

Phosphatidylinositolphosphate in *D. discoideum*

-

Inaktivierung eines Gens kodierend für ein myotubularinartiges Protein

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften
der Bergischen Universität Wuppertal

vorgelegt von

Alexander Müller

aus Radevormwald

Juni 2007

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2004 bis Juni 2007 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Vogel im Fachbereich C Mathematik und Naturwissenschaften der Bergischen Universität Wuppertal.

Publikation:

Fischbach, A.; Adelt, S.; Müller, A.; Vogel, G. Disruption of inositol biosynthesis through targeted mutagenesis in *Dictyostelium discoideum*: generation and characterization of inositol-auxotrophic mutants. *Biochem J.* **2006**, Aug 1;397(3): 509 - 518

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20070801

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20070801>]

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günter Vogel für die interessante Aufgabenstellung und seiner engagierten Betreuung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Udo Wehmeier danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Dr. Stephan Adelt, Dr. Guido Dallmann, Dipl. Biol. Anne-Brigitte Eyidi, Dr. Andreas Fischbach und Dr. Christine Trautwein danke ich für die gute und entspannte Arbeitsatmosphäre, für die vielen Ratschläge und anregenden Diskussionen.

Bei Herrn Roland Thiele möchte ich mich für die Offenheit und Hilfestellung bei Fragen zur GC-MS bedanken.

Meiner Familie und im Besonderen Michaela Uhlir bin ich dankbar für die Geduld und Unterstützung während der Promotion.

Für Michaela

Zusammenfassung

Phosphatidylinositolphosphate spielen eine zentrale Rolle bei vielen fundamentalen zellulären Prozessen, wie z.B. Wachstum, Endocytose, Signalvermittlung, Chemotaxis und Apoptose. Myotubularine und verwandte Proteine stellen eine umfassende und hochkonservative Gruppe von Proteinen dar, die eine Phosphatidylinositolphosphat-3-Phosphatase-Aktivität aufweisen. Etliche Studien an myotubularinartigen Proteinen konnten die besondere Beteiligung von Phosphatidylinositolphosphat-3-Phosphatasen an zellulären Prozessen unterstreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine nicht-radioaktive Methode zur analytischen Erfassung von Phosphatidylinositolphosphaten über hochauflösende Ionenchromatographie genutzt, um die intrazellulären Gehalte von Phosphatidylinositolphosphaten im Organismus *D. discoideum* zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre Gehalt von Phosphatidylinositol-3-phosphat (PtdIns(3)P) abhängig von der Nahrungsquelle ist.

Um die physiologische Funktion von 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphaten in *D. discoideum* zu untersuchen, wurde eine Mutante über Gen-Knock-Out generiert, in der ein Gen kodierend für ein myotubularinartiges Protein inaktiviert vorliegt. Im Vergleich zum Elternstamm zeigt die Mutante ein beeinträchtigt Wachstum bei Bakterien als Nahrungsquelle, wohingegen Wachstum in axenischen Medien, Differenzierung, Chemotaxis und Endocytoseraten nicht beeinflusst sind. Zusätzlich liess sich feststellen, dass Membranpräparationen der Mutante Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PtdIns(3,4)P₂) deutlich langsamer dephosphorylieren als die des Elternstamms. Es wurde geschlussfolgert, dass die Ursache dieser reduzierten Aktivität der gezielte Knock-Out des für ein myotubularinartiges Protein kodierenden Gens darstellt.

In der Mutante konnten keine Veränderungen der steady-state Konzentrationen von *myo*-inositolhaltigen Verbindungen nachgewiesen werden. Es ist darauf hinzuweisen, dass die verwendete analytische Methode lediglich die in *D. discoideum* prominent vorkommenden Phosphatidylinositolphosphate (PtdIns(4)P, PtdIns(3)P und PtdIns(4,5)P₂) nachweisen kann. In Anbetracht der Rolle von Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat bei abbauenden endosomalen Prozessen *via* der Wechselwirkung mit cytosolischen NADPH-Oxidase Untereinheiten könnte die Inaktivierung eines Gens kodierend für eine PtdIns(3,4)P₂ spezifische 3-Phosphatase Defekte der Phagosomenreifung verursacht haben.

Abstract

Phosphatidylinositolphosphates play key roles in many fundamental cellular processes as growth, endocytosis, cell signaling, chemotaxis and apoptosis. Myotubularins and related proteins constitute a large and highly conserved family possessing phosphatidylinositolphosphate 3-phosphatase activity. Several studies on myotubularin related proteins have underlined the importance of phosphatidylinositolphosphate 3-phosphatases in cell functions.

In the present work a nonradioactive method to analyse phosphatidylinositolphosphates by high-performance ion chromatography was used to study the cellular concentrations of phosphatidylinositolphosphates in the organism *D. discoideum*. It could be shown that the level of phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns(3)P) is dependent on the nutrition source.

To investigate the role of 3-phosphorylated phosphatidylinositolphosphates in *D. discoideum* a mutant with an inactivated gene encoding for a myotubularin related protein was generated by gene disruption. Compared to the parent strain the mutant shows an impaired growth on bacteria, whereas growth in axenic media, differentiation, chemotaxis and endocytosis rates are not altered.

In addition it was found that membrane preparations of the mutant dephosphorylate the metabolite phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P₂) much slower than that of the parent strain. It was concluded that this reduced activity is caused by the targeted knock-out of a gene encoding for a myotubularin related protein.

There were no changes in the steady state concentrations of *myo*-inositol containing compounds in the mutant detectable. It is to note that the used analytical method is able to detect only the in *D. discoideum* prominent phosphatidylinositolphosphates (PtdIns(4)P, PtdIns(3)P and PtdIns(4,5)P₂).

Considering the role of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate in degradative endosomal pathways *via* interaction with cytosolic NADPH oxidase subunits the inactivation of a gene encoding for a myotubularin related protein which specifically acts on phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate might have provoked defects in phagosome maturation.

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
Bla	Blasticidin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CD	Leitfähigkeitsdetektion
cDNA	komplementäre DNA
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
FITC	Fluoreceinisothiocyant
FYVE	Fab1p, YOTB, Vac1p und EEA1
G418	Genetecin
GC-MS	Gaschromatographie in Kombination mit Massenspektroskopie
GRAM	glycosyltransferases, Rab like GTPase activators and myotubularin
GroPtdInsPx	Glycerophosphatidylinositolphosphate
HPIC	Hochauflösende Ionenchromatographie
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IPAD	Integrierte gepulste Amperometrie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
MDD	Metall-Farbstoff-Detektion
MTMR	myotubularin related protein
NOX	NADPH Oxidasen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH	pleckstrin homolog
PI3K	Phosphatidylinositolphosphat-3-Kinase
PKB	Protein-Kinase B
PLC	Phospholipase C
PtdInsPx	Phosphatidylinositolphosphate
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PX	phagocyte oxidase homolog (phox)
REMI	restriction enzyme mediated integration
RISC	RNA induced silencing complex
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
SHIP	SH2 domain containing inositol 5-phosphatase
siRNAs	small interfering RNAs
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Phosphatidylinositolphosphate in Eukaryonten	1
1.1.1	Stoffwechsel und physiologische Funktionen von Phosphatidylinositolphosphaten	3
1.1.2	3-phosphorylierte Phosphatidylinositolphosphate – Wechselwirkung mit spezifischen Proteindomänen und ihre Bedeutung während der Phagozytose	9
1.1.3	Die Proteinklasse der Myotubularine	13
1.2	<i>Dictyostelium discoideum</i>	15
1.2.1	Biologie und phylogenetische Einordnung von <i>D. discoideum</i>	15
1.2.2	<i>D. discoideum</i> als Modellorganismus	18
1.2.3	Endozytose und phagozytotischer Transit in <i>D. discoideum</i>	19
1.2.4	Molekularbiologische Manipulationen von <i>D. discoideum</i> , unter besonderer Berücksichtigung von Mutationen im Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsel	21
2	Aufgabenstellung	26
3	Material und Methoden	28
3.1	Allgemeine Angaben	28
3.2	Zellbiologische Methoden	33
3.2.1	Anzucht, Kultivierung und Sporengewinnung von <i>D. discoideum</i>	33
3.2.1.1	Axenische Kulturen	33
3.2.1.2	Kultivierung auf Bakterienplatten	34
3.2.1.3	Inkubation auf Wasseragarplatten zur Gewinnung von Sporen	34
3.2.1.4	Kultivierung in Bakteriensuspension	35
3.2.2	Bestimmung der Zelldichte und der Zellgrößenverteilung	35
3.2.3	Phagozytostest	35
3.2.4	Pinocytoestest	36

3.2.5	Chemotaxis	37
3.2.6	Adhäsion	37
3.2.7	Aggregation in Sörensen-Puffer	37
3.3	Molekularbiologische Methoden	38
3.3.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>D. discoideum</i>	38
3.3.2	Verwendete Primer und PCR	38
3.3.3	Verwendete Plasmide	40
3.3.4	Verwendeter <i>E. coli</i> - Stamm zur Transformation	41
3.3.5	Herstellung von kompetenten Bakterien und Transformation	41
3.3.6	Generierung des Vektors zur homologen Rekombination	42
3.3.7	Generierung des Vektors zur Antisense-Mutagenese	43
3.3.8	Enzymatischer Verdau von DNA	43
3.3.9	Agarosegelelektrophorese	44
3.3.10	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	44
3.3.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
3.3.12	Transformation von <i>D. discoideum</i>	45
3.4	Präparative Methoden	46
3.4.1	Extraktion von Phospholipiden nach Vickers	46
3.4.2	Deacylierung von Phospholipiden mit Monomethylamin nach Clarke und Dawson	46
3.4.3	Isolierung von <i>myo</i> -Inositol und <i>myo</i> -Inositolphosphaten	47
3.5	Analytische Methoden	48
3.5.1	Quantitative Phosphatbestimmung nach Lanzetta	48
3.5.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Lowry	50
3.5.3	Phosphatidylinositolphosphatanalytik über hochauflösende Ionenchromatographie mit Leitfähigkeitsdetektion (HPIC-CD)	51
3.5.4	<i>Myo</i> -Inositol-Analytik über hochauflösende Ionenchromatographie kombiniert mit integrierter gepulster Amperometrie (HPIC-IPAD)	55
3.5.5	Analytik von <i>myo</i> -Inositolphosphaten über hochauflösende Flüssigkeitschromatographie in Kombination mit Nachsäulenderivatisierung (HPLC-MDD)	57
3.6	Nachweis von PtdInsPx-Phosphatase-Aktivitäten	59
3.6.1	Aktivitätsbestimmung	59

3.6.2	Präparation von Cytosol- und Membran-Fraktion	59
3.6.3	Chromotographie an Heparin-Agarose	60
4	Ergebnisse und Diskussion	62
4.1	Phosphatidylinositolphosphate in <i>D. discoideum</i>	61
4.1.1	Etablierung der Phosphatidylinositolphosphatanalytik über HPIC-CD	61
4.1.2	Phosphatidylinositolphosphatzusammensetzung von <i>D. discoideum</i> -AX2 in Abhängigkeit von der Nahrungsquelle	64
4.1.3	Exkurs: PtdIns und PtdInsPx in der <i>myo</i> -inositol-auxotrophen Mutante Δ Ddino1	66
4.2	Untersuchungen zu PtdInsPx-Phosphatase-Aktivitäten in AX2	69
4.3	Inaktivierung eines Gens kodierend für ein myotubularinartiges Protein durch gezielte Mutagenese	70
4.3.1	Datenbankrecherche und Homologievergleich zu anderen Organismen	70
4.3.2	Generierung von Mutanten durch homologe Rekombination	71
4.3.3	Versuche zur Antisense-Mutagenese	76
4.4	Phänotypische Charakterisierung der Mutante ΔDdmtmr	78
4.4.1	Wachstum	78
4.4.1.1	Wachstum in axenischem Medium	78
4.4.1.2	Wachstum in Bakteriensuspension	79
4.4.2	Endocytose	82
4.4.2.1	Pinocytose	82
4.4.2.2	Phagocytose	83
4.4.3	Differenzierungsverhalten	84
4.5	Vergleich von ΔDdmtmr und AX2 bezüglich PtdInsPx-Phosphatase-Aktivitäten	85
4.6	Analytik von <i>myo</i>-inositolhaltigen Metaboliten in ΔDdmtmr und AX2	87
4.6.1	Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositolphosphate	87
4.6.2	Myo-Inositol und myo-Inositolphosphate	88
4.7	Abschliessende Betrachtung und Ausblick	89

5	Anhang	93
6	Literaturverzeichnis	102

1 Einleitung

1.1 Phosphatidylinositolphosphate in Eukaryonten

Phosphatidylinositolphosphate (Abk.: PtdInsPx; auch als Phosphoinositide bezeichnet) spielen eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Signalvermittlung. Die vom *myo*-Inositol abgeleiteten Verbindungen sind beteiligt an fundamentalen zellulären Prozessen wie Zellmotilität, Endocytose, Chemotaxis und der Zelldifferenzierung.

Phosphatidylinositolphosphate beinhalten als zentralen Baustein *myo*-Inositol. Der mehrwertige Alkohol *myo*-Inositol ist ein Cyclohexanhexol, bei dem eine Hydroxylgruppe axial steht (nach IUPAC-Konvention an der Position 2) und die verbleibenden fünf äquatorial. Diese Stellung führt zu einer Symmetrieebene, die durch die Kohlenstoffatome 2 und 5 verläuft. Derivate des *myo*-Inositols werden nach einer Empfehlung der NC-IUB entgegen dem Uhrzeigersinn numeriert (D-Konfiguration).¹

Bei den Phosphatidylinositolphosphaten liegt *myo*-Inositol phosphoryliert vor. Natürlich vorkommende Phosphatidylinositolphosphate sind ausschliesslich an den äquatorialen Positionen 3, 4 und 5 des *myo*-Inositols phosphoryliert. Somit ist das Trisphosphat PtdIns(3,4,5)P₃ das in Zellen am höchsten phosphorylierte Phosphatidylinositolphosphat.

Die jeweiligen Isomere der Mono- bzw. Bisphosphate unterscheiden sich in der Position der Phosphatreste am *myo*-Inositol.

In Bezug auf ihre chemische Struktur gehören Phosphatidylinositolphosphate zur Klasse der Glycerophospholipide. Der *myo*-Inositol-Baustein ist an Position 1 über einen Phosphodiester mit einem Glycerinmolekül verbrückt. An den beiden anderen Positionen ist das Glycerin mit Fettsäuren verestert.

Exemplarisch für die Struktur der Phosphatidylinositolphosphate ist in Abbildung 1 PtdIns(3,4,5)P₃ dargestellt. Gezeigt ist eine für Säugetierzellen typische Fettsäurezusammensetzung mit Stearinsäure an der 1-Position und mit Arachidonsäure an der 2-Position des Glycerins.

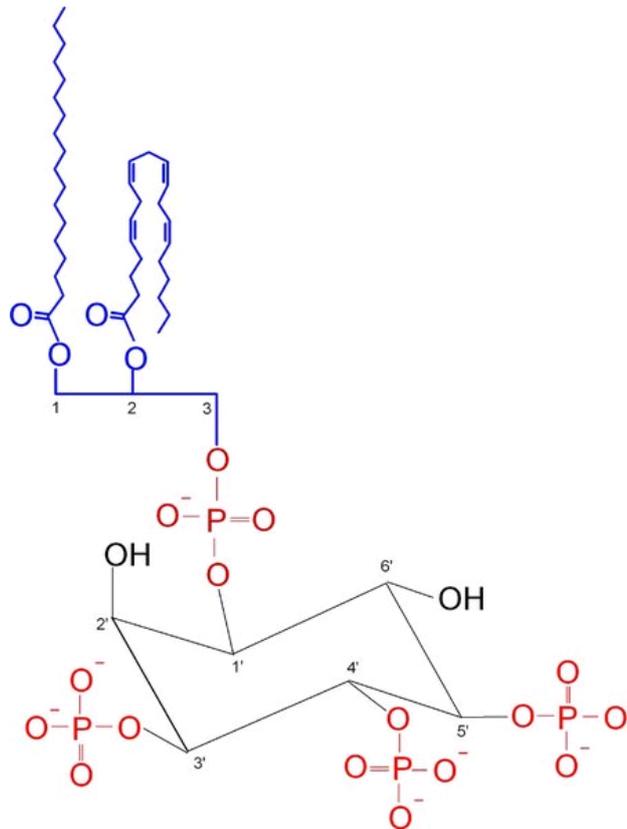


Abb. 1: Chemische Struktur von sn-1-stearoyl-2-arachidonoyl-Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat.

Charakteristisch für Phosphatidylinositolphosphate ist ihr aufgrund der Fettsäuren vorhandener lipidartiger Charakter. Im Gegensatz zu den wasserlöslichen Inositolphosphaten, die frei im Cytosol diffundieren, sind sie an Zellmembranen verankert. Phosphatidylinositolphosphate sind daher als Phospholipide am Aufbau von biologischen Membranen beteiligt.

Gut untersucht sind mittlerweile die qualitativen und quantitativen Gehalte von Phosphatidylinositolphosphaten in Zellen von Säugetieren (Mammalia). Der Grundbaustein Phosphatidylinositol (PtdIns) bildet in mammalen Zellen ca. 10 % aller Phospholipide. Bezüglich der Gehalte von Phosphatidylinositolphosphatisomeren in Säugetierzellen werden in der Literatur deutlich unterschiedliche Ergebnisse beschrieben. Die Gehalte der beiden prominentesten Vertreter PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ variieren von ca. 5 - 10 % bezogen auf den PtdIns-Gehalt; absolute Konzentrationen liegen im Bereich von 1 - 5 nmol pro 10⁹ Zellen.

Die Gehalte der anderen Phosphatidylinositolphosphatisomere liegen deutlich unter einem Prozent bezogen auf den PtdIns-Gehalt.²

Diese geringen Gehalte (insbesondere der 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphate und des PtdIns(5)P) führen zum Teil zu erheblichen Problemen bei der Identifizierung und Quantifizierung dieser Verbindungen aus biologischen Proben und bei der Aufklärung ihres Metabolismus.

Folgende Tabelle fasst die Literaturdaten knapp zusammen. Die angegebenen relativen Prozentwerte beziehen sich auf den PtdIns-Gehalt und stellen lediglich Orientierungswerte dar.

PtdIns(4)P	5 - 10 %
PtdIns(4,5)P ₂	5 - 10 %
PtdIns(5)P	0.1 – 0.5 %
PtdIns(3)P	0.1 – 0.5 %
PtdIns(3,5)P ₂	0.01 – 0.02 %
PtdIns(3,4)P ₂	0.01 – 0.02 %
PtdIns(3,4,5)P ₃	0.01 – 0.02 %

Tab. 1: Relative Angaben zu Phosphatidylinositolphosphatgehalten in Säugetierzellen (bezogen auf PtdIns = 100 %).

1.1.1 Stoffwechsel und physiologische Funktionen von Phosphatidylinositolphosphaten

Der Grundbaustein Phosphatidylinositol wird in eukaryontischen Zellen aus CDP-DAG (Cytidindiphosphat-Diacylglycerin) und *myo*-Inositol unter katalytischer Beteiligung einer PtdIns-Synthase gebildet. *Myo*-Inositol selber wird in eukaryontischen Zellen aus D-Glucose-6-phosphat *via* D-*myo*-Inositol-3-phosphat als Zwischenprodukt unter Beteiligung der MIPS

(D-*myo*-Inositol-3-phosphat Synthase) und anschließender Dephosphorylierung des Ins(3)P durch die IMPase (*myo*-Inositolmonophosphat-Phosphatase) synthetisiert.

Phosphatidylinositolphosphate unterliegen einem sehr dynamischen und komplexen Stoffwechsel. Die Bildung wird durch eine Reihe von Kinasen katalysiert (Abb. 2).

Die Entdeckung des PtdIns(3,4,5)P₃ durch Traynor-Kaplan im Jahr 1988 ging einher mit der Entdeckung der Phosphatidylinositolphosphat-3-Kinasen (PI3K).^{3,4} Die Klasse der PI3K besteht aus mindestens drei homologen Kinasen (Typ I,II,III) mit unterschiedlichen Substratspezifitäten und Regulationsmechanismen. PI3K vom Typ I phosphorylieren vorzugsweise PtdIns(4,5)P₂. Dieser Typ von PI3Kinasen spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Bildung von PtdIns(3,4,5)P₃. Auf die wichtige physiologische Rolle von PtdIns(3,4,5)P₃ und PtdIns(4,5)P₂ als „second messenger“ wird im Folgenden noch näher eingegangen. Zu den strukturellen Charakteristika der verschiedenen PI3K sei auf einen Übersichtsartikel von Vanhaesebroeck et al. verwiesen.⁵

Neben den PI3Kinasen gibt es weiterhin die Gruppe der Phosphatidylinositolphosphat-4-Kinasen (PI4K) und die der Phosphatidylinositolphosphat-5-Kinasen (PI5K). Sie sind unter anderem entscheidend an der Synthese des sekundären Botenstoffes PtdIns(4,5)P₂ und seinen beiden Vorstufen PtdIns(4)P und PtdIns(5)P beteiligt. Erst kürzlich wurde der Metabolit PtdIns(3,5)P₂ in eukaryontischen Zellen identifiziert, der durch eine PI5Kinase-Aktivität aus PtdIns(3)P gebildet wird. Dove et al. konnten zeigen, dass aufgrund von osmotischem Stress in Hefezellen die Phosphatidylinositol-3-phosphat 5-Kinase Fab1p aktiviert wird, was zu einem rapiden Anstieg des PtdIns(3,5)P₂-Gehalts führt. Anscheinend ist dieser Prozess in *S. cerevisiae* essentiell für die Vakuolenfunktion und die Membranhomöostase.⁶

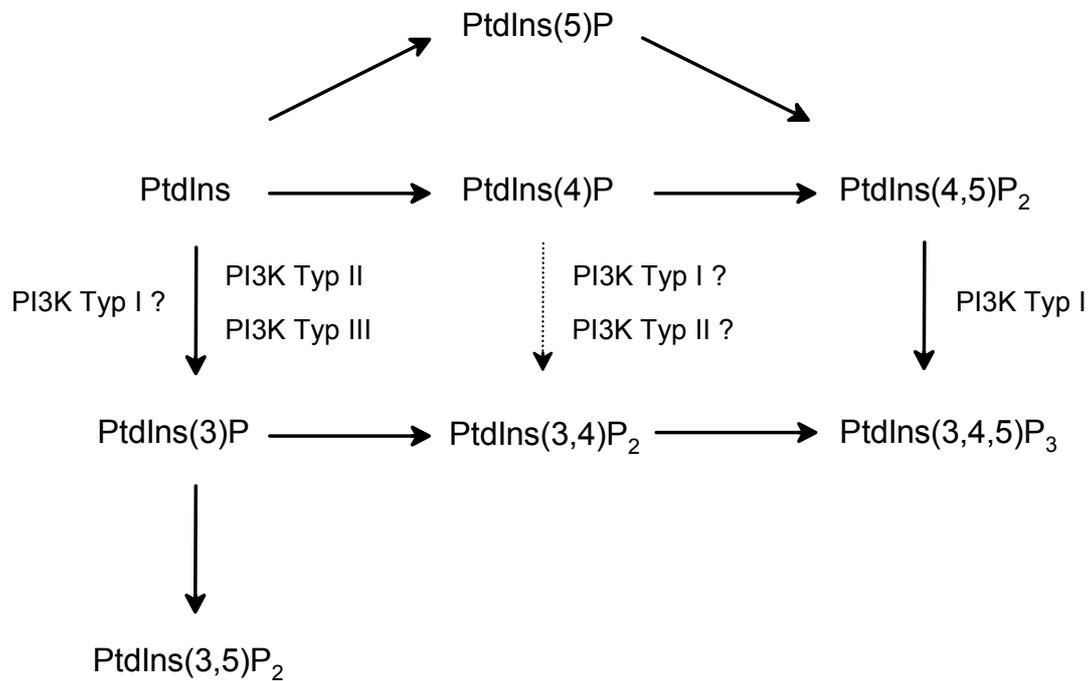


Abb. 2: PtdIns/PtdInsP_x-Kinase Aktivitäten in Säugetierzellen. Hervorgehoben sind die PI3K-Aktivitäten. Zu beachten ist die exklusive Aktivität der Typ I PI3K bei der Bildung von PtdIns(3,4,5)P₃ aus PtdIns(4,5)P₂.

Am metabolischen Abbau der Phosphatidylinositolphosphate sind unter anderem eine Reihe von Phosphomonoesterasen beteiligt (Abb. 3). Es ist in diesem Zusammenhang zu betonen, dass die 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphate nicht von der Phospholipase C (PLC) hydrolysiert werden können.

PtdIns(4,5)P₂ wird durch die Gruppe der Typ II 5-Phosphatasen zu PtdIns(4)P abgebaut. Diese Gruppe von Enzymen schliesst auch die löslichen Inositolphosphate Ins(1,4,5)P₃ und Ins(1,3,4,5)P₄ als potentielle Substrate mit ein.

Typ II 5-Phosphatasen, die für die Substraterkennung eine Phosphatgruppe an Position 3 des Inositolrings benötigen, werden als SHIP (SH2 domain containing inositol 5-phosphatase) bezeichnet. PtdIns(3,4,5)P₃ wird durch SHIP zu PtdIns(3,4)P₂ dephosphoryliert.

Ein weiteres Enzym, das PtdIns(3,4,5)P₃ dephosphoryliert, ist PTEN (phosphatase and tensin homolog). PTEN wurde ursprünglich als Tumorsuppressor identifiziert und gehört zu der Gruppe der Protein-Tyrosinphosphatasen. Es zeigte sich, dass PTEN zusätzlich eine Phosphatidylinositolphosphat-3-Phosphatase darstellt.

Zu PTEN ähnliche Protein-Tyrosinphosphatasen, die ebenfalls 3-dephosphorylierende Aktivität besitzen, sind die sogenannten Myotubularine. Auf PTEN und die Myotubularine wird in Punkt 1.1.3 näher eingegangen.

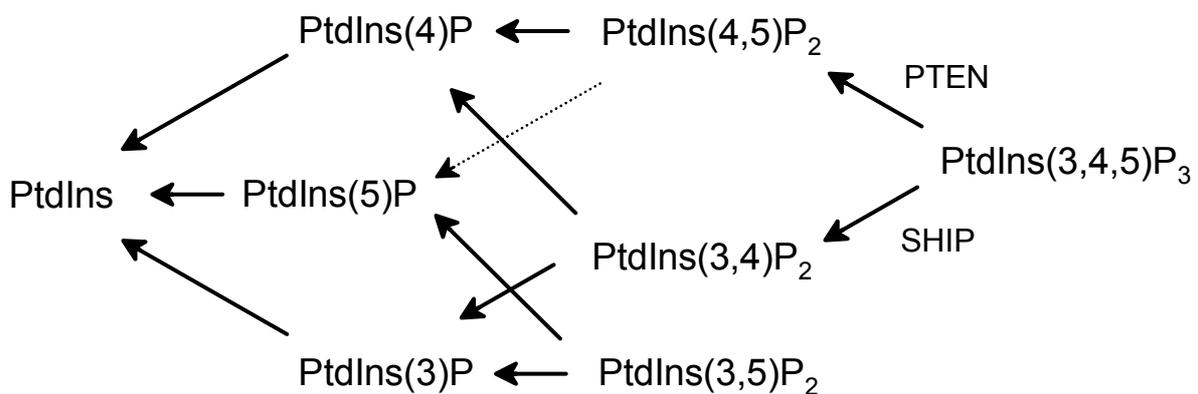


Abb. 3: PtdInsP_x-Phosphatase Aktivitäten in Säugetierzellen. Hervorgehoben ist die Dephosphorylierung von PtdIns(3,4,5)P₃ durch PTEN bzw. SHIP.

Die an Bildung und Abbau beteiligten Proteine sind Schlüsselenzyme in der intrazellulären Signaltransduktion. Beruhend auf einer vereinfachten Sichtweise kommt den 3-Kinasen eine Signal-modulierende Aufgabe zu, wohingegen man in den 5-Phosphatasen Enzyme mit einer Signal-terminierenden Rolle sieht.⁷

Die vollständige Aufklärung der Signalwege und ihrer physiologischen Bedeutung, in der Phosphatidylinositolphosphate involviert sind, gehört derzeit zu einem wichtigen Gebiet der biochemischen Forschung.

Bereits in den 50er Jahren wurden durch bahnbrechende Arbeiten von Hokin und Hokin erste Hinweise auf eine Beteiligung von Phosphatidylinositolphosphaten an Signalübertragungsprozessen gewonnen.⁸ Heute gilt als gesichert, dass die membranständigen Phosphatidylinositolphosphate in grundlegenden zellulären Prozessen massgeblich involviert sind. Ausschlaggebend für die physiologische Funktion ist hierbei das charakteristische

Phosphorylierungsmuster am *myo*-Inositolring. Es ist hervorzuheben, dass die Funktionsweise von Phosphatidylinositolphosphaten im Gegensatz zu frei diffundierenden Signalmolekülen wie Inositolphosphaten oder cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) darauf beruht, dass sie ortsgebunden Informationen vermitteln: Phosphatidylinositolphosphate werden in der Membran gebildet und verbleiben dort; die Zielproteine werden zur Membran „rekrutiert“ und die Membran ist als Ort der Protein-Ligand-Wechselwirkung festgelegt. Das spezifische Phosphorylierungsmuster birgt hierbei die Information zur gezielten Anlagerung von cytosolischen Proteinen.

Von der bei Phosphatidylinositolphosphaten in Säugetierzellen am häufigsten auftretenden Fettsäurezusammensetzung, an Position 1 Stearinsäure und an Position 2 Arachidonsäure, wird angenommen, dass es die Interaktion zwischen dem phosphoryliertem Inositolring und dem Zielprotein durch räumliche Faktoren begünstigt.

Es wird ausserdem vermutet, dass Phosphatidylinositolphosphate ihre Signale auch durch lokale Akkumulationen an Membranregionen (sogenannten „rafts“) vermitteln und nicht allein durch eine Änderung der Gesamtkonzentration.

Von der physiologischen Rolle des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats ist bisher am meisten bekannt. Berridge et al. entdeckten im Jahr 1983, dass *myo*-Inositol-1,4,5-trisphosphat ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$) eine intrazelluläre Calciumionen-Mobilisation initiiert.⁹ Dieser „second messenger“ wird unter Beteiligung der Phospholipase C durch eine rezeptorvermittelte Hydrolyse von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ generiert. Das von der Membran ins Cytosol diffundierende $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ bindet spezifisch an Ionenkanäle des endoplasmatischen Retikulums und löst damit die Freisetzung von Ca^{2+} aus. Die Wirkung dieses kurzlebigen „second-messengers“ wird durch einen extensiven Inositolphosphat-Metabolismus moduliert. Neben $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ entsteht bei der Spaltung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ auch Diacylglycerin (DAG). Das in der Membran verbleibende DAG aktiviert die Protein-Kinase C (PKC), die die Phosphorylierung einer Reihe von Zielproteinen katalysiert.

Zunächst wurde $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ lediglich als Vorstufe zur Bildung der Botenstoffe $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, DAG angesehen. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ selbst mit vielen Proteinen wechselwirken kann und direkt an grundlegenden zellulären Prozessen beteiligt ist. Folgendes Schema veranschaulicht die physiologischen Funktionen von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und den über PLC-Katalyse generierten Metaboliten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und DAG. (Abb. 4).

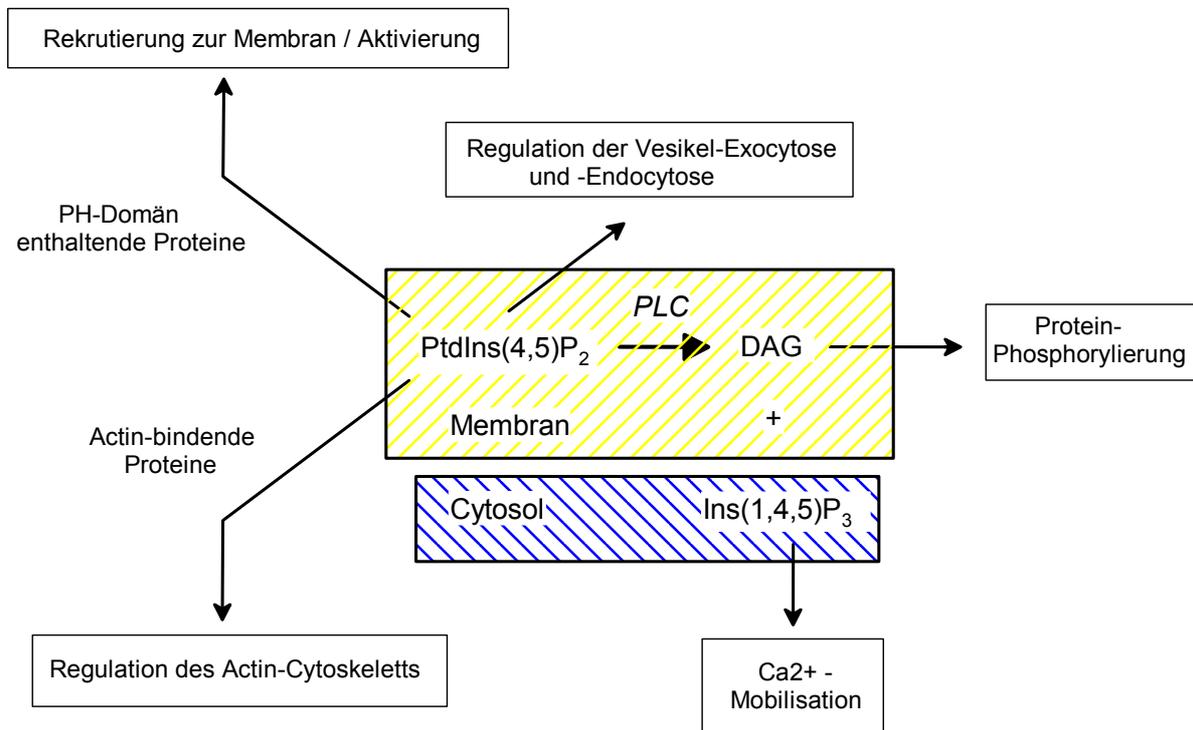


Abb. 4: Physiologische Funktionen von PtdIns(4,5)P₂, DAG und Ins(1,4,5)P₃.

Desweiteren stellt PtdIns(4,5)P₂ auch die Vorstufe für den Botenstoff Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat dar. Von PtdIns(3,4,5)P₃ ist bekannt, dass es mit einer Reihe von Protein-Kinasen (z.B. mit der Protein-Kinase B (Abk.: PKB oder auch AKT) interagiert.

Auch die anderen Phosphatidylinositolphosphatisomere scheinen wesentlich an fundamentalen zellulären Prozessen involviert zu sein. Im nächsten Kapitel wird auf die besondere Stellung von 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphaten näher eingegangen.

1.1.2 3-phosphorylierte Phosphatidylinositolphosphate – Wechselwirkung mit spezifischen Proteindomänen und ihre Bedeutung während der Phagocytose

Die an 3-Position des *myo*-Inositolrings phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphate rücken derzeit in den Blickpunkt der Phospholipid-Forschung.

Wie schon angedeutet, gibt es für die in den Membranen gebildeten Phosphatidylinositolphosphate nur die Möglichkeit der lateralen Diffusion. Eine erhebliche Anzahl von Proteinen verfügt über Bereiche mit Phosphatidylinositolphosphat-spezifischen Bindungsmotiven. Übersichtsartikel bezüglich PtdInsPx-bindenden Domänen sind unter anderem von Cullen et al. und Corvera verfasst worden.^{10,11}

In Proteinen weit verbreitet sind die sogenannten Pleckstrin-Homologie (PH) - Domänen. PH-Domänen sind kleine β -sandwich Proteinabschnitte von ungefähr 120 Aminosäuren und wurden zuerst als sich zweimal wiederholendes Muster in Pleckstrin identifiziert. Es konnte festgestellt werden, dass eine Vielzahl von Proteinen, die in der Signalvermittlung involviert sind, ebenfalls PH-Domänen aufweisen.¹² Im Jahr 1994 fanden Harlan et al. heraus, dass PH-Domänen PtdIns(4,5)P₂ binden können.¹³ Auch die oben erwähnte Phospholipase C interagiert über ihre PH-Domäne mit PtdIns(4,5)P₂. Heutzutage wird insbesondere die Wechselwirkung mit 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphaten erforscht. Der erste Nachweis, dass PH-Domänen Zielbereiche von 3-phosphorylierten PtdInsPx darstellen, wurde für die Proteinkinase B (PKB / AKT) berichtet.¹⁴ PKB spielt eine zentrale Rolle in der Homöostase der Zelle und ist ein Schlüsselprotein vieler metabolischer und anti-apoptotischer Prozesse. Die PH-Domäne von PKB bindet mit hoher Affinität und Spezifität PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃.

Eine weitere Domäne ist die sogenannte FYVE - Domäne; die Abkürzung FYVE leitet sich ab von den Anfangsbuchstaben der vier zuerst entdeckten Proteine, die diese Domäne aufweisen (Fab1p, YOTB, Vac1p und EEA1). EEA1, das „early endosomal antigen-1“, ist maßgeblich an der frühen Endosomen-Entwicklung beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die FYVE - Domäne spezifisch PtdIns(3)P, nicht aber die anderen Phosphatidylinositolphosphate erkennt. Der sogenannte „FYVE-Finger“ interagiert mit der Phosphatgruppe von PtdIns(3)P hauptsächlich *via* einer konservativen basischen Region (RKHHCR) und ist zweifach von Zink(II)-Ionen koordiniert. PtdIns(3)P wird durch

Phosphorylierung von PtdIns in der Membran von Endosomen und Phagosomen gebildet und ist massgeblich an der Phagosomenreifung und endocytotischen Transportprozessen beteiligt (siehe auch Abb. 6).

Eine dritte Domäne, die phagocyte oxidase-homologe (phox homology / PX) - Domäne, interagiert spezifisch mit PtdIns(3)P und PtdIns(3,4)P₂.

Abbildung 5 fasst die Wechselwirkung der drei Domänen mit 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphaten zusammen.

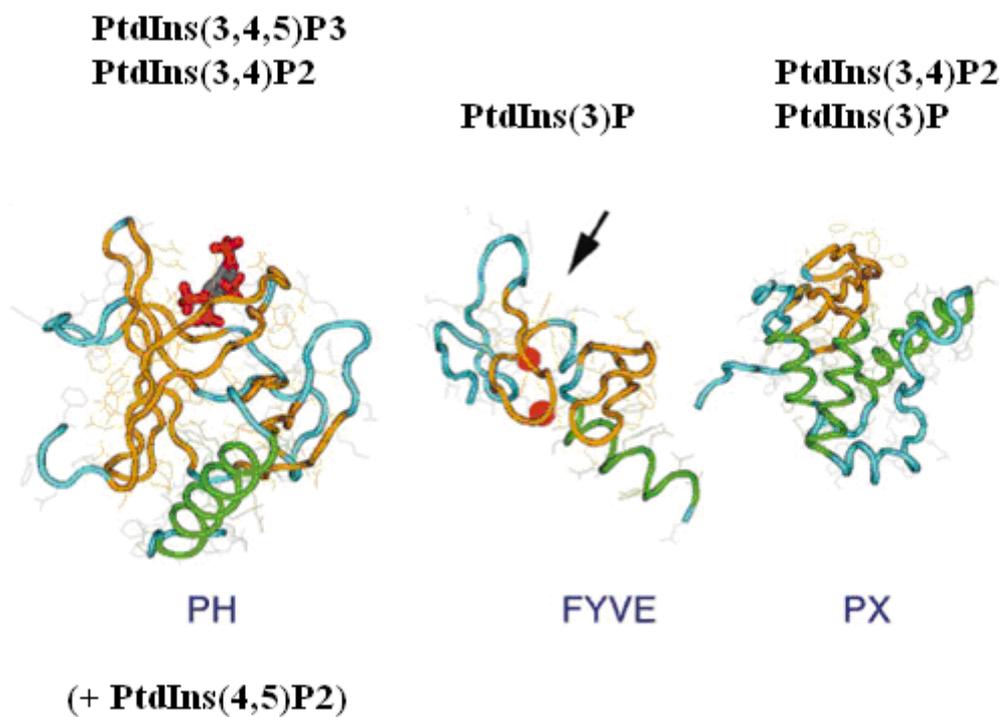


Abb. 5: Wechselwirkung von 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphaten mit spezifischen Proteindomänen. Die basische Region des FYVE-Fingers RKHHCR ist durch den Pfeil gekennzeichnet; in Koordination sind zwei Zn(II)-Ionen.

PX - Domänen enthaltende Proteine sind massgeblich an der Phagozytose beteiligt. Es liegen Erkenntnisse vor, dass die Wechselwirkung von PX-Domänen mit PtdIns(3)P bzw.

PtdIns(3,4)P₂ in der von Neutrophilen vermittelten Infektionsabwehr *via* Phagocytose und oxidativem Abbau („respiratory burst“) involviert ist.¹⁵

Die PX Domäne wurde ursprünglich als ein konservatives Motiv von ungefähr 130 Aminosäuren der p40^{phox} und p47^{phox} Untereinheiten des NADPH Oxidase Komplexes von Neutrophilen identifiziert. Dieser Komplex ist entscheidend bei der Phagocytose bzw. der Immunabwehr beteiligt, indem er für eine schnelle Ausschüttung von reaktiven oxygenen Spezies (ROS) wie z.B. Superoxid-Radikale oder Hydrogenperoxide in das Phagosom sorgt. Dieser Prozess, der auf eine Abtötung des internalisierten Mikroorganismus abzielt, wird als „respiratory burst“ oder „oxidative burst“ bezeichnet. Im inaktiven Zustand besteht die NADPH Oxidase sowohl aus membranständigen als auch aus cytosolisch vorliegenden Untereinheiten. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden cytosolischen Untereinheiten p40^{phox} und p47^{phox} über ihre PX Domäne mit PtdIns(3)P bzw. PtdIns(3,4)P₂ interagieren können.¹⁶ Zudem liegen Erkenntnisse vor, dass diese Phosphatidylinositolphosphate kurz nach dem Schliessen des phagocytic cup rapide ansteigen.¹⁷ Dies lässt vermuten, dass dieser Anstieg das Signal darstellt, dass diese Untereinheiten zum Phagosom rekrutiert werden und zusammen mit den membranständigen Untereinheiten den aktivierten NADPH Oxidase Komplex bilden, der nun funktionsfähig ist, um die für den phagocytierten Mikroorganismus toxischen Sauerstoffspezies zu bilden. Die Bedeutung dieser Protein-PtdInsPx-Interaktion wird am Beispiel der menschlichen Krankheit CGD erkennbar. Die CGD, die chronic granulomatous disease, ist eine genetisch bedingte Immunschwäche, bei der die Makrophagen bzw. Neutrophilen des Immunsystems feindliche Mikroorganismen sprich Pilze oder Bakterien zwar einverleiben, aber nicht mehr töten können. Die Fähigkeit des „respiratory burst“ ist gänzlich oder zum Teil verloren. Eine Ursache ist unter anderem eine Punktmutation der PX Domäne der p47^{phox} Untereinheit, die R42Q Mutation, die zu einem deutlichen Verlust der Wechselwirkung bzw. Binefähigkeit zu PtdIns(3,4)P₂ führt.¹⁶ Dies hat zu Folge, dass der NADPH Oxidase Komplex nicht mehr aktiviert werden kann.

Aufgrund der potentiell schädlichen Reaktionen, die von der NADPH Oxidase katalysiert werden, wird verständlich, dass diese Enzymaktivität strikt reguliert wird.

Strukturelle Details der Bindung von PtdIns(3,4)P₂ an p47-PX werden von Karathanassis et al. beschrieben.¹⁸ Sie beschreiben unter anderem, dass im Ruhezustand die PX-Domäne von p47 intramolekular blockiert wird. Durch Phosphorylierung wird die PX-Domäne frei zugänglich und ist nun fähig über PtdIns(3,4)P₂ an die Phagosomenmembran zu binden.

Abbildung 6 fasst die Wechselwirkung von 3-Phosphatidylinositolphosphaten und des NADPH Oxidase Komplexes während der Phagozytose als Modell zusammen.

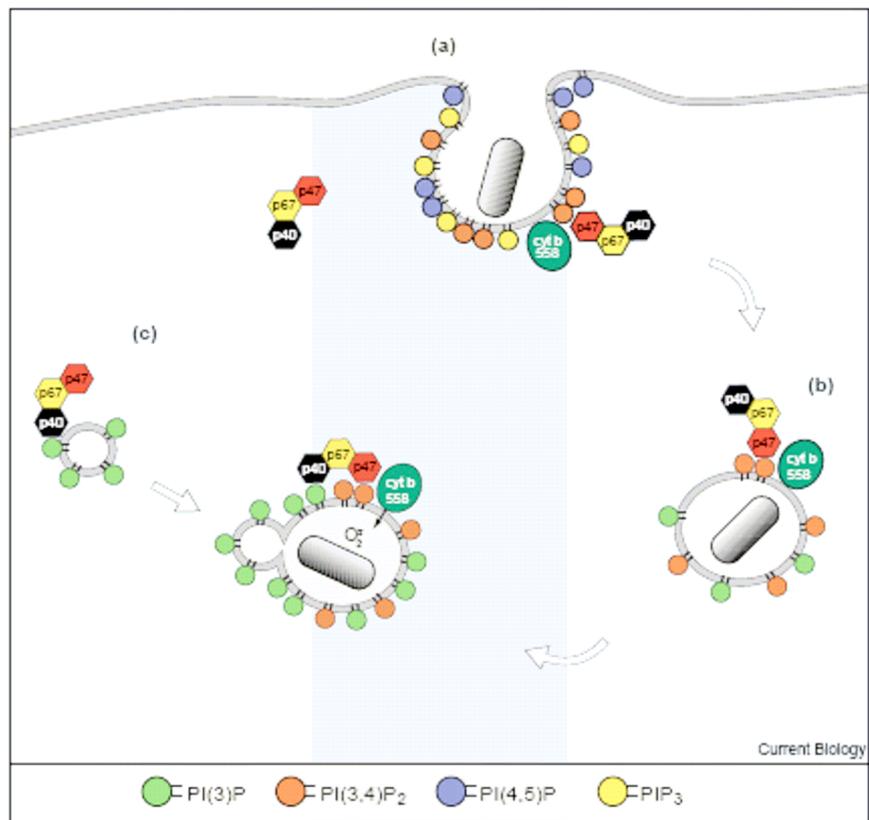


Abb. 6: PtdInsPx-Metabolismus während der Phagozytose.¹⁷

a) Interaktion des Partikels mit Oberflächenrezeptoren führt zur Rekrutierung und Aktivierung von PI3Kinase Typ I und somit zu einem schnellen lokalen Anstieg von PtdIns(3,4,5)P₃. Gleichzeitige SHIP-Aktivität verursacht zudem einen Anstieg von PtdIns(3,4)P₂. Desweiteren steigt auch der Gehalt von PtdIns(4,5)P₂ während dieser Anfangsphase rapide an.

b) Nach dem Schließen der kelchförmigen Ausstülpung, des sogenannten phagocytic cup, zum Phagosom fallen die Gehalte von PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ rapide ab.

c) Frühe Endosomen, die PtdIns(3)P enthalten, fusionieren mit der Vakuole. Der NADPH Oxidase Komplex wird nun über seine beiden Untereinheiten an PtdIns(3)P bzw. PtdIns(3,4)P₂ gebunden und aktiviert.

1.1.3 Die Proteinklasse der Myotubularine

1996 konnten Laporte et al. das Gen identifizieren, dass bei Patienten mit der Muskelschwäche-Krankheit X-linked Myotubular Myopathy (XLMTM) mutiert vorlag; das implizierte Protein Myotubularin MTM1 ist als eine Protein-Tyrosin Phosphatase identifiziert worden.¹⁹ Die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ B beruht ebenfalls auf einer Mutation von Genen, die für myotubularinverwandte Proteine (myotubularin related proteins, MTMRs) kodieren.²⁰ Mittlerweile ist eine Vielzahl von Myotubularinen und MTMRs in eukaryontischen Zellen identifiziert worden. Eine Einteilung sowie phylogenetische Beziehungen der Myotubularine werden in einem Übersichtsartikel von Laporte beschrieben.²¹

Myotubularine gehören wie PTEN zu den Protein-Tyrosin Phosphatasen (PTP). PTPs zeichnen sich durch ein aktives CX₅R-Motiv innerhalb einer ungefähr 250 Aminosäuren grossen katalytischen Domäne aus.

Myotubularine besitzen als strukturelle Charakteristika zwei konservative Domänen, eine PH-Domäne ähnliche, die sogenannte GRAM-Domäne (glycosyltransferases, Rab like GTPase activators and mytotubularin) und die Phosphatase-Domäne mit dem streng konservativen Motiv CSDGWDR (siehe Abbildung 7). Die GRAM-Domäne ist entscheidend für die Bindung an Proteine. Trotz dieser Ähnlichkeiten zeigen Myotubularine *in vitro* nur schwache Aktivitäten gegenüber phosphorylierten Proteinen. Zahlreiche Arbeiten hingegen konnten zeigen, dass Myotubularine eher PtdInsPx-3-Phosphatasen darstellen.^{22,23} Die präferierten Substrate sind PtdIns(3)P und PtdIns(3,5)P₂.^{23,24} die Anbindung dieser Phosphatidylinositolphosphate erfolgt ebenfalls über die GRAM-Domäne. *In vitro* Bindungsstudien mit isolierten GRAM-Domänen zeigen zusätzlich die Fähigkeit auf, auch andere Phosphatidylinositolphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃ und PtdIns(3,4)P₂) effektiv zu binden.²⁵

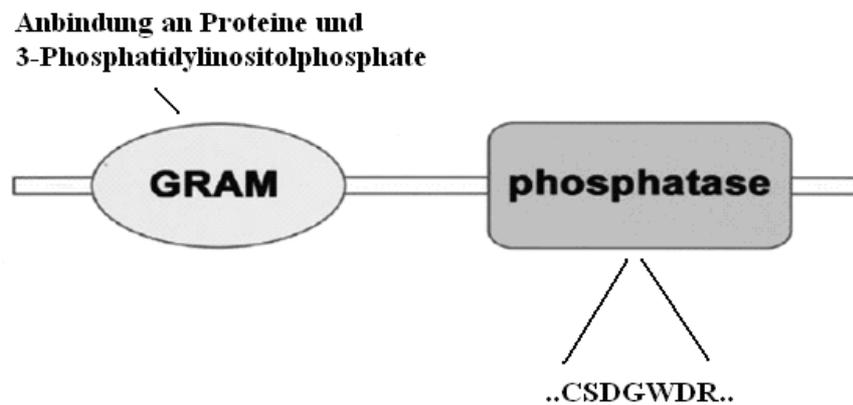


Abb. 7: Strukturelle Charakteristika der Myotubularine.

Im Gegensatz zu PTEN, das auch Inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphat als lösliches Analogon umsetzen kann²⁶, katalysieren Myotubularine spezifisch nur die Dephosphorylierung von den membranständigen Phosphatidylinositolphosphaten.^{27,28} Die physiologische Rolle von Myotubularinen ist bisher weitestgehend ungeklärt. Eine Reihe von Myotubularinen ist katalytisch inaktiv. Es wurde ursprünglich vermutet, dass diese Myotubularine Substrate binden und diese so vor der Dephosphorylierung aktiver Myotubularine schützen. Neuere Studien zeigen, dass die inaktiven Myotubularine als Adaptoren für die aktiven fungieren, und deren Lokalisierung und Aktivität durch Protein-Protein-Wechselwirkungen modifizieren.^{28,29} Wie im Fall von PTEN werden die Myotubularine als Tumorsuppressoren diskutiert.³⁰ Takenawa et al. vermuten als physiologische Rolle von Myotubularinen, dass sie als Regulatoren im späten endosomalen Transport und der Vakuolenentwicklung fungieren.²⁵ Dies ist konsistent mit Arbeiten von Walker et al., die zeigen konnten, dass die Expression von humanem MTMR3 in Hefezellen abnormal grosse Vakuolen erzeugte.²⁴ Fares et al. beschreiben 2003 Mutationen der Phosphatase-Regionen von MTM6- und MTM9-Genen im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Es wurde festgestellt, dass die Coelomocyten von Mutantenstämmen endocytotische Defekte aufweisen.³¹

1.2 *Dictyostelium discoideum*

1.2.1 Biologie und phylogenetische Einordnung von *D. discoideum*

Im Jahr 1869 wurde der erste Vertreter der Dictyosteliden von Brefeld beschrieben. Er klassifizierte den Organismus, den er aus Pferdedung isolierte, als *Dictyostelium mucoroides*.³² *Dictyostelium discoideum*, der am besten untersuchte Vertreter der Dictyosteliden, wurde 1935 von Raper in North Carolina entdeckt und aufgrund seiner Morphologie (Schleimhülle, Sporen) taxonomisch den „zellulären Schleimpilzen“ (Acrasiomyceten) zugeordnet (Raper, 1935).³³ In seinem natürlichen Habitat, dem Waldboden, ernährt sich *D. discoideum* ausschliesslich durch Phagozytose von Bakterien. Sussman und Sussman selektionierten 1967 aus dem Wildtyp NC-4 den Stamm AX1, der aufgrund zweier unabhängiger Mutationen in der Lage ist, in einem axenischem (bakterienfreiem) Nährmedium zu wachsen.³⁴ Franke und Kessin publizierten 1977 ein synthetisches Minimalmedium für das Wachstum von axenischen Stämmen.³⁵ Die axenischen Stämme besitzen bei entsprechendem Nahrungsangebot weiterhin die Fähigkeit zur Phagozytose. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm AX2 wurde 1970 von Watts und Ashworth aus AX1 Zellen gewonnen.³⁶

D. discoideum durchläuft einen sehr interessanten Lebenszyklus (siehe auch Abbildung 8), der sich durch eine Trennung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung auszeichnet. Während der Wachstumsphase, sprich unter geeigneten Umwelt- und Nahrungsbedingungen, liegt *D. discoideum* als einzellige, amöboide Form vor, die sich asexuell alle 2 – 3 h durch mitotische Zellteilung vermehrt. Die sehr motilen Zellen ernähren sich durch Phagozytose von Bakterien und erkennen ihre „Beute“ chemotaktisch über eine Reihe von Oberflächenrezeptoren.³⁷ Unter Hungerbedingungen kommt die Zellteilung zum Stillstand und es wird ein komplexes Differenzierungsprogramm eingeleitet. Dabei geben die Amöben die einzellige Lebensweise zugunsten eines Zellverbandes auf.

Nach einer Hungerperiode von etwa 4 h beginnen einzelne Zellen spontan pulsartig zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) auszuschütten. Umliegende Zellen empfangen das chemotaktische Signal und schütten ihrerseits wieder cAMP aus, so dass es zu einer Ausbreitung des Signals kommt. Extrazelluläres cAMP wird schnell durch sekretierte Phosphodiesterasen abgebaut und somit eine Resensitivierung der Zellen ermöglicht.³⁸ Die Zellen beginnen, sich chemotaktisch in Richtung der höheren cAMP-Konzentration zu

orientieren und bewegen sich in langen Strömen auf das Aggregationszentrum zu. Adhäsionsproteine an der Zelloberfläche ermöglichen es den Zellen, Kontakte auszubilden und sich zu einem Zellverband aus bis zu 10^5 Zellen zusammenzuschließen.³⁹ Aus diesem Zellverband entsteht ein von einer Schleimhülle umgebenes, schneckenförmiges Pseudoplasmodium („slug“). Der „slug“ ist in der Lage, sich fortzubewegen und phototaktisch bzw. thermotaktisch einen günstigen Standort für die Kulmination zu erreichen. Während dieser Wanderung kommt es zu einer Differenzierung in prä-Sporezellen und prä-Stielzellen, was letztlich in der Kulminationsphase mit der Ausbildung eines Fruchtkörpers endet. In diesem sind die Zellen ausdifferenziert zu Stiel- und Sporezellen. Der gesamte Vorgang, vom Einsetzen des Nahrungsmangels bis zum ausgereiften Sporenträger, dauert ca. 24 h. Durch natürliche Sporenverbreitung und anschließender Germination unter günstigeren Umweltbedingungen kann *D. discoideum* neue Lebensräume erschließen und somit seinen Fortbestand sichern.

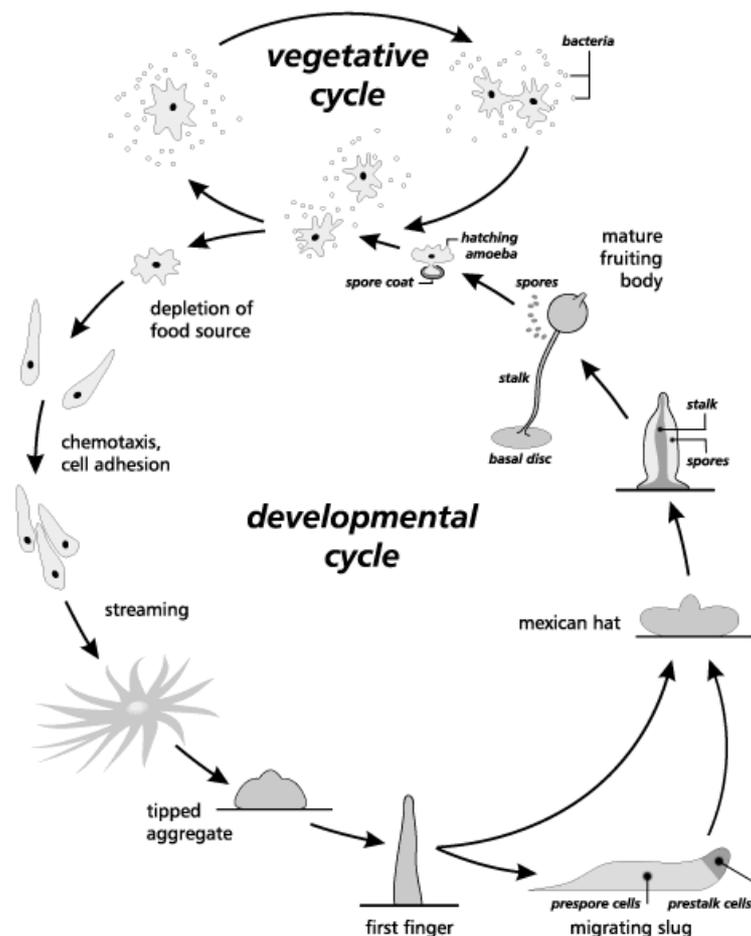


Abb. 8: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *D. discoideum*.

Aufgrund der Lebensweise, Morphologie und vieler gemeinsamer physiologischer Merkmale mit Pflanzen, Tieren und Pilzen wird die systematische Einordnung von *D. discoideum* und anderer zellulärer Schleimpilze heute immer noch, teilweise kontrovers, diskutiert.

Raper et al. ordneten *D. discoideum* klassisch in das Reich der Pilze, genauer in die Klasse der Acrasiomyceten, ein.³³ Auf der Basis aktuellerer Forschung wird *D. discoideum* zu den Mycetozoa (Schleimpilzen), eine Gruppe bestehend aus drei Unterklassen, den zellulären Schleimpilzen (Dictyosteliden), den echten Schleimpilzen (Myxomyceten) und den Zwergschleimpilzen (Protosteliden), klassifiziert.⁴⁰ Molekulare phylogenetische Untersuchungen von ribosomaler RNA lassen im Falle der Mycetozoa auf eine frühe Abspaltung vom eukaryontischen Hauptzweig (noch vor der Trennung von Pflanzen, Tieren und Pilzen) zurückschliessen. Desweiteren werden die Mycetozoa als untereinander nicht näher verwandte, polyphyletische Gruppe angesehen.⁴¹

Phylogenetische Analysen von konservativen Proteinsequenzen (insbesondere der Proteine Actin, β -Tubulin und dem Elongationsfaktor EF-1 α) hingegen deuten darauf hin, dass es sich bei den Mycetozoa um eine kohärente, monophyletische Gruppe handelt, die einen eukaryontischen Zweig bilden, der einen Schwesternzweig („sister-clade to animalia-fungi“) zu dem Tier-Pilz-Zweig (Ophisthokonta) darstellt. Insofern seien die Mycetozoa mit Tieren und Pilzen näher verwandt als mit Pflanzen. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass sich die Mycetozoa erst nach der Abzweigung der Pflanzen, aber noch vor der Trennung von Tieren und Pilzen abgezweigt haben.^{42,43}

Die verwandschaftlichen Beziehungen der zellulären Schleimpilze untereinander waren bislang ungeklärt. Eine Zuordnung erfolgte bisher primär nach morphologischen Gesichtspunkten, z.B. dem Aussehen des Fruchtkörpers. Im Jahr 2006 ist es einem internationalem Forscherteam gelungen, einen genetischen Stammbaum von mehr als 100 Dictyostelidenarten zu erstellen. Es stellte sich überraschenderweise heraus, dass manche Arten, die nach ihrem äusseren Erscheinungsbild eng miteinander verwandt zu sein schienen, genetisch grosse Unterschiede aufweisen.⁴⁴

1.2.2 *D. discoideum* als Modellorganismus

Der zelluläre Schleimpilz *D. discoideum* wurde vom National Institutes of Health als ein eukaryontischer, nicht-mammaler Modellorganismus gekennzeichnet (http://www.nih.gov/science/models/d_discoideum/). Aufgrund seiner Lebensweise und des Entwicklungszyklus ist *D. discoideum* besonders geeignet, um zelluläre Prozesse wie Zellmotilität, Chemotaxis, Cytokinese, Endo- und Exocytose, Zelldifferenzierung und Signaltransduktion zu untersuchen.⁴⁵ Das Studium dieser Prozesse bei *D. discoideum* kann somit von großem Nutzen beim Verständnis der Zellphysiologie von Eukaryonten, einschließlich Säugetieren sein.

D. discoideum hat eine Reihe von weiteren Vorzügen. Das Genom beinhaltet viele Gene und Genfamilien, die starke Homologien zu denen höherer Eukaryonten aufweisen, und die bei anderen eukaryontischen Modellorganismen wie z.B. der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* fehlen. *D. discoideum* ist mit einem haploiden Genom für molekularbiologische Manipulationen leicht zugänglich und internationale Programme zur Bestimmung der Sequenz des Genoms (Genome Project; <http://genome.imb-jena.de/dictyostelium/>) und von exprimierten Genen (cDNA Project; <http://dictycdb.biol.tsukuba.ac.jp/>) sind inzwischen abgeschlossen und erlauben somit einen vollständigen Überblick auf die genetische Information von *D. discoideum*.

Axenische Stämme von *D. discoideum* sind zudem im Labor leicht kultivierbar, lassen sich schnell in grösseren Zellmengen heranziehen und Wildtypen wie auch genetisch veränderte Stämme lassen sich meist in Form von Sporen (oder auch in amöboider Form) längere Zeit unter Kältekonservierung aufbewahren.

In den letzten Jahren etablierte sich *D. discoideum* auch als Modellsystem für intrazelluläre humanpathogene Keime wie Legionellen und Pseudomonaden. Durch die gezielte Ausschaltung von Genen des Wirts bzw. des Parasiten kann man deren Einfluss auf die Pathogenität der Mikroorganismen studieren. Gleichzeitig erlaubt es aber auch, einen Einblick in verschiedene intrazelluläre Mechanismen der Wirtszelle zu gewinnen. Dies betrifft z.B. den Mechanismus der Phagozytose.

1.2.3 Endocytose und phagocytotischer Transit in *D. discoideum*

Die Phagocytose ist ein komplexer Prozess, bei dem eukaryontische Zellen Partikel von über 200 nm Durchmesser einverleiben. *D. discoideum* ernährt sich in der vegetativen Wachstumsphase durch Phagocytose von Bakterien. Phagocytose ist auch in Metazoa bei Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, neutrophilen Granulocyten (Neutrophile) und dendritischen Zellen zu finden, die eingedrungene Mikroorganismen phagocytieren und abtöten.

Bei der Pinocytose handelt es sich um einen weiter verbreiteten zellulären Prozess, welcher die Aufnahme von Flüssigkeit und Makromolekülen umfasst. Im Gegensatz zu der Phagocytose, die nur bei bestimmten eukaryontischen Organismen und Zell-Linien vorkommt, ist die Pinocytose bei vielen eukaryontischen Zellen zu finden. Der Oberbegriff für beide Prozesse ist Endocytose.

In *D. discoideum* sind Phagocytose und Pinocytose unterschiedlich gesteuerte physiologische Prozesse, die jedoch gewisse morphologische Gemeinsamkeiten aufweisen.⁴⁶ Zur Internalisierung von Partikeln und Flüssigkeit wird in beiden Prozessen Aktinpolymerisation induziert. Ein wesentlicher Unterschied ist jedoch, dass die Pinocytose unspezifisch abläuft, die Zelle umschließt sie umgebendes Medium, unabhängig der Substanzen, die sich darin befinden („Zell-Trinken“). Die Phagocytose hingegen ist rezeptorvermittelt.

Der gesamte phagocytotische Prozess in *D. discoideum* kann grob in vier Phasen unterteilt werden: die Internalisierung an der Plasmamembran, eine frühe saure Phase, eine späte neutrale Phase sowie die Exocytose (siehe Abbildung 9).

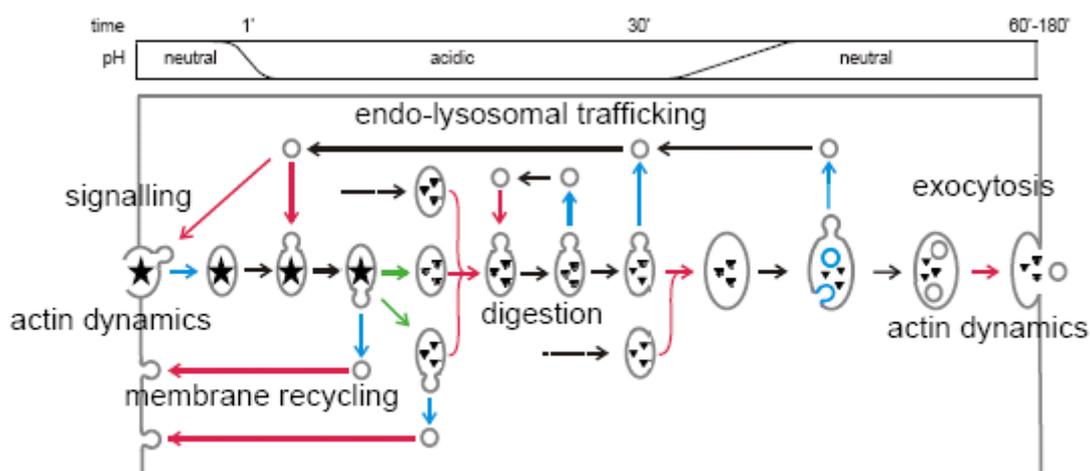


Abb. 9: Der phagocytotische Transit in *D. discoideum*.⁴⁷

Die Internalisierung von Partikeln beginnt mit der Bindung eines Partikels an einen Rezeptor. Dies kann bei *D. discoideum* vermutlich über zwei verschiedene Mechanismen geschehen. Die Bindung an einen glucosespezifischen lektinähnlichen Rezeptor und die Bindung an einen „nicht-spezifischen“ Rezeptor über hydrophobe Interaktionen. Bei dem Transmembranprotein Phg1 handelt es sich um einen Rezeptor vom zweiten Typ. Knock-Out-Mutanten zeigen selektiv Phagozytose-Defekte in Bezug auf protein-coated Latex-Beads, Erythrocyten und *E. coli* Zellen ohne Glucose-Reste an der Oberfläche, *E. coli* K2754 (Vogel et al., 1980).³⁷

Nachdem der Partikel an die Plasmamembran gebunden hat, kommt es zu einer kelchförmigen Ausstülpung, dem sogenannten „phagocytic cup“. Bei der Bildung dieser Ausstülpung spielt die Polymerisation von Aktin eine wichtige Rolle. Die Enden der Ausstülpung verschmelzen miteinander und entlassen das frisch gebildete Phagosom in die Zelle. Die Hülle aus Aktin und Aktin-interagierenden Proteinen bleibt ca. 1 Minute nach Internalisierung bestehen und dissoziiert dann ab. Das Phagosom wird angesäuert und Endosomen fusionieren mit dem Phagosom. Nach dem Töten des einverleibten Mikroorganismus beginnt der Verdau durch lysosomale Enzyme. Diese werden zum weiteren Gebrauch wiederverwendet. Nach ca. 30 - 45 Minuten wird das Phagosom neutralisiert und nach ca. 60 Minuten erfolgt die Exocytose nicht verwertbaren Materials.

Während dieser „Phagosomenreifung“ verändert sich die Protein- und Lipidzusammensetzung der Phagosomenmembran sehr dynamisch. Eine proteomische Aufklärung dieser Reifung ist für *D. discoideum* von Gotthardt et al. publiziert worden.⁴⁷

Sowohl bei der Pinocytose als auch bei der Phagozytose sind Phosphatidylinositolphosphate als Regulatoren involviert. Frühere Annahmen, dass PI3Kinasen ausschliesslich die Pinocytose von *D. discoideum* regulieren,^{46,48} wurden mittlerweile widerlegt.^{49,50,51,52}

Die molekularen Mechanismen der Phagozytose bei *D. discoideum* scheinen Ähnlichkeiten mit denen aufzuweisen, die der Phagozytose bei höheren eukaryontischen Zellen wie neutrophilen Granulocyten oder Makrophagen zugrunde liegen.

Die „host-pathogen-interaction“ während des phagozytotischen Prozesses wird derzeit besonders intensiv für den Erreger der Legionärskrankheit *Legionella pneumophila* untersucht. Bei Makrophagen und *D. discoideum* handelt es sich in beiden Fällen um motile, professionelle Phagozyten und eine Infektion mit *Legionella*-Erregern verläuft sehr ähnlich. In *D. discoideum* wie auch in Makrophagen entwickelt sich ein spezielles Phagosom, das nicht mit Lysosomen fusioniert und auch nicht angesäuert wird, die sogenannte LCV (legionella-containing vacuole). Statt dessen lagern sich zunächst Mitochondrien an das

Phagosom an und nach einigen Stunden ist es von Ribosomen umgeben. *L. pneumophila* vermehrt sich, wird säure-tolerant und bildet ein Flagellum aus. Nach 16 – 20 h fusioniert die Vakuole mit Lysosomen, wodurch vermutlich Nährstoffe bereitgestellt werden. Der Infektionszyklus endet mit einer von *L. pneumophila* induzierten Nekrose der Wirtszelle, dabei werden die Legionellen freigesetzt.

Aktuelle Forschungen konnten zeigen, dass *L. pneumophila* für das Ausbilden der LCV Proteine in den Wirt über ein spezielles Sekretionssystem (Dot/Icm) injiziert. Dieses System ist essentiell für die modifizierte Phagosomenreifung. Es wurden Dot/Icm sekretierte Proteine identifiziert, die spezifisch an PtdIns(4)P binden. Desweiteren gibt es Hinweise, dass *L. pneumophila* den Phosphatidylinositolphosphatmetabolismus des Wirts ausnutzt, um die LCV zu etablieren.⁴⁹

1.2.4 Molekularbiologische Manipulationen von *D. discoideum*, unter besonderer Berücksichtigung von Mutationen im Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsel

Der eukaryontische Organismus *D. discoideum* besitzt Eigenschaften, die ihn für molekularbiologische Manipulationen und für funktionale Genanalysen geeignet machen. Das chromosomale Genom von *D. discoideum* ist haploid und relativ klein (ungefähr 34 Megabasen). Es besteht aus sechs Chromosomen mit einer Grösse von je 4 – 8 Mb; die Genanzahl liegt im Bereich von ca. 12.000. *D. discoideum* besitzt somit ungefähr halb so viele Gene wie der Mensch.

Das Vorkommen einer vegetativen Wachstumsphase und einer strikt davon abgetrennten Differenzierungsphase begünstigen ausserdem sowohl funktionale Analysen von Genen als auch das Studium und die Arbeit mit Stämmen, bei denen sich genetische Defekte erst bei bestimmten Entwicklungszeitpunkten auswirken.

Desweiteren erleichtern bestehende Transformationssysteme, Expressionsvektoren sowie etablierte Methoden der Mutantenselektion die molekularbiologische Arbeit mit *D. discoideum*.

Viele Methoden der molekularbiologischen Manipulation sind mittlerweile auch für *D. discoideum* beschrieben. Hierzu gehören unter anderem die klassische chemische Mutagenese und die REMI-Technik (restriction enzyme mediated integration). Für die chemische

Mutagenese werden mutagene Substanzen wie z.B. Nitrosoguanidin eingesetzt, die ungerichtete Punktmutationen im gesamten Genom verursachen. Die REMI-Technik führt ebenfalls zu ungerichteten Mutationen. Hierbei wird ein Restriktionsenzym zum Transformationsansatz gegeben. Dies führt zu einer Integration der transformierenden Plasmid-DNA an den entsprechenden genomischen Restriktionsschnittstellen.

Der Gen-Knock-Out („gene disruption“) durch homologe Rekombination und die Genabschaltung („gene silencing“) durch Antisense Mutagenese bzw. durch siRNAs (small interfering RNAs) vermittelte RNA-Interferenz stellen hingegen Methoden zur zielgerichteten Inaktivierung eines Gens dar. Im Falle des Gen-Knock-Outs enthält der verwendete Transformationsvektor ein homologes Teilstück des Zielgens und eine Resistenzkassette. Nach Einführung des Vektors in den Zielorganismus kommt es durch homologe Rekombination zur Mutation. Der Prozess der homologen Rekombination spielt eine lebenswichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität in pro- und eukaryontischen Organismen. Dieser natürliche Prozess der Interaktion von homologen DNA-Sequenzen wird in der Biotechnologie häufig ausgenutzt, um bestimmte Gene eines Zielorganismus auszuschalten und entsprechende Knock-Out-Mutanten zu generieren.

Eine weitere Möglichkeit die Expression eines Gens spezifisch zu inhibieren ist die Genabschaltung durch Antisense RNA (asRNA). Die Mechanismen, bei denen zur mRNA komplementäre RNA zum „gene silencing“ führt, sind noch weitgehend unverstanden. Die Vorstellung, dass doppelsträngige Hybride aus asRNA und mRNA nicht translatiert werden können, erwies sich als nicht haltbar. Die doppelsträngige RNA war meist instabil, das heisst die Vorstellung eines einfachen „Abfangens“ der mRNA durch asRNA konnte nicht der eigentliche Grund für die beobachtete Genabschaltung sein. 1998 postulierten Fire et al., dass doppelsträngige RNA (dsRNA), nicht asRNA, das inaktivierende Agens darstellt und prägen den Ausdruck RNA-Interferenz.⁵³ Unter RNA-Interferenz versteht man einen natürlichen Mechanismus, der in eukaryontischen Zellen die Expression von einzelnen Genen hemmt. Sie spielt in der Genregulation, aber auch in der Abwehr von Viren eine bedeutende Rolle. Man geht heute von der Vorstellung aus, dass dsRNA durch eine spezifische RNase („Dicer“) in 21 – 28 Nukleotid lange small interfering RNAs zerlegt wird. Diese kleinen RNAs werden anschliessend in einem Proteinkomplex RISC (RNA induced silencing complex) eingebaut. Nach Entwindung ist RISC spezifiziert zur Degradation der mRNA (siehe Abbildung 10). Die molekularbiologische Forschung setzt mittlerweile synthetisch hergestellte siRNAs zur gezielten Unterdrückung bestimmter Gene ein.

Nellen et al. fassen 2006 die Methoden der Antisense-Mutagenese und der RNA-Interferenz zum „gene silencing“ für den Organismus *D. discoideum* zusammen.⁵⁴

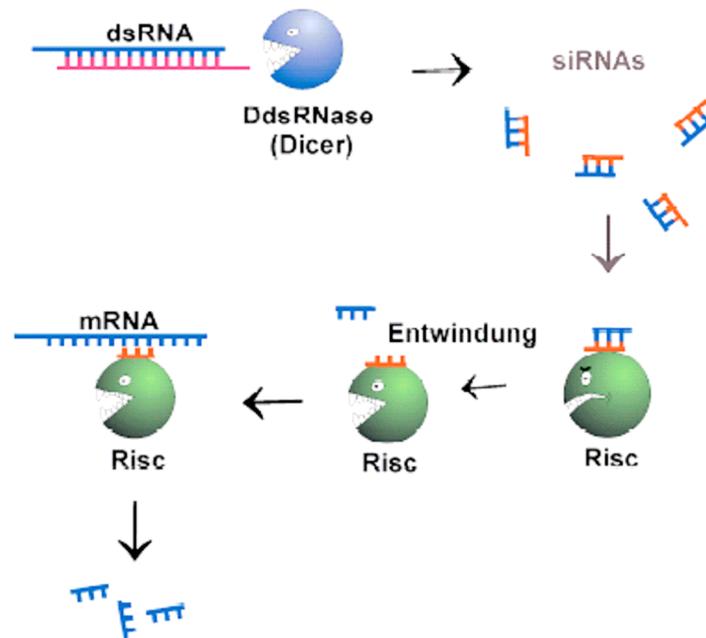


Abb. 10: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz.⁵⁵

Folgende Auflistung gibt einen kurzen Überblick über einige Charakteristika von ausgewählten Mutationen von *D. discoideum* wieder, die Veränderungen im Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsel aufweisen.

Δ Ddpik1 Δ Ddpik2: Wachstums- und Entwicklungsdefekte⁵⁶, deutlich verringerte Level von PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃, stark gestörte Pinocytose.

Langsamere Phagocytoserate und erniedrigte Wachstumsrate auf Bakterien, aber keine Störung der Partikelinternalisierung, vermutlich Defekte der Phagosomenreifung, vergleichbar mit der Mutante **Δ Ddpkb** und der Behandlung mit **PI3Kinase-Inhibitoren**.^{50,57,58}

Δ Dd5p4: Ausgeschaltete Dephosphorylierung von PtdIns(3,4,5)P₃ zu PtdIns(3,4)P₂; verringerte Phagocytose, vermutlich aufgrund gestörtes Schliessen des phagocytic cup.⁵⁹

Forschungen an neutrophilen HL-60 Zellen konnten zeigen, dass am phagocytic cup lokalisiertes PtdIns(3,4,5)P₃ ursächlich für das Schliessen des Phagosoms verantwortlich ist. Desweiteren wird berichtet, dass die Phosphatidylinositolphosphate PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ nicht an der Partikelbindung und der Bildung des phagocytic cup involviert sind. Experimente mit HL-60 Neutrophilen und Makrophagen, die mit dem PI3Kinase-Inhibitor LY294002 behandelt wurden, zeigen konsistente Ergebnisse.^{60,61,62} Ein vergleichbarer Zusammenhang konnte auch beim Organismus *D. discoideum* beobachtet werden. Δ Dd5p4 Zellen formen weiterhin einen phagocytic cup aus und PtdIns(3,4,5)P₃ wird in der Mutante normal produziert, aber der phagocytic cup schliesst sich nicht. Van Haastert et al. schlussfolgern, dass der durch die 5-Phosphatase Dd5p4 katalysierte Abbau von PtdIns(3,4,5)P₃ zu PtdIns(3,4)P₂ essentiell für das Schliessen des phagocytic cup ist.⁵⁹

Δ Ddptn: Keine Zellaggregation, reduzierte Chemotaxis mit ungerichteter Pseudopodien-Ausbildung.⁶³

Ein Enzym, das der PI3Kinase Typ I entgegenwirkt, ist die PtdInsPx-3-Phosphatase PTEN. PTEN dephosphoryliert PtdIns(3,4,5)P₃ und stellt insofern einen Tumorsuppressor dar, da es der PI3K und folglich der PKB im PI3K/PKB-Signalweg entgegenwirkt.

Der Phänotyp der Δ Ddptn - Mutante von *D. discoideum* zeigt zudem die wichtige Rolle von PTEN bei dem Prozess der Chemotaxis auf. Δ Ddptn Zellen wandern langsamer und besitzen eine deutliche geringere Ausrichtungsfähigkeit gegenüber dem chemotaktischen Signal (Pseudopodien erscheinen auch an den Seiten und der Rückseite). Ein lokaler Anstieg von PtdIns(3,4,5)P₃ an der „leading edge“, vermittelt durch das Zusammenspiel von PI3K und PTEN, wird als entscheidend angesehen, die Zellpolarität bei chemotaktisch aktiven Zellen zu induzieren.⁶⁴

2003 berichten Devreotes et al. von einer Regulation der Chemotaxis von *D. discoideum* durch das hochphosphorylierte Inositolpyrophosphat InsP₇. Es wird vermutet, dass InsP₇ in Konkurrenz mit PtdIns(3,4,5)P₃ um PH-Domänen enthaltende Proteine steht. Die Erniedrigung des InsP₇-Gehalts durch den Knock-Out des InsP₆-Kinase Gens verursachte in

Δ Ddinsp6k Zellen eine schnelle Aggregation und eine erhöhte chemotaktische Sensitivität gegenüber cAMP.⁶⁵

Es wird deutlich, dass sich Mutationen des Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsels signifikant auf den Phänotyp von *D. discoideum* auswirken. Als professioneller Phagocyt, chemotaktisch aktiver und unter Hungerbedingungen sich differenzierender Organismus kann man von einem komplexen und strikt regulierten Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsel bei *D. discoideum* ausgehen. Die angeführten Beispiele der Doppelmutante Δ Ddpik1 Δ Ddpik2, der Δ Dd5p4 Mutante und der Δ Ddptn Mutante belegen die entscheidende Rolle von Phosphatidylinositolphosphaten bei zellulären Prozessen wie Endocytose oder Chemotaxis.

Desweiteren zeigen sowohl Forschungen mit pathogenen Keimen sowie mit PtdInsPx-spezifischen Proteinbindedomänen als auch Manipulationen des Phosphatidylinositolphosphatstoffwechsels durch genetische Mutationen oder Behandlung mit spezifischen Inhibitoren die besondere Stellung der 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphatmetabolite, insbesondere bei phagocytotischen Prozessen.^{49,50,52,57,58,59}

2 Aufgabenstellung

Die physiologischen Funktionen von Phosphatidylinositolphosphat-3-Phosphatasen im Modellorganismus *D. discoideum* sind derzeit noch weitestgehend ungeklärt. In *D. discoideum* ist bisher lediglich die Δ Ddptn - Mutante generiert und charakterisiert worden. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung einer mytotubularinartigen Phosphatidylinositolphosphat-3-Phosphatase und die Aufklärung deren physiologischen Rolle.

Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit sind:

A) Quantitative und qualitative Analytik von Phosphatidylinositolphosphaten in *D. discoideum*.

Ziel ist es, über hochauflösende Ionenchromatographie in Kombination mit Leitfähigkeitsdetektion (HPIC-CD), die Gehalte und die Verteilung der in vegetativen *D. discoideum* Zellen vorkommenden Phosphatidylinositolphosphatisomere zu bestimmen. Es soll untersucht werden, welche Phosphatidylinositolphosphatkonzentrationen in *D. discoideum* während der exponentiellen Wachstumsphase vorliegen, ob sich die Phosphatidylinositolphosphatzusammensetzung unter Verwendung verschiedener Nährmedien ändert und ob sich daraus evtl. Rückschlüsse auf die physiologische Bedeutung ziehen lassen.

Die HPIC-CD-Analytik sollte zudem zur näheren Untersuchung einer *myo*-inositol-auxotrophen Mutante verwendet werden, die in diesem Arbeitskreis generiert wurde.⁶⁶

B) Untersuchungen zu einer 3-dephosphorylierenden Phosphatidylinositolphosphat-Phosphatase in *D. discoideum*.

Es soll die physiologische Rolle einer PtdInsPx-3-Phosphatase mittels funktionaler Genanalytik untersucht werden. Ziel ist eine gezielte Geninaktivierung und Generierung von

Aufgabenstellung

Mutantenstämmen über homologe Rekombination bzw. über Antisense-Technik, sowie deren phänotypische Charakterisierung.

Welche Auswirkungen hat die Inaktivierung dieser PtdInsPx-3-Phosphatase auf die steady-state-Konzentrationen von inositolhaltigen Metaboliten ?

Treten beobachtbare Veränderungen bei zellulären Prozessen auf und lassen sich diese evtl. mit Metabolit- oder Enzymaktivitätsänderungen korrelieren ?

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeine Angaben

Verwendete Geräte:

Elektroporation:	Electroporator 2510, Eppendorf
Fluoreszenzmessung:	Spectrofluorimeter RF-510, Shimadzu
Gefriertrocknung:	CHRIST Alpha-Apparatur, angeschlossen an eine Chemie-Hybrid-Pumpe Vacuubrand RC 5
Photometer:	BIO RAD Model 450 Microplate Reader; Lambda 40 UV/VIS Spektrometer, Perkin Elmer
Polymerasekettenreaktion:	Tpersonal Thermocycler, Biometra
Reinstwasser:	Milli-Q Synthesis A 10, Millipore
UV-Photometer:	Uvicord SII, Pharmacia LKB
Zellzählung:	Partikelzählgerät Coulter Counter Modell Z2, Coulter Electronics
Zentrifugen:	Heraeus Variofuge K; Beckmann J2-21, Rotor JA10; Beckmann Ultrazentrifuge L7-55, Rotor 70Ti

Verwendete Medien und Nährböden:

HL-5 Medium:

Fleischpepton	14.3 g/l
Hefeextrakt	7.15 g/l
Glucose-Monohydrat	15.4 g/l
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0.64 g/l
KH ₂ PO ₄	0.48 g/l
Dihydrostreptomycin · 3/2H ₂ SO ₄	0.25 g/l

FM Medium:

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

Stocklösungen des FM-Mediums:

Aminosäurelösung:		Salzlösung:		Vitaminlösung:	
NaOH	0.4 g/l	NH ₄ Cl	2.675 g/l	Biotin	2.0 mg/l
Arginin	3.5 g/l	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.147 g/l	Folsäure	20.0 mg/l
Asparagin	1.5 g/l	FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.350 g/l	Cyanocobalamin	0.5 mg/l
Cystein	1.0 g/l	MgCl ₂ · 6H ₂ O	4.070 g/l	Liponsäure	40.0 mg/l
Glutamat	2.5 g/l			Riboflavin	50.0 mg/l
Glycin	4.5 g/l			Thiamin · HCl	60.0 mg/l
Histidin	1.5 g/l			Einstellung von pH 7.0	
Isoleucin	3.0 g/l	Spurenelementlösung:			
Leucin	4.5 g/l	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	48.4 g/l		
Lysin	4.5 g/l	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	23.0 g/l		
Methionin	1.5 g/l	H ₃ BO ₃	11.1 g/l		
Phenylalanin	2.5 g/l	MnCl ₂ · 4H ₂ O	5.10 g/l		
Prolin	4.0 g/l	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.70 g/l		
Threonin	2.5 g/l	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.50 g/l		
Tryptophan	1.0 g/l	Ammoniummolybdat	1.00 g/l		
Valin	3.5 g/l	Einstellung von pH 6.5			

SM-Agar:

Bacto-Pepton	1.0 % (w/v)	KH ₂ PO ₄	16.2 mM
Hefeextrakt	0.1 % (w/v)	K ₂ HPO ₄	5.25 mM
D(+)-Glucose-Monohydrat	50 mM	Agar	1 % (w/v)
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.05 mM		

Wasseragar:

KH ₂ PO ₄	14.67 mM
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	2.83 mM
Agar	15 g/l

LB-Medium:

[g/l]	
Bacto-Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	10
	pH 7.2

LB-Agar:

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

KB-Medium:

Bacto-Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
D(+)-Glucose-Monohydrat	10 g/l

SOC-Medium:

Bacto-Trypton	2 %(w/v)
Hefeextrakt	0.5%(w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM

Nach Autoklavieren, Zugabe von:

MgCl ₂	10 mM
Glucose	20 mM

Verwendete Chemikalien:

Die folgende Liste enthält alle nicht standardmässig eingesetzten Chemikalien und Enzyme bzw. Fertig-Kits und ihre Bezugsquellen.

A) Referenzsubstanzen

Echelon Research Laboratories Inc. (Salt Lake City, USA):

PtdIns, Dioctanoyl und Dihexadecanoyl (P-0008 und P-0016)
PtdIns(3)P, Dioctanoyl und Dihexadecanoyl (P-3008 und P-3016)
PtdIns(4)P, Dioctanoyl und Dihexadecanoyl (P-4008 und P-4016)
PtdIns(5)P, Dioctanoyl und Dihexadecanoyl (P-5008 und P-5016)
PtdIns(3,4)P₂, Dioctanoyl und Dihexadecanoyl (P-3408 und P-3416)
PtdIns(4,5)P₂, Dioctanoyl und Dihexadecanoyl (P-4508 und P-4516)
PtdIns(3,5)P₂, Dioctanoyl und Dihexadecanoyl (P-3508 und P-3516)
PtdIns(3,4,5)P₃, Dioctanoyl und Dihexadecanoyl (P-3908 und P-3916)

Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf:

1,3-Bisphosphatidylglycerin (Cardiolipin, C 0563)
Glycero-3-Phosphat (G 7886)
L- α -Phosphatidylcholin, Dipalmitoyl (P 4329)
L- α -Phosphatidylethanolamin, Dipalmitoyl (P 1348)
L- α -Phosphatidyl-L-Serin, Dipalmitoyl (P 1185)
Myo-Inositol (57569)

B) Chemikalien

Agar	Invitrogen GmbH, Karlsruhe; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Amberlite MB-3	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach
Aminosäuren	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf
Bacto-Pepton; Bacto-Trypton	Oxoid GmbH, Wesel
Blasticidin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Material und Methoden

Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
cAMP	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf
Dihydrostreptomycin	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf
DNA-Längenstandard (100 – 5000 bp)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
dNTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
FITC-Dextran	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf
Fleischpepton	Gibco; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Folsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Geneticin (G418)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid GmbH, Wesel
IPTG	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
PEG 8000	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Polystyrolbeads (1 µM)	Polysciences, Inc., Warrington, USA
Malachitgrün-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf
PAR	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf
Thimerosal	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf
X-Gal	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Xylencyanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

C) Für molekularbiologische Arbeiten verwendete Enzyme bzw. Kits

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNeasy Plant Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Hot Star <i>Taq</i> Master Mix Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; New England Biolabs, Inc., Beverly, USA; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4 DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Vent</i> -DNA-Polymerase	New England Biolabs, Inc., Beverly, USA

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Anzucht, Kultivierung und Sporengewinnung von *D. discoideum*

In der vorliegenden Arbeit wurde der axenisch wachsende Stamm AX2 (ATCC: 24397) als Elternstamm verwendet.³⁶ Der Stamm AX2 wächst auch in einem bakterienfreiem Nährmedium (axenisches Medium). Die einfache Handhabung dieser Flüssigkulturen erlaubt es, grössere Zellmengen heranzuziehen.

Die Zellen wurden entweder in einem voll-synthetischem Minimalmedium (leicht modifiziertes FM Medium³⁵), in einem semi-synthetischem Pepton-Hefeextrakt Medium (HL-5 Medium, nach Watts, Ashworth³⁶) oder mit Bakterien als Nahrungsquelle kultiviert.

Die Anzucht erfolgte aus Sporen, die bei -20 °C in steriler Glycerinlösung (20 % (v/v) in 17 mM Phosphatpuffer pH 6.5 (Sörensen-Puffer)) gelagert wurden. Die Germination erfolgte nach zweimaliger Waschung mit Sörensen-Puffer in Gewebekulturflaschen (50 ml, 25 cm² Grundfläche), gefüllt mit 4 ml axenischem Medium, innerhalb von 2 – 3 Tagen.

3.2.1.1 Axenische Kulturen

Beide Flüssigmedien wurden in 1 Liter-Glasgefäßen 14 min bei 120 °C autoklaviert und anschließend abgedunkelt gelagert.

Anzucht und Inkubation erfolgten unter Standardbedingungen auf einem Rundschüttler (120 Upm) bei 22 °C. Als Kulturgefäße dienten Erlenmeyerkolben (100 – 1000 ml) oder Fernbachkolben (1200 bzw. 3000 ml). Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung 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 $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml gehalten. Die Verdopplungszeit betrug in der logarithmischen Wachstumsphase ungefähr 10 – 11 h bei Verwendung des HL-5 Mediums und ca. 12 – 13 h bei Verwendung des FM Mediums.

Die Zellernte erfolgte standardmässig durch 10minütige Zentrifugation bei 4 °C und 500 g. Die geernteten Zellen wurden unter gleichen Zentrifugationsbedingungen zweimal mit adäquaten Mengen Sörensen-Puffer nachgewaschen.

Zur besseren mikroskopischen Betrachtung von *D. discoideum* – Zellen an adhäsiven Oberflächen wurden Zellen auch in submersen Standkulturen bei 22 °C kultiviert. Befüllt waren die Gewebekulturflaschen für eine ausreichende Sauerstoffversorgung mit 4 ml axenischem Medium (HL-5 bzw. FM). Nach Erreichen eines geschlossenen Monolayers wurden die Kulturflaschen über Nacht geschüttelt und die Zellsuspension verdünnt.

3.2.1.2 Kultivierung auf Bakterienplatten

Die Kultivierung von *D. discoideum* erfolgte auch auf Bakterienplatten. Diese Methode wurde auch zur Gewinnung von Sporen verwendet. Als Nahrungsquelle diente hierfür der Bakterienstamm *E. coli* B/r (ATCC: 6573) (Gerisch, 1959).⁶⁷ Es wurden 200 µl einer dichten *E. coli* B/r – Suspension und eine adäquate Menge *D. discoideum* – Zellen in Sörensen-Puffer auf SM-Agar-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden unter relativ feuchten Bedingungen bei 22 °C im Brutschrank inkubiert. *D. discoideum* – Kolonien zeigten sich nach ca. 3 – 5 Tagen als klare Fresshöfe (Plaques) auf dem Bakterienrasen. Eine längere Inkubation führte schliesslich zum vollständigen Verzehr der Bakterien und zum Ausdifferenzieren von *D. discoideum*. Nach abgeschlossener Differenzierung wurden die erhaltenen Sporen durch Abschlagen geerntet und in 1 ml der unter Punkt 3.2.1 beschriebenen sterilfiltrierten Glycerin-Lösung aufgenommen. Die Aliquots wurden bei – 20 °C eingefroren und waren unter diesen Bedingungen ohne Vitalitätsverlust mehrere Jahre haltbar.

3.2.1.3 Inkubation auf Wasseragarplatten zur Gewinnung von Sporen

Eine bakterienfreie Alternative zur Gewinnung von Sporen ist die Inkubation auf Wasseragarplatten. Dazu wurden $2 - 5 * 10^8$ *D. discoideum* – Zellen in Sörensen-Puffer auf Wasseragarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte analog wie unter Punkt 3.2.1.2 beschrieben bei 22 °C. Eine längere Inkubation führte schliesslich zum vollständigen Ausdifferenzieren von *D. discoideum*. Die nachfolgende Sporenernte ist ebenfalls analog zu Punkt 3.2.1.2.

3.2.1.4 Kultivierung in Bakteriensuspension

100 ml KB-Medium wurden mit einer Impföse *E. coli* B/r angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem 1000 ml Schikanekolben auf einem Rundschtüttler (180 Upm) inkubiert (OD₄₂₀ von ca. 5 – 8).

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5000 g, 4 °C, 10 min) und zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen. Zur Anzucht von *D. discoideum* wurden 1·10⁵ Zellen/ml in Gegenwart von *E. coli* B/r (1·10¹⁰ Zellen/ml) in Sörensen-Puffer inkubiert (Verwendung von Kulturgefässen und Inkubationsbedingungen analog wie unter Punkt 3.2.1.1 für axenische Medien beschrieben). Die Generationszeit betrug hierbei ca. 2 – 3 h. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation (500 g, 4 °C, 10 min). Um restliche Bakterien zu entfernen, wurde viermal mit einer adäquaten Menge Sörensen-Puffer gewaschen.

3.2.2 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 Schüttler (Vortex) schonend resuspendiert. Die Bestimmung der Zelldichte und der Zellgrößenverteilung erfolgte über ein Partikelzählgerät (Coulter Counter Modell Z2, Coulter Electronics GmbH, Krefeld) mit nachgeschalteter elektronischer Datenauswertung (Coulter Z2 AccuComp Version 3.01a).

3.2.3 Phagocytosetest

Die Durchführung der Phagocytosetests ist angelehnt an etablierte Methoden der Quantifizierung der endocytotischen Aufnahme (Vogel, Methods in Cell Biology).⁶⁸

Als Modellpartikel wurden hydrophile carboxylierte Polystyrolbeads mit 1 µm Durchmesser (Polysciences, Inc.) verwendet. *D. discoideum* wurde in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet (500 g, 4 °C, 10 min), dreimal mit Sörensen-Puffer gewaschen, auf eine Zelldichte von 5·10⁶ Zellen/ml in axenischem Medium resuspendiert und vorinkubiert (22 °C, 120 Upm). Nach ca. 30 min erfolgte die Zugabe der Polystyrolbeads, so dass sich eine Relation

von rund 200 Partikeln pro Zelle ergab. Zu definierten Zeitpunkten wurde die Phagozytose gestoppt, indem je 1 ml Zellsuspension in ein Reagenzglas mit 2 ml eiskaltem Sörensen-Puffer pipettiert wurde.

Um nicht internalisierte, an der Oberfläche der Zellen haftende Partikel zu entfernen, erfolgte anschliessend eine Zentrifugation der Zellsuspension durch 10 ml einer 20 %igen (w/w) PEG-8000-Lösung (2000 g, 4 °C, 10 min). Das Zellpellet wurde dreimal mit eiskaltem Sörensen-Puffer gewaschen (500 g, 4 °C, 10 min) und in 2 ml 50 mM Na₂HPO₄ (pH 9.2) resuspendiert. Nach Bestimmung der Zelldichte wurden die Zellen durch Zugabe von Triton X-100 lysiert (0.2 % (v/v) Endkonzentration). Nach erfolgter Lyse wurde die Lichtstreuung bei 560 nm gemessen. Um die Anzahl internalisierter Partikel zu quantifizieren, wurden für definierte Partikelkonzentrationen die Lichtstreuung gemessen und daraus eine Kalibrierkurve ermittelt.

3.2.4 Pinocytosetest

Als Indikator zur Messung der Pinocytose wurde fluoreszenzmarkiertes Dextran (FITC Dextran) der Firma Sigma-Aldrich verwendet. *D. discoideum* wurde in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet (500 g, 4 °C, 10 min), dreimal mit Sörensen-Puffer gewaschen, auf eine Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in axenischem Medium resuspendiert und vorinkubiert (22 °C, 120 Upm). Nach ca. 30 min erfolgte die Zugabe von FITC-Dextran (Endkonzentration von 2 mg/ml).

Zu definierten Zeitpunkten wurde die Pinocytose gestoppt, indem je 1 ml Zellsuspension in ein Reagenzglas mit 5 ml eiskaltem Sörensen-Puffer pipettiert wurde. Die Proben wurden zentrifugiert (500 g, 4 °C, 10 min) und dreimal mit eiskaltem Sörensen-Puffer nachgewaschen. Anschliessend wurde das Zellpellet in 2 ml 50 mM Na₂HPO₄ (pH 9.2) resuspendiert. Nach Bestimmung der Zelldichte wurden die Zellen durch Zugabe von Triton X-100 lysiert (0.2 % (v/v) Endkonzentration). Nach nochmaliger Zentrifugation zur Entfernung störender Partikel (2000 g, 4 °C, 10 min) wurde die Fluoreszenz der Probenüberstände bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen (Spectrofluorimeter RF-510, Shimadzu). Die Quantifizierung der pinocytotisch aufgenommenen Flüssigkeitsmengen erfolgte durch Vergleich mit einer Kalibrierkurve.

3.2.5 Chemotaxis

Zur Bestimmung der Chemotaxis wurde der einfach durchzuführende „Well-Assay“ nach der Methode von Wallace und Frazier benutzt.⁶⁹ 10 ml einer 2 %igen (w/w) Agarlösung wurden in eine Petrischale von 9.2 cm Durchmesser (Standardausführung der von Sarstedt bezogenen Petrischalen) gefüllt. Ein Loch mit einem Durchmesser von ca. 6 mm wurde in der Mitte ausgestanzt und mit der entsprechenden chemotaktischen Lösung befüllt. Als chemotaktische Lösungen wurden cAMP- und Folsäure - Lösungen im Konzentrationsbereich von 0 – 250 μ M verwendet. Danach wurden je 1 μ l einer $2 \cdot 10^8$ Zellen/ml dichten Zellsuspension in Sörensen-Puffer in verschiedenen Abständen und Winkeln zum Zentrum auf die Agarplatte pipettiert. Nach ca. 3 – 4 h konnten die Platten mikroskopisch ausgewertet werden.

3.2.6 Adhäsion

4 ml einer axenischen Zellkultur resuspendiert auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden in eine 50 ml Gewebekulturflasche überführt. Nach zehnmütigem Schütteln (120 Upm, 22 °C) zur Erholung der Zellen wurde 40 min ohne Schütteln inkubiert. Anschliessend wurden die Kulturflaschen 3 min bei 120 Upm geschüttelt. Der prozentuale Anteil nicht-adhäsiver Zellen wurde durch Bestimmung der Zelldichte im Überstand ermittelt.

3.2.7 Aggregation in Sörensen-Puffer

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet (500 g, 4 °C, 10 min), einmal mit Sörensen-Puffer gewaschen, in Sörensen-Puffer zu einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert und bei 120 Upm und 22 °C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Partikelzahl bestimmt. Die Aggregation wurde durch Bestimmung der Abnahme von einzeln vorliegenden Zellen gemessen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung genomischer DNA aus *D. discoideum*

Die Isolierung genomischer DNA aus *D. discoideum* erfolgte mit Hilfe des „DNeasy Plant Mini Kits“ bzw. bei grösseren Zellmengen mit dem „DNeasy Plant Maxi Kit“. Mit beiden Fertigungskits der Firma Qiagen wurde gemäss den Herstellerangaben gearbeitet.

Die Quantifizierung der aufgereinigten genomischen DNA erfolgte spektralphotometrisch bei 260 nm. Eine OD_{260 nm} von 1 entspricht etwa 50 µg/ml DNA. Der Grad der Verunreinigung mit Proteinen kann über den Quotienten OD_{260 nm} / OD_{280 nm} ermittelt werden. Ist dieser Quotient nahe 1.8, kann von einer reinen DNA-Probe ausgegangen werden.

3.3.2 Verwendete Primer und PCR

Die in dieser Arbeit benutzten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Die gelieferten Primerlösungen wurden standardmässig auf eine Konzentration von 30 pmol/µl verdünnt.

HRAM1: 5' - GTA **AAG** CTT CAT TAA ATT TAG TTA ATC C – 3'

28 bp, T_M: 56.3 °C

HRAM2: 5' - GAT TTT **GAA** TTC TAT CTT TTT CAC AAT T – 3'

28 bp, T_M: 54.9 °C

Diesen beiden Primer wurden für die Amplifikation eines ca. 1.7 kb grossen DNA-Abschnitts mit zwei Restriktionsschnittstellen an den Enden aus dem *D. discoideum* Gen DDB0190271 benutzt. Die fett markierten Buchstaben kennzeichnen die Restriktionsschnittstellen (HRAM1: *Hind*III sowie HRAM2: *Eco*RI). Hierfür musste im Falle des HRAM1-Primers die Base Adenin gegen Guanin ausgetauscht werden (unterstrichener Buchstabe).

BlaAM1: 5' - CTC AAC AAG ATC TAG AAT TAG TAG AAG – 3'

27 bp, T_M : 58.9 °C

BlaAM2: 5' - GGC TGT TTT ACA TCT AAT GCA TAT ATT – 3'

27 bp, T_M : 57.4 °C

Die beiden BlaAM-Primer dienten zur Detektion der ca. 1.4 kb grossen Blasticidinkassette (*Bam*HI-*Hind*III-Fragment aus pUCBsr Δ Bam) durch Amplifizierung eines ca. 1.0 kb grossen DNA-Abschnitts aus dieser Kassette. Ein Basenaustausch wurde nicht vorgenommen.

Die PCR wurde in einem Tpersonal Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt. Als DNA-Polymerasen wurden die *Vent*DNA-Polymerase der Firma New England Biolabs und die *Taq*DNA-Polymerase, in Kombination zusammen mit dem „Hot Star *Taq* Master Mix Kit“, der Firma Qiagen benutzt.

Ein typischer PCR-Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

***Vent*DNA-Polymerase:**

Reaktionspuffer (10x)	5 μ l
Template-DNA	5 – 10 ng/50 μ l
DNA-Polymerase	1 U/50 μ l
dNTP	0.2 mM
Primer	1.2 μ M

Mit Wasser auf 50 μ l aufgefüllt.

Der vom Hersteller New England Biolabs mitgelieferte Reaktionspuffer beinhaltet gleichzeitig auch MgSO₄ (2 mM Endkonzentration im PCR-Ansatz).

***Taq*DNA-Polymerase in Kombination mit Hot Star Master Mix Kit:**

Master Mix	25 μ l
Template-DNA	5 – 10 ng/50 μ l
Primer	1.2 μ M

Mit Wasser auf 50 μ l aufgefüllt.

Die Master Mix Lösung beinhaltet als Komponenten neben dem Reaktionspuffer auch die DNA-Polymerase, die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) und Mg²⁺ - Ionen in optimierten Standardkonzentrationen.

Das PCR-Programm setzte sich aus folgenden Teilschritten zusammen:

- 1) **Initiierende Aktivierung:** 15 min, 95 °C (Hot Star Master Mix)
2 min, 95 °C (*Vent*DNA-Polymerase)

- 2) **3-Schritt-Zyklus:**
Denaturierung: 1 min, 94 °C
Annealing: 1 min, 46 °C (HRAM-Primer) bzw.
1 min, 50 °C (BlaAM-Primer)
Extension: 1 min/1000 bp, 72 °C
Anzahl der Zyklen: 30

- 3) **Finale Extension:** 10 min, 72 °C

Für PCR-Produkte über 2 kb wurde die Extensionszeit auf 2 min/1000 bp verlängert. Desweiteren wurde die Extensionstemperatur von 72 °C auf 68 °C erniedrigt. Auch war es notwendig, die beigefügte DNA-Polymerase-Menge pro PCR-Ansatz von 1 U/50 µl auf 5 U/50 µl zu erhöhen. Diese modifizierte Prozedur zur Amplifikation längerer PCR-Produkte (2 – 5 kb) wird von Herstellern von PCR-Materialien empfohlen.

3.3.3 Verwendete Plasmide

pUC18: Herkunft: Fermentas; Vieira et al., 1982⁷⁰

pUCBsrΔBam: Herkunft: A. Noegel (Universität Köln); Adachi et al., 1994⁷¹

pDexRH Herkunft: A. Noegel (Universität Köln); Faix et al., 1992⁷²

3.3.4 Verwendeter *E. coli* - Stamm zur Transformation

***E. coli* DH5 α**

Genotyp: F⁻, ϕ 80 Δ lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

In *E. coli* DH5 α ist das *lacZ* – Gen defekt, somit kann dieser Stamm bei Verwendung von pUC18-Plasmiden für Blau-Weiss-Selektionen benutzt werden.

Die Anzucht von *E. coli* DH5 α und plasmidtragender Stämme erfolgte entweder in LB-Medium (Luria-Bertoni-Medium) oder auf LB-Agarplatten. Als Kulturgefäße dienten Schikanekolben (100 – 1000 ml). Um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurden diese nur mit maximal 10 % des Nennvolumens befüllt. Die Inkubation erfolgte standardmässig auf einem Rundschüttler bei 37 °C und 180 Upm. Plasmidtragende Stämme wurden stets unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert. Dauerkulturen wurden in LB-Medium (versetzt mit 30 % Glycerin (v/v)) bei -20 °C gelagert.

3.3.5 Herstellung von kompetenten Bakterien und Transformation

Transformationskompetente *E. coli* DH5 α – Zellen wurden nach der „Frozen Storage III“ – Methode nach Hanahan⁷³ hergestellt. Aliquots von je 200 μ l wurden entnommen und sofort in fl. Stickstoff eingefroren. Die aliquotierten und bei – 80 °C aufbewahrten Zellen wurden nach langsamen Auftauen auf Eis direkt zur Transformation eingesetzt. Zur Transformation wurden 1 – 10 μ l DNA zugesetzt, 60 min auf Eis inkubiert und alle 15 min vorsichtig gemischt. Anschliessend wurden die Zellen für 90 sec bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und dann erneut auf Eis gekühlt. Danach wurden 800 μ l SOC-Medium zugesetzt und 1 h bei 37 °C geschüttelt (180 Upm). Aliquots der Zellsuspension wurden auf selektiven LB-Agarplatten (z.B. 100 μ g/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.6 Generierung des Vektors zur homologen Rekombination

Ein Replikationsvektor (AM01; 4.4 kb) wurde durch „sticky-end-ligation“ des ca. 1.7 kb grossen DNA-Abschnitts aus dem *D. discoideum* Gen DDB0190271 über die *EcoRI*- und *HindIII*-sites in den pUC18-Vektor (2.7 kb) konstruiert. Die Ligation wurde mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ der Firma Fermentas durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Ligationsprotokolle des Herstellers benutzt. Die pUC18-Vektor-DNA Menge pro Ansatz betrug üblicherweise ca. 10 ng, die Insert-DNA Menge entsprach mindestens dem 4 – 5 fachen der Vektor-DNA (ca. 40 – 100 ng). Als Ligase wurde eine T4 DNA Ligase verwendet. Der Ligationsansatz konnte direkt in kompetente *E. coli* DH5 α – Zellen transformiert werden. Die Ausplattierung und Klonierung erfolgte auf blau-weiss-selektiven LB-Agarplatten (100 μ g/ml Ampicillin; 50 μ l 0.1 M IPTG und 100 μ l X-Gal (20 mg/ml DMSO) pro Platte). Die farblosen Kolonien wurden gepickt und angezchtet. Nach der Plasmidisolierung erfolgte die Identifizierung des Vektors AM01 über Agarosegelelektrophorese und enzymatischem Verdau.

Der Transformationsvektor zum Gen-Knock-Out (AM02; 5.8 kb) wurde durch „blunt-end-ligation“ des 1.4 kb grossen *BamHI-HindIII*-Fragments aus pUCBsr Δ Bam, das das Gen für die Blastocin-S-Deaminase aus *Bacillus cereus* unter Kontrolle des Aktin 15-Promotors und des Aktin 8-Terminators enthält, in die *XmiI*-site von AM01 konstruiert. Für die „blunt-end-ligation“ war es notwendig, zunächst die Überhänge sowohl des *BamHI-HindIII*-Fragments als auch des mit *XmiI* linearisierten AM01 Vektors zu entfernen. Hierfür wurde eine T4 DNA Polymerase (Fermentas) benutzt. Die Ansätze wurden mittels entsprechender Standardreaktionsprotokolle der Firma Fermentas durchgeführt.

In einem typischen Reaktionsansatz zur Entfernung von 5' oder 3' - Überhängen wurden ca. 1 μ g DNA mit 2 U T4 DNA Polymerase und 4 μ l Reaktionspuffer (5x) versetzt, und mit Wasser auf 20 μ l aufgefüllt. Anschliessend erfolgte eine Zugabe von 2 μ l 5 mM dNTP-Lösung und eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch 10 minütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Aufgereinigt wurde nach Punkt 3.3.10.

Danach wurde der mit *XmiI* linearisierte und „glatte“ AM01 Vektor zur Vermeidung einer Religation dephosphoryliert. Hierfür wurde eine alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) der Firma Fermentas benutzt. 5 μ g linearisierte Vektor-DNA wurden mit 5 μ l

Reaktionspuffer (10x) versetzt und mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Anschliessend erfolgte eine Zugabe von 3 U CIAP und eine 30 minütige Inkubation bei 37 °C. Danach wurde die Reaktion durch 15 minütiges Erhitzen bei 85 °C gestoppt und der dephosphorylierte Vektor nach Punkt 3.3.10 aufgereinigt.

Die anschliessende Ligation und Transformation wurden prinzipiell analog wie für den Replikationsvektor beschrieben durchgeführt. Eine Modifizierung der Ligationsbedingungen musste aufgrund der glatten Enden vorgenommen werden (siehe Fermentas-Protokolle zu „Rapid DNA Ligation Kit“ und T4 DNA Ligase).

Die transformierten *E. coli* DH5α – Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Da eine Blau-Weiss-Selektion in diesem Fall nicht möglich war, wurde eine gewisse Anzahl von Kolonien (20 – 30 pro Ansatz) gepickt und angezchtet. Die Identifizierung von AM02 erfolgte ebenfalls über Agarosegelelektrophorese und enzymatischem Verdau. Zusätzlich wurde die Existenz der Blasticidinkassette in AM02 über PCR unter Verwendung der BlaAM-Primer nachgewiesen.

3.3.7 Generierung des Vektors zur Antisense-Mutagenese

Das *EcoRI-HindIII*-Fragment aus AM01 (1.7 kb; siehe Punkt 3.3.6) wurde durch „sticky-end-ligation“ in Antisense-Orientierung in den Vektor pDexRH (5.2 kb) eingefügt. Die Antisense-Orientierung ergab sich zwangsläufig aufgrund der Positionen der Restriktionsschnittstellen von *EcoRI* und *HindIII* im pDexRH-Vektor. Nach erfolgter Ligation unter Standardreaktionsbedingungen (siehe Punkt 3.3.6) wurde in kompetente *E. coli* DH5α – Zellen transformiert. Der resultierende Vektor AM03 (6.9 kb) wurde durch Agarosegelelektrophorese und enzymatischem Verdau identifiziert.

3.3.8 Enzymatischer Verdau von DNA

In einer Standardreaktion wurden ca. 500 ng Plasmid-DNA mit 10 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease umgesetzt. Die Inkubation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Abgestoppt wurde der Verdau durch zehnminütiges Erhitzen auf 85 °C. Im Falle von Restriktionsendonukleasen, bei denen Erhitzen nicht zur Inaktivierung führt, wurde

gemäss den Herstellerangaben mit EDTA abgestoppt. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

3.3.9 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden durch horizontale, submerse Agarosegelelektrophorese mit 5 – 10 V/cm konstanter elektrischer Spannung in TAE-Laufpuffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure; pH 8.3) aufgetrennt. Die Agarosekonzentration betrug üblicherweise 1 % (w/w), für kleine DNA-Fragmente wurde mit Konzentrationen bis zu 2 % (w/w) gearbeitet. Zur Detektion der DNA-Fragmente unter UV-Licht enthielten die Agarosegellösung und der Laufpuffer zusätzlich 0.1 µg/ml Ethidiumbromid. Zur Farbmarkierung wurde den Proben 1/6 Volumenteile Probenauftragungspuffer (0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylencyanol, 40 % (w/v) Sucrose) zugesetzt. Als Längenmarker dienten die DNA-Standard-Fragmente des Produkts „100 bp-DNA-Leiter, extended“ der Firma Roth (17 Fragmente von 100 – 5000 bp; siehe Anhang). Über quantitativen Bandenvergleich konnte dieser Längenmarker auch gleichzeitig zur Konzentrationsbestimmung von aufgetragenen DNA-Proben verwendet werden.

3.3.10 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Trennung aus Agarosegelen erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen entsprechend den Protokollen des Herstellers.

Die Entfernung von Proteinen und niedermolekularen Verbindungen aus DNA-Proben erfolgte mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ der Firma Roche entsprechend den Herstellerangaben.

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

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* DH5 α erfolgte mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen gemäss den Herstellerangaben. Für präparative Isolierungen wurde das „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ verwendet.

3.3.12 Transformation von *D. discoideum*

Eine effiziente Transformationsmethode für *D. discoideum* ist die Elektroporation. Pro Transformationsansatz wurden $5 \cdot 10^7$ Zellen geerntet (500 g, 4 °C, 10 min), zweimal mit eiskaltem, steril filtriertem Elektroporationspuffer (10 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , 50 mM Sucrose; pH 6.2) gewaschen und anschliessend in 5 ml Elektroporationspuffer auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml resuspendiert.

400 μ l dieser Zellsuspension wurden in eine 0.4 cm Elektroporationsküvette pipettiert, mit ca. 50 μ g DNA versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die anschliessende Elektroporation erfolgte im „Electroporator 2510“ der Firma Eppendorf mit 1.000 V Spannung und einer Zeitkonstanten von 5 ms.

Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert, anschliessend in eine Petrischale (9.2 cm Durchmesser) überführt und mit 10 ml axenischem Medium versetzt. Nach einer Vorinkubation von 24 h bei 22 °C erfolgte die Selektion der Transformanten durch Zugabe von 10 μ g/ml des Antibiotikums Blasticidin (homologe Rekombination) bzw. durch Zugabe von 20 μ g/ml des Antibiotikums Geneticin (G418) zur Selektion von Antisense-Mutanten. Im Abstand von jeweils 2 Tagen erfolgte ein vorsichtiger Austausch des Mediums. Die nach ca. 7 – 10 Tagen sichtbaren Klone wurden isoliert und in Bezug auf eine erfolgte Geninaktivierung analysiert.

3.4 Präparative Methoden

3.4.1 Extraktion von Phospholipiden nach Vickers⁷⁴

Folgende Arbeitsvorschrift ist angesetzt für die Extraktion von Phospholipiden aus $1 \cdot 10^9$ Zellen (entspricht in etwa 1 g Feuchtgewicht).

Zum Aufschluss wird das gefrorene Zellmaterial mit 3.75 ml einer Mischung aus Chloroform/Methanol (1:2; v/v) versetzt und anschliessend ca. 30 - 45 Minuten bei Raumtemperatur im Ultraschallbad inkubiert. Danach werden 1.25 ml Chloroform hinzugegeben, durchmischt, gefolgt von der Zugabe von 1.25 ml 10 mM EDTA-Lösung (pH 7.5) und erneuter Durchmischung. Durch die Zugabe des Chloroforms und der wässrigen EDTA-Lösung kommt es zur Bildung von zwei Phasen, einer organischen, chloroformhaltigen Phase (unten) und einer wässrig/methanolischen Phase (oben). Das Zweiphasengemisch wird zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (10 min, 6000 g, 20 °C). Man erhält eine organische Phase (neutrales Extrakt) und eine wässrige Phase.

Zu dieser wässrigen Phase werden 9.5 ml einer Mischung aus Chloroform/Methanol/12 N HCl/H₂O (90:120:15:3; v/v/v/v), die 0.1 mg butyliertes Hydroxytoluol/100 ml als Antioxidanz enthält, gegeben (saure Extraktion). Es bildet sich eine homogene Phase, der man nach 5 min unter zwischenzeitlichem Schütteln (Vortex) 3.75 ml Chloroform hinzugibt; nach Durchmischung werden 3.75 ml Wasser addiert und erneut gemischt. Das resultierende Zweiphasengemisch wird wieder durch Zentrifugation getrennt (10 min, 6000 g, 20 °C).

Die beiden chloroformhaltigen Phasen (aus neutraler und saurer Extraktion) werden vereinigt. Anschliessend wird mit einem gleichen Volumen von Methanol/0.1 M CDTA (10:9; v/v, pH 6.8) nachgewaschen. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und kann für längere Zeiträume bei - 80 °C gelagert werden.

3.4.2 Deacylierung von Phospholipiden mit Monomethylamin nach Clarke und Dawson⁷⁵

Alle Volumen- und Mengenangaben der folgenden Vorschrift zur Deacylierung von Phospholipiden beziehen sich auf eine Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^9$ Zellen. Zu dem Phospholipidgemisch werden 2.3 ml eines Monomethylamin-Reagenzes zugesetzt.

Monomethylamin-Reagenz: 77 VT 33% CH₃NH₂ in Ethanol
15 VT Wasser
8 VT n-Butanol

Nach vorsichtigem Erwärmen wird das Reaktionsgemisch für 50 - 60 min auf 53 °C erhitzt; zur besseren Durchmischung unter magnetischem Rühren oder unter Verwendung eines Ultraschallbades. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf Eis gekühlt und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum abgezogen. Nachdem das überschüssige Monomethylamin größtenteils verdampft ist, wird bis zur Trockne einrotiert (Wasserbadtemperatur ≤ 50 °C).

Zu dem öligen, gelblich-braunen Rückstand werden 1 ml Wasser und 1.2 ml eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol/Petroläther/Ethylformiat (20:4:1; v/v/v) gegeben. Letzteres neutralisiert noch eventuell verbliebene Spuren von Monomethylamin.

Nach Durchmischung wird zentrifugiert (10 min, 6000 g, 20 °C). Die untere, wässrige Phase wird mit 0.75 ml des obigen Lösungsmittelgemisches nachgewaschen und danach in 5 ml Wasser aufgenommen.

Durch Auftragen auf eine Polystyrol-Säule (Maxi-Clean IC Mixed-Mode RP-H Cartridge, Alltech) wird die Probe von hydrophoben Verunreinigungen befreit, anschließend gefriergetrocknet und bei - 20 °C aufbewahrt.

Die Analytik der in der Probe enthaltenen deacylierten Phosphatidylinositolphosphate (Glycerophosphoinositolphosphate, GroPIInsP_x) erfolgte über HPIC-CD (siehe Punkt 3.4.7).

3.4.3 Isolierung von *myo*-Inositol und *myo*-Inositolphosphaten

Die folgende Methode wurde zur Isolierung von *myo*-Inositolphosphaten aus einer Gesamtzellzahl von $1 - 2 \cdot 10^8$ Zellen verwendet. Zum Aufschluss wurde das gefrorene Zellmaterial mit zwei Teilen (v/w) eiskalter 2 M Perchlorsäure versetzt. Desweiteren wurde 1/10 des Perchlorsäurevolumens an 100 mM EDTA (pH 6.0) und 1/100 an 100 mM NaF hinzugesetzt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Vortexen lysiert und das denaturierte Material abzentrifugiert (6000 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde anschliessend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und eisgekühlt. Der Rückstand wurde mit 100 µl eiskaltem Wasser nachgewaschen. Zur Neutralisation der vereinigten Überstände wurde eine Lösung von 1.5 M

KOH in 60 mM Bis-Tris verwendet, der man kurz vor Gebrauch 3 Tropfen Universal-Indikator (pH 4 – 10, Merck) je 5 ml Volumen zusetzte. Im pH-Bereich zwischen 5 und 6 schlug die Farbe von rosa/orange nach gelb/grün um. Die Puffer-Substanz Bis-Tris verhinderte, dass dies zu abrupt geschah. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C unter gelegentlichem Schütteln wurde das präzipitierte Kaliumperchlorat abzentrifugiert (20.000 g, 5 min, 4 °C), der Überstand entnommen und das Präzipitat mit 50 µl Wasser nachgewaschen. Nach Vereinigung der Überstände in ein 2 ml Reaktionsgefäß gab man 65 µl einer Aktivkohlesuspension (20 % (w/v) in 0.1 M NaCl und 50 mM Natriumacetat; pH 4.0) hinzu und inkubierte für 15 Minuten bei 4 °C unter gelegentlichem Schütteln. In diesem Schritt wurde neben Nukleotiden auch der Farbstoff des Indikators abgetrennt. Die Aktivkohle wurde abzentrifugiert (20.000 g, 5 min, 4 °C) und der Überstand entnommen. Die sedimentierte Aktivkohle wurde anschliessend mit 100 µl einer Waschlösung (0.1 M NaCl, 5 mM NaF, 1 mM EDTA, pH 5.0) nachgewaschen. Die vereinigten Überstände wurden entweder direkt zur HPLC-MDD-Analytik (siehe Punkt 3.4.9) eingesetzt oder zunächst lyophilisiert.

Zur Isolierung von *myo*-Inositol wurden die Proben nach der Aktivkohlebehandlung zusätzlich mit einem Mischbettionenaustauscher (Amberlite MB-3, Merck) deionisiert. Aliquots wurden dann wie unter Punkt 3.5.4 beschrieben auf *myo*-Inositol untersucht.

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Quantitative Phosphatbestimmung nach Lanzetta⁷⁶

Zur Quantifizierung von Phosphat im nanomolaren Maßstab wurde ein kolorimetrisches Verfahren nach Lanzetta angewandt. Die Reduzierung auf den Mikrotiterplatten-Maßstab erlaubte die simultane Bestimmung einer grossen Probenanzahl. Mit dieser Methode konnte sowohl die enzymatische Aktivität von Phosphatasen verfolgt, als auch über die Bestimmung organisch gebundenen Phosphats Phosphatidylinositolphosphate und Glycerophosphoinositolphosphate quantifiziert werden.

Zur Quantifizierung von Phosphatidylinositolphosphaten und Glycerophosphoinositolphosphaten über deren Phosphatgehalt war es zuvor notwendig, die Orthophosphorsäureester durch Behandlung mit heisser Schwefelsäure vollständig zu

hydrolysieren. Ein typischer Reaktionsansatz wurde folgendermassen durchgeführt. 10 – 40 μl einer 100 - 200 μM Phosphatidylinositolphosphat- bzw. Glycerophosphoinositolphosphatlösung wurden in hydrolysebeständige Borsilikatgläschen pipettiert. Nach Zugabe von 10 - 100 μl 10 M Schwefelsäure wurde ca. 3 - 4 h auf 170 °C erhitzt. Anschließend wurden 20 - 50 μl einer 30 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung zugegeben und auf 170 °C für ca. 10 - 12 h erhitzt. Dadurch wurde der entstandene Kohlenstoff (schwärzliche Trübung) zu Kohlendioxid oxidiert. Es war notwendig, überschüssiges Peroxid durch längeres Erhitzen vollständig zu zersetzen, da es sonst zur Bildung von störenden, gelben Peroxokomplexen mit dem Molybdat des Malachit-Reagenzes kam. Die abgekühlten, klaren Proben wurden mit 1 M Schwefelsäure auf ein definiertes Volumen zwischen 100 und 1000 μl verdünnt, und konnten dann über die kolorimetrische Phosphatbestimmung analysiert werden.

Kolorimetrische Phosphatbestimmung:

Zwischen 20 - 40 μl der Probelösung wurden in Mikrotiterplatten pipettiert und mit 100 μl Malachit-Reagenz versetzt. Nach einer Minute wurden 20 μl einer 25 %igen (w/v) tri-Natriumcitrat-Monohydrat-Lösung hinzugegeben. Zur vollständigen Farbentwicklung wurden die Proben 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Abschliessend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Microplatten-Reader Modell 450, BioRad) gemessen. Die Bestimmung erwies sich im Bereich von 0 – 3 nmol Phosphat als linear. Zur Kalibrierung verfuhr man analog mit Lösungen aus Kaliumdihydrogenphosphat in 1 M Schwefelsäure (0 - 200 μM KH_2PO_4).

Folgende Geradengleichung wurde zur Kalibrierung der kolorimetrischen Phosphatbestimmung ermittelt:

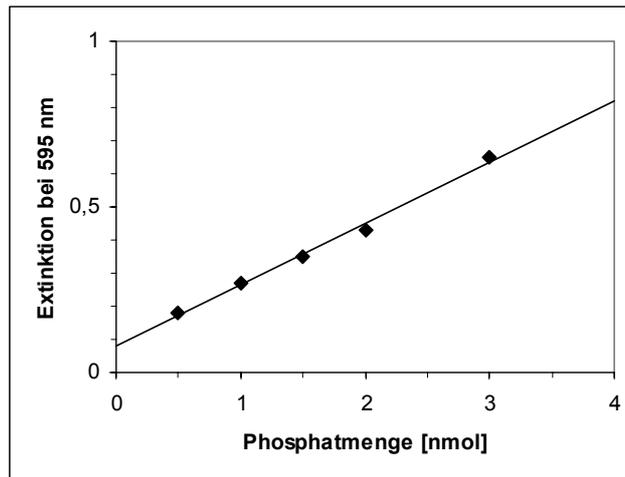


Abb. 11: Kalibrierung der kolorimetrischen Phosphatbestimmung nach Lanzetta.

$$\text{Phosphatmenge [nmol]} = 5.87 \text{ nmol} \cdot \text{Extinktion}_{595 \text{ nm}} - 0.53 \text{ nmol}; R^2 = 0.99$$

Für die Herstellung des Malachit-Reagenzes wurden zunächst 735 Volumenteile einer wässrigen 0.045 % (w/v) Malachitgrün-Hydrochlorid-Lösung mit 245 Volumenteilen einer sauren (4 M HCl) 4.2 % (w/v) Ammoniumheptamolybdat-Lösung gemischt. Die Lösung wurde nach 24-stündigem Rühren im Dunkeln mit 20 Volumenteilen einer 2.0 % (v/v) Tergitol NP-10-Lösung versetzt und anschliessend filtriert. Das erhaltene Malachit-Reagenz ist bei kühler Lagerung in Braunglasflaschen mehrere Monate stabil.

3.5.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Lowry⁷⁷

Proteinkonzentrationen von Proben im Bereich von 0 – 1.5 mg/ml wurden mit einem, auf der Methode von Lowry et al. basierendem, kommerziell erhältlichem Testsystem der Firma BioRad (DC Protein Assay) gemäss den Anleitungen des Herstellers bestimmt.

Folgende Geradengleichung erhielt man aus der Kalibrierung mit BSA als Vergleichsprotein:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = 3.26 \text{ mg/ml} \cdot \text{Extinktion}_{750 \text{ nm}} - 0.22 \text{ mg/ml}; R^2 = 0.99$$

3.5.3 Phosphatidylinositolphosphatanalytik über hochauflösende Ionenchromatographie mit Leitfähigkeitsdetektion (HPIC-CD)

Die qualitative und quantitative Analytik von Phosphatidylinositolphosphaten erfolgte durch hochauflösende Ionenchromatographie mit Leitfähigkeitsdetektion der nach Deacylierung erhaltenen Glycerophosphoinositolphosphate.

Es wurde eine Ionenchromatographie-Anlage der Firma Dionex (DX-500) benutzt.

Nach Trennung an einer Anionenaustauschersäule (IonPac AS11-HC, 4 · 250 mm, Dionex) erfolgte die Detektion über die elektrische Leitfähigkeit (ED 50). Zusätzlich war zur Kontrolle ein UV-Detektor (AD 25) nachgeschaltet (Messung bei 254 nm). Eine UV-Absorptionszelle ermöglichte eine Unterscheidung zwischen phosphorylierten Substanzen ohne UV-Absorptionsvermögen (in dieser Arbeit speziell deacylierte Phosphatidylinositolphosphate) und mit UV-Absorptionsvermögen (z.B. Nukleotide). Die Signale der beiden Detektionszellen wurden einem Rechner übermittelt und konnten mittels der Software Chromeleon 6.2 verarbeitet werden.

Sowohl Trennung als auch Detektion fanden bei einer konstanten Temperatur von 30 °C statt; dies wurde durch einen Chromatographie-Ofen (LC 30) gewährleistet.

Als Laufmittel wurden Wasser / Methanol - Gemische verwendet. Das Maximum des Methanol-Anteils betrug 25 % Volumenprozent. Wasser (A) und Methanol (B) wurden separat aus Vorratsgefäßen, die zur Entgasung unter Heliumgasdruck stehen, entnommen. Als Pumpe diente eine quaternäre Gradientenpumpe (GP 50). Die verwendete Flussrate betrug 1.0 ml/min. Der je nach Flussrate und Laufmittelzusammensetzung einstellende Maximaldruck durfte 210 bar nicht überschreiten.

Als Eluent wurde Kaliumhydroxid verwendet, das elektrolytisch durch ein Eluent-Generator-System (EG 40) erzeugt wurde. Dadurch wurde carbonatfreies Laufmittel sichergestellt. Die Obergrenze der Hydroxidionenkonzentration betrug 100 mM.

Als Regenerant diente 25 mM Schwefelsäure, die über einen konstanten Druck von 5 psi aus einem Vorratsgefäß dem Suppressorsystem (AMMS III) zugeführt wurde (externe chemische Suppression).

Durch die nachfolgende chemische Suppression mit 25 mM H₂SO₄ an Kationenaustauschmembranen (AMMS III) wurde erstens der KOH-Eluent neutralisiert

(Verringerung der Grundleitfähigkeit) und zweitens der Analyt in die protonierte Form überführt (Erhöhung der Empfindlichkeit). Anschließend erfolgte die Detektion über die Leitfähigkeits- und UV-Absorptionszelle.

Folgende Abbildung gibt die verwendete Ionenchromatographie-Anlage schematisch wieder:

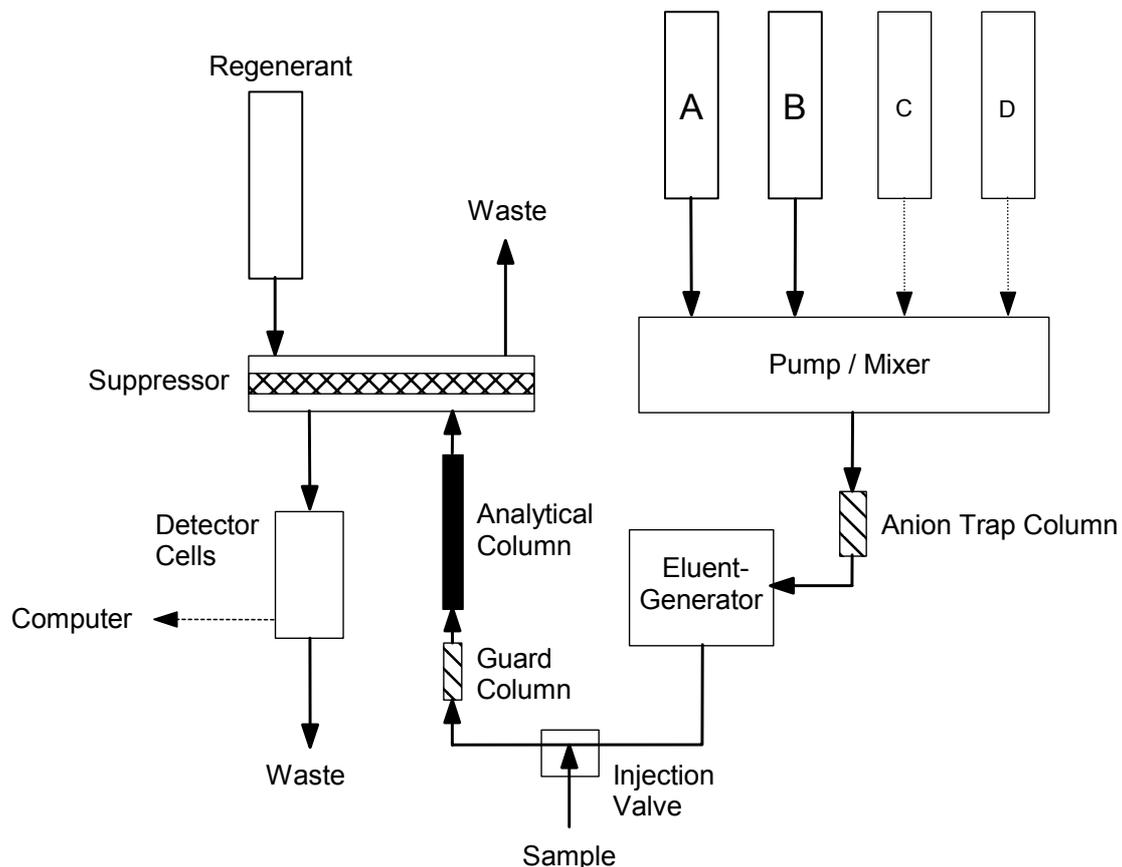


Abb. 12: Schematischer Aufbau der HPIC-CD-Anlage DX-500 ion chromatography system (Dionex). Bestehend aus folgenden Komponenten: GP 50 Gradienten Pumpe; Eluent-Generator-System EG 40, ausgestattet mit EGC-KOH Kartusche; AMMS III, Micro Membrane Suppressor; Chromatographie-Ofen LC 30; ED 50, elektrochemischer Detektor, ausgestattet mit Leitfähigkeitszelle (PEEK, Innenvolumen: 1.0 μl , Zellkonstante: 160 cm^{-1}); AD 25, UV-Detektor, ausgestattet mit UV-Absorptionszelle (PEEK, Innenvolumen: 10 μl); ATC-HC, Anion Trap Column; Vorsäule IonPac AG11-HC, Guard (4 \cdot 50 mm); Analytische Säule IonPac AS11-HC, Analytical (4 \cdot 250 mm); Laufmittel: Reinstwasser aus einer Millipore-Anlage (Milli-Q Synthesis A 10), Widerstand $\geq 18 \text{ M}\Omega$, TOC-Gehalt $\leq 5 \text{ ppb}$, entgast mit Helium (A) und Methanol von Rotisolv, HPLC Gradient Grade, entgast mit Helium (B); Eluent: Kaliumhydroxid, elektrolytisch produziert über das Eluent-

Generator-System; Regenerant: 25 mM Schwefelsäure; 100 μ l Injektionsschleife; Software Chromeleon 6.2

Die Verwendung einer Gradientenpumpe und eines Eluent-Generator-Systems gestattete es, kombinierte und nicht-lineare Gradientenprofile zu fahren.

Folgende Abbildung zeigt einen analytischen Lauf von deacylierten Phosphatidylinositolphosphatstandardverbindungen.

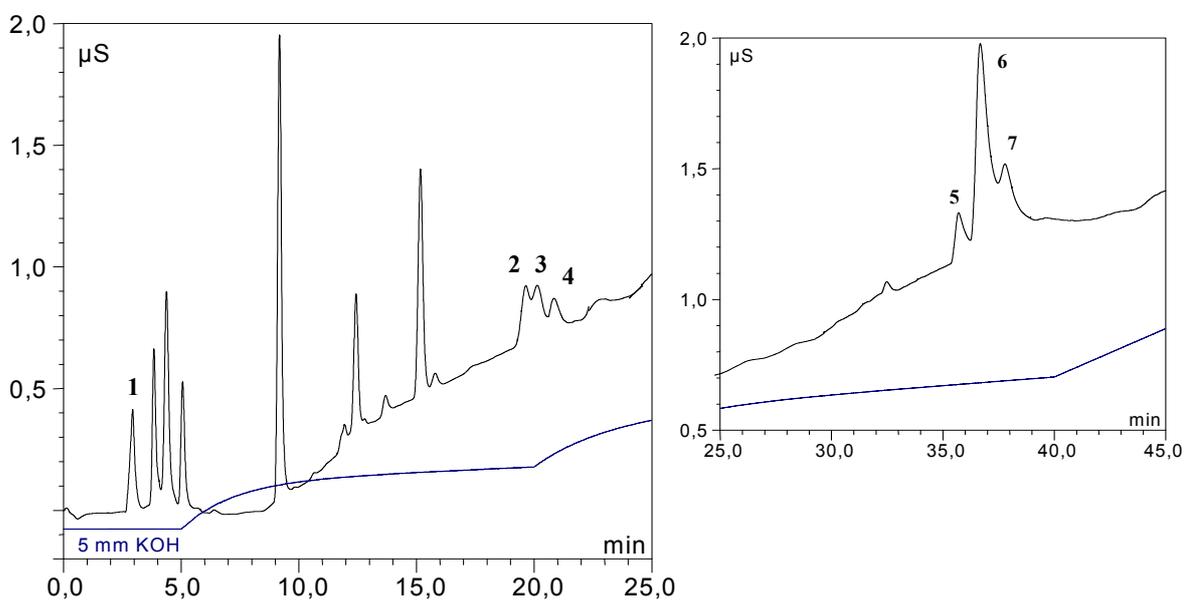


Abb. 13: HPIC-CD-Chromatogramme von GroPtdInsP_x-Standardverbindungen.

1: GroPIns 3.0 min; **2:** GroPIns(4)P 19.3 min; **3:** GroPIns(3)P 19.8 min; **4:** GroPIns(5)P 20.5 min; **5:** GroPIns(3,4)P₂ 35.6 min; **6:** GroPIns(4,5)P₂ 36.7 min; **7:** GroPIns(3,5)P₂ 37.7 min. Die untere Kurve beschreibt den Gradientenverlauf (siehe Tab. 2).

Folgender Gradient wurde zur Analytik von Glycerophosphoinositolphosphaten verwendet:

Zeit:	Wasser:	Methanol:	KOH:	Steigung:
0.0 min	85 %	15 %	5 mM	linear (Kurve 5)
5.0 min	85 %	15 %	5 mM	linear (Kurve 5)
20.0 min	85 %	15 %	30 mM	konvex (Kurve 2)
40.0 min	85 %	15 %	65 mM	konvex (Kurve 3)
50.0 min	85 %	15 %	70 mM	linear (Kurve 5)
55.0 min	85 %	15 %	90 mM	linear (Kurve 5)

Tab. 2: Gradient zur Trennung von deacylierten Phosphatidylinositolphosphaten.

Flussrate: 1.0 ml/min; Temperatur: 30 °C. Nähere Details zur Kurvensteigung werden im Handbuch zur Gradientenpumpe GP50 beschrieben.

Zur analytischen Erfassung von Phosphatidylinositolphosphat-Metaboliten wurden 100 µl einer deacylierten Phosphatidylinositolphosphat-Probe manuell über die Injektionsschleife aufgetragen. Die applizierte Glycerophosphoinositolphosphatmenge entsprach einer aufgeschlossenen Zellzahl von $0.5 - 5 \cdot 10^7$ Zellen.

Nach einem geringfügigem Umbau der HPIC-CD-Anlage konnte ein Analyt auch im semi-präparativen Maßstab isoliert werden. Hierzu wurde der Analyt bei der entsprechenden Retentionszeit nach Passage des Suppressorsystems aufgefangen. Diese Vorgehensweise wurde benutzt, um über einen Umweg deacyliertes PtdIns (GroPIIns) aus Zellproben zu analysieren.

Deacyliertes PtdIns aus Zellproben konnte nicht direkt über HPIC-CD quantifiziert werden, da einige Substanzen, darunter deacyliertes Phosphatidylglycerol, mit GroPIIns koeluiieren (Nasuhoglu et al.).⁷⁸ Um den intrazellulären PtdIns-Gehalt erfassen zu können, war es notwendig, das Deacylierungsprodukt GroPIIns nach HPIC-CD aufzufangen und zum *myo*-Inositol umzusetzen.

3.5.4 *Myo*-Inositol-Analytik über hochauflösende Ionenchromatographie kombiniert mit integrierter gepulster Amperometrie (HPIC-IPAD)

Die Bestimmung des *myo*-Inositol-Gehalts in Zellproben erfolgte über HPIC-IPAD.

Diese Methode konnte auch angewandt werden, um den intrazellulären Phosphatidylinositol-Gehalt zu erfassen. Dazu war es notwendig, dass deacyliertes PtdIns zunächst ionenchromatographisch (HPIC-CD) erfasst und aufgefangen wurde. Danach erfolgte der Abbau des Glycerophosphoinositols (GroPIns) in zwei Schritten zum *myo*-Inositol.

Eine gefriergetrocknete GroPIns-Probe aus ca. $5 \cdot 10^7$ Zellen wurde in 400 μ l Wasser aufgenommen. Durch Zugabe von 50 μ l einer 90 mM NaIO₄-Lösung und 20minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und unter Dunkelheit wurde der Glycerinrest oxidiert. Überschüssiges NaIO₄ wurde durch Addition von 20 μ l einer 700 mM Na₂SO₃-Lösung zerstört (20 Minuten Inkubation, Raumtemperatur, Dunkelheit). Anschliessend erfolgte die Zugabe von 40 μ l einer 1%igen (w/v) Dimethylhydrazinlösung (pH 4.5; eingestellt mit Ameisensäure). Nach 4 h Inkubation war der durch Oxidation entstandene Glycolaldehyd vollständig zu *D*-*myo*-Inositol-1-phosphat (Ins(1)P) umgesetzt.

Die Probe wurde anschliessend in 1 ml 50 mM MOPS-Puffer (pH 9.0) aufgenommen. Durch Zugabe von 10 U alkalischer Phosphatase und 4stündiger Inkubation bei 37 °C wurde Ins(1)P zu *myo*-Inositol dephosphoryliert. Die Reaktion wurde durch 5minütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Abschliessend wurde die Probe mit einem Mischbettionenaustauscher (Amberlite MB-3, Merck) deionisiert und konnte nun über HPIC-IPAD auf ihren *myo*-Inositol-Gehalt analysiert werden.

Zur Trennung des *myo*-Inositols wurde eine CarboPac MA1-Säule (4 · 250 mm, Dionex) benutzt. 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 ist in Abbildung 14 wiedergegeben. Die Säulen und die Detektorzelle wurden auf 30 °C temperiert.

Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 0.4 ml/min. Der Gradient, bestehend aus Wasser (A) und 1 m NaOH (C), hatte folgenden Verlauf:

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

Tab. 3: Gradient zur Trennung von *myo*-Inositol. Flussrate: 0.4 ml/min;
Temperatur: 30 °C.

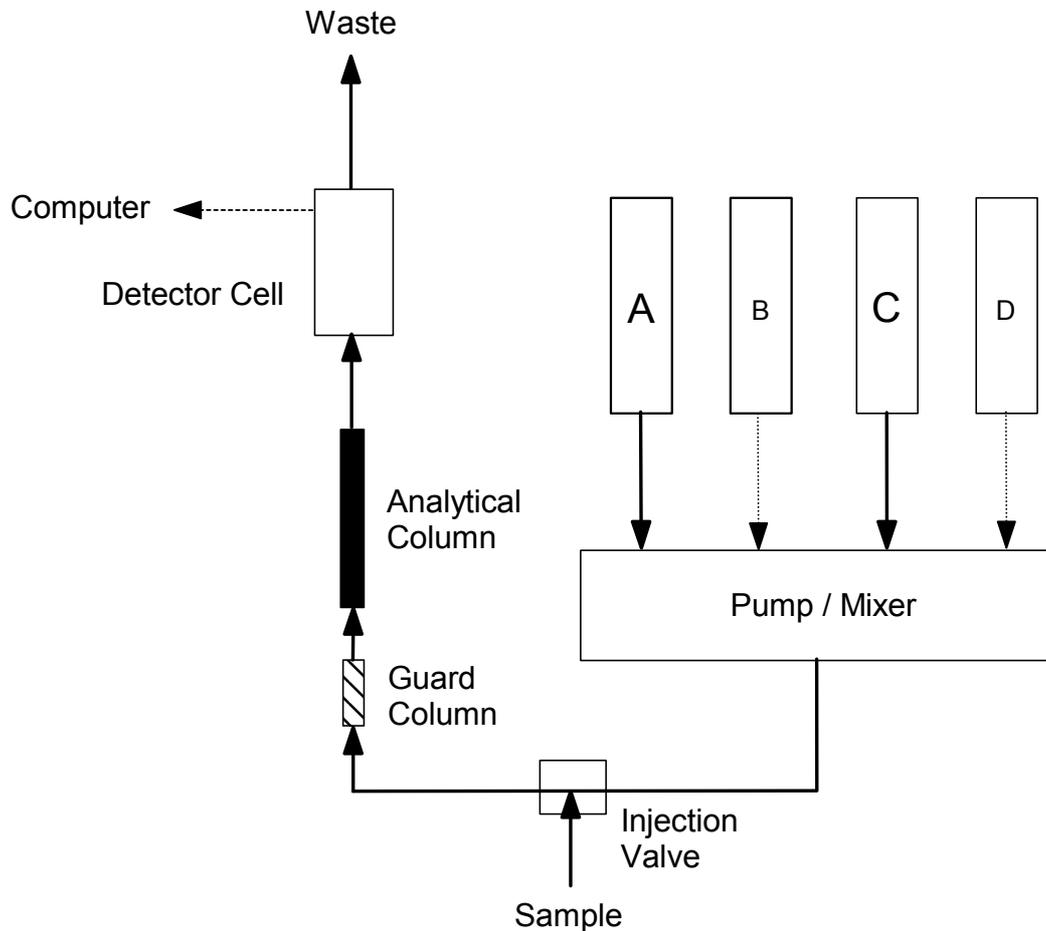


Abb. 14: Schematischer Aufbau der HPIC-IPAD-Anlage (Dionex). Bestehend aus folgenden Komponenten: GP 50 Gradienten Pumpe; Chromatographie-Ofen LC 30; ED 50, elektrochemischer Detektor, ausgestattet mit PAD-Zelle (Arbeitselektrode Gold, Referenzelektrode

Ag/AgCl); Vorsäule CarboPac MA1, Guard (4 · 50 mm); Analytische Säule CarboPac MA1, Analytical (4 · 250 mm); Laufmittel: Reinstwasser aus einer Millipore-Anlage (Milli-Q Synthesis A 10), Widerstand $\geq 18 \text{ M}\Omega$, TOC-Gehalt $\leq 5 \text{ ppb}$, entgast mit Helium (A) und 1 M NaOH (hergestellt aus NaOH Pellets, 99.998 %, Sigma-Aldrich), entgast mit Helium (C); Eluent: Natriumhydroxid; 100 μl Injektionsschleife; Software Chromeleon 6.2

3.5.5 Analytik von *myo*-Inositolphosphaten über hochauflösende Flüssigkeitschromatographie in Kombination mit Nachsäulenderivatisierung (HPLC-MDD)

Myo-Inositolphosphate tragen keine chromophoren Gruppen und sind daher im UV- oder sichtbaren Bereich nicht direkt photometrisch nachweisbar. Zur Lösung dieses Detektionsproblems wurde ein von Mayr et al. entwickeltes Verfahren zur Nachsäulenderivatisierung (metal dye detection, MDD) eingesetzt.⁷⁹ Nach der chromatographischen Trennung wurden zum Nachweis eluierender *myo*-Inositolphosphate der Farbstoff 4-(2-Pyridylazo)-resorcinol (PAR) und Yttrium (III) – Ionen beigemischt.

Der Aufbau der HPLC-MDD-Anlage ist in Abbildung 15 schematisch wiedergegeben.

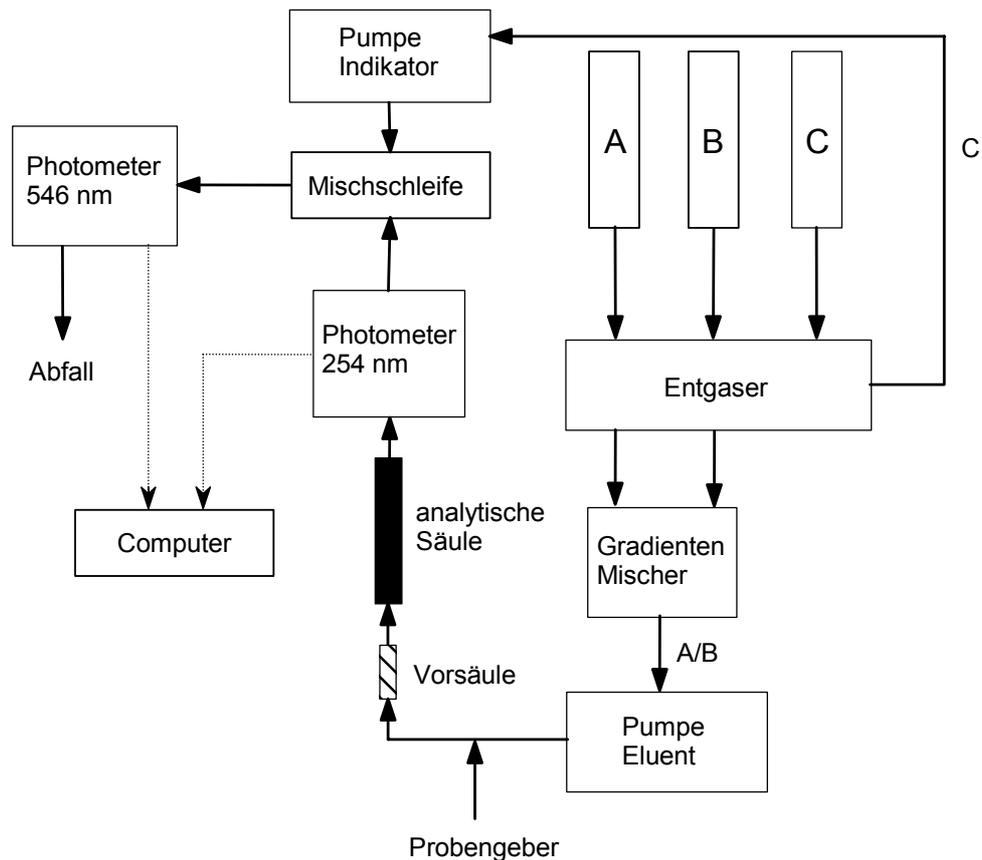


Abb. 15: Schematischer Aufbau der HPLC-MDD-Anlage.

Komponenten der HPLC-MDD-Anlage: Controller: LC 2252, Pharmacia LKB; Entgaser: Degasys DG 1310, Uniflows; Gradientenmischer: Low-Pressure-Mixer, Pharmacia LKB; Pumpen: HPLC Pump 2248, Pharmacia LKB; Photometer: VWM 2141, Pharmacia LKB; Autosampler: Marathon; Analytische Säule: Mono Q HR 10/10, Pharmacia; Vorsäule: Resource Q HR 5/5, Pharmacia

Übersichtsspektren von *myo*-Inositolphosphat-Metaboliten mit Phosphorylierungsgraden zwischen 3 und 8 wurden durch Verwendung eines kombinierten pH- und Chlorid-Gradienten (HCl-System) erhalten. Zur Analytik von InsP_3 - und InsP_4 -Isomeren wurden zwischen $0.5 - 3 \cdot 10^8$ Perchlorsäure-aufgeschlossener Zellen appliziert. Der angelegte lineare Gradient setzte sich aus 0.2 mM HCl (A) und 0.5 mM HCl (B) zusammen (0 min, 0 % B; 70 min, 100 % B; 100 min, 100 % B; Flussrate: 1.5 ml/min). Die PAR-Indikatorlösung (C) setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 2 M Tris/HCl (pH 9.1), 200 μM PAR (Fluka), 30 μM YCl_3 (Aldrich), 10 % MeOH Rotisolv, HPLC Gradient Grade. Indikatorflussrate: 0.75 ml/min.

Bei Fragestellungen, die den Bereich der InsP_5 - bis InsP_8 -Isomeren betrafen, wurden zwischen $0.2 - 1 \cdot 10^7$ Perchlorsäure-aufgeschlossener Zellen appliziert. Es konnte mit einem

verkürzten linearen Gradienten gearbeitet werden (0 min, 75 % B; 15 min 100 % B; 60 min, 100 % B).

3.6 Nachweis von PtdInsP_x-Phosphatase-Aktivitäten

3.6.1 Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung von dephosphorylierenden Enzymaktivitäten erfolgte in Mikrotiterplatten. Standardmässig wurden pro Kavität zunächst 40 µl der Enzymlösung, entsprechend verdünnt mit 200 mM Bis-Tris pH 6.9, und anschliessend 10 µl verschiedener 400 µM di-C8-Phosphatidylinositolphosphatstandardlösungen pipettiert.

Die Mischung wurde bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (90 Upm) inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 2 M HCl gestoppt. Das freigesetzte Phosphat wurde anschliessend kolorimetrisch bestimmt.

Durch Variation der Reaktionszeiten und der Verdünnung der Enzymlösung war es möglich, den Abbau aller eingesetzten di-C8-PtdInsP_x-Standards in einem linearen Bereich zu verfolgen.

3.6.2 Präparation von Cytosol- und Membran-Fraktion

Ungefähr $5 \cdot 10^9$ Zellen (Feuchtwicht: ca. 5 g mit einem Gesamtproteingehalt von ca. 550 mg) aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet (500 g, 4 °C, 10 min), zweimal mit 100 mM Hepes pH 6.9 gewaschen und in 10 ml eiskaltem 100 mM Hepes pH 6.9 resuspendiert. Alle anschliessenden Schritte wurden ebenfalls unter Eiskühlung durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte mechanisch durch mehrmalige Passage durch 5µm Nucleopore-Filter (Millipore). Anschliessend erfolgte Ultrazentrifugation (140.000 g, 4°C, 45 min). Der Proteingehalt der cytosolischen Fraktion betrug ca. 300 mg/10 ml.

Proteine der Membranfraktion wurden in 10 ml einer eiskalten 1%igen (v/v) Triton X-100-Lösung (100 mM Hepes, pH 6.9) aufgenommen und durch 15minütige Inkubation unter gelegentlichem Schütteln solubilisiert. Der Proteingehalt dieser Fraktion betrug ca. 250 mg/10 ml.

3.6.3 Chromatographie an Heparin-Agarose

Das filtrierte cytosolische Extrakt wurde 1:1 mit Aufschlusspuffer (100 mM Hepes pH 6.9) verdünnt und mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine mit Aufschlusspuffer äquilibrierte Heparin-Agarose-Säule aufgetragen (Säulenvolumen: ca. 10 ml). Die Proteindetektion erfolgte durch ein UV-Photometer mit Durchflussküvette (Uvicord SII, Pharmacia LKB) bei 280 nm. Die Elution erfolgte stufenweise mit 100 mM NaCl, 500 mM NaCl und 1000 mM NaCl in 100 mM Hepes pH 6.9. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 6 °C. Bei der Chromatographie von Membranproteinen enthielten alle Lösungen zusätzlich 0.1 - 1% (v/v) Triton X-100.

Die Regeneration der Säule erfolgte durch 5 – 10 Säulenvolumina 100 mM Tris/HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.5 und 100 mM Acetat, 0.5 M NaCl, pH 4.5. Die Heparinsäule wurde anschliessend unter 50 mM Tris/HCl, 0.02 % (w/v) Thimerosal (Sigma), pH 7.2 aufbewahrt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Phosphatidylinositolphosphate in *D. discoideum*

4.1.1 Etablierung der Phosphatidylinositolphosphatanalytik über HPIC-CD

Zur Trennung von Phosphatidylinositolphosphaten wurde aufgrund ihrer negativen Ladung eine hochauflösende Anionenaustauschchromatographie in Betracht gezogen. Hierzu mussten aber die lipophilen, nicht wasserlöslichen Phosphatidylinositolphosphate zunächst zu den entsprechenden Glycerophosphoinositolphosphaten deacyliert werden, sprich in eine hydrophile Form gebracht werden. Da die analytischen Ziele dieser Arbeit vor allem auf das Phosphorylierungsmuster, welches entscheidend für spezifische Wechselwirkungen mit Proteindomänen ist, ausgerichtet waren, war der Verlust der Information über die Fettsäurezusammensetzung im weiteren Verlauf der Arbeit nicht von Belang.

Da der analytische Ansatz auf einer vorangehenden Deacylierung der Phosphatidylinositolphosphate zu den entsprechenden Glycerophosphoinositolphosphaten basierte, konnten synthetische Pendants dieser Naturstoffe mit anderen Fettsäureresten als Referenzsubstanzen herangezogen werden. Eine vollständige Reihe von synthetischen Verbindungen mit den relevanten Phosphorylierungsmustern und definierter Stereochemie am Inositolring wird derzeit nur von der Firma Echelon Research Laboratories Inc. (Salt Lake City, Utah, USA) vertrieben. Alle zur Etablierung der Analytik benötigten Referenzsubstanzen wurden hierüber bezogen (siehe Punkt 3.1).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Deacylierung von Phosphatidylinositolphosphaten ist eine O / N – Transacylierung unter Bildung von N-methyl-Fettsäureamiden und den entsprechenden Glycerophosphoinositolphosphaten. Hierbei diente Monomethylamin sowohl als Base als auch als Acyl-Akzeptor. Die Verwendung von Monomethylamin gegenüber Alkalimetallhydroxiden als reaktive Spezies hatte den Vorteil, dass überschüssiges Amin-Reagenz nach der Reaktion leicht mittels eines Rotationsverdampfers entfernt werden konnte

und dass unter den beschriebenen Versuchsbedingungen (siehe Punkt 3.4.2) keinerlei Nebenreaktionen abliefen.⁷⁵

Es konnte zudem sichergestellt werden, dass der Prozess der Deacylierung keine quantitativen Verluste verursachte. Die Bestimmung des Phosphatgehalts nach Lanzetta ermöglichte die Kontrolle der Deacylierungsreaktion durch Messung des nach der Reaktion verbliebenen organisch gebundenen Phosphats. Durchschnittlich betrug die Wiederfindungsrate nach Deacylierung zwischen 90 % und 95 %.

Da Phosphatidylinositolphosphate und Glycerophosphoinositolphosphate selber keine chromophoren Gruppen beinhalten und sich somit auf UV/VIS-Absorption beruhenden Methoden entziehen, wurde als Detektionsmethode die Detektion über die elektrische Leitfähigkeit eingesetzt. Die Glycerophosphoinositolphosphate lagen im alkalischen Milieu in ihrer anionischen Form vor, konnten an einer Anionenaustauschersäule unter Hydroxidionen-Elution getrennt und nach Suppression mit einer Nachweisempfindlichkeit von bis zu 50 pmol über ihre elektrische Leitfähigkeit detektiert werden. Problematisch war in diesem Zusammenhang lediglich der Nachweis von GroPIns, dem Deacylierungsprodukt des PtdIns, da dieses aufgrund seiner geringen Ladung sehr früh eluierte und im Falle der Analytik von Proben mit komplexeren Matrices (zum Beispiel zu analysierenden Zellproben) mit etlichen Verbindungen koeluierte, darunter unter anderem auch deacyliertem Phosphatidylglycerol.⁷⁸ Versuche, durch Variation der Hydroxidionenelution dieses Problem zu beheben, schlugen fehl. Stattdessen wurde durch Verwendung der Referenzsubstanz zunächst die entsprechende Retentionszeit von GroPIns bestimmt. Standardmässig wurde dann bei analytischen Proben das Eluat in einem ausreichendem Zeitfenster aufgefangen, anschliessend das GroPIns in *myo*-Inositol umgewandelt und letztendlich dieses dann über HPIC-IPAD nachgewiesen.

Als zusätzliche Kontrolle für die Eichung der HPIC-CD-Analytik über Referenzsubstanzen wurden die tatsächlich injizierten Stoffmengen über deren Phosphatgehalt nach der Methode von Lanzetta bestimmt.

Anhand der Daten aus der Phosphatbestimmung konnte eine Eichung der HPIC-CD-Methode durchgeführt werden. Messungen im Bereich von 200 pmol bis 2 nmol injizierter Stoffmenge ergaben einen linearen Zusammenhang zwischen dem Peakintegral und der Stoffmenge.

Nach linearer Regression konnten folgende Eichgeraden ermittelt werden:

GroPIns: $y = 0.46 \text{ nmol}^{-1} \cdot \mu\text{S} \cdot \text{min} \cdot x - 0,02 \mu\text{S} \cdot \text{min}; R^2 = 1,00$

GroPIns(3)P, GroPIns(4)P,

GroPIns(5)P: $y = 0.63 \text{ nmol}^{-1} \cdot \mu\text{S} \cdot \text{min} \cdot x - 0,01 \mu\text{S} \cdot \text{min}; R^2 = 0,98$

GroPIns(3,4)P₂, GroPIns(4,5)P₂,

GroPIns(3,5)P₂: $y = 0.83 \text{ nmol}^{-1} \cdot \mu\text{S} \cdot \text{min} \cdot x - 0,03 \mu\text{S} \cdot \text{min}; R^2 = 0,99$

GroPIns(3,4,5)P₃: $y = 0.98 \text{ nmol}^{-1} \cdot \mu\text{S} \cdot \text{min} \cdot x - 0,03 \mu\text{S} \cdot \text{min}; R^2 = 0,99$

(mit y = Peakintegral [$\mu\text{S} \cdot \text{min}$] und x = Stoffmenge [nmol])

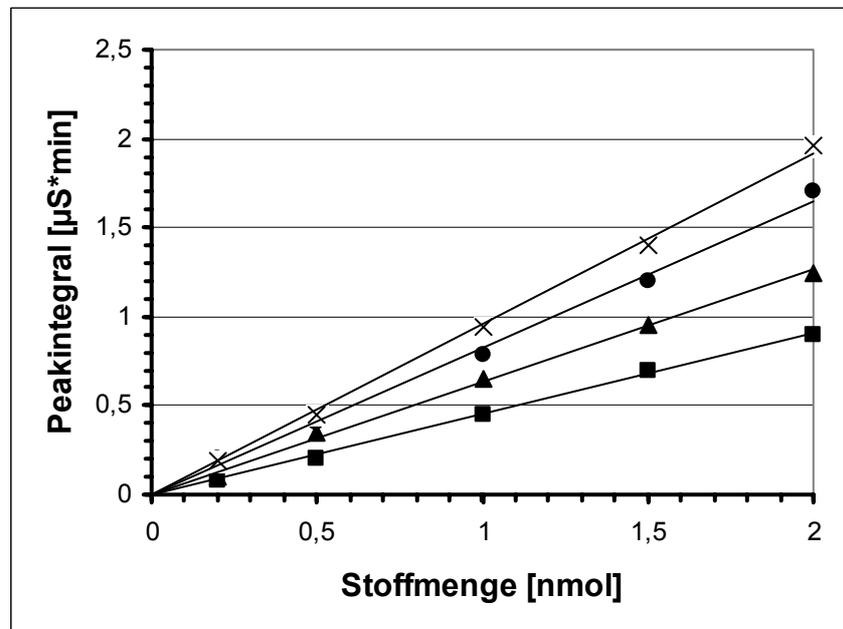


Abb. 16: Kalibrierung der HPIC-CD-Analytik von GroPIns und GroPInsPx.

Mit GroPIns = Quadrat; GroPInsP = Dreieck; GroPInsP₂ = Kreis; GroPInsP₃ = Kreuz.

Wie der Auftragung der Geradengleichungen zu entnehmen ist, besteht ein Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungsgrad einer Verbindung und der Änderung in der Leitfähigkeit; das heisst, je höher eine Verbindung phosphoryliert ist (je mehr Ladungen sie aufweist), desto grösser ist das relative Peakintegral und somit die Nachweisempfindlichkeit.

Die Nachweisempfindlichkeit für GroPIns und Glycerophosphoinositolphosphate liegt bei Leitfähigkeitsdetektion durchschnittlich im unteren pmol-Bereich (ca. 50 pmol).

4.1.2 Phosphatidylinositolphosphatzusammensetzung von *D. discoideum*-AX2 in Abhängigkeit von der Nahrungsquelle

Axenisch gewachsene Zellen:

Abb. 17 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt eines analytischen Laufs eines deacylierten Phospholipid-Extrakts aus AX2-Zellen, die in einem bakterienfreiem Nährmedium herangezüchtet worden waren. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch Ko-chromatographie mit Glycerophosphoinositolphosphatstandardverbindungen.

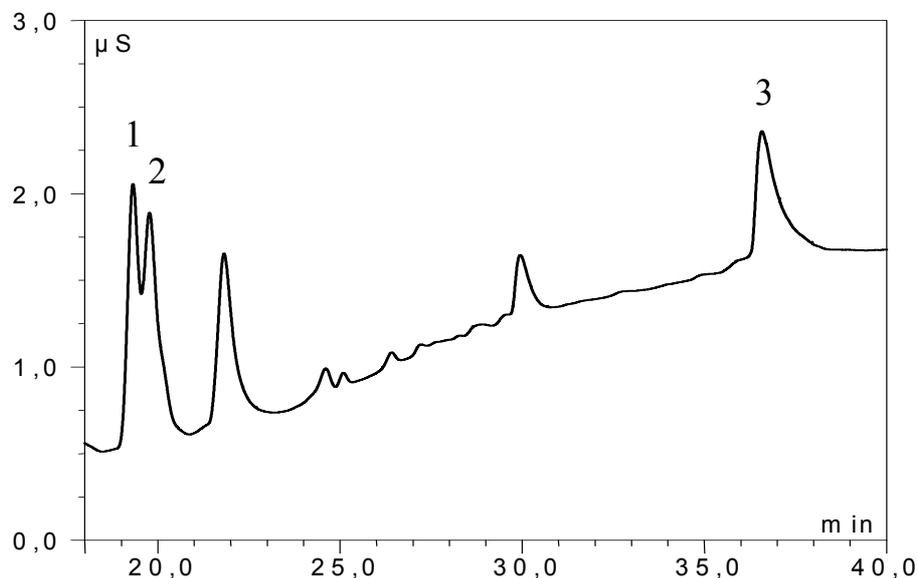


Abb. 17: HPIC-CD Analytik einer deacylierten Präparation aus AX2; axenisches Nährmedium. Injektion eines Äquivalents von $3.0 \cdot 10^7$ Zellen.
1: GroPIIns(4)P, 19.3 min; 2: GroPIIns(3)P, 19.8 min; 3: GroPIIns(4,5)P₂, 36.7 min

Die quantitative Auswertung aller Messungen ergab im Mittel folgende intrazelluläre Konzentrationen:

PtdIns:	$64 \pm 7 \mu\text{M}$ (ermittelt in Kombination mit HPIC-IPAD, siehe 3.5.4)
PtdIns(4)P:	$5.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$
PtdIns(3)P:	$4.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$
PtdIns(4,5)P ₂ :	$6.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$

Deacylierungsprodukte von anderen Phosphatidylinositolphosphaten konnten nicht beobachtet werden. Desweiteren zeigten sich keine Unterschiede der intrazellulären Konzentrationen zwischen HL-5- und FM-Medium-gewachsenen Zellen.

Axenisch gewachsene Zellen weisen in Bezug auf PtdIns, PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ ähnliche Verhältnisse auf, wie sie auch in Zellen von Säugetieren auftreten. Auch die absoluten Konzentrationen sind ähnlich und liegen im Falle von PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ im Bereich von ca. 5 nmol pro 10⁹ Zellen. Auffällig ist hingegen, dass in bakterienfreien Medien kultivierte Zellen einen ungewöhnlich hohen Anteil an PtdIns(3)P aufweisen (ca. 40 % bezogen auf die Fraktion der Phosphatidylinositolmonosphosphate). Für Säugetierzellen wird der Anteil des PtdIns(3)P auf lediglich ca. 3 – 4 % der Phosphatidylinositolmonophosphat-Fraktion abgeschätzt.² In der Dissertation von Thiel, U. wurde bereits durch HPTLC-Experimente ein zweites prominentes Phosphatidylinositolmonophosphat-Isomer in *D. discoideum* vermutet.⁸⁰

In Bakteriensuspension gewachsene Zellen:

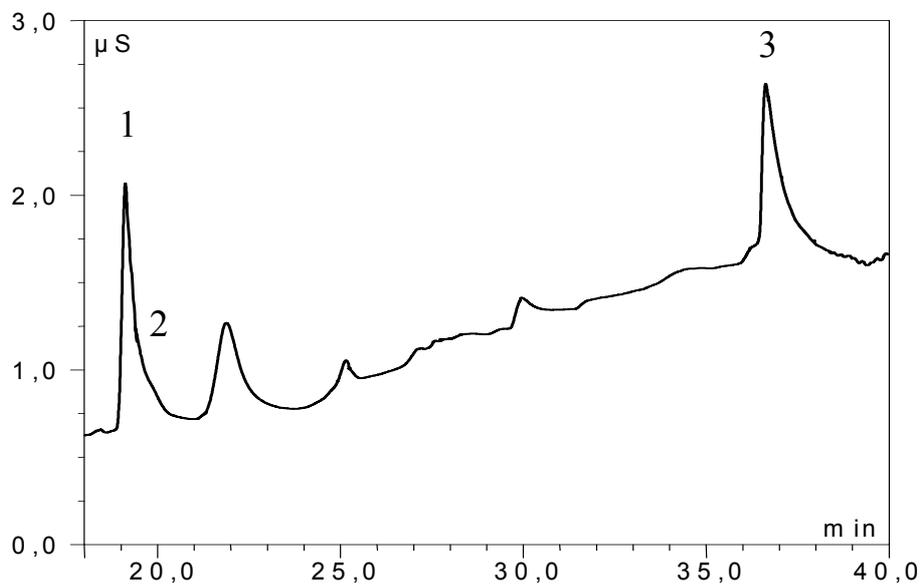


Abb. 18: HPIC-CD Analytik einer deacylierten Präparation aus AX2; Bakteriensuspension als Nährmedium. Injektion eines Äquivalents von $3,0 \cdot 10^7$ Zellen.
1: GroPIns(4)P, 19.3 min; 2: GroPIns(3)P, 19.8 min; 3: GroPIns(4,5)P₂, 36.7 min

Die quantitative Auswertung aller Messungen ergab im Mittel folgende intrazelluläre Konzentrationen (siehe auch Abb. 18):

PtdIns:	$66 \pm 7 \mu\text{M}$ (ermittelt in Kombination mit HPIC-IPAD, siehe 3.5.4)
PtdIns(4)P:	$5.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$
PtdIns(3)P:	$0.2 - 0.5 \mu\text{M}$
PtdIns(4,5)P ₂ :	$6.9 \pm 0.8 \mu\text{M}$

Während die Gehalte von PtdIns, PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ sich kaum von axenisch gewachsenen Zellen unterscheiden, kann man deutlich erkennen, dass der PtdIns(3)P – Gehalt in Bakteriensuspension kultivierten AX2-Zellen drastisch abnimmt. Eine quantitative Auswertung war nicht mehr möglich; GroPIns(3)P ist lediglich als Schulter des GroPIns(4)P – Peaks zu erkennen. Der PtdIns(3)P-Gehalt wurde auf $0.2 - 0.5 \mu\text{M}$ abgeschätzt (entspricht 5 – 10 % in Vergleich zu in axenischen Medien kultivierten Zellen).

Anscheinend zeigen aktiv phagozytierende Amöben einen deutlich veränderten PtdIns(3)P-Metabolismus.

Dieses Ergebnis ist besonders interessant in Hinblick auf die natürliche Lebensweise von *D. discoideum*, da PtdIns(3)P in vielerlei Hinsicht mit phagocytotischen Prozessen in Verbindung gebracht wird.

Es ist darauf hinzuweisen, dass die anderen natürlich vorkommenden 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphatisomere (PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃) sowohl bei in axenischen Medien als auch in Bakteriensuspension kultivierten Zellen in solch geringen Konzentrationen auftreten, dass sie sich der HPIC-CD-Analytik entziehen. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Analysen aus Säugetierzellen, die ebenfalls nur sehr geringe Konzentrationen dieser Isomere aufweisen.

4.1.3 Exkurs: PtdIns und PtdInsPx in der *myo*-inositol-auxotrophen

Mutante ΔDdino1

Die beschriebene HPIC-CD-Analytik wurde auch verwendet, um mögliche PtdIns- und PtdInsPx-Konzentrationsänderungen in der *myo*-inositol-auxotrophen Mutante ΔDdino1 während des Hungerns an *myo*-Inositol nachzuweisen. Hier konnte festgestellt werden, dass der PtdIns-Gehalt in der Mutante nach 24 h *myo*-Inositol-Entzug drastisch von anfänglich ca. $125 \mu\text{M}$ (Zellen in Gegenwart von $500 \mu\text{M}$ *myo*-Inositol gewachsen) auf ca. $5 \mu\text{M}$ abfällt.

Auch der PtdIns(4,5)P₂-Gehalt nahm von ca. 6 μ M auf ca. 2 μ M deutlich ab, wohingegen die Konzentrationen der anderen Phosphatidylinositolphosphatisomere PtdIns(3)P und PtdIns(4)P annähernd konstant blieben.

Diese Ergebnisse konnten dazu beitragen, die *myo*-inositol-auxotrophe Mutante Δ Ddino1 näher zu charakterisieren und wurden 2006 im Biochem. J. veröffentlicht.⁶⁶

Folgende Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der intrazellulären PtdIns-Konzentration in der Mutante Δ Ddino1 unter *myo*-Inositolmangel:

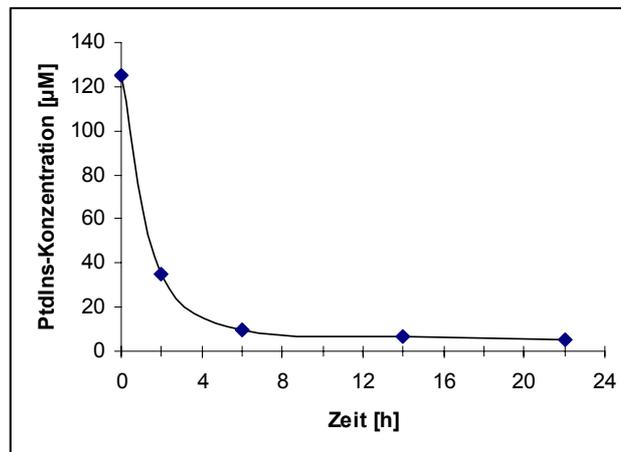


Abb. 19: Intrazelluläre PtdIns-Konzentration in der Mutante Δ Ddino1 in Abhängigkeit von der Zeit des Entzugs an *myo*-Inositol. Zeitpunkt $t = 0$ h entspricht Zellen in Gegenwart von 500 μ M *myo*-Inositol.

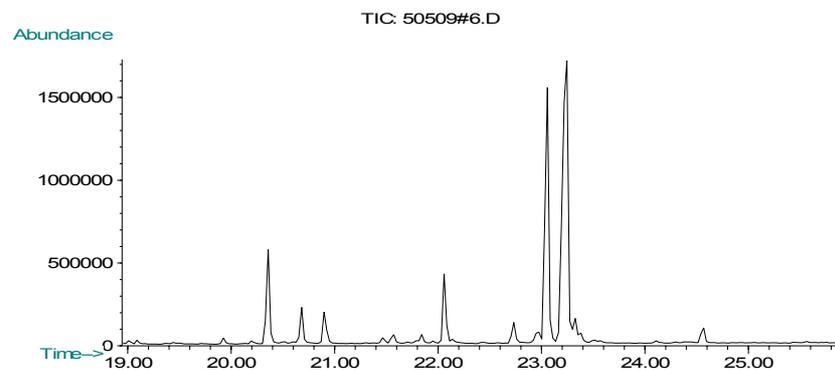
Die Beobachtung, dass der PtdIns-Gehalt zunächst rapide abnimmt, sich dann aber auf etwa 5 % des ursprünglichen Werts stabilisiert, führte zu der Vermutung, dass eventuell zwei verschiedene Pools von PtdIns mit unterschiedlichen Fettsäureresten in den Zellmembranen existieren könnten: eine Hauptmenge an PtdIns einerseits und einem deutlich kleineren Pool an PtdIns andererseits, der aber für die Aufrechterhaltung von PtdInsPx-Konzentrationen notwendig zu sein scheint.

Um diese These von zwei verschiedenen PtdIns-Pools zu überprüfen, wurde eine GC-MS-Analytik der Fettsäuren durchgeführt. Extrahierte Phospholipidproben der Mutante zu den Zeitpunkten 0 h und nach 24 h Hungerzeit wurden hierfür zunächst über 2-D-Dünnschichtchromatographie in ihre einzelnen Komponenten aufgetrennt. Phosphatidylinositol wurde anschliessend wieder vom Kieselgel-Material extrahiert.

Zur gaschromatographischen Analyse erfolgte abschliessend die Darstellung der Fettsäuremethylester mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH). Die GC-MS erlaubte nun die Analyse der Fettsäurezusammensetzung der PtdIns-Proben.

Die GC-MS-Analytik zeigte keine signifikanten Veränderungen der Fettsäuremuster. Es konnten zwar die für Phosphatidylinositol zu erwarteten Fettsäuren (16:0, 16:1, 16:2, 18:0, 18:1, 18:2) detektiert werden,⁸¹ aber das Fettsäuremuster war für beide Proben (a) t = 0 h; b) t = 24 h) recht ähnlich. Somit konnten keine Hinweise auf zwei verschiedene PtdIns-Pools gefunden werden. Allerdings liefert diese Methode keine Information zur Position der einzelnen Fettsäuren am Glycerin.

a)



b)

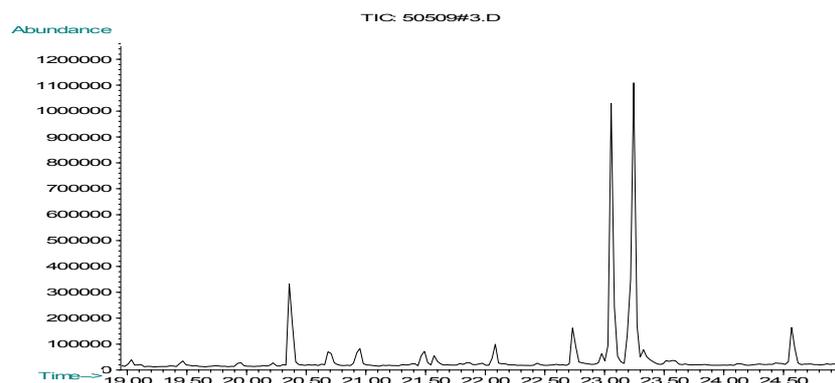


Abb. 20: Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidylinositols in Δ Ddino1. a) zum Zeitpunkt t = 0 h; b) zum Zeitpunkt t = 24 h. Zur GC-MS-Analytik von b) wurde ein 10faches Äquivalent zu a) injiziert. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch Ko-

Chromatographie mit Fettsäuremethylesterstandards und durch massenspektroskopische Auswertung.

Retentionszeiten: 16:0, 20.4 min; 16:1, 20.7 min; 16:2, 20.9 min; 18:0, 22.7 min; 18:1, 23.0 min; 18:2, 23.3 min.

Geräteparameter: GC: HP 5980 Series II; MS: HP 5989 MS Engine (Quadrupol / HED); Autosampler: HP 7673; Vorsäule: CS FS Phenyl-Sil-Desaktivierung 3 m * 0.25 µm ID; Säule: J&W DB-FFAP (30 m * 0.25 µm Film * 0.25 mm ID); Trägergas: Helium 1.2 ml/min; Ionisation: Elektronenstossionisation mit 70 eV; Vakuum: ca. $3.5 \cdot 10^{-6}$ torr

4.2 Untersuchungen zu PtdInsPx-Phosphatase-Aktivitäten in AX2

Es wurde versucht, PtdInsPx-3-Phosphatase Aktivitäten in Zellpräparationen von *D. discoideum* nachzuweisen. Als Testsubstrat wurde di-C8-PtdIns(3)P verwendet (siehe Punkt 3.1), da nur dieses Isomer ausschliesslich in 3-Position eine Phosphatgruppe aufweist.

Der Hersteller Echelon bietet synthetische Phosphatidylinositolphosphate mit zwei gesättigten Fettsäuren der Kettenlänge von je C16, C8 bzw. C4 an. Aus Gründen der Übertragbarkeit auf natürlich vorkommende Phosphatidylinositolphosphate in *D. discoideum*, von denen anzunehmen ist, dass sie vor allem Fettsäurereste von 16 - 18 Kohlenstoffatomen aufweisen (Davidoff et al.),⁸¹ wurde zunächst mit dem di-C16-Produkt gearbeitet. Es zeigte sich jedoch, dass dieses aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in wässrigen Lösungen nur bedingt für die Messung von enzymatischen Aktivitäten zu gebrauchen war. Da die di-C8-Produkte gerade noch in wässrigen Lösungen löslich sind, wurde im Verlauf dieser Arbeit ausschliesslich mit diesen Substanzen als Standardverbindungen weitergearbeitet.

Cytosolische Fraktionen mussten aufgrund des hohen Phosphathintergrunds über eine Chromatographie an Heparin-Agarose weiter aufgearbeitet werden.

Cytosolische Aktivitäten nach Chromatographie an Heparin-Agarose konnten nur in sehr geringer Menge in einer 500 mM – 1000 mM NaCl-Elutionsstufe nachgewiesen werden. Die Gesamtaktivität in dieser Elutionsstufe betrug lediglich ca. 1 mU (ausgehend von $5 \cdot 10^9$ Zellen). Die spezifische Aktivität betrug ca. 0.5 mU/mg.

Solubilisierte Membranfraktionen zeigten hingegen deutlich höhere Aktivitäten. Die Aktivität eluierte bei einer Ionenstärke von 500 mM – 600 mM NaCl und betrug durchschnittlich fast das 1000fache gegenüber dem Eluat der cytosolischen Fraktion

(Gesamtaktivität: ca. 800 mU, ausgehend von $5 \cdot 10^9$ Zellen). Die spezifische Aktivität betrug ca. 32 mU/mg.

Dies zeigt, dass die nachgewiesene PtdIns(3)P-3-Phosphatase-Aktivität von membrangebundenen Proteinen stammt. Es lässt sich nicht zwingend folgern, dass nur ein Protein mit dieser Aktivität in der Membranfraktion vorliegt.

Eine Auftrennung in verschiedene PtdIns(3)P-3-Phosphatasen liess sich durch Chromatographie an Heparin-Agarose nicht erreichen. Sämtliche an das Heparinmaterial gebundenen Proteine eluierten bei einer Ionenstärke von ca. 500 – 600 mM NaCl. Es wurde geschlussfolgert, dass eine mögliche Auftrennung durch Mizellenbildung verhindert wird. Auch Experimente mit niedrigeren Triton X-100 – Konzentrationen (minimiert auf 0.1 %) konnten dieses Problem nicht beheben.

Vergleichsexperimente mit anderen Substraten deuteten darauf hin, dass auch die anderen 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphate (PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃) von membranständigen Proteinen abgebaut werden. Es ist zu bemerken, dass die verwendete analytische Methode des kolorimetrischen Nachweises von freigesetztem Phosphat keine Information über die Position der Dephosphorylierung liefert.

4.3 Inaktivierung eines Gens kodierend für ein myotubularinartiges Protein durch gezielte Mutagenese

Um Erkenntnisse über die physiologische Rolle von 3-dephosphorylierenden PtdInsPx-Phosphatasen in *D. discoideum* zu erlangen, wurde ein myotubularinartiges Protein durch gezielten Knock-Out des kodierenden Gens näher untersucht.

4.3.1 Datenbankrecherche und Homologievergleich zu anderen Organismen

Die genomische Datenbank von *D. discoideum* (<http://dictybase.org/>) wurde nach mutmasslichen 3-Phosphatasen von Phosphatidylinositolphosphaten durchsucht. Neben des schon identifizierten Gens für pten (DDB0191093) konnte ein Gen gefunden werden, das für

ein myotubularinartiges Protein kodiert. Das Gen mit der DictyBase-Identifizierungsnummer DDB0190271 (UniProt-ID: Q55E04) befindet sich auf Chromosom 1 (2791078 bis 2795119) des *D. discoideum*-Genoms und zeigt hohe Homologien zu myotubularinartigen Proteinen kodierenden Genen anderer Organismen (siehe Anhang). Folgende Abbildung zeigt die Protein-Domänenstruktur von DDB0190271. Hervorzuheben sind die GRAM-Domäne (rot) und die PtdInsPx-3-Phosphatase-Region mit dem Motiv CSDGWDR (gelb).

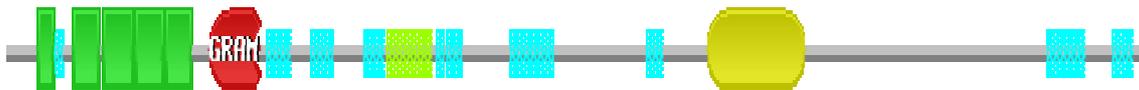


Abb. 21: Schematische Darstellung der Protein-Domänenstruktur von DDB0190271 (Q55E04) anhand der Datenbank „Protein families database of alignments and HMMs“ (Pfam); <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/swisspfamget.pl?name=Q55E04>.

In rot die GRAM-Domäne, in gelb die PtdInsPx-3-Phosphatase-Region, in grün Ankyrin-Domänen, in hellgrün eine coiled-coil-Domäne, hellblau sind Bereiche geringer Komplexität.

Aufgrund der hohen Homologie zu myotubularinartigen Proteinen anderer Organismen und der Existenz charakteristischer Domänen, kann davon ausgegangen werden, dass DDB0190271 für eine PtdInsPx-3-Phosphatase kodiert.

4.3.2 Generierung von Mutanten durch homologe Rekombination

Der Gen-Knock-Out durch homologe Rekombination ist ein weit verbreitetes Werkzeug zur gezielten Mutagenese. Über die generierten Knock-Out-Mutanten lässt sich das interessierende Gen funktional analysieren. Voraussetzung für die homologe Rekombination sind DNA-Abschnitte mit gleicher oder sehr ähnlicher Basenabfolge.

Die Generierung von Mutanten über homologe Rekombination erfolgt üblicherweise durch Insertion von Resistenzkassetten, zum Beispiel für Blastocidin oder Geneticin in das

entsprechende Gen. Hierfür wird ein entsprechender Transformationsvektor konstruiert, der zusätzlich die nicht-homologe Resistenzkassette enthält. Im Idealfall kommt es durch homologe Rekombination im Zielorganismus zu einem völligen Verlust der Genexpression.

Für die Konstruktion des notwendigen Transformationsvektors wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst über Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) ein ca. 1.7 kb grosser DNA-Abschnitt aus DDB0190271 amplifiziert. Durch gezielte Wahl der hierfür verwendeten Primer liessen sich gleichzeitig zwei Restriktionsenzym-Schnittstellen (*EcoRI* und *HindIII*) an den Enden des Amplifikats generieren (siehe auch Anhang).

Das amplifizierte DNA-Fragment besitzt zudem in mittlerer Position eine *XmiI*-Schnittstelle.

Verwendete Oligonukleotide (Primer):

HRAM1: 5' - GTA **AAG** CTT CAT TAA ATT TAG TTA ATC C – 3'
28 bp, T_M: 56.3 °C

HRAM2: 5' - GAT TTT **GAA** TTC TAT CTT TTT CAC AAT T – 3'
28 bp, T_M: 54.9 °C

Die fett markierten Buchstaben kennzeichnen die Restriktionsschnittstellen (HRAM1: *HindIII* sowie HRAM2: *EcoRI*). Hierfür musste im Falle des HRAM1-Primers die Base Adenin gegen Guanin ausgetauscht werden (unterstrichener Buchstabe).

Durch „sticky-end-ligation“ dieses DNA-Fragments über die *EcoRI*- und *HindIII*-sites in den pUC18-Vektor (2.7 kb; siehe Anhang) wurde der Replikationsvektor AM01 (4.4 kb) konstruiert.

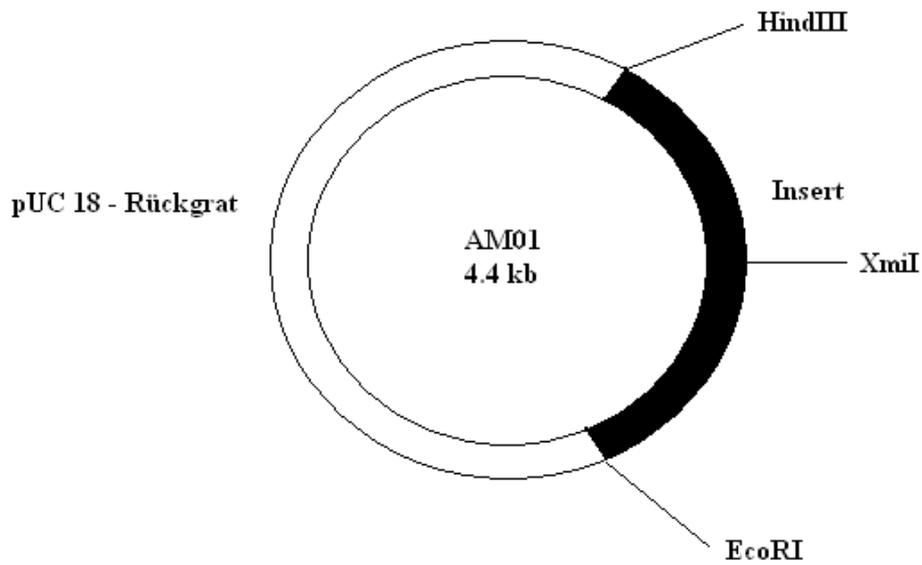


Abb. 22: Schematische Darstellung des Replikationsvektors AM01.

Der Transformationsvektor zum Gen-Knock-Out AM02 (5.8 kb) wurde durch „blunt-end-ligation“ des 1.4 kb grossen *Bam*HI-*Hind*III-Fragments aus pUCBsrΔBam, das das Gen für die Blasticin-S-Deaminase aus *Bacillus cereus* unter Kontrolle des Aktin 15-Promotors und des Aktin 8-Terminators enthält, in die *Xmi*I-site von AM01 konstruiert.

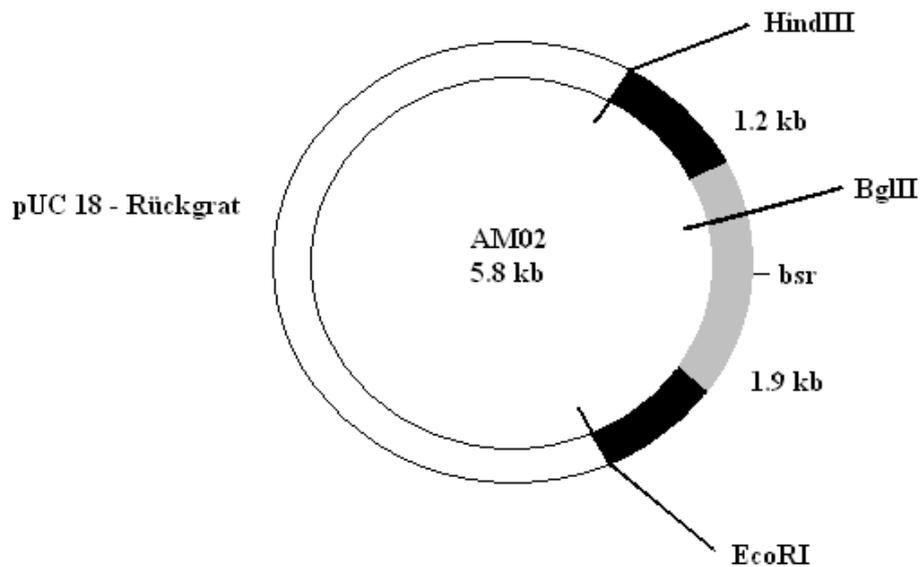


Abb. 23: Schematische Darstellung des Transformationsvektors AM02 zur homologen Rekombination.

Dieser Vektor wurde sowohl ungeschnitten, linearisiert durch Verdau mit *HindIII*, als auch doppelt geschnitten (*EcoRI* und *HindIII*) über Elektroporation in Zellen von *D. discoideum* AX2 eingeschleust. Unter Selektionsdruck wurden blasticidinresistente Transformanten isoliert und über PCR analysiert.

Es wurden eine Reihe von blasticidinresistenten Transformanten selektiert, die nachweislich in ihrem Genom die Blasticidinresistenzkassette eingebaut hatten, aber das eigentliche Zielgen blieb aus bisher unerklärlichen Gründen in diesen unverändert. Der Nachweis der eingebauten Blasticidinresistenzkassette erfolgte über PCR mit *bsr*-spezifischen Primern und AX2-DNA als Nullprobe.

Verwendete Oligonukleotide (Primer) zum Nachweis der Blasticidinkassette:

BlaAM1: 5' - CTC AAC AAG ATC TAG AAT TAG TAG AAG - 3'

27 bp, T_M : 58.9 °C

BlaAM2: 5' - GGC TGT TTT ACA TCT AAT GCA TAT ATT - 3'

27 bp, T_M : 57.4 °C

Nur bei Verwendung des doppelt geschnittenen Transformationsvektors konnte ein Klon mit verändertem Zielgen isoliert werden. Dieser wird im Folgenden als Δ Ddmtmr (mtmr als Synonym für myotubularin related protein) bezeichnet. Anscheinend wirkte sich die Abtrennung vom pUC18-Rückgrat positiv auf einen korrekten Einbau in das Genom aus. Der Nachweis erfolgte aus genomischer DNA der generierten Mutante und nachfolgender PCR mit dem oben angeführten HRAM-Primerpaar; die Bedingungen der PCR mussten aufgrund der vergrößerten Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts modifiziert werden (siehe Punkt 3.3.2). Als Kontrolle wurde wieder DNA des Elternstamms AX2 verwendet.

Zur weiteren Verifizierung wurde eine Restriktionsenzymanalytik des 3.1 kb grossen PCR-Amplifikats mit *Bg*/II durchgeführt. Das erhaltene Abbaumuster stimmt exakt mit dem theoretisch erwarteten Muster (1.9 kb + 1.2 kb) überein (siehe Abbildungen 23, 24 und Anhang „100 bp-DNA-Leiter, extended“).

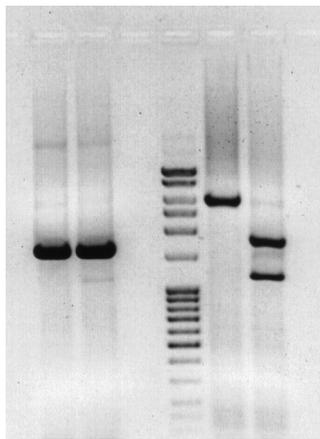


Abb. 24: Identifizierung der Knock-Out-Mutante Δ Ddmtmr über PCR, Agarosegelelektrophorese und enzymatischem Verdau. Von links nach rechts: AX2-DNA, 1.7 kb PCR-Amplifikat; AX2-DNA, 1.7 kb PCR-Amplifikat + *Bg*/II; DNA-Längenstandard; Δ Ddmtmr-DNA, 3.1 kb PCR-Amplifikat; Δ Ddmtmr-DNA, 3.1 kb PCR-Amplifikat + *Bg*/II: zwei DNA-Fragmente (1.9 kb + 1.2 kb).

4.3.3 Versuche zur Antisense-Mutagenese

Eine weitere Möglichkeit zur gezielten Unterdrückung der Expression bestimmter Gene bietet die Nutzung von Antisense-RNA. Hierbei wird das interessierende Gen (oder ein Genabschnitt) in Antisense-Orientierung in einen Expressionsvektor kloniert. Eine Transformation dieses Vektors in den Zielorganismus kann zur vollständigen oder stark reduzierten Translation des Genprodukts führen. Mittels Antisense-Mutagenese lassen sich meist auch genetische Manipulationen durchführen, die sich bei einem vollständigen Knock-Out lethal für den Organismus auswirken würden. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Antisense-Genabschnitt nicht spezifisch in das Genom eingebaut werden muss, in der Tat ist es vielmehr so, dass zumeist mehrere Kopien eingebaut werden, die für die Antisense-RNA kodieren. Insofern sind die Transformationsraten normalerweise deutlich höher als bei der homologen Rekombination.

In der vorliegenden Arbeit diente der Vektor pDexRH (5.2 kb) als Expressionsvektor. Das *EcoRI-HindIII*-Fragment aus AM01 (siehe Abb. 22) wurde durch „sticky-end-ligation“ in Antisense-Orientierung in pDexRH eingefügt. Das eingefügte Antisense-Insert (siehe Abb. 25) steht dabei unter Kontrolle des Aktin 15-Promotors und des Aktin 8-Terminators. Der resultierende Transformationsvektor AM03 (6.9 kb) wurde sowohl ungeschnitten als auch linearisiert (durch einfachen Verdau mit *BglII*) in AX2-Zellen über Elektroporation eingeschleust. Unter Selektionsdruck wurden G418-resistente Transformanten isoliert und über enzymatische Aktivitätstests aus Membranpräparationen analysiert.

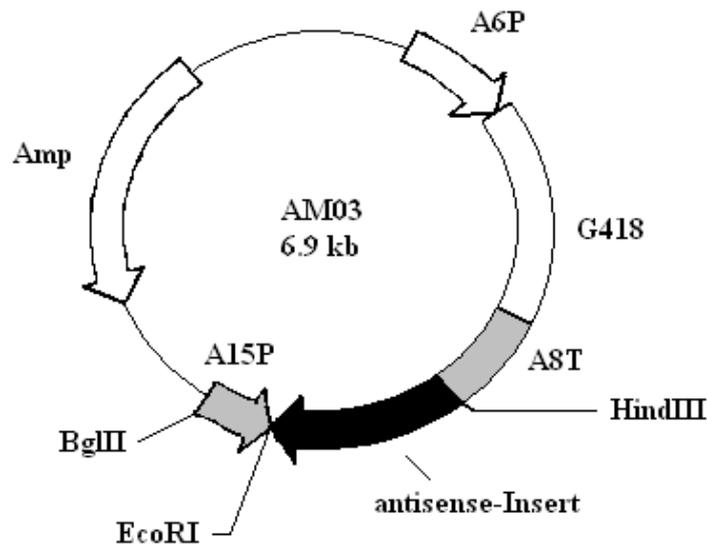


Abb. 25: Schematische Darstellung des Transformationsvektors AM03 zur Antisense- Mutagenese.

Im Gegensatz zum Gen-Knock-Out durch homologe Rekombination, führten die Antisense-Ansätze zu keiner erfolgreichen Genabschaltung. In allen isolierten, G418 resistenten Stämmen konnten keinerlei Veränderungen von PtdInsPx-Phosphataseaktivitäten festgestellt werden. Woran dieser Misserfolg lag, konnte nicht vollständig geklärt werden. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, entspricht die einfache Vorstellung, dass die Antisense-RNA und die mRNA des Zielgens direkt miteinander wechselwirken, nicht den wirklichen Umständen. Tatsächlich ist der Vorgang der Genabschaltung durch asRNA wesentlich komplexer.⁵⁵

Problematisch bei der Antisense-Technik ist zudem, dass das kodierende Zielgen im Organismus weiterhin intakt bleibt. So führt eine ungenügende Expression der Antisense-RNA zu negativen Ergebnissen.

Man muss desweiteren davon ausgehen, dass selbst eine nachweisliche Verringerung des mRNA-Levels nicht zwangsläufig im gleichen Masse zu einer verringerten Proteinexpression führen muss.

4.4 Phänotypische Charakterisierung der Mutante Δ Ddmtmr

Zunächst erfolgte eine phänotypische Charakterisierung anhand leicht beobachtbarer Eigenschaften wie Wachstum, Endocytose und Differenzierungsverhalten.

4.4.1 Wachstum

Die Morphologie und Zellgrösse von vegetativen Zellen sind kaum verändert. In axenischen Flüssigmedien zeigt Δ Ddmtmr eine leicht verringerte Zellgrösse gegenüber AX2 (ca. 15 % kleineres Zellvolumen).

4.4.1.1 Wachstum in axenischem Medium

AX2 verdoppelt sich in HL-5 Medium unter optimalen Lebensbedingungen (22 °C, genügender Sauerstoffzufuhr) ca. alle 10 – 11 h. Die Verdopplungszeit ist bei Verwendung von vollsynthetischem FM Medium etwas länger (ca. 12 - 13 h).

Das Wachstum des Δ Ddmtmr-Stammes auf Flüssigmedien (HL-5 und FM) ist nicht signifikant unterschiedlich gegenüber dem Elternstamm AX2. Δ Ddmtmr zeigt unter optimalen Bedingungen ebenfalls eine Verdopplungszeit von ca. 10 – 11 h in HL-5, und von ca. 12 – 13 h in FM-Medium. Um einen permanenten Selektionsdruck aufrechtzuerhalten, erfolgte die Kultivierung der Mutanten in Anwesenheit des Antibiotikums Blasticidin. Standardmässig wurde mit einer Antibiotikakonzentration von 10 μ g/ml in axenischen Flüssigmedien gearbeitet. Variationen dieser Konzentration von 0 – 50 μ g/ml bewirkten keinerlei Änderungen im Wachstum. Erst ab Konzentrationen über 50 μ g/ml wuchsen die Zellen deutlich langsamer (Verdopplungszeiten von ca. 24 h).

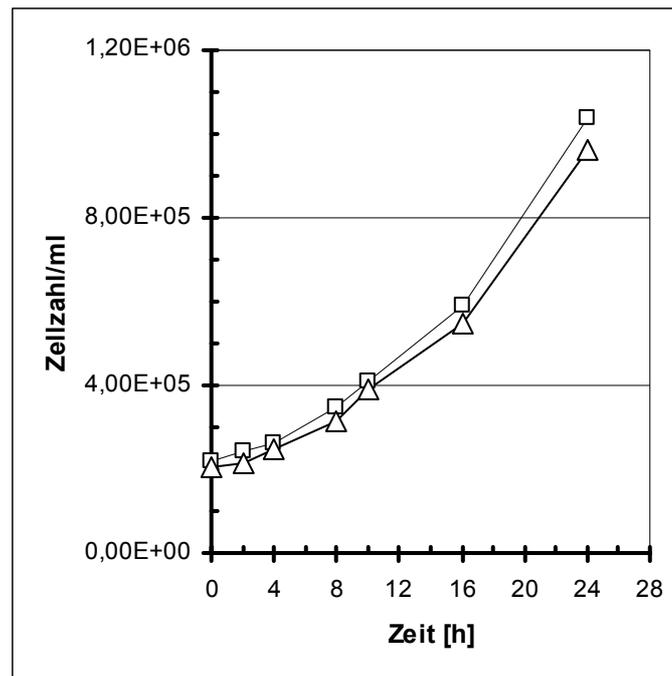


Abb. 26: Repräsentativer Wachstumsvergleich von AX2 (□) und Δ Ddmtmr (Δ) in HL-5 Medium. Gemessene Verdopplungszeiten betragen sowohl für AX2 als auch für Δ Ddmtmr ca. 10 - 11 h. Zellgrößen: AX2 $750 \pm 20 \mu\text{m}^3$; Δ Ddmtmr $650 \pm 20 \mu\text{m}^3$; Inkubationsbedingungen: 100 ml HL-5 Medium bei 22 °C und 120 Upm.

Das Wachstumsverhalten in bakterienfreien Flüssigmedien lässt zunächst keinerlei signifikante Unterschiede der Pinocytose vermuten. Dies konnte durch Messungen der Pinocytoserate verifiziert werden (siehe Punkt 4.4.2.1).

4.4.1.2 Wachstum in Bakteriensuspension

In dieser Arbeit wurde der Stamm *E. coli* B/r als Nahrungsquelle verwendet.

Im Gegensatz zum Elternstamm, der sich in geschüttelten Bakteriensuspensionen von *E. coli* ca. alle 2 - 3 h verdoppelt, zeigt die Mutante Δ Ddmtmr ein deutlich geringeres Wachstum. Die Generationszeit ist ca. doppelt so lange und beträgt ca. 4 - 5 h (siehe Wachstumskurven in Abb. 27).

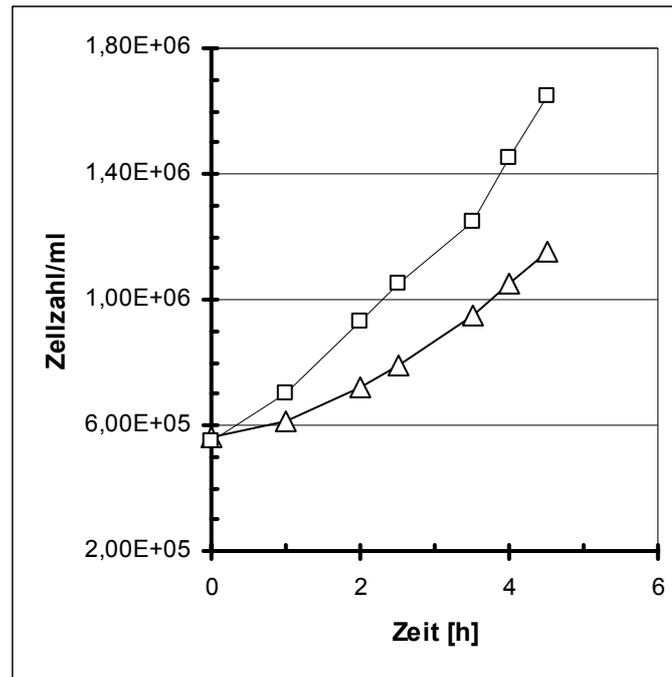
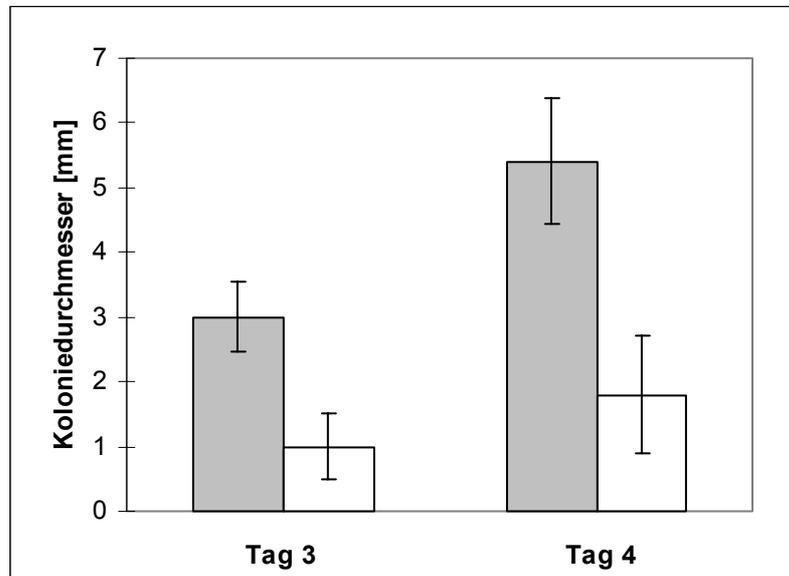


Abb. 27: Repräsentativer Wachstumsvergleich von AX2 (□) und ΔDdmtmr (Δ) in *E. coli* Schüttelkulturen. Gemessene Verdopplungszeiten: AX2 ca. 2 - 3 h; ΔDdmtmr ca. 4 - 5 h. Zellgrößen: AX2 $390 \pm 15 \mu\text{m}^3$; ΔDdmtmr $400 \pm 15 \mu\text{m}^3$; Inkubationsbedingungen: 100 ml Bakteriensuspension in Sörensen-Phosphat-Puffer bei 22 °C und 120 Upm.

Konsistent zu diesem Befund ist das Wachstum auf Bakterienrasen ebenfalls deutlich unterschiedlich. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 dargestellt. Die Koloniedurchmesser des Elternstamms waren im Schnitt zwei- bis dreimal grösser als die der Mutante.

a)



b)

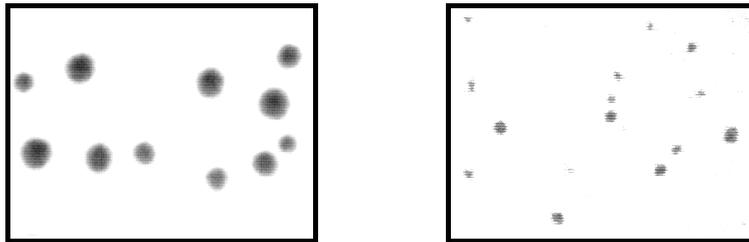


Abb. 28: Repräsentativer Wachstumsvergleich von AX2 (grauer Balken (a) und linkes Foto (b)) und Δ Ddmtmr (weisser Balken (a) und rechtes Foto (b)) auf Bakterienrasen. Die unter b) abgebildeten Fotos wurden nach 3 Tagen aufgenommen; gemittelte Koloniedurchmesser nach 3 Tagen: AX2 Stamm: 3 ± 0.5 mm; Δ Ddmtmr-Stamm: 1 ± 0.5 mm.

Um diese deutlichen Wachstumsdefekte auf Bakterien näher zu verstehen, wurden Messungen der Endocytoseraten durchgeführt.

4.4.2 Endocytose

4.4.2.1 Pinocytose

Pinocytoseraten konnten durch Zugabe von FITC-Dextran in das axenische Medium bestimmt werden. Repräsentative Messungen der Pinocytoseraten sind in Abb. 29 dargestellt.

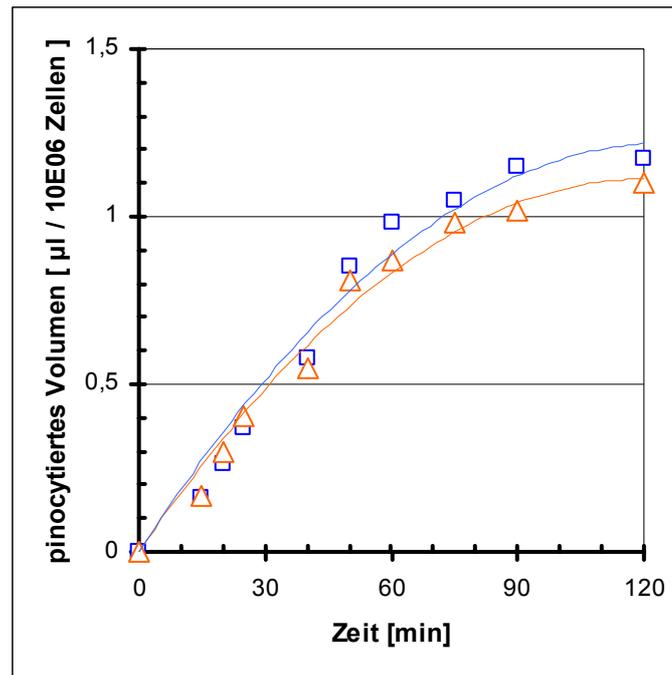


Abb. 29: Vergleich der Pinocytoseraten von AX2 (□) und ΔDdmtmr (Δ).

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet (500 g, 4 °C, 10 min), dreimal mit Sörensen-Puffer gewaschen, auf eine Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in axenischem Medium resuspendiert und vorinkubiert (22 °C, 120 Upm). Nach ca. 30 min erfolgte die Zugabe von FITC-Dextran (Endkonzentration von 2 mg/ml).

Die Pinocytoserate von ΔDdmtmr ist der von AX2 gleich. Beide betragen ca. 0.5 µl in 30 Minuten pro 10^6 Zellen. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Beobachtung, dass die Zellen in axenischem Medium genauso gut wachsen wie AX2-Zellen (siehe Punkt 4.4.1.1).

4.4.2.2 Phagozytose

Phagozytoseraten wurden durch Verwendung von carboxylierten Polystyrolbeads als Modellpartikel bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 30 dargestellt.

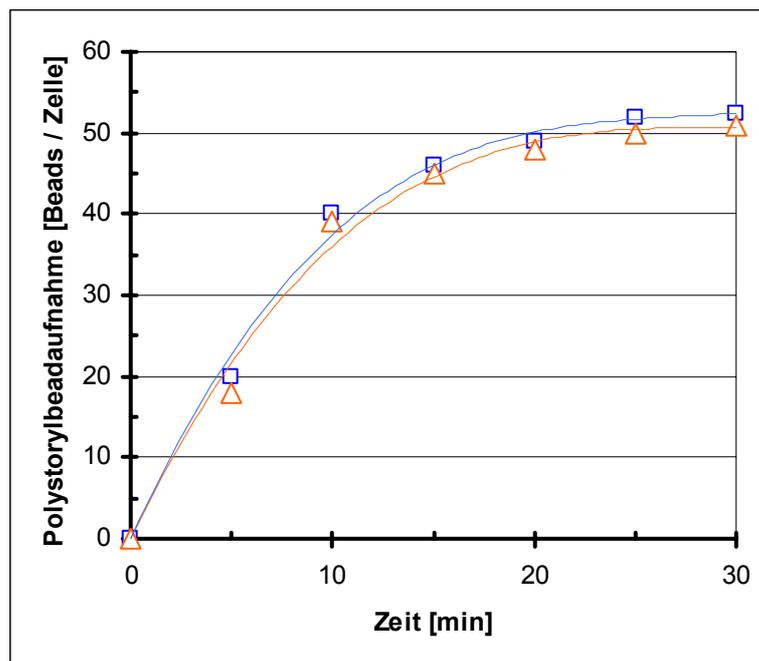


Abb. 30: Vergleich der Phagozytose von carboxylierten Polystyrolbeads bei AX2 (□) und ΔDdmtmr (Δ).

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet (500 g, 4 °C, 10 min), dreimal mit Sörensen-Puffer gewaschen, auf eine Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in axenischem Medium resuspendiert und vorinkubiert (22 °C, 120 Upm). Nach ca. 30 min erfolgte die Zugabe an hydrophilen carboxylierten Polystyrolbeads (1 μm), so dass sich eine Relation von rund 200 Partikeln pro Zelle ergab.

Sowohl AX2 als auch ΔDdmtmr nehmen carboxylierte Polystyrolbeads recht ähnlich auf. In beiden Fällen betragen die Phagozytoseraten durchschnittlich 4 Partikel pro Minute und Zelle. Die Endkapazität beträgt ca. 50 Partikel pro Zelle und ist in beiden Stämmen nach ca. 20 – 25 Minuten erreicht.

Es ist daher anzunehmen, dass eine gestörte Partikelinternalisierung anscheinend nicht der Grund dafür ist, dass der Δ Ddmtmr-Stamm langsamer auf Bakterien wächst. Die Wachstums- und die Phagocytose-Experimente lassen eher darauf schließen, dass der Phagocytose nachgeschaltete degradative Prozesse negativ beeinflusst sind.

In den nachfolgenden Kapiteln wird versucht, diese Erkenntnisse mit in Δ Ddmtmr eventuell vorhandenen reduzierten PtdInsPx-3-Phosphataseaktivitäten und/oder modifizierten Gehalten von inositolhaltigen Metaboliten (insbesondere von 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphatisomeren) in Zusammenhang zu bringen.

4.4.3 Differenzierungsverhalten

Chemotaxis, die zielgerichtete Bewegung auf einen Lockstoff bzw. von ihm weg (negative Chemotaxis), ist eine generelle Eigenschaft zahlreicher motiler Eukaryonten. *D. discoideum* reagiert positiv chemotaktisch sowohl auf das Beutesignal Folsäure, das von Bakterien produziert wird, als auch auf das Hungersignal cAMP, das die Entwicklungsphase einleitet.⁸² Es zeigte sich, dass das Differenzierungsverhalten nicht verändert ist. Δ Ddmtmr-Zellen zeigen eine normale positive Chemotaxis zu cAMP (auch die positive Chemotaxis zu Folsäure ist nicht eingeschränkt). Desweiteren zeigen Δ Ddmtmr-Zellen vergleichbare adhäsive Eigenschaften wie AX2-Zellen. Auch die Aggregation und die Entwicklung sind ebenfalls nicht gestört. Δ Ddmtmr bildet vergleichbar dem Elternstamm nach ca. 24 h Fruchtkörper aus; auch die Zwischenstadien der Differenzierung weisen zeitlich und morphologisch keine Unterschiede auf.

Anscheinend wirkte sich der Gen-Knock-Out nicht auf die Chemotaxis und das Aggregationsverhalten bzw. die Entwicklung aus.

4.5 Vergleich von Δ Ddmtmr und AX2 bezüglich PtdInsPx-Phosphatase-Aktivitäten

Um Veränderungen im PtdInsPx-Stoffwechsel zu untersuchen, wurden enzymatische Tests mit Phosphatidylinositolphosphaten durchgeführt. Für die Bestimmung und den Vergleich von dephosphorylierenden Aktivitäten wurden Membranpräparationen von AX2 und Δ Ddmtmr verwendet. Als Substrate wurden nur die wasserlöslichen di-C8-PtdInsPx eingesetzt. Die eigentliche Bestimmung von dephosphorylierenden Aktivitäten erfolgte über die zeitabhängige Quantifizierung von freigesetztem Phosphat nach Lanzetta.

Abb. 31 gibt den Abbau der metabolisch relevanten Phosphatidylinositolphosphatisomere wieder; die AX2-Membranpräparation dient hierbei als Referenz.

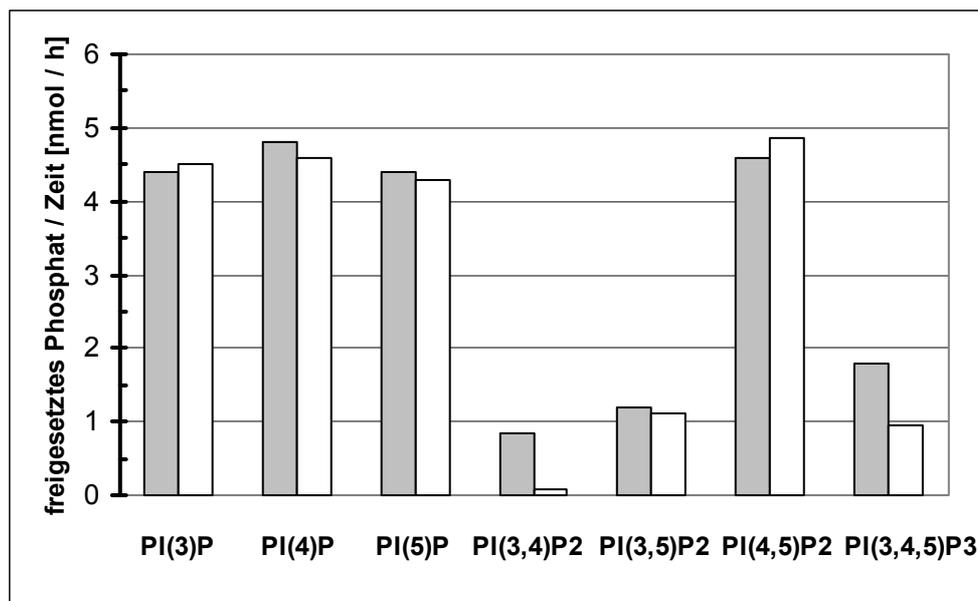


Abb. 31: Repräsentativer Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung verschiedener Phosphatidylinositolphosphate durch membranständige Phosphatasen aus AX2 (grauer Balken) und Δ Ddmtmr (weisser Balken). Eingesetzt wurden je 20 μ g Membranproteingemisch. Vorarbeiten konnten zeigen, dass die Bildung anorganischen Phosphats in der gemessenen Zeit linear verläuft und direkt proportional zur eingesetzten Zell- bzw. Proteinmenge ist.

Die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung von PtdIns(3)P und der beiden anderen Phosphatidylinositolmonophosphate PtdIns(4)P und PtdIns(5)P ist in beiden Stämmen sehr ähnlich; die prozentuale Abweichung beträgt maximal ca. 5 %. Ebenso verhält es sich bei den Substraten PtdIns(3,5)P₂ und PtdIns(4,5)P₂. Dies ist insofern überraschend, da davon ausgegangen wurde, dass aufgrund der gezielten Abschaltung eines Gens, das für ein myotubularinartiges Protein kodiert, der Abbau vor allem des Metaboliten PtdIns(3)P beeinflusst ist.

Es ist bekannt, dass PtdIns(3)P-3-Phosphatasen anderer eukaryontischer Organismen neben ihrer Aktivität gegenüber PtdIns(3)P zumeist auch eine Aktivität gegenüber dem löslichen Inositolphosphatanalogon Ins(1,3)P₂ besitzen.⁸³ Vergleichsexperimente mit Ins(1,3)P₂ als lösliches Substratanalogon zeigten für beide Stämme ebenfalls eine identische Phosphatfreisetzung (nicht abgebildet). Sowohl die Experimente mit PtdIns(3)P als auch mit Inositol(1,3)bisphosphat deuten darauf hin, dass es sich bei dem ausgeschalteten Enzym nicht, wie ursprünglich angenommen, um eine PtdIns(3)P-3-Phosphatase handelt.

Interessanterweise ist hingegen die Dephosphorylierung von PtdIns(3,4)P₂ bei Δ Ddmtmr deutlich gestört, diese beträgt weniger als 10 % bezogen auf AX2. Auch die Dephosphorylierung von PtdIns(3,4,5)P₃ ist verringert (ca. 50 -60 % bezogen auf AX2). Ob das ausgeschaltete Enzym sowohl PtdIns(3,4)P₂ als auch PtdIns(3,4,5)P₃ als Substrate erkennen kann, oder ob der verringerte Abbau von PtdIns(3,4,5)P₃ nur eine Folge dessen darstellt, dass das nach 5-Dephosphorylierung resultierende Zwischenprodukt PtdIns(3,4)P₂ deutlich langsamer dephosphoryliert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Auch die Position der Dephosphorylierung (3- bzw. 4-Position) konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden. Aufgrund der hohen Homologie zu bekannten Myotubularinen anderer Organismen, die allesamt PtdInsPx-3-Phosphatasen darstellen, und der Existenz einer typischen PtdInsPx-3-Phosphatase-Domäne im untersuchten Enzym (siehe Punkt 4.3.1), ist von einer Dephosphorylierung an der 3-Position auszugehen.

Es ist somit festzuhalten, dass der mit Abstand grösste prozentuale Unterschied bei Inkubation mit PtdIns(3,4)P₂ als Testsubstrat auftritt. Es wird daher davon ausgegangen, dass das Gen DDB0190271 für eine PtdIns(3,4)P₂-3-Phosphatase kodiert, die vorzugsweise PtdIns(3,4)P₂ zu PtdIns(4)P dephosphoryliert und dass der gezielte Knock-Out dieses Gens (und als Folge dessen die reduzierte Phosphataseaktivität) für das reduzierte Wachstum des Δ Ddmtmr-Stamms auf Bakterien verantwortlich ist.

4.6 Analytik von *myo*-inositolhaltigen Metaboliten in Δ Ddmtmr und AX2

Die Gehalte von *myo*-inositolhaltigen Metaboliten in vegetativen Δ Ddmtmr- und AX2-Zellen wurden über verschiedene analytische Methoden qualitativ und quantitativ bestimmt.

4.6.1 Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositolphosphate

Phosphatidylinositolphosphate wurden nach Deacylierung über hochauflösende Ionenchromatographie unter Verwendung von Leitfähigkeitsdetektion (HPIC-CD) analysiert (siehe Punkt 3.5.3). Zur Bestimmung des PtdIns-Gehaltes musste eine modifizierte Methode verwendet werden (siehe Punkt 3.5.4).

Abb. 32 gibt exemplarisch ein Übersichtsspektrum von deacylierten Phosphatidylinositolphosphaten aus Δ Ddmtmr wieder. Der PtdIns-Gehalt wurde separat bestimmt.

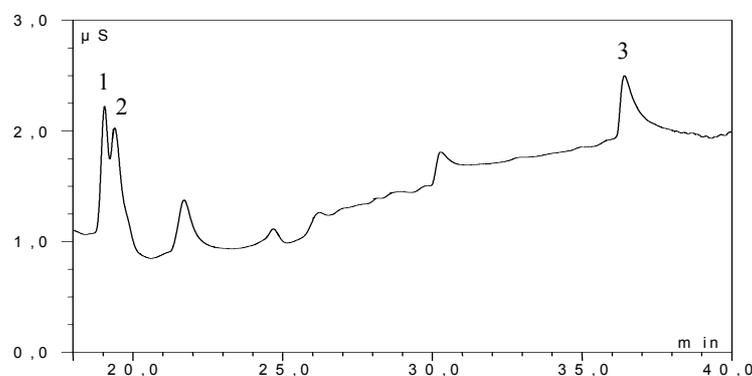


Abb. 32: HPIC-CD Analytik einer deacylierten Präparation aus Δ Ddmtmr, axenisches Nährmedium. Injektion eines Äquivalents von $2.5 \cdot 10^7$ Zellen.
1: GroPIns(4)P, 19.2 min; 2: GroPIns(3)P, 19.7 min; 3: GroPIns(4,5)P₂, 36.5 min

Die quantitative Auswertung und der Vergleich mit den Daten für den Elternstamm AX2 (siehe Punkt 4.1.2) zeigen, dass sich die intrazellulären Konzentrationen der Phosphatidylinositolphosphate PtdIns(4)P, PtdIns(3)P und PtdIns(4,5)P₂ nicht nennenswert

unterscheiden. Auch der PtdIns-Gehalt ist in der Mutante nicht beeinflusst; in beiden Stämmen betrug die intrazelluläre PtdIns-Konzentration ca. 60 - 70 μM . Zu AX2 vergleichbare Konzentrationen von PtdIns, PtdIns(4)P, PtdIns(3)P und PtdIns(4,5)P₂ ergaben sich auch bei Experimenten mit in Bakteriensuspension kultivierten ΔDdmtmr -Zellen.

Dass im Falle der prominenten Phosphatidylinositolphosphate keine Änderungen der intrazellulären steady-state-Konzentrationen beobachtbar sind, ist konsistent mit den Ergebnissen aus Punkt 4.5, dass der Abbau von PtdIns(3)P, PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ in der Mutante nicht beeinflusst ist.

Problematisch ist in diesem Zusammenhang, dass PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ aufgrund ihrer sehr geringen intrazellulären Konzentrationen mit dieser Methode nicht nachweisbar sind. Eine Aussage über eventuelle Veränderungen der Gehalte dieser beiden Metabolite ist daher nicht möglich. Hier müsste man mit radioaktiv markierten Verbindungen arbeiten, um eine höhere Nachweisempfindlichkeit zu erzielen.

4.6.2 *Myo*-Inositol und *myo*-Inositolphosphate

Der intrazelluläre *myo*-Inositol-Gehalt wurde über hochauflösende Ionenchromatographie mit integrierter gepulster Amperometrie als Detektionsmethode (HPIC-IPAD) bestimmt (siehe Punkt 3.5.4).

Lösliche *myo*-Inositolphosphate (InsP₃ – InsP₈) wurden über hochauflösende Flüssigkeitschromatographie mit Nachsäulenderivatisierung (HPLC-MDD) analysiert (siehe Punkt 3.5.5).

Die in der Mutante gemessenen Gehalte von *myo*-Inositol und löslicher *myo*-Inositolphosphate im Bereich von InsP₃ – InsP₈ wurden mit denen des Elternstamms AX2 verglichen. In beiden Stämmen betrug die intrazelluläre *myo*-Inositol-Konzentration ca. 40 μM . Auch die Konzentrationen der *myo*-Inositolphosphate waren denen von AX2 sehr ähnlich.⁶⁶

Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass es sich bei dem ausgeschalteten Enzym um eine myotubularinartige Phosphatase handelt, da diese nur die membranständigen Phosphatidylinositolphosphate als Substrate erkennen und die somit nicht direkt im Metabolismus von *myo*-Inositolphosphaten und des *myo*-Inositols involviert sind.

4.7 Abschliessende Betrachtung und Ausblick

Es wurde eine Mutante aus dem *D. discoideum* Stamm AX2 über homologe Rekombination generiert, bei der ein Gen, das für ein myotubularinartiges Protein kodiert, inaktiviert wurde. Diese Mutante zeigt deutliche Wachstumsdefekte bei Bakterien als Nahrungsquelle.

Es konnte gezeigt werden, dass der Phosphatidylinositolphosphatmetabolit PtdIns(3,4)P₂ (und zu einem gewissen Grad auch PtdIns(3,4,5)P₃) von Membranpräparationen der Mutante wesentlich langsamer dephosphoryliert wird. Der direkte Nachweis und die Quantifizierung dieser beiden Metabolite waren jedoch über die verwendete analytische Methode der Leitfähigkeitsdetektion nicht möglich. Hier wären Experimente mit radioaktiv markierten Substanzen denkbar, die gegebenenfalls einen direkten Einfluss der Geninaktivierung auf die steady-state-Konzentrationen von PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ zeigen würden. Offensichtlich konnte über die Mutagenese eine sehr spezifische Manipulation im Stoffwechsel von *myo*-inositolhaltigen Metaboliten vorgenommen werden. Sowohl die Gehalte der prominenten Phosphatidylinositolphosphate (PtdIns(3)P, PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂) als auch die von PtdIns, *myo*-Inositol und den löslichen *myo*-Inositolphosphaten (InsP₃ – InsP₈) sind nicht verändert. Dies bedeutet, dass das eingeschränkte Wachstum auf Bakterien nicht direkt mit den zuvor aufgeführten Metaboliten, sondern mit aller Wahrscheinlichkeit mit den 3-phosphorylierten Verbindungen PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ in Zusammenhang steht, und auf einen gestörten Metabolismus dieser beiden Phosphatidylinositolphosphate beruht, insbesondere des PtdIns(3,4)P₂.

Anscheinend wirkt sich die zielgerichtete Mutagenese und die damit verbundene Inaktivierung eines myotubularinartigen Proteins nur auf Prozesse aus, die der Partikelinternalisierung nachgeschaltet sind. Veränderungen anderer physiologischer Prozesse konnten nicht festgestellt werden. So sind die Chemotaxis, die Pinocytose- und Phagocytoseraten sowie das Wachstum in axenischen Medien bei der Mutante nicht beeinflusst. Dies ist konsistent mit dem bisherigen Wissen über die molekularen Grundlagen dieser Prozesse im Organismus *D. discoideum*: Es konnte gezeigt werden, dass ein räumliches und zeitliches Zusammenspiel von PTEN und PI3K, die beide am Stoffwechsel von PtdIns(3,4,5)P₃ beteiligt sind, den ausschlaggebenden Regulationsmechanismus für chemotaktische Prozesse in *D. discoideum* darstellt.^{63,64,84} Insofern war es nicht zu erwarten, dass sich der Knock-Out auf die Chemotaxis auswirkt.

Die Wachstumsstudien auf axenischen Medien und die Pinocytostests bei der Mutante ergaben keine Veränderungen gegenüber dem Elternstamm AX2. Dass in der Mutante der Phagocytose nachgeschaltete Prozesse beeinträchtigt sind, bedeutet nicht zwangsläufig, dass der Pinocytose nachgeschaltete Prozesse ebenfalls beeinflusst sein müssen. Es ist hier zu bedenken, dass die natürliche Lebensweise von *D. discoideum* die Phagocytose und der Verdau von Bakterien ist, und dass Pinocytose und Phagocytose in *D. discoideum* zwei unterschiedlich gesteuerte Prozesse darstellen.^{46,85} Im Fall der Phagocytose wird postuliert, dass die Metaboliten PtdIns(3,4)P₂ bzw. PtdIns(3,4,5)P₃ nicht an den frühen Prozessen der Partikelbindung und der Bildung des phagocytic cup beteiligt sind.⁶⁰ Die nachfolgende Fusion der Partikel umfließenden Membranen führt zur Bildung des primären Phagosoms. Dieser Prozess ist offensichtlich beim Organismus *D. discoideum* ursächlich auf das Vorhandensein von PtdIns(3,4,5)P₃ und auf die Dephosphorylierung von PtdIns(3,4,5)P₃ durch eine 5-Phosphatase zurückzuführen.^{59,60} Dafür spricht auch die *in vivo* beobachtete lokale, schnelle Bildung und der schnelle Abbau von PtdIns(3,4,5)P₃ an den Phagosomenmembranen während der Partikelinternalisierung. Studien der Phagocytose bei *D. discoideum* unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten PtdInsPx-spezifischen Proteinbindedomänen konnten zeigen, dass der erhöhte Level von PtdIns(3,4,5)P₃ an der Phagosomenmembran bereits nach ca. 2 min wieder auf normalem Niveau ist, der PtdIns(3,4)P₂ – Level bleibt hingegen über 3 - 4 min erhöht.⁵² Die in dieser Arbeit generierte Mutante zeigt eine ungestörte Partikelinternalisierung (siehe Experimente mit Polystyrolpartikeln, Punkt 4.4.2.2), aber einen gestörten PtdIns(3,4)P₂-Metabolismus. Insofern kann man davon ausgehen, dass die Bindung eines Partikels, die Bildung des phagocytic cup und das Schliessen der Partikel umfließenden Membranen nicht beeinflusst sind. Es stellt sich die Frage, welche physiologische Funktion PtdIns(3,4)P₂ während der Phagosomenreifung wahrnehmen könnte. Die Phagosomenreifung in *D. discoideum* ist ein sehr komplexer und regulierter Prozess, an dem viele unterschiedliche Proteine beteiligt sind. Neben Signalproteinen und am intrazellulären Vesikeltransfer beteiligte Proteine wie z.B. kleine GTPasen konnten Verdauungsenzymen wie Hydrolasen (z.B. Proteasen und Nukleasen) identifiziert werden.⁴⁷ PtdIns(3,4)P₂ könnte für PH- bzw. PX-Domänen-enthaltende Proteine, die an der Phagosomenreifung bei *D. discoideum* beteiligt sind, einen Bindungspartner darstellen, und diese somit zur Membran translozieren und in ihrer Aktivität regulieren.

Bereits Dormann et al. diskutierten 2004 die potentielle Rolle von PtdIns(3,4)P₂ als Bindungspartner von Proteinen während der Phagosomenreifung. Insbesondere wird auf die

cytosolische p47-Untereinheit des NADPH-Oxidase-Komplexes verwiesen, die mit hoher Spezifität an PtdIns(3,4)P₂ bindet.⁵²

Von Neutrophilen ist bekannt, dass über PtdIns(3)P und PtdIns(3,4)P₂ cytosolische Untereinheiten (p40^{phox} und p47^{phox}) einer NADPH-Oxidase an die Phagosomenmembran transloziert werden, und dann die NADPH-Oxidase am Phagosom aktiviert wird, die reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) generiert (siehe auch 1.1.2).¹⁷ In *D. discoideum* konnten zu Neutrophilen homologe Gene für NADPH-Oxidase-Untereinheiten (cybA, ncfA, noxA, noxB und noxC) identifiziert werden, die sogenannte NOX-Klasse. Die Beobachtung, dass der Gehalt von PtdIns(3,4)P₂ über einen längeren Zeitraum in Phagosomenmembranen von *D. discoideum* erhöht bleibt, könnte ein Indiz für eine lokal erhöhte ROS-generierende Aktivität an diesen Membranen sein.⁵²

Die vermutete Störung degradativer endosomaler Prozesse aufgrund einer reduzierten Dephosphorylierung von PtdIns(3,4)P₂ an der Phagosomenmembran liesse sich direkt experimentell beobachten, wenn man phagozytierte Bakterien wieder ausplattiert, und deren Überlebensrate bestimmt. Diese Methode ist für *D. discoideum* in einigen Publikationen bereits beschrieben worden.⁸⁶

Die Generierung von Doppel-Knock-Out-Mutanten könnte weitere Hinweise auf die Beteiligung von 3-phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphatisomeren an endosomalen Prozessen liefern. Besonders interessant wäre in diesem Zusammenhang ein Doppel-Knock-Out in Kombination mit einem ausgeschaltetem pten-Gen. In diesem Falle wäre der Abbau von PtdIns(3,4,5)P₃ zu PtdIns(4,5)P₂ gestört und somit der alternative Abbau über eine 5-Dephosphorylierung zum PtdIns(3,4)P₂ stärker getriggert. Dies könnte den Defekt der 3-Phosphataseaktivität noch stärker ausprägen, und somit die gestörte Phagosomenreifung und die beobachteten Wachstumsdefekte weiter verstärken.

Aufbauend auf einer von Gotthardt et al.⁸⁷ entwickelten Methode, die Reifung von Phagosomen bei *D. discoideum* zu verfolgen, wären Experimente möglich, den zeitlichen Verlauf der PtdInsPx-Konzentrationen an den Phagosomenmembranen der Mutante zu erfassen. *In vivo* liessen sich die erzielten Ergebnisse durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten PtdInsPx-spezifischen Bindedomänen wie z.B. PH-CRAC-GFP (PH-Domäne des cytosolic regulator of adenyl cyclase, mit green fluorescence protein markiert) absichern, die einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der PtdIns(3,4)P₂-Konzentration an der Phagosomenmembran widerspiegeln sollten.⁵²

Abschliessend ist festzustellen, dass erstmalig ein myotubularinartiges Protein in *D. discoideum* über ein Gen-Knock-Out inaktiviert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Knock-Out das Wachstum von *D. discoideum* auf Bakterien negativ beeinflusst. Dass im Gegensatz zu bekannten myotubularinartigen Proteinen anderer Organismen PtdIns(3,4)P₂ das Hauptsubstrat darstellt, macht dieses Protein zudem äusserst interessant in Hinblick auf seine strukturellen Eigenschaften, insbesondere des aktiven Zentrums. Zur Zeit ist lediglich ein weiteres myotubularinartiges Protein aus Säugetierzellen bekannt, das ebenfalls PtdIns(3,4)P₂ umsetzen kann.⁸⁸ Immunopräzipitate dieses Proteins zeigen eine 3-Phosphatase-Aktivität gegenüber PtdIns(3)P und PtdIns(3,4)P₂. Eine Überexprimierung des in dieser Arbeit untersuchten Enzyms in *D. discoideum* könnte hilfreich sein, dieses anzureichern und besser in seiner Funktionalität zu charakterisieren.

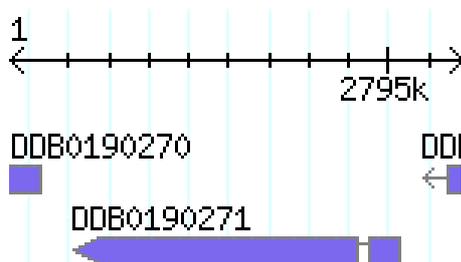
5 Anhang

Folgende Daten (Kartierung, Protein-Sequenz und genomische Sequenz) des Gens DDB0190271 wurden von der Internet-Website <http://dictybase.org/> übernommen.

Kartierung des Gens DDB0190271:

Chromosome 1 coordinates 2791078 to 2795119, Crick strand

	CDS coord.	Chrom. coord.
Exon 1	1 - 359	2795119 - 2794761
Intron 1	360 - 522	2794760 - 2794598
Exon 2	523 - 4042	2794597 - 2791078



Protein-Sequenz des Gens DDB0190271; fett markiert ist das Motiv CSDGWDR:

MSTNDQTLEHISRSQDKNVFKEFLKRGDLSTKRNSKGQTLHLLIAMNDNMFALKFFFKKKYGFLKDTSI
 EVDHRDIDGYTPLHYAVNQGAFEIATKLLSRGADPNARTENGLTPLHLLTKYCYSNKSILAQLIENGA
 YINHKDNKQETPLHRATMLNDNFDFLKLFLFHGANPNIVNKRGRTCQHLSIEQGKVELLEFLMYGAD
 CSKPTPILPSPMEMAAISPFPLIRQFFSERISPTGENILMIEKAVFLGKPVSTFIQNGDSFTTGTSTQLYTGK
 LFITNFRLVFKLDQPNNSSNSNSNSNSNSNSNSNSNCNNSNINFPIDEDEEESIPLLSISTVRTDDDRDNQS
 NGGSNNSNDLDSSSGLNKETIIIPTNNSNDIFFTTSEITTGGNIIDDYLINPIGSSSTGSNNSSSNSNSNGYYN
 SNQINCNSQQSNINPTITTT
 TTVTSLNQQSIINVHNSNNSNLGHSINQSASSILNNIINFSKTSLNLVNPSTGGSSPNPTPPLSPAQSYHF
 SLDNLSQQQQQPPPPQSQPILNSSPVNNNNNNNNITTSISSNLSNYTISTSSMSYQLINIETKDFKQFKL
 YFMSIHVRDKIMDLINYHFKDKIERSIKVTSQNKNIQKKIVEENIQMQDES RVEHIDRYESYGIFEEMVPF

LFAPLYKSPGFSDLNPSSSSSSSTTTTSTSSPSFSTQPNVLSSTSSIDGWQVYNQRREYARFNIIYGDSENS
GWKFTNINKDHRMCSSYPSSLVVSNKATDKDLEKIFSRKGRIPITLSWKDPSSNASISRCSQPLVGIERA
RCPEDEFYCSSLALSSPSKTLYLIDARPKINAIANTANGAGFENIHNYPNCKLIFMNIPNIHVIRKSLEKLV
LAMKSSARDKDHTESTDMRFWGYIEETGWISHIKSILEAATFSAELILKGNLSILVH**CSDGWDR**TPQIT
SLTQILLDPFYRTIHGFQVLEKEWLSFGHKFSLRLGHLPGNEEERSPIFQQFLDCCFQLLNQFLLFEFTPS
LLLFI SDNIH SCKYGTFLN NCEKDRIQNQVKT KTISIWTEVNLNVNKFLNPFYFNPQDIQSIRPKLYSRCLE
LWKSCYMR FESKDSWMHSNWLLHNSNFNLLNYFSKFNQNKQFN NNNNNNNNNNNNNNNNNSSINNNDR
NSISSSTNSNNNNSSDNNSGWISQSRNSQPQHSPILASHRPNSSLIDDYTGDTNLNISNNSNNNNNGDTPTN
TIHDSDIINTLEVLTEIN

**Genomische DNA-Sequenz des Gens DDB0190271; fett markiert: DNA-Matrize
(template) zur PCR-Amplifikation; unterstrichen: Primer-Gegenstücke:**

TGCTCAAGTTATCGTCCTCAACCATCCAGGTCAAATCCATGCTGGTACTCACCAGTCTTAGATTGT
CACACTGCTCACATTGCTGTAAATTCAGTCAAATCGTCGATAAAGTTGATCGTCGACTGGTGCCG
TCGTTGCCAAAGAAGGTACTGCCGCCGTCGTCTTAAAGAATGGTGATGCCGCTATGGTCAATTAA
CCCCATCTCGTCCAATGTGTGTTGAATCCTTCACTGAATACCCACCATTAGGTCGTTTCGCCGTCAG
AGATATGAGACAAACCGTCGCCGTCGGTGTCATCAAATCAACCGTCAAGAAAGCCCCAGGTAAAG
CCGGTGATAAGAAAGGTGCTGCTGCCCATCAAAAAAGAAATAAATAAATAATATTTCTTAATAAA
TAGCATTTTATAATAATTTTAAAAAAAATTTCTTTTTTTAATTTTAACTTTTTGTATTGATT
TGTTTTTTTTAAATGGTTAATTTTAAAAATTATGGATATTTAATTAATATATTTAATTTAAAAA
CTATGGATACATTTAATTTTTTATATAATCTCATAGAGGTAAAAATAAACTAAACATTTTCAGG
AAAATATATTGTTTTAAAAATAAATAATAGGATCCCAAAGTTTAAATATATTAATTTTTTTA
TATAATTTCAAAAAGGTAAAAAAAAGAAAAATGTATATACAATGTTTAAAAAATATCTCATTTAA
AGAATAATAATTAGTTATGTATATACATTTTTCTTTTTTCAATCCTAAAATTTCTTGCTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTGCGGATTTTCTTTTTTTTTTTTTATTTTTCTATTTTTTTTTTTCTTAAAAT
ATCAAGATATTGCGCAATTTTTTTTTTTTTTTTTATATTTTATATTTTATATTTTCACAAATCC
ACATATTTCAATTATCATTTTTATTTTTTTTTTATATAGATTTCTTAGATAGAATGTCAACAAAT
GATCAAACATTAGAACATATATCAAGATCTCAAGATAAAAATGTATTTAAAGAATTTTTGAAAAGG
GGTGATTTATCAACCAAAGGAATAGTAAAGGTCAAACATTATTACATTTAATCGCGATGAATGAT
AATATGTTTGCATTAATAATCTTTTTTAAAAAAAATATGGATTTTTAAAGACACCTCAATTGAAG
TAGACCATAGAGATATTGATGGTTATACACCATTACATTATGCTGTAAATCAAGGTGCATTTGAAA
TTGCTACAAAATTATTATCAAGAGGTGCTGATCAAATGCAAGAACTGAAAATGGTTAACTCCAT
TACATTTATTAACAAAGTAAATATACATATATATATACAATATCTTATTATTATTATTATTATTA
TTAT
TATTTAATACTAATATATATATATATATTTTCATTAAGATATTGTTATTCAAATAAATCAATTAA
ATTAGCTCAATTAATAATTGAAAATGGAGCATATATAAATCATAAAGATAATAAACAAGAAACAC
CATTACATAGGGCAACAATGTTAAATGATAATTTTGATTTCTTAAAATTATTATTATTCATGGGGC
AAATCCAAATATTGTTAATAAAAGAGGTAGAACATGTCAACATTTATCAATTGAACAAGGTAAAGT

TGAATTATTGGAATTGTTTTAATGTATGGAGCAGATTGTAGTAAACCAACACCAATATTACCATCA
CCAATGGAAATGGCAGCAATTTACCATTTCATTGATTAGACAATTCCTTTTCAGAAAGAATTCAC
CAACTGGTGAAAACATTTAATGATTGAAAAAGCTGTATTTTTAGGTAAACCGTTTCAACCTTTAT
TCAAAAATGGTGATTCTTTTACTACTGGTACTTCAACTCAATTATATACTGGTAAATTATTTATAACA
AATTTTAGATTAGTTTTTAACTTGATCAACCAAATAATAGTAATAGTAGTAATAGTAATAGTAAT
AGTAGTAATAGTAATAGTAATAATAGCAATTGTAATAATAGTTCAAATATAAATTTTCCAATATTA
GAAGATGAGGAAGAATCAATACCATTGTTATCAATATCAACAGTTAGAAGTATGATGATGATAGAGA
TAATCAATCAAATGGTGGTTCTAATAATAGTAATGATTTAGATTTCATCATCAGGTTTAAATAAAGA
ACAATTATAATACCAACAAATAATAGTAATGATATTTCTTTACTACAAGTGAAATTACAACCTGG
TGGTAATATAATTGATGATTATTTAATAAATCCGATTGGTTCTAGTACTGGTAGTAATAATAGTAGT
AGTAGTAATAGTAATAGTAATGGTTACTATAATTCAAATCAAATAAATTGTAATAATAGTCAACAA
CAACA
ACA
ACAACAATCAAATATAAATCCAACAATAACAACAACAACAACAACAAGTAACAACATCATTAAATCAAC
AATCAATTATAAATGTACATAGTAATAATAGTAGTAATTTAAGTGGTCATTTTAGTATTAATCAAA
GTGCATCATCAATTTTAAATAATATAATTAATTTTAGTAAAACTTCATTAAATTTAGTTAA
TCCATCATTGGGTGGTTCATCACCAAATCCGACACCACCTTTATCACCAGCTCAATC
TTATCATTTTTCTTTAGATAATTTATCACAACAACAACAACAACAACCACCACCACAA
CAATCTCAACCAATTTTAAATAGTTCACCTGTAAATAATAATAATAATAATAATAATA
TAACAACATCAATTTTCATCAAATAATTTATCAAATTATACAATATCAACATCATCAAT
GAGTTATCAATTAATTAATATTGAACTAAAGATTTTAAACAATTTAAATTATATTTTC
ATGTCAATTCATGTTAGAGATAAAATAATGGATTTAATAAATTATCATTTTAAAGATA
AAATTGAAAGATCAATAAAAGTAACAAGTCAAATAAAAATATTCAAAAAAGATTG
TTGAAGAGAATATTCAAATGCAAGATGAATCAAGAGTTGAACATATTGATCGTTATG
AAAGTTATGGTATTTTTGAGGAAATGGTACCATTTTTATTTGCATTTTTATATAAATC
ACCTGGATTTTCAGATTTAAATCCATCATCATCGTCATCGTCATCAACAACAACAAC
ATCAACATCATCACCATCATTTTCAACACAACCAAATGTTTTAAATTCAAGTACAAGT
AGTATAGATGGTTGGCAAGTTTATAATCAAAGAAGAGAATATGCTAGATTTAATATC
TATGGTGATAGTGAAAATAGTGGTTGGAAATTTACAAACATCAATAAAGATCATAGA
ATGTGTTCAAGTTATCCAAGTTCATTGGTTGTCTCAAACAAAGCAACTGATAAAGAT
TTAGAGAAAATATTTTCATTTTCGTAGTAAAGGTCGTATACCAACATTGTCATGGAAA
GATCCATCTTCAAATGCTTCCATTAGTAGATGTAGTCAACCATTGGTTGGTATTGAA
AGGGCACGTTGTCCAGAGGACGAATTTTATTGTAGTAGTCTAGCATTAAAGTTCACCA
TCGAAAACACTCTATCTAATTGATGCAAGACCAAAAATAAATGCAATTGCAAATACA
GCCAATGGTGCAGGCTTTGAAAATATTCATAATTATCCAAATTGTAAATTAATATTTA
TGAATATACCTAATATTCATGTAATTAGAAAAAGTTTAGAGAAATTAGTATTGGCAA
TGAAATCATCAGCTCGTGACAAAGATCATACCGAGAGCACTGATATGAGATTTTGGG
GCTACATCGAAGAGACTGGTTGGATATCACATATTAATCAATATTGGAAGCGGCAA
CTTTCTCTGCTGAATTAATCCTAAAAGGTAATAGTATATTGGTGCATTGTAGTGATG

GTTGGGACAGAACCCCGCAAATCACTTCATTAECTCAAATTCATTGGACCCTTTCT
ATCGTACAATTCATGGGTTTCAAGTATTAATCGAAAAGGAATGGCTTAGTTTTGGCC
ATAAATTCCTTTACGTCTTGGTCATTTACCTGGTAATGAAGAAGAGAGATCCCCAA
TTTTTCAACAATTTTTAGATTGTTGTTTTCAATTATTAATCAGTTTCCATTACTTTTC
GAGTTTACTCCATCTCTATTGTTATTCATTTCCGATAATATTCATAGTTGTAAATATG
GTACTTTCTTAAATAATTGTGAAAAAGATAGAATTCAAAATCAAGTTAAAACCAAAA
CAATCTCAATTTGGACTGAAGTTAATTTAAATGTTAATAAATTTTTAAATCCATACTTTAATCCTCA
AGATATTCATCAATTAGACCAAAAATTATATTCACGTTGCTTAGAACTTTGGAAATCATGTTATATG
AGATTTGAATCAAAGATTCTTGGATGCATAGTAATTGGTTATTACATAATTCAAATTTAATAATT
TAAATTATTTTTCAAATTTAATCAAATAAACAATTTAATAATAATAATAATAATAATAATA
ATAATATTAATAATAATAATAGTAGTATTAATAATAATGATAGAACTCAATCTCTCAAGTACCA
ATAGTAATAATAATAATAGTTGAGATAATAATAGTGGTTGGATTTACAAAGTAGAACTCTCAGC
CACAACATTCACCAATACTTGCAAGTCATAGACCAAACTCTTCATTAATTGATGATTATACTGGTGA
TACAAATTTAAATATTTCAAACAACAGCAATAACAATAATGGTGATACCCCCACAAACACAATTCA
TGATTCAGATATTATTAACACCCTTGAAGTTTTAACAGAAATAAACTAAAAATAAAAAAATAAATT
AAAAATAAAAAATTAATAACCAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAATTCAA
AAAAAATAAAAAAACACAGTTTTTGA AAAATATCAAAAAGTTTTGTA ACTTTTTTTTTTTGTTTCAG
TTATATTA ACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTCTAAATTTTTTAATTTTTTTTTTA
AACATTATTTTTATATATCTTTTAATACATTGGCAATTACAATAATTATTTTTAATTTTTTTTTTAA
TAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATTTATTTAAATTATTTAAATATTATTTAATTTATTTTTTAATAAT
TAAATGTTTTATTATTTGTA AAAATTATTTAAAAATAATAATATATATAATAAAATTA AACTATG
AACCTCAAGATTTACCGACAGAGGTATTTTATTTAATATTATCAAAAAGTTCAAGTGATTTTATAA
TTCAAGAATTTCAATATGTTTCAAATATATTTACCATCTCTGTAGTGATGAATTATTTGGAAATT
ATTATCACACTCTAAATATAAAAATTCTCCAAAATTA AATCAAGATTTCAAAAATTAATAACCA
AGAATTTAATGAAAATCAAGATAATTTAAATATTGATTTAAATAATTTAATAATAATAATAATAA
TAATAATAAAAATAATAATAATAATTTAAATGAAAATAATGAAAATAATTATTTTTTAGATGA
AGCAAATATTGAAAATAATTATAGAAGAATTTTATTTAAATTATCAAGAAAATAGTTGGAAATTTTT
TTTTATTTAAAGTAGTACTCCACGTTATTTAGTAATTGGTTCAGAAATTGAAGATAATAGAATTTTA
GAATTA AAAAAAAGTCTACATAAAATGGGTTTAAATCAATTGATCATTTTAATGTTTTTGGTTTTA
AATCATTAACCGTAAATGATCTTTACCAATATGATGGTATACT

Folgende Auflistung zeigt exemplarisch Ähnlichkeiten von DDB0190271 (Q55E04) zu einigen myotubularinartigen Proteinen anderer Organismen; verwendetes Programm: „NCBI Blast“; allen gemeinsam ist das CSDGWDR-Motiv (siehe Position 982 – 988 von „query“, „query“ entspricht DDB0190271, „subject“ entspricht dem jeweiligen Protein eines anderen Organismus):

Q13613 (Mensch):

Myotubularin related protein 1; **2e-88**

Myotubularin-related protein 1 human
Length=665

Score = 327 bits (837), Expect = 2e-88
Identities = 169/396 (42%), Positives = 246/396 (62%), Gaps = 16/396 (4%)

```

Query 758 IDGWQVYNQRREYARFNIYGDSSENSGWKFTNINKDHRMCSSYPSSLVVSNKATDKLEKI 817
I+GW+VY+ EY R + N WK + IN ++ C +YP+ +VV D DL K+
Sbjct 224 INGWKVYDVPVSEYKRQGL----PNESWKISKINSNYEFCDTYPAIIVVPTSVKDDDLISKV 279

Query 818 FSFRSKGRIPTLSWKDPSSNASISRCSQPLVGIERARCPEDFYCSSLA-LSSPSKTLYL 876
+FR+KGR+P LSW P S A+I+RCSQPLVG RC EDE Y ++ ++ S L +
Sbjct 280 AAFRAKGRVPVLSWIHPESQATITRCSQPLVGPNDKRCKEDEKYLQTIMDANAQSHKLI 339

Query 877 IDARPKinaiantangagFENIHNPCKLIFMNIPIHVIRKSLEKLVLAMKSSARDKD 936
DAR A N G G+E+ YPN +L+F+ I NIHV+R+SL KL ++
Sbjct 340 FDARQNSVADTNKTKGGGYESESAYPNAELVFLEIHNIHVMRESLRKL-----KEIV 391

Query 937 HTESTDMRFWGYIEETGWISHIKSILEAATFSAELILKGN-SILVHCSDGWDRTQPITSL 995
+ + R+ ++ T W+ +I+ +L A A+ I G S++VHCSDGWDRT Q+TSL
Sbjct 392 YPSIDEARWLSNVDGTHWLEYIRMLLAGAVRIADKIESGKTSVVVHCSDGWDRTAQLTSL 451

Query 996 TQILLDPFYRTIHGFQVLIEKEWLSFGHKFSLRLGHLPGN--EEERSPIFQQFLDCCFQL 1053
++LD +YRTI GF+ L+EKEW+SFGH+F+LR+GH N + +RSPIF QF+DC +Q+
Sbjct 452 AMLMLDSYYRTIKGFETLVEKEWISFGHRFALRVGHGNDNHADADRSPIFLQFVDCVWQM 511

Query 1054 LNQFPLLFEFTPSLLLFI SDNIHSCKYGTFLN NCEKDRIQNQVKT KTISIWTEVNLNVNK 1113
QFP FEF L+ I D+++SC +GTFL NCE+ R + V TKTIS+W+ +N +++
Sbjct 512 TRQFPFAFEFNEFLITILDHLYSCLFGTFLCNCEQRFKEDVYTKTISLWSYINSQLDE 571

Query 1114 FLNPFYFNPQDIQSIRPKLYSRCLELWKSCYMRFESK 1149
F NP+F + + P LELW + Y+R+ +
Sbjct 572 FSNPFFVNYENHVLYPVASLSHLELWVNYVVRWNPR 607

```

Q9Y217 (Mensch):

Myotubularin related protein 6; **3e-84**

Myotubularin-related protein 6 human
Length=621

Score = 313 bits (802), Expect = 3e-84
Identities = 178/435 (40%), Positives = 264/435 (60%), Gaps = 27/435 (6%)

```

Query 749  NVLNSSTSSIDGWQVYNQRREYARFNIYGDSENSGWKFTNINKDHRMCSSYPSSLVVSNK 808
          N  + + + GWQ+ +  EY R  +      NS W+ ++ N+D+++C +YP  L V
Sbjct 113  NPKQNDSERLQGWQLIDLAAEYKRMGV----PNSHWQLSDANRDYKICETYPRELYVPRI 168

Query 809  ATDKDLEKIFSRSKGRIPTLSWKDPSSNASISRCSQPLVGIERARCPDEFYCSSLALS 868
          A+  +      FRSKGR P LS+      A+I RCSQPL G  ARC EDE  +++ +
Sbjct 169  ASKPIIVGSSKFRSKGRFPVLSYHQDKEAAICRCSQPLSGFS-ARCLEDEHLLQAIKA 227

Query 869  SP-SKTLYLIDARPKinaiantangagFENIHNYPNCKLIFMNIPIHIVIRKSLEKLVL 927
          +P ++ +Y++D RPK+NA+AN A G G+EN  NY N +  F+ I NIHV+R SL+KL+
Sbjct 228  NPVNRMYVMDTRPKLNAMANRAAGKGYENEDNYSNIRFQFVGIENIHVMRSSLQKLL-- 285

Query 928  MKSSARDKDHTESTDMR-FWGYIEETGWISHIKSILEAATFSAELILKGN-SILVHCSDG 985
          + + T+  +  F+  +E +GW+ HIK++++AA F A+ I  N S+LVHCSDG
Sbjct 286  -----EVNGTKGLSVNDFYSGLESSGWLRIKAVMDAAVFLAKAITVENASVLVHCSDG 339

Query 986  WDRTQPQITSLTQILLDPFYRTIHGFQVFLIEKEWLSFGHKFSLRLGHLPGNEEERSPIFQQ 1045
          WDRT Q+ SL  +LLD +YRTI GF VLIEK+W+SFGHKFS R G L G+ +E SP+F Q
Sbjct 340  WDRTSQVCSLGSLLLDSDYRTIKGFMVFLIEKDWISFGHKFSERCGQLDGDPEKVEVPVFTQ 399

Query 1046  FLDCCFQLLNQFPLLFEFTPSLLLFISDNIHSCYGTFLNCKDRIQNQVKTKTISIWT 1105
          FL+C + L  QFP  FEF+ + LL I ++IHSC++G FL NC+K+R + ++K KT S+W
Sbjct 400  FLECVWHLTEQFPQAFEFSEAFLLQIHEHIHSCQFGNFLGNCQKEREELKLKEKTYSLWP 459

Query 1106  EVNLNVNKFNLNPFNPD--IQSIRPKLYSRCLELWKSCYMRFESKDSWMHNSWLLHNSN 1163
          + + K+LNP ++ +      + P  S  + W++ Y +F  D +H  + N
Sbjct 460  FLLEDQKKYLNPLYSSESHRTVLEPNTVSNFNFKFWRNMYHQF---DRTLHPRQSVFNI- 515

Query 1164  FNNLNYFSKFNQNKQ 1178
          N+N      QNKQ
Sbjct 516  IMNMN-----EQNKQ 525

```

Q9Z2C4 (Maus):

Myotubularin related protein 1; **9e-89**

Myotubularin-related protein 1 mouse
Length=669

Score = 328 bits (841), Expect = 9e-89
Identities = 174/396 (43%), Positives = 247/396 (62%), Gaps = 16/396 (4%)

```

Query 758  IDGWQVYNQRREYARFNIYGDSENSGWKFTNINKDHRMCSSYPSSLVVSNKATDKLEKI 817
          ++GW+VY+  EY R  +      N  WK + IN ++  C +YP+ +VV  D DL K+
Sbjct 228  VNGWKVYDPVSEYKRQGL----PNESWKISKINSNYEFCDTYPPIIVVPTSVKDDDLKSV 283

Query 818  FSFRSKGRIPTLSWKDPSSNASISRCSQPLVGIERARCPDEFYCSSLA-LSSPSKTLYL 876
          +FR+KGR+P LSW  P S A+I+RCSQPLVG  RC EDE Y  ++  ++ S  L +
Sbjct 284  AAFRAKGRVPVLSWIHPESQATITRCSQPLVGPNDKRCKEKEKYLQTIMDANAQSHKLT 343

Query 877  IDARPKinaiantangagFENIHNYPNCKLIFMNIPIHIVIRKSLEKLVLAMKSSARDKD 936

```

Anhang

Sbjct	344	DAR A N A G G+EN YPN +LIF+ I NIHV+R+SL KL + S D+ FDARQNSVADTNKAKGGGYENESAYPNAELIFLEIHNIHVMRESLRKLKEIVYPSI-DES	402
Query	937	HTESTDMRFWGYIEETGWISHIKSILEAATFSAELILKGN-SILVHCSDGWDRTQPITSL	995
Sbjct	403	H S ++ T W+ +I+ +L A A+ I G S+++HCSDGWDRT Q+TSL HWLSN-----VDGTHWLEYIRVLLAGAVRIADKIESGKTSVVIHCSDGWDRTSQTSL	455
Query	996	TQILLDPFYRTIHGFQVLIEKEWLSFGHKFSLRGLHLPGN--EEERSPIFQQFLDCCFQL	1053
Sbjct	456	++LD +YRTI GF+ LIEKEW+SFGH+F+LR+GH N + +RSPIF QF+DC +Q+ AMLMLDSYYRTIKGFALIEKEWISFGHRFALRVGHGDDNHADADRSPIFLQFIDCVWQM	515
Query	1054	LNQFPLLFEFTPSLLLFI SDNIHSCYGTFLN NCEKDRIQNQVKT KTISIWTEVNLNVNK	1113
Sbjct	516	QFP FEF L+ I D+++SC +GTFL NCE+ RI+ V T TIS+W+ +N +++ TRQFP S A FEFNELFLITILDHLYSCLFGTFLCNCEQQRIKEDVYTN TISLWSYINSQLDE	575
Query	1114	FLNPYFNPQDIQSIRPKLYSRCLELWKSCYMR FESK 1149	
Sbjct	576	F NP+F + + P LELW + Y+R+ + FSNPFVNYENHVLYPVASMSHLELWVNYVYRW NPR 611	

Q9Z2D1 (Maus):

Myotubularin related protein 2; 3e-85

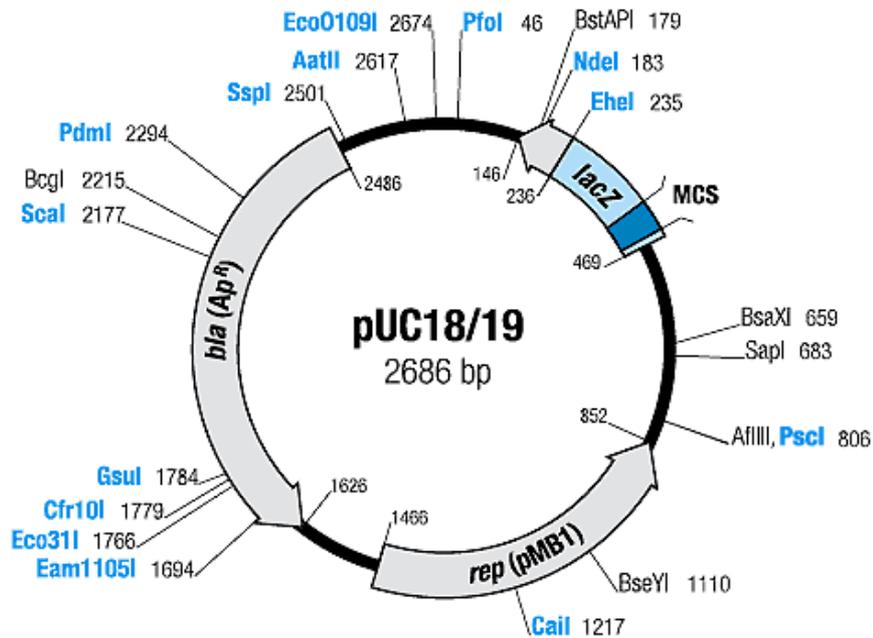
Myotubularin-related protein 2 mouse
Length=643

Score = 317 bits (811), Expect = 3e-85

Identities = 167/395 (42%), Positives = 247/395 (62%), Gaps = 16/395 (4%)

Query	759	DGWQVYNQRREYARFNIYGDSENSGWKFTNINKDHRMCSSYPSSLVVS NKATDKDLEKIF	818
Sbjct	204	+GW++Y+ EY R I N W+ T IN+ + +C +YP+ LVV D++L+++ NGWKLYDPLLEYRRQGI----PNESWRITKINERYELCDTYPALLVVPANIPDEELKRVA	259
Query	819	SFRSKGRIPTLSWKDPSSNASISRCSQPLVGIERARCPED EFCSSLALSSP-SKTLYLI	877
Sbjct	260	SFRS+GRIP LSW P S A+++RCSQP+VG+ R EDE Y ++ S+ S +++ SFRSRGRIPVLSWIHPESQATVTRCSQPMVGVSGKRSKEDEKYLQAIMDSNAQSHKIFIF	319
Query	878	DARPKinaiantangagFENIHNYPNCKLIFMNIPIHVIKRSLEKLV LAMKSSARDKDH	937
Sbjct	320	DARP +NA+AN A G G+E+ Y N +L+F++I NIHV+R+SL KL ++ + DARPSVNAVANKAKGGGYESEDAYQNAELVFLDIHNIHVMRESLRKL-----KEIVY	371
Query	938	TESTDMRFWGYIEETGWISHIKSILEAATFSAELILKGN-SILVHCSDGWDRTQPITSLT	996
Sbjct	372	+ + +E T W+ HIK IL A A+ + G S++VHCSDGWDRT Q+TSL PTIEETHWLSNLESTHWLEHIK LILAGALRIADKVESGKTSVVVHCSDGWDRTAQLTSLA	431
Query	997	QILLDPFYRTIHGFQVLIEKEWLSFGHKFSLRGLHLPGN--EEERSPIFQQFLDCCFQLL	1054
Sbjct	432	++LD +YRTI GF+VL+EKEWLSFGH+F LR+GH N + +R P+F QF+DC +Q+ MLMLDGYYRTIRGFVLEKEWLSFGHRFQLRVGHGDKNHADADRXPVFLQFIDCVWQMT	491
Query	1055	NQFPLLFEFTPSLLLFI SDNIHSCYGTFLN NCEKDRIQNQVKT KTISIWTEVNLNVNKF	1114
Sbjct	492	QFP FEF L+ I D+++SC +GTFL N E+ R + + KT+S+W+ +N + F RQFP T A FEFNEYFLITILDHLYSCLFGTFLCNSEQQRGKENLPKKT VSLWSYINSQL EDF	551
Query	1115	LNYPYFNPQDIQSIRPKLYSRCLELWKSCYMR FESK 1149	
Sbjct	552	NP + + P R LELW Y+R+ + TNPLYG SYSNHVLYPVASMRHLELWVGYIIRW NPR 586	

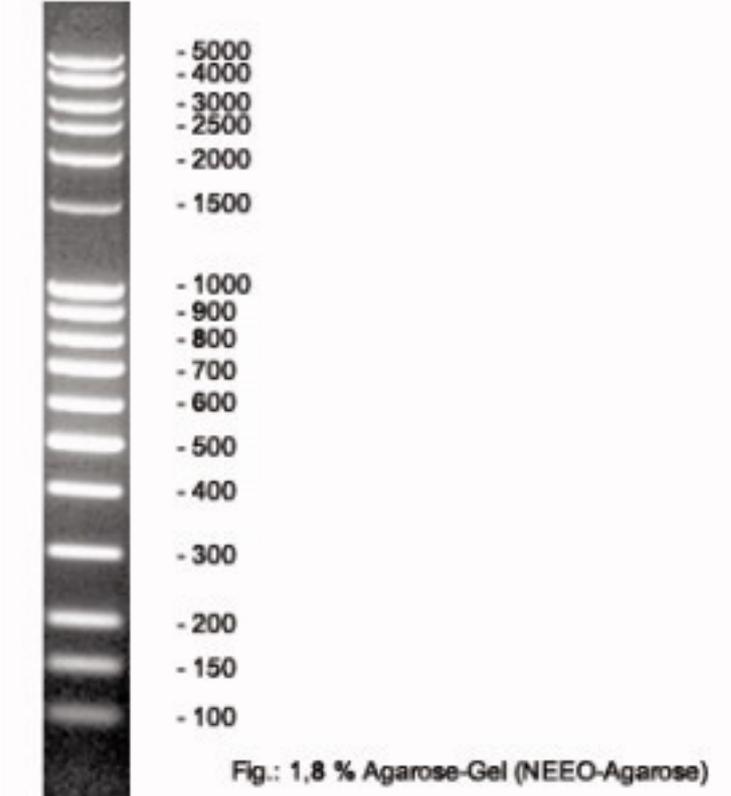
pUC18-Vektor (Fermentas):



Multiple Cloning Site (MCS) des pUC18-Vektors mit den Restriktionsschnittstellen von *EcoRI* (Position 455) und *HindIII* (Position 399):

399	HindIII	PaeI	PstI	HincII	XbaI	BamHI	Cfr9I	Acc65I	Eco138II	EcoRI	455								
CAA	GCT	TGC	ATG	CCT	GCA	GGT	CGA	CTC	TAG	AGG	ATC	CCC	GGG	TAC	CGA	GCT	CGA	ATT	CGT
gTT	CGA	ACG	TAC	GGA	CGT	CCA	GCT	GAG	ATC	TCC	TAG	GGG	CCC	ATG	GCT	CGA	GCT	TAA	GCA
Leu	Ser	Ala	His	Arg	Cys	Thr	Ser	Glu	Leu	Pro	Asp	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Ser	Asn	Thr

DNA-Standard-Fragmente des Produkts „100 bp-DNA-Leiter, extended“ der Firma Roth:



6 Literaturverzeichnis

-
- ¹ NC-IUB. Numbering of Atoms in myo-Inositol (Recommendations 1988). *Biochem. J.* **1989**, 258, 1 - 2
- ² Cockcroft, S. Biology of Phosphoinositides. Chapter 2.2. Published by Oxford University Press
- ³ Traynor-Kaplan, A.E.; Harris, A.L.; Thompson, B.L.; Taylor, P.; Sklar, L.A. An inositol tetrakisphosphate-containing phospholipid in activated neutrophils. *Nature* **1988**, 334, 353 - 356
- ⁴ Whitman, M.; Downes, C.P.; Keeler, M.; Keller, T.; Cantley, L. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* **1988**, 332, 644 - 646
- ⁵ Vanhaesebroeck, B.; Leever, S.J.; Panayotou, G.; Waterfield, M.D. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends in Biochemical Sciences* **1997**, 22, 267 - 272
- ⁶ Dove, S.K.; Cooke, F.T.; Douglas, M.R.; Sugars, L.G.; Parker, P.J.; Michell, R.H. Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* **1997**, 390, 187 - 192
- ⁷ Cockcroft, S. Biology of Phosphoinositides. Chapter 11.10. Published by Oxford University Press
- ⁸ Hokin, M.R.; Hokin, L.E. Enzyme Secretion and the Incorporation of ³²P into Phospholipids of Pancreas Slices. *J. Biol. Chem.* **1953**, 203, 967 - 977
- ⁹ Streb, H.; Irvine, R.F.; Berridge, M.J.; Schulz, I. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature (London)* **1983**, 306, 67 - 69
- ¹⁰ Cullen, P.J.; Cozier, G.E.; Banting, G.; Mellor, H. Modular phosphoinositide-binding domains – their role in signalling and membrane trafficking. *Curr. Biol.* **2001**, 11, R882 - R893
- ¹¹ Corvera, S. Phosphatidylinositol 3-Kinase and the Control of Endosome Dynamics: New Players Defined by Structural Motifs. *Traffic* **2001**, 2, 859 - 866

-
- ¹² Musacchio, A.; Gibson, T.; Rice, P.; Thompson, J.; Saraste, M. The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *Sep; 18(9)*: 343 - 348
- ¹³ Harlan, J.E.; Hajduk, P.J.; Yoon, H.S.; Fesik, S.W. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **1994**, *Sep 8; 371(6493)*: 168 - 170
- ¹⁴ Coffey, P.J.; Jin J.; Woodgett J.R. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.* **1998**, *Oct 1; 335 (Pt 1)*: 1 - 13
- ¹⁵ Ellson, C.D.; Gobert-Gosse, S.; Anderson, K.E.; Davidson, K.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Thuring, J.W.; Cooper, M.A.; Lim, Z.Y.; Holmes, A.B.; Gaffney, P.R.; Coadwell, J.; Chilvers, E.R.; Hawkins, P.T.; Stephens, L.R. PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40phox. *Nat. Cell. Biol.* **2001**, *3*, 679 - 682
- ¹⁶ Kanai, F.; Liu, H.; Field, S.J.; Akbary, H.; Matsuo, T.; Brown, G.E.; Cantley, L.C.; Yaffe, M.B. The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI3K. *Nat. Cell. Biol.* **2001**, *Jul; 3(7)*: 675 - 678
- ¹⁷ Cullen, P.J.; Cozier, G.E.; Banting, G.; Mellor, H. Modular phosphoinositide-binding domains – their role in signalling and membrane trafficking. *Curr. Biol.* **2001**, *Oct 30;11(21)*: R882 - 893
- ¹⁸ Karathanassis, D.; Stahelin, R.V.; Bravo, J.; Perisic, O.; Pacold, C.M.; Cho, W.; Williams, R.L. Binding of the PX domain of p47phox to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO Journal* **2002**, *Vol. 21 No. 19*, 5057 - 5068
- ¹⁹ Laporte, J.; Hu, L.J.; Kretz, C.; Mandel, J.-L.; Kioschis, P.; Coy, J.F.; Klauck, S.M.; Poustka, A. and Dahl, N. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* **1996**, *13*, 175 - 182
- ²⁰ Bolino, A., Muglia, M., Conforti, F. L., LeGuern, E., Salih, M. A., Georgiou, D. M., Christodoulou, K., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Mandich, P., Schenone, A. et al. Charcot-marie-tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 17 - 19
- ²¹ Laporte, J.; Bedez, F.; Bolino, A.; Mandel, J.L. Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *Oct 15;12 Spec No 2*: R285-92
- ²² Blondeau, F., Laporte, J., Bodin, S., Superti-Furga, G., Payrastre, B. and Mandel, J.-L. Myotubularin, a phosphatase deficient in Myotubular Myopathy, acts on PI3-kinase and phosphatidylinositol 3 phosphate pathway. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 2223 - 2229

-
- ²³ Taylor, G. S., Maehama, T. and Dixon, J. E. Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8910 - 8915
- ²⁴ Walker, D. M., Urbé, S., Dove, S. K., Tenza, D., Raposo, G. and Clague, M. J. Characterization of MTMR3: an inositol lipid 3-phosphatase with novel substrate specificity. *Curr. Biol* **2001**, *11*, 1600 - 1605
- ²⁵ Tsujita, K.; Itoh, T.; Ijuin, T.; Yamamoto, A.; Shisheva, A.; Laporte, J.; Takenawa, T. Myotubularin regulates the function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate interaction. *J. Biol. Chem.* **2004**, *Apr 2*;279(14): 13817-24
- ²⁶ Maehama, T.; Dixon, J.E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **1998**, *May 29*;273(22): 13375-8
- ²⁷ Kim, S.-A.; Taylor, G.S.; Torgersen, K.M.; Dixon, J.E. Myotubularin and MTMR2, Phosphatidylinositol 3-Phosphatases Mutated in Myotubular Myopathy and Type 4B Charcot-Marie-Tooth Disease. *J. Biol. Chem.* **2002**, *Vol. 277, No. 6*, 4526 - 4531
- ²⁸ Begley, M.J.; Taylor, G.S.; Brock, M.A.; Ghosh, P.; Woods, V.L.; Dixon, J.E. Molecular basis for substrate recognition by MTMR2, a myotubularin family phosphoinositide phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2006**, *Jan 24*;103(4): 927-32
- ²⁹ Begley, M.J.; Dixon J.E. The structure and regulation of myotubularin phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *Vol. 15 Issue 6*, 614 - 620
- ³⁰ Wishart, M.J.; Dixon J.E. PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. *Trends Cell Biol.* **2002**, *Dec*;12(12): 579-85
- ³¹ Dang, H.; Li, Z.; Skolnik, E.Y.; Fares, H. Disease-related myotubularins function in endocytic traffic in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *Jan*;15(1): 189-96
- ³² Brefeld, O. *Dictyostelium mucoroides*. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abh. Senckenb. Naturforsch. Ges.* **7**, 85 (1869)
- ³³ Raper, K.B. *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **1935**, *50*, 135 - 147
- ³⁴ Sussman, R.; Sussman, M. Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *Oct 11*;29(1): 53-5
- ³⁵ Franke, J.; Kessin, R. A defined minimal medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1977**, *May*;74(5): 2157-61

-
- ³⁶ Watts, D.J.; Ashworth, J.M. Growth of myxameobae of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **1970**, *Sep*;119(2): 171-4
- ³⁷ 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. *J. Cell. Biol.* **1980**, *86*, 456 - 465
- ³⁸ Malchow, D.; Nägele, B.; Schwarz, H.; Gerisch, G. Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *Jun 23*;28(1): 136-42
- ³⁹ Gerisch, G. Cell aggregation and differentiation in *Dictyostelium*. *Curr. Top. Dev. Biol.* **1968**, *3*: 157-97
- ⁴⁰ Olive, L S.; Stoianovitch, C. The Mycetozoans. New York: Academic; **1975**
- ⁴¹ Hendriks L, De Baere R, Van de Peer Y, Neefs J, Goris A, De Wachter R. *J Mol Evol.* **1991**; *32*: 167–177
- ⁴² Baldauf, S.L.; Doolittle, W.F. Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1997**, *Oct 28*;94(22): 12007-12
- ⁴³ Kuma, K.; Nikoh, N.; Iwabe, N.; Miyata, T. Phylogenetic position of *Dictyostelium* inferred from multiple protein data sets. *J Mol Evol.* **1995**, *Aug*;41(2): 238-46
- ⁴⁴ Spiegel online; <http://www.spiegel.de/wissenschaft/natur/0,1518,445005,00.html>
- ⁴⁵ Loomis, W.F. (editor): The development of *Dictyostelium discoideum*. Academic Press, New York 1982.
- ⁴⁶ Cardelli, J. Phagocytosis and macropinocytosis in *Dictyostelium*: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic* **2001**, *May*;2(5): 311-20
- ⁴⁷ Gotthardt, D.; Blancheteau, V.; Bosserhoff, A.; Ruppert, T. Delorenzi, M.; Soldati, T. Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Mol. Cell. Proteomics*, **2006**, *Dec*;5(12): 2228-43
- ⁴⁸ Duhon, D.; Cardelli, J. The regulation of phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2002**, *23*(7-8): 803-8
- ⁴⁹ Weber, S.S.; Ragaz, C.; Reus, K.; Nyfeler, Y.; Hilbi, H. *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PloS Pathog.* **2006**, *May*;2(5):e46. Epub 2006 May 19
- ⁵⁰ Buczynski, G.; Grove, B.; Nomura, A.; Kleve, M.; Bush, J.; Firtel, R.A.; 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. *J. Cell Biol.* **1997**, Mar 24;136(6): 1271-86

⁵¹ Gillooly, D.J.; Simonsen, A.; Stenmark, H. Phosphoinositides and phagocytosis. *J. Cell Biol.* **2001**, Oct 1;155(1): 15-7

⁵² Dormann, D.; Weijer, G.; Dowler, S.; Weijer C.J. In vivo analysis of 3-phosphoinositide dynamics during Dictyostelium phagocytosis and chemotaxis. *J. Cell Sci.* **2004**, Dec 15;117(Pt 26): 6497-509

⁵³ Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, Feb 19;391(6669): 806-11

⁵⁴ Kuhlmann, M.; Popova, B.; Nellen, W. RNA interference and antisense-mediated gene silencing in Dictyostelium. *Methods Mol. Biol.* **2006**, 346: 211-26

⁵⁵ Martens, H.; Nellen, W. Epigenetisches Genesilencing: RNA Interferenz und Antisense RNA. *BIOspektrum* 4/02 8. Jahrgang

⁵⁶ 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. *Mol. Cell Biol.* **1995**, Oct;15(10): 5645-56

⁵⁷ 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. *J. Cell Sci.* **1998**, Jan;111 (Pt 2): 283-94

⁵⁸ Rupper, A.C.; Rodriguez-Paris, J.M.; Grove, B.D.; Cardelli, J.A. p110-related PI 3-kinases regulate phagosome-phagosome fusion and phagosomal pH through a PKB/Akt dependent pathway in Dictyostelium. *J. Cell Sci.* **2001**, Apr;114(Pt 7): 1283-95

⁵⁹ Loovers, H.M.; Kortholt, A.; de Groote, H.; Whitty, L.; Nussbaum, R.L.; van Haastert, P.J. Regulation of phagocytosis in Dictyostelium by the inositol 5-phosphatase OCRL homolog Dd5P4. *Traffic* **2007**, May;8(5): 618-28. Epub 2007 Mar 2

⁶⁰ Dewitt, S.; Tian, W.; Hallett, M.B. Localised PtdIns(3,4,5)P3 or PtdIns(3,4)P2 at the phagocytic cup is required for both phagosome closure and Ca²⁺ signalling in HL60 neutrophils. *J. Cell Sci.* 2006, 119, 443 - 451

⁶¹ Cox, D.; Tseng, C.C.; Bjekic, G.; Greenberg, S. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* **1999**, Jan 15;274(3): 1240-7

-
- ⁶² Araki, N.; Johnson, M.T.; Swanson, J.A. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.*, **1996**, *Dec;135(5)*: 1249-60
- ⁶³ Iijima, M.; Devreotes, P. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell* **2002**, *May 31;109(5)*: 599-610
- ⁶⁴ 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. *Cell* **2002**, *May 31;109(5)*: 611-23
- ⁶⁵ 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. *Cell* **2003**, *Sep 5;114(5)*: 559-72
- ⁶⁶ Fischbach, A.; Adelt, S.; Müller, A.; Vogel, G. Disruption of inositol biosynthesis through targeted mutagenesis in Dictyostelium discoideum: generation and characterization of inositol-auxotrophic mutants. *Biochem. J.* **2006**, *Aug 1;397(3)*: 509-18
- ⁶⁷ Gerisch, G. Ein Submerskulturverfahren für entwicklungsphysiologische Untersuchungen an Dictyostelium discoideum *Naturwissenschaften* **1959**, *46*, 654 - 656
- ⁶⁸ Vogel, G. Endocytosis and Recognition Mechanisms in Dictyostelium discoideum. *Methods in Cell Biology* **1987**, *Vol. 28. Chapter 6*, 129 - 137
- ⁶⁹ Wallace, L.J.; Frazier, W.A. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1979**, *76*, 4250 - 4254
- ⁷⁰ Vieira, J.; Messing, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **1982**, *Oct;19(3)*: 259-68
- ⁷¹ 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. *Biochem Biophys Res Commun.* **1994**, *Dec 30;205(3)*: 1808-14
- ⁷² Faix, J.; Gerisch, G.; Noegel, A.A. Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in Dictyostelium. *J Cell Sci.* **1992**, *Jun;102 (Pt 2)*: 203-14
- ⁷³ Hanahan, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol.* **1983**, *Jun 5;166(4)*: 557-80
- ⁷⁴ Vickers, J.D. Extraction of Polyphosphoinositides from Platelets: Comparison of a Two-Step Procedure with a Common Single-Step Extraction Procedure. *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 449 - 451
- ⁷⁵ Clarke, N.G.; Dawson R.M.C Alkaline O->N-transacylation - A new method for the quantitative deacylation of phospholipids. *Biochem. J.* **1981**, *195*, 301 - 306

-
- ⁷⁶ Lanzetta, P.A.; Alvarez, L.J.; Reinach, P.S; Candia, O.A. An Improved Assay for Nanomole Amounts of Inorganic Phosphate. *Anal. Biochem.* **1979**, *100*, 95 - 97
- ⁷⁷ Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **1951**, *Nov;193(1)*: 265-75
- ⁷⁸ 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. *Anal Biochem.* **2002**, *Feb 15;301(2)*: 243-54
- ⁷⁹ Mayr, G.W. A novel metal-dye detection system permits picomolar-range h.p.l.c. analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cell or tissue specimens. *Biochem J.* **1988**, *Sep 1;254(2)*: 585-91
- ⁸⁰ Thiel, U. Inositolphosphate, Phosphoinositide und Signaltransduktion in *Dictyostelium discoideum* – Vergleich von Wildtyp und Phagozytose-Mutanten. Dissertation im Fachbereich Chemie der Bergischen Universität Wuppertal 1993.
- ⁸¹ Davidoff, F.; Korn, E.D. FATTY ACID AND PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF THE CELLULAR SLIME MOLD, DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM. THE OCCURRENCE OF PREVIOUSLY UNDESCRIBED FATTY ACIDS. *J Biol Chem.* **1963**, *Oct;238*: 3199-209
- ⁸² GERISCH, G., HÜLSER, D., MALCHOW, D., WICK, U.: Cell communication by periodic cyclic-AMP pulses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **B 272**, 181 (1975)
- ⁸³ Caldwell, K.K.; Lips, D.L.; Bansal, V.S.; Majerus, P.W. Isolation and characterization of two 3-phosphatases that hydrolyze both phosphatidylinositol 3-phosphate and inositol 1,3-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **1991**, *Sep 25;266(27)*: 18378-86
- ⁸⁴ Merlot, S.; Firtel, R.A. Leading the way: directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 3471 - 3478
- ⁸⁵ Rupper, A.; Cardelli, J. Regulation of phagocytosis and endo-phagosomal trafficking pathways in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta.* **2001**, *Mar 15;1525(3)*: 205-16
- ⁸⁶ Zhang, H.; Gomez-Garcia, M.R.; Brown, M.R.W.; Kornberg, A. Inorganic polyphosphate in *Dictyostelium discoideum*: Influence on development, sporulation, and predation. *PNAS* **2005**, *102*, 2731 - 2735
- ⁸⁷ Gotthardt, D.; Warnatz, H.J.; Henschel, O.; Brückert, F.; Schleicher, M.; Soldati, T. High-Resolution Dissection of Phagosome Maturation Reveals Distinct Membrane Trafficking Phases. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 3508 - 3520
- ⁸⁸ Nandurkar, H. H., Caldwell, K. K., Whisstock, J. C., Layton, M. J., Gaudet, E. A., Norris, F. A., Majerus, P. W. & Mitchell, C. A. Characterization of an adapter subunit to a

phosphatidylinositol (3)P 3-phosphatase: identification of a myotubularin-related protein lacking catalytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, Aug 14;98(17): 9499-504