6-2).

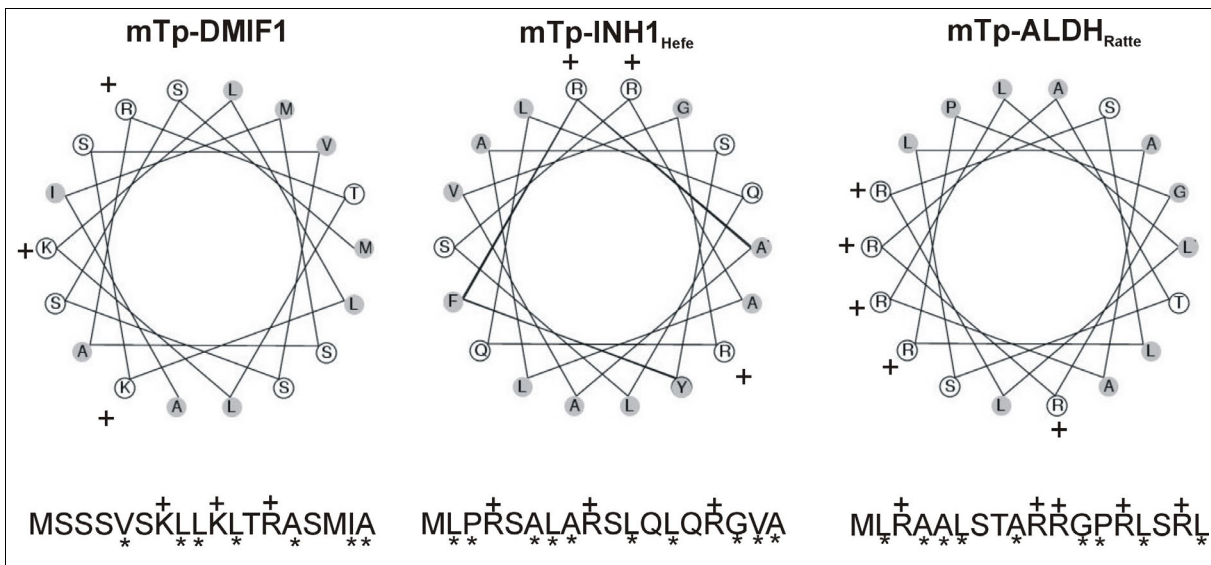


Abbildung 6-2 Amphiphilität und Helices in Targeting-Sequenzen von mitochondrialen ATPase-Präproteinen. Während alle mitochondrialen Targeting-Peptide (mTp) deutlich amphiphil sind (Peptid-Sequenzen unten), wird nur von dem der Alkoholdehydrogenase (ALDH) eine annähernd klassische amphiphile Helix gebildet (Grafiken oben). Basische Reste sind mit » + « gekennzeichnet. Hydrophobe Reste sind in der Helix-Abbildung grau unterlegt, in den Peptid-Sequenzen mit » * « markiert.

Prolin ist ein starker Helixbrecher, der die α -Helix-Struktur vermutlich auch im DMIF1-Präprotein an Position P20 terminiert. Prolin wird in pflanzlichen Targeting-Domänen oft zwischen zwei Sequenz-Bereichen gefunden, die unterschiedliche Funktionen haben. Der N-terminale helicale Bereich dient dem Targeting, und der häufig ebenso helicale Bereich am C-terminalen Ende der Präsequenz dient als Prozessierungsdomäne. Prolin kommt außerdem als Linker in einem Helix-Stretch-Motiv in einem sonst sehr variablen Bereich vor (Sjöling und Glaser, 1998). Das trifft für die beiden Reis-Inhibitoren IF1 mit 3 Pro-Resten und IF2 mit einem Pro-Rest (Nakazono et al., 2000) und für IF1 aus *Arabidopsis thaliana* mit einem Pro-Rest (AccNr. BAB08979) zu, nicht jedoch für *Arabidopsis*-IF2 (AccNr. AAC73027). Die Unterbrechung der pflanzlichen Präsequenz-Helix durch Prolin führt vermutlich zur Flexibilisierung des Peptidstranges. Das hat in höheren Pflanzen entscheidende Bedeutung für die Bindung an das Prozessierungsenzym MPP, welches hier Teil des bc_1 -Komplexes der respiratorischen Kette und somit für eine Bindung sterisch stark eingeschränkt ist. Erst die flexible Präsequenz-Helix kann eine Bindung mit der MPP in einem „induced fit“-Modus (Ogishima et al., 1995) über elektrostatische Wechselwirkung (Kitada und Ito, 2001) eingehen.

In sämtlichen Säuger-Inhibitoren fehlen diese Prolinreste, und das Hefe-Homolog INH1 besitzt nur Pro-Reste außerhalb der Prozessierungsregion. Die MPP liegt in Säugern und Hefe frei in der Matrix vor, so daß eine Flexibilität des Präproteins wie in höheren Pflanzen nicht erforderlich erscheint. Doch sind bei Inhibitoren aus Säugern Glycinreste verbreit-

tet, die ebenfalls helixbrechend sind. In Präsequenzen anderer mitochondrialer Proteine wie der Alkoholdehydrogenase aus Ratte ist der bereits vorher erwähnte RGP-Linker bekannt, der die zwei Helices der N-terminalen Targeting-Region und der darauffolgenden Prozessierungsdomäne voneinander trennt. Wenn der Linker entfernt wird erfolgt keine Prozessierung mehr (Waltner und Weiner, 1995; Hammen et al., 1996). Eine flexible Präsentation des Targeting-Peptides scheint demnach in allen Organismen für eine Prozessierung erforderlich zu sein, unabhängig davon, ob MPP in der Matrix oder membrangebunden vorliegt.

Durch statistische Auswertung einer Reihe von mitochondrialen Targeting-Peptiden aus verschiedenen taxonomischen Gruppen (Rind, Mensch, Maus, Schwein, Ratte Hefe, *Neurospora*, Mais, Kartoffel, Tabak) mittels Neuronaler Netzwerke wurden mit "R-2", "R-3" und "R-10" drei verbreitete und spezieübergreifend konservierte Motive für die MPP-Erkennungs- und Prozessierungsstelle extrahiert (Schneider et al., 1998, Abbildung 6-3). Dabei bezeichnen die Ziffern die Position eines Arginin-Restes R gerechnet von der Schnittstelle. Für ein R-2-Motiv zum Beispiel befindet sich ein Arginin-Rest zwei Aminosäure-Positionen von der Schnittstelle stromaufwärts. Eine Spaltung nach einem R-10-Motiv erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Schritten: zunächst wird durch MPP nach der Position -8 stromabwärts geschnitten, anschließend durch das Enzym IMP (Inner/Intermediate Membrane Protease, auch MIP) nach der Position -1 stromabwärts das restliche Oktapeptid abgespalten (Branda und Isaya, 1995). In Pflanzen wird nicht nach dem R-10-Muster prozessiert, im Einklang mit dem dort fehlenden IMP-Enzym. Es wird außerdem spekuliert, daß einige oder alle Prozessierungen nach dem R-3-Motiv zunächst eine Proteolyse mittels MPP nach dem R-2-Muster durchlaufen, und anschließend ein weiterer Aminosäure-Rest durch eine unbekannt proteolytische Aktivität abgespalten wird (Schneider et al., 1998).

Position	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	
R - 2 - Motiv								V/A/S	R	X	↓	X	S/A
R - 3 - Motiv							V/A/S	R	X	F/Y/L	↓	S/A	
R - 10 - Motiv	R	X	F/L/I	X	X	T/S/G	X	V/A/S	R	X	↓	F/Y/L	S/A

Abbildung 6-3 Konservierte Motive zur MPP-Prozessierung. Die Spaltstelle ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. R steht für Arginin, X bezeichnet beliebige Reste, die übrigen Reste entsprechen ebenfalls der Aminosäure-Nomenklatur.

Die Motive sind eine wichtige aber offenbar nicht ausreichende Voraussetzung für die Proteolyse, da sie auch in nicht prozessierten mitochondrialen Proteinen zu finden sind. Hier könnte der Einfluß der oben erwähnten Aminosäuren oder Tripeptide (Prolin, Glycin, RGP-Linker) auf die Struktur entscheidend sein.

Sowohl der bovine als auch der Hefe-Inhibitor werden gemäß dieser statistischen Analyse nach einem R-3-Motiv prozessiert, wobei das Hefe-mTp ein perfektes, das Rinder-mTp

ein modifiziertes Motiv aufweist. Auch für STF1 ist ein R-3-Motiv beschrieben (Branda und Isaya, 1995). Für DMIF1 wurden alle in Frage kommenden R-Positionen auf Passung zu den Motiven R-2, R-3 und R-10 analysiert (Abbildung 6-4).

Position	-4	-3	-2	-1		+1	+2	
Consensus		V/A/S	R	X	↓	X	[S/A]	R-2
DMIF1 _{R13}	L	<i>T</i>	R	A	↓	S	M	
DMIF1 _{R22}	P	K	R	S	↓	I	A	
DMIF1 _{R27}	A	<i>F</i>	R	G	↓	D	E	
DMIF1 _{R34}	K	E	R	E	↓	E	A	

Position	-4	-3	-2	-1		+1	+2	
Consensus	V/A/S	R	X	[F/Y/L]	↓	[S/A]		R-3
INH1	A	R	F	Y	↓	S	E	
IF1 _{Rind}	G	R	G	F	↓	G	S	
DMIF1 _{R13}	<i>T</i>	R	A	S	↓	M	I	
DMIF1 _{R22}	K	R	S	<i>I</i>	↓	A	F	
DMIF1 _{R27}	<i>F</i>	R	G	D	↓	E	F	
DMIF1 _{R34}	E	R	E	E	↓	A	F	

Position	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2		
Consensus	R	X	FLI	X	X	T/S/G	X	V/A/S	R	X	↓	F/Y/L	S/A	R-10
DMIF1 _{R13}	R	A	S	M	I	A	A	P	K	R	↓	S	I	
DMIF1 _{R22}	R	S	I	A	F	R	G	D	E	F	↓	K	E	
DMIF1 _{R27}	R	G	D	E	F	K	E	R	E	E	↓	A	F	
DMIF1 _{R34}	R	E	E	A	F	E	S	Q	Y	V	↓	K	Q	

Abbildung 6-4 Screening von Prozessierungsmotiven und Schnittstellen in DMIF1. Die Lage der für ein Motiv potentiell relevanten Arg-Reste in der DMIF1-Präsequenz sind mit Indices markiert. DMIF1_{R27} bedeutet z.B., daß die 27. Aminosäure der Präsequenz ein Arginin ist. Dieses befindet sich nach der Nomenklatur des R-2-Motivs bei [-2]. Passende Motive in DMIF1 sind grau unterlegt. DMIF1-Aminosäuren, die nicht im Consensus-Motiv vorkommen, aber ähnliche Ladungseigenschaften haben, sind kursiv dargestellt. Zur Kalkulation der Schnittstellen anhand von Sequenzvergleichen vergleiche 2.3.1.

Keines der Motive paßt perfekt zu einer der potentiellen Prozessierungsregionen von DMIF1, deshalb wird für DMIF1 ein modifiziertes Motiv angenommen. Anhand der Sequenzvergleiche mit INH1 aus Hefe und einiger typischerweise vorkommenden Aminosäuren wurde eine Schnittstelle bei G28 postuliert (Kapitel 2.3.1). Wenn aufgrund gleicher Ladungseigenschaften ein Austausch der Reste V/A/S der konservierten Sequenz gegen einen F-Rest in der DMIF1-Sequenz möglich ist, ohne die Prozessierung zu behindern, würde die Schnittstelle G28 zu einem R-2-Motiv passen. Die Analyse mit PSORT ergibt ebenfalls ein R-2-Motiv mit Schnittstelle nach G28, die somit als die wahrscheinlichste gilt. Ein Beweis dieser Schnittstelle könnte durch die N-terminale Sequenzierung des reifen Proteins oder durch massenspektroskopische Untersuchungen erbracht werden.

Die Größe der resultierenden Fragmente wurde experimentell mit monoklonalen Antikörpern gegen DMIF1 im Westernblot überprüft (Kapitel 4.1). Endogenes DMIF1-Protein war dabei in *Dictyostelium*-Zellen nur als prozessiertes Molekül von 10 kDa detektierbar. Das gilt auch für das Fusionsprodukt GFP-C-DMIF1 – hier wurde ein 37 kDa-Fragment gefunden, das durch MPP-Spaltung aus dem Fusions-Präprotein von 41 kDa hervorgeht. Die Größen der experimentell gefundenen Fragmente entsprechen den berechneten Größen. Die in beiden Fällen abgespaltene Targeting-Domäne konnte mit den vorhandenen Antikörpern nicht nachgewiesen werden. Neben den in Kapitel 3.2.2 und 4.1 diskutierten Ursachen spielen vermutlich folgende Eigenschaften von Targeting-Sequenzen eine weitere Rolle:

In den Mitochondrien haben die abgespaltenen basischen Targeting-Peptide eine starke Neigung, in die negativ geladene Membran zu integrieren, was bei der großen Zahl anfallender Moleküle zu einer massiven Überdehnung und schließlich zum Zerreißen der Membran führen würde. Nach der Abspaltung vom Präprotein müssen diese Sequenzen daher sehr schnell degradiert werden, um die Mitochondrien vor mechanischer Zerstörung zu schützen (Ståhl et al., 2000). Mitochondriale Präproteine im Zytosol müssen sehr schnell in die Mitochondrien transportiert werden, um eine Degradierung der dafür anfälligen Präsequenz zu verhindern (Ni et al., 1999). Präsequenzen sind daher weder in den Mitochondrien noch zytosolisch nachweisbar.

Aus dem Nachweis des ausschließlich reifen Proteins und der Lokalisation der Protease MPP ausschließlich in den Mitochondrien ist zu schließen, daß in *Dictyostelium*-Zellen das endogene Präprotein und auch das GFP-C-DMIF1-Fusionsprotein in die Mitochondrien importiert und dort prozessiert wird. Abgesehen von dem centrosomal lokalisierten Fusionsprotein GFP-N-DMIF1 (Kapitel 7.2) konnte die unprozessierte Form des Proteins durch Expression von DMIF1 in *E. coli* nachgewiesen werden. Das entspricht der Erwartung, weil Bakterien keine mitochondriale Prozessierungsmaschinerie besitzen. Selbst wenn man von der eher unwahrscheinlichen Aktivität einer bakteriellen Leaderpeptidase ausgeht, maskiert GST am N-terminus (Kapitel 3.2.1) möglicherweise die Targetingsequenz und verhindert damit einen potentiellen Angriff einer bakteriellen MPP-ähnlichen Protease (Nach der Endosymbiontentheorie sind einige ähnliche biochemische Prozesse in Bakterien und Mitochondrien zu erwarten. OmpP, eine Leaderpeptidase in der äußeren Bakterienmembran, schneidet eukaryontische Präproteine und erkennt dabei spezifische Aminosäuren an bestimmten Positionen, die auch von MPP erkannt werden. Review Leaderpeptidasen: Dalbey, 1991; Striebel und Kalousek, 1999). Ein ähnliches „Maskierungs-Phänomen“ wurde bei GFP-N-DMIF1 beobachtet.

Das rekombinante Protein GST-DMIF1 ist in *E.coli* auch gegen eine degradierende Proteolyse stabil. Im Gegensatz dazu wurde eine Proteolyse bei der Expression des C-terminal um 2/3 verkürzten DMIF1-Proteins in Bakterien beobachtet. Für Hefe ist bekannt, daß der C-Terminus des Inhibitors für dessen Stabilität in Mitochondrien unentbehrlich ist, da er durch seinen stabilisierenden Einfluß auf die Konformation des Proteins proteolytische Angriffe von mitochondrialen Proteasen verhindert (Ichikawa et al., 1998). C-terminal verkürzte Inhibitorproteine aus Rind konnten in *E.coli* in meßbaren Mengen nur exprimiert werden, wenn am C-Terminus nicht mehr als 28 Reste fehlten, alle kürzeren Fragmente konnten nicht nachgewiesen werden, was auf einen proteolytischen Abbau zurückgeführt wurde (Raaij et al., 1996). Proteolytische Degradation findet bei der Expression des rekombinanten Proteins GFP-N-DMIF1 in *Dictyostelium* statt, wurde aber auch bei GFP-C-DMIF1 gefunden (Kapitel 4.1). Beim GFP-C-DMIF1-Abbau entstehen zwei Proteolyse-Intermediate von ca. 20 und 30 kDa. Aus den Daten ist nicht ableitbar, ob die proteolytische Degradation in den Mitochondrien oder im Zytosol erfolgt. Im Falle des GFP-N-DMIF1 muß von einem extramitochondrialen Abbau ausgegangen werden (siehe Kapitel 7.2), der durch die Neigung des Inhibitors, in wäßriger Lösung Aggregate zu bilden gefördert wird (Klein et al., 1982). Für Präsequenzen ist bekannt, daß sie aufgrund ihrer amphiphilen Natur mit ungefalteten Proteinen interagieren und somit deren Aggregation induzieren können (Endo et al., 1995). Das wird als Grund für die Instabilität von Präsequenzen angesehen, die posttranslational durch zytosolische Chaperone stabilisiert werden müssen. Das Lokalisationsverhalten von verschiedenen chimären Proteinen zeigt, daß mitochondriale Proteine noch während der Translation in die Mitochondrien dirigiert werden: (Ni et al., 1999). Die Tatsache, daß mitochondriale Präsequenzen sehr proteaseanfällig sind, erfordert Transportzeiten, die sich auf einer vergleichbaren Skala bewegen wie die Synthese des Proteins.

6.2.2 Das „reife“ Protein

DMIF1 ist überwiegend α -helical und in seiner Primärstruktur vergleichbar mit anderen F1F0-ATPase-Inhibitoren, die eine inhibitorisch aktive Domäne besitzen, mit der auch die Bindung an die ATPase erfolgt. Der Bereich der minimalen Inhibitor-Sequenz, die Gegenstand ausführlicher Untersuchungen am Protein IF1 des Rindes war, wurde von verschiedenen Autoren unterschiedlich weit gefaßt (Review Green und Grover, 2000; Abbildung 6-5).

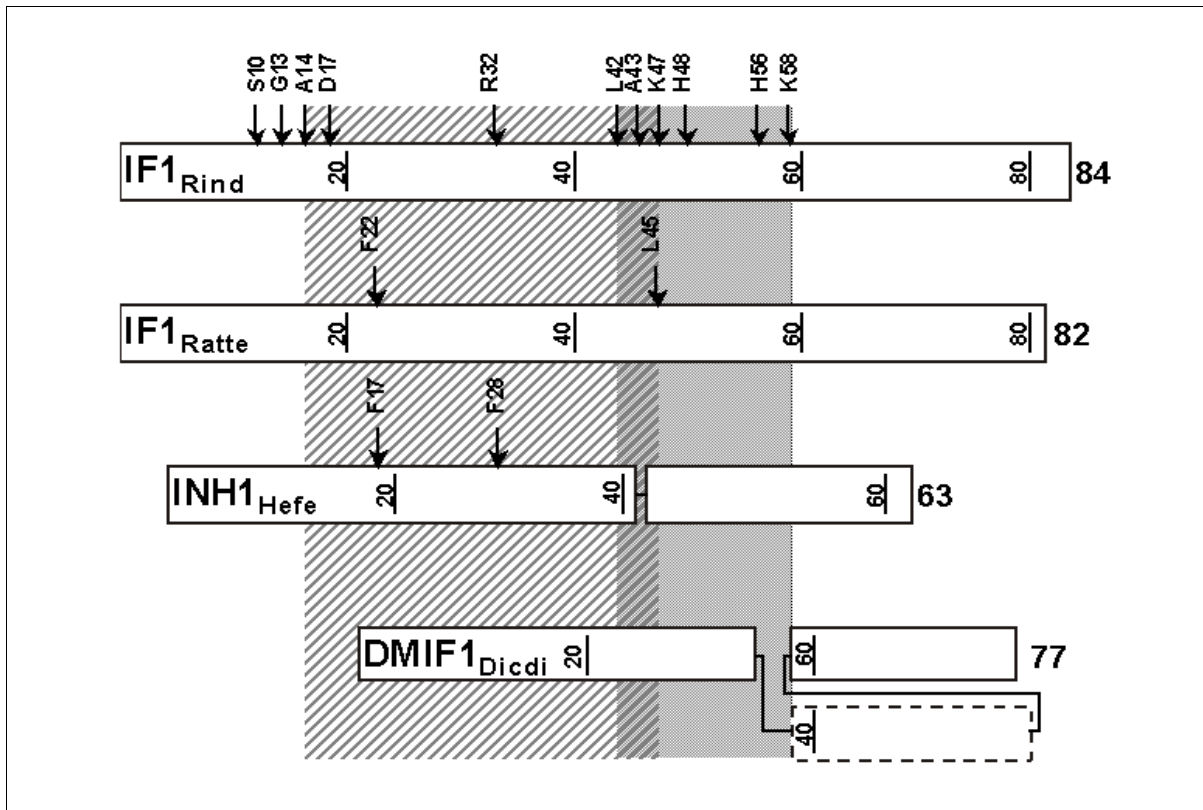


Abbildung 6-5 Inhibitorische Domänen in Inhibitorproteinen aus Rind ($IF1_{\text{Rind}}$), Ratte ($IF1_{\text{Ratte}}$), Hefe ($INH1_{\text{Hefe}}$) und *Dictyostelium* ($DMIF1_{\text{Dicdi}}$). Die minimale inhibitorische Sequenz A14-K47 im Inhibitor des Rindes (nach van Raaij et al., 1996) ist schraffiert unterlegt. Andere Autoren beschrieben davon differierende Bereiche (Beschreibung im Text), dazugehörige Reste und ihre Position sind ebenfalls dargestellt. Das synthetische Peptid L42-K58 (dunkelgrau unterlegt) zeigt die gleiche inhibitorische Wirkung auf die ATPase wie das Wildtyp-Protein IF1 (Papa et al., 1996; Zanotti et al., 2000). Die gestrichelte Box im *Dictyostelium*-Protein steht für die nicht in anderen Inhibitoren zu findende Region K36-K57 (Die Numerierung der Reste im reifen Protein entspricht K64-K85 im Präprotein.).

Anhand N- und C-terminal verkürzter IF1-Fragmente wurde gezeigt, daß der Bereich zwischen den Aminosäuren A14 und K47 des prozessierten Proteins essentiell für seine inhibitorische Aktivität ist und die Aminosäuren S10 bis G13 sowie H48 bis H56 an der Stabilisierung des IF1-ATPase-Komplexes beteiligt sind. N-terminale Deletionen bis G13 haben die Fähigkeit zur Hemmung der ATPase nicht beeinträchtigt, doch erschien die Bindung von IF1 zum Enzym weniger stabil (Raaij et al., 1996). Im Gegensatz dazu fanden andere Autoren, daß die Deletion des N-Terminus bis D17 sogar zum Anstieg der Bindungsaffinität und zum Abfall der Inhibitoraktivität führt (Harris, 1997). Für extrem verkürzte Proteine wie das synthetische Peptid L42-K58 wurde ein vergleichbares Inhibierungsvermögen wie für das Wildtyp-Protein nachgewiesen (Papa et al., 1996; Zanotti et al., 2000).

In IF1 aus Ratte wurde der inhibitorische Bereich mit Hilfe einzelner Peptide aus der IF1-Sequenz untersucht und auf die Region F22-L45 eingegrenzt, die mit einem wesentli-

chen Teil der inhibitorischen Domäne in IF1_{Rind} (A14-K47), jedoch nicht mit dem Peptid L42-K58 im Inhibitor des Rindes korrespondiert (Lebowitz und Pedersen, 1996). In der Sequenz des Inhibitors INH1 aus Hefe wurde der Bereich F17-F28 als essentiell ermittelt (Ichikawa et al., 2001). Dieser Bereich überlappt nicht mit dem kurzen L42-K58-Peptid des Rinder-Proteins, überdeckt aber einen Teil der weiter gefassten Sequenz A14-K47.

DMIF1 ist in dem inhibitorischen Bereich des Hefe-Proteins mit 50% identischen Resten homolog zu INH1, so daß hier die inhibitorische Domäne oder ein wichtiger Teil davon vermutet werden kann. Weiterhin ist für INH1 bekannt, daß die C-terminale Region, die bei DMIF1 eine Coiled Coil - Helix ausbildet, wichtig für die Stabilisierung des INH1-F1F0-Komplexes und seiner Protektion gegen Degradation *in vivo* ist (Ichikawa et al., 1998). Dieser Bereich dient beim Rinder-Inhibitor seiner Dimerisierung (Cabezón et al., 2000a).

Anzumerken ist, daß für die Feststellung der minimalen Inhibitorsequenz in Rind und Ratte einige der untersuchten Moleküle als rekombinante Proteine in *E. coli* exprimiert, andere chemisch synthetisiert wurden. Deshalb ist damit zu rechnen, daß wichtige Sekundärstrukturen im einen oder anderen Falle nicht ausgebildet sind. Dies könnte eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der Autoren sein.

Außerdem schien der unterschiedlich gewählte pH- Bereich im Assay von pH 6.7 bis pH 8.0 wesentlich zu sein, da er Einfluß auf das Bindungsverhalten des Inhibitors zum Enzym hat. Das Inhibitor-Molekül nimmt abhängig vom pH-Wert unterschiedliche Konformationen an: Die nativen Inhibitoren aus Rind, Büffel, Ratte und die rekombinanten Proteine IF1_{Rind} und IF1_{Ratte} sind bei einem pH-Wert von 8.0 α -helical. Bei Absenken auf pH 6.7 und darunter bleiben der rekombinante Inhibitor aus Ratte und das native Protein IF1_{Rind} nahezu unverändert α -helical, während der native Büffel-Inhibitor diese Sekundärstruktur komplett verliert (Green und Grover, 2000). Die pH-Abhängigkeit der Konformationsänderung des Hefe-Inhibitors wurde mit Hilfe von NMR-Studien untersucht und die bei niedrigen pH-Werten auftretende Konformation als die aktive, also inhibierende Form nachgewiesen (Fujii et al., 1983). Interessanterweise hat das Protein im niedrigen pH-Bereich eine relativ ungeordnete Struktur, während mit dem Anstieg des pH-Werts die helicale Anordnung zunimmt und dabei die inhibierende Funktion verloren geht. Kürzlich wurde beobachtet, daß sich STF1, dem auch inhibitorische Wirkungen zugeschrieben werden, entgegengesetzt zu INH1 verhält, denn STF1 befindet sich bei basischen pH-Werten (etwa pH 8) in seinem aktiven Zustand (Cabezón et al., 2002)

Lebowitz und Pedersen stellen ein Modell vor, in dem die Inhibitorregion aus 2 Helices besteht, von denen die N-terminale Helix eine inhibitorische, die C-terminale Helix (Coiled Coil - Region) regulatorische Funktion für die Interaktion der beiden Helices miteinander hat (Lebowitz und Pedersen, 1996). Das Zusammenspiel beider Helices ist stark vom pH-Wert

abhängig: Bei hohen Werten interagieren beide derart miteinander, daß die inhibitorische von der regulatorischen Domäne maskiert wird und keine Bindung an F1 erfolgen kann. Die Folge einer pH-Erniedrigung ist die Protonierung von Histidin-Resten, die zur Lockerung der Interaktion führt und letztlich die inhibitorische Region zur Bindung an F1 freigibt. Die Domäne erfährt dabei den partiellen Verlust ihrer helicalen Struktur (Abbildung 6-6). Histidine sind bei Säuger-Inhibitoren häufig, bei anderen Inhibitoren eher selten bis nicht vorhanden. Das Pendant in DMIF1, welches keinen Histidinrest besitzt, ist nicht bekannt.

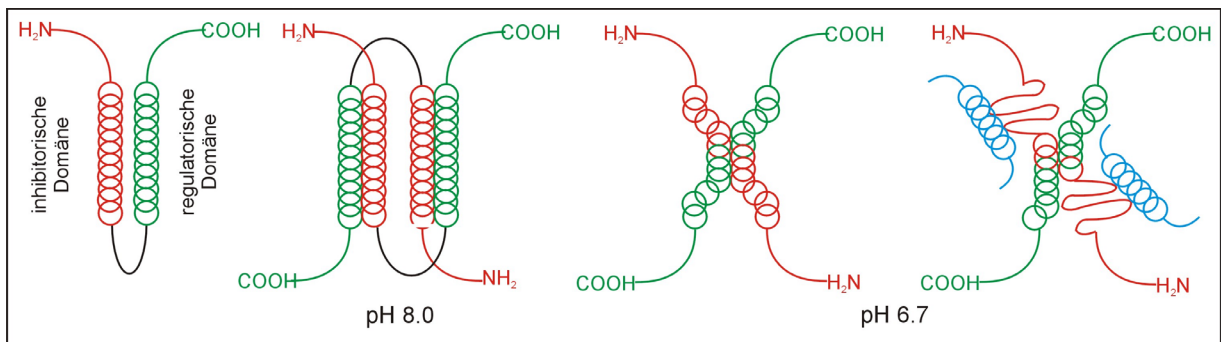


Abbildung 6-6 Konformationsänderungen im Inhibitor durch pH Verschiebung. v.l.n.r.:
1. Die Inhibitor-Region enthält eine auf die F1F0-ATPase inhibierend wirkende (rot) und eine die Bindung regulierende Domäne (grün). **2.** Bei pH 8.0 bildet das Molekül eine sich selbst maskierende Struktur, d.h. die inhibitorische Region ist unzugänglich. **3.** Änderung des pH-Wertes auf 6.7 führt zur Auflösung der Bindung zwischen Inhibitor- und Regulatordomäne. Der Übersicht halber ist nur ein Helixpaar gezeigt. **4.** Die partielle Auflösung der helicalen Struktur ermöglicht die Bindung der ATPase (blau) an die Inhibitorregion.

Der niedrige pH-Wert induziert nicht nur eine Lockerung der beiden beschriebenen Helices, sondern auch die Veränderung der Oligomerisierung des Inhibitors. Man kennt von IF1_{Rind} zwei oligomere Zustände: das Homo-Dimer wird bei pH 6.7, das Tetramer bei pH 8.0 gebildet (Cabezón et al., 2000a und b). Der pH-sensitive Bereich für die Conversion ist der C-terminale Bereich der minimalen Inhibitorsequenz (R32-A43, vgl. Abbildung 6-5). Die Interaktion des Inhibitors mit der ATPase erfolgt im dimerisierten Zustand. Wie der ATPase-Inhibitor aus Rind neigt auch der aus Hefe bei niedrigen pH-Werten zur Dimerisierung (Arnold et al., 1998; Cabezón et al., 2000b). Die beiden inhibitorischen Domänen des Inhibitor-Dimers können somit simultan mit je einer F1- α/β -Untereinheit des Enzyms interagieren. Derartige Konformationsänderungen des Inhibitors in Abhängigkeit vom pH-Wert wurden u.a. mittels ¹H-NMR-Studien beobachtet (Fujii et al., 1983).

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die tatsächlich notwendige(n) Region(en) für die effektive Hemmung der F1F0-ATPase nach wie vor unsicher sind, weil der Einfluß der variablen experimentellen Bedingungen nicht vollständig abgeklärt ist. Legt man aber die weitgefaßte Inhibitor-Domäne von A14 bis K47 zugrunde (Abbildung 2-4, blauer Kasten), so sind in

DMIF1 die wesentlichen Aminosäuren vorhanden, die anderen Inhibitoren (Ratte, Candida, Bäckerhefe) in diesem Bereich eigen sind (F22, K24, R25, E26, A28, E30, Y33, L42). Lediglich drei Reste sind konservativ ausgetauscht (R35K, E40D, L45M) und zwei Reste fehlen (Q41, K46). Außerdem sind helicale Bereiche einschließlich der C-terminalen Coiled Coil - Helix vorhanden, die potentiell miteinander interagieren können. Eine inhibitorische Funktion von DMIF1 ist demnach sehr wahrscheinlich.

7 Intrazelluläre Lokalisation

7.1 Mitochondriale Lokalisation

Der Nachweis von DMIF1 in *Dictyostelium*-Mitochondrien *in vivo* gelang mit GFP als Reporterprotein am C-Terminus von DMIF1 (GFP-C-DMIF1). Die Immunmarkierung des endogenen DMIF1 bestätigte die Lokalisation sowohl im Fluoreszenz- wie im TEM- Präparat. Dabei hatte die Expressionshöhe keinen Einfluß auf die Spezifität der Lokalisation. Damit wird die mitochondriale Targeting-Funktion der N-terminalen Domäne von DMIF1 untermauert.

Der Nachweis der Assoziation mit der inneren Mitochondrien-Membran im TEM-Präparat gestaltete sich schwieriger, da *Dictyostelium*-Mitochondrien sehr dicht gepackte Tubuli besitzen. Mit der Präparation von "inside-out" Vesikeln (Kapitel 3.3.2.1), die der Entzerrung der Strukturen diene, wurden die Vorteile von zwei Präparationstechniken vereinigt: die Möglichkeit der Immunmarkierung wie im Kryopräparat unter Beibehaltung morphologischer Feinheiten wie im EPON-Präparat.

Die Akkumulation von anti-DMIF1-Antikörpern in membrannahen Strukturen spricht gegen eine Lokalisation von DMIF1 in der Matrix. Für eine Lokalisation im Lipidteil der inneren Membran sind längere hydrophobe Bereiche in der Sequenz erforderlich, und für die Ausbildung eines Lipidankers sind myristoylierte oder prenylierte Reste notwendig (Wedegaertner et al., 1995). Längere hydrophobe Regionen existieren nicht in der DMIF1-Sequenz, und sie enthält gemäß Analyse mit dem Programm PSORT auch kein Lipid- oder GPI-Anker-Motiv. Der beobachtete „Stiel“, auf dem der Inhibitor gegenüber der Membran sitzt, ist ein Indiz für die Verbindung von DMIF1 mit der Membran über ein Linkerprotein. Dafür kommt die F1-Untereinheit der F0F1-ATPase als Rezeptor von DMIF1 in Betracht. DMIF1 koppelt demnach wahrscheinlich ebenso wie die anderen bekannten Inhibitor-Proteine über diesen Rezeptor an die innere Membran.

7.2 Centrosomales Targeting

Das Protein GFP-N-DMIF1 ist an den Centrosomen, im Zytoplasma und in kleinerem Umfang in Vesikeln nachweisbar, jedoch nicht in den Mitochondrien. Die centrosomale Lokalisation wurde anhand der Co-Lokalisation der GFP-Fluoreszenz mit dem MTOC gezeigt und wurde weder bei dem endogenen DMIF1 noch bei GFP-C-DMIF1 beobachtet, welche erwartungsgemäß in die Mitochondrien transportiert werden. Daraus wird gefolgert, daß der Transfer des Inhibitors in die Mitochondrien nur bei ungestörter Umgebung seiner Targeting-Domäne möglich ist (Kapitel 3.1.2.2; 3.2.3.2; 4.1). Die Kopplung von GFP an den N-Terminus von DMIF1 hemmt diese Funktion komplett.

Beobachtungen *in vivo* über das Bewegungsverhalten und die Morphologie von Mitochondrien oder über Importprozesse werden durch Kopplung des Reporterproteins GFP an mitochondriale Targeting-Sequenzen (Suelmann und Fischer, 2000; Kanazawa et al., 1997; Ni et al., 1999) oder an mitochondriale Präproteine (Yano et al., 1997) möglich. All diesen Experimenten ist gemeinsam, daß GFP an den C-Terminus des zu analysierenden Peptides oder Proteins fusioniert wird und die Signalsequenz am N-Terminus freiliegt. Diese Fusionsproteine akkumulieren erwartungsgemäß in den Mitochondrien. Zwar treten einige Proteine, trotz freier mitochondrialer Targetingdomäne, zusätzlich an anderen Stellen in der Zelle auf, wie das Präprotein des IF1-Proteins aus Reis, welches mit GFP an seinem C-Terminus in den Mitochondrien und im Kern gefunden wurde (Nakazono et al., 2000). Die Lokalisation im Kern wurde jedoch mit einem unspezifischen Transfer von GFP in den Kern erklärt, der insbesondere bei kleinen Proteinen häufig beobachtet wird.

Erst in jüngster Zeit mehren sich Untersuchungen, die sich gezielt mit der Lokalisation rekombinanter Proteine beschäftigen, die mit GFP an unterschiedlichen Stellen fusioniert wurden (Gerisch und Müller-Taubenberger, 2003). Das Transkript einer sowohl in Peroxisomen als auch in Mitochondrien enzymatisch aktiven Racemase trägt zwei topogene Signale, die zu einer dualen Verteilung des Proteins führen, je nach dominierendem Signal. Mit GFP am N-Terminus ist die Lokalisation peroxisomal, mit GFP am C-Terminus mitochondrial (Amery et al., 2000). Der N-Terminus des Proteins wurde als Träger der mitochondrialen Targeting-Domäne identifiziert. Inwieweit solche oder auch andere Mechanismen für GFP-N-DMIF1 zutreffen, die letztlich zu dessen centrosomaler Lokalisation führen, wird im folgenden anhand von vier Hypothesen diskutiert.

- CENTROSOMALE TARGETING SEQUENZEN. Auf der Suche nach potentiellen centrosomalen Targetingsequenzen konnten in DMIF1 einige Bereiche festgestellt werden, die mit Sequenzabschnitten centrosomaler Proteine wie z.B. CP190 und γ -Tubulin partiell überein-

stimmen. Diese Bereiche befinden sich im mittleren bis C-terminalen Bereich von DMIF1 und würden wahrscheinlich durch ein N-terminal gekoppeltes Reporterprotein wie GFP nicht beeinträchtigt. Die Sequenzhomologien sind jedoch nicht sehr ausgeprägt. Ihre Funktion als centrosomale Targetingsequenz wird daher nicht als wahrscheinlich angesehen.

- **PROTEIN-SEKUNDÄRSTRUKTUR.** Coiled Coil- Bereiche in centrosomalen Proteinen werden für deren Lokalisation am Centrosom verantwortlich gemacht, indem sie damit Komplexe mit anderen centrosomalen Proteinen bilden, die Coiled Coil- Domänen tragen (Chen et al., 2003; Ohta et al, 2002). Da DMIF1 eine ausgeprägte Coiled Coil- Struktur aufweist, ist ein solcher Mechanismus prinzipiell vorstellbar, ohne daß DMIF1 die Funktion eines centrosomalen Proteins hat.
- **TARGET FÜR CENTROSOMALE KINASEN.** Das Centrosom enthält eine Reihe von Kinasen, die den centrosomalen Umbau während des Zellzyklus kontrollieren (Mayor et al., 1999). Substrate dieser Kinasen sind centrosomale Proteine mit entsprechenden Phosphorylierungsstellen. Die DMIF1-Sequenz hat sowohl eine potentielle PKC-Bindestelle als auch eine potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstelle. Dennoch erscheint es wenig stichhaltig, daß DMIF1 an eine centrosomale Kinase bindet, insbesondere weil die aus der Sequenz abgeleiteten Phosphorylierungsstellen hypothetisch sind.
- **DEGRADATION IN DER CENTROSOMALEN UMGEBUNG.** Das Protein GFP-N-DMIF1 wird nach seiner Synthese im Zytoplasma nicht in die Mitochondrien transportiert, daher nicht richtig gefaltet und ist funktionsuntüchtig. Damit wird es der Degradationsmaschinerie der Proteasomen im Zytoplasma und alternativ in Aggresomen zugeführt. Ein Aggresom ist ein komplex strukturiertes Aggregat aus ungefalteten, oft ubiquitinierten Proteinen, welches sich bei einer massiven Überexpression nichtfunktioneller Proteine, deren Abbau durch die Proteasom-Maschinerie nicht mehr zu bewältigen ist, in der Centrosomenregion bildet und dort mit γ -Tubulin co-lokalisiert (Review Kopito, 2000; Johnston et al., 1998). In der Zellperipherie gebildete kleinere Proteinaggregat-Partikel werden über Mikrotubuli zu den Centrosomen transportiert, wo sie zu Aggresomen assemblieren (Garcia-Mata et al., 1999).
GFP-N-DMIF1 sammelt sich wahrscheinlich in Aggresomen an, worauf die spezifische Lokalisation in der centrosomalen Region hinweist. Warum das Protein immunologisch nicht in der Centrosomenregion nachgewiesen werden konnte, läßt sich aus einer speziellen Struktur des Aggresoms ableiten: In tierischen Zellen ist ein Aggresom nach Um-

verteilung intermediärer Filamente von einem Vimentin-Proteinkäfig umgeben, welcher dem Aggresom eine kompakte Struktur verleiht. Wenn auch in *Dictyostelium* keine Intermediärfilamente vorhanden sind, könnte eine ähnliche, aus anderen Proteinen gebildete Struktur existieren, die die Bindung von Antikörpern sterisch unterbindet.

8 Inhibitor- Homologe in *Dictyostelium* ?

In den meisten Organismen und in allen untersuchten Säugern ist bisher nur jeweils ein ATPase-Inhibitor-Protein identifiziert worden. Bei den in der Ratte neben IF1 gefundenen Sequenzen handelt es sich lediglich um Pseudogene, also keine funktionellen Gene (Samuel et al., 1995). In Hefe sind dagegen mit INH1 und STF1 zwei Inhibitoren und mit STF2 und STF3 zusätzlich zwei regulierende Faktoren bekannt, wodurch das Hefe-System als das bisher komplexeste erscheint. In Reis (Nakazono et al., 2000) und *Arabidopsis thaliana* (Bevan et al., 2000; Nakamura et al., 2000, Genbank NCBI) sind mit IF1 und IF2 Isoformen in höheren pflanzlichen Zellen beschrieben.

Anhand der Inaktivierungsexperimente und Southern-Blot-Analysen wurde bereits postuliert, daß in *Dictyostelium* mindestens zwei verwandte Inhibitorproteine existieren (Kapitel 5.1). Die mittlerweile abgeschlossene Sequenzierung des *Dictyostelium*-Genoms (www.dictrybase.org) ermöglicht es, die entsprechenden homologen Gene zu identifizieren. Zum einen läßt sich aus der Sequenzdatenbank ableiten, daß das vollständige Gen *dmif1* auf Chromosom 6 kodiert ist. Auf dem selben Chromosom an anderen Positionen finden sich zusätzlich kurze Sequenzen der regulatorischen Elemente des 5'UTR-Bereichs, der Targeting-Domäne und des Introns. Daneben liegen auf den Chromosomen 1, 2 und 3 Bereiche der inhibitorischen Region, auf den Chromosomen 2 und 5 Abschnitte der pH-sensitiven Domäne sowie der regulatorischen Elemente der 5'UTR-Region und auf dem Chromosom 3 Teile der 3'UTR-Region.

Außerdem ergab die Durchmusterung der Datenbank mit Hilfe der DMIF1-Aminosäuresequenz auf Chromosom 2 ein homologes Protein mit 99 Aminosäureresten, welches 32% identische Reste wie DMIF1 hat, und auch mit den beiden Inhibitoren aus Hefe verwandt ist (32% zu INH1 und 42% zu STF1 identisch). Der N-Terminus enthält die typischen Elemente einer mitochondrialen Targetingsequenz, also viele basische, einige hydrophobe und keine sauren Reste (Abbildung 8-1 A). Die Analyse des N-Terminus mit MITO-PROT (Claros und Vincens, 1996) zeigt die Importierbarkeit in Mitochondrien an, das Programm PSORT/GAVEL (PSORT: Nakai und Kanehisa, 1992, GAVEL: Gavel und von Heijne, 1990) identifiziert eine Prozessierungsschnittstelle nach dem Aminosäurerest S34 gemäß einem R-2-Motiv. Der inhibitorische Bereich weist die gleichen konservierten Aminosäure-

muster auf wie in DMIF1 und anderen Inhibitoren (im Beispiel INH1 aus Hefe, Abbildung 8-1 B). Die Analyse der Proteinsequenz mit der Programmgruppe PROTSCALE (Hydrophobizitätsprofil nach Kyte & Dolittle, Alpha-Helix-Bereiche nach Chou & Fasman) ergab ähnliche strukturelle Eigenschaften wie sie in DMIF1 vorkommen. Das 11 kDa-Protein hat mit pI 11 einen ähnlichen theoretischen isoelektrischen Punkt wie DMIF1.

Das Gen besteht aus einem 162 bp langen Exon, gefolgt von einem Intron mit 357 bp und einem zweiten Exon 2 mit 155 bp. Damit weist auch die chromosomale Struktur des Gens eine große Ähnlichkeit mit der Struktur von *dmif1* auf. Es wird daher vorgeschlagen, das homologe Gen als *dmif2* zu benennen.

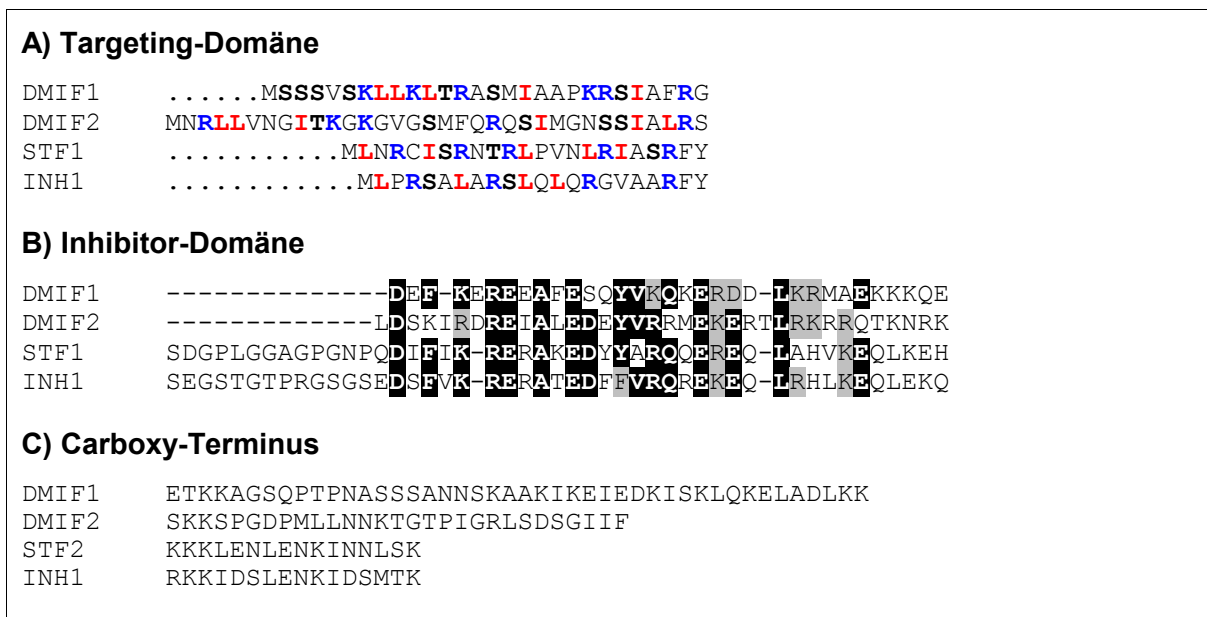


Abbildung 8-1 Sequenzvergleich von DMIF1 mit seinem Homolog DMIF2 sowie dem Hefe-Inhibitor INH1. (A) Die Targeting Domäne ist gekennzeichnet durch viele basische (Lysin und Arginin, blau), hydrophobe (Leucin und Isoleucin, rot) sowie Serin- und Threonin-Reste (schwarz, fett). **(B)** Inhibitor-Domäne: Konservierte Reste sind weiß auf schwarz dargestellt, homologe Austausche grau hinterlegt. **(C)** In der C-terminalen Region treten keine klaren Homologien zwischen allen drei Proteinen auf. Alignment mit LALIGN (adaptiert nach Huang und Miller, 1991).

Diese Ergebnisse erklären, warum in der Vielzahl Antibiotika-resistenter Klone nach Knock out-Experimenten mittels Westernblot keine Null-Mutante gefunden wurde. Bei der gezeigten Sequenzhomologie von DMIF2 zu DMIF1 ist von einer Kreuzreaktivität von anti-DMIF1-Antikörpern mit DMIF2 auszugehen. So ist es denkbar, daß durch die Knock out-Versuche das *dmif1*-Gen inaktiviert wurde, jedoch ohne daß eine phänotypische Änderung sichtbar wurde, da *dmif2* den Funktionsverlust von *dmif1* kompensieren könnte. Eine Southernblot-Analyse der Antibiotika-resistenten Klone würde Aufschluß geben, ob der Vektor in das *dmif1*-Gen integriert ist. Die Existenz mehrerer Kopien einiger *dmif1*-Sequenzbereiche und ihre Verteilung auf fast alle Chromosomen erklärt auch, weshalb im

Southernblot mit der *dmif1*-DNA-Sonde mehr Banden detektiert wurden, als für das ursprünglich angenommene single copy-Gen zu erwarten war.

9 Funktion des Inhibitors

9.1 Funktion unter Streßbedingungen und in pathologischen Prozessen

An INH1-Minus-Zellen wurde in Hefe nachgewiesen, daß die ATP-Hydrolyse nur bei Zusammenbruch des Membranpotentials erfolgt. Diese Mutantenzellen, die sich sonst in ihrem Wachstumsverhalten und ihrer Aktivität in der oxidativen Phosphorylierung von Wildtypzellen nicht unterscheiden, praktizieren bei vorhandenem Protonengradienten über einer intakten Membran ausschließlich ATP-Synthese, die erst nach Applikation von Entkopplern in die Hydrolyse umgekehrt wird (Ichikawa et al., 1990). In Wildtypzellen ist dieser Vorgang schwer meßbar, da die Hydrolyse durch den aktiven Inhibitor blockiert ist. Daß bei dieser Blockierung die Bindung von STF2 an die ATPase eine wesentliche Rolle spielt, wurde an STF2-Minus-Mutanten gezeigt, die deutlich mehr ATP hydrolysierten als Wildtyp-Zellen, da der Inhibitor weniger fest an das Enzym binden konnte (Yoshida et al., 1990). Spätere Untersuchungen an Hefe-Mutanten, bei denen alle drei ATPase-regulierenden Faktoren deletiert wurden (Tripel-Null von INH1, STF1 und STF2), bestätigten, daß der Inhibitor die Hydrolyse hemmt (Iwatsuki et al., 2000).

Das durch die Zugabe von Antimycin A, einem Blocker des Komplexes III der Atmungskette, zusammengebrochene Membranpotential wurde in den Tripel-Null-Mutanten schnell durch hohe ATP-Hydrolyse-Raten restauriert, was jedoch mit einem rapiden Verlust an mitochondrialem ATP einherging (Lu et al., 2001). Tripel-Null-Zellen mit Nährstoffmangel litten ebenfalls unter einem hohen mitochondrialen und zellulären ATP-Verlust durch die unkontrollierte Hydrolyse-Aktivität der ATPase. Aus solchen Zellen extrahierte mitochondriale DNA wies deutliche Veränderungen im Restriktionsmuster auf. IF1-überexprimierende Hefe-Zellen waren unter den ungünstigen Bedingungen des Nährstoffentzuges vor dem Absinken des ATP-Spiegels und der daraus resultierenden DNA-Veränderung deutlich besser geschützt. Es wurde auch gezeigt, daß der zelluläre IF1-Spiegel in Zellen in der stationären Phase erheblich höher ist als in der exponentiellen Wachstumsphase. Auch hier wird vermutet, daß dies günstig für den Erhalt der Respirationsfähigkeit ist und zum Schutz der DNA unter ungünstigen Kulturbedingungen beiträgt. Der Verlust an großen Mengen ATP unter so kritischen Bedingungen wie Sauerstoffmangel und Nährstoffentzug scheint für die Zelle problematischer zu sein als ein zusammengebrochenes Membranpotential. Damit hat der Inhibi-

tor die Aufgabe, die Zelle bis zur Verbesserung der Situation in einem ATP-konservierenden Zustand zu halten.

In der Human-Pathologie spielen diese Punkte eine Rolle. Die meisten Erkenntnisse über die Bedeutung von IF1 in pathologischen Prozesse hat man aus der Untersuchung von myokardialen Ischämien gewonnen, bei denen zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffversorgung ein Ungleichgewicht besteht (Green und Grover, 2000, Rouslin et al., 1995a, b; Rouslin und Broge 1993, 1994, 1996a, b). Der Inhibitor bindet anscheinend bei erniedrigten pH-Werten, wie sie bei der Ischämie auftreten, stärker an die ATPase. Außerdem ist er stärker exprimiert (Gaballo et al., 2002). Beides bewahrt die Zelle offenbar unter ischämischen Bedingungen vor zu hohen ATP-Verlusten.

Mitochondrien in Tumorgewebe weisen einen 2-3fach erhöhten IF1-Gehalt auf (Capuano et al., 1997). Man vermutet, daß die Sättigung der IF1-Bindestellen an der ATPase zur weitgehenden Unterdrückung der ATP-Hydrolyse führt und damit ATP aufgespart werden kann für bestimmte energiezehrende Prozesse. Bei der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) bei Mäusen, einem Tier-Modell für humane Rheuma-Arthritis, ist ebenfalls die Expression des IF1-Proteins erhöht (Yamada et al., 1997).

Die Luftsche Erkrankung ist eine seltene mitochondriale Myopathie, bei der der Inhibitor fehlt (Review Green und Grover, 2000). Die Krankheit ist gekennzeichnet durch einen generellen Hypermetabolismus, hervorgerufen durch die deutlich verringerte Kopplung von Oxidation und Phosphorylierung. Morphologische Veränderungen der Mitochondrien wie dichter gepackte Cristae sind offensichtlich Kompensationseffekte für die wenig effiziente ATP-Produktion. Es wird jedoch bezweifelt, daß dies direkte Effekte des Inhibitor-Mangels sind. Dazu treten gehäuft Mutationen der mitochondrialen DNA auf. Wie bereits zu Beginn des Abschnitts erläutert, wurde eine erhöhte DNA-Mutationsrate auch bei Hefezellen beobachtet, deren Gen für den Inhibitor INH1 deletiert wurde und die daher ungehindert ATP-Hydrolyse mit der Folge hoher ATP-Verluste betrieben.

9.2 Physiologische Funktion des rekombinanten Inhibitors GFP-C-DMIF1

Inwiefern GFP-C-DMIF1, das ordnungsgemäß in die Mitochondrien geleitet und dort auch prozessiert wird, physiologisch aktiv wie DMIF1 ist, kann derzeit nicht beurteilt werden. Unter der Voraussetzung, daß dem F1F0-ATPase-Inhibitor die Regulation der ATPase-Funktion zukommt, kommen drei Modelle in Betracht.

(A). GFP-C-DMIF1 IST FUNKTIONELL NICHT VON DMIF1 UNTERSCHIEDBAR. Unter normalen Bedingungen sollte ein Inhibitor-Überangebot keinen Einfluß auf das Wachstumsverhal-

ten der Zellen haben, da nicht zu erwarten ist, daß DMIF1 die ATP-Synthese reguliert. Nur im Falle von Nährstoff- oder Sauerstoffmangel oder anderen Streßbedingungen, die zur ATP-Hydrolyse führen, wirkt der Inhibitor hemmend auf die ATPase. Ein Inhibitor-Überangebot durch die Expression eines funktionellen GFP-Fusionsproteins erhöht gegebenenfalls die Effizienz dieser Hemmung. Unter Streßbedingungen sollten Inhibitor-überproduzierende Zellen besonders widerstandsfähig gegen einen bedrohlich hohen ATP-Verlust durch ungehinderte ATP-Hydrolyse sein.

(B). GFP-C-DMIF1 BINDET AN DAS ENZYM, IST SELBST ABER NICHT INHIBITORISCH AKTIV.

Wegen der räumlichen Nähe der inhibierenden Domäne zu GFP am C-Terminus ist auch diese Variante naheliegend. Damit werden freie Bindeplätze für ein endogenes Inhibitor-Molekül blockiert und die ATP-Hydrolyse würde ungehindert ablaufen, in der energetischen Auszehrung der Zelle gipfelnd.

(C). DIE BINDUNG AN DIE ATPASE UND FOLGLICH AUCH DIE INHIBITORISCHE AKTIVITÄT DES GFP-C-DMIF1-INHIBITORS SIND GESTÖRT. Wenn man von einer regulatorischen Beteiligung der Coiled Coil-Domäne an der Bindung ausgeht, kann man sich deren Beeinträchtigung durch GFP vorstellen. Abgesehen von energieverbrauchenden Degradations-Prozessen zum Abbau dieses physiologisch inaktiven Proteins würde dieses Szenario zu keiner drastischen Änderung des Energiehaushaltes führen, da der endogene Inhibitor DMIF1 allein eine potentielle ATP-Hydrolyse effektiv hemmen könnte.

GFP-C-DMIF1-Zellen zeigten verlängerte Generationszeiten in axenischer Schüttelkultur sowie im Westernblot Fragmente des Proteins, die auf einen proteolytischen Abbau in den Mitochondrien hinweisen. Die anderen untersuchten Stämme *AX2*, *AX2-GFP* und *GFP-N-DMIF1* waren bezüglich ihres Wachstums unauffällig. Der Unterschied im Wachstumsverhalten von *GFP-C-DMIF1*-Zellen läßt sich erklären wenn man annimmt, daß axenisch wachsende Zellen einem Streß ausgesetzt sind, der die ATP-Hydrolyse induziert. Als Streßfaktor kommt der hohe osmotische Wert des Nährmediums in Betracht, der einem Wert von 150mM entspricht. Hierfür gibt es aus der Analyse von Cytoskelettmutanten Hinweise (G. Gerisch, persönliche Mitteilung). Damit ist eine Wirkung nach dem Modell (B) naheliegend. Eine vergleichende Untersuchung von Wildtypzellen mit den beiden GFP-Transformanten und einem Knock out-Stamm unter diversen Streßbedingungen wäre erforderlich, um Funktion oder Einfluß der rekombinanten Proteine in Relation zum endogenen Protein zu analysieren.

MATERIAL UND METHODEN

10 Material

10.1 Biologisches Material

10.1.1 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> JM83	Vieira und Messing, 1982
<i>Escherichia coli</i> JM105	Yanisch-Perron et al., 1985
<i>Escherichia coli</i> JM109	Yanisch-Perron et al., 1985
<i>Escherichia coli</i> RY1090 ⁻ (Y1090r ⁻)	Young und Davis, 1983
<i>Escherichia coli</i> TOPO10F'OneShot™	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> B/r	
<i>Escherichia coli</i> B/2	
<i>Enterobacter (Klebsiella) aerogenes</i>	Ushiba und Magasanik, 1952 Newell et al., 1969 Williams, 1978

10.1.2 *Dictyostelium discoideum*- Stämme

AX2 (Klon 214)	Raper, 1935
	Clarke und Kayman, 1987
	Watts und Ashworth, 1970
<i>GFP-N-DMIF1</i>	diese Arbeit
<i>GFP-C-DMIF1</i>	diese Arbeit
<i>GFP-MCS</i>	Dumontier et al., 2000*
<i>GFP-AX2</i>	M.Westphal, MPI für Biochemie

* *GFP-MCS* ist eine Zell-Linie, die im genetischen Hintergrund von AX2 mit pDGFP-MCS-Neo (Dumontier, et al., 2000) transformiert wurde. Dieses Plasmid basiert auf dem Expressionsvector pDEXH (Faix et al., 1992), in den eine 700 bp lange GFP-(S65T) Sequenz aus pDGFP-MCS (Weber et al., 1999) zwischen den Actin15-Promotor und den Actin8-Terminator (vgl. Abbildung 3-1) kloniert wurde. GFP wird ohne STOP bis in den Terminator abgelesen, was etwa 30 zusätzlichen Aminosäuren stromabwärts entspricht. Diese C-terminale Aminosäuresequenz hat hohe Sequenzhomologie zu ER- lokalisierten Signalpeptidasen.

10.1.3 Myeloma-Zelllinie (Maus)

<i>PAIB₃Ag81</i>	Trembicki und Dietert, 1985
-----------------------------	-----------------------------

10.2 Vektoren, Genbanken, Oligonukleotide, DNA-Fragmente

10.2.1 Vektoren

Plasmide

pCR®-TOPO-TA	Invitrogen
pCR®-TOPO-DMIF1	diese Arbeit
pGEM-T	Promega
pIC20R, pIC20H	Marsh <i>et al.</i> , 1984
pDEXRH	Faix <i>et al.</i> , 1992
pDEXRH-GFP	Westphal <i>et al.</i> , 1997
pDEXRH-GFP-N-DMIF1	diese Arbeit
pDEXRH-GFP-C-DMIF1	diese Arbeit
pDEXCH	H. Boves, MPI für Biochemie
pDEXCH-DMIF1-G418	diese Arbeit
pBsr2	Sutoh, 1993
pSP72	Promega
pSP72-DMIF1-Bsr	diese Arbeit
pGEX5X1 (GST Gene Fusion System)	Pharmacia Biotech Inc.
pGEX-GST-DMIF1	diese Arbeit
pGEX-GST-DMIF1 Δ 3	diese Arbeit

Bacterio-Phagen

λ gt11	Young und Davis, 1983
----------------	-----------------------

10.2.2 λ gt11-cDNA-Expressionsgenbanken

hergestellt aus

poly(A) ⁺ -RNA aus AX2 (t0)	Graham <i>et al.</i> , 1988 [bereitgestellt von Dr. A. Kaplan (St. Louis University School of Medicine, St. Louis)]
poly(A) ⁺ -RNA aus AX3 (t4)	Clontech Laboratories Inc., Palo Alto CA [bereitgestellt von Dr. P. Devreotes (J. Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD)]

10.2.3 Oligonukleotide

Sequenzier- und Klonierungsprimer

SP6-promoter-primer	5' GAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA CCA
T7-promoter-primer	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA
M13fw	5' GTA AAA CGA CGG CCA G
M13rev	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC
λ fw (BamHI)	5' GCT GGA TCC ATA TGG GGA TTG GTG GCG

λ rev (PstI)	5' GTG CTG CAG ACC AAC TGG TAA TGG TAG
pgfp-11	5' CGA AAA GAG AGA CCA CAT GG
pgfp-seqend	5' TGG GAT TAC ACA TGG CAT
pgfp-69	5' GTG AAA AGT TCT TCT CCT TTA CTC AT
pgex-fw	5' GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG
pgex-rev	5' CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG
p1	5' GCT TTC AGA GGT GAT G
p2	5' CAT CAC CTC TGA AAG CAA TGG
p3	5' GAG ATC CAT TGC TTT CAG AGG TGA TG
p4 (= p3 mit BamHI)	5' GCG GGA TCC GAG ATC CAT TGC TTT CAG AGGTGATG
p5	5' GCT GAC ACT GCT GGA C
p6	5' CAG CCA ACA ATT CCA AAG CTG CC
p7	5' GGA GTT GGT TGT GAG CCA GC
p8 (= p7 mit BamHI)	5' GCG GGA TCC GGA GTT GGT TGT GAG CCA GC
p9	5' GAA TTC ATC ACC TCT GAA AGC AAT GG
p10 (Phagensequenz)	5' CCG GAA TTC CAG CTG AGC GCC GGT CGC
p12	5' GCA TTA TCA TCA GTC ATT GGA GTA TCA CC
p15 (= p5 mit BamHI)	5' GCG GGA TCC GCT GAC ACT GCT GGA C
p16 (= p6 mit BamHI)	5' GCG GGA TCC CAG CCA ACA ATT CCA AAG CTG CC

Primer für Expressionskonstrukte der GFP-Fusionsproteine:

pgfp-C1(NruI) START	5' GCG TCG CGA AAA ATG TCC AGC AGT GTC AGC AAA C
pgfp-C2(NruI) \emptyset STOP	5' GCG TCG CGA TTT TTT TTT TTA AAT CGG CAA GTT C
pgfp-N1(ClaI) START	5' GCG ATC GAT AAA ATG TCC AGC AGT GTC AGC
pgfp-N2(ClaI) STOP	5' GCG ATC GAT TTT TTA TTT TTT TAA ATC GGC AAGTTC

Primer für Expressionskonstrukte der GST-Fusionsproteine:

pgst-fw(BamHI) START	5' GCG GGA TCC AAA AA TGT CCA GCA GTG TCA GC
pgst-rev(XhoI) STOP	5' GCG CTC GAG TTA TTT TTT TAA ATC GGC AAG TTC

Primer zur Konstruktion des Knockouts:

p181-fw(ClaI)	5' GCG CAT CGA TTA CAA ACC AAA ATA ATT AAT TAA TTA ATT AAT TCA AC
p208-fw(ClaI)	5' GCG CAT CGA TTT AAT TCA ACA AAT AAA AAT AATGTC C
p567-rev(XhoI)	5' GCG CCT CGA GTA AAA ACA CAG GGA TTT TGA TTT ATT TTT TTA AAT CGG C
p71-del-rev(ClaI)	5' GCG CAT CGA TTT AAT TAT CAA AAA AAA AAA AAA AAA A
p208-fw(Bgl II)	5' GCG CAG ATC TTT AAT TCA ACA AAT AAA AAT AATGTC C
p181-fw(Bgl II)	5' GCG CAG ATC TTA CAA ACC AAA ATA ATT AAT TAA TTA ATT AAT TCA AC

10.2.4 DNA-Fragmente

F10	siehe Kapitel 2.1, Phagentotallysat: Labor-Nr. F68-7 bzw. daraus gewonnene cDNA: Labor-Nr. F68-8 als Template für PCR)
-----	--

10.3 Enzyme und Kits für die Molekularbiologie**10.3.1 Enzyme**

Alkal. Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) 1U/μl	Boehringer Mannheim
DNA-Polymerase I	Boehringer Mannheim
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Boehringer Mannheim
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Sigma
DNase I	Sigma
RNase A	QIAGEN, Sigma
T4-DNA-Ligase 1U/μl	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase („Ready To Go“)	Pharmacia Sweden
Taq-DNA-Polymerase (<i>AmpliTaq</i> ®) 5U/μl	Perkin Elmer, Eurogentec
Taq-DNA-Polymerase 5U/μl	Amersham
T4-DNA-Polymerase	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim, Amersham, New England Biolabs

10.3.2 Kits

Gel-Extraction-Kit (QIAquick)	QIAGEN
PCR-Purification-Kit (QIAquick)	QIAGEN
Plasmid-Mini-Kit (QIAprepMiniprep)	QIAGEN
QIAGEN Plasmid-Midi-Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid-Maxi-Kit	QIAGEN
TOPO-TA-Cloning-Kit	Invitrogen

Random-Primer-Labeling-Kit (Prime-It® II)
DIG-DNA-Labeling- und Detection-Kit
pGEM®-T-Vector System

Stratagene
Boehringer Mannheim
Promega

10.4 Antikörper

10.4.1 Primärantikörper

10.4.1.1 Monoklonale murine Antikörper

anti-DMIF1-Antikörper (Fusion 272)	diese Arbeit
mAk 236-173-2	M. Ecke, MPI
anti-F ₁ F ₀ ATPase β -chain (mAk 238-196-11)	A. Popp, MPI
anti-GFP-IgG (mAk 264-449-2)	U. Hacker, MPI
anti-Porin (mAk 70-100-1)	Troll et al. 1992
anti-GST (mAk 268-44-6)	C. Chlougherty, MPI
anti-Calnexin (mAk270-390-2, 270-349-1)	M. Ecke, MPI
anti-Proteindisulfidisomerase (mAK 221-135-1)	Monnat et al., 1997
anti-DSI (mAk 159-387-4)	

10.4.1.2 Polyklonale Seren

anti- α -Tubulin-IgG (pAk Kaninchen)	
anti-GFP-IgG (pAk Kaninchen)	Clontech
anti-GST (pAk Ratte)	Connex

10.4.2 Sekundärantikörper

10.4.2.1 Enzym-gekoppelte Antikörper

Ziege-anti-Maus (GAM)/ Meerrettich-Peroxidase	Biorad
Ziege-anti-Maus-IgG (GAM)/alkal. Phosphatase	Dianova
Ziege-anti-Maus-IgM (GAM)/alkal. Phosphatase	Dianova
Ziege-anti-Maus-IgM (GAM)/alkal. Phosphatase	Calbiochem

10.4.2.2 Radioaktiv markierte Antikörper

¹²⁵ I-Schaf-anti-Maus-IgG (SAM)	Amersham
--	----------

10.4.2.3 Sekundär-Antikörper – Fluoreszenz-markiert:

Ziege-anti-Maus (GAM)-IgG/TRITC	Dianova, Calbiochem
Ziege-anti-Kaninchen (GAR)-IgG/TRITC	
Ziege-anti-Maus (GAM)-IgG/CY3	
Ziege-anti-Kaninchen (GAR)-IgG/CY3	
Ziege-anti-Maus (GAM)-IgG/CY5	
Ziege-anti-Kaninchen (GAR)-IgG/CY5	

10.4.3 Ak für Ouchterlony-Test

Ziege-anti-Maus (GAM) Isotypisierungsserum	Sigma
--	-------

(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA)

10.5 Protease-Inhibitoren

Antipain-Hydrochlorid	Sigma
Benzamidin-Hydrochlorid	Sigma
Bestatin-Hydrochlorid	Sigma
Leupeptin-Hemisulfatsalz	Sigma
Pefabloc	Roth
Pepstatin A	Sigma
Trasylol (Aprotinin)	Bayer

10.6 Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Blasticidin S	Calbiochem
Kanamycin	Sigma
Geneticin (G 418)	Sigma
Penicillin/Streptomycin 10000 IU/ml	Boehringer Ingelheim

10.7 Reagenzien, Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, stammten die verwendeten Laborchemikalien von Merck und hatten den Reinheitsgrad *p.a.*.

Aceton	Riedel-de-Haën
Agar Agar	Biomatik
Agarose (Seakem GTG)	Biozym
Agarose (Seakem ME)	Biozym
Agarose, niedriger Schmelzpunkt (Typ VII)	Sigma
Alu-Gel S	Serva
AquaPhenol	Appligene
β -Mercaptoethanol	Merck, SIGMA
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Pepton	Difco
Bacto-Trypton	Difco, Oxoid
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat)-Toluidin-Salz	Roth
Benzamidinhydrochlorid	
Bradford-Testreagens	BioRad
Bromphenolblau	Merck
Caesiumchlorid	Biomol
4-Chlor-1-Naphtol	Sigma
Chloroform (Trichlormethan)	Riedel-de-Haën
cAMP	Sigma
CM-Cellulose	Whatman
Coomassie-Brilliant-Blau G 250	Serva
Coomassie-Brilliant-Blau R 250	Serva
CSPD [®] (Disodium 3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.3.1]decan}-4-yl]phenylphosphat	Boehringer Mannheim (DIG-Kit)
DABCO, 97 %	Janssen Chimica
DAPI	Sigma

DEAE-(Diethylaminoethyl)-Cellulose DE52	Whatman
di-Natrium-Pyrophosphat	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva
dNTPs	Boehringer Mannheim
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Sigma
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	Merck
EGTA (Ethylen-glycol-bis[2-amino-ethylether]- N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma
Epon 812	Electron Microscopy Science
Essigsäure	Riedel-de-Haën
Ethanol	Riedel-de-Haën
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll 400	Pharmacia
Fischgelatine	Sigma
Formaldehyd, min. 37 %	Merck
Formamid	Merck
Freund'sches Adjuvans, inkomplett	Behringwerke
Freund'sches Adjuvans, komplett	Behringwerke
Gelatine	Sigma
Gelvatol 20-30	Sigma
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin, 99,5 %	Sigma, Merck
Glycin (electrophoresis grade)	ICN
Hefeextrakt	Oxoid
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-ethansulfonsäure)	Biomol
IPTG	Loewe Biochemica
Isoamylalkohol	Merck
Isobutanol	Riedel-de-Haën
Isopropanol	Riedel-de-Haën
Maltose	Merck
MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure)	Serva
MOPS (γ -[Morpholino]propansulfonsäure)	Biomol
Methanol	Riedel-de-Haën
Mineralöl (heavy white oil)	Sigma
Natriumcitrat	Merck
NBT (4-Nitrotetrazolium-Chloridblau-Hydrat)	Sigma
N-Lauryl-Sarcosin	Sigma
Nonidet-P40(NP-40, Ethylphenylpolyethylenglycol)	Sigma, Fluka
Nukleotide	Sigma, Boehringer
NZamin A	Aldag
OctylPOE (Octyloligooxyethylen)	Bachem Biochemica
Paraformaldehyd	Merck
PEG, $M_r = 4000$ g/mol	Polysciences
Pertussis-Toxin	Schweizer Serum- und Impfinstitut
Phenol	Merck
Phenolrot	Sigma
Pikrinsäure	Merck
PIPES (1,4-Piperazindiethansulfonsäure)	Sigma, Serva
Ponceau S	Serva
Protogel (30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid)	National Diagnostics
Rapid-Hyb-Puffer	Amersham
Repel-Silan	Pharmacia, LKB
Rinderserumalbumin Fraktion V	Sigma

Saccharose (RNase frei)	BRL
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
Sephadex G-75	Pharmacia
Silicagel (Kieselgel 6-16 mesh)	Fisons Scientific Equipment
Siliconpasta	Wacker
TCA (Trichloressigsäure)	Riedel-de-Haën
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin)	Serva
Tris	ICN, Riedel-de-Haën
TRITC-Dextran	Sigma
Triton X-100 (Octylphenylpoly[ethylenglycolether])	BioRad
Trypanblau	Merck
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Polysciences

10.8 Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (10mCi/ml = 370 Mbq/ml)	Amersham
$[\gamma\text{-Na}^{125}\text{J}]\text{-IMS 30}$ (100mCi/ml)	Amersham

10.9 Standards

10.9.1 DNA-Größen-Marker

1 kb-Leiter	Gibco BRL
75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396 506/517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180 11198, 12216 bp	

<u>100 bp-Leiter</u>	Gibco BRL
100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400 1.500, 2.072 bp	

<u>DIG-DNA-Längenstandard III</u>	Boehringer Mannheim
564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 bp	

10.9.2 Protein-Größen-Marker

<u>SeeBlue™-Pre-Stained Standard (gefärbt)</u>	BioRad
Myosin	250 kDa
BSA	98
Glutamindehydrogenase	64
Alkoholdehydrogenase	50
Carboanhydrase	36
Myoglobin	30
Lysozym	16
Aprotinin	6
Insulin, β -Kette	4

<u>“Low” Protein-Standard</u>	BioRad
Phosphorylase b	92.5 kDa
Serumalbumin	66.2
Ovalbumin	45
Carboanhydrase	31
Trypsininhibitor	21.5
Lysozym	14.4
<u>Color Marker Ultralow (gefärbt)</u>	Sigma
Triosephosphatisomerase	26.6 kDa (28 kDa, orange)
Myoglobin	17 kDa (18 kDa, violett)
α -Lactalbumin	14.2 kDa (15.6 kDa, rot)
Aprotinin	6.5 kDa (7.6 kDa, blau)
Insulin β -Kette	3.496 kDa (3.55 kDa, blau)
Bradykinin	1.06 kDa (1.1 kDa, blau)
	(in Klammern apparentes MolGewicht in Tricine-Puffer-System)
<u>Ultralow Molecular Weight Peptide Marker</u>	Pharmacia
	16.9, 14.4, 10.7, 8.2, 6.2, 2.5 kDa

10.10 Medien, Puffer und andere Lösungen

Alle verwendeten Medien und Puffer werden mit deionisiertem Wasser angesetzt, das über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) gefiltert wurde. Medien und Puffer werden bei 120°C autoklaviert. Antibiotika und Enzyme werden nach dem Abkühlen zugegeben und die Platten mit einer halbautomatischen Plattengießmaschine gegossen.

10.10.1 Medien für die *D.-discoideum*-Kultur

<u>AX2-Flüssigkulturmedium, pH 6.7</u> (Watts und Ashworth, 1970)	14,3 g Pepton 7,15 g Hefeextrakt 18 g Maltose 0,616 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,486 g KH ₂ PO ₄ mit H ₂ O auf 1 l auffüllen.
<u>Soerensen-Phosphatpuffer 17mM, pH 6.0</u> (Malchow <i>et al.</i> , 1972)	2 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄
<u>Phosphatagar-Platten, pH 6.0</u>	12 g Agar Agar mit Soerensen-Puffer auf 1 l auffüllen.

SM-Agarplatten, pH 6.5

9 g Agar Agar
 10 g Pepton
 10 g Glucose
 1 g Hefeextrakt
 1 g MgSO₄ x 7 H₂O
 2,2 g KH₂PO₄
 1,3 g K₂HPO₄ x 3 H₂O
 mit H₂O auf 1 l auffüllen.

Normalagar-Platten (NA), pH 6.0

15 g Bacto-Agar
 1 g Pepton
 1 g Glucose x 1 H₂O
 mit Soerensen-Puffer
 auf 1 l auffüllen.

10.10.2 Medien für die Bakterienkultur

(Maniatis et al., 1989)

LB-Medium, pH 7.4

10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 auf 1 l mit H₂O auffüllen.

Der pH-Wert von 7,4 wird mit 1 N NaOH eingestellt. Bei Bedarf wurde mit 50 µg/ml Ampicillin supplementiert.

LB-Agarplatten, pH 7.4

1.5% (w/v) Agar-Agar
 50 µg/ml Ampicillin
 in LB-Medium

Für Blau/Weiß-Selektion von *E.coli*-Transformanten wurden pro Platte 50 µl einer 0.1 M IPTG-Lösung und 50 µl einer X-Gal-Lösung (2 % in DMF) ausplattiert.

Standard I-Nährbouillon

25 g Standard I-Nährbouillon (Merck)
 auf 1 l mit H₂O auffüllen

SOC-Medium

2% Trypton
 0,5% Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 20 mM Glucose

10.10.3 Medien für die Hybridom-ZellkulturMedium

RPMI-1640-Medium

Gibco BRL

RPMIαH-Medium

Gibco BRL

Medienzusätze

Aminopterin	Sigma
FCS (fötales Kälberserum)	Gibco BRL
L-Glutamin-Lösung, 200 mM	Gibco BRL
Hypoxanthin	Merck
Kanamycin-Lösung, 10 mg/ml	Gibco BRL
Thymidin	Sigma
Bri Clone	Bio Research Ireland

Normalmedium

1 % fötales Kälberserum
2 mM Glutamin
10 µM 2-Mercaptoethanol
0,01 % Kanamycin
in RPMI 1640

3 x HAT-Medium

300 µM Hypoxanthin
1,2 µM Aminopterin
48 µM Thymidin
in Normalmedium

HT-Medium

100 µM Hypoxanthin
16 µM Thymidin
in Normalmedium

Einfriermedium

20 % fötales Kälberserum
12 % DMSO
10 µM β-Mercaptoethanol
in RPMI 1640/L-Glutamin/HEPES

10.10.4 Puffer und andere Lösungen

Hier nicht verzeichnete Puffer und Lösungen sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

10x NCP (TBS-Tween), pH 7.4

100 mM Tris-HCl
1,5 M NaCl
0,5 % (v/v) Tween 20
0,2 % NaN₃

1x PBS, pH 7.2 / 8.0

65 mM Na₂HPO₄
35 mM KH₂PO₄
150 mM NaCl
0.1% NaN₃

1x TE-Puffer, pH 8.0

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

10x TBE (Tris/Borat/EDTA-Puffer), pH 8.3

0,9 M Tris
0,9 M Borsäure
25 mM EDTA

10x Loening-(Tris-Phosphat)-Puffer, pH 7.8

360 mM Tris/Phosphorsäure
300 mM Na₂HPO₄
10 mM EDTA

<u>20x SSC</u>	0,3 M Natriumcitrat 3 M NaCl
<u>2x KGB-Puffer, pH 7.6</u>	200 mM Kaliumglutamat 50 mM Trisacetat 20 mM Magnesiumacetat 100 µg/ml BSA 1 mM 2-Mercaptoethanol sterilfiltriert bei 4°C oder aliquotiert bei -20°C
<u>10x One-Phor-All-Puffer (Pharmacia), pH 7.5</u>	100 mM Trisacetat 100 mM Magnesiumacetat 500 mM Kaliumacetat
<u>Homogenisationspuffer, pH 8.0</u>	30 mM Tris-HCl 4 mM EGTA 2 mM EDTA 2 mM DTT 30 % (w/v) Saccharose 10 mM Benzamidin 0,5 mM Pefabloc

10.11 Verbrauchsmaterial

3MM Chromatografie-Papier	Whatman
3MM Filterpapier	Whatman
Cellophan-Folien, Dryease und Rahmen	Novex
DE81-Papier	Whatman
Deckgläschen, Ø 12 mm	Assistent
Deckgläschen, Ø 18 mm	Assistent
Deckgläschen, 5 x 5 cm	Assistent
Deckgläschen mit Raster, Ø 12 mm	Eppendorf
Dialyseschlauch	Sigma
Einfrierröhrchen, 1,8 ml	Nunc
Elektroporationsküvetten, 2 mm	Eurogentec
Faltenfilter 595 1/2, Ø 385 mm	Schleicher&Schuell
Film Fuji Neopan, 400 ASA (schwarz/weiß)	Fuji
Film Ilford Pan F, 50 ASA (schwarz/weiß)	Ilford
Filme Fujicolor, 400 ASA (farbig)	Fuji
Hamilton-Spritze	Hamilton
Kanülen, 0,9/0,8 x 40 mm, 0,6 x 30 mm	Braun Melsungen
Kulturplatten, 24 Loch, Ø 16 mm	Costar
Mikrokapillaren, Ø außen 1 mm, innen 0,58 mm	Sutter Instruments
Mikrokonzentratoren, Centrikon 10, 30, 100	Amicon
Mikrokonzentratoren, Centriprep 10, 30, 100	Amicon
Mikrokonzentratoren, Macrosep 3, 30, 50, 100	Filtron
Mikrokonzentratoren, Microsep 3, 30, 50, 100	Filtron
Mikrotiterplatten, 96 Loch	Falcon
Mikrotiterplatten, 96 Loch, F-Boden	Greiner
Nitrocellulose-Membran BA 85, 0.45µm	Schleicher&Schuell
Nitrocellulose-Rundfilter BA 85, 0.45µm, Ø82mm	Schleicher&Schuell
Nitrocellulose-Rundfilter HA, 0.45 µm, Ø47mm	Millipore

Nitrocellulose, Hybond-C	Amersham
Nylon-Membran, Hybond-N	Amersham
Nylonmembran, Biodyne A	PALL
Nylonmembran positiv geladen	Boehringer Mannheim
Nylonfilter amphoter, Ø 82 mm	Boehringer Mannheim
Parafilm	American National Can
Plastikküvetten, 1 ml	Greiner
Plastikröhrchen, 0,4 ml	Eppendorf
Plastikpipetten, 1, 5 und 10 ml	Falcon
50 ml Röhrchen, Falcon 2070	Falcon
15 ml Röhrchen, Falcon 2095	Falcon
Petrischalen, 120 x 120 x 17 mm	Greiner
Petrischalen, Ø 90 mm x 17 mm	Greiner
Petrischalen, Ø 90 mm, Höhe 17 mm	Greiner
Petrischalen, Ø 90 mm, Höhe 20 mm	Falcon
Pipettenspitzen	Gilson
Protein-A-Sepharose CL-4B	Pharmacia
Kunststoff-Zentrifugenröhrchen, 15 und 50 ml	Sarstedt
Plastikküvetten (1 und 4 ml)	Greiner
Plastikpipetten (1, 5 und 10 ml)	Falcon
Polaroidfilm Typ 667, 8,5 x 10,8 cm	Polaroid
Protein-A-Sepharose CL-4B	Pharmacia
Quick Spin® Columns	Boehringer Mannheim
Reaktionsgefäß, 0,5 ml (PCR)	AGS, Sarsted
Reaktionsgefäße, 0,4, 1,5 und 2 ml	Eppendorf
Röntgenfilm X-omat AR-5, 35 x 43 cm	Kodak
Röntgenfilm X-omat S-1, 18 x 43 cm	Kodak
Sephacryl S-300	Pharmacia
Sephadex-G-50-Säulchen	Boehringer Mannheim
Skalpellschlingen Typ 11	Bayha
Spritzen 5, 10, 50ml	Braun Melsungen
Sterilfilter Millex-HA, 0,45 µm	Millipore
Sterilfilter Millex GS, 0,22 µm	Millipore
Sterilfiltrierflaschen, 0,2 µm, 500 ml	Nalgene
Zellkulturflaschen, 5 ml	Falcon
Zellkulturflaschen, 50 ml	Greiner

10.12 Geräte und Zubehör

Zentrifugen:

Airfuge	Beckman
Ultrazentrifuge L3-50	Beckman
Sorvall RC-5B Superspeed	Du Pont
Rotanta/K; Rotanta/R	Hettich
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Biofuge 13 (15?)	Heraeus
Speed-Vac Concentrator	Bachhofer, SAVANT
Centrikon T-1065 Ultrazentrifuge	Kontron
TGA-65 Ultrazentrifuge	Kontron
Rotixa/KS	Hettich
Tischzentrifuge Universal	Hettich

Rotoren:

Airfuge-Rotor	Beckman
---------------	---------

Sorvall A6.9	Du Pont, Kontron
Sorvall A6.14	Kontron
Sorvall SS-34	Du Pont Instruments
Sorvall HB-4	Du Pont
TFT 65.13	Kontron
TFT 50.38	Kontron
A8.24	Kontron
SW41 Ti	Beckman
TST60	Kontron
TFT 45.94	Kontron
VTi50	Beckman
VTi65	Beckman
A6.9	Kontron
A6.14	Kontron
 <u>Zentrifugenröhrchen:</u>	
Airfuge-Röhrchen, 5 x 20 mm	Beckman
Kunststoff-Röhrchen, 10 und 30 ml (UZ)	Kontron
Corex-Glasröhrchen, 15 und 30 ml (Sorvall)	Du Pont
Kunststoff-Röhrchen, 30 ml (Sorvall)	Sorvall Instruments
Plastikbecher für A6.9-Rotor, 400 ml	Sorvall Instruments
 <u>Mikroskope:</u>	
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135TV (invers)	Zeiss
Makroskop M420 und M3Z	Leika
Mikroskop Axiovert 25 (invers)	Zeiss
Mikroskop Diavert (invers)	Leitz
Konfokales Mikroskop LSM 410	Zeiss
 <u>Kameras:</u>	
Fotokamera 167MT (Lichtmikroskop)	Contax
Fotokamera KR-CM	Ricoh
Fotokamera (Immunfluoreszenz)	Zeiss
Fotokamera Vario-Orthomat (Makroskop)	Leitz
Polaroid MP-4 Land Camera	Polaroid
Videokamera	Zeiss
Digitalkamera	
 <u>Sonstige Geräte:</u>	
Brutschrank	
Beschichtungseinheit SCD 020	Balzers
"Cell-cracker" mit Stahlkugeln	
Dounce-Homogenisator	Wheaton
Electrophoresis Power Supply ECPS 3000/150	Pharmacia
Elektrophoresekammern	Werkstatt MPI für Biochemie
Elektroporationsgerät Gene Pulser	Bio-Rad
Filmkassetten	Rego
Fluoreszenzspektrometer SFM 25	Kontron
Fraktionenkollektor Frac-100	Pharmacia
Fraktionenkollektor Redirac2112	LKB
Fraktionenkollektor Microcol TDC80	Gilson
Fraktionenkollektor RediFrac	Pharmacia
French Pressure Cell	American Instrument Company

Gelgießapparatur	Werkstatt
Glas-Säule mit Fritte, Ø 1,25 cm, Höhe 10 cm	BioRad
Glas-Säule mit Fritte, Ø 1,5 cm, Höhe 10 cm	Biorad
Glas-Säule mit Fritte, Ø 2,75 cm, Höhe 30 cm	BioRad
Gradientenmischer	MPI für Biochemie
Heizblock für Reaktionsgefäße	Stork-Tronik
Hybridisierungsöfen	Hybaid
Hybridisierungsröhren	Hybaid
Kultur-Schüttler	Adolf-Kühner AG
Labor-Schüttler 3015	GFL
Laborwaage	
Mixer 5432	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	Brand
Parr-Bombe	Parr Instrument Company
Peristaltische Pumpe Microperpex S 2232	LKB
Peristaltische Pumpe P-1	Pharmacia
Phosphoimager Fujix BAS 1000 und Zubehör	Fuji
Photometer PCP 6121	Eppendorf
Entwicklermaschine M35 X-omat	Kodak
Pipetten 2, 10, 20, 200 und 1000 µl	Gilson
Plattengießmaschine	TEC-NO-MAT
Quarzküvetten Infrasil	Hellma
Quarzküvetten QS	Hellma
Roll-Inkubator für <i>E. coli</i> -Kultivierung in Röhren	MPI für Biochemie
Rührer/Heizplatte Ikamag RCT	Ika
Schreiber P-40	Epson
Schreiber REC-1	Pharmacia
SemiDry-Blotkammern	Keutz
Spektralphotometer Ultrospec III mit	Pharmacia
Spektralphotometer Uvikon 820	Kontron
Sterilwerkbank	
Stromversorgungsgerät 2301 Macrodrive 1	Pharmacia
Szintillationszähler Tri-carb 4550	Packard
Trockenschrank	Heraeus
Ultraschall-Stab-Sonifier B-12	Branson
Ultraschall-Wasserbad	Branson
UV-Detektor UV-1	Pharmacia
UV-Monitor UV-1	Pharmacia
UV-Transilluminator UVT 2040 (302 nm)	Herolab
UV-Auflichtilluminator MinUVIS(254 nm, 366 nm)	Desaga
DNA-Thermal-Cycler 480	Perkin Elmer
UV-Transilluminator TF-35M (312 nm)	Bioblock
Verstärkerfolien Quanta III-T	Du Pont
Videorecorder AG6720	Panasonic
Video-Scanner Elscript 400	Hirschmann
Vortex-Mixer	Cenco
Wasserbäder	Köttermann

11 Methoden der Zell-Kultivierung

11.1 *Dictyostelium discoideum*

11.1.1 Anzucht in axenischem Medium

Der Laborstamm AX2 kann im Gegensatz zum Wildtyp (Freilandisolat NC4) in axenischem Medium aus tiefgefrorenen Sporen (bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert), durch Überimpfen der Zellen von SM-Platten (mit *K. aerogenes*) oder eines kleinen Volumens einer Vorkultur kultiviert werden. Die Animpfdichte sollte nicht kleiner als 10^4 Zellen oder Sporen pro ml sein. Bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 Upm im Kulturschüttler und einer Temperatur von 23°C beträgt die Generationszeit etwa 8 h; der Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase erfolgt bei einer Zelldichte von 4 bis $6 \cdot 10^6$ Zellen pro ml. Eine Vorkultur dieser Zelldichte ist bei 4°C unter Schütteln (100 Upm) 1-2 Wochen haltbar. Nach Überschreiten dieser Dichte bei RT setzt die Entwicklung zu aggregationskompetenten Zellen ein (1.1, 11.1.4, 11.1.5). Die Zelldichten der Suspensionskulturen werden mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Bei einer Dichte über $2 \cdot 10^6$ werden die Zellen zum Zählen verdünnt.

Die Kultur in axenischem Medium kann außerdem in Petrischalen oder 24-Loch-Kulturplatten (Costarplatten) erfolgen, wodurch die Zellen die Möglichkeit der Anheftung an die Kunststoffoberfläche des Gefäßbodens haben. Beim Animpfen von auf einem Bakterienrasen gewachsenen Kolonien wird dem Medium 1 % Penicillin/Streptomycinlösung zugesetzt.

11.1.2 Wachstum in Bakteriensuspensionskultur

Der Bakterienstamm *E.coli*- B/2 wird in 2l luftdurchperlter Standard I- Nährbouillon über Nacht herangezogen und bei einer Dichte von maximal $5 \cdot 10^9$ Zellen pro ml geerntet, zweimal mit eiskaltem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und mit diesem Puffer auf eine Dichte von 10^{10} Zellen pro ml eingestellt. Die Suspension kann unter Schütteln bei 4°C ca 2 Wochen aufbewahrt werden. Die Dichtebestimmung erfolgt photometrisch durch Ermittlung der Absorption bei 600nm und Vergleich mit einer Eichgeraden. Diese Bakteriensuspension wird dann mit 10^4 bis 10^5 *D.-discoideum*-Zellen pro ml beimpft und bei 23°C und 150 Upm geschüttelt. Die Generationszeit von AX2 beträgt in einer Suspension von *E.coli*- B/2 etwa 3,5 h.

11.1.3 Anzucht auf Agarplatten

Zur Beurteilung der Koloniemorphologie und der Wachstumsgeschwindigkeit werden *D.-discoideum*-Zellen auf Normal-Agarplatten mit dem Bakterienstamm *E.coli*- B/r kultiviert. Transformanten werden zum Klonieren gemeinsam mit *K. aerogenes* auf SM-Agarplatten ausgespatelt und ebenso bei 23°C vermehrt, bis nach ca 48 Stunden einzelne Kolonien als klare Stellen im Bakterienrasen ("clearing plates") sichtbar werden (genaues Protokoll siehe Kapitel 12.7.3 Klonieren von Transformanten). Nach einem weiteren Tag werden Fruchtkörper gebildet. Die Generationszeit beträgt unter diesen Bedingungen 3 bis 4 h. Alternativ können Zellen aus *D.-discoideum*-Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf ausgespatelte Bakterien gepickt werden, z. B. zum Anfertigen von Musterplatten für Kolonie-Blotting.

11.1.4 Entwicklung in Suspension

In Flüssigmedium gewachsene *D.-discoideum*-Zellen werden nach Erreichen einer Dichte von 2 bis $4 \cdot 10^6$ Zellen pro ml durch Zentrifugation (4°C, 5 min, 1000 Upm, Hettich-Zentrifuge) geerntet und zweimal mit eiskaltem Soerensen-Phosphatpuffer, pH 6.0 gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift werden die Zellen zu einer Dichte von 10^7 /ml in Phosphatpuffer resuspendiert (Zeitpunkt t_0) und bei 23°C mit 150 Upm geschüttelt. Zeitpunkte der Entwicklung bezeichnet man mit t_n (n = Zeit in Stunden seit t_0). In geschüttelten Kulturen erreichen die Zellen Aggregationskompetenz, d.h. sie bilden stabile Zell-Zell-Kontakte aus. Eine Weiterentwicklung zu den Stadien wie in 1.1 beschrieben findet jedoch nicht statt. Um Sporen zu gewinnen, müssen die Amöben auf festen Unterlagen wie Phosphat-Agarplatten kultiviert werden.

11.1.5 Sporengewinnung und Konservierung

Axenisch gewachsene, zweimal mit eiskaltem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschene *D.-discoideum*-Zellen werden in einer Dichte von $2 \cdot 10^7$ /ml in Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert und je 5 ml dieser Suspension auf eine Phosphatagarplatte pipettiert ($=10^8$ Zellen). Man läßt die Zellen 20 min absitzen, gießt den überstehenden Phosphatpuffer vorsichtig ab und läßt die Platten 30 min im sterilen Luftstrom trocknen. Nach 2 bis 3tägiger Inkubation bei 23°C werden die gebildeten Sporenköpfchen in den Deckel der Petrischale geklopft, in 3 bis 5 ml eiskaltem Phosphatpuffer aufgenommen und die Sporen gezählt. Die Suspension wird auf 10^7 Sporen pro ml eingestellt, in 1-ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C oder flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Vegetative Zellen (2 bis $4 \cdot 10^6$ Zellen pro ml) können in eiskaltem AX-Medium, daß 5% DMSO und bei Bedarf 1% Penicillin/Streptomycin enthält, eingefroren werden. Dazu werden die Zellen in 1ml- Aliquots 3 h in

Einfrierköpfen über flüssigem Stickstoff gekühlt (Temperaturerniedrigung um 1°C pro Minute) und schließlich in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

11.2 Bakterien

11.2.1 Anzucht in Flüssigmedium

Werden Bakterien in Rollerkulturen vermehrt, wird LB- oder SOC- Medium in Reagenzgläsern, bei Bedarf supplementiert mit selektionierenden Antibiotika (Ampicillin: 50µg/ml), mit sterilen Zahnstochern von einer Agarplatte oder aus einer eingefrorenen Glycerin-Kultur beimpft und bei 37°C im Rollschüttler mindestens 12 Stunden inkubiert. Schüttelkulturen werden nach Beimpfen auf dem Schnellschüttler mit mindestens 250 Upm inkubiert.

11.2.2 Anzucht auf Agarplatten

Bakterien können auf SM- (*K. aerogenes*) oder NA-Agarplatten (*E.coli*- B/r) vermehrt werden. Durch Einstechen einer ausgeglühten Impföse in die noch tiefgefrorenen Zellen wird diese mit Bakterien benetzt, die sofort in Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert werden. Diese Suspension kann mit einem sterilen Glasspatel auf Agarplatten verteilt werden. Die Inkubation erfolgt mindestens 12 Stunden bei 37°C mit Deckel nach unten. Die spezielle Kultivierung der Bakterien für die Phagenbank ist im Kapitel 12.1 beschrieben.

12 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, sind die hier verwendeten Methoden aus „Molecular Cloning - A Laboratory Manual“ (Maniatis *et al.*, 1989) entnommen. Für alle molekularbiologischen Arbeiten wurde bidestilliertes, millipore-filtriertes und anschließend autoklaviertes H₂O verwendet.

12.1 cDNA-Bank Screening

An Expressions-Genbanken von *Dictyostelium* können sowohl durch Immunoscreening mit monoklonalen Antikörpern (Young und Davis, 1983a und 1985) als auch Screening mit Digoxigenin- (Boehringer) und radioaktiv markierten DNA-Sonden (Benton und Davis, 1977) Phagenklone für interessierende Gene in vegetativen (t_0) und in sich entwickelnden (t_4) Zellen isoliert werden. Die beschriebene Prozedur wird zwei- bis dreimal bis zur Isolierung von sauberen Einzelklonen wiederholt.

12.1.1 λ gt11 Bank, Puffer und Lösungen

λ gt11 cDNA-Bank AX2 t ₀	5.8·10 ¹⁰ pfu/ml (plaque forming unit)
λ gt11 cDNA-Bank AX3 t ₄ NZYM-Medium, pH 7.4	5·10 ⁹ pfu/ml 10 g Nzamin A 5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 2 g MgSO ₄ ·7 H ₂ O 800 ml H ₂ O pH mit NaOH einstellen auf 1l mit Wasser auffüllen
NZYM-Agarplatten, pH 7.4	0.9 % (w/v) Agar-Agar NZYM-Medium autoklavieren 50 µg/ml Ampicillin Petrischalen, 120 x 120 x 17 mm
Top-Agarose, pH 7.4	0.7% (w/v) Agarose In NZYM-Medium
SM-Puffer, pH 7.4	5g NaCl 2g MgSO ₄ ·7 H ₂ O 50 ml 1M Tris-HCl 5 ml 2% Gelatine mit H ₂ O auf 1 l auffüllen autoklavieren
Denaturierungslösung	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl
Neutralisierungslösung 1, pH 7.5 (für radioaktive Markierung von Plaque lifts und Southern mit DIG)	0.5 M Tris-HCl 3 M NaCl
Neutralisierungslösung 2, pH 7.5 (für DIG-Markierung von Plaque lifts)	1 M Tris-HCl 1.5 M NaCl
Äquilibrierungslösung (20x SSC), pH 7.0	0.3 M Na-Citrat 3 M NaCl

12.1.2 Vorbereitung der Bakterien

100 ml NZYM-Medium mit 40 µg/ml Ampicillin und 0.4% (v/v) Maltose (Stocklösung 20%) werden mit 10 µl einer konservierten Glycerin-Stammkultur von *E.coli*- RY1090⁻ beimpft und über Nacht unter Schütteln mit 270 Upm bei 37°C bis zur OD₆₀₀ = 2 vermehrt. Für eine schnellere Anzucht können auch 1 ml Bakterien in 100 ml Medium 3 bis 4 Stunden bei 37°C kultiviert werden. Die Zellen werden 10 min bei 4°C mit 4000 Upm (Hettich-Zentrifuge) sedimentiert und in 25 ml kaltem sterilen 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Die Bakterien sind

ca. 2 Wochen bei 4°C haltbar. Weitere Kulturen können aus zuvor angelegten Agarplatten gezogen werden, die ca. 4 Wochen bei Lagerung im Kühlschrank verwendbar sind. Dazu werden MgSO₄-freie LB-Platten (50 µg/ml Ampicillin) mit 5 µl der Bakterien-Stock-Kultur beimpft und bei 37°C über Nacht vermehrt. Von diesen Arbeits-Platten werden einzelne Kolonien in Schüttelkulturen überimpft und wie oben beschrieben verarbeitet.

12.1.3 Ausplattieren der Phagen und Bakterien

Für eine Platte werden 300 µl *E.coli*- RY1090 mit 3 µl Phagen der Originalgenbank (t_0 -, t_4 -Bank) einer geeigneten Verdünnung in SM- Puffer (Endkonzentration der Verdünnung 10^4 pfu/µl = 1:500 t_4 -Bank, 1:5800 t_0 -Bank) gemischt und durch 30 min Inkubieren bei RT infiziert. Dabei nutzen die Phagen die durch Magnesium stabilisierten Maltoserezeptoren der Bakterien als Andockstellen. Die Topagarose wird in der Mikrowelle aufgeköcht und in sterilen Reagenzgläsern zu 9 ml-Aliquots im Wasserbad auf maximal 52°C gehalten. Die Bakterien mit den anhaftenden Phagen (die Suspension enthält $3 \cdot 10^4$ pfu) werden in der Topagarose verdünnt, durch kurzes Vortexen gut gemischt und sofort auf die im sterilen Luftstrom getrockneten und auf 42°C vorgewärmten NZYM-Agarplatten verteilt. Nach einer Erstarungszeit von 15 min werden die Platten bei 42°C 3 bis 5 h bis zum Erscheinen der klaren Plaques im Bakterienrasen inkubiert. Ein temperatursensitiver Repressor der Genexpression in λ gt11 sorgt für den lytischen Verlauf durch seine eigene Inaktivierung bei 42°C. Für das Immunoscreening sollten die Plaques sehr dicht sein, sich aber weitgehend nicht berühren, während für die Hybridisierung mit einer DNA-Sonde die Bakterien nahezu vollständig lysiert werden können, da diese Detektionsmethode erheblich feiner ist.

12.1.4 „Plaque lifts“ für das „Immunoscreening“

Zur Identifizierung von Phagen, die das gesuchte Gen oder dessen Fragmente enthalten, wird die Expression des jeweiligen Genproduktes als *lacZ*-Fusionsprotein durch Anschalten des *lac*-Promoters durch IPTG induziert. Dazu werden mit 10 mM IPTG getränkte und gut getrocknete Nitrocellulosefilter luftblasenfrei auf die Agarplatten aufgelegt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die niedrigere Temperatur zwingt die Phagen durch den aktiven Zustand des Repressors in den lysogenen Verlauf der Infektion und nur die unter Kontrolle des *lacZ*-Promoters stehenden „Phagen-Proteine“ werden durch die Bakterien zusätzlich produziert. Die Filter werden auf den Platten markiert und nach Abziehen von der Oberfläche dreimal je 10 min in 1x NCP-Puffer gewaschen. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgt immunologisch analog zum Westernblot (siehe Kapitel 13.2.4).

12.1.5 „Plaque lifts“ für die Detektion mit DNA-Sonden

Das interessierende Gen oder Genfragment kann auch auf der Ebene seiner DNA-Sequenz durch Hybridisieren mit markierten DNA-Sonden in Phagen identifiziert werden. Die Agarplatten, die die klaren Plaques aus lysierten Bakterien enthalten werden bei 4°C 30 min vorgekühlt und getrocknet. Anschließend werden die Plaques durch 1- minütiges Auflegen von Nylon- oder Nitrocellulose-Membranen (amphotere oder ungeladene Oberfläche) auf diese abgeklatscht.

Zur Detektion mittels radioaktiv markierter DNA-Sonden werden die Filter, nach Markierung ihrer Lage, prozessiert, d.h. 5 min denaturiert, 15 min neutralisiert und 10 min in 2x SSC äquilibriert. Die luftgetrockneten Filter werden zur Immobilisierung der DNA 30 min bei 80°C (15 min, 120°C) gebacken. Markierung der Sonden, Hybridisierung und Detektion erfolgen wie unter 12.4.1 beschrieben.

Plaque lifts, die zur Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden bestimmt sind, werden nach kurzem Trocknen auf Whatmanfilterpapier auf, mit entsprechenden Puffern getränkten, Lagen von Filterpapier 15 min denaturiert, 15 min neutralisiert und mindestens 10 min äquilibriert. Nach vollständiger Trocknung der Nylon-Membranen (für DIG-Detektion kann keine Nitrocellulose verwendet werden) wird die DNA durch 30 min Backen bei 80°C oder 5 min UV-Bestrahlung an das Trägermaterial gebunden und mit sich selbst vernetzt. Das DIG-Verfahren ist in 12.4.2 beschrieben.

In beiden Fällen werden die Phagenplatten bis zur Detektion der Filter lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

12.1.6 Isolierung von positiven λ gt11-cDNA-Klonen

Positive Klone werden beim ersten Screening durch Ausstechen des sie enthaltenden und umgebenden Agars mit dem hinteren Ende, bei weiteren Aufreinigungsschritten mit dem spitzen Ende steriler Pasteurpipetten isoliert und in Eppendorfreaktionsgefäße (1.5 ml) mit 1 ml SM-Puffer/ 10 μ l Chloroform überführt. Die Phagen diffundieren bei 4°C innerhalb von 12 bis 24 Stunden in die flüssige Phase. Chloroform tötet die Bakterien ab, ohne die Phagen zu beeinträchtigen.

Zum Anreichern und Säubern der Klone wird die Lösung, die die Phagen enthält mit SM-Puffer 1:100 verdünnt und 100 μ l RY1090 mit 1.5 μ l dieser Verdünnung infiziert (weitere Prozedur siehe 12.1.3 bis 12.1.5, aber auf Petrischalen \varnothing 90 mm, Nitrocellulose-Rundfilter \varnothing 82 mm oder Nylonmembran \varnothing 82 mm). Das Picken und Vermehren der Phagen erfolgt solange, bis die Phagen „sauber“ sind, d.h. bis keine negativen Plaques mehr auf der Platte zu finden sind. Nach diesem Prozeß entspricht ein Plaque einem Klon, der einzeln isoliert wird.

12.1.7 Amplifizierung reiner Phagenklone, Herstellung von Totallysaten

Von einem einzelnen Klon in SM-Puffer werden 30 µl zur Infektion von 300 µl Bakterien entnommen und auf einer großen Platte bis zur vollständigen Lyse vermehrt. Zur Gewinnung der Phagen durch Diffusion werden 20 ml SM-Puffer auf die Agarplatte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Lösung wird in Falcon-Röhrchen 10 min bei 4000 Upm (Hettich-Zentrifuge) zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert und nach Entnahme eines Aliquots von 1 ml unter Zusatz von 10 µl Chloroform/ml im Kühlschrank gelagert. Dieses Totallysat ist eines der Ausgangsmaterialien für die PCR zur Amplifizierung und Sequenzierung der enthaltenen cDNA.

12.1.8 Bestimmung des Titers der Phagenbank

Vor Verwendung der cDNA-Bank muß der Titer der Bank festgestellt werden, um statistisch jeden Klon der Bank mindestens einmal zu testen, ohne die Bank zu dicht auszubringen. Die Prozedur ist weitgehend die gleiche wie für das Screening beschrieben, es werden aber verschiedene Verdünnungen getestet und die entstehenden Plaques in Einheiten von pfu (plaque forming units) ausgezählt. Die ideale Dichte beim Ausbringen der vorliegenden Banken auf Agarplatten liegt bei 200 pfu /cm².

12.2 Präparation von DNA und RNA

Für die meisten DNA- und RNA-Präparationen werden gekaufte Puffer aus dem QIAGEN-Sortiment verwendet. Zusätzliche oder andere Lösungen sind bei den jeweiligen Verfahren aufgeführt.

12.2.1 Allgemeine Puffer aus QIAGEN Kits

aus „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (für Plasmid DNA Minipräparation)

P1 (Resuspensionspuffer), pH 8.0	50 mM TRIS-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A nach Zugabe von RNase A bei 4°C
P2 (Lysispuffer)	200 mM NaOH 1% SDS
N3 (Neutralisierungspuffer)	enthält chaotropes Salz
PB	enthält chaotropes Salz
PE	
EB (Elutionspuffer), pH 8.5	10 mM TRIS-HCl

aus "QIAquick Gel Extraction Kit" (zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen)
PE und EB wie oben

QX1 (9/95-1/97), QG (ab 7/97) chaotropes Salz

aus „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ (für Plasmid DNA Maxipräparation)
P1, P2 und EB wie oben

P3 (Neutralisierungspuffer), pH 5.5 3 M K-Acetat

QBT, pH 7.0 750 mM NaCl
50 mM MOPS
15% Ethanol

QC, pH 7.0 1 M NaCl
50 mM MOPS
15% Ethanol

QF, pH 8.2 1.25 M NaCl
50 mM MOPS
15% Ethanol

12.2.2 Präparation von Phagen-DNA

L1, pH 7.5 10 mM EDTA
100 mM TRIS-HCl
300 mM NaCl
autoklavieren, kurz vor Gebrauch dazu:
20 mg/ml RNase A
6 mg/ml DNase I
0.2 mg/ml BSA

L2 30% PEG (6000)
3 M NaCl

L3, pH 7.5 25 mM EDTA
100 mM TRIS-HCl
100 mM NaCl

L4 4% SDS

L5, pH 4.8 2.55 M K-Acetat

Puffer L1 bis L5 autoklavieren

Eine sicherere Methode als die Aufbewahrung von Totallysaten ist die Konservierung aufgereinigter Phagen-DNA. Die Isolierung von DNA aus λ -Phagen erfolgt nach der QIAGEN-Methode und beruht auf der Fällung mit PEG 6000 aus einem Flüssiglysat (Maniatis *et al* 1989). Dazu werden 7 bis 20 ml RY1090 mit 20 μ l des Totallysates 30 min bei RT infiziert, in 300 ml auf 37°C vorgewärmtes NZYM-Medium überführt und unter Schütteln mit 270 Upm

40 min inkubiert. Die Lyse wird bei 42°C induziert und ca. 3 h bis zum Auftreten von Flocken lysierter Zellen durchgeführt. Die Suspension wird 10 min mit 5000 Upm in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand in ein sauberes Zentrifugen-Röhrchen gefüllt und auf 37 °C vorgewärmt. Nach Addition von 550 µl L1 (die enthaltenen Enzyme RNase und DNAse dienen dem Verdau der Wirts-DNA) wird der Ansatz im Wasserbad 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 1/5 Vol (70 ml) eiskaltem L2 versetzt und 1 h auf Eis oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Das PEG-Präzipitat, das intakte Phagen enthält, wird durch 10 min Zentrifugieren bei 4°C mit 10000 x g in der Sorvall-Zentrifuge vom Überstand getrennt, in 10 ml L3-Puffer unter gründlichem Abspülen der Wände des Zentrifugenröhrchens resuspendiert und in ein kleineres Röhrchen überführt. Es werden 10 ml L4 (SDS lysiert Phagen) dazupipettiert und alles bei 70°C für 20 min unter gelegentlichem vorsichtigem Schwenken inkubiert. Nach 15 min Abkühlen auf Eis werden 10 ml L5 zugefügt und 30-60 min bei 4°C mit 15000 x g in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand enthält die Phagen-DNA, die unter Verwendung der QIAGEN-Puffer und -Säulen isoliert wird: Auf eine mit 30 ml QBT äquilibrierte DEAE-Anionenaustauscher-Säule (QIAGEN-tip 500) wird die Lösung aufgetragen, 2mal mit je 30 ml QC gewaschen und mit 15 ml QF in Corex-Röhrchen (Glas) eluiert. Die DNA wird mit 0.7 Vol. Isopropanol bei RT präzipitiert, 30 min bei 4°C mit 10000 x g in der Sorvall-Zentrifuge vom Überstand getrennt und mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird nach 30 min Trocknen an Luft in 300 µl 10 mM TRIS oder TE (beide pH 8.0) über Nacht bei 4°C gelöst und bei -20°C gelagert. Die Konzentration und Reinheit der DNA-Lösung wird photometrisch durch Bestimmung der Absorbtion (siehe 12.2.6) ermittelt.

12.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* nach der QIAGEN Methode

Die Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA (bis 20µg dsDNA) aus *E.coli* erfolgt nach dem „QIAprep Spin Miniprep Kit Protokoll“ und basiert auf dem alkalischen Aufschlußverfahren (Birnboim und Doly, 1979; Birnboim, 1983) und der Adsorbtion von DNA an Silica-Gel in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie, 1979). Diese Methode wurde regelmäßig zur schnellen Überprüfung des Klonierungserfolges nach Transformation eines Ligationsansatzes verwendet und eignet sich für eine große Anzahl paralleler Ansätze. Größere Mengen Plasmid-DNA (bis zu 500µg) werden mit Hilfe des “Plasmid-Maxi-Kits” von QIAGEN isoliert. Die Lyse der Bakterien und die Abtrennung der Proteine erfolgt im Wesentlichen nach dem Protokoll für die “Mini“-Präparation. Die Präparation wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt (QIAGEN Plasmid-Kit-Protokoll, 1997).

12.2.3.1 „Mini-Präparation“

Bakterien werden von Einzelkolonien auf Agarplatten mittels Zahnstocher in 3 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) überimpft und in einem Roller-Schüttler mindestens 12 h bei 37°C vermehrt. In einem Eppendorfreaktionsgefäß werden die Zellen aus 1.5 ml dieser Kultur in der Eppendorf-Tischzentrifuge mit 10.000 x g sedimentiert und in 250 µl P1 resuspendiert. Nach Lyse der Bakterien durch die Einwirkung von P2 unter Schwenken des Gefäßes (250 µl P2, 4 bis 5 min bei RT) wird die Aufschlußreaktion durch Hinzufügen von 350 µl N3 gestoppt und durch den hohen Salzgehalt die optimalen Bedingungen für eine effektive Bindung der Plasmid-DNA an das Säulenmaterial eingestellt. Während die Plasmid-DNA renaturiert wird, führt die hohe Salzkonzentration von N3 zusätzlich zur Sedimentation denaturierter Proteine, chromosomaler DNA, Zelltrümmer und SDS. Diese Bestandteile werden beim Zentrifugieren der Suspension in der Tischzentrifuge (10.000 x g, 10 min) abgetrennt. Der klare Überstand wird auf eine Silica-Gel-Säule (QIAprep Spin Column), die spezifisch DNA bindet, appliziert und alle anderen Bestandteile (Salze, Lösungsmittel, RNA, zelluläre Proteinreste) werden jeweils durch kurze Zentrifugationsschritte zwischen den Waschschritten (PB-, PE-Puffer) entfernt. Endonucleasen, die DNA degradieren können und in Bakterienstämmen der JM-Serie enthalten sind, werden effizient durch einen einzigen Waschschriff mit 500 µl PB beseitigt. Vor der Elution der DNA mit 50 µl Wasser oder dem Niedrigsalzpuffer EB werden die großen Salzengen durch Applikation von 750 µl PE und Zentrifugation der Säule bis zur Trockne ausgespült.

12.2.3.2 „Maxi-Präparation“

Aus 100 ml ("high copy"-Plasmide) bzw. 500 ml ("low copy"-Plasmide) Kulturvolumen werden die Bakterien durch 15 min Zentrifugieren bei 6.000 x g in der Hettich-Zentrifuge pelletiert. Das Sediment wird in 10 ml P1 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 10 ml P2 und 5 min Inkubation bei RT lysiert. Die Proteine, Zellbruchstücke, genomische DNA und SDS werden durch weitere Zugabe von 10 ml eiskalter Lösung P3 und 20 min Inkubation auf Eis gefällt. Das Präzipitat wird beim Zentrifugieren (30 min, 4°C, 20.000 x g =13.000 Upm im Sorvall SS34 Rotor) aus der Lösung entfernt und der Überstand durch einen Faltenfilter auf eine mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Silica-Gel-Säule (QIAGEN tip 500) geladen. Die Säule wird zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen und die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert, mit 0,7 Vol. Isopropanol (RT) gefällt und 30 min bei 15.000 x g, 4°C (Sorvall-Zentrifuge, SS34-Rotor) pelletiert. Das Pellet wird mit Ethanol (70 %, RT) gewaschen, getrocknet (speed vac concentrator), in 200 bis 400 µl EB aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über OD-Messung (siehe 12.2.6).

12.2.4 Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

Dictyostelium- Zellen besitzen einen hohen Gehalt an Kohlenhydraten und RNA, so daß chromosomale DNA aus angereicherten Zellkernen isoliert wird (Noegel *et al.*, 1985).

12.2.4.1 Puffer und Lösungen

<u>NP40-Lysispuffer, pH 7.5</u>	30 mM HEPES 10 mM Mg-Acetat 10 mM NaCl 10 % Saccharose 2 % NP40
<u>EDTA-Sarcosyl-Lösung, pH 8.4</u>	200 mM EDTA 2% Na-Lauryl-Sarcosinat
<u>TE-Puffer, pH 8.0</u>	10 mM TRIS-HCl 1 mM EDTA
<u>SDS-Lysispuffer</u>	0,7 % SDS in TE-Puffer
<u>Proteinase-K-Lösung</u>	25 mg/ml in H ₂ O. zur Aktivierung vor Gebrauch 30 min bei 37°C inkubieren

12.2.4.2 Gewinnung reiner Kerne

Axenisch kultivierte Zellen (siehe 11.1.1) werden geerntet ($5 \cdot 10^8$ bis $5 \cdot 10^9$ Zellen), zweimal in eiskaltem, bidestilliertem Wasser gewaschen und in einem geeigneten Volumen (10 bis 100 ml) eiskaltem NP40-Lysispuffer resuspendiert ($\rightarrow 5 \cdot 10^7$ Zellen/ml). Im Gegensatz zu den Zellen lysieren die Zellkerne unter diesen Bedingungen nicht und die Vollständigkeit der Zell-Lyse wird nach 5-10 min im Lichtmikroskop überprüft. Die Kerne werden in Corex-Röhrchen 10 min bei 4°C mit 6.000 x g (8.000 Upm im SS34- oder HB4-Rotor) abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgezogen.

12.2.4.3 Kern-Lyse

A: Das Kernpellet wird in 1 ml NP40-Lysispuffer aufgenommen. Diese Suspension wird tropfenweise zu 6 ml einer 60°C warmen EDTA-Sarcosyl-Lösung gegeben, auf 8 ml aufgefüllt und mindestens 1 h bei 60°C inkubiert.

B: Das Kernpellet wird in 6 ml SDS-Lysispuffer resuspendiert, mit 60 µl Proteinase-K-Lösung supplementiert, 1 bis 3 h bei 60°C lysiert und mit TE auf 12 ml aufgefüllt.

12.2.4.4 Extraktion und Aufreinigung der DNA mit Phenol/Chloroform

Proteine und Membranbestandteile werden durch vorsichtiges Ausschütteln mit 1Vol. Phenol-TE (Phenol äquilibriert mit TE, pH 8.0) extrahiert und die Phasen durch Zentrifugation bei RT 1 bis 5 min mit 14.000xg getrennt. Die obere wäßrige Phase wird entnommen und mit gleichem Volumen Phenol-TE/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die organische und Interphase der ersten Extraktion werden mit TE reextrahiert und die resultierenden wäßrige Phasen vereinigt. Die Entfernung von Phenolresten aus der wäßrigen Phase kann durch Nachextraktion mit Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) erreicht werden. Durch Zugabe von 1/10 Vol. 2 M NaAcetat-Lösung, pH 5.2, Überschichten der wäßrigen Phase mit 2 Vol. Ethanol (100%, eiskalt) und Inkubation über Nacht auf Eis erfolgt die Präzipitation der DNA an der Grenzschicht zwischen Wasser- und Alkoholphase. Sie kann mit einem Glashaaken ausgedreht oder abzentrifugiert (20 min, 10.000 Upm, SS34, 4°C) werden. Die DNA wird mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 200 bis 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Genomische DNA wird bei 4°C gelagert und darf aus Gründen der Degradation durch Scherkräfte nicht eingefroren werden.

12.2.4.5 Aufreinigung über Gradienten-Zentrifugation mit Cäsiumchlorid

Die aufgereinigten und lysierten Kerne (aus der Präparation A) werden mit CsCl zu einer Endkonzentration 0.9 g/ml (hier 7.56 g) und Ethidiumbromid zur Endkonzentration 10mg/ml (hier 400 µl) versetzt und verteilt auf Plastik-Zentrifugenröhrchen (Quickseals) 10 bis 18 h bei 15°C in einem Vertikalrotor (VT165) mit 50.000 Upm zur Bildung des Cäsiumchlorid-Gradienten zentrifugiert. Die durch Ethidiumbromidfärbung sichtbare DNA-Bande wird nach Aufschneiden der Verschlussklappe durch seitliches Anstechen des Zentrifugenröhrchens mit einer Einmalspritze (Kanüle Ø 0.9 mm) isoliert, das Ethidiumbromid durch Isopropanol-Extraktion (mit gesättigter NaCl-Lösung äquilibriert) aus der Lösung entfernt und die saubere DNA mit 2 Vol. H₂O versetzt. Aus dieser Lösung kann die DNA mit 2 Vol. Ethanol gefällt und mit einem Glashäkchen ausgedreht werden. Es folgen Reinigung mit 70% Ethanol, Entwässerung (Ethanol absolut), Lufttrocknung und Lösung der DNA in TE-Puffer über Nacht. Lagerung bei 4°C.

12.2.5 Fragmentisolierung aus DNA-Gelen nach dem QIAGEN-Verfahren

DNA-Fragmente können nach Auftrennung im Agarose-Gel (12.3.1) nach dem QIAGEN Protokoll (QIAquick Spin Handbook/ Gel Extraction Kit Protokoll) isoliert werden. Das die interessierende Bande enthaltende Agarosestück wird mit einer sterilen Skalpellklinge aus dem Gel herausgeschnitten und in einem Eppendorfröhrchen mit drei Volumenteilen QX1-Puffer 10 min bei 50°C aufgelöst (das Volumen der Gelscheibe bestimmt man unter

der Annahme einer Dichte von 1 g/l durch Abwiegen). Der Puffer QX1 enthält ein chaotropes Reagens (NaI oder NaClO₄), das die Bindung der DNA an Silica-Gel-Oberflächen durch Modifizierung der Struktur von Wasser optimiert (Vogelstein und Gillespie, 1979; Hamaguchi und Geiduscheck, 1962). Nach Addition von 1 Gelvolumen Isopropanol wird die Lösung auf ein Silica-Gel-Säulchen appliziert und nicht bindende Anteile durch kurze Zentrifugation (1min, 14.000 Upm, Eppendorf-Tischzentrifuge) und Waschen der Säulenmatrix mit 750 µl PE-Puffer entfernt. Vor der Elution der DNA mit 30 bis 50 µl EB (12.2.1) werden letzte Ethanolreste beim Trockenzentrifugieren entfernt.

12.2.6 Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA in einer Lösung

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen (DNA, RNA, Oligonukleotide) wird in Quarzküvetten über ihre Lichtabsorption (optische Dichte OD) im Spektralphotometer bestimmt. Nukleinsäuren absorbieren aufgrund ihrer Basen bei einer Wellenlänge λ zwischen 250 bis 270 nm und bei 260 nm maximal, wobei bei einer Schichtdicke von 1cm der $OD_{260} = 1$ etwa 50 µg/ml dsDNA oder 37 µg/ml ssDNA oder RNA bzw. 20 µg/ml Oligonukleotide (siehe 12.5.2) entspricht. Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm, welches auf dem Gehalt an Tyrosin- und Tryptophan-Resten beruht, wobei hier $1OD_{280}$ ungefähr 1.8 mg/ml Protein entspricht. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} gibt Auskunft über die Reinheit einer Nukleinsäure-Präparation:

$$OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \text{ bis } 1.95 \quad (\text{sehr reine dsDNA-Lösungen})$$

$$OD_{260}/OD_{280} = 1.9 \text{ bis } 2.0 \quad (\text{sehr reine RNA-, ssDNA-Lösungen})$$

Erhöhte Werte bei DNA-Lösungen ($OD_{260}/OD_{280} > 2$) können die Anwesenheit von RNA oder Denaturierung der DNA anzeigen. Beim Übergang von dsDNA in ssDNA kann eine Extinktionszunahme von 40% resultieren. Niedrigere Werte sind ein Indiz für eine Kontamination mit Proteinen oder Phenol.

12.3 Chromatographie von DNA- und RNA-Fragmenten und Transfer auf Trägermembranen

12.3.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Agarose wird in 1x Loening- oder 1x TBE-Puffer unter Kochen gelöst und nach Zugabe von Ethidiumbromidlösung (Stocklösung 10 mg/ml) in Flachbettgelapparaturen verschiedener Größe gegossen (alternativ werden die Gele ohne Ethidiumbromid gegossen und nach der Elektrophorese in einem Ethidiumbromidbad [1µg/ml Ethidiumbromid in H₂O] 10 bis 60

min gefärbt und in H₂O entfärbt). Die DNA-Proben werden mit einem geeignetem Volumen Probenpuffer (i.d.R. 0.5 Vol.) versetzt und in die Taschen des erstarrten Gels geladen. Für kleine Gele (ca. 10 x 8 cm) werden etwa 100 bis 300 ng DNA pro Tasche, für ein präparatives Gel (ca. 15 x 20 cm, z.B. für genomischen Southernblot) 5 µg DNA pro Tasche aufgetrennt. Als Größenstandard dienen die in 10.9.1 aufgeführten Marker. Die Elektrophorese erfolgt in 1x TBE- oder 1x Loening-Puffer bei 5 bis 10 V/cm. Das Gel wird auf einem UV-Illuminator (302 nm) fotografiert.

<u>Agarose-Gel</u>	0.7 bis 2 % Agarose (w/v) in 1x TBE- (oder 1x Loening-) Puffer 0.1 bis 0.3 µg/ml Ethidiumbromid
<u>DNA-Probenpuffer</u>	50 % Saccharose (w/v) 0.5 % SDS 0.2 % Bromphenolblau

12.3.2 Southern-Transfer

Das Übertragen von, auf einem Gel nach ihrer Größe aufgetrennten, Nukleinsäure-Molekülen auf eine feste Trägerschicht (Nylonmembran, positiv geladen) mit Hilfe der Southernblot-Technik beruht auf Kapillarkräften (Southern, 1975). Nach Immobilisierung der DNA können einzelne Fragmente mit Hilfe von DIG- oder radioaktiv markierten Sonden spezifisch detektiert werden (siehe 12.4). Die erforderlichen Puffer sind unter 12.1.1 aufgeführt.

Gel: Das zu blottende Agarose-Gel wird zur späteren Auswertung unter UV-Licht, bei Bedarf (insbesondere bei dem radioaktiven Verfahren, bei dem der normale DNA-Standard im Röntgenfilm nicht erkennbar ist) mit einem Längenmarker fotografiert und anschließend bei RT unter moderatem Schütteln wie folgt prozessiert:

1. zweimal 15 min Denaturieren und Fragmentieren
2. Spülen in sterilem destilliertem H₂O
3. zweimal 15 min Neutralisieren (Lösung1)
4. Spülen in sterilem destilliertem H₂O
5. 5 min Äquilibrieren in 20x SSC.

Membran: Die Nylonmembran wird vor Verwendung in 20x SSC äquilibriert.

Southern-Aufbau: Das Gel wird auf eine Schicht aus 3 Lagen mit 20x SSC getränktem Whatmanpapier gelegt, die über einen weiteren Whatman-Schal in Kontakt mit der in einer Wanne befindlichen 20x SSC-Lösung steht. Die äquilibrierte Nylonmembran wird auf das Gel luftblasenfrei aufgelegt und mit einer zweiten Schicht Whatman-Papierlagen sowie einem 10 cm hohen Stapel trockenen Saugpapiers bedeckt. Dieser Aufbau wird mit einem Gewicht beschwert und der „schwerkraftunterstützte“ Transfer (Chomczynski, 1992) ca. 16

bis 20 h durchgeführt. Nach dem Abnehmen und Verpackung der Membran in Frischhaltefolie wird die DNA durch 5 min Bestrahlung mit UV (302 nm) kovalent an die Trägeroberfläche gebunden. Nach kurzem Spülen in 2x SSC und Trocknung an Luft ist die Membran bis zur Verwendung trocken bei -20°C (für DIG-Detektion bei 4°C) zu lagern.

12.4 Detektion mit DNA-Sonden

12.4.1 Markierung von DNA-Fragmenten mit radioaktive Sonden

12.4.1.1 ^{32}P -Markierung von DNA-Sonden

DNA-Fragmente, die als Sonden für Plaquelifts beim Screenen von Genbanken (Grunstein und Hogness, 1975), DNA- und RNA-Blots (Southern, 1975; Smith und Summers, 1980) eingesetzt werden sollen, können mit Hilfe der "Random-Prime"-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) durch den Einbau von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ unter Verwendung des Prime It[®] II Random Primer Labeling Kits (Stratagene) radioaktiv markiert werden. Das Nonamerengemisch ist so konzipiert, daß es zu einem breiten Bereich der Template-DNA Bindungsbereitschaft zeigt (Random Prime) und ca. alle 100 Nukleotide an die Matrize bindet.

Puffer, Materialien (*im Prime It[®] II Random Primer Labeling Kit enthalten)

<u>5x dATP-Reaktionspuffer</u>	0.1 mM dTTP 0.1 mM dCTP 0.1 mM dGTP in gepufferter wäßriger Lösung
<u>Oligonukleotidgemisch*</u>	Random Primer (Nonamere = 9mer) 27 OD-Einheiten/ml in gepufferter wäßriger Lösung
<u>Exo⁻-Klenow-Fragment*</u>	5U/ μl in gepufferter Glycerinlösung
<u>$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$</u>	10mCi/ml = 370 Mbq/ml
<u>Sephadex-G50-Gelfiltrations-Säulchen</u>	QuickSpin [™] Columns (Boehringer Mannheim)

In einem Eppendorf-Röhrchen werden 25ng DNA in 24 μl H₂O mit 10 μl des Oligonukleotidgemisches in einem Wasserbad 5min bei 100°C denaturiert und nach Abkühlen auf RT kurz abzentrifugiert. Nach Zugabe von 10 μl 5x dATP-Reaktionspuffer, 5 μl radioaktiv markiertem dATP (3000 Ci/mmol) und 1 μl Exo⁻-Klenow-Enzym wird die Synthesereaktion 10min bei 37°C im Heizblock durchgeführt. Die nicht eingebauten Nukleotide werden durch Auftragen des Ansatzes auf Gelfiltrations-Säulchen und 2min Zentrifugation in der Hettich-Zentrifuge mit 1200 Upm von der markierten DNA abgetrennt. Im Durchfluß befindet sich die

Sonde, die entweder bei -20°C gelagert oder direkt in der nachfolgenden Hybridisierungsreaktion eingesetzt wird.

12.4.1.2 Hybridisierung mit ^{32}P -markierten Sonden

<u>Hybridisierungspuffer</u>	„Rapid-Hyb“-Puffer (Amersham)
<u>2x SSC-Waschpuffer</u>	2x SSC 0.1% SDS
<u>30 % Formamidwaschpuffer</u>	30% Formamid 120 mM Na-Phosphat (pH 6.8) 2 mM EDTA (pH 7.2) 0.2 % SDS 1 % Sarcosyl in 2x SSC
<u>50 % Formamidwaschpuffer</u>	50% Formamid 120 mM Na-Phosphat (pH 6.8) 2 mM EDTA (pH 7.2) 0.2 % SDS 1 % Sarcosyl in 2x SSC

Die gemäß Protokoll für Plaque lifts (Kapitel 12.1.5) bzw. für Southernblots (Kapitel 12.3.2) vorbereitete Nylonmembran wird in Hybridisierungsröhren mit „Rapid-Hyb“-Puffer 20min bei $60-65^{\circ}\text{C}$ im Hybridisierungsofen vorinkubiert. Die Sonde (Kapitel 12.4.1.1) wird zur Verwendung in $500\ \mu\text{l}$ „Rapid-Hyb“-Puffer verdünnt, 5 min im Heizblock bei 95°C denaturiert und nach sofortiger Abkühlung auf Eis direkt in den Hybridisierungspuffer zu der vorhybridisierten Membran gegeben. Die Endkonzentration der Sonde sollte bei etwa 2ng/ml liegen (dazu wird die gesamte markierte DNA aus einer $25\ \text{ng}$ -Labeling-Reaktion in $20\ \text{ml}$ Rapid-hyb-Puffer verdünnt). Die Hybridisierungsreaktion wird über Nacht bei 60°C durchgeführt. Anschließend wird die DNA-haltige Lösung entfernt (wird bei -20°C aufbewahrt und vor Wiederverwendung erneut denaturiert), der Blot zweimal 15 min in 2x SSC-Waschpuffer bei RT und 1 h in 30 % Formamidwaschpuffer bei 37°C unter Schütteln in einer Schale gewaschen (für stringenteres Waschen kann anstelle des 30 %igen der 50 %ige Formamidwaschpuffer oder 1 bis 0.1x SSC/0.1% SDS bei 42°C verwendet werden). Die Membran wird zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet und ein Röntgenfilm in einer Kassette mit Verstärkerfolie bei -70°C exponiert.

DNA-Blots können nach einer Hybridisierung wiederverwendet werden, indem man die Sonden durch 1-3-minütiges Kochen der Membran in $1\ \text{mM}$ EDTA/0,1 % SDS-Lösung denaturiert („abschmilzt“).

12.4.2 Markierung von DNA-Fragmenten mit nichtradioaktiven Sonden

DNA-Sonden werden nach dem „Random Prime“-Verfahren unter Verwendung des DIG „DNA Labeling and Detection Kit“ und Anwendung des „DIG-Systems für Filter Hybridisierung“ (Protokoll Boehringer Mannheim) mit DIG-dUTP markiert. Die Detektion von DNA-Fragmenten oder Phagenplaques nach Hybridisierung mit diesen Sonden basiert auf der Erzeugung von chemolumineszenter Strahlung. Das in die Sonden integrierte DIG wird dabei von anti-DIG-Antikörpern als Antigen erkannt. Die mit dem Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase setzt CSPD[®] als Substrat unter Lichtemission um.

12.4.2.1 Puffer und Lösungen

für Markierung der Sonde

Hexanukleotid-Mixtur, pH 7.2

1.56 mg/ml „Random“ Hexanukleotide
500 mM Tris-HCl
100 mM MgCl₂
1 mM Dithioerythrol (DTE)
1 mg/ml BSA

dNTP „labeling“ Mixtur, pH 6.5

1 mM dATP
1 mM dCTP
1 mM dGTP
1 mM dTTP
0.35 mM DIG-dUTP (alkali-labil)

Klenow Enzym

2U/ µl (DNA Polymerase I-Fragment)
aus *E.coli*

unmarkierte Kontroll-DNA

200 mg/ml pBR328-EcoRI-linearisiert

Stop-Lösung, pH 8.0

200 mM EDTA in H₂O

DIG-markierte DNA (Kontrolle)

5 µg/ml pBR328-DIG in 25µg/ml DNA

DNA-Verdünnungspuffer, pH 8.0

10 mM Tris-HCl
50 µg/ml DNA aus Hering-Spermien

für Hybridisierung

Hybridisierungspuffer

5x SSC
0.02 % SDS
2 % Block-Stocklösung (10%)
50 % Formamid (deionisiert):
[50g Ionenaustauscherharz
(AG501-X8, Biorad)
500 ml Formamid
30 min Rühren (RT), Filtrieren]
0.1 % N-lauroylsarcosin:
[10% (w/v) in sterilem H₂O
filtriert (0.2-0.45 µm)]

<u>2x SSC-Waschpuffer</u>	2x SSC 0.1% SDS
<u>0.5x SSC-Waschpuffer</u>	0.5x SSC 0.1 % SDS
für Detektion	
<u>Maleinsäurepuffer, pH 7.5</u>	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl autoklavieren
<u>Maleinsäure-Wasch-Puffer, pH 7.5</u>	0.3% (v/v) TWEEN®20 in Maleinsäurepuffer
<u>Blockierungs-Stocklösung, pH 7.5</u>	10% (w/v) Block-Reagenz (Boehringer Mannheim) in Maleinsäurepuffer unter Rühren bei 60°C lösen, danach autoklavieren, bei 4°C lagern
<u>Blockierungspuffer, pH 7.5</u>	1 % (v/v) Block-Stocklösung (10%) 1:10 in Maleinsäurepuffer verdünnt
<u>anti-DIG-ALKP</u>	anti-DIG-Antikörper (Fab-Fragment) alkalische Phosphatase konjugiert
<u>Detektionspuffer, pH 9.5</u>	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl
<u>CSPD®</u>	25mM

12.4.2.2 Inkorporation von Digoxigenin (DIG) in DNA-Sonden

Die Matrizen- oder eine entsprechende Kontroll-DNA (Gesamtmenge 10ng bis 3µg) werden in H₂O auf ein Volumen von 15µl verdünnt (0.5 bis 200 ng/µl), 10 min im Wasserbad bei 100°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Der Lösung werden 2 µl Hexanukleotide (10x Gemisch Random Primer), 2 µl 10x dNTP-Mixtur und 1 µl Klenow Enzym (Endkonzentration 100 U/ml) zugegeben. Die Labeling-Reaktion findet bei 37°C mindestens 1 bis 20 h statt und wird durch Zugabe von 2 µl 200 mM EDTA-Lösung gestoppt. Die Ausbeute ist von der eingesetzten DNA-Menge und der Reaktionszeit abhängig (Tabelle 8).

Matritzen-DNA	DIG-DNA nach 1h	DIG-DNA nach 20h
10 ng	15 ng	50 ng
30 ng	30 ng	120 ng
100 ng	60 ng	260 ng
300 ng	120 ng	500 ng
1000 ng	260 ng	780 ng
3000 ng	530 ng	890 ng

Tabelle 8 DIG-Markierungsausbeute in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge DNA und der Inkubationszeit

Die Markierungseffizienz muß vor Verwendung der Sonde (zur Vermeidung von unspezifischen oder fehlenden Markierungen) in einem direkten Detektions-Assay mittels Dot-blot folgendermaßen getestet werden. Aus der DIG-markierten Kontroll-DNA wird durch schrittweises Verdünnen mit DNA-Verdünnungspuffer jeweils im Verhältnis 1:10 eine Verdünnungsreihe (1ng/µl bis 0.01 pg/µl) hergestellt. Die Konzentration der markierten experimentellen DNA wird aus der eingesetzten DNA-Menge und der Reaktionszeit unter Zuhilfenahme der Tabelle 8 geschätzt und eine Verdünnung zu ungefähr 1ng/µl hergestellt. Aus dieser Vorverdünnung wird die oben beschriebene Verdünnungsreihe erstellt. Je 1µl jeder Kontrollprobe werden in einer Reihe, die korrespondierenden Verdünnungen der experimentellen Proben in einer zweiten Reihe auf ein Stück Nylonmembran pipettiert und die DNA nach kurzem Trocknen der Membran an Luft durch 5 min UV-Bestrahlung oder 30 min Bakken bei 120°C immobilisiert. Die Membran wird anschließend genauso behandelt wie im Kapitel Detektion beschrieben. Die entstehenden Signale auf einem Röntgenfilm können in ihrer Intensität (Durchmesser der Spots) direkt verglichen und daraus die DIG-Konzentration der markierten Probe abgeschätzt werden.

12.4.2.3 Hybridisierung

Die Puffer und Temperaturen sind so gewählt, daß man von stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen ausgehen kann. Die vorbereitete Nylon-Membran (siehe 12.3.2 und 12.1.5) wird zum Abblocken ihrer unspezifischen Nukleinsäure-Bindungsstellen mit 20 ml Hybridisierungspuffer pro 100 cm² bei 42°C mindestens 2 h in Hybridisierungsröhren vorhybridisiert. Die DIG-markierte DNA-Sonde wird verdünnt auf 5 bis 25 mg/ml in Hybridisierungspuffer (50% Formamid, auf 42°C vorgewärmt) auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsofen. Nach dem Abgießen der Hybridisierungslösung wird ungebundenes Material durch Spülen der Membran wie folgt entfernt: zweimal je 5 min bei RT in 2x SSC-Waschpuffer und zweimal je 15 min 68°C in 0.5x

SSC-Waschpuffer (für höchststringentes Waschen der Membran wird 0.1x SSC/0.1% SDS-Waschlösung verwendet).

Die Sonde ist bei -20°C etwa 1 Jahr lagerfähig und kann für weitere Hybridisierungen wiederverwendet werden. Dazu muß sie vor Gebrauch durch 10 min Erhitzen auf 68°C denaturiert werden.

12.4.2.4 Detektion

Die Membran wird zunächst kurz mit Waschpuffer, danach 30 min mit Blockpuffer und weitere 30 min mit anti-DIG-ALKP, 1:10.000 (für Bestimmung der DIG-Markierungseffizienz der Sonde 1:5000) in Blockpuffer verdünnt, bei RT behandelt. Ungebundenes Material wird mit Maleinsäure-Waschpuffer (zweimal 15 min, RT) entfernt. Nach Äquilibrieren der Membran in Detektionspuffer (2min) wird sie naß in Plastikfolien verpackt und nach Applikation des Substrates (CSPD, 1:100 verdünnt in Detektionspuffer, $0.5\text{ ml}/100\text{cm}^2$) eingeschweißt und 15 min bei 37°C aktiviert. Durch Auflegen eines Röntgenfilmes werden die ausgesendeten Lichtsignale detektiert. Bei Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes (nach ca 7 bis 8 h Inkubation bei RT) genügt eine Exposition von 15 min für eine ideale Signaldetektion bei geringstem Hintergrund. Die Detektion ist insgesamt ca 2 Tage möglich.

Die alkali-labile DIG-Sonde kann von der Membran nach kurzem Spülen in H_2O zur Entfernung des Substrates 10 min mit 0.2 M NaOH/0.1% SDS-Lösung bei 37°C entfernt werden. Der Blot wird anschließend in 2x SSC geschwenkt. Die erneute Hybridisierung beginnt mit dem Vorhybridisierungsschritt.

12.5 Enzymatische Reaktionen

12.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

12.5.1.1 Standard-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR) ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation beliebiger DNA-Abschnitte von bis zu 20 kb Länge zwischen zwei Regionen bekannter Sequenz (Saiki *et al.*, 1985). Durch Anwendung eines vielfach wiederholten Reaktionszyklus' bestehend aus Denaturierung, Primerhybridisierung ("Annealing") und DNA-Polymerisierung (Elongation) wird eine doppelsträngige DNA-Matrize (Plasmide, λ gt11-Phagen, lineare DNA-Stücke aus Restriktionsreaktionen u.s.w.) unter Verwendung spezifischer „Primer“ (Oligonukleotide mit bekannter Sequenz, die aus getrennt liegenden Abschnitten dieser Vorlage abgeleitet werden), Desoxyribonukleotiden in Gegenwart der hitzebeständigen *Taq*-DNA-Polymerase (Chien *et al.*, 1976) vervielfältigt. Bei entsprechendem

Design der Primer können in die neu synthetisierte DNA beliebige Sequenzen z.B. für Schnittstellen eingeführt werden. Die Taq-DNA-Polymerase hängt außerdem einzelne Deoxyadenosinreste am 3'-Ende des PCR-Produktes an. Diese Überhänge wie auch die Schnittstellen können zur Klonierung herangezogen werden (siehe 12.5.6).

Puffer/Reagenzien

10x PCR-Puffer (Perkin Elmer), pH 8.3

100 mM Tris-HCl
500 mM KCl
15 mM MgCl₂
0.01% (w/v) Gelatine

10x PCR-Puffer (Amersham), pH 8.8

260 mM Tris-HCl
26 mM MgCl₂

10 mM dNTP's

2.5 mM dATP
2.5 mM dCTP
2.5 mM dGTP
2.5 mM dTTP in H₂O

Oligonukleotid-Primer

100 pmol/μl in H₂O

Enzyme

Taq-DNA-Polymerase (Amersham)

5U/μl
in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
100 mM KCl
1 mM DTT
0.1 mM EDTA
50 % Glycerol

AmpliTag®-DNA-Polymerase (Perkin Elmer)

5U/μl
in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
100 mM KCl
0.1 mM EDTA
1 mM DTT
50 % Glycerol
0.5 % TWEEN 20®
0.5 % NP40®

Reaktionsansatz (100 μl)

1-10 μl DNA

1 μl Primer A (100 pmol/μl)
1 μl Primer B (100 pmol/μl)
8 μl dNTP's (10 mM)
10 μl 10x PCR-Reaktions-Puffer
1 μl Taq-DNA-Polymerase
69-78 μl H₂O

Menge bzw. Endkonzentration

200-500 ng genomische DNA aus
D.-discoideum, Plasmid-DNA bzw.
1-10 μl Phagen-Lysat
1 μM
1 μM
800 μM
1x PCR-Reaktions-Puffer
5U

Reaktionsbedingungen

Der Ansatz wird in 0.5 ml Reaktionsgefäßen zur Vermeidung der Evaporation von Flüssigkeit mit Mineralöl überschichtet und in einem PCR-„Thermocycler“ (Perkin Elmer Cetus) folgendem Zyklus unterworfen:

<u>1. Zyklus</u>	5 min, 94°C (Denaturieren) 1 min, 50 bis 60°C (Annealing) 2.5 min 65 oder 72°C (Elongation)
<u>2.-31. Zyklus</u>	1 min 94°C 1 min 50 bis 60°C 2.5 min 65 oder 72°C
<u>32. Zyklus</u>	1 min 94°C 1 min 50 bis 60°C 5 bis 10 min 65 oder 72°C

Nach Ablauf der Zyklen wird der Ansatz automatisch bei 4°C gekühlt. Das PCR-Produkt wird unter dem Öl abgezogen und weiterverarbeitet. Die für jeden Primer spezifische Hybridisierungstemperatur T_H wird nach seiner Basen-Zusammensetzung abgeschätzt (Suggs *et al.*, 1981). Bei der Berechnung von T_H gehen nur die zur Matrize komplementären Nukleotide, nicht aber eingeführte Überhänge (z.B. Schnittstellen für Restriktionsenzyme) ein. Die Hybridisierungstemperatur sollte einige Grad (i.R. 10-20°) unter der Schmelztemperatur T_M des Primers liegen. Die T_M ist die Temperatur, bei der die Hälfte aller Nukleinsäuremoleküle einzelsträngig vorliegen.

$$T_M = 4 \cdot (\sum G;C) + 2 \cdot (\sum A;T)$$

Die Dauer der Polymerisation hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes ab (Faustregel: 1 kb/min). Der letzte Elongationsschritt wird zum sicheren Auffüllen einzelsträngig verbliebener DNA-Stücke verlängert (5 min, für TA-Klonierung 7 bis 10 min).

12.5.1.2 Inverse PCR

Prinzip

Zur Amplifikation von Sequenzabschnitten, die nicht zwischen zwei bekannten, von den Primern begrenzten, Regionen sondern außerhalb dieses Bereichs liegen, wird das Standardverfahren der PCR abgewandelt zur sogenannten inversen PCR (Triglia *et al.*, 1988, Ochman *et al.*, 1989). Hier wird die DNA-Matrize nicht komplett und in ihrer linearen Form, sondern in Form kleinerer ringförmiger Moleküle eingesetzt. Dazu wird die chromosomale DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym vollständig in Stücke von maximal 1 kb Größe hydrolysiert und dabei so stark verdünnt, daß statistisch bevorzugt ein Ringschluß der DNA stattfindet (die 5'- und 3'-Enden jeweils eines Moleküls werden religiert). Diese zir-

kuläre DNA wird in die PCR eingesetzt. Zur Feststellung geeigneter Restriktionsenzyme und der Primer ist eine vorhergehende Identifizierung der entstehenden Gen-Fragmente durch Southernblot-Analyse mit Sonden aus bekannten Genabschnitten notwendig.

Herstellung des Templates

Etwa 8-10 µg genomische proteinfreie DNA (Herstellung siehe 12.2.4) wird zunächst 3-4 Stunden mit dem ausgewählten Enzym (ca. 40 Units) in einem Reaktionsvolumen von 100 µl und nach Zugabe von zusätzlich 20 Units und Verdünnung des Ansatzes mit Puffer und Wasser auf 200 µl eine weitere Stunde verdaut (siehe 12.5.3). Der Ansatz wird 1.5 h bei 37°C einer RNase-Behandlung unterzogen (10 ng RNase A, SIGMA). Das phenolextrahier- te, mit Ethanol gefällte, getrocknete Pellet der so aufgereinigten DNA (12.2.4.4) wird in 200 µl Tris-HCl (pH 7.4) aufgenommen und komplett in die Ligationsreaktion für mindestens 24 h mit 10 bis 15 µl T4-Ligase (1U/µl, Boehringer), unter Zusatz von 1mM ATP eingesetzt.

PCR-Reaktion

Die zirkulären Stücke werden nach Aufreinigung (Phenolisieren, Fällern, Lösen in 100µl Tris-HCl, pH 7.4, 12.2.4.4) als Template in der nachfolgenden PCR eingesetzt. Die Primer werden so konzipiert, daß einer nahe am 5'-Ende bindet und Gen-aufwärts gerichtet ist, der zweite am 3'-Ende die entgegengesetzte Richtung vorgibt und bei linearer DNA die Richtung der Polymerisation auseinanderlaufend wäre und kein PCR-Produkt entstehen würde. Durch den Ringschluß werden nun nicht wie in der linearen PCR die Bereiche zwischen den Primern sondern die flankierenden unbekanntes Abschnitte amplifiziert. Die PCR-Reaktion selbst wird wie im Standardverfahren durchgeführt und die üblichen Konzentrationen der verwendeten Lösungen (Primer, Template u.s.w.) eingesetzt.

12.5.2 Oligonukleotide

Die meisten für Sequenzierungen und PCR eingesetzten Oligonukleotide wurden von Frau Schimanko (MPI für Biochemie, Abt. Membranbiochemie) nach dem Phosphoramidit-Verfahren (Dörper und Winnacker, 1983) an einem DNA-Synthesizer (Applied Biosystems 394) hergestellt. Einige Oligonucleotide (pλfw, pλrev, p11) wurden von der Firma MWG Biotech Ebersberg synthetisiert. Die Lösung wurde im Speed-Vac-Konzentrator zur Trockne eingedampft und der Rückstand in H₂O Tris-HCl- oder TE-Puffer zu einer Endkonzentration von 100 nmol/µl aufgenommen. Die Konzentration wird über die Absorption bei 260 nm in einem Photometer kontrolliert (12.2.6). Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 37 µg/ml einzelsträngiger DNA.

12.5.3 Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Verdau mit Restriktionsenzymen erfolgt mit dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C). Üblicherweise werden 1-2 U/µg DNA eingesetzt. Plasmid-DNA wird 1 bis 2h, genomische DNA 4 bis 12h verdaut. Die nach einer enzymatischen Restriktion vorliegenden Fragmentenden können entweder einen 5'- oder 3'-Überhang (kohäsive Enden), oder aber keinen Überhang (glatte Enden) aufweisen.

12.5.4 DNA-Dephosphorylierung am 5'-Ende

Zur Vermeidung der Rezirkularisierung eines linearisierten Vektors wird die Phosphatgruppe am 5'-Ende mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) entfernt (Marniatis *et al.*, 1989). Nach dem Restriktionsverdau des Vektors (12.5.3) und seiner anschließenden Aufreinigung über ein Silica-Gel-Säulchen („QIAquick Spin Column“, 12.5.7) wird die gewonnene DNA-Lösung in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit 1/10 Vol 10x CIAP-Puffer, 2U CIAP und H₂O bei 37°C zunächst 30 min und nach Zugabe von weiteren 2U Enzym nochmal 30 min im Heizblock inkubiert. Das Enzym wird entweder 10 min bei 65°C inaktiviert und die DNA durch Phenolisieren und Fällern (12.2.4.4) extrahiert oder gleich über einen Chromatographieschritt an einer QIAquick Spin-Säule abgetrennt (12.5.7).

10x CIAP-Puffer (Boehringer Mannheim)

0.5 M Tris-HCl (pH 8.5)
1 mM EDTA

CIAP 1U/µl (Boehringer Mannheim)

25 mM Tris-HCl (pH 7.6)
1 mM MgCl₂
0.1 mM ZnCl₂
50% (w/v) Glycerol

12.5.5 Überführung von überhängenden 5'-Enden in glatte Enden

Die Mehrzahl der Restriktionsenzyme erzeugt kohäsive Enden mit einem 5'-Überhang. Durch „Auffüllen“ des 3'-Endes mit Nukleotiden können glatte Enden erzeugt werden. Ursprünglich nicht-kompatible kohäsive Enden können nun zusammengefügt werden. Zum Auffüllen wird das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* verwendet, dem die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität fehlt.

Reaktionsansatz 50 µl

30 µl Vektor-DNA (ca. 5-10µg)
5 µl 10 x „Filling-In“-Puffer (USB)
0.1 mM dNTP-Lösung (2 µl 10 mM Stock = à 2.5 mM)
2 µl Klenow-Enzym (2U/µl)
11 µl H₂O

Der Ansatz wird zunächst 30min bei RT und anschließend 15min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1/10 Vol 200 mM EDTA-Lösung gestoppt und die DNA über eine Silica-Gel-Säule (QIAquick) abgetrennt.

12.5.6 Ligation

12.5.6.1 Ligation mit T4-Ligase

Mit der DNA-Ligase-Reaktion werden DNA-Fragmente und linearisierte Vektoren, die entweder glatte oder kompatible kohäsive Enden besitzen, unter Bildung von Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft. Bei Verwendung der T4-DNA-Ligase und des Ligationspuffers von Boehringer Mannheim wird die Reaktion über Nacht bei 8-16°C durchgeführt. Die einzusetzenden DNA-Mengen werden in einem Agarose-Gel (12.3.1) oder durch Bestimmung der OD (12.2.6) so abgeschätzt, daß das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA etwa 1 : 3 beträgt.

<u>Reaktionsansatz 20 µl</u>	1 µl Vektor-DNA (ca. 100 ng) 10 µl DNA (ca. 300 ng Insert-DNA) 2 µl 10 x Ligationspuffer (Boehringer Mannheim) 2 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl, Boehringer Mannheim) 2 µl 5mM ATP 3 µl H ₂ O
<u>10 x Ligationspuffer, pH 7.5</u>	660 mM Tris-HCl 50 mM MgCl ₂ 10 mM Dithioerythrit (DTE) 10 mM ATP

12.5.6.2 TA-Klonierung

Prinzip

Man nutzt die vom Template unabhängige terminale Transferaseaktivität der *Taq*-Polymerase aus, die an den 3'-Enden des PCR-Produktes einen einzelnen Deoxyadenosinrest anhängt. Das Plasmid besitzt den dazu komplementären Deoxythymidin-Überhang am 3'-Ende und kann so effizient mit dem Insert ligiert werden. Die Methode wird entsprechend TA-Klonierung genannt.

Klonierung in pGEM-T (Promega)

Bei Verwendung des Promega-Klonierungs-Systems werden der mitgelieferte Reaktionspuffer und eine spezielle T4-Ligase, der jegliche Exonukleaseaktivität fehlt, eingesetzt. Nach der Inkubation von 3 h bei 15°C kann ein Aliquot von 2 µl für einen ersten Transforma-

tionsversuch direkt verwendet werden. Zur Sicherheit wird die Reaktion mit dem restlichen Ansatz über Nacht bei 4°C fortgesetzt und bis zur Verwendung bei –20°C gelagert.

<u>Reaktionsansatz 10 µl</u>	1 µl pGEM T-Vektor (50 ng, Promega) X µl PCR- oder A-tailing-Produkt (oder Kontroll-Insert) 1 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (Promega) 1 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl, Promega) X µl dH ₂ O
<u>10x Ligationspuffer, pH 7.5</u>	300 mM Tris-HCl 100 mM MgCl ₂ 100 mM DTT 10 mM ATP

Ligation mit Topoisomerase (TOPO-TA-Klonierung)

Bei der TOPO-TA-Reaktion finden die Ligationsreaktion und Transformation (12.6.2.2) unmittelbar hintereinander statt. Anstelle der üblichen T4-Ligase zur Verbindung der DNA-Enden von Vektor und Insert wird Topoisomerase als Enzym verwendet.

Die Verwendung von frisch hergestelltem PCR-Produkt ist für die Effizienz entscheidend, da gefrorene und wieder aufgetaute PCR-Produkte ihren A-Überhang leicht verlieren können. Solche DNA-Stücke oder PCR-Produkte, die von Polymerasen erzeugt werden, die die erwähnte Transferaseaktivität nicht besitzen, können dennoch mit einer postamplikativen Addition des A-Überhangs (siehe A-Tailing) der TA-Klonierung zugänglich gemacht werden.

<u>TOPO-Reaktionsansatz 5µl</u>	0.5 bis 2 µl DNA (5-20 ng frisches PCR-Produkt oder nach A-Tailing) 1 µl TOPO-pCR®-Vektor (enthält Topoisomerase) X µl H ₂ O bis Gesamtreaktionsvolumen
---------------------------------	---

Der Ansatz für die TOPO-Klonierungsreaktion wird nach Mischen 5 min bei RT inkubiert und bis zur unmittelbar folgenden Transformation (12.6.2.2) auf Eis aufbewahrt.

A-Tailing-Reaktion (Protokoll Promega pGEM®-T-Vektor-System, modifiziert):

direkt nach der Amplifikation (12.5.1):

Der komplette PCR-Reaktionsansatz (100 µl) wird zur Denaturierung der DNA 20 min bei 95°C im Heizblock erhitzt. Nach Zugabe von dATP (2 mM Stock, Endkonzentration 0.5 mM) und 10 Einheiten Taq-Polymerase/100 µl Ansatz wird der Ansatz 15 min bei 70°C inkubiert und bis zur Verwendung in der Ligationsreaktion auf Eis gestellt.

nach Aufreinigung des PCR-Produktes (12.5.7):

1 bis 2 µl des aufgereinigten PCR-Fragments werden mit 1 µl 10xPCR-Reaktionspuffer, 1 µl 25mM MgCl₂, dATP bis zur Endkonzentration von 0.2 mM, 5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase versetzt und mit deionisiertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Nach Denaturierung bei 95°C wird der Ansatz für 15 bis 30 min auf 70 °C gehalten.

12.5.7 Reinigung von DNA-Fragmenten aus PCR, Dephosphorylierungs-, Verdau- und Ligationsansätzen

Um DNA, die z.B. aus einem Restriktionsverdau, einer Phosphatase-Behandlung oder einer PCR hervorgeht, von den jeweiligen Enzymen, Nukleotiden oder Oligonukleotiden zu reinigen und den Puffer auszutauschen, wird sie nach Herstellervorschrift über ein Silica-Gel-Säulchen aufgereinigt (PCR-Purification-Kit, QIAGEN). Dazu wird das Reaktionsgemisch (maximal 10 µg DNA) mit 5 Vol. PB-Puffer gemischt, auf ein Säulchen geladen, das in ein Auffangröhrchen gestellt wird, und 1 min in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Die im Säulenmaterial zurückgehaltene DNA wird mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und der Durchfluß verworfen. Die Elution der DNA erfolgt mit 30 bis 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8.0. Die von Proteinen gereinigte DNA wird hauptsächlich für Ligationen, radioaktive Markierungen, weitere Restriktionsverdaus und Sequenzreaktionen verwendet. Weitere Aufreinigungen sind über Agarosegele mit nachfolgender DNA-Isolierung möglich. Diese Methode wird vor allem zur Abtrennung der verschiedenen Produkte, die aus einem Restriktionsverdau hervorgehen, eingesetzt. Dabei findet der QIAGEN-Gel-Extraction Kit Verwendung.

12.5.8 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden von der Firma TopLab (Martinsried) mit einem Sequenzierautomaten durchgeführt (Didesoxy-Kettenabbruch-Methode, Sanger *et al.*, 1977).

12.6 Transformation von Bakterien

12.6.1 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*

Die am häufigsten angewandten Verfahren, um *E.coli*-Zellen transformationskompetent für die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Hitzeschock zu machen, sind die CaCl₂-Methode (Mandel und Higa, 1970; Dagert und Ehrlich, 1979) und die Mehrionentechnik (Hananan, 1983). Der Vorteil der ersten Methode ist die leichtere Durchführbarkeit, die Mehrionen-Methode liefert dagegen höhere Ausbeuten an transformierbaren Zellen. Die CaCl₂-Methode wurde nur einmal für den *E.coli*-Stamm JM109 verwendet und aufgrund unbefriedi-

gender Transformationskompetenz der Bakterien bei nachfolgenden Präparationen (JM83, JM105 und JM109) durch das Mehrionenprotokoll ersetzt.

12.6.1.1 Calciumchlorid-Methode

Eine frisch aus eingefrorenen Zellen angeimpfte Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Stamms in LB-Medium (3 ml, 37°C) wird in 200 ml LB-Medium verdünnt (1:70) und auf dem Schnellschüttler (≥ 270 Upm, 37°C) bis zu einer OD_{585nm} von 0.2 bis 0.4 kultiviert. Die Suspension wird in Falcon-Röhrchen auf Eis vorgekühlt, die Bakterien in der Sorvall-Zentrifuge 5 Minuten bei 4°C und 4000 Upm pelletiert, in 0.25 Vol. (= 50 ml) eiskaltem 100mM $CaCl_2$ -Puffer/ 20% Glycerin resuspendiert und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Der Vorgang wird wiederholt, allerdings wird das Resuspensionsvolumen auf 0.025 Vol. (5ml) erniedrigt. Nach einer weiteren Stunde auf Eis können die Zellen entweder direkt in einer Transformation eingesetzt oder in 200 bis 400 μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

12.6.1.2 Mehrionentechnik

5 ml Minimalmedium (25 μ g/ml Kanamycin) werden mit einer Stammkultur des *E. coli*-Stammes beimpft und über Nacht bei 37°C im Roller-Schüttler inkubiert. Mit 1 ml dieser Übernachtskultur werden 100 ml LB-Medium (25 μ g/ml Kanamycin) angeimpft und weiter geschüttelt, bis eine OD_{550} von 0.3 bis 0.4 erreicht ist. Die Zellen werden in 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt und sofort auf Eis abgekühlt, durch 5 min Zentrifugation bei 4000 Upm (Hettich-Zentrifuge) pelletiert und in 0.15 Vol. eiskaltem TfBI-Puffer aufgenommen. Diese Suspension wird für 10 bis 15 min auf Eis inkubiert und danach abzentrifugiert. Das Zellsediment wird in 0.05 Vol. TfBI-Puffer aufgenommen und für mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Die nun kompetenten Zellen werden entweder sofort transformiert oder in 200 bis 400 μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

M9-Minimalmedium

6 g NaH_2PO_4
 3 g KH_2PO_4
 0.5 g NaCl
 1 g NH_4Cl
 pH 7,4 einstellen, autoklavieren
 Lösungen (steril filtriert) zugeben:
 2 ml 1 M $MgSO_4$
 0.1 ml 1 M $CaCl_2$
 10 ml 20 % Glucose
 1 ml 1 % Thiamin

TfBI-Puffer, pH 5.8

30 mM K-Acetat
 100 mM RbCl
 50 mM $MnCl_2 \times 2H_2O$

	10 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O 15 % (v/v) Glycerin mit 0.2 M Essigsäure auf pH 5.8
<u>TfBII-Puffer, pH 7.0</u>	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O 15 % (v/v) Glycerin mit KOH auf pH 7.0

Beide Lösungen werden steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

12.6.2 Transformation von *E.coli* mittels Hitzeschock und Selektion

12.6.2.1 Standard-Transformation

10µl des Ligationsansatzes oder die entsprechende Menge eines Kontroll-Plasmids und 100µl kompetente Bakterien werden gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach 45 bis 90s Hitzeschock bei 42°C wird der Ansatz 2min auf Eis abgekühlt, mit 800µl bis 1ml SOC oder LB (RT) verdünnt und 45 bis 60min bei 37°C gerollert. LB-Platten (50µg/ml Ampicillin) werden mit den transformierten Zellen beimpft und bei 37°C mindestens 12 h bebrütet.

12.6.2.2 Transformation von TOPO-TA-ligierten Vektoren

50µl *E.coli* TOP10F['] „One Shot“-Zellen und 2µl 0,5M β-Mercaptoethanol-Lösung werden unter vorsichtigem Rühren gemischt und nach Zugabe von 2µl TOPO-Klonierungs-Reaktion 30 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen 30s bei 42°C hitzegeschockt und sofort für 2 min auf Eis gelagert. Der Ansatz wird mit 250µl SOC-Medium (RT) verdünnt und 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Je 50 bis 100µl des Transformationsansatzes werden auf LB/Amp-Platten ausgespatelt und mindestens 12h bei 37°C bebrütet.

12.6.2.3 Blau-Weiß-Selektionierung

Bei Transformationen mit Vektoren, die eine Selektion über Blau-Weiß-Färbung der Kolonien ermöglichen (pGEX5X1, TOPO-pCR® und pGEM T), wurden pro Platte 50 µl einer 100 mM IPTG-Lösung (sterilfiltriert) sowie 50 µl einer X-Gal-Lösung (2 % in Dimethylformamid, sterilfiltriert) ausplattiert und darauf die Bakteriensuspension ausgespatelt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht sollen sich blaue und weiße Bakterienkolonien gebildet haben. Letztere enthalten die erfolgreich mit dem Insert-tragenden Plasmid transformierten Zellen.

Dem Verfahren der „Blau-Weiß-Selektion“ liegt das Hydrolaseverhalten der β-Galactosidase, die vom Gen *lacZ* kodiert wird, zugrunde (Ibelgaufts, 1993). Das Enzym spaltet β-D-Galactoside in Galactose und die entsprechende Alkohol-Verbindung. Das physiolo-

gisch wichtigste Substrat ist Lactose, das in die beiden Monozucker Galactose und Glucose hydrolysiert wird. Ein unphysiologisches Substrat wie X-gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoyl- β -D-galactosid) ergibt nach der Hydrolyse ein farbiges Reaktionsprodukt, den durch Luftoxidation entstehenden schwerlöslichen blauen Farbstoff 5-Brom-4-chlor-Indigo. Zellen, die aktive β -Galactosidase enthalten, bleiben so dauerhaft blau gefärbt. Bei Klonierungen verwendete Wirtsbakterien, die mit der Blau-Weiß-Selektion unterschieden werden sollen, besitzen jedoch nur ein aminoterminal deletiertes *lacZ*-Gen (Δ *lacZ*), so daß keine funktionsfähige β -Galactosidase gebildet werden kann. Die DNA-Region dieses fehlenden Teils ist im sogenannten α -Peptid enthalten, das in einem geeigneten Vektor kodiert vorliegt. Bei erfolgreicher Transformation von Bakterien mit diesem Plasmid erfolgt eine nichtkovalente Reassoziation von diesen zwei enzymatisch inaktiven Peptidfragmenten zur enzymatisch aktiven β -Galactosidase, die die Hydrolyse von X-gal durchführen kann. Der rekonstituierende Vorgang wird als α -Komplementation bezeichnet. Wird durch das Einfügen einer DNA-Sequenz in den kodierenden Bereich des α -Peptids dieser unterbrochen, geht dessen Beitrag zum aktiven Enzymkomplex verloren und die Umsetzung von X-gal findet nicht mehr statt. Die betreffenden Bakterienkolonien bleiben weiß, was ein Indikator für eine erfolgreiche Insertion der Fremd-DNA in das Plasmid ist. Der Induktor IPTG ist ein von *E.coli* nicht hydrolysierbares Zucker-Analogon, welches den *lac*-Repressor blockiert und damit die *lac*-Gene zur Transkription freigibt.

12.6.3 Kolonie-Blotting von *E.coli*-Kolonien zur DNA-Hybridisierung

Für die Suche eines *E.coli*-Klons mit dem gewünschten rekombinanten Vektor aus einer Transformation, von der eine geringe Effizienz erwartet wird, wird eine größere Anzahl von Kolonien auf einen Nitrocellulosefilter transferiert, dort alkalisch lysiert und der gesuchte rekombinante Vektor durch Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde identifiziert.

Mittels steriler Zahnstocher werden zufällig gewählte *E.coli*-Kolonien auf eine Musterplatte und deren Duplikat überimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Transfer erfolgt durch Auflegen eines passenden Nitrocellulosefilters auf die Oberfläche der Agarplatte, bis der Filter mit Feuchtigkeit getränkt ist. Der Filter wird nun mit den anhaftenden Kolonien nach oben nacheinander auf Whatman-Papiere gelegt, die mit folgenden Lösungen getränkt sind:

1. 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl für 5 min (Denaturieren)
2. 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0/1,5 M NaCl für 5 min (Neutralisieren)
3. 2 x SSC 2 x für 5 min (Umpuffern).

Der Filter wird zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet und 2 h bei 80°C inkubiert, um die DNA kovalent mit der Nitrocellulose zu verbinden. Zur Detektion werden die Filter wie in Kapitel 12.4 beschrieben weiterbehandelt.

12.6.3.1 Konservierung von transformierten Bakterien

Zur langfristigen Aufbewahrung der Klone wurden je 180 µl Zellen in LB-Medium mit 820 µl autoklaviertem Glycerin (87% v/v in H₂O) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

12.7 Transformation von *D. discoideum* und Selektion

Das Einführen von Plasmid-DNA der Konstrukte pDEXRH-N-DMIF1, pDEXRH-C-DMIF1 und pSP72-DMIF1-Bsr in *D. discoideum* wurde mit der Elektroporations-Methode nach Howard *et al.* (1988) erreicht. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

12.7.1 Vorbereitung der *D.-discoideum*-Zellen und Elektroporation

Während der einzelnen Schritte wird steril gearbeitet und der Ansatz auf Eis gekühlt. Zellen von *D.-discoideum* werden bis zu einer Dichte von 2 bis 3·10⁶/ml kultiviert, 20 min auf Eis gehalten und abzentrifugiert. Die Zellen werden je einmal mit eiskaltem Soerensen-Phosphatpuffer und Elektroporationspuffer gewaschen und in Elektroporationspuffer zu einer Dichte von etwa 5·10⁷ Zellen/ml aufgenommen. In eine zuvor bei –20°C eingefrorene Elektroporationsküvette (4 mm), die entweder keine (Kontrolle für spätere Selektion) oder 20 bzw. 40 µg Plasmid-DNA in maximal 200 µl Elektroporationspuffer enthält, werden luftblasenfrei 0.8 ml (= 4·10⁷ Zellen) dieser Zellsuspension gegeben und durch sehr kurzes Mixen auf dem Vortex-Mixer mit dem Plasmid vermischt. Die Elektroporation im „Gene Pulser“ erfolgt bei einer Kapazität von 3 µF und einer Spannung von 0.9 kV. Die gemessene Zeitkonstante ist durch den Salzgehalt des Elektroporationspuffer in gewissen Grenzen vorgegeben und sollte bei 0.5 bis 0.6 s liegen. Die Küvette mit den Zellen wird für 10 Minuten auf Eis gekühlt und dann auf 3 Petrischalen verteilt, indem 1 Volumen des Transformationsansatzes in je einen vorgelegten eiskalten Tropfen CaMg (1/4 Volumen) übergeführt wird. Nach einer Regenerationsphase von 15 min bei RT, die dem Schließen der perforierten Zellmembran dient, werden die Zellen mit je 10 ml AX-Medium pro Platte aufgewirbelt und 24 h bei 23°C inkubiert. Die Konzentration der Zellen ist so gewählt, daß sie in diesem Zeitraum zu einer konfluenten Kultur heranwachsen können.

10 mM K-Phosphat, pH 6.1

10 mM K₂HPO₄ x 3 H₂O (Lösung1)
10 mM KH₂PO₄ (Lösung 2)
Lösung 1 und 2 bis pH 6.1 titrieren

Elektroporationspuffer (EP), pH 6.1

10 mM K-Phosphat:
50 mM Saccharose

CaMg-(Recovery)-Puffer

1 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂

12.7.2 Selektion der Transformanten

Die Selektion der Transformanten beginnt einen Tag nach der Transformation und wird entsprechend dem verwendeten Vektor mit Blasticidin S 10 µg/ml (pSP72-DMIF1-Bsr) oder mit Geneticin 10 und 20 µg/ml (pDEXRH-GFP-N-DMIF1, pDEXRH-GFP-C-DMIF1) durchgeführt. Das *bsr*-Gen kodiert die Blasticidin S-Deaminase und verleiht den *D.-discoideum*-Zellen ihre Resistenz gegenüber Blasticidin. Expression des G418-Gens bewirkt, daß *D.-discoideum*-Zellen gegenüber dem eukaryotischen Translationsinhibitor Geneticin resistent werden. Als Kontrolle für das Absterben nicht transformierter Zellen dienen AX2-Zellen, die ohne Plasmid-DNA elektroporiert und wie die anderen Ansätze behandelt werden.

12.7.3 Klonierung und Untersuchung der Transformanten

Das Klonieren der Transformanten erfolgte nach 2 bis 3 Wochen Wachstum in selektionierendem Medium auf SM-Platten ohne Selektionsdruck (Loomis, 1975). Dazu wird das Medium mit dem Antibiotikum von den Transformationsplatten entfernt und die Zellen mit Soerensen-Phosphatpuffer aufgewirbelt. Von einer dicht mit *K. aerogenes* bewachsenen SM-Agarplatte werden 3 Impfösen Bakterien-Zellen steril entnommen und in Soerensen Phosphatpuffer resuspendiert. 100 µl dieser Suspension werden zusammen mit etwa 10 bis 20µl (je nach Dichte der Zellen) der aufgewirbelten *D.-discoideum*-Zellen auf einer SM-Agarplatten ausgespatelt und davon weitere Verdünnungsplatten überimpft, so das man von 50 bis 100 Zellen pro Platte ausgehen und sicher einzelne Kolonien erhalten kann. Die Platten werden 3 bis 4 Tage bei 23°C mit dem Deckel nach unten inkubiert.

Für den Fall der Eliminierung der Plasmide wurden die Original-Transformationsplatten als Reserve bei 4°C aufbewahrt. Bei dem Gen-Unterbrechungs-Konstrukt sollte eine Elimination der integrierten Vektorsequenz ohne Absterben des Klons nicht möglich sein.

Zur weiteren Analyse wurden vom Rand einzelner Kolonien Zellen in Costarplatten in AX-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin überimpft und erneut unter Selektionsdruck gesetzt. Von resistenten Klonen wurden lebende Zellen im Fluoreszenzmikroskop oder als Gesamthomogenat in 3x SDS-Probenpuffer gekocht im Immunoblot (Kapitel 13.2.3) untersucht. Zusätzlich wurden Klone auf je 2 weitere SM-Platten mit *K. aerogenes* für die Untersuchung im Protein-Kolonieblot (Kapitel 13.2.2) und als Reserve mit sterilen Zahnstochern angeimpft.

13 Proteinchemische und - analytische Methoden

13.1 Gelelektrophorese

Für die chromatographische Auftrennung von Proteinen von Zell- oder Proteinproben wird das Verfahren der Gelelektrophorese angewendet. Im Gegensatz zu DNA- oder RNA-Gelen, die in der Regel aus Agarose hergestellt werden, wird hier Polyacrylamid für feinere Porengrößen und damit für bessere Auftrennung verwendet.

13.1.1 SDS-Tris-Glycin-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

Für die diskontinuierliche Natrium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (Laemmli, 1970) werden Trenngele (Standardgele 15x 11x 0,1 cm, "Minigele" 10x 8x 0,05 cm) mit konstanter Polyacrylamid-Konzentration (10, 12, und 14 %ig) und 3%ige Sammelgele gegossen. Während Standardgele einzeln gegossen werden, sind Minigele in einer 10er-Gießkammer mit konstanter Polyacrylamid-Konzentration polymerisiert worden. In Ethanol-gereinigte, mit Spacern auf Abstand gehaltene flach aufeinanderliegende Glasplatten werden mit 1% Agarose abgedichtet, mit der Trenngel-Lösung befüllt und mit Wasser-gesättigter Isobutanol-Lösung überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde die Alkoholschicht vollständig ausgespült, die Sammelgel-Lösung aufgefüllt und mit einge-setzten Probenauftragskammern auspolymerisiert.

Die Proben werden in 1/3 Vol. 3x SDS-Proben-Puffer 5 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert und auf Eis abgekühlt. Auf Minigele werden ca. $5 \cdot 10^5$, auf Standardgele ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen bzw. Zelläquivalente, vom Proteinmarker i.d.R. 10 µl pro Tasche aufgetragen. Die Auftrennung in Minigelen erfolgt mit ca. 20 mA für 1 bis 2 Stunden, in Standardgelen bei 600V/6mA über Nacht.

Trenngel-Puffer, pH 8.8

1.5 M Tris-HCl

0.4 % SDS

Sammelgel-Puffer, pH 6.8

0.5 M Tris-HCl

0.4 % SDS

Trenngel-Lösung, pH 8.8

375 mM Tris-HCl

0.1 % SDS

10 bis 14 % Acryl/Bisacrylamid (30:1, Protogel)

1 mM EDTA

0.2 % APS (v/v)
0.02 % TEMED (v/v)

Sammelgel-Lösung, pH 6.8

125 mM Tris-HCl
0.1 % SDS
3 % Acryl/Bisacrylamid
1 mM EDTA
0.3 % APS
0.05 % (v/v) TEMED

10x Laufpuffer, pH 8.3

250 mM Tris
1.9 M Glycin
1 % SDS

3 x SDS-Probenpuffer, pH 6.8

62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8
2.3 % SDS
10 % (v/v) Glycerin
6 % (v/v) β -Mercaptoethanol
0.001 % Bromphenolblau (nach pH-Einstellung)

Die Proteine wurden entweder durch Coomassie-Brillant-Blau unspezifisch im Gel angefärbt (Kapitel 13.1.4) oder nach Elektrotransfer auf Nitrozellulose-Membranen immunologisch detektiert (Kapitel 13.2).

13.1.2 Tris-Tricine-Gele (Schägger)

SDS-Tris-Tricine-Gele (Schägger und Jagow, 1987) eignen sich insbesondere zur Auftrennung von Proteinen mit kleinen Molekularmassen. Die Vorbereitung der Glasplatten erfolgt analog wie in Kapitel 13.1.1 beschrieben.

Puffer und Lösungen:

Lösung A

Protogel (Acryl/Bisacrylamid 30:1)

Lösung B (Gelpuffer), pH 8.5

3 M Tris-HCl
0.3 % SDS

10x Anodenpuffer, pH 8.9

2 M Tris-HCl

10x Kathodenpuffer

1 M Tris

1 M Tricine

1 % SDS

Pipettierschema für 1 Gel:

	Trenngel 16%	Sammelgel
Lösung A	16 ml	1 ml
Lösung B	10 ml	4 ml
H ₂ O	4 ml	7 ml
TEMED	15 bis 20 µl	10 µl
APS 10%	200 µl	100 µl

Laufbedingungen: das Trenngel wird mit 0.1% SDS oder Lösung B (1:2 verdünnt) überschichtet, Lauf entweder 3 h mit 30 V, und über Nacht mit 60V, RT oder Einlauf mit 30 V, dann 6 h mit 45 mA (90-100V)

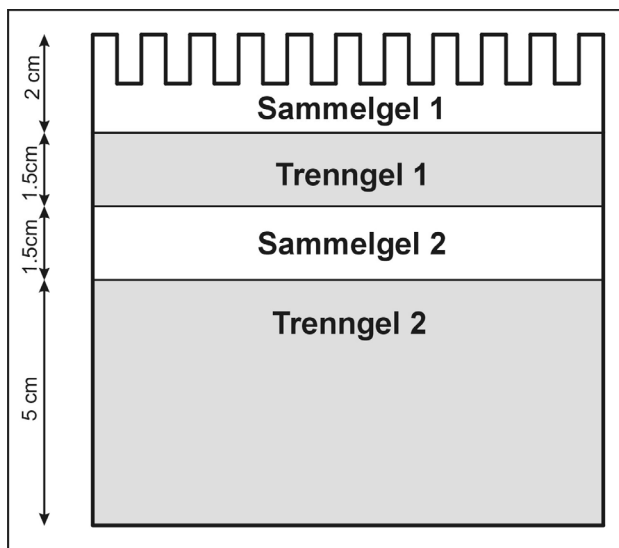
13.1.3 2-Phasen-SDS-Gele

Abbildung 13-1 Aufbau eines 2-Phasen-Gels
(nach Kubis und Gros, 1997)

Das Verfahren beruht auf dem Durchlauf von 2 nacheinander befindlichen Trenngelen mit jeweils eigenem Sammелgel (Kubis und Gros, 1997). Dabei wird das Trennverhalten durch kombinierte Variation des Acrylamid-Anteils und des pH-Wertes aller Phasen beeinflusst. Mit einer Variante (A) werden Auftrennungen von sehr eng beieinanderliegenden Proteinbanden im mittleren Molekularmassen-Bereich möglich. Bei entsprechender Erhöhung des Acrylamidanteils im Gel (Variante B) können auch sehr kleine Proteine erfolgreich separiert werden.

Gelpuffer A, pH 8.8

1.5 M Tris-HCl

0.4 % SDS

Gelpuffer B, pH 6.8

0.5 M Tris-HCl

0.4 % SDS

Gelpuffer C, pH 8.8

2 M Tris-HCl

0.6 % SDS

Pipettierschema für 1 Gel (Variante A):

	Sammelgel 1	Trenngel 1	Sammelgel 2	Trenngel 2
Eigenschaften	3.5 %	6.6 %	6.6 %	8.8 %
	pH 6.8	pH 8.8	pH 6.8	pH 8.8
Komponenten	10 ml	10 ml	10 ml	50 ml
Gelpuffer A, pH 8.8	-	3.7 ml	-	18.3 ml
Gelpuffer B, pH 6.8	3.1 ml	-	3.7 ml	-
30 % Bis-Acrylamid	1.2 ml	2.2 ml	2.2 ml	14.7 ml
Glycerin 87 %	-	550 µl	1.7 ml	14.1 ml
H ₂ O	5.5 ml	3.5 ml	2.3 ml	2.7 ml
Bromphenolblau	100 µl	-	100 µl	-
TEMED	10 µl	7 µl	7 µl	35 µl
APS 10%	60 µl	40 µl	60 µl	200 µl

Pipettierschema für 1 Gel für kleine Fragmente (Variante B):

	Sammelgel 1	Trenngel 1	Sammelgel 2	Trenngel 2
Eigenschaften	3.5 %	8.8 %	8.8 %	14 %
	pH 6.8	pH 8.8	pH 6.8	pH 8.8
Komponenten	10 ml	10 ml	10 ml	50 ml
Gelpuffer A, pH 8.8	-	3.7 ml	-	-
Gelpuffer B, pH 6.8	3.1 ml	-	3.7 ml	-
Gelpuffer C, pH 8.8	-	-	-	13.7 ml
30 % Bis-Acrylamid	1.2 ml	2.9 ml	2.9 ml	23.3 ml
Glycerin 87 %	-	550 µl	1.7 ml	12.9 ml
H ₂ O	5.5 ml	2.8 ml	1.6 ml	-
Bromphenolblau	100 µl	-	100 µl	-
TEMED	10 µl	7 µl	7 µl	35 µl
APS 10%	60 µl	40 µl	60 µl	200 µl

13.1.4 Anfärbung von Proteinen im Gel mit Coomassie-Blau

In der Regel erfolgt der Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen durch Färbung mit einer 0.25%igen Coomassie-Brillant-Blau-Lösung für 10 bis 60 min. Anschließend wird das

Gel für 30 min bis mehrere Stunden in Entfärberlösung geschüttelt, um den Farbstoff aus dem Gel-Hintergrund zu entfernen.

<u>Färbelösung</u>	0.25 % Coomassie-Blue R250 50 % Methanol 10 % Eisessig die Lösung durch einen Faltenfilter filtrieren
<u>Entfärbelösung</u>	10 % Methanol 10 % Eisessig

13.1.5 Trocknen von Gelen

Gefärbte Gele können zur Aufbewahrung getrocknet werden, indem sie 2 x 20 min in 25 % Ethanol/ 5 % Glycerin äquilibriert und über Nacht zwischen zwei Folien im Rahmen eingespannt werden.

13.2 Transfer und Detektion von Proteinen

13.2.1 Transfer aus Gelen

Proteine werden mit der "Semi-Dry"-Technik aus SDS-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen transferiert (Towbin et al., 1979). Drei auf die Größe des Gels zugeschnittene Whatman-Papiere (3MM) werden mit Transferpuffer befeuchtet und auf die Graphit-Anode der Transferkammer gelegt. Die ebenfalls mit Transferpuffer benetzte Nitrocellulose-Membran und anschließend das Gel werden luftblasenfrei darauf gelegt. Den Abschluß bilden weitere drei feuchte Whatman-Papiere. Die Graphitkathode wird leicht angedrückt und mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgt für 2 bis 3 h bei einer Stromstärke von 0.8mA/cm^2 .

<u>Transfer-Puffer</u>	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,04 % SDS 20 % (v/v) Methanol
------------------------	---

13.2.2 Kolonie-Dot-Blotting von *D.-discoideum*-Kolonien zur Protein-Detektion

Die Protein-Kolonie-Blotting-Methode (Wallraff et al. 1986; Wallraff und Gerisch, 1991) wurde zum Testen transformierter *D.-discoideum*-Klone auf Knockout-Klone durchgeführt. *D.-discoideum*-Kolonien werden von SM-Agarplatten auf Nitrozellulose-Filter übertragen und

durch Einfrieren der Filter auf eine mit Trockeneis gekühlte Aluminiumplatte (Kolonien nach oben) lysiert. Die Filter werden anschließend bei RT 2 bis 4 h mit 1x NCP unter mehrmaligem Pufferwechsel gewaschen, zur Denaturierung der Proteine 5 min in 0,1 % SDS-Lösung bei 80°C inkubiert und nochmals mit 1xNCP gewaschen. Für Immunmarkierungen werden die Filter wie unter 13.2.4 beschrieben weiterbehandelt.

13.2.3 Färben von Protein-Blots

Nach dem Blotten aus Gelen oder als Dot-Blot lassen sich die auf die Nitrozellulose-Membran transferierten Proteine vor der Antikörperinkubation direkt und reversibel mit Ponceau-Rot (Sigma) anfärben. Dazu werden die Blots ca. 5 min in der Färbelösung geschwenkt und der schwach gebundene Farbstoff mit H₂O wieder abgespült, bis Protein-Banden sichtbar werden. Zur vollständigen Entfärbung werden die Filter in 1x NCP-Puffer geschüttelt.

<u>10x Ponceau-Rot-Färbelösung</u>	2 % Ponceau S
	30 % TCA

13.2.4 Immundetektion im Western

Die Immunmarkierung dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen auf einer Trägermembran (i.d.R. Nitrozellulose), die darauf durch Transfer aus Gelen (13.2.1) oder durch direktes Abklatschen von *Dictyostelium*- (13.2.2) bzw. Bakterien-Zellen (12.1.4) immobilisiert wurden. Die Detektion erfolgt durch Farbstoffbildung oder radioaktiv.

Puffer und Lösungen

<u>10 x NCP (TBS-Tween), pH 7.4</u>	100 mM Tris-HCl
	1,5 M NaCl
	0,5 % (v/v) Tween 20
	0,2 % NaN ₃

<u>2x Blocking-Puffer</u>	8 % BSA
	0.2 % NaN ₃
	in 1x NCP

<u>NCP-Antikörper-Puffer</u>	4 % BSA
	0.1 % NaN ₃
	in 1x NCP

<u>1x Carbonatpuffer, pH 10.2</u>	100 mM (10.6 g/l) Na ₂ CO ₃ 800 ml H ₂ O pH mit HCl auf 10.2 einstellen mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
<u>BCIP-(Alk.-Phosphatase-Substrat)-Lösung</u>	0.2 mg/ml BCIP in Carbonatpuffer
<u>NBT- Nachfärbe-Lösung</u>	0.33mg/ml in Carbonatpuffer
<u>10x TBS, pH 7.4</u>	60.6 g/l Tris-HCl 87.6 g/l NaCl, ohne NaN ₃ !
<u>TBS-Antikörperpuffer, pH 7.4</u>	5 % BSA in 1x TBS
<u>Peroxidase-Substrat-Lösung (frisch!)</u>	Substrat: 4-Chlor-1-Naphtol (Sigma) 2 ml 0.3 % (3mg/ml) Substrat in Methanol 10 ml 1x TBS 10 µl H ₂ O ₂ (direkt vor Gebrauch)

Nachweis durch Alkalische Phosphatase-Reaktion mit BCIP/NBT

Die Membran wird 3x 10min in 1x NCP gewaschen und für mindestens weitere 30 min in 1x Blocking-Puffer abgeblockt. Anschließend wird die Membran mit dem Primär-Antikörper (unverdünnter Hybridoma-Kulturmedium-Überstand oder aufgereinigter Antikörper in 4% BSA/NCP, ca. 10 bis 20 µg/ml) 2 h bis über Nacht auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Ungebundene Antikörper werden durch 3x 10 min Waschen in 1x NCP entfernt. Der an Alkalische-Phosphatase-gekoppelte Sekundär-Antikörper (Verdünnung in Antikörperpuffer gemäß Herstellervorschrift) wird mindestens 2 h bei RT unter Schütteln zugegeben. Nach 3x 10 min Waschen in 1x NCP wird mit 5 min mit 1x Carbonat-Puffer umgepuffert, um das für die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase notwendige alkalische Milieu zu schaffen. Das Substrat BCIP wird bis zur Bildung des Farbkomplexes (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo) 15 bis 60 min umgesetzt. Die Farbreaktion wird mit H₂O gestoppt. Falls das Signal zu schwach ist, kann mit NBT 30 bis 60 min nachgefärbt werden. Die Blots werden getrocknet und lichtgeschützt gelagert.

Nachweis durch Peroxidase-Reaktion

Die Membran wird nach dem Blotten und 15 min Waschen in 1x NCP für 15 min in 1x TBS umgepuffert und mit 5% BSA in 1x TBS mindestens 1 h blockiert. Der Primärantikörper (direkter Kulturüberstand oder Verdünnung in TBS-Ak-Puffer) wird für 2 h bis über Nacht inkubiert. Überschüssige Lösung wird anschließend durch 3x Waschen in 1x TBS entfernt. Die Membran wird mindestens 2 h mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundär-Antikörper (1:1000 verdünnt) inkubiert und danach 6x 5 min mit 1x TBS gewaschen. Die Entwicklung des Farbstoffs erfolgt mit frisch angesetzter Substrat-Lösung.

Radioaktiver Nachweis

Zum radioaktiven Nachweis mit höherer Sensitivität wurden aufgereinigte Primär-Antikörper (14.5) mit ^{125}I -NaI -Markierung verwendet. Die Markierung des mAk 236-173-2 wurde freundlicherweise von Gerhard Rahn/MPI mittels Chloramin T durchgeführt.

Die Inkubation von NCP-äquilibrierten und geblockten Membranen mit diesem Ak erfolgte für 2 h, anschließend wurden die Blots in NCP gewaschen und in Folie eingeschweißt. In Filmkassetten mit Verstärkerfolie wurden die Signale bei -80°C auf Röntgenfilmen (X-omat AR-5) detektiert.

Anstelle von Enzym-gekoppelten Sekundär-Antikörpern stand ein ebenfalls mit ^{125}I radioaktiv markierter Schaf-anti-Maus-Ak (SAM) zur Verfügung. Nach einer Inkubation der Membranen mit SAM für 2 h und nachfolgenden Waschschritten in NCP erfolgte die Auswertung ebenso autoradiographisch.

13.3 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien und Aufreinigung

13.3.1 Expression von β -Gal-Fusionsproteinen in *E.coli* RY1090⁻

Bei der Konstruktion der λ gt11-Phagenbank wurden die „fremden“ *Dictyostelium*-Sequenzen in das *lacZ*-Gen kloniert, so daß die „Fremdproteine“, in dem vorliegenden Fall DMIF1, als Teil eines β -Galactosidase-Fusionsproteins in RY1090⁻ exprimiert werden. Die Induktion erfolgt durch die Aktivierung des *lac*-Promotors mit IPTG bei 37°C über Nacht (vgl. Kapitel 12.1).

13.3.2 Präparation von GST- DMIF1 – Das Fusionsprotein als Antigen zur Immunisierung von Mäusen

13.3.2.1 Induktionstest in *E.coli* der JM-Serie

Nährmedium Starterkultur

3 ml LB-Medium

	100 µg/ml Ampicillin
<u>Nährmedium Hauptkultur</u>	10 ml LB-Medium
	100 µg/ml Ampicillin
	2 % Glucose

Sowohl das GST-DMIF1-Fusionsprotein als auch das verkürzte Protein GST-DMIF1 Δ 3 wurden in *E.coli* JM 83 und JM109 exprimiert. Für die Expression des Voll-Länge-Fusionsproteins wurden kompetente *E.coli*-JM109- bzw. JM83-Zellen nach der Hitzeschock-Methode (12.6) mit dem Plasmid pGEX-GST-DMIF1 transformiert und mit Ampicillin (50µg/ml) und α -Komplementation selektioniert. Für den Expressionstest wurden 7 Klone (je 3 aus F68-7 und F68-8 in JM109 und einer aus F68-8 in JM83) ausgewählt. Die richtige Basenfolge wurde durch DNA-Sequenzierung mit den Primern pgexfw und pgexrev ermittelt.

Zum Animpfen einer Starterkultur wurde ein steriler Zahnstocher in den gefrorenen *E.coli*- Zellkuchen einer bei -80°C gelagerten Glycerin-Kultur (12.6.3.1) eingestochen, in ein Reagenzglas mit vorgelegtem Nährmedium überführt und im Rollerinkubator bei 37°C über Nacht kultiviert. 500 µl der Starterkultur wurden in ein Erlenmeyerkölbchen in Hauptkultur-Medium verdünnt und mit 260 Upm bei 37°C amplifiziert. Das Wachstum wurde über OD-Messungen ($\lambda = 600\text{nm}$) kontrolliert und sollte bei 0.8 bis 0.9 liegen.

Die Induktion erfolgte mit IPTG in einer Endkonzentration von 0.1 mM bei 30°C und 37°C . Zur Analyse in der SDS-PAGE erfolgte stündliche Probennahme von 0 bis 4 h. Je 500 µl der Bakteriensuspension wurden 30s mit 14.000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet N_2^{liq} -schockgefroren und 3 min im Wasserbad bei 100°C in 50 µl 3x SDS-Probenpuffer denaturiert. Die Induktion von GST-DMIF1 Δ 3 und Probennahme zum Kartieren der Antikörper (Kapitel 14) fand analog statt.

13.3.2.2 Expression von GST-DMIF1 zur Aufreinigung

Eine 200 ml- Vorkultur wurde von einer frischen *E.coli*-Agarplatte mittels Zahnstocher beimpft und über Nacht bei 30°C und 270 Upm im Erlenmeyerkolben angezogen. Die Bakterien der daraus angesetzten 2- Liter-Hauptkultur (in 5 Kolben à 400 ml) wurden bis zur OD 0.9 bei 30°C und 270 Upm vermehrt und anschließend 3h mit 0.1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden 20min mit 8000xg bei 4°C sedimentiert, einmal mit 1/20Vol. 1x PBS (eiskalt) gewaschen, und das nach Absaugen des Überstandes in N_2^{liq} schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Ein zweiter Ansatz erfolgte mit einer 3.3- Liter-Kultur aus einer 300 ml-Startkultur und Induktion mit 0.1 mM IPTG über 24h bei 30°C und 270 Upm. Die gewaschenen Pellets wurden ebenso in N₂^{liq} schockgefroren und bei –80°C gelagert.

13.3.2.3 Zellaufschluß von *E.coli* in der “French Pressure Cell”

Bei der “French Pressure Cell” handelt sich um eine hydraulische Presse, die mit ihrem Kolben in einen Stahlzylinder, der mit einer sehr dichten Bakteriensuspension (ca. $2 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml) gefüllt ist, drückt und dabei einen Überdruck von mehr als 10^7 Pa erzeugt. Am gegenüberliegenden Ende des Kolbeneintritts befindet sich ein Auslaßröhrchen mit einem Durchmesser von 3 mm. Bei dessen Öffnung treten die Bakterien durch diese aus und erleiden dabei einen plötzlichen massiven Druckabfall, der die Zellen zum Platzen bringt.

Alle folgenden Schritte finden zum Schutz vor proteolytischen Abbau bei 4°C oder, wenn möglich, auf Eis statt. Die Pellets werden in jeweils 110 ml 1xPBS resuspendiert und in den vorgekühlten Stahlzylinder gefüllt, dieser wird verschlossen und der Kolben bei geöffnetem Auslaßventil so lange nach oben bewegt, bis die Zelle weitgehend frei von Luft ist. Nun wird das Ventil geschlossen, der Stahlzylinder in der Hydraulikpresse fixiert und ein Druck von $1,2 \times 10^7$ Pa (1200 psig) eingestellt. Dann wird sehr vorsichtig das Auslaßventil so weit geöffnet, daß das Bacterienlysat langsam in ein auf Eis stehendes 50-ml-Röhrchen tropft. Der Vorgang wird in 3 Volumen-Ansätzen je 3x wiederholt. Zur Vervollständigung des Aufschlusses wird TritonX100 (1% Endkonzentration) zugegeben und 30 min bei 4°C geschwenkt. Ungespaltene Zellen und Zell-Bruchstücke werden durch 10 min Zentrifugieren mit 12.000xg (A6.14-Rotor) bei 4°C entfernt. Der geklärte Überstand, der die löslichen Proteine enthält, wird weiterverarbeitet. Von Überstand und Pellet werden Aliquots in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem SDS-Minigel analysiert.

13.3.3 Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose

Für die Aufreinigung des GST-DMIF1-Proteins aus dem geklärten Überstand des Zellaufschlusses (13.3.2.3) wird Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia) als Gelbett-Matrix vorbereitet (Protokoll Pharmacia, 1993). Die 75% (v/v) Glutathion-Sepharose4B-Dispersion wird gut gemischt, ein entsprechendes Volumen entnommen (hier 2 ml für 3 Liter Kulturvolumen: 0.5 ml Gelbettvolumen/Liter Kulturvolumen; 1.33 ml Dispersion/ml Gelbettvolumen) und bei 500xg 5min abzentrifugiert, um den 20% Ethanol enthaltenden Konservierungspuffer zu entfernen. Die Matrix wird einmal mit 15 ml 1x PBS gewaschen und erneut sedimentiert. In frischem PBS resuspendiert wird eine kleine Chromatographie-Säule (Biorad) luftblasenfrei befüllt und mit 5 bis 10 Gelbett-Volumina PBS äquilibriert.

Der Überstand wird mit 0.5ml/min auf die vorbereitete Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen, über Nacht zirkulieren gelassen und mit PBS gewaschen. Das Produkt wird mit 25 mM reduziertem Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8.8 mit 0.5ml/min in 3ml-Fraktionen eluiert. Vom geladenen Überstand, dem Durchlauf durch die Säule, der Waschfraktion und jeder Elutionsfraktion werden Proben zur Analyse auf einem SDS-Gel genommen.

Die GST-DMIF1- haltigen Fraktionen 2 bis 12 werden vereinigt (ca. 33ml), mit Centriprep 3K-Zentrifugations-Filtrierröhrchen etwa 3fach ankonzentriert und gegen physiologische Kochsalz-Lösung (0.9% NaCl) über 3 Tage bei 4°C dialysiert. In dieser Form wurde es zur Immunisierung von Mäusen verwendet (14.1).

Das Gelbett läßt sich durch einen weiteren Überschuß an 25 mM reduziertem Glutathion stripfen und wiederverwenden.

13.3.4 Abspaltung des GST- tags

Das Reporter-gen GST läßt sich aus dem Fusionsprotein an der eingeführten FaktorXa-Spaltstelle abtrennen (Protokoll Pharmacia, 1993). Als Ausgangsmaterial dient dialysiertes aufgereinigtes GST-DMIF1-Protein (13.3.3). Dabei sind zwischen 1/50 bis 1/100 der zu spaltenden Proteinmenge an FaktorXa einzusetzen, d.h. etwa 10µg FaktorXa/mg Protein.

FaktorXa-Spaltpuffer, pH 7.5

50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl

Reaktionsansatz 5 ml

3.5 ml GST-DMIF1 (4.9 mg)
5 µl FaktorXa in Spaltpuffer (50 µg)
1.5 ml Spaltpuffer
0.5 mg CaCl₂·2H₂O

Der Ansatz wird in eine 5 ml-Spritze aufgezogen und bei 4°C langsam rotieren gelassen. Wesentliche Mengen des Fusionsproteins sind nach 19 h nahezu, und nach 43h vollständig gespalten.

13.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

13.4.1 Mit BSA-Standard

Die Protein-Konzentration wird anhand einer BSA-Verdünnungsreihe im Coomassiegefärbten Gel bestimmt. Dazu werden die Bandenintensitäten nach Augenmaß verglichen. Allerdings handelt es sich um eine sehr grobe Methode, die einerseits das unterschiedliche

Färbeverhalten des Coomassie-Blau-Farbstoffs von verschiedenen Proteinen und die ebenso subjektive Wahrnehmung des Beobachters einschließt, andererseits nur auf gereinigte Proteinproben anwendbar ist.

13.4.2 Nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit dem Bradford-Reagens (BioRad) bestimmt. Das Prinzip beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brillant-Blau G-250 von 465 nm nach 595 nm nach dessen Bindung an die basischen und aromatischen Aminosäuren eines Proteins (Bradford, 1976). Das Signal (OD) wird mit einer Eichgeraden verglichen. Dazu werden Verdünnungsreihen eines Standards pipettiert und je 800 µl mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt. Der lineare Meßbereich liegt zwischen 1 und 20 µg Protein. Entsprechend werden die Meßproben, i.d.R. 10-50 µl auf 800 µl verdünnt und mit 200 µl Bradford-Reagenz gründlich gemischt. Nach 5 min Inkubation wird die OD_{595} in Einmal-Plastikküvetten im Photometer gemessen. Detergenz-Konzentrationen über 0.1% stören die Messung. Mit der Methode wurden Konzentrationen von aufgereinigten Antikörperlösungen bestimmt.

13.4.3 BCA- Protein- Assay

Beim BCA-Protein-Assay (Pierce) wird die Reduktion von $Cu^{2+} \rightarrow Cu^{1+}$ in alkalischem Milieu und die anschließende colorimetrisch meßbare Umsetzung mit Bicinchoninic-Säure (BCA) zu einem rot gefärbten $(BCA)_2-Cu^{+1}$ -Chelat-Komplex ausgenutzt (Smith et al 1985). Er zeigt bei 562 nm starke Absorption. Auch hier dient BSA als Standard zur Bildung einer Eichgeraden. Der Meßbereich liegt zwischen 5-2000 µg/ml.

Arbeitsverdünnung

50 Vol. Reagenz A

1 Vol. Reagenz B

Reaktionsansatz

100 µl Proteinprobe (z.B. Lysat aus 10^6 Zellen,
oder Standardverdünnung, Puffer)

2 ml Arbeitsverdünnung (50:1)

Nach dem Mischen werden die Proben und Standards 30 min bei 37°C inkubiert, dann auf RT gekühlt und im Photometer bei 562nm gegen eine Wasser-Referenz vermessen.

13.5 Aufreinigung von Mitochondrien und Präparation von Vesikeln

Zunächst werden Mitochondrien aus einer *Dictyostelium*-Zellkultur präpariert (Troll, et al., 1992) und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Owen und Kaback,

1978). Letztere führt zum Zerreißen der Organellen in Membranteile, die zu Vesikeln reassoziieren können. Dabei entstehen Vesikel mit Doppel- und Einzelmembranen, die sich in der ursprünglichen Orientierung (RSV: "right side" Vesikel) oder umgekehrt dazu, d. h. mit der ursprünglichen inneren Membran außerhalb und der ursprünglichen äußeren Membran innerhalb (IOV: "inside-out" Vesikel) anordnen. Auch Einzelmembranen können derart umgestülpt vorliegen.

Alle Schritte finden bei 4°C bzw. auf Eis statt. 2500ml Zellen einer exponentiell gewachsenen axenischen AX2-Kultur werden bei einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml geerntet und nach 2x Waschen in Soerensen-Phosphatpuffer durch Resuspension in S-Puffer (s.u.) zu $2 \cdot 10^8$ Zellen/ml verdichtet. In der Parr-Bombe werden die Zellen durch plötzliche Entspannung eines zuvor angelegten Überdruckes (1000 psi) lysiert. Fraktionierende Zentrifugationen bei 4°C ermöglichen die Präparation der Mitochondrien aus dem Zell-Lysat nach folgendem Schema:

1. Schritt: Zellpartikel und Bruchstücke werden durch 20 min Zentrifugation mit 27.000xg von löslichen Bestandteilen abgetrennt. Das Pellet wird mit dem gleichen Volumen des abgenommenen Überstandes S-Puffer resuspendiert.

2. Schritt: Bei 400xg (5 min) werden aus dem resuspendierten Pellet ungespaltene Zellen von kleineren Partikeln separiert. Der Überstand wird abgenommen und enthält neben anderen Organellen die Mitochondrien.

3. Schritt: Die Mitochondrien werden aus dem Überstand durch 10 min Zentrifugation bei 16.000xg sedimentiert und so von weiteren kleineren Bruchstücken und Membranteilen, die im Überstand bleiben, abgetrennt.

4. Schritt: 33 ml Percoll (30% (v/v) in S-Puffer) werden in Quick Seal Röhrchen (Beckman) vorgelegt und 2 ml der Mitochondriensuspension auf die Oberfläche gegeben. Die Röhrchen werden zugeschweißt und in der UZ mit 100.000xg 1h zentrifugiert (VTi-50 Ausschwenk-Rotor, 35.000Upm). Die Mitochondrien werden im Percollgradienten in einer Dichte-Fraktion angereichert.

5. Schritt: Ultraschallbehandlung: 2 min mit Branson Standard-Mikrospitze bei Stufe 4, Leistungsabgabe 20%, auf Eis.

Von sämtlichen Fraktionen wurden Proben für die Analyse im SDS-PAGE genommen (13.2). Die Vesikel-Suspension wurde im TEM analysiert.

<u>S- Puffer</u>	200 mM Saccharose	<u>100x PIC</u>	2.5 mg Bestatin
	20 mM Tris-HCl pH 8.0		5 mg Pepstatin
	1 mM EGTA		5 mg Antipain
	10 mM Benzamidinhydrochlorid		5 mg Leupeptin
	2 mM Dithiothreitol		in 50 ml Methanol
	0.5 mM PefablocSC®		
	1:100 Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)		
	1:100 Trasylol		

14 Immunologische und zellbiologische Methoden

14.1 Hybridoma-Gewinnung

14.1.1 Prinzip

Durch die Fusion von Milzzellen (B-Lymphozyten) mit Myelomzellen werden sogenannte Hybridomzellen erhalten (Köhler und Milstein, 1976). Diese vereinigen in sich die Eigenschaften der Ausgangszellen (Peters, 1990), nämlich Antikörperproduktion (B-Lymphozyten) und Teilungsfähigkeit (Myelomzellen). Um diese Hybridomzellen selektionieren zu können, werden Myelomzelllinien zur Fusion verwendet, die keine Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase (HGPRT) besitzen. Diese Zellen sterben in einem Kulturmedium ab, das mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin supplementiert ist. Da auch Milzzellen nicht in der Lage sind, in Kultur zu überleben, werden bei diesem Selektionsmedium nur Fusionsprodukte aus B-Lymphozyten und Myelomzellen wachsen können. Die Milzzelle steuert das Enzym HGPRT bei, so daß die Purinsynthese über Hypoxanthin ("salvage pathway") ablaufen kann. Die *de novo* Biosynthese von dTMP ist durch Aminopterin, das die Dihydrofolatreduktase hemmt, blockiert. Die Myelomzelle bringt ihrerseits die Teilungsfähigkeit in die Fusion ein, die Hybridomzelle kann sich somit vermehren.

14.1.2 Immunisierung von Balb/c-Mäusen

Zur Herstellung von Antikörpern gegen DMIF1 wurden 2 weibliche, 4-6 Wochen alte Balb/c-Mäuse mit 50-150 µg GST-DMIF1 in PBS, dialysiert gegen physiologische Kochsalzlösung (13.3.3) unter Zusatz verschiedener Adjuvantien (Alugel S und Pertussis-Toxin) von C. Heizer, Dr. Gerisch und Dr. Faix (alle MPI für Biochemie, Abt. Zellbiologie) intraperitoneal immunisiert. Die gewählte Antigenmenge sollte zwischen 10 µg und 500 µg pro Immunisierung liegen (Baumgarten et al., 1990, Harlow und Lane, 1988).

Immunisierungsprotokoll

Maus 1 (Fusion272) am 1. Tag:	50 µg GST-DMIF1 in 100 µl Puffer + 20 µl Alugel S [Al(OH) ₃]
am 15. Tag:	75 µg GST-DMIF1 in 100 µl Puffer + 50 µl Pertussis-Toxin
am 29. Tag:	100 µg GST-DMIF1 in 100 µl Puffer + 20 µl Alugel S
am 46. Tag:	120 µg GST-DMIF1 in 143 µl Puffer + 50 µl Pertussis-Toxin
am 57. Tag:	100 µg GST-DMIF1 in 100 µl Puffer + 20 µl Alugel S
am 58. Tag:	150 µg GST-DMIF1 in 150 µl Puffer ohne Adjuvans
am 60. Tag:	Milzentnahme

Maus 2 (Fusion271) am 1. Tag:	100 µg GST-DMIF1 in 100 µl Puffer + 100 µl komplettes Freund'sches Adjuvans
am 58. Tag:	100 µg GST-DMIF1 in 100 µg Puffer + 100 µl inkomplettes Freund'sches Adjuvans
am 60. Tag:	Milzentnahme

14.1.3 Präparation von B-Lymphozyten

Fusion und Klonierung der Hybridomzellen wurden mit der freundlichen Unterstützung von Alicija Baskaya und Mary Ecke (MPI für Biochemie, Abt. Zellbiologie) durchgeführt. Die Milz einer immunisierten Maus wird unter sterilen Bedingungen präpariert und in 5 ml kaltem RPMI-1640-Medium ohne Hapes (RPMIoH) mit Skalpell und Pinzette von Fettgewebe befreit und fein zerkleinert. Größere Bestandteile werden mit Hilfe eines Glashomogenisators vorsichtig in Einzelzellen aufgelöst. Diese Zellsuspension wird anschließend durch eine mit Kunstfaserwolle gestopfte Spritze filtriert, um noch restliche gröbere Bestandteile abzutrennen. Die B-Lymphozyten werden zweimal mit kaltem serumfreien RPMIoH-Medium gewaschen (Hettich-Zentrifuge; 1500 Upm, 5 min, 4°C), anschließend in 5 ml RPMIoH-Medium (RPMI ohne HEPES-Puffer) aufgenommen und auf Eis gestellt.

14.1.4 Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen

Für die Fusion mit den Milzzellen beider Mäuse wurde der Myelomstamm PAIB₃Ag81 verwendet. Milzzellen und Myelomzellen sollen im Verhältnis von 2:1 fusioniert werden, d.h. jeweils die Zellen einer Milz (entspricht etwa 10⁸ Lymphozyten) in 5ml RPMIoH-Medium und 5·10⁷ Myelomzellen in 5ml RPMI-Medium werden gemischt. Dieser Ansatz wird auf zwei 50-ml-Röhrchen verteilt, zentrifugiert (1500 Upm, 5 min, 4°C) und mit 5 ml RPMI-Medium gewaschen. Die Zellen werden dann in ein 37°C-Wasserbad überführt, mit einer Pasteurpipette aufgewirbelt und mit 0,5 ml einer PEG-Lösung (1 g PEG, M_r = 4000 g/mol, in 5 ml 0,9%iger

NaCl-Lösung, steril filtriert) versetzt. Die Zellsuspension wird nochmals mit einer Pasteurpipette leicht gemischt und dann 1 min im Wasserbad (37°C) leicht geschüttelt. Nach der Inkubation von 1 min bei RT werden dann innerhalb von 5 min tropfenweise und unter leichtem Schütteln des Röhrchens im Wasserbad 10 ml RPMI α H-Medium zupipettiert. Die Suspension wird zentrifugiert, das Sediment in 125 ml Normalmedium + 5 % Bri Clone aufgenommen und auf 10 Costarplatten verteilt (0,5 ml pro Loch). In jedes dieser Löcher wurden am Tag zuvor 0,5 ml einer Makrophagensuspension pipettiert.

Die Platten werden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95,5 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. 24 Stunden nach der Fusion werden pro Loch 0,5 ml des 3 x HAT-Selektionsmediums + 5 % Bri Clone zugegeben. Das Medium wird dreimal wöchentlich gewechselt, wobei nach 14 Tagen HAT-Medium durch HT-Medium ersetzt wird und nach einem weiteren Mediumwechsel Normalmedium verwendet wird.

14.1.5 Herstellung der Makrophagensuspension

Zur Isolierung von Makrophagen als Feederzellen für die frischen Hybridoma-Zellen werden 10ml Normalmedium unter sterilen Bedingungen in die Bauchhöhle einer durch Genickdislokation getöteten Maus injiziert und zur Lösung der Makrophagen in das Medium geschwenkt. Das Medium wird wieder entnommen und der ganze Vorgang mit frischem Medium 2x wiederholt. Die Makrophagen werden abzentrifugiert (1000Upm, 5min, 4°C, Hettich-Zentrifuge), 2x mit Normalmedium gewaschen und in 125ml Normalmedium + 5% Bri Clone aufgenommen. Diese Makrophagensuspension ist bei 4°C 3 Tage lang verwendbar.

14.2 Testen der Überstände und Klonieren der Hybridomzellen

14.2.1 Western-Test

Sobald Klone sichtbar werden und sich das Medium gelblich verfärbt (Umschlag des zugesetzten pH-Indikators wegen Ansäuerung des Mediums aufgrund von Stoffwechselprodukten), werden die Überstände der einzelnen Löcher auf Antikörper getestet. Dazu werden Westernblot-Teststreifen, die AX2-Zellhomogenat einerseits und Homogenat der Transformante *GFP-N-DMIF1* enthalten mit den Kulturüberständen über Nacht inkubiert und am folgenden Tag mit Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus) und anschließender BCIP-Reaktion detektiert (13.2.4). Hybridomzellen, die eine etwa 14kDa-Bande im AX2-Blot und eine 14kDa sowie eine etwa 40kDa-Bande im *GFP-N-DMIF1*-Blot zeigen, werden kloniert. Als weiteres Auswahlkriterium dient der ELISA-Test (14.2.2).

Zur Klonierung werden die Zellen aufgewirbelt und mit Normalmedium verdünnt. Aus dieser Suspension werden dann mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette kleine Tropfen

in die Löcher einer Mikrotiterplatte (96-Loch-Platte) pipettiert. Löcher, die Tropfen mit nur einer Zelle enthalten, werden mit 2-3 Tropfen einer Makrophagensuspension und der gleichen Menge an Normalmedium aufgefüllt. Nach 5-10 Tagen werden die klonierten Zellen, die sich vermehrt haben, nochmals im Western und ELISA getestet. Hierzu werden die Nitrocellulosestreifen auf Parafilm gelegt, mit dem Hybridomüberstand überschichtet und in einer feuchten Kammer inkubiert. Klone, die erneut ein positives Signal ergeben, werden wieder auf Costarplatten überimpft und anschließend in Gewebekulturflaschen (5-ml-, dann 50-ml) übertragen und der Mediumüberstand als antikörperhaltige Lösung gesammelt.

14.2.2 ELISA-Screening (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Hybridomaüberstände sowohl aus den ersten Anzuchtlöchern als auch aus beiden Klonierungsrunden wurden auf die Anwesenheit anti-DMIF1-spezifischer Antikörper mit dem ELISA überprüft. Dabei wurden alle Überstände parallel gegen GST-DMIF1- und GST-Antigen getestet, um GST-reaktive Ak, die auch in GST-DMIF1 reagieren werden, aber DMIF1-unspezifisch sind, herauszufiltern.

<u>Platten</u>	96-Loch-Mikrotiterplatten, F-Boden (Greiner)
<u>1l Vollers Puffer, pH 9.2</u>	zur Beschichtung von Mikrotiterplatten 1.59 g Na ₂ CO ₃ 0.2 g NaN ₃ 2.93 g NaHCO ₃
<u>1 x PBS, pH 7.4 (für 1l)</u>	137 mM (8 g) NaCl 2.7 mM (0.2 g) KCl 8.1 mM (1.15 g) Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM (0.2 g) KH ₂ PO ₄
<u>Waschpuffer PBST, pH 7.4</u>	0.04% (v/v) Tween 20 in 1 x PBS
<u>Blockpuffer, pH 7.4</u>	1% (w/v) BSA in 1 x PBS
<u>Sekundärer Antikörper</u>	Ziege-anti-Maus-Peroxidase (Biorad)
<u>Substratpuffer, pH 6.8</u>	0.02 M Na ₂ HPO ₄

<u>Substrat</u>	0.01% H ₂ O ₂ 1mg/ml 5-Aminosalicylsäure
-----------------	---

Beim direkten (Antigen-Capture) ELISA werden die Antigene am Boden von Mikrotiterplatten immobilisiert. Dazu werden pro Loch 100 µl einer 40µg/ml-Verdünnung von aufgereinigtem GST-DMIF1 und GST in Vollers-Puffer pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten werden 4 bis 5x mit je 100 µl PBST gewaschen und 2h bei RT mit PBS/1% BSA geblockt. Der Puffer wurde aus den ELISA-Platten geschlagen, die nun bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert werden können.

Alle Schritte des Assays finden bei RT statt. Von den entnommenen Hybridomaüberständen werden je 100µl/Loch 90 min bei RT inkubiert. Eine Pufferprobe, die mit beiden Ak detektiert wird, dient neben einem Ansatz ohne Hybridomaüberstand, aber mit Sekundär-Ak als Negativkontrolle. Danach wird 4 bis 5x mit PBST gewaschen und mit je 100µl Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper pro Loch für 90 min inkubiert. Nach erneutem Waschen werden 100µl Substrat/Loch dazugegeben, für weitere 20 bis 30 min inkubiert und die Reaktion mit je 100µl 1M NaOH /Loch gestoppt. Die Extinktion wird im ELISA-Reader bei 492 nm gemessen.

14.3 Konservierung und Auftauen von Hybridomaklonen

Zur Kryo-Konservierung der einzelnen Klone werden die Zellen einer confluent bewachsenen 50 ml-Kulturflasche, deren Medium einen Tag zuvor ohne Abklopfen der Zellen gewechselt wurde, geerntet. Dazu werden die Zellen abgeklopft, und 5 min in der Hettich-Zentrifuge mit 1500 Upm bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 5 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zelldichte sollte etwa $5 \cdot 10^6$ /ml betragen. Die Zellsuspension wird steril in 5, auf Eis gehaltene Einfrierröhrchen (1.8 ml, Nunc) verteilt. Die Ampullen werden in Einfrierköpfe in die Atmosphäre von N₂^{liq} gestellt, in denen die Temperaturabnahme um 1°C pro Minute gewährleistet ist.

Um eingefrorene Zellen wieder anzuziehen, wird eine Ampulle im Wasserbad (37°C) aufgetaut und der Inhalt in 10 ml Normalmedium übergeführt. Nach Zentrifugation (1000 Upm, 10 min) wird das Medium abgegossen, die Zellen werden erneut in 10 ml Normalmedium aufgenommen und auf zwei 50-ml-Kulturflaschen verteilt.

14.4 Bestimmung der AK-Klasse mit Diffusionstest

Mit dem Radialdiffusionstest (Ouchterlony, 1962) hat man eine potente Methode zur Verfügung, die Immunglobulinklasse und die Subklasse monoklonaler Antikörper zu

bestimmen. Das ist notwendig für die richtige Auswahl der sekundären Antikörper bei immunologischen Verfahren wie der Immunfluoreszenz, Immunpräzipitation und immunologischen Detektion im Westernblot. Das Prinzip beruht auf der allseitigen Ausbreitung löslicher Stoffe in einer fluiden Umgebung durch Diffusion und auf dem Präzipitationsverhalten von Antigen-Antikörper-Komplexen. Die zunächst löslichen Antigene und Antikörper treffen durch Radialdiffusion aufeinander und bilden, falls sie immunologisch zusammenpassen, solche mit dem Auge sichtbaren Präzipitate aus.

Auf einen Objektträger wird ein Tropfen einer 2% Agaroselösung in PBS mit einem Pinsel zügig verteilt. aufgetragen. Nach Erstarrung dieser Schicht wird eine weitere Schicht Agarose (1.5% in PBS pH 7.4, 2% PEG4000) aufgetragen und nach dem Erkalten hexagonal Löcher von \varnothing 2mm hineingestanz. In das zentrale Loch werden sukzessive 10 bis 30 μ l des zu testenden Serums (Hybridomaüberstand), in die 6 peripheren Vertiefungen je 5 μ l Antiserum bekanner Immunglobulinklasse (IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM) gefüllt und 1 bis 3 Tage bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Nur das gegen die Immunglobulinklasse des Testserums gerichtete Antiserum bildet den als weiße Präzipitatlinien sichtbaren Komplex. Die im Trockenschrank (bei 80°C mit aufgelegtem feuchten Whatman-Papierstreifen) getrockneten Objektträger lassen sich in Coomassie-Blau-Lösung färben und somit die Präzipitate nachkontrastieren. Danach werden die Gläser erneut getrocknet.

14.5 Aufreinigung von monoklonalen IgM-Antikörpern

Der im Genbank-Screening verwendete mAk 236-173-2 wurde mittels Anti-Maus-IgM-Agarose (Sigma) aus Hybridomaüberstand aufgereinigt. Ein kovalent an Agarosebeads gekoppelter (Cyanogenbromid- Aktivierung) μ -Ketten-spezifischer Maus-IgG bildet die Matrix für die Affinitäts-Chromatographie.

<u>Phosphatpuffer (PB), pH 7.2</u>	100 mM Na ₂ HPO ₄ 500 mM NaCl
<u>Elutionspuffer (EB), pH 2.4</u>	100 mM Glycin 150 mM NaCl
<u>Neutralisationspuffer, pH 9</u>	2 M Tris
<u>Dialysepuffer, pH 8.9</u>	100 mM Tris

In eine 0.7x10mm Säule (Biorad) wird PB vorgelegt, 1 ml der Agarose-Dispersion luftblasenfrei zugegeben, mit PB überschichtet und die Säule mit weiteren 50 ml PB (1ml/min) äquilibriert. 100 ml des 5 min mit 1000Upm zentrifugierten Hybridoma-Überstandes werden aufgetragen und 24h mit 0.5ml/min über die Säule zirkuliert.

Nach Waschen der Matrix mit 100ml PB (0.5ml/min) werden mit EB 30 Fraktionen von 1ml eluiert. In die Reagenzgläser wurden jeweils 50 µl Neutralisationspuffer vorgelegt, um das sehr saure Millieu des EB möglichst schnell abzupuffern. Die gepoolte Fraktion wird mit HCl auf pH 7 eingestellt und gegen über Nacht dialysiert. Die Konzentration wird mittels OD-Messung (280nm) und Bradford-Assay (13.4.2) bestimmt.

14.6 Bestimmung von Pinozytoseraten

Zur Quantifizierung der Pinozytoseaktivität (Hacker et al., 1997) wurde die Aufnahme des Flüssigphasenmarkers TRITC-Dextran durch *D. discoideum*- Zellen fluorimetrisch erfaßt. Axenisch gewachsene Zellen (2 bis $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) wurden auf eine Dichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in AX-Medium eingestellt. 10 ml dieser Zellsuspension wurden in silanisierten 25ml-Kölbchen (Vorbehandlung der Kolben mit Repel-Silan und nachfolgendes Spülen mit Ethanol und Wasser soll ein Haften der Zellen an der Glaswand verhindern) bei 150 Upm und 22°C geschüttelt. Zum Zeitpunkt t_0 wurden 20 mg TRITC-Dextran (vorgelöst in AX-Medium) zur Zellsuspension gegeben und kurz gemischt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde 1 ml der Zellsuspension zu 100 µl Trypanblau-Lösung pipettiert. Es wurde kurz gevortext, die Zellen abzentrifugiert (2 min, 800xg, RT) und der Überstand bis zum Zellpellet vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer (RT) gewaschen, in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer (RT) resuspendiert, kurz gevortext und die Fluoreszenzintensität (574nm) in einer Fluorimeter-Quarzküvette mit dem Fluoreszenz-Spektrometer SFM 25 (Kontron) nach Anregung (544 nm) gemessen. Die Messung erfolgte nach 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 und 135 min. Von allen Proben wurden Aliquots zur Proteinbestimmung (13.4.3) entnommen.

<u>Trypanblau-Lösung, pH 4.4 (Hed, 1986)</u>	150 mM (0.087 g) NaCl
	25 mM (0.058 g) Natriumcitrat
	0,2 % (0.02 g) Trypanblau
	in 10 ml Wasser 30 min rühren
	filtrieren durch einen Faltenfilter
	und einen Sterilfilter, 0.45µm

15 Mikroskopie

15.1 Fluoreszenz- und indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

15.1.1 Fixierung von *D.-discoideum*-Zellen in Picrinsäure- Formaldehyd

Puffer und Lösungen

10x PBS, pH 7.4

1370 mM NaCl
27 mM KCl
81 mM Na₂HPO₄ oder Na₂HPO₄·2H₂O
15 mM KH₂PO₄

PBS/Glycin

100 mM Glycin in 1x PBS

PBG

0.5 % BSA
0.05 % Fischgelatine (Sigma, 45 %)
in 1x PBS
sterilfiltriert bei -20°C

PIPES-Puffer, pH 6

20 mM PIPES (Sigma)

Picrinsäure, gesättigt, pH 6

3g Picrinsäure in 1l H₂O, 80°C über Nacht
abkühlen, pH einstellen

Picrinsäure-Paraformaldehyd-Fixativ

0.4g Paraformaldehyd
7 ml H₂O, 40°C, mit 2-4 Tropfen 2M NaOH bis
zum Auflösen titrieren
10 ml 20mM PIPES
3 ml gesättigte Picrinsäure

Einbettmedium

20 g Polyvinylalkohol, M_r 30000-70000 g/mol, werden in 80 ml PBS durch 16-stündiges Rühren aufgelöst. Nach Zugabe von 40 ml Glycerin (99,5 %) und erneutem 16-stündigen Rühren wird bei 15.000 g 15 min zentrifugiert, der Überstand mit 25 µg/ml Antibleichmittel DABCO versetzt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Fixierungsverfahren

Fixierung der *D.-discoideum*-Zellen und Immunfluoreszenz werden nach einer von Humbel und Biegelmann (1992) beschriebenen Methode durchgeführt. *D.-discoideum*-Zellen werden geerntet (1000 Upm, 5min, 4°C) und 2 x mit Soerensen-Phosphatpuffer (PP) gewaschen. Von einer auf Suspension in PP mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml werden je 300 µl auf ein HCl-gereinigtes Deckgläschen (Ø 12 mm) pipettiert. Man läßt die Zellen 15 bis 30 min absitzen, saugt den Puffer mit einem Papiertuch ab und legt das Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf einen 200-µl-Tropfen Pikrinsäure- Paraformaldehyd-Fixativ, der sich auf einer mit Parafilm bedeckten Glasplatte befindet. Nach 30 min Fixieren wird das Gläschen entnommen, nacheinander in 10 mM PIPES und PBS/Glycin gespült und 10min mit 70 % Ethanol nachfixiert.

15.1.2 Immunfluoreszenz-Markierung

In einer feuchten Kammer folgen Wasch- und Inkubationsschritte, bei denen die Gläser mit einer Pasteurpipette mit dem entsprechenden Puffern oder Antikörperlösungen überschichtet und mit einer Wasserstrahlpumpe wieder abgesaugt werden. Gläser werden 2x 5min mit PBS/Glycin und 2x 15min mit PBG gespült.

Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (150 bis 300 µl Kulturüberstand oder 10-20 µg/ml aufgereinigter Antikörper in PBG; zentrifugiert) erfolgt für 3h oder über Nacht bei RT in der geschlossenen feuchten Kammer. Es folgen 6x 5min Waschen mit PBG und Inkubation mit dem Sekundärantikörper (zentrifugiert) für 1 bis 2h. Anfärbung von DNA erfolgt durch 15-minütige Inkubation mit DAPI in PBG (1:1000). Dann wird 2 x 5 min mit PBG und 3 x 5 min mit PBS gewaschen, das Deckgläschen kurz in H₂O gespült und sofort mit den Zellen nach unten auf einen Tropfen Einbettmedium auf einem Objektträger gelegt. Die Präparate werden bei 4°C gelagert. Sie können sowohl im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio-phot) als auch im konkokalen Laserscanningmikroskop ausgewertet werden.

15.1.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Objektive

63x / 1.2 C-Apochromat	Wasserobjektiv
100x / 1.4 Apochromat	Öl

Individuelles Scannen

Farbstoff	Laser	Dichroid	Filter
CY3	HeNe 543	FT 560	LP 590-610 LP 570
CY5	HeNe 633	NT80/20-543	RG 665
TRITC	He Ne 543	FT 560	LP 570
GFP	Ar 488	FT 510	BP 510-565
DAPI	Ar 364	FT 395	BP 400-435

Simultanes Scannen zweier Farbstoffe

Farbstoff	Laser	Dichroid	Zweiter Splitter	Filter
CY3	Ar 488	FT 488/543	FT 560	LP 570 BP 575-640*
GFP				BP 510-525
CY5	Ar 488	NT 80/20-543	FT 560	RG 665
GFP				BP 510-565 BP 510-525*
CY3	HeNe 543	NT 80/20-543	FT 665	BP 575-640
CY5				RG 665

15.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Für morphologische Untersuchungen und die Bestimmung der Lokalisation von Proteinen auf sublichtmikroskopischen Niveau werden Präparate für die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) hergestellt. Zum Studium der Feinstrukturen in Zellen werden EPON-Präparationen (Franke et al., 1969) herangezogen, die weitgehend morphologieerhaltend sind. Spezifische Immunmarkierungen zur Bestimmung der Lokalisation von Proteinen werden sowohl in Kryo- (Tokuyasu, 1973) als auch in EPON- Präparaten vorgenommen. Fixierungen und Einbettungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Monika Matzner durchgeführt.

15.2.1 Fixierung und Immunmarkierung von Kryopräparaten

Lösungen

2x Fixativ

4% Paraformaldehyd
in Picrinsäure (siehe 15.1.1)

<u>Gelatine-Lösung (10%)</u>	5% 2.3 M Saccharose 5 % 20x Soerensen- Phosphatpuffer 90 % H ₂ O 10 % Gelatine
<u>Saccharose-Lösung</u>	1.8 M Saccharose (Merck) 500 ml PBS
<u>PVP/ Saccharose</u>	Polyvinylpyrrolidon, 15% (w/v) 500 ml Saccharose-Lösung 75 g PVP-10 (Sigma) bei -20°C lagern
<u>PBS, pH 7.4</u>	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
<u>PBS/Glycin (PBSG)</u>	100mM Glycin in PBS
<u>PBSG-Gelatine (2%)</u>	2% Gelatine (w/v) in PBS/Glycin
<u>Methylcellulose-Uranylacetat-Lösung</u>	0.8 ml 2% Methylcellulose 0.2 ml 3 % Uranylacetat in H ₂ O 0.1 ml H ₂ O

Paraformaldehyd-Picrinsäure-Fixierung

Zellen aus Schüttel- oder Plattenkulturen werden mit doppelt konzentriertem Fixativ (Endkonzentration 2% Paraformaldehyd) unter Schütteln 15min fixiert und 5min in der Eppendorf- Tischzentrifuge pelletiert. Das Zellsediment wird zweimal in 10mM PIPES (siehe 15.1.1) und einmal in PBSG gewaschen und bei 8000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wird mit dem gleichen Volumen Gelatine-Lösung (Endkonzentration 2%) bei 40°C gut gemischt und 30 min auf Eis gehärtet. Es folgt eine 1 bis 2stündige Nachfixierung mit 1% Paraformaldehyd (in PBS ohne Picrinsäure). Die Pellets werden in PBSG gewaschen und in kleine Blöcke geschnitten. Die Stückchen werden über Nacht in 15 % PVP/1.8M Saccharose absinken gelassen und am darauffolgenden Tag auf Metallstöpseln in flüssigem Stickstoff

schockgefroren. Alternativ können diese Blöckchen für den alsbaldigen Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Kryoprozessierung und Immunmarkierung

Von den Kryoblöckchen werden mit einem Mikrotom 60 bis 70 nm dicke Schnitte angefertigt und auf trägerfilmbeschichteten (Formvar) Nickelnetzen immobilisiert. Die Netze werden 10 min auf PBSG schwimmend äquilibriert, in PBSG gewaschen und 10 min auf eine PBSG-Gelatine-Lösung (2%) gelegt. Nach erneutem Waschen mit PBSG wird der Primärantikörper, verdünnt in PBSG/1% BSA, entweder über Nacht im Kühlschrank, oder 1h bei RT inkubiert. Nach Waschen in PBSG wird mit 1:200 in PBSG/1% BSA verdünntem Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus- IgG) überschichtet und die Grids nach weiterem Waschen in PBSG auf eine ProteinA-Gold-Lösung (1:50 in PBSG/1% BSA) gelegt. Es folgen gründliche Waschschriffe zuerst mit PBSG und danach mit H₂O. Die Nachfixierung wird mit einer 2% Glutaraldehyd-Lösung (in H₂O) durchgeführt, der nach Waschen in H₂O eine 15-minütige Behandlung mit Methylcellulose-Uranylacetat-Lösung zur Nachkontrastierung folgt. Die Flüssigkeit wird abgestreift und die Grids getrocknet.

Entgegen den Einzelmarkierungen, die mit ProtA-Gold detektiert werden, muß für Doppelmarkierungen auf Gold-konjugierte Zweitantikörper zurückgegriffen werden. Deren Markierungseffizienz ist zwar geringer, es werden aber auch Kreuzreaktionen zwischen den Sekundärantikörpern mit den „falschen“ Primärantikörpern vermieden. Dabei wird zuerst der anti-DMIF1-mAk über Nacht inkubiert und dann mit Gold-konjugiertem Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper abgesättigt. Danach kann mit dem nächsten Primärantikörper anti- α -Tubulin-pAk (2h) und anschließend mit Gold-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen-Ak markiert werden.

15.2.2 Fixierung und Einbettung in EPON

Lösungen

2x Fixativ

4% Glutaraldehyd
2% Osmiumtetroxid (OsO₄)
in PBS pH 7.2

Uranylacetat-Fixativ

1% Uranylacetat in H₂O

Simultanfixierung in Glutaraldehyd-Osmiumtetroxid

Wenn nicht anders angegeben, finden alle Schritte bei RT statt. *Dictyostelium*- Zellen werden entweder direkt aus Schüttelkulturen oder, abgespült von AX-Medium enthaltenden Petrischalen, in Suspension fixiert. Dazu werden die Zellen und das doppelt- konzentrierte Fixativ (Endkonzentration 2% Glutaraldehyd, 1% Osmiumtetroxid) zu gleichen Teilen gemischt, 10 min geschwenkt und anschließend 1h auf Eis gestellt. Die Zellen werden 2x mit PBS und 2x mit H₂O gewaschen, 1h mit Uranylacetat nachkontrastiert und wiederum 3x mit H₂O gewaschen. Mit Ethanol- Lösungen verschiedener Konzentrationen findet eine schrittweise Dehydrierung der Proben wie folgt statt:

je 15 min in 30 % – 50 % – 70 % – 80 % Ethanol

30 min in 100 % Ethanol

30 min in Propylenoxid

Der Äquilibration in Propylenoxid folgt die Überführung des Zellsedimentes in BEEN®-Kapseln, in denen die Präparate in einer 1:1-Mischung aus EPON (Agar Resin Kit) und Propylenoxid über Nacht inkubiert werden. Das verdunstende Propylenoxid wird durch EPON ersetzt und 2 Tage bei 60°C ausgehärtet. Danach werden von den EPON-Blöcken mit einem Mikrotom Schnitte angefertigt, die auf Formvar-beschichtete Nickel-Grids transferriert und dort einer Uranylacetat- Nachkontrastierung unterzogen werden.

15.2.3 Immunmarkierung an EPON-Präparaten

Aus isolierten Mitochondrien präparierte Vesikel (13.5) werden immunmarkiert und anschließend in EPON-Harz eingebettet. Damit verbindet man den Vorteil der genaueren Wiedergabe der Strukturen durch das EPON-Verfahren (die bei gewöhnlicher Kryoeinbettung oft diffus werden) mit der spezifischen Markierbarkeit dieser Strukturen.

15.2.3.1 „Preembedding Labeling“ Verfahren

Je 200 µl der Vesikel-Suspension werden mit folgenden Hybridomaüberständen 1h bei RT inkubiert: anti-DMIF1 (mAk 272-208-1; 2µl), anti-Porin (mAk 70-100-1; 200µl) und anti-F1F0-β-Untereinheit (mAk 238-190-11; 200µl). Die Zellen werden 2min bei RT mit 10.000Upm in der Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert, mit 20mM Tris-HCl (pH 8.0) gewaschen und die Pellets für 1h bei RT mit dem polyklonalen Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 20mM Tris-HCl (pH 8.0) erfolgt die Markierung mit ProtA-Gold für eine weitere Stunde. Danach werden die Präparate mit Glutaraldehyd/Osmiumtetroxid analog (15.2.2) fixiert und eingebettet.

16 Computerprogramme

16.1 Unter Windows

Word 97 und Word 2000	Microsoft
Sigma-Plot 5.0	Jandel Scientific
Corel-Draw 8 und 9	Corel
Photoshop 4.0, 5.0	Adobe Systems
iGrafx image 1.0	Micrografx
PC-Bas 2.0 (Phosphoimager)	Raytest
Ovid Client (Literatursuche)	Ovid Technologies
DAVS (Bildverarbeitung)	Richard Albrecht (MPI für Biochemie, Abt. Zellbiologie)

16.2 Unter UNIX

GCG Sequence Analysis Package	University of Wisconsin, Genetics Computer Group (Devereux <i>et al.</i> , 1984)
-------------------------------	---

LITERATURVERZEICHNIS

- Akashi, A., Yoshida, Y., Nakagoshi, H., Kuroki, K., Hashimoto, T., Tagawa, K. and Imamoto, F. (1988). Molecular cloning and expression of a gene for a factor which stabilizes formation of inhibitor-mitochondrial ATPase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* **104**, 526-530.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. 3rd edition, Garland publishing, Inc.
- Allison, D. S. and Schatz, G. (1986). Artificial mitochondrial presequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9011-9015.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410. (BLASTP 1.4.11)
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Ac. Res.* **25**, 3389-3402. (BLASTP 2.0.8; 2.0.10)
- Amery L. Fransen M. De Nys K. Mannaerts GP. Van Veldhoven PP. (2000). Mitochondrial and peroxisomal targeting of 2-methylacetyl-CoA racemase in humans. *J.Lipid Res.* **41(11)**,1752-1759
- Anastasi, A., Knight, C.G. and Barrett, B.J. (1993). Characterization of the bacterial metalloendopeptidase pitrilysin by the use of a continuous fluorescence assay. *Biochem. J.* **290**, 601-607.
- André, E., Brink, M., Gerisch, G., Isenberg, G., Noegel, A. A., Schleicher, M., Segall, J. E. and Wallraff, E. (1989). A *Dictyostelium* mutant deficient in severin, an F-actin fragmenting protein, shows normal motility and chemotaxis. *J. Cell Biol.* **198**, 985
- Angata, K., Yanagisawa, K. and Tanaka, Y. (1995). Codon usage, genetic code and phylogeny of *Dictyostelium discoideum* mitochondrial DNA as deduced from a 7.3-kb region. *Curr. Genet.* **27**, 249-256.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. and Schägger, H. (1998). Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.* **17 (24)**, 7170-7178.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. and Schägger, H. (1999). ATP Synthase of Yeast Mitochondria - Isolation of Subunit j and Disruption of the ATP18 Gene. *J. Biol. Chem.* **274 (1)**, 36-40.
- Baumgarten, H., Schulze, M. and Hebell, T. (1990), Methodik der Maus-Immunisierung. In Peters, J. H. and Baumgarten, H. (Eds.). *Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung*. Springer. Berlin, Heidelberg, New York, 51-57.
- Belogradov, G. I., Tomich, J. M. and Hatefi, Y. (1996). Membrane Topography and Near-neighbor Relationships of the Mitochondrial ATP Synthase Subunits e, f and g. *J. Biol. Chem.* **271 (34)**, 20340-20345.

- Benton, W.D. und Davis, R.W. (1977). Screening lambda gt recombinant clones by hybridization in situ. *Science* **196**: 180-182
- Berger, B., Wilson, D. W., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M. and Kim, P. S. (1995). Predicting Coiled Coils by Use of Pairwise Residue Correlations. *Proc.Nat.Sci.USA*, **92**, 8259-8263.
- Beug, H., Katz, F. E. and Gerisch, G. (1973). Dynamics of antigenic membrane sites relating to cell aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **56**, 647-658.
- Bevan et al., 2000; Genbank NCBI
- Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**, 243-255
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1522.
- Bohr, V., Anson, R. M., Mazur, S. and Dianov, G. (1998). Oxidative damage processing and changes with aging. *Tox. Lett.* **103**, 47-52.
- Böttcher, B. and Gräber, P. (2000). The structure of H⁺-ATP synthase from chloroplasts and its sub-complexes as revealed by electron microscopy. *BBA* **1458**, 404-416.
- Boyer, P.D. (2000). Catalytic site forms and controls in ATP synthase catalysis. *BBA* **1458**, 252-262.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive methodfor the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Branda, S.S. and Isaya, G. (1995). Prediction and identification of new natural substrates of the yeast mitochondrial intermediate peptidase. *J.Biol.Chem.* **270 (45)**, 27366-27373.
- Brink, M., Gerisch, G., Isenberg, G., Noegel, A. A., Segall, J. E., Wallraff, E. and Schleicher, M. (1990). A *Dictyostelium* mutant lacking an F-actin cross-linking protein, the 120-kD gelation factor. *J.Cell Biol.* **111**, 1477-1489.
- Butler, J. M. and Levin, B. C. (1998). Forensic applications of mitochondrial DNA. *TIBTECH* **16**, 158-162.
- Cabezón, E., Arechaga, I., Butler, P. J. G. and Walker, J. E. (2000b). Dimerization of Bovine F1-ATPase by Binding the Inhibitory Protein IF1. *J. Biol. Chem.* **275 (37)**, 28353-28355.
- Cabezón, E., Butler, P.J.G., Runswick and M.J. and Walker, J.E. (2000a). Modulation of the oligomeric state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J.Biol.Chem.* **275 (33)**, 25460-25464.
- Cabezón, E., Butler, P.J.G., Runswick and M.J. and Carbajo, R.J. (2002). Homologous and heterologous inhibitory effects of ATPase inhibitor proteins on F-ATPases. *J.Biol.Chem.* **277 (44)**, 41334-41341.
- Capuano, F., Guerrieri, F. and Papa, S. (1997). Oxidative Phosphorylation Enzymes in Normal and Neoplastic Cell Growth. *J. Bioenerg. Biomemb.* **29 (4)**, 379-384.
- Chan, S. H. and Barbour, R.L. (1976). Purification and properties of ATPase inhibitor from rat liver mitochondria. *BBA* **430 (3)**. 426-433.

- Chaumont, F., O'Riordan, V. and Boutry, M. (1990). Protein transport into mitochondria is conserved between plant and yeast species. *J. Biol. Chem.* **265** (28), 16856-16862.
- Chen, C.-H., Howng, S.-L., Cheng, T.-S., Chou, M.-H., Huang, C.-Y. and Hong, Y.-R. (2003). Molecular characterization of human ninein protein: two distinct subdomains required for centrosomal targeting and regulating signals in cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **308**, 975-983.
- Chen, X. and Schnell, D. J. (1999). Protein import into chloroplasts. *TICB* **9**, 222-227.
- Chien, A., Edgar, D. B. and Trela, J. M. (1976). Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550-1557.
- Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* **201** (1), 134-139.
- Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1978). Empirical predictions of protein structure. *Ann. Rev. Biochem.* **201** (1), 134-139.
- Chung, C.Y., Funamoto, S. and Firtel, R.A. (2001). Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem. Sci.* **26** (9), 557-566.
- Cintron, N. M. and Pedersen, P. L. (1979). A protein inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase complex of rat liver. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **254**, 3439-3443
- Clarke, M. and Kayman, S. C. (1987): The axenic mutations and endocytosis in *Dictyostelium*. *Meth. Cell Biol.* **28**, 157-175.
- Claros, M. G. and Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* **241**, 779-786.
- Coates, J.C. and Harwood, A.J. (2001). Cell-cell adhesion and signal transduction during *Dictyostelium* development. *J. Cell. Sci.* **114** (24), 4349-4358.
- Cortopassi, G. A. and Wong, A. (1999). Mitochondria in organismal aging and degeneration. *BBA* **1410**, 183-193.
- Cox, D., Condeelis, J., Wessels, D., Soll, D., Kern, H. and Knecht, D. A. (1992). Targeted disruption of the ABP-120 gene leads to cells with altered motility. *J. Cell Biol.* **116**, 943-955.
- Cox, E. C., Vocke, C. D., Walter, S., Gregg, K. Y. and Bain, E. S. (1990). Electrophoretic karyotype for *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8247-8251.
- Cross, R. (2000). The rotary binding change mechanism of ATP synthases. *BBA* **1458**, 270-275.
- Cyr, D. M. (1997). Coupling Chemical Energy by the hsp70/tim44 Complex to Drive Protein Translocation into Mitochondria. *J. Bioenerg. Biomem.* **29** (1), 29-34.
- Dagert, M. and Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**, 23-28.
- Dalbey, R. E. (1991). Leader peptidase. *Mol. Microbiol.* **5** (12), 2855-2860.

- Davis, R. E., Hardwick, C., Tavernier, P., Hodgson, S. and Singh, H. (1995). RNA trans-splicing in flatworms: analysis of trans-spliced genes and mRNA in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **270**, 21813-21819.
- de Hostos, E. L., Rehfuß, C., Bradtke, B., Waddell, D. R., Albrecht, R., Murphy, J. and Gerisch, G. (1993). *Dictyostelium* Mutants Lacking the Cytoskeletal Protein Coronin are Defective in Cytokinesis and Cell Motility. *J. Cell Biol.* **120**, 163-173.
- De Lozanne, A. and Spudich, J. A. (1987). Disruption of the *Dictyostelium* Myosin Heavy Chain Gene by Homologous Recombination. *Science* **236**, 1086-1091.
- Devenish, R. J., Prescott, M., Roucou, X. and Nagley, P. (2000). Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *BBA* **1458**, 428-442.
- Devreux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl.Ac.Res.* **12 (1)**, 387-395.
- Dianoux, A. C. and Hoppe, J. (1987). Complete amino-acid sequence of the natural ATPase inhibitor from the mitochondria of the yeast *Candida utilis*. *Eur. J. Biochem.* **163**, 155-160.
- Dictyostelium discoideum* Genome Project: <http://dicty.cmb.nwu.edu/Dicty/genomseq.htm>
- Dörper, T and Winnacker, E. T. (1983). Improvements in the phosphoamidite procedure for the synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Nucl. Ac. Res.* **11 (9)**, 2575-2584.
- Dumontier, M., Höcht, P, Mintert, U. and Faix, Jan (2000). Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in *Dictyostelium*. *J.C.Sci.* **113**, 2253-2265.
- Ebner E. Maier KL. (1977). A protein inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase (F1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **252 (2)**:671-676
- Egelhoff, T.T., Titus, M.A., Manstein, D.J., Ruppel, K.M. and Spudich, J.A., 1991. Molecular Genetic Tools for Study of the Cytoskeleton in *Dictyostelium*. *Meth. Enzymol.*, **196**, 319-334
- Emmermann, M., Braun, H.-P., Arretz, M. and Schmitz, U.K. (1993). Characterization of the bifunctional cytochrome c reductase-processing peptidase complex from potatoe mitochondria. *J.Biol.Chem.* **268(25)**, 18936-18942.
- Endo, T., Mitsui, S. and Roise, D. (1995). Mitochondrial presequences can induce aggregation of unfolded proteins. *FEBS Letters* **359**, 93-96.
- Endres, M., Neupert, W. and Brunner, M. (1999). Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22-54 complex. *EMBO J.* **18 (12)**, 3214-3221.
- Es, S.van and Devreotes, P.N. (1999). Molecular basis of localized responses during chemotaxis in amoebae and leukocytes. *Cell.Mol.Life Sci.* **55**, 1341-1351.
- Faix, J., Gerisch, G. and Noegel, A. A. (1992). Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in *Dictyostelium*. *J.C.S.*, **102 (2)**, 203-214.

- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13
- Fey, P., Compton, K. and Cox, E. C. (1995). Green fluorescent protein production in the cellular slime molds *Polyspondylium pallidum* and *Dictyostelium discoideum*. *Gene* **165**, 127-130
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr. Op. Cell Biol.* **10**, 248-253.
- Firtel, R.A. and Chung, C.Y. (2000). The molecular genetics of chemotaxis: sensing and responding to chemoattractant gradients. *Bioassays* **22(7)**, 603-615.
- Firtel, R.A. and Meili, R. (2000). *Dictyostelium*: a model for regulated cell movement during morphogenesis. *Curr.Op.Genet.Dev.* **10(4)**, 421-427.
- Fleischer, S., Meissner, G., Smigel, M., Wood, R. (1974). Preparation of Submitochondrial Vesicles using Nitrogen Decompression. *Meth.Enzymol.* **31**, 292-299.
- Frangione, B., Rosenwasser, E., Penefsky, H. S. and Pullman, M. E. (1981). Amino acid sequence of the protein inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7403-7407.
- Franke, W. F., Krien, S., Brown, R.M. Jr. (1969). Simultaneous Glutaraldehyde-Osmium Tetroxide Fixation with Postosmications. *Histochemie* **19**, 162-164
- Fujii, S., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Miura, R., Yamano, T. and Tagawa, K. (1983). pH-induced conformational change of ATPase inhibitor from yeast mitochondria. A proton magnetic resonance study. *J. Biochem.* **93**, 189-196.
- Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J.C., Contamin, S., de Thillot, V., Just, I., Ricci, V., Solcia, E., Van Obberghen, E. and Boquet, P. (2000). The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* **19** (23), 6361-6370.
- Garcia-Mata, R., Zsuzsa B., Sorscher, E.J. and Sztul, E.S. (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J.Cell Biol.* **146**, 1239-1254.
- Gavel, Y and von Heijne, G (1990). Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Prot Eng.* **4(1)**, 33-37.
- Gerisch, G. (1965). Spezifische Zellkontakte als Mechanismus der tierischen Entwicklung. *Umschau* **13**, 392-395.
- Gerisch, G. (1986). *Dictyostelium discoideum* - A eukaryotic microorganism that develops by cell aggregation from a unicellular to a multicellular stage. Cellular and molecular aspects of developmental biology / Course 4
- Gerisch, G. (1987). Cyclic AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dictyostelium*. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 835-879.
- Gerisch, G., Malchow, D., Riedel, V., Beug, H. (1972). Cell communication by chemical signals and the regulation of cyclic AMP in the development of the microorganism *Dictyostelium discoideum* (abstract). *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 684-685.

- Gerisch, G., Malchow, D., Riedel, V., Müller, E. and Every, M. (1972). Cyclic AMP phosphodiesterase and its inhibitor in slime mould development. *Nature (London) New Biol.* **235**, 90-92.
- Gerisch, G. and Müller-Taubenberger, A. (2003). GFP-fusion proteins as fluorescent reporters to study organelle and cytoskeleton dynamics in chemotaxis and phagocytosis. Academic Press. *Meth.Enzymol.* **361** (Eds. G. Marriott and I. Parker), 320-337
- Glaser, E. and Dessi, P. (1999). Integration of the Mitochondrial-Processing-Peptidase into the Cytochrome bc₁ Complex in Plants. *J.Bioenerg.Biomem.* **31(3)**, 259-274.
- Glaser, E., Sjöling, S., Szigyarto, C. and Erikson, A.C. (1996). Plant mitochondrial protein import: precursor processing is catalysed by the integrated mitochondrial processing peptidase (MPP) / bc₁ complex and degradation by the ATP-dependent proteinase. *BBA* **1275**, 33-37.
- Glaser, E., Sjöling, S., Tanudij, M. and Whelan, J. (1998). Mitochondrial protein import in plants. Signals, Sorting, Targeting, Processing and Regulation. *Plant Mol. Biol.* **0**, 311-338.
- Graham, T.R. Zassenhaus, H.P. and Kaplan A. (1988): Molecular cloning of the cDNA which encodes b-N-Acetylhexosaminidase A from *Dictyostelium discoideum*. *J.Biol.Chem.* **263**: 16823-16829
- Gray, M. W., Burger, G. and Lang, B. F. (1999). Mitochondrial Evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Green, D. R. and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and Apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Green, D.W. and Grover, G.J. (2000). The IF1 inhibitor protein of the mitochondrial F₁F₀-ATPase. *BBA* **1458**, 343-355.
- Gresser, M. J., Myers, J.A. and Boyer, P. D. (1981). *J. Biol. Chem.* **257**, 12030.
- Groth, G. (2000). Molecular models of the structural arrangement of subunits and the mechanism of proton translocation in the membrane domain of F₁F₀ ATP synthase. *BBA* **1458**, 417-427.
- Grunstein, M. and Hogness, D. (1975). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **72**, 3961-3965
- Hachiya, N., Alam, R., Sakasegawa, Y., Sakaguchi, M., Mihara, K. and Omura, T. (1993). A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. *EMBO J.* **12**, 1579-1586.
- Hacker, U., Albrecht, R. and Maniak, M. (1997). Fluid-Phase Uptake by Macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J. Cell. Sci.* **110**, 105-112.
- Hamaguchi, K. and Geiduscheck, E. P. (1962). The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleate helix. *JACS* **84**, 1329-1337.
- Hammen PK. Waltner M. Hahnemann B. Heard TS. Weiner H. (1996). The role of positive charges and structural segments in the presequence of rat liver aldehyde dehydrogenase in import into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **271(35)**, 21041-21048
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

- Harris, D. A. (1997). Functional regions of the H⁺-ATPase inhibitory protein from ox heart mitochondria. *BBA (Bioenergetics)* **1320** (1), 8-16.
- Hashimoto, T., Negawa, Y. and Tagawa, K. (1981a). Properties of binding sites for adenine nucleotides on ATPase from yeast mitochondria. *J. Biochem.* **90**, 1141-1150.
- Hashimoto, T., Negawa, Y. and Tagawa, K. (1981b). Binding of intrinsic ATPase inhibitor to mitochondrial ATPase – Stoichiometry of binding of nucleotides, inhibitor and enzyme. *J. Biochem.* **90**, 1151-1157.
- Hashimoto, T., Yamamoto, Y., Yoshida, Y. and Tagawa, K. (1995). Cleavage of Bovine Mitochondrial ATPase Inhibitor with Endopeptidases, and Binding of the Resulting Peptides to the Interface between α - and β -Subunits of F1-ATPase. *J. Biochem.* **117**, 641-647.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y. and Tagawa, K. (1983). Binding properties of an intrinsic ATPase inhibitor and occurrence in yeast mitochondria of a protein factor which stabilizes and facilitates the binding of the inhibitor to F1F0-ATPase. *J. Biochem.* **94**, 715-720.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y. and Tagawa, K. (1984). Purification and properties of factors in yeast mitochondria stabilizing the F1F0-ATPase-inhibitor complex. *J. Biochem.* **95**, 131-136.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y. and Tagawa, K. (1987). Binding properties of 9K protein to F1-ATPase: A counterpart ligand to the ATPase inhibitor. *J. Biochem.* **102**, 685-692.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y. and Tagawa, K. (1990a). Regulatory proteins of F1F0-ATPase: Role of ATPase inhibitor. *J. Bioenerg. Biomem.* **22** (1), 27-38.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y. and Tagawa, K. (1990b). Simultaneous bindings of ATPase inhibitor and 9K protein to F1F0-ATPase in the presence of 15K protein in yeast mitochondria. *J. Biochem.* **108**, 17-20.
- Haucke, V. and Lithgow, T. (1997). The First Steps of Protein Import into Mitochondria. *J. Bioenerg. Biomem.* **29** (1), 11-17.
- Haugwitz, M., Noegel, A. A., Karakesioglou, J. and Schleicher, M. (1994). *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *Cell* **79**, 303-314.
- Hed, J. (1986). Methods of distinguishing ingested from adhering particles. *Meth. Enzymol.* **132**, 198-204.
- Heim, R. and Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, lower wavelength and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* **6**, 178-182.
- Heim, R., Cubitt, A.B., Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature.* **373** (6516), 663-664
- Hekman, C., Tomich, J. M. and Hatefi, Y. (1991). Mitochondrial ATP Synthase Complex – Membrane Topography and Stoichiometry of the F0 Subunits. *J. Biol. Chem.* **266** (21), 13564-13571.
- Hennessey, E. S., Drummond, D. R., and Sparrow, J. C. (1993). Molecular genetics of actin function, *Biochem. J.* **282**, 657–671.
- Höfheld, J. and Hartl, F. U. (1994). Role of chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast. *J. Cell Biol.* **126**, 305-315.

- Hoja, M.-R., Wahlestedt, C. and Höög, C. (2000). A visual intracellular classification strategy for uncharacterized human proteins. *Exp. Cell Res.* **259**, 239-246.
- Hong, S. and Pedersen, P.L. (2002). ATP synthase of yeast: structural insight into the different inhibitory potencies of two regulatory peptides and identification of a new potential regulator. *Arch.Biochem.Biophys.* **405**, 38-43.
- Howard, P. K., Ahern, K. G. und Firtel, R. A. (1988): Establishment of a transient expression system in *Dictyostelium discoideum*. *Nucl. Acids Res.*, **6**, 2613-2623.
- Huang, X. and Miller, W. (1991). LALIGN finds the best local alignments between two sequences. Version 2.0. *Adv. Appl. Math.* **12**, 373-381.
- Ibelgaufts, H. (1993). Gentechnologie von A bis Z. VCH Weinheim. 1. korr. Auflage.
- Ichikawa, N., Fukuda, M., Hashimoto, T. and Tagawa, K. (1998). The Carboxyl-Terminal Region of the Yeast ATPase Inhibitor Protein is Indispensable for the Stability of the Protein in Mitochondria. *J. Biochem.* **124**, 886-891.
- Ichikawa, N., Karaki, A., Kawabata, M., Ushida, S., Mizushima, M. and Hashimoto, T. (2001). The region from phenylalanine-17 to phenylalanine-28 of yeast mitochondrial ATPase inhibitor is essential for its ATPase inhibitory activity. *J.Biochem.* **130**, 687-693.
- Ichikawa, N., Ushida, S., Kawabata, M. and Masazumi, Y. (1999). Nucleotide sequence of cDNA coding the mitochondrial precursor protein of the ATPase inhibitor from humans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63 (12)**, 2225-2227.
- Ichikawa, N., Yoshida, Y., Hashimoto, T. and Tagawa, K. (1996). An intrinsic ATPase inhibitor binds near the active site of yeast mitochondrial F1-ATPase. *J. Biochem.* **119 (1)**, 193-199.
- Ichikawa, N., Yoshida, Y., Hashimoto, T., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Imamoto, F. and Tagawa, K. (1990). Activation of ATP hydrolysis by an uncoupler in mutant mitochondria lacking an intrinsic ATPase inhibitor in yeast. *J. Biol. Chem.* **265 (11)**, 6274-6278.
- Iwatsuki, H., Lu, Y.M., Yamaguchi, K., Ichikawa, N. and Hashimoto, T. (2000). Binding of an intrinsic ATPase inhibitor to the F1F0-ATPase in phosphorylating conditions of yeast mitochondria. *J.Biochem.* **128**, 553-559.
- Jensen, R. E. and Kinnally, K. W. (1997). The Mitochondrial Protein Import Pathway: Are Precursors Imported through Membrane Channels? *J. Bioenerg. Biomem.* **29 (1)**, 3-10.
- Johnston, J.A., Ward, C.L. and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: A cellular response to misfolded proteins. *J.Cell Biol.*, **143 (7)**, 1883-1898.
- Káldi, K. and Neupert, W. (1998). Protein translocation into mitochondria. *BioFactors* **8**, 221-224.
- Kanazawa, M., Yano, M., Namchai, C., Yamamoto, S., Ohtake, A., Takayanagi, M., Mori, M. and Niimi, H. (1997). Visualization of Mitochondria with Green Fluorescent Protein in Cultured Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Diseases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **239**, 580-584.
- Kendall, J. M. and Badminton, M. N. (1998). Aequorea victoria bioluminescence moves into an exciting new era. *TIBTECH* **16**, 216-224.

- Kinosita, K., Yasuda, R., Noji, H., Ishiwata, S. and Yoshida, M. (1998). F1-ATPase: A Rotary Motor Made of a Single Molecule. *Cell* **93**, 21-24.
- Kitada, S. and Ito, A. (2001). Electrostatic recognition of matrix targeting signal by mitochondrial processing peptidase. *J.Biochem.* **129**, 155-161.
- Kitada, S., Kojima, K., Shimokata, K., Ogishima, T. and Ito, A. (1998). Glutamate residues required for substrate binding and cleavage activity in mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* **273 (49)**, 32547-32553.
- Kitada, S., Shimokata, K., Niidome, T., Ogishima, T. and Ito, A. (1995). A putative metal-binding site in the beta subunit of rat mitochondrial processing peptidase is essential for its catalytic activity. *J.Biochem.* **117(6)**, 1148-1150.
- Klein, G., Lunardi, J. and Vignais, P. V. (1981). *BBA* **636**, 185
- Klein, G., Satre, M., Dianoux, A.-C., and Vignais, P.V. (1980). Radiolabeling of natural adenosine triphosphatase inhibitor with phenyl(¹⁴C)isothiocyanate and study of its interaction of mitochondrial adenosine triphosphatase. Localization of inhibitor binding sites and stoichiometry of binding. *Biochemistry* **19**, 2919-2925.
- Klein, G., Satre, M., Zaccari, G. and Vignais, P.V. (1982). Spontaneous Aggregation of the Mitochondrial Natural ATPase Inhibitor in Salt Solutions as demonstrated by Gel Filtration and Neutron Scattering. Application to the concomitant Purification of the ATPase Inhibitor and F1-ATPase. *BBA* **681**, 226-232.
- Knecht, D. A. and Loomis, W. F. (1987). Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **236**, 1081-1086.
- Knecht, D. A., Cohen, S. M., Loomis, W. F. and Lodish, H. F. (1986). Developmental regulation of *Dictyostelium discoideum* actin gene fusions carried on low-copy and high-copy transformation vectors. *Mol. Cell. Biol.* **6 (11)**, 3973-3983.
- Knippers, R. (1997). *Molekulare Genetik*. 7.Aufl., Thieme-Verlag
- Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495.
- Kojima, K., Kitada, S., Shimokata, K., Ogishima, T. and Ito, A. (1998). Cooperative formation of a substrate binding pocket by α - and β -subunits of mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* **273 (49)**, 32542-32546.
- Komiya, T. and Mihara, K. (1996). Protein Import into Mammalian Mitochondria. Characterization of the Intermediates along the Import Pathway of the Precursor into the Matrix. *J. Biol. Chem.* **271 (36)**, 22105-22110.
- Kopito, R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *TICB*, **10**, 524-530.
- Kriebel, P.W., Barr, V.A. and Parent C.A. (2003). Adenylyl cyclase localization regulates streaming during chemotaxis. *Cell* **112(4)**, 549-560.

- Kubis, H- P. and Gros, G. (1997). A rapid electrophoretic method for separating rabbit skeletal muscle myosin heavy chains at high resolution. *Electrophoresis* **18(1)**, 64-66.
- Kübrich, M., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1995). Genetic and biochemical dissection of the mitochondrial protein-import machinery. *Curr. Genet.* **27**, 393-403.
- Kuspa, A. and Loomis, W. F. (1992). Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Sci. USA* **89**, 8803-8807.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J.Mol. Biol.*, **157**, 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langer, T. and Neupert, W. (1996). Regulated protein degradation in mitochondria. *Experientia* **52**, 1069-1076.
- Lebowitz, M. S. and Pedersen, P. L. (1993). Regulation of the mitochondrial ATP-synthase/ATPase complex: cDNA cloning, sequence, overexpression and secondary structural characterization of a functional protein inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* **301**, 64-70.
- Lebowitz, M. S. and Pedersen, P. L. (1996). Protein Inhibitor of Mitochondrial ATP Synthase: Relationship of Inhibitor Structure to pH-dependent Regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **330 (2)**, 342-354.
- Leiting, B. and Noegel, A. A. (1988). Construction of an extrachromosomally replicating transformation vector for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid*, **20**, 241-248.
- Lill, R., Nargang, F. E. and Neupert, W. (1996). Biogenesis of mitochondrial proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* **8**, 505-512.
- Lithgow, T., Cuezva, J. M. and Silver, P. A. (1997). Highways for protein delivery to the mitochondria. *TIBS* **22**, 110-113.
- Loomis, W. F. (1975). *Dictyostelium discoideum*. A developmental system. New York: Acad. Press.
- Loomis, W. F. and Kuspa, A. (1997). The genome of *Dictyostelium discoideum*. In *Dictyostelium – A model system for cell and developmental biology.*, ed Maeda, Y., Inouye, K. and Takeuchi, I.: Tokyo, Japan: Univ. Acad. Press, 15-30.
- Lu, Y.M., Miyazawa, K., Yamaguchi, K., Nowaki, K., Iwatsuki, H., Wakamatsu, Y., Ichikawa, M. and Hashimoto, T. (2001). Deletion of mitochondrial ATPase inhibitor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* decreased cellular and mitochondrial ATP levels under non-nutritional conditions and induced a respiration-deficient cell-type. *J. Biochem.* **130**, 873-878.
- Luciano, P. and Géli, V. (1996). The mitochondrial processing peptidase: function and specificity. *Experientia* **52**, 1077-1082.
- Luciano, P., Geoffroy, S., Brandt, A., Hernandez, J.-F. and Géli, V. (1997). Functional Cooperation of the Mitochondrial Processing Peptidase Subunits. *J. Mol. Biol.* **272**, 213-225.

- Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J. (1991). Predicting Coiled Coils from Protein Sequences. *Science* **252**, 1162-1164.
- Malchow, D., Nägele, B., Schwarz, H. and Gerisch, G. (1972). Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.*, **28**, 136-142.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J. and Gerisch, G. (1995). Coronin Involved in Phagocytosis: Dynamics of Particle-Induced Relocation Visualized by a Green Fluorescent Protein Tag. *Cell* **83**, 915-924.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Manson, M. D. and Segall, J. E. (1992). Chemotaxis. *Encycl. Microbiol.* **1**, 501-512.
- Manstein, D. J., Titus, M. A., DeLozanne, A., and Spudich, J. A. (1989): Gene replacement in *Dictyostelium*: generation of myosin null mutants. *EMBO J.*, **8**, 923-932.
- Marsh, J. L., Erfle, M. and Wykes, E. J. (1984). The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**, 481-485.
- Martin, J. (1997). Molecular Chaperones and Mitochondrial Protein Folding. *J. Bioenerg. Biomem.* **29(1)**, 35-43.
- Matsubara, H., Hase, T., Hashimoto, T. and Tagawa, K. (1981). Amino acid sequence of an intrinsic inhibitor of mitochondrial ATPase from yeast. *J. Biochem.* **90**, 1159-1165.
- Matsubara, H., Inoue, K., Hashimoto, T., Yoshida, Y. and Tagawa, K. (1983). A stabilizing factor of yeast mitochondrial F1F0-ATPase-Inhibitor complex: common amino acid sequence with yeast ATPase inhibitor and E. coli ϵ and Bovine δ subunits. *J. Biochem.* **94**, 315-318.
- Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y.-D., Nigg, E.A. and Fry, A.M. (1999). Protein kinases in control of the centrosome cycle. *FEBS Lett.* **452**, 92-95.
- Mihara, K. and Omura, T. (1996). Cytosolic factors in mitochondrial protein import. *Experientia* **52**, 1063-1068.
- Mimura, H., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Ichikawa, N. and Tagawa, K. (1993). Binding of an Intrinsic ATPase Inhibitor to the Interface between α - and β -Subunits of F1F0ATPase upon De-Energization of Mitochondria. *J. Biochem.* **113**, 350-354.
- Mitchell, P. (1979). Keilin's Respiratory Chain Concept and Its Chemoosmotic Consequences. *Science* **206**, 1148-1159
- MITOP Database (2000). www.mips.biochem.mpg.de
- Monnat, J., Hacker, U., Geissler, H., Rauchenberger, R., Neuhaus, E., Maniak, M., Soldati, T. (1997): *Dictyostelium discoideum* protein disulfide isomerase, an endoplasmatic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal. *FEBS Lett.* **418 (3)**, 357-362.

- Murakami, K. and Mori, M. (1990). Purified presequence binding factor (PBF) forms an import-competent complex with a purified mitochondrial precursor protein. *EMBO J.* **9**, 3201-3208.
- Nakai, K. and Kanehisa, M. (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**, 897-911.
- Nakamoto, R.K., Ketchum, C.J., Kuo, P.H., Yelena, B.P., Al-Shawi, M.K. (2000). Molecular mechanism of rotational catalysis in the F1F0 ATP synthase. *BBA* **1458**, 289-299.
- Nakazono, M., Imamura, T., Tsutsumi, N., Sasaki, T. and Hirai, A. (2000). Characterization of two cDNA clones encoding isozymes of the F1F0-ATPase inhibitor protein of rice mitochondria. *Planta* **210 (2)**, 188-194.
- Nargang, F. E., Künkele, K. P., Mayer, A., Ritzel, R. G., Neupert, W. and Lill, R. (1995). Sheltered disruption of *Neurospora crassa* MOM22, an essential component of the mitochondrial protein import complex. *EMBO J.* **14**, 1099-1108.
- Nellen, W., Silan, C. and Firtel, R. A. (1984). DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2890-2898.
- Nelson N. Nelson H. Racker E. (1972). Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XI. Magnesium-adenosine triphosphatase properties of heat-activated coupling factor I from chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **247(20)**:6506-6510
- Nelson, N. and Harvey, W. R. (1999) Vacuolar and Plasma Membrane Proton-Adenosinetriphosphatases. *Physiol. Rev.* **79 (2)**, 361-385.
- Netzer, W. and Hartl, F. U. (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and – independent mechanisms. *TIBS* **23**, 68-73.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.* **66**, 863-917.
- Nakamura et al., 2000, Genbank NCBI
- Newell, P. C., Telser, A. and Sussman, M. (1969). Alternative developmental pathways determined by environmental conditions in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J. Bacteriol.* **100**, 763-768.
- Ni, L., Heard, T. S. and Weiner, H. (1999). In vivo mitochondrial import. A comparison of leader sequence charge and structural relationships with the in vitro model resulting in evidence for co-translational import. *J. Biol. Chem.* **274 (18)**, 12685-12691.
- Nieuwenhuis FJ. Bakkenist AR. (1977). Isolation and characterization of an inhibitory subunit of the Mg²⁺--Ca²⁺-ATPase of *Escherichia coli*. *BBA.* **459 (3)**:596-604
- Niewöhner, J., Weber, I., Maniak, M., Müller-Taubenberger, A. and Gerisch, G. (1997). Talin-Null Cells of *Dictyostelium* are Strongly Defective in Adhesion to Particle and Substrate Surfaces and Slightly Impaired in Cytokinesis. *J. Cell Biol.* **138**, 349-361.
- Noegel, A., Welker, D. L., Metz, B. A. und Williams, K. L. (1985): Presence of nuclear associated plasmids in the lower eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.*, **185**, 447-450.

- Norling, B., Tourikas, C., Hamasur, B. and Glaser, E. (1990). Evidence for an endogenous ATPase inhibitor protein in plant mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **188**, 247-252.
- Ochman, H., Medhora, M., Garza, D. and Hartl, D. L. (1989). Amplification of flanking sequences by inverse PCR. In: *PCR Protocols*. Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T. eds. Academic Press, New York.
- Ogawa, S., Yoshino, R., Angata, K., Iwamoto, M., Pi, M., Kuroe, K., Matsuo, K., Morio, T., Urushihara, H., Yanagisawa, K. and Tanaka, Y. (2000). The mitochondrial DNA of *Dictyostelium discoideum*: Complete sequence, gene content and genome organization. *Mol. Gen. Genet* **263** (3), 514-519.
- Ogishima, T., Niidome, T., Shimokata, K., Kitada, S. and Ito, A. (1995). Analysis of elements in the substrate required for processing by mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* **270** (51), 30322-30326.
- Ogura et al., 2001, Genbank NCBI
- Ohta, T., Essner, R., Ryu, J.-H., Palazzo, R.E., Uetake, Y. and Kuriyama, R. (2002). Characterization of Cep135, a novel coiled-coil centrosomal protein involved in microtubule organization in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* **156** (1), 87-99.
- Okada, Y., Hashimoto, T., Yoshida, Y. and Tagawa, K. (1986). Existence of stoichiometric amounts of an intrinsic ATPase inhibitor and two stabilizing factors with mitochondrial ATP synthase in yeast. *J. Biochem.* **99**, 251-256.
- Ono, H. and Tuboi, S. (1988). The cytosolic factor required for import of precursors of mitochondrial proteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **263**, 3188-3193.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. and Remington, S. J. (1996). Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* **273**, 1392-1395.
- Oster, G. and Wang, H. (2000). Reverse engineering a protein: the mechanochemistry of ATP synthase. *BBA* **1458**, 482-510.
- Ouchterlony, Ö (1962): Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. In: *Progress in Allergy*, (Kallos, P., Waksman, B. H., eds.).
- Owen, P. and Kaback, H. R. (1978). Molecular structure of membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**(7), 3148-3152.
- Papa, S., Zanotti, F., Cocco, T., Perucci, C., Candita, C. and Minuto, M. (1996). Identification of functional domains and critical residues in the adenosinetriphosphatase inhibitor protein of mitochondrial F₀F₁ ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* **240**, 461-467.
- Parent, C.A., Blacklock, B.J., Froehlich, W.M., Murphy, D.B. and Devreotes, P.N. (1998). G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell* **95**, 81-91.
- Parish, R. W. (1975). Mitochondria and Peroxisomes from cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. Isolation techniques and urate oxidase association with Peroxisomes. *Eur. J Biochem.*, **58**(2), 523-531.

- Peters, J. H. (1990). Zellfusion zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern der Maus. In Peters, J. H. and Baumgarten, H. (Eds.). *Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung*. Springer. Berlin, Heidelberg, New York, 51-57.
- Pfanner, N., Douglas, M. G., Endo, T., Hoogenraad, N. J., Jensen, R. E., Meijer, M., Neupert, W., Schatz, G., Schmitz, U. K. and Shore, G. C. (1996). Uniform nomenclature for the Protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *TIBS* **21**, 51-52.
- Pharmacia: Isolation and Subfractionation of Rat Liver Mitochondria (Percoll-Protokoll).
- Pharmacia: Protokoll GST Gene Fusion System, 1993.
- Pilon, M. and Schekman, R. (1999). Protein Translocation: How Hsp90 pulls it off. *Cell* **97**, 679-682.
- Polgreen, K. E., Featherstone, J., Willis, A. C. and Harris D. A. (1995). Primary structure and properties of the inhibitory protein of the mitochondrial ATPase (H(+)-ATP synthase from potatoe. *BBA* **1229** (2), 175-180.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M.J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233.
- Pullman, M. E. and Monroy, G. C. (1963). A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **238**, 3762-3769.
- Raaij, M. J. van, Orriss, G. L., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M. and Walker J. E. (1996). The ATPase Inhibitor Protein from Bovine Heart Mitochondria: The Minimal Inhibitory Sequence. *Biochem.* **35**, 15618-15625.
- Raper, K. B. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mould from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**, 135-147.
- Reymond, C.D., Schaap, P., Veron, M. and Williams, J.G. (1995). Dual role of cAMP during *Dictyostelium* development. *Experientia* **51**(12), 1166-1174.
- Richter, M- L., Hein, R. and Huchzermeyer, B. (2000). Important subunit interaction in the chloroplast ATP synthase. *BBA* **1458**, 326-342.
- Richter, S. and Lamppa, G. K. (1998). A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7463-7468.
- Roise, D. (1997). Recognition and Binding of Mitochondrial Presequences during the Import of Proteins into Mitochondria. *J. Bioenerg. Biomem.* **29** (1), 19-27.
- Roise, D., Theiler, F., Horvath, S. J., Tomich, J. M., Richards, J. H., Allison, D. S. and Schatz, G. (1988). Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO J.* **7** (3), 649-653.
- Royo, E. E., Guiard, B., Neupert, W. and Stuart, R. A. (1999). N-terminal tail export from the mitochondrial matrix. Adherence to the prokaryotic „positive-inside“ rule of membrane protein topology. *J. Biol. Chem.* **274** (28), 19617-19622.
- Rosenbusch, J. P., Garavito, R. M., Dorset, D. L. and Engel, A. (1982). Structure and function of a pore-forming transmembrane protein: high resolution studies of a bacterial porin. In: *Protides of*

the biological fluids, 29th Colloquium 1981, ed. Peeters, H. (Pergamon Press, Oxford and New York), 171-174.

- Rouslin, W. and Broge, C. W. (1993). Factors affecting the species-homologous and species-heterologous binding of mitochondrial ATPase Inhibitor, IF1, to the mitochondrial ATPase of slow and fast heart-rate hearts. *Arch. Biochem. Biophys.* **303** (2), 443-450.
- Rouslin, W. and Broge, C. W. (1994). Analysis of factors affecting functional assays for estimating IF1, the mitochondrial ATPase Inhibitor. *Anal. Biochem.* **222**, 68-75.
- Rouslin, W. and Broge, C. W. (1996a). IF1 function in situ in uncoupler-challenged ischemic rabbit, rat, and pigeon hearts. *J. Biol. Chem.* **271** (39), 23638-23641.
- Rouslin, W. and Broge, C. W. (1996b). Isoform-independent heart rate-related variation in cardiac myofibrillar Ca^{2+} -activated Mg^{2+} -ATPase activity. *Am. J. Physiol.* **270** (Cell Physiol. **39**), C1271-C1276.
- Rouslin, W., Broge, C. W., Guerrieri, F. and Capozza, G. (1995b). ATPase activity, IF1 content, and proton conductivity of ESMP from control and ischemic slow and fast heart-rate hearts. *J. Bioenerg. Biomemb.* **27** (4), 459-466.
- Rouslin, W., Frank, G. D. and Broge, C. W. (1995a). Content and binding characteristics of mitochondrial ATPase Inhibitor, IF1, in the tissues of several slow and fast heart-rate homeothermic species and in two poikilotherms. *J. Bioenerg. Biomemb.* **27** (1), 117-125.
- Ryan, M. T., Müller, H. and Pfanner, N. (1999). Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **274** (29), 20619-20627.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim N. (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Samuel, D. S., Belote, J. M. and Chan S. H. P. (1995). Isolation of the F1-ATPase inhibitor gene and its pseudogenes. *BBA* **1230**, 81-85.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Saraste, M. (1999). Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**, 1488-1493.
- Schägger, H. and v. Jagow, G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Schein, C. H. (1993). Solubility and secretability. *Curr. Op. Biotechnol.* **4**(4), 456-461.
- Schleicher, M., André, B., Andréoli, C., Eichinger, L., Haugwitz, M., Hotmann, A., Karakesioglou, J., Stöckelhuber, M. and Noegel, A. A. (1995). Structure/function studies on cytoskeletal proteins in *Dictyostelium amoebae* as a paradigm. *FEBS Lett.* **369**, 38-42.
- Schleicher, M., André, E., Hartmann, H. and Nougél, A. A. (1988). Actin binding proteins are conserved from slime molds to man. *Dev. Genet.* **9**, 521-530.

- Schneider, G., Sjöling, S., Wallin, E., Wrede, P., Glaser, E. and von Heijne, G. (1998). Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides. *Proteins* **30**, 49-60.
- Schoupe, C., Vaillier, J., Venard, R., Rigoulet, M., Velours, J. and Haraux, F. (1999). Activation and deactivation of F0F1-ATPase in yeast mitochondria. *J. Bioenerg. Biomem.* **31 (2)**, 105-117.
- Schwartz, M. P., Huang, S. and Matouschek, A. (1999). The structure of precursor proteins during import into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **274 (18)**, 12759-12764.
- Sherman, M. Yu. and Goldberg, A. L. (1992). Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in Escherichia coli. *EMBO J.* **11 (1)**, 71-77.
- Sheterline, P., Clayton, J., and Sparrow, J. C. (1995) Actin, in Sheterline, P. (series Ed.), *Protein Profile*, **2 (1)**, Academic Press, New York.
- Silva-Filho, M. de C., Wieërs, M.-C., Flügge, U.-I., Chaumont, F. and Boutry, M. (1997). Different in Vitro and in Vivo Targeting Properties of the Transit Peptide of a Chloroplast Envelope Inner Membrane Protein. *J. Biol. Chem.* **272 (24)**, 15264-15269.
- Sjöling, S. and Glaser, E. (1998). Mitochondrial targeting peptides in plants. *Trends in Plant Sci.* **3 (4)**, 136-140.
- Sjöling, S., Erikson, A.C. and Glaser, E. (1994). A helical element in the C-terminal domain of the *N.plumbaginifolia* F1 β presequence is important for recognition by the mitochondrial processing peptidase. *J.Biol.Chem.* **269(51)**, 32059-32062.
- Sjöling, S., Waltner, M., Kalousek, F., Glaser, E. and Weiner, H. (1996). Studies on protein processing for membrane-bound spinach leaf mitochondrial processing peptidase integrated into the cytochrome bc1 complex and the soluble rat liver matrix mitochondrial processing peptidase. *Eur.J.Biochem.* **242**, 114-121.
- Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67 (1)**, 31-40.
- Smith, G. E. and Summers, M. D. (1980). The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzyloxymethyl-paper. *Anal.Biochem.* **109**, 123-129
- Smith, P. K., Kron, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Solaini, G., Baracca, A., Gabellieri, E. and Lenaz, G. (1997). Modification of the mitochondrial F1-ATPase ϵ subunit, enhancement of the ATPase activity of the IF1-F1 complex and IF1-binding dependence of the conformation of the ϵ subunit. *Biochem. J.* **327**, 443-448.
- Song, MC., Shimokata, K., Kitada, S., Ogishima, T. and Ito, A. (1996). Role of basic amino acids in the cleavage of synthetic peptide substrates by mitochondrial processing peptidase. *J.Biochem.* **120(6)**,1163-1166.

- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Spieth, J., Brooke, G., Kuerstan, S., Lea, K. and Blumenthal, T. (1993). Operons in *C. elegans*: Polycistronic mRNA precursors are processed by trans-splicing of SL2 to downstream coding regions. *Cell* **73(3)**, 521-532.
- Stähl, A., Pavlov, P.F., Szigyarto, C. and Glaser, E. (2000). Rapid degradation of the presequence of the F1b precursor of the ATP synthase inside mitochondria. *Biochem. J.* **349**, 703-707.
- Stöckelhuber, M., Noegel, A. A., Eckerskorn, C., Köhler, J., Rieger, D. and Schleicher, M. (1996). Structure/function studies on the pH-dependent actin-binding protein hisactophilin in *Dictyostelium* mutants. *J. Cell Sci.* **109**, 1825-1835.
- Striebel, H.-M. and Kalousek, F. (1999). Eukaryotic precursor proteins are processed by Escherichia coli outer membrane protein OmpP. *Eur. J. Biochem.* **262**, 832-839.
- Stryer, L. (1994). Biochemie. Übersetzung der Originalausgabe 1988, 2. korr. Nachdruck der neu bearbeiteten Auflage 1990, Spektrum Verlag
- Suelmann, R. and Fischer, R. (2000). Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **45**, 42-50.
- Suggs, S. V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E. H., Johnson, M. J., Itakura, K. and Wallace, R. B. (1981). Use of synthetic oligodeoxy-ribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences using purified genes. In: *Developmental Biology* (Brown, D. D. and Fox, C. F., eds.), Academic Press NY, 683-693.
- Susin, S. A., Zamzami, N. and Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *BBA* **1366**, 151-165.
- Sutoh, K. (1993): A transformation vector for *Dictyostelium discoideum* with a new selectable marker bsr. *Plasmid* **30**: 150-154
- Tagawa, K., Hashimoto, T. and Yoshida Y. (1986). Isolation and characterization of an inactivated complex of F1F0-ATPase and its inhibitory factors from yeast. *Meth. Enzymol.* **126**, 504-512.
- Tanudji, M., Sjöling, S., Glaser E. and Whelan, J. (1999). Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **274 (3)**, 1286-1293.
- Thedinga, E. (1993). Diplomarbeit
- Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies Within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Tokuyasu, K. T. (1973). A technique for ultracyotomy of cell suspensions and tissues. *J. Cell Biol.* **57(2)**, 551-565.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Sci. USA*, **76 (9)**, 4350-4354.
- Trembicki, K.A. and Dietert, R.R. (1985). Chicken developmental antigens: analysis of erythroid populations with monoclonal antibodies. *J. Exp. Zool* **235 (1)**: 127-134

- Triglia T., Peterson M.G., Kemp D. (1988). A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucl. Acids. Res.* **16**, 8186
- Troll, H., Malchow, D., Müller-Taubenberger, A., Humbel, B., Lottspeich, F., Ecke, M., Gerisch, G., Schmid, A. and Benz, R. (1992). Purification, Functional Characterisierung, and cDNA Sequencing of Mitochondrial Porin from *Dictyostelium discoideum*. *J.Biol.Chem.* **267/29**, 21072-21079.
- Ushiba, D. and Magasanik, B. (1952). Effects of auxotrophic mutations on the adaption to inositol degradation in *Aerobacter aerogenes*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**, 626-632.
- Van Driessche, N., Shaw, C., Kato, M., Morio, T., Sugang, R., Ibarra, M., Kuwayama, H., Saito, T., Urushihara, H., Maeda, M., Takeuchi, I., Ochiai, H., Eaton, W., Tollett, J., Halter, J., Kuspa, A., Tanaka, Y. and Shaulky, G. (2002). A transcriptional profile of multicellular development in *Dictyostelium discoideum*. *Develop.* **129**, 1543-1552.
- Velours, J., Paumanrd, P., Soubannier, V., Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G. and Graves, P.-V. (2000). Organisation of the yeast ATP synthase F₀: a study based on cysteine mutants, thiol modifications and cross-linking reagents. *BBA* **1458**, 443-456.
- Venard, R., Brethes, D., Giraud, M.-F., Vaillier, J., Velours, J. and Haraux, F. (2003). Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochem.*, **42**, 7626-7636.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982): The pUC plasmid, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, **19**, 259-268.
- Vogelstein, B and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **76**, 615-619.
- Voisine, C., Craig, E. A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N. and Voos, W. (1999). The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* **97**, 565-574.
- Von Heijne, G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* **7**, 1335-1342.
- Walker, J. E., Gay, N. J., Powell, S. J., Kostina, M., Dyer, M. R. (1987). ATP Synthase from Bovine Mitochondria: Sequences of Imported Precursors of Oligomycin Sensitivity Conferral Protein, Factor 6, and Adenosinetriphosphatase Inhibitor Protein. *Biochem.* **26**, 8613-8619.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science* **283**, 1482-1488.
- Wallraff, E, Schleicher, M., Modersitzki, M., Rieger, D., Isenberg, G. and Gerisch, G. (1986). Selection of *Dictyostelium* mutants defective in cytoskeletal proteins: use of an antibody that binds to the ends of alpha-actinin-rods. *EMBO J.* **5**, 61-67.
- Wallraff, E. and Gerisch, G. (1991). Screening for *Dictyostelium* mutants defective in cytoskeletal proteins by colony immunoblotting. *Methods in Enzymol.* **196**, 334-348.

- Waltner, M. and Weiner, H. (1995). Conversion of a nonprocessed mitochondrial precursor protein into one that is processed by the mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* **270** (44), 26311-26317.
- Watts, D. J. and Ashworth, J. M. (1970): Growth of myxamoebae of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 171-174.
- Weber, I., Gerisch, G., Badelt, K., Heizer, C., Murphy, J., Stock, A., Schwartz, J.-M. and Faix, J. (1999). Cytokinesis mediated through the recruitment of cortexillins into cleavage furrow. *Embo J.* **18**, 586-594.
- Weber, J. and Senior A. E. (2000). ATP synthase: what we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis. *BBA* **1458**, 300-309.
- Wedegaertner PB, Wilson PT, Bourne HR. (1995) LIPID MODIFICATIONS OF TRIMERIC G PROTEINS *J.Biol.Chem.* **270**(2):503-506
- Westphal, M., Jungbluth, A., Heidecker, M., Mühlbauer, B., Heizer, C., Schwartz, J. M., Mariott, G. and Gerisch, G. (1997). Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using GFP-actin fusion protein. *Curr.Biol.* **7**(3), 176-183.
- Williams, K. L. (1978): Characterization of dominant resistance to cobalt chloride in *Dictyostelium discoideum* and its use in parasexual genetic analysis. *Genetics* **90**, 37-47.
- Wintero et al., 1999, Genbank NCBI
- Witke, W., Nellen, W. and Noegel, A. A. (1987). Homologous recombination in the Dictyostelium alpha-actinin gene leads to an altered mRNA and lack of the protein. *EMBO J.* **6**, 4143-4148. .
- Witke, W., Schleicher, M., and Noegel, A. A. (1992): Redundancy in the microfilament system: Abnormal development of *Dictyostelium* cells lacking two F-actin cross-linking proteins. *Cell*, **68**, 53-62.
- Wood et al., 1999, Genbank NCBI
- Yamada EW, Shiffman FH, Huzel NJ. (1980). Ca²⁺-regulated release of an ATPase inhibitor protein from submitochondrial particles derived from skeletal muscles of the rat. *J. Biol. Chem.* **255**(1):267-73.
- Yamada, E. W. and Huzel, N. J. (1983). *Biosc. Rep.* **3**, 947
- Yamada, E. W., Shiffman, F. H. and Huzel, N. J. (1980). *J. Biol Chem.* **255**, 267-273.
- Yamada, E., Ishiguro, N., Miyaishi, O., Takeuchi, A., Nakashima, I., Iwata, H. and Isobe, K. (1997). Differential display analysis of murine collagen-induced arthritis: cloning of the cDNA-encoding murine ATPase Inhibitor. *Immunol.* **92**, 571-576.
- Yang, F., Moss, L. G. and Philips, G. N. Jr. (1996). The Molecular Structure of Green Fluorescent Protein. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1246-1251.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

-
- Yano, M., Kanazawa, M., Terada, K., Namchai, C., Yamaizumi, M., Hanson, B., Hoogenraad, N. and Mori, M. (1997). Visualization of Mitochondrial Protein Import in Cultured Mammalian Cells with Green Fluorescent Protein and Effects of Overexpression of the Human Import Receptor Tom20. *J. Biol. Chem.* **272** (13), 8459-8465.
- Yoshida, Y., Hashimoto, T., and Tagawa, K. (1983b). Cell-free synthesis of mitochondrial ATPase inhibitor precursor and its transport into mitochondria. *J. Biochem.* **94**, 283-290.
- Yoshida, Y., Hashimoto, T., Hase, T., Matsubara, H. and Tagawa, K. (1983a). Partial amino terminal sequence of the precursor of mitochondrial ATPase inhibitor protein synthesized with mRNA partially purified by gel permeation chromatography. *J. Biochem.* **94**, 291-297.
- Yoshida, Y., Sato, T., Hashimoto, T., Ichikawa, N., Nakai, S., Yoshikawa, H., Imamoto, F and Tagawa, K. (1990). Isolation of a gene for regulatory 15-kDa subunit of mitochondrial F₁F₀-ATPase and construction of mutant yeast lacking the protein. *Eur. J. Biochem.* **192**, 49-53.
- Yoshida, Y., Wakabayashi, S., Matsubara, H., Hashimoto, T. and Tagawa, K. (1984). *FEBS Lett.* **170**, 135
- Young, R. A. und Davis, R. W. (1983): Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. *Science*, **222**, 778-782.
- Young, R. A. und Davis, R. W. (1985): Immunoscreening λ gt11 recombinant DNA expression libraries. In Setlow, J.K. and Hollander, A. (Eds), *Genetic Engineering. Plenum Publishing Corp. New York*: 29-41.
- Zanotti, F., Raho, G., Vuolo, R., Gaballo, A., Papa, F and Papa, S. (2000). Functional domains of the ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria. *FEBS Lett.* **482**, 163-166.

DANKSAGUNG

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, ich möchte mich an dieser Stelle herzlich dafür bedanken.

Herrn Prof. Dr. Gerisch danke ich für das freie, herausfordernde Thema und sein kontinuierliches Interesse am Fortgang der Arbeit. Seine stete fachliche Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und wertvollen Hinweise während der Bearbeitung des Themas und insbesondere in der Phase des Zusammenschreibens haben die Arbeit sehr vorangebracht. Durch die gewährte selbständige Arbeitsmöglichkeit konnte ich meinen praktischen wie theoretischen Erfahrungshorizont wesentlich erweitern. Desweiteren bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die sehr guten Arbeitsbedingungen in der Abteilung und nicht zuletzt für die finanzielle Absicherung, um die Experimente abschließen zu können.

Herrn Prof. Dr. Baumeister möchte ich herzlich für seine Betreuung danken und für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät für Chemie der TU München. Dies hat den erfolgreichen Abschluß der Arbeit letztlich ermöglicht.

Vielen Dank auch an die Mitglieder meiner Prüfungskommission - Herr Prof. Dr. Nuyken, Herr Prof. Dr. Baumeister, Frau Prof. Dr. Weinkauff - für das kurzfristige Zustandekommen des Prüfungstermins, trotz übervoller Terminkalender.

Ein besonderes Bedürfnis ist es mir, den "Bewohnern von C134" für die freundliche Aufnahme in Euer Labor zu danken - es hat mir dort sehr viel Spaß gemacht. Mit Euch hatte ich nicht nur das beste Laborteam um mich, in guten wie in weniger guten Tagen, sondern auch privat liebe Freunde. Mary Ecke möchte ich dabei ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei meinen ersten molekularbiologischen Gehversuchen und so vielen weiteren experimentellen Schritten im Labor danken. Unvergessen ist ihre Einsatzbereitschaft zur Pflege meiner doch etwas umfangreicheren Sammlung Hybridoma-Klone, was mir nach vielwöchiger auslaugender Klonierungsarbeit meinen "Reset-Urlaub" erst ermöglicht hat. Ebenfalls ein großes Dankeschön an Christina Mang - ihr verdanke ich vor allem mein erstes zellbiologisches und mikroskopisches Rüstzeug - sehr solide und ein zentrales Werkzeug für die Arbeit, dazu die Immunisierung meiner Mäuse, ständig Nachschub an frischen Dicty's und gute Stimmung, auch wenn es in unserem Labor keinen kleinen Chemotechniker gab.

Elke Thedinga hat mich überzeugt, daß umgestülpte Mitochondrien eigentlich viel spannender sind, sie hat mir gezeigt wie man das Letzte aus Elektrophorese-Gelen herausholt und wie man sonst emotional überlebt. Zusammen mit Ulrike Hacker sind die Pinozytose-Assays entstanden, die eine gewisse sportliche Ertüchtigung darstellten, andere Mitglieder der Abteilung zeitweise akut in Kollisionsgefahr brach-

ten und daneben einen überzeugenden Eindruck von guter Planung und stringenter Arbeitsweise vermittelten - Tugenden an denen ich selbst noch arbeite. Monika Matzner danke ich für ihre maßgebliche Unterstützung bei den Präparationen fürs TEM und ihre Lösungsvorschläge für spezielle Probleme.

Hans Faix danke ich für sehr hilfreiche Diskussionen von Knockout-Strategien und seine stets burschikos-motivierende, pragmatische Art und Hilfsbereitschaft, derer ich, trotz Zugehörigkeit zur sich gerade entwickelnden und von ihm eher geringgeschätzten "Kit-Generation" sicher sein konnte. Nicht zu vergessen sind zur Verfügung gestellte Naturalien wie Vektoren, Antikörper und fix und fertig aufgereinigtes GST. Alicja Baskaya danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Herstellung und Testung der Hybridoma-Zellen, und daß ich dabei, wenn schon nicht Land in Sicht, dann doch eine gewisse stabilisierende Systematik behalten habe. Sehr engagiert unterstützt wurde ich dabei auch von Caroline Zentz – und sie hat das völlig freiwillig gemacht, herzlichen Dank! Jean-Marc Schwartz hat seine Meß- und Auswerte-Software für Motility-Messungen mit viel Geduld und Aufwand meinen Untersuchungsobjekten – sich viel zu schnell bewegende Mitochondrien – anpassen müssen, ich hoffe er konnte es sonst auch nochmal brauchen. Oana Mihalache und Paul Strodel standen mir mit wertvollem Rat in Sachen Proteinreinigung bei, Monika Westphal steuerte GFP-Vektor und GFP-Zellen bei, Gerhard Rahn hat meine Antikörper jodiert, vielen Dank an alle!

Danken möchte ich auch all denen, die meist völlig unauffällig alle anderen Routine- und Servicearbeiten durchgeführt haben, und deren enormen Entlastungswert man erst später realisiert, wenn man vieles davon selbst machen muß: u.a. Elfriede Nissig, Marianne Siebert, Klaus Weber, Helga Wien, John Murphy, Richard Albrecht.

Mein besonderer Dank gilt David - er hat meinen größten Respekt dafür, wie selbständig er schon sehr früh zurechtgekommen ist. Auch meinen Eltern gebührt in diesem Zusammenhang großer Dank für ihre jederzeit spontan abrufbare Einsatzbereitschaft und Unterstützung.

Und ganz wichtig: Hartmut Schlichting – er hat nicht nur alle Höhen und Tiefen miterlebt, sondern auch echte Verluste hinnehmen müssen (das Auto war für's Zeitfahren vielleicht doch zu schade, sorry). Er war wichtiger Berater in vielen technischen Dingen, und er hat es verstanden, meine Motivation mit einmalig trockenem Humor ständig neu zu beleben. Vielen Dank für die unendliche Geduld und die permanente Überzeugung, daß es zu schaffen ist.