

***D-myo-Inositol 3-phosphat Synthase in D.discoideum***

Isolierung und Charakterisierung inositol-auxotropher Mutanten

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Chemie  
der Bergischen Universität Wuppertal

vorgelegt von  
**Andreas Fischbach**  
aus Dortmund

**Februar 2005**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 1997 bis Juni 2004 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Vogel im Fachbereich C für Mathematik und Naturwissenschaften der Bergischen Universität Wuppertal.

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden: urn:nbn:de:hbz:468-20050146  
[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20050146>]

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günter Vogel für die Aufgabenstellung und sein Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Piepersberg danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Weiterhin gilt mein Dank:

Meinen Kolleginnen und Kollegen Dr. Stephan Adelt, Guido Dallmann, Anne-Brigitte Eyidi, Dr. Tim Laussmann, Dr. Marcus Mreyen, Alexander Müller, Dr. Christine Trautwein und Dr. Muatasem Ubeidat für viele Ratschläge, ständige Diskussionsbereitschaft und das hervorragende Arbeitsklima.

Den Kollegen des Arbeitskreises „Chemische Mikrobiologie“ unter Leitung von Prof. Dr. Piepersberg für die Unterstützung bei generellen molekularbiologischen Fragestellungen.

Herrn Dr. Michael Podeschwa für die Synthese verschiedener Inositolphosphate und Inositolisomere.

Frau Katja Buhr für die GCMS-Analytik.

Frau Prof. Dr. Angelika Noegel (Universität Köln) für die Bereitstellung von verschiedenen Vektoren.

H. Urushihara (Tsukuba Universität, Japan) für die Bereitstellung der Vektoren FC-AA11 und FC-BP15.

Prof. A. N. Lahiri Majumder (Bose Institute, Calcutta) für den polyklonalen Antikörper gegen die MIPS aus *E. histolytica*.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen eines DFG-Projekts.

## Zusammenfassung

D-*myo*-Inositol 3-phosphat Synthase (MIPS) katalysiert die Umsetzung von D-Glucose 6-phosphat in D-*myo*-Inositol 3-phosphat, dem primären Schritt bei der Synthese von *myo*-Inositol in Archaeobakterien und Eukaryonten. *Myo*-Inositol ist ein Baustein essentieller Moleküle, insbesondere Inositolphosphate, Phosphoinositolphosphate und GPI-verankerter Proteine.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zur Bestimmung der D-*myo*-Inositol 3-phosphat Synthase Aktivität etabliert. Basierend auf dieser Methode wurde die D-*myo*-Inositol 3-phosphat Synthase aus *D.discoideum* identifiziert und partiell angereichert.

Um Kenntnisse über den Inositolstoffwechsel von *D.discoideum* zu erhalten, wurden konditional letale, inositol-auxotrophe Mutanten über „gene replacement“ und Antisense-Mutagenese generiert. Die verringerte Expression der MIPS wurden durch Northern Blotting, Immunoblotting und Aktivitätstest in den Mutanten nachgewiesen.

Im Gegensatz zum Wildtyp wachsen die inositol-auxotrophen Mutanten nur in Medien mit einem Zusatz an *myo*-Inositol. Unter inositol-limitierenden Bedingungen zeigen die Mutanten mehrere Wachstumsdefekte. Sie konnten nicht auf Bakterienrasen oder in Bakteriensuspension wachsen. Auf inositolfreien Medien stellten sie ihr Wachstum ein, verloren ihre typische amöboide Form und starben nach 24 h. Eine Blockierung der Proteinbiosynthese oder Entzug der Kohlenstoffquelle konnte die Zellen vor diesem Tod bewahren. Daraus kann geschlossen werden, dass inositolhaltige Verbindungen essentiell für das vegetative Wachstum sind.

Während des Inositolentzugs zeigten Mutanten aus der vegetativen Wachstumsphase Defekte in der Phagozytose, der Adhäsion und der EDTA-sensitiven Aggregation. Diese phänotypischen Veränderungen gingen einher mit abnehmenden *myo*-Inositol-, PtdIns- und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Konzentrationen. Zusätzlich zeigten die Mutanten eine Zunahme an 2,3-Bisphosphoglycerat. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtung werden diskutiert. In anderen untersuchten inositolhaltigen Verbindungen, beispielsweise Inositolphosphate, PtdIns(3)P, PtdIns(4)P und Diphosphoinositolphosphate, konnten keine weiteren Veränderungen beobachtet werden.

Im Gegensatz zum vegetativen Wachstum zeigten die Mutanten während der Differenzierung nur geringe Defekte. Die Mutanten formten ungewöhnliche Aggregate mit mehrfachen Spitzen, jedoch zeigten die Fruchtkörper einen normalen Aufbau. Die Sporengermination war normal, jedoch verloren die Zellen ihre Vitalität sofort, wenn dem Medium kein *myo*-Inositol zugesetzt wurde.

## Abstract

D-*myo*-Inositol 3-phosphate synthase catalyses the conversion of D-glucose 6-phosphate to D-*myo*-inositol 3-phosphate, the primary reaction for the synthesis of *myo*-inositol in archaeobacteria and eukaryotes. *Myo*-Inositol is a precursor of essential molecules like inositol phosphates, membrane phospholipids and GPI anchor proteins.

In the present work a new method for the determination of D-*myo*-inositol 3-phosphate synthase activity was established. Based on this assay the D-*myo*-inositol 3-phosphate synthase of *D.discoideum* was identified and partially purified.

To investigate the role of inositol-containing compounds in *D.discoideum*, conditional lethal, inositol-auxotrophic mutants were generated by gene replacement and antisense-mediated gene inactivation of the D-*myo*-inositol 3-phosphate synthase gene. The reduced expression of MIPS was proven by northern blots, immunoblots and enzymatic assays.

In contrast to wild type cells the inositol-auxotrophic mutants grow only in media supplemented with *myo*-inositol. The mutants show several growth defects under inositol limiting conditions. They were unable to grow on bacterial lawns or in bacteria suspension. Transferred to *myo*-inositol-free medium the mutants stopped growth, lost their typical amoeboid form and died after 24 h. The cells can be protected from “inositolless death” by blocking the protein biosynthesis or carbon-starvation. It can be concluded that some inositol-containing compounds are essential for the vegetative growth.

During *myo*-inositol starvation mutants from the vegetative growth phase show defects in phagocytosis, adhesion and EDTA-sensitive aggregation. These phenotypical changes were accompanied by a decrease of intracellular *myo*-inositol, PtdIns and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. In addition, the mutants show an increase of 2,3-bisphosphoglycerate. Possible explanations for this observation are discussed. No alterations were observed during *myo*-inositol starvation in the intracellular levels of other analysed inositol-containing compounds such as inositol phosphates, PtdIns(3)P, PtdIns(4)P and diphospho *myo*-inositol phosphates.

In contrast to the vegetative growth phase the mutants show only minor defects during differentiation. The mutants formed unusual aggregates with multiple tips but normal fruiting-body morphology. The spore germination was normally but the cells lost their vitality immediately in media lacking *myo*-inositol.

## Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen bezogen auf das Gesamtvolumen
(w/v)	Masse bezogen auf das Gesamtvolumen
2,3-BPG	2,3-Bisphosphoglycerat
A	Adenin
<i>A.fulgidus</i>	Archaeoglobus fulgidus
<i>A.pseudoplatanus</i>	Acer pseudoplatanus
<i>A.thaliana</i>	Arabidopsis thaliana
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
<i>B.napus</i>	Brassica napus
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
<i>C.albicans</i>	Candida albicans
<i>C.elegans</i>	Coenorhabditis elegans
<i>C.paradisi</i>	Citrus paradisi
cAMP	cyclisches Adenosin 3', 5'-monophosphat
cDNA	copy DNA (revers von RNA transkribierte DNA)
d	Tage
<i>D.discoideum</i>	Dictyostelium discoideum
<i>D.melanogaster</i>	Drosophila melanogaster
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleotid 5'-phosphat
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
<i>E.gracilis</i>	Euglena gracilis
<i>E.histolytica</i>	Entamoeba histolytica
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GCMS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektroskopie
GDP	Guanosin 5'-diphosphat
GPI	<b>G</b> lycosyl <b>p</b> hosphatidyl <b>i</b> nositol
GroPtdIns(P <sub>x</sub> )	Glycerophosphatidylinositol(phosphate)
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
h	Stunde
<i>H.sapiens</i>	Homo sapiens
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethanolsulfonsäure
HPAEC	<b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>A</b> nion <b>E</b> xchange <b>C</b> hromatography
HPLC	<b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography
Ins	<i>myo</i> -Inositol
Ins(3)P	D- <i>myo</i> -Inositol 3-phosphat
InsP <sub>7</sub>	D-6-Diphospho- <i>myo</i> -Inositol(1,2,3,4,5)pentakisphosphat
InsP <sub>8</sub>	D-5,6-Bis-Diphospho- <i>myo</i> -Inositol(1,2,3,4)tetrakisphosphat

InsP <sub>x</sub>	<i>myo</i> -Inositolphosphat (x-fach phosphoryliert)
k	Kilo
<i>K.aerogenes</i>	Klebsiella aerogenes
kb	Kilobasen
<i>L.gibba</i>	Lemna gibba
<i>L.longiforum</i>	Lilium longiforum
<i>L.mexicana</i>	Leishmania mexicana
M	Molar
Mb	Megabasen
<i>M.tuberculosis</i>	Mycobacterium tuberculosis
<i>M.crystallinum</i>	Mesembryanthemum crystallinum
MDD	Metall-Indikator-Detektion ( <b>m</b> etal- <b>d</b> ye- <b>d</b> etection)
MeOH	Methanol
min	Minute
MIPS	D- <b>m</b> yo-I <b>n</b> ositol 3- <b>p</b> hosphat <b>S</b> ynthase
MOPS	Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
<i>N.crassa</i>	Neurospora crassa
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
<i>O.sativa</i>	Oriza sativa
OD	optische Dichte
PAD	<b>P</b> ulsed <b>A</b> mperometric <b>D</b> etection
PAGE	<b>P</b> oly <b>a</b> crylamid <b>g</b> ele <b>l</b> ektrophorese
PAR	4-(2-Pyridylazo)resorcinol
PCR	<b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
<i>P.pastoris</i>	Pichia pastoris
PIK	Phosphatidylinositol-Kinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
PtdInsP <sub>x</sub>	Phosphatidyl- <i>myo</i> -Inositolphosphat (x-fach phosphoryliert)
<i>P.vulgaris</i>	Phaseolus vulgaris
<i>R. phaseoli</i>	Rhizobium phaseoli
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
<i>S.indicum</i>	Sesamum indicum
<i>S.platensis</i>	Spirulina platensis
<i>S.pombe</i>	Schizosaccharomyces pombe
<i>S.cerevisiae</i>	Saccharomyces cerevisiae
<i>S.griseus</i>	Streptomyces griseus
<i>S.polyrrhiza</i>	Spirodela polyrrhiza
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
Upm	Umdrehungen pro Minute
<i>U.hordei</i>	<i>Ustilago hordei</i>

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Struktur und Nomenklatur von Inositol und Inositolphosphaten.....	1
1.2	Vorkommen, Biosynthese und Abbau von Inositol.....	3
1.3	Regulation der <i>D-myo</i> -Inositol 3-phosphat Synthase.....	9
1.4	Natürlich vorkommende Inositol-Auxotrophie .....	11
1.5	Generierte Inositol-Auxotrophie.....	11
1.6	<i>D.discoideum</i> als experimentelles System.....	12
1.7	Methoden zur Generierung von Mutanten .....	14
1.8	Stoffwechsel von inositolhaltigen Metaboliten in <i>D.discoideum</i> und anderen Organismen.....	17
1.8.1	Inositolphosphate .....	17
1.8.2	Der „Second-Messenger“ Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> .....	22
1.8.3	Phosphatidylinositolphosphate.....	24
1.9	Übersicht bekannter Mutanten aus dem Inositolstoffwechsel in <i>D.discoideum</i> .....	31
<b>2</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>34</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	36
3.1.1	Verwendete Stämme .....	36
3.1.2	Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide .....	36
3.1.3	Verwendete Oligonukleotide.....	37
3.1.4	Anzucht von <i>E.coli</i> .....	37
3.1.5	Agarosegelelektrophorese .....	38
3.1.6	Isolierung von Nukleinsäuren .....	38
3.1.7	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	39
3.1.8	Manipulation von Nukleinsäuren .....	39
3.1.9	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	40
3.1.10	Herstellung von kompetenten Bakterien und Transformation .....	40
3.1.11	Ligation von DNA.....	41
3.1.12	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren .....	41
3.1.13	DIG-Markierung von Nukleinsäuren .....	42
3.1.14	Southern-Blotting .....	42
3.1.15	Northern-Blotting .....	43
3.1.16	Hybridisierung von Nukleinsäuren .....	43
3.1.17	Detektion von hybridisierten Nukleinsäuren.....	44
3.1.18	Polymerasekettenreaktion .....	45
3.1.19	Heterologe Genexpression der MIPS aus <i>D.discoideum</i> in <i>E.coli</i> .....	46
3.1.20	Heterologe Genexpression der MIPS aus <i>D.discoideum</i> in <i>P.pastoris</i> .....	46



<b>3.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>49</b>
3.2.1	Kultivierung von <i>D.discoideum</i> .....	49
3.2.1.1	Axenische Kultur von <i>D.discoideum</i> .....	49
3.2.1.2	Anzucht von <i>D.discoideum</i> auf Agarplatten „Clearing Plates“ .....	50
3.2.1.3	Anzucht in Suspension mit <i>E.coli</i> B/r als Nahrungsquelle .....	51
3.2.1.4	Anzucht in Suspension mit <i>K.aerogenes</i> als Nahrungsquelle.....	52
3.2.1.5	Anzucht von <i>D.discoideum</i> in submersen Standkulturen .....	52
3.2.1.6	Inkubation auf Wasseragarplatten.....	52
3.2.2	Chemische Mutagenese.....	53
3.2.3	Synchrone Differenzierung .....	53
3.2.4	Synchrone Sporengermination .....	54
3.2.5	Aufschluss von Sporen.....	54
3.2.6	Bestimmung der Zelldichte und der Zellgrößenverteilung .....	55
3.2.7	Transformation von <i>D.discoideum</i> .....	55
3.2.8	Aufbewahrung von <i>D.discoideum</i> .....	55
3.2.9	Phagozytose.....	56
3.2.9.1	Phagozytostest mit Latexpartikeln .....	56
3.2.9.2	Phagozytostest mit FITC-markierten Bakterien.....	56
3.2.10	Pinozytose .....	57
3.2.11	Exozytose .....	58
3.2.12	Adhäsionstest .....	58
3.2.13	Aggregationstest.....	58
3.2.14	Zellkernfärbung.....	59
3.2.15	Chemotaxis.....	59
3.2.15.1	Folsäurechemotaxis.....	59
3.2.15.2	cAMP-Chemotaxis.....	59
3.2.16	Bestimmung des zellulären F-Aktingehalts .....	60
3.2.16.1	Präparation der Färbelösung .....	60
3.2.16.2	Quantifizierung .....	60
<b>3.3</b>	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>61</b>
3.3.1	Bestimmung der Enzymaktivität durch High Performance Anionenaustauscher-Chromatographie (HPAEC).....	61
3.3.2	Bestimmung der Enzymaktivität durch GCMS .....	62
3.3.3	Proteinbestimmung.....	63
3.3.4	Poyacrylamid-Gelelektrophorese PAGE.....	63
3.3.4.1	Coomassie-Färbung.....	64
3.3.4.2	Silberfärbung.....	64
3.3.5	Immobilisierung von Proteinen auf Membranen (Western-Blot) .....	64
3.3.6	Immunologischer Nachweis immobilisierter MIPS.....	65
3.3.7	Enzymanreicherung.....	65
3.3.7.1	Zellaufschluss und Herstellung eines cytosolischen Extrakts.....	65
3.3.7.2	Anionenaustauscher-Chromatographie an Q-Sepharose.....	65
3.3.7.3	Chromatographie an Hydroxylapatit.....	66
3.3.7.4	Gelchromatographie an HPLC-Superdex 200HR.....	66
3.3.7.5	Anionenaustauscher-Chromatographie an Resource-Q .....	66
3.3.8	Phosphatbestimmung .....	67
3.3.9	Isoelektrischer Punkt.....	68
<b>3.4</b>	<b>Isolierung und Analytik von Inositolphosphaten .....</b>	<b>68</b>
3.4.1	Festphasenextraktion von Inositolphosphaten (Gesamtzellzahl $>1 \cdot 10^9$ ).....	68
3.4.2	Isolierung von Inositolphosphaten (Gesamtzellzahl $1-2 \cdot 10^8$ ).....	69

3.4.3	Analytik von Inositolphosphaten .....	70
<b>3.5</b>	<b>Isolierung und Analytik von Phosphatidylinositolphosphaten .....</b>	<b>72</b>
<b>3.6</b>	<b>Bestimmung des intrazellulären <i>myo</i>-Inositolgehalts .....</b>	<b>76</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Partielle Reinigung und Charakterisierung der MIPS.....</b>	<b>77</b>
4.1.1	Etablierung eines Enzymtests.....	77
4.1.2	Partielle Reinigung der MIPS .....	82
4.1.2.1	Zellaufschluss.....	82
4.1.2.2	Anionenaustauscher-Chromatographie an Q-Sepharose FF .....	83
4.1.2.3	Chromatographie an Hydroxylapatit.....	84
4.1.2.4	Gelchromatographie an HPLC-Superdex 200HR.....	84
4.1.2.5	Anionenaustauscher-Chromatographie an Resource-Q .....	85
4.1.2.6	Zusammenfassung der Anreicherung.....	85
4.1.3	Charakterisierung der <i>D-my</i> o-Inositol-3-phosphat Synthase .....	88
4.1.3.1	Molekulargewicht .....	88
4.1.3.2	Temperaturabhängigkeit .....	88
4.1.3.3	pH-Abhängigkeit.....	89
4.1.3.4	Aktivierung und Inhibierung der MIPS aus <i>D.discoideum</i> .....	92
4.1.3.5	Substratspezifität .....	90
4.1.3.6	Kinetische Parameter .....	90
4.1.3.7	pI-Wert.....	96
<b>4.2</b>	<b>Gezielte Generierung von inositol-auxotrophen Mutanten.....</b>	<b>97</b>
4.2.1	Voraussetzungen .....	97
4.2.1.1	Aufnahme von <i>myo</i> -Inositol durch <i>D.discoideum</i> .....	97
4.2.1.2	Vorliegen der MIPS aus <i>D.discoideum</i> als „single copy gen“.....	101
4.2.1.3	Homologie der abgeleiteten Proteinsequenz zu anderen Organismen.....	102
4.2.2	Generierung von Mutanten mit Defekten in der <i>D-my</i> o-Inositol 3-phosphat Synthase .....	104
4.2.2.1	Chemische Mutagenese.....	104
4.2.2.2	Homologe Rekombination .....	104
4.2.2.3	Antisense-Mutagenese .....	105
4.2.3	Nachweis der Inositol-Auxotrophie .....	107
4.2.3.1	Expression der für MIPS kodierenden mRNA.....	107
4.2.3.2	Vergleich der MIPS-Aktivität von Wildtypzellen und inositol-auxotrophen Mutanten .....	108
4.2.4	Versuche zur Darstellung von Antisense-Mutanten der Inositolmonophosphat-Phosphatase .....	111
<b>4.3</b>	<b>Phänotypische Charakterisierung der Mutanten.....</b>	<b>113</b>
4.3.1	Morphologie .....	113
4.3.2	Wachstum.....	113
4.3.2.1	Axenisches Wachstum .....	113
4.3.2.2	Wachstum auf Bakterien.....	116
4.3.3	Verhalten der Mutanten unter Stressbedingungen .....	118
4.3.4	Zellgrößenverteilung .....	123
4.3.5	Überlebensrate nach Inositolentzug .....	125

4.3.6	Versuche zur Komplementation von <i>myo</i> -Inositol durch andere Inositolisomeren und Inositolphosphate .....	128
4.3.7	Inositolmetabolite.....	130
4.3.7.1	D- <i>myo</i> -Inositol 3-phosphat und <i>myo</i> -Inositol .....	130
4.3.7.2	Höherphosphorylierte Inositolphosphate (InsP <sub>2</sub> -InsP <sub>5</sub> ) .....	132
4.3.7.3	Hochphosphorylierte Inositolphosphate (InsP <sub>6</sub> -InsP <sub>8</sub> ).....	133
4.3.7.4	Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositolphosphate.....	137
4.3.8	Veränderungen anderer, nicht inositolhaltiger Metabolite.....	141
4.3.8.1	2,3-Bisphosphoglycerat.....	141
4.3.8.2	Phospholipide.....	144
4.3.9	Adhäsion, Endozytische Eigenschaften, und Zytokinese .....	145
4.3.9.1	Adhäsion und Aggregation .....	145
4.3.9.2	Phagozytose.....	150
4.3.9.3	Pinozytose und Membranrecycling.....	155
4.3.9.4	Zytokinese .....	158
4.3.10	F-Aktin und F-Aktin assoziierte Proteine .....	160
4.3.11	Analyse der Differenzierung und Sporengermination unter Inositolentzug .....	163
4.3.11.1	Differenzierung .....	163
4.3.11.2	Germination.....	169
4.3.11.3	Hochphosphorylierte Inositolphosphate während der Differenzierung .....	170
<b>4.4</b>	<b>Versuche zur heterologen Genexpression der MIPS aus <i>D.discoideum</i> in <i>E.coli</i> und <i>P.pastoris</i> .....</b>	<b>176</b>
<b>5</b>	<b>FAZIT UND AUSBLICK .....</b>	<b>178</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>184</b>
<b>6.1</b>	<b>Nukleotid- und übersetzte Proteinsequenz des cDNA-Klons FC-AA11 .....</b>	<b>184</b>
<b>6.2</b>	<b>Vergleich der aus der cDNA-Sequenz abgeleiteten Proteinsequenz mit der Proteinsequenz bekannter MIPS .....</b>	<b>186</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>189</b>

# 1 Einleitung

Phosphatidylinositolphosphate und Inositolphosphate spielen eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Signalvermittlung. Vom *myo*-Inositol abgeleitete Verbindungen sind beteiligt an fundamentalen zellulären Prozessen wie Zellmotilität, Endozytose, Chemotaxis und der Zelldifferenzierung.

## 1.1 Struktur und Nomenklatur von Inositol und Inositolphosphaten

Inositole sind Cyclohexanhexole der allgemeinen Summenformel  $C_6H_{12}O_6$  und gehören zur Gruppe der Cyclitole.<sup>1</sup> Aus den sechs asymmetrischen C-Atomen resultieren insgesamt neun Stereoisomere, die mit den Präfixen *allo*-, *cis*-, *epi*-, *muco*-, *myo*-, *neo*-, *scyllo*-, *D-chiro* und *L-chiro* bezeichnet werden.<sup>2</sup> Mit Ausnahme des Enantiomerenpaares *D-chiro* und *L-chiro*-Inositol handelt es sich dabei um optisch inaktive meso-Formen.

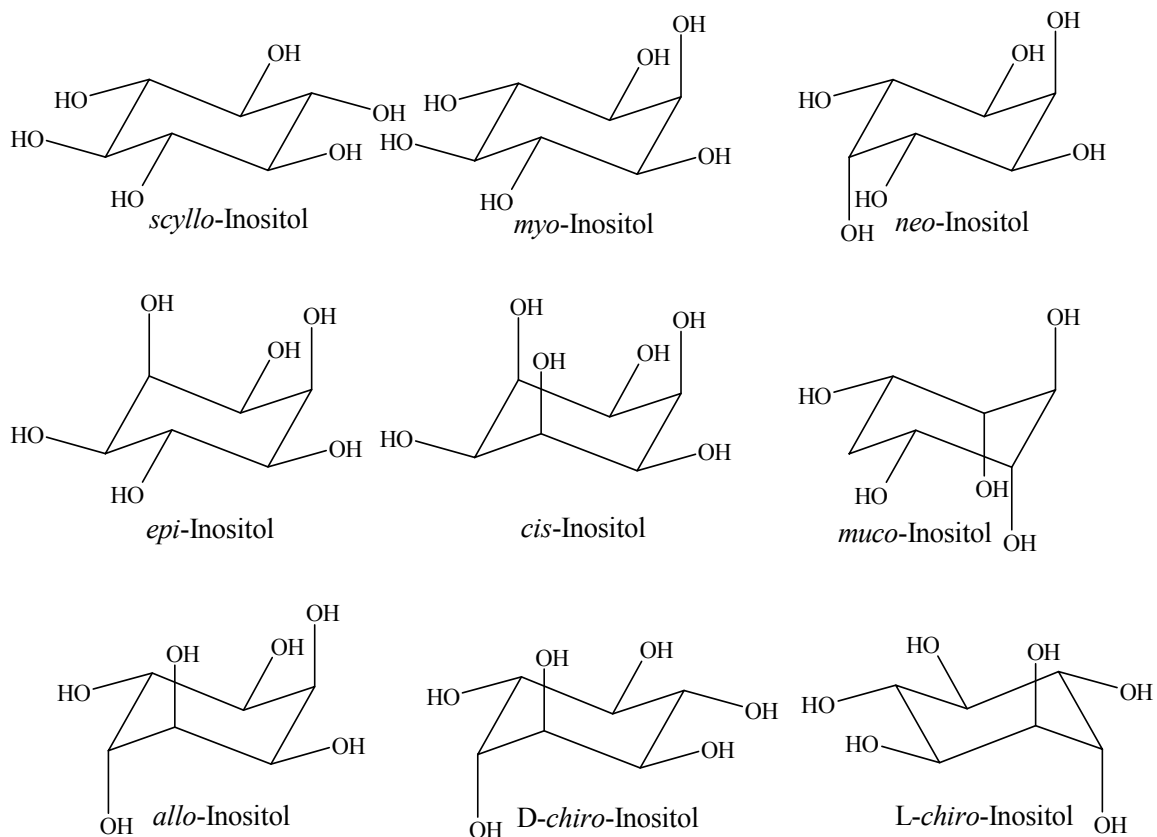
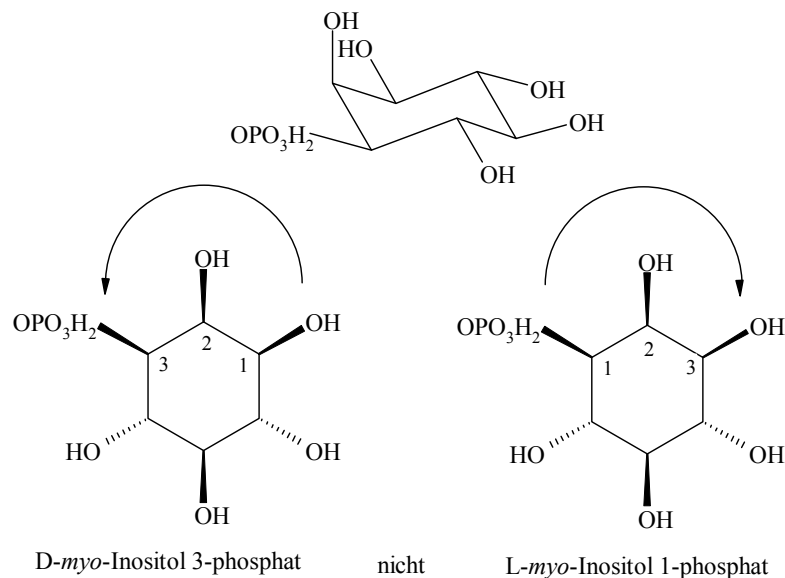


Abbildung 1: Stereoisomere des Inositols

Das bei weitem bedeutendste Isomer ist das ubiquitär vorkommende *myo*-Inositol. Es handelt sich dabei um ein *meso*-Cyclohexanol mit einer axialen und fünf äquatorialen Hydroxylgruppen. Das Kohlenstoffatom mit der axialen Hydroxylgruppe wird als C-2 bezeichnet. Die anderen Kohlenstoffatome werden von C-1 nach C-6 durchnummeriert, wobei sich das C-1 auf einer der beiden Seiten von C-2 befindet. Vereinbarungsgemäß führt eine Nummerierung der C-Atome bei einem asymmetrisch substituierten Inositol gegen den Uhrzeigersinn zur D- und eine Nummerierung im Uhrzeigersinn zur L-Konfiguration. Das Präfix, welches zu niedrigeren Ziffern in der Nummerierung führt, erhält normalerweise Vorzug.<sup>3</sup>



**Abbildung 2: Stereonomenkatur der *myo*-Inositolphosphate**

Die Einhaltung der oben genannten Regeln kann zu Problemen führen, insbesondere beim Verfolgen von Stoffwechselwegen, bei denen sich verwirrende Nomenklaturänderungen ergeben können. Durch die Anwendung der IUPAC-Empfehlung, nur die D-Nummerierung zu nutzen, wird dieses Problem umgangen.<sup>4</sup> Dies spiegelt auch die Tatsache wieder, dass die meisten natürlich vorkommenden Inositolphosphate D-Enantiomere sind. Die konsequente Nutzung der D-Nummerierung verdeutlicht ebenfalls besser die Strukturverwandtschaft zellulärer Stoffwechselvorgänge.

## 1.2 Vorkommen, Biosynthese und Abbau von Inositol

Trotz der Tatsache, dass der Mensch durchschnittlich 1 g *myo*-Inositol/Tag mit der Nahrung aufnimmt<sup>5</sup>, sind die Nieren in der Lage bis zu 4 g *myo*-Inositol/Tag zu synthetisieren.<sup>6</sup> Hoden und Gehirn besitzen auch eine gewisse Möglichkeit zur Synthese von *myo*-Inositol<sup>7</sup>, spielen aber eher eine untergeordnete Rolle.

*Myo*-Inositol spielt als Osmolyt in einigen Zelltypen eine große Rolle. Ein hyperosmotisches Milieu führt zu Wasserverlust der Zellen und zu einer Aufkonzentrierung der Zellinhaltsstoffe durch Schrumpfung der Zelle. Diese Aufkonzentrierung führt zu einer mechanischen Belastung der Zelle und kann die Struktur und Aktivität von Proteinen, DNA und anderen intrazellulären Metaboliten beeinflussen.<sup>8</sup>

Um das Zellvolumen weitgehend konstant zu halten, reagieren Zellen mit verschiedenen Mechanismen auf die veränderten Lebensbedingungen. Zunächst versuchen sie durch Aufnahme von anorganischen Salzen, begleitet von einem osmotisch bedingten Wassereinstrom ihr Zellvolumen zu vergrößern. Dieser Prozess wird als RVI („regulatory volume increase“) bezeichnet. Er führt jedoch aufgrund der starken Abhängigkeit der nichtkovalenten Wechselwirkungen von Makromolekülen von der Ionenkonzentration zur Beeinträchtigung von Zellfunktionen.<sup>8</sup>

In einer zweiten Phase des RVI kommt es in einigen Zelltypen zur Akkumulation von organischen Substanzen, die als „kompatible“ oder „nicht störende“ Osmolyte bezeichnet werden. Die intrazellulären Konzentrationen dieser organischen Osmolyte können dabei auf einige Hundert mmol/l ansteigen.<sup>9</sup> Im Gegensatz zu anorganischen Ionen wirken sich diese organischen Osmolyte nicht nachteilig auf nichtkovalente Wechselwirkungen von Makromolekülen aus, sondern stabilisieren diese eher.<sup>10,11</sup> Hierbei spielen Polyole wie *myo*-Inositol und Sorbitol, Aminosäuren (Glycin, Alanin, Glutamat, Aspartat, Glutamin)<sup>12,13,14</sup>, Aminosäurederivate (z.B. Taurin) und Methylamine (z.B. Glycerophosphorylcholin und Betain) eine Rolle.<sup>15,16</sup>

*Myo*-Inositol ist im Serum vorhanden und kann von den Zellen akkumuliert werden. Es ist noch unklar, ob das *myo*-Inositol hauptsächlich mit der Nahrung aufgenommen oder im Körper synthetisiert wird.<sup>15</sup> In gewissen Maße wird es wahrscheinlich auch durch Recycling von Inositolphosphaten bereitgestellt.

Die Aufnahme von *myo*-Inositol in Nierenmark-Zellen<sup>17</sup>, C6-Glioma-Zellen<sup>18</sup> und astroglia-reichen Primärkulturen<sup>19</sup> ist osmotisch reguliert. Bei Nierenmark-Zellen führt ein Mangel von *myo*-Inositol im Medium zu einer starken Abschwächung der Zunahme des

intrazellulären *myo*-Inositols als Antwort auf hyperosmotischen Stress.<sup>20</sup> In C6-Glioma-Zellen wird der hyperosmotisch-induzierte RVI zunächst durch einen ionischen Mechanismus und danach durch Zunahme der Expression von *myo*-Inositol Transporter mRNA erreicht.<sup>21</sup>

Funktionsstörungen in der Volumenregulation von Zellen des zentralen Nervensystems werden mit Defekten im Inositolhaushalt in Zusammenhang gebracht. Beispielsweise werden Teile der Pathogenese des Down-Syndroms auf die Funktion von *myo*-Inositol als Osmolyt im Nervensystem zurückgeführt. Das Gen eines  $\text{Na}^+$ /*myo*-Inositol Transporter ist hierbei tripliziert<sup>22</sup> und führt zu einer 30-50 %igen Erhöhung des *myo*-Inositolspiegels in Gehirn und der Cerbospinal Flüssigkeit (CSF).<sup>23,24,25,26</sup> Fetale CSF, welche einen 10fach höheren *myo*-Inositolgehalt als adulte CSF hat, zeigt auch beim Downs Syndrom einen erhöhten Anstieg. Es wird vermutet, dass ein osmolytisches und elektrolytisches Ungleichgewicht bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems diesen Anstieg begründet.

Unter Bedingungen einer verstärkten Hypernatriämie akkumuliert das Gehirn große Mengen an *myo*-Inositol um den Wassermangel auszugleichen. Wird die Hypernatriämie zu schnell korrigiert, kann es zur Bildung von cerebralen Ödemen kommen, die zum Tod führen.

Veränderungen im *myo*-Inositol Transport sind auch bei der hepatischen Enzephalopathie zu beobachten. Dieses ist verknüpft mit Hyperammonämie, welche zu einer Schwellung von Astrocyten und zu einem Verlust von cerebralen *myo*-Inositol führt. Kultivierte Astrocyten zeigen bei Inkubation mit  $\text{NH}_4^+$  eine signifikante Reduktion der *myo*-Inositolaufnahme.<sup>27</sup> Dieses ist sowohl auf die Reduktion der Anzahl an  $\text{Na}^+$ /*myo*-Inositol Transporter als auch auf einer Verringerung ihrer Affinität zurückzuführen. Zusätzlich führt  $\text{NH}_4^+$  zu einer Zunahme des Effluxes von *myo*-Inositol aus den Astrocyten. Sowohl die Reduktion der *myo*-Inositolaufnahme als auch die verstärkte *myo*-Inositolabgabe führen zusammen zur  $\text{NH}_4^+$ -induzierten Schwellung der Astrocyten.

Eine Verringerung der *myo*-Inositolkonzentration spielt wahrscheinlich auch bei der Behandlung von manisch-depressiven Patienten („Bipolar Disorder“) mit  $\text{Li}^+$  eine Rolle.<sup>28</sup> Obwohl die exakten biochemischen Abweichungen bei diesem Krankheitsbild noch nicht exakt identifiziert werden konnten, spricht vieles dafür, dass Veränderungen in der Signaltransduktion eine Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass veränderte Level und/oder Funktion von G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten, Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) mit Bipolar Disorder sowohl in peripheren Zellen als auch im postmortalen Gehirngewebe in Zusammenhang stehen.<sup>29</sup> Neuere Untersuchungen deuten jedoch auf Fehler in anderen Signalkaskaden, wie beispielsweise dem ERK/MAPK (extracellularsignal-regulated kinase/ mitogen-activated protein kinase) Pathway hin.<sup>29</sup>

Wahrscheinliches Target für  $\text{Li}^+$  ist die Inositolmonophosphatase (IMPase), die selektiv durch  $\text{Li}^+$  inhibiert werden kann.<sup>30</sup> Übereinstimmend mit dieser Hypothese vermindert  $\text{Li}^+$  die intrazelluläre *myo*-Inositolkonzentration durch Blockierung des IMPase-vermittelten Abbaus von Inositolmonophosphaten. Die Abnahme des freien *myo*-Inositols, das als Co-Substrat für die Bildung von Phosphatidylinositol benötigt wird, soll danach Einfluss auf die Konzentration von  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und DAG nehmen. Eine Verringerung der  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Konzentration konnte bei der Inkubation von CHO-Zellen mit  $\text{Li}^+$  nachgewiesen werden.<sup>31</sup>

In der Natur sind mit Ausnahme von *allo*-, *cis*- und *epi*-Inositol alle Inositole identifiziert worden.<sup>32</sup> *Scyllo*-Inositol wird im menschlichen Gehirn mit Konzentrationen von 5-12 % des *myo*-Inositols gefunden.<sup>33</sup> In den Gehirnen von Ratten und Kaninchen wurde eine Epimerase entdeckt, die in der Lage ist *myo*- in *scyllo*-Inositol umzuwandeln.<sup>34,35</sup> Es ist jedoch unsicher, ob das im Gehirn befindliche *scyllo*-Inositol *in situ* gebildet wird oder über das Blut zum Gehirn transportiert wird.<sup>36</sup> Geringe Mengen von *chiro*-Inositol wurden nach Injektion von  $^3\text{H}$ -markierten *myo*-Inositol im Rattenhirn<sup>37</sup> und in hohen Konzentrationen auch in Knöllchen von mit *R.phaseoli* infizierten *P.vulgaris* L. nachgewiesen.<sup>38</sup> In *E.histolytica* wurden verschiedene *neo*-Inositolphosphate entdeckt.<sup>39</sup>

Der einzige bekannte Weg zur Synthese von *myo*-Inositol und den daraus resultierenden Verbindungen ist die Umlagerung von D-Glucose 6-phosphat zu D-*myo*-Inositol 3-phosphat mit anschließender Dephosphorylierung, wobei die Einstiegsreaktion durch D-*myo*-Inositol 3-phosphat Synthase (EC 5.5.1.4) katalysiert wird.

D-*myo*-Inositol 3-phosphat Synthasen (MIPS) wurden aus Säugetierhoden<sup>40,41,42,43</sup>, einigen Pflanzen<sup>44,45,46,47</sup>, Hefen<sup>48</sup> und Pilzen<sup>49</sup> aufgereinigt. Neben einer cytosolischen Form wurde in Algen und höheren Pflanzen auch eine chloroplastische Form entdeckt.<sup>47</sup>

Es ist wahrscheinlich, dass ein ähnliches Enzym in fast allen Eukaryonten vorkommt. Eine Ausnahme ist die Hefe *S. pombe*, die von Natur aus inositol-auxotroph ( $\text{Ino}^-$ ) ist.<sup>50</sup>

Prokaryonten verfügen üblicherweise über keine MIPS-Aktivität. *E.coli* kann *myo*-Inositol weder synthetisieren noch metabolisieren.<sup>51</sup> Allerdings besitzt *S.griseus* ein vergleichbares Enzym zur Synthese von *myo*-Inositol als Vorstufe zur Synthese von Streptomycin.<sup>52</sup> Mittlerweile ist die MIPS auch in Archaeobakterien<sup>53</sup> und *M.tuberculosis*<sup>54</sup> beschrieben worden.

Die für die MIPS kodierenden Gene aus *S.cerevisiae*<sup>55,56,57</sup>, *C.albicans*<sup>57,58</sup>, *C.paradisi*<sup>59</sup>, *A.thaliana*<sup>60,61</sup>, *S.polyrrhiza*<sup>62</sup>, *M.crystallinum*<sup>63</sup> und *E.histolytica*<sup>64</sup> wurden kloniert und sequenziert.



Es lässt sich feststellen, dass die Enzyme aus den verschiedenen Quellen sich erheblich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften, wie z.B. Molekulargewicht, Anzahl der Untereinheiten, spezifische Aktivität, pH-Optimum und kinetische Parameter unterscheiden. In Tabelle 1 sind verschiedene Enzympräparationen hinsichtlich dieser Eigenschaften gegenübergestellt.

MIPS aus	spezifische Aktivität [ $\mu\text{mol/h}\cdot\text{mg}$ ]	pH-Optimum	MG [Da]	Unter-einheiten	$K_m$ [mM] G-6-P	$K_m$ [mM] NAD <sup>+</sup>	Referenz
Rinderhoden	31.7		218	4*54.5	2.7	0.011	40
Rattenhoden	13	7.7	210	3*68	3.8	0.018	42
<i>S.cerevisiae</i>	24.3	7	240	4*62	1.18	0.008	48
<i>N.crassa</i>	14.8	7.7	260	4*65	1.9		49
<i>L.gibba</i>	3.0	7.7	135	3*45	0.035		46
<i>L.longiforum</i>		7.8-8.5	157	3*61	0.07		45
<i>A.pseudoplantanus</i>	0.05	8	150				44
<i>E.histolytica</i>	8.1	7.6	~180	3*60	0.74	0.66	64
<i>O.sativa</i> (cytosolisch)		8.2	178	3*59	1.967	0.137	47
<i>O.sativa</i> (chloroplastisch)		7.6	253,7	4*60	2.14	0.087	47
<i>E.gracilis</i> (cytosolisch)	10.8	7.5			2.25	0.16	47
<i>E.gracilis</i> (chloroplastisch)	6.6	7.6			1.95	0.12	47
<i>A.fulgidus</i>	66	8.0	168	4*44	0.12	0.005	53
<i>Synechocystis sp</i>	1.2	7.5			1.19	1.95	65
<i>S.platensis</i>	7.5	7.8			2.17	0.11	47

Tabelle 1: MIPS Präparationen aus verschiedenen Quellen

Die spezifischen Aktivitäten sind durchgehend sehr gering und die pflanzlichen Enzyme zeigen kleinere Molekulargewichte als die Synthesen aus anderen Quellen. Die außergewöhnliche spezifische Aktivität der MIPS aus *A.fulgidus* wird auf einen erhöhten Bedarf von *myo*-Inositol für die Synthese von **Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat (DIP)**<sup>66</sup> zurückgeführt. Diese ungewöhnliche Verbindung wurde in zahlreichen thermophilen Archaeobakterien<sup>67,68,69</sup> gefunden und dient wahrscheinlich als Osmolyt unter extremen Temperaturverhältnissen und Salzkonzentrationen.

Für alle bekannten MIPS ist Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) ein essentieller Kofaktor. Beobachtete Enzymaktivitäten ohne Zusatz dieses Kofaktors sind auf endogenem am Enzym gebundenen NAD<sup>+</sup> zurückzuführen. Eine Aktivkohlebehandlung den Synthesen aus Rattenhoden und *S.cerevisiae* entfernte den Kofaktor und führte zum Apoenzym (*apoMIPS*).<sup>70,71</sup> Diese Apoenzyme und die bis zur Homogenität gereinigten MIPS aus

Rattenhoden und *N.crassa* zeigen nur Aktivität nach Zugabe von exogenem  $\text{NAD}^+$ .<sup>42,43,49</sup> Im Gegensatz zu anderen  $\text{NAD}^+$ -benötigenden Enzymen verbraucht die MIPS dieses jedoch nicht.

Der katalytische Mechanismus der MIPS wurde von Loewus und Kelly<sup>72</sup> vorgeschlagen und später von anderen Arbeitsgruppen bestätigt.<sup>73,74,75</sup> Die durch MIPS katalysierte Umsetzung von D-Glucose 6-Phosphat zu 5-Ketoglucose 6-Phosphat erfolgt zunächst durch Oxidation der 5-Hydroxylgruppe zu D-5-Ketoglucose 6-phosphat, wobei  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  reduziert wird. Anschließend erfolgt eine intramolekulare Aldolreaktion zu L-*myo*-Inosose 2,1-phosphat – welches auch als kompetitiver Inhibitor agieren kann.<sup>71</sup> Abschließend erfolgt eine Reduktion der Carbonylgruppe mit Hilfe von  $\text{NADH}$  zu D-*myo*-Inositol 3-phosphat.

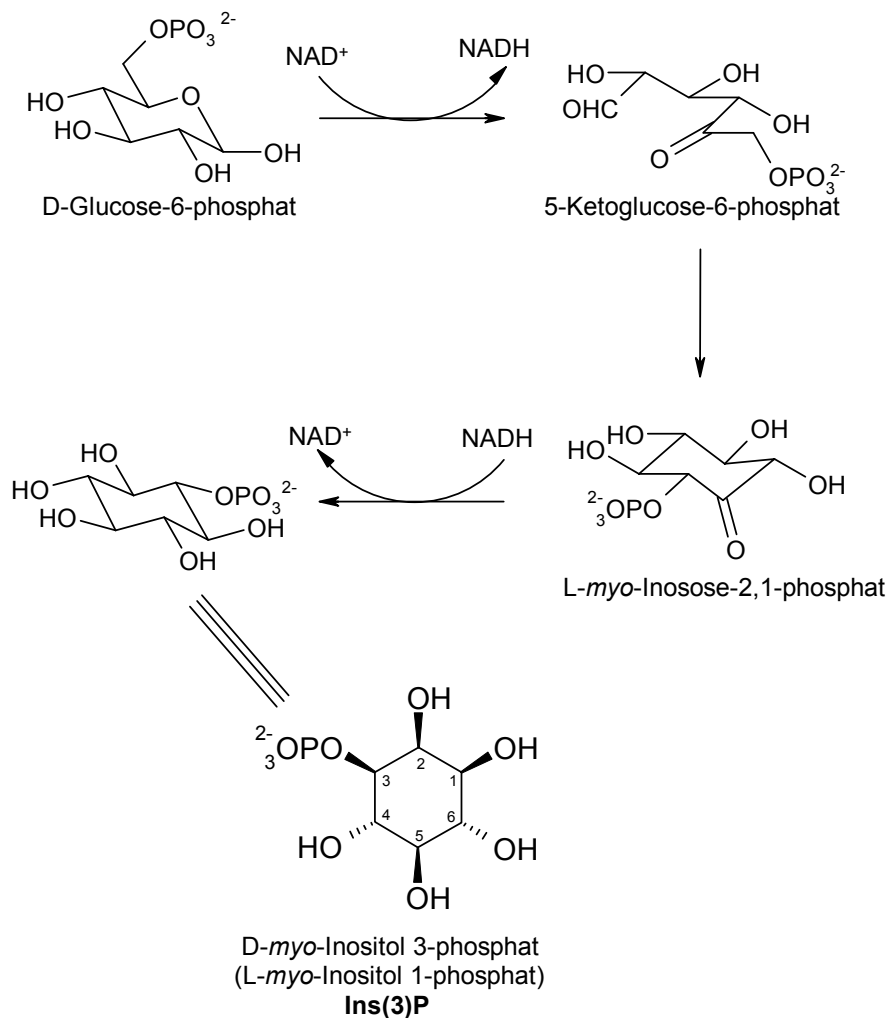


Abbildung 3: Mechanismus der MIPS

Die beschriebenen Zwischenverbindungen konnten bisher nicht isoliert werden, da sie fest am Enzym gebunden sind.<sup>76</sup> Durch Isotopenmarkierung<sup>77</sup>, „trapping“ Experimente<sup>78</sup> und Modellreaktionen<sup>79</sup> konnte der postulierte Mechanismus jedoch bestätigt werden.

Aldolasen werden üblicherweise in zwei Klassen eingeteilt. Bei Aldolasen der Klasse I bildet ein Lysin im aktiven Zentrum mit der Ketogruppe des Substrats eine Schiff'sche Base. Aldolasen der Klasse II gehen keine kovalente Bindung mit dem Substrat ein, benötigen jedoch divalente Kationen (z.B.  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) zur Stabilisierung des Carbanions am Anfang der Zyklisierung. Die eukaryotischen MIPS werden zu den Klasse I Aldolasen gezählt. Sie werden nicht durch EDTA inhibiert, jedoch durch monovalente Ionen ( $NH_4^+$ ) aktiviert. Als mögliche Erklärung für diese Stimulierung wird eine Interaktion des monovalenten Ions mit dem Enol-Tautomer und eine Stabilisierung des Carbanions angenommen.<sup>40</sup> Eine Arbeit<sup>80</sup>, in der berichtet wird das die MIPS aus Rattenhoden zu den Klasse I Aldolasen zu zählen ist, konnte später nicht bestätigt werden.<sup>75,42</sup> Frühe Arbeiten mit der MIPS aus *N.crassa*<sup>81</sup> und Wasserlinsen<sup>46</sup> zeigten eine Inhibierung der Aktivität durch EDTA, was auf eine Klasse II Aldolase deutete. Jedoch wurden diese MIPS nur bei Zugabe von 1-30 mM EDTA zu 50 % inhibiert. Der Befund ist vermutlich auf die damaligen Testmethoden zurückzuführen. Geringe Spuren von Phosphataseaktivitäten (die häufig eine Abhängigkeit von Metallionen zeigen) konnten hierbei zu Fehlinterpretationen führen. Spätere Arbeiten mit der MIPS aus *N.crassa*<sup>49</sup> zeigten jedoch keine Inhibierung der Aktivität durch divalente Kationen und eine 2,5fache Aktivierung durch  $NH_4^+$ . MIPS aus Archaeobakterien werden zu den Klasse II Aldolasen gezählt.<sup>53</sup>

Der einzige bekannte biologische Abbauweg von *myo*-Inositol wird von einer  $O_2$ -abhängigen *myo*-Inositol Oxygenase katalysiert.<sup>82,83,84</sup> D-Glucuronsäure kann danach über Abbau zu D-Xylulose 5-phosphat in den Pentosephosphatzyklus eingeführt werden.<sup>85</sup>

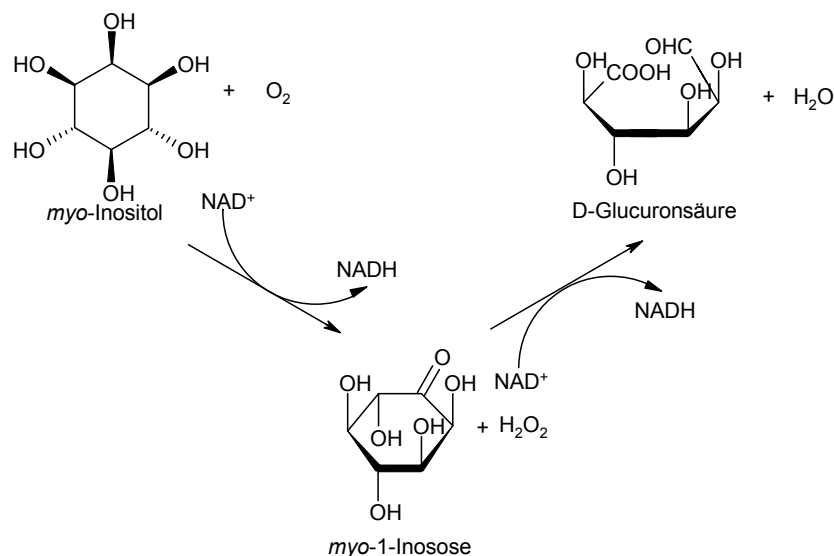


Abbildung 4: Abbau von *myo*-Inositol

### 1.3 Regulation der D-*myo*-Inositol 3-phosphat Synthase

Die genetische Untersuchung in *S.cerevisiae* deckte eine komplexe, stark regulierte Inositolbiosynthese auf. Sowohl Mutationen im Strukturgen *INO1*<sup>56</sup> als auch in vielen anderen Loci bewirken eine Inositol-Auxotrophie. Mutationen in einer Vielzahl anderer Gene führen zur Überproduktion und zur Exkretion des überschüssigen *myo*-Inositols.<sup>86</sup>

Funktion	Gen	Referenz
Transkriptionsfaktoren	INO2,INO4,SWI1,SWI2,SWI3, HAC1, SPT7	86,87
RNA-Polymerase II Untereinheit	RPB1, RPB2,RPB4,SRB2	86,88
TATA-Bindungsprotein	SPT15	86
Co-Aktivatoren für die Transkription	ADA1,ADA5,BSD2,SUB1	89,90,91,92
Enzyme	INO1,IRE1,TRL1UBC4,UBC5, DOA4	86,56,93,94
Integrale Membranproteine	SAC1,SCS2	86,95
Unbekannte Funktion	SCS3,CSE1	86,96

**Tabelle 2: Benötigte Gene für Inositol-Prototrophie in *S. cerevisiae***

Die strukturellen Gene, die für die Biosynthese der Phospholipide nötig sind, werden in *S.cerevisiae* auf Transkriptionsebene koordiniert exprimiert. Erreicht wird dieses durch eine aktivierende Promotorsequenz (ICRE-, „inositol/choline-responsive element“)<sup>97</sup>, die in der upstream-Region der Strukturgene zu finden ist. Die ICRE-abhängige Genexpression ist abhängig von der Konzentration an Cholin und *myo*-Inositol im Medium. Bei Abwesenheit dieser Substanzen wird die Expression aktiviert, in Gegenwart dieser Substanzen reprimiert.<sup>86</sup>

Zwei Regulatorgene (*INO2* und *INO4*) sind unentbehrlich für die Aktivierung von *INO1* als Antwort auf *myo*-Inositol/Cholin-Entzug.<sup>98,99,100</sup> Ein Heterotrimer aus den beiden Genprodukten interagiert mit ICRE und aktiviert die Genexpression.<sup>99,101</sup> *INO2* und *INO4* beinhalten das ICRE-Motiv in ihrer Promotorregion. Isolierte Mutanten mit Defekten in beiden Genen zeigen eine typische Inositol-Auxotrophie.<sup>86,94</sup>

Beide Gene werden durch *myo*-Inositol/Cholin reprimiert (*INO2* 12fach, *INO4* 3fach). So betrachtet könnte die Autoregulation dieser positiven Regulatoren einen möglichen Mechanismus zur Signalverstärkung und/oder der schnellen zellulären Adaption auf einen *myo*-Inositol/Cholin-Entzug darstellen.<sup>99,102</sup> Jedoch zeigten *INO2*- und *INO4*-Varianten, die nicht mehr durch *myo*-Inositol/Cholin-Entzug reprimiert werden, keine Unterschiede zum Wildtyp.<sup>103</sup> Wahrscheinlich spielt die Autoregulation nur eine untergeordnete Rolle, beispielsweise für ein Feintuning der Metabolitkonzentrationen.

Zusätzlich zu den spezifischen Regulatoren wird *INO1* auch durch globale Transkriptionsfaktoren ICRE-abhängig reguliert. Beispielsweise wird der Swi/Snf-Komplex („chromatin remodelling complex“) für eine effiziente Expression einer großen Anzahl von Strukturgenen (u.a. *INO1*) benötigt.<sup>104,105</sup> Dieser Proteinkomplex ist in der Lage DNA-Histon-Wechselwirkungen zu destabilisieren. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Affinität der Transkriptionsfaktoren zu ihren Bindungsstellen. Das *SNF2/SWI2*-Gen kodiert für eine DNA-stimulierte ATPase-Untereinheit des Swi/Snf-Komplexes. Die *ric1*-Mutation, die zu Inositol-Auxotrophie führt, stellte sich als eine Mutation des *SNF2/SWI2*-Gens heraus.<sup>106</sup>

Ein weiterer notwendiger Derepressionsfaktor für die positive Kontrolle der Phospholipidbiosynthese wird durch das zum *SNF2* paraloge *INO80* kodiert.<sup>107</sup> In *ino80*-Mutanten ist die ICRE-abhängige Genaktivierung auf bis zu 16 % des Wildtyp-Levels herabgesetzt.<sup>107</sup>

Zusätzlich sind auch Mutationen in der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II<sup>108</sup>, im TATA-Bindungsprotein<sup>109,110</sup> und im Transkriptionsfaktor TFIIA<sup>111</sup> bekannt, die zu einem *INO*<sup>-</sup>-Phänotyp führen.

Während die positiven Regulatorgene *INO2* und *INO4* für die Derepression der ICRE-abhängigen Gene bei Abwesenheit von *myo*-Inositol/ Cholin zuständig sind, wird das *OPI1*-Gen für die Repression in Gegenwart von hohen *myo*-Inositol/Cholin-Konzentrationen benötigt. Isolierte *opi1*-Mutanten (*opi* = **o**ver**p**roduction of **i**nositol) zeigen eine Sekretion von *myo*-Inositol, die auf eine sehr starke Expression von *INO1* zurückzuführen ist.<sup>112</sup> Der negative Regulator *Opi1* bindet äquivalent zum *Ino2/Ino4*-Komplex an die ICRE-Bindungsstelle.<sup>113,114</sup>

Auch Mutationen in *SIN3*<sup>115</sup> und *UME6*<sup>116</sup>, deren Genprodukte Komponenten eines großen Proteinkomplexes mit Histon-Deacetylase-Aktivität<sup>117,118,119</sup> sind, führen zu einer Überproduktion an *myo*-Inositol.

## 1.4 Natürlich vorkommende Inositol-Auxotrophie

Die meisten Eukaryonten sind in der Lage *myo*-Inositol zu synthetisieren, es gibt jedoch bei einigen wenigen Organismen eine natürliche Inositol-Auxotrophie. Dazu gehören *S.pombe*<sup>120</sup>, *S.carlsbergensis*, *K.apiculata* und *Schizosaccharomyces* spp.<sup>121</sup>

*S.pombe* ist in der Lage unter bestimmten Bedingungen (pH-Wert ca. 3, geringe Phosphatkonzentration) *myo*-Inositol aus  $\text{InsP}_6$  zu generieren.<sup>120</sup> Der natürliche Lebensraum von *S.pombe* sind Früchte, Fruchtsäfte und Sirups.<sup>122</sup> Diese besitzen signifikante Mengen an  $\text{InsP}_6$ . Es ist bekannt, dass *S.pombe* saure Phosphatasen sekretiert<sup>123</sup>, die starke Homologien zu Phytasen aufweisen.<sup>124</sup> Die pH-Optima saurer Phosphatasen und die beobachtete Reprimierung durch Phosphat deuten darauf hin, dass  $\text{InsP}_6$  außerhalb der Zellen zu *myo*-Inositol dephosphoryliert wird und dieses von den Zellen aufgenommen werden kann.

## 1.5 Generierte Inositol-Auxotrophie

Wie schon unter 1.3 beschrieben sind von *S.cerevisiae* zahlreiche inositol-auxotrophe Mutanten bekannt. Dazu gehören sowohl Mutanten mit Defekten im Strukturgen *ino1* als auch Mutanten mit Defekten in der Regulation. Es wurden jedoch auch aus anderen Organismen zahlreiche inositol-auxotrophe Mutanten isoliert bzw. generiert.

Früh wurden inositol-auxotrophe Mutanten bei anderen Organismen wie z.B. *N.crassa*<sup>125</sup> oder Säugetierzellen<sup>126</sup> beschrieben. In neueren Arbeiten ist auch das Ausschalten der MIPS durch Gendeletion angewandt worden. Durch dieses gezielte Verfahren wurden unter anderem inositol-auxotrophe Mutanten von *L.mexicana*<sup>127</sup> und *M.tuberculosis*<sup>128</sup> erzeugt.

Die beschriebenen Mutanten sterben bei Entzug von *myo*-Inositol schnell ab. Dieses Phänomen wird als „inositolless death“ bezeichnet.<sup>129</sup> Dieser beobachtete schnelle Zelltod ist jedoch kein generelles Charakteristikum von auxotrophen Mutanten. Im Gegensatz dazu zeigen diese häufig ein Abstoppen des Wachstums, wenn sie ihres Zusatzes beraubt werden. Sie sterben jedoch nur sehr langsam ab.<sup>130</sup>

Neben Mutanten mit Defekten im Strukturgen *ino1* bzw. mit Defekten in der Regulation von *ino1* sind auch einige andere inositol-auxotrophe Mutanten beschrieben worden. Dazu gehören Mutanten mit Defekten in der Phosphatidylinositolsynthase<sup>131</sup> oder mit Defekten in einer Phosphatidylinositol 4-phosphat Phosphatase.<sup>132</sup> Interessanterweise zeigen letztere zwar eine Inositol-Auxotrophie, jedoch ist das Phänomen des „inositolless death“ hierbei nicht so ausgeprägt.

## 1.6 *D.discoideum* als experimentelles System

*D.discoideum* ist ein amöboid lebender Protist aus der Klasse der Acrasiomyceten und wurde erstmals 1935 von Raper beschrieben.<sup>133</sup> Die genetische Information liegt auf sechs Chromosomen, deren Größe zwischen 4 und 7 Mb variiert, einem 55 kb großen mitochondrialen Genom und einem 90 kb großen extrachromosomalen Element, dessen Gene für rRNA's kodieren. Das daraus resultierende 34 Mb große haploide Genom kodiert für 8000-10000 Gene, von denen viele homolog zu Genen in höheren Eukaryonten sind, während sie in *S.cerevisiae* fehlen.

Durch seinen eigenständigen Organismus erfüllt *D.discoideum* weit vielfältigere Funktionen als die Einzelzellen eines Mehrzellers. Aufgrund des Spektrums an unterschiedlichen Funktionen eignet er sich zur Untersuchung grundlegender zellulärer Prozesse wie z.B. Chemotaxis, Zytokinese, Zellmotilität, Phagozytose, Pinozytose, zellulärer Transport und Zelldifferenzierung. *D.discoideum* ist vom National Institute of Health in die Liste der Modellorganismen für die biomedizinische Forschung aufgenommen worden.

*D.discoideum* hat sein natürliches Vorkommen in humusreichen Böden und auf tierischen Exkrementen. Hier ernährt sich *D.discoideum* durch Phagozytose von Bakterien und vermehrt sich durch einfache mitotische Zellteilung. Für Laborzwecke wurden jedoch Mutanten generiert, die axenisch wachsen und sich über Pinozytose ernähren.<sup>134</sup> Diese Mutanten sind weiterhin in der Lage, sich durch Phagozytose von Bakterien zu ernähren. Dementsprechend können vegetative Amöben des Stammes AX2 auf bakterienbewachsenen Agarplatten, in Bakteriensuspension und in halbsynthetischen oder vollsynthetischen flüssigen Nährmedien kultiviert werden. Diese leichte Kultivierbarkeit ist ein weiterer Grund warum *D.discoideum* sich für die Untersuchung biologischer Prozesse eignet.

Ein Entzug der Nahrungsquelle führt zu einem morphogenetischen Entwicklungs- und Differenzierungsprozess, an dessen Ende die Ausbildung eines Fruchtkörpers steht. Der Fruchtkörper besteht im wesentlichen aus zwei Zelltypen, den Stiel- und den Sporenzellen, wobei sich erstere noch in 3 Untergruppen gliedern.<sup>135</sup> Mit Einsetzen des Hungerzustandes beginnen einige Zellen pulsartig cyclisches AMP (cAMP) in das umgebende Medium zu sezernieren.<sup>136,137,138</sup> Nachbarzellen bewegen sich daraufhin durch Chemotaxis auf diese Zellen zu<sup>139,140</sup> und beginnen ebenfalls pulsartig cAMP auszuschütten.<sup>141,142,143</sup> Bis zu  $10^5$  Zellen lagern sich zusammen und bilden einen schneckenförmigen, multizellularen Organismus, der als „slug“ bezeichnet wird. In dieser Phase ist *D.discoideum* als Gesamtorganismus in der Lage phototaktisch und chemotaktisch zu wandern. Während

dieser Wanderung kommt es zu einer Differenzierung der Zellen zu prä-Sporezellen und prä-Stielzellen, was letztlich in der Kulminationsphase mit der Ausbildung eines Fruchtkörpers endet. Dieser besteht aus einer Fußplatte und Stiel aus toten Zellen und aus einem Kopf aus Sporen. Der gesamte Vorgang- vom Einsetzen des Nahrungsmangels bis zum ausgereiften Sporenträger- dauert ca. 24 h. Die Stielzellen bilden Cellulosewände aus, fungieren als Träger der Sporen und sterben mit fortschreitender Vakuolisierung ab.<sup>144</sup> Die Sporen können bei günstigen Umweltbedingungen und ausreichendem Nahrungsangebot keimen, und es bilden sich wieder vegetative Amöben.<sup>141</sup>

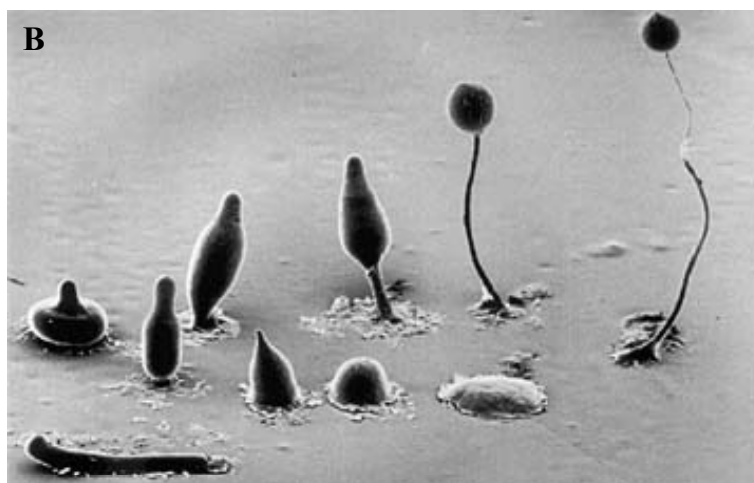
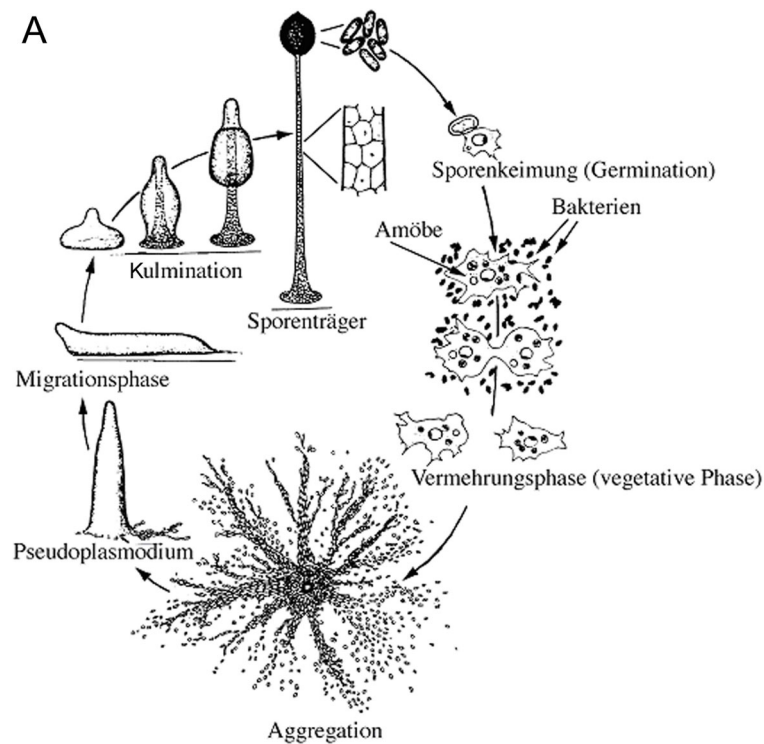


Abbildung 5: Schematisch Darstellung und REM-Aufnahme des Lebenszyklus von *D. discoideum*  
 (A) nach Gerisch, 1965; (B) nach Grimson und Blanton



Klassische taxonomische Studien ordnen *D.discoideum* aufgrund der Gesamtmorphologie in das Reich der Pilze, in die Abteilung Myxomycota und in die Klasse der Acrasiomyceten ein.<sup>133</sup>

Neuere molekulare, phylogenetische Untersuchungen widerlegen jedoch die nahe Verwandtschaft von *D.discoideum* zu den Pilzen und ordnen *D.discoideum* zur monophyletischen Gruppe der Mycetozoa (Schleimpilze) und zur Untergruppe der Dictyostelidae (zelluläre Schleimpilze) ein.<sup>145</sup>

Die Position von *D.discoideum* im Stammbaum der Eukaryonten wird zur Zeit noch diskutiert. Loomis datiert die Divergenz von dem Ast der Eukaryonten auf ca. 1,5 Milliarden Jahre zurück, nach der Abzweigung von Hefen und Pilzen, jedoch ca. 600 Millionen Jahre vor der Auftrennung in Tier- und Pflanzenreich.<sup>146</sup> Studien von Baldauf und Doolittle<sup>145</sup> kommen zu dem Ergebnis, dass zunächst eine Trennung in Pflanzen – und Tierreich auftrat und es danach zur Abspaltung der Mycetozoa vom Tierreich gab.

### 1.7 Methoden zur Generierung von Mutanten

Die Isolation und Charakterisierung von Mutanten in *D.discoideum* wird durch das haploide Genom, bestehende Transformationssysteme und Vektoren, sowie Methoden zur Mutantenselektion erleichtert.

Für die konventionelle Mutagenese werden mutagene Substanzen eingesetzt, wie z.B. Nitrosoguanidin, die ungerichtete Punktmutationen im gesamten Genom verursachen. Eine weitere Möglichkeit bei *D.discoideum* ungerichtete Mutationen durchzuführen ist die REMI-Technik („**R**estriction **E**nzyme **m**ediated **I**ntegration“).<sup>147</sup> Hierbei wird ein Restriktionsenzym zum Transformationsansatz gegeben. Dies führt zu einer Integration der transformierenden Plasmid-DNA an entsprechenden genomischen Restriktionsschnittstellen. Der molekulare Mechanismus, der diesem Vorgang zugrunde liegt, ist bisher nicht bekannt. Wahrscheinlich gelangt das Restriktionsenzym mit der transformierenden Plasmid-DNA in den Zellkern und schneidet die genomische DNA an den entsprechenden Restriktionsschnittstellen. Durch Reparaturenzyme werden die komplementären Enden des ebenfalls durch das Enzym geschnittenen Plasmids und der genomischen DNA ligiert. Dadurch wird die heterologe Integration der Plasmid-DNA herbeigeführt.

Das Verfahren der Genzerstörung (gene disruption) erlaubt dagegen eine zielgerichtete Ausschaltung eines Gens. Der Transformationsvektor enthält dabei ein homologes Teilstück des Zielgens und eine Resistenzkassette. Nach Einführung des Vektors in *D.discoideum*, kommt es durch homologe Rekombination zur Mutation, wenn sich die genomische DNA

öffnet und der vollständige Vektor in der DNA-Sequenz des Zielgens integriert wird. Nach der Genzerstörung ist die nicht mehr funktionsfähige DNA des Zielgens jedoch noch vollständig im Genom vorhanden, was zu unerwünschten Rekombinationsvorgängen führen kann.

Dieser Nachteil besteht bei der Genersatz-Methode (gene replacement) nicht, da hier ein Teil der genomischen Sequenz durch ein Genersatzkonstrukt ausgetauscht wird. Dieses Konstrukt besteht aus einer Resistenzkassette flankiert von zwei dem Zielgen homologen DNA-Regionen. Ein doppeltes Cross-over führt zu einem Ersatz der genomischen Sequenz durch die Resistenzkassette.

Eine weitere Möglichkeit die Expression eines Gens spezifisch zu inhibieren ist die Genabschaltung durch Antisense-RNA (asRNA). Die Mechanismen, wodurch komplementäre RNA zum Gene-Silencing führt, sind noch weitgehend unverstanden.<sup>148</sup> Die Vorstellung, dass Hybride aus Antisense und mRNA nicht translatiert werden können, erwies sich als nicht haltbar. Beide Transkripte waren meist instabil, was der damaligen Lehrmeinung von einer hohen Stabilität der doppelsträngigen RNA widersprach. Spezifische Doppelstrang-RNasen wurden postuliert und auch identifiziert. Eine direkte Verbindung dieser RNasen zum Antisense-Mechanismus konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.<sup>149</sup>

Fire und Mitarbeiter postulierten anstelle des Antisense-Transkripts kontaminierte dsRNA als inaktivierendes Agenz.<sup>150</sup> Es zeigte sich, dass eine Injektionen von substöchiometrischen Mengen dsRNA in *C.elegans* einen besseren Silencingeffekt als bei der Injektion größerer Mengen von Antisense-Transkripten bewirkte. Die Autoren prägten den Begriff „RNA Interferenz“ (RNAi) für diese Art der Geninhibition. Ein unerwarteter Befund war das Auffinden der eingeführten dsRNA und der „verlorenen mRNA“ in Form von kleinen, 20-23 bp großen Stücken, die als siRNAs (**s**mall **i**nterfering RNAs) bezeichnet wurden.<sup>151</sup> Der Ursprung dieser Oligomere zeigte sich, als in *D.melanogaster* der Proteinkomplex „Dicer“ gefunden wurde Er zerschneidet *in vitro* doppelsträngige RNA in 21mere.<sup>152</sup> In *D.discoideum* war eine dsRNase-Aktivität bekannt, die *in vitro* 23mere produziert.<sup>149</sup> Kürzlich wurden im Genom zwei Dicer-Homologe gefunden.

Die Rolle der Oligomere im RNAi Mechanismus wurde zunächst durch die Entdeckung von RISC (**R**NA **i**nduced **s**ilencing **c**omplex) in *D.melanogaster* erklärt. RISC ist ein Proteinkomplex, der ein 21mer als RNA Komponente enthält. Dieser Proteinkomplex hat ssRNase-Aktivität und enthält seine Spezifität durch das 21mer. Offensichtlich findet der Komplex seine Ziel-RNA durch den Antisense-Strang des 21mers und schneidet dann die mRNA in der Mitte des Hybrids.<sup>153</sup>

Eine weitere Beobachtung, dass dsRNA ohne Zielgen (z.B.  $\beta$ -Gal dsRNA in einer Wildtyp-Zelllinie) nicht zur Bildung detektierbarer siRNA führte, legte nahe, dass die siRNAs nicht ausschließlich Produkte der eingeschleusten dsRNA sein können.<sup>154</sup> Untersuchungen zeigten, dass der Antisense-Strang der siRNAs als Primer für eine RNA abhängige RNA-Polymerase (RdRP) dienen kann und damit an der mRNA die Synthese weiterer dsRNA initiieren kann.<sup>155</sup> Bestätigt wurde dies dadurch, dass auch siRNAs zu Sequenzen gefunden wurden, die 5'-wärts (nicht 3'-wärts!) der eingesetzten interferierenden dsRNA auf der Ziel-mRNA lokalisiert waren.<sup>156</sup> Wenn der resultierende, von RdRP synthetisierte Doppelstrang, wiederum ein Ziel für Dicer darstellt, würde das zu einer mRNA-Degradation führen, die RISC unabhängig ist. Gleichzeitig führt dieser Mechanismus zu einer Ziel-RNA abhängigen Amplifizierung der siRNAs.

Tatsächlich wurde RISC-Aktivität bisher nur in *D.melanogaster* nachgewiesen, jedoch nicht in Organismen, die einen RdRP-abhängigen Silencing Mechanismus besitzen. Es ist in diesem Zusammenhang noch zu bemerken, dass im *D.melanogaster*-Genom bisher kein RdRP homologes Protein gefunden wurde. Möglicherweise wurde bei der Fliege im Gegensatz zu vielen anderen Modellorganismen ein anderer evolutionärer Weg eingeschlagen.

In *C.albicans*, *A.thaliana*, *N.crassa* und *D.discoideum* wurden jeweils mehrere RdRP Homologe gefunden. Es zeigte sich jedoch, dass nur einige dieser RdRPs (RrpA in *D.discoideum*, Rrf1 und Ego1 in *C.albicans*) für RNAi notwendig sind.<sup>154,157,158</sup> Das bestehende Modell musste also für bestimmte Organismen um eine RdRP Komponente erweitert werden, während RISC nicht immer erforderlich scheint.

Ein Mechanismus der in der Lage ist RISC unabhängig mRNA zu degradieren wurde von Martens vorgeschlagen.<sup>159</sup> Antisense-RNA wird von einer Primer-unabhängigen RdRP (RrpB und /oder DosA in *D.discoideum*) als „aberrant“ erkannt und zum Doppelstrang transkribiert. Dieser kann wiederum als Substrat für Dicer dienen. Die daraus resultierenden siRNAs können nach Entwindung, sowohl auf der mRNA als auch auf der Antisense-RNA als Primer für die Primer-abhängige RdRP (RrpA in *D.discoideum*) dienen. Dies führt im Falle des Antisense-Silencing zu einer stärkeren Amplifikation von siRNAs und somit zu einer größeren Silencing-Effizienz. Der ursprüngliche Ansatz über die Hybridisierung von Sense- und Antisense-RNA zum Doppelstrang, der dann die RNAi Antwort auslöst ist unwahrscheinlich. Denn eine Zelllinie ohne RrpB ist zwar noch kompetent für RNAi, aber nicht für Antisense-RNA vermitteltes Silencing ist.<sup>159</sup>

## 1.8 Stoffwechsel von inositolhaltigen Metaboliten in *D.discoideum* und anderen Organismen

### 1.8.1 Inositolphosphate

Der Inositolphosphat-Metabolismus in *D.discoideum* ist sehr komplex, und es wurden bisher mehr als 25 Inositolphosphate mit unterschiedlichen Substitutionsgraden, die sich alle vom *myo*-Inositol ableiten, in axenisch kultivierten Amöben identifiziert.<sup>160,161</sup> Die hochphosphorylierten Inositolphosphate (InsP<sub>6</sub>, InsP<sub>7</sub>, InsP<sub>8</sub>) heben sich dabei durch ihre relativ hohen Konzentrationen von den weniger phosphorylierten Inositolphosphaten ab.<sup>160</sup>

*D.discoideum* kann auf synthetischen Medien ohne *myo*-Inositol wachsen.<sup>162</sup> Die Zellen sind also in der Lage, *myo*-Inositol *de novo* zu synthetisieren. Dies erfolgt unter katalytischer Wirkung der MIPS, die in dieser Arbeit genauer betrachtet werden soll. Das aus dieser Reaktion resultierende Ins(3)P kann durch eine Monophosphatase zum *myo*-Inositol dephosphoryliert werden.<sup>163</sup> In Zellextrakten konnten auch die **Inositolmonophosphate** Ins(1)P und Ins(4)P nachgewiesen werden.<sup>163</sup> Sie gelten als Abbauprodukte höherphosphorylierter Inositolphosphate. Über physiologische Funktionen diese Monophosphate in *D.discoideum* ist bisher nichts bekannt.

Bei den **Inositolbisphosphaten** sind bisher Ins(3,6)P<sub>2</sub>, Ins(1,4)P<sub>2</sub> und Ins(4,5)P<sub>2</sub> beschrieben worden. In *D.discoideum* ist Ins(3,6)P<sub>2</sub> ein Intermediat bei der Biosynthese von InsP<sub>6</sub> aus *myo*-Inositol. Das Einstiegsenzym, die D-3-Hydroxykinase, wurde partiell gereinigt und erkannte nur *myo*-Inositol als Substrat.<sup>164</sup> Ins(1,4)P<sub>2</sub> und Ins(4,5)P<sub>2</sub> entstehen beim Abbau von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> durch eine 1- bzw. 5-Phosphatase.<sup>217</sup> Ins(1,4)P<sub>2</sub> stimuliert die DNA-Polymerase  $\alpha$  und könnte bei der DNA-Replikation eine Rolle spielen.<sup>165</sup>

Neben dem bekannten Signalmolekül **Inositoltrisphosphat** Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> wurden in *D.discoideum* und höheren Organismen auch andere Inositoltrisphosphate nachgewiesen. So wurde Ins(3,4,6)P<sub>3</sub> als Zwischenprodukt der InsP<sub>6</sub>-Biosynthese nachgewiesen. Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> entsteht bei *D.discoideum* durch den Abbau von InsP<sub>6</sub> durch eine membranassoziierte InsP<sub>6</sub>-Phosphohydrolase (Phytase)<sup>166</sup> *in vitro*. Der Abbauweg führt zunächst über drei InsP<sub>5</sub>-Isomere (Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> / Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>, Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> und Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> / Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub>), danach über drei InsP<sub>4</sub>-Isomere (Ins(1,2,3,4)P<sub>4</sub> / Ins(1,2,3,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,2,4,5)P<sub>4</sub> / Ins(2,3,5,6)P<sub>4</sub> und Ins(1,2,4,6)P<sub>4</sub> / Ins(2,3,4,6)P<sub>4</sub>) schließlich zum Hauptprodukt Ins(1,2,4)P<sub>3</sub> / Ins(2,3,6)P<sub>3</sub>, welches nur langsam weiter zu *myo*-Inositol hydrolysiert wird. Ins(2,3,4)P<sub>3</sub> konnte ebenfalls in *D.discoideum* nachgewiesen werden.<sup>167</sup> Die intrazelluläre Konzentration dieser Verbindung

steigt drastisch an, wenn die Zellen mit extrazellulären  $\text{InsP}_6$  inkubiert werden. Es scheint ein Intermediat beim Abbau des aufgenommenen  $\text{InsP}_6$  zum *myo*-Inositol zu sein.

Pharmakologisch relevant ist  $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$ . Dieser Verbindung konnten entzündungshemmenden<sup>168</sup>, schmerzstillenden<sup>169</sup> und antivasokonstriktorischen Wirkungen<sup>170</sup> zugeordnet werden. Auf welche Weise es zu den genannten Wirkungen kommt, ist bislang noch unklar.

Bei den **Inositoltrakisphosphaten** hebt sich das  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  ab, das wie  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  als Signalmolekül wirkt. Es reguliert den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  über die Zellmembran.<sup>171</sup> Zusätzlich ist  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  an der GAP-vermittelten (**G**TPase **a**ktivierendes **P**rotein) Signaltransduktion in höheren Zellen beteiligt.<sup>172</sup> Bei GAP handelt es sich um einen hochspezifischen  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Rezeptor. Dieses Protein stimuliert *in vitro* die GTPase-Aktivität von Ras. Die Aktivität kann von Liposomen, die eine ähnliche Phospholipidzusammensetzung wie die Oberfläche der inneren Plasmamembran zeigen, inhibiert werden. Ein Zusatz von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  macht diesen Effekt rückgängig. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine Verbindung zwischen dem PLC-Signalweg und den über Ras-Proteinen aktivierten Signalwegen. Ein weiteres physiologisch wirksames Inositoltrakisphosphat ist das  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ . Es hemmt die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Chloridsekretion in Epithelzellen.<sup>173</sup>

Das einzige biologisch relevante **Inositolpentakisphosphat** ist das  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ . In Erythrozyten von Amphibien und Vögeln senkt  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  die Bindungsaffinität von Hämoglobin zu Sauerstoff und nimmt so die Stellung des 2,3-Bisphosphoglycerats bei Säugern ein.<sup>174</sup> Beim Abbau von  $\text{InsP}_6$  in *D.discoideum* entstehen zwei weitere Inositolpentakisphosphate. Die Inkubation eines cytosolischen Extrakts mit  $\text{InsP}_6$  führt zur Dephosphorylierung zu  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ . Führt man dieses Experiment jedoch in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems durch, so ist keine Dephosphorylierung zu beobachten. Aus diesen Ergebnissen wurde das Bestehen von „futilen Zyklen“ zwischen  $\text{InsP}_6$  und den beiden Inositolpentakisphosphaten abgeleitet. Ein an diesem Prozess vermutlich beteiligtes Enzym ist die in unserem Arbeitskreis aufgereinigte und charakterisierte Inositolpentakisphosphat 3/5-Kinase.<sup>175</sup>

**Inositolhexakisphosphat** entsteht aus *myo*-Inositol über  $\text{Ins}(3)\text{P}$ ,  $\text{Ins}(3,6)\text{P}_2$ ,  $\text{Ins}(3,4,6)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ .<sup>176</sup> Ein weiterer Weg zum  $\text{InsP}_6$  führt über die Phosphorylierung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ . Bei diesem zweiten Weg zur Bildung von  $\text{InsP}_6$  sind Proteine aus dem Zellkern beteiligt.<sup>177</sup> Über physiologische Funktionen von  $\text{InsP}_6$  wird seit einigen Jahren regelmäßig berichtet. Voraussetzung für fast

alle diese Funktionen ist ein lokal begrenzter Pool von Inositolphosphaten. Nur so lassen sich die sehr hohen Umsatzraten, die diese Funktionen mit sich führen, im Einklang bringen mit dem quasistationären InsP<sub>6</sub>-Gehalt.

Eine physiologische Funktion von InsP<sub>6</sub> in *D.discoideum* konnte bisher nicht nachgewiesen werden. In anderen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass InsP<sub>6</sub> Serin/Threonin-Proteinphosphatasen inhibiert.<sup>178</sup> Dieses hatte beispielsweise zur Folge, dass es in Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu einem Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Aktivität kommt.

Weiterhin komplexiert InsP<sub>6</sub> sehr stark divalente und trivalente Metallionen.<sup>179</sup> InsP<sub>6</sub> hemmt die durch Fe<sup>3+</sup> katalysierte Hydroxylradikalbildung<sup>180</sup> und unterdrückt damit die Lipidoxidation. Die Entstehung der Radikale wird mit der Bildung von Krebs in Zusammenhang gebracht. In Tiermodellen konnte eine Hemmung des Tumorwachstums und eine Abnahme der Tumorgroße bei oralen Gaben von InsP<sub>6</sub> im Trinkwasser beobachtet werden.<sup>181</sup> Verantwortlich für die biologischen Eigenschaften des InsP<sub>6</sub> ist wahrscheinlich die 1,2,3 (äquatorial-axial-äquatorial)-Trisphosphatgruppe.<sup>180</sup>

In Pflanzen induziert das Stresshormon Abscisinsäure einen Anstieg der MIPS-eigenen mRNA.<sup>182</sup> Ein damit verbundener Anstieg der InsP<sub>6</sub>-Konzentration könnte am Wasserhaushalt der Zellen beteiligt sein. InsP<sub>6</sub> bildet sich unter hyperosmotischen Bedingungen in Pflanzenzellen und öffnet Ionenkanäle in Vakuolen.<sup>183</sup>

In vielen Studien wird auch die hohe Affinität von InsP<sub>6</sub> zu verschiedenen Proteinen diskutiert. Dazu gehören z.B. Arrestin<sup>184</sup> und das Clathrin-Assembly Protein AP-2.<sup>185</sup> Aufgrund der hohen negativen Ladung von InsP<sub>6</sub> und den daraus resultierenden starken unspezifischen Wechselwirkungen sind diese Ergebnisse jedoch mit Vorsicht zu betrachten.

Der metabolische Endpunkt des Inositolphosphatstoffwechsels wird jedoch nicht von InsP<sub>6</sub>, sondern durch **Diphosphoinositolphosphate** gebildet. Diese werden durch Phosphorylierung von InsP<sub>6</sub> durch ATP mittels einer InsP<sub>6</sub>-Kinase gebildet.<sup>186</sup> InsP<sub>6</sub>-Kinasen wurden sowohl aus Hefen als auch aus Säugetieren kloniert.<sup>187</sup> Eine Mutation in dem für die InsP<sub>6</sub>-Kinase codierenden Gen in *S.cerevisiae* führt zu starken Konzentrationsabnahmen bei den Diphosphoinositolphosphaten. Diese mutierten Hefezellen zeigen ein geringes Wachstum und enthalten ungewöhnlich kleine und fragmentierte Vakuolen.<sup>188</sup>

Ein Rückgang der InsP<sub>6</sub>-Synthese führt zu einem reduzierten mRNA-Transports aus dem Zellkern. Vermutlich ist nicht InsP<sub>6</sub>, sondern daraus resultierende Diphosphoinositolphosphate an der Regulation dieses Transports beteiligt.<sup>189</sup> Es konnte

ebenfalls gezeigt werden, dass PP-InsP<sub>5</sub> mit hoher Affinität an die im Vesikeltransport beteiligten Proteine AP-3<sup>190</sup> und an das „coatomer“-Protein<sup>191</sup> bindet.

Die Diphosphoinositolphosphate InsP<sub>7</sub> und InsP<sub>8</sub> wurden in *D.discoideum* entdeckt.<sup>192</sup> Die Strukturen dieser in *D.discoideum* erstmals nachgewiesenen Substanzen wurden durch NMR-Spektroskopie und mit Hilfe spezifischer Enzyme aufgeklärt.<sup>193,194</sup> Im InsP<sub>7</sub> befindet sich die Diphosphatgruppe an Position 6, während im InsP<sub>8</sub> die Positionen 5 und 6 jeweils eine Diphosphatgruppe tragen. Die genauen Bezeichnungen der beiden Diphosphoinositolphosphate lauten daher D-6-Diphospho-*myo*-Inositol(1,2,3,4,5)-pentakisphosphat (6-PP-Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>) und D-5,6-Bis-Diphospho-*myo*-Inositol(1,2,3,4)-tetrakisphosphat (5,6-bis-PP-Ins(1,2,3,4)P<sub>4</sub>).

Die intrazelluläre Konzentration von InsP<sub>7</sub> liegt zwischen 30 und 100 µM, die von InsP<sub>8</sub> zwischen 60 und 300 µM bei *D.discoideum*.<sup>195</sup> Eine spezifische 6-PP-InsP<sub>5</sub>-(5)-Kinase katalysiert die Reaktion von 6-PP-InsP<sub>5</sub> zu 5,6-bis-PP-InsP<sub>4</sub>.<sup>194</sup> Zusätzlich wurde ein weiteres InsP<sub>7</sub>-Isomer als 5-PP-InsP<sub>5</sub> identifiziert. Dieses liegt in geringerer Konzentration als das 6-PP-InsP<sub>5</sub> vor (10-25 %).<sup>195</sup>

Deletionsmutanten der Inositolhexakisphosphat Kinase zeigen keine messbaren Konzentrationen an InsP<sub>7</sub> und InsP<sub>8</sub>.<sup>196</sup> Phänotypisch zeigen diese Mutanten nur geringe Veränderungen. Sowohl in der Endozytose, im Zellwachstum als auch in der Zellgröße wurden keine Unterschiede zum Wildtyp entdeckt. Während der Differenzierungsphase zeigte sich jedoch eine schnellere Aggregation und eine erhöhte Sensitivität der Mutanten gegenüber cAMP. Die Konzentrationen von InsP<sub>7</sub> und InsP<sub>8</sub> steigen bei Stimulation mit cAMP stark an. Vermutlich konkurrieren InsP<sub>7</sub> und das membrangebundene PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> um die Bindung an pleckstrin-homologe (PH) Domänen. Ein niedriger InsP<sub>7</sub>-Level bedingt eine verstärkte Interaktion dieser Proteine mit PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Infolgedessen werden diese Proteine an der Membran rekrutiert.

Die physiologischen Funktionen der hochphosphorylierten Verbindungen in *D.discoideum* sind noch unbekannt.

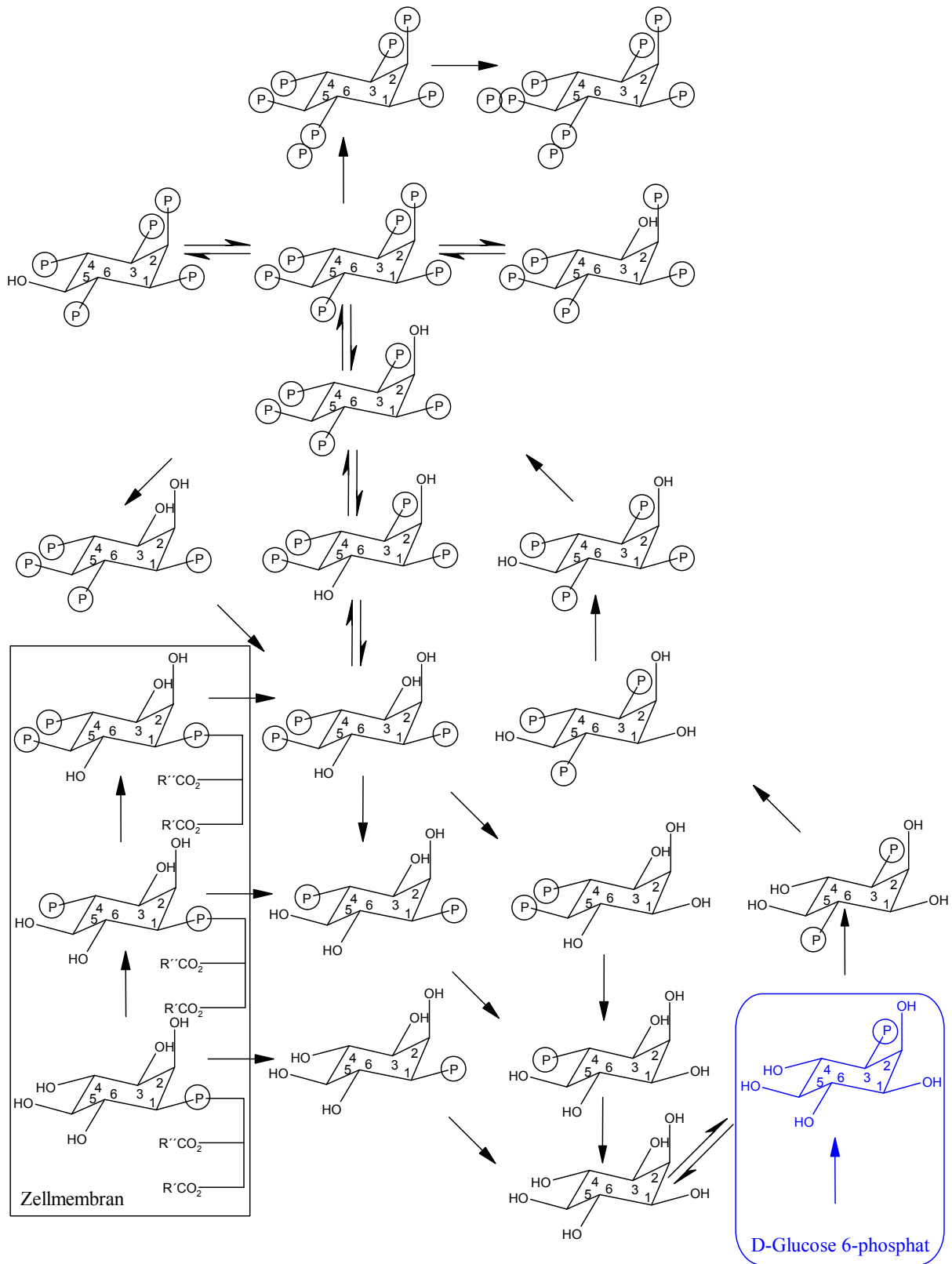


Abbildung 6: Inositolphosphat-Metabolismus in *D. discoideum* - Stand der Forschung



### 1.8.2 Der „Second-Messenger“ $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$

$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  ist in höheren Zellen an der Signaltransduktion beteiligt. Es dient hierbei als Botenstoff und wird neben Diacylglycerol aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat mit Hilfe der Phospholipase C gebildet. Michael Berridge entdeckte die rasche Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus nicht-mitochondrialen Speichern, etwa aus dem endoplasmatischen Retikulum oder dem sarkoplasmatischen Retikulum glatter Muskelzellen durch  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ .<sup>197,198</sup> Diacylglycerin, der zweite Botenstoff, der durch Hydrolyse von  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  entsteht, aktiviert die Proteinkinase  $\text{C}^{199,200}$ , die in verschiedenen Zielproteinen Serin- und Threoninreste phosphoryliert.

Eine schematische Darstellung der Phosphoinositidkaskade ist in Abbildung 7 wiedergegeben. Die Wechselwirkung eines externen  $\text{Ca}^{2+}$ -Agonisten mit einem membrangebundenen Rezeptor führt zur Bindung eines G-Proteins<sup>201,202,203</sup> (heterotrimerer Proteinkomplex aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit) an einem Rezeptor. Diese Wechselwirkung führt zu einem Austausch von GDP gegen GTP, wodurch das G-Protein aktiviert wird. Die GTP-tragende  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert ab und aktiviert die membrangebundene Phospholipase-C (PLC). Dieses Enzym hydrolysiert  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  und bildet  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , welches in das Cytosol diffundiert und DAG, welches in der Membran verbleibt.

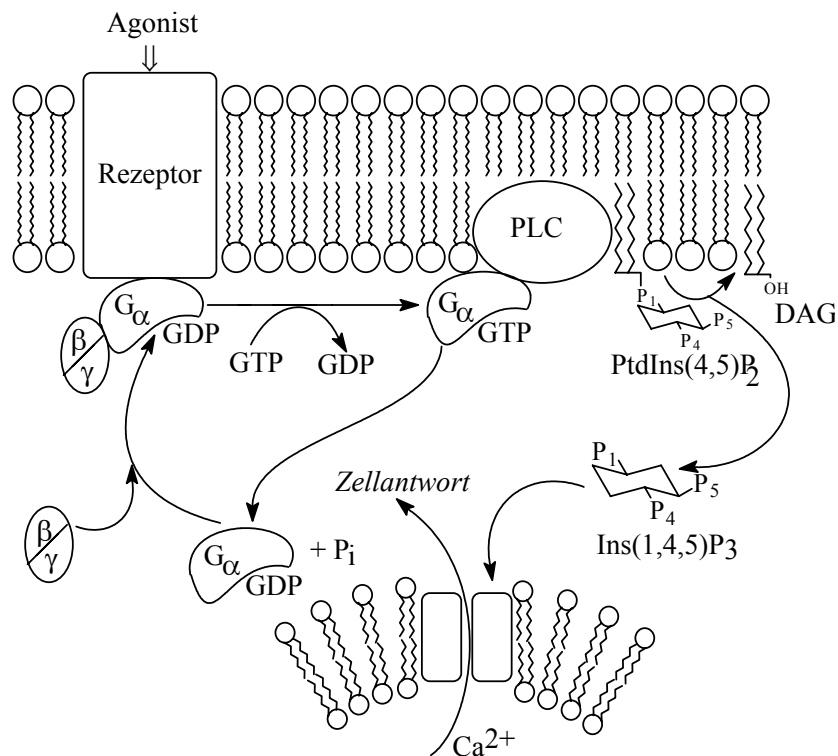


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Phosphatidylinositolphosphat-abhängigen Signaltransduktion

Die Wirkung des kurzlebigen Second-Messengers  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  wird bei tierischen Zellen über zwei konkurrierende Wege gesteuert. Der dominierende Weg ist die Dephosphorylierung durch eine Inositolpolyphosphat 5-phosphatase. Daneben findet eine Terminierung über eine ATP-abhängige Phosphorylierung durch die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-Kinase statt.<sup>204</sup> Für das Produkt  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  sind eine Reihe von hochaffinen, spezifischen Bindeproteinen (z.B.  $\text{p}42^{\text{IP}4}$ <sup>205</sup>,  $\text{GAP}1$ <sup>172</sup>,  $\text{Centaurin-}\alpha$ <sup>206</sup>) in verschiedenen Zellen nachgewiesen worden.

Die Phosphoinositid-Signalkaskade beteiligt sich bei *D.discoideum* wahrscheinlich an der Weiterleitung chemotaktischer Reize (z.B.  $\text{cAMP}$ <sup>207</sup>,  $\text{Folat}$ <sup>208</sup>) und der Sensorik der Zelldichte (CMF – „conditioned-medium factor“<sup>209</sup>).

Stimulation der Phospholipase C führt innerhalb kürzester Zeit zur Bildung von Diacylglycerol und  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ .<sup>210, 211</sup> Zugabe von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zu permeabilisierten Amöben führt zu einer Mobilisation von intrazellulär gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>212</sup> und zur Stimulierung der Aktinpolymerisation.<sup>213</sup>

Eine Deletion des PLC-Gens zeigte jedoch keine signifikanten phänotypischen Veränderungen<sup>214,160</sup>, so dass eine physiologische Rolle für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  in *D.discoideum* wie in höheren Organismen fraglich ist. Die Mutanten (PLC-Minus) zeigten nur noch eine geringe Phospholipase C Aktivität (<10 %) <sup>160</sup>, die Zellen wachsen jedoch normal und auch die Differenzierung und die Chemotaxis werden nicht beeinträchtigt. Die intrazelluläre Konzentration von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (1.5-3  $\mu\text{M}$  im unerregten Zustand<sup>215,161</sup>) wird bei den PLC-Minus-Mutanten nur um ca. 20 % unterschritten. Jedoch findet eine sehr starke Konzentrationsabnahme von  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  statt. Dieses führte zur Entdeckung eines alternativen Syntheseweges des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Ausgehend vom  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  entsteht durch Dephosphorylierung  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  und anschließend  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Möglicherweise kann die Zelle hierdurch die Abnahme des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  kompensieren. Eine analoge Reaktion wird von der „**M**ultiplen **I**nositol**p**olyphosphat **P**hosphatase (MIPP) in Ratenleber katalysiert.<sup>216</sup>

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es auf proteinchemischer Ebene keinen Hinweis für das Vorliegen eines  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptors, der analog zu Säugerzellen als ligandenaktivierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal fungieren könnte. Auf genetischer Ebene sind jedoch Sequenzen mit starken Homologien zu Genen von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptoren aus anderen Organismen zu finden.

Die Inaktivierung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  in *D.discoideum* zeigt starke Parallelen zu höheren eukaryontischen Zellen. Zwei cytosolische Phosphataseaktivitäten sind beim Katabolismus von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  beteiligt.<sup>217</sup> Die Analyse der Produkte ergab, dass es sich bei der einen

Aktivität um eine  $Mg^{2+}$ -abhängige 5-Phosphatase handelte, die auch Phosphoinositide als Substrat akzeptiert<sup>218</sup> In dem anderen Fall handelt es sich um eine  $Li^+$ -sensitive 1-Phosphatase. Ein Abbau von  $Ins(1,4,5)P_3$  zu  $Ins(4,5)P_2$  durch 1-Phosphatasen wurde bisher nur bei Pflanzen und Pilzen beobachtet.<sup>219,220</sup>

In *D.discoideum* wurden bisher 4 Gene identifiziert, die Homologien zu 5-Phosphatasen aus anderen Organismen zeigen.<sup>221</sup> Die Inaktivierung eines der vier Gene führte zu Defekten im Wachstum und bei der Entwicklung. Die Mutanten zeigten ein wesentlich langsames Wachstum auf Bakterien und in axenischer Kultur. Während der Differenzierung kommt es zur Bildung von „multiple-tipped aggregates“.

Eine weitere Möglichkeit der Inaktivierung von  $Ins(1,4,5)P_3$  ist die Phosphorylierung durch eine kernassoziierte 3-Kinase.<sup>177</sup> Diese bleibt nicht auf der Stufe des Tetrakisphosphates stehen, sondern verläuft *in vitro* bis zum  $InsP_6$ . Interessanterweise läuft sowohl die Bildung als auch die Deaktivierung von  $Ins(1,4,5)P_3$  über die gleichen Zwischenstufen  $Ins(1,3,4,5)P_4$  und  $Ins(1,3,4,5,6)P_5$ .

Der Zusatz von  $Ins(1,4,5)P_3$  und/oder Diacylglycerol zu Saponin-permeabilisierten Zellen führt zum Ein- und Ausschalten von verschiedenen entwicklungsabhängigen Genen.<sup>222</sup>  $Ins(1,4)P_2$  und  $PtdIns(4)P$ , beides Produkte der 5-Phosphatase, binden an DNA-Polymerase  $\alpha$ . Hierdurch wird ihre Aktivität um das 10-fache gesteigert.<sup>165</sup> Überexpression einer Inositolphosphat 1-Phosphatase in COS-7 und HeLa-Zellen, die  $Ins(1,4)P_2$  abbaut, führt zu einer 50 %igen Reduzierung der DNA-Synthese.<sup>223</sup>

### 1.8.3 Phosphatidylinositolphosphate

Die Phosphatidylinositole machen in Säugerzellen und *D.discoideum* ca. 10 % der Phospholipide aus.<sup>224</sup> Dabei nimmt das  $PtdIns$  den Hauptteil ein. In Säugern bilden  $PtdIns(4)P$  und  $PtdIns(4,5)P_2$  5-10 %, alle anderen Phosphatidylinositolphosphate weniger als 1 % bezogen auf den  $PtdIns$ -Gehalt.<sup>225</sup>

Phosphatidylinositolphosphate wirken als Signalmoleküle. Ihre Wirkung unterscheidet sich jedoch stark zu frei im Cytosol diffundierenden Signalmolekülen wie  $Ins(1,4,5)P_3$  oder cAMP. Phosphoinositide werden in der Membran synthetisiert und verbleiben dort, d.h. sie vermitteln ortsgebundene Informationen. Die Zielproteine werden zur Membran „rekrutiert“ und die Grenzfläche zwischen Membran und Cytosol ist damit als Ort der Protein-Ligand-Wechselwirkung festgelegt. Das spezifische Phosphorylierungsmuster birgt die Information zur gezielten Anlagerung von Proteinen.

Vermutlich werden die Signale nicht allein durch einen Anstieg der Phosphatidylinositolphosphatkonzentration, sondern auch durch lokale Akkumulation an Membranregionen („rafts“) vermittelt.

Die Biosynthese des Grundbausteins Phosphatidylinositol erfolgt in eukaryontischen Zellen über die Phosphorylierung von Diacylglycerol durch eine spezifische DAG-Kinase. Die daraus gebildete Phosphatidsäure wird durch Aktivierung mit Cytidin-5'-triphosphat (CTP) zu CDP-Diacylglycerol umgebaut. Durch Übertragung des Diacylglycerinphosphatrestes von CDP-DAG auf *myo*-Inositol entsteht Phosphatidylinositol. Durch ein komplexes Netzwerk von Kinasen und Phosphatasen werden weitere Phosphatidylinositolphosphate gebildet.

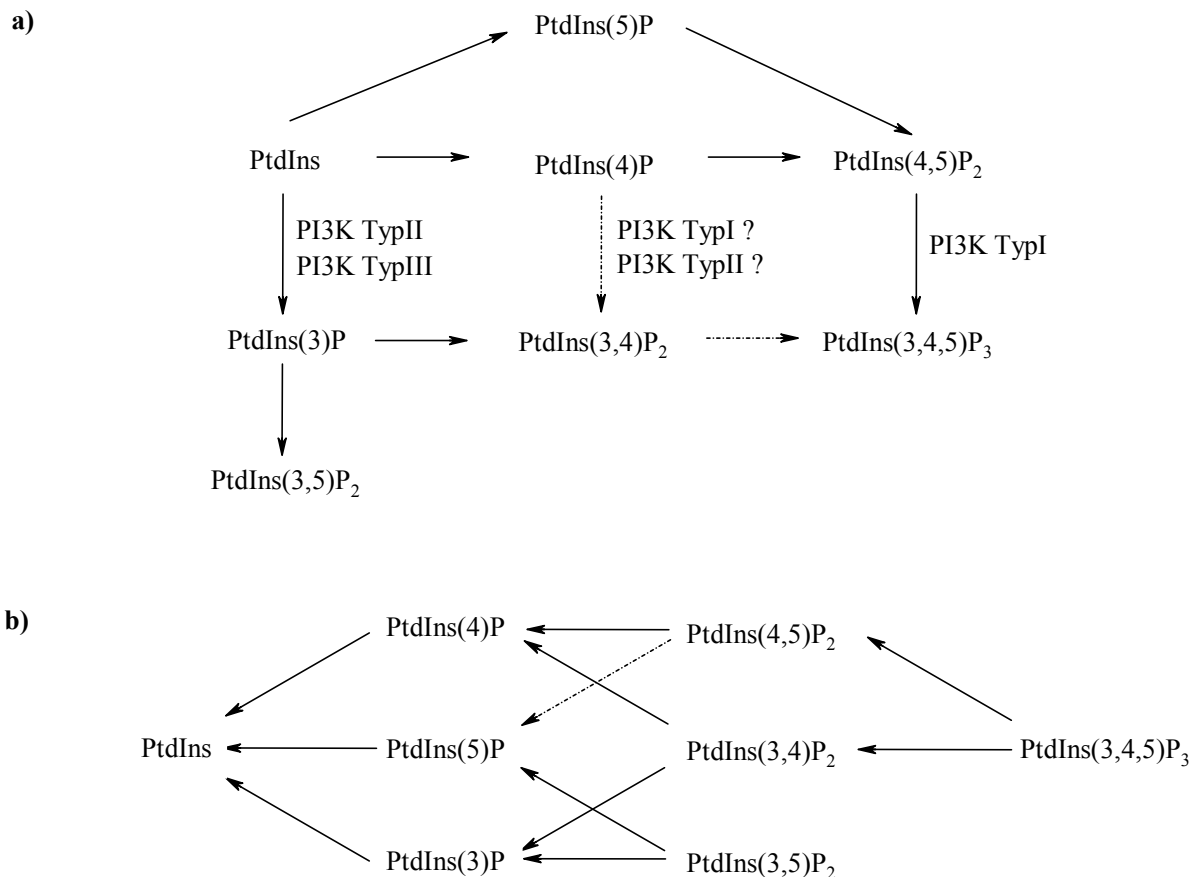


Abbildung 8: *PtdIns/PtdInsPx-Kinase* (a) und *PtdInsPx-Phosphatase* (b) Aktivitäten in Säugerzellen  
Gestrichelte Pfeile stehen für Aktivitäten, die *in vivo* noch nicht zweifelsfrei bewiesen sind.

PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kann direkten Einfluss auf cytosolische Proteine ausüben, oder als Vorläufer für weitere „Second-Messenger“ dienen. Zusätzlich kann PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zahlreiche Proteinkinasen direkt aktivieren.<sup>226,227,228,229,230,231</sup>

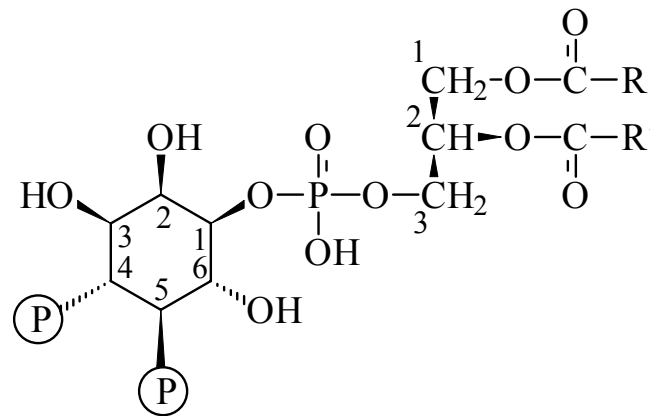


Abbildung 9: Schematische Struktur von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>)

PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> scheint eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts zu spielen. Es bindet an verschiedenen aktinbindenden Proteinen und reguliert diese *in vitro*.<sup>232</sup> Hierzu gehören Gelsolin<sup>233,234</sup>, Profilin<sup>235,236</sup>,  $\alpha$ -Actinin<sup>237</sup>, Vinculin<sup>238,239,240</sup>, ERM-Proteine<sup>241</sup> und N-WASP (homolog zum WASP-Protein).<sup>242</sup> WASP, dem eine entscheidende Rolle beim Wiscott-Aldrich-Syndrom zugeschrieben wird<sup>243</sup>, besitzt neben eine prolinreiche Sequenz, die typisch für aktinbindende Proteine ist auch eine pleckstrin-homologe Region (PH, platelet and leukocyte C kinase substrate protein), über die eine Interaktion mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> erfolgen kann.

Die Synthese von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> korreliert oft mit der Polymerisierung von Aktin.<sup>244,245,246</sup> Eine Manipulation des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Levels führt zu einer veränderten Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Beispielsweise führt eine Überexpression von Phosphatidylinositol 4-phosphat 5-Kinasen (PIP5Ks) in COS-Zellen zu einer dramatischen Zunahme der Aktinpolymerisation.<sup>247,248</sup> Im Gegensatz dazu führt die Überexpression einer PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Phosphatase zu einer Neuordnung der Aktinfilamente.<sup>249</sup>

Die Bindung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> Gelsolin führt zu einer Dissoziation des Aktin-Gelsolin-Komplexes und somit zu einer Neubildung von Aktinfilamenten.<sup>244,250</sup>

Weiterhin wechselwirkt PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> mit verschiedenen Proteinen und Enzymen, die im Vesikeltransport involviert sind.<sup>251,252</sup> Inhibierung der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Synthese blockiert die Ca<sup>2+</sup>-gesteuerte Sekretion. Es wird angenommen, dass die Produktion von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> wichtig für die Exozytose ist.<sup>253</sup>

In perforierten Zellen konnte gezeigt werden, dass PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> eine wichtige Rolle sowohl in der frühen als auch in der späten Phase bei der Bildung von „endocytic coated vesicle“ spielt.<sup>254</sup>

PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kann mit einer Reihe weiterer Proteine, die im Vesikeltransport involviert sind, interagieren. Dazu gehören ARF1 (ADP ribosylation factor 1)<sup>255</sup>, ARNO (ARF guanine nucleotide exchange factor)<sup>256</sup>, ARF1 GAP (ARF1 GTPase-activating protein)<sup>257</sup>, Phospholipase D<sup>258</sup>, Dynamin<sup>259</sup> und der Chlathrin-Adapter Komplex AP-2.<sup>260</sup>

Weitere potentielle Funktionen ergeben sich durch die spezifische Bindung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> an pleckstrin-homologe Domänen verschiedenster Proteine.<sup>261</sup> Hierzu gehören mSOS1<sup>262</sup>, Dynamin<sup>263</sup> und PLC-δ1.<sup>264,265</sup>

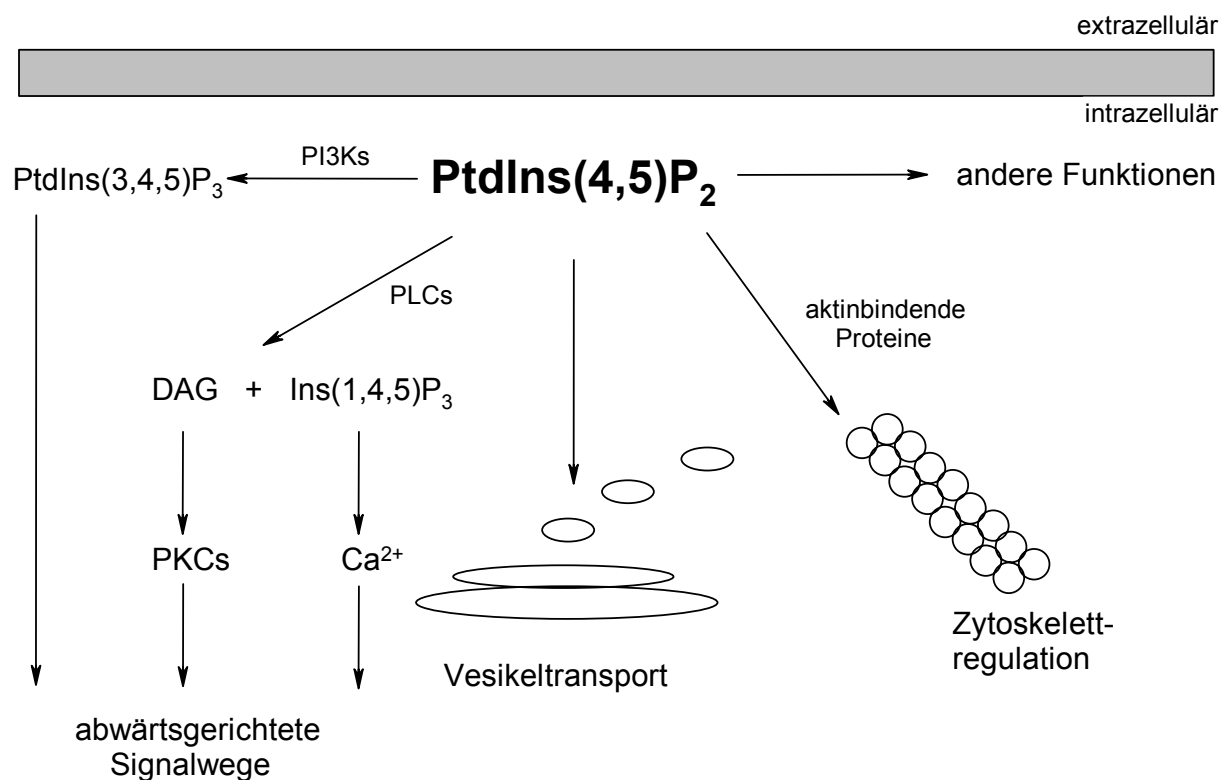


Abbildung 10: Schematische Darstellung der physiologischen Funktionen von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>

Der Nachweis von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in aktivierten Neutrophilen<sup>266</sup> führte zur Entdeckung der Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K).<sup>267</sup> Die Klassifizierung der PI3K erfolgt aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Klassen. Klasse I PI3Ks phosphorylieren *in vitro* PtdIns, PtdIns(4)P oder PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, während Klasse II PI3Ks nur PtdIns oder PtdIns(4)P (aber kein PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) und Klasse III PI3Ks sogar ausschließlich PtdIns als Substrat akzeptieren.<sup>268</sup>

Neben der unterschiedlichen Substratspezifität bestehen zwischen den Mitgliedern der drei PI3K-Klassen weitere funktionelle und strukturelle Unterschiede. Klasse I PI3Ks sind

heterodimere Enzyme bestehend aus einer 110 kDa großen katalytischen Untereinheit und einer kleineren (50-101 kDa) nicht-katalytischen Untereinheit.<sup>268</sup> Sie sind überwiegend im Cytosol lokalisiert. Eine Aktivierung durch Zelloberflächenrezeptoren rekrutiert diese vermutlich aus dem Cytosol an die Plasmamembran. Man unterteilt sie weiter in Klasse I<sub>A</sub> und I<sub>B</sub>. Die Klasse I<sub>A</sub> der PI3Ks wird durch eine Tyrosin-Kinase-Aktivität, Klasse I<sub>B</sub> über einen G-Protein basierenden Mechanismus stimuliert.<sup>269</sup>

Die regulatorischen Funktionen der PI3K des Typs I in Säugetieren scheinen unerschöpflich. Pleiotrope zelluläre Kontrollfunktionen wurden in genetisch modifizierten Mäusen, durch Transfektionsexperimente und mit Hilfe von PI3K-Inhibitoren nachgewiesen.<sup>270,271</sup> Zur Steuerung von Zellfunktionen tragen neben der Kinaseaktivität auch eine Proteinkinaseaktivität und direkte Interaktionen mit anderen Signalmolekülen bei. Besondere Bedeutung besitzen PI3K des Typs I als Suppressoren der Apoptose und bei der Kontrolle der Motilität bestimmter Zellen. Jedoch treten PI3K auch als Mediatoren der zellulären Proliferation, von Differenzierungs- und Transportprozessen und der Endozytose auf.

Neuerdings sind PI3K des Typs I auch Gegenstand der pharmakologischen Forschung geworden. Ein Ziel ist es, spezifische Inhibitoren der Kinaseaktivität zur Behandlung inflammatorischer Erkrankungen wie Rheuma, Asthma oder Allergien einzusetzen. Diese Bemühungen folgen Befunden zur essentiellen Funktion von PI3K des Typs I bei der Steuerung der Entzündungsreaktion bei Phagozyten.<sup>272</sup> Weitere therapeutische Anwendungen ergeben sich auch aus Ergebnissen zur regulatorischen Funktion von PI3K bei der Herzkontraktion<sup>273</sup> und bei der gezielten Induktion der Apoptose bei Tumorzellen.<sup>274</sup>

Bei der Klasse II der PI3Ks handelt es sich um größtenteils membrangebundene monomere Enzyme. Sie haben ein Molekulargewicht zwischen 170-210 kDa und werden durch Rezeptoren für Chemokine<sup>275</sup>, Insulin<sup>276</sup> und Wachstumsfaktoren<sup>277</sup> aktiviert.

Enzyme der Klasse III der PI3Ks sind homolog zu Vps34p (vacuolar protein-sorting Protein)<sup>278</sup>, der einzigen in *S.cerevisiae* bekannten PI3K. Wie der Name andeutet, spielt es eine Rolle bei intrazellulären Transportvorgängen. Vps34p ist essentiell für den Traffic neuer Proteine vom Golgi-Apparat zur Vakuole.<sup>279,251</sup>

Phosphoinositid 5-Kinasen (PI5Ks) wurden in verschiedenen Zellkompartimenten gefunden. Dazu gehören Plasmamembran, Cytosol, endoplasmatisches Retikulum, Zytoskelett und der Zellkern.<sup>280</sup> Eine in *S.cerevisiae* identifizierte PI5K (Mss4) spielt eine Rolle bei der Aktinorganisation.<sup>281,282</sup> In *S.cerevisiae* und *S.pombe* stieg die Konzentration von

PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, eines der durch PI5Ks möglichen Produkte, bei hyperosmotischen Stress drastisch an.<sup>283</sup>

PtdIns(4)P wird in Zellen über eine Phosphatidylinositol 4-Kinase aus PtdIns gebildet. PI4Ks sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die mit zellulären Membranen assoziiert sind.<sup>284</sup> Alle bisher klonierten PI4Ks phosphorylieren *in vitro* nur PtdIns. PIK1 - eine PI4Ks aus Hefen. Null-Mutanten sind nicht entwicklungsfähig und zeigen Defekte in der Zytokinese.<sup>285,286</sup>

Die enzymatische Darstellung von PtdIns(5)P ist bisher unklar. PtdIns(5)P wurde zuerst als Verunreinigung von aus Hirn isolierten PtdIns(4)P entdeckt.<sup>287</sup> Das humane Protein p235 ist in der Lage PtdIns *in vitro* zu PtdIns(5)P umzuwandeln.<sup>288</sup> Es ist möglich, dass es dieses auch *in vivo* kann. Alternativ könnte PtdIns(5)P auch durch Dephosphorylierung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> entstehen.

Phosphatidylinositol 5-phosphat 4-Kinase (PIP4K) ist in der Lage PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> aus PtdIns(5)P zu synthetisieren. Sie akzeptiert auch PtdIns(3)P als Substrat zur Bildung von PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, jedoch wird PtdIns(5)P wesentlich besser umgesetzt.<sup>287</sup>

Die oben beschriebenen Enzyme sind für die Bildung von den vermeintlichen Second-Messenger PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> verantwortlich.<sup>289,290</sup> Diese Verbindungen sind *in vitro* in der Lage Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Proteinkinasen C Isoforme zu aktivieren<sup>291</sup> und interagieren mit SH2-Domänen.<sup>292</sup> Analog zum PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> interagieren die in 3-Position phosphorylierten PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> mit Pleckstrin-homologe Domänen.<sup>293</sup> Die erste Beschreibung über eine Wechselwirkung zwischen PtdIns(3)P und Pleckstrin-homologe Domänen erfolgte bei der Ser/Thr-Kinase Proteinkinase B (PKB). Dieses Schlüsselenzym wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Insulin stimuliert. PKB nimmt Einfluss auf die Glycolyse, Glucoseaufnahme, Glycogensynthese, Proteinbiosynthese und dem Zusammenspiel von Mitogenese und Apoptosis.<sup>293</sup>

Ein zum PKB aus Säugetieren homologes Protein wurde in *D.discoideum* identifiziert.<sup>294</sup> PKB wird durch cAMP über einen mit einem G-Protein gekoppelten Rezeptor<sup>207</sup> aktiviert. Eine Co-Regulation erfolgt in Säugetierzellen durch PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, beides Produkte der PI3K.

Eine mit einem GFP-Tag versehene Version von PKB ist in der Migrationsfront im cAMP-Gradienten lokalisiert. PKB-Nullzellen zeigen starke Defekte im Aggregationsstadium. Die Mutanten weisen eine anomale Chemotaxis und eine fehlerhafte Ausrichtung im cAMP-Gradienten auf. Zudem aggregieren sie bei geringeren Zelldichten.<sup>294</sup>



Ein weiteres Protein mit Pleckstrin-homologer Domäne – CRAC - welches für die Aktivierung der Adenylatcyclase in *D.discoideum* benötigt wird, zeigte GFP-versetzt eine äquivalente Lokalisation zu PKB.<sup>295</sup> Dieses deutet auf eine Aktivierung der PI3K 1 und 2 an der Migrationsfront hin.

In *D.discoideum* wurden drei PI3K (PI3K1-3) mit Homologien zu PI3Ks aus Säugern gefunden.<sup>296</sup> PI3K1 und PI3K2 sind sich untereinander sehr ähnlich und scheinen genetisch redundant zu sein. Ein single knock-out beider Gene führt phänotypisch zu keiner Veränderung, während bei einem double knock-out Defekte im Wachstum, bei der Entwicklung und bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts auftreten.<sup>296,297</sup> Zusätzlich werden auch Defekte in der Pinozytose und beim Transport von Flüssigkeiten aus aciden Lysosomen zu nichtaciden postlysosomalen Vakuolen beobachtet.<sup>298</sup> Ein knock-out des PI3K3-Gens zeigte keine sichtbare Veränderung des Phänotyps, jedoch ist PI3K3 essentiell für ein Wachstum der Zellen mit einem geringen genetischen Hintergrund an PI3K1 und PI3K2.

Ein Gen mit starker Homologie zu PI4K aus anderen Organismen wurde in *D.discoideum* identifiziert.<sup>297</sup>

## 1.9 Übersicht bekannter Mutanten aus dem Inositolstoffwechsel in *D.discoideum*

Die nachfolgende Tabelle zeigt einen Überblick der beschriebenen Mutanten aus dem Inositolstoffwechsel von *D.discoideum* und deren phänotypischen Merkmale. Eine genauere Beschreibung der Mutanten ist unter 1.8 zu finden.

	<i>ΔDdpik1 ΔDdpik2</i>	<i>PLC<sup>-</sup></i>	<i>Dd5p4<sup>-</sup></i>	<i>pten<sup>-</sup></i>	<i>insp6k<sup>-</sup></i>
<b>Produktlevel</b>	PtdIns(3)P unverändert, PtdIns(3,4)P <sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> nehmen ab.	Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> bleibt konstant.			Kein InsP <sub>8</sub> und nur wenig InsP <sub>7</sub> in Zellysaten. Keine InsP <sub>6</sub> -Kinaseaktivität in vitro.
<b>Morphologie</b>	Zellen sind kleiner und irregulär geformt. Die Zellen enthalten weniger und kleinere Vakuolen. Bildung von "Brücken" bei der Zellteilung.				
<b>Wachstum</b>	Axenisches Wachstum und Wachstum in submersen Standkulturen langsamer. Wachstum auf Bakterien gestört. Kein Wachstum in Bakteriensuspension		Reduziertes Wachstum in axenischer Kultur und auf Bakterienrasen		
<b>Entwicklung</b>	Differenzierung langsamer. Keine Bildung von "aggregate streams"	Sporen germinieren auch bei schlechten Bedingungen	„multiple tipped aggregates“	Keine Zell-aggregation	
<b>Endozytose</b>	Pinozytoserate geringer.				
<b>Chemotaxis</b>	Reaktion auf cAMP stärker.			Reduzierte Chemotaxis	Reaktion auf cAMP stärker.
<b>Transport</b>	Transport vom Lysosom zum Postlysosom gestört. Kleine Postlysosomen.				
<b>F-Aktin</b>	Weniger F-Aktin, jedoch "F-aktinreiche" Filopodien			Basallevel an F-Aktin höher gegenüber dem Wildtypzellen	

**Tabelle 3: Gegenüberstellung bekannter Mutanten aus dem Inositolphosphat-/Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsel und deren Defekte bei *D.discoideum***

*ΔDdpik1ΔDdpik2*: Doppelmutante der PI 3-kinase; *PLC<sup>-</sup>*: Nullmutante der Phospholipase C; *Dd5p4<sup>-</sup>*: Nullmutante einer PI 4-Kinase; *pten<sup>-</sup>*: Nullmutante einer Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Phosphatase; *insp6k<sup>-</sup>*: Nullmutante der InsP<sub>6</sub>-Kinase.

## 2 Aufgabenstellung

Der zentrale biosynthetische Weg zum *myo*-Inositol besteht in der Umwandlung von D-Glucose 6-phosphat in D-*myo*-Inositol 3-phosphat mit anschließender Dephosphorylierung. Der Baustein *myo*-Inositol findet sich in Phospholipiden, Inositolphosphaten, Diphosphoinositolphosphaten und GPI-verankerten Membranproteinen wieder. Für diese in eukaryontischen Zellen ubiquitären Verbindungen werden viele Funktionen diskutiert, als abgesichert gelten dabei nur wenige.

Zellen des eukaryontischen Mikroorganismus *D.discoideum* beinhalten ein breites Spektrum von inositolhaltigen Metaboliten, denen unter anderem Aufgaben bei dem Membranfluss, der Signaltransduktion und der Zellmotilität nachgesagt werden.

Aufgrund seines haploiden Genoms werden auch Auswirkungen rezessiver Mutationen unmittelbar sichtbar, weshalb sich *D.discoideum* als idealer Versuchsorganismus für genetische Ansätze anbietet.

Die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit sind:

- *Etablierung von geeigneten Enzymtests zum Nachweis der D-myoinositol 3-phosphat Synthaseaktivität*
- *Reinigung und Charakterisierung der D-myoinositol 3-phosphat Synthase aus D.discoideum*

Da *myo*-Inositol 3-phosphat der zentrale Vorläufer sowohl für die Phosphoinositide als auch für die Inositolphosphate ist, besteht ein großes Interesse die Regulation der Einstiegsreaktion zu verstehen.

- *Generierung von inositol-auxotrophen Mutanten durch gezielte genetische Manipulation mit Hilfe der bei D.discoideum etablierten Techniken der homologen Rekombination und der Antisense-Mutagenese.*

Das Ausschalten des Gens für die D-*myo*-Inositol 3-phosphat Synthase sollte zu konditional letalen Mutanten führen, bei denen eine Kompensation des Defekts durch Zusatz von *myo*-Inositol zum Medium möglich ist.

- *Funktionale Analyse der Mutanten*

Anhand der inositol-auxotrophen Mutanten sollen verschiedene Aspekte des Phosphatidylinositolphosphat/Inositolphosphatstoffwechsels untersucht werden:

- a) Welche Auswirkungen hat ein *myo*-Inositolmangel auf die intrazelluläre Konzentration verschiedener Folgemetabolite?
- b) Treten phänotypische Veränderungen auf und lassen sich diese mit Änderungen im Stoffwechsel bzw. den steady-state Konzentrationen der Metabolite korrelieren?
- c) Gibt es Verbindungen, deren Funktion in der „Abpufferung“ des zellulären Inositolpools liegen? Eine Möglichkeit wäre hierbei  $\text{InsP}_6$

Diese Untersuchungen sollen Rückschlüsse auf physiologisch relevante Inositolmetabolite und deren Funktion liefern.

### 3 Material und Methoden

Die nachfolgende Liste enthält alle nicht standardmäßig eingesetzten Chemikalien, Enzyme, Kits und ihre Bezugsquellen.

<b>Chemikalien, Medienbestandteile:</b>	
<sup>3</sup> H-markiertes <i>myo</i> -Inositol	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
5-Bromdesoxyuridin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Agar	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Agarose LE	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Amberlite MB-3	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach - Ts.
Aminosäuren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen; Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bacto-Trypton	Oxoid GmbH, Wesel
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Biotin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Blasticidin-S	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege
Blocking-Reagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
Cyanocobalamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dihydrostreptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
dNTP's	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
FITC-Dextran 60	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Fluoresceinisothiocyanat	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Fleisch-Pepton	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Folsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid GmbH, Wesel
HEPES	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Hydroxylapatit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hyperfilm	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Ins(3)P	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
InsP <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Latexpartikel (1µm Durchmesser, hydrophil)	Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania USA
Liponsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Malachitgrün-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mono-Q	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
MOPS	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
<i>myo</i> -Inositol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
NAD <sup>+</sup>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Nitrocellulose	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
N'-Methyl N'-Nitro N-Nitrosoguanidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PAR	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Deacylierte Phosphatidylinositolphosphate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PVDF-Membran (Immobilon-P)	Millipore GmbH, Schwalbach
Q-Sepharose FF	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

Resource-Q	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Riboflavin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Thiamin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
TRITC-Phalloidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Yeast Nitrogen Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
$\alpha$ -d-[ <sup>32</sup> P]-CTP	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

**Enzyme:**

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Life Technologies, Eggenstein; New England Biolabs, Inc., Beverly, USA
RNase A	Qiagen GmbH, Hilden
T4-DNA-Ligase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
T4-Polynukleotidkinase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>Vent</i> -DNA-Polymerase	New England Biolabs Inc., Beverly, USA

**Kits:**

BM Chromogenic Western Blotting Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNeasy Plant Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
DNeasy Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
pPIC6 Starter Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pPIC6 A,B,C	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Easy Select <sup>TM</sup> Pichia Expression Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alamarblue <sup>TM</sup>	Serrotec GmbH, Düsseldorf

**Standards:**

DNA-Längenstandard III (0.12-21.2 kbp)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Molekulargewichtsstandard Protein (97.4-14.4 kDa), low range	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RNA-Längenstandard II (1.5-6.9 kb)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Prestained SDS-standard, high range	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Verwendete Stämme

In dieser Arbeit wurden folgende Stämme verwendet:

Stamm	Relevante genotypische und phänotypische Eigenschaften	Herkunft
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , supE44, $\Delta$ lacU169, $\phi$ 8 $\alpha$ d, lacZ $\Delta$ M15, recA1, gyrA69, thi-1	299
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)pLysS <i>P.pastoris</i> X-33	F <sup>-</sup> ompTr <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> , hsdS <sub>B</sub> , $\lambda$ (DE3), Cm <sup>R</sup> , pLysS Mut <sup>+</sup>	300 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>D.discoideum</i> AX2	Axenisch und auf Bakterien wachsender Abkömmling von NC4	133

Tabelle 4: Verwendete Stämme

#### 3.1.2 Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide

Die nachfolgenden Tabellen geben die verwendeten Vektoren und neu konstruierte rekombinante Plasmide wieder.

Vektor	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
FC-AA11	bla, ColE1	H. Urushihara, Tsukuba Universität (Japan)
FC-BP15	bla, ColE1	H. Urushihara, Tsukuba Universität (Japan)
pDexRH	bla	A. Noegel (Universität Köln), <sup>301</sup>
pUCBsr $\Delta$ Bam	bla	A. Noegel (Universität Köln), <sup>302</sup>
pUC18	bla, lacZ', ColE1	U. Wehmeier (Universität Wuppertal), <sup>303</sup>
pET16bP	bla, lacI, T7- $\phi$ ip, lacO, s10-leader, ColE1	U. Wehmeier (Universität Wuppertal), <sup>300</sup>
pPIC6 $\alpha$ A		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pPIC6 $\alpha$ A/HSA		Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Neukonstruierte Plasmide	Konstruktion
pAF01	1.3 kb <i>EcoRI/BamHI</i> (Blasticidinresistenzkassette) aus pUCBsr $\Delta$ Bam blunt-end in FC-AA11 <i>AspI</i>
pAF03	1.7 kb <i>SalI/BamHI</i> aus FC-AA11 in pUC18
pAF04	1.7 kb <i>HindIII/EcoRI</i> aus pAF03 in pDexRH
pAF06	1.1 kb <i>SalI/BamHI</i> aus FC-BP15 in pUC18
pAF07	1.1 kb <i>HindIII/EcoRI</i> aus pAF06 in pDexRH
pAF08	1.5 kb <i>Nde1/SalI</i> aus FC-AA11 in pET16bP
pAF09	1.5 kb <i>EcoRI/XbaI</i> aus FC-AA11 in pPIC6 $\alpha$ A

Tabelle 6: In dieser Arbeit neu konstruierte Plasmide

### 3.1.3 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit benutzten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 aufgeführt. Als Bezugsquelle diente die Firma MWG-Biotech (Ebersberg). Unterstrichene Abschnitte geben die generierte Restriktionsschnittstelle wieder, fett gedruckte Buchstaben kennzeichnen die dazu nötigen Basenaustausche.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	generierte Restriktionsschnittstellen	Gen
AFoxsense	AAA GTT <u>GAA TTC</u> ATG GGT GTT ATG	<i>EcoRI</i>	ino1
AFoxantisense	GTT TGT <u>TCT AGA</u> TAT AAT CTT TGT TCT AAT AAC ATG	<i>XbaI</i>	ino1
AF01	AAA GTT CCA <u>CAT ATG</u> GGT GTT ATG	<i>NdeI</i>	ino1
AF02	AAA GTT CCA AGA ATG GGT GTT AT		ino1
AF03	TCT TTG TTT GAA GAG TGC ATT TA		ino1
AF04	TCT TTG <u>GTC GAC</u> GAG TGC ATT TA	<i>SalI</i>	ino1

Tabelle 7: Verwendete PCR-Primer

### 3.1.4 Anzucht von *E.coli*

*E.coli*-Stämme wurden entweder in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten kultiviert.<sup>304</sup> Als Kulturgefäße dienten Schikanekolben (100-1000 ml). Um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurden diese nur mit maximal 10 % des Nennvolumens befüllt. Die Inkubation der Schüttelkulturen erfolgte auf einem Rundschüttler (37 °C, 180 Upm). Plasmidtragende Stämme wurden stets unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert. Dauerkulturen wurden in LB-Medium (versetzt mit 30 % Glycerin) bei -20 °C gelagert.

LB-Medium:	[g/l]	LB-Agar:	[g/l]
Bacto-Trypton	10	Bacto-Trypton	10
Hefeextrakt	5	Hefeextrakt	5
NaCl	10	NaCl	10
		Agar	15
	pH 7.2		pH 7.2

Tabelle 8: Zusammensetzung des Luria-Bertoni-Vollmedium (LB)

Das Medium wurde 16 min bei 120 °C autoklaviert. Eventuell benötigte Antibiotika wurden dem Agar bei 60 °C bzw. dem Flüssigmedium bei RT steril zugesetzt.



### 3.1.5 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden durch horizontale, submerse Agarosegelelektrophorese mit 5-10 V/cm Laufstrecke in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure; pH 8.3) aufgetrennt.<sup>305</sup> Die Agarosekonzentration wurde dabei dem jeweiligen Trennproblem angepasst. Den Proben wurde 1/6 Volumenteile Probenauftragungspuffer (0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylencyanol, 40 % (w/v) Sucrose) zugesetzt. Zur Detektion der DNA-Fragmente unter UV-Licht (366 nm) enthielten Agarose und Laufpuffer 0.1 µg/ml Ethidiumbromid. Der DNA-Längenstandard III (0.12-21.2 kbp) diente als Größenmarker.

RNA-Fragmente wurden durch horizontale, submerse Agarosegelelektrophorese mit 5-7 V/cm Laufstrecke in 1 x FA-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA; pH 7.0) aufgetrennt.<sup>305</sup> Den Proben wurden 1/5 Volumenanteile Probenauftragungspuffer (16 µl gesättigte Bromphenolblaulösung, 80 µl 500 mM EDTA (pH 8.0), 2 ml Glycerin, 720 µl 37 %iges Formaldehyd, 3084 µl Formamid, 4 ml 10x FA-Puffer auf 10 ml mit Wasser auffüllen) zugesetzt. Die Denaturierung der Proben erfolgte durch Erhitzen für 5 min auf 65 °C und anschließender Abkühlung auf Eis. Zur Detektion der RNA-Fragmente unter UV-Licht (366 nm) enthielten Agarose und Laufpuffer je 1 µg/ml Ethidiumbromid Als Standard wurde der RNA-Längenstandard II (1.5-6.9 kb) verwendet.

### 3.1.6 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmiden aus *E.coli* erfolgte mittels Kochpräparation<sup>305</sup>, alkalischer Lyse<sup>306</sup> oder mit QIAprep Spin Miniprep Kit. Für präparative Isolierungen wurde das QIAprep Spin Maxiprep Kit verwendet.

*D.discoideum* enthält einen hohen Gehalt an RNA und Kohlenhydraten, die bei der Reinigung chromosomaler DNA diese häufig begleiten. Um dieses zu verhindern, wurde die DNA aus angereicherten Zellkernen isoliert.<sup>307</sup> Die Zellen wurden geerntet (500 g, 4 °C, 5 min) und zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml kaltem Kernisolierungs-Puffer, der Zellen lysiert aber die Kernmembran nicht angreift, resuspendiert und die intakten Zellkerne abzentrifugiert (2000 g, 4 °C, 10 min).

---

10 mM Magnesiumacetat
10 mM Natriumchlorid
30 mM HEPES; pH 7.5
10 % Saccharose
2 % Nonidet P-40

---

**Tabelle 9: Zusammensetzung des Kernisolierungs-Puffers**

Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die pelletierten Kerne in 1 ml TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8.0) aufgenommen und mit 50  $\mu$ l 10%iger SDS-Lösung und 10  $\mu$ l Proteinase K-Lösung (100  $\mu$ g/ml) versetzt. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C wurden restliche RNA und Proteine durch mehrmalige Extraktion mit wassergesättigtem Phenol pH 8.0 entfernt.

Zum erhaltenen Überstand wurde zur DNA-Präzipitation das zweifache Volumen 96%iger Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat; pH 5.2 pipettiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit reinem Ethanol gewaschen und an Luft getrocknet. Die DNA wurde anschließend in TE-Puffer gelöst.

Die Isolierung kleinerer Mengen genomischer DNA aus *D.discoideum* erfolgte mit Hilfe des DNeasy Plant Mini Kit oder des DNeasy Plant Maxi Kit.

Für die Isolierung von RNA aus *D.discoideum* wurde das RNeasy Mini Kit verwendet.

Die Konzentration der DNA und RNA-Proben wurde spektralphotometrisch bei 260 nm ermittelt. Eine  $OD_{260nm}$  von 1 entspricht etwa 50  $\mu$ g/ml dsDNA oder 40  $\mu$ g/ml RNA. Der Grad der Verunreinigungen mit Proteinen erfolgte durch Bestimmung des Quotienten  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$ . Ist der Wert bei DNA größer als 1.8 bzw. bei RNA größer als 2.0, so kann von einer sauberen Probe ausgegangen werden. Zusätzlich wurde die Konzentration durch Vergleich mit DNA/ RNA-Proben bekannter Konzentration in der Agarosegelelektrophorese abgeschätzt.

### **3.1.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

In einer Standardreaktion wurden ca. 500 ng Plasmid-DNA mit 10 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease umgesetzt. Die Inkubation erfolgte in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Temperaturbedingungen. Das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze betrug 50  $\mu$ l. Plasmid-DNA wurde ein bis drei Stunden, chromosomale DNA mindestens zehn Stunden verdaut. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch zehnmütiges Erhitzen auf 65 °C bzw. durch Zusatz von EDTA. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

### **3.1.8 Manipulation von Nukleinsäuren**

Um die Religation eines Vektors zu minimieren wurden die 5'-Phosphatgruppen eines linearisierten Vektors mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) entfernt.

5 µg linearisierte Vektor-DNA wurden in 50 µl CIAP-Puffer gelöst und mit 3 U alkalische Phosphatase versetzt. Die Dephosphorylierung erfolgte durch eine dreißigminütige Inkubation bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch zehnmütige Hitzeinaktivierung bei 70 °C gestoppt. Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor wurde anschließend nach 3.1.9 aufgereinigt.

50 mM Tris/ HCl; pH 9.0
1 mM MgCl <sub>2</sub>
0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>

**Tabelle 10: Zusammensetzung des CIAP-Puffers**

Viele Restriktionsenzyme erzeugen kohäsive Enden mit einem 5'- oder 3'-überstehenden Ende. 5'-DNA-Überhänge können mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt werden. 3'-Überhänge können von der T<sub>4</sub>-DNA-Polymerase abgebaut und nach Zugabe von Nukleotiden wieder zu einem glatten Ende aufgefüllt werden.

Um 5'-Überhänge aufzufüllen wurden ca. 1 µg DNA mit 2 µl 1mM dNTP-Lösung und 1 U Klenow-Enzym versetzt. Die Inkubation erfolgte in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem bei 37 °C. Das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze betrug 20 µl. Nach 30 min wurde die Reaktion durch zehnmütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach 3.1.9.

Zur Entfernung von 3'-Überhängen wurden ca. 1 µg DNA mit 2 U T<sub>4</sub>-Polymerase und 2 µl des vom Hersteller empfohlenen Puffersystem versetzt, auf 20 µl mit Wasser aufgefüllt und 2 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 2 µl 5 mM dNTP-Lösung und eine weitere fünfzehnminütige Inkubation bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch zehnmütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Aufgereinigt wurde die DNA nach 3.1.9.

### **3.1.9 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Trennung aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

Die Entfernung von Proteinen und/ oder niedermolekularen Verbindungen aus DNA-Proben erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit entsprechend den Herstellerangaben.

### **3.1.10 Herstellung von kompetenten Bakterien und Transformation**

Die Herstellung von transformationskompetenten *E.coli* erfolgte nach Inoue.<sup>308</sup> Aliquots von je 200 µl wurden entnommen und sofort in fl. N<sub>2</sub> eingefroren.

Zur Transformation wurden 1-10 µl DNA zugesetzt, 30 min auf Eis inkubiert, die Zellen einem Hitzeschock (30 s, 42 °C) ausgesetzt und erneut auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 800 µl SOC-Medium zugesetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

2 % Bacto-Trypton
0.5 % Hefeextrakt
10 mM NaCl
2.5 mM KCl
Nach dem Autoklavieren
10 mM MgCl <sub>2</sub>
20 mM Glucose

**Tabelle 11: Zusammensetzung des SOC-Mediums**

Aliquots der Zellsuspension wurden auf selektiven LB-Agarplatten (z.B. 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

### **3.1.11 Ligation von DNA**

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten und linearisierter Vektor-DNA erfolgte durch T4-DNA-Ligase.

Abhängig von der Problemstellung, also „Sticky-End“ – bzw. „Blunt-End“-Ligation, der Größe des zu klonierenden Fragmentes und des Vektors wurden unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse von Insert zu Vektor eingesetzt. Bei herkömmlichen Klonierungen wurde ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 4:1 eingesetzt. Bei der Klonierung sehr kleiner Fragmente wurde das Verhältnis auf 10:1 erhöht.

Ein typischer Ligationsansatz umfasste ein Volumen von 20 µl und enthielt etwa 100-200 ng Vektor-DNA, 1 U T4-DNA-Ligase, 2 µl 10fach-Puffer des Enzymherstellers und eine entsprechende Menge Insert-DNA. Die Ligation von „Sticky Ends“ erfolgte mindestens 90 min bei 10-14 °C. „Blunt End“-Ligationen erfolgten über Nacht bei 14-16 °C.

Gute Ergebnisse bei der „Blunt-End“-Ligation wurden auch mit dem Rapid DNA Ligation Kit gemäß den Empfehlungen des Herstellers erhalten.

Die verwendeten Vektoren wurden stets dephosphoryliert eingesetzt.

### **3.1.12 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren**

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte mit dem Random Primed DNA Labeling Kit entsprechend den Herstellerangaben. Die Markierung erfolgte durch  $\alpha$ -d-[<sup>32</sup>P]-CTP.

### 3.1.13 DIG-Markierung von Nukleinsäuren

Die nichtradioaktive Markierung von DNA erfolgte mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit entsprechend den Herstellerangaben. Die Detektion erfolgte mittels DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids.

Strangspezifische RNA-Sonden wurden durch *in vitro* Transkription aus DNA hergestellt. Die *in vitro*-Transkription zur Herstellung markierter RNA-Proben wurde mit Hilfe einer SP6 Polymerase bzw. einer T7 Polymerase unter Verwendung von Digoxigenin-markiertem UTP durchgeführt.

Für die Transkription wurde jeweils 1 µg linearisiertes Plasmid als Matrize eingesetzt und zusammen mit 14 µl Wasser, 2 µl Transkriptionspuffer, 2 µl NTP-Lösung (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM Digoxigenin-markiertem UTP; pH 7.5) und 2 µl der jeweiligen RNA-Polymerase (20 U) für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 200 mM EDTA; pH 8.0 gestoppt. Das RNA-Transkript wurde durch Zugabe von 2.5 µl 4 M LiCl und 75 µl Ethanol gefällt (2 h, 20 °C) und abzentrifugiert (13000 g, 4 °C, 15 min). Die Flüssigkeit wurde entfernt und das Pellet mit 50 µl 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 g, 4 °C, 15 min) wurde die Flüssigkeit entfernt, das Pellet im Vakuum getrocknet und anschließend in 10 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1mM EDTA; pH 8.0) gelöst.

### 3.1.14 Southern-Blotting

Der Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrocellulosemembranen erfolgte nach Sambrock.<sup>305</sup> Das Agarosegel inkubierte zunächst zwanzig Minuten in Denaturierungspuffer und danach zwanzig Minuten in einem Neutralisationspuffer. Der Transfer der DNA auf die Nitrocellulosemembran erfolgte in 20 x SSC über 20 h aufgrund von Kapillarkräften. Das Gel wurde auf zwei mit 20 x SSC getränkten Filterpapieren mit Kontakt zu einem Transferpufferreservoir gelegt. Anschließend wurde das Gel mit einer in 20 x SSC befeuchteten Nitrocellulosemembran und zwei in 20 x SSC getränkten Filterpapieren belegt. Es folgte ein ca. 15 cm hoher Stapel an Saugpapier und ein Gewicht von ca. 1 kg zum beschweren. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran zunächst in 2 x SSC gewaschen und die DNA durch zweistündiges Erhitzen im Vakuum auf 80 °C fixiert.

Denaturierungspuffer	Neutralisationspuffer	20 x SSC
1.5 M NaCl	1.5 M NaCl	3 M NaCl
0.5 M NaOH	0.5 M Tris/HCl; pH 7.5	0.3 M Natriumcitrat/NaOH; pH 7.0

Tabelle 12: Zusammensetzung der Lösungen für den Southern-Blot

### 3.1.15 Northern-Blotting

Der Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nitrocellulosemembranen erfolgte analog 3.1.14. Das Agarosegel wurde zunächst 10 min in Wasser, 15 min in 50 mM NaOH und anschließend 10 min in 10 x SSC inkubiert. Der Transfer erfolgte über 20-30 h in 20 x SSC. Nach erfolgreichem Transfer der RNA wurde die Nitrocellulosemembran 2 min in 10 x SSC gewaschen und anschließend durch zweistündiges Erhitzen im Vakuum auf 80 °C fixiert.

### 3.1.16 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Bei DNA-DNA Hybridisierungen mit homologen, radioaktiv markierten Sonden wurden die Membranen zunächst 4 h in Prähybridisierungslösung inkubiert.

Prähybridisierungslösung	50 x Denhardt's Lösung
5 x SSC	1 % (w/v) Ficoll
0.5 % (w/v) SDS	1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon
5 x Dehnhardt's Lösung	1 % (w/v) BSA
200 µg/ml gescherte Heringssperma-DNA	

**Tabelle 13: Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung und von 50 x Denhardt's Lösung für die DNA-RNA Hybridisierung**

Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung erneuert und hitzedenaturierte (5 min, 95 °C) [<sup>32</sup>P]-markierte DNA-Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 45 °C über Nacht. Nicht gebundene Sonde wurde anschließend durch Waschen mit 5 X SSC, 0.5 % (w/v) SDS entfernt.

Bei RNA-RNA Hybridisierungen inkubierte die Membran zunächst 3 h bei 45 °C in Prähybridisierungslösung. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung erneuert und mit DIG-markierter RNA-Sonde versetzt. Die Hybridisierung erfolgte für ca. 40 h bei 65 °C.

5 x SSC
2 % (w/v) Blocking-Reagenz
100 µg/ml gescherte Heringssperma-DNA
0.1 % (w/v) N-Laurylsarcosin
0.02 % (w/v) SDS
50 % (v/v) Formamid)

**Tabelle 14: Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung für die RNA-RNA Hybridisierung**

Nicht gebundene Sonde wurde anschließend in mehreren Schritten entfernt.

Lösung	Temperatur	Zeit
2 x SSC, 0.1 % (w/v) SDS	RT	10 min
2 x SSC, 0.1 % (w/v) SDS	65 °C	10 min
0.1 x SSC, 0.1 % (w/v) SDS	65 °C	15 min

**Tabelle 15: Waschritte bei der RNA-RNA Hybridisierung**

Die RNA-DNA Hybridisierung erfolgte mit Hilfe des DIG-DNA Labeling Kit. Die Membran inkubierte zunächst 3 h in Prähybridisierungslösung bei 42 °C..

5 x SSC
2 % (w/v) Blocking-Reagenz
0.1 % (w/v) NaCl
0.1 % (w/v) N-Laurylsarcosin
0.02 % (w/v) SDS
50 % (v/v) Formamid)

**Tabelle 16: Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung für die RNA-DNA Hybridisierung**

Danach wurde die Prähybridisierungslösung gewechselt und hitzedenaturierte (5 min, 95 °C) DIG-markierte DNA-Sonde zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte 36 h bei 42 °C. Überschüssige Sonde wurde anschließend in mehreren Waschschrinen entfernt.

Lösung	Temperatur	Zeit
2 x SSC, 0.1 % (w/v) SDS	RT	2 x 5 min
2 x SSC, 0.1 % (w/v) SDS	42 °C	2 x 15 min
1 x SSC, 0.1 % (w/v) SDS	42 °C	10 min
1 x SSC, 0.1 % (w/v) SDS	42 °C	10 min
0.5 x SSC, 0.1 % (w/v) SDS	65 °C	10 min
0.1 x SSC, 0.1 % (w/v) SDS	65 °C	10 min

**Tabelle 17: Waschritte bei der RNA-DNA Hybridisierung**

### 3.1.17 Detektion von hybridisierten Nukleinsäuren

Zur Detektion von [<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Fragmenten wurde die Membran mit „Hybond MP“-Röntgenfilm bei -70 °C inkubiert.

Die Detektion von DIG-markierten Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe des DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids entsprechend den Herstellerangaben.

### 3.1.18 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) wurde in einem Personal-Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die *Taq*- und *Vent*-DNA-Polymerasen wurden mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Die für die Amplifizierung des jeweiligen DNA-Abschnitts geeigneten Primerpaare und deren Hybridisierungstemperatur wurden mit dem Programm PrimerFind 3.0 (Fröbel Labor Geräte, Lindau) berechnet. Die Amplifikationszeit betrug ca. 1 min/1000 bp Produktlänge.

Schritt	Temperatur	Zeit		Beschreibung
1	95 °C	2 min		Denaturierung
2	95 °C	1 min	} 30 Zyklen	Denaturierung
3	40-60 °C	1 min		Annealing
4	72 °C	1min/1000bp		Amplifikation
5	72 °C	5 min		Amplifikation

Tabelle 18: PCR-Programm

	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	<i>Vent</i> -DNA-Polymerase
10 x Polymerasepuffer	10 %	10 %
dNTP's	0.2 mM	0.2 mM
Primer (je)	1.2 µM	1.2 µM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	
MgSO <sub>4</sub>		2 mM
<u>Template-DNA:</u>		
Chromosomale DNA		25-125 ng/50 µl
Plasmid DNA	5-10 ng/50 µl	
DNA-Polymerase	1 U/50 µl	1 U/50 µl

Tabelle 19: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze

Gen/DNA-Bereich	Primerpaar	DNA-Polymerase	Annealing-Temperatur	Template-DNA	Verwendung
<i>inol</i>	AF02/AF03	<i>Vent</i> -	50 °C	chromosomale DNA	3.1.13
<i>inol</i>	AF01/AF04	<i>Taq</i> -	40 °C	FC-AA11	3.1.19
<i>inol</i>	AFoxsense/ AFoxantisense	<i>Taq</i> -	40 °C	FC-AA11	3.1.20

Tabelle 20: Bedingungen der jeweiligen PCR-Reaktion



### **3.1.19 Heterologe Genexpression der MIPS aus *D.discoideum* in *E.coli***

Von der bekannten cDNA-Sequenz wurden spezifische Primer für das 5'-Ende und das 3'-Ende abgeleitet. Im 5'-Primer AF01 wurde über dem vermeintlichen Translationsstartpunkt die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NdeI* eingeführt. Im 3'-Primer AF04 wurde die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SalI* eingeführt. Das amplifizierte 1.6 kb Fragment wurde mit *NdeI* und *SalI* hydrolysiert und in ebenso behandelten Expressionsvektor pET16bp kloniert. In dem entstandenen Plasmid pAF08 wurde das 5'-Ende des Fragments an das 3'-Ende der vektoreigenen Sequenz fusioniert, die für ein Histidin-Hexapeptid kodiert.

*E.coli* BL21(DE3)/pLysS wurde mit gereinigtem Vektor (pAF08) transformiert und eine Kolonie unter Selektionsdruck in LB-Medium bei 180 Upm und 37 °C über Nacht kultiviert. 1 ml dieser Übernachtskultur wurde am nächsten Tag mit 50 ml LB-Medium verdünnt, mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und bis zu einer OD<sub>560</sub> von 0.5 kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Anschließend wurde die Zellkultur für weitere 6-8 h inkubiert. Die Produktion des Zielproteins wurde mittels SDS-Page und Western-Blot überprüft.

### **3.1.20 Heterologe Genexpression der MIPS aus *D.discoideum* in *P.pastoris***

Die Klonierung des Expressionsvektors und die anschließende methanolinduzierte Expression in *P.pastoris* erfolgte mittels Pichia Expression Kit entsprechend den Herstellerangaben. Die Produktion des Zielproteins wurde mittels SDS-Page und Western-Blot überprüft.

Die Primerkonstruktion für das 5'-Ende (AFoxsense) und für das 3'-Ende (AFoxantisense) erfolgte unter Beibehaltung des Startcodons und unter Ausschluss des Stopcodons. Dabei wurden zwei neue Restriktionsschnittstellen generiert um das Gen in korrekter Ausrichtung einzusetzen. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt, mit *EcoRI* und *XbaI* verdaut und mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit in den mit *EcoRI* und *XbaI* linearisierten pPIC6α A kloniert (3.1.11). Die Klonierung erfolgte "in frame" mit der vorliegenden sekretorischen Sequenz und mit dem nachfolgenden (6\*His)-tag. In dem verwendeten Vektor pPIC6α A steht das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle des durch Glucose reprimierbaren und durch Methanol induzierbaren AOX1-Promotors. Eine

N-terminale Erkennungssequenz führt zu einer Sekretion des Proteins in das umgebene Medium. Der C-terminale Histidintag kann zur effizienten Anreicherung des Proteins über metallionenbeladene Chelatsäulen benutzt werden.

Der Ligationsansatz wurde in *E.coli* DH5 $\alpha$  transformiert und auf LB-Agarplatten mit geringerer Salzkonzentration und 50  $\mu\text{g/ml}$  Blasticidin ausgestrichen. Einige Klone wurden gepickt und in LB-Medium vermehrt. Die erfolgreiche Klonierung der cDNA in den Vektor wurde durch PCR mit den obigen Primern bzw. durch einen Verdau des isolierten Plasmids mit *EcoRI* und *XbaI* nachgewiesen.

Nach präparativer Isolierung des Plasmids pAF09 wurde mit *SacI* linearisiert und mittels Elektroporation (Gene Pulser der Firma Bio-Rad, 20 mm Elektrodenabstand, 1  $\mu\text{F}$ , 1 kV, 3 Pulse) in *P.pastoris* transformiert. Die Integration in das *P.pastoris*-Genom erfolgt durch homologe Rekombination in den AOX1-Locus. Die Transformationsansätze wurden auf YPDS-Agarplatten ausplattiert und drei Tage bei 30 °C inkubiert.

	YPDS-Agar	YPD-Medium
Hefeextrakt	10 g	10 g
Sorbitol	182.2 g	
Trypton	20 g	20 g
Agar	20 g	
Wasser	900 ml	900 ml
Autoklavieren bei 120 °C für 16 min		
20 %ige Glucoselösung	100 ml	100 ml
Blasticidin	300 $\mu\text{g/ml}$	300 $\mu\text{g/ml}$

**Tabelle 21: Zusammensetzung von YPDS + Blasticidin Agar und YPD-Medium**

(Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol bzw. Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

Zwei der erhaltenen Klone wurden anschließend in YPD-Medium vermehrt und die erfolgreiche Transformation von pAF09 durch Isolierung der genomischen DNA und PCR mit entsprechenden Primern AFoxsense und AFoxantisense nachgewiesen. Dazu wurden zunächst die Zellwände enzymatisch abgebaut und aus den resultierenden Spheroplasten DNA mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit gemäß Herstellerangaben isoliert.

Die methanolinduzierte Proteinexpression erfolgte nach Herstellerangaben des Pichia Expression Kit. Als Kontrolle diente der Wildtyp X33 und ein mit pPIC6 $\alpha$ A/HSA transformierter Stamm, der in der Lage ist, humanes Serumalbumin zu sekretieren.

Dazu wurden die Klone in BMGY-Medium vermehrt und die Expression durch Umsetzen der Zellen auf methanolhaltiges BMMY-Medium induziert. Dieses Medium ist für die Expression sekretierter Proteine besonders vorteilhaft. Durch den Phosphatpuffer kann der

pH-Wert dem rekombinanten Protein angepasst werden und bleibt während der Expression weitgehend stabil. Der Zusatz von Pepton und Hefeextrakt stabilisiert die rekombinanten Proteine und verringert ihre Proteolyse.

100 ml BMGY-Medium wurden mit Vorkultur (500 µl YPD-Medium + 300 µg/ml Blasticidin, ÜN, 30 °C, 200 Upm) angeimpft, ca. 16 h inkubiert (30 °C, 200 Upm) und durch Zentrifugation geerntet (1500 g, 5 min 4 °C). Die Zellen wurden danach in BMM-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 1 resuspendiert und mit 0.5 % Methanol versetzt. Es wurden alle 24 h Proben entnommen, durch Zentrifugation der Überstand vom Zellpelett getrennt und beides in fl. N<sub>2</sub> eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Entwichenes Methanol wurde täglich ergänzt.

**BMGY: Buffered Glycerol**

Stocklösung:	Volumen (ml):	Endkonzentration:
10 g Hefeextrakt, 20 g Trypton gelöst in 700 ml Wasser		
Autoklavieren bei 120 °C für 20 min		
1 M Kaliumdihydrogenphosphat (pH 6.0)	100	100 mM
13.4 % YNB ( <u>Y</u> east <u>N</u> itro <u>g</u> ene <u>B</u> ase)	100	1.34 %
0.02 % Biotin	2	4·10 <sup>-5</sup> %
10 % Glycerin	100	1 %

**BMM: Buffered Minimal Methanol**

Stocklösung:	Volumen (ml):	Endkonzentration:
Wasser	700	
Autoklavieren bei 120 °C für 20 min		
1 M Kaliumdihydrogenphosphat (pH 6.0)	100	100 mM
13.4 % YNB ( <u>Y</u> east <u>N</u> itro <u>g</u> ene <u>B</u> ase)	100	1.34 %
0.02 % Biotin	2	4·10 <sup>-5</sup> %
10 % Methanol	100	1 %

**Tabelle 22: Zusammensetzung des bei der Proteinexpression verwendeten Medium**

Die Expression des Zielproteins wurde im Überstand durch SDS-PAGE, Western-Blot und Aktivitätstest analysiert. Der immunochemische Nachweis erfolgte mit dem Penta-His-Antikörper (Qiagen) in Kombination mit dem BM Chromogenic Western Blotting Kit.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von *D.discoideum*

In der vorliegenden Arbeit wurde der axenisch wachsende Stamm AX 2 (ATCC: 24397) verwendet. Unter „axenischer“ Kultur versteht man das Wachstum der Zellen in bakterienfreiem Medium.<sup>134</sup> AX2 Zellen werden adhäsiv an hydrophilen und hydrophoben Oberflächen und phagozytieren neben Bakterien hydrophile und hydrophobe Modellpartikel. Die Anzucht erfolgte aus Sporen, die bei  $-20\text{ °C}$  in 17 mM Phosphatpuffer (Sörensen-Puffer), 30 % (v/v) Glycerin; pH 6.5 lagerten. Die Germination erfolgte in Gewebekulturflaschen (50 ml, 25 cm<sup>2</sup> Grundfläche) innerhalb von 2-3 Tagen.

#### 3.2.1.1 Axenische Kultur von *D.discoideum*

Größere Zellmengen wurden entweder in einem synthetischen Nährmedium (leicht modifiziertes FM-Medium) kultiviert<sup>162</sup> oder in einem semi-synthetischen axenischen Medium.<sup>134</sup>

Substanz	Konzentration (g/l)
Kaliumdihydrogenphosphat	0.48
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	0.64
D(+)-Glucose-Monohydrat	15.4
Hefeextrakt	7.15
Fleisch-Pepton	14.3
Dihydrostreptomycin	0.25

**Tabelle 23: Zusammensetzung des semi-synthetischen axenischen Mediums (HL-5 Medium)**

Die Komponenten wurden in der obigen Reihenfolge eingewogen, mit Wasser auf das jeweilige Volumen aufgefüllt und bei  $120\text{ °C}$  für 16 min autoklaviert.

Stocklösung:	
Aminosäurelösung	250 ml/l
Salzlösung	20 ml/l
Spurenelementlösung	0.1 ml/l
NaHCO <sub>3</sub>	16.8 mg/l
D(+)-Glucose (wasserfrei)	10 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	1.14 g/l
Dihydrostreptomycin	50 mg/l
Vitaminlösung	10 ml/l
pH 6.8 eingestellt mit 85 %iger Phosphorsäure	

**Tabelle 24: Zusammensetzung des synthetischen Mediums (FM-Medium)**

Die Komponenten wurden in der obigen Reihenfolge eingewogen, mit Wasser auf das jeweilige Volumen aufgefüllt und bei  $120\text{ °C}$  für 14 autoklaviert.

Aminosäurelösung:		Salzlösung:		Vitaminlösung:	
NaOH	0.4 g/l	NH <sub>4</sub> Cl	2.675 g/l	Biotin	2 mg/l
Arginin	2.9 g/l	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.147g/l	Folsäure	20 mg/l
Asparagin	1.5 g/l	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.35g/l	Cyanocobalamin	0,5mg/l
Cystein	1 g/l	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4.07 g/l	Liponsäure	40 mg/l
Glutamat	2.5 g/l			Riboflavin	50 mg/l
Glycin	4.5 g/l			Thiamin	60 mg/l
Histidin	1.12 g/l			Einstellung auf pH 7 mit 10 M NaOH	
Isoleucin	3 g/l	Spurenelementlösung:			
Leucin	4.5 g/l	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	48.4 g/l		
Lysin	3.6 g/l	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	23 g/l		
Methionin	1.5 g/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.1 g/l		
Phenylalanin	2.5 g/l	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5.1 g/l		
Prolin	4 g/l	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.7 g/l		
Threonin	2.5 g/l	CuCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1.5 g/l		
Tryptophan	1 g/l	Ammonium-	1 g/l		
Valin	3.5 g/l	molybdat	Einstellung auf pH 6.5		

**Tabelle 25: Zusammensetzung der Stocklösungen für das FM-Medium**

Anzucht und Inkubation erfolgten unter Standardbedingungen auf einem Rundschüttler (120 Upm) bei 22.5 °C. Als Kulturgefäße dienten Erlenmeyerkolben (100-1000 ml) oder Fernbachkolben (1200 bzw. 3000 ml). Um eine ausreichende Belüftung zu gewährleisten, wurden Erlenmeyerkolben mit maximal 10 %, Fernbachkolben mit maximal 30 % des Nennvolumens gefüllt.

Die Zellen wurden bei Zelldichten zwischen  $1 \cdot 10^5$  und  $1.5 \cdot 10^7$  Zellen/ml gehalten. Die Verdopplungszeit betrug in der logarithmischen Wachstumsphase ca. 10-12 h.

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4° C. Kleinere Volumina im Bereich von 1-50 ml wurden mit 500 g für 5 min zentrifugiert, größere Volumina über 200 ml mit 2000 g für 15 min. Die geernteten Zellen wurden unter gleichen Zentrifugationsbedingungen mindestens zweimal mit adäquaten Mengen Sörensen-Puffer gewaschen.

### 3.2.1.2 Anzucht von *D.discoideum* auf Agarplatten „Clearing Plates“

Die Klonierung von Transformanten und die Gewinnung von Sporen erfolgte auf SM-Agarplatten.<sup>309</sup> Dazu wurden 200 µl einer dichten *K.aerogenes* bzw. *E.coli* B/r-Suspension und eine adäquate Menge *D.discoideum*-Zellen in Sörensen-Puffer auf SM-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend bei 22.5 °C 2-4 Tage inkubiert. Die Generationszeit von *D.discoideum* betrug hierbei 3-4 Stunden. *D.discoideum*-Kolonien zeigten sich hierbei als klare Fresshöfe („Plaques“) auf dem Bakterienrasen. Eine längere

Inkubation führte zum vollständigen Verzehr der Bakterien und anschließend zum Ausdifferenzieren von *D.discoideum*.

Substanz:	Konzentration :
Bakteriologisches Pepton	1.0 %
Hefeextrakt	0.1 %
D(+)-Glucose-Monohydrat	50 mM
Magnesiumsulfat $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.05 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	16.2 mM
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	5.25 mM
Agar	1 % (w/v)

**Tabelle 26: Zusammensetzung des Standardmedium-Agar (SM-Agar)**

Die Komponenten wurden mit Wasser auf das jeweilige Volumen aufgefüllt und bei 120 °C für 16 min autoklaviert. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 50 °C wurde der Agar in Petrischalen gegossen.

### 3.2.1.3 Anzucht in Suspension mit *E.coli* B/r als Nahrungsquelle

1000 ml KB-Medium<sup>309</sup> wurden mit einer Impföse *E.coli* B/r angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Rundschtüttler (120 Upm) inkubiert ( $\text{OD}_{420}$  ca. 5-8).

Substanz	Konzentration [g/l]
Bacto-Trypton	10
Hefeextrakt	5
Natriumchlorid	10
D(+)-Glucose-Monohydrat	10

**Tabelle 27: Zusammensetzung des KB-Mediums**

Das Medium wurde 16 min bei 120 °C autoklaviert.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5000 g, 4 °C 10 min) und zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen. Zur Anzucht von *D.discoideum* wurden  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml in Gegenwart von *E.coli* B/r ( $1 \cdot 10^{10}$  Zellen/ml) in Sörensen-Puffer resuspendiert und bei 22.5 °C auf einem Rundschtüttler (120 Upm) inkubiert. Die Verdopplungszeit betrug ca. 3 h. Die maximal erhaltliche Zelldichte lag bei ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation (4 °C, 500 g, 10 min). Um restliche Bakterien zu entfernen wurde viermal mit einer adäquaten Menge Sörensen-Puffer gewaschen.

### 3.2.1.4 Anzucht in Suspension mit *K.aerogenes* als Nahrungsquelle

Die Anzucht von *D.discoideum* auf *K.aerogenes* erfolgte analog zu 3.2.1.3 in für *K.aerogenes* geeignetem Medium.

Substanz	Konzentration [g/l]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.9
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.25
Glucose	5
Hefeextrakt	0.5
Pepton	5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5

**Tabelle 28: Flüssigmedium für *K.aerogenes*<sup>310</sup>**

Das Medium wurde 16 min bei 120 °C autoklaviert

### 3.2.1.5 Anzucht von *D.discoideum* in submersen Standkulturen

Zur längeren Haltung der Zellen und zur besseren mikroskopischen Betrachtung wurden die Zellen in submersen Standkulturen gehalten (50 ml Gewebekulturflaschen, 25 cm<sup>2</sup> Grundfläche). Nach Erreichen eines geschlossenen Monolayers wurde die Kulturflasche geschüttelt (120 Upm, 22 °C, 16 h) und die Zellsuspension verdünnt.

Als Medium wurde sowohl vollsynthetisches FM-Medium<sup>162</sup> als auch semi-synthetisches axenisches Medium<sup>134</sup> verwendet.

### 3.2.1.6 Inkubation auf Wasseragarplatten

Die Differenzierungsstudien und die Gewinnung von Sporen erfolgte auf Wasseragarplatten. Dazu wurde 2-5·10<sup>8</sup> *D.discoideum*-Zellen in Sörensen-Puffer auf Wasseragarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend bei 22.5 °C inkubiert. Eine längere Inkubation führte zum vollständigen Ausdifferenzieren von *D.discoideum*.

Substanz	Konzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14.67 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.83 mM
Agar	15 g/L

**Tabelle 29: Zusammensetzung des Wasseragars**

Der Agar wurde für 30 min bei 120 °C autoklaviert. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 50 °C wurde der Agar in Petrischalen gegossen.

### 3.2.2 Chemische Mutagenese

Die Vorgehensweise lehnte sich stark an der Prozedur von Loomis an.<sup>311</sup> Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden geerntet (4 °C, 300 g, 5 min), zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen und danach mit Sörensen-Puffer auf eine Zelldichte von  $1 \cdot 10^8$  Zellen/ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 50 µl einer wässrigen N'-Methyl N'-Nitro N-Nitrosoguanidinlösung (10 mg/ml) versetzt und 30 min (120 Upm) bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Mutagenese wurde danach durch Zentrifugation (4 °C, 300 g, 5 min) und Resuspendierung in 10 ml frisches Medium beendet. Nach einer Erholungsphase von 1 h (120 Upm, 22.5 °C) wurden die Zellen erneut zentrifugiert (4 °C, 300 g, 5 min) und in 100 ml FM-Medium aufgenommen.

Zur Selektionierung auf inositol-auxotrophe Mutanten wurde nach einer Erholungsphase von ca. 12 h (nach diesem Zeitraum sollte das endogene *myo*-Inositol von potentiellen inositol-auxotrophen Mutanten verbraucht sein) die Zellsuspension mit einer wässrigen Lösung des Thymidin-Basenanalogs 5-Bromdesoxyuridin auf eine Konzentration von 150 µg/ml versetzt und 24 h inkubiert (120 Upm, 22.5 °C). In diesem Zeitraum wird 5-Bromdesoxyuridin nur in den wachsenden – nicht inositol-auxotrophen Zellen - anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA eingebaut.

Die Zellen wurden anschließend geerntet (4 °C, 300 g, 5 min), zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen und in 4 ml Sörensen-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 25 ml Kulturflasche überführt, auf Eis gekühlt und 1 h mit einer UV-Lampe (15 W, 5 cm Abstand) bestrahlt. Durch diese Photolyse wird die durch 5-Bromdesoxyuridin substituierte DNA degradiert.

Danach wurden die Zellen geerntet (4 °C, 300 g, 5 min) und in 4 ml Sörensen-Puffer resuspendiert. Aliquots der Zellsuspension wurden anschließen mit *E.coli* B/r auf SM-Agarplatten (enthielten 10 mM *myo*-Inositol) ausplattiert. Die nach 4-5 Tagen sichtbaren Klone wurden danach mit *E.coli* B/r auf SM-Agarplatten (ohne bzw. mit 10 mM *myo*-Inositol) ausplattiert und auf ihre Inositol-Auxotrophie getestet.

### 3.2.3 Synchroner Differenzierung

Mit diesem Experiment wurde der entwicklungsabhängige Verlauf der intrazellulären Konzentration der Diphosphoinositolphosphate in den inositol-auxotrophen Mutanten untersucht.



Um eine synchrone Differenzierung bei *D.discoideum* zu erreichen ist es notwendig, die Migrationsphase der Pseudoplasmodien zu minimieren.<sup>310</sup> Dieses wurde durch eine hohe Phosphatkonzentration im Agar (in der Originalliteratur feuchtes Filterpapier)<sup>312</sup> erreicht.

Der Einfluss von exogenem *myo*-Inositol wurde durch 6stündige Inkubation der Zellen auf inositolfreiem FM-Medium minimiert. Zu diesem Zeitpunkt ist ein Großteil des internalisierten *myo*-Inositols über Exozytose entfernt, jedoch zeigen die Zellen noch keinen Inositolmangel. Danach wurden  $2 \cdot 10^8$  Zellen auf phosphatgepufferten Wasseragarplatten (40 mM Phosphat, pH 6.5) ausplattiert und bei 22.5 °C inkubiert. Durch dieses Verfahren wurde den Zellen schnell die Nahrungsquelle entzogen, so dass sich die Reaktion auf den Hungerzustand gut verfolgen lässt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit eiskaltem Sörensen-Puffer von der Agarplatte abgewaschen, durch Zentrifugation (500 g, 4 °C, 5 min) geerntet und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren.

### 3.2.4 Synchrone Sporengermination

Um den Verlauf der Diphosphoinositolphosphat- bzw. *myo*-Inositolkonzentration während der Sporengermination zu untersuchen, ist eine möglichst synchrone Germination notwendig.

Dazu wurde zunächst der Germinationsinhibitor, der sich in der Sporenhülle befindet, durch dreimaliges Waschen mit Sörensen-Puffer entfernt. Anschließend wurden die Sporen mit einem aus stationären *K.aerogenes* isolierten Sporengerminationsfaktor behandelt. Hierbei handelt es sich um ein niedermolekulares Stoffwechselprodukt, das sich im Überstand einer stationären *K.aerogenes* Kultur anreichert. Dazu wurde *K.aerogenes* in 400 ml Medium (siehe 3.2.1.4) über 60 h kultiviert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation und Filtration (0.22 µm Filter, Millipore) vom Medium abgetrennt.

Nun wurden die Sporen in dem konditionierten Medium resuspendiert und 30 min inkubiert. Eine anschließende Überführung in Sörensen-Puffer führte zu einer raschen und synchronen Germination innerhalb von 2 h. Die frisch germinierten Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren.

### 3.2.5 Aufschluss von Sporen

Zum Aufschluss wurde das geerntete Sporenmaterial in einem Achatmörser mit flüssigem Stickstoff eingefroren und durch mehrmaliges Verreiben aufgeschlossen.

### 3.2.6 Bestimmung der Zelldichte und der Zellgrößenverteilung

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und für 15 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe eines Schüttlers (Vortex) schonend resuspendiert. Die Bestimmung der Zelldichte und der Zellgrößenverteilung erfolgte zu Beginn der vorliegenden Arbeit mit einem Partikelzählgerät (Coulter<sup>®</sup> Counter Modell BI, Coulter Electronics GmbH, Krefeld), welches zur Bestimmung der Größenverteilung mit einem Volumenanalysator (Channelyzer Modell C<sub>256</sub>, Coulter Electronics GmbH, Krefeld) ausgestattet war. Später erfolgte die Analyse über ein Partikelzählgerät (Coulter<sup>®</sup> Counter Modell Z2, Coulter Electronics GmbH, Krefeld) mit nachgeschalteter elektronischer Datenauswertung (Coulter<sup>®</sup> Z2 AccuComp<sup>®</sup> Vers. 3.01a).

### 3.2.7 Transformation von *D.discoideum*

Eine effiziente Transformationsmethode für *D.discoideum* ist die Elektroporation. Pro Transformationsansatz wurden  $1 \cdot 10^8$  Zellen geerntet (1000 g, 4 °C, 5 min), zweimal mit eiskaltem Elektroporationspuffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 21 mM Hepes, 5 mM Glucose; pH 7.1) gewaschen und in 1 ml eiskaltem Elektroporationspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine 0.4 cm Elektroporationsküvette überführt, mit ca. 50 µg DNA versetzt und für 10 min auf Eis belassen. Die anschließende Elektroporation erfolgte in einem Bio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit 1250 V und 25 µF (Time const. 0.4-0.6 ms).

Der Transformationsansatz wurde in eine Petrischale (8 cm Durchmesser) überführt, mit 10 ml axenischem Medium (inklusive 500 µM *myo*-Inositol) versetzt und 24 h bei 22.5 °C inkubiert. Danach erfolgte die Selektion der Transformanten durch Zugabe von 10 µg/ml Blasticidin-S bzw. Gentamycin. Im Abstand von jeweils 2 Tagen erfolgte ein vorsichtiger Austausch des Mediums. Die nach ca. 10 Tagen sichtbaren Klone wurden isoliert und auf ihre Inositol-Auxotrophie getestet.

### 3.2.8 Aufbewahrung von *D.discoideum*

Die langfristige Lagerung von *D.discoideum* erfolgte in Glycerinkultur. Dazu wurden axenisch wachsende Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet (500 g, 4 °C, 5 min), zweimal mit einer adäquaten Menge Sörensen-Puffer gewaschen und auf eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^8$  Zellen/ml resuspendiert. 1 ml der Zellsuspension wurde danach auf Wasseragarplatten (8 cm Durchmesser) mit der Pipette ausgestrichen, leicht angetrocknet und bei 22.5 °C inkubiert. Nach abgeschlossener Differenzierung wurden die Sporen durch

Abschlagen geerntet und in 1 ml einer sterilfiltrierten 30 %igen Glycerinlösung in Sörensen-Puffer resuspendiert. Die Aliquots wurden bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren und waren unter diesen Bedingungen ohne Vitalitätsverlust mindestens vier Jahre haltbar.

### 3.2.9 Phagozytose

#### 3.2.9.1 Phagozytostest mit Latexpartikeln

Der Phagozytostest erfolgte mit Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase. Die Zellen wurden geerntet, (500 g,  $4\text{ °C}$ , 10 min), dreimal mit Sörensen-Puffer gewaschen und auf eine Zelldichte von  $2\cdot 5\cdot 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen wurden 30 min vorinkubiert ( $22\text{ °C}$ , 120 Upm) und anschließend carboxylierte Latexpartikel zugesetzt, so dass sich eine Relation von rund 500 Partikeln pro Zelle ergab.

Zu definierten Zeitpunkten wurden die Phagozytose gestoppt, indem je 1 ml Zellsuspension in ein Reagenzglas mit 5 ml eiskaltem Sörensen-Puffer pipettiert wurde.

Um nicht internalisierte, an der Oberfläche der Zellen adsorbierte Partikel zu entfernen wurde die Zellsuspension anschließend durch 10 ml 20 %ige PEG-6000-Lösung zentrifugiert ( $4\text{ °C}$ , 10 min, 2000 g). Das Zellpellet wurde zweimal mit eiskaltem Sörensen-Puffer gewaschen (1000 g,  $4\text{ °C}$ , 5 min) und in 2 ml 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 9.3) resuspendiert.

Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen durch Zusatz von 20  $\mu\text{l}$  10 %igen (w/v) Triton X-100 lysiert. Die Proben wurden gründlich für die Bestimmung der optischen Dichte bei 570 nm durchmischt.

Um die Anzahl internalisierter Partikel zu quantifizieren wurden für definierte Partikelkonzentrationen die optische Dichte gemessen und die entsprechende Kalibrierfunktion ermittelt.

#### 3.2.9.2 Phagozytostest mit FITC-markierten Bakterien

Als Substrat dienten hier fluoreszenzmarkierte Bakterien des Stammes *E.coli* B/r. Diese wurden in KB-Medium gezüchtet und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (5000 g,  $4\text{ °C}$ , 10 min), zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen und anschließend in 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 9.2) auf eine  $\text{OD}_{420}$  von ca. 20 resuspendiert. Nach Zugabe von 0.1 mg/ml Fluoresceinisothiocyanat wurde für 3 h bei  $37\text{ °C}$  inkubiert. Die Bakterien wurden erneut geerntet (5000 g,  $4\text{ °C}$ , 10 min) und mit 17 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 6.0) fluoreszenzfrei gewaschen. Die FITC-markierten Bakterien waren ca. 14 Tage bei  $0\text{ °C}$  haltbar.

*D.discoideum* wurde in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, (500 g,  $4\text{ °C}$ , 10 min), dreimal mit Sörensen-Puffer gewaschen und auf eine Zelldichte von  $2\cdot 5\cdot 10^6$  Zellen/ml

resuspendiert. Nach einer dreißigminütigen Vorinkubation (22.5 °C, 120 Upm) erfolgte die Zugabe an fluoreszenzmarkierten Bakterien, so dass sich eine Relation von rund 500 Bakterien pro Zelle ergab.

Zu definierten Zeitpunkten wurden die Phagozytose gestoppt, indem je 1 ml Zellsuspension in ein Reagenzglas mit 5 ml eiskaltem Sörensen-Puffer pipettiert wurde.

Um nicht internalisierte, an der Oberfläche der Zellen adsorbierte Bakterien zu entfernen erfolgte anschließend eine Zentrifugation der Zellsuspension durch 10 ml 20 %ige PEG-6000-Lösung (4 °C, 10 min, 2000 g). Das Zellpellet wurde dreimal mit eiskaltem Sörensen-Puffer gewaschen (1000 g, 4 °C, 5 min) und in 2 ml 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9.3) resuspendiert. Nach erfolgter Lyse der Zellen durch Zugabe von 20 µl 10 %igen (w/v) Triton X-100 wurde die Proben auf Raumtemperatur gebracht und anschließend die Fluoreszenz der Proben bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen (Spectrofluorimeter RF-510, Shimadzu).

Die Bestimmung der pro Amöbe phagozytierten Bakterienanzahl erfolgte durch Vergleich mit einer Kalibrierkurve. Dazu wurde von einer Bakteriensuspension zunächst die Bakterienkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer und nach anschließender Lyse die dazugehörige Fluoreszenz ermittelt.

### **3.2.10 Pinozytose<sup>313</sup>**

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet (500 g, 4 °C, 5 min), zweimal mit eiskaltem Sörensen-Puffer gewaschen und mit Sörensen-Puffer auf eine Zelldichte zwischen  $2\text{-}5 \cdot 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Vor Beginn der Messung wurden die Zellen 30 min vorinkubiert (22.5 °C, 120 Upm).

Als Indikator zur Erfassung pinozytierter Volumina diente fluoreszenzmarkiertes Dextran (FITC-Dextran), das in einer Konzentration von 2 mg/ml den Zellen zugesetzt wurde. Als Stocklösung diente eine Lösung von 100 mg/ml FITC-Dextran in Sörensen-Puffer.

Die Zellsuspensionen wurden auf einem Rundschtüttler inkubiert (22.5 °C, 120 Upm). Um den Verlauf der Pinozytose zu verfolgen, wurden zu definierten Zeitpunkten 1 ml Zellsuspension entnommen und mit eiskaltem Sörensen-Puffer 1:5 verdünnt. Die Proben wurden zentrifugiert (1000 g, 4 °C, 5 min) und dreimal mit eiskaltem Sörensen-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet in 2 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9.5) resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die restlichen Zellen durch Zugabe von 20 µl 10 %igen (w/v) Triton X-100 und kräftiges Schütteln (Vortex) lysiert. Zur Vermeidung von Streueffekten erfolgte eine erneute Zentrifugation (5000 g, 4 °C, 5 min).

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte analog zur Phagozytose (3.2.9.2). Die Quantifizierung der pinozytisch aufgenommenen Flüssigkeitsmengen geschah durch Vergleich mit einer Kalibriergerade.

### **3.2.11 Exozytose**

Zur Bestimmung der Exozytose wurden 15 ml der mit FITC-Dextran für 2 h inkubierten Zellen abzentrifugiert (1000 g, 4 °C, 5 min), dreimal mit Sörensen-Puffer gewaschen und in 15 ml Sörensen-Puffer erneut aufgenommen. Während der anschließenden Inkubation (120 Upm, 22 °C) wurden zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen. Die weitere Probenbehandlung erfolgte analog 3.2.10.

### **3.2.12 Adhäsionstest**

Für den Adhäsionstest wurden axenisch wachsende Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Die Zellen wurden geerntet (500 g, 4 °C, 5 min), zweimal mit eiskaltem Sörensen-Puffer gewaschen und mit FM-Medium auf eine Zelldichte von  $1.5 \cdot 10^6$  Zellen/ml resuspendiert.

4 ml der Zellsuspension wurden in eine 50 ml Gewebekulturflasche überführt und die Zellen zunächst für ca. 10 min auf einem Rundschtüttler (120 Upm, 22.5 °C) geschüttelt, anschließend 30 min ohne Schütteln inkubiert und danach erneut für 5 min (120 Upm, 22.5 °C) geschüttelt.

Durch Bestimmung der Zelldichte vor Überführung in die Gewebekulturflaschen, sowie nach Abschluss der Inkubation im Überstand, konnte der prozentuale Anteil adhäsiver Zellen bestimmt werden.

### **3.2.13 Aggregationstest**

Um das Aggregationsverhalten zu beobachten wurden axenisch wachsende Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Die Zellen wurden geerntet (500 g, 4 °C, 5 min), zweimal mit eiskaltem Sörensen-Puffer gewaschen und mit Sörensen-Puffer auf eine Zelldichte von ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml resuspendiert.

Die Zellen wurden auf einen Rundschtüttler inkubiert (80 Upm, 22.5 °C). Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Partikelzahl bestimmt. Die Aggregation wurde als prozentuale Partikelzahl bezogen auf die Ausgangspartikelzahl ausgedrückt.

### **3.2.14 Zellkernfärbung**

Die Anzahl von Kernen pro Zelle wurde durch Anfärbung der DNA mit Bisbenzimid mikroskopisch bestimmt. Dazu wurden ca.  $1 \cdot 10^6$  Zellen geerntet (500 g, 5 min, 4 °C), zweimal mit eiskaltem Sörensen-Puffer gewaschen und durch Zugabe von Methanol/Essigsäure (3:1 v/v) fixiert. Nach 15 min wurden die Zellen zentrifugiert (500 g, 5 min, 4 °C) und mit Hoechst-Puffer (50 mM Kaliumphosphat; pH 7.7, 200 mM NaCl, 20 mM EDTA) gewaschen. Die Zellen wurden in Hoechst-Puffer resuspendiert und mit 1 µg/ml Bisbenzimid (Hoechst Farbstoff 33258) versetzt. Die Zellproben wurden 15 min inkubiert, zweimal mit Hoechst-Puffer gewaschen (500 g, 5 min, 4 °C) und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BH-2 470/520 nm) betrachtet.

### **3.2.15 Chemotaxis**

#### **3.2.15.1 Folsäurechemotaxis<sup>314</sup>**

Zur Bestimmung der Folsäurechemotaxis wurden exponentiell wachsende Zellen aus einer axenischen Kultur verwendet. Die Zellen wurden geerntet (500 g, 4 °C, 5 min), zweimal mit eiskaltem Sörensen-Puffer gewaschen und mit Sörensen-Puffer auf eine Zelldichte von ca.  $2.5 \cdot 10^8$  Zellen/ml resuspendiert.

Am Tage des Experiments wurden Chemotaxisagar (1 % Agar, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> in Sörensen-Puffer) vorsichtig in der Mikrowelle geschmolzen und 20 ml in eine 10 cm Petrischale gefüllt. Nach Abkühlung wurde mit dem stumpfen Ende einer Pasteurpipette ein Loch von ca. 6 mm ausgestanzt und eventuell vorhandene Flüssigkeit aus dem Loch entfernt. Das ausgestanzte Loch wurde mit Folsäure gefüllt und im Abstand von ca. 5 mm zum Rand des ausgestanzten Lochs 1 µl Zellsuspension aufgetragen. Die Folsäure bildet durch Diffusion einen Konzentrationsgradienten, auf den die Zellen zuwandern. Nach ca. 3-5 h konnten die Platten ausgewertet werden.

#### **3.2.15.2 cAMP-Chemotaxis**

Um die Chemotaxis auf cAMP zu beobachten wurde exponentiell wachsende Zellen aus einer axenischen Kultur verwendet. Die Zellen wurden geerntet (500 g, 4 °C, 5 min), zweimal mit eiskaltem Sörensen-Puffer gewaschen und mit Sörensen-Puffer auf eine Zelldichte von ca.  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach 6-8 h inkubiert (22.5 °C, 120 Upm), geerntet und auf  $2.5 \cdot 10^8$  Zellen/ml in Sörensen-Puffer resuspendiert.

Die Vorbereitung der Agarplatten geschah analog zu 3.2.15.1, jedoch wurden die ausgestanzten Löcher mit cAMP (0, 10, 50 und 250 µM) gefüllt. Nach ca. 3-4 h konnten die Platten ausgewertet werden.

### 3.2.16 Bestimmung des zellulären F-Aktinhalts

#### 3.2.16.1 Präparation der Färbelösung

Kommerziell erhältliches, mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat konjugiertes Phalloidin (TRITC-Phalloidin) wurde in Methanol gelöst (100 µg/ml) und in Aliquoten von 100 µl jeweils in Kryogefäße überführt. Das Methanol wurde über Nacht im Dunkeln abgedampft. Die getrockneten Portionen sind bei -20 °C haltbar.

Zur Anwendung wurden 10 µg TRITC-Phalloidin in 5 µl Methanol gelöst und 300 µl Färbepuffer zugesetzt.

#### 3.2.16.2 Quantifizierung

Zur Ermittlung des zellulären F-Aktinhalts wurden exponentiell wachsende Zellen aus einer axenischen Kultur verwendet. 10 ml Zellsuspension ( $5 \cdot 10^7$  Zellen) wurden direkt mit 50 ml eiskaltem Lysispuffer versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Der tritonunlösliche Rückstand wurde abzentrifugiert (1500 g, 20 min, 4 °C) und das Pellet anschließend in 70 µl Färbepuffer resuspendiert. Zur Anfärbung des F-Aktins wurde die Suspension über Nacht bei 4 °C inkubiert.

<b>Lysispuffer</b>	<b>Färbepuffer</b>
40 mM Tris/HCl; pH 7.5	20 mM Tris/HCl; pH 7.2
90 mM KCl	60 mM KCl
6 mM MgCl <sub>2</sub>	5 mM MgCl <sub>2</sub>
60 mM Saccharose	50 mM Saccharose
0.3 % (v/v) Triton X-100 (hydrogenisiert)	25 µM TRITC-Phalloidin
0.1 mM PMSF (kurz vor der Lysis aus einer 100 mM Stocklösung in DMSO zugesetzt)	

**Tabelle 30: Zusammensetzung der Puffer für die quantitative Aktinbestimmung**

Nach erneuter Zentrifugation (1500 g, 20 min, 4 °C) wurde das gefärbte Pellet zweimal mit Triton X-100 haltigem Färbepuffer (0.25 % (v/v)) ohne TRITC-Phalloidin gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und das rosa Pellet in 1 ml Methanol aufgenommen. Man ließ die Proben zur Extraktion des TRITC-Phalloidins über Nacht bei 4 °C inkubieren, zentrifugierte die Proben (1500 g, 20 min, 4 °C) und bestimmte die Fluoreszenz des Überstands mit einem Fluoreszenzspektrometer (Modell Spectrofluorimeter RF-510, Shimadzu; em.: 550 nm; ex.: 580 nm).

Anhand einer aufgenommenen Kalibriergeraden kann der Gehalt an gebundenem TRITC-Phalloidin bestimmt werden. Über das stöchiometrische Bindungsverhältnis von F-Aktin und TRITC-Phalloidin und anschließender Normierung auf die Anzahl der Zellen ergibt sich der zelluläre F-Aktin Gehalt.

### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 Bestimmung der Enzymaktivität durch High Performance Anionenaustauscher-Chromatographie (HPAEC)

20  $\mu$ l Probe wurde mit 80  $\mu$ l Assaypuffer (62.5 mM MOPS, 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 6.25 mM Glucose 6-phosphat, 1 mM  $\text{NAD}^+$ ; pH 8.0) versetzt bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die enzymatische Reaktion durch Erhitzen auf 95 °C für 2 min abgebrochen. Als Negativkontrolle wurden 20  $\mu$ l der Probe mit 80  $\mu$ l Assaypuffer versetzt, sofort 2 min auf 95 °C erhitzt und anschließend analog zu den Proben weiterbehandelt. Präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugation entfernt (3 min, 13000 g, 20 °C).

Die anschließende Dephosphorylierung erfolgte durch Zusatz von 5  $\mu$ l Reaktionspuffer (80 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM MOPS; pH 8.0), 3  $\mu$ l alkalischer Phosphatase (1.4 U/ $\mu$ l), 5  $\mu$ l 1 M NaOH und Inkubation von 1 h bei 37 °C. Es wurde wieder für 2 min auf 95 °C erhitzt und das präzipitierte Protein abzentrifugiert (3 min, 13000 g, 20 °C). Die Proben wurden danach mit Wasser 1:25 verdünnt. Davon wurden 100  $\mu$ l für die HPAEC-Analyse verwendet.

Die routinemäßige Trennung des *myo*-Inositols erfolgte durch High Performance Anionenaustauscher-Chromatographie (HPAEC) an einer CarboPac MA1-Säule (4 x 250 mm) mit CarboPac MA1-Vorsäule (4 x 30 mm).

Die Detektion erfolgte durch integrierte gepulste Amperometrie (IPAD). Zum Einsatz kam ein elektrochemischer Detektor (ED 50, Dionex) mit PAD-Zelle (Arbeitselektrode Gold, Referenzelektrode Ag/AgCl). Der schematische Aufbau der HPLC ist in Abbildung 11 wiedergegeben. Die Säulen wurden auf 30 °C temperiert. Folgende Pulssequenz wurde verwendet:

Zeit [s]	Potential [V]	Integration
0	0.05	
0.2	0.05	Start
0.4	0.05	Ende
0.41	0.75	
0.6	0.75	
0.61	-0.15	
1	-0.15	



Die Elution erfolgte mit 0.4 ml/min. Der Gradient, bestehend aus Wasser (Lsg. A) und 1 M NaOH (Lsg. B) hatte folgenden Verlauf:

Zeit [min]	A [%]	B[%]
0	100	0
10	75	25
12	48	52
43	48	52
43.1	100	0
51	100	0

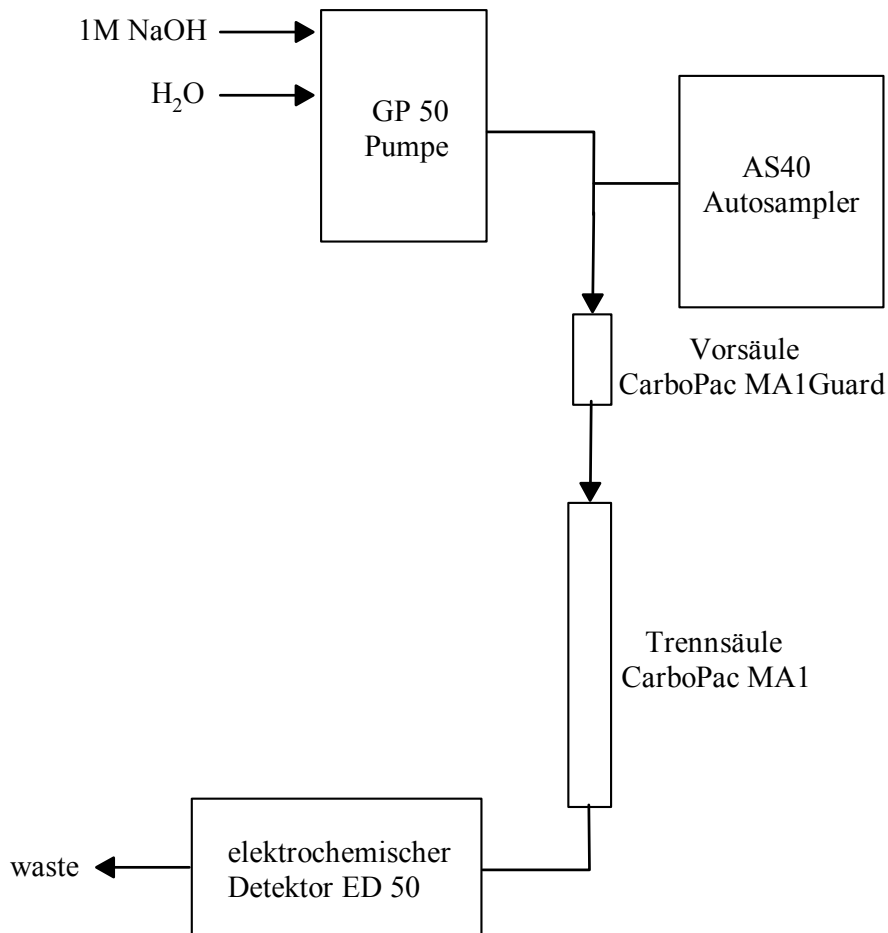


Abbildung 11: Schematischer Aufbau der HPLC zur Bestimmung der MIPS-Aktivität

### 3.3.2 Bestimmung der Enzymaktivität durch GCMS

Der Aktivitätstest und die anschließende Dephosphorylierung erfolgten analog zu 3.3.1. Die Dephosphorylierung wurden durch fünfminütiges Erhitzen der Proben auf 95 °C gestoppt und eventuell präzipitiertes Protein durch Zentrifugation entfernt (5 min, 4 °C, 13000 g). Die

Proben wurden mit Wasser auf 2 ml verdünnt, über Amberlite MB-3 entsalzt und lyophilisiert.

100-500 nmol des potentiell entstandenen *myo*-Inositols wurden mit 90 µl N,O-Bis-(Trimethylsilyl)-acetamid und 10 µl Trimethylchlorsilan versetzt und 40 Minuten bei 70 °C derivatisiert. 1 µl der Lösung wurde für die GC-MS-Analyse verwendet.

Zur Identifikation des entstandenen *myo*-Inositols diente ein mit Massendetektor ausgestatteter Gaschromatograph (25 m Ultra-1 Säule, Trägergas He mit 1.24 bar).

Temperaturprogramm:

Temperatur [°C]	Haltezeit [min]	Aufheizrate [°C/min]
60	1.0	50
100	0	7.0
250	0	

### 3.3.3 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Proben wurde im Bereich von 0.15-1.5 mg/ml mit einem kommerziell erhältlichen BIO-RAD D<sub>c</sub>-Proteinassay bestimmt. Der Test baut auf die Methode nach Lowry auf.<sup>315</sup>

Im Bereich von 2 µg/ml bis 20 µg/ml wurde ein auf der BCA-Methode<sup>316,317</sup> basierender Pierce Micro-BCA-assay verwendet. Als Kalibrierstandard diente in beiden Fällen Rinderserumalbumin.

### 3.3.4 Poyacrylamid-Gelelektrophorese PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte analog der von Lämmler beschriebenen Methode.<sup>318</sup> Als Apparatur diente die Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Es wurden entweder Trenngele mit einem Acrylamiddichte-Gradienten von 5-15 % oder 10 %ige Gele verwendet.

Die aufzutrennenden Proben wurden mit 5 x SDS-Probenauftragungspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. In der Regel wurden 5-25 µg Protein in jede Probentasche gegeben (je nach Färbemethode). Angefärbt wurde entweder durch Coomassie Brilliant Blue oder mit Hilfe der empfindlicheren Silberfärbung. Als Protein-Marker diente ein Marker im Bereich 97.4-14.4 kDa. Die Durchführung der nativen PAGE erfolgte ohne Zusatz von SDS im Gel und im Laufpuffer.

### 3.3.4.1 Coomassie-Färbung

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 0.5-1 µg Protein/ 0.5 cm Bande.

Arbeitsschritt:	Lösungen:	Dauer
Färbung	0.1 % Coomassie, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure	60 min
Entfärbung	45 % Methanol, 10 % Essigsäure	40 min
	10 % Methanol, 7.5 % Essigsäure	60 min
	5 % Methanol, 7 % Essigsäure	60 min
Aufbewahrung	Wasser	

### 3.3.4.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung weist gegenüber der Coomassie-Färbung eine bis zu hundertfach erhöhte Empfindlichkeit auf. Die Empfindlichkeit beträgt ca. 5-30 ng/ 0.5 cm Bande.

Arbeitsschritt:	Lösungen:	Dauer:
Fixierung	50 % Ethanol 10 % Essigsäure	30 min
Vorbehandlung	5 % Ethanol 1 % Essigsäure	15 min
Waschen	Wasser	3·5 min
Inkubation	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0.2 g/L	
Färben	AgNO <sub>3</sub> 0.2 g/100 ml HCHO (37 %) 75 µl/100 ml	25 min
Waschen	Wasser	2·1 min
Entwicklung	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0.4 mg/100 ml	ca. 5 min
	HCHO (37 %) 75 µl/100 ml	
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 6 g/100 ml	
Abstoppen	6 % Essigsäure	30 min
Aufbewahrung	Wasser	

### 3.3.5 Immobilisierung von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)

Nach analytischer SDS-PAGE wurden Proteine auf PVDF-Membranen (Immobilon-P) übertragen (Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Die Membran wurde zur Erhöhung der Bindungskapazität 10 min in Methanol äquilibriert. Der Transfer erfolgte über Nacht bei konstanter Stromstärke von 350 mA und 100 V in 10 mM CAPS/Na<sup>+</sup>, 10 % Methanol; pH 11. Die Kontrolle des Transfers erfolgte über vorgefärbte Standardproteine (Prestained SDS-Standard, high range, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

### 3.3.6 Immunologischer Nachweis immobilisierter MIPS

Der immunologische Nachweis der immobilisierten MIPS erfolgte mit Hilfe des BM Chromogenic Western Blotting Kit (AP, Mouse/Rabbit). Als Primärantikörper diente ein polyklonaler Antikörper gegen die MIPS aus *E.histolytica* (Prof. A.N. Lahiri Majumder, Bose Institute Calcutta).

### 3.3.7 Enzymanreicherung

#### 3.3.7.1 Zellaufschluss und Herstellung eines cytosolischen Extrakts

Für die Proteinanreicherung wurden auf FM-Medium kultivierte Zellen eingesetzt und bei einer Zelldichte von ca.  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml geerntet (1500 g, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden einmal mit 20 mM Mes/Na<sup>+</sup> pH 6.8 gewaschen, erneut zentrifugiert und das Pellet mit eisgekühltem Lysispuffer (50 mM MOPS/Na<sup>+</sup>, 1 mM PMSF; pH 7.5) auf eine Zelldichte von  $1.0 \cdot 10^8$  Zellen/ml verdünnt. Der Aufschluss erfolgte durch mehrmalige Passage der Zellsuspension durch 8 µm bzw. 5 µm Nucleopore-Filter (Millipore). Der Zellaufschluss wurde mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation entfernt (140000 g, 45 min, 4 °C). Das Überstand wurde für die Säulenchromatographie an Q-Sepharose eingesetzt.

#### 3.3.7.2 Anionenaustauscher-Chromatographie an Q-Sepharose

Der cytosolische Extrakt wurde zunächst mit Lysispuffer (50 mM MOPS/Na<sup>+</sup>, 1 mM PMSF; pH 7.5) auf das fünffache des Volumens verdünnt und über eine peristaltischen Pumpe (P1, Pharmacia) mit einer Flussrate von 3 ml/min direkt auf eine mit Lysispuffer (50 mM MOPS/Na<sup>+</sup>, 1 mM PMSF; pH 7.5) äquilibrierte Q-Sepharose ff Säule (Säulenvolumina 15 ml, Kapazität ca.1800 mg Protein) aufgetragen. Die Proteindetektion erfolgte durch ein UV-Photometer mit Durchflussküvette (Uvicord SII, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) bei 280 nm.

Die Elution erfolgte stufenweise durch 50 mM MOPS/Na<sup>+</sup>; pH 7.5 mit definierten NaCl-Konzentrationen. Die Flussrate betrug 3 ml/min. Die Fraktion mit der höchsten Aktivität wurde direkt für die weitere Aufreinigung an Hydroxylapatit eingesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C.

Die Q-Sepharose wurde nach Benutzung mit dem fünffachen Säulenvolumen an 1 M NaOH, 1 M HCl und 2 M NaCl regeneriert, mit Wasser neutral gewaschen und zur erneuten Benutzung mit Lysispuffer äquilibriert. Längere Lagerung erfolgte unter 20 % EtOH.

### 3.3.7.3 Chromatographie an Hydroxylapatit

Die nach der Chromatographie an Q-Sepharose gewonnene aktivste Fraktion wurde mit 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.8) auf das zehnfache Volumen verdünnt. Mit einer HPLC-Anlage (siehe 3.4.3, ohne Nachsäulenderivatisierung) wurde die Probe direkt auf eine Hydroxylapatitsäule (Bio-Rad Macro-Prep Ceramic Hydroxylapatit 20  $\mu\text{m}$ , 0.5 $\times$ 5 cm, Volumen ca. 1 ml) mit einer Flussrate von 1.5 ml/min aufgetragen.

Die Elution erfolgte stufenweise durch definierte  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösungen; pH 6.8. Die Flussrate betrug 1.5 ml/min. Die Fraktion mit der höchsten Aktivität wurde direkt für die weitere Aufreinigung eingesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 20 °C.

Das Hydroxylapatit wurde nach Benutzung mit dem fünffachen Säulenvolumen an 400 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.8) gewaschen, mit Wasser neutral gewaschen und zur erneuten Benutzung mit Lysispuffer äquilibriert. Längere Lagerung erfolgte unter Wasser.

### 3.3.7.4 Gelchromatographie an HPLC-Superdex 200HR

Die aktive Hydroxylapatitfraktion wurde auf ca. 0.5 ml konzentriert (Cenriprep-10 (MW cut-off) 10 kDa, Millipore GmbH, Schwalbach) und auf eine HPLC-Superdex 200HR (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) aufgetragen.

Als Material für die Gelfiltration diente Superdex 200HR mit einem Trennbereich von 10-600 kDa. Die Säule (1 cm  $\times$  30 cm, Volumen ca. 24 ml) wurde durch die HPLC-Anlage (siehe 3.4.3, ohne Nachsäulenderivatisierung) betrieben. Als Laufpuffer diente 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA; pH 7.7 mit Flussrate von 250  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die Kalibrierung erfolgte durch folgende Standardproteine: Ferritin (450 kDa), Aldolase (158 kDa), Rinderserumalbumin (68 kDa), Ovalbumin (45 kDa),  $\alpha$ -Chymotrypsinogen (25 kDa) und Cytochrom C (12.5 kDa). Die Lagerung der Gelfiltrationssäule erfolgte unter 20 % Ethanol.

### 3.3.7.5 Anionenaustauscher-Chromatographie an Resource-Q

Der abschließende Reinigungsschritt erfolgte durch einer an der HPLC-Anlage (HPLC-MDD ohne Nachsäulenderivatisierung, siehe 3.4.3) betriebenen Resource-Q-Säule (Bettvolumen ca. 0.5 ml). Die nach der Gelchromatographie erhaltenen aktiven Fraktionen wurden mit 50 mM MOPS/ $\text{Na}^+$ , 100 mM NaCl, 1 mM PMSF; pH 7.5 auf das zehnfache Volumen verdünnt. Die Auftragung der Proben und die anschließende Elution erfolgte mit 1.5 ml/min. Das gebundene Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 100-400 mM NaCl

in 15 min eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 1.5 ml. Die *myo*-Inositol 3-phosphat Synthase Aktivität eluierte konzentriert in 1-2 Fraktionen. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 20 °C.

Das Material wurde nach Benutzung mit jeweils 5 Säulenvolumina 1 M NaOH, 1 M HCl und 2 M NaCl regeneriert, mit Wasser neutral gewaschen und zur erneuten Benutzung mit Lysispuffer äquilibriert. Längere Lagerung erfolgte unter 20 % EtOH.

### 3.3.8 Phosphatbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung von Inositolphosphaten und Phosphat wurde ein von P.A. Lanzetta<sup>319</sup> entwickelter Phosphattest verwendet. Zur Freisetzung des organisch gebundenen Phosphats wurden 100 µl der Proben in einem Hydrolyseglas (Borosilikatglas der Hydrolyseklasse 1, MN-Düren) mit 20 µl 10 M Schwefelsäure versetzt und 4 h bei 170 °C zersetzt. Eventuell entstehender Kohlenstoff wurde durch Zugabe von 20 µl 20 %iger Wasserstoffperoxidlösung und anschließender einstündiger Erhitzung auf 170 °C entfernt. Das Hydrolysat wurde mit 1 M Schwefelsäure so verdünnt, dass die Extinktion im linearen Bereich der Kalibriergerade lag.

10 µl des entsprechend verdünnten Hydrolysats wurden mit 100 µl Phosphatreagenz versetzt, kurz auf einem Schüttler (Vortex) gemischt und die Reaktion nach 1 min mit 10 µl 25%iger tri-Natriumcitratlösung gestoppt. Nach zwanzigminütiger Inkubation wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Bio-Rad, Microplatten-Reader, Modell 450) gemessen. Durch Vergleich mit einer Kalibriergerade im Bereich von 0-200 µM Phosphat (hergestellt aus einer 200 µM Kaliumdihydrogenphosphatlösung in 1 M Schwefelsäure) konnte auf die Konzentration an organisch gebundenem Phosphat geschlossen werden. Eventuell vorhandenes freies Phosphat wurde durch Vermessung von nicht hydrolysierten Proben detektiert und subtrahiert.

#### Phosphatreagenz:

Die eingesetzte Reagenzlösung bestand aus 735 Volumenteile einer 0.045 %igen Malachitgrünlösung und 245 Volumenteile einer 4.2 %igen Ammoniumheptamolybdatlösung in 4 M HCl. Die Lösung wurde nach 24-stündigem Rühren mit 20 Volumenteile 2 %igen Tergitol NP-10 versetzt und danach filtriert.

### 3.3.9 Isoelektrischer Punkt

Die Ermittlung des isoelektrischen Punktes erfolgte durch eine Chromatofokussierung im pH-Bereich von 7-4 über eine PBE94<sup>®</sup>-Anionenaustauschersäule (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg). Die Säule wurde bei einem pH-Wert oberhalb des isoelektrischen Punktes äquilibriert und das Protein im gleichen Puffer aufgetragen (25 mM Imidazol/HCl; pH 7.4). Eluiert wurde danach über ein speziell angepasstes Puffersystem (Polybuffer<sup>®</sup> 74, Pharmacia). Während der Elution bildet sich auf der Säule ein pH-Gradient aus und der pH-Wert des Eluats sinkt kontinuierlich vom Startwert bis auf den pH-Wert des Elutionspuffers (Polybuffer<sup>®</sup> 74, 1:8 verdünnt mit Wasser; pH 4) ab. Das Protein wird dabei im pH-Bereich seines isoelektrischen Punktes auf der Säule fokussiert und eluiert.

Eluiert wurde mit einer Flussrate von 1.5 ml/min. Es wurden jeweils 3 ml-Fractionen gesammelt, von denen jeweils der pH-Wert und anschließend die MIPS-Aktivität bestimmt wurde.

## 3.4 Isolierung und Analytik von Inositolphosphaten

### 3.4.1 Festphasenextraktion von Inositolphosphaten (Gesamtzellzahl $>1 \cdot 10^9$ )

Zum Aufschluss wurden ca. 2.5 g (Feuchtgewicht) gefrorenes Zellmaterial mit zwei Teilen (v/w) eiskalter 2 M Perchlorsäure, 1/10 (v/v) 10 mM EDTA (Tetranatriumsalz, pH 6.0) und 1/100 (v/v) 10 mM NaF versetzt und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Zugabe von EDTA und NaF erfolgte, um den Verlust von Inositolphosphaten durch Bildung schwerlöslicher Komplexe mit zweiwertigen Kationen oder durch Abbau von Phosphatasen zu vermeiden. Die Suspension wurde auf einem Vortexschüttler 1 min homogenisiert und das denaturierte Protein abzentrifugiert (6000 g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment mit 500 µl Wasser gewaschen und die Überstände vereinigt.

Die Probe wurde rasch unter Eiskühlung mit 4 M KOH auf einen pH-Wert von 5.5 eingestellt, 30 min inkubiert und das gebildete Kaliumperchlorat abzentrifugiert (6000 g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment mit 500 µl Wasser gewaschen (evtl. nochmals zentrifugiert) und die Überstände vereinigt.

Die Proben wurden anschließend mit 0.5 ml Aktivkohlesuspension (20 %ige (w/v) Suspension in 0.1 M Natriumchlorid und 50 mM Natriumacetat; pH 4.0) je Gramm eingesetztes Feuchtgewicht der Zellen versetzt, 15 Minuten unter gelegentlichen Schütteln auf Eis inkubiert und die Aktivkohle durch Zentrifugation (6000 g, 4 °C, 10 min) entfernt. Die

Aktivkohle erlaubt die Abtrennung von störenden Nukleotiden, die an ihr hydrophob adsorbiert werden.<sup>320</sup> Das Sediment wurde anschließend mit 1 ml Waschpuffer (0.1 M NaCl, 5 mM NaF, 1 mM EDTA) pro 1.5 g Feuchtwicht der Zellen gewaschen und die Überstände vereinigt. Die Aktivkohle wurde durch Zentrifugation (6000 g, 4 °C, 10 min) entfernt und der Niederschlag mit 1 ml Wasser pro 1.5 g Feuchtwicht gewaschen. Die Proben wurden vereinigt und evtl. Aktivkohlereste durch einen 0.45 µm Membranfilter (Millipore GmbH, Schwalbach) entfernt.

Die eigentliche Isolierung der Inositolphosphate geschah durch Festphasenextraktion an Q-Sepharose fast-flow. 1 ml einer 1:1 Suspension (w/v) von Q-Sepharose fast-flow (Chlorid-Form) in 20 %igen Ethanol je Gramm Feuchtwicht der Zellen wurde in einer Poly-Prep Säule (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) vorgelegt und mit Wasser ethanolfrei gewaschen.

Vor dem Auftragen auf die Säule wurde die Probe auf eine Leitfähigkeit von 2-3 mS/cm verdünnt und auf einen pH-Wert von 4-5 eingestellt. Nach dem Auftragen wurde mit dem vierfachen Säulenvolumen an 10 mM Ammoniumacetat gewaschen und die Inositolphosphate mit dem vierfachen Säulenvolumen an 2.5 M Ammoniumacetat eluiert. Die Proben wurden bis zur Gewichtskonstanz lyophilisiert. Die getrockneten Proben wurden bis zur Durchführung der Analyse bei -20 °C gelagert.

### **3.4.2 Isolierung von Inositolphosphaten (Gesamtzellzahl $1-2 \cdot 10^8$ )**

Zum Aufschluss wurde das gefrorene Zellmaterial mit zwei Teilen (v/w) eiskalter 2 M Perchlorsäure, 1/10 (v/v) 10 mM EDTA (Tetranatriumsalz, pH 6.0) und 1/100 (v/v) 10 mM NaF versetzt und bei RT aufgetaut. Die Zellen wurden durch Schütteln (Vortex) lysiert und denaturiertes Material abgetrennt (6000 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Rückstand wurde mit 100 µl Wasser gewaschen und beide Fraktionen vereinigt. Die Neutralisation der vereinigten Rückstände erfolgte durch eine Lösung von 1.5 M KOH in 60 mM Bis-Tris. Als Indikator diente ein Universal-Indikator (pH 4-10, Merck Biosciences GmbH, Schwalbach - Ts.). Im pH-Bereich zwischen 5 und 6 schlägt die Farbe von rot nach gelb um. Die zugesetzte Puffersubstanz Bis-Tris verhinderte einen zu schnellen pH-Drift. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C unter gelegentlichen Schütteln wurde das präzipitierte Kaliumperchlorat abzentrifugiert (20000 g, 5 min, 4 °C) und der Überstand entnommen. Der Rückstand wurde anschließend mit 100 µl Wasser gewaschen und die Waschflüssigkeit dem Überstand zugefügt.



Die vereinigten Überstände wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl Aktivkohlesuspension (3.4.1) versetzt und 15 min bei 4 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Dieser Schritt hat neben der Abtrennung von Nukleotiden auch die Entfernung der Indikatorfarbstoffe zur Folge. Die Aktivkohle wurde danach durch Zentrifugation entfernt (20000 g, 5 min, 4 °C) und der Überstand vorsichtig entnommen. Die sedimentierte Aktivkohle wurde anschließend mit 100 µl Waschlösung (3.4.1) gewaschen. Der vereinigte Überstand wurde entweder lyophilisiert oder direkt zur HPLC-MDD eingesetzt.

### 3.4.3 Analytik von Inositolphosphaten

Das Prinzip der HPLC-Trennung von Inositolphosphaten und deren Nachweis mit Hilfe einer Nachsäulenderivatisierung wurde von G.W. Mayr<sup>320,321</sup> eingeführt und soll deshalb nur kurz beschrieben werden.

4-(2-Pyridylazo)-resorcinol (PAR) bildet mit  $Y^{3+}$ -Ionen einen intensiv orangerot gefärbten Komplex. Die ebenfalls stark komplexierenden Inositolphosphate konkurrieren mit dem Farbstoff um die  $Y^{3+}$ -Ionen und bilden einen farblosen Komplex.

Die Absorption bei 546 nm des freien PAR ist gegenüber dem komplexgebundenen PAR geringer. Dieses bedeutet, dass im Chromatogramm bei der charakteristischen Retentionszeit der  $InsP_x$ -Isomere ein negatives Absorptionssignal registriert wird, welches durch Invertierung am Integrator als positives Spannungssignal empfangen wird.

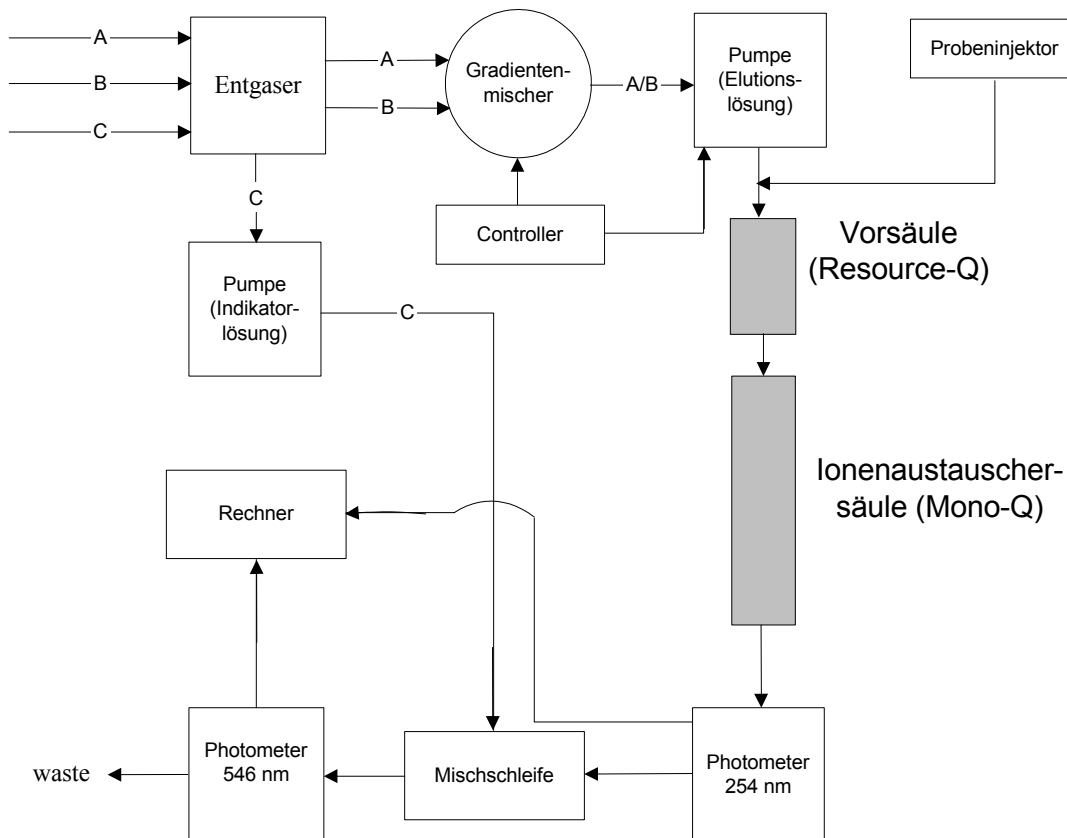
Der Aufbau der HPLC-Anlage ist schematisch in Abbildung 12 wiedergegeben. Das nach 3.4.1 bzw. 3.4.2 gewonnene Lyophilisat wurde in einer adäquaten Menge Wasser aufgenommen und 1 ml durch einen automatischen Probengeber auf eine Anionenaustauschersäule (Mono-Q, Länge 10 cm, Durchmesser 1.0 cm, Volumen 8.5 ml) aufgetragen. Als Elutionslösungen dienten wässrige Laufmittel (Lösung A und B), deren Verhältnis über einen programmgesteuerten Gradientenmischer geregelt wurde. Die an dem Säulenmaterial gebundenen Inositolphosphate wurden entweder durch einen Ionenstärkegradienten (alkalisches System) bzw. durch einen pH- und Ionenstärkegradienten (saurer System) eluiert.

Das Eluat passierte zunächst einen UV-Detektor ( $\lambda=254$  nm) zum Nachweis von Nukleotiden und anderen UV-absorbierenden Substanzen. Über eine Mischschleife wurde dem Eluat PAR/ $Y^{3+}$ -Farbstofflösung zugesetzt und gelangte danach in ein weiteres Photometer ( $\lambda=546$  nm). Durch Vergleich der beiden Chromatogramme konnten Inositolphosphate von UV-absorbierenden Phosphateestern, die ebenfalls  $Y^{3+}$  komplexieren,

unterschieden werden. Die Chromatogramme wurden über das Programm EZChrom (V6.1, Scientific Software) ausgewertet.

Gerät	Hersteller	Modell
Controller	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg	LC 2252
Entgaser	Uniflows, Uniflows Co. Ltd., Tokio, Japan	Degasys DG 1310
Gradientenmischer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg	Low-Pressure-Mixer
Pumpen	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg	HPLC-Pump 2248
Photometer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg	VWM 2141
Auto-sampler	Marathon	
Säulen	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg	Hauptsäule Mono-Q HR 10/10 Vorsäule Resource-Q HR 5/5

**Tabelle 31: Komponenten der HPLC-MDD Anlage**



**Abbildung 12: Schematischer Aufbau der HPLC-MDD Anlage**

In dieser Arbeit wurden drei Gradientensysteme verwendet. Bei dem HCl-System handelt es sich um einen kombinierten pH- und Chlorid-Gradienten. Er diente zur Trennung von  $\text{InsP}_4$ -Isomere bis  $\text{InsP}_8$ . Bei dem alkalischen System handelt es sich um einen Chlorid-Gradienten, der eine optimierte Trennung von  $\text{InsP}_2$ - und  $\text{InsP}_4$ -Isomeren liefert. Das dritte

Gradiententrennung diente zur Detektion von AMP, ADP und ATP. Diese Trennung erfolgte auch an einer kleineren Säule (Mono-Q, 2 ml). Die Flussrate der Eluenten betrug 1.5 ml/min, die Flussrate der Farbstofflösung 0.75 ml/min.

**A. Alkalisches System:**

---

Lösung A:	50 mM Tris/HCl; pH 8.5
Lösung B:	50 mM Tris/HCl, 0.4 M KCl; pH 8.5
Lösung C (Farbstoff):	2 mM Ammoniumacetat, 200 $\mu$ M PAR, 30 $\mu$ M YCl <sub>3</sub> , 10 % (v/v) Methanol, pH 5.0

---

Programm: 0 min: 30 % B; 2 min: 40 % B; 16 min: 42 % B; 20 min: 50 % B; 38 min: 60 % B; 48 min: 75 % B; 50 min: 100 % B; 60 min: 100 % B

**B. HCl-System:**

---

Lösung A:	0.2 mM HCl
Lösung B:	0.5 M HCl
Lösung C (Farbstoff):	2 M Tris, 30 $\mu$ M YCl <sub>3</sub> , 10 % (v/v) Methanol, 200 $\mu$ M PAR, pH 9.1

---

Programm: 0 min: 0 % B; 70 min: 100 % B; 100 min: 100 % B

**C. Nachweis von Nukleotiden:**

---

Lösung A:	0.2 mM HCl
Lösung B:	0.5 M HCl

---

Programm: 0 min: 0 % B; 15 min: 100 % B; 20 min: 100 % B

Die Regenerierung der HPLC-Säule erfolgte nach fünf Messungen. Dazu wurden viermal 1 ml 2 M NaOH, viermal 1 ml 1 M HCl und viermal 1 ml 2 M NaCl über den Autosampler injiziert, während mit Lösung A eluiert wurde.

**3.5 Isolierung und Analytik von Phosphatidylinositolphosphaten**

Das Zellwachstum erfolgte in 400 ml FM-Medium in Fernbachkolben (120 Upm, 22.5 °C). Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml durch Zentrifugation geerntet (500 g, 10 min, 4 °C) und mit eiskaltem Sörensen-Puffer gewaschen.

$2 \cdot 10^9$  Zellen wurden mit 9.5 ml Chloroform/Methanol/12 N HCl/H<sub>2</sub>O (90:120:15:3, v/v/v/v) versetzt und 30 min bei RT im Ultraschallbad aufgeschlossen. Anschließend wurden 3.75 ml Chloroform und 3.75 ml Wasser zugesetzt und 10 sec geschüttelt (Vortex). Das resultierende Zweiphasengemisch wurde zentrifugiert (6000 g, 10 min, 20 °C), die organische Phase entnommen (Abimed-Schlauchpumpe) und in ein 50 ml Glasgefäß gefüllt. Die wässrige Phase wurde verworfen und die Interphase nochmalig sauer ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer eingengt.

Zu den Lipidrückständen wurden 4.6 ml Monomethylamin-Reagenz (40 ml 33 %iges  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  in Ethanol, 8ml Wasser, 4 ml n-Butanol) zugesetzt und die Proben 1 h unter Rühren im Trockenschrank bei 53 °C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend auf Eis gekühlt, mit 1.5 ml eiskalten n-Propanol versetzt und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mit 1 ml Wasser und 1.2 ml Lösungsmittelgemisch (n-Butanol/Petrolether (40-60 °C-Fraktion)/Ethylformiat (20:4:1, v/v/v) aufgenommen, die Proben 10 sec geschüttelt (Vortex) und zur Phasentrennung zentrifugiert (6000 g, 8 min, 20 °C). Die obere organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase nochmalig mit 0.75 ml Lösungsmittelgemisch gewaschen.

Die wässrige Phase wurde in 10 ml Wasser aufgenommen und auf eine methanolgewaschene Maxi-Clean Cartridge Mixed Mode RP/H, 25/PK (Alltech GmbH, Unterhaching) aufgetragen. Die deacylierten Proben wurden anschließend mit 15 ml Wasser eluiert, in fl.  $\text{N}_2$  eingefroren und lyophilisiert. Die Lagerung der getrockneten Proben erfolgte bei -20 °C.

Der resultierende Rückstand wurde in 1 ml Wasser aufgenommen, geschüttelt (Vortex) und kurz zentrifugiert. Anschließend wird ein Äquivalent von  $2 \cdot 10^8$  Zellen entnommen und in 1ml Wasser aufgenommen. Zur Analyse wurden 100  $\mu\text{l}$  ( $2 \cdot 10^7$  Zellen) eingesetzt.

Die Analytik erfolgte durch Ionenchromatographie mit anschließender Leitfähigkeitsdetektion der nach der Deacylierung der Phosphatidylinositolphosphaten erhaltenen Glycerophosphoinositolphosphate. Es wurde die Ionenchromatographie-Anlage DX-500 (Dionex GmbH, Idstein) verwendet. Die Trennung erfolgte an einer Anionenaustauschersäule (IonPac AS11-HC), die Detektion über einen Leitfähigkeitsdetektor. Die Trennung und die Detektion erfolgten bei 30 °C in einem Chromatographieofen. Eine zusätzliche Kontrolle erfolgte über einen UV-Detektor bei 254 nm.

Eluiert wurde mit einem Wasser/Methanol-Gemisch (85:15), dem über einen Eluentgenerator elektrolytisch erzeugtes KOH (0-90 mM) zugeführt wurde. Dadurch wurde ein durch Carbonat kontaminiertes Laufmittel vermieden. Die Eluentlösungen wurden vor der Analyse mit Helium entgast.

Anfangs erfolgte eine elektrochemische Suppression. Später erfolgte eine externe chemische Suppression mit einem AMMS III-Suppressorsystem. Zur Regeneration wurde 25 mM Schwefelsäure verwendet, welche mit einem konstanten Druck von 5 psi dem Suppressorsystem zugeführt wurde.

Als Laufmittel diente mit Helium entgastes Reinstwasser aus einer Millipore-Anlage (Milli-Q Synthesis A10, Millipore GmbH, Schwalbach) mit einem elektrischen Widerstand von ca. 18 MΩ und einem TOC-Gehalt <5 ppb.

Die Auswertung erfolgte über die von Dionex vertriebene Software Chromeleon 6.2.

Pumpe:	GP 50 Gradient Pump
Eluentgenerator :	EG 40 mit EGC-KOH Kartusche
Suppressor:	AMMS III, Micro Membrane Suppressor
Chromatographie-Ofen:	LC 30
Elektrochemischer Detektor:	ED 50 (Zelle mit 1μl Innenvolumen, Zellkonstante 160 cm <sup>-1</sup> )
UV-Detektor:	AD 25 Absorbance Detector (10μl Zellvolumen)
Sicherheitssäule:	ATC-HC Anion Trap
Vorsäule:	IonPac AG11-HC, 4*50 mm
Trennsäule:	IonPac AS11-HC, 4*250 mm

Tabelle 32: Bauteile des DX-500 Ionenchromatographiesystems der Firma Dionex

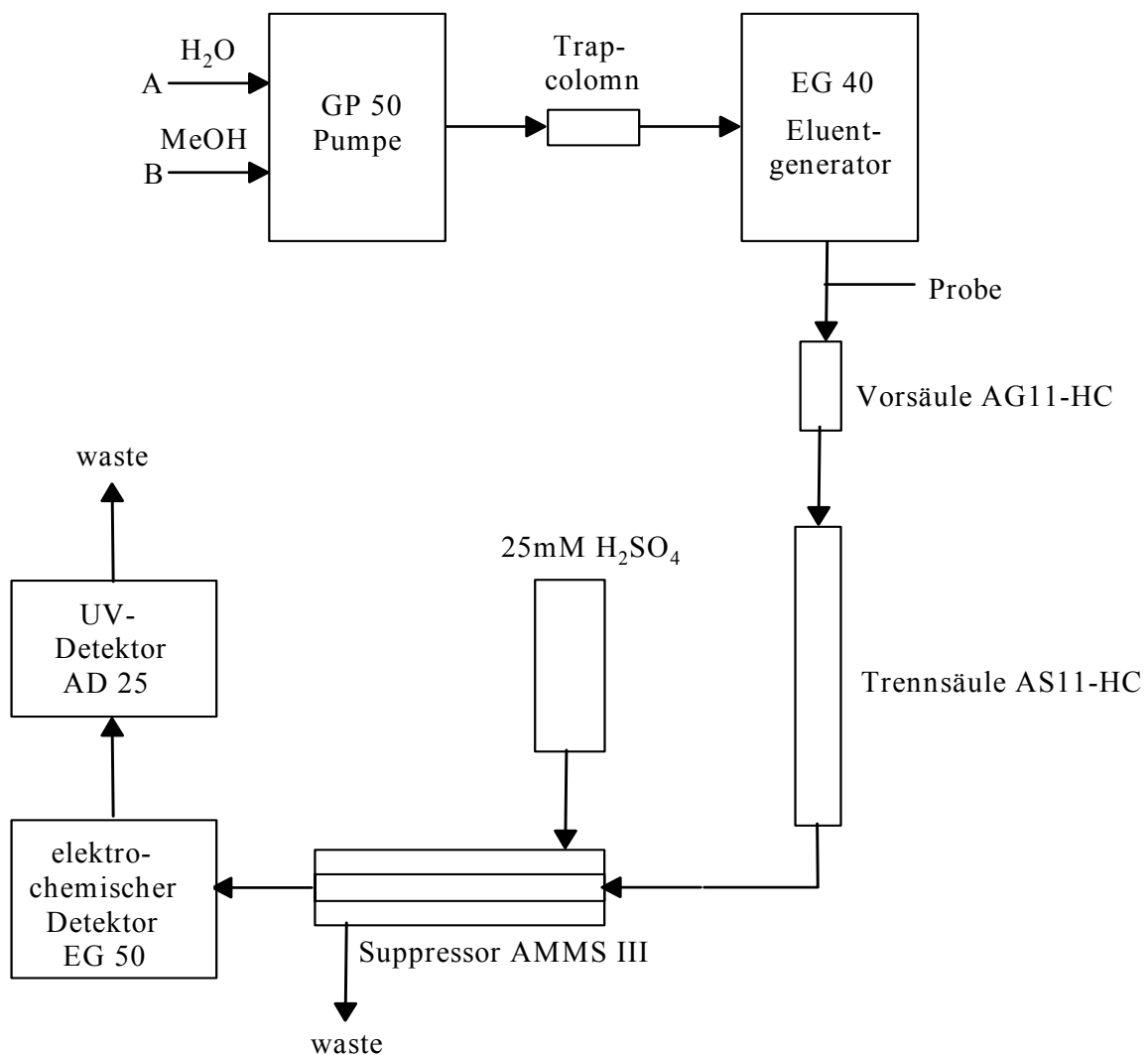


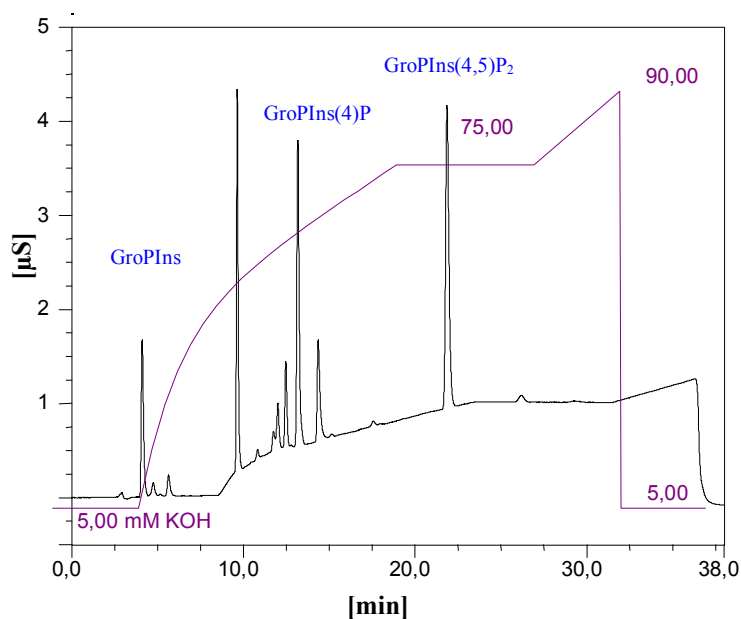
Abbildung 13: Schematischer Aufbau der HPLC-CD-Anlage mit externer chemischer Suppression

Der KOH-Gradient ist in Tabelle 33 und Abbildung 14 wiedergegeben. Durch Verwendung des Eluentengenerators konnten konvexe Gradienten benutzt werden.

Zeit	Wasser [%]	MeOH [%]	KOH [mM]	Steigung	Kurve
0	85	15	5	linear	5
5	85	15	5	linear	5
20	85	15	75	konvex	3
28	85	15	75	konvex	3
33	85	15	90	linear	5
33.1	85	15	5	linear	5
38	85	15	5	linear	5

**Tabelle 33: Gradient zur Trennung von deacylierten Phosphatidylinositolphosphaten**

Die Trennung erfolgte mit einer Flussrate von 1 ml/min. Die Probe wurde nach Säulenäquilibration manuell mit Hilfe einer 100 µl Injektionsschleife aufgetragen.



**Abbildung 14: HPIC-CD Chromatogramm von GroPIIns, GroPIIns(4)P und GroPIIns(4,5)P<sub>2</sub>**

Injektion von 1 nmol der kommerziell erhältlichen Substanzen. Die Suppression erfolgte elektrochemisch bei einem Suppressionsstrom von 300 mA.

Messungen ergaben einen linearen Zusammenhang zwischen der Peakfläche und der Stoffmenge im Bereich von 50 pmol-10 nmol. Die Kalibriergeraden in Abbildung 15 zeigen, dass die Nachweisempfindlichkeit mit zunehmendem Phosphorylierungsgrad (bzw. steigender Ladungszahl) steigt. Die Nachweisempfindlichkeit für GroPIIns und GroPIInsP<sub>x</sub> liegt bei der Leitfähigkeitsdetektion durchschnittlich im unteren pmol-Bereich.

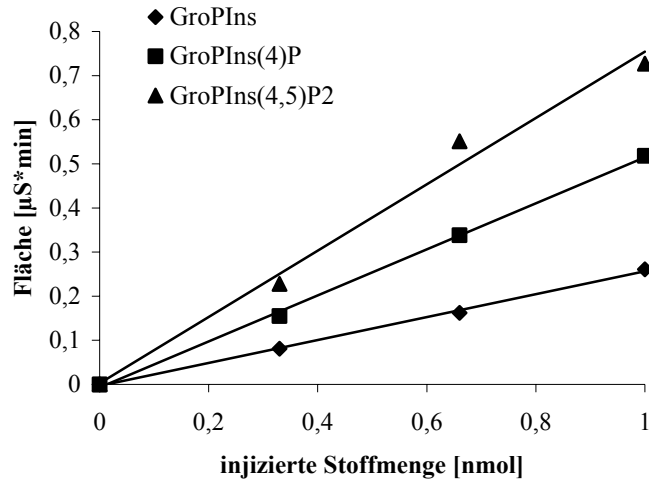


Abbildung 15: Kalibriergeraden zur quantitativen Bestimmung von GroIns, GroIns(4)P und GroIns(4,5)P<sub>2</sub>

### 3.6 Bestimmung des intrazellulären *myo*-Inositolgehalts

Die Bestimmung des intrazellulären *myo*-Inositols erfolgte im Vorlauf der unter 3.4.1 beschriebenen Festphasenextraktion an Q-Sepharose-ff. Der Vorlauf wurde in fl. N<sub>2</sub> eingefroren, lyophilisiert und in 1ml Wasser aufgenommen. Aliquots wurden danach wie unter 3.3.1 beschrieben auf *myo*-Inositol untersucht.

Alternativ wurden die Zellen zunächst wie unter 3.4.1 beschrieben durch Perchlorsäure aufgeschlossen und mit Aktivkohle behandelt, jedoch anschließend durch Mischbettionenaustauscher Amberlite MB-3 entsalzt. Aliquots wurden danach wie unter 3.3.1 auf *myo*-Inositol untersucht.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Partielle Reinigung und Charakterisierung der MIPS

#### 4.1.1 Etablierung eines Enzymtests

Um die enzymatisch katalysierte Umwandlung von Glucose 6-phosphat zu Inositol 3-phosphat zu verfolgen, wurden in der Vergangenheit folgende Möglichkeiten genutzt: a) die enzymatische Dephosphorylierung des Inositol 3-phosphats, Derivatisierung des *myo*-Inositols und gaschromatographischer Quantifizierung, oder b) ein indirekter, weniger selektiver Test, der die weitgehende oxidative Spaltung des Inositol 3-phosphats bis zum Phosphat durch Natriummetaperiodat ausnutzt.<sup>322</sup> Das freigesetzte Phosphat ist proportional zum gebildeten Inositol 3-phosphat, und kann photometrisch ermittelt werden. Glucose 6-phosphat wird durch Natriummetaperiodat auch oxidativ gespalten, allerdings entsteht kein freies Phosphat.

D-*myo*-Inositol 3-phosphat

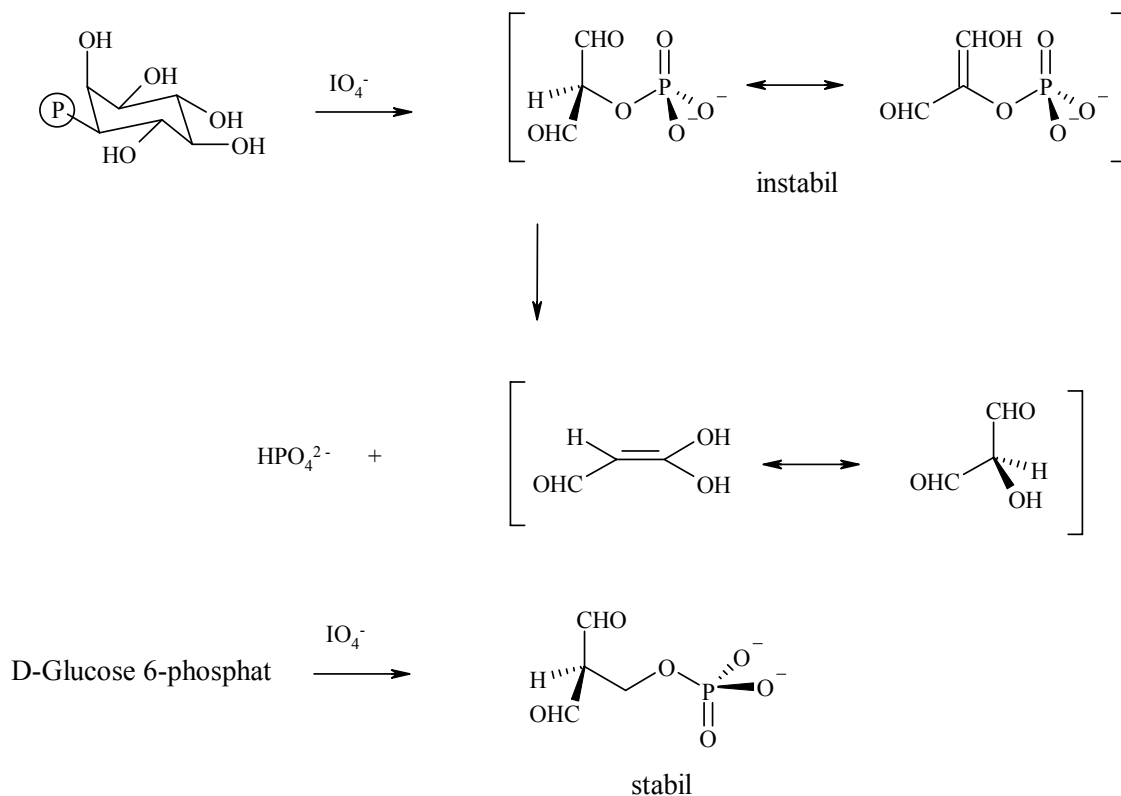


Abbildung 16: Strategie zum optischen Nachweis der MIPS-Aktivität in *D.discoideum*



Wenn auch Möglichkeit a) die genauere Erfassung von Nebenreaktionen zulässt, so ist sie jedoch erheblich zeitaufwendiger und aufgrund der problematischen Derivatisierungsreaktionen für einen Enzymtest wenig geeignet.

Angelehnt an Literaturdaten wurden folgende Inkubationsbedingungen gewählt: Ein leicht alkalischer pH-Wert von 8.5 (100 mM Tris/HCl), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM NAD<sup>+</sup>. In Anbetracht der veröffentlichten K<sub>M</sub>-Werte von 0.05 – 4.5 mM wurde eine Substratkonzentration von 5 mM Glucose 6-phosphat eingesetzt. Aufgrund einer relativ hohen Phosphatverunreinigung im kommerziell erhältlichen Glucose 6-phosphat war eine höhere Substratkonzentration nicht praktikabel.

1) Um das gebildete Inositol 3-phosphat von Glucose 6-phosphat zu differenzieren, wurde anschließend Natriummetaperiodat zugesetzt. Im Gegensatz zu Glucose 6-phosphat wird Inositol 3-phosphat bis zum Phosphat abgebaut. Die Menge an Phosphat ist proportional zur Menge an gebildetem Inositol 3-phosphat und wurde nach 3.3.8 bestimmt.

Mit Hilfe des Tests wurde ein Enzym etwa 400fach angereichert. Die Eigenschaften dieses Enzyms stimmten allerdings nicht mit den bisher beschriebenen MIPS überein. Wahrscheinlich handelte es sich bei dem angereicherten Enzym um eine Phosphoglucomutase, die Glucose 6-phosphat zu Glucose 1-phosphat umsetzt. Auch Glucose 1-phosphat wird durch Natriummetaperiodat oxidativ bis zum Phosphat gespalten und täuscht die Bildung von Inositol 3-phosphat vor.

2) Um gebildetes Inositol 3-phosphat neben Glucose 1-phosphat nachzuweisen wurde alternativ ein bereits beschriebener fluorimetrischer Inositoltest leicht abgewandelt.<sup>323</sup> Es handelt sich hierbei um einen gekoppelten enzymatischen Test, indem Inositol 3-phosphat mit Hilfe von alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und das freigesetzte *myo*-Inositol durch NAD<sup>+</sup> in Gegenwart von *myo*-Inositoldehydrogenase zu Inosose oxidiert wird. Das bei dieser Reaktion gebildete NADH reduziert in Gegenwart von Diaphorase den fluorimetrisch inaktiven Farbstoff Resazurin in den fluorimetrisch aktiven Farbstoff Resorufin.

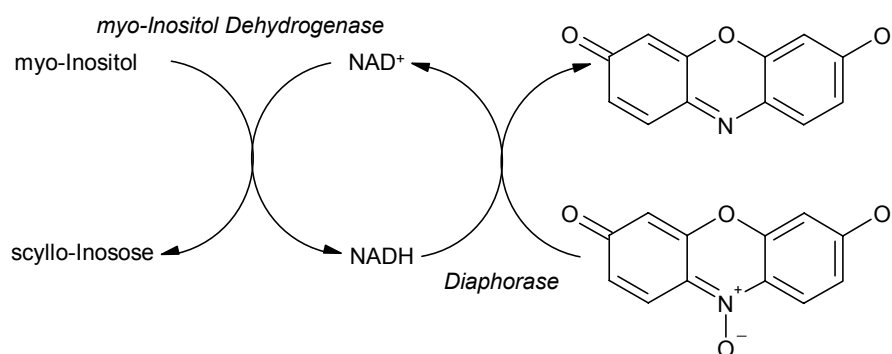


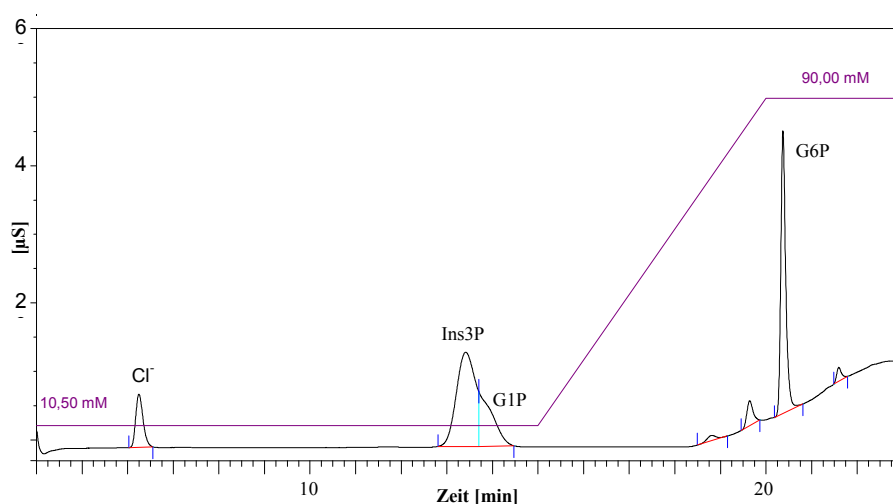
Abbildung 17: Strategie zum fluorimetrischen Nachweis der MIPS-Aktivität in *D.discoideum*

Auch dieser Enzymtest erwies sich als nicht praktikabel. Während der Inkubation des Enzymtests entstehen größere Mengen NADH. Dieses täuscht eine höhere Inositolkonzentration und somit eine wesentlich höhere Synthaseaktivität vor. Versuche NADH mit Hilfe von Ionenaustauscher bzw. Aktivkohle quantitativ zu entfernen schlugen fehl.

3) Versuche zur Entwicklung eines geeigneten Enzymtests basierend auf der HPIC-CD Analytik waren nicht erfolgreich. Der Zellextrakt enthielt große Menge Glucose 1-phosphat und erhebliche Mengen wurden während der Inkubation der Zellextrakte mit Glucose 6-phosphat durch eine Phosphoglucomutase neu gebildet. In einem späten Aufreinigungsschritt konnte die dafür verantwortliche Phosphoglucomutase abgetrennt werden.

Glucose 1-phosphat koeluiert mit dem Produkt der Enzymreaktion Inositol 3-phosphat. und konnte durch Variation der chromatographischen Bedingungen nicht von diesem getrennt werden. Abbildung 18 zeigt die Antrennung von Inositol 3-phosphat und Glucose 1-phosphat durch eine isokratische Elution mit 10.5 mM KOH.

Methanol wirkt sich als modifizierendes Reagenz unterschiedlich auf die Nettoladungen der jeweiligen Verbindungen aus. Im Gegensatz zur Trennung von Inositolbisphosphaten, wobei durch Einsatz von Methanol und KOH-Gradienten das Zeitfenster zur Elution der Inositolbisphosphate von weniger als 0.5 min auf mehr als 3.5 min gespreizt werden konnte, war bei der Trennung von Glucose 1-phosphat und *myo*-Inositol 3-phosphat keine spürbare Verbesserung der Trennleistung zu beobachten.



**Abbildung 18: HPIC-CD Analytik von Inositol 3-phosphat, Glucose 1-phosphat und Glucose 6-phosphat**  
 Injektion von jeweils 1 nmol Substanz; Flussrate 0.85 ml/min; Säule IonPac AS11-HC

4) Ein anderer Ansatz erwies sich als erfolgreicher. Dabei wurden die phosphorylierten Verbindungen im Testansatz nach Inkubation mit Glucose 6-phosphat vollständig mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und das entstandene *myo*-Inositol detektiert.

Eine häufig angewandte Methode zur Analytik des *myo*-Inositols ist die Gaschromatographie mit nachgeschalteter Massenspektrometrie. Ein gravierender Nachteil dieses Verfahrens ist die erforderliche Derivatisierung der nichtflüchtigen Kohlenhydrate. Verlaufen diese Schritte nicht quantitativ, sind die Ergebnisse mit großen Fehlern behaftet.

Verbreitet ist auch ein Verfahren zur Trennung an stark sauren Kationenaustauschern in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Form mit Wasser als Eluent. Dieses Verfahren ist jedoch nur bedingt einsetzbar. Enthält die Probe beispielsweise komplexierende Substanzen, so können die an der Austauscherfunktion fixierten Metall-Ionen eluiert werden, wodurch eine periodische Regenerierung des Austauschers erforderlich ist. Zusätzlich ist die Anzahl an retentionsbestimmenden Parametern begrenzt, da nur Wasser oder Mischungen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln als Eluent verwendet werden können.

Alternativ wird die Trennung der Kohlenhydrate nach Komplexbildung mit Borsäure sowohl für die Kapillarelektrophorese als auch für die HPLC diskutiert. Obwohl sich die Trennungen durch hohe Selektivitäten auszeichnen, ist die Komplexbildung langsam, so dass sich eine zeit- und experimentell aufwendige Analytik ergibt.

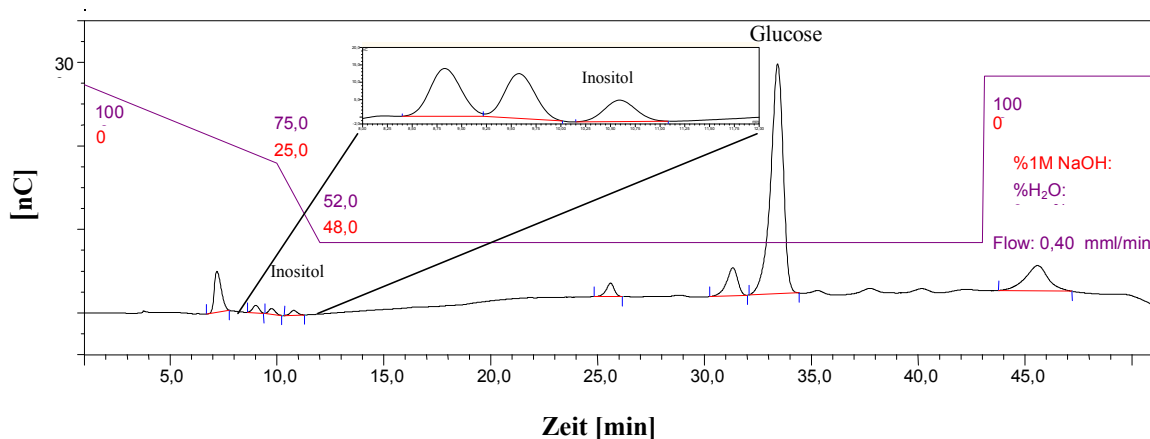
Eine weitere Möglichkeit ist die Trennung der Kohlenhydrate durch Anionenaustausch-Chromatographie. Kohlenhydrate verhalten sich wie schwache Säuren mit einem pK-Wert zwischen 12 und 14, d.h. sie können im alkalischen Milieu in die anionische Form überführt werden und an stark basischen Anionenaustauschern getrennt werden. Als Elutionsmittel eignet sich dabei Natriumhydroxid. Den Hydroxid-Ionen kommen dabei zwei Funktionen zu. Zum einen fungieren sie als Eluent-Ionen, zum anderen bestimmen sie den pH-Wert der mobilen Phase. Eine Änderung der Hydroxid-Konzentration in der mobilen Phase führt dabei zu zwei gegensätzlichen Retentionsverhalten. Während mit steigendem pH-Wert die Dissoziation der Kohlenhydrate und somit ihre Retention zunimmt, bewirkt die damit verbundene Erhöhung der Eluenten-Konzentration eine Verringerung der Retention.

Ein Problem bei der Etablierung eines Enzymassays durch Nachweis von *myo*-Inositol ist die außerordentlich geringe Affinität von *myo*-Inositol zu den typischerweise bei der Zuckanalytik eingesetzten stationären Phasen. Selbst durch Herabsetzung der NaOH-Konzentration auf 1 mM wurde *myo*-Inositol an einer CarboPac PA1 nur unzureichend retardiert. Um *myo*-Inositol ionenchromatographisch erfassen zu können, muss die stationäre Phase sich durch eine hohe Kapazität und Hydrophobie auszeichnen. Durch den Einsatz einer

hochkapazitiven CarboPac MA1-Säule auf Basis eines total aminierten, makroporösen Substrat, das mit einem quartären Alkylamin funktionalisiert ist, konnte *myo*-Inositol jedoch ausreichend retardiert werden. Durch den hydrophoben Charakter der stationären Phase werden die an sich geringen Adsorptionswechselwirkungen des *myo*-Inositols verstärkt und tragen so zur Verbesserung der Trennung bei.

Die Detektion über gepulste Amperometrie basiert auf der elektrokatalytischen Oxidation der Verbindungen an der Oberfläche einer Gold-Elektrode. Wird das aufgenommene Signal über den Zeitraum des angelegten, positiven Detektionspotentials integriert, spricht man von integrierter, gepulster Amperometrie (IPAD = **i**ntegrated **p**ulsed **a**mperometric **d**etection).

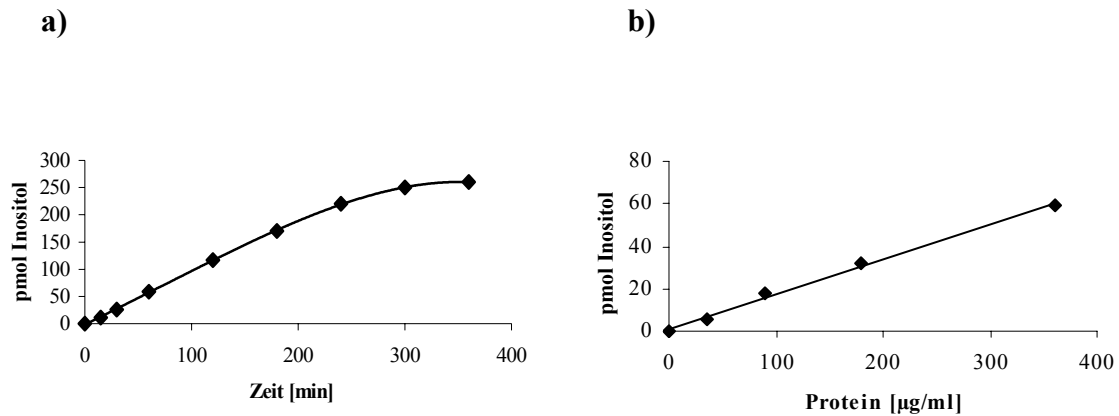
Auf diese Weise gelang letztlich doch die Etablierung eines geeigneten Enzymtests. Abbildung 19 zeigt einen typischen Enzymtest, wobei das Zeitfenster herausgestellt wurde in dem *myo*-Inositol retardiert. Die erzielte Nachweisgrenze für *myo*-Inositol liegt im Bereich von 50 nM (entspricht etwa 5 pmol absolut bei analytischen Läufen). Kalibriergeraden zeigten einen über mehrere Zehnerpotenzen linearen Bereich zwischen Konzentration bzw. aufgetragener Substanzmenge und integriertem Signal.



**Abbildung 19: Beispielchromatogramm eines nach 3.3.1 bearbeiteten Enzymtests aufgenommen über HPIC-IPAD Analytik**

Die Inkubationszeit betrug 1 h, das relevante Zeitfenster wurde hervorgehoben.

Die ermittelte Menge an *myo*-Inositol ist unter den gewählten Bedingungen über etwa 3 h linear zur Inkubationszeit und in dieser Zeit proportional zur eingesetzten Proteinmenge.



**Abbildung 20: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit (a) und der Proteinmenge (b)**

Testbedingungen: 50 mM MOPS, 1 mM NAD<sup>+</sup>, 5 mM Glucose 6-phosphat, 14 mM NH<sub>4</sub>Cl; pH 8.0 bei 37 °C. Die Proteinkonzentration in (a) beträgt 180 µg/ml und die Inkubationszeit in (b) 30 min. Der lineare Bereich in (a) diente zur Berechnung der Synthaseaktivität.

Definitionsgemäß entspricht 1 Unit der Bildung von 1 µmol D-*myo*-Inositol 3-phosphat in einer Minute unter den gewählten Bedingungen.

#### 4.1.2 Partielle Reinigung der MIPS

In diesem Kapitel werden neben der Anreicherung die mit dem Trennproblem verbundenen Schwierigkeiten behandelt. Anschließend zeigt eine Anreicherungstabelle den Fortschritt der Anreicherung, die auch durch eine SDS-Gelelektrophorese dokumentiert wird.

Die Reinigung der MIPS wurde auf eine auf Literaturergebnissen basierende Strategie aufgebaut. Die bisher beschriebenen Aufreinigungen erfolgten normalerweise zunächst über Ammoniumsulfatpräzipitation, anschließend über Anionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration. Nur bei der Reinigung der MIPS aus einigen Pflanzen wurde Affinitäts-Chromatographie eingesetzt.<sup>46</sup> Für eine typische Anreicherung wurden  $1 \cdot 10^{10}$  Zellen axenisch angezogene *D.discoideum*-Zellen verwendet.

Wie in Kapitel 1.3 erwähnt, wird die Expression der MIPS in *S.cerevisiae* durch *myo*-Inositol reprimiert. Um den Einfluss von *myo*-Inositol im Nährmedium auf die MIPS-Aktivität zu vermeiden, erfolgte die Anzucht von *D.discoideum* in vollsynthetischem FM-Medium, und nicht im komplexen axenischen Medium, das *myo*-Inositol enthält.

##### 4.1.2.1 Zellaufschluss

Die Zellernte erfolgte bei einer Zelldichte von  $0.75 \cdot 10^7$  Zellen/ml, da in diesem Bereich die Enzymaktivität am höchsten war. Als Aufschlusspuffer diente ein MOPS/Na<sup>+</sup>-Puffer (pH 8). Der bei den Anreicherungen von MIPS aus anderen Organismen üblicherweise

eingesetzte leichtbasische Tris/HCl-Puffer stört die integrierte, gepulste Amperometrie (IPAD).

Für den Zellaufschluss wurde ein auf Scherkräften basierendes Verfahren eingesetzt. Die Zellyse erfolgte durch mehrmalige Passage der Zellsuspension durch Membranfilter (eine Passage durch Membranfilter mit der Porengröße 8 µm und anschließender zweimaliger Passage durch Membranfilter mit der Porengröße 5 µm). Hierbei handelt es sich um ein besonders schonendes Verfahren, da ein Großteil der Zellorganellen intakt bleibt.<sup>324</sup>

Der nach der Ultrazentrifugation erhaltene cytosolische Rohextrakt enthält 85-95 % der gesamten Enzymaktivität. Bei der *myo*-Inositol 3-phosphat Synthase aus *D.discoideum* handelt es sich offensichtlich um ein lösliches cytosolisches Enzym.

Andere Aufschlussmethoden führten zu einem Verlust an Enzymaktivität (Gefrierenaufschluss ca. 30 %, French-Press ca. 40 %).

#### 4.1.2.2 Anionenaustauscher-Chromatographie an Q-Sepharose FF

Als erster Reinigungsschritt diente eine Anionenaustauscher-Chromatographie an Q-Sepharose FF. Dieses Material erlaubt das Auftragen großer Proteinmengen und eine Elution mit hohen Flussraten, besitzt jedoch eine relativ schlechte Trennleistung. Das Enzym wurde vollständig gebunden und konnte durch eine stufenweise Elution mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen aufgereinigt werden. Mehr als 97 % der aufgetragenen Gesamtaktivität befand sich nachher in der 250 mM NaCl-Fraktion. Tabelle 34 zeigt eine repräsentative Anreicherung aus  $1.0 \cdot 10^{10}$  Zellen.

	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [mU]	spezifische Aktivität [mU/mg]
Rohextrakt	495	153	0.3
Vorlauf	150	0	0
150 mM NaCl	60	5	< 0.1
250 mM NaCl	195	144	0.7
325 mM NaCl	50	0	0

**Tabelle 34: Repräsentative Anreicherung der MIPS an Q-Sepharose FF**

Die spezifische Aktivität der MIPS betrug etwa 0.7 mU/mg in der aktivsten Fraktion und wurde somit gegenüber dem cytosolischen Extrakt um das dreifache angereichert. Zusätzlich neben der Anreicherung der MIPS erhielt man ein starke Volumenreduktion der Probe und eine Abtrennung von *myo*-Inositol und *myo*-Inositol 3-phosphat, die einen nicht unerheblichen Hintergrund bei der Aktivitätsbestimmung im Rohextrakt bzw. im cytosolischen Extrakt bildeten.

#### 4.1.2.3 Chromatographie an Hydroxylapatit

Die aktive Q-Sepharosefraktion wurde anschließend auf eine Hydroxylapatitsäule aufgetragen. Ausgehend von den sauren pI-Werten bekannter MIPS wurde dieser Chromatographieschritt für die Trennung von sauren Proteinen optimiert. Die Aktivität wurde vollständig gebunden und mit  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  eluiert. Die spezifische Aktivität der MIPS betrug etwa 4 mU/mg in der aktivsten Fraktion und wurde gegenüber der aufgetragenen aktiven Q-Sepharosefraktion um den Faktor 5 angereichert.

	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [mU]	spezifische Aktivität [mU/mg]
Q-Sepharose-Fraktion	195	144	0.7
Vorlauf	110	0	0
25 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	10	1.0	0.1
50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	8.9	34	3.8
75 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	10	0.3	0.1
100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	14	0	0

Tabelle 35: Repräsentative Anreicherung der MIPS an Hydroxylapatit

#### 4.1.2.4 Gelchromatographie an HPLC-Superdex 200HR

Die aktive Hydroxylapatitfraktion wurde konzentriert und auf eine HPLC-Superdex 200HR (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) aufgetragen. Die spezifische Aktivität der MIPS betrug etwa 20 mU/mg in den aktivsten Fraktionen (45-56 min) und wurde somit gegenüber der aufgetragenen aktiven Hydroxylapatit-Fraktion um den Faktor 5 angereichert.

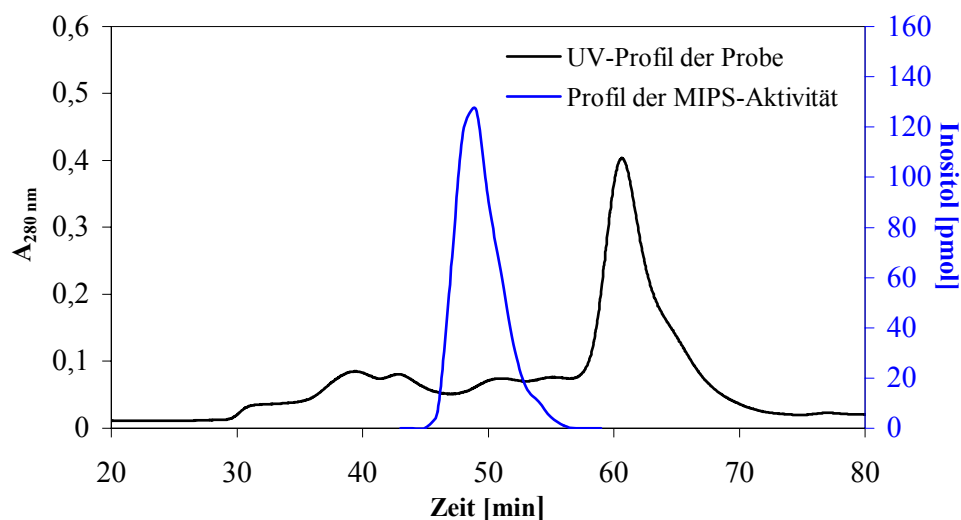


Abbildung 21: Elutionsprofil der Gelfiltration, Superdex 200HR (1 cm \* 30 cm, Volumen ca. 24 ml)

#### 4.1.2.5 Anionenaustauscher-Chromatographie an Resource-Q

Die vereinigten aktiven Fraktionen der Gelfiltration wurden auf eine Resource-Q Säule (Bettvolumen 0.5 ml) aufgetragen und mit einem linearen NaCl-Gradienten von 100-400 mM eluiert. Hierbei handelt es sich um einen hochauflösenden Anionenaustauscher mit hoher Trennleistung. Die Trennung erfolgte mit Hilfe einer HPLC-Pumpe, da sich materialbedingt ein hoher Gegendruck aufbaut. Die MIPS-Aktivität eluierte konzentriert in 1-2 Fraktionen zwischen 325-375 mM NaCl. Die spezifische Aktivität der MIPS betrug etwa 180 mU/mg in den vereinigten aktiven Fraktionen und wurde somit gegenüber der aufgetragenen aktiven Fraktion aus der Gelfiltration um den Faktor 9 angereichert.

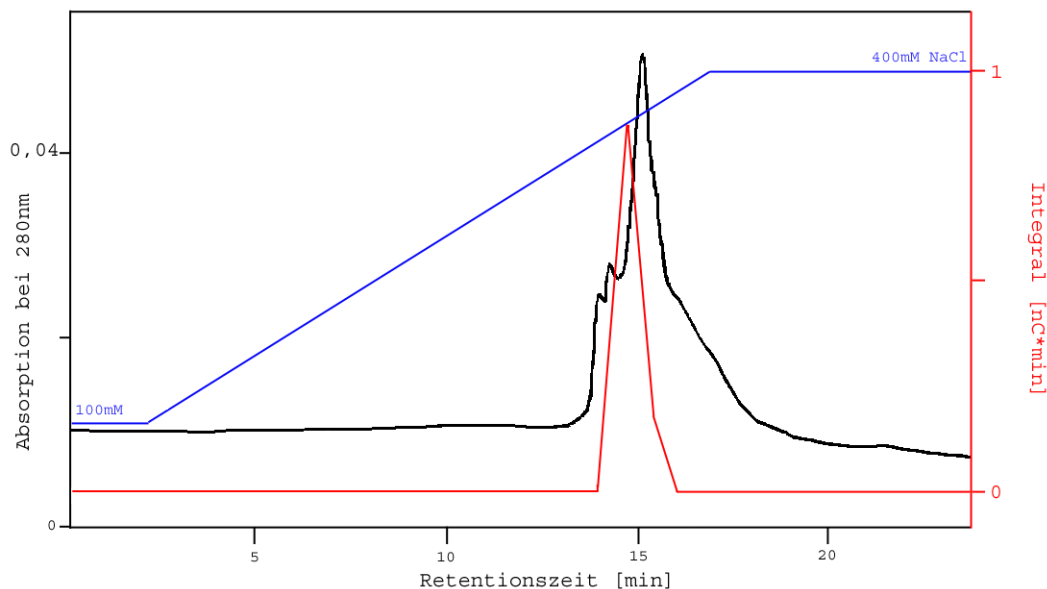


Abbildung 22: HPLC an Resource-Q mit einem linearen NaCl-Gradienten

#### 4.1.2.6 Zusammenfassung der Anreicherung

Tabelle 36 zeigt eine repräsentative Anreicherung der MIPS-Aktivität aus  $1 \cdot 10^{10}$  Zellen. Im Durchschnitt ergibt sich ein Anreicherungsfaktor von 500-1000. Versuche zur weiteren Aufreinigung des Enzyms mit Hilfe verschiedenster Materialien (Heparin, Kationenaustauscher, Phenyl-Sepharose, Chelat-Materialien) führten nur zu geringer Anreicherung oder zu hohen Ausbeuteverlusten. Versuche mit Affinitätsmaterialien (cAMP-Sepharose, immobilisiertes Glucose 6-phosphat, immobilisiertes 2-Desoxyglucose 6-phosphat) waren nicht erfolgreich.

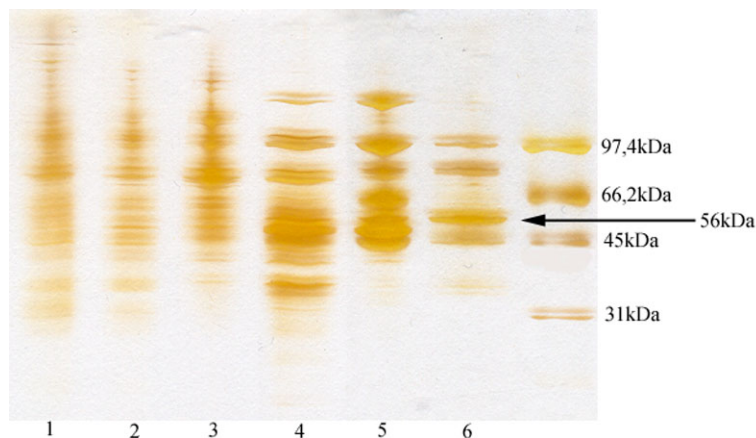
Die gereinigten MIPS-Präparationen sind ab dem ersten Reinigungsschritt stabil und lagerfähig. Eingefroren bei  $-20\text{ °C}$  oder  $-80\text{ °C}$  sind die Präparationen über Monate stabil.



Reinigungs- schritt	Proteinmenge [mg]	Gesamtaktivität [mU]	Spez. Aktivität [mU/mg]	Anreicherungs- faktor	Ausbeute [%]
Cytosolischer Extrakt	495	154	0.3	1	100
Q-Sepharose	195	144	0.7	2.4	93
Hydroxylapatit	8.9	34	3.8	12	62
Gelfiltration	0.8	15	20	66	10
Resource-Q	0.9	16	179	577	10

**Tabelle 36: Anreicherungstabelle, Zusammenfassung der Reinigungsschritte der MIPS aus einer repräsentativen Aufreinigung von  $1 \cdot 10^{10}$  Zellen**

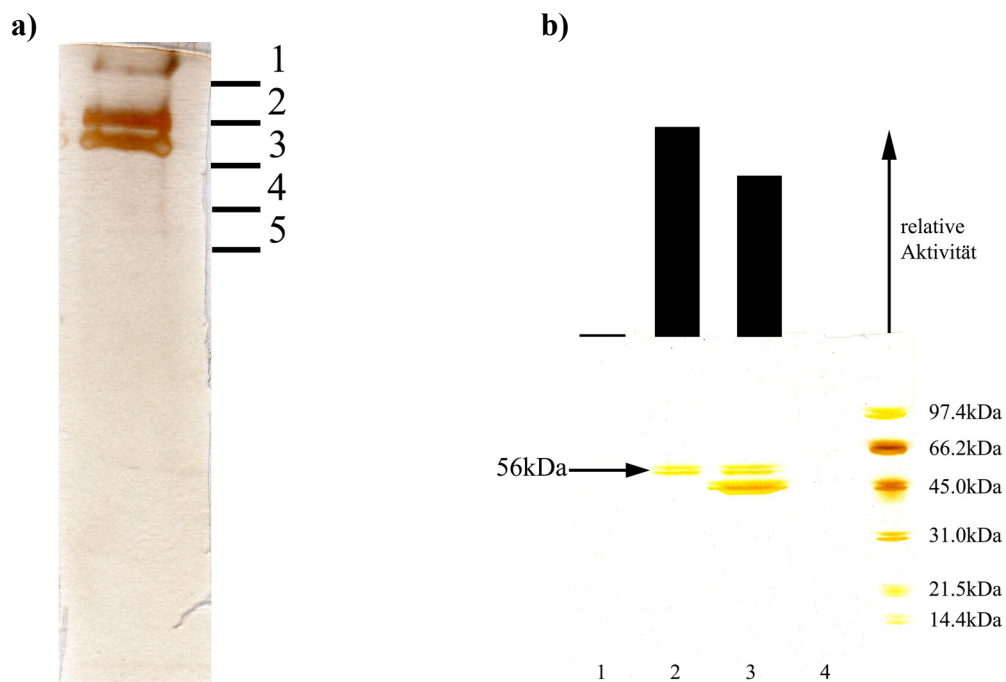
Abbildung 23 zeigt das dazugehörige Silber-gefärbte SDS-Gel. Unter denaturierenden Bedingungen zeigten sich in der Resource-Q-Fraktion vier Proteinbanden. Die prominenteste Bande zeigte ein Molekulargewicht von 56 kDa.



**Abbildung 23: SDS-Page (Gradient mit 5-15 % Quervernetzung, Proteinfärbung über Silberpräzipitierung) zu Tabelle 36**

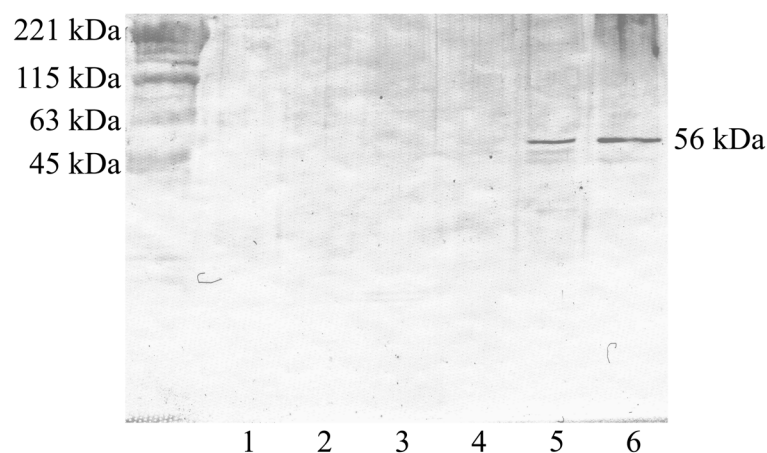
- |                                    |                                      |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Rohextrakt                      | 4. Chromatographie an Hydroxylapatit |
| 2. Cytosolischer Extrakt           | 5. Gelfiltration an Superdex 200HR   |
| 3. Anionenaustausch an Q-Sepharose | 6. Anionenaustausch an Resource-Q    |

Um sicherzustellen, dass die angereicherte 56 kDa-Bande von der MIPS stammt, wurde die Präparation nach der Resource-Q Säule mit Hilfe eines Microcon YM-10 (Amicon) konzentriert und einer nativen Gelelektrophorese unterworfen. Eine Gelbahn wurde durch Silberpräzipitierung angefärbt (Abbildung 24a), während eine zweite Gelbahn in 3 mm-Stücke zerkleinert (Fraktion 1-5) und das native Protein extrahiert wurde (Gel Nebulizer - Amicon). Der anschließende Enzymtest zeigte, dass nur in den Fraktionen 2-3 und damit in der prominentesten Bande MIPS-Aktivität vorhanden ist (Abbildung 24b). Eine anschließende SDS-Gelelektrophorese zeigte, dass diese Aktivität zu einer 56 kDa-Bande führt, die mit der in Abbildung 23 angereicherten Bande identisch ist.



**Abbildung 24:** a) Native Gelelektrophorese (12 % Quervernetzung, Proteinfärbung über Silberpräzipitierung) der Resource-Q Fraktion und b) Aktivitätsvergleich der aus a) isolierten Proteine mit anschließender SDS-PAGE (Gradient von 5-15 %, Proteinfärbung über Silberpräzipitierung).

Abbildung 25 zeigt die Verfolgung einer repräsentativen Anreicherung durch einen Western-Blot. Als Primärantikörper diente ein polyklonaler Antikörper gegen die MIPS aus *E.histolytica*. Es wurde ein Signal detektiert, dessen Intensität mit zunehmendem Verlauf der Anreicherung zunimmt. Dieses Signal ist mit der angereicherten Bande in Abbildung 23 identisch.



**Abbildung 25:** Verfolgung der Anreicherung der MIPS durch Immunoblot-Analyse

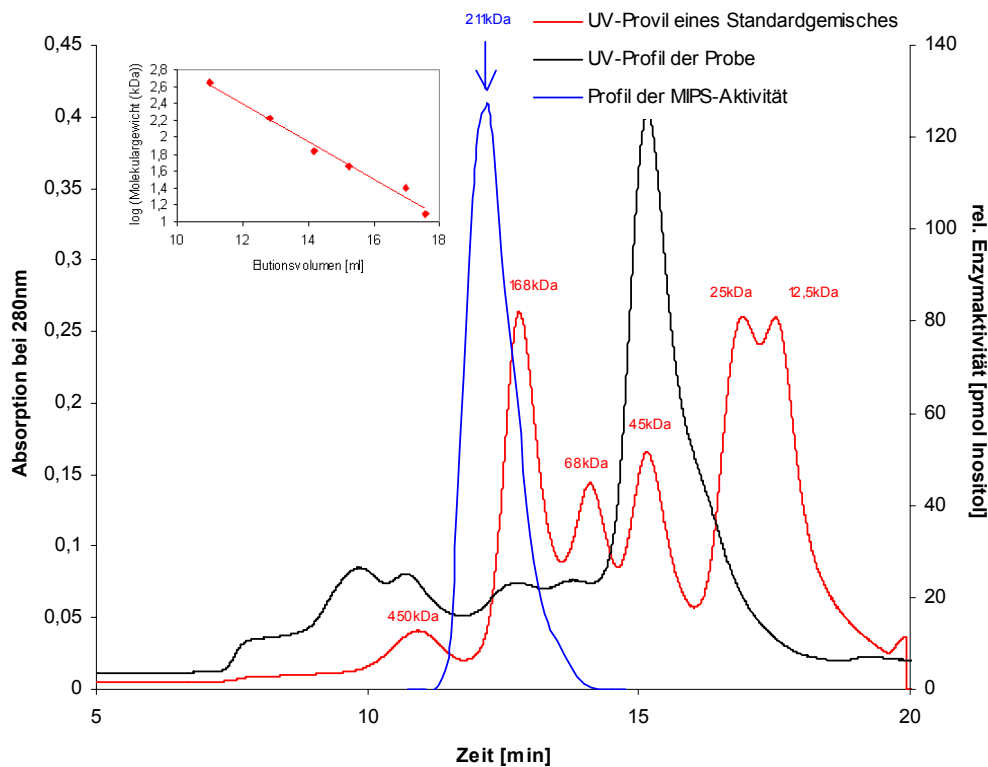
0.5 µg Protein wurden durch SDS-PAGE (5-15 % Quervernetzung) getrennt, auf PVDF-Membran transferiert und durch eine 1:1000-Verdünnung des Antikörpers gegen die MIPS aus *E.histolytica* detektiert.

- |                                    |                                      |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Rohextrakt                      | 4. Chromatographie an Hydroxylapatit |
| 2. Cytosolischer Extrakt           | 5. Gelfiltration an Superdex 200HR   |
| 3. Anionenaustausch an Q-Sepharose | 6. Anionenaustausch an Resource-Q    |

### 4.1.3 Charakterisierung der D-myo-Inositol-3-phosphat Synthase

#### 4.1.3.1 Molekulargewicht

Die Molekularmasse der nativen MIPS wurde mit Hilfe der Gelfiltration bestimmt. Gemittelt aus drei verschiedenen Messungen ergab sich ein Molekulargewicht für das native Enzym von  $221 \pm 10$  kDa.



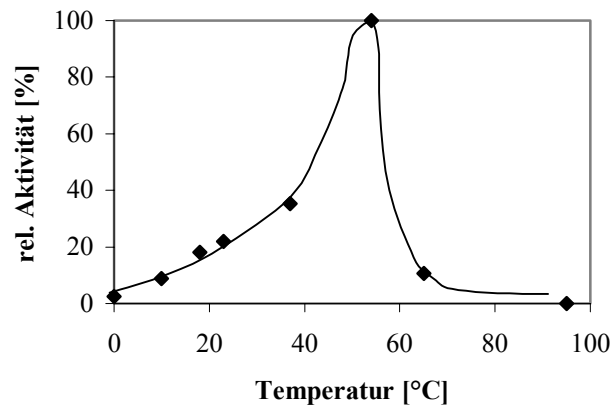
**Abbildung 26:** Elutionsprofil einer repräsentativen Gelfiltration, Superdex 200HR (1 cm \* 30 cm, Volumen 24 ml)

Oben links eingesetzt: Kalibriergerade der Gelfiltration mit Standardprotein).

Dieses deckt sich gut mit den in der Literatur beschriebenen Werten aus anderen Organismen (Tabelle 1). Das Molekulargewicht der denaturierten MIPS in der SDS-PAGE wurde bereits im Kapitel 4.1.2.6 mit 56 kDa ermittelt. Folglich handelt es sich bei der MIPS aus *D.discoideum* um ein tetrameres Enzym.

#### 4.1.3.2 Temperaturabhängigkeit

Die Aktivität der MIPS steigt mit zunehmender Temperatur langsam an, erreicht bei 56 °C ein Maximum und fällt bei höheren Temperaturen drastisch ab. Dieser Abfall ist auf Denaturierung des Enzyms zurückzuführen. Eine erneute Inkubation bei geringeren Temperaturen zeigte keine nachweisbare Aktivität.



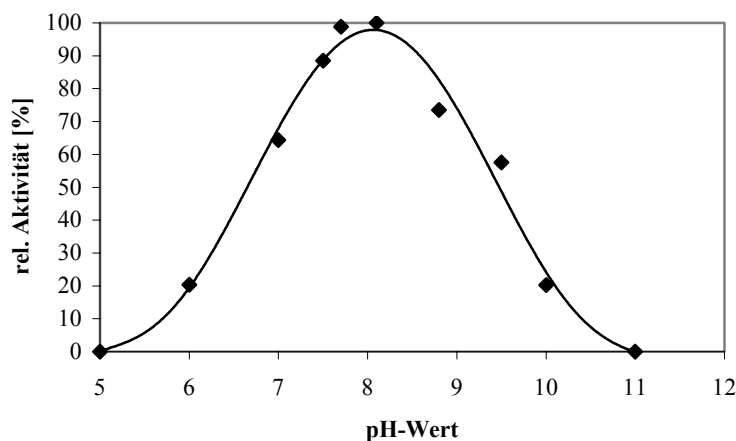
**Abbildung 27: Temperatur-Abhängigkeit der myo-Inositol 3-phosphat Synthase Aktivität**

Testbedingungen: 50 mM MOPS, 1 mM NAD<sup>+</sup>, 5 mM Glucose 6-phosphat, 14 mM NH<sub>4</sub>Cl; pH 8.0 bei 37 °C. Zum Einsatz kam hierbei eine angereicherte HA-Fraktion.

Damit zeigt das Enzym aus *D.discoideum* das höchste Temperaturmaximum aller eukaryotischen MIPS. Nur die MIPS aus *A.fulgidus*, einem hyperthermophilen Archaeon, zeigt ein Aktivitätsmaximum >60 °C.<sup>53</sup>

#### 4.1.3.3 pH-Abhängigkeit

Die pH-Abhängigkeit der MIPS ergab eine nahezu symmetrische Gaußsche Glockenkurve. Das pH-Optimum lag bei 8.0±0.2 pH-Einheiten und korreliert damit gut mit Literaturangaben (Tabelle 1). Das basische pH-Optimum deutet auf eine Beteiligung von basischen Aminosäuren im aktiven Zentrum hin.



**Abbildung 28: pH-Abhängigkeit der myo-Inositol 3-phosphat Synthase Aktivität**

Testbedingungen: 50 mM Puffer, 1 mM NAD<sup>+</sup>, 5 mM Glucose 6-phosphat, 14 mM NH<sub>4</sub>Cl bei 37 °C. Zum Einsatz kam hierbei eine angereicherte HA-Fraktion. Verwendete Puffer:

pH 5.0:	50 mM Natriumacetat
pH 6.0:	50 mM Mes
pH 6.0-8.0:	50 mM MOPS
pH 8.0-11.0:	50 mM Tris

#### 4.1.3.4 Substratspezifität

Um erste Anhaltspunkte über die Substratspezifität der MIPS aus *D.discoideum* zu erhalten wurde Glucose 6-phosphat durch verschiedene Monosaccharidphosphate ersetzt.

Neben dem natürlichen Substrat Glucose 6-phosphat wurde kein Monosaccharidphosphat als Substrat akzeptiert. Die gemessene Produktbildung im Falle von Fructose 6-phosphat ist wahrscheinlich auf eine Nebenaktivität der Glucosephosphat-Isomerase in der gemessenen Präparation zurückzuführen. Die Glucosephosphat-Isomerase katalysiert die Isomerisierung von Fructose 6-phosphat zu Glucose 6-phosphat, das anschließend durch die MIPS zu *D-myo*-Inositol 3-phosphat umgewandelt wird. Dieses wird auch durch das Auftreten eines Glucose-Peaks in den Chromatogrammen belegt.

Substrat	Rel. Aktivität [%]
Glucose 6-phosphat	100
Mannose 6-phosphat	0
Galaktose 6-phosphat	0
Fructose 6-phosphat	1.2
Ribulose 5-phosphat	0

**Tabelle 37: Phosphorylierte Monosaccharide als Substrate für die MIPS aus *D.discoideum***

Alle Enzymtests erfolgten bei Substratkonzentrationen von 5 mM. Als Enzym-Präparation diente die mit 250 mM NaCl eluierte Fraktion von der Q-Sepharose-Säule.

Diese hohe Spezifität der MIPS ist auch aus anderen Organismen bekannt. Die MIPS aus *S.cerevisiae* wurde bisher nur für die Synthese des natürlichen Produkts Ins(3)P eingesetzt.<sup>325</sup> Die enzymatische Synthese von Ins(3)PS aus D-Glucose 6-phosphorthioat mit der MIPS aus Rinderhoden gelang nicht.<sup>326</sup> Jedoch katalysiert die MIPS aus Rinderhoden die Zyklisierung von Mannose 6-phosphat zu *neo*-Inositol 3-phosphat mit 3 % der Aktivität und die Umsetzung von 2-Desoxyglucose 6-phosphat zu L-3-Desoxy-*myo*-Inositol mit 0.2 % der Aktivität gegenüber Glucose 6-phosphat.<sup>327</sup>

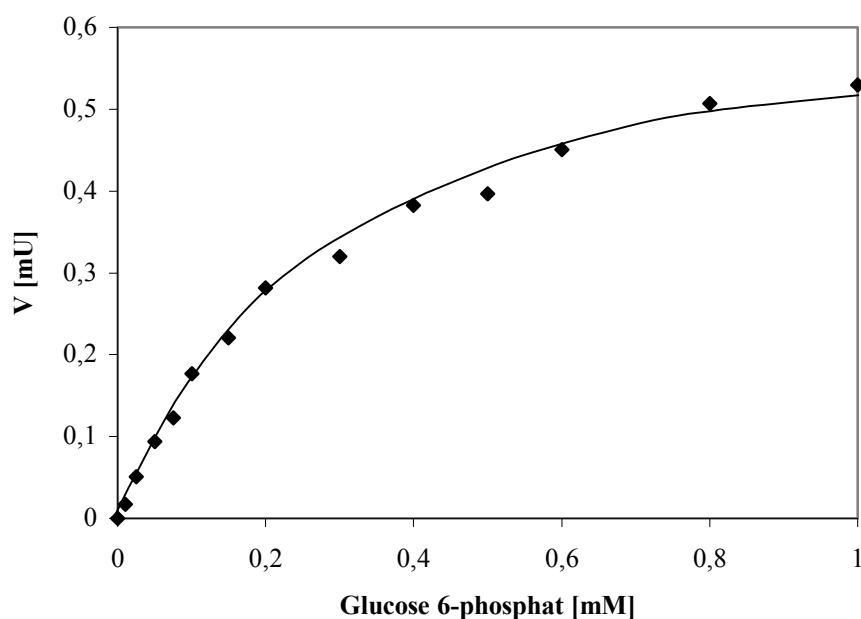
#### 4.1.3.5 Kinetische Parameter

Die MIPS katalysiert die Umwandlung von Glucose 6-phosphat zu *myo*-Inositol 3-phosphat über eine intramolekulare Aldolkondensation. Die Kinetiken der publizierten MIPS gehorchten für Glucose 6-phosphat den Gesetzmäßigkeiten des Michaelis-Menten-Modells.

Die aus dem Michaelis-Menten-Modell ermittelten kinetischen Konstanten liefern wichtige Informationen über die Eigenschaften eines Enzyms. Die Michaelis-Konstante  $K_M$  entspricht häufig der Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes und ist somit ein

Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Zusätzlich kann über die Maximalgeschwindigkeit  $v_{\max}$  die Wechselzahl des Enzyms (umgesetzte Substratmoleküle pro Enzymmolekül und Sekunde) berechnen.

Um zu überprüfen, ob die MIPS den Gesetzmäßigkeiten der Michaelis-Menten-Kinetik folgt wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemessen. Da die MIPS neben dem Substrat auch noch geringe Mengen  $\text{NAD}^+$  benötigt, wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in Gegenwart von 1 mM  $\text{NAD}^+$  bestimmt. Der resultierende Kurvenverlauf zeigt, dass die enzymatische Reaktion dem Michaelis-Menten-Modell gehorcht.



**Abbildung 29: Anfangsgeschwindigkeit  $v$  in Abhängigkeit von der Substratkonzentration**

Inkubationsbedingungen: 50 mM MOPS, 14 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{NAD}^+$ ; pH 8.0. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C. Zum Einsatz kam hierbei eine hochangereicherte Resource-Q-Präparation mit 180 mU/mg.

Die Parameter der Michaelis-Menten-Gleichung wurden nach der Methode von Lineweaver-Burk ermittelt. Es ergab sich eine Michaelis-Konstante von 0.324 mM und eine Maximalgeschwindigkeit von 0.696  $\mu\text{M}/\text{min}$ . Die gefundenen Parameter stehen in Übereinstimmung mit publizierten Daten (Tabelle 1).

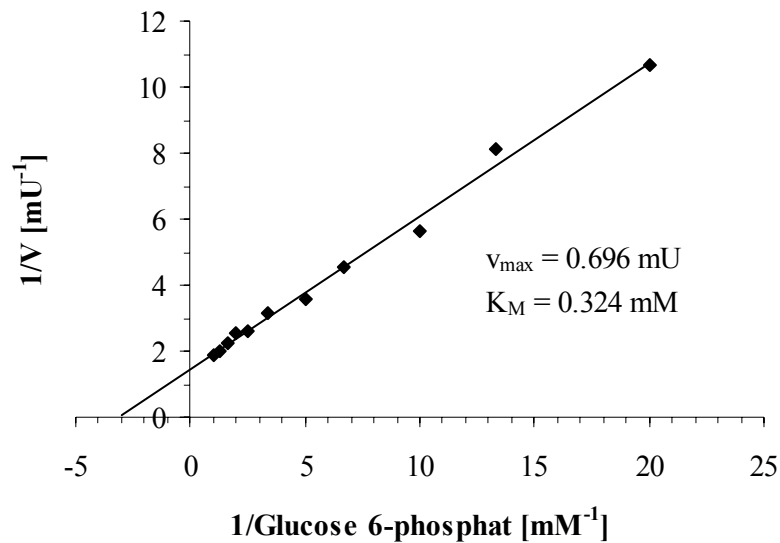


Abbildung 30: Lineweaver-Burk-Auftragung zur Bestimmung von  $K_M$  und  $v_{max}$

Die in der Literatur beschriebenen Michaelis-Konstanten bewegen sich häufig im Bereich von einigen mM. Wie Inhibitorstudien belegen, bindet vermutlich nur das azyklische Glucose 6-phosphat Tautomer an das Enzym.<sup>338</sup> Das azyklische Tautomer liegt jedoch im Gleichgewicht mit der zyklischen Form nur zu 0.4 % vor und würde dementsprechend zu einer wesentlich kleineren Michaelis-Konstante führen.

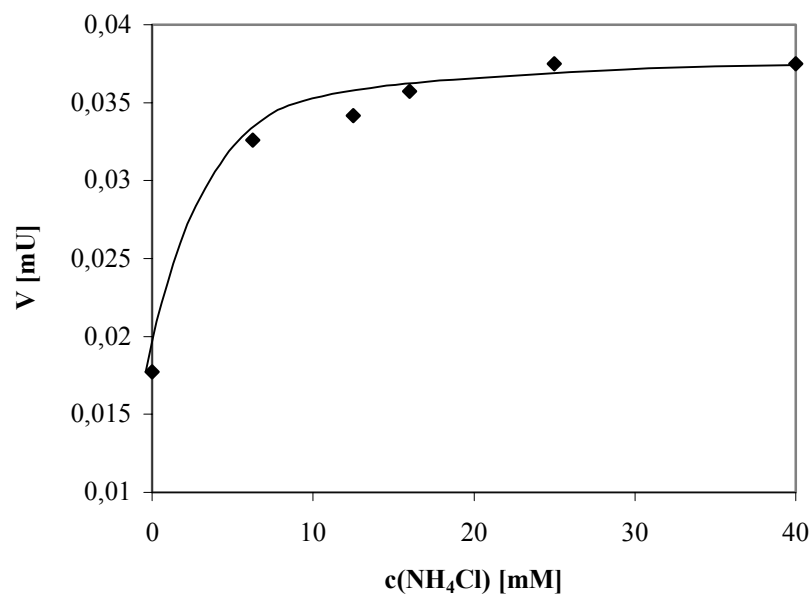
Um die Wechselzahl aus der ermittelten Maximalgeschwindigkeit zu berechnen muss berücksichtigt werden, dass es sich bei der benutzten Präparation nicht um ein homogenes Enzym handelt. Eingesetzt wurde eine ca. 1000fach gereinigte Präparation, in der die MIPS ca. 10 % des Proteingehalts ausmacht. Aus der für die Enzympräparation ermittelten Maximalgeschwindigkeit von 0.696  $\mu\text{M}/\text{min}$ , der Molekularmasse und der im Test vorhandenen MIPS-Menge von ca. 0.06 $\mu\text{g}$  ergibt sich eine Wechselzahl von 2 Substratmolekülen pro Sekunde. Diese geringen Wechselzahlen sind typisch für MIPS. Höhere Wechselzahlen sind nur aus Archaeobakterien bekannt, die *D-myo*-Inositol 3-phosphat zur Synthese von *Di-myo*-Inositol-1,1-phosphat benötigen. Dieses dient als Osmolyt und wird unter hyperosmotischen Bedingungen von der Zelle gebildet.<sup>53</sup>

#### 4.1.3.6 Aktivierung und Inhibierung der MIPS aus *D.discoideum*

Aldolasen werden üblicherweise in zwei Klassen eingeteilt. Bei Aldolasen der Klasse I bildet ein Lysin im aktiven Zentrum mit der Ketogruppe des Substrats eine Schiffsche Base. Aldolasen der Klasse II gehen keine kovalente Bindung mit dem Substrat ein, benötigen jedoch divalente Kationen (z.B.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) zur Stabilisierung des Carbanions am Anfang der Cyclisierung. Typischerweise werden Aldolasen der Klasse II durch EDTA inhibiert.

Die eukaryotischen MIPS werden zu den Klasse I Aldolasen gezählt. Sie werden nicht durch EDTA inhibiert, jedoch durch monovalente Ionen ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) aktiviert. Als mögliche Erklärung für diese Stimulierung wird eine Interaktion des monovalenten Ions mit dem Keto-Enol Tautomer und eine Stabilisierung des Carbanions angenommen.<sup>40</sup>

Bei der MIPS aus *D.discoideum* handelt es sich um eine Klasse I Aldolase. Sie wird nicht durch EDTA inhibiert und es ist auch kein Einfluss divalenter Kationen wie  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$  auf die Reaktion zu beobachten. Die Aktivität der MIPS aus *D.discoideum* wird jedoch durch monovalente Ionen wie  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Na}^+$  erhöht.

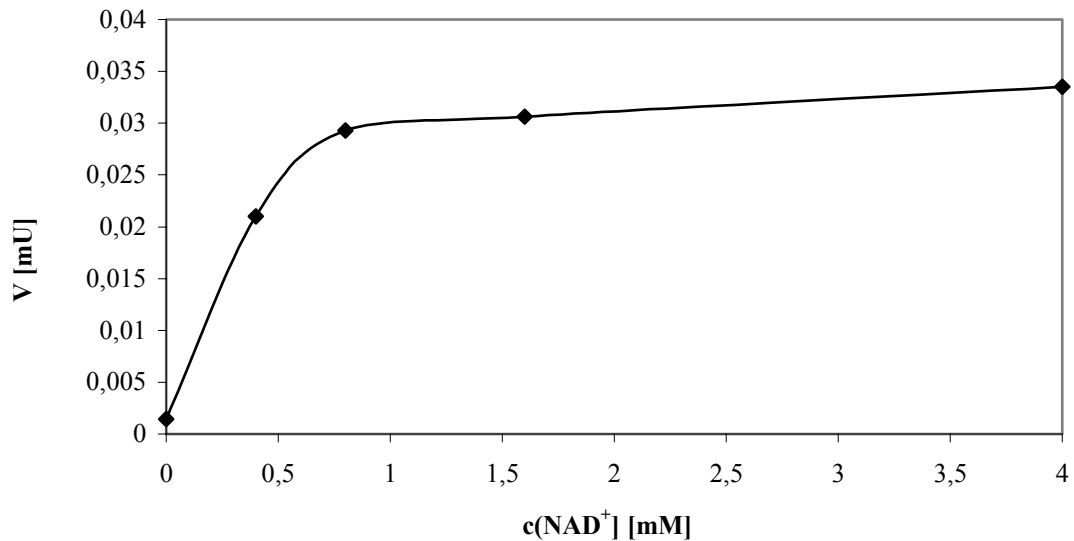


**Abbildung 31: Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration**

Inkubationsbedingungen: 50 mM MOPS, 5 mM Glucose 6-phosphat, 1 mM  $\text{NAD}^+$ ; pH 8,0. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C.

Im Gegensatz zu anderen  $\text{NAD}^+$ -benötigenden Enzymen verbraucht die MIPS dieses nicht. Da jedoch im Verlaufe der Reaktion  $\text{NAD}^+$  vom Enzym dissoziieren kann, muss eine gewisse Menge  $\text{NAD}^+$  dem Enzymsatz beigelegt werden. Bei der MIPS aus *D.discoideum* erwies sich eine Konzentration von 1 mM  $\text{NAD}^+$  als optimal.



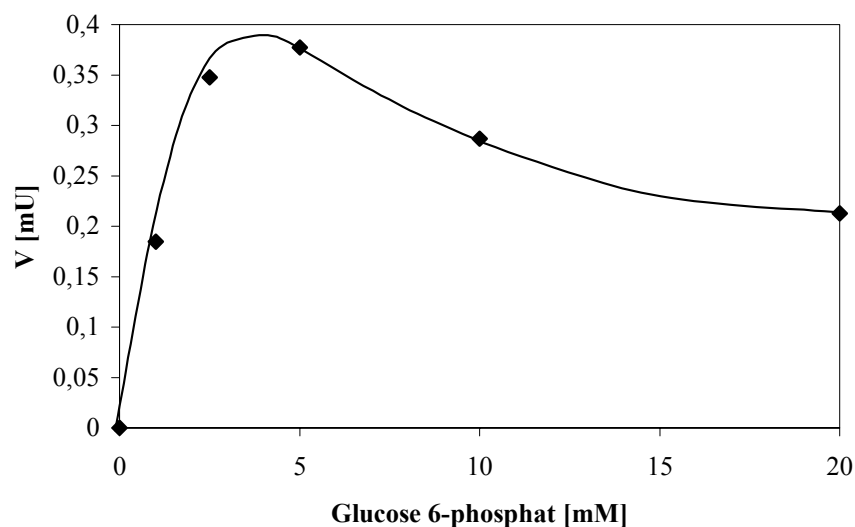


**Abbildung 32: Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der NAD<sup>+</sup>-Konzentration**

Inkubationsbedingungen: 50 mM MOPS, 14 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM Glucose 6-phosphat; pH 8.0. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C.

Die in der Literatur beschriebenen MIPS werden durch Sulfhydryl-Reagenzien, verschiedene Schwermetalle, anorganisches Phosphat und Diphosphat inhibiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde kein inhibierender Einfluss dieser Verbindungen auf die MIPS-Aktivität aus *D.discoideum* beobachtet.

Die MIPS wird durch hohe Substratkonzentrationen > 5 mM inhibiert. Dieses Verhalten ist jedoch für Enzyme nicht ungewöhnlich.<sup>328</sup> Eine Produktinhibierung der MIPS wurde nicht festgestellt.

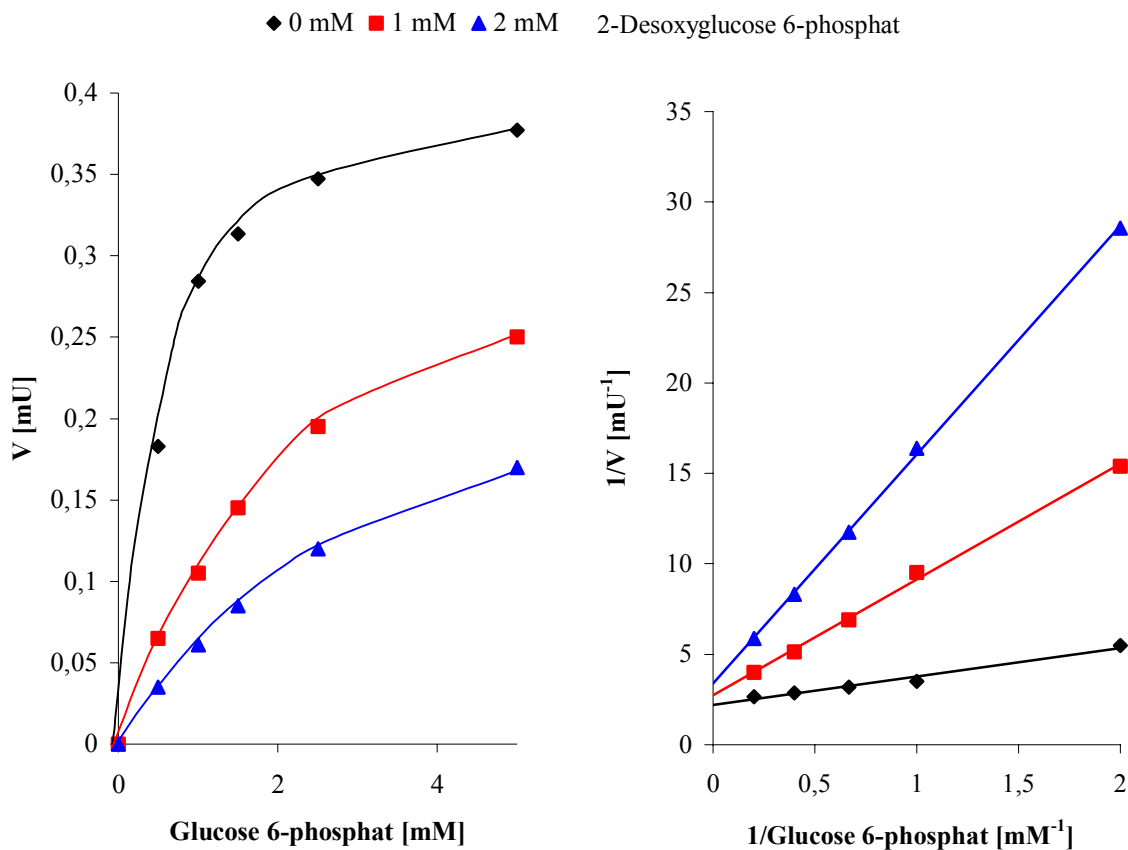


**Abbildung 33: Substratinhibierung der MIPS aus *D.discoideum***

Inkubationsbedingungen: 50 mM MOPS, 14 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM NAD<sup>+</sup>; pH 8.0. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C.

Neben der Substratinhibierung konnte auch eine Inhibierung durch verschiedene Substratanaloga beobachtet werden. 2-Desoxyglucose 6-phosphat, Fructose 6-phosphat und Mannose 6-phosphat hemmen die MIPS.

Abbildung 34 zeigt die Inhibierung exemplarisch am Beispiel von 2-Desoxyglucose 6-phosphat. Es handelt sich hierbei um eine kompetitive Inhibierung, d.h. das Substrat und der Inhibitor konkurrieren um die Substratbindungsstelle im Enzym. Die Inhibitorkonstante beträgt 0.3 mM. Die Hemmung der MIPS durch Fructose 6-phosphat und Mannose 6-phosphat zeigte sich erst bei Konzentrationen > 5mM.



**Abbildung 34: Inhibierung der MIPS aus *D.discoideum* durch 2-Desoxyglucose 6-phosphat**

Anfangsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration and dazugehöriger Lineweaver-Burk-Graph. Inkubationsbedingungen: 50 mM MOPS, 14 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{NAD}^+$ ; pH 8.0. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C.

Versuche die Inhibierung der MIPS durch 2-Desoxyglucose 6-phosphat für die Synthese eines Affinitätsmaterials auszunutzen, verliefen aufgrund der geringen Affinität erfolglos. Neuere Studien mit Substratanaloga der offenkettigen Form von Glucose 6-phosphat zeigen, dass diese einen wesentlich stärkeren inhibierenden Einfluss auf die MIPS ausübt. 2-Deoxy-

D-Glucitol 6-(E)-vinylhomophosphonat zeigt beispielsweise einen  $K_i$  von  $0,67 \mu\text{M}$ .<sup>329</sup> Dieses legt den Verdacht nahe, dass nur das azyklische Tautomer von Glucose 6-phosphat an das Enzym bindet.

Die Erniedrigung des *myo*-Inositolniveaus im Gehirn durch Inhibierung der IMPase ist möglicherweise die Wirkung bei der Therapie von manischer Depression mit  $\text{Li}^+$ .<sup>28</sup> Die *in vivo* Hemmung der MIPS im Gehirn könnte ebenfalls dazu beitragen die *myo*-Inositolkonzentration im Gehirn zu senken und so eine alternative Therapiemöglichkeit für die manische Depression bieten. Einige der bei der MIPS-katalysierten Reaktion entstehenden Zwischenprodukte und ihre Analoga (DL-2-Desoxy-*myo*-Inositol 1-phosphat, DL-1-Desoxy-1-Phosphonomethyl-*myo*-2-inosose und DL-*myo*-2-Inosose 1-phosphat) wurden vor diesem Hintergrund als MIPS-Inhibitoren untersucht.<sup>330</sup>

#### 4.1.3.7 pI-Wert

Der isoelektrische Punkt der MIPS wurde durch Chromatofokussierung (siehe 3.3.9) bestimmt und liegt bei  $5.5 \pm 0.3$ . Dieser saure isoelektrische Punkt ist typisch für cytosolische Proteine in *D.discoideum* und deckt sich mit den Literaturangaben von bekannten MIPS.<sup>46</sup>

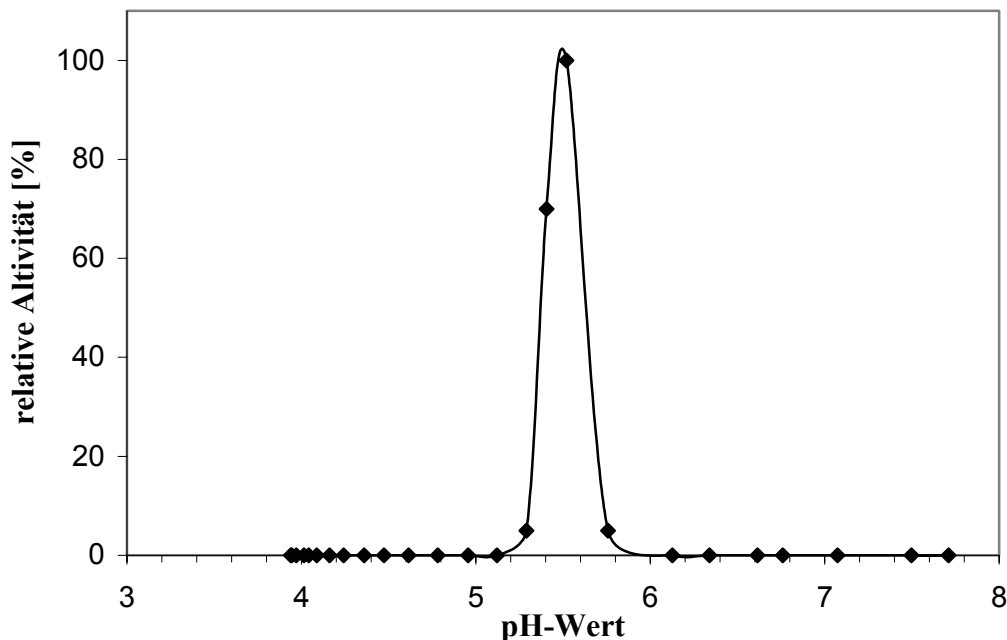


Abbildung 35: Elutionsprofil der Chromatofokussierung, PBE94® (5ml)

## 4.2 Gezielte Generierung von inositol-auxotrophen Mutanten

Um die Funktion der MIPS genauer zu analysieren, wurden mit verschiedenen Techniken gezielt inositol-auxotrophe Mutanten generiert.

Zum Einsatz kam dabei sowohl eine konventionelle Mutagenese mit Hilfe von N'-Methyl N'-Nitro N-Nitrosoguanidin, einer mutagenen Substanz die ungerichtete Punktmutationen im gesamten Genom verursacht, als auch die zielgerichtete Mutagenese durch homologe Rekombination und Antisense-Mutation. Diese Strategien haben im Idealfall den vollständigen Ausfall der Expression der MIPS zur Folge.

Eine weitere Möglichkeit, inositol-auxotrophe Mutanten zu generieren, besteht in der gezielten Manipulation der Inositolmonophosphat Phosphatase mit Hilfe der Antisense-Mutagenese. Mutanten mit Defekten in der Inositolmonophosphat Phosphatase wären in der Lage Ins(3)P aus Glucose 6-phosphat zu synthetisieren, jedoch wäre es ihnen unmöglich dieses zu dephosphorylieren. Unter Inositolmangel wäre die Synthese der höherphosphorylierten Inositolphosphate aus Ins(3)P gewährleistet, ein Einbau von *myo*-Inositol in PtdIns jedoch nicht mehr möglich. Damit könnte der Inositolphosphatstoffwechsel vom Phosphatidylinositol-phosphatstoffwechsel abgekoppelt werden. Auftretende Defekte unter Inositolmangel wären in diesen Mutanten nur auf einen gestörten Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsel zurückzuführen.

### 4.2.1 Voraussetzungen

Aus dem c-DNA Projekt der Tsukuba Universität (Japan)<sup>331</sup> stand eine 1.7 kB große cDNA (FC-AA11) zur Verfügung, die weitgehende Homologien zu bekannten MIPS aus anderen Organismen aufweist. Zudem war eine 0.9 kB große cDNA (FC-BP15) verfügbar, die weitgehende Homologien zu bekannten Inositolmonophosphat Phosphatasen aus anderen Organismen zeigt. Diese cDNA's dienten als Ausgangsmaterial für die homologe Rekombination und für Antisense-Experimente. Die erfolgreiche Generierung inositol-auxotropher Mutanten ist jedoch von verschiedenen weiteren Faktoren abhängig.

#### 4.2.1.1 Aufnahme von *myo*-Inositol durch *D.discoideum*

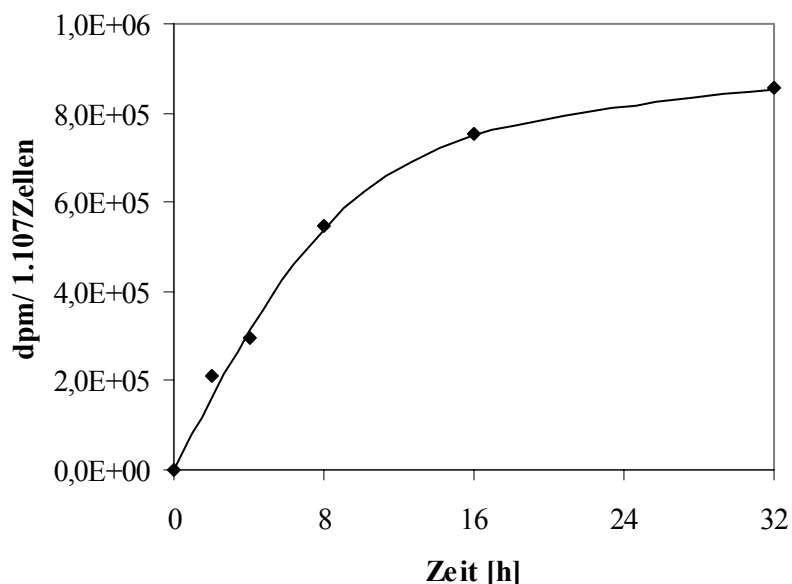
Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Isolierung von auxotrophen Mutanten ist die Aufnahme der fehlenden Stoffe aus dem Medium. In der Literatur

beschriebene uracil-<sup>332</sup> bzw. thymidin-auxotrophe<sup>333</sup> Mutanten zeigen, dass *D.discoideum* grundsätzlich dazu in der Lage ist.

Durch die zentrale Lage des *myo*-Inositols in verschiedensten Stoffwechselwegen ist es wahrscheinlich, dass die Manipulation der Expressionslevels der MIPS bzw. ein vollständiger „knock out“ des kodierenden Gens sich als letal für *D.discoideum* herausstellt.

Unter diesen Bedingungen wäre eine Kultivierung der Mutanten nur möglich, wenn das zum Leben benötigte *myo*-Inositol aus dem Medium aufgenommen werden könnte. Literaturdaten<sup>365</sup> und eigene Experimente mit <sup>3</sup>H-markiertem *myo*-Inositol zeigten eindeutig, dass *myo*-Inositol von axenisch wachsenden *D.discoideum* aufgenommen und in die Zelle eingebaut werden kann.

Abbildung 36 zeigt die Aufnahme von <sup>3</sup>H-markiertem *myo*-Inositol in *D.discoideum*. Aufgenommen wird das *myo*-Inositol aus dem Medium über Pinozytose. Ein Zusatz des Pinozytoseinhibitors Cycloheximid führte nur zu einer geringfügigen Internalisierung von *myo*-Inositol. Der schnelle Anstieg der Markierung in den ersten Stunden ist auf die pinozytische Aufnahme des markierten *myo*-Inositols, der spätere langsamere Anstieg auf den Einbau des markierten *myo*-Inositols in die Zellsubstanz zurückzuführen. Im Gegensatz dazu zeigen nicht-metabolisierbare Pinozytosemarker eine stationäre Phase, die aus dem Gleichgewicht von pinozytiertem und exozytiertem Marker resultiert.

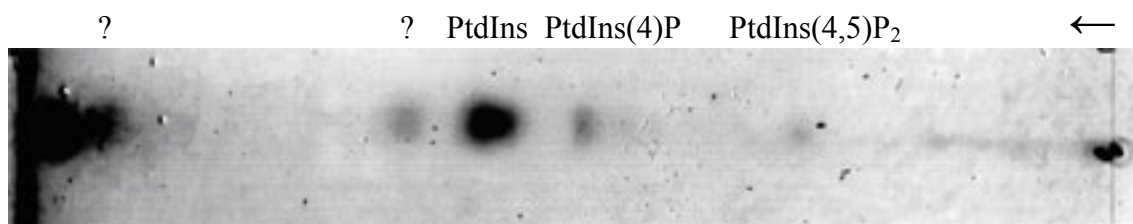


**Abbildung 36: Aufnahme von <sup>3</sup>H-markiertem *myo*-Inositol in axenisch wachsenden Zellen**

In Gegenwart von <sup>3</sup>H-markiertem *myo*-Inositol wachsende Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationszähler vermessen.

Für erfolgreiche Mutagenese-Experimente ist eine weitere Grundvoraussetzung die Verstoffwechslung des aufgenommenen *myo*-Inositols. Wie die nachfolgenden Abbildungen zeigen ist *D.discoideum* in der Lage, internalisiertes *myo*-Inositol als Synthesebaustein für Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositolphosphate und Inositolphosphate zu nutzen.

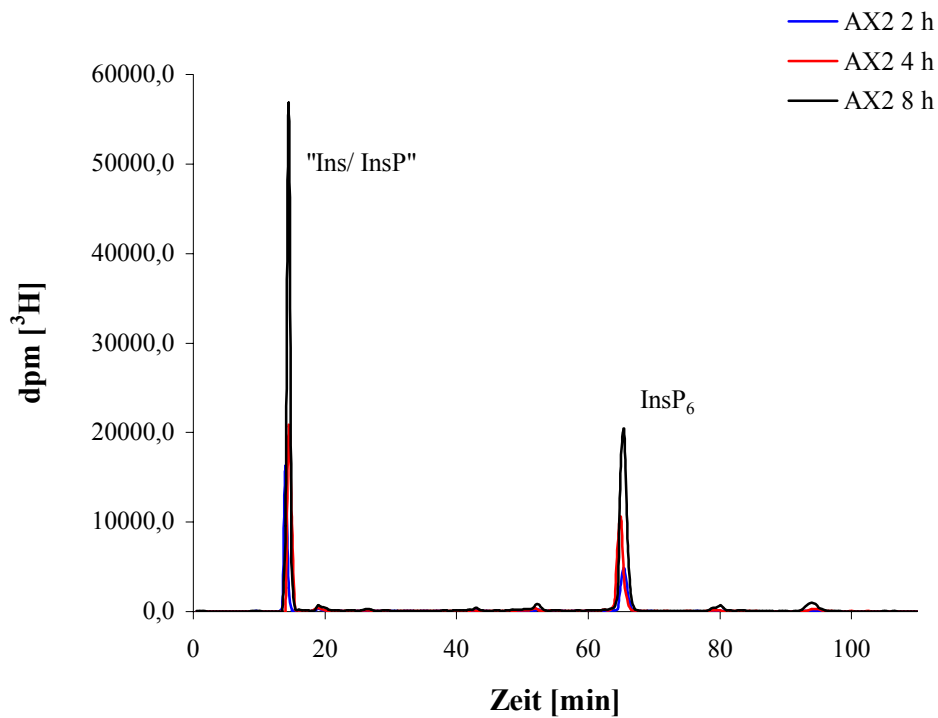
Die Zuordnung der Signale erfolgte mit nichtradioaktiven Standardsubstanzen, die in einer Iodkammer angefärbt wurden. Zwei weitere Signale sind zu sehen, diese konnten jedoch nicht zugeordnet werden.



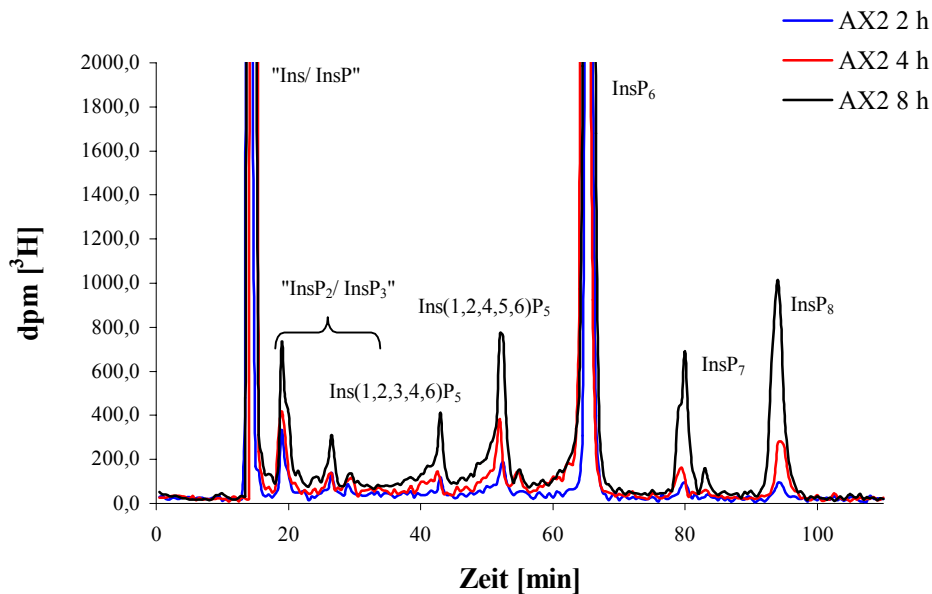
**Abbildung 37: Einbau von <sup>3</sup>H-markierten Inositol in Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositolphosphaten in *D.discoideum***

Die Markierung erfolgte durch 16 h Inkubation mit <sup>3</sup>H-markierten *myo*-Inositol. Die Lipide wurden mit 10 %iger TCA gefällt und mit Chloroform/Methanol/37 %ige HCl (20:40:1 vol) extrahiert. Die Auftrennung erfolgte auf imprägnierten HPTLC-Platten (1 % Kaliumoxalat/2 mM EGTA in Wasser/Methanol (3:2 vol)), die vorher durch 20 min Erhitzen auf 120 °C aktiviert wurden. Als Laufmittel diente Chloroform/ Aceton/ Methanol/ Essigsäure/ Wasser (40:15:13:12:7 vol).

a.



b.



**Abbildung 38: Zeitlicher Einbau von  $^3\text{H}$ -markierten *myo*-Inositol in verschiedenen Inositolphosphaten**

Die Markierung erfolgte durch Inkubation mit  $^3\text{H}$ -markierten *myo*-Inositol. Die Inositolphosphate wurden isoliert und mit Hilfe des sauren Systems an einer Mono-Q Säule fraktioniert getrennt. Die Fraktionen wurden anschließend mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationszähler vermessen. Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe von nichtradioaktiven Standardsubstanzen.

- a) Übersichtschromatogramm
- b) Vergrößerung von a) zur Zuordnung nichtprominenter Inositolphosphate

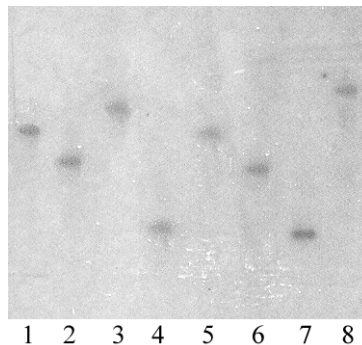
Die Aufnahme von *myo*-Inositol aus dem Medium und Einbau in zelleigene Verbindungen bei *D.discoideum* deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur. Die beschriebenen inositol-auxotrophen Mutanten von *S.cerevisiae*<sup>334</sup>, *N.crassa*<sup>335</sup>, *U.hordei*<sup>336</sup> und *L.mexicana*<sup>127</sup> sind alle in Gegenwart von *myo*-Inositol kultivierbar.

#### 4.2.1.2 Vorliegen der MIPS aus *D.discoideum* als „single copy gen“

Eine weitere Voraussetzung zur Inaktivierung des *INO1*-Gens bei *D.discoideum* ist das Vorliegen als „single copy gen“. Im Gegensatz zur Antisense Mutagenese – bei der auch Genfamilien ausgeschaltet werden können – besteht sowohl bei der chemischen Mutagenese als auch bei der homologen Rekombination nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit, mehrere Gene auszuschalten.

Um den Nachweis für ein „single copy gen“ zu führen, wurde DNA aus AX2 isoliert und mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen, die keine Erkennungsstelle im *INO1*-Gen zeigten, oder mit Kombinationen derselben behandelt. Die aus dem Verdau resultierenden Fragmente wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Membran wurde anschließend mit der radioaktiv markierten cDNA hybridisiert.

Abbildung 39 zeigt deutlich nur ein Signal pro Spur, was das Vorhandensein von lediglich einer Kopie von *INO1*-Gen im Genom bestätigt.



**Abbildung 39: Genomischer Southern-Blot von AX2**

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| 1. <i>Hind</i> III                 | 5. <i>Hind</i> III + <i>Bam</i> HI                 |
| 2. <i>Eco</i> RI                   | 6. <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI                   |
| 3. <i>Bam</i> HI                   | 7. <i>Hind</i> III + <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI |
| 4. <i>Hind</i> III + <i>Eco</i> RI | 8. genomische DNA                                  |

Bei der MIPS handelt es sich um ein hochkonservatives Protein, dass in den meisten untersuchten Organismen vermutlich nur durch ein Gen kodiert wird. Eine Ausnahme hierbei sind pflanzliche MIPS. Verschiedene Pflanzen besitzen sowohl eine cytosolische Form als auch eine chloroplastische Form der MIPS.<sup>47</sup> Southern-Blot-Analysen von *S.indicum* L.-DNA zeigen, dass 2-3 Kopien von *SeMIPS1* im Genom vorhanden sind.<sup>337</sup>



#### 4.2.1.3 Homologie der abgeleiteten Proteinsequenz zu anderen Organismen

Eine wichtige Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Generierung inositol-auxotropher Mutanten ist, dass die cDNA wirklich für die MIPS aus *D.discoideum* kodiert. Da die cDNA-Sequenz nicht vollständig bekannt war, wurde der aus Tsukuba erhaltene Klon FC-AA11 zunächst sequenziert. Die vollständige Sequenz ist im Anhang 6.1 wiedergegeben.

Ein Ähnlichkeitsvergleich abgeleiteter MIPS Proteinsequenzen aus verschiedenen Quellen mit der aus der cDNA abgeleiteten Proteinsequenz (Anhang 6.2) zeigt einen hohen Grad an Homologie. Das „Alignment“ erfolgte mit der Clustal W-Methode. Grauunterlegt sind hochkonservierte Sequenzbereiche die in allen eukaryotischen MIPS auftreten.<sup>338,337</sup> Die Ähnlichkeit bewegt sich dabei zwischen 46 und 60 %. Es kann davon ausgegangen werden, dass die vorhandene cDNA für die MIPS aus *D.discoideum* kodiert.

	<i>C.albicans</i>	<i>C.paradisi</i>	<i>A.thaliana</i>	<i>E.histolytica</i>	<i>S.polyrhizza</i>	<i>C.elegans</i>	<i>D.melanogaster</i>	<i>B.napus</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>M.crystallinum</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>D.discoideum</i>
<i>C.albicans</i>	1	0,49	0,504	0,499	0,503	0,494	0,479	0,518	0,499	0,51	0,602	0,481
<i>C.paradisi</i>	---	1	0,868	0,512	0,839	0,502	0,529	0,87	0,863	0,873	0,439	0,58
<i>A.thaliana</i>	---	---	1	0,53	0,855	0,516	0,532	0,949	0,992	0,89	0,462	0,592
<i>E.histolytica</i>	---	---	---	1	0,531	0,49	0,46	0,538	0,527	0,531	0,436	0,521
<i>S.polyrhizza</i>	---	---	---	---	1	0,51	0,538	0,863	0,849	0,876	0,468	0,589
<i>C.elegans</i>	---	---	---	---	---	1	0,46	0,515	0,511	0,51	0,436	0,468
<i>D.melanogaster</i>	---	---	---	---	---	---	1	0,546	0,527	0,554	0,431	0,497
<i>B.napus</i>	---	---	---	---	---	---	---	1	0,941	0,902	0,471	0,601
<i>P.vulgaris</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	1	0,882	0,456	0,588
<i>M.crystallinum</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1	0,465	0,601
<i>S.cerevisiae</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1	0,447
<i>D.discoideum</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1

**Tabelle 38: Homologie abgeleiteter MIPS Proteinsequenzen aus verschiedenen Quellen mit der aus der cDNA abgeleiteten Sequenz**

Seit 1998 wird das *D.discoideum* Genom im Rahmen einer internationalen Zusammenarbeit sequenziert und analysiert.<sup>339</sup> Die komplette Genomsequenz von *D.discoideum* ist seit 2004 unter (<http://dictybase.org>) verfügbar.

Die eingesetzte cDNA aus Tsukuba gibt allerdings nicht das vollständige Gen der MIPS wieder. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aus der cDNA mit der aus der

genomischen *D.discoideum* Datenbank zeigt, dass am N-Terminus einige Aminosäuren (MSAQMFESEFKVNSPNVKYTDDEHIISDYTYQTTKVQNVN) fehlen. Das Gen für die MIPS ist auf dem Crick-Strang von Chromosom 4 (DDB0186536, Locus: BC4V1\_0C0070\_12106, Position 3242699 to 3241027) lokalisiert. Es ist 1673 bp groß und enthält ein Intron (1389-1528). Das aus der Basensequenz abgeleitete Protein ist 511 Aminosäuren lang, besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 56.85 kDa und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 6.18. Dieses deckt sich gut mit dem experimentell ermittelten Molekulargewicht von 56 kDa und dem isoelektrischen Punkt von 5.6.

```

FC-AA11          -----TRPGELIVEPVDQKYIFKTERKVPR 25
DDB0186536      MSAQMFESEFKVNSPNVKYTDDEHIISDYTYQTTKVQNVNGELIVEPVDQKYIFKTERKVPR 60
                  *****

FC-AA11          MGVMIVGLCGNNGTTVVGVIANREGLCWNTKQGLQTPNYFGSVVMSSTIRMGMDENGCD 85
DDB0186536      MGVMIVGLCGNNGTTVVGVIANREGLCWNTKQGLQTPNYFGSVVMSSTIRMGMDENGCD 120
                  *****

FC-AA11          AYIPLKNLIPMVHPNDIVFGGWDINNANLADAMQRAQVFDYDLQVQLIPHMKNITPLPSI 145
DDB0186536      AYIPLKNLIPMVHPNDIVFGGWDINNANLADAMQRAQVFDYDLQVQLIPHMKNITPLPSI 180
                  *****

FC-AA11          YFPDFIAANQKDRANNVLTGTTKKEQMEQIRKDIRDFKESNKLDTVVVMWSANTERFSSLV 205
DDB0186536      YFPDFIAANQKDRANNVLTGTTKKEQMEQIRKDIRDFKESNKLDTVVVMWSANTERFSSLV 240
                  *****

FC-AA11          PGVNDTIENLMAAIDRSEEEISPSTLFAVASILENTTYINGSQPNTFVPAVVDLAIQHNV 265
DDB0186536      PGVNDTIENLMAAIDRSEEEISPSTLFAVASILENTTYINGSQPNTFVPAVVDLAIQHNV 300
                  *****

FC-AA11          SIGGDDFKTGQTKIKSVLTDYLVSAGIKPVSIVSYNHLGNNDGKNSAPQQFRSKEITKS 325
DDB0186536      SIGGDDFKTGQTKIKSVLTDYLVSAGIKPVSIVSYNHLGNNDGKNSAPQQFRSKEITKS 360
                  *****

FC-AA11          NVVDDMIASNNILYKQGEHPDHVIVIKYVPYVGDSEKRAMDEYTSQIFMGGHNTIVLHNTC 385
DDB0186536      NVVDDMIASNNILYKQGEHPDHVIVIKYVPYVGDSEKRAMDEYTSQIFMGGHNTIVLHNTC 420
                  *****

FC-AA11          EDSLLAAPIILDVLVLAEVTSRITMKKQDDDQFATFHPVLSLLSYLLKAPIVPKHATVVN 445
DDB0186536      EDSLLAAPIILDVLVLAEVTSRITMKKQDDDQFATFHPVLSLLSYLLKAPIVPKHATVVN 480
                  *****

FC-AA11          ALFKQRACIENIFKACVGIAPDNNMLLEQRL 476
DDB0186536      ALFKQRACIENIFKACVGIAPDNNMLLEQRL 511
                  *****

```

**Abbildung 40: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA-Klons FC-AA11 aus Tsukuba mit der aus dem *D.discoideum* Genomprojekt abgeleiteten Aminosäuresequenz**

Der fehlende N-Terminus wurde grau unterlegt.

## 4.2.2 Generierung von Mutanten mit Defekten in der D-*myo*-Inositol 3-phosphat Synthase

### 4.2.2.1 Chemische Mutagenese

Spontane Mutationen kommen relativ selten vor. In *D.discoideum* beträgt die Mutationsrate ca.  $10^{-6}$  pro Basenpaar und Generation. Die Mutationsrate lässt sich jedoch durch Verwendung von UV-Licht oder mutagenen Reagenzien beträchtlich steigern.

Alkylierende Reagenzien wie Ethylmethylsulfonat oder N'-Methyl N'-Nitro N-Nitrosoguanidin hängen Alkylreste (Methyl-, Ethyl-) an Basen an. Die resultierenden Fehlpaarungen können nach der Replikation zu einem Basenaustausch führen.

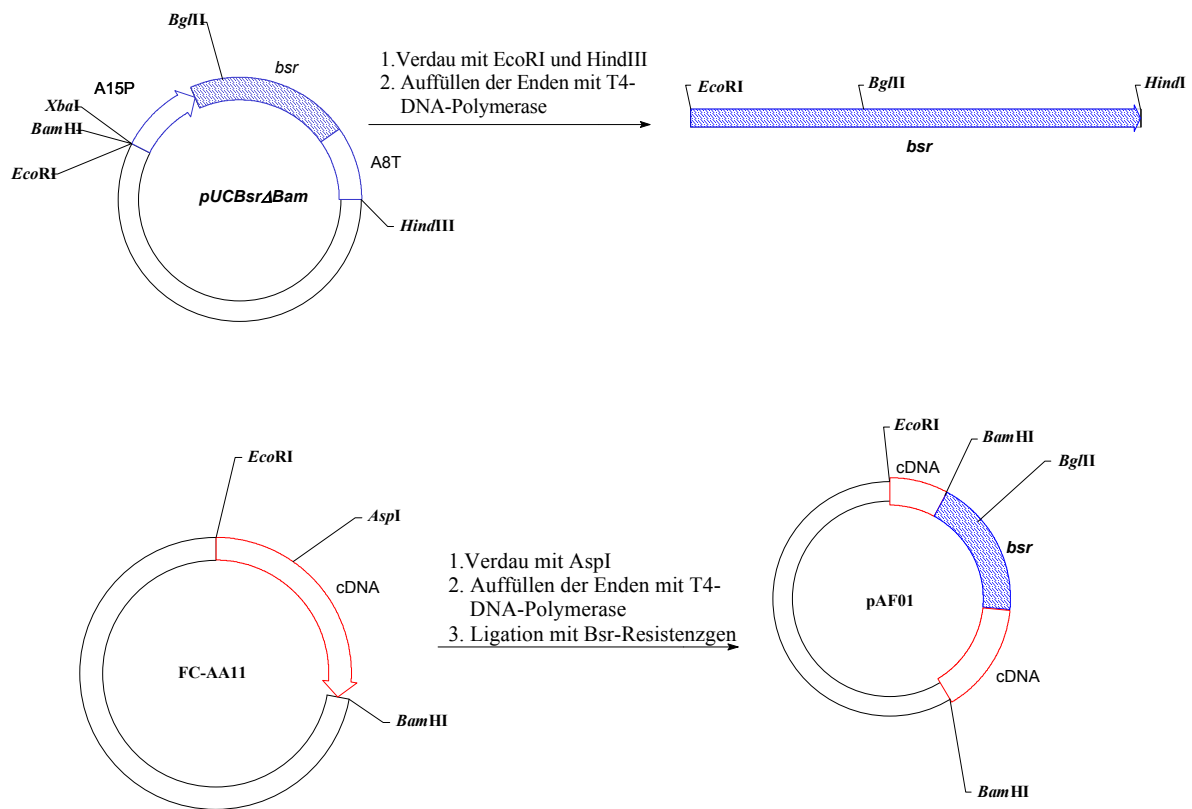
Die durchgeführte chemische Mutagenese mit N'-Methyl N'-Nitro N-Nitrosoguanidin führte zu einer Überlebensrate von ca. 0.1 %. Von den 6500 getesteten Klonen zeigte jedoch keiner eine Auxotrophie auf *myo*-Inositol. Experimente zur Selektionierung auf inositol-auxotrophen Mutanten mit Hilfe von 5-Bromdesoxyuridin führten zur Bildung von 4500 weiteren Klonen. Jedoch zeigte auch hier kein Klon eine Auxotrophie auf *myo*-Inositol.

### 4.2.2.2 Homologe Rekombination

„Knock-out“-Mutanten sind in *D.discoideum* ein verbreitetes Werkzeug zur gezielten Mutagenese und funktionaler Analyse von Genen. Die Herstellung von „knock-out“-Mutanten erfolgt üblicherweise durch Insertion von Resistenzkassetten, z.B. für Blasticidin oder Geneticin in das interessierende Gen. Im Idealfall kommt es zu einem völligen Verlust der Expression des entsprechenden Gens. Je nach Insertionsort der Resistenzkassette kann es auch nur zu einer Teilexpression des entsprechenden Gens kommen. Der Austausch des endogenen Gens erfolgt über homologe Rekombination.

Die Konstruktion des notwendigen Transformationsvektors (AF01) erfolgte durch Klonierung einer 1.3 kb großen Resistenzkassette mit dem Gen für die Blasticidin-S-Deaminase aus *Bacillus cereus*<sup>340</sup> unter Kontrolle des Aktin 15-Promoters und des Aktin 8-Terminators<sup>341</sup> in eine einfach in dem Vektor FC-AA11 vorhandene *AspI*-Schnittstelle. Nach Transformation des Vektors AF01 in Zellen des *D.discoideum*-Wildtyps AX2 konnten Transformanten in Gegenwart von Blasticidin und *myo*-Inositol selektiert werden. Es wurden drei blasticidinresistente Klone isoliert, wobei nur zwei eine Inositol-Auxotrophie zeigten. Bei dem dritten Klon fand ein Rekombinationsvorgang statt, jedoch wurde das für die MIPS codierende Gen nicht deaktiviert. Da eine Unabhängigkeit der beiden inositol-auxotrophen

Klone nicht gewährleistet war, wurde nur einer für die späteren Experimente verwendet. Dieser Klon wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit *Ddino1Δ* bezeichnet.



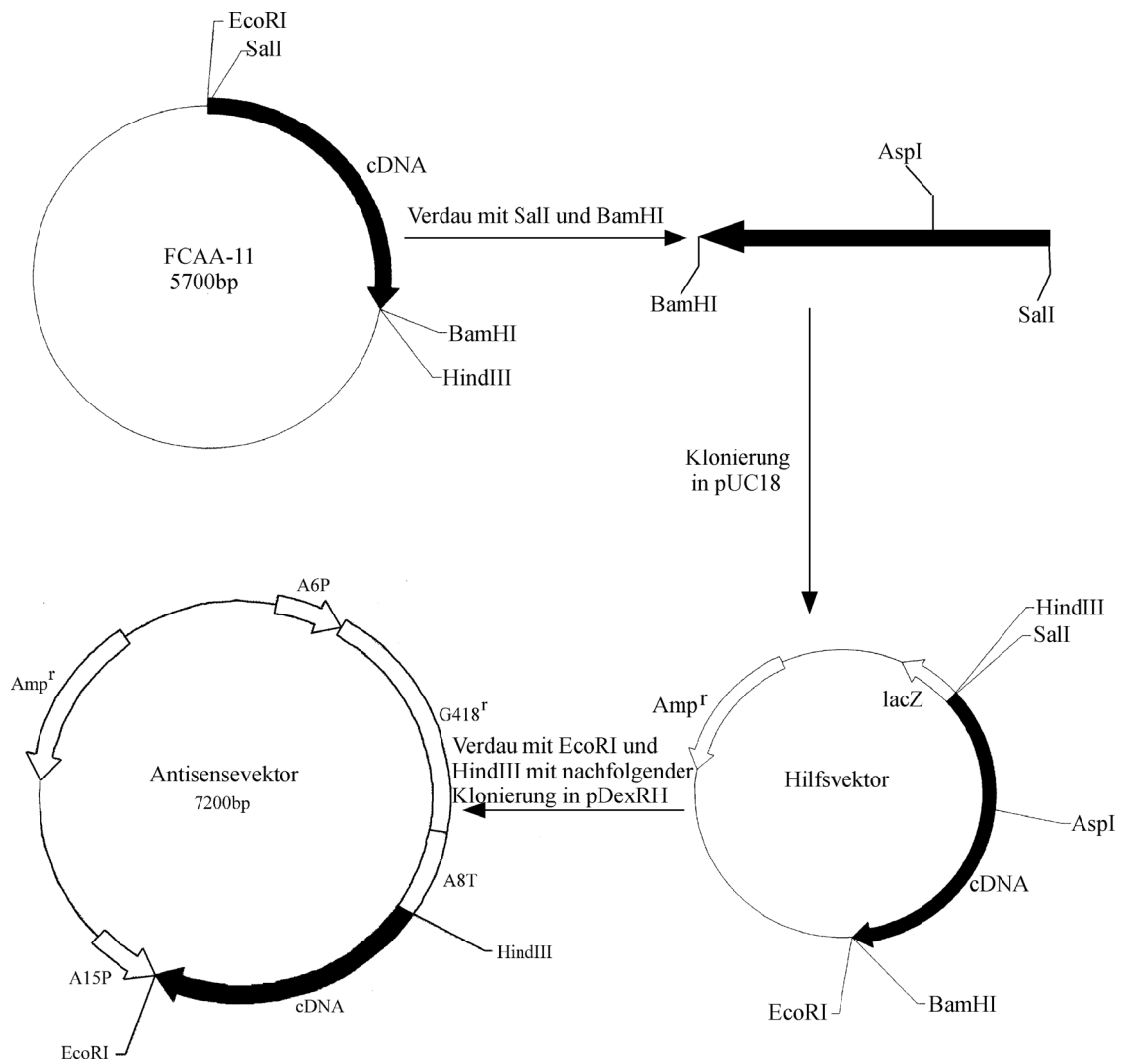
**Abbildung 41: Schematische Darstellung der Konstruktion des Rekombinationsvektors pAF01**

#### 4.2.2.3 Antisense-Mutagenese

Eine weitere Möglichkeit zur gezielten Unterdrückung der Expression bestimmter Proteine bietet die Nutzung von Antisense-RNA. Hierbei wird das interessierende Gen oder der interessierende Genabschnitt in Antisense-Orientierung in einen Expressionsvektor kloniert. Eine Transformation dieses Vektors in *D.discoideum* kann wie unter 1.7 beschrieben zur vollständigen oder stark reduzierten Translation des Genprodukts führen.

Als Expressionsvektor diente der integrierende Vektor pDexRH.<sup>301</sup> Die in Antisense-Orientierung eingesetzte cDNA steht dabei unter Kontrolle des konstitutiven Aktin15-Promotor. Nach Transformation des Vektors AF04 in Zellen des *D.discoideum*-Wildtyps AX2 konnten Transformanten in Gegenwart von G418 und *myo*-Inositol selektiert werden. Es wurden insgesamt 18 G418-resistente Klone isoliert, von denen mindestens drei unabhängig

voneinander waren (*Ddino1(as1)*- *Ddino1(as3)*). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Klon *Ddino1(as1)* benutzt, der den ausgeprägtesten Phänotyp zeigte.



**Abbildung 42: Schematische Darstellung der Konstruktion des Antisense-Vektors AF04**

## 4.2.3 Nachweis der Inositol-Auxotrophie

### 4.2.3.1 Expression der für MIPS kodierenden mRNA

Die Expression des MIPS-Gens wurde mit Northern-Blot-Analyse überprüft. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus axenisch gewachsenen Zellen isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als spezifische Sonde diente zur mRNA komplementäre DIG-markierte RNA.

In *S.cerevisiae* ist eine Reprimierung der MIPS durch *myo*-Inositol bekannt (siehe 1.3). Um Fehlinterpretationen zu vermeiden wurde die RNA sowohl von 24 h auf inositolfreiem Medium kultivierten Zellen, als auch in Gegenwart von 500  $\mu$ M *myo*-Inositol gewachsenen Vergleichszellen isoliert.

Nur AX2 zeigt dabei ein Signal bei ca. 1.5 kB. Dieses ist die zu erwartende Größe der für die MIPS kodierenden mRNA. Sowohl bei *Ddino1 $\Delta$*  als auch bei *Ddino1(as)* konnte keine Expression der für die MIPS kodierenden mRNA beobachtet werden.

Die Signalintensität bei AX2 war unabhängig von der *myo*-Inositolkonzentration im Medium. Damit ist eine starke Reprimierung der MIPS durch *myo*-Inositol äquivalent zu *S.cerevisiae* ausgeschlossen. Eine schwache Reprimierung der MIPS durch *myo*-Inositol war in späteren Experimenten zu beobachten. Im Gegensatz zu *S.cerevisiae* war eine nennenswerte Reprimierung der MIPS in *D.discoideum* auch nicht zu erwarten. Das angestammte natürliche Substrat für *D.discoideum* sind im Boden lebende Bakterien, die kein *myo*-Inositol enthalten. *S.cerevisiae* wächst jedoch auf Früchten, die selbst starke Konzentrationen an *myo*-Inositol enthalten können. Eine Reprimierung der MIPS kann hierbei helfen, einen konstanten *myo*-Inositollevel zu gewährleisten.



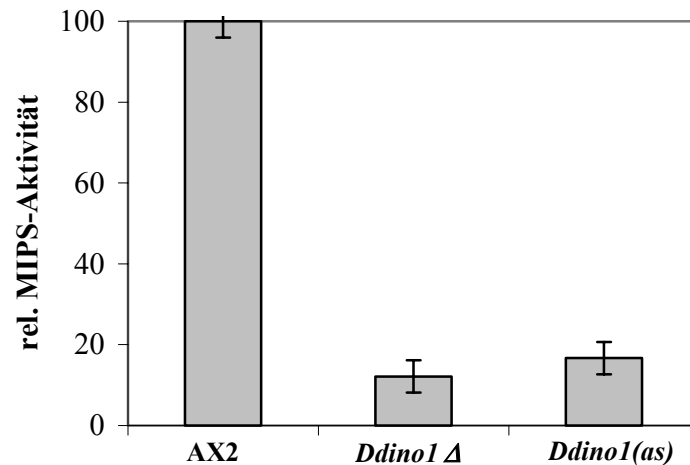
**Abbildung 43: Northern-Blot-Analyse von *Ddino1Δ* und *Ddino1(as)* und AX2**

Als Sonde diente zur mRNA komplementäre DIG-markierte RNA.

- |  |   |   |
|--|---|---|
| 1. <i>Ddino1Δ</i> + 500 $\mu$ M <i>myo</i> -Inositol | 3. <i>Ddino1(as)</i> + 500 $\mu$ M <i>myo</i> -Inositol | 5. AX2 + 500 $\mu$ M <i>myo</i> -Inositol |
| 2. <i>Ddino1Δ</i> ;                                  | 4. <i>Ddino1(as)</i>                                    | 6. AX2                                    |

#### **4.2.3.2 Vergleich der MIPS-Aktivität von Wildtypzellen und inositol- auxotrophen Mutanten**

Aufgrund vielfältiger Nebenaktivitäten (Glucose 6-phosphatase, Glucosephosphat-Isomerase, Glucose 6-phosphat Dehydrogenase, Glucosephosphat Mutase) kann die MIPS-Aktivität in Zellhomogenaten nur schwer exakt bestimmt werden. Um eine Quantifizierung der MIPS-Aktivitäten im Zellhomogenat des Wildtyps und der Mutanten durchzuführen, wurde der im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Enzymtest mit HPIC-IPAD Analytik durchgeführt (3.3.1). Deutlich ist die drastische Abnahme der MIPS-Aktivität in den Mutanten *Ddino1Δ* und *Ddino1(as)* zu erkennen.



**Abbildung 44: Vergleich der MIPS-Aktivität des Wildtyps und der Mutanten in Zellhomogenaten bestimmt mit HPIC-IPAD Analytik**

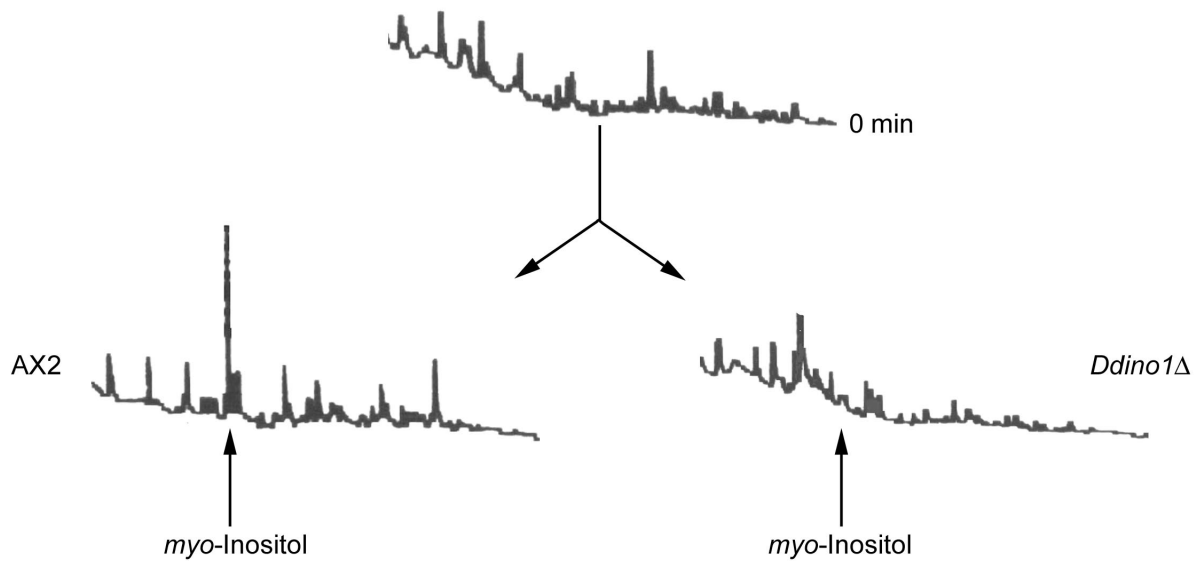
Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden bei einer Zelldichte von  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml (Inkubationsbedingungen: 100 ml FM-Medium + 500  $\mu$ M *myo*-Inositol, 22,5 °C, 120 Upm) geerntet. Eingesetzt wurde ein Zellhomogenat aus  $2 \cdot 10^8$  Zellen/ml.

Die relativ hohen Aktivitäten der Mutanten sind zum größten Teil auf den Abbau von niedermolekularen, inositolhaltigen Verbindungen zurückzuführen. Eine Abtrennung der niedermolekularen Bestandteile durch Ammoniumsulfatpräzipitation, Ultrafiltration oder PEG-Fällung führt zu keiner nachweisbaren MIPS-Aktivität in *Ddino1*Δ. Die Antisense-Mutante *Ddino1(as)* zeigt noch eine relative Aktivität von 2-5 % gegenüber dem Wildtyp. Trotz nicht nachweisbarer mRNA zeigt die Antisense-Mutante immer noch eine geringe Expression der MIPS. Dieses Verhalten ist jedoch für Antisense-Mutanten nicht ungewöhnlich. So zeigt beispielsweise eine Discoidin I Antisense-Mutante zwar keine nachweisbare mRNA, jedoch ca. 10 % der Proteinniveaus aller Discoidin I Isoformen.<sup>342</sup> Und auch Calmodulin-Mutanten zeigen trotz nicht nachweisbarer mRNA noch 50 % des Calmodulinniveaus des Wildtyps.<sup>343</sup>

Zur weiteren Absicherung wurde eine zweite unabhängige Methode durchgeführt. Die Proben wurden zunächst analog zur gepulsten Amperometrie aufgearbeitet. Anschließend jedoch nach 3.3.2 weiterverarbeitet und gaschromatographisch vermessen. Deutlich ist in Abbildung 45 bei AX2 die zeitliche Zunahme eines Signals zu sehen, dessen Retentionszeit mit *myo*-Inositol identisch ist. Dieses Signal ist bei *Ddino1*Δ und *Ddino1(as)* (Daten nur teilweise gezeigt) nicht zu erkennen.

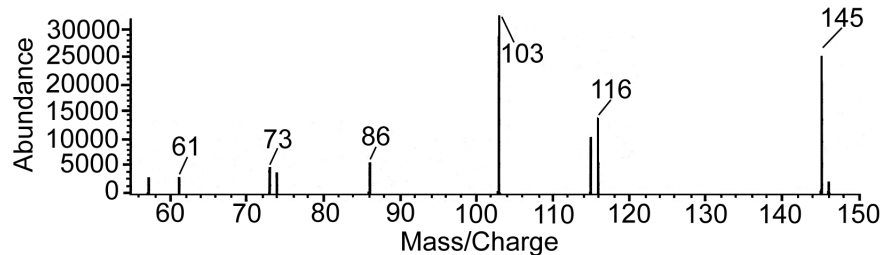
Eine genaue Quantifizierung der gefundenen Aktivitäten wurde hierbei nicht durchgeführt, da sich die Derivatisierungsreaktion als problematisch herausstellte und eine quantitative Umsetzung des *myo*-Inositols nicht gewährleistet war.





**Abbildung 45: Gaschromatographischer Auftrennung**  
GC-Chromatogramm eines Enzymassays des Wildtyps AX2 und *Ddino1Δ*

Mittels gekoppeltem Massendetektor wurde von dieser Substanz ein MS-Spektrum aufgenommen. Ein Datenbankabgleich zeigte eindeutig, dass es sich bei dieser Substanz um *myo*-Inositol handelte.



**Abbildung 46: MS-Spektrum von enzymatisch dargestelltem *myo*-Inositol**

Zusammenfassend zeigen die Experimente, dass die gezielte Generierung von inositol-auxotrophen Mutanten erfolgreich verlaufen ist. Die fehlende Expression der MIPS konnte auf proteinchemischer Ebene durch Aktivitätsvergleich von Wildtyp und Mutanten nachgewiesen werden. Die Abwesenheit der für MIPS kodierenden mRNA in den Mutanten bestätigt dieses Ergebnis.

#### 4.2.4 Versuche zur Darstellung von Antisense-Mutanten der Inositolmonophosphat-Phosphatase

Ein „knock out“ der MIPS bzw. eine Manipulation des Expressionslevels der für die MIPS kodierenden mRNA beeinflusst nicht nur den Inositolphosphatstoffwechsel, sondern auch den Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsel. Das aus dieser Reaktion gebildete *D-myo*-Inositol 3-phosphat kann anschließend entweder durch Inositolmonophosphat Phosphatasen zu *myo*-Inositol dephosphoryliert oder durch Kinasen zu höheren Inositolphosphaten phosphoryliert werden.

Durch gezielte Manipulation der Inositolmonophosphat Phosphatase wäre es möglich, den Inositolphosphatstoffwechsel vom Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsel abzukoppeln. Die Zellen könnten Ins(3)P aus Glucose 6-phosphat synthetisieren, jedoch wäre es ihnen unmöglich dieses zu dephosphorylieren. Die Biosynthese von PtdIns erfolgt durch Übertragung eines Diacylglycerinrestes von CDP-DAG auf *myo*-Inositol. Inositolmangel hätte starke Auswirkungen auf die PtdIns-Synthese und den resultierenden Phosphatidylinositolphosphaten. Die Synthese von höherphosphorylierten Inositolphosphaten wäre hingegen noch gewährleistet.

In *D.discoideum* sind verschiedene Inositolmonophosphat-abbauende Aktivitäten bekannt, die sich durch ihre Spezifität und ihre Sensitivität auf  $\text{Li}^+$  unterscheiden.<sup>163</sup> Wahrscheinlich würde durch das gezielte Ausschalten einer Inositolmonophosphat Phosphatase durch homologe Rekombination dazu führen, dass ein anderes Enzym dessen Aufgabe übernimmt. Um dieses Problem zu minimieren, wurde die Antisense-Technik gewählt. Diese ermöglicht es, nicht nur spezifisch mit einer mRNA zu interagieren, sondern auch mit solchen ähnlicher Sequenz.

Zur Klonierung eines Antisense-Vektors stand eine cDNA (FC-BP15) zur Verfügung, die starke Homologien zu Inositolmonophosphat Phosphatasen aus anderen Organismen zeigte. Die Konstruktion des Vektors erfolgte analog zu 4.2.2.3 und ist in Abbildung 47 schematisch gezeigt.

Eine erfolgreiche Transformation des Vektors AF07 in Zellen des *D.discoideum*-Wildtyps AX2 konnte jedoch nicht beobachtet werden. Zahlreiche Änderungen der Elektroporationsbedingungen und andere Transformationsprotokolle führten zu keiner Verbesserung.

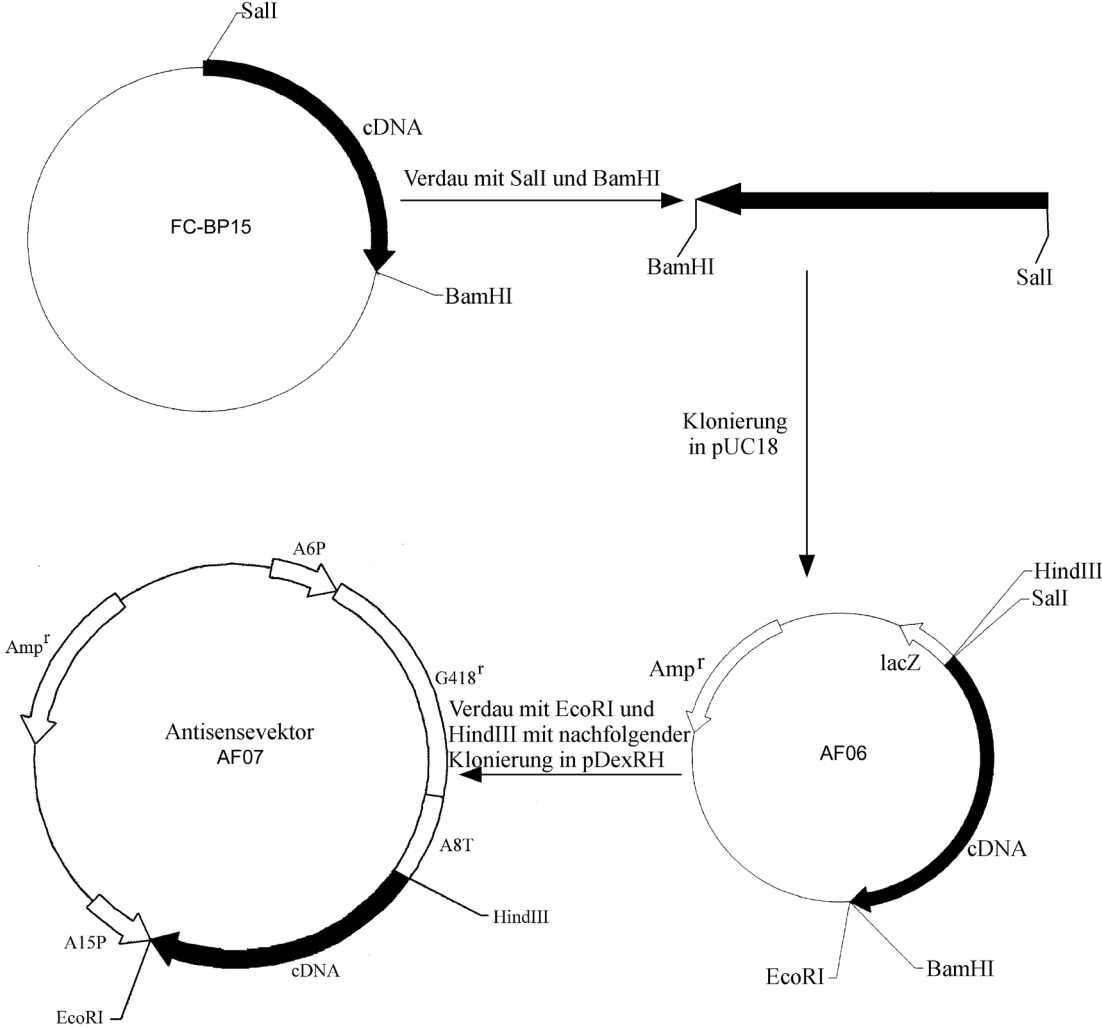


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Konstruktion des Antisense-Vektors AF07

## 4.3 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

### 4.3.1 Morphologie

In Gegenwart von 500  $\mu\text{M}$  *myo*-Inositol zeigen die inositol-auxotrophen Mutanten *Ddino1* $\Delta$  und *Ddino1(as)* keine Unterschiede zum Wildtyp AX2. Ein längerfristiger Entzug von *myo*-Inositol führt jedoch zu einigen morphologischen Veränderungen.

Ein Vergleich von AX2 und *Ddino1* $\Delta$  zeigt deutliche Unterschiede in Form und Struktur der einzelnen Zellen. Im Gegensatz zum Wildtyp bzw. auf *myo*-Inositol wachsenden Zellen zeigen die inositol-auxotrophen Mutanten bei Inositolmangel eine Veränderung ihrer Form. Es kommt zu einem Verlust der natürlichen, runden Form und zur Ausbildung von blasenförmigen Auswüchsen. Zusätzlich zeigt sich auch eine Abnahme der intrazellulären Kompartimentierung. Die gleichen morphologischen Veränderungen sind auch bei *Ddino1(as)* zu sehen.

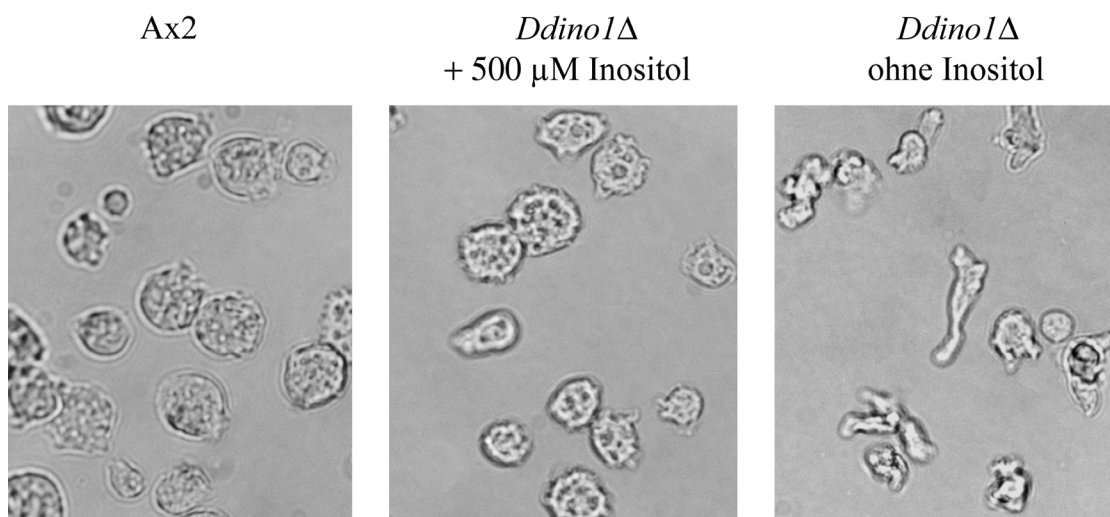


Abbildung 48: Mikroskopischer Vergleich von AX2 und *Ddino1* $\Delta$

Die ersten sichtbaren Veränderungen in der Zellmorphologie der inositol-auxotrophen Mutanten machen sich in Form von schwachen blasenförmigen Auswüchsen nach ca. 5 h Inositolmangel bemerkbar.

### 4.3.2 Wachstum

#### 4.3.2.1 Axenisches Wachstum

Wachstum von Zellen in axenischem Medium beruht auf Interaktion verschiedenster zellulärer Vorgänge wie Pinozytose und Zytokinese.

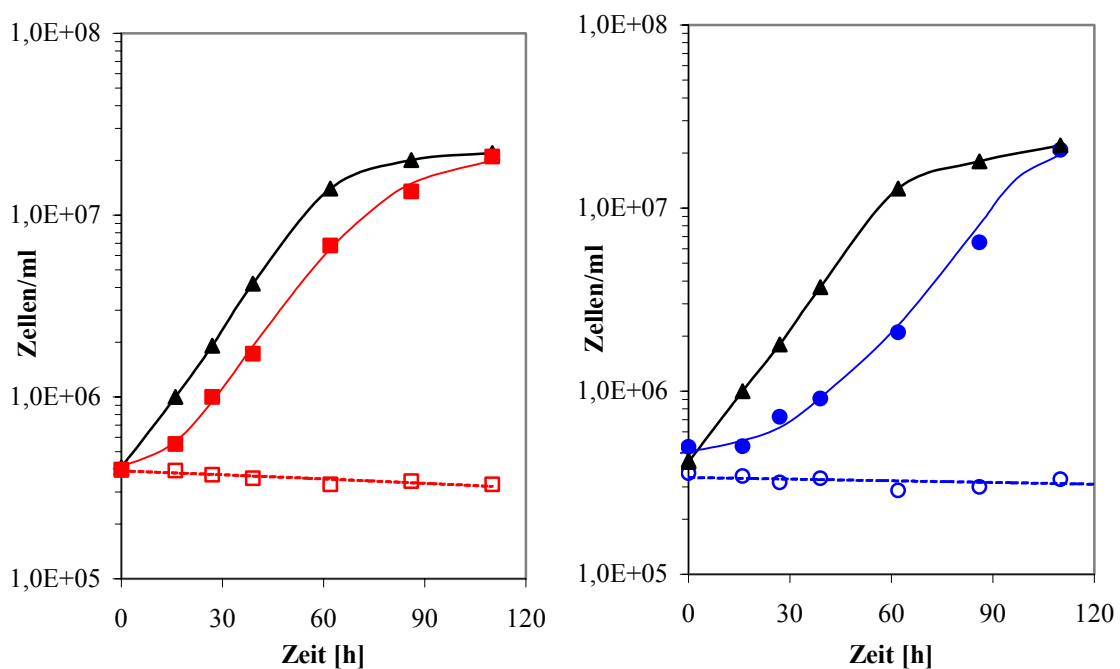
In Gegenwart von *myo*-Inositol zeigen die Mutanten ein zum Wildtyp äquivalentes Wachstum auf axenischem Medium. Die Mutanten haben eine etwas ausgeprägtere Verzögerungsphase, die Verdopplungszeiten in der logarithmischen Wachstumsphase und die maximal erreichbaren Zelldichten sind jedoch ähnlich.

Stamm	Verdopplungszeit [h]	Maximale Zelldichte [ $10^7$ Zellen/ml]
AX2	10.5	2.1
<i>Ddino1</i> $\Delta$	11	2.2
<i>Ddino1(as)</i>	11.5	2.3

**Tabelle 39: Vergleich der Verdopplungszeiten und der maximal erreichten Zelldichten von AX2 und den inositol-auxotrophen Mutanten in Gegenwart von 500  $\mu$ M *myo*-Inositol**

Die Inkubation erfolgte in 400 ml FM-Medium bei 120 Upm und 22.5 °C.

In Abwesenheit von *myo*-Inositol ist die Auxotrophie der Mutanten für *myo*-Inositol eindeutig zu sehen. Sowohl bei *Ddino1* $\Delta$  als auch bei *Ddino1(as)* ist kein Wachstum zu erkennen.



**Abbildung 49: Wachstumsvergleich von AX2 (▲), *Ddino1* $\Delta$  ohne *myo*-Inositol (□), *Ddino1* $\Delta$  mit 500  $\mu$ M *myo*-Inositol (■), *Ddino1(as)* ohne *myo*-Inositol(○) und *Ddino1(as)* mit 500  $\mu$ M *myo*-Inositol (●)**

Inkubationsbedingungen: 400 ml FM-Medium bei 22.5°C und 120 Upm.

Um einen Selektionsdruck aufrechtzuerhalten erfolgte die Kultivierung der Mutanten immer in Gegenwart von Antibiotika. Dieses ist besonders wichtig für die Antisense-Mutanten. Ohne Selektionsdruck verlieren die Zellen schnell ihre Inositol-Auxotrophie.

Die optimale Antibiotikakonzentration für axenische Kulturen betrug 10 µg/ml Blastidicin bei *Ddino1Δ* und 10 µg/ml Gentamycin bei *Ddino1(as)*. Diese Konzentrationen hatten nur einen geringen Einfluss auf die Verdopplungszeiten der Mutanten, das Wachstum des Wildtyps wurde jedoch vollständig inhibiert. In submersen Standkulturen wurde eine Antibiotikakonzentration von 20 µg/ml gewählt. Bei langfristigen Inkubationen erfolgte eine Neuzugabe der Antibiotika nach 3 Tagen.

Ein Zusatz von 500 µM *myo*-Inositol zum Medium führt zu einem optimalen Wachstum der inositol-auxotrophen Mutanten. Geringere *myo*-Inositolkonzentrationen führen zu einer stark verlangsamten Verdopplungszeit. Bei *myo*-Inositolkonzentrationen < 50 µM konnte kein Wachstum bei *Ddino1Δ* mehr beobachtet werden. Eine Erhöhung der *myo*-Inositolkonzentration >500 µM brachte keine weitere Verbesserung des Wachstums. Eine Erhöhung >1 mM führte sogar zu einer leichten Abnahme der Verdopplungszeit.

Die Antisense-Mutante *Ddino1(as)* zeigt ein ähnliches Wachstumsverhalten. Die optimale *myo*-Inositolkonzentration beträgt auch hier 500 µM. *Ddino1(as)* zeigt auch bei geringeren *myo*-Inositolkonzentrationen immer noch ein merkliches Wachstum. Auch in Gegenwart von nur 50 µM *myo*-Inositol wächst die Antisense-Mutante merklich, die Verdopplungszeit liegt jedoch bei 60 h. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die MIPS-Expression in der Antisense-Mutante nicht vollständig unterdrückt ist. Trotz nicht nachweisbarer mRNA in *Ddino1(as)* ist noch eine geringe MIPS-Aktivität nachweisbar. Diese Restaktivität reicht wahrscheinlich um die Zellen mit Einschränkungen in der Vitalität am Leben zu halten.

<i>myo</i> -Inositol [µM]	Verdoppelungszeit [h]		
	AX2	<i>Ddino1Δ</i>	<i>Ddino1(as)</i>
0	10.4	-	-
50	10.2	-	60
100	10.3	25	19
250	10.1	19	15,6
500	9.9	11.1	11
1000	10.2	11.3	11.3

**Tabelle 40: Vergleich der Verdopplungszeiten von Wildtyp und den inositol-auxotrophen Mutanten in Gegenwart von unterschiedlichen *myo*-Inositolkonzentrationen**

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden in FM-Medium auf eine Zelldichte von  $4 \cdot 10^4$  Zellen/ml angeimpft, zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und die Zelldichte bestimmt (Inkubationsbedingungen: 100 ml FM-Medium, 22.5 °C, 120 Upm).

#### 4.3.2.2 Wachstum auf Bakterien

Die natürliche Nahrungsquelle der im Waldboden und auf verrottendem biologischen Material lebenden Dictyosteliden sind Mikroorganismen. *D.discoideum* vermehrt sich durch mitotische Zellteilung bis nahezu alle verwertbaren Bakterien phagozytiert sind.

Im Gegensatz zum Wildtyp wachsen *Ddino1Δ* und *Ddino1(as)* nicht auf *K.aerogenes* und *E.coli* B/r, zwei etablierten Laborstämmen. Dieses Verhalten ist unabhängig von Scherkräften und nicht nur in Suspension mit Bakterien, sondern auch auf Bakterienrasen anzutreffen.

Im Gegensatz zum Wachstum auf axenischem Medium ist der Wachstumsdefekt auf Bakterien unabhängig von einer *myo*-Inositolsupplementierung. Bei der Phagozytose von Bakterien wird eine große Menge Plasmamembran in kurzer Zeit verbraucht, jedoch bleibt selbst bei hoher Phagozytose-Aktivität die Oberfläche der Plasmamembran konstant. Da die *de novo* Synthese von Membrankomponenten wie Phospholipide und Rezeptoren relativ langsam ist, werden die Membranen offensichtlich recycelt. Der Wachstumsdefekt der inositol-auxotrophen Mutanten auf Bakterien in Gegenwart von *myo*-Inositol könnte darauf zurückzuführen sein, dass für eine aktive Pinozytose keine Membranen zur Verfügung stehen. Durch die Phagozytose wird ein großer Teil der Plasmamembran internalisiert und ein „Membranrecycling“ ist erst nach dem Verdau des Bakteriums möglich. Für die Pinozytose steht dementsprechend nur noch wenig Membran zur Verfügung, was sich in einer drastisch reduzierten Pinozytoserate bei aktiv phagozytierenden Zellen äußert. Supplementiertes *myo*-Inositol kann dann nur noch in unzureichender Menge in die Mutanten gelangen. Dafür spricht auch, dass nach dem Zusatz von *myo*-Inositol zum Puffer keine wesentliche intrazelluläre Konzentrationserhöhung von *myo*-Inositol in den Zellen festgestellt werden konnte.

Inositolhaltige Bakterien wären eine Möglichkeit von der pinozytotischen Aufnahme von *myo*-Inositol unabhängig zu werden. Versuche zur Etablierung geeigneter Wachstumsbedingungen von *D.discoideum* auf inositolproduzierenden Streptomyceten<sup>52</sup> waren nicht erfolgreich. Sowohl die Mutanten als auch der Wildtyp zeigten kein Wachstum auf *S.griseus*. Diese Bakterien bilden jedoch ein Mycel, welches wahrscheinlich *D.discoideum* daran hindert, einzelne Zellen zu phagozytieren.

Zellwachstum auf Bakterien beruht auf der Interaktion verschiedener zellulärer Vorgänge wie Phagozytose, Mitose und Zytokinese. Die Bakterien werden zunächst über rezeptorvermittelte Phagozytose aufgenommen. Das resultierende Phagosom verschmilzt

innerhalb der Zelle mit Lysosomen und das aufgenommene Bakterium wird verdaut. Ein Teil der aufgenommenen Plasmamembran erreicht niemals die Lysosomen, weil sie aus den Phagosomen durch Transportvesikel zur Plasmamembran zurückgebracht werden.

Bei diesen Vorgängen wird das Aktin-Zytoskelett einer ständigen Reorganisation unterworfen. Es sind verschiedene Mutationen von aktinbindenden Proteinen in *D.discoideum* bekannt, die zu einem veränderten Wachstum führen. Dazu gehören beispielsweise ABP-120 und  $\alpha$ -Actinin defiziente Mutanten<sup>344</sup>, die ein stark verlangsamtes Wachstum auf axenischem Medium zeigen oder auch eine Talin defiziente Mutante<sup>345</sup>, die Wachstumsdefekte auf *E.coli* B/r zeigt. Da einige aktinbindende Proteine mit Phosphatidylinositolphosphaten interagieren (siehe 1.8.3), könnte das Ausschalten der MIPS indirekt zur Erniedrigung verschiedener Phosphatidylinositolphosphatlevel und damit zu einem veränderten Wachstum führen.

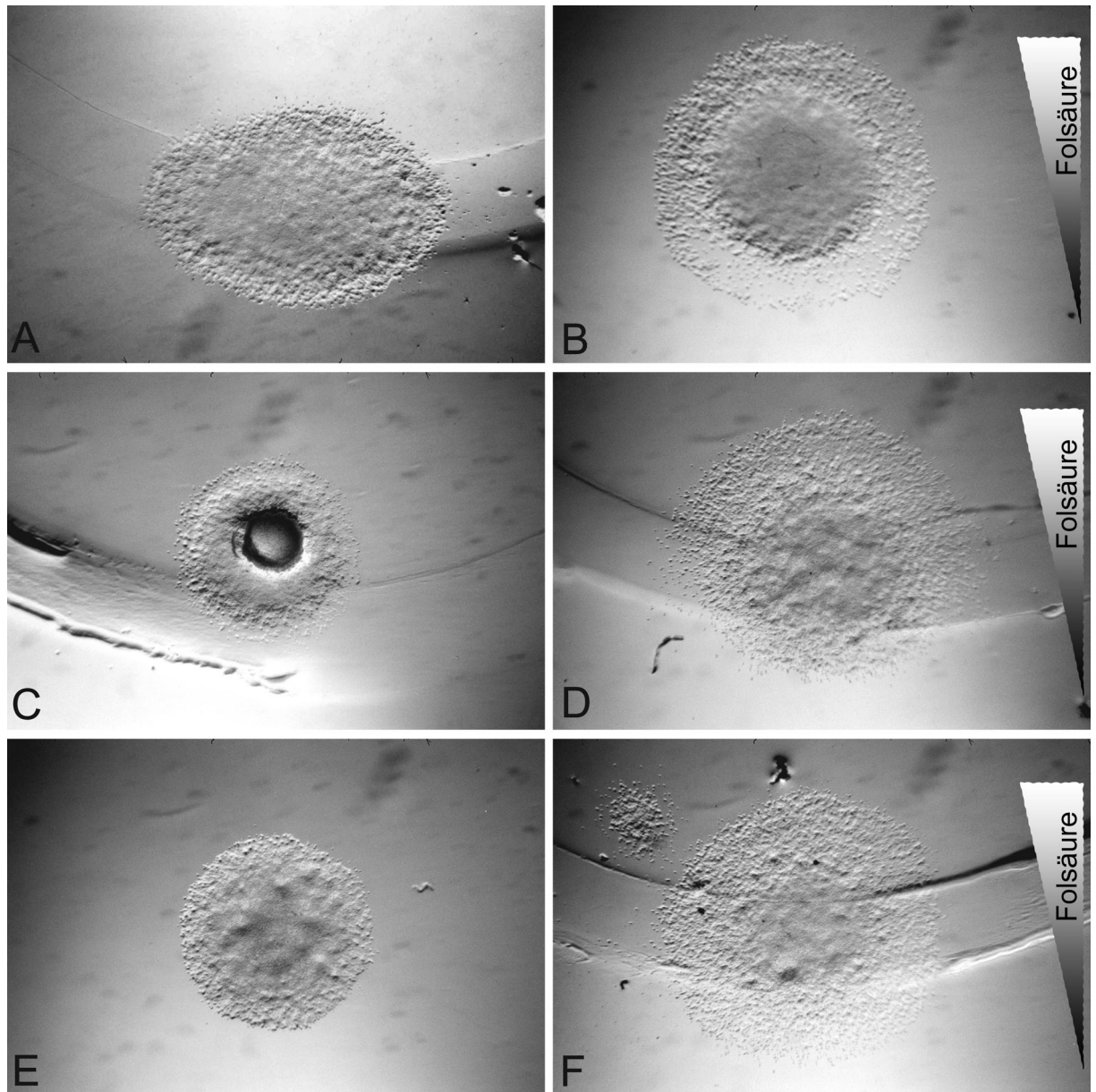
Der Wachstumsdefekt der inositol-auxotrophen Mutanten bietet auch eine mögliche Erklärung für die fehlgeschlagene Isolierung von inositol-auxotrophen Mutanten nach der chemischen Mutagenese.

Die nach der Behandlung mit N'-Methyl N'-Nitro N-Nitrosoguanidin und 5-Bromdesoxyuridin überlebenden Zellen wurden in Gegenwart von *E.coli* B/r auf SM-Agarplatten (enthielten 10 mM *myo*-Inositol) kloniert. Durch den Wachstumsdefekt auf Bakterienrasen ist die Klonierung potentieller inositol-auxotropher Mutanten jedoch nicht möglich. Eine Klonierung durch Verdünnen in Flüssigkultur wäre vorteilhafter gewesen.

Chemotaxis, die zielgerichtete Bewegung auf einen löslichen Stoff ist eine generelle Eigenschaft zahlreicher motiler Eukaryonten. Neben dem Wachstumsdefekt auf Bakterien zeigen die inositol-auxotrophen Mutanten eine normale positive Chemotaxis zu Folsäure. Dieses Verhalten ist unabhängig von einer Inositol-Supplementierung. Folsäure wird von Bakterien ausgeschüttet und signalisiert *D.discoideum* die Anwesenheit von Futterbakterien.

Die Erkennung von Folsäure und die zielgerichtete Zellbewegung in einem Folsäure-Konzentrationsgradienten sind offensichtlich von der Inositol-Auxotrophie nicht betroffen.





**Abbildung 50: Folsäurechemotaxis**

- |   |   |
|---|---|
| <b>A:</b> AX2 ohne Folsäure   | <b>B:</b> AX2 in einem Folsäure-Gradienten von 0-1 mM   |
| <b>C:</b> <i>Ddino1Δ</i> ohne Folsäure                                  | <b>D:</b> <i>Ddino1Δ</i> in einem Folsäure-Gradienten von 0-1 mM                                  |
| <b>E:</b> <i>Ddino1Δ</i> (24 h ohne <i>myo</i> -Inositol) ohne Folsäure | <b>F:</b> <i>Ddino1Δ</i> (24 h ohne <i>myo</i> -Inositol) in einem Folsäure-Gradienten von 0-1 mM |

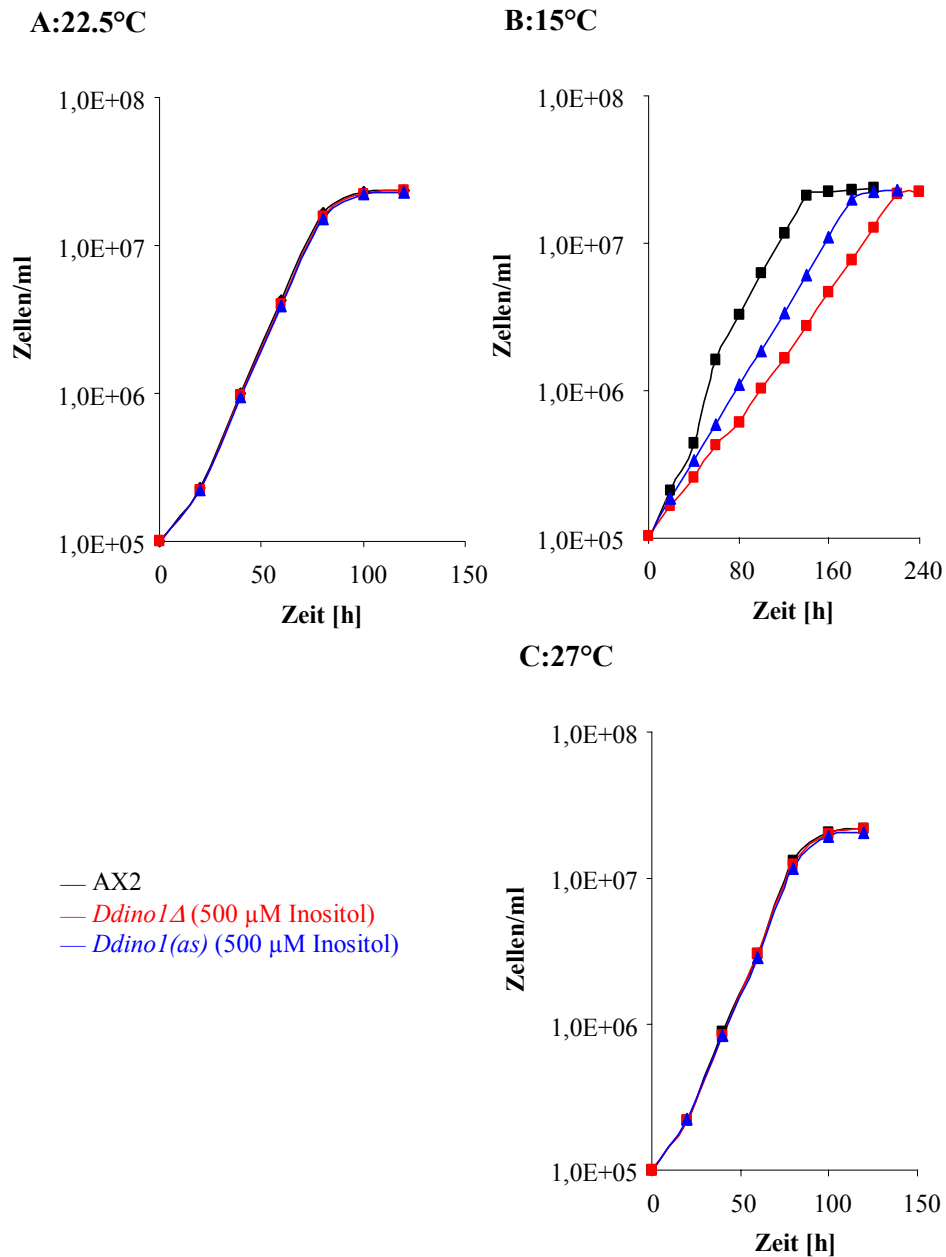
### 4.3.3 Verhalten der Mutanten unter Stressbedingungen

Veränderte Umweltbedingungen wie Temperatur, Feuchtigkeit und Osmolarität stellen eine physiologische Herausforderung für das Wachstum und Überleben einer Zelle dar. Die Rolle eines ausgeschalteten Proteins wird häufig unter optimalen Wachstumsbedingungen im Labor nicht sichtbar, sondern nur unter Stressbedingungen.

Als Stressbedingungen wurden verschiedene pH-Werte und Inkubationstemperaturen gewählt. Da *myo*-Inositol in einigen Zellen als Osmolyt wirkt, könnten die Mutanten anfällig

auf Osmostress sein. Dieses soll durch Zugabe von NaCl und Sorbitol zum Medium geklärt werden.

Ein Vergleich des Wachstums von Wildtyp und inositol-auxotrophen Mutanten bei verschiedenen Temperaturen zeigte nur geringe Unterschiede. Das Wachstum der Mutanten ist bei 22.5 °C und 27 °C nahezu identisch mit AX2. So beträgt die Verdoppelungszeit jeweils 10 h und es werden maximale Zelldichten zwischen  $2 \cdot 10^7$  und  $2.5 \cdot 10^7$  Zellen/ml erreicht. Auffallend ist jedoch das verminderte Wachstum der inositol-auxotrophen Mutanten bei 15 °C gegenüber dem Wildtyp. Hier beträgt die Verdoppelungszeit von AX2 20 h gegenüber ca. 30 h bei *Ddino1Δ* und ca. 24 h bei *Ddino1(as)*. Die Pinozytose ist ein temperaturabhängiger Prozess. Durch tiefe Temperaturen wird weniger *myo*-Inositol von den Zellen aufgenommen, *myo*-Inositol wird vermutlich zum limitierenden Faktor und kann zu längeren Verdoppelungszeiten führen. Die maximal erreichbare Zelldichte ist wieder ähnlich der von AX2 und liegt zwischen  $2.2 \cdot 10^7$  und  $2.3 \cdot 10^7$  Zellen/ml.



**Abbildung 51: Wachstum von Wildtyp und inositol-auxotropher Mutanten unter Temperaturstress**

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden in frisches FM-Medium überführt (100 ml, 120 Upm, 22.5 °C, 500 μM *myo*-Inositol), zu verschiedenen Zeiten Aliquots entnommen und die Zelldichte bestimmt.

Als weitere Stressbedingung wurde das Wachstum der Mutanten unter hyperosmotischen Stress beobachtet. Als zellwandlose Amöbe ist *D.discoideum* in der Natur häufigen Veränderungen der Osmolarität ausgesetzt.

Bei einem hyperosmotischen Schock von 400 mM Sorbitol schrumpfen die Zellen innerhalb von zwei Minuten auf etwa die Hälfte ihres ursprünglichen Volumens und bewahren über einen längeren Zeitraum (2 h) dieses Volumen<sup>346</sup>, sofern die hypertonen Bedingungen weiter anhalten.

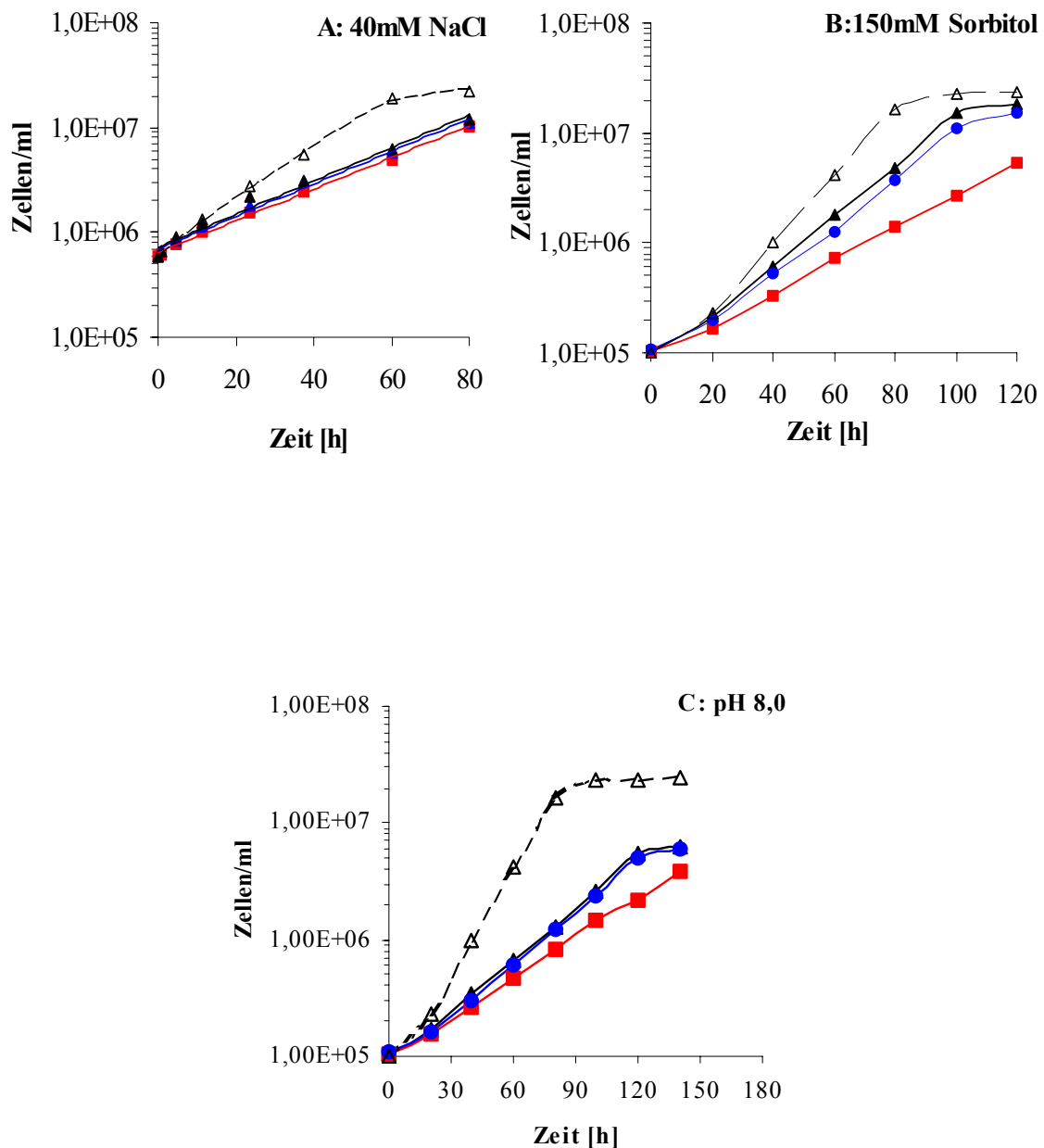
In *D.discoideum* wurde bisher keine Zunahme kompatibler Osmolyten wie beispielsweise *myo*-Inositol, Glycerin oder Aminosäuren festgestellt, die zu einer erneuten Volumenzunahme führen. *D.discoideum* hat jedoch andere Mechanismen zur regulatorischen Volumenzunahme bei hyperosmotischem Stress entwickelt. In erster Linie findet eine massive Umlagerung des Zytoskeletts statt. Hyperosmotische Bedingungen bewirken eine vermehrte Anlagerung von Myosin II und Aktin an den Zellcortex.<sup>347,348</sup> Dies führt zu einer Verstärkung des Zellkortex zu einer schalenartigen Struktur unter der Plasmamembran. Diese Verstärkung zu einer „de facto-Zellwand“ und die Abrundung der Zellen ermöglichen es den Zellen, dem äußeren Druck zu widerstehen.<sup>349</sup>

In Gegenwart von ionischen Verbindungen können axenisch wachsende Zellen von *D.discoideum* bei hyperosmotischen Bedingungen ihr reduziertes Zellvolumen durch Einströmen von ionischen Verbindungen aus dem Medium korrigieren.<sup>350</sup>

In Gegenwart von 40 mM NaCl oder 250 mM Sorbitol verhalten sich die inositol-auxotrophen Mutanten analog zum Wildtyp. Sowohl bei den Mutanten als auch in abgeschwächter Form beim Wildtyp ist eine Verlängerung der Generationszeit festzustellen. Die Antwort auf die hyperosmotischen Bedingungen ist dabei unabhängig von der *myo*-Inositolkonzentration im Medium. Zunächst nimmt das Zellvolumen durch Wasserverlust drastisch ab. Danach erfolgt eine langsame Adaption an die veränderten Lebensbedingungen mit dem Ziel das Zellvolumen weitgehend wieder herzustellen.

Das pH-Optimum für das Wachstum von AX2 in FM-Medium beträgt 6.7. Ein erhöhter pH-Wert führt zu Stress und damit zu erschwerten Wachstumsbedingungen. Sowohl die inositol-auxotrophen Mutanten als auch der Wildtyp zeigen nur noch ein schwaches Wachstum bei pH 8. Die Generationszeiten betragen beim Wildtyp und bei der Antisense-Mutante *Ddino1(as)* ca. 20 h, die Zelldichte in der stationären Phase beträgt jedoch nur  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml. Die Generationszeit von *Ddino1Δ* beträgt ca. 24 h.

Abschließend lässt sich feststellen, dass keine gravierenden Unterschiede beim Wachstumsverhalten zwischen AX2-Wildtypzellen und den inositol-auxotrophen Mutanten unter Stressbedingungen zu beobachten sind. Daraus lässt sich folgern, dass unter den hier gewählten Bedingungen die Teilungsfähigkeit der Zellen und die Fähigkeit zur Pinozytose in Gegenwart von *myo*-Inositol nicht beeinträchtigt sind.



**Abbildung 52: Wachstum des Wildtyps und der inositol-auxotrophen Mutanten unter verschiedenen Stressbedingungen**

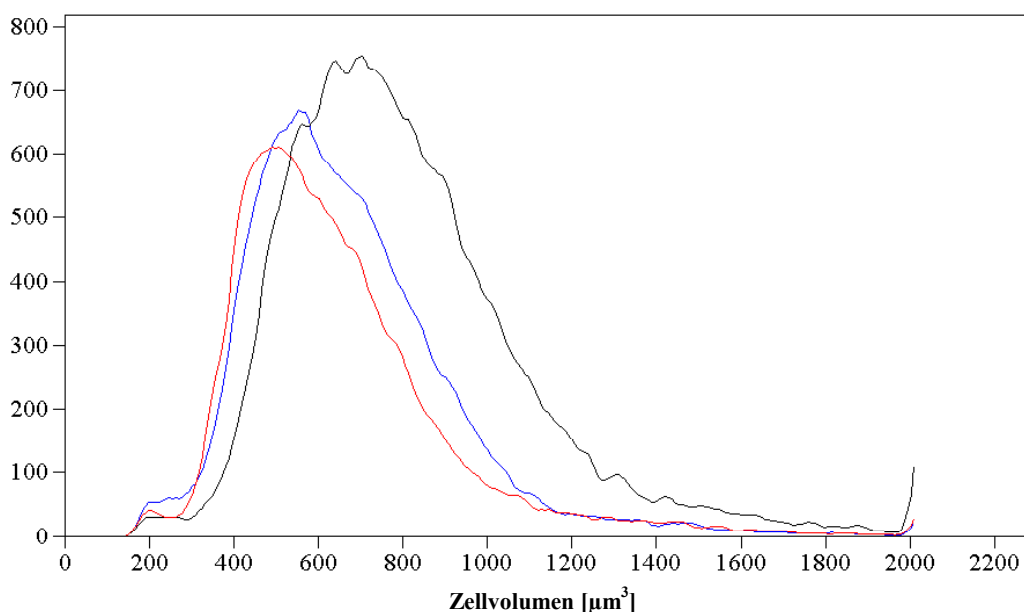
Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden in frisches FM-Medium (100 ml, 120 Upm, 22.5 °C, 500  $\mu$ M *myo*-Inositol) überführt, zu verschiedenen Zeiten Aliquots entnommen und die Zelldichte bestimmt. AX2 (▲); *Ddino1*Δ (■); *Ddino1(as)* (●); AX2 ohne Osmolytzusatz bzw. bei pH 6.7 (Δ).

#### 4.3.4 Zellgrößenverteilung

Aufgrund der Fähigkeit zur regulierten Polymerisation ist Aktin an fast allen motilen Prozessen der Zelle beteiligt. Neben dem Wachstum wird auch die Größe einer Zelle von Komponenten des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst. Die Funktion von Aktin selbst wird durch eine Vielzahl von verschiedenen Faktoren bestimmt, wobei aktinbindende Proteine großen Einfluss nehmen.

Das Ausschalten der MIPS könnte indirekt Einfluss auf die Aktinpolymerisation nehmen, da einige aktinbindende Proteine mit verschiedenen Phosphatidylinositolphosphaten wechselwirken (siehe 1.8.3).

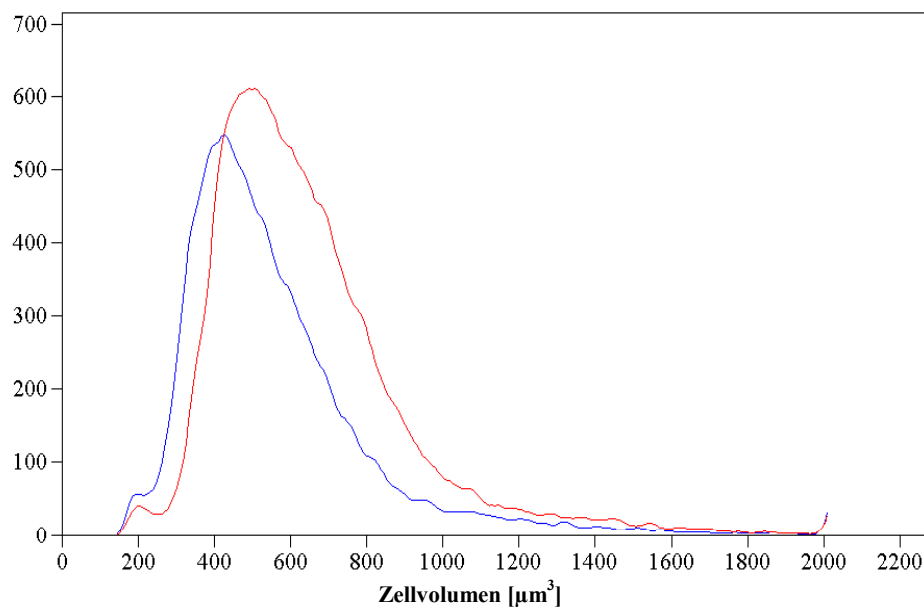
Abbildung 53 zeigt die Größenverteilungen vom Wildtyp AX2 und den inositol-auxotrophen Mutanten in Gegenwart von 500  $\mu\text{M}$  *myo*-Inositol. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen die inositol-auxotrophen Mutanten ein deutlich verringertes Zellvolumen.



**Abbildung 53: Vergleich der Größenverteilung in Gegenwart von 500  $\mu\text{M}$  *myo*-Inositol**

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden in FM-Medium (100 ml, 22.5°C, 120 Upm) auf eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml angeimpft und bei einer Zelldichte von ca.  $8 \cdot 10^6$  Zellen/ml die Zellgröße bestimmt. AX2 (—); *Ddino1* $\Delta$  (—); *Ddino1(as)* (—).

Ein Inositolentzug führt bei den inositol-auxotrophen Mutanten zu einer weiteren Verminderung des Zellvolumens. In Abbildung 54 ist dieses exemplarisch für *Ddino1* $\Delta$  gezeigt. Es ist deutlich eine Volumenverkleinerung bei Inositolmangel zu beobachten. Das Profil der Größenverteilung bleibt dabei unverändert. Die Antisense-Mutante *Ddino1(as)* verhält sich identisch.



**Abbildung 54: Abnahme der Zellgröße von *Ddino1Δ* unter Inositolentzug**

(—) *Ddino1Δ* +500 µM *myo*-Inositol; (—) *Ddino1Δ* (24 h ohne *myo*-Inositol). Die Zellgröße wurde bei einer Zelldichte von  $8 \cdot 10^6$  Zellen/ml bestimmt.

Eine statistische Auswertung dreier unabhängiger Messungen ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

[µm <sup>3</sup> ]	+ 500 µM <i>myo</i> -Inositol	ohne <i>myo</i> -Inositol
AX2	751 ± 20	754 ± 14
<i>Ddino1Δ</i>	606 ± 19	513 ± 16
<i>Ddino1(as)</i>	660 ± 21	620 ± 17

**Tabelle 41: Vergleich des mittleren Zellvolumens von Wildtyp und inositol-auxotrophen Mutanten**

Diese Ergebnisse sind nicht die ersten Hinweise auf den Einfluss inositolhaltiger Metabolite auf die Zellgröße. In *D.discoideum* wurden drei Gene für Phosphatidylinositol 3-kinasen (PI3K1-3) mit Homologien zu PI3Ks aus Säugern gefunden.<sup>296</sup> Phosphatidylinositol 3-kinasen katalysieren die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol bzw. Phosphatidylinositolphosphaten in der 3-Position.

PI3K1 und PI3K2 sind sich untereinander sehr ähnlich und scheinen genetisch redundant zu sein. Ein single knock-out beider Gene führte zu keinen Veränderungen, während ein double knock-out stark reduzierte Konzentrationen von PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> im Vergleich zum Wildtyp zeigte.

Die Mutanten zeigten neben einer geringeren Zellgröße auch Defekte im Zellwachstum, der Entwicklung und einen dramatischen Rückgang von F-aktinreichen Strukturen. Die

Autoren vermuten, dass PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> über aktinbindende Proteine Einfluss auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts nehmen.

#### 4.3.5 Überlebensrate nach Inositolentzug

Es stellt sich die Frage, ob die inositol-auxotrophen Mutanten bei Inositolentzug nur das Wachstum einstellen oder ob auch andere zentrale physiologische Funktionen betroffen sind. Dazu soll die Überlebensrate der Zellen nach Inositolentzug ermittelt werden.

Die gebräuchlichste Methode zur Bestimmung der Überlebensrate bei *D.discoideum* beruht auf dem Ausbringen der Zellen auf Agarplatten in Gegenwart von *K.aerogenes* und Auszählen der entstehenden Plaques. Dieses Verfahren konnte jedoch bei den Mutanten nicht angewandt werden, da sowohl *Ddino1Δ* als auch *Ddino1(as)* nicht in der Lage sind auf Bakterien, der natürlichen Nahrungsquelle von *D.discoideum*, zu wachsen.

Die Nutzung von Vitalfarbstoffen zur Differenzierung lebender von toten Zellen erwies sich als nicht effektiv, da auch abgestorbene Zellen die Farbstoffe passiv einlagern.

Versuche, die Überlebensrate der Zellen mit einem kommerziell erhältlichen Test (Alamarblue™) zu ermitteln, führten nicht zum Erfolg. Das Testprinzip beruht darauf, dass ein Farbstoff nur von vitalen Zellen aufgenommen und reduziert wird. Der reduzierte Farbstoff wird von den vitalen Zellen in das Medium sekretiert und kann dann über Fluoreszenzmessung quantifiziert werden. Der Farbstoff zeigte jedoch schon in Gegenwart von Medium eine positive Reaktion. Höchstwahrscheinlich wird der Farbstoff durch die große Menge an Glucose im FM-Medium reduziert.

Die genaue Quantifizierung der Überlebensrate nach Inositolentzug erfolgte durch Überführung eines Aliquots der Zellsuspension in submerse Standkultur. Nach 5-6 Tagen entwickelten sich in Gegenwart von 500 μM *myo*-Inositol aus den überlebenden Zellen sichtbare Klone, die ausgezählt werden konnten. Dieser Test ist jedoch sehr zeitintensiv und für eine schnelle, versuchsbegleitene Bestimmung der Überlebensrate nicht geeignet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 55 dargestellt.



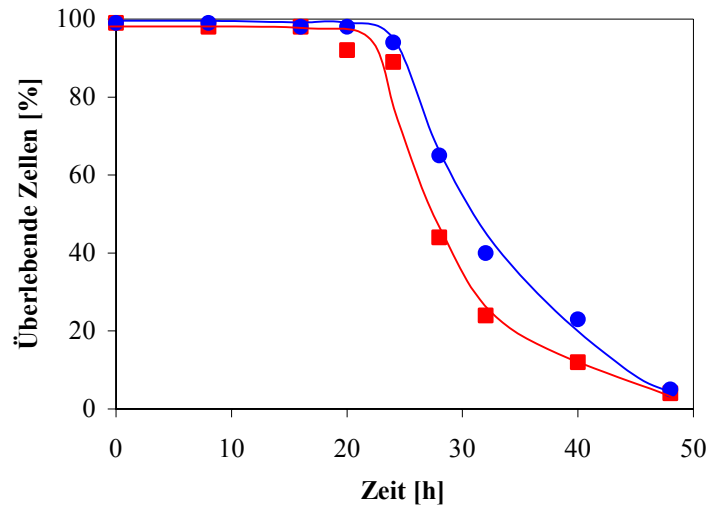


Abbildung 55: Bestimmung der Anzahl überlebender Zellen

■ *Ddino1Δ*; ● *Ddino1(as)*

Ein Inositolentzug über 24 h hat keine signifikanten Auswirkungen auf die Überlebensrate der Zellen. Das Wachstum der Zellen wird in diesem Zeitraum stark eingeschränkt, jedoch sterben die Zellen nicht ab. Bei Zusatz von 500  $\mu\text{M}$  *myo*-Inositol zum Medium beginnen die Zellen nach einer Verzögerungsphase von ca. 6 h erneut zu wachsen. Ein Inositolentzug über einen längeren Zeitraum führt zu einer drastischen Abnahme der Überlebensrate. Nach 40 h ist bei *Ddino1Δ* kein erneutes Anwachsen zu beobachten (*Ddino1(as)* nach 48 h).

Die inositol-auxotrophen Mutanten enthalten zu Beginn des Inositolentzugs große Mengen pinozytiertes *myo*-Inositol. Es wird vermutlich zwar nur ein Bruchteil des internalisierten *myo*-Inositols aufgenommen, jedoch kann dieser *myo*-Inositolvorrat eine gewisse Zeitspanne den Mangel an *myo*-Inositol in den Zellen kompensieren.

Der Zeitraum von 24 h erwies sich als optimal um die Auswirkungen des Inositolentzugs auf den Phänotyp der Mutanten zu betrachten. Kürzere Zeiträume führten zu einem weniger ausgeprägten Phänotyp, während ein längerfristiger Inositolentzug zu einem Anstieg toter Zellen führte und damit die Beobachtungen verfälschte. Dementsprechend wurde der Einfluss des Inositolentzugs auf phänotypische Veränderungen der Mutanten immer nach 24 h betrachtet.

In Kapitel 4.3.9.1 wird eine schnellere, jedoch indirekte Methode, zur Bestimmung der Überlebensrate, vorgestellt.

Inositol-auxotrophe Mutanten zahlreicher Organismen teilen dieses Verhalten. Mutanten aus *S.cerevisiae*<sup>334</sup>, *N.crassa*<sup>335</sup>, *U.hordei*<sup>336</sup>, *L.mexicana*<sup>127</sup> und Eizellen aus Meerschweinchen<sup>126</sup> verlieren ihre Vitalität sehr schnell nach Inositolentzug.

Dieser beobachtete Zelltod ist jedoch kein generelles Charakteristikum auxotropher Mutanten. Viele andere auxotrophen Mutanten stoppen häufig nur das Wachstum, sterben aber nur langsam ab.<sup>130</sup>

Eine Erklärung des Phänomens „inositolless death“ wurde bisher noch nicht gefunden. Untersuchungen an *S.cerevisiae*<sup>125</sup> deuten auf eine Ungleichheit zwischen dem Zellvolumen und der Akkumulation verschiedener cytoplasmatischer Bestandteile hin.

Bereits nach 30 min Inositolentzug zeigen inositol-auxotrophe *S.cerevisiae*<sup>129</sup> eine verringerte Neusynthese von Phosphatidylinositol. Die Zellen zeigen über die ersten 2 h (eine Generationszeit) eine normale Zellteilung. Nach 2 h stellen die Zellen ihre Zellteilung ein, das Zellvolumen und die Biosyntheserate von Makromolekülen bleiben jedoch zunächst konstant. Dabei wurde auch eine erhöhte spezifische Dichte der Zellen ermittelt. Nach ca. 4 h nimmt die RNA-, DNA-, Lipid- und Proteinbiosynthese ab, gefolgt von einer Verringerung des intrazellulären ATP und K<sup>+</sup>-Spiegels. Das Absterben der Zellen beginnt nach ca. 4-5 h und ist nicht mit morphologischen Veränderungen der Zelle verknüpft.

Durch verschiedene Maßnahmen konnten *S.cerevisiae* vor dem „inositolless death“ bewahrt werden. Inhibierung des Wachstums durch Entzug der Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle oder osmotischer Stress führen zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl überlebender Zellen. Eine Zugabe von Cycloheximid (inhibiert die Proteinbiosynthese) in den ersten 1,5 Stunden, führt zu einer deutlich erhöhten Vitalität.

Dieses Verhalten ist auch bei inositol-auxotrophen Mutanten von *D.discoideum* zu beobachten. Wie in Abbildung 55 zu sehen, nimmt die Überlebensrate der inositol-auxotrophen Mutanten nach einem Inositolentzug über einen längeren Zeitraum drastisch ab. Einen 48stündigen Inositolentzug überleben nur ca. 5 % der Zellen. Wird den inositol-auxotrophen Mutanten parallel neben *myo*-Inositol auch über 48 h die Kohlenstoffquelle Glucose entzogen, so zeigt sich ein anderes Bild. Die Anzahl an überlebenden Zellen steigt hierbei auf über 60 % an.

Das Absterben der inositol-auxotrophen Mutanten auf inositolfreiem Medium kann jedoch nicht nur durch Entzug der Kohlenstoffquelle, sondern auch durch Entzug der Stickstoffquelle (Aminosäuren und NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) inhibiert werden.

Es besteht offensichtlich ein Zusammenhang zwischen Zellwachstum und dem Absterben der inositol-auxotrophen Mutanten auf inositolfreiem Medium besteht.

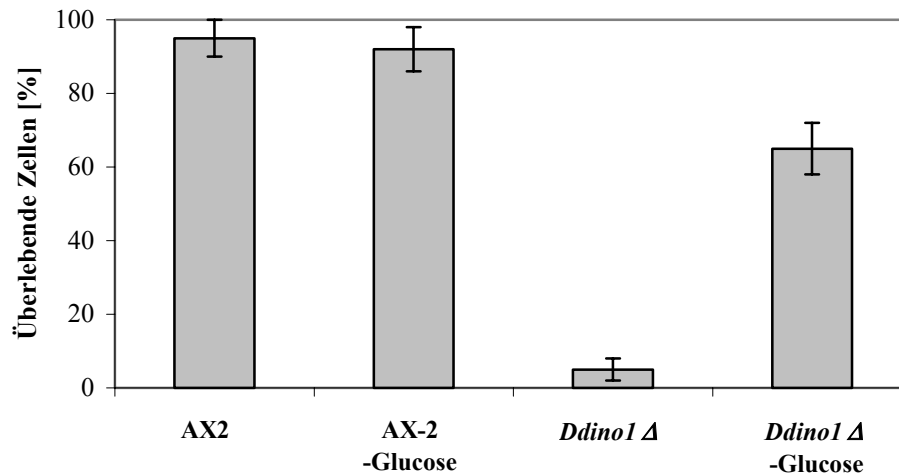


Abbildung 56: Einfluss von Glucosemangel auf die Überlebensfähigkeit der Zellen

Neben dem Verlust von *myo*-Inositol als Synthesebaustein könnte auch der genregulatorische Einfluss von *myo*-Inositol eine Rolle beim „inositolless death“ spielen. In *S.cerevisiae* zeigen mehrere Enzyme der Phospholipidbiosynthese eine gemeinsame Regulation.<sup>86,351</sup> Dazu gehören neben der MIPS die Phosphatidylserin Synthase, die Phosphatidylserin Decarboxylase und die Cytidindiphosphatdiacylglycerin Synthase. Diese Enzyme werden in Abwesenheit von *myo*-Inositol und Cholin vollständig dereprimiert. In Gegenwart von *myo*-Inositol werden sie teilweise, und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Cholin vollständig reprimiert. Cholin alleine zeigt kaum einen Effekt. Interessanterweise unterliegt die Phosphatidylinositol Synthase nicht dieser Regulation. Die gemeinsame Regulation von Cholin und *myo*-Inositol erfolgt dabei auf Transkriptionsebene (1.3).

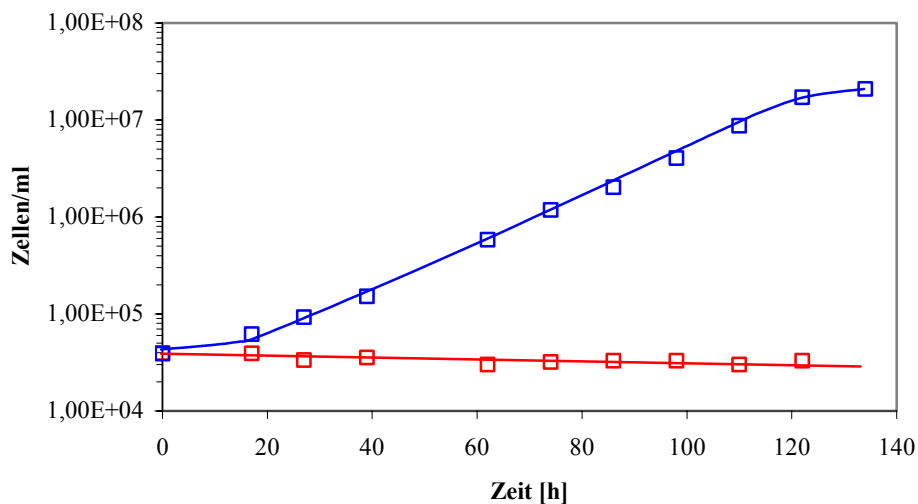
Neuere Expressionsstudien<sup>352</sup> in *S.cerevisiae* deuten auch auf eine posttranslationale Regulation verschiedener Gene durch *myo*-Inositol hin. Dazu gehören Gene, die bei der Biotin-Biosynthese, beim Stickstoffabbau, der Zellwandorganisation und im Acetyl-CoA Metabolismus involviert sind.

#### 4.3.6 Versuche zur Komplementation von *myo*-Inositol durch andere Inositolisomeren und Inositolphosphate

In Kooperation mit Michael Podeschwa (Organische Chemie, Wuppertal)<sup>353</sup> wurde versucht, die Zugabe von *myo*-Inositol zum Wachstumsmedium durch andere Inositolstereoisomere zu ersetzen. Wachstumsversuche der inositol-auxotrophen Mutanten in Gegenwart von *scyllo*-, *allo*- und *neo*-Inositol zeigten, dass diese Isomere *myo*-Inositol nicht ersetzen können.

Pinozytoseexperimente, Inkubationsexperimente mit  $^3\text{H}$ -markiertem  $\text{InsP}_6$  und HPLC-MDD-Messungen zeigen, dass *D.discoideum*  $\text{InsP}_6$  aufnehmen und zu *myo*-Inositol abbauen kann.<sup>365</sup> Diese Beobachtungen führten zur Überlegung, dass *myo*-Inositol durch Abbau von  $\text{InsP}_6$  gebildet werden könnte.

Das Wachstum der inositol-auxotrophen Mutanten in Gegenwart von  $\text{InsP}_6$  zeigte den einzigen gravierenden Unterschied zwischen den beiden Mutanten. *Ddino1Δ* ist im Gegensatz zu *Ddino1(as)* nicht in der Lage auf  $\text{InsP}_6$ -haltigem Medien zu wachsen. Die Verdopplungszeit von *Ddino1(as)* auf diesem Medium ist dabei vergleichbar mit der auf inositolhaltigem Medium.  $\text{InsP}_6$  wird dephosphoryliert und gelangt letztendlich in den Inositolpool der Zelle.



**Abbildung 57: Wachstum von *Ddino1Δ* und *Ddino1(as)* in Gegenwart von 80 μM  $\text{InsP}_6$**

Wachstumsbedingungen: 100 ml FM-Medium (22.5 °C, 120 Upm). (□) *Ddino1Δ* + 80 μM  $\text{InsP}_6$ ; (□) *Ddino1(as)* + 80 μM  $\text{InsP}_6$ .

Auch bei einer höheren Konzentration von  $\text{InsP}_6$  im Medium war kein Wachstum von *Ddino1Δ* zu beobachten. Das Wachstum von *Ddino1(as)* auf  $\text{InsP}_6$  ist vermutlich auf die verbliebene Restaktivität der MIPS zurückzuführen.

Möglicherweise existiert eine Kompartimentierung der MIPS in *D.discoideum*. In diesem Kompartiment könnte endogen gebildetes *myo*-Inositol für das Wachstum essentielle Aufgaben erfüllen. Die in den Antisense-Mutanten verbliebene Restaktivität könnte diese Funktionen noch ausfüllen. Exogenes  $\text{InsP}_6$  oder die durch Abbau resultierenden dephosphorylierten Produkte wären nicht in der Lage, in dieses Kompartiment einzudringen und könnten daher die Funktionen von endogenem *myo*-Inositol nicht übernehmen. In der Literatur sind allerdings keine Hinweise auf eine Kompartimentierung der MIPS zu finden. Eine Ausnahme ist die chloroplastische Form der MIPS, die neben der cytosolischen Form in

Algen und höheren Pflanzen entdeckt wurde.<sup>47</sup> Wie eigene Experimente zeigten, ist nur eine geringe Enzymaktivität in der Membranfraktion zu finden. Eine fraktionierte Trennung der Membranbestandteile zeigte keine Fraktion mit einer erhöhten Aktivität. Dieses zeigt deutlich, dass eine Kompartimentierung der MIPS in *D.discoideum* nicht vorliegt.

Im Medium gelöste Nährstoffe nimmt *D.discoideum* zum größten Teil über Makropinozytose auf.<sup>354</sup> Durch verschiedene Fusionsprozesse wird das entstandene Endosom anschließend angesäuert und mit lysosomalen Enzymen versetzt. Ein Einfluss von endogenem *myo*-Inositol auf diese Fusionsprozesse kann nicht ausgeschlossen werden.

Möglicherweise sind auch inositolhaltige Proteine, z.B. GPI-verankerte Proteine, beim Abbau von InsP<sub>6</sub> involviert.

*Myo*-Inositol könnte auch die Genregulation von Enzymen beeinflussen, die beim Abbau von exogenem InsP<sub>6</sub> notwendig sind. Eine regulatorische Funktion von *myo*-Inositol auf die Genexpression von *D.discoideum* konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Für einen Abbau von InsP<sub>6</sub> sind offensichtlich geringe Konzentrationen *myo*-Inositol notwendig. Dieses wird auch durch die Beobachtung bestätigt, dass *Ddino1Δ* bei einem Zusatz von 80 μM InsP<sub>6</sub> und 25 μM *myo*-Inositol zum Medium ein normales Wachstum zeigt. Setzt man die Verbindungen einzeln zu, so ist kein Wachstum zu beobachten.

### 4.3.7 Inositolmetabolite

#### 4.3.7.1 D-*myo*-Inositol 3-phosphat und *myo*-Inositol

Das eigentliche Produkt der durch MIPS katalysierten Reaktion ist D-*myo*-Inositol 3-phosphat (Ins(3)P). Jedoch führte das Ausschalten der MIPS zu keiner signifikanten Änderung der Ins(3)P-Konzentration. Die ermittelten intrazellulären Konzentrationen lagen sowohl beim Wildtyp als auch bei den Mutanten im Bereich von 0.6-1.0 μM und waren unabhängig von einer *myo*-Inositolsupplementierung zum Medium.

Dieses lässt sich erklären, wenn man bedenkt, dass neben der Neusynthese aus Glucose 6-phosphat verschiedene Wege bestehen über die Ins(3)P gebildet werden kann. Eine Dephosphorylierung von höherphosphorylierten Inositolphosphaten könnte beispielsweise den Ins(3)P-Level längere Zeit konstant halten. Die Wachstumsbeeinflussung und die reduzierte Überlebensrate nach längerfristigen Inositolentzug zeigt jedoch, dass ein konstanter Ins(3)P-Level nicht ausreicht um das Inositoldefizit vollständig auszugleichen.

Ferner ist es bei der Bestimmungsmethode nicht klar, ob es sich tatsächlich um Ins(3)P oder Ins(1)P handelt, da die HPIC-CD eine achirale Analysenmethode ist.

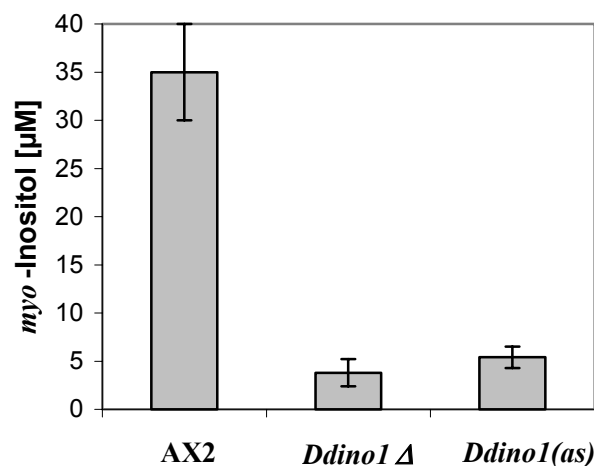
Wie unter 4.1.1 beschrieben ist die Quantifizierung von Ins(3)P mit Hilfe der HPIC-CD Analytik mit Fehlern behaftet. Glucose 1-phosphat koeluiert mit dem Produkt der Enzymreaktion *myo*-Inositol 3-phosphat. und konnte bisher auch durch Variation der chromatographischen Bedingungen nur eingeschränkt von diesem getrennt werden.

Im Gegensatz zur intrazellulären Ins(3)P-Konzentration führt eine Inkubation von *Ddino1* $\Delta$  auf inositolfreiem Medium zu einer drastischen Verringerung der intrazellulären *myo*-Inositolkonzentration.

Der Wildtyp AX2 enthält auf inositolfreiem Medium etwa  $35 \pm 5$   $\mu\text{M}$  *myo*-Inositol. Bedingt durch die hohe *myo*-Inositolkonzentration im Medium der Vorkultur enthielten die Mutanten zunächst große Mengen *myo*-Inositol, die zum größten Teil auf internalisiertes Medium zurückzuführen sind. Bei aktiv pinozytierenden Zellen kann das internalisierte Medium bis zu 15 % des Zellvolumens erreichen.<sup>370</sup>

Die *myo*-Inositolkonzentration sinkt schon nach ca. 4 h deutlich unter den Basalwert des Wildtyps ab und erreicht nach ca. 24 h ein Minimum von unter 5  $\mu\text{M}$ . *Ddino1(as)* zeigt ein ähnliches Verhalten, jedoch setzt der starke Konzentrationsabfall etwas später ein und das Konzentrationsminimum liegt etwas über 5  $\mu\text{M}$ .

Diese Ergebnisse korrelieren gut mit den ersten sichtbaren phänotypischen Veränderungen der Mutanten, die nach ca. 5 h auftreten.



**Abbildung 58: Intrazelluläre *myo*-Inositolkonzentration von Wildtypzellen und 24 h auf inositolfreiem Medium kultivierten inositol-auxotrophen Mutanten**

Inkubationsbedingungen: 100 ml FM-Medium in 1000 ml Schüttelkolben (22.5 °C, 120 Upm). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen.

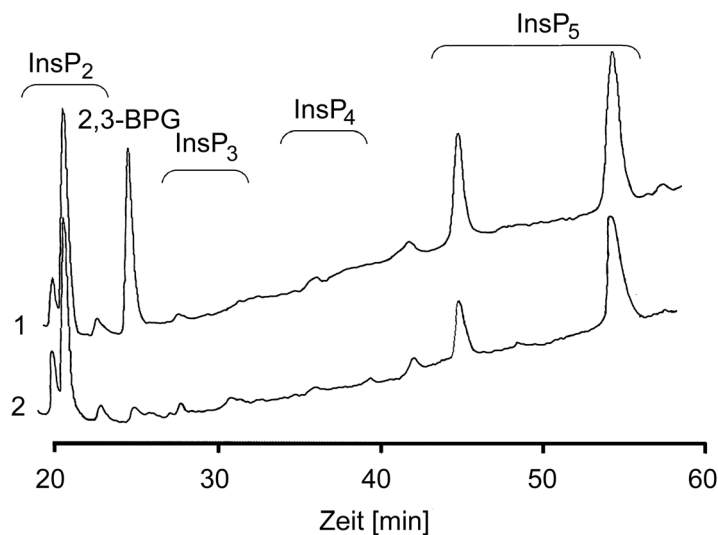
Einen drastischen Rückgang der intrazellulären *myo*-Inositolkonzentration konnte auch schon bei inositol-auxotrophen Eizellen aus Meerschweinchen beobachtet werden. Hierbei

sank die intrazelluläre *myo*-Inositolkonzentration innerhalb von 72 h von 8.5 nmol/mg Protein auf 0.103 nmol/mg Protein.<sup>126</sup>

#### 4.3.7.2 Höherphosphorylierte Inositolphosphate (InsP<sub>2</sub>-InsP<sub>5</sub>)

Die Abnahme des intrazellulären *myo*-Inositollevels führte zur Überlegung, dass der Entzug von *myo*-Inositol im Medium der inositol-auxotrophen Mutanten die intrazellulären Konzentrationen verschiedener Inositolphosphaten beeinflussen könnte.

Die inositol-auxotrophen Mutanten zeigten, unabhängig von einer *myo*-Inositol-supplementierung, keine bedeutsamen Änderungen im Bereich von InsP<sub>2</sub>-InsP<sub>5</sub> gegenüber dem Wildtyp.



**Abbildung 59: HPLC-MDD Analyse (saures System) von extrahierten Inositolphosphaten aus  $2 \cdot 10^8$  Zellen**  
Wachstumsbedingungen: 400 ml FM-Medium in Fernbachkolben (22.5 °C, 120 Upm). (1) *Ddino1Δ* 24 h ohne *myo*-Inositol; (2) *Ddino1Δ* +500  $\mu$ M *myo*-Inositol.

Die intrazelluläre Konzentration des physiologisch relevanten Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> wurde für *D.discoideum* in der Literatur mit 1.5-3  $\mu$ M<sup>215</sup> bzw. 6.7  $\mu$ M<sup>355</sup> angegeben. Aufgrund dieser geringen Konzentration ist eine Detektion mittels HPLC-MDD nicht möglich.

Versuche mit einem radioaktiven Verdrängungstest in Zusammenarbeit mit Dr. H. Lemoine (Uniklinik, Düsseldorf) zeigten, dass *Ddino1Δ* eine leicht erhöhte Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Konzentration (0.8-1.0  $\mu$ M) gegenüber dem Wildtyp (0.5-0.7  $\mu$ M) zeigen. Ein Inositolentzug in den inositol-auxotrophen Mutanten führte zu keiner Reduzierung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>.

Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> nimmt eine herausragende Rolle bei der Signaltransduktion höherer Organismen ein. Eine ähnliche physiologische Rolle ist in *D.discoideum* jedoch fraglich, da

eine mittels homologer Rekombination erzeugte Deletion des PLC-Gens zu keiner signifikanten Veränderung des Phänotyps führte.<sup>356,160</sup>

*D.discoideum* besitzt einen sehr komplexen Inositolphosphatstoffwechsel. Es sind Phosphohydrolasen bekannt, die hochphosphorylierte Inositolphosphate gegebenenfalls bis zum *myo*-Inositol abbauen können.<sup>166</sup> Unter diesem Gesichtspunkt ist es sehr überraschend, dass die inositol-auxotrophen Mutanten unter Inositolmangel keine Veränderungen bei den höherphosphorylierten Inositolphosphaten zeigen.

Der einzige auffällige Unterschied ist eine starke Konzentrationszunahme einer Verbindung, die mit 2,3-Bisphosphoglycerat koeluiert, wenn die inositol-auxotrophen Mutanten 24 h auf inositolfreiem Medium inkubierten. *Ddino1(as)* zeigte dieses Verhalten in abgeschwächter Form. Dieser Effekt wird in 4.3.8.1 näher betrachtet.

### 4.3.7.3 Hochphosphorylierte Inositolphosphate (InsP<sub>6</sub>-InsP<sub>8</sub>)

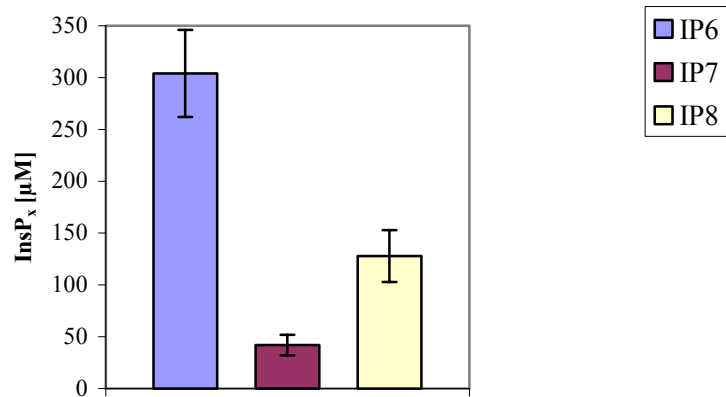
Die hochphosphorylierten Inositolphosphate InsP<sub>6</sub>-InsP<sub>8</sub> sind in *D.discoideum* in hohen Konzentrationen vertreten. Es handelt sich bei InsP<sub>7</sub> und InsP<sub>8</sub> um die pyrophosphorylierten Inositolphosphate D-6-Diphospho-*myo*-inositolpentakisphosphat und D-5,6-Bisdiphospho-*myo*-inosoltetrakisphosphat. Neben D-6-Diphospho-*myo*-inositolpentakisphosphat ist in *D.discoideum* noch D-5-Diphospho-*myo*-inositolpentakisphosphat zu finden. Die beiden InsP<sub>7</sub>-Isomere treten im Verhältnis von 10:1 auf.

In *D.discoideum* liegen die intrazellulären Konzentration von InsP<sub>6</sub> zwischen 300 und 600 µM, von InsP<sub>7</sub> zwischen 30 und 100 µM und von InsP<sub>8</sub> zwischen 60 und 300 µM.<sup>357,195</sup> Diese hohen Konzentrationen führten zur Überlegung, dass die hochphosphorylierten Inositolphosphate als „Speichermoleküle“ dienen und einen intrazellulären *myo*-Inositolmangel über einen gewissen Zeitraum ausgleichen könnten.

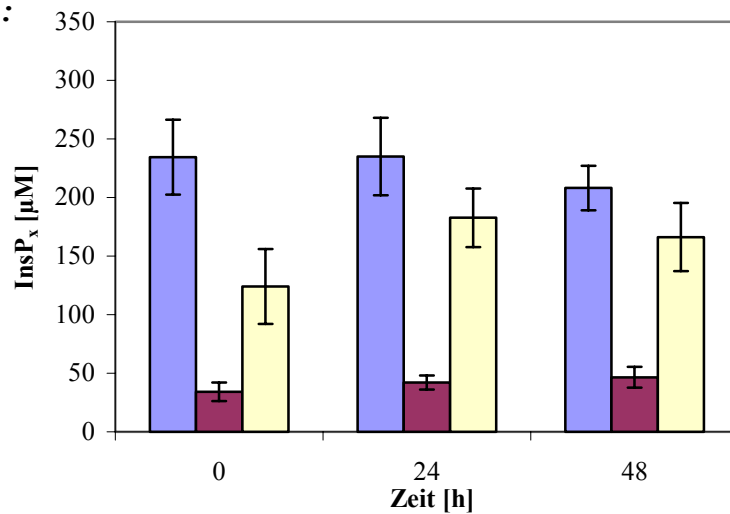
Ein Vergleich von Wildtypzellen und inositol-auxotrophen Mutanten zeigt in Gegenwart von 500 µM *myo*-Inositol keine Unterschiede bei den hochphosphorylierten Inositolphosphaten. Ein 24stündiger Entzug von *myo*-Inositol im Wachstumsmedium der inositol-auxotrophen Mutanten führte zu keinen signifikanten Konzentrationsänderungen.



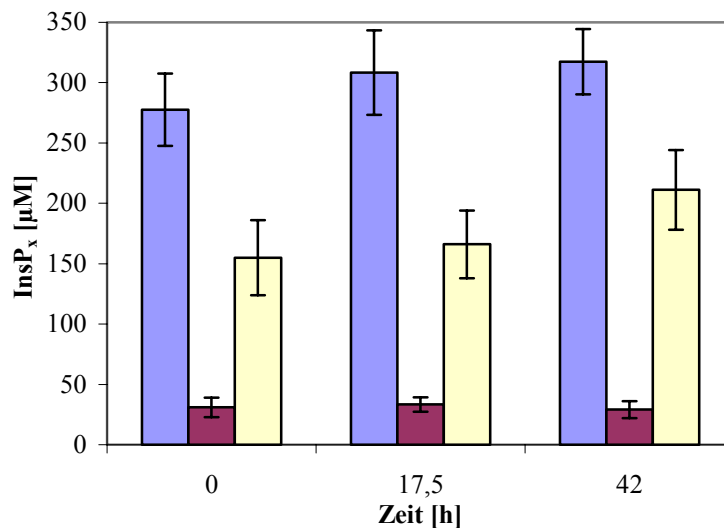
**AX2:**



***Ddino1 Δ*:**



***Ddino1(as)*:**



**Abbildung 60: Einfluss von Inositolmangel auf die intrazelluläre Konzentration hochphosphorylierter Inositolphosphate bei AX2, *Ddino1Δ* und *Ddino1(as)*.**

Wachstumsbedingungen: 400 ml FM-Medium in Fernbachkolben (22.5 °C, 120 Upm). Die Konzentrationen ergaben sich aus dem Mittelwert dreier unabhängiger Messungen. Um den Einfluss der Zelldichte auf die Konzentration der hochphosphorylierten Inositolphosphate zu minimieren wurden die Proben bei einer Zelldichte von ca.  $2.5 \cdot 10^6$  Zellen/ml entnommen.

Die Funktion von InsP<sub>6</sub> und den Diphosphoinositolphosphaten in *D.discoideum* ist bisher noch unbekannt.

Allgemein besitzen alle hochphosphorylierten Inositolphosphate die Fähigkeit divalente und trivalente Metallionen (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>) zu komplexieren. InsP<sub>6</sub> hemmt die durch Fe<sup>3+</sup> katalysierte Hydroxylradikalbildung und unterdrückt die Lipidperoxidation.<sup>358</sup> Für die Komplexbildung sind die Phosphatgruppen in den Positionen 1,2 und 3 wichtig, die anderen Gruppen spielen nur eine untergeordnete Rolle. Daher ist anzunehmen, dass die PP-InsPs Fe<sup>3+</sup>-Ionen ähnlich komplexieren können wie InsP<sub>6</sub>.

*In vitro* Studien deuten auf eine inhibitorische Wirkung hochphosphorylierter Inositolphosphate auf Proteine hin, die bei der Endo- und Exozytose eine zentrale Rolle spielen. Problematisch sind hierbei jedoch die gefundenen Bindungskonstanten ( $K_d < 300$  nM)<sup>190,191,359</sup> dieser Proteine für hochphosphorylierte Inositolphosphate. Die weit über diesen Wert liegenden intrazellulären Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate würden zu keiner Wachstumsphase eine Endo- oder Exozytose zulassen. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die tatsächlichen Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate durch Kompartimentierung oder Maskierung wesentlich geringer ist. Daher kann eine Rolle der PP-InsPs bei der Regulation von Exo- und Endozytose nicht ausgeschlossen werden.

Eine drastische Verminderung der InsP<sub>6</sub>-Synthese in *S.cerevisiae* ist mit einem deutlichen Rückgang des mRNA-Exports aus dem Kern verbunden. Der mRNA-Transport wird wahrscheinlich durch die Metabolisierung von InsP<sub>6</sub> zu PP-InsPs und weniger durch InsP<sub>6</sub> selber reguliert.<sup>360,188</sup> Ob dieses auch bei *D.discoideum* der Fall ist, konnte jedoch bisher noch nicht gezeigt werden.

Untersuchungen bei *S.cerevisiae* deuten auf eine Beteiligung der Diphosphoinositolphosphate bei der Vakuolenbildung hin. Eine Mutation in dem für die InsP<sub>6</sub>-Kinase kodierenden Gen führte zu starken Konzentrationsabnahmen bei den Diphosphoinositolphosphaten. Diese mutierten Hefezellen zeigen ein geringes Wachstum und enthalten ungewöhnlich kleine und fragmentierte Vakuolen.<sup>188</sup>

In *S.cerevisiae* führt die Deletion eines für eine Diphosphoinositolpolyphosphat Synthase kodierenden Gens zu Defekten in der Vakuolenbiosynthese, der Zellwandintegrität und zu einer erhöhten Anfälligkeit der Zellen gegen osmotischen Stress.<sup>361</sup>

Deletionsmutanten der Inositolhexakisphosphat Kinase bei *D.discoideum* zeigen phänotypisch nur geringe Veränderungen. Es wurden keine Änderungen in der Endozytose, im Zellwachstum und in der Zellgröße entdeckt.<sup>196</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Inositolmangel bei den inositol-auxotrophen Mutanten keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate  $\text{InsP}_6$ - $\text{InsP}_8$  zeigt.

Trotz der hohen Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate ist es *D.discoideum* nicht möglich einen *myo*-Inositolmangel auszugleichen.

Eventuell sind die hochphosphorylierten Inositolphosphate essentiell für lebenswichtige Funktionen der Zelle, so dass eine strikte Regulation den Abbau dieser Verbindungen verhindert.

Eine Erklärung könnten „futile“ Substratzyklen bieten, die den Gehalt der hochphosphorylierten Verbindungen konstant halten. Die Inkubation von cytosolischen Extrakten aus *D.discoideum* mit  $\text{InsP}_6$  in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems führt zu keiner signifikanten Dephosphorylierung.<sup>176</sup> Ohne Zusatz von ATP kommt es hauptsächlich zur Bildung von  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ . Aus diesen Resultaten wurden „futile“ Substratzyklen zwischen  $\text{InsP}_6$  und den beiden Inositolpentakisphosphaten postuliert. An diesem Prozess beteiligt ist wahrscheinlich die inzwischen gereinigte und charakterisierte Inositolpentakisphosphat 3/5 Kinase.<sup>175</sup> Die physiologische Bedeutung dieser ATP-verbrauchenden Zyklen ist noch nicht bekannt.

In den inositol-auxotrophen Mutanten bleibt die ATP-Konzentration bei Inositolentzug zunächst konstant bei ca. 1 mM. Erst mit dem Absterben der Zellen sinkt die ATP-Konzentration deutlich ab.

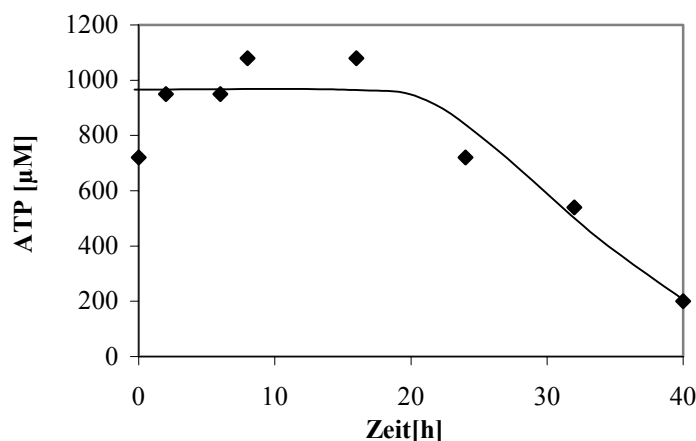


Abbildung 61: Zeitlicher Verlauf der ATP-Konzentration unter Inositolmangel am Beispiel von *Ddino1A*

Die ATP-Konzentration ist vermutlich ausreichend für die Aufrechterhaltung der „futilen“ Substratzyklen und könnte die  $\text{InsP}_6$ -Konzentration bis zum Tod der Zelle konstant halten.

#### 4.3.7.4 Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositolphosphate

Phosphatidylinositol ist unter den Membranlipiden einzigartig, da es an mehreren Stellen reversibel phosphoryliert werden kann und dabei eine Vielzahl unterschiedlicher Phosphatidylinositolphosphate bilden kann.

Um den Einfluss der Inositol-Auxotrophie auf die Konzentrationen von Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositolphosphaten zu bestimmen, wurde ein System etabliert, um isolierte und deacylierte Phosphatidylinositole durch HPIC-CD Analytik zu quantifizieren (3.5).

Abbildung 62 zeigt ein Übersichtschromatogramm isolierter und deacylierter Phospholipide aus AX2. Mit Hilfe von Standardsubstanzen wurden PtdIns, PtdIns(4)P, PtdIns(3)P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> entsprechend ihrer Retentionszeit den Signalen zugeordnet. Weitere Phosphatidylinositolphosphate wurden nicht gefunden.

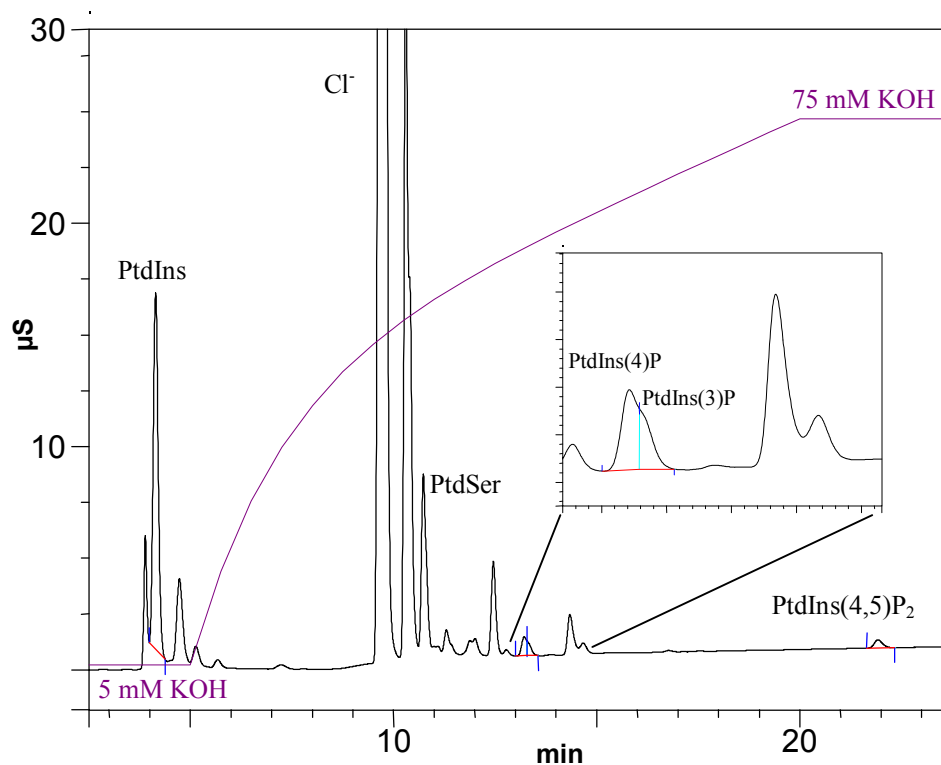


Abbildung 62: HPIC-CD Analytik einer deacylierten Präparation aus *D. discoideum* AX2

Injektion eines Äquivalents von  $2 \cdot 10^7$  Zellen.

Im Verlauf der Experimente zeigte sich, dass PtdIns zeitgleich eine zweite Substanz koeluierte. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Phosphatidylglycerol. Die Koelution von PtdIns und Phosphatidylglycerol in der HPIC-CD Analytik ist seit längerer Zeit

bekannt.<sup>362</sup> Die Isolierung des Peaks, Deglycerierung, anschließende Dephosphorylierung und Quantifizierung des resultierenden *myo*-Inositols zeigte, dass nur ein Teil des Peaks auf Phosphatidylinositol zurückzuführen ist.

Inositolentzug führt bei den inositol-auxotrophen Mutanten zu einem starken Rückgang an PtdIns und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Die Konzentrationen an PtdIns(3)P und PtdIns(4)P werden durch den Inositolentzug kaum beeinflusst. Die nachfolgende Tabelle zeigt den Einfluss von 24stündigem Inositolmangel bei *Ddino1Δ* und *Ddino1(as)* gegenüber dem Wildtyp AX2.

μM	AX2 (+)	AX2 (-)	<i>Ddino1Δ</i> (+)	<i>Ddino1Δ</i> (-)	<i>Ddino1(as)</i> (+)	<i>Ddino1(as)</i> (-)
PtdIns	125	65	125	4.7		
PtdIns(4)P	1,3	1.2	1.2	1.2	1.1	1.1
PtdIns(3)P	0.7	0.7	0.8	0.8	0.7	0.6
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	0.8	0.6	1.1	0.2	0.6	0.1

**Tabelle 42: Auswirkungen des Inositolmangels auf die Konzentrationen von Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositolphosphate des Wildtyps und der inositol-auxotrophen Mutanten**

(+) Zellen in Gegenwart von 500 μM *myo*-Inositol gewachsen; (-) Zellen nach 24stündigem Inositolentzug.

PtdIns ist in *D.discoideum* eines der Hauptmembranbestandteile. Es nimmt in vegetativen Zellen ca. 6 % und in der Plasmamembran ca. 8 % aller Phospholipide ein.<sup>224</sup> Neben einem starken Rückgang der Neusynthese von PtdIns bei Inositolentzug in inositol-auxotrophen *S.cerevisiae*<sup>129</sup> wurde auch eine Abnahme der PtdIns-Konzentration bei inositol-auxotrophen Eizellen des Hamsters beobachtet. Damit verbunden war eine Zunahme der Phosphatidylglycerol-Konzentration. Die Autoren vermuteten, dass in der Membran Phosphatidylinositol durch Phosphatidylglycerol ersetzt wurde.<sup>126</sup> Ob dieses auch bei *D.discoideum* der Fall ist, konnte nicht ermittelt werden. Die Abnahme der PtdIns-Konzentration unter Inositolentzug bei *DdIno1Δ* konnte nicht im HPIC-CD Chromatogramm beobachtet werden, sondern erst nach Isolierung des Peaks, Degradation des PtdIns durch Deglycerierung und Dephosphorylierung und amperometrischer Detektion des resultierenden *myo*-Inositols. Die Tatsache, dass die Signalintensität im HPIC-CD Chromatogramm nicht abnimmt, die PtdIns-Konzentration jedoch stark zurückgeht, deutet auf eine erhöhte Phosphatidylglycerol-Konzentration hin.

Die Konzentrationsabnahme an PtdIns setzt in den Mutanten früh ein. Nach 8 h Inositolentzug sinkt PtdIns auf ca. 1/10 der Ausgangskonzentration ab. Dieses ist für *Ddino1Δ* exemplarisch in Abbildung 63 wiedergegeben.

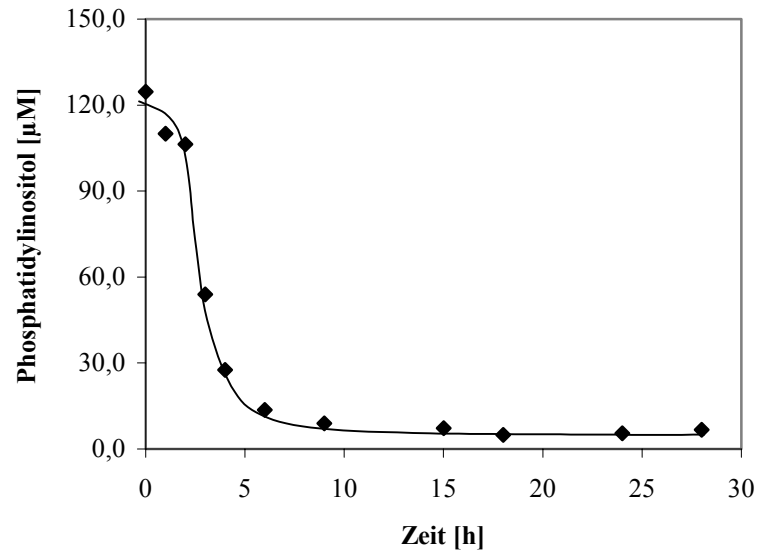


Abbildung 63: Zeitliche Abnahme der PtdIns-Konzentration unter Inositolmangel bei *Ddino1* $\Delta$

Die relativen Mengen PtdIns(4,5) $\text{P}_2$  von 1.3 % bezogen auf den PtdIns-Gehalt bewegen sich in *D.discoideum* in der gleichen Größenordnung wie bei Säugerzellen. Ein 24stündiger Inositolentzug führt sowohl bei *Ddino1* $\Delta$  als auch bei *Ddino1(as)* zur Absenkung der intrazellulären PtdIns(4,5) $\text{P}_2$ -Konzentration auf ca. 20 % gegenüber auf *myo*-Inositol gewachsenen Vergleichszellen.

Der Rückgang der PtdIns(4,5) $\text{P}_2$ -Konzentration setzt dabei schon früh ein. Nach 4 h ist das intrazelluläre PtdIns(4,5) $\text{P}_2$  auf ca. 20 % der Ausgangskonzentration abgesunken.

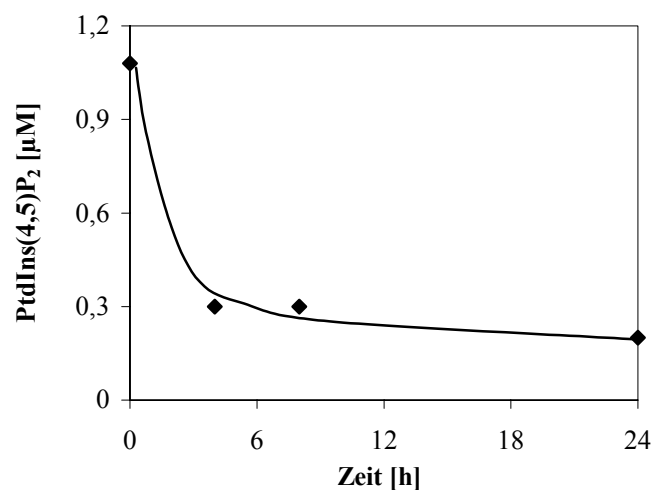


Abbildung 64: Zeitliche Abnahme der PtdIns(4,5) $\text{P}_2$ -Konzentration bei *Ddino1* $\Delta$  unter Inositolmangel.

Die Biosynthese von PtdIns(4,5) $\text{P}_2$  erfolgt aus PtdIns über PtdIns(4)P (1.8.3). Obwohl sowohl PtdIns als auch PtdIns(4,5) $\text{P}_2$  unter Inositolentzug stark zurückgehen, bleibt die

PtdIns(4)P-Konzentration in den inositol-auxotrophen Mutanten konstant. Eine mögliche Erklärung könnte in den unterschiedlichen Geschwindigkeiten der am Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsel beteiligten Enzyme liegen.

*D.discoideum* zeigt einen ungewöhnlich hohen Anteil von PtdIns(3)P. Dieser beträgt ca. 40 % der gesamten Phosphatidylinositolmonophosphat-Fraktion. Bei Säugerzellen nimmt PtdIns(3)P nur ca. 2-5 % dieser Fraktion ein.<sup>363</sup> Die relativen Mengen an PtdIns(4)P von 2.7 % bezogen auf den PtdIns-Gehalt bewegen sich in der gleichen Größenordnung wie bei Säugerzellen.

Im Gegensatz zu den Inositolphosphaten zeigt ein Inositolentzug starke Auswirkungen auf die Konzentrationen der membrangebundenen Verbindungen PtdIns und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in den inositol-auxotrophen Mutanten. Dieses spiegelt wahrscheinlich die Tatsache wieder, dass der Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsel wesentlich schneller ist als der Inositolphosphatstoffwechsel. Führt man <sup>3</sup>H-markiertes *myo*-Inositol durch Elektroporation in *D.discoideum* ein, so wird es wesentlich schneller in PtdIns und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> eingebaut als in Inositolphosphate.<sup>364</sup>

Die Bildung von PtdIns aus *myo*-Inositol und die Phosphorylierung über PtdIns(4)P zu PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> geschehen sehr schnell. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kann anschließend über Phospholipase C zu Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> abgebaut werden. Durch sukzessive Dephosphorylierung von Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> ist es möglich wieder *myo*-Inositol zu bilden. Die starken Verluste an *myo*-Inositol und PtdIns innerhalb von 24 h deuten jedoch darauf hin, dass es in *D.discoideum* kein „Recycling“ von *myo*-Inositol gibt.

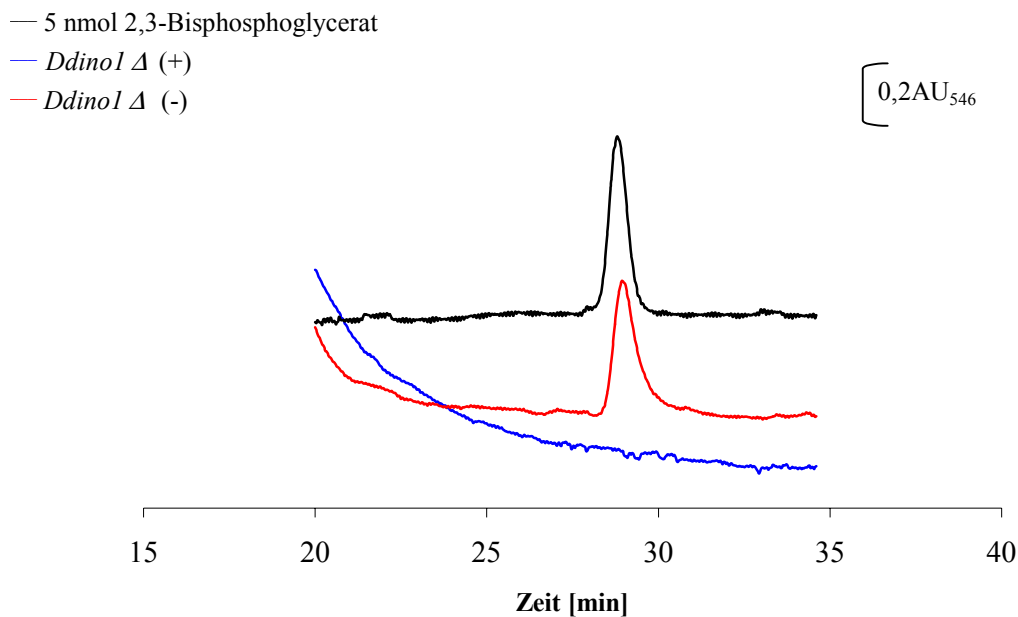
Es stellt sich die Frage, welche metabolischen Wege das *myo*-Inositol einschlägt. Eine Möglichkeit wäre der Einbau des *myo*-Inositols in Inositolphosphate. Die Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate (InsP<sub>6</sub>-InsP<sub>8</sub>) bleibt zwar in den inositol-auxotrophen Mutanten während des Inositolentzugs konstant, sie sind jedoch wesentlich höher als die *myo*-Inositolkonzentration. Ein Zufluss von *myo*-Inositol beeinflusst diesen Pool nur unwesentlich.

Ein Verlust an *myo*-Inositol könnte auch durch Abbau zu Glucuronsäure erfolgen. Dieses kann danach über D-Xylulose 5-phosphat in den Pentosephosphatzyklus eingeführt werden.<sup>85</sup> Es ist nicht bekannt, ob dieser Stoffwechselweg in *D.discoideum* eine Rolle spielt.

### 4.3.8 Veränderungen anderer, nicht inositolhaltiger Metabolite

#### 4.3.8.1 2,3-Bisphosphoglycerat

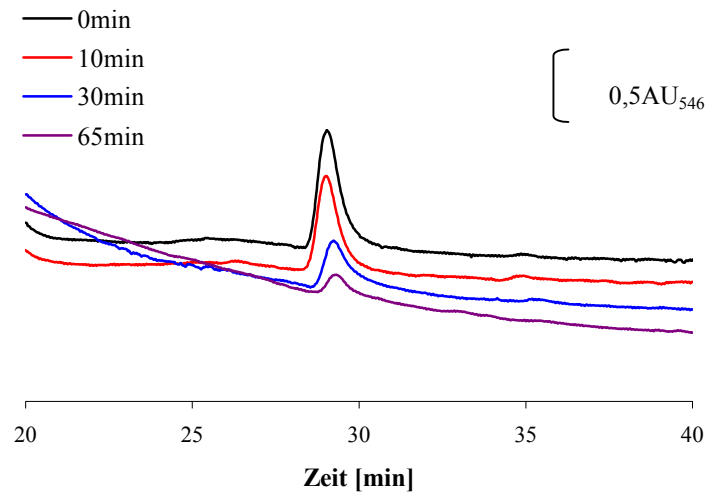
Wie schon berichtet, reichert sich in den inositol-auxotrophen Mutanten bei Inositolentzug eine Verbindung an, die mit 2,3-Bisphosphoglycerat koeluiert. Dieses ist in Abbildung 65 exemplarisch am Beispiel *Ddino1*Δ gezeigt.



**Abbildung 65: Konzentrationsanstieg einer Verbindung die mit 2,3-BPG koeluiert**  
HPLC-MDD (alkalisches System) eines Perchlorsäureextrakts von  $1 \cdot 10^8$  Zellen

Die Identifizierung der Substanz als 2,3-BPG erfolgte durch Inkubation eines Perchlorsäureextrakts von *Ddino1*Δ mit Phosphoglycerat-Mutase (EC 2.7.5.3). Dieses Enzym wirkt in Gegenwart von 2-Phosphoglykolat als spezifische 2-Phosphatase, und baut 2,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat ab. Die nachfolgende Abbildung zeigt deutlich den zeitlichen Abbau der angereicherten Substanz und damit die Identifizierung als 2,3 BPG.



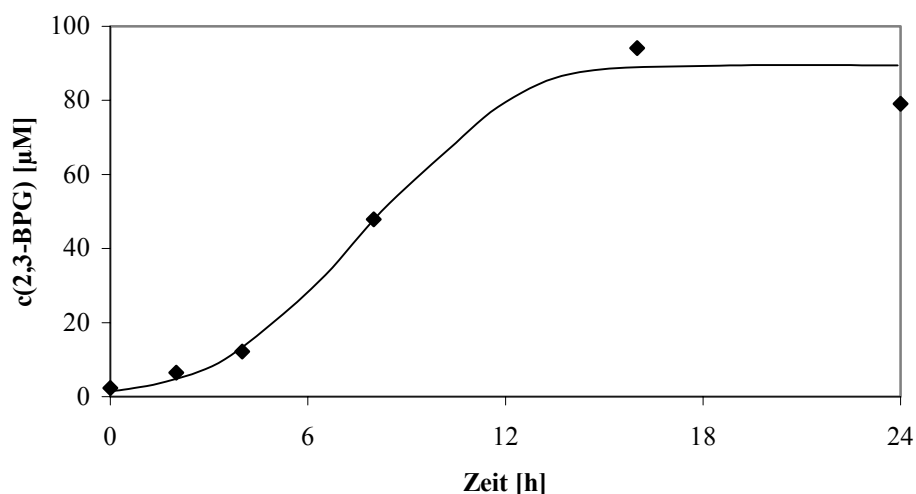


**Abbildung 66: Identifizierung von 2,3-BPG in Zellextrakten von *Ddino1Δ* durch Abbau mit 2,3-Bisphosphoglycerat-Phosphatase**

HPLC-MDD (alkalisches System) von  $2 \cdot 10^8$  Zellen (*Ddino1Δ*, 24 h ohne *myo*-Inositol). Zusatz von 250 mU 2,3-Bisphosphoglycerat Phosphatase.

Der Anstieg des intrazellulären 2,3-BPG beginnt nach etwa 4 h und erreicht nach etwa 18 h ein Maximum von ca. 90  $\mu\text{M}$ . Mit dem Absterben der Zellen sinkt der 2,3-BPG-Spiegel wieder ab.

Die intrazelluläre Konzentration von 2,3-BPG im Wildtyp beträgt bei exponentiell wachsenden Zellen ca. 8  $\mu\text{M}$ .<sup>365</sup> Die intrazelluläre Konzentration von 2,3-BPG in den Mutanten liegt in Gegenwart von *myo*-Inositol niedriger (ca. 2-4  $\mu\text{M}$ ). Ein 24stündiger Inositolentzug führt zu einer 30-70fachen Konzentrationserhöhung. In abgeschwächter Form ist diese Konzentrationserhöhung auch bei *Ddino1(as)* zu beobachten (10-15fach).



**Abbildung 67: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären 2,3-Bisphosphoglyceratkonzentration bei *Ddino1Δ* unter Inositolmangel**

Synthese und Abbau von 2,3-BPG sind Nebenwege der Glycolyse. Die Bisphosphoglycerat-Mutase wandelt 1,3-BPG in 2,3-BPG um, das wiederum durch die 2,3-Bisphosphoglycerat-Phosphatase zu 3-Phosphoglycerat hydrolysiert wird. Die Synthese und der Abbau von 2,3-BPG sind nahezu irreversibel.

Wahrscheinlich ist der Anstieg an 2,3-BPG auf eine erhöhte Aktivität der Bisphosphoglycerat-Mutase zurückzuführen. Die Inkubation von Zellextrakten aus *Ddino1Δ* mit 1,3-Bisphosphoglycerat zeigte eine 2-3fach erhöhte Aktivität gegenüber dem Wildtyp. Eine geringere Abbaurate von 2,3-BPG konnte bei Inositolentzug in den Mutanten nicht bemerkt werden.

Geringe Mengen 2,3-BPG werden in der Glycolyse benötigt. Die Phosphoglycerat-Mutase, das Enzym, das die Umwandlung von 3-Phosphoglycerat in 2-Phosphoglycerat katalysiert, benötigt zur Aktivierung katalytische Mengen von 2,3-BPG. 2,3-BPG phosphoryliert einen Histidinrest im aktiven Zentrum, wodurch die aktive Form des Enzyms entsteht.

Neben dieser ursprünglichen Funktion dient 2,3-BPG bei Säugererythrozyten zur Modulation der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins, indem es die deoxygenierte Form des Hämoglobins stabilisiert. 2,3-BPG tritt in den meisten Zelllinien nur in Spuren auf. In Säugererythrozyten liegt es jedoch in Konzentrationen von bis zu 4 mM vor.

Eine weitere bekannte Funktion von 2,3-BPG ist die *in vitro* Inhibierung der *myo*-Inositol 1,4,5-trisphosphat 5-Phosphatase. In *D.discoideum* wurden bisher 4 Gene identifiziert, die Homologien zu 5-Phosphatasen aus anderen Organismen zeigen.<sup>221</sup> Die Inaktivierung eines der vier Gene führte zu Defekten im Wachstum und bei der Entwicklung.

Eine *myo*-Inositol 1,4,5-trisphosphat 5-Phosphatase wurde in unserem Arbeitskreis aus *D.discoideum* isoliert.<sup>365</sup> Dieses Enzym ist in der Lage sowohl  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  als auch  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  spezifisch in der 5-Position zu dephosphorylieren. Es zeigte sich, dass unter den gleichen Konzentrationsverhältnissen von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  zu 2,3-BPG, wie in der Zelle *in vitro* vorliegen, die Abbaurate von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  um über 80% verlangsamt wurde.

Diese Inhibierung ist auch aus anderen Zelllinien bekannt. Beispielsweise führt ein Zusatz von 2,3-BPG zu permeabilisierten Pancreas-Acinar-Zellen bei Erregung durch Cholecystokinin-Octapeptid (sekretionsstimulierend) dazu, dass sowohl der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel als auch die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Konzentration für ein bestimmtes Zeitintervall im Vergleich zur Kontrolle erhöht waren.<sup>366</sup> Bei endokrinen Zellen des Pankreas wird sogar ein regulatorischer Einfluss dieser Wechselwirkung vermutet, da die durch externe Glucose

stimulierte Inositol-Sekretion der Zellen mit beträchtlichen Veränderungen einer Reihe von Glycolyse-Zwischenprodukten verbunden ist.<sup>367</sup>

Bei dem Anstieg von 2,3-BPG könnte es sich um eine Art „rescue“-Mechanismus handeln. Hypothetisch sind die Zellen durch Änderungen der 2,3-BPG-Konzentration in der Lage, Einfluss auf die *myo*-Inositol 1,4,5-trisphosphat 5-Phosphatase Aktivität zu nehmen. Folglich könnte sich der Anstieg der 2,3-BPG-Konzentration auf die Konzentrationen von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$  und  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  auswirken.

Die Inhibierung der *myo*-Inositol 1,4,5-trisphosphat 5-Phosphatase durch 2,3-BPG könnte den Abbau der physiologisch wichtigen Moleküle  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  über einen längeren Zeitraum einschränken, und so *D.discoideum* ein längeres Überleben ermöglichen. Während des Inositolentzugs bleibt jedoch nur die  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Konzentration konstant, die  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Konzentration nimmt auf etwa 30 % ab. Allerdings setzt diese Konzentrationsabnahme sehr früh ein und erreicht nach 4 h ein Minimum. Zu diesem Zeitpunkt beginnt der 2,3-BPG-Level erst allmählich anzusteigen. Die Stabilisierung der  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Konzentration nach 4 h könnte ein weiteres Indiz für einen „rescue“-Mechanismus des 2,3-BPG's sein.

### 4.3.8.2 Phospholipide

Die Biosynthese verschiedener Phospholipide wird in Hefen durch *myo*-Inositol auf Transkriptionsebene reguliert (1.3). Neben der Reprimierung der MIPS, wird auch die Expression verschiedener, für die Phosphatidylcholin-Biosynthese benötigter Enzyme, durch *myo*-Inositol reguliert.<sup>86</sup>

Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine posttranslationale Regulation verschiedener, für die Membranbiosynthese wichtigen, Enzyme durch *myo*-Inositol. Beispielsweise wird die Aktivität der Phosphatidylglycerolphosphat Synthase, einem bei der Biosynthese von Cardiolipin beteiligtem Enzym, durch *myo*-Inositol reprimiert.<sup>368</sup> Ob *myo*-Inositol Proteinkinasen deaktiviert, oder Proteinphosphatasen aktiviert, ist noch Gegenstand der Forschung.

Neben dem Rückgang an  $\text{PtdIns}$  und  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  zeigte ein Inositolentzug keine weiteren Auswirkungen auf die Phospholipidzusammensetzung von *Ddino1Δ*.

Die durchgeführten HPLC-Analysen der deacylierten Phospholipide (4.3.7.4) und Literaturhinweise<sup>126</sup> deuten jedoch darauf hin, dass der Rückgang an  $\text{PtdIns}$  mit einer Zunahme an Phosphatidylglycerol verbunden ist. Dieses konnte jedoch noch nicht belegt werden.

HPLC-Analysen zeigten keine Veränderungen in der Konzentration an Phosphatidylserin, Cardiolipin und Phosphatidat. Zwitterionische Verbindungen wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und die plasmalogene Form des Phosphatidylethanolamin konnten auf der Anionenaustauschersäule nicht analysiert werden. Dünnschichtchromatographische Trennungen zeigten jedoch, dass der Inositolenzug die Konzentrationen dieser Hauptmembranbestandteile nicht beeinflusst.

### 4.3.9 Adhäsion, Endozytische Eigenschaften, und Zytokinese

Die Funktionen der inositolhaltigen Metabolite in *D.discoideum* sind noch weitgehend unbekannt. Das Ausschalten der MIPS führt bei vegetativen Zellen zu Konzentrationsänderungen einiger Metabolite. Nachfolgend werden verschiedene Experimente beschrieben, deren Ziel es war, die ermittelten Konzentrationsänderungen von *myo*-Inositol, PtdIns und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> mit phänotypischen Veränderungen zu korrelieren.

In der Literatur wird über die Rolle verschiedener Phosphoinositide und Inositolphosphate bei der Endozytose und Membranrecycling, bei der Organisation des Zytoskeletts und der Zytokinese diskutiert (1.8.3). Dementsprechend stehen endozytische Prozesse wie Pinozytose und Phagozytose, Zelladhäsion, Membranrecycling und Zytokinese im Mittelpunkt der Betrachtung.

#### 4.3.9.1 Adhäsion und Aggregation

*D.discoideum* besitzt mindestens zwei funktionell unabhängige Rezeptorsysteme, die unterschiedliche Substrateigenschaften erkennen. So vermitteln nicht-spezifische Rezeptoren die Bindung durch hydrophobe Wechselwirkungen, und Lectin-artige Rezeptoren die spezifische Bindung an glucosylierten Oberflächen.

Durch Selektion von Zellen, die keine schweren Wolframpartikel phagozytieren bzw. in Phosphatpuffer keine Zellaggregate bilden, wurden sogenannte phg-Mutanten isoliert, die sich durch einen Defekt in der nicht-spezifischen Erkennung auszeichnen.<sup>313</sup> Die Zellen haben einen pleiotropen Phänotyp. Sie vermögen keine Partikel mit hydrophiler Oberfläche (z.B. Bakterien ohne terminale Zuckerreste, proteinbeschichtetes Latex, Erythrozyten) zu phagozytieren, adhären nicht an hydrophilen Oberflächen (z.B. mit Medium beschichtetes Polystyrol) und zeigen Defekte in der Zytokinese (Akkumulation von mehrkernigen Zellen). Dagegen sind die Zellen bei der zuckerspezifischen Erkennung intakt. Sie phagozytieren glucosylierte Modellpartikel und Bakterien mit terminalen Glucose-Resten (*E.coli* B/r). Auch

die Phagozytose von hydrophoben Partikeln und die Adhäsion an hydrophoben Oberflächen zeigt keine Störungen.

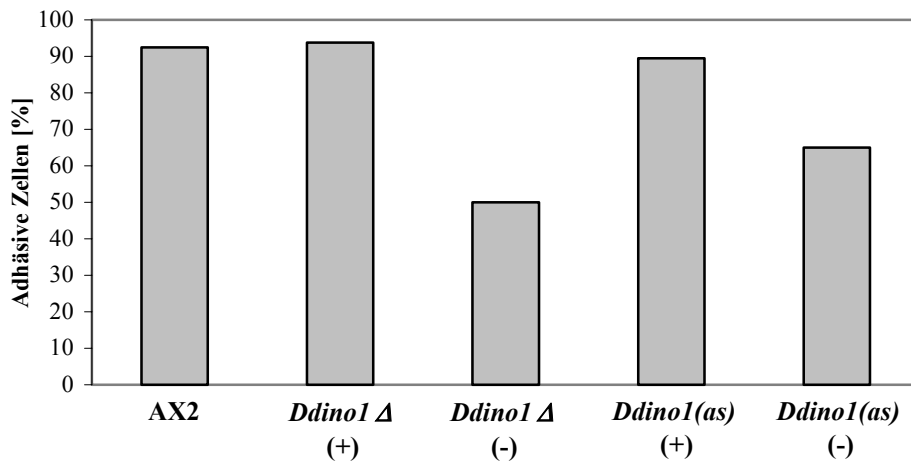
Ausgehend von den *phg*-Mutanten wurden Mutanten isoliert, die neben dem Defekt in der nicht-spezifischen Erkennung auch Defekte in der Erkennung von glycosylierten Oberflächen zeigen.<sup>369</sup> Die *glc*-Mutanten sind weder auf hydrophilen noch auf glycosylierten Oberflächen adhäsiv und phagozytieren in geschüttelten Suspensionen weder Bakterien noch glycosylierte Latexpartikel. Unter Ausschaltung von Scherkräften auf Agarplatten phagozytieren sie jedoch ohne Probleme.

Revertanten, die wieder an hydrophilen Oberflächen adhäreren, zeigen auch alle anderen phänotypischen Eigenschaften des Wildtyps.<sup>370</sup> Dieses deutet darauf, dass die Adhäsion von Partikeln, die Adhäsion an Oberflächen, die Phagozytose von Partikeln und auch die EDTA-sensitive Aggregation miteinander verwandte Prozesse sind und vermutlich eine gemeinsame molekulare Basis besitzen. Die Adhäsion an Oberflächen kann als „frustrierte“ Phagozytose eines unendlich großen Partikels verstanden werden.

Diese Vermutung wird auch durch neuere Arbeiten bestätigt. Es wurden zwei REMI-Mutanten isoliert, *phg1* genannt, die Defekte in der Phagozytose zeigen. Diese Mutanten zeigten eine Insertion in einem Gen, das für ein Membranprotein mit neun Transmembran-Helices kodiert. PHG1 ist der erste beschriebene Phagozytoserezeptor in *D.discoideum* und könnte mit dem nicht-spezifischen Rezeptor identisch sein. Das Ausschalten dieses Gens führt zu einem Phänotyp äquivalent zu dem der *phg*-Mutanten.<sup>371</sup>

Werden die inositol-auxotrophen Mutanten auf hydrophilen Polystyrol-Oberflächen submers ohne *myo*-Inositol inkubiert, so zeigt sich anfangs kein Unterschied zum Wildtyp. Die Zellen adhäreren zunächst normal. Nach einiger Zeit wird der Kontakt jedoch schwächer und endet in einem vollständigen Ablösen der Zelle vom Substrat.

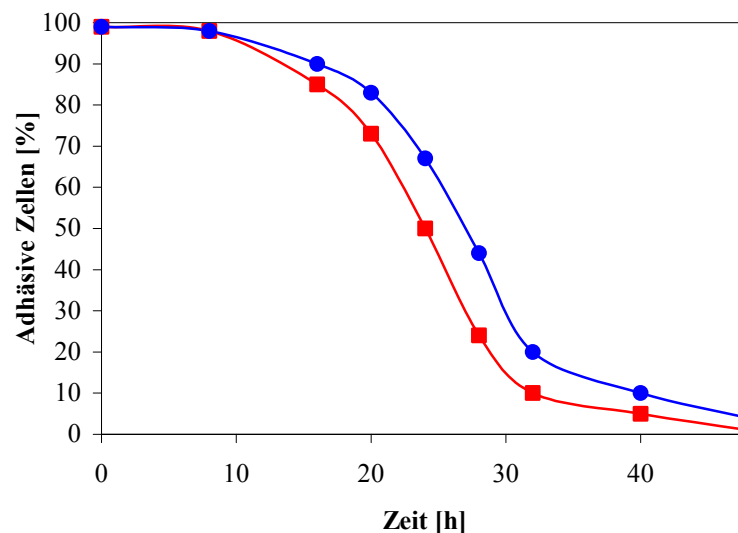
Wie Abbildung 68 zeigt, sind über 90 % der Wildtypzellen und der in Gegenwart von 500  $\mu$ M *myo*-Inositol wachsenden inositol-auxotrophen Mutanten auf hydrophilen Polystyrol-Oberflächen adhäsiv. Im Vergleich zum Wildtyp adhäreren nur noch 50 % der *Ddino1* $\Delta$ -Zellen nach 24 h Inositolentzug. *Ddino1(as)* zeigte ein analoges Adhäsionsverhalten.



**Abbildung 68: Vergleich des Adhäsionsverhaltens des Wildtyps AX2 und der inositol-auxotrophen Mutanten**

Zellen des Wildtyps AX2 und der inositol-auxotrophen Mutanten *Ddino1*Δ und *Ddino1(as)* wurden in FM-Medium angezogen (100 ml, 22.5 °C, 120 Upm) und auf ihr Adhäsionsverhalten untersucht. (+) + 500 μM *myo*-Inositol; (-) 24 h ohne *myo*-Inositol.

Abbildung 69 zeigt den zeitlichen Verlauf der Adhäsion der inositol-auxotrophen Mutanten bei Inositolentzug. Nach ca. 16 h beginnt eine deutliche Abnahme der Adhäsion. Im weiteren Verlauf des Inositolentzugs nimmt die Adhäsion drastisch ab. Nach 32 h sind nur noch 10 % der *Ddino1*Δ-Zellen bzw. 20 % der *Ddino1(as)*-Zellen adhäsiv.

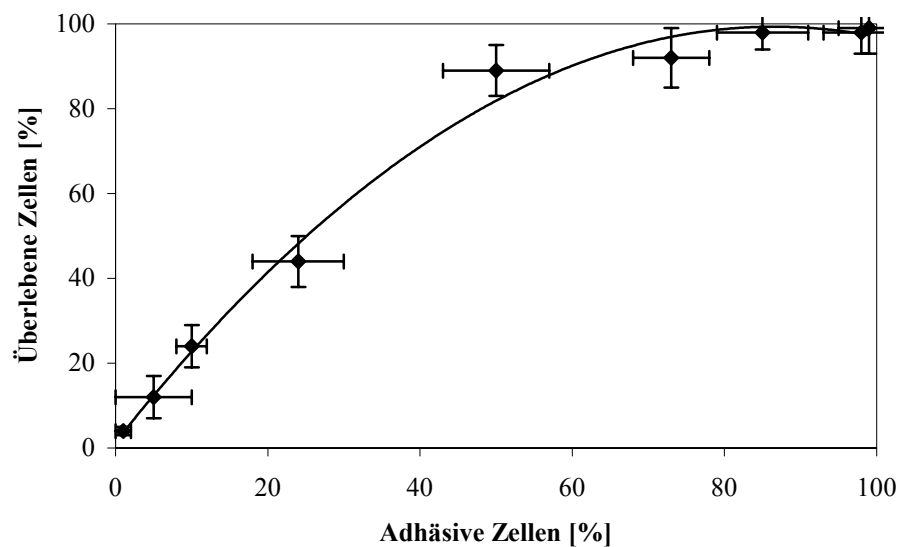


**Abbildung 69: Einfluss von Inositolmangel auf die Adhäsion von *Ddino1*Δ und *Ddino1(as)***

Zellen der inositol-auxotrophen Mutanten *Ddino1*Δ und *Ddino1(as)* wurden in FM-Medium ohne *myo*-Inositol kultiviert (100 ml FM-Medium, 22 °C, 120 Upm). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und auf ihr Adhäsionsverhalten untersucht.

Ob, und in welcher Weise inositolhaltige Metabolite an der Adhäsion an Oberflächen beteiligt sind, konnte bisher noch nicht ermittelt werden. Es ist jedoch bekannt, dass bei Makrophagen die Konzentrationen an  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  bei Adhäsion an Glasoberflächen drastisch ansteigen und nach einigen Minuten wieder auf den Ausgangswert absinken.<sup>372</sup>

Eine Möglichkeit zur schnellen Quantifizierung der Überlebensrate ergab sich durch die Beobachtung, dass dem Vitalitätsverlust der inositol-auxotrophen Mutanten bei längerfristigen Inositolentzug ein Verlust ihrer Adhäsionsfähigkeit auf hydrophilem Polystyrol vorangeht. Nach 20-28 h verliert ein großer Anteil der inositol-auxotrophen Mutanten ihre Adhäsivität. Mit einer Verzögerung von 3-4 h sterben die nichtadhäsiven Zellen anschließend ab. Diese Korrelation wurde ausgenutzt, um versuchsbegleitend die Überlebensrate der Zellen zu bestimmen.



**Abbildung 70: Korrelation der Adhäsion und der Überlebensrate von *Ddino1Δ***

*Ddino1Δ* wurde in FM-Medium ohne *myo*-Inositol kultiviert (100 ml, 22 °C, 120 Upm). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und auf ihr Adhäsionsverhalten getestet. Die Anzahl von überlebenden Zellen wurde durch Ausbringen eines Aliquots von ca. 100 Zellen in eine Petrischale (10 ml FM-Medium, + 500  $\mu\text{M}$  *myo*-Inositol), fünftägige Inkubation bei 22.5 °C und Auszählen der sichtbaren Klone bestimmt. Die Daten stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar.

Bei Nahrungsmangel tritt zunächst das EDTA-sensitive Aggregationssystem „contact site B“ in Erscheinung. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Protein gp24 (DdCAD-1).<sup>373,374</sup> Dieses Protein wird direkt zu Beginn der Hungerphase exprimiert und nicht auf Bakterien wachsenden Zellen exprimiert. Anfangs ist gp24 größtenteils im Cytosol zu finden und ist in der Plasmamembran nur leicht angereichert. Während der Aggregation wird es jedoch stark

an der äußeren Seite der Plasmamembran angereichert. Es handelt sich hierbei um ein lösliches Protein, das über die kontraktile Vakuole die Zelloberfläche erreicht.<sup>375</sup> Ein nicht unerheblicher Teil des sekretierten Proteins ist mit der Außenseite der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig assoziiert. Gegen DdCAD-1 gerichtete Antikörper blockieren die Bildung EDTA-sensitiver Kontakte zwischen den Zellen.<sup>376,377,378</sup>

Abbildung 71 zeigt einen Vergleich der EDTA-sensitiven Aggregation von Wildtypzellen und inositol-auxotrophen Mutanten als prozentuale Zellzahl bezogen auf die Ausgangszellzahl. Die Mutanten zeigen nicht nur in Gegenwart von *myo*-Inositol, sondern auch nach 24stündiger Inkubation in inosolfreiem Medium keine EDTA-sensitive Aggregation. Ein Zusatz von *myo*-Inositol zum Aggregationspuffer zeige keinen Einfluss auf dieses Verhalten.

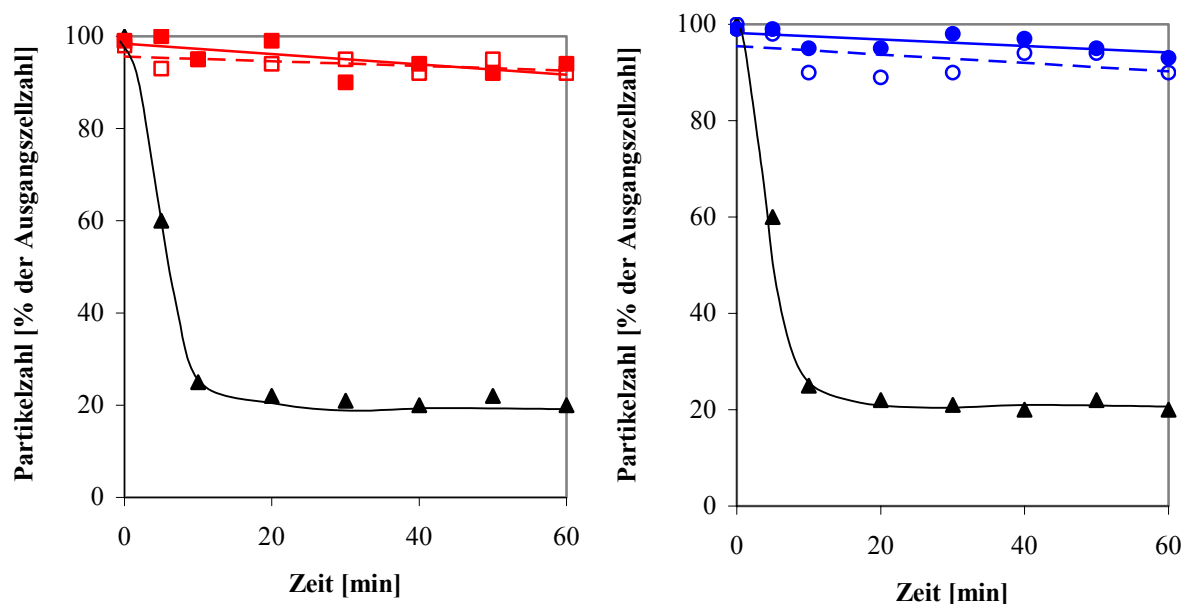


Abbildung 71: Vergleich der EDTA-sensitiven Aggregation

(▲) AX2; (■) *Ddino1*Δ; (□) *Ddino1*Δ 24 h ohne *myo*-Inositol; (■) *Ddino1*(*as*); (□) *Ddino1*(*as*) 24 h ohne *myo*-Inositol.

Die fehlende EDTA-sensitive Aggregation ist neben dem Wachstumsdefekt auf Bakterien die einzige phänotypische Veränderung gegenüber dem Wildtyp, die in Gegenwart von *myo*-Inositol auftritt. Während das fehlende Wachstum auf Bakterien wahrscheinlich auf Inositolmangel durch die geringere Pinozytoserate während der Phagozytose zurückzuführen ist, gestaltet sich eine Erklärung für die Defekte in der EDTA-sensitiven Aggregation problematischer. Ein Inositolmangel kann für die fehlende EDTA-sensitive Aggregation nicht verantwortlich sein, da die Aggregation bei AX2 schon nach 1-2 Minuten mikroskopisch



beobachtet wird. Innerhalb dieses kurzen Zeitraumes dürfte das intrazelluläre *myo*-Inositol ausreichen, um jegliches Defizit einer inositolhaltigen Verbindung auszugleichen.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Membranzusammensetzung der inositol-auxotrophen Mutanten in Gegenwart von *myo*-Inositol vom Wildtyp unterscheidet. In der Membranebene kommt es durch die gleichzeitige Beeinflussung negativ geladener Lipide mit positiv geladenen Proteinen zur Bildung von Mikrodomänen. Dieses und Änderungen in der Membranfluidität könnten zu einer veränderten Rekrutierung von bei der Adhäsion beteiligter Moleküle führen.

### 4.3.9.2 Phagozytose

Bei der Phagozytose handelt es sich um einen zellulären aktinabhängigen Prozess, bei dem Partikel durch Pseudopodien umflossen und nach Fusion internalisiert werden. Die Phagozytose wird bei sogenannten „professionellen Phagozyten“, wie z.B. Amöben und Ciliaten, gefunden. Diesen Zellen dient die Phagozytose als Nahrungsaufnahme dient.<sup>379</sup> Sie ist jedoch auch bei Makrophagen und den neutrophilen Granulocyten des Immunsystems zu finden, die eingedrungene Fremdorganismen phagozytieren und abtöten.

Die Phagozytose ergibt sich aus einer koordinierten Abfolge verschiedener Teilvorgänge, die durch die Erkennung und Bindung des Partikels mit Hilfe von spezifischen Rezeptoren eingeleitet wird. Für diese Erkennungs- und Bindungsvorgänge sind wahrscheinlich dieselben Wechselwirkungen verantwortlich, die bei der Zelladhäsion an Oberflächen dienen.<sup>380,381</sup> In *D.discoideum* sind bei der Phagozytose zwei unterschiedliche Rezeptorsysteme involviert.<sup>313</sup> Ein lektin-artiger Rezeptor bindet spezifisch Partikel bzw. Bakterien mit terminalen Glucose-Enden, der zweite nicht-spezifische Rezeptor bindet Partikel durch hydrophobe Wechselwirkungen.

Die Rezeptor-Ligand Wechselwirkung triggert ein Signal durch die Plasmamembran, das über aktinbindende Proteine die lokale Reorganisation des Zytoskeletts bewirkt. In *D.discoideum* wird dieser Prozess vermutlich über ein heterotrimeres G-Protein vermittelt.<sup>382</sup> Eine Beteiligung von Tyrosinkinasen, GTPasen, Phosphatidylinositolphosphaten und  $Ca^{2+}$  an dieser Signalvermittlung wird auch diskutiert.<sup>383</sup>

Das Aktin-Zytoskelett beginnt die Plasmamembran um das Objekt zu schieben. Dabei bilden sich immer neue Rezeptor-Liganden Paare „zipper model“.<sup>384,385</sup> Anschließend fusioniert die Plasmamembran am Ort des Partikeleintritts und schnürt den Partikel in ein Vesikel ein. Es entsteht ein primäres Phagosom, das in die Zelle bewegt wird. Danach wird

die Aktinhülle entfernt, das neugebildete Phagosom verschmilzt mit Lysosomen und wird dem Abbauweg zugeführt.

Die hauptsächliche Regulation der Phagozytose erfolgt über F-Aktin<sup>386</sup>. In der letzten Zeit wurden verschiedene regulatorische Proteine beschrieben, die bei der phagozytotischen Aufnahme von Partikeln eine Rolle spielen. Viele dieser regulatorischen Proteine sind in der Lage mit Phosphatidylinositolphosphaten zu interagieren.<sup>387</sup>

Um den Einfluss von inositolhaltigen Metaboliten auf die Phagozytose zu untersuchen, wurden die inositol-auxotrophen Mutanten mit carboxylierten Polystyrolpartikeln oder mit fluoreszenzmarkierten Bakterien inkubiert und danach die zeitabhängig internalisierte Partikel- bzw. Bakterienanzahl pro Zelle bestimmt.

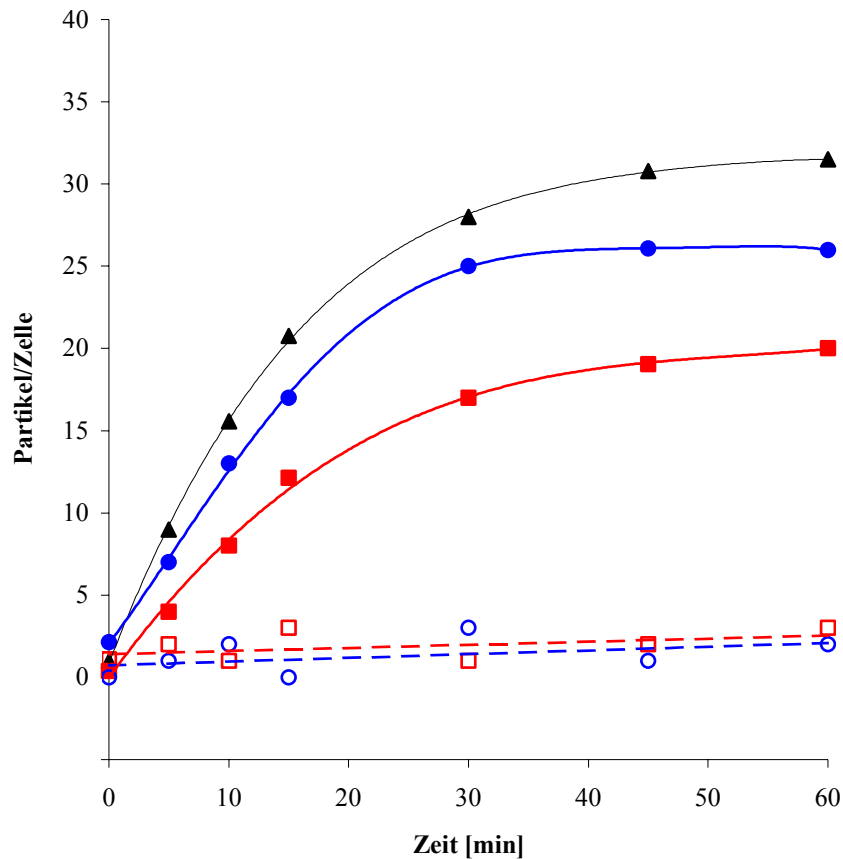
Die inositol-auxotrophen Mutanten phagozytieren carboxylierte Modellpartikel in Gegenwart von *myo*-Inositol etwas schwächer als der Wildtyp. Sowohl die geringere Aufnahme rate der Zellen innerhalb des linearen Anstiegs als auch die geringere maximal internalisierte Partikelzahl sind zum Teil auf die geringere Zellgröße und der daraus resultierenden geringeren Zelloberfläche zurückzuführen.

	AX2	<i>Ddino1Δ</i> [500 μM <i>myo</i> -Inositol]	<i>Ddino1(as)</i> [500 μM <i>myo</i> -Inositol]
Phagozytoserate [Partikel/Zelle/min]	1.6 ±0.2	0.8 ±0.2	1.3 ±0.2
Phagozytosekapazität [Partikel/Zelle]	32 ±3	15 ±2	24 ±3

**Tabelle 43: Parameter der Phagozytose von Latexpartikeln**

Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

Ein längerfristiger Inositolentzug führt bei den inositol-auxotrophen Mutanten zu einer drastischen Abnahme der Phagozytose. Sowohl bei *Ddino1Δ* als auch bei *Ddino1(as)* sind bei 24 h Inositolentzug keine Internalisierung von Partikeln nachweisbar.



**Abbildung 72: Vergleich der Phagozytose von carboxylierten Latex-Modellpartikeln bei AX2 und inositol-auxotrophen Mutanten**

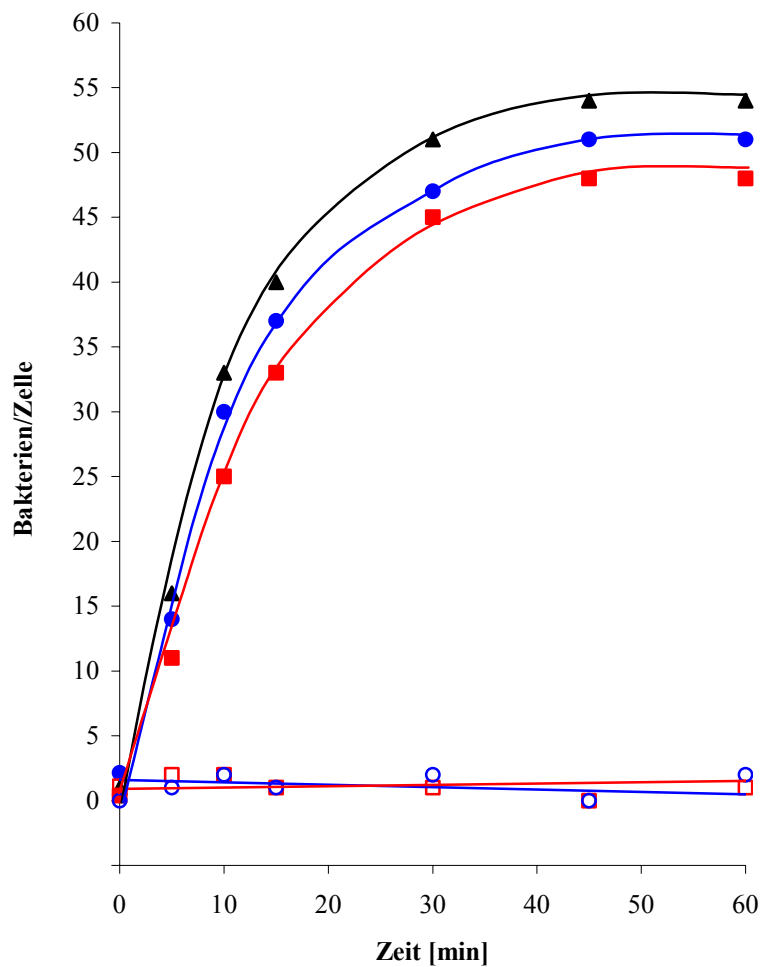
Zellen des Wildtyps und der inositol-auxotrophen Mutanten wurden in FM-Medium angezogen und danach auf eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Sørensen-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit hydrophilen Latexpartikeln (1  $\mu$ m) versetzt und mit Hilfe des Standard-Phagozytotest untersucht. Für die Auswertung wurde die zeitabhängig pro Zelle internalisierte Partikelzahl bestimmt. (▲) AX2; (■) *Ddino1*Δ; (□) *Ddino1*Δ 24h ohne *myo*-Inositol; (●) *Ddino1*(*as*); (○) *Ddino1*(*as*) 24h ohne *myo*-Inositol.

Dieses Verhalten ist nicht nur auf carboxylierte Modellpartikel beschränkt, sondern zeigt sich auch bei Bakterien. Die inositol-auxotrophen Mutanten phagozytieren Bakterien in Gegenwart von *myo*-Inositol analog dem Wildtyp.

	AX2	<i>Ddino1</i> Δ [500 $\mu$ M <i>myo</i> -Inositol]	<i>Ddino1</i> ( <i>as</i> ) [500 $\mu$ M <i>myo</i> -Inositol]
Phagozytoserate [Bakterien/Zelle/min]	2.5 $\pm$ 0,3	2.3 $\pm$ 0,4	2.8 $\pm$ 0,4
Phagozytosekapazität [Bakterien/Zelle]	51 $\pm$ 4	47 $\pm$ 4	53 $\pm$ 5

**Tabelle 44: Parameter der Phagozytose von FITC-konjugierten Bakterien**

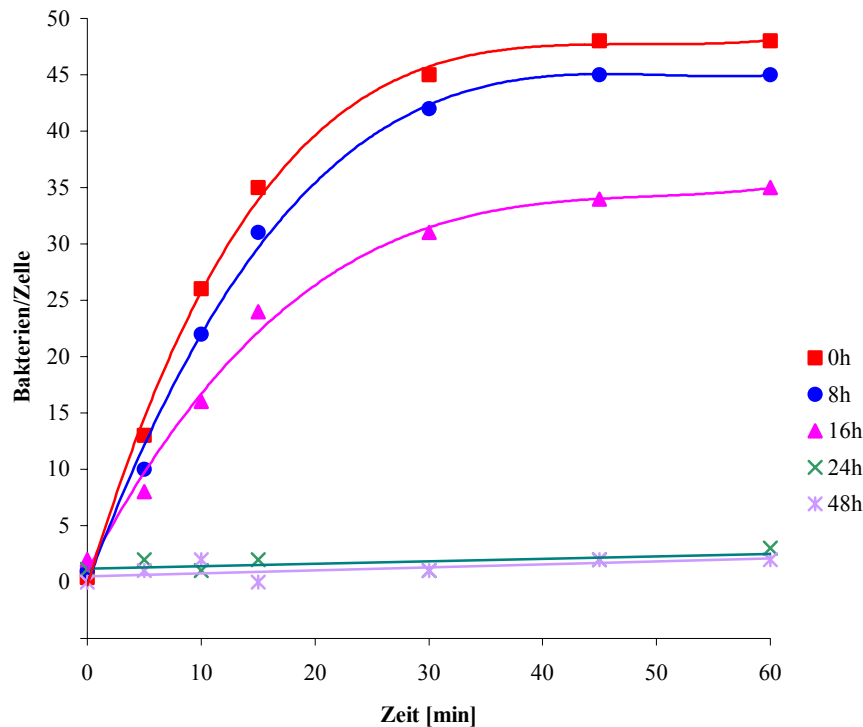
Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.



**Abbildung 73: Vergleich der Phagozytose von FITC-konjugierten Bakterien bei AX2 und inositol-auxotrophen Mutanten**

Zellen des Wildtyps und der inositol-auxotrophen Mutanten wurden in FM-Medium angezogen und danach auf eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Sørensen-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit FITC-markierten Bakterien versetzt und mit Hilfe des Standard-Phagozytotest auf ihr Phagozytoseverhalten untersucht. Für die Auswertung wurde die zeitabhängig pro Zelle internalisierte Bakterienzahl bestimmt. (▲) AX2; (■) *Ddino1*Δ; (□) *Ddino1*Δ 24h ohne *myo*-Inositol; (●) *Ddino1*(*as*); (○) *Ddino1*(*as*) 24h ohne *myo*-Inositol.

Abbildung 74 zeigt die zeitliche Abnahme der Phagozytoserate bzw. der Phagozytosekapazität. Nach 16 h Inositolentzug ist die Phagozytoserate auf ca. die Hälfte und die Phagozytosekapazität auf ca. 75 % des Wildtyplevels abgesunken. Nach 24 h ist keine Phagozytose mehr sichtbar.



**Abbildung 74: Einfluss der Dauer des Inositolentzugs auf das Phagozytoseverhalten von FITC-konjugierten Bakterien bei *Ddino1Δ***

*Ddino1Δ* wurden in FM-Medium unter Inositolmangel inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Die Zellen wurden auf eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Sørensen-Puffer resuspendiert, mit FITC-markierten Bakterien versetzt und auf ihr Phagozytoseverhalten untersucht. Für die Auswertung wurde die zeitabhängig pro Zelle internalisierte Bakterienzahl bestimmt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass sich das Phagozytoseverhalten der inositol-auxotrophen Mutanten in Gegenwart von *myo*-Inositol wenig vom Wildtyp unterscheidet.

Die Defekte in der Phagozytose der in inositolfreiem Medium kultivierten Mutanten ist nicht nur in Schüttelkultur, sondern auch in Standkulturen zu beobachten. Hier unterscheiden sich die inositol-auxotrophen Mutanten von anderen Mutanten mit Defekten in der Phagozytose. Beispielsweise können *glc*-Mutanten<sup>369</sup> in geschüttelten Suspensionen weder Bakterien noch hydrophile Latexpartikel phagozytieren, unter Ausschluss von Scherkräften sind sie jedoch dazu in der Lage.

Wie in 4.3.7.4 beschrieben, zeigen die inositol-auxotrophen Mutanten unter Inositolentzug einen starken Rückgang in der  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Konzentration. Mikroskopische Untersuchungen von Zellen mit Hilfe der Fusionsproteine YFP („yellow fluorescent protein“) und CFP („cyan fluorescent protein“) mit Proteindomänen, die spezifisch an  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  und DAG binden, zeigten, dass bestimmte Phosphatidylinositolphosphate nicht gleichförmig über die inneren Membranen der Zelle verteilt sind, sondern lokal, in spezialisierten

Membranbereichen, stark angereichert vorliegen; z.B. wurde an den Initiationsorten der Phagozytose eine Konzentrierung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> beobachtet<sup>388</sup>, während in den begrenzenden Membranen des frühen Endosoms (Phagosom) PtdIns(3)P angereichert ist.

Die Anreicherung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> führt zusätzlich zu einer Rekrutierung von PLC und einem damit verbundenen Anstieg an DAG und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. DAG kann Rap1 aktivieren, dass sich positiv auf die Phagozytose auswirkt.<sup>389</sup> Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, und der damit verbundene Ca<sup>2+</sup>-Anstieg im Cytosol, regulieren die Phagozytose bei vielen Säugetieren.<sup>390</sup>

Vermutlich führen die aus dem Inositolentzug resultierenden Veränderungen der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Konzentration in den inositol-auxotrophen Mutanten zu den Defekten in der Phagozytose. Es nimmt nicht nur die Konzentration an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ab, sondern auch die der Vorläufersubstanz PtdIns. Damit verbunden ist eine fehlerhafte Regulation verschiedenster aktinregulierender Proteine und eine schwächere Rekrutierung der PLC.

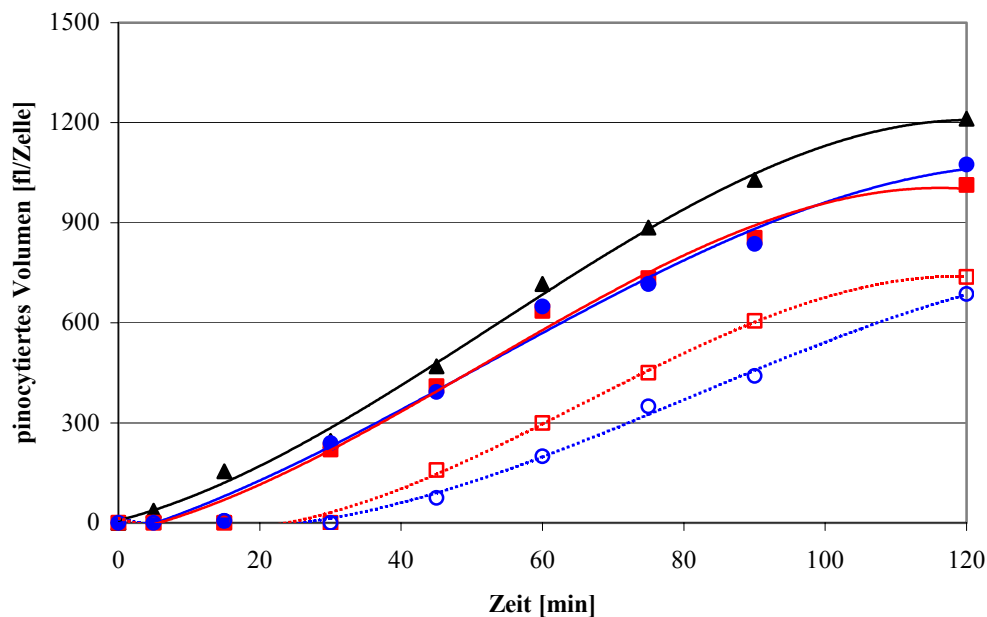
### 4.3.9.3 Pinozytose und Membranrecycling

Axenisch wachsende *D.discoideum* Zellen nehmen Flüssigkeit und darin gelöste Stoffe durch Pinozytose auf. Hierbei werden größere Mengen Flüssigkeit internalisiert, indem Teile der Plasmamembran durch Aktin-Polymerisation einstülpt. Das dabei internalisierte Volumen ist dem Zufall überlassen.<sup>391</sup>

Abbildung 75 zeigt einen Vergleich der Pinozytose von Wildtypzellen und inositol-auxotrophen Mutanten. In Gegenwart von 500 µM *myo*-Inositol gewachsene inositol-auxotrophen Mutanten zeigen eine ähnliche Pinozytoserate und eine etwas geringere Pinozytosekapazität gegenüber dem Wildtyp. Dieses kann jedoch auf deren verringertes Zellvolumen zurückzuführen sein.

Eine 24stündige Inkubation der inositol-auxotrophen Mutanten auf inositolfreiem Medium führt zu einem veränderten Verhalten. Zunächst zeigten die inositol-auxotrophen Mutanten unter Inositolentzug eine Verzögerungsphase. Die Aufnahme von Flüssigkeit ist erst nach ca. 30 min zu beobachten. Dies könnte auf eine verstärkte mechanischen Labilität der inositol-auxotrophen Zellen zurückzuführen sein. Im Verlauf der Untersuchungen zeigte es sich, dass die Zellen nach Zentrifugationsschritten länger benötigen, sich an neue Umgebungsbedingungen anzupassen.

Der Inositolentzug hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Pinozytoserate. Die Pinozytosekapazität war jedoch leicht verringert. Jedoch ist auch hier zu berücksichtigen, dass der Inositolentzug in den inositol-auxotrophen Mutanten zu einem verringerten Zellvolumen führt.



**Abbildung 75: Vergleich des Pinozytoseverhaltens zwischen Wildtyp und inositol-auxotrophen Mutanten**

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase bzw. Zellen nach einem 24stündigen Inositolentzug wurden zweimal mit Sørensen-Puffer gewaschen, mit Sørensen-Puffer auf eine Zelldichte von  $2 \cdot 5 \cdot 10^6$  Zellen/ml angesetzt und das Pinozytoseverhalten untersucht (3.2.10). (▲) AX2; (■) *Ddino1*Δ; (□) *Ddino1*Δ 24 h ohne *myo*-Inositol; (●) *Ddino1*(*as*); (○) *Ddino1*(*as*) 24 h ohne *myo*-Inositol.

Im Gegensatz zur Phagozytose hat der Inositolentzug bei den inositol-auxotrophen Mutanten nur geringe Auswirkungen auf die Pinozytose. Dieses ist nicht verwunderlich, da die Phagozytose eine wesentlich höhere Organisation erfordert als die Pinozytose. Die Schlussfolgerung, dass *myo*-Inositol, PtdIns und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> auf die Pinozytose bei *D. discoideum* keinen Einfluss haben, muss jedoch mit Vorsicht betrachtet werden.

Es gibt Anhaltspunkte, dass PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> bei der Pinozytose eine entscheidende Rolle spielt. Es reichert sich an Initiationsorten der Pinozytose an und sorgt für die Rekrutierung von verschiedenen Proteinen an dieser Stelle. Dazu gehören beispielsweise Profilin (bindet an globulärem Aktin) und PI 3-kinase. Konsistent mit dieser Idee konnte demonstriert werden, dass PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> - beides Produkte der PI 3-Kinase – sich im formenden „macropinosomal cup“ anreichern.<sup>392</sup> Diese Phosphatidylinositolphosphate könnten als zusätzliches Signal zur Modifizierung des Aktin-Zytoskeletts dienen oder andere Phosphatidylinositolphosphatbindeproteine z.B. PKP rekrutieren, die stimulierend beim „vesicle trafficking“ wirken.<sup>393</sup>

Eine Anreicherung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> an Initiationsorten der Pinozytose kann jedoch immer noch möglich sein.

In dieser Arbeit konnten PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> aufgrund ihrer geringen Mengen nicht nachgewiesen werden. Die potentiellen Vorläufer PtdIns(3)P und PtdIns(4)P

sind jedoch in ausreichenden Mengen vorhanden und nahmen im Verlaufe des Inositolentzugs nicht ab. Es ist auch zu beachten, dass die PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Konzentration unter Inositolentzug in den inositol-auxotrophen Mutanten zwar abnimmt, der Wert jedoch über das gesamte Zellvolumen gemittelt ist, so dass eine lokale Anreicherung nicht ausgeschlossen werden kann.

Endozytisch aufgenommene Nährstoffe werden von *D.discoideum* in saure lysosomale Vesikel transferiert und anschließend in Postlysosomen transportiert. Die Endozytose führt dabei zu einer Abnahme der Membranoberfläche. Um die internalisierte Membran wieder zu „recyclen“ und nicht benötigte Stoffe an das umgebende Medium abzugeben, muss *D.discoideum* exozytieren.

Wie bei der Pinozytose und Phagozytose ist auch bei der Exozytose eine Reorganisation des Zytoskeletts erforderlich. Inositolentzug könnte bei den inositol-auxotrophen Mutanten durch die Abnahme der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Konzentration indirekt Einfluss auf Proteine des Aktin-Zytoskeletts und damit auf die Exozytose nehmen.

Beide in Gegenwart von 500 µM *myo*-Inositol gewachsenen inositol-auxotrophen Mutanten zeigen eine zum Wildtyp ähnliche Exozytose. Eine 24 h Inkubation der inositol-auxotrophen Mutanten auf inositolfreiem FM-Medium führt zu einer etwas veränderten Exozytose. Diese Zellen exozytieren im Gegensatz zu den in Gegenwart von *myo*-Inositol gewachsenen Zellen mit einer annähernd linearen Kinetik. Das reduzierte Zellvolumen der inositol-auxotrophen Mutanten unter Inositolentzug ist jedoch auch hier wieder zu berücksichtigen.

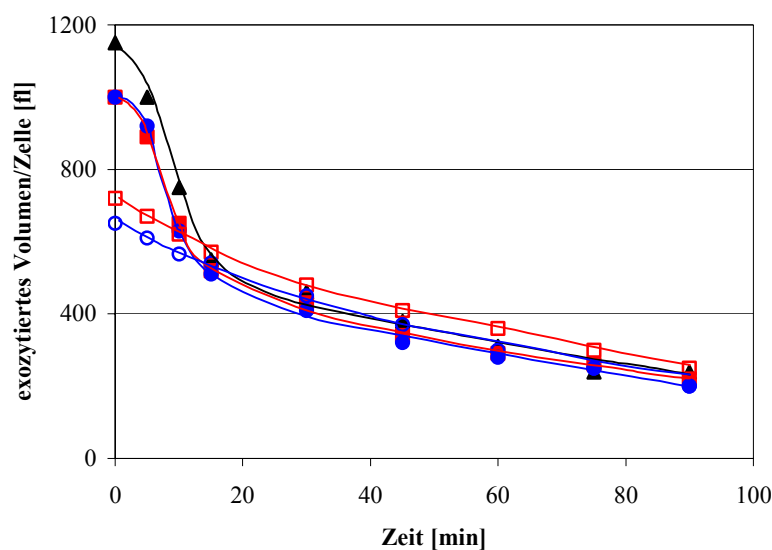


Abbildung 76: Exozytose von FITC-Dextran

(▲) AX2; (■) *Ddino1Δ*; (□) *Ddino1Δ* 24h ohne *myo*-Inositol; (●) *Ddino1(as)*; (○) *Ddino1(as)* 24h ohne *myo*-Inositol.



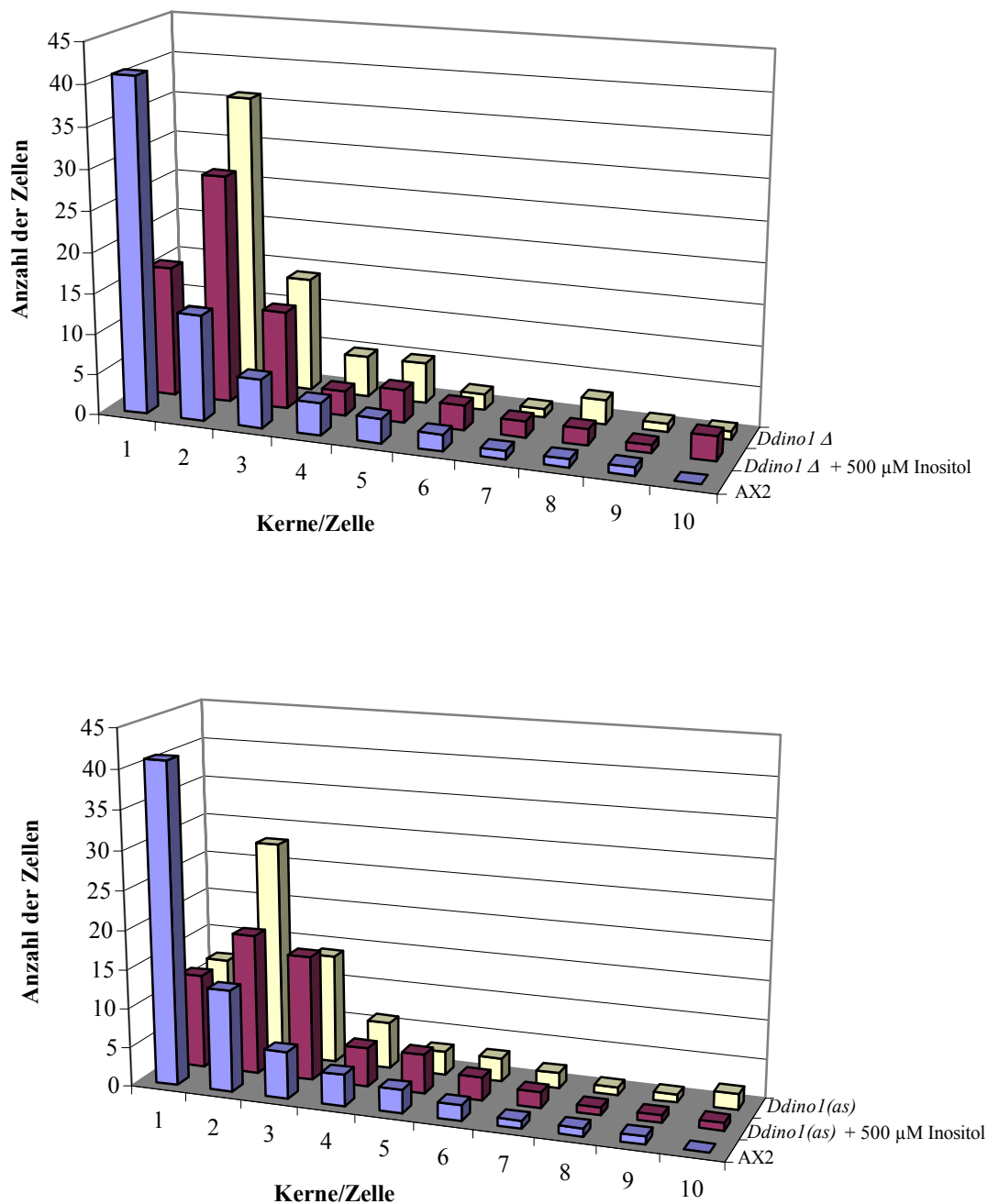
#### 4.3.9.4 Zytokinese

Der Zellzyklus erreicht seinen Höhepunkt mit der Teilung des Zytoplasmas auf die beiden Tochterzellen durch Zytokinese. Bei normalen Zellen folgt die Zytokinese einer jeden Mitose. Es gibt jedoch auch Zellen, die Mitose ohne Zytokinese durchlaufen und vielkernig werden. Vermittelt wird die Zytokinese durch einen kontraktile Ring, der aus Aktin- und Myosinfilamenten, sowie einer Reihe assoziierter Proteine besteht. Wie sich der kontraktile Ring zusammenzieht ist noch unklar. Ein einfacher Mechanismus wie im Skelettmuskel, mit aneinander vorbeigleitenden Aktin- und Myosin II-Filamenten kommt hierbei nicht in Fragen. Wenn sich der Ring zusammenzieht, bleibt der Querschnitt konstant, was darauf hindeutet, dass sowohl das Volumen als auch die Anzahl der Filamente laufend abnimmt.

Die Abhängigkeit der Zytokinese vom Myosin II wird deutlich bei der Betrachtung von Myosin II-defizienten Mutanten von *D.discoideum*.<sup>394,395</sup> Neben einem vergrößerten Zellvolumen zeigen diese Zellen eine stark erhöhte Vielkernigkeit.

Neben dem Myosin II sind auch verschiedene aktinquervernetzende Proteine in der Zytokinese involviert. Coronin-defiziente Mutanten<sup>396,397</sup> und Profilin-Doppelmutanten<sup>398</sup> zeigen Vielkernigkeit. Die Interaktion dieser aktinquervernetzenden Proteine mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> könnte die Organisation des Zytoskeletts beeinflussen.

Abbildung 77 zeigt, dass die inositol-auxotrophen Mutanten nur geringe Defekte in der Zytokinese zeigen. Sowohl bei *Ddino1(as)* als auch bei *Ddino1Δ* ist die Anzahl an mehrkernigen Zellen leicht erhöht. Inositolentzug führt dabei noch zu einer weiteren Steigerung der Multinuklearität.



**Abbildung 77: Vergleich des Anteils mehrkerniger Zellen bei *Ddino1*Δ, *Ddino1*(*As*) und AX2**

Logarithmisch wachsende Zellen wurden fixiert und die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid angefärbt. Die Kernzahl wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop visuell bestimmt (3.2.14).

Die leichten Defekte in der Zytokinese könnten auf das in den Mutanten unter Inositolmangel defizitäre PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zurückzuführen sein. Dieses könnte zu einer fehlerhaften Regulation aktinquervernetzender Proteine führen und damit die Trennung der Zellkerne beeinflussen. Im Gegensatz zu Myosin II-defizienten Mutanten, die bis zu 50

Zellkerne pro Zellen enthalten, ist der Einfluss der Inositol-Auxotrophie auf die Zytokinese gering.

#### **4.3.10 F-Aktin und F-Aktin assoziierte Proteine**

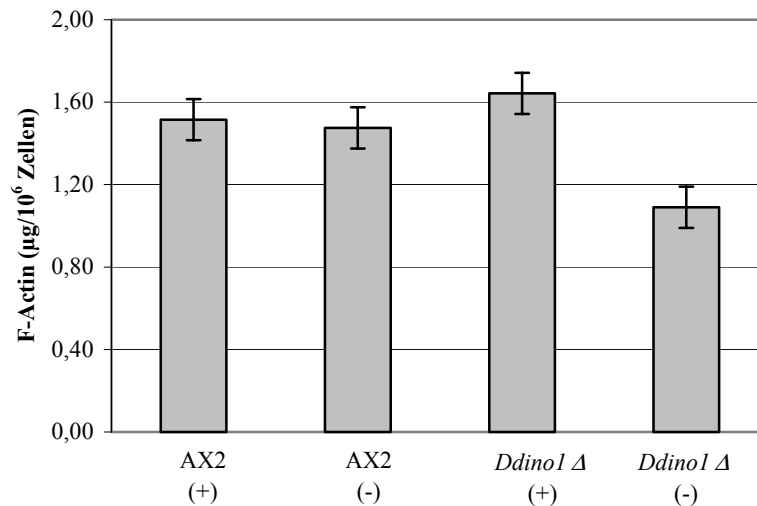
Aufgrund der Fähigkeit zur regulierten Polymerisation ist Aktin an fast allen motilen Prozessen der Zelle beteiligt. Dabei kommt es häufig vor, dass Aktin zusammen mit aktinbindenden Regulatorproteinen am Ort des Geschehens akkumuliert, beispielsweise in den vorderen und hinteren Enden sich bewegender Zellen, in der Kontaktregion adhäsiver und kohäsiver Zellen, innerhalb des kontraktilen Rings in der Zytokinese und bei der Phagozytose im Kontaktbereich zwischen Zelle und Partikel.

Aktin besteht aus einer hochkonservativen Polypeptidkette von 375 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 43 kDa und ist Hauptbestandteil des Mikrofilamentsystems. In Lösungen von geringer Ionenstärke liegt Aktin als Monomer vor und wird wegen seiner globulären Gestalt G-Aktin genannt. Hebt man die Ionenstärke in Gegenwart von ATP auf physiologische Werte an, so polymerisiert das Aktin zu einer Faserform, dem F-Aktin.

Die Bindung der Kationen am G-Aktin führt zu einer Konformationsveränderung des Proteins, wodurch dieses aktiviert wird. Dieses aktivierte G-Aktin bildet in der Nukleationsphase langsam Oligomere, wobei die kleinste stabile Einheit das Trimer ist. Anschließend kommt es zur Elongation, Monomere binden an beiden Enden der Filamente, dissoziieren aber auch wieder ab. Die Verlängerung kann an beiden Enden erfolgen, allerdings mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.

G-Aktin und F-Aktin liegt in *D.discoideum* in gleichen Mengen vor.<sup>399</sup> Der Gesamt-Aktin Gehalt beträgt ca. 93  $\mu\text{M}$  in *D.discoideum*.<sup>400</sup>

Bei Anzucht in FM-Medium verfügen die Zellen des Wildtyps über ca. 1.5  $\mu\text{g}$  F-Aktin/ $1 \cdot 10^6$  Zellen. Dieses deckt sich mit publizierten Daten axenisch gewachsener Zellen.<sup>401</sup> Die inositol-auxotrophe Mutante *Ddino1 $\Delta$*  zeigt in Gegenwart von 500  $\mu\text{M}$  *myo*-Inositol einen ähnlichen F-Aktin Gehalt von ca. 1.6  $\mu\text{g}$  F-Aktin/ $1 \cdot 10^6$  Zellen. Ein 24stündiger Inositolentzug führt bei *Ddino1 $\Delta$*  zu einem Rückgang an F-Aktin auf ca. 1.1  $\mu\text{g}$  / $1 \cdot 10^6$  Zellen. Dies bedeutet, dass der Gehalt an F-Aktin gegenüber dem Wildtyp um 20 % und gegenüber den auf *myo*-Inositol gewachsenen Vergleichszellen um 30 % abnimmt.



**Abbildung 78: Vergleich des zellulären F-Aktinhalts zwischen Wildtyp AX2 und *Ddino1*Δ**

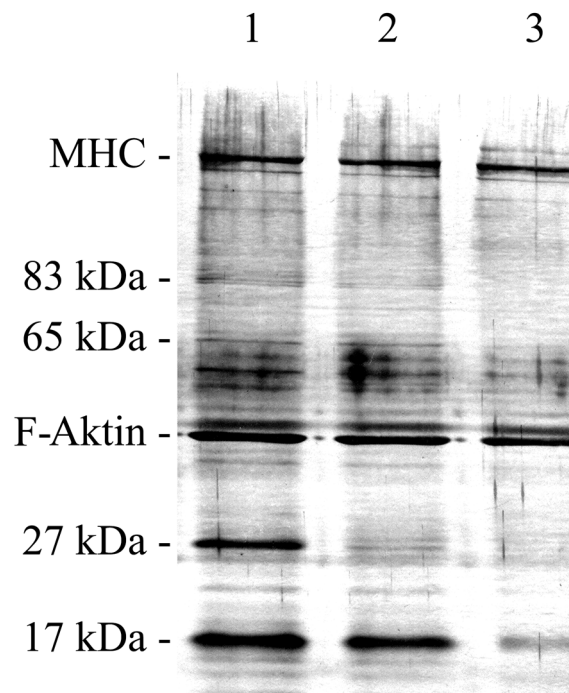
Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase (bzw. 24 h auf inositolfreiem FM-Medium inkubierte *Ddino1*Δ) wurden nach 3.2.16.2 lysiert und der F-Aktin Gehalt fluorimetrisch bestimmt. Um den Einfluss von Waschschritten auf den F-Aktin Gehalt möglichst gering zu halten, wurden die Zellen direkt im Wachstumsmedium mit Triton X-100 haltigem Puffer lysiert, wobei geeignete Konzentrationen an KCl und MgCl<sub>2</sub> die Depolymerisation von Aktin verhinderten. Die Abbildung repräsentiert den Mittelwert und die Standardabweichung von vier unabhängigen Messungen. (+) + 500 µM *myo*-Inositol; (-) ohne *myo*-Inositol.

Durch chemotaktische Reize kann der F-Aktin Gehalt innerhalb von Sekunden um 50-60 % ansteigen.<sup>402</sup> Mutanten mit deletierten Profilin-Genen zeigen einen drastisch erhöhten F-Aktin Gehalt von 60 %.<sup>398</sup> Es stellt sich die Frage, inwiefern sich das G-Aktin / F-Aktin-Gleichgewicht in Richtung G-Aktin verschieben kann. Die Vielzahl der physiologischen Funktionen des F-Aktins deuten jedoch darauf, dass sich das Gleichgewicht nicht vollständig auf die Seite des G-Aktins verschieben kann.

Die Synthese von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> korreliert oft mit der Polymerisierung von Aktin.<sup>244,245,246</sup> Eine Manipulation des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Level führt zu einer veränderten Aktin-Zytoskelett Organisation. Beispielsweise führt eine Überexpression von Phosphatidylinositol 4-phosphat 5-Kinasen (PIP5Ks) in COS-Zellen zu einer dramatischen Zunahme der Aktinpolymerisation<sup>247,248</sup>. Im Gegensatz dazu führt die Überexpression einer PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Phosphatase zu einer Neuordnung der Aktinfilamente.<sup>249</sup> Die Reduzierung des F-Aktins in den inositol-auxotrophen Mutanten bei Inositolentzug könnte auf die reduzierte PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Konzentration zurückzuführen sein.

Es ist bekannt, dass PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und G-Aktin um die Bindestelle am Profilin konkurrieren.<sup>404,405</sup> Eine Erniedrigung der zellulären PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Konzentration würde daher zu einer verstärkten Sequestrierung von G-Aktin durch Profilin führen, und damit zu einer teilweisen Depolymerisation des Aktinfilamentsystems.

Der Inositolenzug beeinflusst jedoch nicht nur die Aktinpolymerisation in den inositol-auxotrophen Mutanten, sondern auch die Proteinzusammensetzung des Zytoskeletts. Als Zytoskelett wurde hierbei die in 1 % Triton X-100 unlösliche Fraktion definiert.<sup>403</sup> Die Gesamtproteinmenge im Zytoskelett veränderte sich nur unwesentlich, jedoch sind deutliche Veränderungen in der Proteinmenge einzelner Proteine feststellbar. Die nachfolgende Abbildung zeigt einen Vergleich elektrophoretisch getrennter Zytoskelettproteine. Deutlich sind Unterschiede im Bandenmuster erkennbar. Besonders auffällig ist der starke Intensitätsunterschied einer 17 kDa-Bande, jedoch zeigen auch andere Banden eine Intensitätsabnahme. Erwähnenswert ist auch eine intensive 27 kDa-Bande. Dieses Protein ist im Wildtyp prominent, jedoch in *Ddino1Δ* nur schwach zu erkennen. Die Intensitätsabnahme ist dabei unabhängig vom Inositolenzug.



**Abbildung 79: Vergleich der Zytoskelettproteinen von AX2 und *Ddino1Δ***

1) AX2; 2) *Ddino1Δ* + 500  $\mu\text{M}$  *myo*-Inositol; 3) *Ddino1Δ* ohne *myo*-Inositol. SDS-Page (10  $\mu\text{g}$  Protein/Bahn, Gradient mit 5-15 % Quervernetzung, Proteinfärbung über Silberpräzipitierung).

Reguliert wird die Polymerisation / Depolymerisation des Aktins über eine Vielzahl aktinbindender Proteine, die in der Lage sind mit  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  zu interagieren. Einige dieser Proteine binden erst in Gegenwart von  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  an F-Aktin. Die Abnahme der  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Konzentration könnte die unterschiedlichen Bandenmuster erklären. Tabelle 45 zeigt eine Zusammenstellung von aktinregulierenden Proteinen, die über verschiedene  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -bindende Domänen verfügen.

Funktion	Protein	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> -bindene Domänen	Referenz
Monomerbindendes Protein	Profilin	geladen/hydrophob*	404, 405
Depolymerisierung von Aktinfilamenten	Cofilin	geladen/hydrophob*	406
	N-WASP	PH	242
Depolymerisierung von Aktinfilamenten und „Capping“	Gelsolin	geladen/hydrophob	407
	Severin	geladen/hydrophob	408
Membranverankernde Proteine	Talin	geladen/hydrophob*	409
	Vinculin	geladen/hydrophob*	410
	CapG	geladen/hydrophob	411
„Capping“-Proteine	Cap32/34		412
	Filamin	geladen/hydrophob*	413
Quervernetzende Proteine	$\alpha$ -Actinin	geladen/hydrophob*	414

**Tabelle 45: Aktinbindende Proteine mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindestelle**

PH: Pleckstrin-homologe Domäne; geladen/hydrophob: Bindungsstelle ähnlich Gelsolin über basische und hydrophobe Aminosäuren; geladen/hydrophob\*: unähnlich Gelsolin, jedoch auch über basische und hydrophobe Aminosäuren

### 4.3.11 Analyse der Differenzierung und Sporengermination unter Inositolentzug

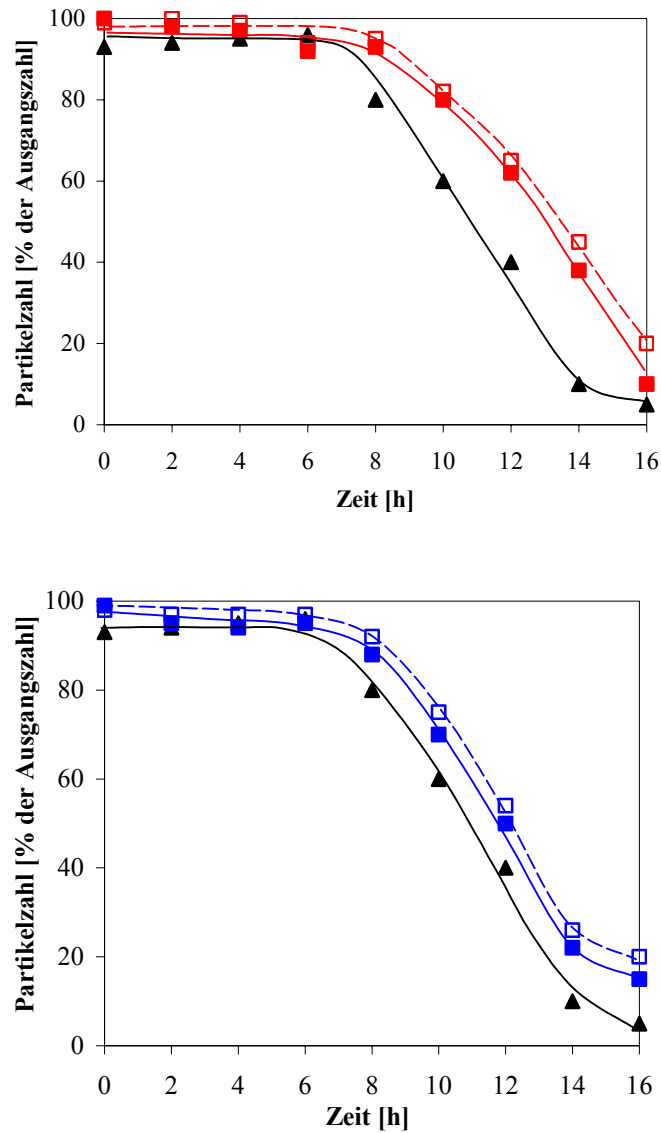
#### 4.3.11.1 Differenzierung

Leidet *D.discoideum* unter Nahrungsmangel, so durchläuft er einen Entwicklungszyklus, der zur Ausbildung eines multizellulären Organismus führt (siehe 1.6). Die Amöben wandern, durch cAMP angelockt, auf einen zentralen Punkt zu und formen Aggregate, die sich in ein Pseudoplasmodium („slug“) umwandeln. Nach ca. 12-18 h ist das Slugstadium erreicht, in dem sich das Pseudoplasmodium phototaktisch bewegen kann. Der Entwicklungszyklus endet nach ca. 24 h im Kulminationsstadium mit der Ausbildung von Sporen- und Stielzellen.

An der Zellaggregation zu Beginn des Differenzierungsprogramms sind zwei Zell-Zell Adhäsionsmechanismen beteiligt, die sich immunologisch und durch ihre Empfindlichkeit gegen Chelatbildner unterscheiden lassen.

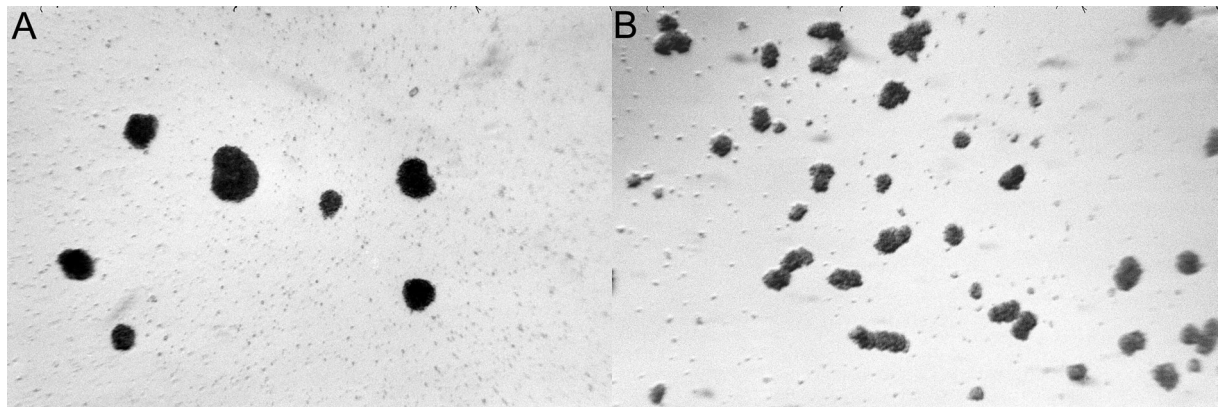
Zunächst tritt nach ca. 8 h das gegenüber EDTA resistente Adhäsionssystem „contact site A“ in Erscheinung. Ein wichtiges, an diesem Mechanismus beteiligtes Glycoprotein, konnte identifiziert werden („csA“). CsA-Null Mutanten zeigen ein stark reduziertes EDTA-resistentes Adhäsionsverhalten, jedoch fehlt es nicht völlig.<sup>415</sup> Dieses wirft die Frage auf, ob noch andere Adhäsionsmoleküle bei der EDTA-resistenten Adhäsion eine Rolle spielen. Im späteren Verlauf der Differenzierung bleibt die EDTA-resistente Adhäsion bestehen, es wird jedoch vermutet, dass die Funktion von csA durch andere Proteine übernommen wird.<sup>416,417</sup>

Nach 8 h zeigen die inositol-auxotrophen Mutanten, unabhängig von einer Inositol-Supplementierung, eine normale EDTA-resistente Aggregation in Suspensionskultur. Die gebildeten Aggregate sind jedoch im Vergleich zum Wildtyp etwas kleiner.



**Abbildung 80: Quantitativer Vergleich der EDTA-resistenten Aggregation**

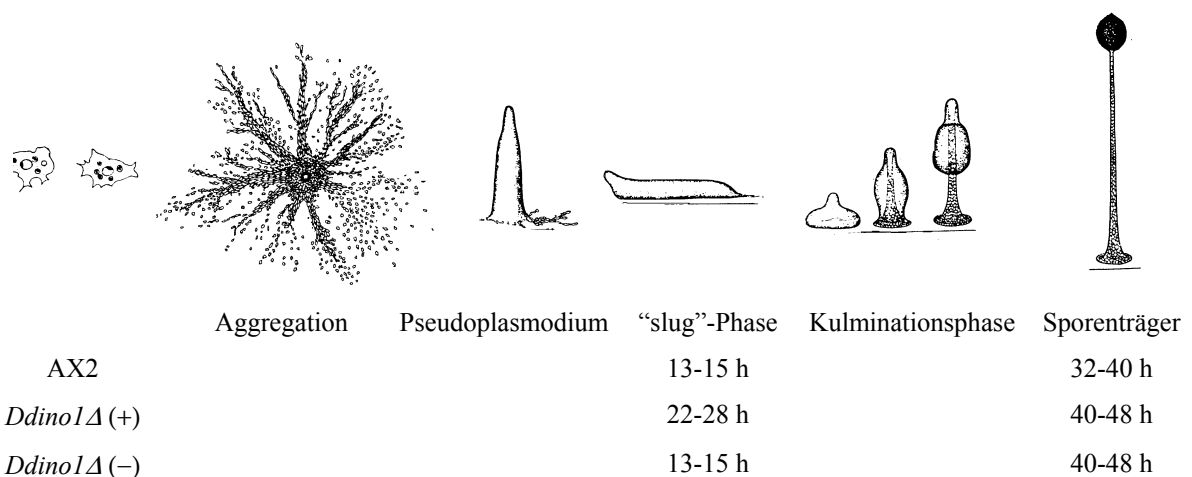
(▲) AX2; (■) *Ddino1Δ*; (□) *Ddino1Δ* 24h ohne myo-Inositol; (■) *Ddino1(as)*; (□) *Ddino1(as)* 24h ohne myo-Inositol.



**Abbildung 81: Mikroskopischer Vergleich der EDTA-stabilen Aggregation von AX2 (A) und Ddino1D (24 h ohne myo-Inositol) (B)**

Die inositol-auxotrophen Mutanten ähneln stark Talin-Null Mutanten. Diese zeigen auch keine EDTA-sensitive Aggregation der vegetativen Zellen, jedoch eine EDTA-resistente Aggregation zu Beginn der Differenzierungsphase.<sup>345</sup> In Wirbeltieren ist Talin Bestandteil der Fokalkontakte. Sie koppeln das Aktin des Zellgerüsts an das Integrin der extrazellulären Matrix an.<sup>418</sup> In *D.discoideum* konnten bisher keine Proteine mit Homologien zu Integrinen gefunden werden, es existieren jedoch Kandidaten für Talin-regulierte Adhäsionsmoleküle.<sup>419,420</sup>

Ein Vergleich des Entwicklungszyklus zwischen Wildtyp und inositol-auxotrophen Mutanten zeigt deutliche zeitliche und morphologische Unterschiede.



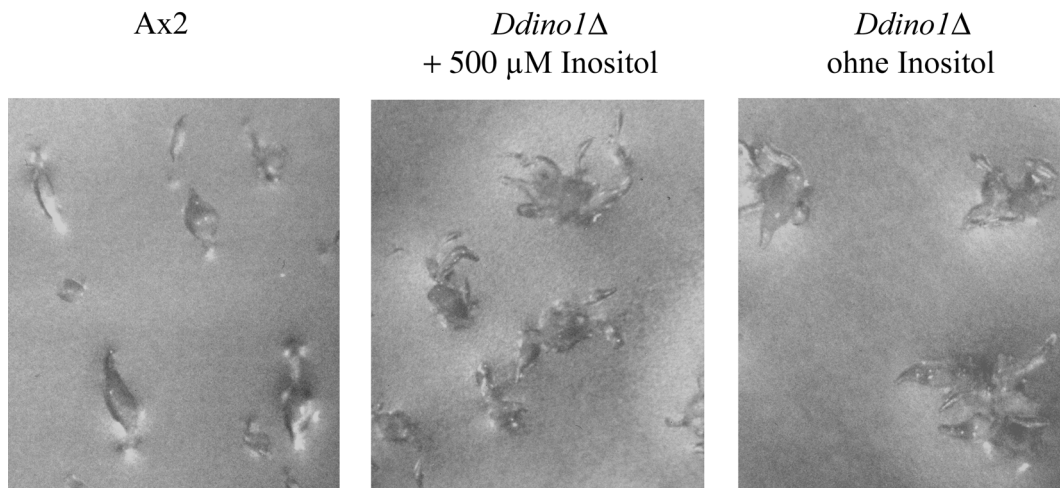
**Abbildung 82: Zeitliche Unterschiede bei der Differenzierung von AX2, *Ddino1Δ* + 500  $\mu$ M myo-Inositol (+) und *Ddino1Δ* ohne myo-Inositol (-)**

In Gegenwart von 500  $\mu$ M myo-Inositol ist der Entwicklungsprozess der inositol-auxotrophen Mutante *Ddino1Δ* gegenüber dem Wildtyp AX2 deutlich verlangsamt. Während AX2 nach 13-15 h bereits das „Slug“-Stadium erreicht hat, befindet sich *Ddino1Δ* noch im



Aggregationsstadium. Erst nach ca. 22-28 h wird das „Slug“-Stadium bei *Ddino1Δ* erreicht. Eine 24 h Inkubation auf inositolfreiem Medium verkürzt bei *Ddino1Δ* die Entwicklung bis zum "slug stadium" deutlich. „Slugs“ sind nach Inositolentzug schon nach 13-15 h zu sehen.

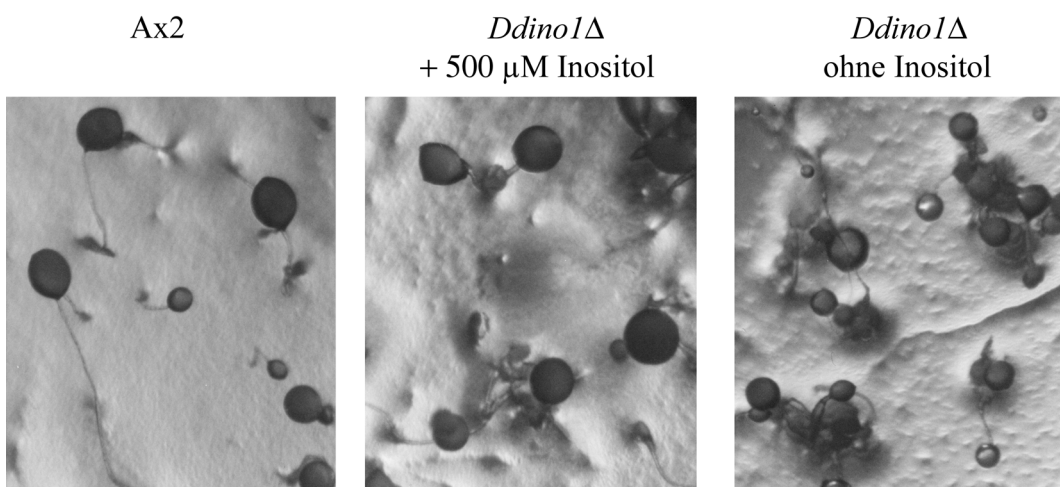
Gegenüber dem Wildtyp bilden die inositol-auxotrophen Mutanten größere Aggregate mit mehrfachen Spitzen „multi-tipped aggregates“. Aus diesen Spitzen gehen „slugs“ hervor, die sich jedoch nur wenig von dem entstandenen Aggregat wegbewegen.



**Abbildung 83: Bildung von "multiple-tipped aggregates" bei *Ddino1Δ***

$2.5 \cdot 10^8$  Zellen wurden aus der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen, auf Wasseragarplatten aufgebracht und bei 22.5 °C inkubiert.

Unabhängig von einer Inkubation auf inositolfreiem Medium entstehen aus *Ddino1Δ* nach ca. 40 h Sporenträger. Bei *Ddino1Δ* gehen mehrere Sporenträger aus den „multiple-tipped“-Aggregaten hervor. Dieses führt dazu, dass im Gegensatz zum Wildtyp die Sporenträger in Gruppen auftreten.



**Abbildung 84: Vergleich der Fruchtkörper bei AX2 und *Ddino1Δ***

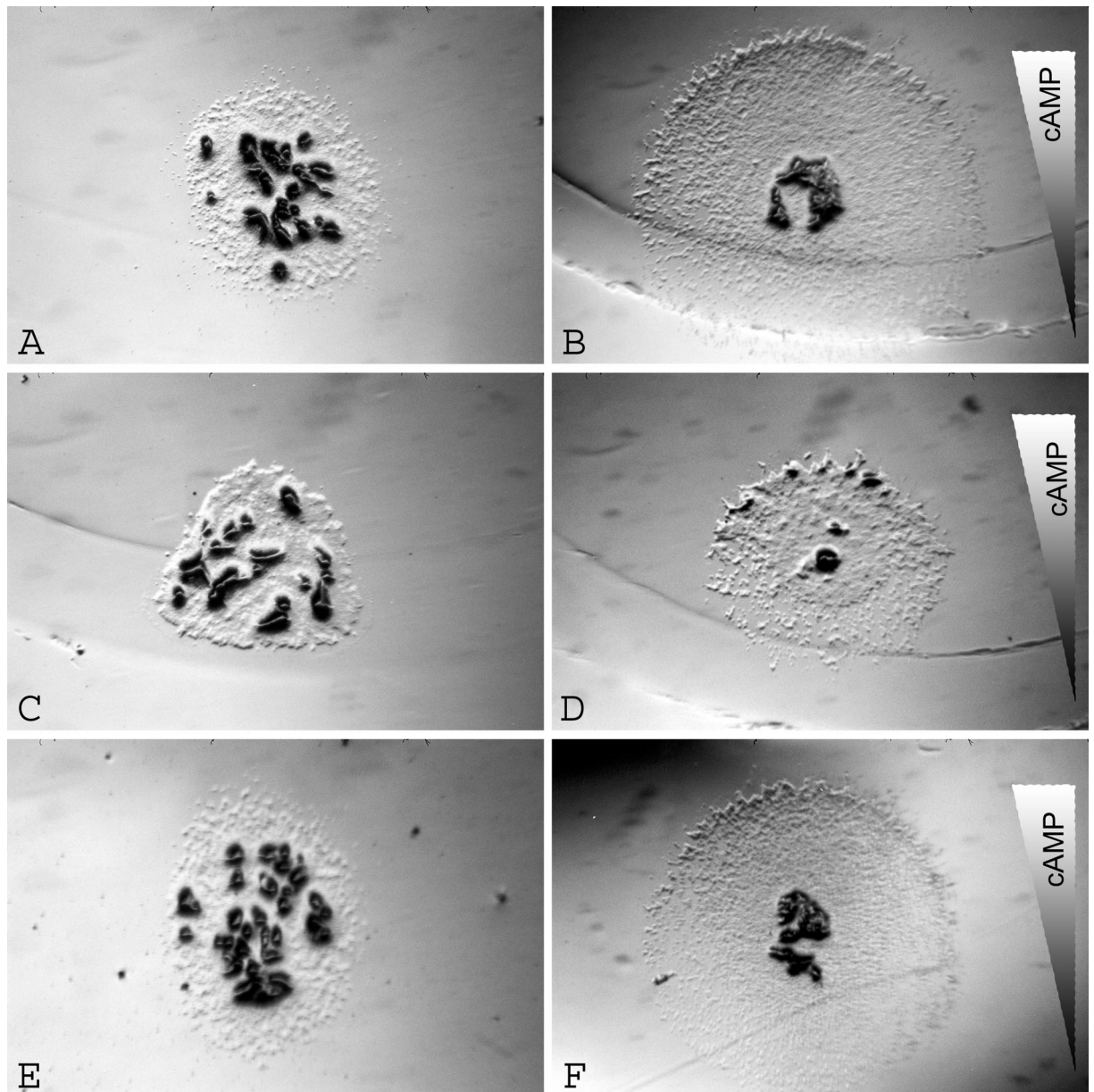
$2.5 \cdot 10^8$  *Ddino1Δ* -Zellen wurden aus der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen, auf Wasseragarplatten aufgebracht und bei 22.5 °C inkubiert. Die Aufnahmen zeigen AX2-Fruchtkörper nach 30 h und *Ddino1Δ*-Fruchtkörper nach 40 h.

Während der Differenzierung der inositol-auxotrophen Mutanten sind gegenüber dem Wildtyp nur geringe zeitliche, bzw. morphologische Unterschiede zu erkennen. Die während des Inositolentzugs sinkenden Konzentrationen an *myo*-Inositol, PtdIns und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> spielen wahrscheinlich bei diesem Vorgang nur eine untergeordnete Rolle.

Die etwas längere Entwicklungsphase der inositol-auxotrophen Mutanten könnten auf eine fehlerhafte Chemotaxis auf cAMP zurückzuführen sein. Neben der positiven Chemotaxis auf Folsäure zeigt *D.discoideum* auch eine positive Chemotaxis auf cAMP. Dieses dient neben seiner Funktion als intrazellulärer „second messenger“ auch noch als extrazelluläres Hungersignal.

Der erste Hinweis auf eine Beteiligung des Inositolphosphatstoffwechsels an der Chemotaxis war die Beobachtung, dass die Aktivität der Phospholipase C bei Stimulierung mit extrazellulärem cAMP anstieg.<sup>421</sup> PLC Null-Mutanten zeigten jedoch weder Defekte in der Chemotaxis noch andere nennenswerte phänotypische Veränderungen.<sup>160</sup>

Sowohl in Gegenwart von *myo*-Inositol gehaltene als auch 24 h gehungerte inositol-auxotrophe Mutanten zeigen eine normale positive Chemotaxis auf cAMP. Die Migrationsrate unterscheidet sich dabei nicht signifikant vom Wildtyp AX2.



**Abbildung 85: cAMP - Chemotaxis**

**A:** AX2 ohne cAMP

**C:** *Ddino1Δ* ohne cAMP

**E:** *Ddino1Δ* (24 h ohne *myo*-Inositol) ohne cAMP

**B:** AX2 in einem cAMP-Gradienten von 0-50μM

**D:** *Ddino1Δ* in einem cAMP-Gradienten von 0-50 μM

**F:** *Ddino1Δ* (24 h ohne *myo*-Inositol) in einem cAMP-Gradienten von 0-50 μM

Diese Ergebnisse zeigen, dass *myo*-Inositol, PtdIns und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> keinen starken Einfluss auf die cAMP-Chemotaxis haben. Quantitative Aussagen können bei diesen Experimenten jedoch nur mit Einschränkungen gemacht werden. Die Zellen reagieren in dem Test nicht unabhängig voneinander, es reagieren nur die äußeren Zellen auf das cAMP-Signal und die Zellbewegung ist stark abhängig vom Substrat. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die zeitlichen Unterschiede im Entwicklungszyklus zwischen Wildtyp und Mutanten auf eine fehlerhafte cAMP-Chemotaxis zurückzuführen sind. Um quantitative Aussagen zu machen, müssten quantitative Studien mit Einzelamöben gemacht werden.

Die Chemotaxis wird durch andere inositolhaltige Metabolite beeinflusst. Es ist bekannt, dass Zellen denen das Gen für die Phosphoinositid 3-phosphatase (*pten*) deletiert wurde, starke Beeinträchtigungen in der Chemotaxis zeigen. Gegenüber dem Wildtyp reagieren die Mutanten wesentlich langsamer und uneinheitlicher auf cAMP.<sup>422</sup>

Eine Inhibierung der PI3K mit dem Inhibitor LY294002 verringert die Chemotaxis bei nanomolaren cAMP-Konzentrationen, während bei höheren cAMP-Konzentrationen kein Effekt zu beobachten ist.<sup>423</sup>

Im Gegensatz dazu zeigen Mutanten denen das Gen für die PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 5-Phosphatase<sup>221</sup> oder der InsP<sub>6</sub>-Kinase<sup>196</sup> deletiert wurde eine verstärkte Reaktion auf cAMP.

Studien mit GFP-markierter Phosphoinositid 3-phosphatase und Phosphoinositid 3-Kinase deuten auf eine Beteiligung dieser Enzyme an der Bewegungssteuerung der Zelle während der Chemotaxis hin. Es zeigte sich, dass sich PI3K an der Stelle der Zelle sammelt, die dem chemischen Signal am nächsten liegt. PTEN hingegen sammelt sich an der Seite und am anderen Ende der Zelle.<sup>424</sup> Dadurch entsteht vermutlich in der Zelle eine Art Kompass, der die Ausrichtung des Zytoskeletts beeinflusst. Durch Ausbau von Aktin-Filamenten am Vorderende und entsprechende Abbauvorgänge am Hinterende kann sich die Zelle zielgerichtet bewegen.

Die publizierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis einnimmt. Die Konzentration an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> ist in *D.discoideum* jedoch sehr gering. Wahrscheinlich wird der größte Teil des PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> durch Phosphorylierung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> gebildet. Obwohl die PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Konzentration bei Inositolentzug in den inositol-auxotrophen Mutanten drastisch abnimmt, dürfte die restliche Menge ausreichen, um den Bedarf an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zu decken.

### 4.3.11.2 Germination

In Gegenwart von 500  $\mu$ M *myo*-Inositol zum Germinationsmedium zeigen die Sporen der inositol-auxotrophen Mutanten ein normales Germinationsverhalten. Führt man die Germination jedoch in inositolfreiem Medium durch, germinieren die Sporen zwar, die vegetativen Zellen verlieren jedoch innerhalb von 2 h ihre Vitalität und wachsen auch bei einem späteren Zusatz von *myo*-Inositol zum Medium nicht mehr an.

Im vegetativen Stadium sind die inositol-auxotrophen Mutanten bis 24 h nach Inositolentzug überlebensfähig. Zu diesem Zeitpunkt führt eine Supplementierung von *myo*-Inositol zum Medium zu einem erneuten Anwachsen der Zellen. Diese Zellen enthalten anfangs große Mengen internalisiertes *myo*-Inositol und die intrazellulären Inositolmetabolitkonzentrationen unterscheiden sich nur unwesentlich vom Wildtyp. Dieses

führt dazu, dass die Zellen unter Inositolentzug zwar ihr Wachstum einschränken, die Vorräte jedoch einige Zeit zum Überleben reichen.

Das schnelle Absterben der Mutanten kurz nach der Germination auf inositolfreiem Medium könnte auf die geringe Menge gespeichertes *myo*-Inositol zurückzuführen sein. Während der Sporenbildung waren die Zellen ca. 40 h ohne einen Zusatz von *myo*-Inositol. Die Konzentration an *myo*-Inositol, PtdIns und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> dürften zu diesem Zeitpunkt stark reduziert sein. Die Sporen von *Ddino1*Δ enthalten beispielsweise nur noch 1.3 μM *myo*-Inositol. Dieser Wert liegt deutlich unter dem Basalwert von 35-40 μM in vegetativen Wildtypzellen.

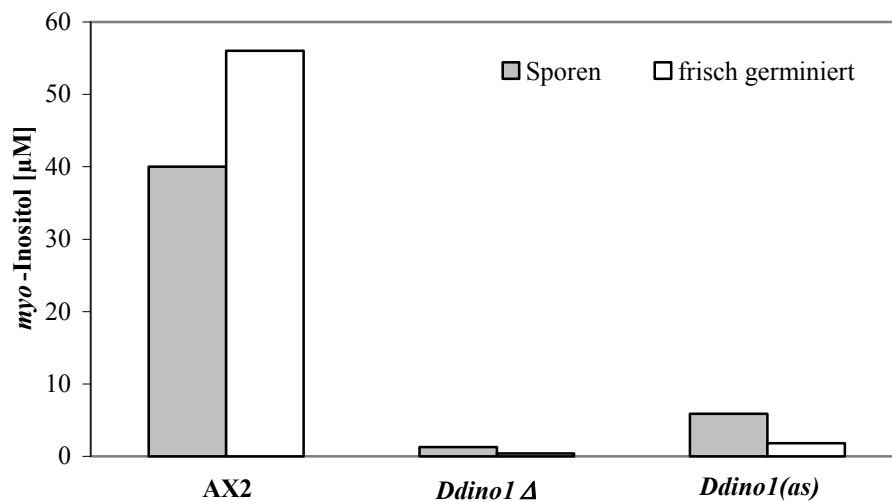


Abbildung 86: Vergleich der *myo*-Inositolkonzentration in Sporen und frisch germinierten Zellen von AX2 und den inositol-auxotrophen Mutanten.

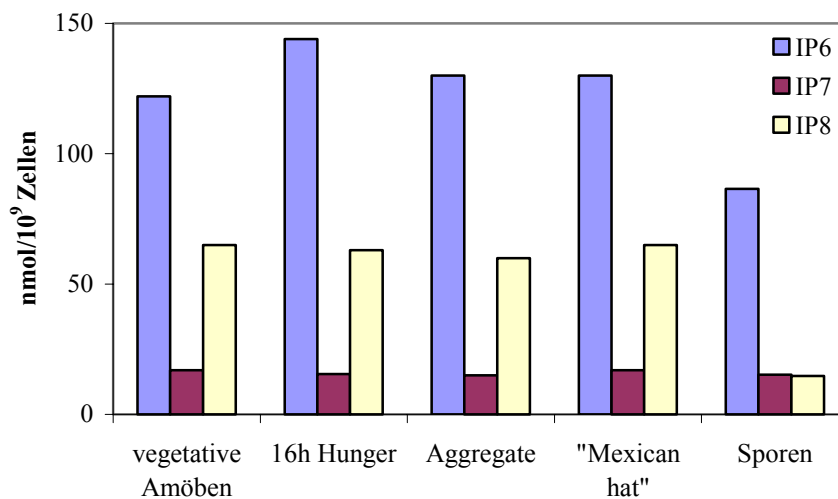
Die Ergebnisse zeigen, dass für den eigentlichen Germinationsvorgang keine bzw. nur geringe Mengen an *myo*-Inositol, PtdIns und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> notwendig sind. Nach der Germination benötigen die vegetativen Zellen wahrscheinlich große Mengen *myo*-Inositol als Synthesebaustein. Die geringen Menge intrazelluläres *myo*-Inositol kann diesen Bedarf nicht decken und die „frisch geschlüpften“ Zellen sterben ohne Inositol-Supplementierung schnell ab.

#### 4.3.11.3 Hochphosphorylierte Inositolphosphate während der Differenzierung und Germination

Während des Übergangs der Wildtypzellen vom vegetativen Stadium zur Differenzierungsphase werden Diphosphoinositolphosphate stark angereichert und in Sporen eingelagert. Vermutlich ist die Einlagerung ein Bestandteil des „pre-starvation-response“ (PSR), eine Reaktion der Zellen auf hohe Zelldichten.<sup>195</sup> Vermittelt wird der PSR durch ein

70 kDa großes Glycoprotein, welches von *D.discoideum* ständig sekretiert wird. Durch einen unbekanntem Mechanismus deaktivieren Nahrungsbakterien diesen Faktor. Daher wird der Faktor von Zellen erst wahrgenommen, wenn ein bestimmtes Verhältnis von Zelldichte zur Anzahl der Nahrungsbakterien überschritten wird, und induziert anschließend die Expression differenzierungsabhängiger Gene.<sup>425</sup>

Bisherige Studien über die Diphosphoinositolphosphate während der Differenzierung gingen immer von bakteriengewachsenen Zellen aus. Da die inositol-auxotrophen Mutanten nicht auf Bakterien kultivierbar sind, wurde zunächst das Verhalten der Diphosphoinositolphosphate während der Differenzierung von auf FM-Medium kultivierten Wildtypzellen untersucht.



**Abbildung 87: Hochphosphorylierte Inositolphosphate (InsP<sub>6</sub> und PP-InsPs) im Lebenszyklus von *D.discoideum* (AX2)**

Auf FM-Medium wachsende Zellen wurden geerntet, zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen, auf Wasseragarplatten ausplattiert und bei 22.5 °C inkubiert. Die Zellen wurden in ihren jeweiligen Differenzierungsstadien geerntet. Die Quantifizierung erfolgte nach 3.4.3 mit Hilfe der HPLC-MDD. Dargestellt sind die Ergebnisse einer repräsentativen Messung. Das Experiment wurde dreimal wiederholt und lieferte jeweils ähnliche Resultate.

Die Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate verändern sich im Verlauf der Differenzierung von in FM-Medium gewachsenen AX2 nur unwesentlich. Der auffällige Anstieg der InsP<sub>6</sub>-Konzentration bei in Bakteriensuspension kultivierten AX2-Zellen innerhalb der ersten Stunde und der Anstieg an InsP<sub>8</sub> nach einer Stunde auf das dreizigfache mit einer verbundenen Abnahme der InsP<sub>6</sub>-Konzentration<sup>195,426</sup> konnte nicht beobachtet werden. Dieser Konzentrationsanstieg tritt bei auf FM-Medium kultivierten Zellen schon bei einer wesentlich geringeren Zelldichte ein.

Dies wird auch durch Vergleich der ermittelten Konzentrationen mit Literaturdaten von auf Bakterien kultivierten Zellen deutlich.<sup>426</sup> Die vegetativen Wildtypzellen zeigen bei

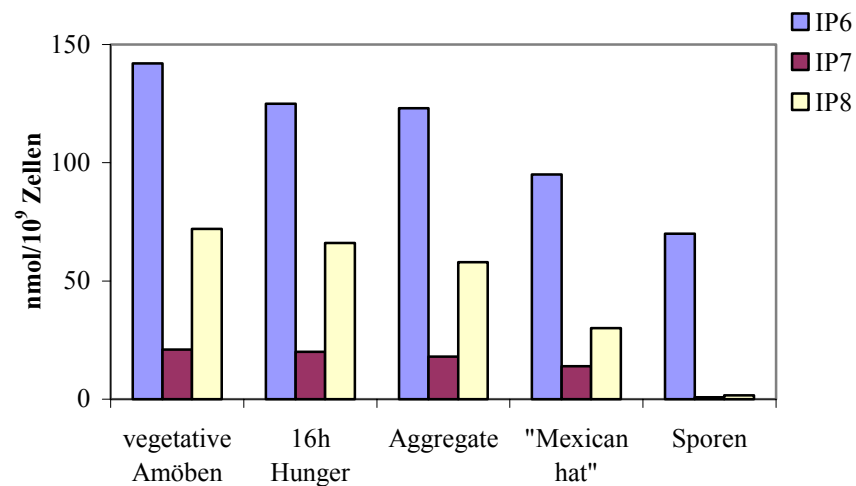
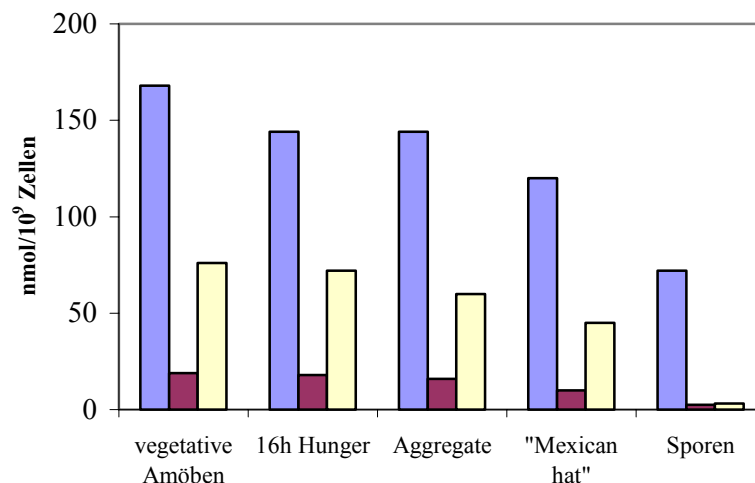
gleicher Zelldichte ( $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml) auf FM-Medium eine wesentlich höhere Konzentration an  $\text{InsP}_7$  und  $\text{InsP}_8$  ( $c(\text{InsP}_7)=17 \text{ nmol}/1 \cdot 10^9 \text{ Zellen}$ ,  $c(\text{InsP}_8)=65 \text{ nmol}/1 \cdot 10^9 \text{ Zellen}$ ) gegenüber auf Bakterien kultivierten Zellen ( $c(\text{InsP}_7)=3 \text{ nmol}/1 \cdot 10^9 \text{ Zellen}$ ,  $c(\text{InsP}_8)=3 \text{ nmol}/1 \cdot 10^9 \text{ Zellen}$ ).

In Bakteriensuspension werden die hochphosphorylierten Inositolphosphate  $\text{InsP}_7/\text{InsP}_8$  während des Übergangs von der vegetativen Wachstumsphase in die stationäre Phase in den Zellen stark angereichert. Dieses wird auch bei axenisch wachsenden Zellen beobachtet, jedoch beginnt die Anreicherung der hochphosphorylierten Inositolphosphate bedeutend früher. Schon bei einer Zelldichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml beträgt die  $\text{InsP}_8$ -Konzentration bis zu  $30 \text{ nmol InsP}_8/1 \cdot 10^9 \text{ Zellen}$ .<sup>195</sup> Unter Berücksichtigung des größeren Zellvolumens axenischer Zellen, entspricht dies der Menge an  $\text{InsP}_8$  bei Zellen in Bakteriensuspension der späte exponentiellen Wachstumsphase.

In den Sporen von AX2 wurden ähnliche Mengen von  $\text{InsP}_6$  gefunden wie in Zellen der späten Differenzierungsphase. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Ergebnissen<sup>195,426</sup>, jedoch nimmt im Gegensatz zu diesen Ergebnissen die  $\text{InsP}_8$ -Konzentration stark ab. Die Konzentrationsabnahme ist nicht auf einen fehlerhaften Aufschluss der Sporen, sondern auf die anfängliche axenische Lebensweise zurückzuführen. Wurden die Zellen erst in Bakteriensuspension gehalten und danach auf Wasseragar ausplattiert, zeigten die isolierten Sporen das in der Literatur beschriebene Verhalten einer starken  $\text{InsP}_6$ -Abnahme und nur eine schwache Abnahme der  $\text{InsP}_8$ -Konzentration gegenüber der späten Differenzierungsphase.

Bei der Differenzierung von *Ddino1Δ* zeigt sich ein etwas anderes Bild. Die Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate nehmen im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich ab. Beim Übergang von der späten Differenzierungsphase zu Sporen zeigt sich eine dramatische Abnahme der  $\text{InsP}_7$ - und  $\text{InsP}_8$ -Konzentration von  $30 \text{ nmol}/1 \cdot 10^9 \text{ Zellen}$  auf  $1.6 \text{ nmol}/1 \cdot 10^9 \text{ Zellen}$  ( $\text{InsP}_8$ ) bzw. von  $14 \text{ nmol}/1 \cdot 10^9 \text{ Zellen}$  auf  $0.7 \text{ nmol}/1 \cdot 10^9 \text{ Zellen}$  ( $\text{InsP}_7$ ). Die Konzentrationsabnahme der hochphosphorylierten Inositolphosphate ist auch in der Antisense-Mutante *Ddino1(as)* zu sehen.

Werden die inositol-auxotrophen Mutanten vorher 24 h auf inositolfreiem Medium kultiviert, so zeigt sich ein ähnliches Bild. Die gemessenen Konzentration sind jedoch gegenüber auf *myo*-Inositol kultivierten Zellen um ca. 20 % geringer.

***Ddino1Δ*:*****Ddino1(as)*:**

**Abbildung 88: Hochphosphorylierte Inositolphosphate (InsP6 und PP-InsPs) im Lebenszyklus der inositol-auxotrophen Mutanten *Ddino1Δ* und *Ddino1(as)*.**

Auf FM-Medium wachsende Zellen wurden geerntet, zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen, auf Wasseragarplatten ausplattiert und bei 22.5 °C inkubiert. Die Zellen wurden in ihren jeweiligen Differenzierungsstadien geerntet. Die Quantifizierung erfolgte nach 3.4.3 mit Hilfe der HPLC-MDD. Dargestellt sind die Ergebnisse einer repräsentativen Messung. Das Experiment wurde dreimal wiederholt und lieferte jeweils ähnliche Resultate.

Die physiologische Funktion der hochphosphorylierten Inositolphosphate während der Differenzierung ist bisher weitgehend unbekannt. Die hohen Konzentrationen der Verbindungen in der späten Wachstumsphase und in den Sporen führten zu der Vorstellung, dass die PP-InsPs als Energiespeichermoleküle dienen und eine Funktion ähnlich dem Creatinphosphat in den Muskeln der Säugetiere einnehmen. Dieses erscheint jedoch fraglich, da die 6-PP-InsP<sub>5</sub>-(5)-Kinase zu langsam arbeitet, um den ATP-Vorrat bei Mangel durch die Übertragung der β-Phosphatgruppe von 5,6-bis-PP-InsP<sub>4</sub> auf ADP aufzufüllen<sup>195</sup>. Es ist auch fraglich ob die *Dictyosteliden* ein Molekül mit den Eigenschaften des Creatinphosphats



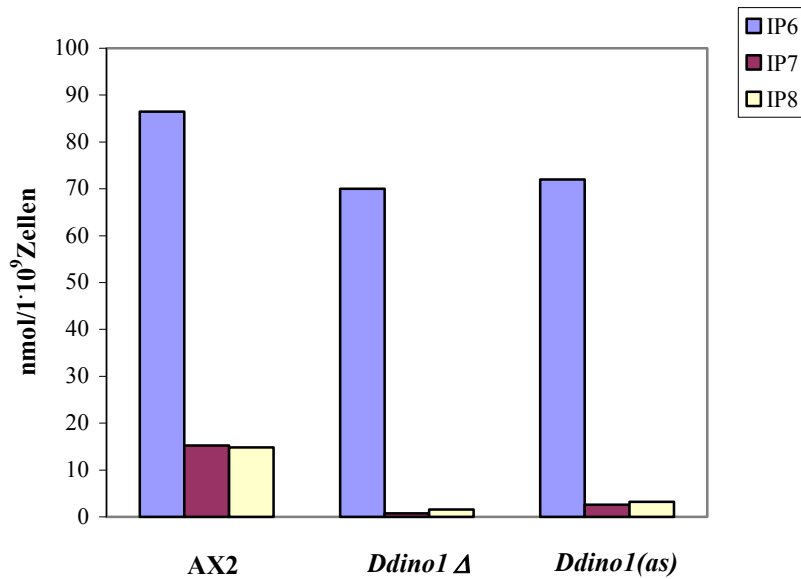
überhaupt benötigen. Durch die Differenzierung unter Hungerbedingungen zu einer Dauerform wird ein Energiemangel vermieden. Des Weiteren existieren in *Dictyosteliden* große Mengen an Polyphosphate (>10 mM), die ebenfalls in einer frei reversiblen Reaktion ADP phosphorylieren können.<sup>427</sup>

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate InsP<sub>6</sub>-InsP<sub>8</sub> bei den inositol-auxotrophen Mutanten während der Differenzierung kontinuierlich abnehmen und in den Sporen ein Minimum erreichen. Dieses Verhalten zeigt der Wildtyp nicht. Hier bleiben die Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate InsP<sub>6</sub>-InsP<sub>8</sub> über den Differenzierungszeitraum relativ konstant. Beim Übergang von der späten Differenzierungsphase zu den Sporen tritt jedoch ein deutlicher Abfall der InsP<sub>6</sub>- und der InsP<sub>8</sub>-Konzentration auf.

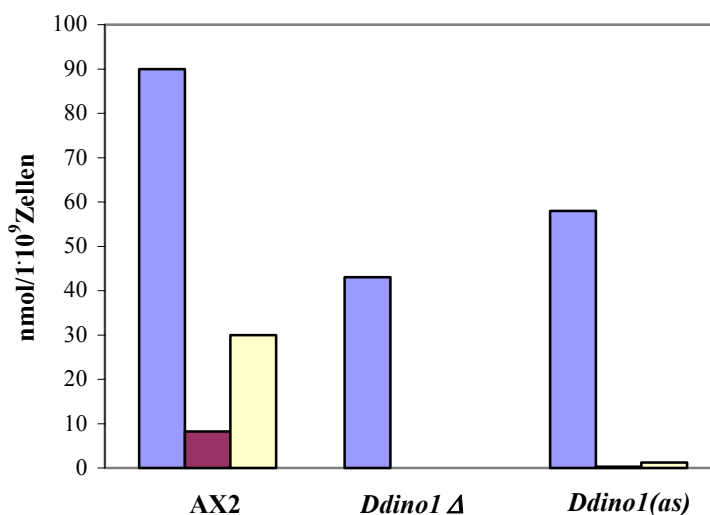
Ein Vergleich der hochphosphorylierten Inositolphosphate in Sporen zeigt, dass im Gegensatz zum Wildtyp die Konzentrationen an InsP<sub>7</sub> und InsP<sub>8</sub> wesentlich stärker abgenommen haben, während die InsP<sub>6</sub>-Konzentration fast konstant geblieben ist. Besonders drastisch ist die Verringerung bei *Ddino1Δ*. Die InsP<sub>8</sub>-Konzentration sinkt auf 10 % und die InsP<sub>7</sub>-Konzentration sogar auf 5 % der in AX2 ermittelten Konzentrationen.

Germinieren die Sporen der inositol-auxotrophen Mutanten auf inositolfreiem Medium, so zeigen sich auch hier stark reduzierte InsP<sub>7</sub>- und InsP<sub>8</sub>-Konzentrationen gegenüber AX2. Die InsP<sub>6</sub>-Konzentration der inositol-auxotrophen Mutanten sinkt dabei auf ca. 50 % des Wildtyplevels ab.

a)



b)



**Abbildung 89: Vergleich der Konzentrationen hochphosphorylierter Inositolphosphaten zwischen AX2 und den inositol-auxotrophen Mutanten in Sporen (a) und frisch germinierten Zellen (b).**

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die hochphosphorylierten Inositolphosphate keine oder nur eine geringe regulatorische Funktion haben. Die Konzentrationen nehmen zwar im Laufe der Differenzierung ab und erreichen in den Sporen ein Tiefststand, jedoch sind diese Sporen germinationsfähig.

Es ist auch unwahrscheinlich, dass die Konzentrationsabnahme von InsP<sub>7</sub>/InsP<sub>8</sub> bei der Germination der auslösende Faktor für den Vitalitätsverlust auf inositolfreiem Medium darstellt. Die Supplementierung von *myo*-Inositol zwei Stunden nach der Germination führt zu vitalen Zellen. Der langsame Inositolphosphatstoffwechsel würde nicht dazu ausreichen in

dem Zeitrahmen den Gehalt an InsP<sub>7</sub>/InsP<sub>8</sub> aufzufüllen. Hier ist es wahrscheinlicher, dass daran Phosphatidylinositolphosphate beteiligt sind die einem schnellen Stoffwechsel unterliegen.

Es hat jedoch den Anschein, dass die Synthese von InsP<sub>7</sub>/InsP<sub>8</sub> nicht aus InsP<sub>6</sub> hervorgeht. Zwar nimmt die InsP<sub>6</sub>-Konzentration bei *Ddino1Δ* im Verlaufe der Differenzierung und der Germination ab, jedoch ist noch genügend vorhanden, um eventuelle Verluste an InsP<sub>7</sub>/InsP<sub>8</sub> auszugleichen. Dieses bekräftigt die Hypothese, dass InsP<sub>7</sub>/InsP<sub>8</sub> nicht aus InsP<sub>6</sub> hervorgeht. Eine mögliche Biosynthese von InsP<sub>7</sub> könnte über eine Pyrophosphorylierung eines InsP<sub>5</sub>-Isomers oder über die Pyrophosphorylierung eines InsP<sub>x</sub>-Isomers mit anschließenden Phosphorylierungen sein. Jedoch konnten diese Zwischenstufen bisher noch nicht in *D.discoideum* beobachtet werden.

Zusätzlich stellt sich auch die Frage, ob die InsP<sub>7</sub>/InsP<sub>8</sub>-Konzentration durch einen verstärkten Abbau reduziert wird, oder die Biosynthese der Verbindungen verringert ist. Die geringe *myo*-Inositolkonzentration in den Sporen und in frisch germinierten Zellen von *Ddino1Δ* und *Ddino1(as)* sind gegenüber dem Wildtyp drastisch reduziert. Da im Verlaufe der Germinierung keine (*Ddino1Δ*) bzw. nur eine geringe Biosynthese (*Ddin1(as)*) von *myo*-Inositol stattfindet, könnte die Reduzierung der hochphosphorylierten Inositolphosphaten nur eine Begleiterscheinung sein, da das Vorläufermolekül nicht im erforderlichen Maße vorhanden ist.

#### **4.4 Versuche zur heterologen Genexpression der MIPS aus *D.discoideum* in *E.coli* und *P.pastoris***

Um die Eigenschaften der MIPS aus *D.discoideum* genauer zu charakterisieren, wurde versucht, das Gen in *E.coli* und *P.pastoris* heterolog zu exprimieren.

Die heterologe Expression von MIPS wurde in einigen Arbeiten beschrieben. Beispielsweise wurde die MIPS aus *S.polyrhizza* in *A.thaliana*<sup>428</sup>, die MIPS aus *P.coarctata* in Bakterien<sup>429</sup> und die humane MIPS erfolgreich in Hefe exprimiert.<sup>430</sup>

Die heterologe Expression der MIPS aus *D.discoideum* in *E.coli* war nicht erfolgreich. Im bakteriellen Zelllysat konnte im SDS-PAGE weder eine zusätzliche Proteinbande, noch MIPS-Aktivität nachgewiesen werden. Ein Western-Blot und immunologischer Nachweis durch einen gegen den His-Tag gerichteten Antikörpers zeigte keine sichtbare Proteinexpression. Dieses Ergebnis wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen die MIPS aus *E.histolytica* verifiziert.

Eine Erklärung könnte der AT-Reichtum der DNA aus *D.discoideum* sein. Bei der heterologen Genexpression AT-reicher Gene in *E.coli* kommt es häufig zur Bildung verkürzter mRNA's durch vorzeitige Termination. Dieses Verhalten ist auf die geringen Konzentrationen verschiedener tRNA's zurückzuführen.

Ein *P.pastoris* Expressionssystem erschien hiernach besser zur Expression von *D.discoideum*-Genen geeignet zu sein, da hier die Codonusage und die Häufigkeit verschiedener tRNA's starke Ähnlichkeiten zu *D.discoideum* zeigt. Als eukaryontisches Expressionssystem bietet *P.pastoris* auch ein endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat, die für eventuell vorhandene Disulfidbrücken, Phosphorylierungen und Glycolisierungen eukaryontischer Gene wichtig sind.

Das rekombinante Protein konnte jedoch weder im Überstand noch in den Zellen nachgewiesen werden. Es wurde weder eine MIPS-Aktivität gefunden, noch konnte das exprimierte Protein mit Hilfe einer SDS-PAGE und Coomassie-Färbung nachgewiesen werden. Ein Western-Blot und immunologischer Nachweis des exprimierten rekombinanten Proteins mit einem gegen den His-Tag gerichteten Antikörpers zeigten keinen Erfolg. Dieses Ergebnis wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen die MIPS aus *E.histolytica* bestätigt.

Die Expression und Sekretion von humanem Serumalbumin als Positivkontrolle war erfolgreich. Hier konnte die Expression des Proteins deutlich im Überstand und in den Zellen nachgewiesen werden.

Die in das *P.pastoris* integrierte cDNA ist sehr AT-reich. Bei solchen AT-reichen Sequenzen wurde in *P.pastoris* häufig eine vorzeitige Termination der Transkripte beobachtet. Die mRNA des rekombinanten Proteins konnte jedoch in der erwarteten Größe deutlich nachgewiesen werden.

Wie in 4.2.1.3 beschrieben, gibt die eingesetzte cDNA aus Tsukuba nicht das vollständige Gen der MIPS wieder. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aus der cDNA mit der aus der genomischen *D.discoideum* Datenbank zeigt, dass am N-Terminus einige Aminosäuren (MSAQMFESEFKVNSPNVKYTDEHIISDYTYQTTKVQNVN) fehlen. Dieser fehlende N-Terminus könnte entscheidend für die Aktivität der MIPS sein, erklärt jedoch nicht die fehlende Expression des rekombinanten Proteins.

Eine endgültige Erklärung, warum das rekombinante Protein nicht gebildet wurde, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden.

## 5 Fazit und Ausblick

*D.discoideum* zeigt einen komplexen Inositolstoffwechsel. Neben der Funktion von *myo*-Inositol als Synthesebaustein für mehr als 25 Inositolphosphate verschiedenster Substitutionsgerade, Phosphatidylinositolphosphate und GPI-verankerte Proteinen ist auch eine Involvierung des freien *myo*-Inositols in der Genregulation nicht ausgeschlossen. Der einzige bekannte Weg zur Synthese von *myo*-Inositol und den daraus resultierenden Verbindungen ist die Umlagerung von D-Glucose 6-phosphat zu D-*myo*-Inositol 3-phosphat mit anschließender Dephosphorylierung, wobei die Einstiegsreaktion durch D-*myo*-Inositol 3-phosphat Synthase katalysiert wird.

Die D-*myo*-Inositol 3-phosphat Synthase aus *D.discoideum* wurde partiell angereichert und eingehend charakterisiert. Es handelt sich um ein cytosolisches Protein, bestehend aus vier identischen Untereinheiten, mit einem Molekulargewicht von 220 kDa. Es wird nicht durch EDTA inhibiert, jedoch durch  $\text{NH}_4^+$  aktiviert. Dies spricht dafür, dass es sich bei der MIPS um eine Klasse I Aldolase handelt. Das Enzym ist hochspezifisch und setzt nur Glucose 6-phosphat um. Der  $K_M$ -Wert für Glucose 6-phosphat liegt bei 0.324 mM.

Das für die MIPS kodierende Gen wurde sowohl deletiert als auch die Translation der MIPS-mRNA reduziert. Die resultierenden inositol-auxotrophen Mutanten verdeutlichen die zentrale Bedeutung von *myo*-Inositol und dessen Abkömmlinge bei verschiedensten biologischen Prozessen in *D.discoideum*.

In Gegenwart von *myo*-Inositol zeigen die Mutanten nur wenige phänotypische Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Sowohl das axenische Wachstum als auch Endozytose, Zellbeweglichkeit, Zytokinese unterscheiden sich nur unwesentlich vom Wildtyp.

Bemerkenswert ist jedoch der Wachstumsdefekt auf Bakterien. Unabhängig von einer *myo*-Inositolsupplementierung zeigen die inositol-auxotrophen Mutanten kein sichtbares Wachstum auf Bakterien. Es stellt sich die Frage nach einer Beteiligung inositolhaltiger Metabolite bei den Erkennungs- und Bindungsvorgängen und der Aufnahme von Bakterien.

Ein Entzug von *myo*-Inositol führt jedoch zu drastischen phänotypischen Veränderungen. Die Zellen stellen ihr Wachstum ein und nach 5 h treten die ersten deutlichen morphologischen Veränderungen auf. Die Zellen verlieren ihre einheitliche Form, auf der Membranoberfläche werden bläschenförmige Ausstülpungen erkennbar und es ist ein Rückgang der zellulären Kompartimentierung zu beobachten.

Nach 14 h sind erste Defekte bei den endozytotischen Eigenschaften zu beobachten. Zunächst zeigen die Zellen eine deutliche Beeinträchtigung der Adhäsion an hydrophile

Oberflächen, nach 16 h wird die Phagozytose und in geringen Maße die Pinozytose beeinträchtigt.

Dieser Prozess ist in den ersten 24 h reversibel. Ein erneuter Inositolzusatz macht alle phänotypischen Defekte rückgängig.

Danach beginnt das Absterben der Zellen, wobei nach ca. 48 h nur noch ein Bruchteil der Zellen vital ist. Mit dem Absterben der Zellen ist auch ein drastischer Rückgang der intrazellulären ATP-Konzentration verbunden.

Das Absterben der inositol-auxotrophen Mutanten auf inositolfreiem Medium kann durch Inhibierung der Proteinbiosynthese oder parallelen Entzug der Kohlenstoffquelle bzw. der Stickstoffquelle inhibiert werden. Offensichtlich sind inositolhaltige Verbindungen essentiell für das vegetative Wachstum.

Der Inositolentzug führt zu Veränderungen im Metabolitspektrum der inositol-auxotrophen Mutanten. Die intrazelluläre *myo*-Inositolkonzentration sinkt stark ab. Zunächst verlieren die Zellen internalisiertes *myo*-Inositol, welches aus zuvor pinozytierten, inositolhaltigem Medium resultiert. Nach 4 h Inositolentzug liegt die Konzentration jedoch schon deutlich unter dem wildtypspezifischen Basalwert von 35-40  $\mu\text{M}$  und erreicht nach 24 h eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ .

Gleichzeitig mit der Abnahme der intrazellulären *myo*-Inositolkonzentration sinken auch die intrazellulären Konzentrationen von PtdIns und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> stark ab. Die Konzentrationen von PtdIns(3)P und PtdIns(4)P werden jedoch nicht beeinflusst.

Obwohl ein starker Rückgang an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu beobachten ist, nimmt die Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Konzentration kaum ab. Der Inositolentzug zeigt auch keine Auswirkungen auf die Konzentrationen anderer Inositolphosphate.

Neben den Konzentrationsabnahmen von *myo*-Inositol, PtdIns und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kommt es zu einem drastischen Konzentrationsanstieg an 2,3-Bisphosphoglycerat. Die Akkumulation von 2,3-BPG setzt nach 4 h Inositolentzug ein und erreicht nach 24 h mit der 30-70fachen Ausgangskonzentration ein Maximum. Der Anstieg des 2,3-BPG-Levels erfolgt ungefähr zu dem Zeitpunkt an dem der intrazelluläre *myo*-Inositollevel unter dem des Wildtyps absinkt.

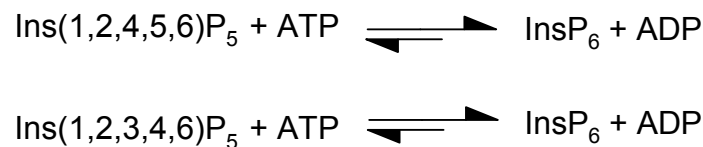
Der Anstieg von 2,3-BPG könnte eine Art „rescue“-Mechanismus für die wichtigen Signalmoleküle Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> sein. Denkbar wäre eine Inhibierung der Inositol(1,4,5)-trisphosphat Phosphatase durch 2,3-BPG. Die Inhibierung der *myo*-Inositol 1,4,5-trisphosphat 5-Phosphatase durch 2,3-BPG könnte den Abbau der physiologisch wichtigen Moleküle Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> über einen längeren Zeitraum

einschränken, und *D.discoideum* ein längeres Überleben ermöglichen. Hier besteht jedoch noch erheblicher Aufklärungsbedarf.

Die hochphosphorylierten Inositolphosphate  $\text{InsP}_6$ - $\text{InsP}_8$  zeigen überraschenderweise keine Konzentrationsänderungen im Verlauf des Inositolentzugs. Trotz ihrer sehr hohen Konzentrationen werden die hochphosphorylierten Inositolphosphate nicht dazu benutzt, um durch Dephosphorylierung den Inositolpool aufzufüllen.

Es stellt sich hier die Frage, ob diese Verbindungen so essentiell sind, dass der Abbau unbedingt verhindert werden muss, oder ob aufgrund einer Kompartimentierung keine Möglichkeit besteht den Verlust an cytosolischem *myo*-Inositol rückgängig zu machen.

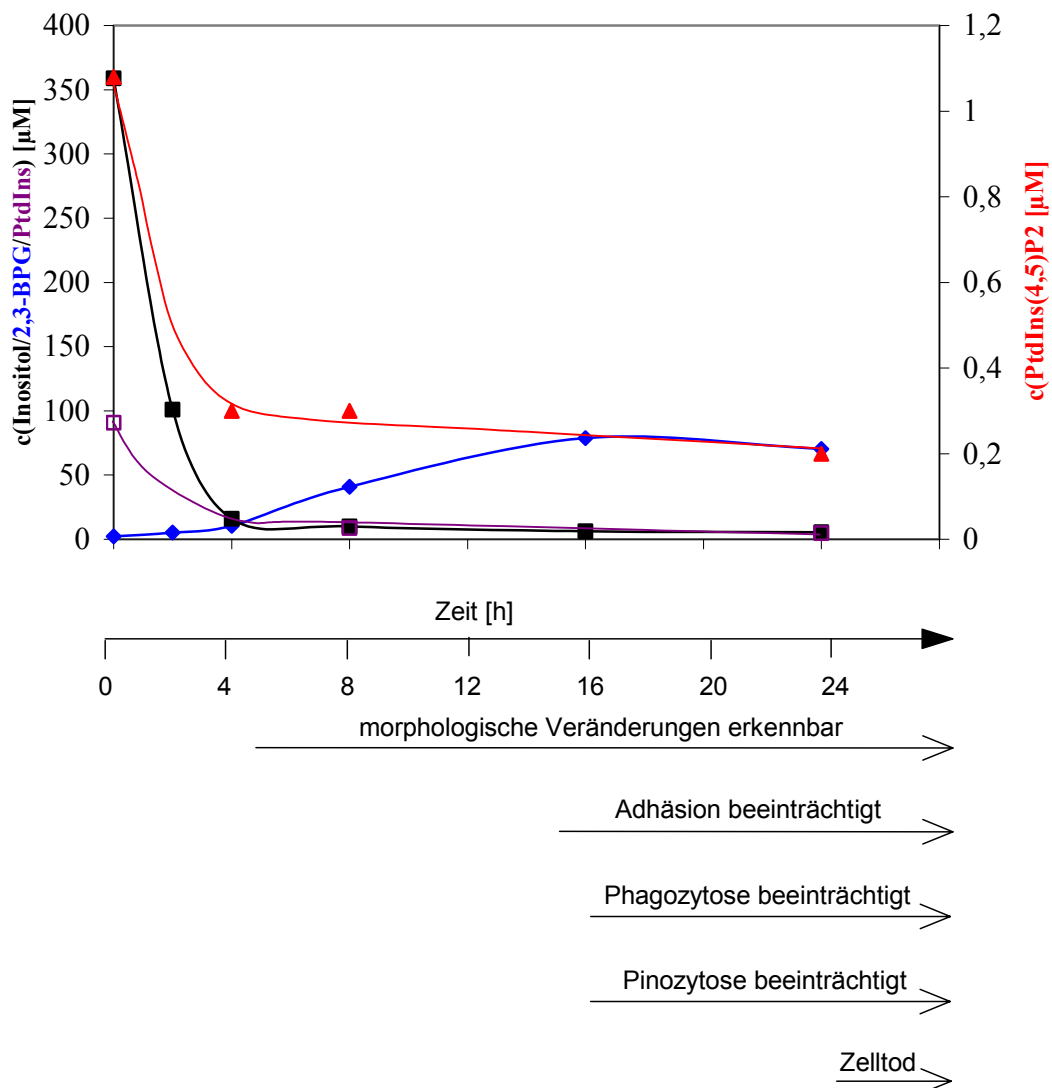
Eine Erklärung könnten dabei „futile Substratzyklen“ bieten, die den Gehalt der hochphosphorylierten Verbindungen konstant halten. Der Abbau von  $\text{InsP}_6$  verläuft zum größten Teil über  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ . Eine inzwischen gereinigte und charakterisierte Inositolpentakisphosphat 3/5 Kinase<sup>175</sup> katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung dieser Verbindungen zu  $\text{InsP}_6$ . Das Gleichgewicht der Reaktion liegt dabei weit auf der Produktseite.



**Abbildung 90: Die von der Inositolpentakisphosphat 3/5-kinase katalysierte Reaktionen**

In den inositol-auxotrophen Mutanten bleibt die ATP-Konzentration bei Inositolentzug zunächst konstant bei ca. 1 mM. Erst mit dem Absterben der Zellen sinkt die ATP-Konzentration deutlich ab. Die ATP-Konzentration reicht vermutlich für die Aufrechterhaltung der futilen Substratzyklen aus und kann die  $\text{InsP}_6$ -Konzentration bis zum Tod der Zelle konstant halten.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die zeitliche Korrelation der sich bei Inositolentzug verändernden Metabolite und den eintretenden phänotypischen Veränderungen in den inositol-auxotrophen Mutanten.



**Abbildung 91: Zeitliche Korrelation ausgewählter Metabolitkonzentrationen und phänotypischer Veränderungen in den inositol-auxotrophen Mutanten bei Inositolentzug**

Die phänotypischen Veränderungen der inositol-auxotrophen Mutanten gegenüber dem Wildtyp können durch den Verlust von  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  und die damit verbundenen indirekten Auswirkungen auf das Aktin-Zytoskelett erklärt werden. Die Regulation der Polymerisation/Depolymerisation des Aktins geschieht über eine Vielzahl aktinbindender Proteine, die in der Lage sind mit  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  zu interagieren.

Dieses wird auch durch die Abnahme des F-Aktins und einer gestörten Assoziation von Proteinen mit dem Zytoskelett bestätigt.

$\text{PtdIns}$  ist nicht nur an der Synthese von Phosphatidylinositolphosphaten beteiligt, sondern auch einer der Hauptmembranbestandteile. Es wird somit für die Integrität der Plasmamembran von entscheidender Bedeutung sein. Die nach 5 h sichtbaren



morphologischen Veränderungen der Zelle könnten auf den Verlust dieses Membranbestandteils zurückzuführen sein.

Die abnehmende intrazelluläre *myo*-Inositolkonzentration führt zu einem Verlust von *myo*-Inositol als Synthesebaustein für zahlreiche Verbindungen. Neben Phosphatidylinositolphosphate und Inositolphosphate gehören auch Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Membranproteine dazu. Eine Beteiligung von *myo*-Inositol bei der Genregulation kann auch nicht ausgeschlossen werden.

Die generierten inositol-auxotrophen Mutanten sind in der Lage zu Differenzieren und vitale Sporen zu bilden. Das Differenzierungsprogramm ist dabei zeitlich etwas verzögert und es kommt zur Bildung von „multiple-tipped aggregates“. Während der Differenzierung gehen die Konzentrationen der hochphosphorylierten Inositolphosphate gegenüber dem Wildtyp signifikant zurück, die Konzentrationsänderungen sind jedoch gering, so dass von einer essentiellen Bedeutung während der Differenzierung abgesehen werden kann.

In den Sporen selbst ist ein deutlicher stärkerer Abfall der  $\text{InsP}_6$ - und der  $\text{InsP}_8$ -Konzentration gegenüber dem Wildtyp zu bemerken. Die Sporen sind in der Lage zu germinieren, verlieren jedoch danach ihre Vitalität, sofern dem Medium kein *myo*-Inositol zugesetzt wurde.

Der Schwerpunkt weiterer Forschung sollte darauf gerichtet sein, die Funktion der verschiedensten Inositolmetabolite aufzuspüren. Erfolg verspricht hierbei der gezielte „knock out“ von verschiedenen, am Inositolmetabolismus beteiligten Enzymen. Interessante Ansatzpunkte wären hierbei:

1. Inositolmonophosphat Phosphatase:

Mutanten mit Defekten in der Inositolmonophosphat Phosphatase könnten  $\text{Ins}(3)\text{P}$  aus Glucose 6-phosphat synthetisieren, eine anschließende Dephosphorylierung zu *myo*-Inositol wäre jedoch unmöglich. Unter Inositolmangel wäre die Synthese der höherphosphorylierten Inositolphosphate aus  $\text{Ins}(3)\text{P}$  gewährleistet, ein Einbau von freiem *myo*-Inositol in  $\text{PtdIns}$  jedoch nicht mehr möglich. Die resultierenden phänotypischen Veränderungen könnten nur dem Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsel zugeordnet werden.

2. Inositolpentakisphosphat 3/5-Kinase:

Mutanten mit Defekten in der Inositolpentakisphosphat 3/5-Kinase könnten Einblicke in die „futilen Substratzyklen“ und die Regulation von  $\text{InsP}_6$  geben.

3. Bisphosphoglycerat-Mutase:

„Double knock-out“ Mutanten mit Defekten in der MIPS und Bisphosphoglycerat-Mutase könnten den postulierten „rescue“-Mechanismus für PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> bestätigen. Wenn dieses Modell zutrifft, sollten die Mutanten unter Inositolentzug geringere PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>- und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Konzentrationen und ein kürzeres Überleben zeigen.

4. InsP<sub>6</sub>-Phosphohydrolase (Phytase):

Der Katabolismus von InsP<sub>6</sub> in *D.discoideum* wurde bisher kaum untersucht. Mutanten mit Defekten in der Phytase könnten Hinweise auf die Funktion von InsP<sub>6</sub> liefern.

Von besonderem Interesse ist auch der Wachstumsdefekt der inositol-auxotrophen Mutanten in Bakteriensuspension und auf Bakterienrasen in Gegenwart von *myo*-Inositol. Dies lässt darauf schließen, dass ein späterer Schritt bei der Phagosomenreifung defekt ist. Vermutlich spielen bestimmte Phosphatidylinositolphosphate bei der Reifung der Phagosomen eine Rolle. Mit einer kürzlich entwickelten Methode, die Reifung von Phagosomen bei *D. discoideum* zu verfolgen, sollte es möglich sein, Phagosomenmembranen und damit die darin enthaltenen Phosphatidylinositolphosphate aus unterschiedlichen Stadien zu isolieren.<sup>431</sup> Der Vergleich der Konzentrationen in Phagosomenmembranen der Mutanten mit denen des Wildtyps könnte Hinweise darauf liefern, ob Phosphatidylinositolphosphate bei der Phagosomenreifung involviert sind, und erklären, warum die inositol-auxotrophen Mutanten sich nicht mehr durch Phagozytose ernähren können.

## 6 Anhang

### 6.1 Nukleotid- und übersetzte Proteinsequenz des cDNA-Klons FC-AA11

1	GGT GAA TTA ATT GTT GAA CCA GTT GAT CAA AAA TAT ATT TTC AAG	45
1	G E L I V E P V D Q K Y I F K	15
46	ACT GAA CGT AAA GTT CCA AGA ATG GGT GTT ATG ATT GTT GGT TTA	90
16	T E R K V P R M G V M I V G L	30
91	TGT GGT AAC AAT GGT ACA ACA GTA GTT GGT GGT GTT ATT GCC AAT	135
31	C G N N G T T V V G G V I A N	45
136	CGT GAA GGT TTA TGT TGG AAT ACC AAA CAA GGT CTT CAA ACA CCA	180
46	R E G L C W N T K Q G L Q T P	60
181	AAC TAT TTT GGT TCA GTT GTT ATG TCC TCA ACC ATT AGA ATG GGT	225
61	N Y F G S V V M S S T I R M G	75
226	ATG GAT GAA AAT GGT TGT GAT GCC TAC ATT CCA TTA AAG AAC TTA	270
76	M D E N G C D A Y I P L K N L	90
271	ATC CCA ATG GTT CAT CCA AAC GAT ATT GTT TTC GGT GGT TGG GAT	315
91	I P M V H P N D I V F G G W D	105
316	ATC AAC AAT GCC AAC TTA GCT GAT GCC ATG CAA CGT GCT CAA GTT	360
106	I N N A N L A D A M Q R A Q V	120
361	TTT GAC TAT GAT TTA CAA GTT CAA TTG ATT CCA CAC ATG AAA AAC	405
121	F D Y D L Q V Q L I P H M K N	135
406	ATC ACT CCA CTC CCA TCC ATC TAT TTC CCA GAC TTT ATC GCT GCA	450
136	I T P L P S I Y F P D F I A A	150
451	AAT CAA AAG GAT CGT GCC AAC AAT GTT TTA ACT GGT ACC AAA AAG	495
151	N Q K D R A N N V L T G T K K	165
496	GAA CAA ATG GAA CAA ATT AGA AAA GAT ATT AGA GAT TTC AAA GAA	540
166	E Q M E Q I R K D I R D F K E	180
541	TCA AAC AAA CTC GAC ACC GTC GTC GTT ATG TGG TCC GCA AAC ACT	585
181	S N K L D T V V V M W S A N T	195
586	GAA CGT TTC TCT TCA CTC GTT CCA GGT GTC AAT GAT ACC ATC GAA	630
196	E R F S S L V P G V N D T I E	210
631	AAT TTA ATG GCC GCA ATC GAT CGT TCC GAA GAA GAA ATC TCA CCA	675
211	N L M A A I D R S E E E I S P	225
676	TCC ACT TTA TTC GCC GTC GCC TCT ATC CTC GAA AAT ACC ACA TAC	720
226	S T L F A V A S I L E N T T Y	240
721	ATC AAT GGT TCA CCA CAA AAC ACC TTT GTT CCA GCT GTC GTT GAT	765
241	I N G S P Q N T F V P A V V D	255
766	TTA GCC ATT CAA CAC AAT GTT AGC ATT GGT GGT GAT GAT TTC AAA	810
256	L A I Q H N V S I G G D D F K	270

## Anhang

---

811	ACT	GGT	CAA	ACC	AAA	ATC	AAA	TCT	GTC	CTC	ACT	GAT	TAT	CTC	GTC	855
271	T	G	Q	T	K	I	K	S	V	L	T	D	Y	L	V	285
856	AGT	GCT	GGT	ATT	AAA	CCA	GTT	TCA	ATC	GTT	TCA	TAC	AAT	CAT	TTA	900
286	S	A	G	I	K	P	V	S	I	V	S	Y	N	H	L	300
901	GGT	AAT	AAC	GAT	GGT	AAG	AAT	CTC	TCT	GCT	CCA	CAA	CAA	TTC	CGT	945
301	G	N	N	D	G	K	N	L	S	A	P	Q	Q	F	R	315
946	TCC	AAA	GAA	ATT	ACC	AAA	TCA	AAT	GTT	GTC	GAT	GAT	ATG	ATT	GCC	990
316	S	K	E	I	T	K	S	N	V	V	D	D	M	I	A	330
991	TCA	AAT	AAC	ATC	CTC	TAC	AAA	CAA	GGT	GAA	CAC	CCA	GAT	CAC	GTT	1035
331	S	N	N	I	L	Y	K	Q	G	E	H	P	D	H	V	345
1036	ATT	GTC	ATC	AAA	TAC	GTC	CCA	TAC	GTA	GGT	GAT	TCA	AAG	AGA	GCT	1080
346	I	V	I	K	Y	V	P	Y	V	G	D	S	K	R	A	360
1081	ATG	GAT	GAA	TAT	ACC	TCA	CAA	ATC	TTT	ATG	GGT	GGT	CAC	AAT	ACA	1125
361	M	D	E	Y	T	S	Q	I	F	M	G	G	H	N	T	375
1126	ATC	GTT	CTC	CAC	AAC	ACT	TGT	GAA	GAT	TCT	TTA	TTA	GCC	GCT	CCA	1170
376	I	V	L	H	N	T	C	E	D	S	L	L	A	A	P	390
1171	ATT	ATT	TTA	GAT	TTA	GTT	ATT	CTT	GCT	GAA	GTT	ACT	AGT	CGT	ATC	1215
391	I	I	L	D	L	V	I	L	A	E	V	T	S	R	I	405
1216	ACA	ATG	AAA	AAA	CAA	GAT	GAT	GAT	CAA	TTT	GCT	ACT	TTC	CAT	CCA	1260
406	T	M	K	K	Q	D	D	D	Q	F	A	T	F	H	P	420
1261	GTT	TTA	TCA	TTA	TTA	TCA	TAC	CTC	CTT	AAA	GCA	CCA	ATT	GTT	CCA	1305
421	V	L	S	L	L	S	Y	L	L	K	A	P	I	V	P	435
1306	AAA	CAT	GCT	ACC	GTT	GTA	AAT	GCA	CTC	TTC	AAA	CAA	AGA	GCC	TGC	1350
436	K	H	A	T	V	V	N	A	L	F	K	Q	R	A	C	450
1351	ATA	GAA	AAT	ATC	TTC	AAA	GCA	TGC	GTT	GGT	ATC	GCT	CCA	GAT	AAT	1395
451	I	E	N	I	F	K	A	C	V	G	I	A	P	D	N	465
1396	AAC	ATG	TTA	TTA	GAA	CAA	AGA	TTA	TAA	ATA	ATA	CAA	ACA	ATT	TCA	1440
466	N	M	L	L	E	Q	R	L	*	I	I	Q	T	I	S	480
1441	ATA	ATA	ATA	ACA	TTT	ATT	TAA	AAA	ATA	ACT	TCC	ATT	TAT	AAT	AAA	1485
481	I	I	I	T	F	I	*	K	I	T	S	I	Y	N	K	495
1486	ATA	ATC	TTT	TGT	AAA	ATT	TAA	TAA	CTC	TAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	1530
496	I	I	F	C	K	I	*	*	L	*	K	K	K	K	K	

## 6.2 Vergleich der aus der cDNA-Sequenz abgeleiteten Proteinsequenz mit der Proteinsequenz bekannter MIPS

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	10                  20                  30                  40                  50                  60
<i>C. albicans</i>	-----MS TPIEFKSSNS VTKDDHLYTK FTYENSVVEK DANG-----K FIVTPTASDY
<i>C. paradisi</i>	-----MFI ENFKVESPNV KYTDHEIHSV YDYETTELVH ENR--NGTYQ WIVKPKTVKY
<i>A. thaliana</i>	-----MFI ESFKVESPNV KYTENEIHSV YDYETTEVVH EKT-VNGTYQ WIVKPKTVKY
<i>E. histolytica</i>	-----MSYQFHSTKS HQTKSSIAD FHYETTHVEV SKE-----G VICTPIAKDY
<i>S. polyrriza</i>	-----MFI EKFRVESPNV KYGDGEIESV YSYETTELVH EVR--NGSYQ WVVVKPSVQY
<i>C. elegans</i>	MSSAQVNGIS KRLLIVSEPNV KLEDGVLESR FTYRKNHFEH RAD-----G LHVTPKEHDY
<i>D. melanogaster</i>	----MKPTNN STLEVISPKV QVDEFFITD YDYQTSVVKR TAD--G--Q LQVHPQTTSL
<i>B. napus</i>	-----MFI ESFKVESPNV KYTENEIHSV YDYETTEVVH EN--VNGAYQ WIVKPKVVKY
<i>P. vulgaris</i>	-----MFI ESFKVESPNV KYTENEIHSV YDYETTEVVH EKT-VNGTYQ WIVKPKTVKY
<i>M. crystallinum</i>	-----MFI ESFKVESPNV KYTENEIESV YNYDTTELVH ENRKDAGVQ WIVKPKTVQY
<i>S. cerevisiae</i>	MTEDNIAPIT SVKRLVTDKC TYKDNELLTK YSYENAVVTK TASG-----R FDTVPTVQDY
<i>D. discoideum</i>	-----LIVEPVDQKY
<b>CLUSTAL CONSENSUS</b>	: * : :
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	70                  80                  90                  100                  110                  120
<i>C. albicans</i>	EFKVDLKVPK VGLLLV LGS ---NN TTLL GATLANKHNI SFENKE-GVV KPNYYGSVTQ
<i>C. paradisi</i>	EFKTDVHVPK LGVMLV WGS ---NN STLT GGVIANREGI CWATKD-TVQ QANYFGSLTQ
<i>A. thaliana</i>	DFKTDIRVPK LGVMLV LSI ---NN STLT AGVIANKEGI SWATKD-KVQ QANYFGSLTQ
<i>E. histolytica</i>	KFKVDKKIPK MGLMMI WGS ---NN TTVT AGILANKHHL CWTDRR-GVH EPNYYGSYTQ
<i>S. polyrriza</i>	QFKTDTRVPR LGVMLV WGS ---NN STLT AGVIANREGI SWVTKE-KVQ QANYFGSLTQ
<i>C. elegans</i>	SFKTVLKRPK TGLLLV LGS ---NN STAV GSIFANQYAM TWRTEKE-GHS QANYFGSVTQ
<i>D. melanogaster</i>	KIRTEGRHVPK LGVMLV WGS ---NN STLT AALEANRRQL KWRKRT-GVQ EANWYGSITQ
<i>B. napus</i>	DFKTDTRVPK LGVMLV WGS ---NN STLT AGVIANKEGI SWATKD-KVQ QANYFGSLTQ
<i>P. vulgaris</i>	DFKTDTRVPK LGVMLV LSI ---NN STLT AGVIANKEGI SWATKD-KVQ QANYFGSLTQ
<i>M. crystallinum</i>	HFKTDTRVPK LGVMLV WGS ---NN STLT GGVIANREGI SWATKD-KIQ QANYFGSLTQ
<i>S. cerevisiae</i>	VFKLDFEKKP EKTRNYAHWV RWLQQWLTW PRYWRISTMW SFQTKAKGVK QPNYFGSMTQ
<i>D. discoideum</i>	IFKTERKVPR MGVMIW LGS ---NN TTVV GGVIANREGL CWNTKQ-GLQ TPNYFGSVVM
<b>CLUSTAL CONSENSUS</b>	. : : * : : : * : : : * : : : *
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	130                  140                  150                  160                  170                  180
<i>C. albicans</i>	ASTVKIGVDK ETGEDVYVPF NSIVPMVNP DLVVDGWDIS GLPLDQAMKR AKVLDVTLQK
<i>C. paradisi</i>	ASAIRVGS-- YNGEEIYAPF KSILPMVNPD DIVFGGWDIS DMNLADAMAR ARVFDIDLQK
<i>A. thaliana</i>	ASSIRVGS-- FNGEEIYAPF KSLLPVMPND DVVFGGWDIS DMNLADAMAR ARVLDIDLQK
<i>E. histolytica</i>	SATMRLGAT- SEGEEIHAPY KDISPFLCPD NIVVGGWDIS KVNMDALKR AQVVDYDLQR
<i>S. polyrriza</i>	SSSIRVGS-- FNGEEIYAPF KSLLPVMPND EIVFGGWDIS DMNLADAMGR AKVLDIDLQK
<i>C. elegans</i>	TATVHLGYDS ATQNQIFVFP KDIVPILSPN DLIISGWDIS DSNLYEAMGR AKVFEPELQE
<i>D. melanogaster</i>	ASTVFIGSD- EDGGDVYVPF NLIIVDVEPD NLIIVDVEPD GLHLGDMAR AELVDLADQD
<i>B. napus</i>	ASSIRVGS-- FNGEEMYAPF KSLVPMVNPD DVVFGGWDIS DMNLADAMGR AKVLDIDLQK
<i>P. vulgaris</i>	ASSIRVGS-- FNGEEIYAPF KSLLPVMPND DVVFGGWDIS DMNLADAMAR ARVLDIDLQK
<i>M. crystallinum</i>	ASSIRVGS-- FNGEEIYAPF KSLLPVMPND DVVFGGWDIS DMNLADAMTR ARVFDIDLQK
<i>S. cerevisiae</i>	CSTLKLGIDA E-CNDVYAPF NLLPMVSPK HFVVSQWDIN NADLYEAMQR SQVLEYDQQ
<i>D. discoideum</i>	SSTIRMGMD- ENGCDAYIPL KNLIIPMVHPN DIVFGGWDIN NANLADAMQR AQVFDYDLQV
<b>CLUSTAL CONSENSUS</b>	:: : * : . * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	190                  200                  210                  220                  230                  240
<i>C. albicans</i>	QLYPYLENKK PLESIIYDPDF IALNQSERAN NVFNQVN-GE VKTDNKWADV EKIRKDIRDF
<i>C. paradisi</i>	QLRPYEMSV PLPGIYDPDF IAAHQSSRAN NVIKG-T--- ----KKEQM LQIIKDIREF
<i>A. thaliana</i>	QLRPYEMENIV PLPGIFDPDF IAAHQSSRAN HVIKG-T--- ----KKEQV DHIKDMREF
<i>E. histolytica</i>	QLYPYMKELV PLPSIYKSY IAAHQSSRAN NVIPG-T--- ----KQNLH DTVRQDIRDF
<i>S. polyrriza</i>	QLRPYEMSV PLPGIYNPDF IAAHQSSRAN NVIKG-P--- ----KKQV QRIIDIREF
<i>C. elegans</i>	KLRPFMEPIV PLPSIYDPDF IASNQSDRAN NVIPGDN--- ----KLEHL EHIRADIRKF
<i>D. melanogaster</i>	QIYDQLAQLR PRPSIYDPDF IAAHQSSRAN NVIRG-T--- ----RLEQY EQIRKDIRDF
<i>B. napus</i>	QLRPYEMENIV PLPGIYDPDF IAAHQSSRAN NVIKG-T--- ----KKEQV DQIIKDMREF
<i>P. vulgaris</i>	QLRPYEMENIV PLPGIFDPDF IAAHQSSRAN HVIKG-T--- ----KKEQV DHIKDMREF
<i>M. crystallinum</i>	QLRPYEMHMV PLPGIYDPDF IAAHQSSRAN NVIKG-T--- ----KKEQV ERVIKDIREF
<i>S. cerevisiae</i>	RLKAKMSLVK PLPSIYDPDF IAAHQSSRAN QCINLDEKCN VITRKGWTHL QRIRDIQNF
<i>D. discoideum</i>	QLIPHMKNIT PLPSIYFPDF IAAHQSSRAN NVLTG-T--- ----KKEQM EQIRKDIRDF
<b>CLUSTAL CONSENSUS</b>	:: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	250                  260                  270                  280                  290                  300
<i>C. albicans</i>	KAKNELDKVI ILWTAN ERY ADVLPNVNDT ADNLIKSIKE SHEETAPSTV FAVASILEKV
<i>C. paradisi</i>	KEKNKVDKVV VLWTAN ERY SNVIVGLNDT VESLLASLDK NEAEISPSTL YAIACVLENI
<i>A. thaliana</i>	KEKNKVDKVV VLWTAN ERY SNVIVOMNDT MENLMESVDR DEAEISPSTL YAIACVLEGI
<i>E. histolytica</i>	KAQHGLDKIV VLWTATERY VEIKEGLNDT AENLLKSIAA GEEEVTPSTI FATAAILECC
<i>S. polyrriza</i>	KEREKVEKVV VLWTAN ERY SDLVVGLNDT MENLLAAVER DEAEISPSSL YALACIMEQV

# Anhang

<i>C. elegans</i>	KQEHELECVI	VLMTANERY	TDVRQGLNAT	ADEIMESIRV	NEDEVSPSNI	FAVASILEGA
<i>D. melanogaster</i>	RERSGVDSVI	VLMTANERF	ADVQPGLNNT	SQELIASLEA	NHSEVSPSTI	FAMASTIAEGC
<i>B. napus</i>	KEKNKVDKVV	VLMTANERY	SNVIVGLNDT	MENLMNSVDR	DESEISPSSTL	YAIACVLEGI
<i>P. vulgaris</i>	KEKNKVDKVV	VLMTANERY	SNEVVGNDT	MEDLMBSVDR	DEAEISPSSTL	YAIACVLEGI
<i>M. crystallinum</i>	KEKNKVDKVV	VLMTANERY	SNVVGGLNDT	MENLLASLEK	NESEISPSSTS	YALACIEENI
<i>S. cerevisiae</i>	KEENALDKVI	VLMTANERY	VEVSPGVNDT	MENLLQSTKN	DHEEITAPSTI	FAAVASILEGV
<i>D. discoideum</i>	KESNKLDTVV	VMISANERF	SSLVPGVNDT	IENLMAAIDR	SEEEISPSSTL	FVAVASILENT
<b>CLUSTAL CONSENSUS</b>	:	:: :	::*::***:	. : * *	::: : :	:: *::**:
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
		310	320	330	340	350
<i>C. albicans</i>	PYINAPONT	FVPVIELAE	KYDSFIGGDD	FKSGQTKIKS	VLAQFLVDAG	IKPLSLIAYN
<i>C. paradisi</i>	PFINAPONT	FVPLIDLAI	RRNCLIGGDD	FKSGQTKMKS	VLVDFLVGAG	IKPTSIVYN
<i>A. thaliana</i>	PFINAPONT	FVPLIDMAI	RNNVLIGGDD	FKSGQTKMKS	VLVDFLVGAG	IKPTSIVYN
<i>E. histolytica</i>	PFVNAPONT	LVPVIDLAN	KNNVLLGDD	FKTGQTKIKS	VLADFVSSG	LKLQSIIVYN
<i>S. polyrriza</i>	PFVNAPONT	FVPLIEMAI	KRNSLIGGDD	FKSGQTKMKS	VLVDFLVGAG	IKPTSIVYN
<i>C. elegans</i>	HYINAPONT	LVPVIELAE	RHKVFIGGDD	FKSGQTKFKS	AFVDFLVSSG	MKPEISIVYN
<i>D. melanogaster</i>	TYINAPONT	FVPLIQLAE	EKNVFIAGDD	FKSGQTKIKS	VLVDFLVGAG	IKPVSLIAYN
<i>B. napus</i>	PFINAPONT	FVPLIDLAI	KNNVLIGGDD	FKSGQTKMKS	VLVDFLVGAG	IKPTSIVYN
<i>P. vulgaris</i>	PFINAPQHT	FVPLIDMAI	RNNVLIGGDD	FKSGQTKMKS	VLGDFLVGAG	IKPTSIVYN
<i>M. crystallinum</i>	PFINAPONT	FVPLIDLAI	KKNSLIGGDD	FKSGQTKMKS	VLVDFLVGAG	IKPTSIVYN
<i>S. cerevisiae</i>	PYINAPONT	FVPLVQLAE	HEGTFIAGDD	LKSGQTKLKS	VLAQFLVDAG	IKPVSLIAYN
<i>D. discoideum</i>	TYINAPONT	FVPVAVDLAI	QHNVSIGGDD	FKTGQTKIKS	VLTDYLVSSG	LKPVSLIAYN
<b>CLUSTAL CONSENSUS</b>	::*****:	::*::***:	. : * *	::: : *	::*::**:	::*::**:
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
		370	380	390	400	410
<i>C. albicans</i>	HLNNDYNL	SSPKQFRSKE	ISKQSVVDDI	IESNELLYNK	ESGDKVDHCI	VIKYLPVAGD
<i>C. paradisi</i>	HLNNDMNL	SAPQTFRSKE	ISKSNVVDDM	VSSN--VFFM	--GLVNTTRP	WIKYVPYVA-
<i>A. thaliana</i>	HLNNDMNL	SAPQTFRSKE	ISKSNVVDDM	VASNGILFEP	--GEHPDHVV	VIKYVPYVAD
<i>E. histolytica</i>	HLNNDKNL	SSPSQFRSKE	ISKSNVSDV	VKSNNIMYKA	--GEHPDHVI	VITVYPPVGD
<i>S. polyrriza</i>	HLNNDMNL	SAPQTFRSKE	ISKSNVVDDM	VSSNGILYEP	--GEHPDHVI	VIKYVPYVGD
<i>C. elegans</i>	HLNNDKNL	SEARQFRSKE	ISKSNVVDDM	VKSNNILFPD	--AKNPDHCV	VIKYVPYVAD
<i>D. melanogaster</i>	HLNNDKNL	SAPQQFRSKE	ISKSNVVDDM	VASNRLLYGP	--DEHPDHVV	VIKYVPYVGD
<i>B. napus</i>	HLNNDMNL	SAPQTFRSKE	ISKSNVVDDM	VASNGILFEP	--GEHPDHVV	VIKYVPYVAD
<i>P. vulgaris</i>	HLNNDMNL	SAPQTFRSKE	ISKSNVVDDM	VASNGILFEP	--GEHPDHVV	VIKYVPYVAD
<i>M. crystallinum</i>	HLNNDMNL	SAPQTFRSKE	ISKSNVVDDM	VASNGILYEP	--GEHPDHVV	VIKYVPYVGD
<i>S. cerevisiae</i>	HLNNDYNL	SAPKQFRSKE	ISKSNVDDI	IASNDILYND	KLGGKVDHCI	VIKYMKPVGD
<i>D. discoideum</i>	HLNNDKNL	SAPQQFRSKE	ITKSNVVDDM	IASNNILYKQ	--GEHPDHVI	VIKYVPYVGD
<b>CLUSTAL CONSENSUS</b>	***** ** *	*****	*:*.*.*: :	** :	:	: *.*: *
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
		430	440	450	460	470
<i>C. albicans</i>	SKVAMDEYYS	ELMLGGHNKI	SIHNVCEDSL	LATPLIIDLV	VATEFATRVQ	VK--GPGKSD
<i>C. paradisi</i>	IERAMDEYTS	EIFMGGKSTI	VLHNTCEDSL	LAAPIIIDLV	LLAELSTRIQ	LK---AELEG
<i>A. thaliana</i>	SKRAMDEYTS	EIFMGGKNTI	VMHNTCEDSL	LAAPIIIDLV	LLAELSTRIQ	FK---SEEGE
<i>E. histolytica</i>	SHRAMDDYTS	HIFLRGHNTI	ALHNTCEDSL	LAAPLMIDLA	VLMEFMTRVT	YS----IDG
<i>S. polyrriza</i>	SKRAMDEYTS	EIFMGGKSTI	ILHNTCEDSL	LAAPIIIDLV	LLAELSTRIQ	LK---AELEG
<i>C. elegans</i>	SKRAMDEYIC	SIFMGGKQTF	VHNTCEDSL	LASPLIIDLA	ILTELASRVS	YK----VDD
<i>D. melanogaster</i>	SKRAMDEYTS	EIMMGHNTL	VIHNTCEDSL	LATPLIIDLV	ILGELSTRIQ	LRN--AEKES
<i>B. napus</i>	SKRAMDEYTS	EIFMGGKNTI	VMHNTCEDSL	LAAPIIIDLV	LLAELSTRIQ	FK---SEKEG
<i>P. vulgaris</i>	SKRAMDEYTS	EIFMGGKNTI	VMHNTCEDSL	LAAPIIIDLV	LLAELSTRIQ	FK---SEEGE
<i>M. crystallinum</i>	SKRAMDEYTS	EIFMGGTNTI	VMHNTCEDSL	LAAPIIIDLV	LLAELSTRIQ	LK---ABEED
<i>S. cerevisiae</i>	SKVAMDEYYS	ELMLGGHNRI	SIHNVCEDSL	LATALIIDLV	VMTEFCTRV	YKVVDPVKED
<i>D. discoideum</i>	SKRAMDEYTS	QIFMGGHNTI	VLHNTCEDSL	LAAPIIIDLV	ILAEVTSRIT	MK---KQDDD
<b>CLUSTAL CONSENSUS</b>	. **:* :	::: * . :	::*::***	**::** :	::*::** :	::*::** :
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
		490	500	510	520	530
<i>C. albicans</i>	--- <td>ASLLSYWLKA</td> <td>PLARPQFKPI</td> <td>NGLNKQRQQL</td> <td>VNLLSVLVGL</td> <td>PIDNELRFER</td>	ASLLSYWLKA	PLARPQFKPI	NGLNKQRQQL	VNLLSVLVGL	PIDNELRFER
<i>C. paradisi</i>	K--FHSFHPV	ATILSYLTKA	PLVPPGTPVV	NALSKQRAML	ENILRACVGL	APENNMILEY
<i>A. thaliana</i>	K--FHSFHPV	ATILSYLTKA	PLVPPGTPVI	NALSKQRAML	ENIMRACVGL	APENNMIMEF
<i>E. histolytica</i>	KE-FKNFNSV	MSMISYLLKA	PVVPKQSPVI	NALFKQRECL	DNFFRALLGL	PCDNHLLLEG
<i>S. polyrriza</i>	K--FHSFHPV	ASILSYLSKA	PLVPPGTPVV	NALSKQRAML	ENILRACVGL	APENNMILEY
<i>C. elegans</i>	E--YKPFHSV	LSILSLLLKA	PVVPPTPIS	NAFMRQFSTL	TKLVTALAGF	PSDTDMQIEF
<i>D. melanogaster</i>	AP-WVFFKPV	LSLLSYLCKA	PLVPPQSQVV	NSLFRQRAAI	ENILRGCIGL	PPISHTMLEQ
<i>B. napus</i>	K--FHSFHPV	ATKLSYLTKA	PLVPPGTPVV	NALSKQRAML	ENILRACVGL	APENNMILEY
<i>P. vulgaris</i>	K--FHSFHPV	ATILSYLTKA	PLVPPGTPVI	NALSKQRAML	ENIMRACVGL	APENNMIMEF
<i>M. crystallinum</i>	K--FHSFHPV	ATILSYLTKA	PLVPPGTPVV	NALSKQRAML	ENILRACVGL	APENNMILEY
<i>S. cerevisiae</i>	AGKFENFYPV	LTFLSYWLKA	PLTRPGFHPV	NGLNKQRTAL	ENFLRLLIQ	PSQNELPFEE
<i>D. discoideum</i>	Q--FATFHPV	LSLLSYLLKA	PIVPHATVV	NALFKQRACI	ENIFKACVGI	APDNMMLLEQ
<b>CLUSTAL CONSENSUS</b>	: : * :	: * * * :	** :	*:.* :	: : :	*: . . . : *
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
		550	560	570	580	590
<i>C. albicans</i>	ILK----	----	----	----	----	----
<i>C. paradisi</i>	K----	----	----	----	----	----
<i>A. thaliana</i>	K----	----	----	----	----	----

## Anhang

---

```
E.histolytica      KTEHFF-----
S.polyrriza      K-----
C.elegans        FTQLPAKSK SQ-----
D.melanogaster  RFDFTITNE PPLKRVKILG QPCSVESVTN GKKLHANGHS NGSAKLATNG NGH
B.napus         K-----
P.vulgaris      K-----
M.crystallinum  K-----
S.cerevisiae    RLL-----
D.discoideum    RL-----
CLUSTAL CONSENSUS
```

## 7 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> **Billington D.C.**, The Inositol Phosphates – Chemical Synthesis and Biological Significance. 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, (1993).
- <sup>2</sup> **Arganoff B.W.**, Phosphorylated Derivatives of *myo*-Inositol, (1986), Federation Proceedings 45, 2629-2633.
- <sup>3</sup> **IUPAC-IUB**. Nomenclature of Inositols (Recommendations 1973), (1974), Pure Appl.Chem. 37, 285-297
- <sup>4</sup> **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB)**, Numbering of Atoms in *myo*-Inositol. Recommendations 1988, (1989), European Journal of Biochemistry 180, 485-486
- <sup>5</sup> **Holub B.J.**, Metabolism and function of *myo*-inositol and inositol phospholipids, (1986), Annu. Rev. Nutr. 6, 563-597
- <sup>6</sup> **Clements R.S. Jr., Diethelm A.G.**, The metabolism of *myo*-Inositol by the human kidney, (1979), J. Laboratory Clin. Med. 93, 210-219
- <sup>7</sup> **Hauser G., Finelli V.N.**, The biosynthesis of free and phosphatide *myo*-Inositol from glucose in mammalian tissues, (1963), J. Biol. Chem. 238, 3224-3228
- <sup>8</sup> **Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somero G.N.**, Living with water stress: evolution of osmolyte systems, (1982), Science 217, 1214-1222.
- <sup>9</sup> **Häussinger D.**, The role of cellular hydration in the regulation of cell function, (1996), Biochem J. 313, 697-710.
- <sup>10</sup> **Burg M.B.**, Coordinate regulation of organic osmolytes in renal cells, (1996), Kidney Int. 49, 1684-1685.
- <sup>11</sup> **Burg M.B.**, Molecular basis for osmoregulation of organic osmolytes in renal medullary cells, (1994), J. Exp. Zool. 268, 171-175.
- <sup>12</sup> **Hoffmann E.K., Simonsen L.O.**, Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells, (1989), Physiol. Rev. 69, 315-382.
- <sup>13</sup> **Kimelberg H.K., Goderie S.K., Higman S., Pang S., Waniewski R.A.**, Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures, (1990), J. Neurosci. 10, 1583-1591
- <sup>14</sup> **Roy G.**, Amino acid current through anion channels in cultured human glial cells, (1995), J. Membr. Biol. 147, 35-44.
- <sup>15</sup> **Burg M.B.**, Molecular basis of osmotic regulation, (1995), Am. J. Physiol. 268, 983-996
- <sup>16</sup> **Handler J.S., Kwon H.M.**, Regulation of renal cell organic osmolyte transport by tonicity, (1993), Am. J. Physiol. 265, 1449-55
- <sup>17</sup> **Garcia-Perez A., Burg M.B.**, Renal medullary organic osmolytes, (1991), Physiol. Rev. 71, 1081-1115
- <sup>18</sup> **Paredes A., McManus M., Kwon H.M., Strange K.**, Osmoregulation of Na(+)-inositol cotransporter activity and mRNA levels in brain glial cells, (1992), Am. J. Physiol. 263, 1282-1288
- <sup>19</sup> **Isaacks R.E., Bender A.S., Kim C.Y., Prieto N.M., Norenberg M.D.**, Osmotic regulation of *myo*-inositol uptake in primary astrocyte cultures, (1994), Neurochem. Res. 19, 331-338
- <sup>20</sup> **Burg M.B., Kwon E.D., Kültz D.**, Regulation of gene expression by hypertonicity, (1997), Annu. Rev. Physiol. 59, 437-455.
- <sup>21</sup> **Sinning R., Schliess F., Kubitz R., Haussinger D.**, Osmosignalling in C6 glioma cells, (1997), FEBS Lett. 400, 163-167
- <sup>22</sup> **Berry G.T., Mallee J.J., Kwon H.M., Rim J.S., Mulla W.R., Muenke M., Spinner N.B.**, The human osmoregulatory Na<sup>+</sup>/*myo*-inositol cotransporter gene (SLC5A3): molecular cloning and localization to chromosome 21, (1995), Genomics 25, 507-513
- <sup>23</sup> **Shetty H.U., Schapiro M.B., Holloway H.W., Rapoport S.I.**, Polyol profiles in Down syndrome. *myo*-Inositol, specifically, is elevated in the cerebrospinal fluid, (1995), J. Clin. Invest. 95, 542-546.
- <sup>24</sup> **Shonk T., Ross B.D.**, Role of increased cerebral *myo*-inositol in the dementia of Down syndrome, (1995), Magn. Reson. Med. 33, 858-861.
- <sup>25</sup> **Berry G.T., Wang Z.J., Dreha S.F., Finucane B.M., Zimmerman R.A.**, In vivo brain *myo*-inositol levels in children with Down syndrome, (1999), J. Pediatr. 135, 94-97.
- <sup>26</sup> **Huang W., Alexander G.E., Daly E.M., Shetty H.U., Krasuski J.S., Rapoport S.I., Schapiro M.B.**, High brain *myo*-inositol levels in the prodementia phase of Alzheimer's disease in adults with Down's syndrome: a 1H MRS study, (1999), Am. J. Psychiatry. 156, 1879-1886.
- <sup>27</sup> **Isaacks R.E., Bender A.S., Kim C.Y., Shi Y.F., Norenberg M.D.**, Effect of ammonia and methionine sulfoximine on *myo*-inositol transport in cultured astrocytes, (1999), Neurochem Res. 24, 51-59.
- <sup>28</sup> **Drummond A.H.**, Lithium and inositol lipid-linked signalling mechanisms, (1987), Trends Pharmacol. Sci. 8, 129-133.
- <sup>29</sup> **Bechlibnyk Y., Young L.T.**, The neurobiology of bipolar disorder: focus on signal transduction pathways and the regulation of gene expression, (2002), Can. J. Psychiatry 47, 135-148.
- <sup>30</sup> **Berridge M.J., Downes C.P., Hanley M.R.**, Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis, (1989), Cell 59, 411-419.



- <sup>31</sup> **Jenkinson S., Nahorski S.R., Challiss R.A.**, Disruption by lithium of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate supply and inositol-1,4,5-trisphosphate generation in Chinese hamster ovary cells expressing human recombinant m1 muscarinic receptors, (1994), *Mol. Pharmacol.* **46**, 1138-1148.
- <sup>32</sup> **Mayr G.W.**, Inositol Phosphates: Structural Components, Regulators and Signal Transducers of the Cell – a Review, *Topics in Biochemistry*, Boehringer Mannheim, (1987).
- <sup>33</sup> **Seaqest E.R., Gruetter R.**, Identification of a high concentration of *scyllo*-Inositol in the brain of a healthy human subject using <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR, (1998), *Magn. Reson. Med.* **39**, 313-316
- <sup>34</sup> **Sherman W.R., Stewart M.A., Kurien M.M., Goodwin S.L.**, The measurement of myo-inositol, myo-inosose-2 and scyllo-inositol in mammalian tissues, (1968), *Biochim. Biophys. Acta.* **158**, 197-205.
- <sup>35</sup> **Sherman W.R., Stewart M.A., Simpson P.C., Goodwin S.L.**, The identification of myo-inosose-2 and scyllo-inositol in mammalian tissues, (1968), *Biochemistry* **7**, 819-824.
- <sup>36</sup> **Spector R.**, The transport and metabolism of scyllo-Inositol in the central nervous system, (1978), *J. Neurochem.* **31**, 1113-1115
- <sup>37</sup> **Pak Y., Huang L.C., Lilley K.J., Lerner J.**, In vivo conversion of [3H]myoinositol to [3H]chiroinositol in rat tissues, (1992), *J. Biol. Chem.* **267**, 16904-10.
- <sup>38</sup> **Raggio N., Raggio M., Burris R.H.**, Enhancement by inositol of the nodulation of isolated bean roots, (1959), *Science* **129**, 211-212
- <sup>39</sup> **Martin J.B., Laussmann T., Bakker-Grunwald T., Vogel G. and Klein G.**, *neo*-Inositolpolyphosphates in the amoeba *Entamoeba histolytica*, (2000), *J. Biol. Chem.* **275**, 10134-10140
- <sup>40</sup> **Mauck L.A., Wong Y.-H., Sherman W.R.**, L-myoinositol-1-phosphate synthase from bovine testis: purification to homogeneity and partial characterization, (1980), *Biochemistry* **19**, 3623-3629
- <sup>41</sup> **Wong Y.-H., Mauck L.A., Sherman W.R.**, L-myoinositol-1-phosphate synthase from bovine testis, (1982), *Methods Enzymol.* **90**, 309-314
- <sup>42</sup> **Maeda T., Eisenberg F. Jr.**, Purification, structure, and catalytic properties of L-myoinositol-1-phosphate synthase from rat testis, (1980), *J Biol Chem.* **255**, 8458-8464
- <sup>43</sup> **Eisenberg F. Jr., Parthasarathy R.**, Measurement of biosynthesis of myo-inositol from glucose 6-phosphate, (1987), *Methods Enzymol.* **141**, 127-143
- <sup>44</sup> **Loewus M.W., Loewus F.A.**, The isolation and characterization of D-glucose-6-phosphate cycloaldolase (NAD-dependent) from *Acer pseudoplatanus* L. cell cultures, (1971), *Plant. Physiol.* **48**, 255-260
- <sup>45</sup> **Loewus M.W., Bedgar D.L., Loewus F.A.**, 1L-myoinositol 1-phosphate synthase from pollen of *Lilium longiflorum*. An ordered sequential mechanism, (1984), *J. Biol. Chem.* **259**, 7644-7647
- <sup>46</sup> **Ogunyemi E.O., Pittner F., Hoffmann-Ostenhof O.**, Studies on the biosynthesis of cyclitols. XXXVI: Purification of myo-Inositol-1-phosphate synthase of the duckweed *Lemna gibba*, to homogeneity by affinity chromatography on NAD-sepharose. Molecular and catalytic properties of the enzyme, (1978), *Hope-Seyler's J. Physiol. Chem.* **359**, 613-616
- <sup>47</sup> **RayChaudhuri A., Hait N.C., DasGupta S., Bhaduri T.J., Deb R., Majumder A.L.**, L-myoinositol 1-Phosphate Synthase from Plant Sources (Characteristics of the Chloroplastic and Cytosolic Enzymes), (1997), *Plant Physiol.* **115**, 727-736.
- <sup>48</sup> **Donahue T.F., Henry S.A.**, myo-Inositol-1-phosphate synthase. Characteristics of the enzyme and identification of its structural gene in yeast, (1981), *J Biol Chem.* **256**, 7077-85.
- <sup>49</sup> **Escamilla J.E., Contreras M., Martinez A., Zentella-Pina M.**, L-myoinositol-1-phosphate synthase from *Neurospora crassa*: purification to homogeneity and partial characterization, (1982), *Arch Biochem Biophys.* **218**, 275-85.
- <sup>50</sup> **Fernandez S., Homann M.J., Henry S.A., Carman G.M.**, Metabolism of the phospholipid precursor inositol and its relationship to growth and viability in the natural auxotroph *Schizosaccharomyces pombe*, (1986), *J Bacteriol.* **166**, 779-86.
- <sup>51</sup> **Weishäupl V., Scheiner O., Dworsky P., Hoffmann-Ostenhoff O.**, Biosynthesis of myo-inositol and its incorporation into the phospholipids of *Escherichia coli*, (1976), *Z Allg Mikrobiol.* **16**, 81-3
- <sup>52</sup> **Pittner F., Tovarova I.I., Kornitskaya E.Y., Khokhlov A.S., Hoffmann-Ostenhof O.**, Myo-inositol-1-phosphate synthase from *Streptomyces griseus* (studies on the biosynthesis of cyclitols, XXXVIII), (1979), *Mol. Cell. Biochem.* **25**, 43-46
- <sup>53</sup> **Chen L., Zhou C., Yang H., Roberts M.F.**, Inositol-1-phosphate Synthase from *Archaeoglobus fulgidus* Is a Class II Aldolase, (2000), *Biochemistry* **39**, 12415-12423
- <sup>54</sup> **Bachhawat N., Mande S.C.**, Identification of the *INO1* Gene of *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* Reveals a Novel Class of Inositol-1-phosphate Synthase Enzyme, (1999), *J. Mol. Biol.* **291**, 531-536
- <sup>55</sup> **Klig L.S., Henry S.A.**, Isolation of the yeast *INO1* gene: located on an autonomously replicating plasmid, the gene is fully regulated, (1984), *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3816-20
- <sup>56</sup> **Dean-Johnson M., Henry S.A.**, Biosynthesis of inositol in yeast. Primary structure of myo-inositol-1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4) and functional analysis of its structural gene, the *INO1* locus, (1989), *J Biol Chem.* **264**, 1274-83

- <sup>57</sup> **Klig L.S., Zobel P.A., Devry C.G., Losberger C.**, Comparison of INO1 gene sequences and products in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, (1994), *Yeast* 10, 789-800
- <sup>58</sup> **Klig L.S., Antonsson B., Schmid E., Friedli L.**, Inositol biosynthesis: *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* genes share common regulation, (1991), *Yeast* 7, 325-36
- <sup>59</sup> **Abu-Abied M., Holland D.**, The gene *c-ino1* from *Citrus paradisi* is highly homologous to *tur1* and *ino1* from yeast and *Spirodela* encoding for myo-inositol phosphate synthase, (1994), *Plant Physiol.* 106, 1689
- <sup>60</sup> **Johnson M.D.**, The *Arabidopsis thaliana* myo-inositol 1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4), (1994), *Plant Physiol.* 105, 1023-1024
- <sup>61</sup> **Johnson M.D., Sussex I.M.**, 1 L-myoinositol 1-Phosphate Synthase from *Arabidopsis thaliana*, (1995), *Plant Physiol.* 107, 613-619
- <sup>62</sup> **Smart C.C., Fleming A.J.**, A plant gene with homology to D-myoinositol-3-phosphate synthase is rapidly and spatially up-regulated during an abscisic-acid-induced morphogenic response in *Spirodela polyrrhiza*, (1993), *Plant J.* 4, 279-93
- <sup>63</sup> **Ishitani, M.; Majumder, A.L.; Bornhouser, A.; Michalowski, C.B.; Jensen, R.G.; Bohnert, H.J.**, Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress, (1996), *Plant J.* 9, 537-548
- <sup>64</sup> **Lohia A., Hait N.C., Majumder A.L.**, L-myoinositol 1-phosphate synthase from *Entamoeba histolytica*, (1999), *Mol Biochem Parasitol.* 5, 67-79
- <sup>65</sup> **Chatterjee A., Majee M., Ghosh S., Majumder A.L.**, *sll1722*, an unassigned open reading frame of *Synechocystis* PCC 6803, codes for L-myoinositol 1-phosphate synthase, (2004), *Planta* 218, 989-998.
- <sup>66</sup> **Chen L., Spiliotis E.T., Roberts M.F.**, Biosynthesis of Di-myoinositol-1,1'-phosphate, a novel osmolyte in hyperthermophilic archaea, (1998), *J. Bacteriol.* 180, 3785-92.
- <sup>67</sup> **Ciualla R.A., Burggraf S., Stetter K.O., Roberts M.F.**, Occurrence and role of di-myoinositol-1,1'-phosphate in *Methanococcus igneus*, (1994), *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3660-3664
- <sup>68</sup> **Scholz S., Sonnenbichler J., Schafer W., Hensel R.**, Di-myoinositol-1,1'-phosphate: a new inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*, (1998), *FEBS Lett.* 306, 239-242
- <sup>69</sup> **Martins L.O., Santos H.**, Accumulation of mannosylglycerate and di-myoinositol-phosphate by *Pyrococcus furiosus* in response to salinity and temperature, (1994), *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3299-3303
- <sup>70</sup> **Barnett J.E., Corina D.L.**, The mechanism of glucose 6-phosphate-D-myoinositol 1-phosphate cyclase of rat testis. The involvement of hydrogen atoms, (1968) *Biochem J.* 108, 125-9.
- <sup>71</sup> **Migaud M.E., Frost J.W.**, Inhibition of myo-inositol 1-phosphate synthase by a reaction coordinate, (1995), *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5154-5155
- <sup>72</sup> **Loewus F.A., Kelly S.**, Conversion of glucose to inositol in parsley leaves, (1962), *Bioche. Biophys. Res. Commun.* 7, 204-208
- <sup>73</sup> **Chen I.W., Charalampous C.F.**, Biochemical studies on inositol. IX. D-Inositol 1-phosphate as intermediate in the biosynthesis of inositol from glucose 6-phosphate, and characteristics of two reactions in this biosynthesis, (1966), *J Biol Chem.* 241, 2194-2199
- <sup>74</sup> **Eisenberg F. Jr.**, D-myoinositol 1-phosphate as product of cyclization of glucose 6-phosphate and substrate for a specific phosphatase in rat testis, (1967), *J Biol Chem.* 242, 1375-82.
- <sup>75</sup> **Sherman W.R., Rasheed A., Mauck L.A., Wiecko J.**, Incubations of testis myo-inositol-1-phosphate synthase with D-(5-18O)glucose 6-phosphate and with H218O show no evidence of Schiff base formation, (1977), *J Biol Chem.* 252, 5672-5676
- <sup>76</sup> **Sherman W.R., Stewart M.A., Zinbo M.**, Mass spectrometric study on the mechanism of D-glucose 6-phosphate-L-myoinositol 1-phosphate cyclase, (1969), *J Biol Chem.* 244, 5703-5708
- <sup>77</sup> **Loewus M.W.**, Hydrogen isotope effects in the cyclization of D-glucose 6-phosphate by myo-inositol-1-phosphate synthase, (1977), *J Biol Chem.* 252, 7221-7223
- <sup>78</sup> **Chen C.H., Eisenberg F. Jr.**, Myoinosose-2 1-phosphate: an intermediate in the myoinositol 1-phosphate synthase reaction, (1975), *J Biol Chem.* 250, 2963-2967
- <sup>79</sup> **Kiely D.E., Sherman W.R.**, A chemical model for the cyclization step in the biosynthesis of L-myoinositol 1-phosphate, (1975), *J Am Chem Soc.* 97, 6810-6814
- <sup>80</sup> **Pittner F., Hoffmann-Ostenhof O.**, Studies on the biosynthesis of cyclitols, XXXVII. On mechanism and function of Schiff's base formation as an intermediary reaction step of myo-inositol-1-phosphate synthase from rat testicles, (1978), *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 359, 1395-1400
- <sup>81</sup> **Mogyoros M., Brunner A., Pina E.**, Behavior of cycloaldolase from *Neurospora crassa* towards substrate analogs and aldolase inhibitors, (1972), *Biochim Biophys Acta.* 289, 420-427
- <sup>82</sup> **Reder C.C., Pierzchala J.S. and Hamilton G.A.**, myo-Inositol oxygenase from hog kidney. Catalytic properties, (1981), *J. Biol. Chem.* 256, 8519-8524

- <sup>83</sup> Reder C.C., Swan J.C. and Hamilton G.A., *myo*-Inositol oxygenase from hog kidney. Purification and characterization, (1981), *J. Biol. Chem.* 256, 8510-8518
- <sup>84</sup> Naber N.I., Swan J.S., and Hamilton G.A., *L-my*-inosose-1 as a probable intermediate in the reaction catalysed by *myo*-inositol oxygenase, (1986), *Biochemistry* 25, 7201-7206
- <sup>85</sup> Hanks L.V., Politzer W.M., Touster O., Anderson L., Myo-inositol catabolism in human pentosurics: the predominant role of the glucuronate-xylulose-pentose phosphate pathway, (1969), *Ann N Y Acad Sci.* 165, 564-576
- <sup>86</sup> Greenberg M.L., Lopes J.M., Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, (1996), *Microbiol. Rev.* 60, 1-20
- <sup>87</sup> Nikawa J., Sugiyama M., Hayashi K., Nakashima A., Suppression of the *Saccharomyces cerevisiae* *hac1/ire15* mutation by yeast genes and human cDNAs, (1997), *Gene* 201, 5-10
- <sup>88</sup> Archambault J., Jansma D.B., Friesen J.D., Underproduction of the largest subunit of RNA polymerase II causes temperature sensitivity, slow growth, and inositol auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*, (1996), *Genetics* 142, 737-747
- <sup>89</sup> Kagiwada S., Kearns B.G., McGee T.P., Fang M., Hosaka K., Bankaitis V.A., The yeast BSD2-1 mutation influences both the requirement for phosphatidylinositol transfer protein function and derepression of phospholipid biosynthetic gene expression in yeast, (1996), *Genetics* 143, 685-697
- <sup>90</sup> Knaus R., Pollock R., Guarente L., Yeast SUB1 is a suppressor of TFIIB mutations and has homology to the human co-activator PC4, (1996), *EMBO J.* 15, 1933-1940
- <sup>91</sup> Horiuchi J., Silverman N., Pina B., Marcus G.A., Guarente L., ADA1, a novel component of the ADA/GCN5 complex, has broader effects than GCN5, ADA2, or ADA3, (1997), *Mol. Cell. Biol.* 17, 3220-3228
- <sup>92</sup> Roberts S.M., Winston F., SPT20/ADA5 encodes a novel protein functionally related to the TATA-binding protein and important for transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, (1996), *Mol. Cell. Biol.* 16, 3206-3213
- <sup>93</sup> Sidrauski C., Cox J.S., Walter P., tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response, (1996), *Cell* 87, 405-413
- <sup>94</sup> Henry S.A., Patton-Vogt J.L., Genetic regulation of phospholipid metabolism: yeast as a model eukaryote, (1998), *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 61, 133-179
- <sup>95</sup> Whitters E.A., Cleves A.E., McGee T.P., Skinner H.B., Bankaitis V.A., SAC1p is an integral membrane protein that influences the cellular requirement for phospholipid transfer protein function and inositol in yeast, (1993), *J. Cell. Biol.* 122, 79-94
- <sup>96</sup> Hosaka K., Nikawa J., Kodaki T., Ishizu H., Yamashita S., Cloning and sequence of the SCS3 gene which is required for inositol prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biochem.* 116, 1317-21
- <sup>97</sup> Schüller H.-J., Hahn A., Tröster F., Schütz A., and Schweizer E., Coordinate genetic control of yeast fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* by an upstream activation site common to genes involved in membrane lipid biosynthesis, (1992), *EMBO J.* 11, 107-114
- <sup>98</sup> Hirsch J. P. and Henry S. A., Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* inositol-1-phosphate synthase (*INO1*) gene is regulated by factors that affect phospholipid synthesis, (1986), *Mol. Cell. Biol.* 6, 3320-3328
- <sup>99</sup> Schüller H.-J., Schorr R., Hoffmann B. and Schweizer E., Regulatory gene *INO4* of yeast phospholipid biosynthesis is positively autoregulated and functions as a *trans*-activator of fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* from *Saccharomyces cerevisiae*, (1992), *Nucleic. Acids Res.* 20, 5955-5961
- <sup>100</sup> Hosaka K., Nikawa J.-I., Kosaki T., and Yamashita S., Cloning and characterization of the *SCS1* gene required for the expression of genes in yeast phospholipid synthesis, (1994), *J. Biochem.* 115, 131-136
- <sup>101</sup> Ambroziak J., and Henry S.A., *INO2* and *INO4* gene products, positive regulators of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, form a complex that binds to the *INO1* promoter, (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 15344-15349
- <sup>102</sup> Ashburner B.P., and Lopes J.M., Autoregulated expression of the yeast *INO2* and *INO4* helix-loop-helix activator genes effects cooperative regulation on their target genes, (1995), *Mol. Cell. Biol.* 15, 1709-1715.
- <sup>103</sup> Schwank S., Hoffmann B. and Schüller, H.-J., Influence of gene dosage and autoregulation of the regulatory genes *INO2* and *INO4* on inositol/choline-repressible gene transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, (1997), *Curr. Genet.* 31, 462-468.
- <sup>104</sup> Peterson C.L., and Tamkun J.W., The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine?, (1995), *Trends Biochem. Sci.* 20, 143-146
- <sup>105</sup> Cairns B.R., Chromatin remodelling machines: similar motors, ulterior motives, (1998), *Trends Biochem. Sci.* 23, 20-25
- <sup>106</sup> Kodaki T., Hosaka K., Nikawa J.-I., and Yamashita S., The *SNF2/SWI2/GAM1/ TYE3/RIC1* gene is involved in the coordinate regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, (1995), *J. Biochem.* 117, 362-368.
- <sup>107</sup> Ebbert R., Birkmann A., and Schüller H.-J., The product of the *SNF2/SWI2* paralogue *INO80* of *Saccharomyces cerevisiae* required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular weight protein complex, (1999), *Mol. Microbiol.* 32, 741-751

- <sup>108</sup> Scafe C., Chao D., Lopes J., Hirsch J.P., Henry S., Young R.A., RNA polymerase II C-terminal repeat influences response to transcriptional enhancer signals, (1990), *Nature* 347, 491-494
- <sup>109</sup> Arndt K.M., Ricupero-Hovasse S., Winston F., TBP mutants defective in activated transcription in vivo, (1995), *EMBO J.* 14, 1490-7
- <sup>110</sup> Shirra M.K., Arndt K.M., Evidence for the involvement of the Glc7-Reg1 phosphatase and the Snf1-Snf4 kinase in the regulation of INO1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, (1999), *Genetics* 152, 73-87
- <sup>111</sup> Liu Q., Gabriel S.E., Roinick K.L., Ward R.D., and Arndt K.M., Analysis of TFIIA function in vivo: evidence for a role in TATA-binding protein recruitment and gene-specific activation, (1999), *Mol. Cell. Biol.* 19, 8673-8685
- <sup>112</sup> Greenberg M.L., Goldwasser P., and Henry S.A., Characterization of a yeast regulatory mutant constitutive for synthesis of inositol-1-phosphate synthase, (1982), *Mol. Gen. Genet.* 186, 157-163.
- <sup>113</sup> Bachhawat N., Ouyang Q., and Henry S.A., Functional characterization of an inositol-sensitive upstream activation sequence in yeast, (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 25087-25095
- <sup>114</sup> Schwank S., Ebbert R., Rautenstrauss K., Schweizer E. and Schüller H.-J., Yeast transcriptional activator *INO2* interacts as an Ino2p/Ino4p basic helix-loop-helix heteromeric complex with the inositol/choline-responsive element necessary for expression of phospholipid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, (1995), *Nucleic Acids Res.* 23, 230-237
- <sup>115</sup> Hudak K.A., Lopes J.M., Henry S.A., A pleiotropic phospholipid biosynthetic regulatory mutation in *Saccharomyces cerevisiae* is allelic to *sin3* (*sdi1*, *ume4*, *rpd1*), (1994), *Genetics* 136, 475-83
- <sup>116</sup> Jackson J.C., Lopes J.M., The yeast UME6 gene is required for both negative and positive transcriptional regulation of phospholipid biosynthetic gene expression, (1996), *Nucleic Acids Res.* 24, 1322-9
- <sup>117</sup> Kadosh D., Struhl K., Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo, (1998), *Mol. Cell. Biol.* 18, 5121-5127
- <sup>118</sup> Kasten M.M., Dorland S., Stillman D.J., A large protein complex containing the yeast Sin3p and Rpd3p transcriptional regulators, (1997), *Mol. Cell. Biol.* 17, 4852-4858
- <sup>119</sup> Rundlett S.E., Carmen A.A., Suka N., Turner B.M., Grunstein M., Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3, (1998), *Nature* 392, 831-835
- <sup>120</sup> Ingavale S.S., and Bachhawat A.K., Restoration of inositol phototrophy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, (1999), *Microbiology* 145, 1903-1910
- <sup>121</sup> Ridgway G.J., and Douglas H.C., Unbalanced growth of yeast due to inositol deficiency, (1958), *J. Bacteriol.* 76, 163-166
- <sup>122</sup> Phaff J.H., Macmillan J.D., (1978), Yeasts: description of various genera and species of special interest. In *Handbook of Microbiology*, 2nd edn, vol. II: *Fungi, Algae, Protozoa and Viruses*, pp.229-250. Edited by Laskin A.I., and Lechevalier H.A., Boca Raton, FL: CRC Press
- <sup>123</sup> Dibenedetto G., Acid phosphatase in *Schizosaccharomyces pombe*: I. Regulation and preliminary characterization, (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 286, 363-374
- <sup>124</sup> Wodzinski R.J., and Utah A.H.J., Phytases, (1996), *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302
- <sup>125</sup> Shatkin A.J., Tatum E.L., The relationship of M-inositol to morphology in *Neurospora crassa*, (1961), *Am. J. Bot.* 48, 760-771
- <sup>126</sup> Jackowski S., Voelker D.R., Rock C.O., Inositol metabolism and cell growth in a Chinese hamster ovary cell myo-inositol auxotroph, (1988), *J. Biol. Chem.* 263, 16830-16836.
- <sup>127</sup> Ilg T., Generation of myo-Inositol-auxotrophic *Leishmania mexicana* Mutants by targeted replacement of the myo-Inositol-1-phosphate synthase gene, (2002), *Molecular & Biochemical Parasitology* 120, 151-156
- <sup>128</sup> Movahedzadeh F., Smith D.A. Norman R.A., Dinadayala P., Murray-Rust J., Russell D.G., Kendall S.L., Rison S.C., McAlister M.S., Bancroft G.J., McDonald N.Q., Daffe M., Av-Gay Y., Stoker N.G., The Mycobacterium tuberculosis *ino1* gene is essential for growth and virulence, (2004), *Mol. Microbiol.* 51, 1003-1104.
- <sup>129</sup> Henry S.A., Atkinson K.D., Kolat A.I., Culbertson M.R., Growth and metabolism of inositol-starved *Saccharomyces cerevisiae*, (1977), *J. Bacteriol.* 130, 472-484.
- <sup>130</sup> Henry S.A., Death resulting from fatty acid starvation in yeast, (1973), *J. Bacteriol.* 116, 1293-1303
- <sup>131</sup> Nikawa J., Yamashita S., Yeast mutant defective in synthesis of phosphatidylinositol. Isolation and characterization of a CDPdiacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase Km mutant, (1982), *Eur. J. Biochem.* 125, 445-451.
- <sup>132</sup> Rivas M.P., Kearns B.G., Xie Z., Guo S., Sekar M.C., Hosaka K., Kagiwada S., York J.D., Bankaitis V.A., Pleiotropic alterations in lipid metabolism in yeast *sacl* mutants: relationship to "bypass Sec14p" and inositol auxotrophy, (1999), *Mol. Biol. Cell.* 10, 2235-3350.
- <sup>133</sup> Raper K. B., *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves, *J. Agr. Res.* 50 (1935), 135-147
- <sup>134</sup> Watts D.-J., Ashworth J.M., Growth of Myxoamoebae of the Cellular Slime Mold *Dictyostelium discoideum* in Axenic Culture, (1970), *Biochem. J.* 119, 171-174.

- <sup>135</sup> **Jermyn K.A., Duffy K.T.I., Williams J.G.**, A new anatomy of the prestalk zone in *Dictyostelium*, (1989), *Nature* 340, 144-146
- <sup>136</sup> **Konijin T.M., van de Meene J.G.C., Bonner J.T. & Barkley D.S.**, Teh Acrasin Activity of Adenosin-3',5'-cyclic Phosphate, (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 1152-1154
- <sup>137</sup> **Gerisch G., Malchow D. & Hess B.**, (1974), *Biochemistry of Sensory Functions*, ed. Jaenicke L. (Springer, New York), 279-298
- <sup>138</sup> **Devreotes P.N. & Steck T.L.**, Cyclic-3',5'AMP Relay in *Dictyostelium discoideum*, (1979), *J. Cell Biol.* 80, 300-309
- <sup>139</sup> **Alcantara F. & Monk M.**, Signal propagation during aggregation in the slime mould *Dictyostelium discoideum*, (1974), *J. Gen. Microbiol.* 85, 321-334
- <sup>140</sup> **Devreotes P.N.** (1982) in *Development of Dictyostelium discoideum*, ed. Loomis W.F. (Academic, New York), 117-168
- <sup>141</sup> **Bonner J.T.** (1967), *The Cellular Slime Molds* (Princeton Univ. Press, Princeton), 2nd Ed.
- <sup>142</sup> **Shaffer B.M.** Secretion of cyclic AMP induced by cyclic AMP in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*, (1975), *Nature* 255, 549-552
- <sup>143</sup> **Pálsson E. and Cox E.C.**, Origin and evolution of circular waves and spirals in *Dictyostelium discoideum* territories, (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1151-1155
- <sup>144</sup> **Wittingham W.F., Raper K.B.**, Nonviability of stalk cells in *Dictyostelium discoideum*, (1960), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46, 642-649
- <sup>145</sup> **Baldauf S.L., Doolittle W.F.**, Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa), (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94, 12007-12.
- <sup>146</sup> **Loomis W.F., Smith D.W.**, Consensus phylogeny of *Dictyostelium*, (1995), *Experientia* 51, 1110-1115
- <sup>147</sup> **Kuspa A., Loomis W.F.**, Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA, (1992), *Proc Natl Acad Sci U S A* 15, 8803-8807
- <sup>148</sup> **Nellen W., Lichtenstein C.**, What makes an mRNA anti-sense-itive?, (1993), *Trends Biochem Sci.* 18, 419-423
- <sup>149</sup> **Novotny J., Diegel S., Schirmacher H., Mohrle A., Hildebrandt M., Oberstrass J., and Nellen W.**, *Dictyostelium* double-stranded ribonuclease, (2001), *Methods Enzymol.* 342, 193-212
- <sup>150</sup> **Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., and Mello C.C.**, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, (1998), *Nature* 391, 806-811
- <sup>151</sup> **Elbashir S.M., Lendeckel W., and Tuschl T.**, RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs, (2001), *Genes Dev.* 15, 188-200
- <sup>152</sup> **Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., and Hannon G.J.**, Role for the bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, (2001), *Nature* 409, 363-366
- <sup>153</sup> **Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., and Hannon G.J.**, And RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells, (2000), *Nature* 404, 293-296
- <sup>154</sup> **Martens H., Novotny J., Oberstrass J., Steck T., Postlethwait P., and Nellen W.**, RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded Rnase, (2002), *Mol. Biol. Cell.* 13, 445-453
- <sup>155</sup> **Lipardi C., Wei Q., and Paterson B.M.**, RNAi as Random Degradative PCR. SiRNA Primers Convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new SiRNAs, (2001), *Cell* 107, 297-307
- <sup>156</sup> **Sijen T., Fleenor J., Simmer F., Thijssen K.L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R.H., and Fire A.**, On the Role of RNA Amplification in dsRNA-Triggered Gene Silencing, (2001), *Cell* 107, 465-476
- <sup>157</sup> **Sijen T., Vijn I., Rebocho A., van Blockland R., Roelofs D., Mol J.N., and Kooter J.M.**, Transcriptional and posttranslational gene silencing are mechanistically related, (2001), *Curr. Biol.* 11, 436-440
- <sup>158</sup> **Smardon A., Spoerke J.M., Stacey S.C. Klein M.E., Mackin M., and Maine E.M.**, EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C.albicans*, (2000), *Curr. Biol.* 10, 169-178
- <sup>159</sup> **Martens H., and Nellen W.**, Epigenetisches Gensilencing: RNA Interferenz und Antisense RNA, (2002), *Biospektrum* 4, 351-354
- <sup>160</sup> **Drayer A.I., Van der Kaay J., Mayr G.W., Van Haastert P.J.M.**, Role of phospholipase C in *Dictyostelium*: formation of inositol 1,4,5.trisphosphate and normal development in cells lacking phospholipase C activity, (1994), *EMBO Journal* 13, 1601-1609
- <sup>161</sup> **Thiel U.**, Inositolphosphate, Phosphoinositide und Signaltransduktion in *Dictyostelium discoideum* – Vergleich von Wildtyp und Phagozytose Mutanten. Dissertation im Fachbereich 9-Chemie der Bergischen Universität Wuppertal 1993.
- <sup>162</sup> **Franke J., Kessin R.**, A defined minimal Medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum*, (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2157-2161.
- <sup>163</sup> **Van Dijken P., Bergsma J.C.T., Hiemstra H.S., De Vries B., Van der Kaay J. and Van Haastert P.J.M.**, *Dictyostelium discoideum* contains three inositol monophosphatase activities with different substrate specificities and sensitivities to lithium, (1996), *Biochem J.* 314, 491-495

- <sup>164</sup> **Stephens LR, Kay RR, Irvine RF**, A myo-inositol D-3 hydroxykinase activity in *Dictyostelium*, (1990), *Biochem J.* 272, 201-210
- <sup>165</sup> **Sylvia V., Curtin G., Norman J., Stec J., Busbee D.**, Activation of a low specific activity form of DNA polymerase alpha by inositol-1,4-bisphosphate, (1988), *Cell* 54, 651-658.
- <sup>166</sup> **Knipp M.**, Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Inositolphosphaten in *Dictyostelium discoideum* – Ein myo-Inositolhexakisphosphat hydrolysierendes Enzym und seine Produkte: Isolierung und Charakterisierung, Diplomarbeit im Fachbereich 9 – Chemie der Universität Wuppertal **1996**
- <sup>167</sup> **Fischbach A.**, Isolierung und Charakterisierung von Inositoltrisphosphaten in *D. discoideum*, Diplomarbeit an der Bergischen Universität Wuppertal, **1997**
- <sup>168</sup> **Sirén H.**, Pharmacological Effects of D-myo-Inositol-1,2,6-Trisphosphate. In *Inositolphosphates and Derivatives, Synthesis Biochemistry and Therapeutic Potential*; Reitz A. Ed.; ACS Symposium Series Vol. 463, ACS Washington DC, (1991), 103-110
- <sup>169</sup> **Malmberg A.B., Fallgren B., Hedner T.**, Antinociceptive effect of alpha-trinositol, a novel D-myo-inositol phosphate derivative, in the formalin test in rats, (1995), *Eur. J. Pharmacol.* 294, 609-615.
- <sup>170</sup> **Wahlestedt C., Reis D.J., Yoo H., Adamsson M., Andersson D., Edvinsson L.**, A novel inositol phosphate selectively inhibits vasoconstriction evoked by the sympathetic co-transmitters neuropeptide Y (NPY) and adenosine triphosphate (ATP), (1992), *Neurosci. Lett.* 143, 123-126
- <sup>171</sup> **Lückhoff A., Clapham D.E.**, Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca(2+)-permeable channel, (1992), *Nature* 355, 356-358.
- <sup>172</sup> **Cullen P.J., Dawson A.P., Irvine R.F.**, Purification and characterization of an Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> binding protein from pig platelets: possible identification of a novel non-neuronal Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> receptor, (1995), *Biochem J.* 305, 139-43
- <sup>173</sup> **Vajanaphanich M., Schultz C., Rudolf M.T., Wasserman M., Enyedi P., Craxton A., Shears S.B., Tsien R.Y., Barrett K.E., Traynor-Kaplan A.**, Long-term uncoupling of chloride secretion from intracellular calcium levels by Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>, (1994), *Nature* 371, 711-714.
- <sup>174</sup> **Isaaks R.E., Harkness D.R.**, Erythrocyte organic phosphates and haemoglobine function in birds, reptils and fishes, (1980), *Am. Zool.* 20, 115-129
- <sup>175</sup> **Ubeidat M.**, Inositol Phosphate Metabolism in *Dictyostelium* – Purification and Characterization of a myo-Inositol Pentakisphosphate 3/5-Kinase, Dissertation im Fachbereich 9-Chemie der Universität Wuppertal **1999**
- <sup>176</sup> **Stephens L.R., Irvine R.F.**, Stepwise phosphorylation of myo-Inositol leading to myo-Inositol hexakisphosphate in *Dictyostelium*, (1990), *Nature (London)* 346, 580-583
- <sup>177</sup> **Van der Kaay, Wesseling J. and van Haastert P.J.M.**, Nucleus-associated phosphorylation of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> to InsP<sub>6</sub> in *Dictyostelium*, (1995), *Biochemical Journal* 312, 911-917
- <sup>178</sup> **Larsson O., Barker C.J., Sjöholm A., Carlqvist H., Michell R.H., Bertorello A., Nilsson T., Honkanen R.E., Mayr G.W., Zwiller J., Berggren P.O.**, Inhibition of phosphatases and increased Ca<sup>2+</sup> channel activity by inositol hexakisphosphate, (1997), *Science* 278, 471-474.
- <sup>179</sup> **Smith A.W., Poyner D.R., Hughes H.K., Lambert P.A.**, Siderophore activity of myo-inositol hexakisphosphate in *Pseudomonas aeruginosa*, (1994), *J. Bacteriol.* 176, 3455-3459
- <sup>180</sup> **Hawkins P.T., Poyner D.R., Jackson T.R., Letcher A.J., Lander D.A., Irvine R.F.**, Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate, (1993), *Biochem. J.* 294, 929-934
- <sup>181</sup> **Shamsuddin A.M., Vucenic J., Cole K.E.**, IP<sub>6</sub>: a novel anti-cancer agent, (1997), *Life Sci.* 61, 343-354.
- <sup>182</sup> **Flores S., Smart C.C.**, Abscisic acid-induced changes in inositol metabolism in *Spirodela polyrrhiza*, (2000), *Planta* 211, 823-832.
- <sup>183</sup> **Lemtiri-Chlieh F., MacRobbie E.A., Webb A.A., Manison N.F., Brownlee C., Skepper J.N., Chen J., Prestwich G.D., Brearley C.A.**, Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells, (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100, 10091-10095
- <sup>184</sup> **Gaidarov I., Krupnick J.G., Falck J.R., Benovic J.L., Keen J.H.**, Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding, (1999), *EMBO J.* 18, 871-881.
- <sup>185</sup> **Voglmaier S.M., Keen J.H., Murphy J.E., Ferris C.D., Prestwich G.D., Snyder S.H., Theibert A.B.**, Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2, (1992), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 158-163.
- <sup>186</sup> **Voglmaier S.M., Bembenek M.E., Kaplin A.I., Dorman G., Olszewski J.D., Prestwich G.D., Snyder S.H.**, Purified inositol hexakisphosphate kinase is an ATP synthase: diphosphoinositol pentakisphosphate as a high-energy phosphate donor, (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 4305-4310.
- <sup>187</sup> **Saiardi A., Erdjument-Bromage H., Snowman A.M., Tempst P., Snyder S.H.**, Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases., (1999), *Curr. Biol.* 9, 1323-1326.
- <sup>188</sup> **Saiardi A., Caffrey J.J., Snyder S.H., Shears S.B.**, The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis, (2000), *J. Biol. Chem.* 275, 24686-24692.

- <sup>189</sup> Saiardi A., Caffrey J.J., Snyder S.H., Shears .B., Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* **468**, 28-32..
- <sup>190</sup> Ye W., Ali N., Bembenek M.E., Shears S.B., Lafer E.M., Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3, *J. Biol. Chem.* **270**, 1564-1568.
- <sup>191</sup> Fleischer B., Xie J., Mayrleitner M., Shears S.B., Palmer D.J. Fleischer S., Golgi coatomer binds, and forms K(+)-selective channels gated by, inositol polyphosphates, (1994), *J. Biol. Chem.* **269**, 17826-17832.
- <sup>192</sup> Stephens L.R., Radenberg T., Thiel U., Vogel G., Khoo K.-H., Dell A., Jackson T.R., Hawkins P.T., Mayr G.W., The Detection, Purification, Structural Characterization and Metabolism of Diphosphoinositol Pentakisphosphate(s) and Bisdiphosphoinositol Tetrakisphosphate(s), (1993), *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 4009-4015
- <sup>193</sup> Laussmann T., Eujen R., Weissshuhn C.M., Thiel U., Vogel G., Structures of diphospho-*myo*-Inositol pentakisphosphate and bisdiphospho-*myo*-Inositol tetrakisphosphate from *Dictyostelium* resolved by NMR analysis, (1996), *Biochem.J.* **315**, 715-720
- <sup>194</sup> Laussmann T., Reddy K.M., Falck J.R., Vogel G., Diphospho-*myo*-Inositol phosphates from *Dictyostelium* identified as D-6-diphospho-*myo*-inositol pentakisphosphate and D-5,6-bisdiphospho-*myo*-inositol tetrakisphosphate, (1997), *Biochem.J.* **322**, 31-33
- <sup>195</sup> Laussmann T., Diphosphoinositolphosphate in *Dictyosteliden* – Struktur und Stoffwechsel. Dissertation im Fachbereich 9 – Chemie der Universität Wuppertal, (1999)
- <sup>196</sup> Luo H.R., Huang Y.E., Chen J.C., Saiardi A., Iijima M., Ye K., Huang Y., Nagata E., Devreotes P., Snyder S.H., Inositol pyrophosphates mediate chemotaxis in *Dictyostelium* via pleckstrin homology domain-PtdIns(3,4,5)P3 interactions, (2003), *Cell.* **114**, 559-572.
- <sup>197</sup> Berridge M.J. and Irvine R.F., Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction, (1984), *Nature* **312**, 315-321
- <sup>198</sup> Berridge M.J., Inositol trisphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messenger, (1987), *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 211-237
- <sup>199</sup> Nishizuka Y., The Role of Protein Kinase C in Cell Surface Signal Transduction and Tumour Promotion, (1984), *Nature* **308**, 693-698
- <sup>200</sup> Kikkawa U., Nishizuka Y., The Role of Protein Kinase C in Transmembrane Signalling, (1986), *Annu. Rev. Cell Biol.* **2**, 149-178
- <sup>201</sup> Gilman A.G. G-Proteins: Transducers of receptor generated signals, (1984), *Annu. Rev. Biochem* **56**, 615-649
- <sup>202</sup> Stryer L., Bourne H.R., G-Proteins: A Family of Signal Transducers, (1986), *Annu. Rev. Cell Biol.* **2**, 391-419
- <sup>203</sup> Neer E.J., Clapham D., Role of G.protein subunits in transmembrane signalling, (1988), *Nature* **333**, 129-134
- <sup>204</sup> Majerus Ph.W., Inositol Phosphate Biochemistry, (1992), *Annu.Rev.Biochem.* **61**, 225-250
- <sup>205</sup> Stricker R., Hulser E., Fischer J., Jarchau T., Walter U., Lottspeich F., Reiser G., cDNA cloning of porcine p42IP4, a membrane-associated and cytosolic 42 kDa inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphate receptor from pig brain with similarly high affinity for phosphatidylinositol (3,4,5)P3, (1997), *FEBS Lett.* **405**, 229-236
- <sup>206</sup> Hammonds-Odie L.P., Jackson T.R., Profit A.A., Blader I.J., Turck C.W., Prestwich G.D., Theibert A.B., Identification and cloning of centaurin- $\alpha$ . A novel phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding protein from rat brain, (1996), *J. Biol. Chem.* **271**, 18859-68
- <sup>207</sup> Parent C.A., Devreotes P.N., Molecular Genetics of Signal Transduction in *Dictyostelium*, (1996), *Annu.Rev.Biochem.* **65**, 411-440
- <sup>208</sup> Browning D.D., The T., O'Day D.H., Comparative analysis of chemotaxis in *Dictyostelium* using a radial bioassay method: protein tyrosine kinase activity is required for chemotaxis to folate but not to cAMP, (1995), *Cell Signal.* **7**, 481-489
- <sup>209</sup> Brazill D.T., Lindsey D.F., Bishop J.D., Gomer R.H., Cell density sensing mediated by a G protein-coupled receptor activating phospholipase C, (1998), *J. Biol. Chem.* **273**, 8161-8168
- <sup>210</sup> Europe-Finner G.N., Newell P.C., Cyclic AMP stimulates accumulation of inositol trisphosphate in *Dictyostelium*, (1987), *J. Cell Sci.* **87**, 221-9.
- <sup>211</sup> Cubitt A.B., Dharmawardhane S., Firtel R.A., Developmentally regulated changes in 1,2-diacylglycerol in *Dictyostelium*. Regulation by light and G proteins, (1993), *J. Biol. Chem.* **268**, 17431-9
- <sup>212</sup> Europe-Finner G.N., Newell P.C., Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from a non-mitochondrial pool in amoebae of *Dictyostelium*, (1986), *Biochim. Biophys. Acta* **887**, 335-340
- <sup>213</sup> Europe-Finner G.N., Newell P.C., Inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium stimulate actin polymerization in *Dictyostelium discoideum*, (1986), *J. Cell Sci.* **82**, 41-51
- <sup>214</sup> Drayer A.L., Van Haastert P.J.M., Molecular Cloning and Expression of a Phosphoinositide-specific Phospholipase C of *Dictyostelium discoideum*, (1992), *J. Biol. Chem.* **267**, 18387-18392

- <sup>215</sup> **Van Haastert P.J.M.**, Determination of Inositol 1,4,5-Trisphosphate in *Dictyostelium* by Isotope Dilution Assay, (1989), *Anal. Biochem.* 177, 115-119
- <sup>216</sup> **Ali N., Craxton A., Shears S.B.**, Hepatic Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> 3-phosphatase is compartmentalized inside endoplasmic reticulum, (1993), *J Biol Chem.* 268, 6161-6167.
- <sup>217</sup> **Van Lookeren Campagne M.M., Erneux C., Van Eijk R., Van Haastert P.J.M.**, Two dephosphorylation pathways of inositol 1,4,5-trisphosphate in homogenates of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*, (1988), *Biochem.J.* 254, 343-350
- <sup>218</sup> **Woscholski R., Parker P.J.**, Inositol lipid 5-phosphatases – traffic signals and signal traffic, (1997), *Trends Biochem. Sci.* 22, 427-431
- <sup>219</sup> **Martinoia E., Locher R., Vogt E.**, Inositol Trisphosphate Metabolism in Subcellular Fractions of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Mesophyll Cells, (1993), *Plant Physiol.* 102, 101-105
- <sup>220</sup> **Hosking S.L., Trinci A.P.J., Robson G.D.**, In vitro metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate by *Neurospora crassa*, (1997), *FEMS Microbiol. Lett.* 154, 223-229
- <sup>221</sup> **Loovers H.M., Veenstra K., Snippe H., Pesesse X., Erneux C., van Haastert P.J.**, A diverse family of inositol 5-phosphatases playing a role in growth and development in *Dictyostelium discoideum*, (2003), *J. Biol. Chem.* 278, 5652-5658.
- <sup>222</sup> **Ginsburg G., Kimmel A.R.**, Inositoltrisphosphate and diacylglycerol can differentially modulate gene expression in *Dictyostelium*, (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9332-9336
- <sup>223</sup> **York J.D., Saffitz J.E., Majerus Ph.W.**, Inositol Polyphosphate 1-Phosphatase Is Present in the Nucleus and Inhibits DNA Synthesis, (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 19992-19999
- <sup>224</sup> **Weeks G., Herring F.G.**, The lipid composition and membrane fluidity of *Dictyostelium discoideum* plasma membranes at various stages during differentiation, (1980), *Journal of Lipid Research* 21, 681-686
- <sup>225</sup> **Cockcroft S.**, *Biology of Phosphoinositides*, Chapter 2.2. Published by Oxford University Press
- <sup>226</sup> **Bazenet C.E., Brockman J.L., Lewis D., Chan C., Anderson R.A.**, Erythroid membrane-bound protein kinase binds to a membrane component and is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, (1990), *J. Biol. Chem.* 265, 7369-7376
- <sup>227</sup> **Brockman J.L., Anderson R.A.**, Casein kinase I is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in native membranes, (1991), *J. Biol. Chem.* 266, 2508-2512
- <sup>228</sup> **Chauhan A., Chauhan V.P., Brockerhoff H.**, Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: possible involvement in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport down-regulation and cell proliferation, (1991), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 852-857
- <sup>229</sup> **Chauhan V.P., Singh S.S., Chauhan A., Brockerhoff H.**, Magnesium protects phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-mediated inactivation of casein kinase I in erythrocyte membrane, (1993), *Biochim. Biophys. Acta.* 1177, 318-321
- <sup>230</sup> **Kochs G., Hummel R., Fiebich B., Sarre T.F., Marme D., Hug H.**, Activation of purified human protein kinase C alpha and beta I isoenzymes in vitro by Ca<sup>2+</sup>, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, (1993), *Biochem. J.* 291, 627-633
- <sup>231</sup> **Lee M.H., Bell R.M.**, Mechanism of protein kinase C activation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, (1991), *Biochemistry* 30, 1041-1049
- <sup>232</sup> **Janmey P.A.**, Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly, (1994), *Annu. Rev. Physiol.* 56, 169-191
- <sup>233</sup> **Janmey P.A., and Stossel T.P.**, Gelsolin-polyphosphoinositide interaction, (1989), *J. Biol. Chem.* 264, 4825
- <sup>234</sup> **Janmey P.A., and Stossel T.P.**, Modulation of Gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, (1987), *Nature* 325, 362
- <sup>235</sup> **Lassing L., and Lindberg U.**, Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin, (1985), *Nature* 314, 472
- <sup>236</sup> **Lassing L., and Lindberg U.**, Specificity of the interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the profilin:actin complex, (1988), *J. Cell. Biochem.* 37, 255
- <sup>237</sup> **Fukami K., Furuhashi K., Inagaki M., Endo T., Hatano S., and Takenawa T.**, Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function, (1992), *Nature* 359, 150
- <sup>238</sup> **Gilmore A.P., and Burridge K.**, Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate, (1996), *Nature* 381, 531
- <sup>239</sup> **Weekes J., Barry S.T., Critchley D.R.**, Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites, (1996), *Biochem. J.* 314, 827
- <sup>240</sup> **Huttelmaier S., Mayboroda O., Harbeck B., Jarchau T., Jockusch B.M., and Rudiger M.**, The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, (1988), *Curr. Biol.* 8, 479



- <sup>241</sup> Hirao M., Sato N., Kondo T., Yonemura S., Monden M., Sasaki T., Takai Y., and Tsukita S., Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/ plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway, (1996), *J. Cell. Biol.* 135, 37
- <sup>242</sup> Miki H., Miura K., and Takenawa T., N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases, (1996), *EMBO J.* 15, 5326
- <sup>243</sup> Symons M., Derry J.M., Karlak B., Jiang S., Lemahieu V., McCormick F., Francke U., Abo A., Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase Cdc42Hs, is implicated in actin polymerization, (1996), *Cell* 84, 723-734
- <sup>244</sup> Hartwig J.H., Bokoch G.M., Carpenter C.L., Janmey P.A., Taylor L.A., Toker A., and Stossel T.P., Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets, (1995), *Cell* 82, 643
- <sup>245</sup> Pike M.C., Costello K., and Southwick F.S., Stimulation of human polymorphonuclear leukocyte phosphatidylinositol-4-phosphate kinase by concanavalin A and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine is calcium-independent. Correlation with maintenance of actin assembly, (1991), *J. Immunol.* 147, 2270
- <sup>246</sup> Apgar J.R., Activation of protein kinase C in rat basophilic leukemia cells stimulates increased production of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate correlation with actin polymerization, (1995), *Mol. Biol. Cell* 6, 97
- <sup>247</sup> Ishihara H., Shibasaki Y., Kizuki N., Wada T., Yazaki Y., Asano T., and Oka Y., Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/ substitution analysis of members of this novel lipid kinase family, (1998), *J. Biol. Chem.* 273, 8741
- <sup>248</sup> Shibasaki Y., Ishihara H., Kizuki N., Asano T., Oka Y., and Yazaki Y., Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in vivo, (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 7578
- <sup>249</sup> Sakisaka, T., Itoh T., Miura K., and Takenawa T., Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangements of actin filaments, (1997), *Mol. Cell. Biol.* 17, 3841
- <sup>250</sup> Hartwig J.H., Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation, (1992), *J. Cell. Biol.* 118, 1421
- <sup>251</sup> De Camilli P., Emr S.D., McPherson P.S., and Novick P., Phosphoinositides as regulators in membrane traffic, (1996), *Science* 271, 1533-1539
- <sup>252</sup> Martin T.F., Phosphoinositides as spatial regulators of membrane traffic, (1997), *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 331
- <sup>253</sup> Hay J.C., Fiset P.L., Jenkins G.H., Fukami K., Takenawa T., Anderson R.A., and Martin T.F.J., ATP-dependent inositide phosphorylation requires for  $Ca^{2+}$ -activated secretion, (1995), *Nature* 374, 173
- <sup>254</sup> Jost M., Simpson F., Kavran J.M., Lemmon M.A., and Schmid S.L., Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation, (1998), *Curr. Biol.* 8, 1399-1402
- <sup>255</sup> Randazzo P.A., Functional interaction of ADP-ribosylation factor 1 with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 7688
- <sup>256</sup> Chardin P., Paris S., Antonny B., Robineau S., Beraud-Dufour S., Jackson C.L., and Chabre M., A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains, (1996), *Nature* 384, 481-484
- <sup>257</sup> Cukierman E., Huber I., Rotman M., and Cassel D., The ARF1 GTPase-activating protein: Zinc finger motif and Golgi complex localization, (1995), *Science* 270, 1999
- <sup>258</sup> Liscovitch M., Chalifa V., Pertile P., Chen C.-S., and Cantley L.C., Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D, (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 10758
- <sup>259</sup> Barylko B., Binns D., Lin K.M., Atkinson M.A., Jameson D.M., Yin H.L., and Albanesi J., Synergistic activation of dynamin GTPase by Grb2 and phosphoinositides, (1998), *J. Biol. Chem.* 273, 3791
- <sup>260</sup> Beck K.A., Keen J.H., Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2, (1991), *J. Biol. Chem.* 266, 4442-4447
- <sup>261</sup> Harlan J.E., Hajduk P.J., Yoon H.S., Fesik S.W., Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, (1994), *Nature* 371, 168-170
- <sup>262</sup> Kubiseski T.J., Chook Y.M., Parris W.E., Rozakis-Adcock M., Pawson T., High affinity binding of the pleckstrin homology domain of mSos1 to phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate, (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 1799-804
- <sup>263</sup> Zheng J., Cahill S.M., Lemmon M.A., Fushman D., Schlessinger J., Cowburn D., Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity, (1996), *J. Mol. Biol.* 255, 14-21
- <sup>264</sup> Cifuentes M.E., Delaney T., Rebecchi M.J., D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate inhibits binding of phospholipase C-delta 1 to bilayer membranes, (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 1945-8

- <sup>265</sup> **Lemmon M.A., Ferguson K.M., O'Brien R., Sigler P.B., Schlessinger J.**, Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain, (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 10472-10476
- <sup>266</sup> **Traynor-Kaplan A.E., Harris A.L., Thompson B.L., Taylor P., Sklar L.A.**, An inositol tetrakisphosphate-containing phospholipid in activated neutrophils, (1988), *Nature* 334, 353-356
- <sup>267</sup> **Whitman M., Downes C.P., Keeler M., Keller T., Cantley L.**, Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate, (1988), *Nature* 332, 644-6
- <sup>268</sup> **Vanhaesebroeck B., Leever S.J., Panayotou G., Waterfield M.D.**, Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers, (1997), *Trends. Biochem. Sci.* 22, 267-72
- <sup>269</sup> **Stephens L.R., Eguinoa A., Erdjument-Bromage H., Lui M., Cooke F., Coadwell J., Smrcka A.S., Thelen M., Cadwallader K., Tempst P., Hawkins P.T.**, The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101, (1997), *Cell* 89, 105-14
- <sup>270</sup> **Wymann M.P., Pirola L.**, Structure and function of phosphoinositide 3-kinases, (1998), *Biochim Biophys Acta.* 1436, 127-150.
- <sup>271</sup> **Vanhaesebroeck B., Leever S.J., Ahmadi K., Timms J. Katso R., Driscoll P.C., Woscholski R., Parker P.J., Waterfield M.D.**, Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids, (2001), *Annu Rev Biochem.* 70, 535-602.
- <sup>272</sup> **Hirsch E., Katanaev V.L., Garlanda C., Azzolino O., Pirola L., Silengo L., Sozzani S., Mantovani A., Altruda F., Wymann M.P.**, Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation, (2000), *Science* 287, 1049-1053.
- <sup>273</sup> **Patrucco E., Notte A., Barberis L., Selvetella G., Maffei A., Brancaccio M., Marengo S., Russo G., Azzolino O., Rybalkin S.D., Silengo L., Altruda F., Wetzker R., Wymann M.P., Lembo G., Hirsch E.**, PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects, (2004), *Cell* 118, 375-387.
- <sup>274</sup> **Wetzker R., Rommel C.**, Phosphoinositide 3-kinases as targets for therapeutic intervention, (2004), *Curr Pharm Design* 10, 1915-1922.
- <sup>275</sup> **Turner S.J., Domin J., Waterfield M.D., Ward S.G., Westwick J.**, The CC chemokine monocyte chemoattractant peptide-1 activates both the class I p85/p110 phosphatidylinositol 3-kinase and the class II PI3K-C2alpha, (1998), *J. Biol. Chem.* 273, 25987-25995
- <sup>276</sup> **Brown R.A., Domin J., Arcaro A., Waterfield M.D., and Sheperd P.R.**, Insulin activates the alpha isoform of class II phosphoinositide 3-kinase, (1999), *J. Biol. Chem.* 274, 14529-14532
- <sup>277</sup> **Arcaro A., Zvebil M.J., Wallasch C., Ullrich A., Waterfield M.D., Domin J.** Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors, (2000), *Mol. Cell. Biol.* 20, 3817-30
- <sup>278</sup> **Stack J.H., Herman P.K., Schu P.V., Emr S.D.**, A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole, (1993), *EMBO J.* 12, 2195-204
- <sup>279</sup> **Herman P.K., Emr S.D.**, Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 10, 6742-6754
- <sup>280</sup> **Loijens J.C., Boronenkov I.V., Parker G.J., Anderson R.A.**, The phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase family, (1996), *Adv. Enzyme Regul.* 36, 115-140
- <sup>281</sup> **Desrivieres S., Cooke F.T., Parker P.J., Hall M.N.**, MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*, (1998), *J. Biol. Chem.* 273, 15787-15793
- <sup>282</sup> **Homma K., Terui S., Minemura M., Qadota H., Anraku Y., Kanaho Y., Ohya Y.**, Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis, (1998), *J. Biol. Chem.* 273, 15779-86
- <sup>283</sup> **Dove S.K., Cooke F.T., Douglas M.R., Sayers L.G., Parker P.J., Michell R.H.**, Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis, (1997), *Nature* 390, 187-192
- <sup>284</sup> **Pike L.J.**, Phosphatidylinositol 4-kinases and the role of polyphosphoinositides in cellular regulation, (1992), *Endocr. Rev.* 13, 692-706
- <sup>285</sup> **Flanagan C.A., Schnieders E.A., Emerick A.W., Kunisawa R., Admon A., Thorner J.**, Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability, (1993), *Science* 262, 1444-1448
- <sup>286</sup> **Garcia-Bustos J.F., Marini F., Stevenson I., Frei C., Hall M.N.**, PIK1, an essential phosphatidylinositol 4-kinase associated with the yeast nucleus, (1994), *EMBO J.* 13, 2352-2361
- <sup>287</sup> **Rameh L.E., Toliás K.F., Duckworth B.C., Cantley L.C.**, A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, (1997), *Nature* 390, 192-196
- <sup>288</sup> **Shisheva A., Sbrissa D., Ikononov O.**, Cloning, characterization, and expression of a novel Zn<sup>2+</sup>-binding FYVE finger-containing phosphoinositide kinase in insulin-sensitive cells, (1999), *Mol. Cell. Biol.* 19, 623-634

- <sup>289</sup> Divecha N, Irvine R.F., Phospholipid signaling, (1995), Cell 80, 269-78.
- <sup>290</sup> Shepherd P.R., Reaves B.J., Davidson H.W., Phosphoinositide 3-kinases and membrane traffic, (1996), Trends Cell. Biol. 6, 92-97
- <sup>291</sup> Toker A., Meyer M., Reddy K.K. Falck J.R., Aneja R., Aneja S., Parra A., Burns D.J., Ballas L.M., Cantley L.C., Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3, (1994), J. Biol. Chem. 269, 32358-67
- <sup>292</sup> Rameh L.E., Chen C.S., Cantley L.C., Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins, (1995), Cell 83, 821-30.
- <sup>293</sup> Coffey P.J., Jin J., and Woodgett J.R., Protein kinase B (c-AKT): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation, (1998), Biochem. J. 335, 1-13
- <sup>294</sup> Meili R., Ellsworth C., Lee S., Reddy T.B., Ma H., Firtel R.A., Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in Dictyostelium, (1999), EMBO J. 18, 2092-2105
- <sup>295</sup> Parent C.A., Blacklock B.J., Froehlich W.M., Murphy D.B., Devreotes P.N., G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells, (1998), Cell 95, 81-91
- <sup>296</sup> Zhou K., Pandol S., Bokoch G., Traynor-Kaplan A.E., Disruption of Dictyostelium PI3K genes reduces [32P]phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate and [32P]phosphatidylinositol trisphosphate levels, alters F-actin distribution and impairs pinocytosis, (1998), J. Cell. Sci. 111, 283-294
- <sup>297</sup> Zhou K., Takegawa K., Emr S.D., Firtel R.A., A phosphatidylinositol (PI) kinase gene family in Dictyostelium discoideum: biological roles of putative mammalian p110 and yeast Vps34p PI 3-kinase homologs during growth and development, (1995), Mol. Cell. Biol. 15, 5645-5656
- <sup>298</sup> Buczynski G., Grove B., Nomura A., Kleve M., Bush J., Firtel R.A., and Cardelli J., Inactivation of Two Dictyostelium discoideum Genes, DdPIK1 and DdPIK2, Encoding Proteins Related to Mammalian Phosphatidylinositide 3-kinases, Results in Defects in Endocytosis, Lysosome to Postlysosome Transport and Actin Cytoskeleton Organization, (1997), The Journal of Cell Biology 136, 1271-1286
- <sup>299</sup> Hanahan D., Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids, (1983), J. Mol. Biol. 166, 557-580.
- <sup>300</sup> Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W., Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, (1990), Methods Enzymol. 185, 60-89.
- <sup>301</sup> Faix J., Gerisch G., Noegel A.A., Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in Dictyostelium, (1992), J Cell Sci. 102, 203-214.
- <sup>302</sup> Adachi H., Hasebe T., Yoshinaga K., Ohta T., Sutoh K., Isolation of Dictyostelium discoideum cytokinesis mutants by restriction enzyme-mediated integration of the blasticidin S resistance marker, (1994), Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 1808-1814.
- <sup>303</sup> Vieira J., Messing J., The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers, (1982), Gene 19, 259-268.
- <sup>304</sup> Miller J.H., Experiments in molecular genetics, (1972), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 433
- <sup>305</sup> Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T., (1989), Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y:
- <sup>306</sup> Birnboim C., Doly J., Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, (1979), Nucl.Acids.Res. 7, 1513-1523
- <sup>307</sup> Noegel A., Welker D.L., Metz B.A., Williams K.L., Presence of nuclear associated plasmids in the lower eukaryote Dictyostelium discoideum, (1985), J Mol Biol. 185, 447-450.
- <sup>308</sup> Inoue, (1990), Gene 96, 23-28
- <sup>309</sup> Raper K.B., The Dictyostelids, (1984), Princeton University Press, Princeton.
- <sup>310</sup> Sussman M., Cultivation and Synchronous Morphogenesis of Dictyostelium under Controlled Experimental Conditions in: Methods in Cell Biology (Spudich J., editor) 28, 9-29, (1987)
- <sup>311</sup> Methods in Cell Biology, Dictyostelium discoideum: Molecular Approaches To Cell Biology, Edited by James A. Spudich, (1987), Volume 28, 33
- <sup>312</sup> Sussman M., Lovgren N., Preferential release of the enzyme UDP-galactose polysaccharide transferase during cellular differentiation in the slime mold Dictyostelium discoideum, (1965), Exp. Cell Res. 38, 97-105.
- <sup>313</sup> Vogel G, Thilo L, Schwarz H, Steinhart R., Mechanism of Phagocytosis in Dictyostelium discoideum: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties, (1980), J Cell Biol. 86, 456-465
- <sup>314</sup> Segall J.E., Bominaar A.A., Wallraff E., De Wit R.J., Analysis of a Dictyostelium chemotaxis mutant with altered chemoattractant binding, (1988), J Cell Sci. 91, 479-489.
- <sup>315</sup> Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall, Protein measurement with the Folin-Phenol reagents, (1951), J. Biol. Chem. 193, 265-275

- <sup>316</sup> **Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Garther, F.K., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C.**, Measurement of protein using bicinchoninic acid, (1985), *Anal. Biochem.* 150, 76-85
- <sup>317</sup> **Wiechelmann K.J., Braun R.D., Fitzpatrick J.D.**, Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation, (1988), *Anal Biochem.* 175, 231-7
- <sup>318</sup> **Laemmli U.K.**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, (1970), *Nature* 227, 680-685.
- <sup>319</sup> **Lanzetta P.A., Alvarez L.J., Reinbach P.S. and Candia O.A.**, An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate, (1979), *Anal. Biochem.* 100, 95-97
- <sup>320</sup> **Mayr G.W.**, A novel metal-dye detection system permits picomolar-range h.p.l.c. analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cells or tissue specimens, (1988), *Biochem. J.* 254, 585-591
- <sup>321</sup> **Mayr G.W.**, Mass Determination of Inositol Phosphates by High-Performance-Liquid-Chromatography with Postcolumn Complexometry (Metal-Dye-Detektion), (1990), *Methods in Inositide Research* (Irvine R.F. ed.), Raven Press, N.Y., 83-108
- <sup>322</sup> **Barnett J.E.G., Brice R.E., Corina D.L.**, A Colorimetric Determination of Inositol Monophosphates as an Assay for D-Glucose 6-Phosphate-1L-myoinositol 1-Phosphate Cyclase, (1970), *Biochem.J.* 119, 183-186
- <sup>323</sup> **Maslanski J.A., Busa W.B.**, A sensitive and specific mass assay for *myo*-Inositol and inositolphosphates, (1990), *Methods in Inositide Research* (Irvine R.F. ed.), Raven Press, N.Y., 83-108
- <sup>324</sup> **Das O.P., Henderson E.J.**, A novel technique for gentle lysis of eucaryotic cell. Isolation of plasma membrane from *Dictyostelium discoideum*, (1983), *Biochimica Biophysica Acta* 736, 45-56
- <sup>325</sup> **Feth F., Wagner R., Baydoun H., Wray V., Wagner K.G.**, Medium scale production of L-myoinositol 1-phosphate, (1990), *Biotechnol Appl Biochem.* 12, 364-369.
- <sup>326</sup> **Baker G.R., Billington D.C., Gani D.**, Synthesis of d- and l-*myo*-inositol 1-phosphorothioate, substrates for inositol monophosphatase, (1991), *Tetrahedron* 47, 3895-3908.
- <sup>327</sup> **Wong Y.-H., Sherman W.R.**, Anomeric and other substrate specificity studies with *myo*-inositol-1-P synthase, (1985), *J.Biol.Chem.* 260, 11083-11090
- <sup>328</sup> **Dixon M., Webb E.C.**, Inhibition by high substrate concentrations, *Enzymes*, Third edition, Longman Group, London, (1979), 126-137.
- <sup>329</sup> **Jin X., Foley K.M., Geiger JH.**, The structure of the 1L-*myo*-inositol-1-phosphate synthase-NAD<sup>+</sup>-2-deoxy-D-glucitol 6-(E)-vinylhomophosphonate complex demands a revision of the enzyme mechanism, (2004), *J. Biol. Chem.* 279, 13889-13895.
- <sup>330</sup> **Migaud M.E. Frost J.W.**, Elaboration of a General Strategy for Inhibition of *myo*-Inositol 1-Phosphate Synthase: Active Site Interactions of Analogues Possessing Oxidized Reaction Centers, (1996), *J. Am. Chem. Soc.* 118, 495 -501
- <sup>331</sup> **Morio T., Urushihara H., Saito T., Ugawa Y., Mizuno H., Yoshida M., Yoshino R., Mitra B.N., Pi M., Sato T., Takemoto K., Yasukawa H., Williams J., Maeda M., Takeuchi I., Ochiai H., Tanaka Y.**, The *Dictyostelium* developmental cDNA project: generation and analysis of expressed sequence tags from the first-finger stage of development, (1998), *DNA Res.* 5, 335-340.
- <sup>332</sup> **Caterina M.J., Milne J.L., Devreotes P.N.**, Mutation of the third intracellular loop of the cAMP receptor, cAR1, of *Dictyostelium* yields mutants impaired in multiple signaling pathways, (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 1523-1532.
- <sup>333</sup> **Hadwiger J.A., Firtel R.A.**, Analysis of G alpha 4, a G-protein subunit required for multicellular development in *Dictyostelium*, (1992), *Genes Dev.* 6, 38-49.
- <sup>334</sup> **Culbertson M.R., Henry S.A.**, Inositol-requiring mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, (1975), *Genetics* 80, 23-40.
- <sup>335</sup> **Strauss B.S.**, Cell death and unbalanced growth in *Neurospora*, (1958), *J. Gen. Microbiol.* 18, 658-669.
- <sup>336</sup> **Thomas P.L.**, Increased frequency of auxotrophic mutants of *Ustilago hordei* after combined UV irradiation and inositol starvation, (1972), *Can. J. Genet. Cytol.* 14, 785-788
- <sup>337</sup> **Chun J.A., Jin U.H., Lee J.W., Yi Y.B., Hyung N.I., Kang M.H., Pyee J.H., Suh M.C., Kang C.W., Seo H.Y., Lee S.W., Chung C.H.**, Isolation and characterization of a *myo*-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination, (2003), *Planta* 216, 874-880
- <sup>338</sup> **Tian F., Migaud M.E., Frost J.W.**, *myo*-Inositol 1-Phosphate Synthase: Does a Single Active-Site Amino Acid Catalyze Multiple Proton Transfers?, (1999), *J.Am.Chem.Soc.* 121, 5795 - 5796;
- <sup>339</sup> **Kuspa A., Sugang R., Shaulsky G.**, The promise of a protist: the *Dictyostelium* genome project, (2001), *Funct. Integr. Genomics.* 1, 279-293.
- <sup>340</sup> **Kobayashi K., Kamakura T., Tanaka T., Yamaguchi I., Endo T.**, Nucleotide sequence of the *bsr* gene and N-terminal amino acid sequence of blasticidin S deaminase from blasticidin S resistant *Escherichia coli* TK121, (1991), *Agric. Biol. Chem.* 55, 3155-3157

- <sup>341</sup> **Sutoh K.**, A transformation vector for dictyostelium discoideum with a new selectable marker bsr, (1993), *Plasmid* 30, 150-154
- <sup>342</sup> **Crowley T.E., Nellen W., Gomer R.H., Firtel R.A.**, Phenocopy of discoidin I-minus mutants by antisense transformation in Dictyostelium, (1985), *Cell* 43, 633-641.
- <sup>343</sup> **Liu T., Williams J.G., Clarke M.**, Inducible expression of calmodulin antisense RNA in Dictyostelium cells inhibits the completion of cytokinesis, (1992), *Mol. Biol. Cell* 3, 1403-1413.
- <sup>344</sup> **Rivero F., Furukawa R., Fechheimer M., Noegel A.A.**, Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein, alpha-actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of Dictyostelium, (1999), *J. Cell Sci.* 112, 2737-51.
- <sup>345</sup> **Niewohner J., Weber I., Maniak M., Muller-Taubenberger A., Gerisch G.**, Talin-null cells of Dictyostelium are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis, (1997), *J. Cell Biol.* 138, 349-361.
- <sup>346</sup> **Zischka H., Oehme F., Pintsch T., Ott A., Keller H., Kellermann J., Schuster S.C.**, Rearrangement of cortex proteins constitutes an osmoprotective mechanism in Dictyostelium, (1999), *EMBO J.* 18, 4241-4249.
- <sup>347</sup> **Kuwayama H., Ecke M., Gerisch G., Van Haastert P.J.**, Protection against osmotic stress by cGMP-mediated myosin phosphorylation, (1996), *Science* 271, 207-209.
- <sup>348</sup> **Rivero F., Koppel B., Peracino B., Bozzaro S., Siegert F., Weijer C.J., Schleicher M., Albrecht R., Noegel A.A.**, The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development, (1996), *J. Cell Sci.* 109, 2679-2691.
- <sup>349</sup> **Insall R.H.**, Cyclic GMP and the big squeeze. Osmoregulation, (1996), *Curr. Biol.* 6, 516-518
- <sup>350</sup> **Oyama M., Kubota K.**, H<sup>+</sup> secretion induced by hypertonic stress in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum, (1997), *J. Biochem.* 122, 64-70.
- <sup>351</sup> **Carman G.M., Henry S.A.**, Phospholipid biosynthesis in yeast, (1989), *Annu Rev Biochem.* 58, 635-669.
- <sup>352</sup> **Santiago T.C., Mamoun C.B.**, Genome expression analysis in yeast reveals novel transcriptional regulation by inositol and choline and new regulatory functions for Opi1p, Ino2p, and Ino4p, (2003), *J. Biol. Chem.* 278, 38723-38730
- <sup>353</sup> **Podeschwa M.**, Synthese von Naturstoffen auf Inositolbasis ausgehend von *para*-Benzochinon, Dissertation an der Universität Wuppertal, (2003)
- <sup>354</sup> **Hacker U., Albrecht R., Maniak M.**, Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium, (1997), *J Cell Sci.* 110, 105-112.
- <sup>355</sup> **Williams R.S., Cheng L., Mudge A.W., Harwood A.J.**, A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs, (2002), *Nature* 417, 292-295.
- <sup>356</sup> **Drayer A.L., Van Haastert P.J.M.**, Molecular Cloning and Expression of a Phosphoinositide-specific Phospholipase C of *Dictyostelium discoideum*, (1992), *J. Biol. Chem.* 267, 18387-18392
- <sup>357</sup> **Shears S.B.**, Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate, (2001), *Cell Signal.* 13, 151-158.
- <sup>358</sup> **Hawkins P.T., Poyner D.R., Jackson T.R., Letcher A.J., Lander D.A., Irvine R.F.**, Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate, (1993), *Biochem J.* 294, 929-934.
- <sup>359</sup> **Fukuda M., Mikoshiba K.**, The function of inositol high polyphosphate binding proteins, (1997), *Bioessays* 19, 593-603.
- <sup>360</sup> **York J.D., Odom A.R., Murphy R., Ives E.B., Wente S.R.**, A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. (1999), *Science* 285, 96-100
- <sup>361</sup> **Dubois E., Scherens B., Vierendeels F., Ho M.M., Messenguy F., Shears S.B.**, In *Saccharomyces cerevisiae*, the inositol polyphosphate kinase activity of Kcs1p is required for resistance to salt stress, cell wall integrity, and vacuolar morphogenesis, (2002), *J Biol Chem.* 277, 23755-23763.
- <sup>362</sup> **Nasuhoglu C., Feng S., Mao J., Yamamoto M., Yin H.L., Earnest S., Barylko B., Albanesi J.P., Hilgemann D.W.**, Nonradioactive analysis of phosphatidylinositides and other anionic phospholipids by anion-exchange high-performance liquid chromatography with suppressed conductivity detection, (2002), *Anal. Biochem.* 301, 243-254.
- <sup>363</sup> **Cullen P.J., Cozier G.E., Banting G., Mellor H.**, Modular phosphoinositide-binding domains-their role in signalling and membrane trafficking, (2001), *Curr. Biol.* 11, 882-93.
- <sup>364</sup> **Bominaar A.A., van der Kaay J., van Haastert P.J.**, Dynamics and function of the inositol cycle in Dictyostelium discoideum, (1991), *Dev Genet.* 12, 19-24.
- <sup>365</sup> **Adelt S.**, Untersuchungen zum Stoffwechsel von *myo*-Inositolphosphaten in *Dictyostelium discoideum*, Dissertation an der Universität Wuppertal, (1999)
- <sup>366</sup> **Streb H., Heslop J.P., Irvine R.F., Schulz I., Berridge M.J.**, Relationship between secretagogue-induced Ca<sup>2+</sup> release and inositol polyphosphate production in permeabilized pancreatic acinar cells, (1985), *J. Biol. Chem.* 260, 7309-15

- <sup>367</sup> **Rana R.S., Sekar M.C., Hokin L.E., MacDonald M.J.**, A possible role for glucose metabolites in the regulation of inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphomonoesterase activity in pancreatic islets, (1996), *J. Biol. Chem.* 261, 5237-40
- <sup>368</sup> **He Q., Greenberg M.L.**, Post-translational regulation of phosphatidylglycerolphosphate synthase in response to inositol, (2004), *Mol Microbiol.* 53, 1243-1249.
- <sup>369</sup> **Daum V.**, Untersuchung von Zellerkennung und Zelladhäsion am Beispiel des glukose-spezifischen Rezeptors in *Dictyostelium discoideum*, Dissertation an der Universität Wuppertal, (1987)
- <sup>370</sup> **Vogel G.**, Endocytosis and Recognition Mechanisms in *Dictyostelium discoideum*, (1987), *Methods in Cell Biology* 28, 129-137.
- <sup>371</sup> **Cornillon S., Pech E., Benghezal M., Ravel K., Gaynor E., Letourneur F., Bruckert F., Cosson P.** Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis, (2000), *J Biol Chem.* 275, 34287-34292.
- <sup>372</sup> **Allen P.G., Dawidowicz E.A.**, Phagocytosis in *Acanthamoeba*: II. Soluble and insoluble mannose-rich ligands stimulate phosphoinositide metabolism, (1990), *J. Cell Physiol.* 145, 514-521
- <sup>373</sup> **Beug H., Katz F.E., Stein A., Gerisch G.**, Quantitation of membrane sites in aggregating *Dictyostelium* cells by use of tritiated univalent antibody. Quantitation of membrane sites in aggregating *Dictyostelium* cells by use of tritiated univalent antibody, (1973), *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70, 3150-3154.
- <sup>374</sup> **Yang C., Brar S.K., Desbarats L., Siu C.H.**, Synthesis of the Ca(2+)-dependent cell adhesion molecule DdCAD-1 is regulated by multiple factors during *Dictyostelium* development, (1997), *Differentiation* 61, 275-284.
- <sup>375</sup> **Sesaki H., Wong E.F., Siu C.H.**, The cell adhesion molecule DdCAD-1 in *Dictyostelium* is targeted to the cell surface by a nonclassical transport pathway involving contractile vacuoles, (1997), *J Cell Biol.* 138, 939-951.
- <sup>376</sup> **Brar S.K., Siu C.H.**, Characterization of the cell adhesion molecule gp24 in *Dictyostelium discoideum*. Mediation of cell-cell adhesion via a Ca(2+)-dependent mechanism, (1993), *J. Biol. Chem.* 268, 24902-249029.
- <sup>377</sup> **Knecht D.A., Fuller D.L., Loomis W.F.**, Surface glycoprotein, gp24, involved in early adhesion of *Dictyostelium discoideum*, (1987), *Dev Biol.* 121, 277-283.
- <sup>378</sup> **Wong E.F., Brar S.K., Sesaki H., Yang C., Siu C.H.**, Molecular cloning and characterization of DdCAD-1, a Ca<sup>2+</sup>-dependent cell-cell adhesion molecule, in *Dictyostelium discoideum*, (1996), *J Biol Chem.* 271, 16399-16408.
- <sup>379</sup> **Joiner K.A., Fuhrman S.A., Miettinen H.M., Kasper L.H., Mellman I.**, *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts, (1990), *Science* 249, 641-646.
- <sup>380</sup> **Sharon N.**, Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view, (1993), *Trends Biochem. Sci.* 18, 221-226.
- <sup>381</sup> **Sharon N.**, Kohlenhydrate und Zellerkennung, (1993), *Spektrum der Wissenschaft* 3, 66-74
- <sup>382</sup> **Peracino B., Borleis J., Jin T., Westphal M., Schwartz J.M., Wu L., Bracco E., Gerisch G., Devreotes P., Bozzaro S.**, Protein beta subunit-null mutants are impaired in phagocytosis and chemotaxis due to inappropriate regulation of the actin cytoskeleton, (1998), *J. Cell Biol.* 141, 1529-1537.
- <sup>383</sup> **Caron E., Hall A.**, Phagocytosis, (2001), In *Endocytosis*, M. Marsh, ed. (Oxford, New York), 58-78.
- <sup>384</sup> **Griffin F.M. Jr, Griffin J.A., Leider J.E., Silverstein S.C.**, Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane, (1975), *J Exp Med.* 142, 1263-1282.
- <sup>385</sup> **Griffin F.M. Jr, Silverstein S.C.**, Segmental response of the macrophage plasma membrane to a phagocytic stimulus, (1974), *J Exp Med.* 139, 323-36.
- <sup>386</sup> **Maniak M., Rauchenberger R., Albrecht R., Murphy J., Gerisch G.**, Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag, (1995), *Cell* 83, 915-924.
- <sup>387</sup> **Cardelli J.**, Phagocytosis and Macropinocytosis in *Dictyostelium*: Phosphoinositide-Based Processes, Biochemically Distinct, (2001), *Traffic* 2, 311-320
- <sup>388</sup> **Botelho R.J., Teruel M., Dierckman R., Anderson R., Wells A., York J.D., Meyer T., Grinstein S.**, Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis, (2000), *J. Cell. Biol.* 151, 1353-1368
- <sup>389</sup> **Seastone D.J., Zhang L., Buczynski G., Rebstein P., Weeks G., Spiegelman G., Cardelli J.**, The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*, (1999), *Mol. Biol. Cell* 10, 393-406.
- <sup>390</sup> **Simon S.**, ed. *Phagocytosis. The host*. Stamford, CT: Jai Press, (2000)
- <sup>391</sup> **Swanson J.A., Watts C.**, Macropinocytosis, (1995), *Trends Cell Biol.* 5, 424-428.
- <sup>392</sup> **Rupper A., Lee K., Knecht D., Cardelli J.**, Sequential activities of phosphoinositide 3-kinase, PKB/Akt, and Rab7 during macropinosome formation in *Dictyostelium*, *Mol. Biol. Cell.* 12, 2813-2824.

- <sup>393</sup> **Corvera S., D'Arrigo A., Stenmark H.**, Phosphoinositides in membrane traffic, (1999), *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 460-465.
- <sup>394</sup> **De Lozanne A., Spudich J.A.**, Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination, (1987), *Science* 236, 1086-1091.
- <sup>395</sup> **Manstein D.J., Ruppel K.M., Spudich J.A.**, Expression and characterization of a functional myosin head fragment in Dictyostelium discoideum, (1989), *Science* 246, 656-658.
- <sup>396</sup> **de Hostos E.L., Bradtke B., Lottspeich F., Guggenheim R., Gerisch G.**, Coronin, an actin binding protein of Dictyostelium discoideum localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits, *EMBO J.* 10, 4097-4104.
- <sup>397</sup> **de Hostos E.L., Rehfuss C., Bradtke B., Waddell D.R., Albrecht R., Murphy J., Gerisch G.**, Dictyostelium mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility, (1993), *J. Cell Biol.* 120, 163-73.
- <sup>398</sup> **Haugwitz M., Noegel A.A., Karakesisoglou J., Schleicher M.**, Dictyostelium amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development, (1994), *Cell* 79, 303-314.
- <sup>399</sup> **Noegel A.A., Luna, J.E.**, The Dictyostelium cytoskeleton, (1995), *Experientia* 51, 1135-1143.
- <sup>400</sup> **Podolski J.L., Steck T.L.**, Length distribution of F-actin in Dictyostelium discoideum, (1990), *J Biol Chem.* 265, 1312-1318.
- <sup>401</sup> **Dharmawardhane S., Warren V., Hall A.L., Condeelis J.**, Changes in the association of actin-binding proteins with the actin cytoskeleton during chemotactic stimulation of Dictyostelium discoideum, (1989), *Cell Motil Cytoskeleton* 13, 57-63.
- <sup>402</sup> **Hall A.L., Schlein A., Condeelis J.**, Relationship of pseudopod extension to chemotactic hormone-induced actin polymerization in amoeboid cells, (1988), *J Cell Biochem.* 37, 285-299.
- <sup>403</sup> **Chia C.P., Shariff A., Savage S.A., Luna E.J.**, The integral membrane protein, ponticulin, acts as a monomer in nucleating actin assembly, (1993), *J Cell Biol.* 120, 909-922.
- <sup>404</sup> **Chaudhary A., Chen J., Gu Q.M., Witke W., Kwiatkowski D.J., Prestwich G.D.**, Probing the phosphoinositide 4,5-bisphosphate binding site of human profilin I, (1998), *Chem. Biol.* 5, 273-281.
- <sup>405</sup> **Sohn R.H., Chen J., Koblan K.S., Bray P.F., Goldschmidt-Clermont P.J.**, Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin, (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 21114-21120.
- <sup>406</sup> **Yonezawa N., Homma Y., Yahara I., Sakai H., Nishida E.**, A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin, (1991), *J. Biol. Chem.* 266, 17218-17221.
- <sup>407</sup> **Janmey P.A., Lamb J., Allen P.G., Matsudaira P.T.**, Phosphoinositide-binding peptides derived from the sequences of gelsolin and villin, (1992), *J. Biol. Chem.* 267, 11818-11823.
- <sup>408</sup> **Eichinger L., Schleicher M.**, Characterization of actin- and lipid-binding domains in severin, a Ca(2+)-dependent F-actin fragmenting protein, (1992), *Biochemistry* 31, 4779-4787.
- <sup>409</sup> **Tempel M., Goldmann W.H., Isenberg G., Sackmann E.**, Interaction of the 47-kDa talin fragment and the 32-kDa vinculin fragment with acidic phospholipids: a computer analysis, (1995), *Biophys. J.* 69, 228-241
- <sup>410</sup> **Johnson R.P., Niggli V., Durrer P., Craig S.W.**, A conserved motif in the tail domain of vinculin mediates association with and insertion into acidic phospholipid bilayers, (1998), *Biochemistry* 37, 10211-10222.
- <sup>411</sup> **Yu F.X., Johnston P.A., Sudhof T.C., Yin H.L.**, gCap39, a calcium ion- and polyphosphoinositide-regulated actin capping protein, (1990), *Science* 250, 1413-1415.
- <sup>412</sup> **Haus U., Hartmann H., Trommler P., Noegel A.A., Schleicher M.**, F-actin capping by cap32/34 requires heterodimeric conformation and can be inhibited with PIP2, (1991), *Biochem. Biophys. Res Commun.* 181, 833-839.
- <sup>413</sup> **Tempel M., Goldmann W.H., Dietrich C., Niggli V., Weber T., Sackmann E., Isenberg G.**, Insertion of filamin into lipid membranes examined by calorimetry, the film balance technique, and lipid photolabeling, (1994), *Biochemistry* 33, 12565-12572.
- <sup>414</sup> **Fukami K., Sawada N., Endo T., Takenawa T.**, Identification of a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site in chicken skeletal muscle alpha-actinin, (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 2646-2650.
- <sup>415</sup> **Harloff C., Gerisch G., Noegel A.A.**, Selective elimination of the contact site A protein of Dictyostelium discoideum by gene disruption, (1989), *Genes Dev.* 3, 2011-2019.
- <sup>416</sup> **Steinemann C., Parish R.W.**, Evidence that a developmentally regulated glycoprotein is target of adhesion-blocking Fab in reaggregating Dictyostelium, (1989), *Nature* 286, 621-623.
- <sup>417</sup> **Wilcox D.K., Sussman M.**, Serologically distinguishable alterations in the molecular specificity of cell cohesion during morphogenesis in Dictyostelium discoideum, (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 358-362
- <sup>418</sup> **Beckerle M.C., Yeh R.K.**, Talin: role at sites of cell-substratum adhesion, (1990), *Cell Motil Cytoskeleton* 16, 7-13.
- <sup>419</sup> **Chadwick C.M., Ellison J.E., Garrod D.R.**, Dual role for Dictyostelium contact site B in phagocytosis and developmental size regulation, (1984), *Nature* 307, 646-647.
- <sup>420</sup> **Chia C.P.**, A 130-kDa plasma membrane glycoprotein involved in Dictyostelium phagocytosis, *Exp Cell Res.* 227, 182-189.

- <sup>421</sup> **Bominaar A.A., Van Haastert P.J.**, Phospholipase C in Dictyostelium discoideum. Identification of stimulatory and inhibitory surface receptors and G-proteins, (1994), *Biochem. J.* 297, 189-193.
- <sup>422</sup> **Iijima M., Devreotes P.**, Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients, (2002), *Cell* 109, 599-610.
- <sup>423</sup> **Postma M., Roelofs J. Goedhart J., Looovers H.M., Visser A.J. Van Haastert P.J.**, Sensitization of Dictyostelium chemotaxis by phosphoinositide-3-kinase-mediated self-organizing signalling patches, (2004), *J Cell Sci.* 117, 2925-2935.
- <sup>424</sup> **Funamoto S., Meili R., Lee S., Parry L., Firtel R.A.**, Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis, (2002), *Cell* 109, 611-623.
- <sup>425</sup> **Rathi A., Clarke M.**, Expression of early developmental genes in Dictyostelium discoideum is initiated during exponential growth by an autocrine-dependent mechanism, (1992), *Mech Dev.* 36, 173-182.
- <sup>426</sup> **Laussmann T., Pikzack C., Thiel U., Mayr G.W., Vogel G.**, Diphospho-myo-inositol phosphates during the life cycle of Dictyostelium and Polysphondylium, (2000), *Eur. J. Biochem.* 267, 2447-2451
- <sup>427</sup> **Martin J.B., Foray M.F., Klein G., Satre M.**, Identification of inositol hexaphosphate in 31P-NMR spectra of Dictyostelium discoideum amoebae. Relevance to intracellular pH determination, (1987), *Biochim. Biophys. Acta.* 931, 16-25..
- <sup>428</sup> **Smart C.C., Flores S.**, Overexpression of D-myo-inositol-3-phosphate synthase leads to elevated levels of inositol in Arabidopsis, (1997), *Plant Mol Biol.* 33, 811-820.
- <sup>429</sup> **Majee M., Maitra S., Dastidar K.G., Pattnaik S., Chatterjee A., Hait N.C., Das K.P., Majumder A.L.**, A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1-phosphate synthase from Porteresia coarctata (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice: molecular cloning, bacterial overexpression, characterization, and functional introgression into tobacco-conferring salt tolerance phenotype, (2004), *J Biol Chem* 279, 28539-28552
- <sup>430</sup> **Ju S., Shaltiel G., Shamir A., Agam G., Greenberg M.L.**, Human 1-D-myo-inositol-3-phosphate synthase is functional in yeast, (2004), *J Biol Chem.* 279, 21759-21765
- <sup>431</sup> **Gotthardt D., Warnatz H.J., Henschel O., Brückert F., Schleicher M., Soldati T.**, High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases, (2002), *Mol. Biol. Cell* 13, 3508-20.