

**Differentielle Expressionsanalyse CbfA-regulierter Proteine
während des Übergangs vom Wachstum zur Entwicklung
in *Dictyostelium discoideum***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Ingo Wilhelm Matthias Jennes
aus Linnich

Frankfurt am Main, 2006
(D30)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Winckler

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Karas

Datum der Disputation: 14. September 2006

meinen Eltern

There is a theory which states that if ever anyone discovers what the universe is for and why it is here, it will instantly disappear and be replaced by something even more bizarre and inexplicable.

There is another which states that this has already happened.
(Douglas Adams)

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Der Organismus <i>Dictyostelium discoideum</i>	1
1.1.1 Taxonomie und phylogenetischer Ursprung	1
1.1.2 Genom - Aufbau und Struktur	2
1.1.2.1 Transposons	2
1.1.3 Lebenszyklus	4
1.1.3.1 Aggregation und frühe Entwicklung	6
1.1.4 Der C-Modul bindende Faktor A (CbfA)	10
1.2 Proteomanalyse	13
1.2.1 Methoden der Proteomanalyse	14
1.2.1.1 2D-Gelelektrophorese	15
1.2.1.2 DIGE-Technologie	16
1.2.1.3 Massenspektrometrie	17
1.2.1.4 Identifizierung von Proteinen	18
1.3 Stand neuartiger Analyse-Technologien in <i>D. discoideum</i>	19
1.3.1 Transkriptionsanalysen	19
1.3.2 Proteomanalysen	20
1.4 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Verbrauchsmaterial	23
2.1.3 Kits	24
2.1.4 Enzyme	24
2.1.5 Geräte	24
2.1.6 Allgemeine Puffer und Lösungen	25
2.1.7 Nährmedien	26
2.1.8 Mikroorganismen	26
2.1.8.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	26
2.1.8.2 <i>Dictyostelium discoideum</i> -Stämme	27
2.1.9 Vektoren und Plasmide	27
2.1.10 Synthetische Oligonukleotide	27
2.1.11 Verwendete Software	28

2.1.12	Verwendete Datenbanken-----	28
2.2	Molekularbiologische Methoden-----	28
2.2.1	Standardmethoden-----	28
2.2.2	DNA-Sequenzanalysen-----	28
2.3	Biochemische Methoden-----	29
2.3.1	Proteinexpression in Bakterien-----	29
2.3.1.1	Proteinexpression im analytischen Maßstab-----	29
2.3.1.2	Proteinexpression im präparativen Maßstab-----	30
2.3.2	Reinigung rekombinant exprimierter Proteine-----	31
2.3.2.1	Aufreinigung über Ni ²⁺ -NTA-Säule-----	31
2.3.2.2	Elektroelution-----	32
2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration-----	33
2.3.3.1	Bradford-Assay-----	33
2.3.3.2	BCA-Assay-----	33
2.3.4	Lyophilisation-----	33
2.3.5	SDS-PAGE-----	34
2.3.6	Färbung von Protein-Gelen-----	35
2.3.6.1	Coomassie-Färbung-----	35
2.3.6.2	Natriumacetat-Färbung-----	35
2.3.7	Western-Blot-----	36
2.3.8	Herstellung monoklonaler Antikörper-----	37
2.3.8.1	Immunisierung von Mäusen-----	37
2.3.8.2	ELISA-Screening-----	38
2.4	Arbeiten mit <i>D. discoideum</i> -----	39
2.4.1	Kulturbedingungen-----	39
2.4.1.1	<i>Dictyostelium discoideum</i> -Stamm AX2-----	39
2.4.1.2	<i>Dictyostelium discoideum</i> -Stamm JH.D2-----	39
2.4.2	Entwicklungs-Phänotypen-----	39
2.4.3	Herstellung von Zellpellets-----	40
2.5	2D-Gelelektrophorese-----	40
2.5.1	Rehydration-Loading-----	40
2.5.1.1	Probenvorbereitung-----	40
2.5.1.2	Fokussierung-----	41
2.5.2	Cup-Loading-----	41
2.5.2.1	Rehydrierung-----	41
2.5.2.2	Probenvorbereitung-----	42
2.5.2.3	Fokussierung-----	42
2.5.3	PAA-Gele für die 2D-Gelelektrophorese-----	43
2.5.3.1	Gradientengele-----	43
2.5.3.2	Kontinuierliche Gele-----	45

2.5.4	Zweite Dimension / SDS-PAGE -----	45
2.5.4.1	Äquilibration der IPG-Streifen -----	45
2.5.4.2	Laufbedingungen -----	46
2.5.5	Färbung von 2D-Gelen -----	47
2.5.5.1	Coomassie-Färbung -----	47
2.5.5.2	Silbernitrat-Färbung -----	47
2.5.5.3	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen -----	48
2.5.6	DIGE-Experimente -----	49
2.5.6.1	Versuchsaufbau und Durchführung -----	49
2.5.6.2	Scannen der Gele -----	50
2.5.6.3	Auswertung -----	50
2.5.6.4	Ausschneiden der Proteine -----	51
2.6	Massenspektrometrie -----	51
2.6.1	Trypsin-Verdau -----	51
2.6.2	Spotten der Proben -----	53
2.6.3	Auswertung -----	53
3	Ergebnisse -----	54
3.1	Analyse der PkaC-Expression in der <i>cbfA^{am}</i> -Mutante JH.D2 -----	56
3.1.1	Herstellung eines monoklonalen PkaC-Antikörpers -----	56
3.1.1.1	Expression des Antigens -----	56
3.1.1.2	Aufreinigung des Antigens -----	57
3.1.1.3	Auswahl eines PkaC-Antikörpers -----	60
3.1.2	Überprüfung der PkaC-Expression in der <i>cbfA^{am}</i> -Mutante JH.D2 -----	62
3.2	Etablierung einer 2D-gelelektrophoretischen Analyse von <i>D. discoideum</i> -----	63
3.2.1	Probenvorbereitung und IEF -----	64
3.2.1.1	Benzonaseverdau in Kombination mit Rehydratation-Loading -----	64
3.2.1.2	Lyophilisation in Kombination mit Benzonaseverdau und Rehydratation- Loading -----	65
3.2.1.3	Cup-Loading -----	66
3.2.2	Gele für die 2D-Gelelektrophorese -----	68
3.2.2.1	Gradientengele mit Sammelgel -----	68
3.2.2.2	Gradientengele ohne Sammelgel -----	68
3.2.2.3	Kontinuierliche Gele -----	69
3.2.3	Zweite Dimension -----	69
3.2.4	Färbung -----	70
3.2.4.1	Silberfärbung -----	70
3.2.4.2	Coomassiefärbung -----	73
3.2.4.3	Fluoreszenzfärbung -----	76
3.3	DIGE-Experimente -----	77
3.3.1	DIGE-Experiment I -----	77

3.3.1.1	Versuchsaufbau -----	77
3.3.1.2	Versuchsauswertung -----	77
3.3.1.3	Massenspektrometrische Analyse -----	78
3.3.2	DIGE-Experiment II -----	80
3.3.2.1	Versuchsaufbau -----	80
3.3.2.2	Versuchsauswertung -----	81
3.3.2.3	Massenspektrometrische Analyse -----	83
3.3.3	DIGE-Experiment III -----	86
3.3.3.1	Hintergrund -----	86
3.3.3.2	Versuchsaufbau -----	90
3.3.3.3	Versuchsauswertung -----	90
3.3.3.4	Massenspektrometrische Analyse -----	90
3.3.4	DIGE-Experiment IV -----	92
3.3.4.1	Hintergrund -----	92
3.3.4.2	Versuchsaufbau -----	92
3.3.4.3	Versuchsauswertung -----	93
3.3.4.4	Massenspektrometrische Analyse -----	98
4	Diskussion -----	100
4.1	PkaC Expression in der <i>cbfA^{am}</i> -Mutante JH.D2 -----	100
4.1.1	Einfluß von CbfA auf die Etablierung des cAMP-Signalnetzwerkes -----	100
4.1.2	Problem der Kontrolle der PkaC-Expression auf Translationsebene -----	101
4.1.3	Zusammenhang zwischen CbfA und PKA Expression -----	102
4.2	Qualität der 2D-gelelektrophoretischen Untersuchung -----	103
4.3	Qualität der massenspektrometrischen Untersuchung -----	104
4.3.1	Wo ist CbfA? -----	104
4.3.2	Identifizierung differentiell exprimierter Proteine -----	105
4.3.2.1	Nachteil der DIGE-Technologie -----	106
4.3.2.2	PMF: kleine Massen, große Herausforderungen -----	107
4.4	Einfluß von CbfA auf die Proteinexpression -----	107
4.4.1	Spezielle Auswirkungen des C-Terminus von CbfA -----	108
4.5	Alternativen zur 2D-Gelelektrophorese -----	111
5	Zusammenfassung -----	114
6	Literatur -----	116
7	Lebenslauf -----	127
8	Publikationen -----	128
9	Danksagung -----	129

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Lebens- und Entwicklungszyklus von <i>D. discoideum</i> -----	5
Abb. 1.2: PKA-Regelkreis -----	7
Abb. 1.3: Charakteristische Domänen des Proteins CbfA -----	11
Abb. 1.4: Kurzdarstellung des Ettan DIGE Systems -----	17
Abb. 3.1: Northern-Blot Analyse entwicklungsrelevanter Gene -----	54
Abb. 3.2: Western-Blot Analysen ausgesuchter Proteine aus <i>D. discoideum</i> -----	55
Abb. 3.3: Morphologie verschiedener <i>D. discoideum</i> -Stämme auf Agar-Phosphat-Platten--	56
Abb. 3.4: Expression des Antigens GST-PkaC ³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ im <i>E. coli</i> -Expressionstamm W3110---	57
Abb. 3.5: Säulenchromatographische Aufreinigung des Antigens GST-PkaC ³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ -----	58
Abb. 3.6: Zur Immunisierung verwendetes Antigen GST-PkaC ³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ aus <i>Inclusion bodies</i> --	59
Abb. 3.7: Western-Blot Analyse zur Untersuchung von Antikörpern aus den Hybridomazell-Klonen der immunisierten Maus-----	60
Abb. 3.8: Western-Blot Analyse zur genaueren Charakterisierung potentieller PkaC-Antikörper-----	61
Abb. 3.9: Western-Blot Analyse zur Untersuchung der Expression der PkaC in AX2 und JH.D2-----	62
Abb. 3.10: Repräsentatives Bild eines 2D-Gels im Anschluß an das <i>Rehydration-Loading</i> -	65
Abb. 3.11: Bild eines 2D-Gels im Anschluß an das <i>Cup-Loading</i> -----	68
Abb. 3.12: Vergleich verschiedener Silber-gefärbter 2D-Gele-----	71
Abb. 3.13: Übersicht extrahierter Proteine eines Silber-gefärbten 2D-Gels-----	72
Abb. 3.14: Darstellung zur Reproduzierbarkeit der Coomassiefärbung -----	73
Abb. 3.15: Differentiell exprimierte Proteine in Coomassie-gefärbten 2D-Gelen -----	74
Abb. 3.16: Identifizierung differentiell exprimierter Proteine mit der <i>DeCyder-Software</i> -----	78
Abb. 3.17: Darstellung eines entwicklungsrelevanten Proteins in AX2-----	82
Abb. 3.18: Repräsentatives Bild der <i>DeCyder-Software</i> zum DIGE-Experiment II -----	83
Abb. 3.19: Struktur des C-terminalen Fragments rCbfA ⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ -----	87
Abb. 3.20: Morphologie der Transformante JH.D2[PB1] auf Agar-Phosphat-Platten-----	87
Abb. 3.21: Northern-Blot-Analyse zur Untersuchung der TRE5-A-Transkriptionsstärke-----	88
Abb. 3.22: Western-Blot-Analyse zur Überprüfung der Expression des Fragments rCbfA ⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ in JH.D2[PB1]-----	89
Abb. 3.23: Vergleich unterschiedlicher 2D-Gele des Experiments DIGE IV -----	93
Abb. 3.24: Leitprofil der Proteinexpression der Gruppen 1 und 2 (DIGE-Experiment IV)-----	94
Abb. 3.25: Leitprofil der Proteinexpression der Gruppen 3 und 4 (DIGE-Experiment IV)-----	95
Abb. 3.26: Leitprofil der Proteinexpression der Gruppen 5 und 6 (DIGE-Experiment IV)-----	96
Abb. 3.27: Leitprofil der Proteinexpression der Gruppen 7a und 7c (DIGE-Experiment IV) -	97
Abb. 3.28: Leitprofil der Proteinexpression der Gruppen 8a und 8c (DIGE-Experiment IV) -	97

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: Protokoll der Fokussierung im Anschluß an das <i>Rehydration-Loading</i> -----	41
Tab. 2.2: Protokoll der Fokussierung im Anschluß an das <i>Cup-Loading</i> -----	43
Tab. 2.3: Färbeschema Silberfärbung nach Shevchenko-----	48
Tab. 2.4: Versuchsaufbau der DIGE-Experimente -----	49
Tab. 2.5: Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe-----	50
Tab. 2.6: Protokoll des Trypsin-Verdaus -----	52
Tab. 3.1: Übersicht der benötigten Arbeitsschritte zur Herstellung eines 2D-Gels -----	63
Tab. 3.2: Identifizierte Proteine aus Silber-gefärbten 2D-Gelen-----	73
Tab. 3.3: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine aus Coomassie-gefärbten 2D-Gelen -----	75
Tab. 3.4: Versuchsaufbau DIGE-Experiment I-----	77
Tab. 3.5: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine des Experiments DIGE-I -----	79
Tab. 3.6: Übersicht der Versuchsplanung DIGE-Experiment II-----	80
Tab. 3.7: Versuchsaufbau DIGE-Experiment II, Gele 1-6-----	81
Tab. 3.8: Versuchsaufbau DIGE-Experiment II, Gele 7-12-----	82
Tab. 3.9: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine des Experiments DIGE-II, Gele 1-6 -----	84
Tab. 3.10: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine des Experiments DIGE-II, Gele 7-12 -----	86
Tab. 3.11: Versuchsaufbau DIGE-Experiment III -----	90
Tab. 3.12: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine des Experiments DIGE-III-----	91
Tab. 3.13: Versuchsaufbau DIGE-Experiment IV -----	92
Tab. 3.14: Versuchsaufbau DIGE-Experiment IV, zusätzliche Gele -----	93
Tab. 3.15: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine des Experiments DIGE IV -----	98
Tab. 4.1: Übersicht über die unterschiedlichen CbfA Mengen in den untersuchten Stämmen -----	109

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Originallaut
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-diammonium Salz
ACN	Acetonitril
Amp	Ampicillin
APOD	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β -ME	β -Mercaptoethanol
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Cytosin
Da	Dalton
DIGE	<i>Difference in Gel Electrophoresis</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate (A, T, G, C)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
g	Erdanziehungskraft
G	Guanin
IAA	Iodacetamid
IPG	immobilisierter pH Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
m/v	Masse pro Volumen
mA	Milliampere
mbar	Millibar
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
MW	Molekulargewicht
MQ Wasser	Milli-Q Wasser
N	Stickstoff
ng	Nanogramm
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilo-tri-essigsäure
nm	Nanometer
NL	nicht linear
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen bei 600 nm

Abkürzung	Originallaut
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
POD	Peroxidase
q. s.	<i>quantum satis</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VHr	Voltstunden
vs.	<i>versus</i>
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Der Organismus *Dictyostelium discoideum*

1.1.1 Taxonomie und phylogenetischer Ursprung

Der eukaryotische Mikroorganismus *Dictyostelium discoideum* ist ein zellulärer Schleimpilz und wurde erstmals 1935 von K. B. Raper in den Wäldern North Carolinas entdeckt [RAPER 1935]. Neben *D. discoideum* gibt es noch mehr als 70 verschiedene *Dictyostelium*-Arten [MUTZEL 1991], die entsprechend der herkömmlichen Taxonomie der Gruppe der *Dictyostelidae* (zelluläre Schleimpilze) zugerechnet werden und deren erster Vertreter, *Dictyostelium mucuroides*, bereits 1869 von O. Brefeld beschrieben wurde [BREFELD 1869]. Die Bezeichnung "Schleimpilz" ist für *D. discoideum* jedoch irreführend, da er weder den eigentlichen, plasmodischen Schleimpilzen noch den echten Pilzen zugeordnet werden kann. Im Gegensatz zu den echten Schleimpilzen lebt *D. discoideum* nicht saprophytisch und bildet kein Plasmodium. Von den echten Pilzen unterscheidet sich *D. discoideum* durch das Fehlen von Hyphen. Nach neueren phylogenetischen Untersuchungen wird die Gruppe der *Dictyostelidae* zusammen mit der Gruppe der *Myxogastridae* (plasmodische Schleimpilze) zu den *Mycetozoa* (Schleimpilzen) gezählt [BALDAUF *et al.*, 2000]. Die Auswertung der Sequenzanalysen verschiedener Proteine ergab eine Einordnung der Schleimpilze als eine zu den Pilzen und Metazoen (Vielzellern) benachbarte Klasse im Reich der eukaryotischen Lebewesen [BALDAUF *et al.*, 2000]. Aktuelle Untersuchungen zur Folge ähneln viele der Proteine aus *D. discoideum* eher den entsprechenden orthologen humanen Proteinen als z. B. den orthologen Proteinen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) [EICHINGER *et al.*, 2005]. Demnach ist *D. discoideum* deutlich enger mit den Metazoen als mit den Pilzen und Pflanzen verwandt. Er stellt somit einen geeigneten Modellorganismus für die Aufklärung biologischer Fragestellungen, etwa den molekularen Mechanismen bei der Zelldifferenzierung, der Signaltransduktion oder der Zellbewegung, höherer Eukaryonten dar.

1.1.2 Genom - Aufbau und Struktur

D. discoideum besitzt ein etwa 34 Megabasen (Mb) großes, haploides Genom, das sich auf insgesamt sechs Chromosomen mit einer Größe zwischen 3,6 Mb und 8,6 Mb verteilt [EICHINGER *et al.*, 2005]. Es entspricht damit ca. 1% eines Säuger-genoms [KAY & WILLIAMS 1999] und ist mehr als doppelt so groß wie das Genom von *S. cerevisiae* [WILLIAMS *et al.*, 2005]. Neben den sechs Chromosomen befinden sich im Zellkern etwa 100 Kopien eines 88 Kilobasen (kb) großen, extrachromosomalen Palindroms, welches die Information für ribosomale RNA enthält [SUCGANG *et al.*, 2003]. Zusätzlich besitzen die Zellen etwa 200 Kopien einer 55 kb großen, mitochondrialen DNA, die hauptsächlich für Proteine des Energie-stoffwechsels kodiert.

Die Sequenzierung des Genoms durch das internationale "Dictyostelium Genom Projekt" konnte im Jahr 2005 erfolgreich abgeschlossen werden [EICHINGER *et al.*, 2005]. *D. discoideum* kodiert demnach für ca. 12500 Gene; dies entspricht in etwa der Hälfte des menschlichen Genoms [LANDER *et al.*, 2001; VENTER *et al.*, 2001]. Es weist einen durchschnittlichen AT-Gehalt von 76% auf. In Exons beträgt der AT-Gehalt im Mittel etwa 73%, in Introns sogar 88%. In einigen Bereichen des Genoms liegt der AT-Gehalt bei bis zu 96%, wobei homopolymere poly(dA)- bzw. poly(dT)-Sequenzen eine Länge von bis zu 180 Basenpaaren (bp) erreichen können. Mit einer durchschnittlichen Länge von 2500 bp pro Gen im Abstand von jeweils etwa 800 bp besitzt *D. discoideum* ein sehr dichtes Genom, das nur zu etwa 29% aus nicht-codierenden Bereichen besteht. Verglichen mit dieser hohen Genomdichte enthält *D. discoideum* gleichzeitig mit 9,6% einen bemerkenswert großen Anteil an mobilen genetischen Elementen (Transposons) [GLÖCKNER *et al.*, 2002].

1.1.2.1 Transposons

Transposons, oder Transposable Elemente (TEs), sind mobile genetische DNA-Abschnitte einer Zelle, welche die Fähigkeit besitzen, ihre Position im Genom zu verändern. Bereits in den 1940er Jahren von Barbara McClintock in *Zea mays* (Mais) entdeckt [McCLINTOCK 1951], konnten Transposons mittlerweile in praktisch allen dahingehend untersuchten Organismen nachgewiesen werden. Die Anteile der TEs am Genom reichen dabei von 3% in *S. cerevisiae* [KIM *et al.*, 1998] über 45% bei *Homo sapiens* (Mensch) [LANDER *et al.*, 2001; VENTER *et al.*, 2001] zu mehr als 70%

in *Z. mays* [KUMAR & BENNETZEN 1999]. Bei den mobilen genetischen Elementen in *D. discoideum* kann zwischen DNA-Transposons (1,5%) und Retrotransposons (8,1%) unterschieden werden [WINCKLER *et al.*, 2002].

1.1.2.1.1 DNA-Transposons

Der Mobilisierungsmechanismus der DNA-Transposons beruht auf einer Abfolge von Exzisions- und Insertions-Prozessen (*cut and paste*), die durch das Enzym Transposase vermittelt werden. Demnach werden die DNA-Transposons aus der Donor-DNA ausgeschnitten und anschließend an anderer Stelle wieder in das Genom (Ziel-DNA) integriert. Als Bindemotiv für die Transposase besitzen die DNA-Transposons an den Enden jeweils eine entgegengesetzt orientierte, terminale Wiederholungseinheit (*Inverted Terminale Repeat*, ITR).

1.1.2.1.2 Retrotransposons

Die Transposition der Retrotransposons erfolgt über ein Boten-RNA (mRNA) Intermediat nach einem Kopier-Integrations-Mechanismus (*copy and paste*). Eine Reverse Transkriptase (RT) erzeugt aus den mRNA-Intermediaten neue DNA-Kopien, die anschließend in das Genom integriert werden. Die Gruppe der Retrotransposons kann in autonome und nicht-autonome Elemente unterteilt werden. Die autonomen Retrotransposons besitzen sämtliche für die Transposition notwendigen Proteine (Reverse Transkriptase und Integrase). Im Gegensatz dazu besitzen nicht-autonome Retrotransposons keine kodierenden Sequenzen. Sie verwenden statt dessen die Enzyme der autonomen Elemente. Je nach Vorkommen bzw. Nicht-Vorkommen langer terminaler Wiederholungseinheiten (*Long Terminal Repeats*, LTRs) erfolgt innerhalb der autonomen Retrotransposons eine Klassifizierung in LTR-Retrotransposons und Non-LTR-Retrotransposons. In *D. discoideum* befinden sich fast alle Elemente aus der Gruppe der Non-LTR-Retrotransposons in der direkten Umgebung von tRNA-Genen. Für sie wurde daher die systematische Nomenklatur der TRE-Retrotransposons (*tRNA-gene targeted Retrotransposable Element*) eingeführt [SZAFRANSKI *et al.*, 1999]. Zusätzlich wird nach der Integrationspräferenz oberhalb (5'-Ende) oder unterhalb (3'-Ende) der tRNA-Gene zwischen TRE5- und TRE3-Retrotransposons unterschieden. Aus der Familie der TRE5-Retrotransposons lassen sich aufgrund ihres modularen Aufbaus die drei Unterfamilien TRE-5A,

TRE-5B und TRE-5C ableiten, wobei hier nur kurz auf das Element TRE-5A.1 aus der Familie TRE-5A eingegangen wird.

Dabei handelt es sich um ein autonomes Retrotransposon mit einer Größe von 5657 bp. Es besitzt zwei offene Leserahmen, die sich auf einer Länge von 22 bp überschneiden und um -1 Base versetzt sind. Das Element wird an beiden Enden von modular aufgebauten nicht-translatierten Regionen (*Untranslated Regions*, UTRs) begrenzt. Diese bestehen am 5'-Ende aus bis zu sieben jeweils 199 bp großen A-Modulen und einem 299 bp großen B-Modul. Am 3'-Ende befinden sich ein weiteres B-Modul und ein 149 bp großes C-Modul [BECK *et al.*, 2002].

1.1.3 Lebenszyklus

Der natürliche Lebensraum von *D. discoideum* ist humusreicher Waldboden der gemäßigten Zonen. *D. discoideum*-Zellen ernähren sich durch die Phagozytose von Bakterien. Diese werden von Pseudopodien umschlossen, endozytotisch internalisiert, anschließend in den Lysosomen abgebaut und dem Stoffwechsel zugeführt [BOZZARO & PONTE 1995]. In der Zeit zwischen zwei Zellteilungen werden ca. 1000 Bakterien phagozytiert [MUTZEL 1991]. Während dieser vegetativen Wachstumsphase im Lebenszyklus liegt *D. discoideum* als einzellige Amöbe vor, welche neben Pseudopodien auch durch Filopodien gekennzeichnet ist und eine Größe von etwa 8-12 µm aufweist. Mit Hilfe von Aktin- und Myosin-Filamenten ist *D. discoideum* in der Lage, sich amöboid zu bewegen und zur Auffindung von Nahrung auf chemische Reize zu reagieren [PAN *et al.*, 1972]. Sobald die Nahrungsquellen nicht mehr in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen oder eine bestimmte Zelldichte der Amöben pro Fläche überschritten wird, geht *D. discoideum* aus der Phase des vegetativen Wachstums in eine 24 bis 30 Stunden andauernde Entwicklungsphase über. In dieser Zeit entsteht durch morphologische Veränderungen und Zelldifferenzierungen ein multizellulärer Organismus, der abschließend einen Fruchtkörper ausbildet (Abb. 1.1) [MAEDA *et al.*, 1989]. Angelockt von sogenannten Schrittmacherzellen, die aufgrund der ungünstigen Umweltbedingungen als erste die chemotaktisch wirkende Substanz cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) ausscheiden und ein Aggregationszentrum bilden, wandern die Amöben (*Streaming*) in Richtung dieses Signals [KONIJN *et al.*, 1967; LOOMIS 1993]. Nach einem komplexen Mechanismus fungiert dabei jede Zelle sowohl als Empfänger als auch als Sender von cAMP, dessen Konzentration sich pulsierend

in Wellen über die Population fortsetzt. Innerhalb eines Zeitraums von 6 bis 7 Stunden entsteht somit ein multizelluläres Aggregat (*Mound*) aus ca. 10^5 Zellen, das mit einer Protein-Zellulosescheide umhüllt ist.

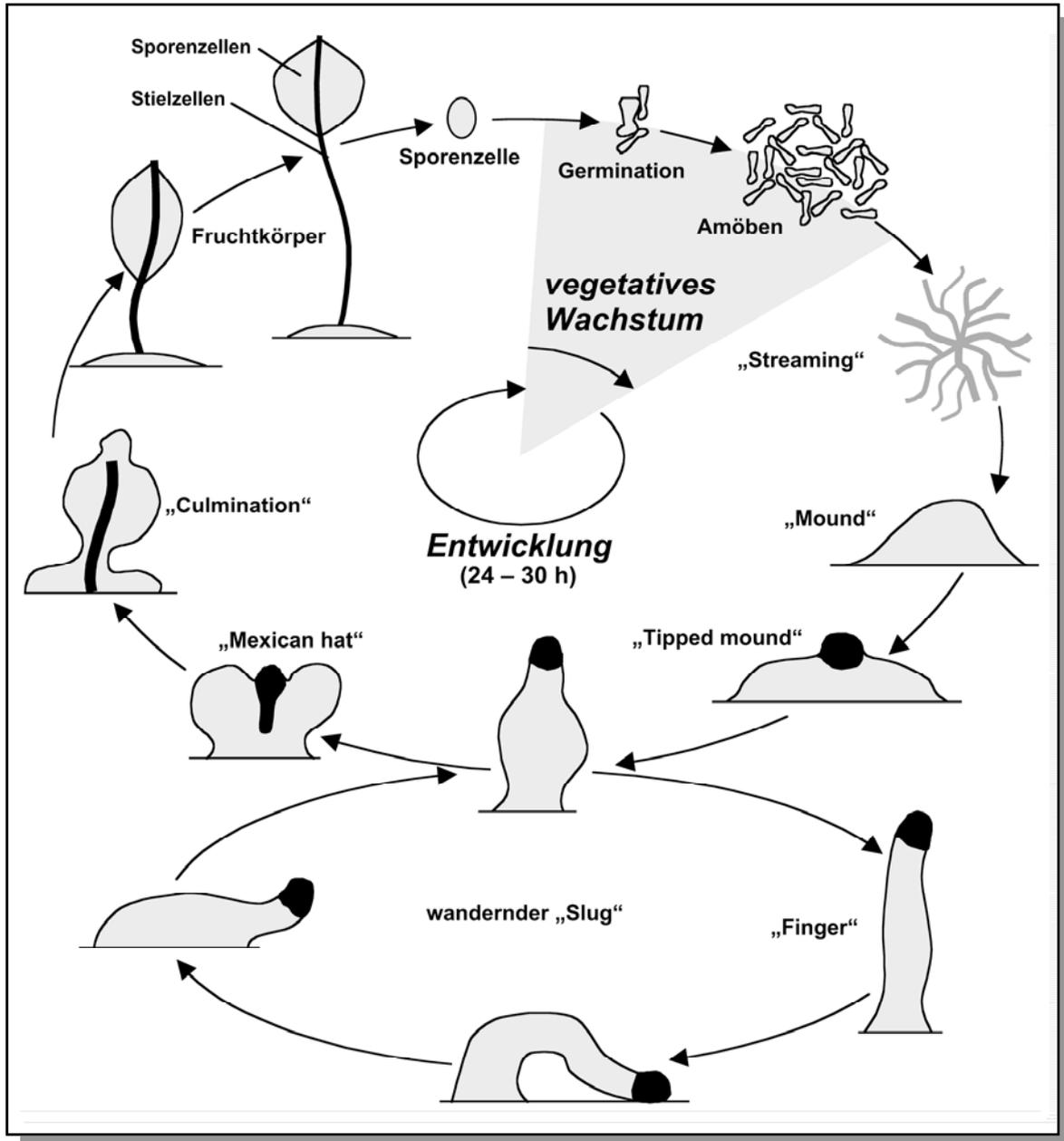


Abb. 1.1: Lebens- und Entwicklungszyklus von *D. discoideum*

Präsporen- und Sporencellen sind grau, Prästiel- und Stielzellen sind schwarz dargestellt.

Die Größe dieser Aggregate wird durch ein sezerniertes Polypeptid, dem sog. *Counting Factor*, über Zell-Zell-Kommunikation reguliert. [GOMER 1999]. Im Gegensatz zu den echten Schleimpilzen fusionieren die Zellen jedoch nicht zu einem Plasmodium. Unter Aufrechterhaltung der einzelnen Zellen kommt es bei

D. discoideum zur Bildung eines sogenannten Pseudoplasmodiums (*Slug*), welches sich mit Hilfe einer Schleimscheide auf phototaktische, chemotaktische oder thermotaktische Reize hinbewegen kann (wandernder *Slug*) [BONNER 1994]. Das Pseudoplasmodium stellt schließlich seine Wanderbewegung ein und es kommt zum Höhepunkt der Entwicklung von *D. discoideum*. Der größte Teil der Zellen des Pseudoplasmodiums, etwa 80%, entwickeln sich zu Sporenzellen, während aus den restlichen 20% Stielzellen entstehen. Sobald diese zur Stielzelle ausdifferenzieren, wandern sie unter Ausbildung einer Stielröhre (*Mexican hat*) auf den Boden des Pseudoplasmodiums, schwellen durch Vakuolisierung stark an und sterben schließlich ab. Gleichzeitig werden die Präsporenzellen emporgehoben (*Culmination*). Es kommt zur Ausbildung eines charakteristischen Fruchtkörpers, aus dem sich durch Abgabe von Wasser die Sporenzellen entwickeln. Diese sind zum Schutz vor äußeren Einflüssen wie Hitze und Trockenheit zusätzlich mit einer Mukosaccharid-Kapsel umgeben. Im Gegensatz zu den abgestorbenen Stielzellen verharren die Sporenzellen in einer Art Ruhezustand. Somit können sie unter geeigneten Umweltbedingungen wieder auskeimen, um anschließend erneut in die Phase des vegetativen Wachstums einzutreten [COTTER *et al.*, 1992].

1.1.3.1 Aggregation und frühe Entwicklung

Aufgrund der komplexen Vorgänge beim Übergang der Wachstums- in die Entwicklungsphase werden die Ereignisse zum Zeitpunkt der Aggregation an dieser Stelle ausführlicher dargelegt.

Mit Hilfe des sogenannten *Pre-Starvation-Factors* (PSF) sind die Zellen in der Lage, das Verhältnis von Populationsdichte zur bakteriellen Nahrungsquelle zu erkennen [CLARKE & GOMER 1995]. Bei der Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes führt der Konzentrationsanstieg des PSFs zur Expression einiger Entwicklungsrelevanter Proteine wie z. B. des extrazellulären Matrix-Proteins Discoidin oder des membranständigen Rezeptors von cAMP, CAR1 [CLARKE *et al.*, 1987; RATHI *et al.*, 1991]. Zusätzlich führt die extrazelluläre Akkumulation des PSFs zur Expression der Proteinkinase YakA. Diese bewirkt neben der Unterbrechung des Zellzyklus auch eine Aufhebung der Translationsblockade für die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PkaC) [SOUZA *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 1999]. Neben dem PSF wird mit Beginn der Hungerphase der *Conditioned-Medium-Factor* (CMF) sezerniert [CLARKE *et al.*, 1992]. CMF spielt eine essentielle Rolle bei der Initiierung der

Entwicklungsphase, da er für die Etablierung des cAMP-Signalnetzwerkes benötigt wird [YUEN *et al.*, 1995; VAN HAASTERT *et al.*, 1996]. Dabei kontrolliert vermutlich die Bindung von CMF an seinen membranständigen Rezeptor die Aktivierung des CAR1-Rezeptors durch cAMP [VAN HAASTERT *et al.*, 1996].

Bei der Aggregation und der anschließenden Differenzierung der einzelnen Amöben in Präsporen- und in Prästielzellen spielt die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) eine entscheidende Rolle. Es handelt sich dabei um eine hoch konservierte Serin/Threonin-spezifische Kinase [FRANCIS & CORBIN 1994], die durch Phosphorylierung einen erheblichen Einfluß auf die Aktivität einer Vielzahl von Proteinen ausübt (Abb. 1.2).

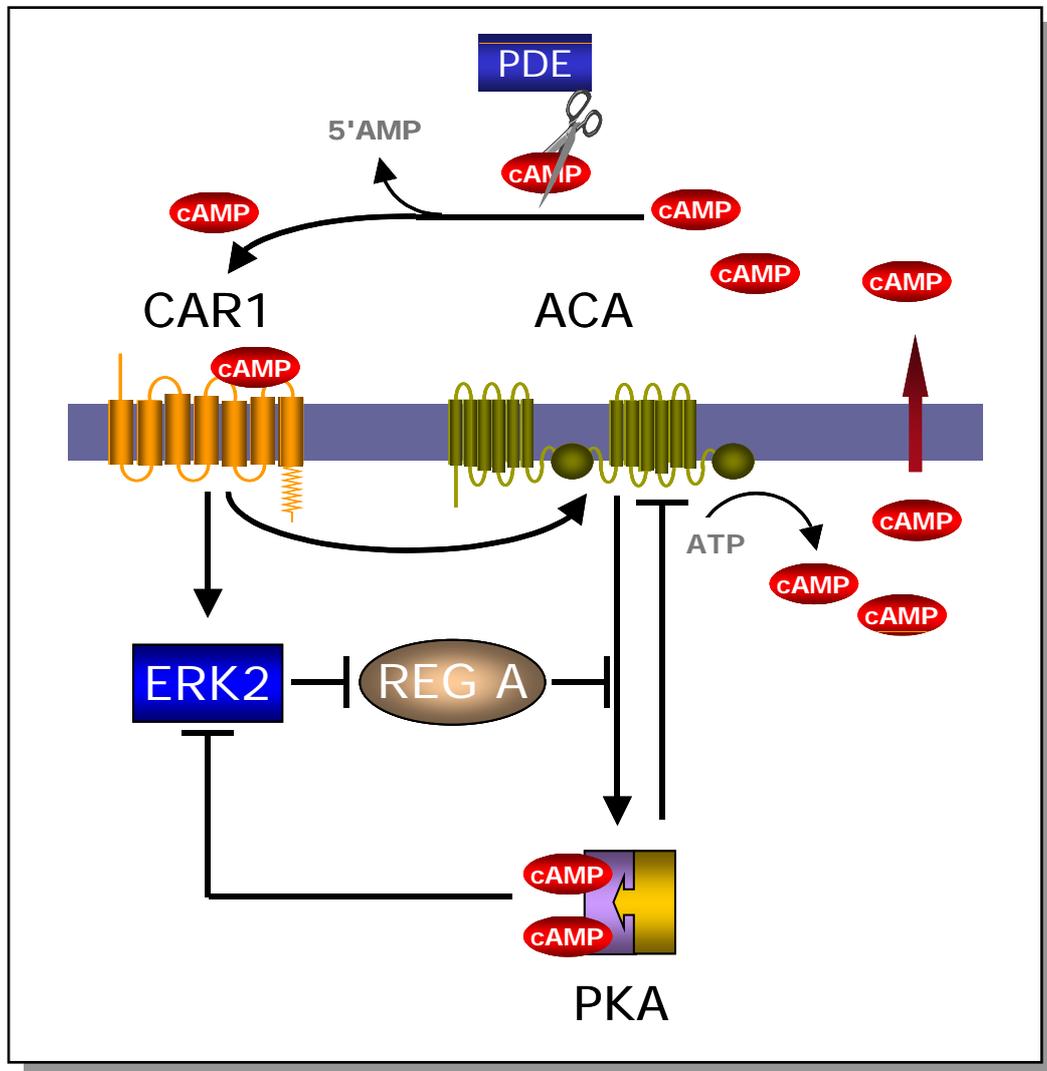


Abb. 1.2: PKA-Regelkreis

Erläuterungen: siehe Text, **ACA**: Adenylat-Zyklase A; **CAR1**: cAMP-Rezeptor 1; **ERK2**: *Extracellular Signal Regulated Kinase 2*; **PDE**: extrazelluläre Phosphodiesterase; **PKA**: Proteinkinase A; **RegA**: intrazelluläre Phosphodiesterase

Zunächst liegt die PKA allerdings inaktiv in Form eines Heterodimers vor, das sich aus einer regulatorischen (PkaR) und der oben erwähnten katalytischen Untereinheit (PkaC) zusammensetzt. Beide Untereinheiten werden in vegetativen *D. discoideum*-Zellen nur zu geringen Mengen exprimiert [LEICHTLING *et al.*, 1984; PART *et al.*, 1985; SCHALLER *et al.*, 1987]. In Versuchen mit entsprechenden Null-Mutanten konnte gezeigt werden, daß weder die regulatorische noch die katalytische Untereinheit essentiell für das Wachstum sind [MANN & FIRTEL 1991]. Sobald die Konzentration an cAMP innerhalb der Zellen einen Wert von 100 nM überschreitet, kommt es zur Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit. Als Folge davon dissoziiert diese von der katalytischen Untereinheit ab, so daß die nun freie PkaC die Transkription entwicklungsrelevanter Gene initiieren kann. Innerhalb der ersten 12 Stunden der Entwicklung steigt die Konzentration der beiden Untereinheiten mindestens um das Vierfache an und bleibt anschließend bis zur Kulmination konstant auf diesem Niveau [LEICHTLING *et al.*, 1984]. Während der weiteren Entwicklung ist das Verhältnis von regulatorischer zu katalytischer Untereinheit von entscheidender Bedeutung. Bei einer Überexpression der regulatorischen Untereinheit kommt es nicht zur Freisetzung der katalytischen Untereinheit, wodurch eine Aggregation der Zellen verhindert wird [SIMON *et al.*, 1989]. Eine Überexpression der katalytischen Untereinheit hingegen hat den Phänotyp eines *rapid developers* zur Folge. Die Zellen solcher Stämme, z. B. bei *pkaR*⁻-Mutanten, entwickeln sich sehr viel schneller als Wildtyp Zellen und sind in der Lage schon nach 16 Stunden Sporen auszubilden. Die Fruchtkörper dieser Stämme sind allerdings oft mißgestaltet und weisen nur kurze und dicke Stiele auf. Innerhalb der ersten acht Stunden der Entwicklung kommt es zu einer gesteigerten Expression der Adenylat-Zyklase (ACA), des Enzyms, das zum Zeitpunkt der Aggregation hauptsächlich für die Umwandlung von ATP in cAMP verantwortlich ist. Initiiert wird die verstärkte Transkription des *acaA* Gens durch die Bindung von cAMP an seinen membranständigen Rezeptor CAR1. Die PKA scheint bei der Expression von ACA ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen, da in Experimenten mit *pkaC*⁻-Mutanten keine Transkription des *acaA*-Gens nachgewiesen werden konnte [MANN *et al.*, 1997]. Mit ACG und ACR gibt es noch zwei weitere Adenylat-Zyklasen, die im Verlauf der Entwicklung differentiell exprimiert werden. ACG ist ebenfalls ein membranständiges Protein; seine Expression wird allerdings erst während der späten Entwicklung in den Sporen eingeleitet [VAN ES *et al.*, 1996]. Die ACR hingegen wird bereits in vegetativen Zellen

auf einem basalen Niveau exprimiert, bevor sie ähnlich wie ACA in der frühen Phase der Entwicklung akkumuliert [MEIMA & SCHAAP 1999; SÖDERBOM *et al.*, 1999]. ACA und ACR können sich nicht gegenseitig ersetzen. Versuche mit *acaA*⁻-Mutanten haben jedoch gezeigt, daß die Aktivität der ACR ausreicht, um die benötigte Konzentration an intrazellulärem cAMP zu synthetisieren [IRANFAR *et al.*, 2003]. Der CAR1 Rezeptor ist in vegetativ wachsenden Zellen kaum vorhanden und wird innerhalb kürzester Zeit nach Einleitung der Entwicklung unabhängig von cAMP exprimiert [IRANFAR *et al.*, 2003]. Neben seiner extrazellulären Domäne mit extrem hoher Affinität zu cAMP besitzt CAR1 eine intrazelluläre Domäne für die Interaktion mit trimeren G-Proteinen. Nach der Bindung des cAMPs kommt es an der α -Untereinheit des G-Proteins zu einem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP). Gleichzeitig wird die β/γ -Untereinheit des G-Proteins freigesetzt und aktiviert eine PI3-Kinase, welche anschließend die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) katalysiert. Durch die Bindung von PIP₃ an die PH-Domäne des cytosolischen Proteins CRAC (Cytosolic Regulator of Adenyl Cyclase) wandert CRAC an die Plasmamembran und aktiviert dort die ACA [INSALL *et al.*, 1994; LILLY & DEVREOTES 1994]. Allerdings sind dazu neben CRAC noch folgende Faktoren notwendig, deren genaueren Wechselwirkungen noch nicht vollständig aufgeklärt sind: das G-Protein RasC [LIM *et al.*, 2001], das Ras *interacting protein*, Rip3 [LEE *et al.*, 1999], der Ras *nucleotide exchange factor* RasGEF [INSALL *et al.*, 1996], die Proteinkinase ERK2 (Extracellular Signal Regulated Kinase) [SEGALL *et al.*, 1995] und der Faktor Pianissimo [CHEN *et al.*, 1997]. Nach der Sekretion wirkt das von der ACA synthetisierte cAMP extrazellulär in einem positiven Rückkopplungs-Mechanismus als chemotaktische Substanz auf andere aggregationsfähige Zellen, bevor es von der Phosphodiesterase PdsA zu 5'-AMP abgebaut wird [SUCGANG *et al.*, 1997]. Die Konzentration an intrazellulärem cAMP, das als sekundärer Botenstoff einen maßgeblichen Einfluß auf zelluläre Signalkaskaden und die Genexpression ausübt, wird ebenfalls durch eine Phosphodiesterase, RegA, reguliert [SHAULSKY *et al.*, 1996]. Innerhalb eines Zeitraums von vier Stunden nach Beginn der Entwicklung kommt es zu einer Akkumulation der *regA* mRNA, die ihren Höhepunkt etwa weitere vier Stunden später erreicht und dann konstant auf diesem Niveau verbleibt [SHAULSKY & LOOMIS 1996]. RegA ist eine spezifische cAMP-Phosphodiesterase, welche die cAMP-Konzentration innerhalb der Zellen senkt und

somit die PKA Aktivität *in vivo* kontrolliert. Experimente mit *regA*⁻-Mutanten haben gezeigt, daß diese denselben Phänotyp aufweisen wie *pkaR*⁻-Mutanten (siehe oben). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die katalytische Untereinheit der PKA in Abwesenheit von RegA permanent in aktivierter Form vorliegt [SHAULSKY *et al.*, 1998]. Die Aktivität von RegA selber scheint dabei über eine negative Rückkopplung durch das Protein ERK2 reguliert zu sein. ERK2 ist ein Mitglied der MAP Kinase Familie (*Mitogen Activated Protein Kinase*) und wird nach Bindung von cAMP an den CAR1 Rezeptor vorübergehend durch diesen aktiviert [KNETSCH *et al.*, 1996; MAEDA *et al.*, 1996; AUBRY *et al.*, 1997]. Da die PKA ihrerseits ebenfalls über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Wirksamkeit sowohl von CAR1 als auch die von ERK2 beeinflusst, steuert sie somit cAMP-vermittelt auch ihre eigene Aktivität.

1.1.4 Der C-Modul bindende Faktor A (CbfA)

Aus Kernextrakten vegetativ wachsender Zellen des *D. discoideum*-Stamms AX2 konnte durch elektrophoretische Gelretardierungs-Experimente (*Electro-Mobility-Shift-Assay*, EMSA) ein Protein identifiziert werden, das Sequenz-spezifisch an das C-Modul des Non-LTR Retrotransposons TRE5-A.1 aus *D. discoideum* bindet [GEIER *et al.*, 1996; HORN *et al.*, 1999]. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde das Protein ursprünglich als C-Modul bindender Faktor (CMBF) bezeichnet. Das C-Modul ist eine 149 bp lange DNA-Sequenz am 3'-Ende des Retrotransposons TRE5-A.1, welche Promotoraktivität für die Transkription des Minus-Strangs des Retrotransposons aufweist [SCHUMANN *et al.*, 1994]. Es handelt sich somit um eine potentielle Bindestelle für Transkriptionsfaktoren, die maßgeblichen Einfluß auf die Retrotransposition von TRE5-A.1 haben könnte. Zur Vermeidung einer eventuellen Verwechslung mit dem *conditioned medium factor* (CMF) wurde für das Protein im Jahr 2004 die neue Terminologie CbfA (C-Modul bindender Faktor A; *DictyBaseID*: DDB0216196) eingeführt [WINCKLER *et al.*, 2004]. Das *cbfA*-Gen (*GenBank* Nr.: AF052006) befindet sich auf Chromosom 3 und umfaßt insgesamt 3412 bp inklusive eines 409 bp großen Introns. Entsprechend der kodierenden Sequenz des Gens besteht CbfA aus 1000 Aminosäuren und besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 114,2 kDa. Das Protein enthält mehrere charakteristische Domänen (Abb. 1.3), auf die im Folgenden einzeln eingegangen wird.

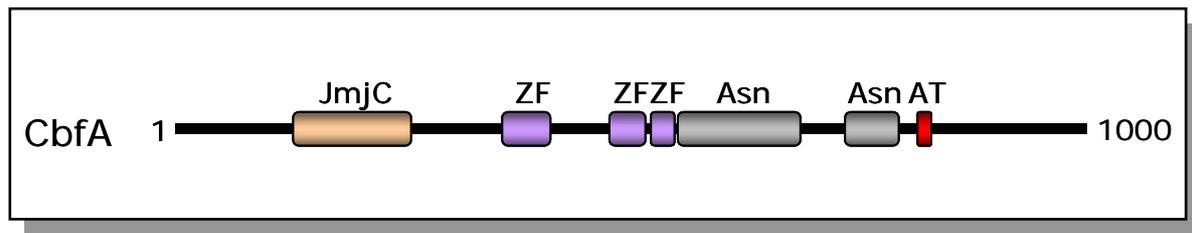


Abb. 1.3: Charakteristische Domänen des Proteins CbfA

JmjC: JumonjiC-Domäne; **ZF:** Zink-Finger; **Asn:** Asparagin-reiche Bereiche; **AT:** AT-Haken

Verglichen mit Proteinen aus anderen Organismen, weist CbfA in Position 144 bis 280 einen Bereich auf, der eine ausgeprägte Homologie zu einer konservierten C-terminalen Domäne des Jumonji-Proteins (JmjC) der Maus besitzt [BALCIUNAS & RONNE 2000; CLISSOLD & PONTING 2001]. Die genaue Funktion von Proteinen mit einer JmjC-Domäne ist zurzeit noch recht wenig erforscht. Bekannt ist, daß das Protein Jumonji für die embryonale Entwicklung der Maus essentiell ist und dort als DNA-bindender Transkriptions-Repressor fungiert [BERGE-LEFRANC *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2003; JUNG *et al.*, 2005]. Neuere Versuche mit Proteinextrakten, die aus HeLa-Zellen gewonnen wurden, zeigen, daß die JmjC-Domäne ferner an der Demethylierung von Histonen beteiligt ist [TSUKADA *et al.*, 2006]. Im mittleren Bereich weist CbfA drei Cystein-reiche, Zink-Finger ähnliche Domänen auf. Zink-Finger-Motive sind in der Lage, Komplexe mit DNA einzugehen. Dabei koordinieren vier Aminosäuren jeweils ein Zink-Ion, wodurch regelrecht „Finger“ ausgebildet werden, die in die große Furche der DNA „greifen“ können. DNA-bindende Proteine besitzen oft mehrere solcher Zink-Finger, da die Wechselwirkung zwischen einzelnen Zink-Fingern und DNA nur recht schwach ausgeprägt ist.

Im Bereich des C-Terminus von CbfA ist eine Domäne lokalisiert, die einen AT-Haken enthält, welche die DNA-Protein-Interaktion zwischen CbfA und dem C-Modul unterstützt [HORN *et al.*, 1999]. Erstmals in *high-mobility-group* (HMG) Proteinen beobachtet, konnten AT-Haken mittlerweile in vielen weiteren DNA-bindenden Proteinen entdeckt werden [HUTH *et al.*, 1997]. Es handelt sich dabei um relativ kleine Bereiche, typischerweise enthalten sie ein Glycin-Arginin-Prolin-Tripeptid Motiv, die an die kleine Furche AT-reicher DNA-Sequenzen binden [REEVES & NISSEN 1990]. Bei der DNA-Protein-Interaktion zwischen CbfA und dem C-Modul von TRE5-A.1 konnte *in vitro* eine spezifische Bindung des AT-Hakens an das C-Modul des Retrotransposons nachgewiesen werden [HORN *et al.*, 1999]. Die Bindung von CbfA an das C-Modul erfolgt über zwei AT-reiche Sequenz-Motive

(CMBS-1 und CMBS-2), die beide etwa 36 bp lang sind und jeweils circa 24 bp große oligo(dT)-Abschnitte umfassen [GEIER *et al.*, 1996].

Neben diesen drei charakteristischen Domänen befinden sich zwischen den Zink-Finger Motiven und dem AT-Haken zwei Asparagin-reiche Bereiche, deren genaue Aufgabe noch nicht geklärt ist. Möglicherweise erfüllen sie die Funktion eines flexiblen Abstandhalters zwischen den Zink-Fingern und dem AT-Haken. Dadurch wäre eine optimale Anordnung der beiden DNA-bindenden Domänen bei der Bindung von CbfA an das C-Modul gewährleistet [HORN *et al.*, 1999].

CbfA wird in *D. discoideum*-Zellen konstitutiv exprimiert und ist möglicherweise für das Überleben von *D. discoideum* essentiell. Versuche, eine entsprechende *cbfA*⁻-Mutante herzustellen sind bislang gescheitert [HORN *et al.*, 1999]. Durch die Einführung eines *amber*-Stop-Codons konnte allerdings eine CbfA-Mangelmutante (*cbfA*^{am}) hergestellt werden, deren *cbfA*-Translation inhibiert wird [WINCKLER *et al.*, 2001]. Infolge der unvollständigen Suppression durch das in das *cbfA*-Gen eingeführte *amber*-Stop-Codon und die gleichzeitige Expression einer Glu^{sup} tRNA werden, verglichen mit dem Wildtyp, nur ca. 5% des funktionellen CbfA-Proteins exprimiert. Der Phänotyp dieser *cbfA*^{am}-Mutante ist bezüglich Wachstum und Entwicklung allerdings deutlich von der Gesamtmenge an funktionellem CbfA abhängig [WINCKLER *et al.*, 2001]. Demnach scheint CbfA einen regulativen Einfluss auf die Phagozytose zu haben, wodurch die *cbfA*^{am}-Mutante ein deutlich langsames Wachstum aufzeigt. Beim Übergang vom Wachstum zur Entwicklung kommt es zu einer verzögerten Einleitung der Aggregation und die Entwicklung der *cbfA*^{am}-Mutante führt zur Ausbildung verkümmelter Fruchtkörper. Der oben beschriebene Phänotyp gleicht sehr stark jenem, der bei der Untersuchung von *pkaC*⁻-Mutanten beobachtet werden kann [LOOMIS 1998]. Tatsächlich kann der CbfA Phänotyp durch eine konstitutive Expression der PkaC in der *cbfA*^{am}-Mutante zum Wildtyp revertiert werden. Eine Transkription des *acaA*-Gens, das in *pkaC*⁻-Mutanten nicht abgelesen wird, konnte auch in der *cbfA*^{am}-Mutante nicht detektiert werden [WINCKLER *et al.*, 2004]. Ähnlich der PkaC kann auch durch die konstitutive Expression der ACA der Phänotyp in den Zellen der *cbfA*^{am}-Mutante wieder hergestellt werden [SIOL *et al.*, 2006]. Die *cbfA*^{am}-Mutante zeichnet sich weiterhin durch eine verminderte Expression von Transkripten des TRE5-A.1 Retrotransposons aus. Dieses deutet auf einen regulierenden Einfluss von CbfA auf die Retrotransposition hin.

1.2 Proteomanalyse

Der Begriff „Proteom“ wurde erstmals 1994 von dem Australier Marc R. Wilkins auf einem wissenschaftlichen Kongress zum Thema 2D-Gelelektrophorese im italienischen Siena geprägt. Er wurde bewußt an den Ausdruck „Genom“ angelehnt, welcher in den 1990er Jahren überwiegend die biologische Forschung bestimmte. Während das Genom die gesamte DNA-Information der Chromosomen eines Organismus widerspiegelt, versteht man unter dem Proteom die Summe aller Proteine, die durch das Genom ausgedrückt werden können. Die Untersuchung von der Form, der Funktion und der Interaktion der Proteine faßt man in Analogie zu anderen „-omics“ Technologien als *Proteomics* zusammen. Rückblickend ist es kein Zufall, daß der Begriff „Proteom“ etwa in dem Zeitraum entstand, als die Sequenzierung kompletter Genome absehbar war [FLEISCHMANN *et al.*, 1995]. Schließlich zeichnete sich bereits zu diesem Zeitpunkt ab, daß die DNA-Sequenz eines Organismus zwar die vollständige Information möglicher Gene aufzuzeigen vermochte, sie aber gleichzeitig keine genaueren Informationen über deren Einsatz und Funktion liefern wird. Es folgten weitere Sequenzierungsprojekte, als Beispiel seien die Sequenzierung von *S. cerevisiae* [GOFFEAU *et al.*, 1996], von *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) [ADAMS *et al.*, 2000], von *H. sapiens* [LANDER *et al.*, 2001; VENTER *et al.*, 2001] und schließlich die Sequenzierung von *D. discoideum* [EICHINGER *et al.*, 2005] genannt. Jedoch liefert die Identifizierung der Gensequenzen nur selten Erkenntnisse über die Funktion der jeweiligen Gene. Die Sequenzierungsergebnisse gleichen vielmehr großen, statischen Datenbanken, die sämtliche Bausteine des Lebens enthalten. Allerdings können allein auf der Grundlage dieser Bausteine keine Aussagen über ihre dynamische, räumliche und zeitliche Verwendung getroffen werden. Nachfolgende Projekte gingen daher dazu über, die Gesamtheit der Genomprodukte zu erforschen. Ein Ansatz, der bereits zu Beginn der 1980er Jahre in dem „*Human Protein Index*“ gefordert wurde [ANDERSON & ANDERSON 1982], seinerzeit jedoch keine ausreichende finanzielle Unterstützung erhielt. Somit wurde als erstes Untersuchungsobjekt der Postgenomphase die mRNA als Analyseobjekt ausgewählt. Verglichen mit Proteinen ist sie wesentlich simpler aufgebaut. Sie besteht aus nur vier verschiedenen Bausteinen, was die Untersuchung wesentlich vereinfachte. Der größte Vorteil lag allerdings darin, daß die benötigten molekularbiologischen Analysemethoden (z. B. die PCR), nicht zuletzt durch intensive Weiterentwicklung zur Zeit der

Genomsequenzierungs-Ära, für Nukleinsäuren bereits etabliert waren. Als eine direkte Folge dieser Entwicklungen wurde zu Beginn der 1990er Jahre eine Methode etabliert, die es ermöglichte, die Expression sämtlicher mRNAs einer Probe parallel durch RNA/DNA-Hybridisierung entweder auf Nylonmembranen [DUNNE *et al.*, 1992; MAIER *et al.*, 1994] oder auf Glasobjektträgern [SCHENA *et al.*, 1995; LOCKHART *et al.*, 1996; LASHKARI *et al.*, 1997], sog. *Microarrays*, zu messen. Dadurch konnte erstmals ein komplexer Einblick in die Funktionsweise des Genoms auf Transkriptionsebene gewonnen werden. Dabei stellte sich jedoch recht schnell heraus, daß die Transkription der mRNA in keinem linearen Verhältnis zu der Expression ihrer eigentlichen Produkte, den Proteinen, steht [ANDERSON & SEILHAMER 1997; GYGI *et al.*, 1999]. Aus den Änderungen der gemessenen mRNA-Konzentrationen resultiert also nicht zwangsläufig eine Veränderung der entsprechenden Proteinkonzentrationen. Dies bedeutet gleichzeitig, daß für die Aufklärung des Proteoms kein Weg an der Proteomanalyse vorbeiführt.

1.2.1 Methoden der Proteomanalyse

Verglichen mit der Sequenzierung eines Genoms, mag sie in Bezug auf ihren technischen und organisatorischen Aufwand noch so komplex sein, stellt die Aufklärung des Proteoms einer Spezies eine noch viel größere, wenn nicht sogar unlösbare Herausforderung dar. Für die Proteomanalyse steht keine der PCR vergleichbare Technologie zur Vervielfachung des Ausgangsmaterials zur Verfügung [HUBER 2003]. Die Menge der aus natürlichen Quellen gewonnenen Proteine stellt somit für die Untersuchung einen limitierenden Faktor dar. Im Gegensatz zum konstanten Genom handelt es sich bei dem Proteom außerdem um eine Momentaufnahme aller exprimierten Proteine zu einem definierten Zeitpunkt, da Proteine innerhalb einer Zelle permanent auf- und abgebaut werden. Sie erfahren posttranslationelle Modifikationen oder lagern sich mit anderen Proteinen zu Multiproteinkomplexen zusammen. So kann sich die Menge einzelner Proteine z. B. in *S. cerevisiae* um den Faktor fünf bis sechs zwischen einzelnen Zellen unterscheiden, was einen qualitativen Nachweis bzw. eine quantitative Analyse erschwert [GYGI *et al.*, 1999]. Ferner kann es sich bei verschiedenen Proteinen um unterschiedliche Spleißvarianten ein und des selben Gens handeln. Zusammengefaßt läßt sich daher feststellen, daß die relativ geringe Zahl z. B. humaner Gene, die aus der Genom-Sequenz vorhergesagt wird [LANDER *et al.*, 2001;

VENTER *et al.*, 2001], das Potential für ein äußerst umfangreiches und komplexes Proteom in sich birgt.

Als eines der vorrangigsten Ziele der Proteomanalyse wurde die vollständige Identifizierung sämtlicher Proteine einer Zelle bzw. eines Gewebes postuliert [WILKINS *et al.*, 1996]. Ein Ziel, das auf Grund der oben beschriebenen Komplexität allerdings bis heute für keinen Organismus erreicht werden konnte. Die aktuellen Forschungsschwerpunkte auf dem Gebiet der Proteomanalyse befassen sich daher neben der Identifizierung auch mit der Quantifizierung und Charakterisierung einzelner Proteine. Als Beispiele seien die Sequenz, die Struktur, die Aktivität, die Interaktion mit anderen Proteinen und der Vergleich verschiedener zellulärer Zustände (z. B. Wildtyp vs. Mutante) genannt. In diesen Bereichen hat die Proteomanalyse einen unschätzbaren Beitrag zur Aufklärung biologischer Zusammenhänge geleistet. In der molekularbiologischen Forschung führte der traditionelle Erkenntnisweg in der Regel in mühevoller Kleinarbeit über die Beobachtung eines bestimmten Phänotyps hin zur Identifizierung und Charakterisierung des verantwortlichen Gens bzw. des von diesem kodierten Proteins. Zusammen mit den etablierten Analysemethoden der Molekularbiologie konnte durch die gezielte Untersuchung der beteiligten Proteine der Zusammenhang zwischen der beobachteten Aktivität des Proteins und dem kodierenden Gen aufgedeckt werden. Der Entwicklung verlässlicherer und sensiblerer Methoden zur Aufklärung der Proteinsequenzen fiel dabei eine Schlüsselrolle zu, wodurch immer geringere Mengen an Protein noch zuverlässig identifiziert werden konnten.

1.2.1.1 2D-Gelelektrophorese

Bei der 2D-Gelelektrophorese handelt es sich um eine analytische Methode zur Trennung von Proteinen [KLOSE 1975; O'FARRELL 1975; SCHEELE 1975]. Durch die Kombination der isoelektrischen Fokussierung mit der Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird eine besonders hochauflösende Trennung von Proteingemischen erzielt. Die 2D-Gelelektrophorese ist nach wie vor die einzige Technik, mit der gleichzeitig bis zu 10000 Proteinkomponenten aufgetrennt werden können [KLOSE & KOBALZ 1995]. Die Proben werden zunächst in der ersten Dimension einer isoelektrischen Fokussierung unterzogen. Dabei werden die Proteine aufgrund ihrer Ladung, abhängig von ihrem relativen Gehalt an sauren und basischen Aminosäuren, in einem Polyacrylamidgel mit einem pH-Gradienten

elektrophoretisch aufgetrennt und an ihrem isoelektrischen Punkt (pI) im Gel fixiert. Im Anschluß werden die aufgetrennten Proteine unter Verwendung eines SDS-Polyacrylamidgels im rechten Winkel zur vorherigen Trennrichtung in einer zweiten Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Schließlich können die aufgetrennten Proteine durch den Einsatz entsprechender Färbemethoden im Gel sichtbar gemacht werden [WESTERMEIER & MAROUGA 2005]. Die Nachteile der 2D-Gelelektrophorese sind allerdings die geringe Sensitivität gegenüber Membran-Proteinen [SANTONI *et al.*, 2000], sowie die Probleme bei der Detektion von Proteinen mit großen (> 150 kDa) oder kleinen (< 10 kDa) Massen bzw. sehr sauren (< 2) oder basischen (> 12) pI-Werten [CORTHALS *et al.*, 2000].

1.2.1.2 DIGE-Technologie

Bei der Anwendung der 2D-Gelelektrophorese zur Untersuchung unterschiedlicher Proteinmuster zweier biologischer Stadien (z. B. Wildtyp vs. Mutante) stellen Gel-zu-Gel-Variationen und die daraus resultierenden Artefakte ein wesentliches Problem dar. Die Verwendung der *Difference in Gel Electrophoresis*-Methode (DIGE) [ÜNLÜ *et al.*, 1997] ermöglicht die Auftrennung und Analyse zweier unterschiedlicher Proben in demselben Gel (Abb. 1.4). Dabei werden die Proteinlysate beider Proben mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3 *minimal dye* und Cy5 *minimal dye*) markiert und anschließend zusammen in einem Gel fokussiert. Dadurch können die experimentell bedingten Schwankungen der Proteinmuster zwischen den zu vergleichenden Gelen stark minimiert werden. Weiterhin bietet diese Methode die Möglichkeit, einen internen Standard zu verwenden. Dieser setzt sich zu gleichen Teilen aus den im Experiment vorhandenen Proteinen beider Proben zusammen. Ebenfalls mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cy2 *minimal dye*) markiert, wird er gemeinsam mit den beiden Proben in der ersten Dimension fokussiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der markierten Proteine in der zweiten Dimension werden die Bildinformationen der 2D-Gele mit einem Fluoreszenzscanner eingelesen und digitalisiert. Die Auswertung dieser Daten ermöglicht eine quantitative Expressionsanalyse, auf deren Grundlage Aussagen zu differentiell exprimierten Proteinen zwischen den beiden biologischen Stadien getroffen werden können [ALBAN *et al.*, 2003; FRIEDMAN *et al.*, 2004].

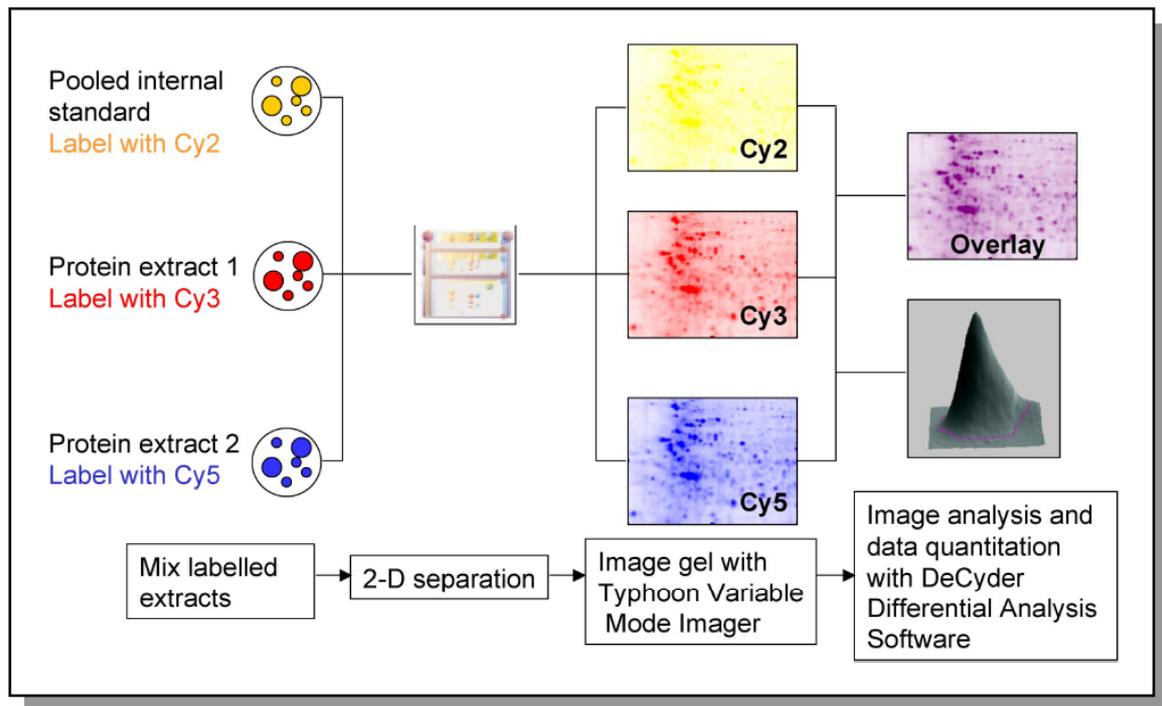


Abb. 1.4: Kurzdarstellung des Ettan DIGE Systems

Entnommen aus: Ettan DIGE system; User Manual (18-1173-17 Edition AA), Amersham Biosciences

1.2.1.3 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie (MS) handelt es sich um ein analytisches Verfahren zur Ermittlung der Molekülmasse von Ionen im Hochvakuum. Die Proben werden zunächst in einer Ionenquelle ionisiert und gelangen anschließend in den Analysator des Massenspektrometers. Dort werden die unterschiedlichen Ionen hinsichtlich ihres Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) aufgetrennt. Der Nachweis der einzelnen Ionen erfolgt schließlich durch einen Detektor. Diese Technik ermöglicht eine schnelle und sensitive Identifizierung von Proteinen aus 2D-Gelen. Allerdings mußten dazu zunächst neue Methoden etabliert werden, da es mit den damals herkömmlichen Ionisierungsmethoden wie der Elektronenstoß-Ionisation (EI) oder der chemischen Ionisation (CI) nicht möglich ist, thermisch labile, hochmolekulare Biomoleküle wie etwa Nukleinsäuren oder Proteine intakt in die Gasphase zu überführen und zu ionisieren. So wurde Mitte der 1980iger Jahre neben der Elektro-Spray-Ionisation (ESI) [FENN *et al.*, 1989] die Methode der *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI) [KARAS & HILLENKAMP 1988] entwickelt, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Die Analyten werden dabei zusammen mit der im Überschuß eingesetzten Matrix (z. B. α -Cyanohydroxizimtsäure) auf einen Probenhalter aufgebracht. Somit liegt der

Analyt nach der Kokristallisation eingebettet in der Matrix vor. Die Matrix absorbiert die Energie des verwendeten Stickstoff-Lasers ($\lambda = 337 \text{ nm}$) und überführt diese in Schwingungsenergie. Dadurch gehen sowohl der Analyt als auch Teile der Matrix in die Gasphase über (Desorption). Die Ionisation zu vorwiegend einfach geladenen Analytionen erfolgt dabei durch einen Protonentransfer aus der Matrix und sekundären Reaktionen, wie z. B. Kationen- und Elektronentransfer. Der genaue Mechanismus der Ionisation ist allerdings weiterhin ungeklärt. Als Massenanalysator bei der MALDI-MS wird hauptsächlich der sogenannte Flugzeitenanalysator (*Time of Flight*, TOF) verwendet. Ionen können in einem elektrischen Feld beschleunigt werden und besitzen nach dem Verlassen der Beschleunigungsstrecke, abhängig von ihren Massen, unterschiedliche Geschwindigkeiten. Die Bestimmung des Masse/Ladungs-Quotienten wird durch die Messung der Flugzeit vom Start der Ionisierung bis zur Registrierung am Detektor ermittelt. Die Interpretation der Daten setzt dabei allerdings eine Kalibrierung mit Referenzsubstanzen bekannter Masse voraus.

1.2.1.4 Identifizierung von Proteinen

Eine Methode zur Identifizierung von Proteinen aus 2D-Gelen stellt der Peptid-Massen-Fingerabdruck (PMF) dar, welcher durch die hohe Meßgenauigkeit der Massenspektrometrie ermöglicht wird [PAPPIN *et al.*, 1993; WEBSTER & OXLEY 2005]. Nachdem die Proben aus dem Gel ausgeschnitten sind, werden sie einem Protein-Verdau (z. B. durch die Endopeptidase Trypsin) unterzogen, bevor sie im Massenspektrometer vermessen werden. Das erhaltene Massenspektrum liefert in diesem Fall einen Satz von Peptidfragmenten (*Peaklist*). Im Idealfall stammen diese nur von einem einzigen Protein, wodurch Rückschlüsse auf die Identität der Probe gezogen werden können. Zu diesem Zweck werden aus Proteindatenbanken abgeleitete Peptidmassen mit dem Massenspektrum verglichen. Die Ergebnisse werden dabei in Form einer Rangliste, welche gestaffelt nach Wahrscheinlichkeit die mögliche Identität des Proteins angibt, dargestellt.

1.3 Stand neuartiger Analyse-Technologien in *D. discoideum*

1.3.1 Transkriptionsanalysen

Mit der fortschreitenden Entschlüsselung des Genoms von *D. discoideum* und den daraus resultierenden Bibliotheken sogenannter *expressed sequence tags* (ESTs) [URUSHIHARA 2002] war es möglich, Veränderungen der Gentranskription auf der Basis von *Microarrays* zu untersuchen. Verglichen mit der ursprünglichen Vorgehensweise unter Verwendung von Northern-Blots, bei der man auf die Analyse einiger weniger Gene beschränkt war, bietet diese Technik die Möglichkeit, ausgewählte Gengruppen oder sogar das gesamte Transkriptom gleichzeitig zu untersuchen. So wurden aufgrund einer im Jahre 2001 durchgeführten Studie insgesamt 17 neue Zelltypen-spezifische Gene, die vorzugsweise in Prästiel- oder Präsporenzellen transkribiert werden, entdeckt [IRANFAR *et al.*, 2001]. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die morphologischen Differenzierungen während der Entwicklungsphase eine Folge der transkriptionellen Veränderung etwa der Hälfte aller Gene in *D. discoideum* ist [VAN DRIESSCHE *et al.*, 2002]. Die Auswertung von 172 nicht redundanten Entwicklungs-Genen im Jahr 2003 ergab eine zeitabhängige Transkriptionsänderung dieser Gene, die dadurch in insgesamt fünf verschiedene *cluster* aufgeteilt werden konnten [IRANFAR *et al.*, 2003]. Weiterhin wurden in derselben Studie drei unabhängig von cAMP-Pulsen exprimierte Gene, nämlich *carA*, *gpaB* und *pdsA*, zum Zeitpunkt der frühen Entwicklung in *D. discoideum* aufgezeigt. Durch die Analyse einer Untersuchung mit entsprechenden *acaA*⁻-Mutanten, *acrA*⁻-Mutanten bzw. *acaA*⁻/*acrA*⁻ Doppel-Mutanten konnte die interzelluläre Aktivität der ACR zum Zeitpunkt der frühen Entwicklung nachgewiesen werden [IRANFAR *et al.*, 2003]. *Microarray*-Untersuchungen der *cbfA*^{am}-Mutante JH.D2 ergaben, daß sämtliche entwicklungsrelevanten Gene auch 18 Stunden nach Beginn der Entwicklung verglichen mit Wildtyp-Zellen überhaupt nicht oder nur minimal transkribiert werden [WINCKLER *et al.*, 2004]. Bei einer im Jahre 2005 durchgeführten Untersuchung konnten aufgrund der Analyse von *Microarray*-Daten bekannte epistatische Zusammenhänge zwischen den Genen *pufA* und *yakA* bestätigt und neue epistatische Beziehungen der Gene *pkaR* und *regA* während der Aggregation aufgedeckt werden [VAN DRIESSCHE *et al.*, 2005].

1.3.2 Proteomanalysen

Durch die Verwendung der 2D-Gelelektrophorese gelang es bereits in den 1980er Jahren, Tubulin in einem Proteinextrakt axenisch wachsender *D. discoideum*-Zellen zu identifizieren [WHITE *et al.*, 1983]. Nach diesem frühen Erfolg der zum damaligen Zeitpunkt recht neuen Methode der Proteinauftrennung vergingen allerdings weitere 14 Jahre, bevor im Jahr 1997 die Protein-Karte von *D. discoideum* zum Zeitpunkt des „Slug“-Stadiums in der SWISS-2DPAGE Datenbank veröffentlicht wurde [YAN *et al.*, 1997]. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden die prominentesten Proteine im Anschluß an die 2D-gelelektrophoretische Auftrennung einer Sequenzanalyse unterzogen. Von den insgesamt 150 analysierten Proteinen konnten damals 31 identifiziert werden. Bei einer im Jahre 2001 durchgeführten Studie wurde die Zusammensetzung von Vesikeln der Präsporenzellen (PSVs) untersucht [SRINIVASAN *et al.*, 2001; ALEXANDER *et al.*, 2003]. PSVs sind für die Abgabe der robusten Protein-Zellulosescheide verantwortlich, mit der die einzelnen Sporen zum Ende der Entwicklung von *D. discoideum* umhüllt werden. Durch die Untersuchung der aus aufgereinigten Vesikeln gewonnen Proteine konnten neben den bekannten Vesikel-Proteinen SP96, SP87 und SP60 auch solche identifiziert werden, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht mit der Differenzierung von Sporen in Verbindung gebracht worden sind. Als Beispiel seien die cAMP-regulierten präsporenspezifischen Proteine PB74, DG17 und D7 oder auch die regulatorisch wirkenden Kinasen PI3 und NDP sowie das Protein Rab7 genannt. Aus dem Jahr 2004 datiert die vorerst letzte Veröffentlichung zur 2D-gelelektrophoretischen Untersuchung in *D. discoideum* [SECKO *et al.*, 2004]. Den Autoren gelang es, Veränderungen im Phosphorylierungsstatus einzelner Proteine in Abhängigkeit einer gesteigerten RasG Aktivität in vegetativ wachsenden *D. discoideum*-Zellen zu beobachten. Durch die Anwendung der Peptid-Massen-Fingerabdruck Methode konnten insgesamt zehn der aus dem 2D-Gel extrahierten Proteine identifiziert werden.

1.4 Zielsetzung

Der Übergang vom vegetativen Wachstum einzelliger Amöben zum multizellulären Organismus setzt eine morphologische Veränderung und Differenzierung der einzelnen Zellen in *D. discoideum* voraus. Eine entscheidende Rolle nimmt dabei die cAMP-abhängige katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PkaC) ein, die durch Phosphorylierung einen erheblichen Einfluß auf die Aktivität einer Vielzahl von Proteinen ausübt und essentiell für die Entwicklung von *D. discoideum* ist. Verglichen mit denen des Wildtyp-Stamms AX2 weisen Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 einen charakteristischen Phänotyp bezüglich Wachstum und Entwicklung auf, der durch das Einbringen eines artifiziellen *cbfA*-Gens revertiert werden kann [BECK 2003]. Im Anschluß an die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen PkaC soll untersucht werden, inwieweit sich ein Mangel an CbfA in den Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 negativ auf die Protein-Expression der PkaC auswirkt.

Des weiteren soll eine reproduzierbare 2D-gelelektrophoretische Methode zur Analyse der Protein-Expressionmuster von *D. discoideum* etabliert werden. Die Verwendung geeigneter Färbemethoden erlaubt anschließend das Auffinden differentiell exprimierter Proteine zwischen den untersuchten Proben des Wildtyp-Stamms AX2 und der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2. Der Einsatz der Massenspektrometrie in Verbindung mit der Methode des Peptid-Massen-Fingerabdrucks ermöglicht anschließend die Identifizierung von Proteinen, deren Expression, direkt oder indirekt, vom Gehalt an CbfA in den Zellen abhängt.

Eine Überexpression des C-Terminus von CbfA führt in entsprechenden Transformanden zu einer erheblich gesteigerten Transkription des Retrotransposons TRE5-A verglichen mit der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 [BECK 2003]. Zusätzlich soll daher überprüft werden, ob sich die Überexpression des C-terminalen Anteils von CbfA auch auf die Proteinexpression der untersuchten *D. discoideum*-Stämme auswirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller/Lieferant
1,4-Dithiothreitol	Fa. Roth
2-Iodacetamid	Fa. Fluka
6-Aminohexansäure	Fa. Sigma
α -Cyanohydroxymethylsäure	Fa. Bruker Daltonics
Acetonitril	Fa. Roth
Acrylamid	Fa. Roth
Agar	Fa. Sigma
Agarose	Fa. Merck
Albumin Fraktion V	Fa. Roth
Ameisensäure	Fa. Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Fa. Merck
Ammoniumsulfat	Fa. Merck
Ampicillin	Fa. Roth
β -Mercaptoethanol	Fa. Roth
Bacto-Pepton	Fa. Difco
Bacto-Trypton	Fa. Difco
Blasticidin S	Fa. ICN Biomedicals
Bromphenolblau	Fa. USB Corporation
BSA	Fa. New England BioLabs
CHAPS Pufferan [®]	Fa. Roth
Coomassie Brilliant Blue G250	Fa. Sigma
<i>DeStreak Reagent</i>	Fa. Amersham
Dodecylsulfat Natriumsalz	Fa. Roth
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Fa. Roth
Essigsäure 99%	Fa. Roth
Ethidiumbromid	Fa. Merck
Formaldehydlösung 37%	Fa. Merck
Glycin	Fa. Roth
Guanidin HCl	Fa. Roth
Harnstoff	Fa. Serva
Leupeptin	Fa. Biomol
Lysin HCl	Fa. Sigma
N, N'-Methylen-bis-acrylamid	Fa. Roth
N,N-Dimethylformamid (<i>Ultrapure</i>)	Fa. USB Corporation
Natrimchlorid	Fa. Roth
Natriumazid	Fa. Roth

Substanz	Hersteller/Lieferant
Natriumcarbonat	Fa. Merck
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Fa. Merck
Paraffin, dünnflüssig	Fa. Merck
Phenol	Fa. Roth
Ponceau S	Fa. Roth
Silbernitrat	Fa. Roth
TEMED	Fa. Roth
Thioharnstoff	Fa. Fluka
Trifluoressigsäure	Fa. Pierce
Tris	Fa. Roth / Fa. Biomol
Triton X 100	Fa. Roth
Trockenmilchpulver, fettarm	Fa. Frema
Tween [®] 20	Fa. Roth
Xylencyanol FF	Fa. Merck

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
<i>Anti-Mouse-Antikörper-POD-Konjugat</i>	Fa. Sigma
<i>Anti-Rabbit-Antikörper-POD-Konjugat</i>	Fa. Sigma
CyDye [™] DIGE Fluor Cy2	Fa. Amersham
CyDye [™] DIGE Fluor Cy3	Fa. Amersham
CyDye [™] DIGE Fluor Cy5	Fa. Amersham
<i>DeStreak Rehydration Solution</i>	Fa. Amersham
Ethanol, ≥ 99,8%, DAB, reinst	Fa. Roth
Film-Entwickler Roentogen [®] liquid	Fa. Tetenal
Film-Fixierer Roentogen Superfix [®]	Fa. Tetenal
Filterpapier 3MM	Fa. Whatmann
<i>Immobiline DryStrip</i> pH 3-10 NL, 18 cm	Fa. Amersham
IPG-Puffer pH 3-10	Fa. Amersham
Microtiterplatten	Fa. Greiner
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Fa. Qiagen
Nitrozellulose-Membran AABP04700	Fa. Millipore
Nitrozellulose-Membran Protran BA 85	Fa. Schleicher & Schuell
Pipettenspitzen, steril	Fa. Eppendorf
Pipettenspitzen, unsteril	Fa. Greiner
Polaroidfilme Typ 667	Fa. Polaroid
<i>Precision Plus Protein[™] Standards</i>	Fa. BioRad
<i>Prestained Protein Marker, Broad Range</i>	Fa. New England BioLabs
Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Fa. Greiner
Reaktionsgefäße (15 mL, 50 mL)	Fa. Greiner
Röntgenfilme X-Omat AR [™]	Fa. Kodak
Rotiphorese [®] Gel 30 30/0,8	Fa. Roth

2.1.3 Kits

Kit	Hersteller/Lieferant
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Fa. Pierce
<i>BigDye™ Cycle Sequencing Kit</i>	Fa. PE Applied Biosystems
<i>ECL™-Kit</i>	Fa. Amersham
<i>pGEM®-T Vector System</i>	Fa. Promega
<i>QIAquick® Gel Extraction Kit</i>	Fa. Qiagen
<i>TripleMaster® PCR System</i>	Fa. Eppendorf

2.1.4 Enzyme

Enzyme	Hersteller/Lieferant
<i>Benzonase™</i>	Fa. Sigma
<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)</i>	Fa. New England BioLabs
<i>DNase I (E. coli)</i>	Fa. Roche Diagnostics GmbH
<i>E. coli DNA-Ligase</i>	Fa. New England BioLabs
<i>Restriktionsendonukleasen</i>	Fa. New England BioLabs
<i>RNase A</i>	Fa. New England BioLabs
<i>T4-DNA-Ligase</i>	Fa. New England BioLabs
<i>T4-Polynukleotidkinase</i>	Fa. New England BioLabs
<i>Trypsin Bovine (Sequencing Grade)</i>	Fa. Roche Diagnostics GmbH

2.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller/Lieferant
<i>Brutschrank</i>	Fa. Heraeus
<i>ColdLab</i>	Fa. Revco Scientific
<i>DNA Sequencer AbiPrism™ 310</i>	Fa. Perkin Elmer
<i>Durchlichtscanner ScanMaker i900</i>	Fa. Microtek
<i>Electrophoresis Power Supply EPS 601</i>	Fa. Amersham
<i>Elektroblotting Apparatur</i>	Fa. Froebel
<i>ELISA-Reader MR 5000</i>	Fa. Dynatech
<i>Ettan DALTsix Electrophoresis System</i>	Fa. Amersham
<i>Ettan IPGphor Manifold</i>	Fa. Amersham
<i>Ettan SpotPicker</i>	Fa. Amersham
<i>French® Pressure Cell Press FA-078</i>	Fa. SLM Aminco
<i>Gefrierschrank (-80 °C) Bio Freezer</i>	Fa. Forma Scientific
<i>Gefrierschrank öko super</i>	Fa. Liebherr
<i>Geltrockner</i>	Fa. Fröbel
<i>Gene Pulser</i>	Fa. BioRad
<i>Heizrührer RCT basic</i>	Fa. IKA Labortechnik
<i>Immoblone DryStrip Reswelling Tray</i>	Fa. Amersham

Gerät	Hersteller/Lieferant
<i>IPGphor</i>	Fa. Pharmacia
Kühlaggregat LKB Multitemp II	Fa. Pharmacia
Kühlschrank Super-520	Fa. Kirsch
Lyophilisator ALPHA 1-2	Fa. Christ
Magnetrührer MR-mini	Fa. Heidolph
Massenspektrometer Ultraflex TOF/TOF	Fa. Bruker Daltonics
Milli-Q Plus 185	Fa. Millipore
Model 395 <i>Gradient Former</i>	Fa. BioRad
pH Meter pH Level 1	Fa. InLab
Picofuge	Fa. Stratagene
Pipettier-Roboter Microlab [®] Star	Fa. Hamilton
<i>Powersupplies</i> E455, E734	Fa. Consort
<i>Protean[™] II Multi-Gel Casting-Chamber</i>	Fa. BioRad
<i>Protean[™] II Xi cells</i>	Fa. BioRad
Pumpe P-1	Fa. Amersham
Rotationsschüttler HT	Fa. Infors
Schlauchpumpe Cycl I	Fa. Roth
Schüttelgerät Duomax 1030	Fa. Heidolph
Schüttler 1083	Fa. GFL
Tischzentrifuge 5415 C	Fa. Eppendorf
<i>Typhoon 9400 Variable Mode Imager</i>	Fa. Amersham
Ultraschallbad Sonorex Super RK 100 SM	Fa. Bandelin
UV-Schirm	Fa. Fröbel
Vortexer REAX 2000	Fa. Heidolph
Vortexer VF2	Fa. Janke und Kunkel
Waage AB 204	Fa. Mettler Toledo
Waage LC 4200 S	Fa. Sartorius
Waage PB 602	Fa. Mettler Toledo
Wasserbad	Fa. Julabo
Ultraschallgerät Sonoplus HD 70	Fa. Bandelin
Ultraschall-Sonde UW 70	Fa. Bandelin
Zentrifuge J2-HS	Fa. Beckman

2.1.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	
Auftragspuffer, nativ	Sucrose	50 % (m/v)
	EDTA (pH8)	100 mM
	Bromphenolblau	0,1 % (m/v)
	Xylencyanol FF	0,1 % (v/v)
LowTE (pH 8,0)	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM

Material und Methoden

Phenol, verflüssigt	Phenol	1 kg
	H ₂ O	250 mL
Phenol, gesättigt	Phenol, verfl.	100 mL
	LowTE	3 mL
Phosphat-Puffer 50 x (pH 7,0)	KH ₂ PO ₄	735 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	100 mM

2.1.7 Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
HL5-Medium	Bacto-Pepton 14,30 g Hefe Extrakt 7,15 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,64 g KH ₂ PO ₄ 0,49 g H ₂ O ad 1 L Autoklavieren Zugabe von Glukoselösung 40% (m/v) 25 ml
YT-Medium	Bacto-Pepton 10 g Hefe Extrakt 5 g NaCl 5 g H ₂ O ad 1 L Autoklavieren
YT-Amp	YT-Medium mit 60 µg/mL Ampicillin
YT-Agar	Agar 12 g YT-Medium ad 1 L Autoklavieren und ausgießen

2.1.8 Mikroorganismen

2.1.8.1 *Escherichia coli*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>rb mb</i> ⁻), <i>gal</i> λ(DE3) [STUDIER <i>et al.</i> , 1990]
DH5α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , (φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> [HANAHAH 1983]
W3110	F ⁻ IN (<i>rrnD-rrnE</i>)1 λ <i>mba</i> ⁻ ; (ATCC 27325)

2.1.8.2 *Dictyostelium discoideum*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp
AX2	Axenisch wachsende Mutante [SUSSMAN & SUSSMAN 1967; LOOMIS 1982] des Wildtyps NC4 [RAPER 1935]. Plasmide werden ins Genom integriert.
JH.D2	Mutante des Stamms AX2, die ein <i>amber</i> Stop-Codon im <i>cbfA</i> -Gen trägt. Durch partielle Supression werden nur ca. 5% des Proteins CbfA exprimiert [WINCKLER <i>et al.</i> , 2001].

2.1.9 Vektoren und Plasmide

Vektor/Plasmid (Laborinterne Nr.)	Beschreibung
pGEM [®] -T	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor, Amp ^R , f1ori, <i>lacZ</i> , MCS T7-Promotor, SP6-Promotor (Fa. Promega)
pGEX-5T (1.1587)	Bakterieller, IPTG-induzierbarer Expressionsvektor. Ermöglicht die Herstellung N-terminaler 6xHis-GST-markierter Fusions-Proteine [BERTHOLD <i>et al.</i> , 1992]
pGEM-pkaC	PCR-Fragment mit Primern pkaC-08 und pkaC-09 (Kinase-Domäne von PkaC) von Plasmid p332 in pGEM [®] -T kloniert
pGEX-PkaC (1.1923)	Expression von PkaC ³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ , <i>EcoRI</i> -Fragment aus pGEM-pkaC in <i>EcoRI</i> von pGEX-5T kloniert
Plasmid p332 (1.1516)	pDNeoll-Derivat [WITKE <i>et al.</i> , 1987], enthält die cDNA der PKA, Aktin-6-Promotor [DAMMANN <i>et al.</i> , 1998]

2.1.10 Synthetische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
pkaC-08	GGA ATT CTC CTG TTC TTG GTA CTG GAA CAT TTG G
pkaC-09	GGA ATT CCT ATA CCT TTA AAG CAC CCA ATC TAC GAG TTC

2.1.11 Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
<i>DeCyder</i> TM 5.02	Fa. Amersham
<i>flexAnalysis</i> 2.2	Fa. Bruker Daltonics
<i>ImageQuant</i> 5.2	Fa. Molecular Dynamics
<i>SilverFast Ai</i> 6.2.1r5	Fa. Laser Soft Imaging AG

2.1.12 Verwendete Datenbanken

Bezeichnung	Anbieter
dictybase (www.dictybase.org)	Northwestern University Medical School Chicago (IL)/USA
Mascot (www.matrixscience.com)	Matrix Science Inc., Boston (MA)/USA
NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)	National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD)/USA
Swiss-Prot (www.expasy.org)	Department de Biochemie Medicale Centre Medical Universitaire, Genf/Schweiz

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Standardmethoden

Allgemein gebräuchliche Methoden wurden, soweit nicht im einzelnen erwähnt, nach Maniatis [SAMBROOK *et al.*, 1989] durchgeführt und werden nicht ausführlicher vorgestellt.

2.2.2 DNA-Sequenzanalysen

Die DNA-Sequenzierungen werden mit dem ABI Prism[®] *BigDye*TM Terminator *Cycle Sequencing ready Kit* entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion erfolgt nach der Kettenterminationsmethode und ermöglicht somit eine auf unterschiedlichen Fluoreszenz-Signalen basierende Sequenzierung der DNA.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinexpression in Bakterien

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgt mit Hilfe des Expressionsplasmids pGEX-5T [BERTHOLD *et al.*, 1992] und des *E. coli* Expressionsstammes W3110. Die Transkription des Zielgens steht unter der Kontrolle eines *tac*-Promotors und eines *lacI*-Gens zur Expression eines Repressorproteins des *tac*-Promotors. Im Grundzustand ist durch die Blockade des *tac*-Promotors keine Proteinexpression möglich. Die Zugabe von IPTG zum Medium führt zur Induktion der Proteinsynthese, da IPTG an das *lacI* Repressorprotein bindet und dieses somit die Affinität zum *tac*-Promotor verliert. Die RNA-Polymerase kann nun ungehindert an den *tac*-Promotor binden und das Zielgen transkribieren.

Des Weiteren besitzt das pGEX-5T Expressionsplasmid am 5'-Ende der MCS die Sequenz für einen His₆-Tag und das Gen für eine Glutathion-S-Transferase zur Expression N-terminaler His₆-Tag GST-Fusionsproteine. Die Aufreinigung des exprimierten Proteins kann somit durch die Bindung des His₆-Tags an eine Ni²⁺-NTA-Säule oder durch die Bindung des GST an eine Glutathion-Säule und anschließender Elution erfolgen. Der Einsatz entsprechender Antikörper gegen den His₆-Tag bzw. GST-Anteil ermöglicht die Detektion des Proteins im Western-Blot. Zur Selektion transformierter Bakterien dient ein β -Lactamase Gen, welches den transformierten Bakterien das Wachstum auf Ampicillin-Platten ermöglicht.

2.3.1.1 Proteinexpression im analytischen Maßstab

Die Proteinexpression im analytischen Maßstab dient zur Überprüfung der Expression und Löslichkeit des exprimierten Proteins. Dazu wird das Expressionsplasmid pGEX-pkaC zunächst in den Expressionsstamm W3110 transformiert. Mit einem Klon der transformierten Bakterien werden 2 mL einer YT-Amp-Vorkultur angeimpft und über Nacht mit 180 μ M bei 37 °C geschüttelt. Am folgenden Tag werden mit 400 μ L dieser Vorkultur 20 mL einer YT-Amp-Schüttelkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 mit 180 μ M bei 37 °C geschüttelt. Durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM wird die Expression induziert. Die Bakterien werden für weitere 2 Stunden bei 37 °C geschüttelt, bevor sie für 10 Minuten mit 5000 μ M (JA-20 Rotor) bei 4 °C zentrifugiert werden. Das Pellet wird in 2 mL Low-TE

resuspendiert und die Bakterien mit 4 x 15 Ultraschall-Pulsen (Geräteeinstellungen: *Cycle*: 70%, *Power*: MS 72/D) lysiert. Nach der Entnahme eines Aliquots zur späteren gelelektrophoretischen Analyse des Gesamtextrakts wird das Bakterienlysat erneut für 10 Minuten bei 15800 x g und 4 °C zentrifugiert. Zur Untersuchung von löslichen Proteinen wird ein Aliquot des Überstands entnommen. Das entstandene Pellet mit den eventuell vorhandenen unlöslichen Proteinen wird abermals in 2 mL Low-TE resuspendiert und ein Aliquot zur anschließenden Untersuchung abgenommen. Die entnommenen Proben werden mit dem äquivalenten Volumen an 2x Proteinauftragspuffer versetzt, gevortext und im Anschluß bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Die Überprüfung der exprimierten Proteine erfolgt mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung.

2.3.1.2 Proteinexpression im präparativen Maßstab

Resuspensionspuffer	Tris (pH 8,0)	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
	β-ME	10 mM
Waschpuffer	Tris (pH 8,0)	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
	β-ME	10 mM
	Triton X 100	1 % (v/v)
Lösungspuffer	Tris (pH 8,0)	10 mM
	NaH ₂ PO ₄	100 mM
	Guanidin HCl	6 M

Zunächst werden 100 mL einer YT-Amp-Vorkultur mit einem Klon transformierter W3110-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 180 UpM geschüttelt. Am folgenden Tag werden 5 x 1000 mL YT-Amp-Schüttelkultur mit jeweils 20 mL der Vorkultur angeimpft (Verdünnung 1:50) und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,4 bei 37 °C mit 180 UpM geschüttelt. Durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM wird die Expression der Proteine induziert. Die Bakterien werden für weitere 2 Stunden bei 37 °C geschüttelt, bevor sie für 20 Minuten mit 3800 UpM (JS-4.2 Rotor) bei 4 °C zentrifugiert werden. Die Pellets werden in ca. 200 mL Resuspensionspuffer aufgelöst und anschließend erneut für

20 Minuten mit 5000 UpM (JA-14 Rotor) bei 4 °C zentrifugiert. Nach Aufnahme in ca. 100 mL Resuspensionspuffer werden die Bakterien mit Hilfe einer *French Press* bei ca. 80 bar lysiert und das Lysat für 15 Minuten mit 5000 UpM bei 4 °C zentrifugiert. Lösliche Proteine können direkt aus dem Überstand des Lysats aufgearbeitet werden. Die im Pellet des Lysats enthaltenen *Inclusion Bodies* werden durch Zugabe von 50 mL eiskaltem Wasch-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten mit 10000 Upm bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wird zweimal wiederholt, wobei vor dem letzten Zentrifugationsschritt der Ansatz auf 5 Gefäße zu jeweils 10 mL aufgeteilt wird (JA-20 Rotor). Vier der Pellets werden bis zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Das verbleibende Pellet wird in 20 mL Lösungspuffer aufgenommen und über Nacht bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird die Suspension für 10 Minuten mit 8000 UpM (JA-20 Rotor) bei RT zentrifugiert. Der Überstand enthält das nun gelöste, denaturierte Protein.

2.3.2 Reinigung rekombinant exprimierter Proteine

2.3.2.1 Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Säule

Waschpuffer A (pH 8,0)	NaH ₂ PO ₄	100 mM
	Tris	10 mM
	Guanidin HCl	6 M

Waschpuffer B (pH 8,0)	NaH ₂ PO ₄	100 mM
	Tris	10 mM
	Harnstoff	8 M

Elutionspuffer C, D, E Waschpuffer B mit pH 6,3 (C), pH 5,9 (D), pH 4,5 (E)

Rekombinante Proteine, die durch die Verwendung des Plasmids pGEX-5T exprimiert werden, besitzen einen N-terminalen His₆-Tag. Diese Proteine können durch den Einsatz einer Ni²⁺-NTA-Säule aus dem Bakterien-Lysat isoliert werden [HOCHULI 1990; GU *et al.*, 1994]. Die bei der Aufreinigung durchgeführten Arbeitsschritte erfolgen mit einer durchschnittlichen Flußrate von ca. 0,5 mL / min.

Für die Aufreinigung werden ca. 7-8 mL einer Ni²⁺-NTA-Agarose Suspension in eine Chromatographiesäule gegeben und mit 3 Säulenvolumen Waschpuffer B äquilibriert. Nach zweistündiger Inkubation der Ni²⁺-NTA-Agarose mit der Proteinlösung in einem 50 mL Reaktionsgefäß wird die Gesamtsuspension erneut in die Chromatographiesäule eingefüllt und abermals mit 3-4 Säulenvolumen Waschpuffer B versetzt. Durch das Spülen mit je 2 Säulenvolumen Elutionspuffer C und D werden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Spezifisch gebundene His₆-Tag Proteine werden durch Zugabe von 3 Säulenvolumen Elutionspuffer E von der Säule eluiert und der Proteingehalt mit Hilfe der Bradford Methode überprüft. Ist eine Verwendung des Proteins zur Immunisierung von Mäusen beabsichtigt, wird das Eluat über Nacht bei 4 °C gegen 5 mM Tris dialysiert und anschließend lyophilisiert.

2.3.2.2 Elektroelution

Elutionspuffer	Tris (pH 7,4)	200 mM
	DTT	100 mM
	SDS	0,1 % (m/v)
	pH mit Essigsäure einstellen	
Laufpuffer	Tris (pH 7,4)	50 mM
	DTT	1 mM
	SDS	0,1 % (m/v)
	pH mit Essigsäure einstellen	

Rekombinant hergestellte Proteine lassen sich durch elektrophoretische Auftrennung und anschließende Elektroelution aus Bakterien-Lysaten isolieren. Bei löslichen Proteinen wird der Überstand des Bakterienlysates, bei unlöslichen Proteinen der gewaschene und mit Harnstoff in Lösung gebrachte Rückstand des Bakterienlysates mit Hilfe der SDS-PAGE Methode aufgetrennt. Anschließend wird das Gel mit 4 M Natriumacetat-Lösung gefärbt. Die entsprechende Proteinbande wird ausgeschnitten und mit ca. 15 mL Elutionspuffer in einen Dialyseschlauch gegeben. Der Dialyseschlauch wird in eine mit Laufpuffer gefüllte Horizontal-Gelkammer gelegt und das Protein durch Anlegen eines Stroms von 100 mA über einen Zeitraum von 2 Stunden aus dem Gel eluiert. Ist eine Verwendung des Proteins zur Immunisierung von Mäusen beabsichtigt, wird das Eluat über Nacht bei 4 °C gegen 5 mM Tris dialysiert und anschließend lyophilisiert.

2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.3.3.1 Bradford-Assay

Die Proteinbestimmung nach Bradford [BRADFORD 1976] beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung an Proteine. In der vorliegenden Arbeit wird der Bradford-Assay zur semiquantitativen Bestimmung eluierter His₆-Tag Proteine von einer Ni²⁺-NTA-Säule verwendet. Dazu werden 2 µL des Eluats mit 100 µL Bradford-Reagenz (0,01% Coomassie Brilliant Blue G250 (m/v), 5% Ethanol (v/v), 10% Phosphorsäure (v/v), H₂O) gemischt. Eine Blaufärbung des braunen Bradford-Reagenz zeigt Fraktionen an, die das aufgereinigte Protein enthalten.

2.3.3.2 BCA-Assay

Der BCA-Assay beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Proteine im alkalischen Milieu (Biuret Reaktion) und der anschließenden kolorimetrischen Bestimmung der Kupfer-Kationen durch Chelatierung mit zwei Bicinchoninsäure-Molekülen [SMITH *et al.*, 1985]. Der wasserlösliche BCA-Kupfer Komplex besitzt ein Absorptionsmaximum von 562 nm. Zur kolorimetrischen Bestimmung können aufgrund des breiten Absorptionsspektrums des Komplexes jedoch auch Wellenlängen zwischen 540-590 nm verwendet werden.

Jeweils 25 µL einer entsprechenden Proteinverdünnung werden mit 200 µL frisch zubereitetem BCA-Reagenz in je eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wird die Mikrotiterplatte im ELISA-Reader bei 550 nm vermessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer mitgeführten Standard-Verdünnungsreihe berechnet.

2.3.4 Lyophilisation

Zur Lyophilisation der exprimierten Proteine wird die wässrige Proteinlösung mehrere Stunden bei -80 °C tiefgefroren. Anschließend wird die Probe für etwa 10 Minuten bei -20 °C gelagert und somit auf ca. -50 °C erwärmt, bevor sie in den auf ca. -50 °C vorgekühlten Lyophilisator gestellt und über Nacht bei -56 °C und 0,10 mbar

gefriergetrocknet wird. Die Lagerung der gefriergetrockneten Proteine erfolgt bei -20 °C.

2.3.5 SDS-PAGE

Trenngelpuffer 4x	Tris (pH 8,8) SDS	1,5 M 0,4 % (m/v)
Sammelgelpuffer 4x	Tris (pH 6,8) SDS	0,5 M 0,4 % (m/v)
Acrylamid 30/8	Acrylamid Bisacrylamid H ₂ O ad	30,0 % (m/v) 0,8 % (m/v) 1000 mL
APOD	Ammoniumperoxo- disulfat-Lösung	30,0 % (m/v)
Trenngel (10%)	Trenngelpuffer Acrylamid 30/8 H ₂ O TEMED APOD	7,0 mL 1,3 mL 6,1 mL 10 µL 100 µL
Sammelgel (4%)	Sammelgelpuffer 4X Acrylamid 30/8 H ₂ O TEMED APOD	2,5 mL 1,3 mL 6,1 mL 10 µL 30 µL
Proteinauftragspuffer 2x	Tris Glyzerin 86% SDS β-ME EDTA Bromphenol- blau (1%ige Lsg.)	125 mM 10 % (v/v) 2 % (m/v) 1 % (v/v) 1 mM 0,005 % (v/v)
SDS-Laufpuffer 10x	Tris Glycin SDS	0,25 M 2 M 1 % (m/v)

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße erfolgt durch den Einsatz der SDS-PAGE Methode nach Laemmli [LAEMMLI 1970] unter Verwendung von 10%igen PAA-Gelen. Zunächst werden die Zellpellets von *D. discoideum* nach Aufnahme in ca. 100 µL Low-TE gevortext. Sobald das Zellpellet vollständig gelöst ist, wird die Proteinsuspension mit demselben Volumen an Proteinauftragspuffer 2x versetzt und anschließend für 5 Minuten im Wasserbad auf ca. 95 °C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen werden die Proben in die Geltaschen eingebracht. Die Proteine werden ca. 2 - 3 Stunden bei einem konstanten Strom von 35 mA pro Gel aufgetrennt und im Anschluß durch Coomassie-Färbung oder Western-Blot detektiert.

2.3.6 Färbung von Protein-Gelen

2.3.6.1 Coomassie-Färbung

Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R250	0,8 g
	Isopropanol	100 mL
	Essigsäure	40 mL
	H ₂ O	260 mL
Entfärbe-Lösung	Essigsäure	10 % (v/v)
	Methanol	10 % (v/v)

Zur Detektion der Proteine werden die PAA-Gele im Anschluß an die Elektrophorese mit Coomassie-Färbelösung für etwa 30 - 60 Minuten unter leichtem Schwenken gefärbt. Nach mehrmaligem Wechsel der Entfärbe-Lösung werden die Proteine nach ca. 1 Stunde im Gel sichtbar.

2.3.6.2 Natriumacetat-Färbung

Durch die Verwendung einer Natriumacetatlösung können Proteine in einem Polyacrylamidgel reversibel gefärbt werden [HIGGINS & DAHMUS 1979]. Dazu wird das Gel zunächst mehrmals mit Wasser gewaschen und im Anschluss so lange unter leichtem Schwenken in 4 M Natriumacetat inkubiert bis die Proteine als weiße Banden sichtbar werden. Aus präparativen Gelen wird die entsprechende Bande ausgeschnitten und zur Entfernung des überschüssigen Natriumacetats mehrmals in

Elektroelutionspuffer gewaschen. Anschließend wird das Protein durch Elektroelution aus dem Gel isoliert.

2.3.7 Western-Blot

Anoden-Puffer I	Tris (pH 10,4) Methanol	300 mM 20 % (v/v)
Anoden-Puffer II	Tris (pH 10,4) Methanol	25 mM 20 % (v/v)
Kathoden-Puffer	Tris (pH 9,4) 6-Aminohexansäure Methanol	25 mM 40 mM 20 % (v/v)
TBS 10x	Tris (pH 7,5) NaCl	100 mM 1,5 M
TBS-T	TBS 10x Tween [®] 20 H ₂ O ad	100 mL 500 µL 1000 mL
BSA-Blockierlösung	Albumin Fraktion V NaN ₃ , 10% (m/v) TBS-T ad	3 g 500 µL 100 mL
Milch-Blockierlösung	Milchpulver TBS-T ad	5 g 100 mL
Ponceau-Färbelösung	Ponceau S TCA	0,1 % (m/v) 2,0 % (m/v)

Die durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden beim Western-Blot durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran[®] BA 85) nach der *Semidry*-Methode [KYHSE-ANDERSEN 1984] übertragen. Bei dem Aufbau des Western-Blots ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen im *Blotsandwich* verbleiben. Damit der Strom nur durch das Gel fließt, wird überschüssiger Puffer entfernt. Der Transfer erfolgt entsprechend der Größe des PAA-Gels bei maximal 0,8 mA/cm² für 60 - 90 Minuten. Zur Kontrolle des Transfers werden die auf die

Membran übertragenen Proteine reversibel mit Ponceau S gefärbt. Nach dem Entfärben der Membran durch leichtes Schwenken in Wasser werden unspezifische Bindungstellen über Nacht bei 4 °C in BSA-Lösung blockiert. Am nächsten Tag erfolgt die Inkubation mit dem entsprechend verdünnten ersten Antikörper für 60 Minuten bei RT unter leichtem Schwenken. Ungebundener erster Antikörper wird durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Nach dreimaliger Vorbehandlung der Membran in Milch-Blockierlösung für jeweils 5 Minuten erfolgt die Inkubation mit einem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Anti Maus-IgG Antikörper (Verdünnung 1:10000 in Milch-Blockierlösung) für eine Stunde unter leichtem Schwenken bei RT. Nach je dreimaligem Waschen mit Milch-Blockierlösung und TBS-T werden die Antikörper-markierten Proteine über eine Chemilumineszenz-Reaktion mittels ECL-Kit gemäß Herstellerangaben und Auflegen eines Röntgenfilms detektiert. Die Expositionszeit beträgt dabei ca. 5 Minuten bei in *E. coli* exprimierten Proteinen bzw. mindestens 2 h bei in *D. discoideum* exprimierten Proteinen.

2.3.8 Herstellung monoklonaler Antikörper

Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper ist es wichtig, aus der Vielzahl der Antikörper-produzierenden Hybridomzell-Klone den Klon zu isolieren, der Antikörper mit extrem hoher Spezifität sowie Affinität gegenüber dem Antigen produziert. Aus diesem Grund werden die Hybridomzell-Klone nach erfolgreicher Fusionierung einem ELISA-basierten *Screening* unterzogen [DOUILLARD & HOFFMAN 1983; BRENNAND *et al.*, 1986].

2.3.8.1 Immunisierung von Mäusen

Nachdem das gelöste Antigen (GST-PkaC aus pGEX-PkaC) mit Freund'schem Adjuvans versetzt ist, werden die Mäuse über einen Zeitraum von zwei Wochen mit 5 Dosen à ca. 100 µg Antigen immunisiert. Nach der dritten Applikation wird aus den Schwanzvenen der Mäuse eine geringe Menge Blut entnommen und der Antikörpertiter durch ein ELISA-*Screening* kontrolliert. Im Anschluss an die fünfte Immunisierung wird die Maus getötet und die Milz entnommen. Die Lymphozyten aus der Milz werden ausgespült, gewaschen und gezählt. Die aus der Milz gewonnenen Lymphozyten werden anschließend in einem Verhältnis von 1:5 mit NS1-Myelomzellen gemischt, bevor die Fusion zu Hybridomzellen durch die

Inkubation mit einer Polyethylenglykollösung induziert wird [DE STGROTH & SCHEIDEGGER 1980; LØVBORG 1982].

2.3.8.2 ELISA-Screening

Coating-Puffer 10x	NaHCO ₃ Na ₂ CO ₃ im Verhältnis 3 zu 1, einstellen auf pH 9,6	100 mM 100 mM
PBS 10x (pH 7,2)	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ KCl NaCl	80 mM 15 mM 25 mM 1,4 M
PBS-T	Tween [®] 20 PBS 1x	0,1 % (v/v)
Gelatine-Blockierlösung	Gelatine PBS 1x	0,25 % (m/v)
Zweiter Antikörper	Anti- <i>Mouse</i> -Ak- POD-Konjugat Gelatine-Blockierlösung	3 µL 30 mL

Das zur Immunisierung der Mäuse verwendete Protein GST-PkaC aus pGEX-PkaC wird in *Coating*-Puffer (Endkonzentration 2,5 µg/mL) aufgenommen. Danach werden je 200 µL der Lösung in die Vertiefungen einer 96iger Mikrotiterplatte pipettiert und das Protein durch Inkubation bei 8 °C üN an die Plastikböden adsorbiert. Am darauffolgenden Tag wird zunächst mit 200 µL PBS-T gewaschen, bevor durch Zugabe von 200 µL Gelatine-Blockierlösung für 60 Minuten verbleibende freie Bindungsstellen der Plastikböden blockiert werden. Durch Inkubation mit jeweils 200 µL Mediumüberstand der Hybridomazellen für 60 Minuten wird der erste Antikörper bei RT gebunden. Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit je 200 µL Gelatine-Blockierlösung erfolgt die Inkubation mit 200 µL des zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers (Verdünnung 1:10000) für 60 Minuten bei RT. Anschließend wird erneut dreimal mit PBS-T gewaschen, bevor je 200 µL des Detektionsreagenz ABTS in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert wird. Die Absorptionen werden nach 30 minütiger Inkubation mit Hilfe des ELISA-Readers

ermittelt. Die Klone der Hybridomazellen, deren Mediumüberstände die stärksten Signale aufzeigen, werden schließlich im Western Blot näher untersucht.

2.4 Arbeiten mit *D. discoideum*

2.4.1 Kulturbedingungen

2.4.1.1 *Dictyostelium discoideum*-Stamm AX2

Der axenische, untransformierte *D. discoideum*-Stamm AX2 wird bei 22 °C in Schüttelkultur bei einer Geschwindigkeit von 150 UpM in HL5-Medium kultiviert [ASHWORTH & WATTS 1970]. Unter diesen Bedingungen beträgt die Generationszeit 8 bis 10 Stunden. Beim Erreichen einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen / mL werden die Zellen geerntet, da ab einer Zelldichte von etwa 1×10^7 Zellen / mL die stationäre Phase erreicht wird. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgt mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

2.4.1.2 *Dictyostelium discoideum*-Stamm JH.D2

Die Kulturbedingungen des *D. discoideum*-Stamms JH.D2 entsprechen denen des Stamms AX2. Dem zur Kultivierung verwendeten HL5-Medium wird jedoch zusätzlich 5 µg / mL Blastocidin S hinzugefügt.

2.4.2 Entwicklungs-Phänotypen

Aus einer spätlogarithmischen Schüttelkultur der zu untersuchenden *D. discoideum*-Stämme wird ein 5×10^7 Zellen entsprechendes Volumen für 5 Minuten mit 1000 UpM (Zentrifuge Rotixa/P) bei RT zentrifugiert. Die Zellen werden anschließend in 30 mL 1x Phosphat-Puffer resuspendiert und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Nach Aufnahme in 2 mL 1x Phosphat-Puffer werden die Zellen auf eine auf Filterpapier liegende Nitrozellulose-Membran (AABP04700) pipettiert. Nach dem Entfernen überschüssiger Flüssigkeit von dem Filterpapier werden sie zunächst für 30 Minuten bei RT verwahrt. Im Anschluß erfolgt die Inkubation der Zellen bei 22 °C. Zur Dokumentation der unterschiedlichen Entwicklungsphänotypen der *D. discoideum*-Stämme werden die Nitrozellulose-Membranen zu geeigneten Zeitpunkten (z. B. alle 2 Stunden) fotografiert. Des weiteren werden von beiden

Stämmen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien Zellpellets mit definierter Zellzahl zur späteren Analyse mittels SDS-PAGE oder 2D-Gelelektrophorese hergestellt.

2.4.3 Herstellung von Zellpellets

Zur Untersuchung der *D. discoideum*-Stämme durch SDS-PAGE oder 2D-Gelelektrophorese werden Zellpellets mit definierter Zellzahl hergestellt. Dazu wird das Volumen einer 2×10^7 Zellen entsprechenden, logarithmisch wachsenden *D. discoideum* Schüttelkultur 5 Minuten bei 4 °C mit 1000 UpM (Zentrifuge Rotixa/P) zentrifugiert. Das entstehende Zellpellet wird in 30 mL kaltem Phosphat-Puffer pH 7 resuspendiert und erneut pelletiert. Die Zellen werden im Anschluß in 1 mL kaltem Phosphat-Puffer resuspendiert, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und dann für ca. 15 sec. bei 15800 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und nach kurzzeitigem Schockfrieren der Pellets in flüssigem Stickstoff erfolgt die Lagerung bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung.

2.5 2D-Gelelektrophorese

2.5.1 Rehydration-Loading

Bei dem sogenannten *Rehydration-Loading* quillt die Gelmatrix der verwendeten IPG-Streifen vor der Fokussierung in Gegenwart der zu untersuchenden Probe [RABILLOUD *et al.*, 1994; SANCHEZ *et al.*, 1997].

2.5.1.1 Probenvorbereitung

Ein Zellpellet (entsprechend ca. 2×10^7 Zellen) wird mit 1,5 µL des Proteaseinhibitors Leupeptin (20 mg/mL), 4 µL Benzonase und 500 µL Benzonasepuffer (5 mM Tris) versetzt. Nach kurzem Vortexen erfolgt die Inkubation über verschiedene Zeiträume (10, 20, 30 oder 40 Minuten) bei unterschiedlichen Temperaturen (4, 30 oder 37 °C). Anschließend wird die Suspension mit 500 µL Rehydrierungspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 0,4% DTT (m/v), 4% CHAPS (m/v), 0,5% Pharmalyte (v/v)) versetzt, gevortext, für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert und schließlich 5 Minuten

bei 15800 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Jeweils 400 µl werden für die Fokussierung verwendet.

2.5.1.2 Fokussierung

Zunächst werden 400 µL der Probe in die Vertiefung einer entsprechenden Keramikschale (*Strip Holder*) pipettiert. Der IPG-Streifen wird anschließend mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei auf die Probensuspension aufgelegt. Durch das Auftragen von dünnflüssigem Paraffin werden Probe und Streifen luftdicht verschlossen und somit vor dem Austrocknen bewahrt. Bei einer konstanten Temperatur von 20 °C und einem maximalen Strom von 50 µA pro IPG-Streifen wird die Isoelektrische Fokussierung der Proben bis zum Erreichen von 56000 Volt-Stunden unter folgenden Bedingungen mit dem IPGphor durchgeführt:

Schritt	Betriebsart	Spannung (V)	Zeit (h)
1	<i>Step and Hold</i>	30	1
2	Gradient	500	1
3	Gradient	1000	1
4	Gradient	2000	0,5
5	Gradient	4000	0,5
6	Gradient	8000	1
7	<i>Step and Hold</i>	8000	q. s.

Tab. 2.1: Protokoll der Fokussierung im Anschluß an das *Rehydration-Loading*

2.5.2 Cup-Loading

Im Gegensatz zum *Rehydration-Loading* wird der IPG-Streifen beim *Cup-Loading* in einem separaten Arbeitsschritt rehydriert. Im Anschluß daran werden die Proben mit Hilfe von Proben-Trögen (*Sample Cups*) auf der anodischen oder kathodischen Seite des IPG-Streifens aufgetragen.

2.5.2.1 Rehydrierung

Bevor die Probe auf einen IPG-Streifen aufgetragen werden kann, muss die Gelmatrix des Streifens zunächst aufquellen. Dazu werden pro Streifen 340 µL Rehydrierungspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS (w/v), 1,2% *DeStreak* (v/v), 0,5% Pharmalyte (v/v), Bromphenolblau) in die entsprechende

Vorrichtung (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*) pipettiert und die Streifen mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei auf den Rehydrierungspuffer aufgelegt. Um ein Austrocknen der Streifen zu verhindern, werden sie im Anschluß mit ca. 2 mL dünnflüssigem Paraffin überschichtet. Die Streifen quellen für ca. 20 Stunden üN bei RT [GÖRG *et al.*, 1988]. Nach Beendigung des Quellvorgangs werden die Streifen aus der Vorrichtung entnommen und mit der Gelseite nach oben auf einen angefeuchteten Streifen 3MM Papier gelegt. Mit einem zweiten, ebenfalls angefeuchteten Streifen 3MM Papier rollt man nun vorsichtig über die IPG-Streifen. Auf diese Weise wird eventuell noch vorhandener Rehydrierungspuffer entfernt, so daß es während der anschließenden Fokussierung nicht zum Auskristallisieren von Harnstoff kommen kann.

2.5.2.2 Probenvorbereitung

Die Zellpellets von *D. discoideum* werden mit einer entsprechenden Menge *DIGE-Labeling* Puffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS (w/v), 30 mM TRIS/HCl pH 8,5) versetzt und gevortext. Nach dem vollständigen Auflösen der Pellets wird die Proteinsuspension für 10 Minuten bei 4 °C mit 15800 x g zentrifugiert. Der lösliche Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser kann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden. Pro IPG-Streifen werden 150 µg Protein mit demselben Volumen an 2x Lyse-Puffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS (w/v), 2% Pharmalyte (v/v), 20 mM DTT) versetzt, kurz gevortext und anschließend in die *Sample Cups* eingefüllt.

2.5.2.3 Fokussierung

Die rehydrierten IPG-Streifen werden mit der Gelseite nach oben in die entsprechenden Kanäle auf das *Ettan IPGphor Manifold* aufgelegt und die *Sample Cups* auf der anodischen Seite der Streifen ca. 5 - 8 mm vom Ende der Gelmatrix entfernt auf diese aufgesetzt. Mit Ausnahme der *Sample Cups* wird das gesamte *Manifold* im Anschluß mit ca. 110 mL dünnflüssigem Paraffin geflutet. Auf die beiden Enden der IPG-Streifen werden jeweils mit 150 µL MQ-Wasser getränkte Watteplättchen aufgelegt. Die Elektroden werden auf die Watteplättchen aufgesetzt und am *Manifold* fixiert. Nachdem die Proben in die Probentröge eingefüllt sind, werden diese durch Zugabe von jeweils ca. 60 µL dünnflüssigem Paraffin vor dem

Austrocknen geschützt. Bei einer konstanten Temperatur von 20 °C und einem maximalen Strom von 50 µA pro IPG-Streifen wird die Isoelektrische Fokussierung bis zum Erreichen von ca. 35000 - 38000 Volt-Stunden unter folgenden Bedingungen mit dem IPGphor durchgeführt:

Schritt	Betriebsart	Spannung (V)	Zeit (h)	Volt-Stunden (kVh)
1	<i>Step and Hold</i>	150	3	0,45
2	<i>Step and Hold</i>	300	3	0,9
3	Gradient	1000	6	3,9
4	Gradient	8000	3	13,5
5	<i>Step and Hold</i>	8000	2 - 2,5	16 - 20

Tab. 2.2: Protokoll der Fokussierung im Anschluß an das *Cup-Loading*

Nach Abschluss der Fokussierung werden die Streifen vor der Durchführung der zweiten Dimension äquilibriert. Alternativ können sie bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

2.5.3 PAA-Gele für die 2D-Gelelektrophorese

Da es sich bei den untersuchten Proben um Gesamtzellextrakte von *D. discoideum* handelt und ein möglichst breites Spektrum an Proteinen mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese detektiert werden soll, werden für die elektrophoretische Auftrennung Gele mit einem relativ hohen Polyacrylamid-Gehalt verwendet.

2.5.3.1 Gradientengele

Die entsprechenden Glasscheiben werden, getrennt durch einen Platzhalter, zu Glaskassetten zusammengesetzt, stapelweise übereinander gelegt und anschließend durch das Verschließen des Deckels der verwendeten Gießkammer (*Protean™ II Multi-Gel Casting-Chamber*) in dieser fixiert. Nachdem die Gießkammer durch einen Einlaß an der unteren Seite über eine Pumpe mit dem Gradientenmischer verbunden ist, werden die beiden frisch zubereiteten Trenngel-Lösungen in den Gradientenmischer eingefüllt. Bei dem oben beschriebenen Aufbau ist darauf zu achten, daß die Trenngel-Lösung mit dem geringeren Polyacrylamidanteil in die vordere der beiden Kammern des Gradientenmischers gefüllt wird. Anschließend wird der Hahn zwischen beiden

Kammern geöffnet. Durch langsames Rühren mittels Magnetrührer in der vorderen Kammer und kontinuierlichem Pumpen der Trenngel-Lösungen in die Gießkammer bilden sich in den Glaskassetten die Gele mit dem entsprechenden Gradient aus den beiden Trenngelkomponenten aus. Sobald die Trenngel-Lösung eine zuvor festgelegte Höhe in der Gießkammer erreicht hat, wird die Pumpe gestoppt. Die Gele werden durch das Auftragen eines geringen Volumens Butanol (gesättigt mit H₂O) überschichtet, wodurch ein glatter und ebenmäßiger Abschluß der Gele entsteht. Die verwendeten Gradientengele haben einen Polyacrylamid-Anteil von 10% - 15% Polyacrylamid und können bis zur endgültigen Verwendung über einen Zeitraum von ein bis zwei Tagen im Kühlschrank gelagert werden.

Beispiel für einen typischen Ansatz zum Gießen von 8 Gradientengelen (10% - 15%, Platzhalter 1,5 mm) in der beschriebenen Gießkammer:

	PAA-Konzentration	
	10%	15%
Trenngelpuffer (pH 8,8)	38 mL	38 mL
Acrylamid 30/8	49,4 mL	74 mL
MQ-Wasser	64 mL	39,3 mL
TEMED	80 µL	80 µL
APOD (10%) (m/v)	600 µL	600 µL

Sollen die Gradientengele zusätzlich mit einem Sammelgel ausgestattet werden, wird dieses erst kurz vor der endgültigen Verwendung des Gels gegossen. Nachdem anhaftendes Wasser mit Hilfe eines Streifens 3MM Papier von der Oberfläche des Trenngels entfernt wurde, wird die entsprechende Menge Sammelgel mit einer Pipette auf das Trenngel aufgetragen. Einen glatten und ebenmäßigen Abschluss des Sammelgels, der zum korrekten Auflegen des IPG-Streifens zwingend erforderlich ist, wird auch hier durch das Auftragen eines geringen Volumens Butanol (gesättigt mit H₂O) erreicht.

Pro Gel werden die folgenden Mengen für das Sammelgel benötigt:

Sammelgelpuffer 4x (pH 6,8)	2,5 mL
Acrylamid 30/8	1,3 mL
MQ-Wasser	6,1 mL
TEMED	10 µL
APOD (10%) (m/v)	30 µL

2.5.3.2 Kontinuierliche Gele

Die einzelnen Glaskassetten werden wie oben beschrieben zusammengefügt, in der entsprechenden Gießkammer (z. B. *Ettan DALTsix Gel Caster*) fixiert und die frisch zubereitete Polyacrylamidlösung luftblasenfrei in die Kammer eingefüllt. Anschließend wird die Lösung entweder mit Butanol (gesättigt mit H₂O) oder mit 0,5%iger SDS-Lösung überschichtet, so daß ein ebenmäßiger Abschluß entsteht.

Gele, die anschließend zur Auftrennung fluoreszenzmarkierter Proteine dienen, werden durch die Verwendung spezieller Glasplatten mit einer minimalen Eigenfluoreszenz hergestellt. Die hinteren Platten dieser Glaskassetten müssen vor dem Gebrauch silanisiert werden (2 mL Ethanol \geq 99,8%, DAB, reinst; 50 μ L Essigsäure; 2,5 μ L *Bind-Silane*; 900 μ L MQ-Wasser). Dadurch wird ein Verrutschen der Gele verhindert. Weiterhin wird gewährleistet, daß die Gele beim Öffnen der Glaskassetten auf der hinteren Glasplatte verbleiben, von welcher sie mit Hilfe des *Spotpickers* ausgeschnitten werden. Im Gegenzug werden die vorderen Platten zur Unterstützung mit *Repeal-Silane* behandelt. Vor dem Gießen werden auf die innere Seite der hinteren Glasplatten jeweils zwei Referenzpunkte für den *Spotpicker* aufgeklebt.

Für einen typischen Ansatz zum Gießen von 6 PAA-Gelen (12,5%; Platzhalter 1,5 mm) in einer *Ettan DALTsix Gel Caster* Gießkammer werden benötigt:

Trenngelpuffer 4x (pH 8,8)	112 mL
Rotiphorese [®] Gel 30 30/0,8	188 mL
MQ-Wasser	148 mL
TEMED	62,5 μ L
APOD (20%) (m/v)	2230 μ L

2.5.4 Zweite Dimension / SDS-PAGE

2.5.4.1 Äquibrierung der IPG-Streifen

Äquibrierungspuffer (pH 8,8)	Harnstoff	6 M
	Tris	50 mM
	SDS	2 % (m/v)
	Glyzerin (99%)	30 % (m/v)
	Bromphenolblausg. (1%)	4 % (v/v)

Äquilibriumspuffer I	Äquilibriumspuffer 1,4-Dithiothreitol	65 mM
Äquilibriumspuffer II	Äquilibriumspuffer 2-Iodacetamid	135 mM
Agarose	Agarose 10x SDS-Laufpuffer MQ-Wasser ad	1 % (m/v) 10 % (m/v) 20 mL

Vor der Durchführung der zweiten Dimension werden die IPG-Streifen in zwei Schritten äquilibriert. Dazu werden sie jeweils für 15 Minuten in einer geeigneten Schale in je 5 mL Äquilibriumspuffer I reduziert und anschließend mit Äquilibriumspuffer II alkyliert. Nach kurzem Spülen in 1x SDS-Laufpuffer werden die IPG-Streifen mit der Folie nach unten auf die überstehende Glasplatte der Gelkassette aufgelegt. Nun wird der IPG-Streifen mit Hilfe eines dünnen Spatels zwischen den beiden Glasplatten auf den ebenen Abschluß des Polyacrylamidgels aufgedrückt. Abschließend werden sowohl das Polyacrylamidgel als auch der IPG-Streifen durch Einfüllen von flüssiger Agarose abgedichtet. Nachdem diese erstarrt ist, kann die zweite Dimension durchgeführt werden.

2.5.4.2 Laufbedingungen

Bei Verwendung des *Protean™ II Xi cells* Systems erfolgt die Elektrophorese der zweiten Dimension über einen Zeitraum von ca. 5 Stunden bei einer Kammertemperatur von 12 °C. Eingespannt in die entsprechenden Rahmen werden die Gele in die Elektrophoresekammer gestellt und an den Wasserkühlkreislauf angeschlossen. Nachdem die Kammer nach den Angaben des Herstellers mit Laufpuffer gefüllt ist, erfolgt die Elektrophorese zunächst für 60 Minuten mit einer Stromstärke von 25 mA pro Gel. Anschließend wird diese auf 50 mA pro Gel erhöht und die Elektrophorese so lange fortgesetzt, bis die Lauffront am unteren Ende gerade noch sichtbar ist.

Bei der Verwendung des *Ettan DALTsix Electrophoresis System* wird die Elektrophorese über einen Zeitraum von ca. 14-15 Stunden bei einer Kammertemperatur von 20 °C durchgeführt. Nachdem die Gele in die Elektrophoresekammer gestellt und diese nach den Angaben des Herstellers mit

Laufpuffer gefüllt und an den Kühlkreislauf angeschlossen ist, erfolgt die Auftrennung mit einer Stromstärke von 15 mA pro Gel. Sobald die Lauffront am unteren Ende gerade noch sichtbar ist, wird die Elektrophorese beendet.

2.5.5 Färbung von 2D-Gelen

Mit Ausnahme der Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Proteinen ist im Anschluß an die zweidimensionale Gelelektrophorese eine Visualisierung der aufgetrennten Proteine erforderlich. Direkt im Gel werden die Proteine ausgefällt und durch entsprechende Färbemethoden (z. B. Silberfärbung, Coomassiefärbung) sichtbar gemacht. Entscheidend ist, eine Methode mit geeigneter Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit zu wählen.

2.5.5.1 Coomassie-Färbung

Fixierlösung	Methanol	45 % (v/v)
	Essigsäure	1 % (v/v)
	H ₂ O	54 % (v/v)
Färbelösung	Ammoniumsulfat	17 % (w/v)
	Methanol	34 % (v/v)
	Essigsäure	0,5 % (v/v)
	Coomassie G 250	0,1 % (w/v)
	H ₂ O ad	1000 mL

Die 2D-Gele werden nach der elektrophoretischen Auftrennung zunächst bei RT für ca. 15-20 Stunden unter leichtem Schwenken in Fixierlösung inkubiert. Im Anschluß daran werden die Gele, ebenfalls unter ständigem Schwenken, für mindestens 24 Stunden gefärbt. Abschließend wird so lange in Wasser unter Schwenken entfärbt, bis die gefärbten *Proteinspots* deutlich vor dem Hintergrund sichtbar werden.

2.5.5.2 Silbernitrat-Färbung

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll [SHEVCHENKO *et al.*, 1996] zeichnet sich durch seine Kompatibilität zur Massenspektrometrie aus.

Material und Methoden

Fixierlösung:	Methanol	50 % (v/v)
	Essigsäure	5 % (v/v)
	MQ-Wasser	45 % (v/v)
Sensibilisierungslösung:	Natriumthiosulfat	0,02 % (w/v)
	MQ-Wasser ad	500 mL
Färbelösung	Silbernitrat	0,1 % (w/v)
	MQ-Wasser ad	500 mL
Entwickler	Natriumcarbonat	2 % (w/v)
	Formaldehyd (37%)	0,04 % (v/v)
	Sensibilisierungslösung	10 mL
	MQ-Wasser ad	500 mL
Stop-Lösung	Essigsäure	5 % (v/v)
	MQ-Wasser ad	500 mL

Arbeitsschritt	Verwendete Lösung	Dauer
Fixieren	Fixierlösung	üN
Waschen	MQ-Wasser	3 x 20 min
Sensibilisieren	Sensibilisierungslösung	1 - 2 min
Waschen	MQ-Wasser	2 x 1 min
Silber-Färbung	Färbelösung (4 °C)	30 min
Waschen	MQ-Wasser	2 x 45 sec
Entwickeln	Entwickler	2 x 5 - 10 min *
Abstoppen	Stop-Lösung	2 x 15 min
Aufbewahren	MQ-Wasser	bis zu mehreren Wochen **

Tab. 2.3: Färbeschema Silberfärbung nach Shevchenko

*) Der Entwickler wird zum ersten Mal gewechselt, wenn sich die Lösung gelb färbt.

**) Mit fortschreitender Zeit wird es jedoch zunehmend schwieriger die Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren.

2.5.5.3 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Vor der Isoelektrischen Fokussierung werden die Proben mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die *Cyanine dye* Farbstoffe (*CyTM2 minimal dye*, *CyTM3 minimal dye* und *CyTM5 minimal dye*) werden in wasserfreiem Dimethylformamid gelöst und in einem Verhältnis von 200 pmol *CyDye* pro 50 µg Protein zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis im Dunkeln wird die Reaktion durch Zugabe von 10 mM Lysin (1 µL pro 200 pmol Farbstoff) und Inkubation für weitere 10 Minuten auf Eis gestoppt. Nach Zugabe eines äquivalenten

Volumens 2x Lyse-Puffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS (m/v), 2% Pharmalyte (v/v), 20 mM DTT) kann die markierte Probe entweder bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert oder direkt im Anschluß fokussiert werden.

2.5.6 DIGE-Experimente

2.5.6.1 Versuchsaufbau und Durchführung

Zunächst wird der interne Standard hergestellt. Dazu werden von allen am Experiment beteiligten Proben, unabhängig ihrer Anzahl, äquivalente Volumen gemischt. Anschließend werden die Proteine mit den unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dabei gibt es die Möglichkeit, Wildtyp und Mutante jeweils immer mit demselben Farbstoff zu markieren. Die zweite Möglichkeit besteht darin, die Proben in verschiedenen Ansätzen mit beiden Farbstoffen zu koppeln (sog. *dye-flip*; siehe Tab. 2.4.). Der interne Standard wird ausschließlich mit Cy2 inkubiert.

Ansatz Nr.	Cy3	Cy5	Cy2
1.1	Wildtyp	Mutante	Interner Standard
1.2	Wildtyp	Mutante	Interner Standard
1.3	Wildtyp	Mutante	Interner Standard
1.4	Wildtyp	Mutante	Interner Standard
<hr/>			
2.1	Wildtyp	Mutante	Interner Standard
2.2	Wildtyp	Mutante	Interner Standard
2.3	Mutante	Wildtyp	Interner Standard
2.4	Mutante	Wildtyp	Interner Standard

Tab. 2.4: Versuchsaufbau der DIGE-Experimente

Ansatz 1.1-1.4: Wildtyp und Mutante werden jeweils mit demselben Farbstoff markiert; Ansatz 2.1-2.4: Wildtyp und Mutante werden jeweils zur einen Hälfte mit Cy3 und zur anderen Hälfte mit Cy5 markiert (*dye-flip*)

Sobald die Proben markiert sind, werden sie entsprechend der einzelnen Ansätze zusammen auf die einzelnen IPG-Streifen aufgetragen (*Cup-Loading*). Pro Streifen werden von jeder Probe (Wildtyp, Mutante und interner Standard) jeweils 50 µg verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der markierten Proteine erfolgt parallel und somit unter gleichen Bedingungen. Um eine gesicherte statistische Analyse durchführen zu können, sollte ein Experiment aus mindestens drei Ansätzen bestehen.

2.5.6.2 Scannen der Gele

Im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung werden die Glaskassetten mit den Gelen aus der Laufkammer entnommen und mit MQ-Wasser abgewaschen. Nach Säuberung und Trocknung der Glasplatten mit Ethanol ($\geq 99,8\%$, DAB, reinst) werden die einzelnen Gele jeweils durch die Glasplatten hindurch gescannt. Die drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (Tab. 2.5) werden dabei nacheinander angeregt.

Fluorophor	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Emissionsfilter [nm]	verwendeter Laser
Cy2	489	506	500 - 540	Blue2 (488)
Cy3	550	570	565 - 595	Green (532)
Cy5	649	670	655 - 685	Red (633)

Tab. 2.5: Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Angaben zu den Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und den Spezifikationen des *Fluoreszenzscanners*; entnommen aus [GADE *et al.*, 2003] und *Typhoon: Users's Guide v3.0 for Microsoft Windows* (Amersham Biosciences)

Für jedes verwendete Fluorophor wird ein separates Bild erstellt und als Datei auf dem Computer abgespeichert. Durch einen Vor-Scan mit einer Auflösung von 1000 μm pro Pixel werden die entsprechenden Scan-Parameter (z. B. *PMT-Voltage*) überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Danach wird der Haupt-Scan mit einer Auflösung von 100 μm pro Pixel durchgeführt. Anschließend werden die Gele in feuchte Tücher verpackt und bei 4 °C bis zum Ausschneiden der *Proteinspots* verwahrt.

2.5.6.3 Auswertung

Die Auswertung der Bild-Daten erfolgt mit Hilfe der *DeCyderTM-Software*. In einem ersten Schritt werden die drei Bild-Dateien eines Gels in das DIA-Modul (*Differential In-gel Analysis*) der *Software* geladen, prozessiert und quantifiziert. Nachdem die Anzahl der detektierten *Spots* und die Lage der Referenzpunkte für den *Spotpicker* von der *Software* ermittelt sind, werden die erhaltenen Rohdaten durch die Verwendung entsprechender Filter (*Slope* $\geq 1,1$; *Area* ≤ 100 ; *Peak Height* ≤ 100 ; *Volume* ≤ 10000) vorselektiert. Vermeintliche *Proteinspots*, wie z. B. Staubpartikel, werden somit von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Anschließend werden die generierten Daten in das BVA-Modul (*Biological Variation Analysis*) der *Software* geladen, mit dessen Hilfe die einzelnen quantifizierten 2D-Gele verglichen und

ausgewertet werden. Zunächst wird die Lage der *Proteinspots* zwischen den einzelnen Gelen abgeglichen (*Matching*). Die anschließende statistische Analyse erfolgt ausschließlich auf Grundlage des verwendeten internen Standards [MAROUGA *et al.*, 2005]. Dieser wird durch die *Software* zwischen den einzelnen Gelen eines Experiments normalisiert. Durch die Vorgabe bestimmter Kriterien (vorhanden in x/x Gelen; T-test Wert; *Average Ratio*) werden aus den analysierten Daten differentiell exprimierte Proteine ermittelt, die anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Die x- und y-Koordinaten dieser Proteine und der entsprechenden Referenzpunkte der jeweiligen Gelkassette werden in Form einer Datei (*Picklist*) abgespeichert und an den *Spotpicker* übertragen.

2.5.6.4 Ausschneiden der Proteine

Die differentiell exprimierten Proteine werden durch die Verwendung eines *Spotpickers* ausgeschnitten. Die vordere Glasplatte der Gelkassette wird entfernt und das auf der hinteren, silanisierten Glasplatte verbleibende Gel in dem *Spotpicker* fixiert. Nachdem dieser die aufgeklebten Referenzpunkte auf der Glasplatte über eine Video-Optik detektiert und sie in Bezug zu den Daten aus der *Picklist* gesetzt hat, kann das Gerät die Koordinaten der einzelnen Proteine vollautomatisch ansteuern. Durch den Einsatz eines Schneidewerkzeugs (1,4 mm bzw. 2,0 mm Innendurchmesser) werden die einzelnen *Spots* ausgestochen und in eine vorgelegte Mikrotiterplatte überführt.

2.6 Massenspektrometrie

2.6.1 Trypsin-Verdau

Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung	NH ₄ HCO ₃	100 mM
Waschlösung	Acetonitril	50 % (v/v)
	NH ₄ HCO ₃	25 mM
	MQ-Wasser ad	100 mL
Reduzierlösung	DTT	10 mM
	mit Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung auffüllen	

Material und Methoden

Alkylierlösung	Iodacetamid mit Ammoniumhydrogencarbonat- Lösung auffüllen	55 mM
Trypsinlösung	Trypsin-Stocklösung (2,5 µg in 1 mM HCl) Ammoniumhydrogen- carbonat-Lösung CaCl ₂ -Lösung (100 mM) MQ-Wasser	20 µL 200 µL 10 µL 170 µL
Verdaupuffer	Ammoniumhydrogen- carbonat-Lösung CaCl ₂ -Lösung (100 mM) MQ-Wasser	5 mL 250 µL 4,5 mL

Die extrahierten Proben aus den 2D-Gelen werden standardmäßig einem tryptischen In-Gel-Verdau unterzogen. Mit Hilfe eines Pipettier-Roboters können die Proteine direkt in einer Mikrotiterplatte unter Verwendung eines modifizierten Verdauprotokolls nach Shevchenko (Tab. 2.6) wie folgt über Nacht enzymatisch gespalten werden [SHEVCHENKO *et al.*, 1996]. Die benötigten Lösungen werden jeweils frisch angesetzt.

Schritt	Beschreibung	Volumen [µL]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zyklen
1	Waschen mit MQ Wasser	200	15	21	3
2	Waschen mit 50% ACN	200	15	21	3
3	Dehydrieren mit 100% ACN	180	10	21	2
4	Trocknen der Gelstücke	--	20	56	--
5.1	Reduzieren mit DTT	110	60	58	1
5.2	Dehydrieren mit 100% ACN	200	10	21	0
6	Alkylieren mit IAA	110	45	21	1
7	Waschen mit NH ₄ HCO ₃	200	5	21	4
8.1	Dehydrieren mit 100% ACN	200	5	21	2
8.2	Aufquellen mit NH ₄ HCO ₃	200	5	21	1
8.3	Dehydrieren mit 100% ACN	200	10	21	2
9	Trocknen der Gelstücke	--	25	56	--
10	Zugabe von Trypsin	18	45	4	1
11	Zugabe des Verdaupuffers	80	0,1	4	1
12	Abnahme des Trypsins	40	--	--	--
13	Verdau	--	720	38	1
14	Zugabe von TFA (0,3%)	20	--	21	1
15.1	Zugabe von 50% ACN, TFA (0,3%)	70	20	21	1
15.2	Zugabe von 100% ACN, TFA (0,3%)	70	20	21	2

Tab. 2.6: Protokoll des Trypsin-Verdau

Am folgenden Tag werden die Proteinextrakte in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Sie können bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

2.6.2 Spotten der Proben

Matrix-Lösung:	Acetonitril	700 µL
	Trifluoressigsäure	5 µL
	α -Cyanohydroxyzimtsäure	2 mg
	MQ-Wasser	295 µL

Trifluoressigsäure (1%,(v/v))	Acetonitril	700 µL
	Trifluoressigsäure	10 µL
	MQ-Wasser	290 µL

Die Proben werden nach dem tryptischen Verdau zusammen mit einer Matrix kokkristallisiert. Dazu werden jeweils 0,5 µL der Matrix und 0,5 µL der Probe (gelöst in 5 µL TFA, 1%, v/v) direkt auf den Probenhalter des Massenspektrometers pipettiert. Anschließend werden die Proben zur Reduktion der Salz-Kontamination gewaschen. Dazu werden jeweils 5 µL Ameisensäure (5%, kalt) auf die einzelnen Spots pipettiert und nach einer Einwirkzeit von etwa 2-3 Sekunden wieder abgenommen.

2.6.3 Auswertung

Die aufgenommenen MALDI-TOF-Spektren werden zunächst durch die *flexAnalysis-Software* (SNAP Algorithmus) vollautomatisch annotiert (*signal/noise ratio: 3, quality factor threshold: 80*). Unter Verwendung eines *Mascot-Servers* (Fa. Matrixscience) wird auf der Grundlage der resultierenden *Peaklist* in der NCBI-Datenbank recherchiert [PERKINS *et al.*, 1999]. Dabei wird standardmäßig eine Abweichung von max. 50 ppm toleriert. Als fixe Modifikation wird die Carbamidomethylierung von Cystein sowie als variable Modifikation die Oxidation von Methionin angegeben. Proteine, die einen *Score* von 77 oder größer erzielen, werden mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ als identifiziert erachtet. Wird die Recherche innerhalb der Datenbank auf die Taxonomie des Organismus *D. discoideum* beschränkt, werden Proteine mit einem *Score* von 54 oder größer als statistisch signifikant identifiziert erachtet.

3 Ergebnisse

Verglichen mit dem Wildtyp-Stamm AX2 wird das Protein CbfA in Zellen der *D. discoideum*-Mutante JH.D2 nur in einem stark verringerten Ausmaß exprimiert. CbfA ist ein potentieller Transkriptionsfaktor, der für die Einleitung der multizellulären Entwicklung in *D. discoideum* essentiell zu sein scheint. Der Phänotyp der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 unterscheidet sich besonders darin, daß die Zellen erst mit einer extremen Verzögerung (> 24 h) beginnen zu aggregieren. Dabei ist die Aggregation meist so ineffektiv, daß sich praktisch keine oder nur selten vor allem verkümmerte Fruchtkörper ausbilden (siehe Abb. 3.3). Northern-Blot Untersuchungen haben gezeigt, daß wichtige Gene der frühen Entwicklung in den JH.D2-Zellen nicht oder nur vermindert exprimiert werden (Abb. 3.1). Die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PkaC) wird zwar auf einem niedrigen Niveau transkribiert. Den Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 fehlt allerdings die cAMP-induzierte Expression während der Aggregation.

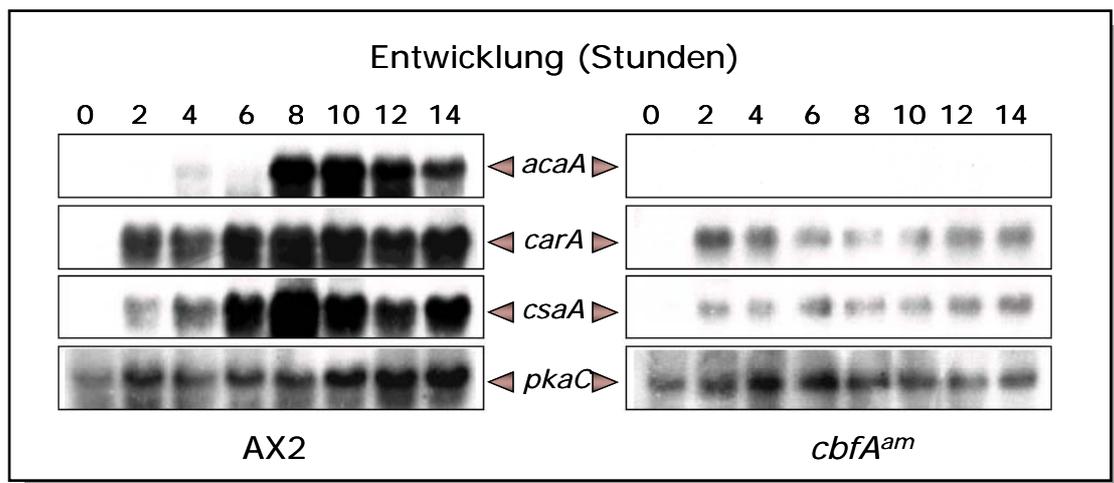


Abb. 3.1: Northern-Blot Analyse entwicklungsrelevanter Gene

Erläuterung: siehe Text; modifiziert übernommen aus [WINCKLER *et al.*, 2004]

Bei der Proteinkinase A (PKA) handelt es sich um eine sehr komplex regulierte Kinase, u. a. wird die Translation ihrer mRNA von verschiedenen Faktoren beeinflusst [SÖDERBOM & LOOMIS 1998; SOUZA *et al.*, 1998]. Die Analysen von Northern-Blots geben daher nur einen unvollständigen Einblick in die tatsächliche Expression des PKA-Proteins. Da die PKA sowohl für die frühe als auch für die spätere Entwicklung essentiell ist [LOOMIS 1998], wurde im ersten Teil der Arbeit untersucht, ob

D. discoideum-Zellen in Abwesenheit von CbfA normale PKA-Level exprimieren. Eine vergleichbare Expression von beispielsweise Aktin und Calreticulin konnte im Western-Blot sowohl im Wildtyp AX2 als auch in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 gezeigt werden (Abb. 3.2). Im Gegensatz dazu wurde CbfA wie erwartet in der Mutante nur zu einem geringen Anteil exprimiert. Entwicklungsregulierte Proteine wie z. B. CSA wurden dagegen nur beim Wildtyp im Entwicklungsstadium exprimiert.

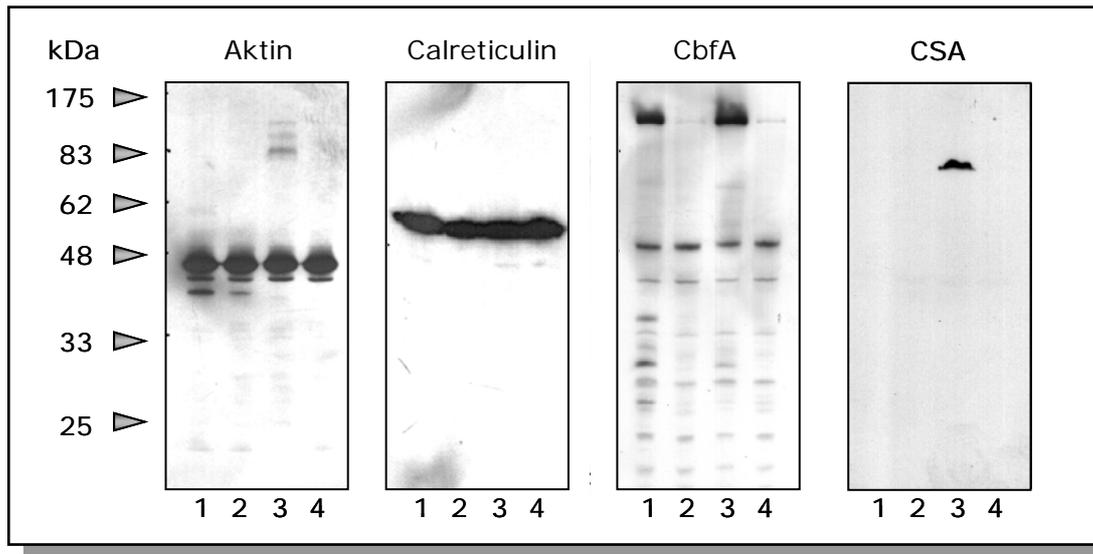


Abb. 3.2: Western-Blot Analysen ausgesuchter Proteine aus *D. discoideum*

Probe: *D. discoideum* Zelllysat, PAA-Gel: 10%, Detektion: gegen das jeweilige Protein gerichtete Antikörper; 1: wachsende AX2-Zellen, 2: wachsende JH.D2-Zellen, 3: AX2-Zellen 11 Stunden nach Beginn der Entwicklung, 4: JH.D2-Zellen 11 Stunden nach Beginn der Entwicklung

Für eine vergleichbare Analyse der PKA-Expression in Wildtyp und Mutante mußte während dieser Arbeit zunächst ein Antikörper gegen PkaC hergestellt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde dann erstmals systematisch mit Methoden moderner Proteomanalyse versucht, Proteine zu identifizieren, deren Expression während der Wachstumsphase und in der frühen Entwicklung direkt von CbfA abhängt. Aus diesem Grund wurden die untersuchten Proben auf einen engen Zeitraum von zwei Stunden während des Übergangs von der Wachstums- zur Entwicklungsphase begrenzt. Zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung könnte sonst die differentielle Expression von Proteinen durchaus andere Ursachen haben als ausschließlich einen Mangel an CbfA.

3.1 Analyse der PkaC-Expression in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2

Der Phänotyp der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2, das verlangsamte Wachstum, die verzögerte Einleitung der Aggregation und die Ausbildung verkümmelter Fruchtkörper, entspricht demselben Phänotyp, der bei der Untersuchung von *pkaC⁻*-Mutanten beobachtet werden kann [MANN & FIRTEL 1991; SÖDERBOM & LOOMIS 1998]. In JH.D2-Transformanden führt eine konstitutive Expression der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase C (PkaC) zu einer Revertierung des beschriebenen Phänotyps (Abb. 3.3). Dies kann als Hinweis genommen werden, daß PkaC in Abwesenheit von CbfA nicht ausreichend exprimiert wird und die Entwicklung dadurch behindert wird. Durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen die katalytische Untereinheit sollte im Western-Blot untersucht werden, ob und in welchem Umfang die PkaC in Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 exprimiert wird.

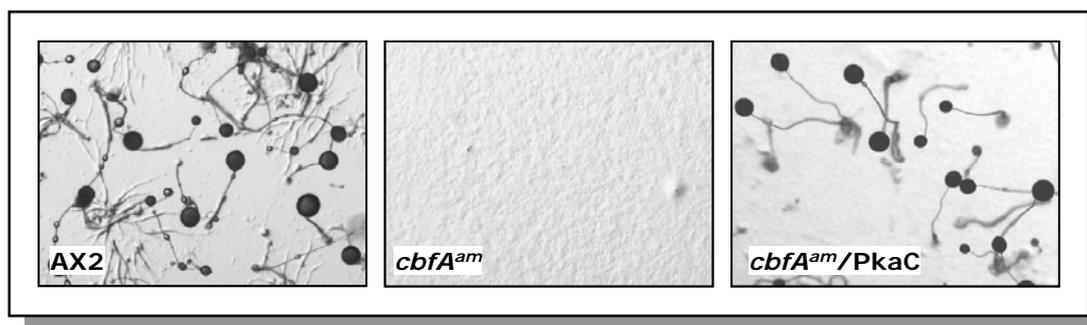


Abb. 3.3: Morphologie verschiedener *D. discoideum*-Stämme auf Agar-Phosphat-Platten

Die Abbildung zeigt verschiedene Entwicklungs-Phänotypen 25 Stunden nach Plattieren auf Phosphatagar sowohl vom Wildtyp-Stamm AX2 (links) als auch von der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 (mitte). Die konstitutive Expression der PkaC im Stamm JH.D2 führt zu einer Revertierung des beobachteten Phänotyps (rechts).

3.1.1 Herstellung eines monoklonalen PkaC-Antikörpers

Für die Herstellung des monoklonalen PkaC-Antikörpers wurde als epitope Erkennungssequenz ein Bereich innerhalb der Kinase-Domäne der ca. 75 kDa großen katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A ausgewählt.

3.1.1.1 Expression des Antigens

Die kodierende DNA-Sequenz der Aminosäuren 340 bis 578 aus der katalytischen Untereinheit von PkaC (PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸) wurde in den Expressionsvektor pGEX-5T kloniert und das erhaltene Plasmid pGEX-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ zur Expression des Antigens

PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ in den *E. coli*-Expressionsstamm W3110 transformiert. Im analytischen Maßstab wurde anschließend die korrekte Expression und die Löslichkeit des GST-gekoppelten Proteins (GST-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸) überprüft. Dabei zeigte sich, daß das exprimierte Protein etwa das errechnete Molekulargewicht von 58 kDa aufwies und ausschließlich in Form von unlöslichen *Inclusion bodies* in den Zellen vorlag (Abb. 3.4).

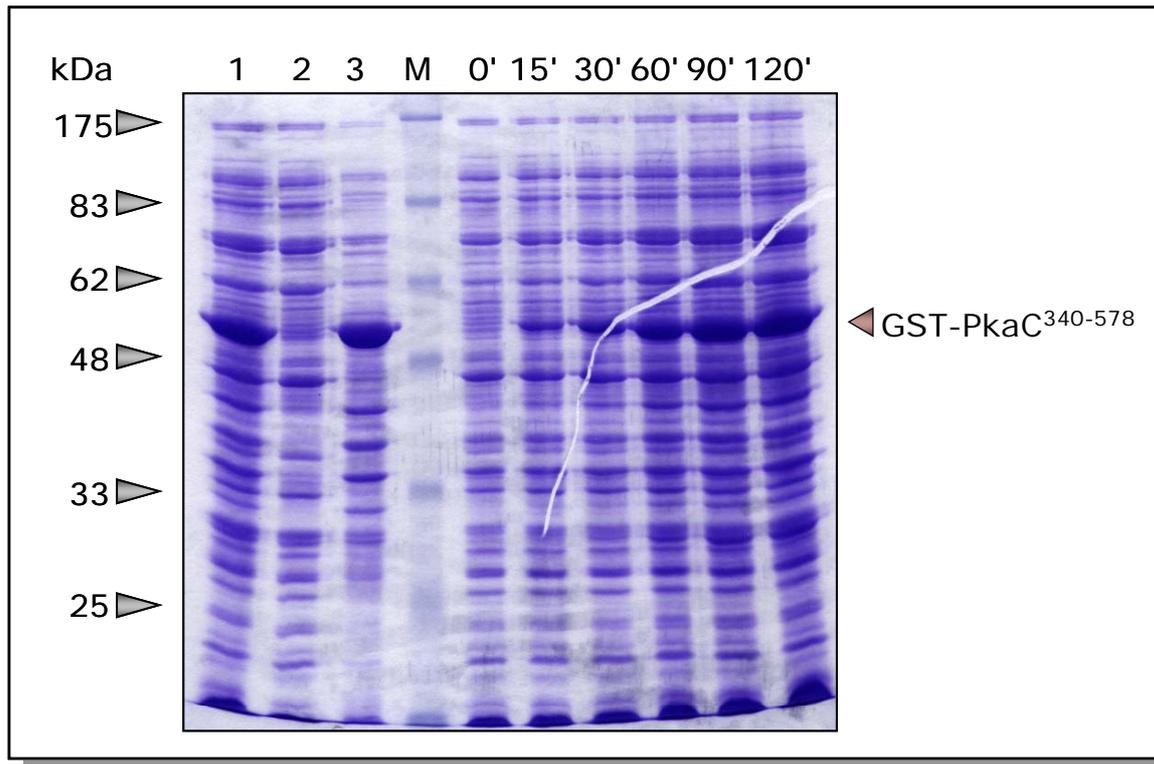


Abb. 3.4: Expression des Antigens GST-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ im *E. coli*-Expressionstamm W3110

Probe: Zelllysat von W3110[pGEX-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸], PAA-Gel: 10%, Färbung: Coomassie
Spur 1: Gesamtextrakt (induziert mit 1 mM IPTG), Spur 2: lösliche Proteine des Gesamtextrakts,
Spur 3: unlösliche Proteine des Gesamtextrakts, M: Marker, 0'-120': Expressionskinetik des
exprimierten Antigens GST-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ über einen Zeitraum von insgesamt 120 Minuten

3.1.1.2 Aufreinigung des Antigens

Im Anschluß an einen präparativen Ansatz zur Proteinexpression wurde ein Pellet mit den unlöslichen Zellbestandteilen über Nacht in 8 M Harnstoff gelöst und am folgenden Tag über eine Ni²⁺-NTA-Agarose Säule aufgereinigt. Mit Hilfe des Bradford-Assays wurde die Elution des Proteins PkaC kontrolliert, bevor die proteinhaltigen Eluatfraktionen vereinigt wurden. Durch die Aufreinigung konnte ein Großteil der unspezifischen Proteine entfernt werden. Es zeigte sich jedoch, daß diese

Aufreinigung allein nicht ausreichend war, um mit dem erhaltenen Protein-Eluat eine Immunisierung von Mäusen durchzuführen (Abb. 3.5).

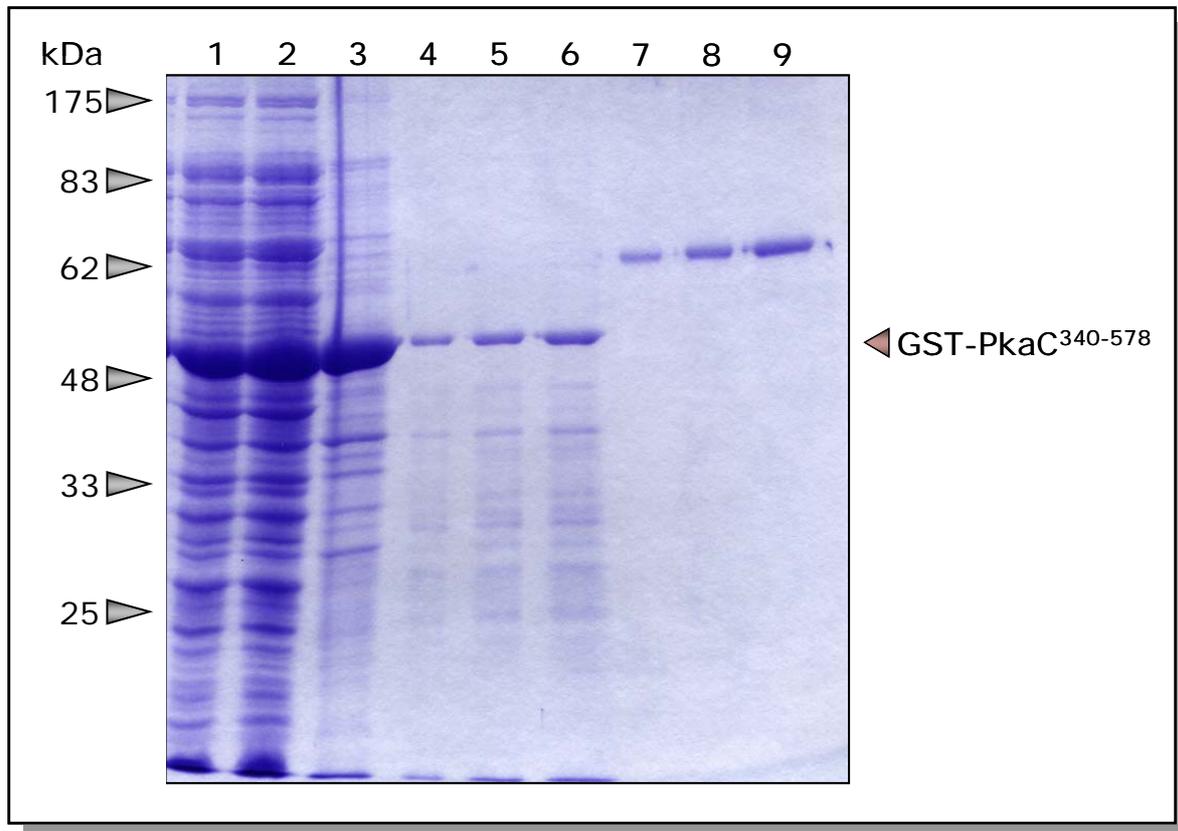


Abb. 3.5: Säulenchromatographische Aufreinigung des Antigens GST-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸

PAA-Gel: 10%, Färbung: Coomassie, Spuren 1 und 2: Gesamtextrakt, Spur 3: Versuch einer TCA-Aufreinigung des Gesamtextrakts (nicht näher beschrieben), Spuren 4-6: steigende Volumina an eluiertem GST-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ (Eluat Puffer E), Spuren 7-9: steigende Konzentration einer BSA-Verdünnung (0,5 µg, 1 µg und 2 µg, dient zum Abschätzen der eluierten Protein-Menge)

Zur Erhöhung der Reinheit des Antigens wurde im weiteren Verlauf eine Elektroelution durchgeführt. Hierzu wurden die vereinigten Eluat-Fractionen zunächst über Nacht bei 4 °C dialysiert und am nächsten Tag in Aliquots zu je 1000 µL lyophilisiert. Ein Aliquot des lyophilisierten Proteins wurde über Nacht in 8 M Harnstoff (300 µL) gelöst, mit dem entsprechenden Volumen Proteinauftragspuffer versetzt, aufgeköcht und in die Tasche eines 10%igen präparativen Polyacrylamid-Gels aufgetragen. Nach Beendigung der gelelektrophoretischen Trennung wurde das Gel über einen Zeitraum von ca. 60-80 Minuten in 4 M Natriumacetat Lösung gefärbt. Die Proteinbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und das Protein anschließend durch Elektroelution aus dem Gel herausgelöst. Die gewonnene Proteinsuspension wurde abermals über Nacht dialysiert und lyophilisiert. Bei einer anschließenden

Überprüfung des aufgereinigten Antigens stellte sich jedoch heraus, daß auch dieses nicht zur Immunisierung der Mäuse geeignet war, da es nach wie vor zu viele *E. coli* Proteine aufwies (Daten nicht gezeigt).

In einem zweiten Ansatz, ganz ohne säulenchromatographische Aufreinigung, wurde ein Proteinpellet in einem kleinen Volumen 6 M Guanidin (10 mL) gelöst und der Überstand über Nacht gegen 8 M Harnstoff dialysiert. Am folgenden Tag wurde eine geringe Menge der dialysierten Probe elektrophoretisch auf einem präparativen 10% igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde mit 4 M Natriumacetat Lösung gefärbt, das Protein durch Elektroelution aus der ausgeschnittenen Bande herausgelöst und das Eluat abschließend gefriergetrocknet. Die Überprüfung des gereinigten Proteins zeigte, daß das lyophilisierte Eluat nur noch geringe Mengen an *E. coli* Verunreinigungen enthielt und sich somit zur Immunisierung der Mäusen eignete (Abb. 3.6). Um den Proteingehalt des gereinigten Proteins abzuschätzen, wurden zusätzlich verschiedene BSA-Verdünnungen mit bekanntem Proteingehalt aufgetragen.

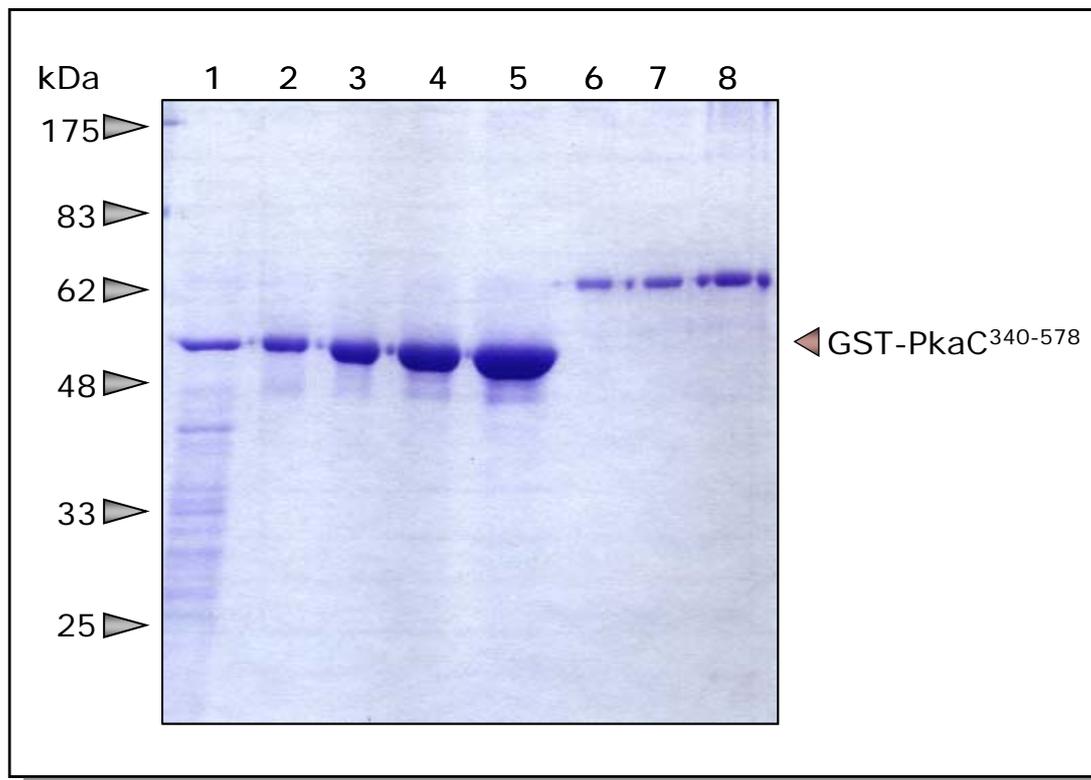


Abb. 3.6: Zur Immunisierung verwendetes Antigen GST-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ aus *Inclusion bodies*

PAA-Gel: 10%, Färbung: Coomassie, Spur 1: Eluat Puffer E der säulenchromatographischen Aufreinigung als Vergleich, Spuren 2-5: steigende Volumina des aufgereinigten Antigens (GST-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸) aus gelösten *Inclusion bodies*, Spuren 6-8: steigende Konzentration der BSA-Verdünnung (0,5 µg, 1 µg und 2 µg)

3.1.1.3 Auswahl eines PkaC-Antikörpers

Nachdem die aus der immunisierten Maus gewonnenen Lymphozyten erfolgreich mit den NS1-Myelomzellen fusioniert waren, wurden die Hybridomazellen einem ELISA-Screening unterzogen. Antikörper produzierende Klone wurden anschließend durch Western-Blot Analyse bezüglich der Affinität und der Spezifität der gebildeten Antikörper untersucht. Neben dem zur Immunisierung eingesetzten Antigen GST-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ aus dem Expressionsstamm W3110[pGEX-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸] wurde dazu auch das exprimierte Protein aus dem entsprechenden Leervektor (W3110[pGEX-5T]) verwendet. Falsch positive Hybridomazellen, die Antikörper gegen *E. coli* Proteine sezernierten, konnten somit schnell erkannt und verworfen werden. Dabei zeigte sich, daß die Mehrzahl der selektierten Klone die gewünschten Antikörper gegen das zur Immunisierung verwendete Antigen (GST-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸ aus pGEX-PkaC³⁴⁰⁻⁵⁷⁸) produzierten (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde eine Auswahl dieser Hybridomazellen im Western-Blot gegen *D. discoideum* Zelllysate des Stamms AX2 getestet (Abb. 3.7).

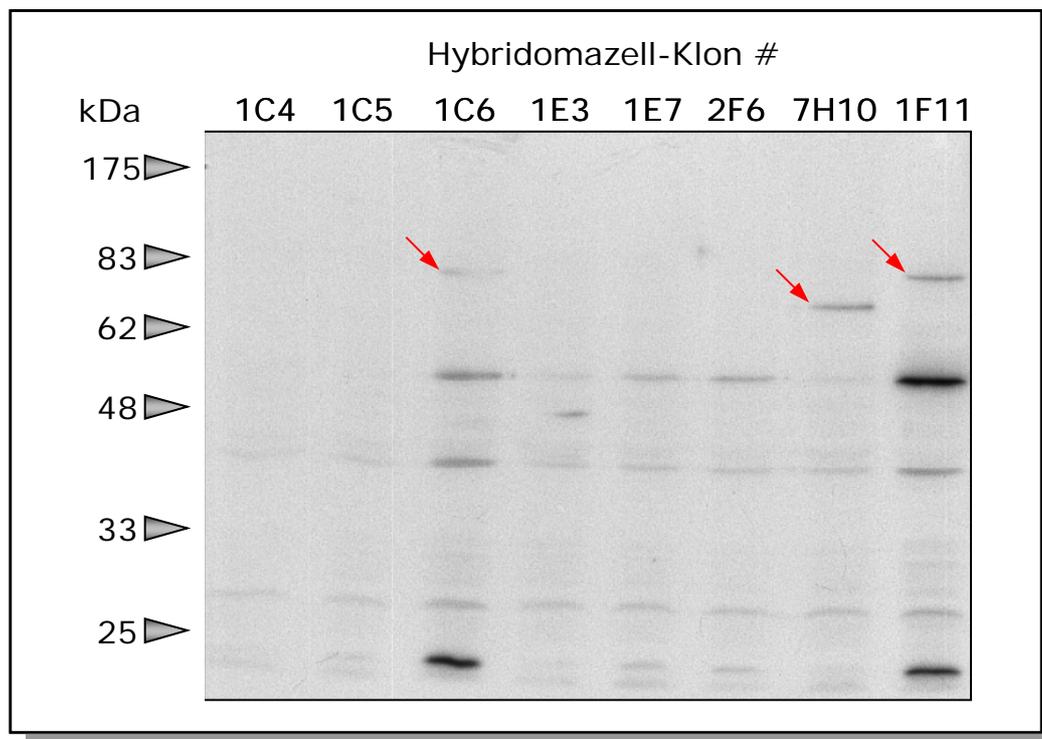


Abb. 3.7: Western-Blot Analyse zur Untersuchung von Antikörpern aus den Hybridomazell-Klonen der immunisierten Maus

Probe: *D. discoideum* Zelllysate, PAA-Gel: 10%, Detektion: Überstände der Hybridomazell-Klone; die Klone # 1C6, # 7H10 und # 1F11 detektieren jeweils ein Protein (Pfeil) auf Höhe des für die PkaC erwarteten Molekulargewichts von 75 kDa.

Neben diversen unspezifischen Banden, die in allen getesteten Überständen detektiert wurden, zeigten zwei der Klone (# 1C6 und # 1F11) eine Bande auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichts von 75 kDa. Ein weiterer Klon (# 7H10), der zudem weniger Kreuzreaktivität aufwies, zeigte ebenfalls in diesem Bereich ein einzelnes Signal.

Zur abschließenden Charakterisierung wurden diese drei Klone gegen *D. discoideum* Zelllysate der Stämme AX2, JH.D2 und einer *pkaC*⁻-Mutante getestet. Dabei zeigte sich, daß die beiden Hybridomklone # 1C6 und # 1F11 jeweils den gesuchten murinen monoklonalen Antikörper gegen die katalytische Untereinheit der Proteinkinase C (75 kDa) produzierten (Abb. 3.8), während der Hybridomklon # 7H10 ein Protein detektierte, daß auch in Lysaten der *pkaC*⁻-Mutante vorhanden war. Folgedessen konnte es sich bei diesem nicht um den gesuchten Hybridomklon handeln.

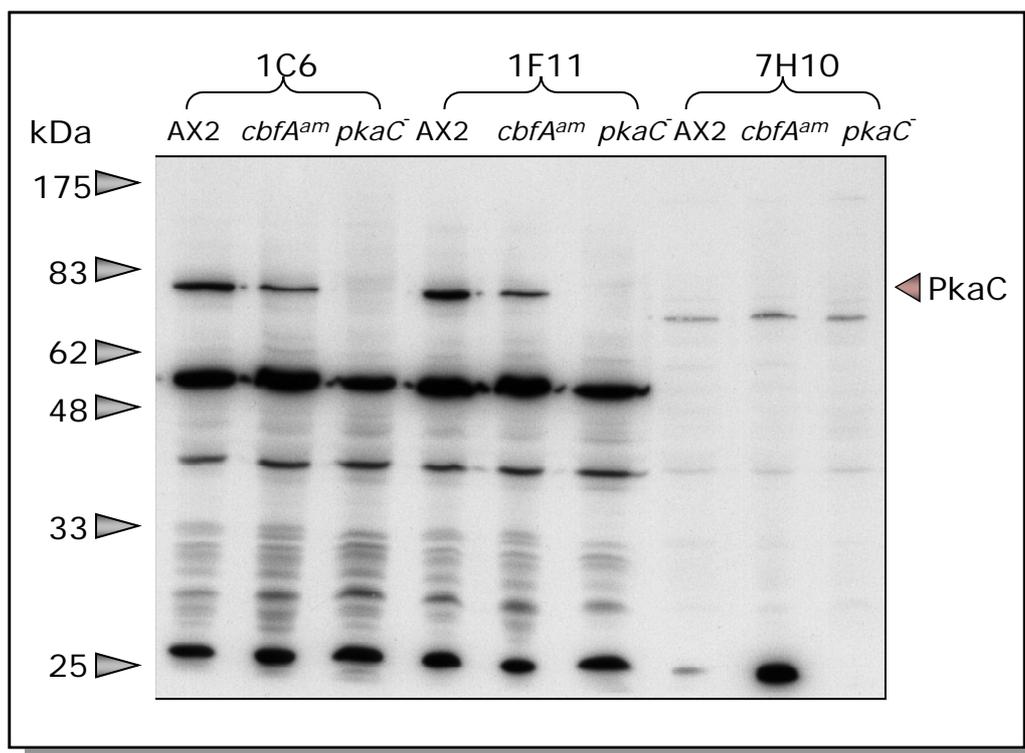


Abb. 3.8: Western-Blot Analyse zur genaueren Charakterisierung potentieller PkaC-Antikörper

Proben: Zelllysate der getesteten *D. discoideum*-Stämme zum Zeitpunkt t_{16} der Entwicklung, PAA-Gel: 10%, Detektion: Überstände der drei Hybridomzell-Klone # 1C6, # 1F11 und # 7H10
Die Hybridomzell-Klone # 1C6 und # 1F11 exprimieren gegen die PkaC gerichtete Antikörper.

Für die weiteren Untersuchungen wurde der Klon 1F11 ausgewählt und charakterisiert. Dabei zeigte sich, daß dieser Klon Antikörper vom Typ IgG_{2b} produziert.

3.1.2 Überprüfung der PkaC-Expression in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2

Von den *D. discoideum*-Stämmen AX2 und JH.D2 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während ihrer Entwicklung Zellpellets hergestellt. Zur Überprüfung der Expression der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A wurden die Zelllysate dieser Proben in einem Western-Blot unter der Verwendung des Antikörpers gegen die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (Klon # 1F11) untersucht (Abb. 3.9).

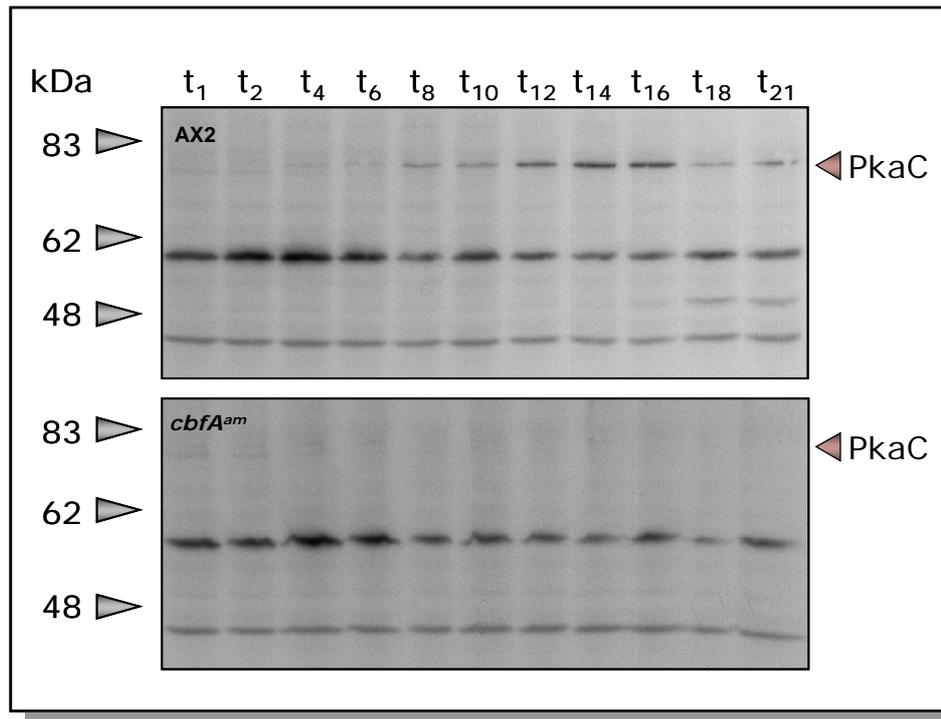


Abb. 3.9: Western-Blot Analyse zur Untersuchung der Expression der PkaC in AX2 und JH.D2

Probe: Zelllysate der *D. discoideum*-Stämme AX2 und JH.D2 zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten (t_1 - t_{21}), PAA-Gel: 10%, Detektion: PkaC-Antikörper # 1F11, Erläuterung: siehe Text

Dabei zeigte sich, daß die Expression der PkaC im Wildtyp-Stamm AX2 ca. 8 Stunden nach Beginn der Entwicklung einsetzte und anschließend über einen Zeitraum von etwa 8 Stunden fortgesetzt wurde. Nach 18 Stunden nahm die Intensität der PkaC-Bande deutlich ab. Gleichzeitig wurde bei einer Größe von etwa 48 kDa eine zusätzliche Bande detektiert. Dies läßt darauf schließen, daß der Abbau des Proteins PkaC zu einem Zeitpunkt zwischen 16 und 18 Stunden nach dem Beginn der Entwicklung einsetzte. Im Gegensatz zur Expression in AX2 konnte in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 in diesem Experiment während des beobachteten Zeitraums von 21 Stunden keine Expression der PkaC im Western-Blot nachgewiesen werden. Dies stand im Gegensatz zu dem in Abb. 3.6 gezeigten Experiment, in dem PkaC

deutlich detektiert wurde, auch wenn die Expression in JH.D2 im Vergleich zu AX2 drastisch reduziert war.

Zusammengefaßt zeigen die Daten, daß der Antikörper 1F11 die PkaC spezifisch nachweisen kann, auch wenn die Western-Blots deutliche Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen zeigen. Ob es sich bei diesen Proteinen um die katalytischen Untereinheiten anderer Proteinkinasen handelt, wurde nicht untersucht.

3.2 Etablierung einer 2D-gelelektrophoretischen Analyse von *D. discoideum*

Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese sollten die Protein-Expressionsmuster unterschiedlicher *D. discoideum*-Stämme untersucht werden. Ziel war es, differentiell exprimierte Proteine zwischen dem Wildtyp-Stamm AX2 und der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 zu erkennen. Durch den Einsatz massenspektrometrischer Methoden sollten diese im Anschluß identifiziert werden. Dazu mußte allerdings zunächst eine geeignete Trennmethode etabliert werden, die reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Von den wenigen zum damaligen Zeitpunkt beschriebenen 2D-gelelektrophoretischen Untersuchungsmethoden für *D. discoideum* war keine dazu geeignet, Aussagen über differentiell exprimierten Proteine unterschiedlicher *D. discoideum*-Stämme zum Zeitpunkt der frühen Entwicklung zu treffen.

Arbeitsschritt	Methode	Ergebnis
Probenvorbereitung + IEF	Benzonaseverdau + <i>Rehydration-Loading</i>	+
	Lyophilisation + Benzonaseverdau + <i>Rehydration-Loading</i>	+
	<i>Cup-Loading</i>	+++
Gele	Gradientengele mit Sammelgel	+
	Gradientengele ohne Sammelgel	+
	Kontinuierliche Gele ohne Sammelgel	+++
Zweite Dimension	über Tag bei 12 °C	+++
	über Nacht bei 20 °C	+++
Färbung	Silberfärbung	+
	Coomassiefärbung	++
	Fluoreszenzfärbung	+++

Tab. 3.1: Übersicht der benötigten Arbeitsschritte zur Herstellung eines 2D-Gels

Die Anzahl der Plus-Zeichen gibt an, inwiefern die untersuchte Methode zur Etablierung einer vergleichenden 2D-gelelektrophoretischen Analyse von *D. discoideum* geeignet war
 +: bedingt geeignet, ++: geeignet, +++: sehr geeignet

Die einzelnen Schritte, die notwendig waren, um die Protein-Proben der untersuchten *D. discoideum*-Stämme mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese zu analysieren, wurden im Verlauf dieser Arbeit fortlaufend angepaßt und verbessert (Tab. 3.1). Nicht zuletzt durch die Nutzung technischer Neuerungen, die nach und nach zur Verfügung standen (z. B. *Ettan IPGphor Manifold*, *Typhoon 9400 Variable Mode Imager*, *DeCyder™ Software*), konnte eine Methode etabliert werden, die reproduzierbare und somit auswertbare Ergebnisse ermöglichte. Neben der Minimierung von Gel-zu-Gel Variationen bestand die größte Schwierigkeit darin, die Proben durch die Auswahl geeigneter Puffer in Lösung zu bringen und durch anschließende Kombination mit den entsprechenden Methoden der Isoelektrischen Fokussierung für die 2D-Gelelektrophorese zugänglich zu machen. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse zu den einzelnen Arbeitsschritten genauer dargestellt.

3.2.1 Probenvorbereitung und IEF

3.2.1.1 Benzonaseverdau in Kombination mit Rehydration-Loading

Zu Beginn der Arbeit wurden gefrorenen Zellpellets entsprechend einer Zellzahl von ca. 2×10^7 Zellen durch die Zugabe des Benzonasepuffers lysiert und des Proteaseinhibitors Leupeptin vor proteolytischem Abbau durch freiwerdende Proteasen geschützt. Die bei der Lyse der Proben ebenfalls freigesetzten Nukleinsäuren wurden durch Zusatz der Endonuklease Benzonase abgebaut. Durch den Vergleich verschiedener Kombinationen aus unterschiedlichen Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen konnten die optimalen Parameter für die Inkubation ermittelt werden. Für diese Art der Probenvorbereitung erwies sich eine Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten als optimal. In Anlehnung an Protokolle für andere Spezies wurden die Proben dann mit den entsprechenden Puffern inkubiert. Die Isoelektrische Fokussierung wurde anschließend nach der Methode des *Rehydration-Loading* durchgeführt. Abbildung 3.8 zeigt ein nach Durchführung dieser Bedingungen erhaltenes 2D-Gel.

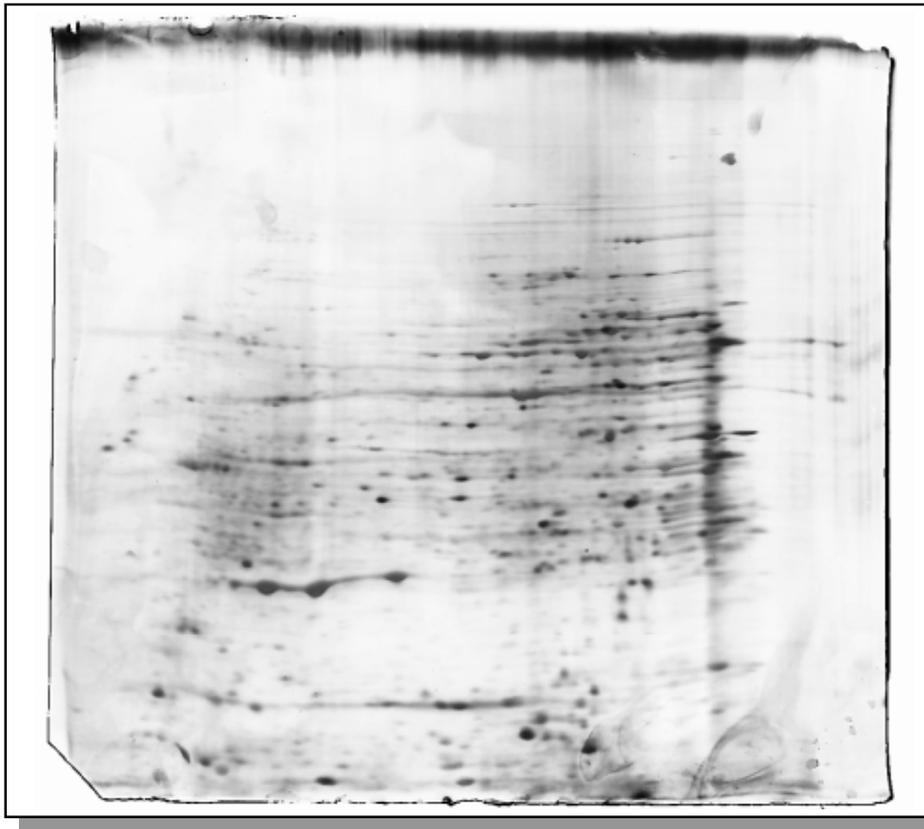


Abb. 3.10: Repräsentatives Bild eines 2D-Gels im Anschluß an das *Rehydration-Loading*

Probe: AX2-Zellen, PAA-Gel: Gradientengel mit einem Polyacrylamidanteil von 10%-15%, Färbung: Silberfärbung

Dabei fällt auf, daß sich die wenigen *Spots* fast alle im mittleren Bereich bzw. im unteren Drittel des Gels befanden. *Spots* von höhermolekularen Proteinen, die sich im oberen Bereich des Gels befinden müßten, waren bis auf wenige Ausnahmen nicht zu erkennen. Insgesamt war die Auftrennung der Proteine schlecht. Die *Spots* erschienen mehr oder weniger unscharf und das Gel wies deutliche Streifen und Schlieren auf. Die Resultate, die bei dieser Art der Probenvorbereitung gewonnen wurden, konnten zwar im Verlauf der Arbeit in einzelnen Fällen etwas verbessert werden (siehe Abb. 3.13). Vor allem in Hinblick auf die erzielte Reproduzierbarkeit reichten sie jedoch nicht an jene Ergebnisse heran, die später durch den Einsatz des *Cup-Loadings* ermöglicht wurden.

3.2.1.2 Lyophilisation in Kombination mit Benzonaseverdau und *Rehydration-Loading*

Alternativ zu der oben beschriebenen Art der Probenvorbereitung wurde eine der wenigen zum damaligen Zeitpunkt veröffentlichten Methoden zur Vorbereitung von

Gesamtzellextrakt von *D. discoideum* für die 2D-Gelelektrophorese getestet und modifiziert [WHITE *et al.*, 1983].

Der Unterschied zur vorherigen Methode bestand im Wesentlichen in der Verwendung eines anderen Löse-Puffers (3% SDS, 100 mM DTT). Die Proben wurden weiterhin kurz aufgekocht, bei -80 °C eingefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert, bevor sie am nächsten Tag nach Zugabe von Leupeptin und Benzonase einem Benzonase-Verdau unterzogen wurden. Nach Zugabe einer äquivalenten Menge an Rehydrierungspuffer wurde die Isoelektrische Fokussierung anschließend ebenfalls nach der Methode des *Rehydration-Loading* durchgeführt. Diese Art der Probenvorbereitung stellte allerdings keine Verbesserung gegenüber der oben genannten dar (Daten nicht gezeigt). Weiterhin erforderte diese Methode einen wesentlich höheren Zeitaufwand, da die Proben über Nacht lyophilisiert werden mußten. Aus diesen Gründen wurde die Methode nicht weiter verfolgt.

3.2.1.3 Cup-Loading

Für das *Cup-Loading* mussten zunächst andere Puffer und Bedingungen zur Probenvorbereitung gefunden werden. Beispielsweise sollten mit dieser Methode später Proben untersucht werden, deren Proteine fluoreszenzmarkiert sind, was einen entsprechend kompatiblen Puffer voraussetzte. Ein Benzonaseverdau der in der Probe freigewordenen Nukleinsäuren war aufgrund von Pufferinkompatibilitäten nicht mehr möglich. Im Hinblick auf einen eventuell störenden Einfluß des verwendeten Proteaseinhibitors auf die Fluoreszenzfärbung wurde bei der Probenvorbereitung außerdem auf die Zugabe von Leupeptin verzichtet. Es stellte sich heraus, daß die Proben in einem mit dem Fluoreszenz-*Labeling* kompatiblen Puffer (*DIGE-Labeling* Puffer) vollständig löslich waren und sie somit der Isoelektrischen Fokussierung zugänglich gemacht werden konnten. Zu Beginn der Untersuchungen zum *Cup-Loading* kam es allerdings vor, daß die IPG-Streifen mit den Proben während der Fokussierung in den damals verwendeten Keramikschaalen austrockneten. Das zur Abdichtung des IPG-Streifens aufgetragene dünnflüssige Paraffin konnte durch die an beiden Enden der Keramikschaalen aufgesetzten Elektroden auslaufen. Mit dem Einsatz des *Ettan IPGphor Manifold* wurde dieses Problem behoben, da es bei bestimmungsgrechtem Gebrauch vor der Fokussierung komplett mit dünnflüssigem Paraffin geflutet wird. Im Gegensatz zum *Rehydration-Loading* wurden für das *Cup-Loading* Proben verwendet, deren Protein-

konzentrationen bekannt waren. Je nach geplanter Visualisierung im Anschluß an die 2D-Gelelektrophorese handelte es sich um Mengen von 150 µg Protein pro Streifen (Silberfärbung, Fluoreszenzfärbung) bzw. 400 µg Protein pro Streifen (Coomassiefärbung). Dabei war zu beachten, daß das maximale Fassungsvermögen der *Sample-Cups* bei Verwendung des *Ettan IPGphor Manifold* 180 µL beträgt. Weiterhin wurde das Protokoll für die Isoelektrische Fokussierung verkürzt. Bei langen Fokussierungszeiten beginnt der pH-Gradient in den IPG-Streifen nach einer gewissen Zeit in Richtung beider Elektroden zu wandern. Dies betrifft vor allem die Kathode, was zum Verlust von basischen Proteinen führen kann (Kathodendrift).

Verglichen mit den anderen getesteten Verfahren zur Probenvorbereitung und anschließender Fokussierung konnten die erzielten Ergebnisse durch die Methode des *Cup-Loadings* in Verbindung mit dem Einsatz des *Ettan IPGphor Manifold* erheblich verbessert werden (Abb. 3.11). Die einzelnen Proteine des Zelllysats wurden sowohl nach ihren pI-Werten als auch nach ihren molekularen Massen deutlich voneinander getrennt. Dabei verteilten sie sich über das gesamte Gel, wobei Proteine bis zu einer Größe von etwa 150 kDa noch gut detektiert werden konnten. Ferner lagen die Proteine jeweils als „scharfe“ *Spots* gut erkennbar im Gel vor und waren deutlich von ihren jeweiligen Nachbarn abgegrenzt. Eine ausgeprägte und störende Streifen- oder Schlierenbildung, wie sie bei Verwendung des *Rehydration-Loading* sehr häufig auftrat, wurde bei Anwendung des *Cup-Loadings* nicht bzw. nur in minimalem Umfang beobachtet. Neben der deutlich besseren Auftrennung der Proben wurde auch die Reproduzierbarkeit bei der Herstellung der Gele in Kombination mit der anschließenden Visualisierung der Proteine durch eine Coomassie-Färbung (Daten hier nicht gezeigt, siehe Abb. 3.14) wesentlich erhöht. Störende Effekte durch unverdaute Nukleinsäuren konnten nicht festgestellt werden. Während der Vorbereitung zur Fokussierung wurden die Proben kontinuierlich auf Eis bearbeitet, so daß die proteolytischen Prozesse auf ein Minimum reduziert werden konnten.

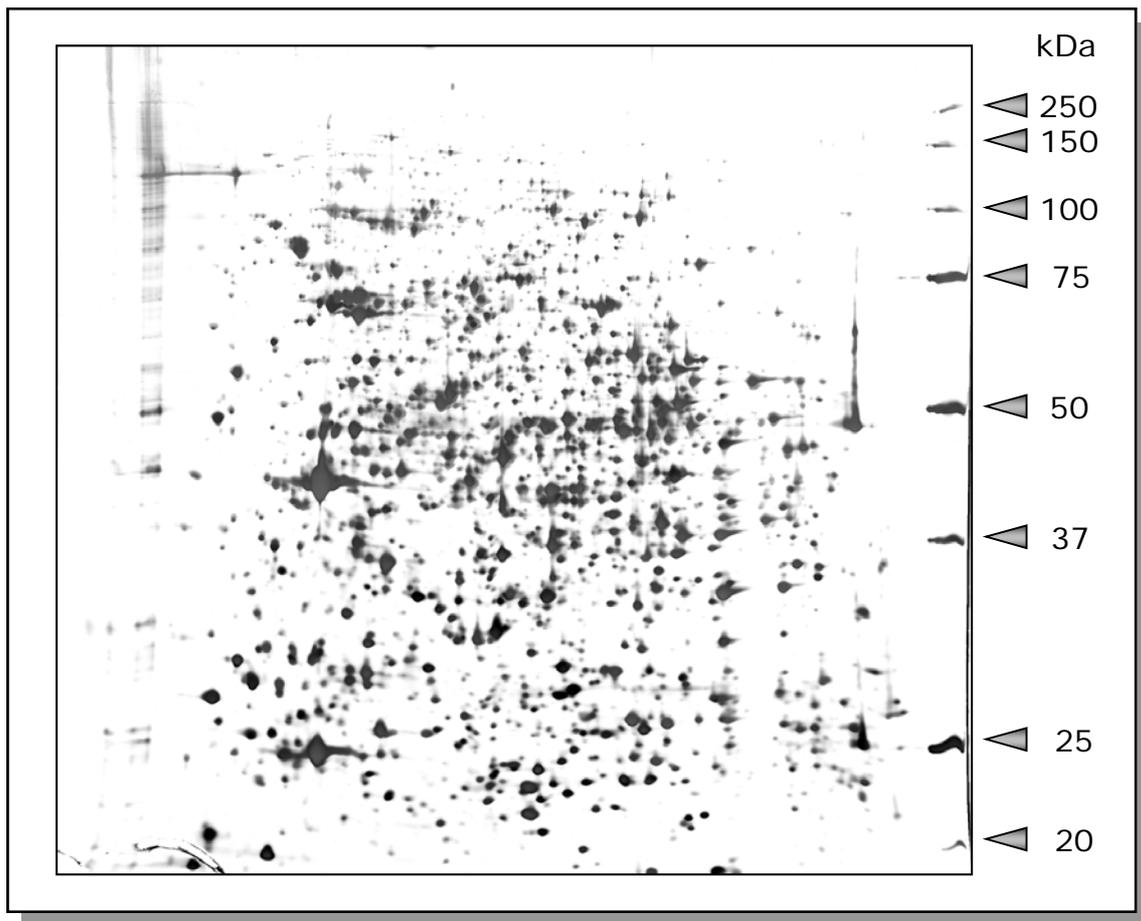


Abb. 3.11: Bild eines 2D-Gels im Anschluß an das *Cup-Loading*

Probe: AX2-Zellen (150 µg Protein), PAA-Gel: Kontinuierliches Gel mit einem Polyacrylamidanteil von 12,5%, Färbung: Silberfärbung

3.2.2 Gele für die 2D-Gelelektrophorese

3.2.2.1 Gradientengele mit Sammelgel

Zur elektrophoretischen Auftrennung der fokussierten Proben wurden zu Beginn der Arbeit Gradientengele mit einem Polyacrylamidanteil von 10% - 15% im Trenngel eingesetzt. Die verwendete Acrylamidlösung wurde zuvor durch Mischen von 30% Acrylamid mit 0,8% Bisacrylamid und anschließendem Filtrieren hergestellt. In Analogie zu SDS-PAGE Gelen wurde auf diese Gele ein etwa 2 cm hohes Sammelgel mit einem Polyacrylamidanteil von etwa 4% aufgebracht.

3.2.2.2 Gradientengele ohne Sammelgel

Die auf die Gele aufgelegten IPG-Streifen besitzen ebenfalls eine aus Acrylamidderivaten bestehende Gelmatrix mit einem Polyacrylamidanteil von 4%,

welche die Funktion des Sammelgels übernehmen können. Mit der Zeit wurde daher auf die Verwendung eines Sammelgels verzichtet, wodurch die für die Auftrennung der Proben zur Verfügung stehende Laufstrecke im Gel vergrößert wurde.

3.2.2.3 Kontinuierliche Gele

Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, daß Gel-zu-Gel Variationen eines der Hauptprobleme bei der vergleichenden Analyse zwischen verschiedenen Proteinproben darstellte. Um diese auf einem Minimum zu reduzieren, wurden die anfänglich verwendeten Gradientengele durch kontinuierliche Gele ersetzt. Gradientengele haben zwar den Vorteil, daß die analysierten Proben aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Porengrößen im Gel wesentlich besser aufgetrennt werden. Bei ihrer Herstellung konnte jedoch trotz der strikten Einhaltung des Herstellungsprotokolls nicht garantiert werden, daß zwei unterschiedliche Chargen gleiche Eigenschaften aufwiesen, was eine vergleichende Auswertung nahezu unmöglich machte. Die Herstellung von kontinuierlichen Gelen ist dagegen im Bezug auf ihre Reproduzierbarkeit wesentlich einfacher und sicherer. Zur 2D-gel-elektrophoretischen Untersuchung der Proben wurden letztlich nur noch Gele mit einem einheitlichen Acrylamidanteil von 12,5% hergestellt. Im Gegensatz zu den Gradientengelen wurde dabei ausschließlich eine gebrauchsfertige Acrylamidlösung (Rotiphorese® Gel 30 30/0,8) verwendet. Dadurch wurde ebenfalls ein Beitrag zur Minimierung störender Gel-zu-Gel Variationen geleistet.

3.2.3 Zweite Dimension

Sowohl die Durchführung der zweiten Dimension bei 12 °C über Tag als auch die bei 20 °C über Nacht lieferten vergleichbare Ergebnisse. Versuche mit Gelen, die im Anschluß mit Coomassie oder Silber gefärbt werden sollten, wurden in der Regel über Tag durchgeführt. Das Ergebnis der Färbung stand somit früher zu Verfügung. Versuche mit fluoreszenzmarkierten Proben dagegen wurden über Nacht durchgeführt, da diese im Anschluß mit dem Typhoon 9400 *Variable Mode Imager* noch eingescannt werden mußten. Dieser Vorgang nimmt, einschließlich des benötigten *Pre-Scans*, etwa eine Stunde pro Gel in Anspruch. Indem die zweite Dimension über Nacht durchgeführt wurde, verblieb nach deren Abschluß ausreichend Zeit, um die max. sechs Gele noch am selben Tag zu *scannen*. Dies ist

notwendig, da die fluoreszenzmarkierten Proteine vor dem *scannen* nicht fixiert werden können und somit innerhalb des Gels diffundieren könnten, was zu falschen Ergebnissen führen würde. Aufgrund der verminderten Hitzeentwicklung durch den geringeren Strom konnte die Kühltemperatur bei den Läufen über Nacht auf Raumtemperatur erhöht werden, ohne daß es in der Kammer zu lokalen Überhitzungen kam.

3.2.4 Färbung

3.2.4.1 Silberfärbung

Durch den Einsatz der Silberfärbung war es möglich, die Proteine in den 2D-Gelen anzufärben. Die gefärbten Gele sollten anschließend zur Identifizierung differentiell exprimierter Proteine der untersuchten *D. discoideum*-Stämme AX2 und JH.D2 verwendet werden. Dies setzt ein extrem hohes Maß an Reproduzierbarkeit der Färbemethode voraus. Zur Überprüfung wurden daher zunächst Gele, die durch das Auftragen von gleichen bzw. identischen Proben (z. B. AX2) hergestellt wurden, miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß die Silberfärbung für dieses Vorhaben nicht geeignet war. Obwohl bei der gewissenhaften Herstellung der Färbelösungen als auch bei der praktischen Durchführung der Färbung auf die exakte Einhaltung des verwendeten Protokolls geachtet wurde, konnten mit den zur Verfügung stehenden Chemikalien und technischen Geräten keine reproduzierbaren silbergefärbten Gele hergestellt werden (Abb. 3.12). Vielmehr war von durchschnittlich vier Gelen pro Ansatz die Färbung bei nur maximal zwei Gelen hinsichtlich der Intensität der gefärbten *Proteinspots* vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Die Herstellung von qualitativ gleichwertigen 2D-Gelen ist jedoch eine Grundvoraussetzung, um auf der Grundlage der Färbung Aussagen zu eventuell differentiell exprimierten *D. discoideum*-Proteinen treffen zu können.

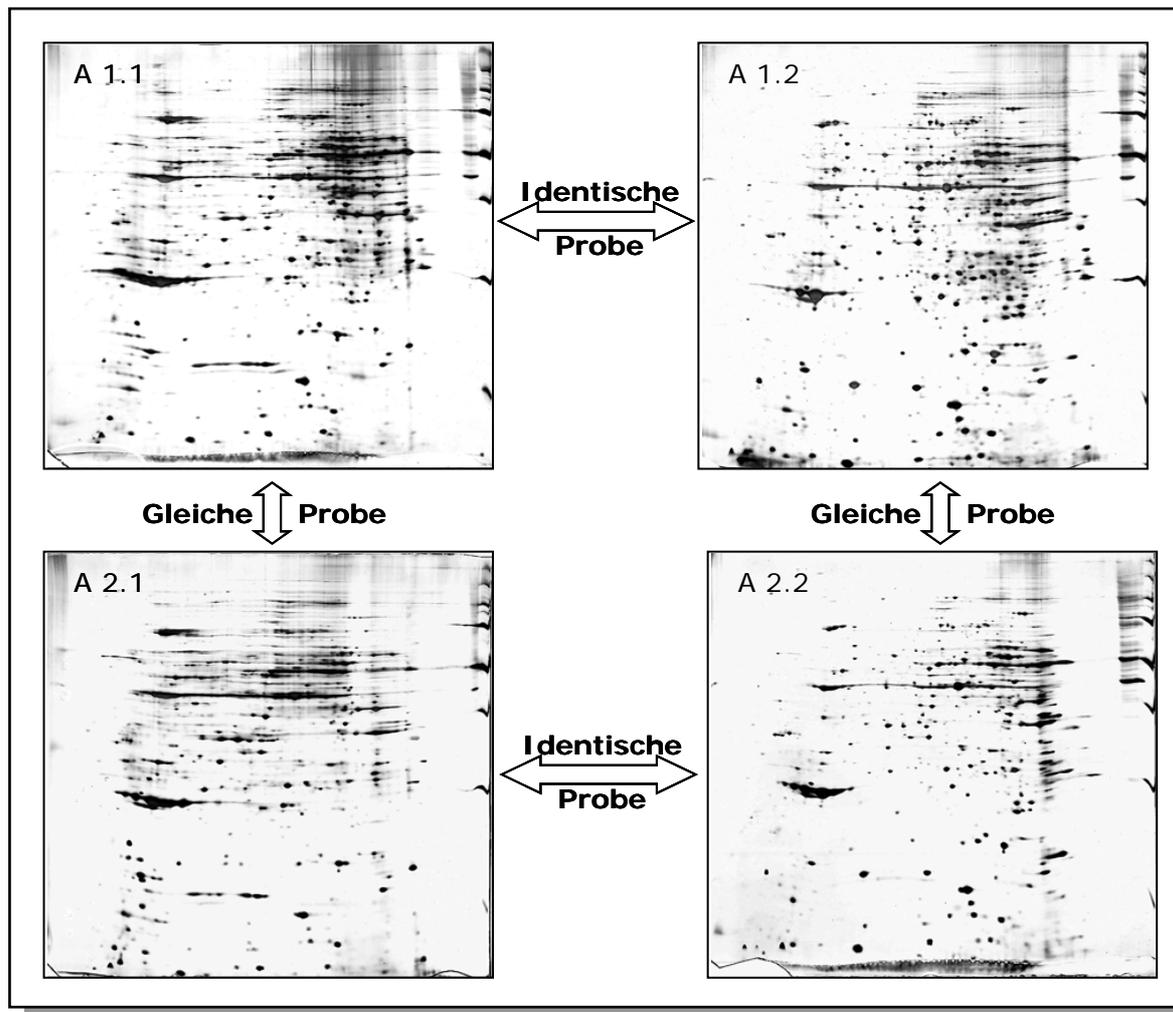


Abb. 3.12: Vergleich verschiedener Silber-gefärbter 2D-Gele

Proben: AX2-Zellen (*Rehydration-Loading*), PAA-Gel: Kontinuierliches Gel mit einem Polyacrylamid-anteil von 12,5%, Färbung: Silberfärbung

3.2.4.1.1 Identifizierung von Proteinen aus Silber-gefärbten 2D-Gele

Die massenspektrometrische Analyse von beliebig ausgewählten *Proteinspots*, die aus Silber-gefärbten Gelen extrahiert und verdaut wurden, zeigte trotz der oben beschriebenen Problematik der Silberfärbung erstmalig im Verlauf dieser Arbeit, daß Proteine von *D. discoideum* mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese getrennt und anschließend identifiziert werden konnten.

Zur Überprüfung der massenspektrometrischen Methode und vor allem zur Überprüfung der PMF-Methode bezüglich der Identifizierung von *D. discoideum*-Proteinen wurden einzelne prominente Proteine aus einem 2D-Gel, das von einer Probe aus wachsenden AX2-Zellen hergestellt wurde, ausgewählt und ausgeschnitten (Abb. 3.13).

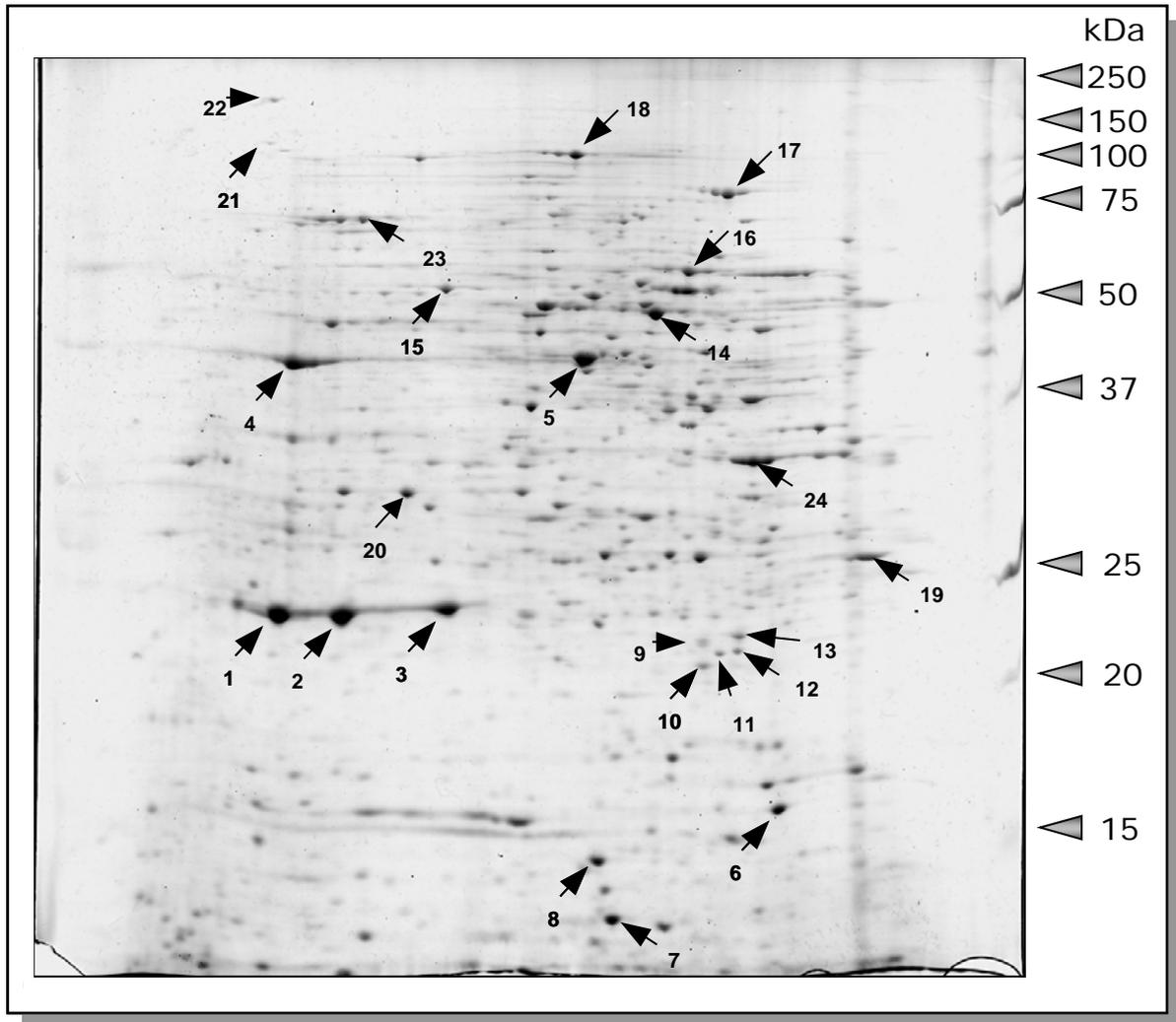


Abb. 3.13: Übersicht extrahierter Proteine eines Silber-gefärbten 2D-Gels

Probe: wachsende AX2-Zellen (*Rehydration-Loading*), PAA-Gel: Kontinuierliches Gel mit einem Polyacrylamidanteil von 12,5%, Färbung: Silberfärbung

Dabei konnten von 24 ausgewählten Proteinen insgesamt 16 durch die Verwendung der PMF-Methode und der damit verbundenen Recherche in der NCBI-Datenbank identifiziert werden. Die charakteristischen Eigenschaften dieser 16 Proteine sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tab. 3.2).

Spot Nr.	Gen Name	Gen Produkt	<i>DictyBaseID</i>	theoretisches/er	
				MW [kDa]	pI
1	<i>cadA</i>	Glycoprotein gp24	DDB0191175	23,9	5,40
2	<i>cadA</i>	Glycoprotein gp24	DDB0191175	23,9	5,40
3	<i>cadA</i>	Glycoprotein gp24	DDB0191175	23,9	5,40
5	DDB0230070		DDB0230070	41,7	6,13
6	<i>ndkC</i>	NDP Kinase	DDB0185051	16,8	7,97
8	<i>rps12</i>	40S ribosomal protein S12	DDB0230044	14,9	6,73
11	JC2V2_0_00012		DDB0202901	25,1	9,05

Fortsetzung Tabelle 3.2:

12	JC2V2_0_00012		DDB0202901	25,1	9,05
15	JC2V2_0_01281		DDB0217242	55,1	5,53
16	<i>purH</i>	IMP cyclohydrolase	DDB0230095	59,1	6,87
17	<i>acnB</i>	aconitate hydratase	DDB0230168	83,5	8,19
19	JC2V2_0_01553		DDB0167892	28,6	9,25
20	JC1V2_0_00789		DDB0202301	33,8	8,28
22	JC1V2_0_00088		DDB0216518	95,5	6,17
23	<i>mhsp70</i>		DDB0215366	71,3	5,89
24	<i>gpbB</i>	G beta like protein	DDB0185122	36,2	7,64

Tab. 3.2: Identifizierte Proteine aus Silber-gefärbten 2D-Gelele

3.2.4.2 Coomassiefärbung

Zur Kompensation der geringeren Sensitivität der Coomassiefärbung wurde die eingesetzte Proteinmenge auf 400 µg pro Ansatz bei der Herstellung der 2D-Gele erhöht. Ein Vergleich von Gelen, die durch das Auftragen von identischen bzw. gleichen Proben hergestellt wurden zeigte, daß diese Methode wesentlich reproduzierbarere Ergebnisse lieferte (Abb. 3.14).

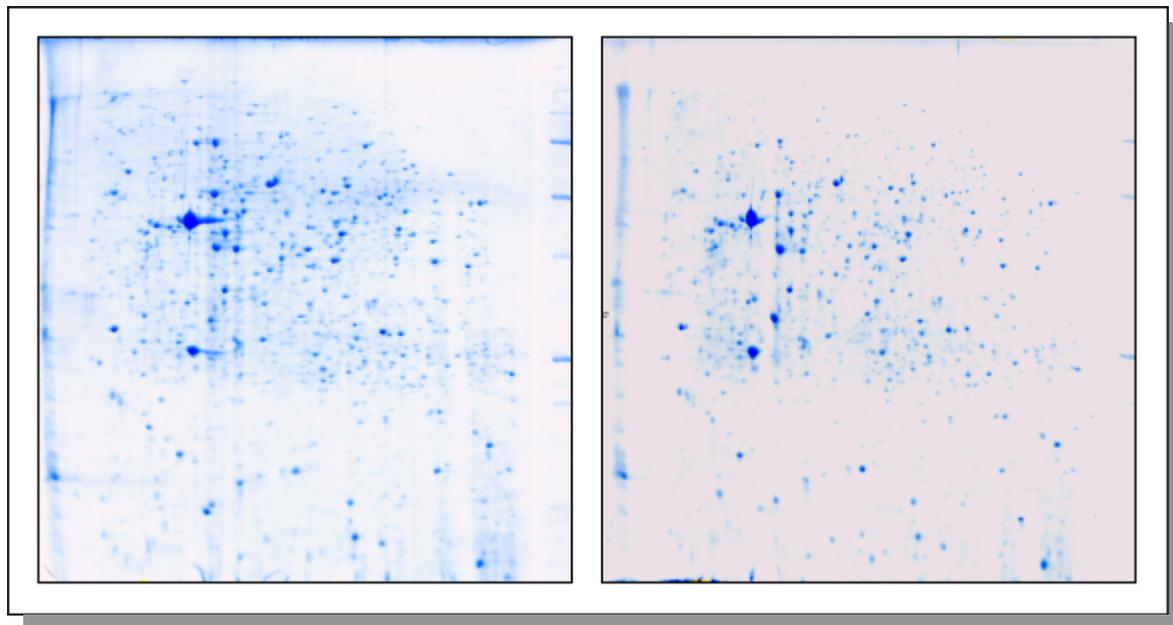


Abb. 3.14: Darstellung zur Reproduzierbarkeit der Coomassiefärbung

Proben: wachsende AX2-Zellen (je 400 µg Protein) (*Cup-Loading*), PAA-Gel: Kontinuierliches Gel mit einem Polyacrylamidanteil von 12,5%; es handelt sich um unterschiedliche Proben, die zu verschiedenen Zeitpunkten elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Folglich wurden im Anschluß unterschiedliche Proben der *D. discoideum*-Stämme AX2 und JH.D2 analysiert. Dabei wurden Zellen sowohl während des logarithmischen Wachstums untersucht (bezeichnet mit "t₀"), als auch Zellen, die für

zwei Stunden in Phosphatpuffer „gehungert“ wurden, um die multizelluläre Entwicklung zu initiieren (bezeichnet mit “ t_2 ”). Durch den visuellen Vergleich dieser Gele konnten im Verlauf der Arbeit erstmals differentiell exprimierte Proteine zwischen den untersuchten *D. discoideum*-Stämmen AX2 und JH.D2 lokalisiert und näher untersucht werden.

3.2.4.2.1 Identifizierung von Proteinen aus Coomassie-gefärbten 2D-Gele

Durch den Einsatz der Coomassiefärbung konnten insgesamt drei differentiell exprimierte Proteine zwischen den untersuchten *D. discoideum*-Stämmen detektiert werden (Abb. 3.15).

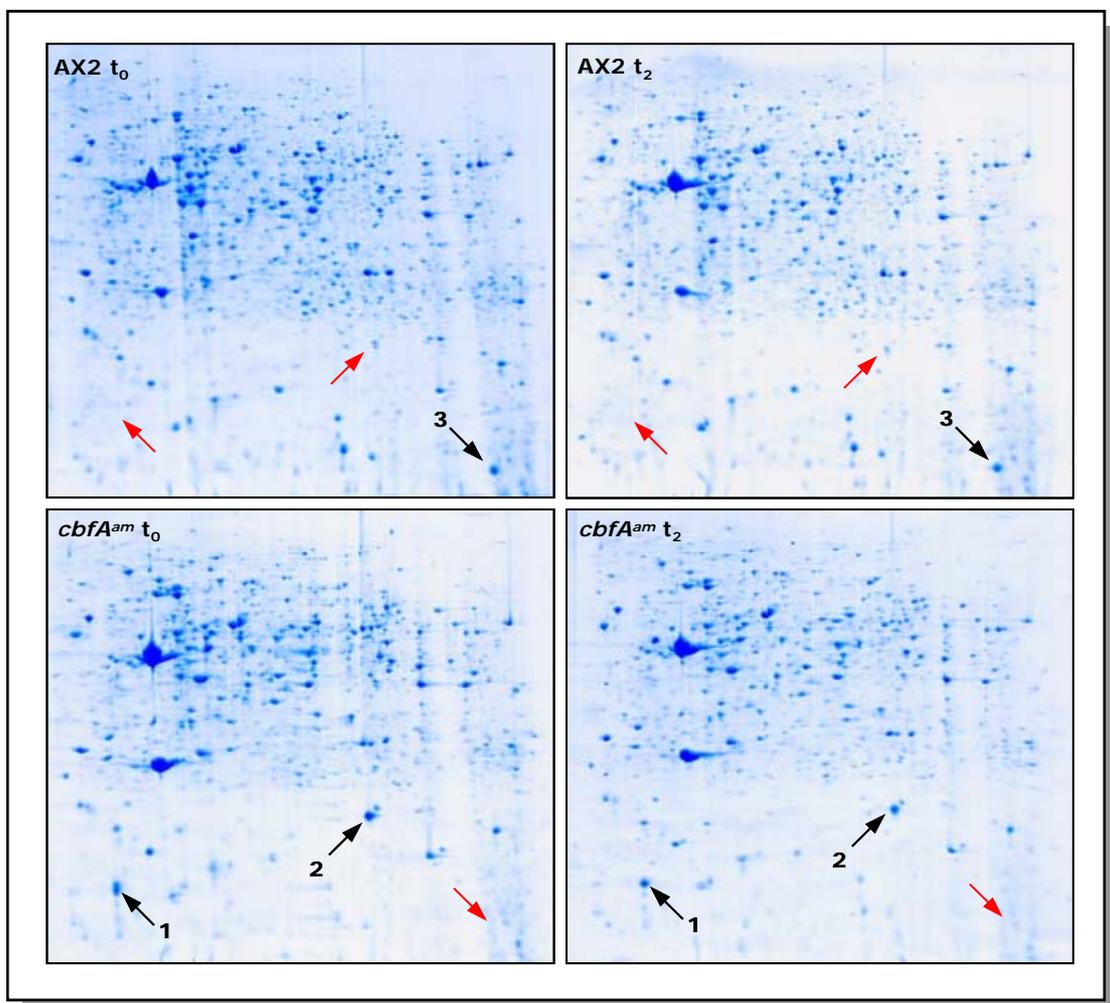


Abb. 3.15: Differentiell exprimierte Proteine in Coomassie-gefärbten 2D-Gele

Proben: siehe Text (Cup-Loading, jeweils 400 μ g Protein), PAA-Gel: Kontinuierliches Gel mit einem Polyacrylamidanteil von 12,5%; die Pfeile zeigen das Fehlen (rot) bzw. das Vorhandensein (schwarz) differentiell exprimierter Proteine (visueller Vergleich) an.

Zwei dieser differentiell exprimierten Proteine wurden jeweils zu den Zeitpunkten t_0 und t_2 in Proteinextrakten der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2, jedoch nicht in den Proben des Wildtyp-Stamms AX2 detektiert. Das dritte differentiell exprimierte Protein hingegen konnte ausschließlich in den Proben der AX2 Wildtyp Zellen beobachtet werden. Im Anschluß an die Extraktion der Proteine aus den Coomassie-Gelen und dem tryptischen Verdau wurden die Proben massenspektrometrisch analysiert. Die charakteristischen Eigenschaften dieser differentiell exprimierten Proteine sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Spot Nr.	Gen Name	Gen Produkt	DictyBaseID	theoretisches/er	
				MW [kDa]	pI
1	bsr	blasticidin S deaminase[<i>E. coli</i>]		15,7	5,34
2	JC1V2_0_00294		DDB0189496	19,5	6,9
3	orfSGP		DDB0214941	32,5	6,36

Tab. 3.3: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine aus Coomassie-gefärbten 2D-Gelen

Bei dem in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 differentiell exprimierten Protein aus *E. coli*, Blasticidin S deaminase (Spot Nr. 1), handelt es sich um den bei der Herstellung der *cbfA^{am}*-Mutante verwendeten Selektionsmarker [WINCKLER *et al.*, 2001]. Konsequenterweise mußte dieses Protein nach der erfolgreichen Etablierung einer 2D-gelelektrophoretischen Analyse von *D. discoideum* detektiert werden, da es in entsprechenden Wildtyp-Zellen nicht exprimiert wird. Über die Funktion des zweiten in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 differentiell exprimierten Proteins, DictyBaseID: DDB0189496 (Spot Nr. 2), ist zur Zeit nichts näheres bekannt. Gleiches gilt für das im Wildtyp-Stamm AX2 detektierte Protein, DictyBaseID: DDB0214941 (Spot Nr. 3). Hierbei ist allerdings zu beachten, daß weder das theoretisch errechnete Molekulargewicht von 32,5 kDa noch der theoretisch vorhergesagte pI-Wert von 6,36 dieses identifizierten Proteins (Score von 79) mit den Werten übereinstimmen, die aus der Lage des ausgeschnittenen Proteins innerhalb des Gels abgeleitet werden können. Danach müßte das Protein (Spot Nr. 3) eine wesentlich geringere molekulare Masse von nur etwa 10 kDa und einen extrem basischen pI-Wert aufweisen.

3.2.4.3 Fluoreszenzfärbung

Durch Verwendung entsprechender Protokolle gelang es, Proteinlysate der untersuchten *D. discoideum*-Stämme mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Mit Hilfe der computergestützten Auswertung der durchgeführten Experimente unter Verwendung der DIGE-Technologie konnte eine Vielzahl differentiell exprimierter Proteine zwischen dem untersuchten Wildtyp-Stamm AX2 und der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 detektiert werden. Auf die Experimente mit fluoreszenzmarkierten Proteinen wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

3.3 DIGE-Experimente

Die einzelnen im Verlauf des Projektes unter Verwendung der DIGE-Technologie durchgeführten Experimente sind im folgenden Kapitel zusammengefaßt. Innerhalb der einzelnen Experimente wird jeweils genauer auf den Aufbau des Versuchs, die nach Ablauf des Versuchs durchgeführte Auswertung und die jeweils identifizierten differentiell exprimierten Proteine eingegangen.

3.3.1 DIGE-Experiment I

3.3.1.1 Versuchsaufbau

In einem ersten Versuch wurden jeweils zwei Proben der *D. discoideum*-Stämme AX2 und JH.D2 zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der frühen Entwicklung (t_0 und t_2) miteinander verglichen. Dabei wurden die Proben des Wildtyp-Stamms AX2 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3, die des Stamms JH.D2 hingegen mit Cy5 markiert. Die Proben von jeweils gleichen Zeitpunkten wurden anschließend zusammen mit dem internen Standard (markiert mit Cy2) in drei Replikaten fokussiert und danach in der zweiten Dimension elektrophoretisch aufgetrennt. Dadurch entstanden sechs reale 2D-Gele, die aufgrund der jeweils enthaltenen Information der drei unterschiedlich markierten Proben (AX2, JH.D2 und interner Standard) einer Anzahl von insgesamt 18 virtuellen 2D-Gelen entsprachen (Tab. 3.4).

Gel Nr.	Streifen Nr.	Cy3	Cy5	Cy2
1	24501	AX2 (t_0)	JH.D2 (t_0)	Interner Standard
2	24504	AX2 (t_0)	JH.D2 (t_0)	Interner Standard
3	24507	AX2 (t_0)	JH.D2 (t_0)	Interner Standard
4	24508	AX2 (t_2)	JH.D2 (t_2)	Interner Standard
5	24510	AX2 (t_2)	JH.D2 (t_2)	Interner Standard
6	24514	AX2 (t_2)	JH.D2 (t_2)	Interner Standard

Tab. 3.4: Versuchsaufbau DIGE-Experiment I

t_0 und t_2 bezeichnen Proben aus wachsenden (t_0) bzw. aus zwei Stunden entwickelten Zellen (t_2)

3.3.1.2 Versuchsauswertung

Die Auswertung der Daten ergab, daß sowohl in wachsenden Zellen als auch zum Zeitpunkt der frühen Entwicklung differentiell exprimierte Proteine zwischen den beiden untersuchten *D. discoideum*-Stämmen gefunden werden konnten. Zum

Zeitpunkt t_0 wurden in den dazugehörigen neun virtuellen Gelen durchschnittlich 2082 Spots detektiert, von denen die *Software* insgesamt 1335 Spots abgleichen (*matchen*) konnte. Zum Zeitpunkt t_2 wurden in den entsprechenden neun Gelen durchschnittlich 1782 Spots detektiert. Hier konnte die *Software* insgesamt 1405 Spots zwischen den Gelen abgleichen. Aufgrund der bei diesem Experiment festgelegten Kriterien (vorhanden in mind. 9 von 9 Gelen; T-test: $p \leq 0,005$; *Average Ratio*: $\geq |2,1|$) wurden zum Zeitpunkt t_0 27 differentiell exprimierte Proteine und zum Zeitpunkt t_2 21 differentiell exprimierte Proteine ausgewählt und zur späteren massenspektrometrischen Untersuchung aus den Gelen ausgeschnitten.

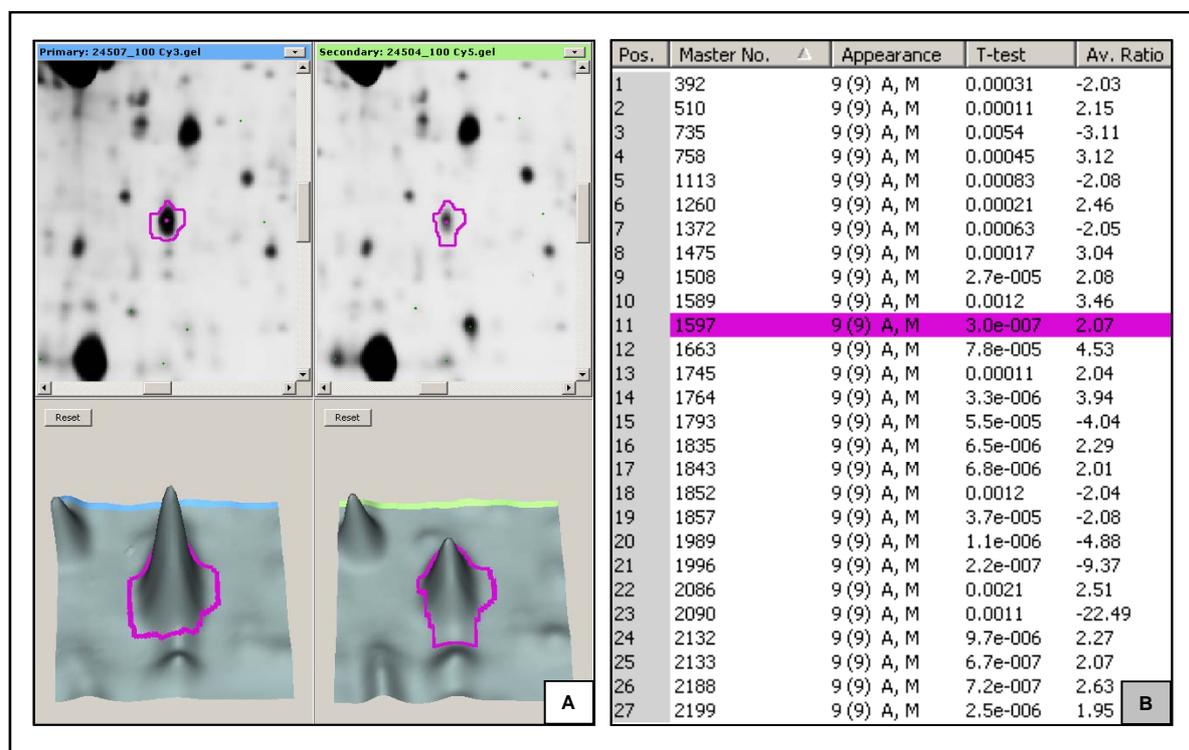


Abb. 3.16: Identifizierung differentiell exprimierter Proteine mit der DeCyder-Software

A: Repräsentative Darstellung eines differentiell exprimierten Proteins (*Master* Nr. 1597) zum Zeitpunkt t_0 ; links AX2, markiert mit Cy3, rechts JH.D2, markiert mit Cy5; die Bildausschnitte stammen jeweils von unterschiedlichen Gelen (links: Gel Nr. 3; rechts: Gel Nr. 2)

B: Übersicht der Eigenschaften der zum Zeitpunkt t_0 als differentiell exprimiert ausgewählten Proteine. (Die Angaben zur *Av. Ratio* beruhen auf dem Quotient der Fluoreszenzintensitäten von AX2 zu JH.D2)

3.3.1.3 Massenspektrometrische Analyse

Von den insgesamt 48 ausgeschnittenen *Spots* des ersten DIGE-Experiments wurden zunächst nur die 21 zum Zeitpunkt t_2 als differentiell exprimiert erkannten Proteine massenspektrometrisch untersucht. Von den 21 untersuchten Proteinen

konnten sechs identifiziert werden. Deren charakteristischen Eigenschaften sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Spot Nr.	Av. Ratio	Gen Name	Gen Produkt	DictyBaseID	theoretische/er	
					Masse [kDa]	pI
448	2,15	<i>cupB</i>	calcium up-regulated protein	DDB0191376	85,7	4,60
851	2,38	DDB0232276		DDB0232276	56,7	5,56
1278	2,82	DDB0231374	translation initiation factor eIF-2B alpha subunit	DDB0231374	38,5	6,30
1378	2,20	JC1V2_0_00789		DDB0202301	33,8	8,28
1434	2,78	<i>dscA</i>	discoidin I, A chain	DDB0215400	28,3	6,19
1541	-3,76	DDB0229909	putative O-methyltransferase	DDB0229909	25,8	5,57

Tab. 3.5: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine des Experiments DIGE-I

Die Angaben zur Av. Ratio beruhen auf dem Quotient der Fluoreszenzintensitäten von AX2 zu JH.D2

Mit einer Ausnahme (Spot Nr. 1541) wurden die identifizierten Proteine vermehrt in den Zellen des Wildtyp-Stamms AX2 exprimiert. Das Gen *cupB* (Spot Nr. 448) kodiert für ein Protein, dessen Expression durch steigende Konzentration an extrazellulären Ca^{2+} -Ionen verstärkt wird (*calcium up-regulated gene*) und das vermutlich eine Ricin-Domäne aufweist. Im Verlauf der Entwicklung kommt es während der Aggregation und der späten Entwicklung zu einer gesteigerten Expression des *cupB*-Gens. Eine Überexpression der *cupB antisense*-mRNA führt zu einer Blockade der Entwicklung. Zellen dieser Stämme sind nicht in der Lage zu aggregieren [COUKELL *et al.*, 2004]. Das Gen *dscA* (Spot Nr. 1434) kodiert für die α -Kette des Proteins Discoidin I, eines Lektins. Lektine sind als Kohlenhydrat-bindende Proteine an der interzellulären Adhäsion der Zellen beteiligt und werden vermehrt in der frühen Hungerphase exprimiert [KOLBINGER *et al.*, 2005]. Über die vier anderen identifizierten Proteine bzw. deren Gene ist zur Zeit nicht viel bekannt. Das von dem Gen DDB0232276 (Spot Nr. 851) exprimierte Protein enthält einen Aktin-Depolymerisationsfaktor und besitzt vermutlich Aktin bindende Eigenschaften. Bei dem Produkt des Gens DDB0231374 (Spot Nr. 1278) handelt es sich um die α -Untereinheit des Translations-Initiations-Faktors eIF-2B und Gen JC1V2_0_00789 (Spot Nr. 1378) kodiert für eine S-adenosylmethionin abhängige Methyltransferase. Bei dem in Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 verstärkt exprimierten Gen DDB0229909 (Spot. Nr. 1541) handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine

O-Methyltransferase. Sie weist starke Ähnlichkeit mit einem entsprechenden bakteriellen Protein auf. Neben diesem besitzt *D. discoideum* auf dem gleichen Chromosom (Chromosom 2) ein weiteres Gen (DDB0229910), das für eine solche O-Methyltransferase kodiert. Da zunächst nur sechs der insgesamt 21 analysierten Proteine identifiziert werden konnten, wurde auf eine Analyse der ausstehenden 27 differentiell exprimierten Proteine zum Zeitpunkt t_0 verzichtet. Weiterhin wurde das zum Ausschneiden der Spots verwendete Schneidewerkzeug des *Spotpickers* mit einem Innendurchmesser von 1,4 mm gegen eines mit einem Innendurchmesser von 2,0 mm ausgetauscht. Dadurch wurde die zur Identifizierung der Proteine verfügbare Probenmenge vergrößert, wodurch das Verhältnis von identifizierten zu analysierten Proteinen verbessert werden sollte.

3.3.2 DIGE-Experiment II

3.3.2.1 Versuchsaufbau

Bei diesem wie auch bei den folgenden Versuchen wurden die Proben nicht mehr strikt nach der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe mit den Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert (z. B. Wildtyp mit Cy3 und Mutante mit Cy5). Vielmehr wurden die Proteine in verschiedenen Ansätzen mit Cy3 und mit Cy5 gefärbt, um negative Auswirkungen einer eventuellen unterschiedlichen Selektivität der Farbstoffe gegenüber den Proben zu minimieren (*dye-flip*, siehe Tab. 2.4). Weiterhin sollte jede Probe in jeder Farbkombination einmal mit jeder anderen im Experiment verwendeten Probe (AX2 t_0 , AX2 t_2 , JH.D2 t_0 und JH.D2 t_2) auf dem gleichen IPG-Streifen fokussiert werden. Der aus dieser Überlegung resultierende Versuchsaufbau ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 3.6). Insgesamt umfaßte dieses zweite DIGE-Experiment somit 12 reale 2D-Gele, die aufgrund der jeweils enthaltenen Information der drei unterschiedlich markierten Proben (AX2, JH.D2 und interner Standard) einer Anzahl von 36 virtuellen 2D-Gelen entsprachen.

Proben	AX2 t_0 Cy3	AX2 t_2 Cy3	JH.D2 t_0 Cy3	JH.D2 t_2 Cy3
AX2 t_0 Cy5	--	Gel Nr. 7	Gel Nr. 11	Gel Nr. 4
AX2 t_2 Cy5	Gel Nr. 1	--	Gel Nr. 8	Gel Nr. 6
JH.D2 t_0 Cy5	Gel Nr. 5	Gel Nr. 2	--	Gel Nr. 9
JH.D2 t_2 Cy5	Gel Nr. 10	Gel Nr. 12	Gel Nr. 3	--

Tab. 3.6: Übersicht der Versuchsplanung DIGE-Experiment II

3.3.2.2 Versuchsauswertung

Limitiert durch die vorhandene technische Ausstattung (*Ettan DALTsix Electrophoresis System*) konnten in einem Ansatz maximal sechs Gele parallel in der zweiten Dimension elektrophoretisch aufgetrennt werden. Der Versuch wurde daher in zwei getrennten Ansätzen mit je sechs Probenpaaren, zunächst mit den Gelen 1-6 und anschließend mit den Gelen 7-12, durchgeführt und ausgewertet. In Tab. 3.7 sind die ersten sechs Gele gelistet.

Gel Nr.	Streifen Nr.	Cy3	Cy5	Cy2
1	49466	AX2 t ₀	AX2 t ₂	Interner Standard
2	49469	AX2 t ₂	JH.D2 t ₀	Interner Standard
3	49471	JH.D2 t ₀	JH.D2 t ₂	Interner Standard
4	49472	JH.D2 t ₂	AX2 t ₀	Interner Standard
5	49473	AX2 t ₀	JH.D2 t ₀	Interner Standard
6	49475	JH.D2 t ₂	AX2 t ₂	Interner Standard

Tab. 3.7: Versuchsaufbau DIGE-Experiment II, Gele 1-6

Bei der Analyse der ersten sechs Gele konnten durchschnittlich 2116 Spots pro Gel von der *DeCyder-Software* detektiert werden. Von diesen wurden wiederum insgesamt 1394 Spots zwischen allen 18 virtuellen Gelen abgeglichen. Aufgrund der bei dieser Auswertung festgelegten Kriterien (vorhanden in mind. 15 von 18 Gelen; T-test: $p \leq 0,05$; *Average Ratio*: $\geq |1,7|$) wurden aus diesen 32 Spots ausgewählt. Zusätzlich wurden durch manuelle Auswahl weitere 8 Spots (vorhanden in mind. 18 von 18 Gelen; T-test: $p \leq 0,05$; *Average Ratio*: $\geq |1,4 - \leq 1,7|$) hinzugefügt, welche sich durch einen auffallenden Verlauf der Proteinexpression innerhalb des beobachteten Zeitraums während der Entwicklung von *D. discoideum* auszeichneten. Das in Abb. 3.17 gezeigte Beispiel verdeutlicht den jeweils unterschiedlichen Expressionsverlauf eines Proteins (Spot Nr. 1888) in Zellen des Wildtyp-Stamms AX2 im Vergleich zu Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 in Reaktion auf den Übergang von Wachstum zu früher Entwicklung. In den AX2 Zellen nimmt die Expression des Proteins innerhalb des beobachteten Zeitraums von zwei Stunden deutlich zu, während die Expression in den Zellen von JH.D2 konstant auf einem niedrigen Niveau verbleibt. Es handelt sich demnach um das Produkt eines möglicherweise entwicklungsrelevanten Gens, dessen Transkription und/oder Translation in den Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 unterschiedlich zu sein scheint.

Im Anschluß an die Auswertung wurden die 40 differentiell exprimierten Spots zur späteren massenspektrometrischen Untersuchung ausgeschnitten.

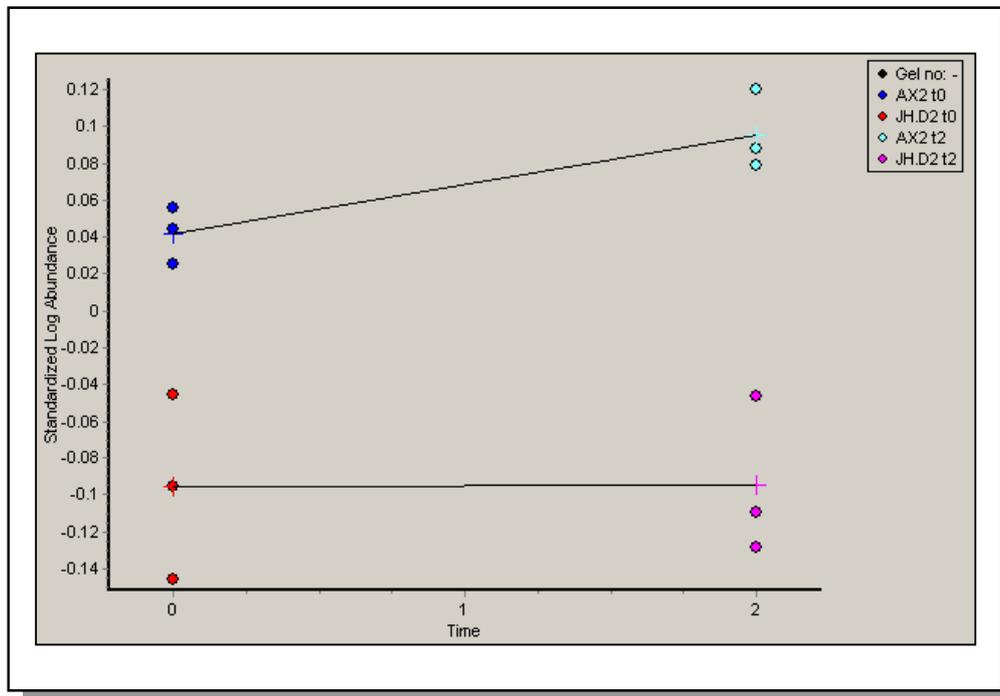


Abb. 3.17: Darstellung eines entwicklungsrelevanten Proteins in AX2

Bildausschnitt aus der *DeCyder-Software* für den Spot mit der Nummer 1888; x-Achse: Zeit, y-Achse: Fluoreszenzintensität

In Analogie zu den Gelen 1-6 wurden die sechs verbliebenen Ansätze des Versuchs ebenfalls fokussiert und elektrophoretisch aufgetrennt (Tab. 3.8).

Gel Nr.	Streifen Nr.	Cy5	Cy3	Cy2
7	89823	AX2 t ₀	AX2 t ₂	Interner Standard
8	89827	AX2 t ₂	JH.D2 t ₀	Interner Standard
9	89829	JH.D2 t ₀	JH.D2 t ₂	Interner Standard
10	89830	JH.D2 t ₂	AX2 t ₀	Interner Standard
11	89831	AX2 t ₀	JH.D2 t ₀	Interner Standard
12	89854	JH.D2 t ₂	AX2 t ₂	Interner Standard

Tab. 3.8: Versuchsaufbau DIGE-Experiment II, Gele 7-12

Bei dieser Analyse konnten in den Gelen 7-12 durchschnittlich 2213 *Spots* detektiert werden, von denen insgesamt 1464 zwischen den 18 Bildern abgeglichen werden konnten. Aus diesen wurden 36 Proteine (vorhanden in mind. 15 von 18 Gelen; T-test: $p \leq 0,05$; *Average Ratio*: $\geq |1,7|$) als differentiell exprimiert identifiziert und zur späteren massenspektrometrischen Bestimmung aus den Gelen ausgeschnitten.

Der Vergleich aller im Experiment beteiligten Gele (1-12) zeigte, daß von den 2485 berücksichtigten Spots insgesamt 16 Proteine die folgenden hohen Auswahlkriterien (vorhanden in mind. 36 von 36 Gelen; T-test: $p \leq 0,05$; *Average Ratio*: $\geq |1,5|$) erfüllten. Eine massenspektrometrische Analyse dieser 16 Proteine war nur unter Verwendung der Gele 7-12 möglich, da die Gele 1-6 aus technischen Gründen zu diesem Zeitpunkt nicht mehr zur Verfügung standen.

3.3.2.3 Massenspektrometrische Analyse

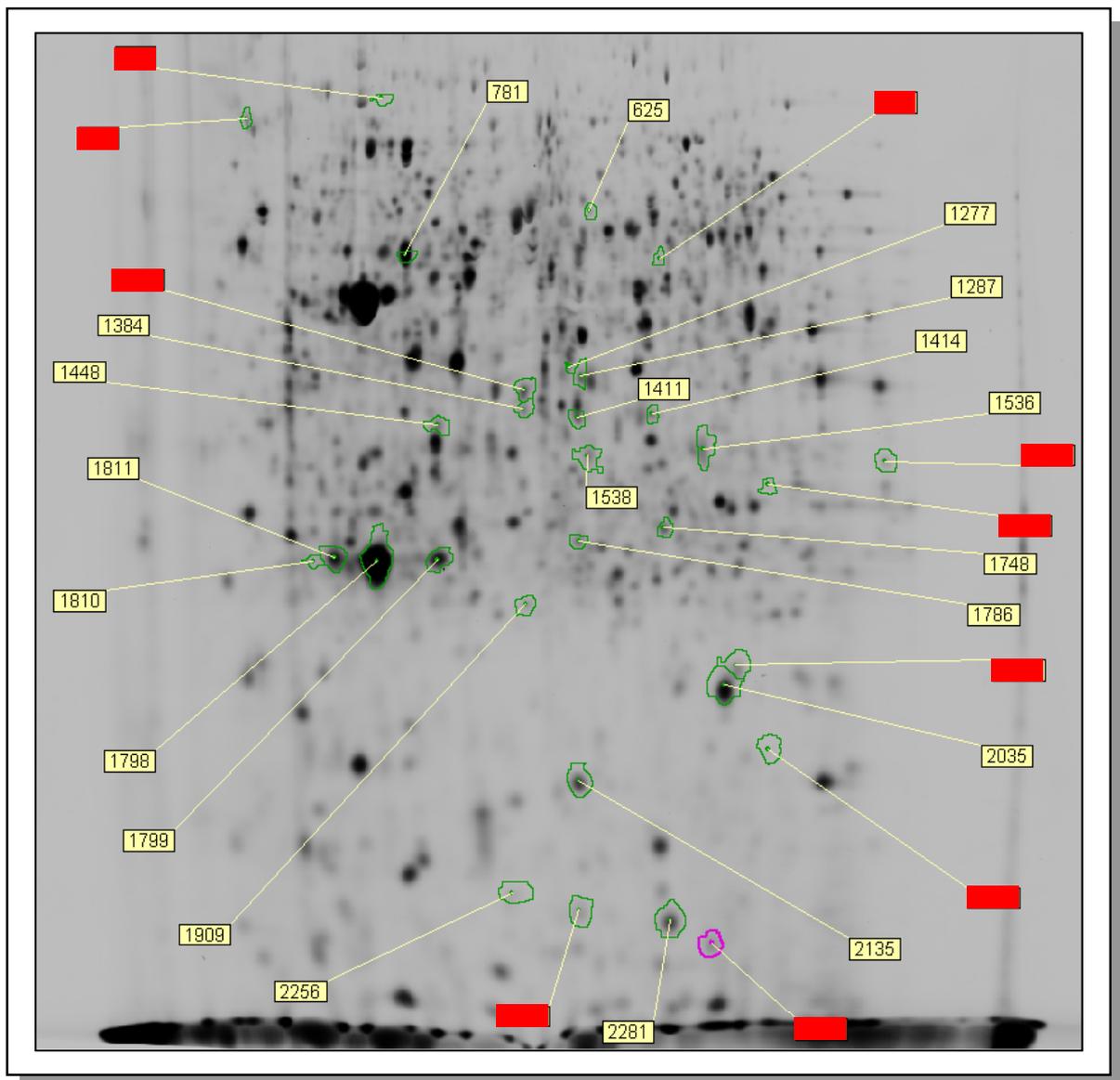


Abb. 3.18: Repräsentatives Bild der DeCyder-Software zum DIGE-Experiment II

Die Abbildung zeigt die Darstellung detektierter *Spots* des Internen Standards (markiert mit Cy2) des Gels Nr. 3. Grün umrandete *Spots* wurden zur massenspektrometrischen Analyse aus dem Gel extrahiert. Proteine, die rot gekennzeichnet sind, konnten nicht identifiziert werden.

Ergebnisse

Zur besseren Orientierung ist die Lage der jeweils aus den Gelen 1-6 ausgeschnittenen *Spots* in der Abbildung 3.18 dargestellt. Die charakteristischen Eigenschaften der identifizierten Proteine aus den Gelen 1-6 dieses Versuchs sind nachfolgend in der Tabelle 3.9 zusammengefaßt.

Spot Nr.	Av. Ratio t_0/t_2	Gen Name	Gen Produkt	DictyBaseID	theoretische/er	
					Masse [kDa]	pl
625	1,71/1,54	BC5V2_0_00382		DDB0187716	59,8	6,05
781	1,65/1,82	<i>argE</i>	acetylorithine deacetylase	DDB0191165	49,4	5,28
1277	2,43/2,29	<i>tubB</i>	beta tubulin	DDB0191169	51,7	5,07
1287	1,75/1,28	<i>Hpd</i>	p-hydroxyphenyl-pyruvic hydroxylase	DDB0231604	41,9	5,77
1384	1,65/2,04	JC1V2_0_00299		DDB0189501	33,4	5,76
1411	-1,61/-1,94	<i>alrA</i>	aldo-keto reductase	DDB0215363	33,8	5,95
1414	2,34	<i>orfSGP</i>	Unknown	DDB0214941	32,5	6,36
1448	1,99/1,89	JC1V2_0_00789		DDB0202301	33,8	8,28
1536	-1,70/-1,26	<i>dscB</i>	discoidin I, β chain	DDB0215401	28,8	6,58
1538	3,13/2,25	<i>dscA</i>	discoidin I, α chain	DDB0215400	28,7	6,20
1726	-3,46/-2,22	DDB0229909	putative O-methyltransferase	DDB0229909	25,9	5,57
1748	1,74/1,82	<i>adkB</i>	adenylate kinase	DDB0230097	26,1	8,86
1786	-1,74/-1,37	JC2V2_0_01198		DDB0217159	27,6	6,05
1798	-2,10/-2,47	<i>cadA</i>	glycoprotein gp24	DDB0191175	24,1	5,40
1799	-2,37/-2,55	<i>cadA</i>	glycoprotein gp24	DDB0191175	24,1	5,40
1810	-1,39/-2,05	<i>cadA</i>	glycoprotein gp24	DDB0191175	24,1	5,40
1811	-2,18/-1,91	<i>cadA</i>	glycoprotein gp24	DDB0191175	24,1	5,40
1909	-1,96/-1,22	JC2V2_0_02739		DDB0167100	40,4	6,99
2035	-6,87/-7,54	JC1V2_0_00294		DDB0189496	19,4	6,90
2135	1,98/1,73	<i>sodA</i>	superoxide dismutase	DDB0191290	15,8	5,85
2256	-1,52/-1,72	BEC6V2_0_01382		DDB0192224	13,4	6,24
2281	1,88/1,69	<i>pkiA</i>	similar to protein kinase C inhibitor	DDB0216234	14,1	6,58

Tab. 3.9: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine des Experiments DIGE-II, Gele 1-6

Die Angaben zur Av. Ratio beruhen auf dem Quotient der Fluoreszenzintensitäten von AX2 zu JH.D2

Von den insgesamt 22 identifizierten Proteinen wurde die Hälfte in Zellen des Wildtyp-Stamms AX2 verstärkt exprimiert. An dieser Stelle wird nicht auf solche Proteine bzw. Gene eingegangen, über deren Funktion momentan keine genaueren Informationen bekannt sind. Das gleiche gilt für Proteine, die schon in einem vorherigen Kapitel ausführlich beschrieben wurden (Spot Nr. 1448, Nr. 1538 und Nr. 1726). Das Gen *argE* (Spot Nr. 781) kodiert für eine Acetylornithin-Deacetylase. Es gehört neben den Enzymen aus diversen anderen Spezies zu einer Gruppe von Metalloexopeptidasen [BIAGINI & PUIGSERVER 2001] und hat demnach Einfluß auf den Metabolismus von *D. discoideum*. β -Tubulin (Spot Nr. 1277) sowie das Protein

α -Tubulin sind heteromere Untereinheiten von Filamenten des Zytoskeletts, den röhrenförmigen Mikrotubuli. Diese sind während der Mitose für den Aufbau des Spindelapparates verantwortlich [MANDELKOW & MANDELKOW 1995] und generell an einer Vielzahl von Transportprozessen beteiligt. Das Gen *alrA* (Spot Nr. 1411) kodiert für eine Aldehyd-Reduktase. Dieses Enzym ist unter anderem für die Umwandlung von Glucose in Sorbitol verantwortlich ist. Die Menge an exprimierter Aldehyd-Reduktase scheint abhängig vom sogenannten *counting factor* (CF) zu sein. Zellen, in denen das *alrA*-Gen zerstört wurde, formen sehr viel größere Aggregate als Wildtyp-Zellen und sind durch eine reduzierte Beweglichkeit gekennzeichnet [EHRENMAN *et al.*, 2004]. Des weiteren scheiden solche *alrA knockout*-Stämme wesentlich geringere Mengen an Countin und CF50, beides Bestandteile des *counting factor* Komplexes, aus [EHRENMAN *et al.*, 2004]. Discoidin I (Spot Nr. 1536 sowie Nr. 1538) ist einer der am besten charakterisierten Protein-Marker von *D. discoideum* beim Übergang vom Wachstum zur Entwicklung. In Dd-STATb Null-Mutanten konnte eine verstärkte Expression von Discoidin I während des Wachstums und in der frühen Entwicklungsphase beobachtet werden [ZHUKOVSKAYA *et al.*, 2004]. Das Protein Adenylat-Kinase (Spot Nr. 1748) katalysiert die Übertragung eines Phosphatrestes von ATP auf AMP und ist somit an der *de novo* Synthese der DNA beteiligt. Das von dem Gen *cadA* kodierte Proteine DdCAD-1 (oder auch gp24, Spot Nr. 1798, Nr. 1799, Nr. 1810 und Nr. 1811) ist ein Calcium-abhängiges Zelladhäsions-Protein. Es wird während der Entwicklung als erstes von insgesamt drei verschiedenen Adhäsions-Molekülen (neben DdCAD-1 sind dies csA/gp80 und LagC/gp150) exprimiert und akkumuliert schnell innerhalb der ersten Stunden [KNECHT *et al.*, 1987]. Die Expression von DdCAD-1 wird dabei durch den *Pre-Starvation-Factor* (PSF) angeregt [RATHI *et al.*, 1991]. Durch das Gen *sodA* wird eine Superoxiddismutase (Spot Nr. 2135) kodiert. Das Protein wird in der Phase der späten Entwicklung verstärkt exprimiert. Zellen, in denen das *sodA* Gen zerstört wurde, weisen keinen auffälligen Phänotyp auf. Demnach scheint es nicht essentiell für das Wachstum und die Entwicklung zu sein [AKAZA *et al.*, 2002]. Durch das Gen *pkiA* kommt es zur Expression eines Proteins, das laut dem Eintrag in der *DictyBase* einem Inhibitor der Proteinkinase C gleicht. Näheres ist zur Zeit über dieses Protein leider nicht bekannt.

Von den insgesamt 36 zwischen den beiden *D. discoideum*-Stämmen differentiell exprimierten Proteinen des zweiten Ansatzes dieses Versuchs (Gele 7-12, kein Übersichtsbild zur Lage der einzelnen *Spots* gezeigt) konnten leider nur sieben identifiziert werden. Die charakteristischen Eigenschaften dieser Proteine sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tab. 3.10).

Spot Nr.	Av. Ratio t_0/t_2	Gen Name	Gen Produkt	DictyBaseID	theoretische/er	
					Masse [kDa]	pI
417	-1,68/-1,71	BEC6V2_0_01236		DDB0219884	80,9	5,19
866	1,77/1,80	<i>argE</i>	acetylmithine deacetylase	DDB0191165	49,4	5,28
1152	1,35/1,92	<i>capA</i>	cAMP-binding protein	DDB0185022	31,7	6,11
1401	1,15/1,97	JC1V2_0_00299		DDB0189501	33,4	5,76
1590	-1,65/-1,72	<i>dscB</i>	Discoidin I, beta chain	DDB0215401	28,8	6,58
1772	-3,35/-3,15	DDB0229909	putative O-methyltransferase	DDB0229909	25,9	5,57
1863	-2,21/-2,21	<i>cadA</i>	glycoprotein gp24	DDB0191175	24,1	5,40

Tab. 3.10: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine des Experiments DIGE-II, Gele 7-12

Die Angaben zur Av. Ratio beruhen auf dem Quotient der Fluoreszenzintensitäten von AX2 zu JH.D2

Da über die anderen Proteine momentan nichts Näheres bekannt ist bzw. sie schon ausführlicher an früher Stelle besprochen wurden, wird hier nur auf das Produkt des Gens *capA* (Spot Nr. 1152) eingegangen. Dabei handelt es sich um das cAMP-bindende Protein CABP1, das in seiner Funktion eng mit den beiden Polypeptiden p31 und p34 verknüpft ist. Stämme, die beide Polypeptide nur noch als extrem verkürzte Fragmente exprimieren, zeigen ein deutlich verlangsamtes Wachstum bei der Kultivierung auf Bakterien. Dieses kann beim Wachstum in axenischen Schüttelkulturen allerdings nicht beobachtet werden. Des weiteren weisen sie ein verändertes Entwicklungsprofil auf. Sie benötigen etwa drei Stunden länger als Wildtyp-Stämme, bevor sie Fruchtkörper ausbilden [BAIN & TSANG 1991].

3.3.3 DIGE-Experiment III

3.3.3.1 Hintergrund

CbfA besteht aus 1000 Aminosäuren. Das Protein kann in mehrere funktionelle Domänen unterteilt werden. Zu diesen zählen die JmjC-Domäne und drei ungewöhnlich strukturierte Zinkfinger (Abb. 3.19). Daneben findet sich eine

Asparagin-reiche Domäne unbekannter Funktion, die den C-terminalen Rest abtrennt. Innerhalb der C-terminalen Domäne befindet sich ein AT-Haken, der für die Bindung an DNA *in vitro* notwendig ist [HORN *et al.*, 1999].

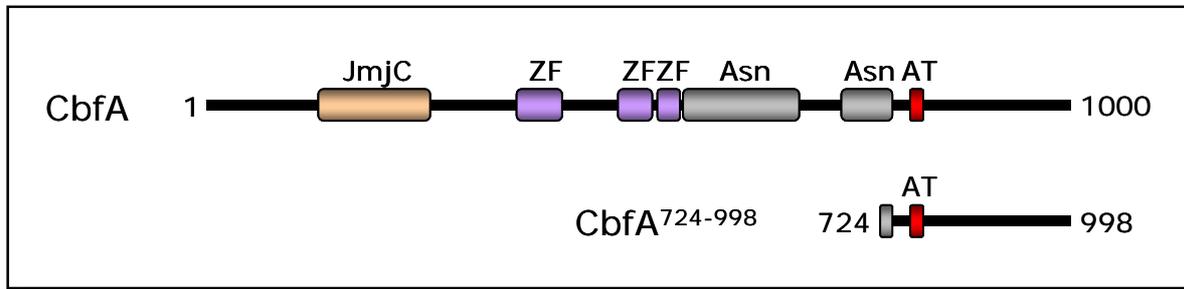


Abb. 3.19: Struktur des C-terminalen Fragments rCbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸

Die Abbildung zeigt die Struktur und die charakteristischen Domänen des Derivats rCbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ (unten) verglichen mit denen des Wildtyp-Proteins CbfA (oben). **JmjC**: JumonjiC-Domäne; **ZF**: Zink-Finger; **Asn**: Asparagin-reiche Bereiche; **AT**: AT-Haken

Aus den Analysen vorangegangener Komplementations-Experimente war bekannt, daß der Entwicklungsphänotyp der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 durch die Expression des C-terminalen Derivats rCbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ anhand des Expressionsplasmides PB1 (siehe unten) nur sehr ungenügend revertiert werden konnte [BECK 2003]. In manchen Experimenten zeigten sich sehr kleine Fruchtkörper, allerdings war die Entwicklung des Stamms JH.D2[PB1] in den meisten Experimenten vom JH.D2-Phänotyp kaum zu unterscheiden (Abb. 3.20).

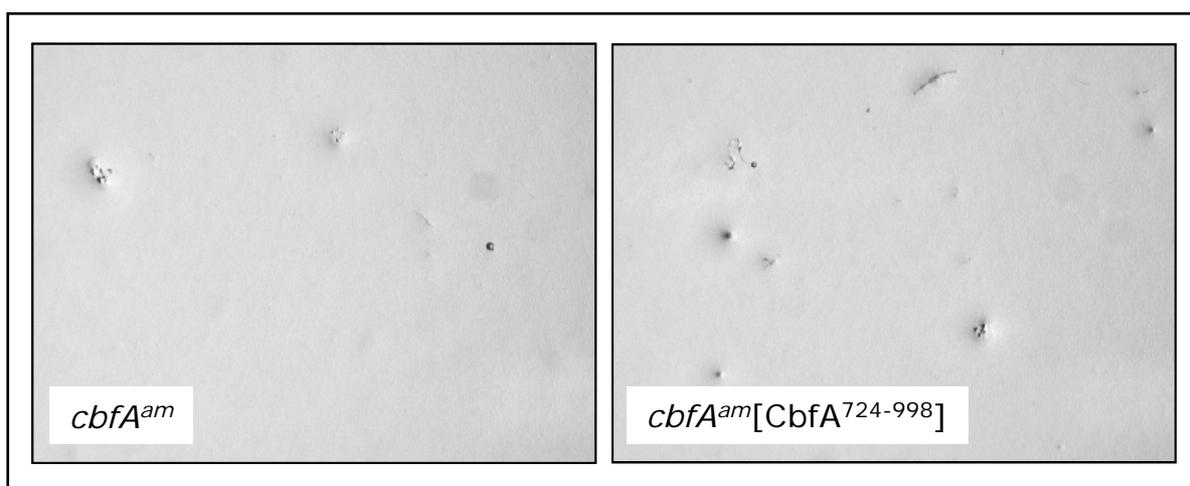


Abb. 3.20: Morphologie der Transformante JH.D2[PB1] auf Agar-Phosphat-Platten

Zellen der Transformante JH.D2[PB1] (rechts) zeigen in Komplementations-Experimenten eine ungenügende Revertierung des in der Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 (links) beobachteten Phänotyps auf. Erläuterungen: siehe Text

Nach diesen Experimenten zu urteilen reicht der C-Terminus von CbfA allein nicht aus, um die für multizelluläre Entwicklung notwendige Expression entwicklungs-regulierter Gene zu unterstützen. Im Gegensatz dazu konnte durch Northern-Blot-Analysen gezeigt werden, daß die in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 stark reduzierten Transkriptmengen des Retrotransposons TRE5-A innerhalb der JH.D2[PB1] Transformante erheblich gesteigert sind [BECK 2003] (Abb. 3.21). Ob die Zunahme der TRE5-A-Transkriptionsstärke gleichzeitig auch einen Anstieg der Retrotranspositions-Frequenz zur Folge hat, konnte bis jetzt allerdings noch nicht gezeigt werden. Demnach reicht der C-Terminus von CbfA aus, um die Transkriptmenge von TRE5-A in *D. discoideum*-Zellen zu regulieren. Diese Experimente deuten an, daß der C-Terminus von CbfA unabhängig vom Rest des Proteins genregulatorische Funktionen ausfüllen könnte. Daher sollte mittels Proteomanalyse versucht werden, Proteine zu identifizieren, die durch die autonome Funktion des C-terminalen Teils von CbfA in ihrer Expression reguliert werden.

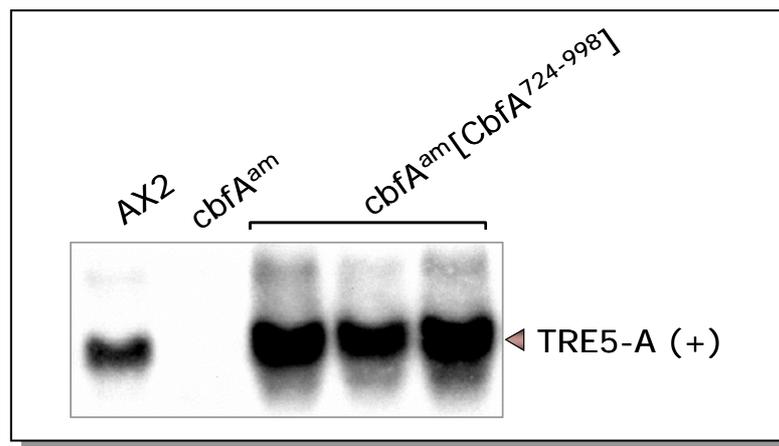


Abb. 3.21: Northern-Blot-Analyse zur Untersuchung der TRE5-A-Transkriptionsstärke

Die Expression des CbfA-Derivats rCbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ in JH.D2[PB1] führt sowohl zu einer Erhöhung der Plus-Strang-Transkription als auch der Minus-Strang-Transkription (Daten nicht gezeigt) von TRE5-A verglichen mit der in AX2. In der Probe der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 konnte in diesem Experiment keine TRE5-A-Transkription detektiert werden.

Es wurde untersucht, ob die Transformation des Expressions-Plasmids PB1 in den *D. discoideum*-Stamm JH.D2 zu einer Revertierung differentiell exprimierter Proteine führt. Das Plasmid PB1 kodiert unter der Kontrolle eines Aktin-15-Promotors für eine Sequenz von Position 2579 bis Position 3403 innerhalb des *cbfA*-Gens. Dadurch kommt es zu Expression eines Derivats rCbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ mit einer Länge 278 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 31,5 kDa [BECK 2003].

Das exprimierte C-terminale Fragment enthält demnach einen Teil der zweiten Asparagin-reichen Domäne sowie den AT-Haken des CbfA^{wt}-Proteins (Abb. 3.19). Vor Beginn der 2D-gelelektrophoretischen Untersuchung wurden Proben des transformierten JH.D2[PB1]-Stamms zunächst im Western-Blot bezüglich der Expression des C-terminalen Fragments rCbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ überprüft. Als Positivkontrollen wurden Zelllysate des Wildtyps AX2, als Negativkontrolle Zellextrakte untransformierter JH.D2 Stämme eingesetzt (Abb. 3.22).

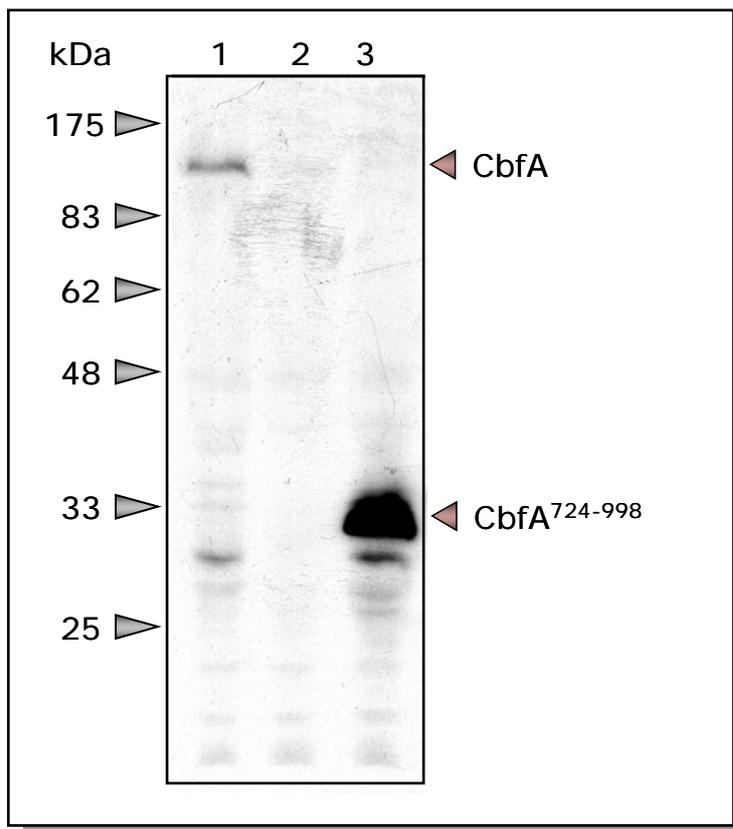


Abb. 3.22: Western-Blot-Analyse zur Überprüfung der Expression des Fragments rCbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ in JH.D2[PB1]

Proben: Zelllysate (Spur 1: AX2, Spur 2: JH.D2, Spur 3: JH.D2[PB1]), PAA-Gel: 10%,
Detektion: CbfA-Antikörper 7F3, Erläuterung: siehe Text

Dabei zeigte sich, daß durch die Verwendung eines gegen den C-terminalen Bereich des CbfA-Proteins gerichteten monoklonalen Antikörpers (7F3) sowohl das CbfA^{wt}-Protein aus AX2 als auch das Fragment rCbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ aus JH.D2[PB1] detektiert werden konnte. Die Probe von AX2 (Abb. 3.22, Spur 1) zeigte auf der Höhe von ca. 114 kDa die erwartete Bande für CbfA auf. Erwartungsgemäß fehlt die CbfA-Bande in den *cbfA^{am}*-Stämmen JH.D2 (Abb. 3.22, Spur 2) und JH.D2[Pb1] (Abb. 3.22, Spur 3). In einer Proben des transformierten Stamms JH.D2[PB1] (Abb.

3.22, Spur 3) wurde auf der Höhe des errechneten Molekulargewichts von 31,5 kDa eine sehr deutliche Bande für das Protein rCbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ nachgewiesen. Die dabei festgestellte auffällige Überexpression des rCbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸-Proteins im Vergleich zum Wildtyp-CbfA kann mit der verstärkten Transkription durch den Aktin-15-Promotor und die dadurch gesteigerte Expression des C-terminalen Fragments erklärt werden.

3.3.3.2 Versuchsaufbau

Bei der 2D-gelelektrophoretischen Untersuchung der Proben JH.D2 und JH.D2[PB1] wurden ausschließlich Proben von logarithmisch wachsenden Zellen verwendet. Die einzelnen Proben wurden unter Verwendung der *dye-flip* Methode mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert, entsprechend der folgenden Tabelle auf insgesamt vier Gele aufgetragen (Tab. 3.11) und anschließend analysiert. Folglich wurden aus diesem Versuch 12 virtuelle 2D-Gele erhalten.

Gel Nr.	Streifen Nr.	Cy3	Cy5	Cy2
1	89009	PB1 t ₀	JH.D2 t ₀	Interner Standard
2	89010	PB1 t ₀	JH.D2 t ₀	Interner Standard
3	89011	JH.D2 t ₀	PB1 t ₀	Interner Standard
4	98447	JH.D2 t ₀	PB1 t ₀	Interner Standard

Tab. 3.11: Versuchsaufbau DIGE-Experiment III

3.3.3.3 Versuchsauswertung

Bei der Analyse dieser vier Gele wurden durchschnittlich 2131 *Spots* detektiert, von denen insgesamt 1295 zwischen den 12 virtuellen Gelen abgeglichen werden konnten. Von diesen wurden schließlich 32 Proteine ausgesucht, welche die für die Auswertung festgelegten Kriterien (vorhanden in mind. 9 von 12 Gelen; T-test: $p \leq 0,05$; *Average Ratio*: $\geq |1,7|$) erfüllten. Die Proben wurden anschließend zur späteren massenspektrometrischen Untersuchung ausgeschnitten.

3.3.3.4 Massenspektrometrische Analyse

Von den 32 untersuchten Proteinen konnten insgesamt 12 identifiziert werden. Die charakteristischen Eigenschaften dieser Proteine sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt (Tab. 3.12).

Spot Nr.	Av Ratio	Gen Name	Gen Produkt	DictyBaseID	theoretische/er	
					Masse [kDa]	pI
186	-2,45	<i>pyd1</i>	dihydropyrimidine dehydrogenase	DDB0231100	112,6	6,09
680	1,73	<i>Zwf</i>	glucose 6-phosphate-1-dehydrogenase	DDB0231285	56,8	7,16
983	-2,37	<i>acnB</i>	Aconitase	DDB0230168	83,9	8,19
1024	-2,76	<i>tat</i>	tyrosine transaminase	DDB0230996	46,9	6,21
1383	-1,72	<i>act23</i>	actin	DDB0220461	40,3	5,56
1457	1,99	JC1V2_0_00299		DDB0189501	33,4	5,76
1493	1,80	BC4V2_0_01063		DDB0186311	31,9	4,80
1571	1,93	JC1V2_0_00789		DDB0202301	33,8	8,28
1612	-11,83	<i>dscB</i>	Discoidin I, beta chain	DDB0215401	33,4	5,76
1814	-2,18	DDB0229909	putative O-methyltransferase	DDB0229909	25,9	5,57
1972	1,79	DDB0231432	putative glutathione S-transferase	DDB0231432	22,5	5,8
2258	-1,97	<i>cofA</i>	cofilin	DDB0214987	15,7	6,29

Tab. 3.12: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine des Experiments DIGE-III

Die Angaben zur Av. Ratio beruhen auf dem Quotient der Fluoreszenzintensitäten von JH.D2[PB1] zu JH.D2

Die in diesem Experiment identifizierten Proteine erfüllen, soweit überhaupt bekannt, größtenteils Aufgaben aus dem Bereich Translation/Metabolismus. So kodiert z. B. das Gen *pyd1* (Spot Nr. 186) für eine Dihydropyrimidin-Hydrogenase, welche die Umwandlung von Dihydrouracil in Uracil katalysiert. Das Enzym Aconitase, Produkt des *acnB*-Gens (Spot Nr. 983), reguliert im Zitrat-Zyklus die Umwandlung von Zitrat in cis-Aconitat und das Gen *tat* (Spot Nr. 1024) ist für die Expression einer Tyrosin-Transaminase verantwortlich. Ausnahmen bilden dabei die Proteine Aktin (Spot Nr. 1383) und Cofilin (Spot Nr. 2258), die beide am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind. Cofilin ist in der Lage Aktin Filamente zu depolymerisieren und scheint für das Wachstum und die Entwicklung von *D. discoideum* ein essentielles Protein zu sein [AIZAWA *et al.*, 1995]. Von den 12 identifizierten Proteinen wurden insgesamt sieben verstärkt in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 exprimiert. Discoidin I *beta chain* (Spot Nr. 1612) weist dabei mit einem Faktor von 11,83 den mit Abstand höchsten Wert auf. Die Funktion von Proteinen bzw. derer Gene, die in dieser Zusammenfassung nicht genauer dargelegt wurden, sind zur Zeit noch nicht aufgeklärt bzw. wurden an früherer Stelle schon ausführlich beschrieben (Spot Nr. 1612 und Spot Nr. 1814).

3.3.4 DIGE-Experiment IV

3.3.4.1 Hintergrund

Neben den Proben der beiden Stämme JH.D2 und JH.D[PB1] aus dem vorherigen Versuch (DIGE III) wurden in diesem Ansatz zusätzlich Proteine des Stamms AX2 analysiert. Dadurch sollte untersucht werden, in wieweit die Expression von rCbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ im Stamm JH.D[PB1] die veränderte Proteinexpression in JH.D2 wieder zum Wildtyp (AX2) revertieren kann.

3.3.4.2 Versuchsaufbau

Für die 2D-gelelektrophoretische Untersuchung der drei Stämme AX2, JH.D2 und JH.D2[PB1] wurden ausschließlich Proben zum Zeitpunkt t_0 der frühen Entwicklung verwendet. Neben der Anwendung der *dye-flip* Methode zur Fluoreszenzmarkierung sollten die analysierten Proben mit jeder der jeweils anderen im Experiment beteiligten Proben einmal auf dem gleichen IPG-Streifen fokussiert werden. Der aus dieser Überlegung resultierende Versuchsaufbau ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 3.13). Demnach entstanden sechs reale 2D-Gele, die aufgrund der jeweils enthaltenen Information der unterschiedlich markierten Proben einer Anzahl von insgesamt 18 virtuellen 2D-Gele entsprachen.

Gel Nr.	Streifen Nr.	Cy3	Cy5	Cy2
1	68728	AX2 t_0	JH.D2 t_0	Interner Standard
2	68730	JH.D2 t_0	PB1 t_0	Interner Standard
3	68745	PB1 t_0	AX2 t_0	Interner Standard
4	68747	JH.D2 t_0	AX2 t_0	Interner Standard
5	69104	PB1 t_0	JH.D2 t_0	Interner Standard
6	69105	AX2 t_0	PB1 t_0	Interner Standard

Tab. 3.13: Versuchsaufbau DIGE-Experiment IV

Nach dem *Scannen* der 2D-Gele stellte sich heraus, daß es bei drei der sechs Gele (Gel 2, Gel 3 und Gel 6) im Verlauf der elektrophoretischen Auftrennung in der zweiten Dimension zu lokalen Überhitzungen innerhalb der Glaskassetten gekommen sein muss. Dies hatte eine verstärkte Diffusion der Proteine, vor allem solcher mit einem hohen Molekulargewicht, zur Folge (Abb. 3.23).

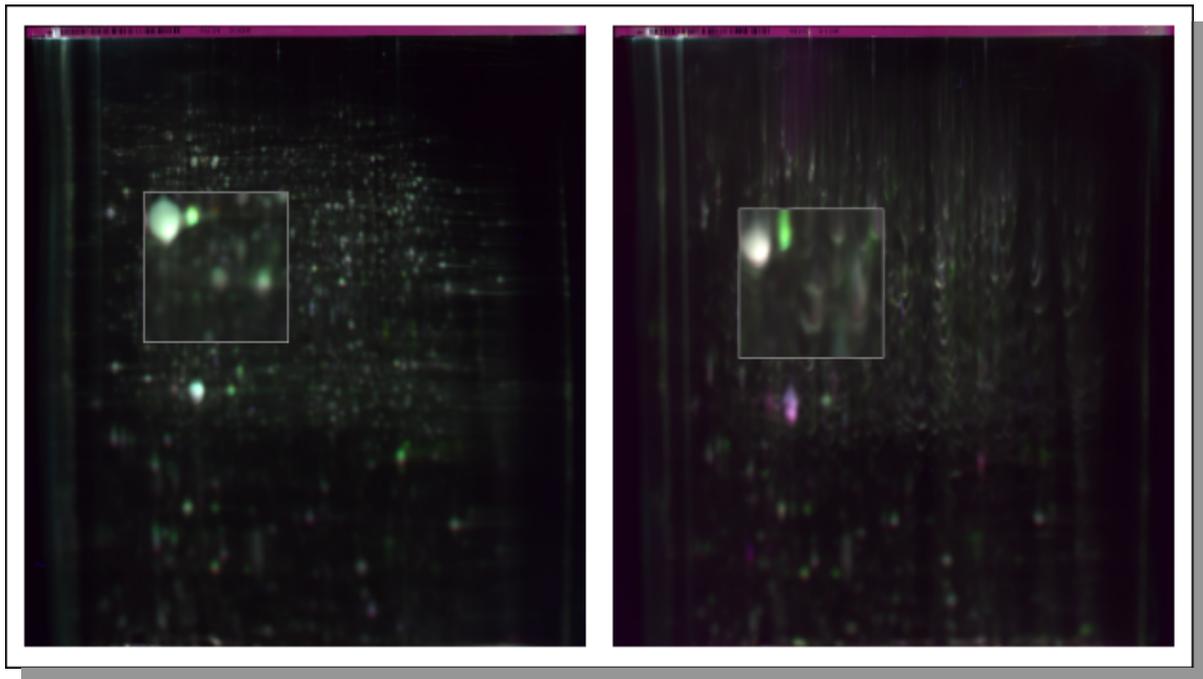


Abb. 3.23: Vergleich unterschiedlicher 2D-Gele des Experiments DIGE IV

Darstellung der eingescannten Gele durch die *ImageQuant-Software* (overlay der drei Fluoreszenzfarbstoffe); links: Gel Nr. 5, rechts: Gel Nr 3; die Abbildung zeigt deutlich, daß die Überhitzung in dem Gel Nr. 3 und die damit verbundene verstärkte Diffusion der Proteine zu einer extremen Schlierenbildung geführt hat (vergrößerter Bildausschnitt jeweils auf der Höhe von Aktin)

Durch eine Auswertung der verbliebenen drei Gele konnten keine gesicherten statistischen Aussagen über differentiell exprimierte Proteine zwischen den untersuchten Proben getroffen werden. Allein drei der vier Gele, auf denen Proben von PB1 aufgetragen waren, standen nicht mehr zur Verfügung. Es wurden daher insgesamt vier weitere Gele mit den drei Proben AX2, JH.D2 und PB1 angefertigt (Tab. 3.14).

Gel Nr.	Streifen Nr.	Cy3	Cy5	Cy2
7	68694	AX2 t ₀	PB1 t ₀	Interner Standard
8	69072	JH.D2 t ₀	PB1 t ₀	Interner Standard
9	69106	PB1 t ₀	AX2 t ₀	Interner Standard
10	75663	PB1 t ₀	JH.D2 t ₀	Interner Standard

Tab. 3.14: Versuchsaufbau DIGE-Experiment IV, zusätzliche Gele

3.3.4.3 Versuchsauswertung

Für die Analyse des Experiments wurden schließlich die Bilder der Gele 1, 4, 5, 7, 9 und 10 verwendet. Dabei wurden im Durchschnitt 2212 Spots pro Gel detektiert. Insgesamt 1390 Spots konnten zwischen den 18 virtuellen Gelen abgeglichen

werden. Nach der Auswertung verblieben 109 Spots, die den festgelegten Kriterien dieses Experiments entsprachen (vorhanden in mind. 15 von 18 Gelen; T-test: $p \leq 0,05$; *Average Ratio*: $\geq |1,7|$). Da kein einheitliches Expressionsmuster dieser differentiell exprimierten Proteine innerhalb der drei untersuchten Proben festzustellen war, wurden die einzelnen Proteine je nach Expressionsprofil in insgesamt acht Gruppen eingeteilt. Eine graphische Darstellung der jeweiligen Leitprofile ist nachfolgend für jede der acht Gruppen abgebildet. Dabei sind die Intensitäten der gemessenen Fluoreszenz (y-Achse) der einzelnen Proben (x-Achse) jeweils im Verhältnis zum mitgeführten Standard (Null-Wert der y-Achse) aufgetragen. Von diesen insgesamt 109 Proteinen wurden letztendlich 62 ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht.

Gruppe 1: $AX2 \approx JH.D2 > JH.D2[PB1]$

Diese Gruppe faßt solche Expressionsmuster zusammen, bei der die Proteine der Proben AX2 und JH.D2 etwa auf gleichem Niveau exprimiert wurden. Der Wert der gemessenen Fluoreszenzintensitäten lag dabei oberhalb des Standard-Werts. Verglichen damit konnten die entsprechenden Proteine in der Probe JH.D2[PB1] nur in einem stark reduzierten Ausmaß detektiert werden (Abb. 3.24).

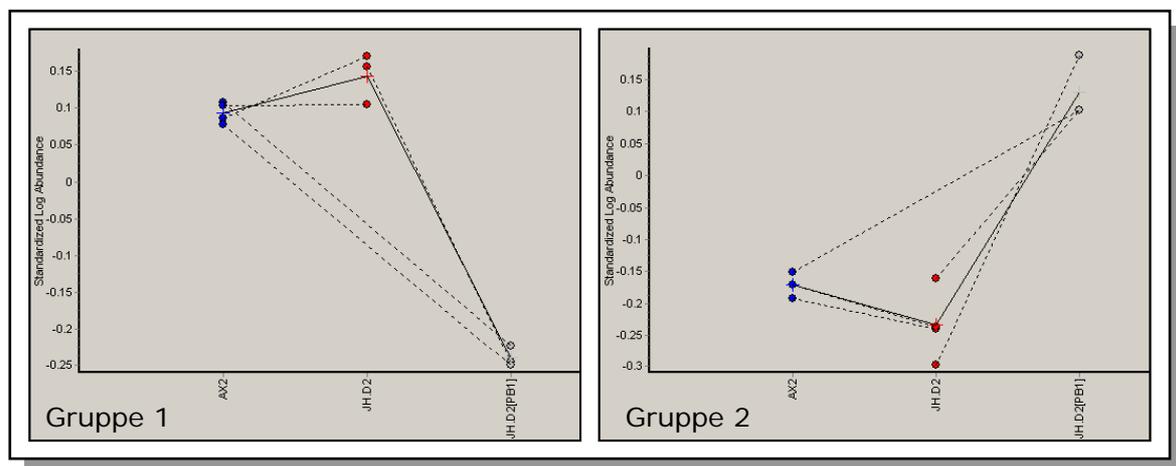


Abb. 3.24: Leitprofil der Proteinexpression der Gruppen 1 und 2 (DIGE-Experiment IV)

Repräsentatives Expressionsprofil jeweils eines Proteins pro Gruppe, erhalten aus insgesamt sechs unabhängigen 2D-Gelen

Gruppe 2: $AX2 \approx JH.D2 < JH.D2[PB1]$

Das Expressionsmuster in dieser Gruppe ist ebenfalls dadurch gekennzeichnet, daß sowohl die Proteine der Probe AX2 als auch die der Probe JH.D2 etwa auf dem

gleichen Niveau exprimiert wurden. Verglichen mit dem Standard wurden die Proteine beider Proben allerdings in einem geringeren Umfang exprimiert. Im Gegensatz zu den Expressionsmustern der Gruppe 1 wurden Proteine der Probe JH.D2[PB1] in einem verstärkten Ausmaß exprimiert (Abb. 3.24). Demnach verhalten sich die Gruppen 1 und 2 in etwa wie Spiegelungen an der x-Achse zueinander.

Gruppe 3: AX2 > JH.D2 > JH.D2[PB1]

In dieser Gruppe sind Expressionsmuster zusammengefaßt, in der Proteine der Probe AX2 deutlich am stärksten und Proteine der Proben JH.D2[PB1] mit Abstand am schwächsten exprimiert wurden. Das Niveau der Expression von Proteinen der Probe JH.D2 liegt etwa in der Mitte zwischen den Proben von AX2 und JH.D2[PB1] (Abb. 3.25).

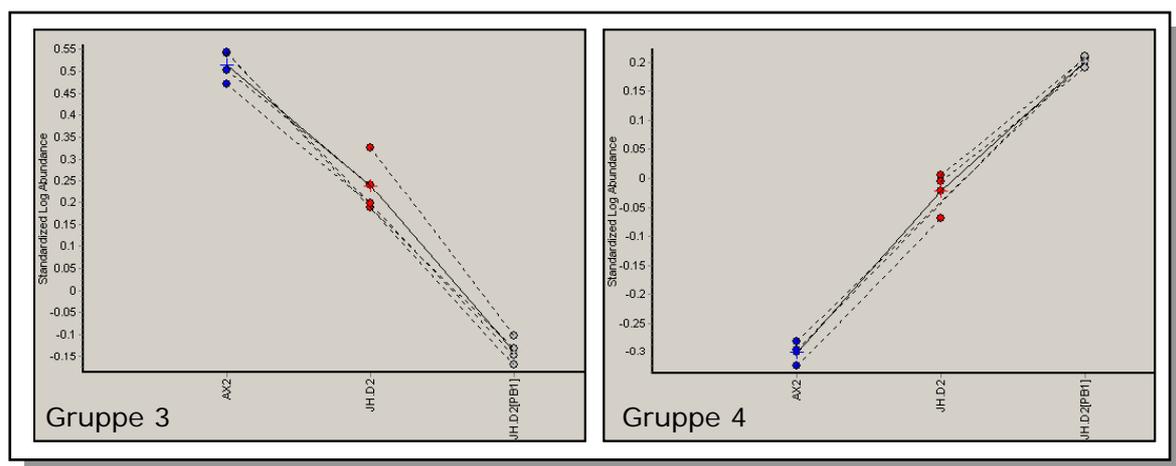


Abb. 3.25: Leitprofil der Proteinexpression der Gruppen 3 und 4 (DIGE-Experiment IV)

Repräsentatives Expressionsprofil jeweils eines Proteins pro Gruppe, erhalten aus insgesamt sechs unabhängigen 2D-Gelen

Gruppe 4: AX2 < JH.D2 < JH.D2[PB1]

Die Expressionsmuster dieser Gruppe verhalten sich umgekehrt zu denen aus Gruppe 3. Proteine der Proben von AX2 wurden hier nur in einem sehr geringen Umfang exprimiert. Die Expression von Proteinen der Probe JH.D2[PB1] zeigten dagegen das höchste Niveau auf. Ebenfalls wie in Gruppe 3 wurden die Proteine der Probe JH.D2 in der Gruppe 4 in einem Ausmaß exprimiert, das sich ziemlich genau zwischen dem der Proben AX2 und dem der Probe JH.D2[PB1] befand (Abb. 3.25).

Gruppe 5: $AX2 > JH.D2 \approx JH.D2[PB1]$

Diese Gruppe faßt solche Expressionmuster zusammen, bei der Proteine der Probe AX2 auf dem höchsten Niveau exprimiert wurden. Proteine der Proben JH.D2 und JH.D2[PB1] wurden etwa in dem gleichen Umfang, jedoch deutlich unterhalb dem von AX2, exprimiert (Abb. 3.26).

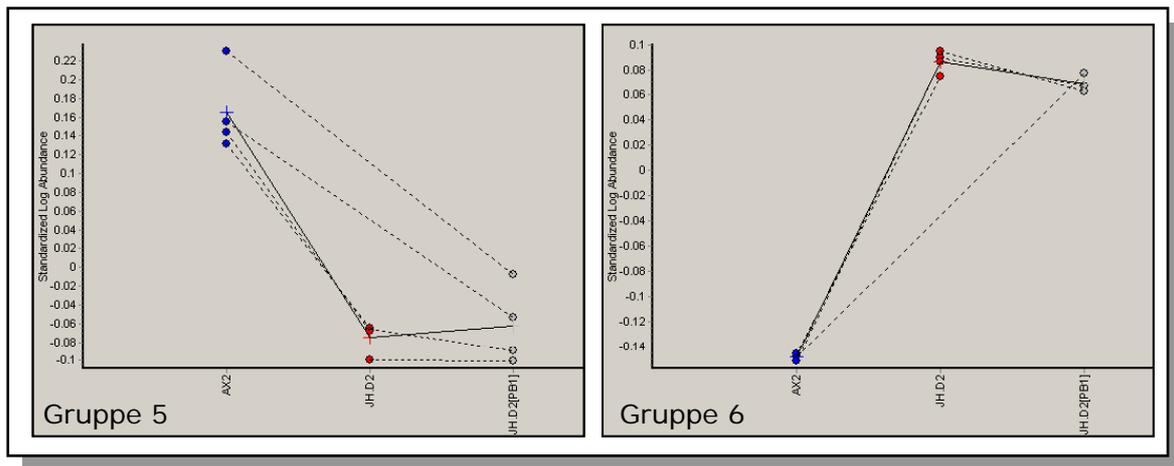


Abb. 3.26: Leitprofil der Proteinexpression der Gruppen 5 und 6 (DIGE-Experiment IV)

Repräsentatives Expressionsprofil jeweils eines Proteins pro Gruppe, erhalten aus insgesamt sechs unabhängigen 2D-Gelen

Gruppe 6: $AX2 < JH.D2 \approx JH.D2[PB1]$

Die Expressionmuster dieser Gruppe verhalten sich umgekehrt zu denen aus Gruppe 5. Die Proteine der Probe AX2 wurden mit Abstand am schwächsten exprimiert. Damit verglichen wurden Proteine der Probe JH.D2 als auch Proteine der Probe JH.D2[PB1] in einem weit stärkeren Ausmaß etwa auf selbem Niveau exprimiert (Abb. 3.26).

In den Gruppen 7 und 8 sind Proteine zusammengefaßt, bei denen sich das Expressionsprofil der JH.D2[PB1]-Transformanten weitestgehend so verhält wie das der Proteine des Wildtyp-Stamms AX2. Diese Gruppen sind zusätzlich in je drei Untergruppen (a-c) aufgeteilt.

- Gruppe 7: $AX2 > JH.D2$
- 7a: $AX2 \approx JH.D2[PB1]$
 - 7b: $AX2 > JH.D2[PB1]$
 - 7c: $AX2 < JH.D2[PB1]$

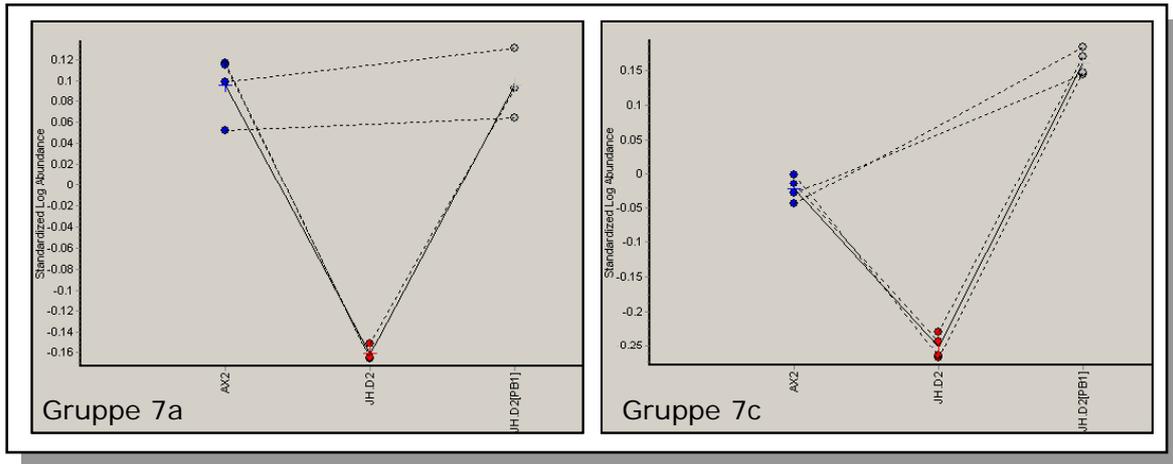


Abb. 3.27: Leitprofil der Proteinexpression der Gruppen 7a und 7c (DIGE-Experiment IV)

Repräsentatives Expressionsprofil jeweils eines Proteins pro Gruppe, erhalten aus insgesamt sechs unabhängigen 2D-Gelen

Allen Mitgliedern der Gruppe 7 ist gemeinsam, daß Proteine der Probe AX2 auf einem deutlich höheren Niveau exprimiert wurden als die der Probe JH.D2. Proteine der Probe JH.D2[PB1] waren entsprechend der Einteilung a-c gleich stark, weniger stark oder stärker exprimiert als in der Probe AX2. Ihre Expression lag in keinem Fall unterhalb der Expression von Proteinen der Probe JH.D2 (Abb. 3.27).

- Gruppe 8: AX2 < JH.D2 8a: AX2 ≈ JH.D2[PB1]
- 8b: AX2 > JH.D2[PB1]
- 8c: AX2 < JH.D2[PB1]

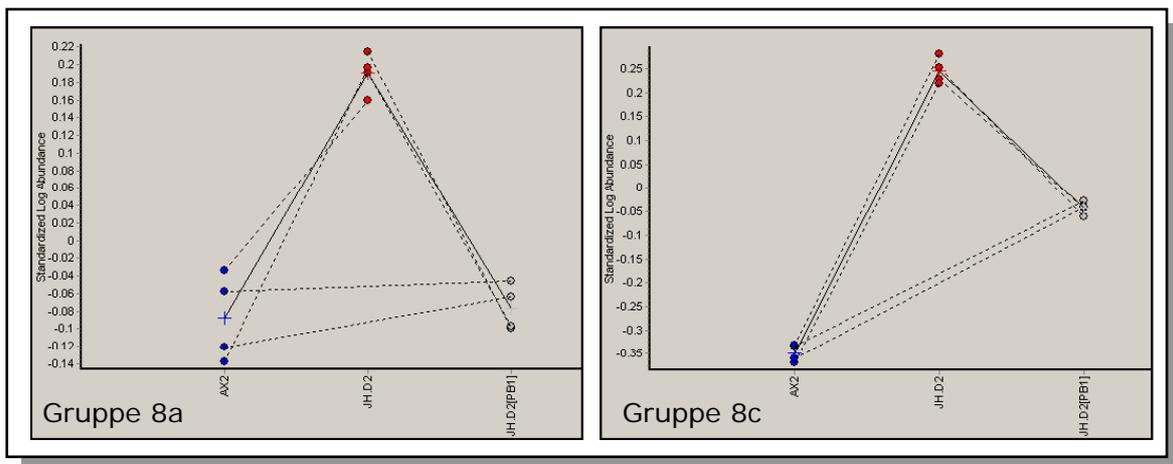


Abb. 3.28: Leitprofil der Proteinexpression der Gruppen 8a und 8c (DIGE-Experiment IV)

Repräsentatives Expressionsprofil jeweils eines Proteins pro Gruppe, erhalten aus insgesamt sechs unabhängigen 2D-Gelen

In Gruppe 8 sind die Proteine zusammengefaßt, deren Expression in Probe JH.D2 deutlich über dem Niveau ihrer Expression in Probe AX2 lag. In Probe JH.D2[PB1] waren die Proteine entsprechend der Einteilung a-c, gleich stark, weniger stark oder stärker exprimiert als in Probe AX2. Ihre Expression lag in keinem Fall oberhalb der Expression der Proteine in Probe JH.D2 (Abb. 3.28).

3.3.4.4 Massenspektrometrische Analyse

Von den 62 untersuchten Proteinen konnten insgesamt 19 identifiziert werden. Die charakteristischen Eigenschaften dieser Proteine sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt (Tab. 3.15).

Spot Nr.	Gruppe	Gen Name	Gen Produkt	DictyBaseID	theoretische/er	
					Masse [kDa]	pI
628	3	mhsp70		DDB0215366	71,6	5,89
794	3	JC1V2_0_01541	ATP synthase beta-subunit	DDB0190669	71,0	5,62
911	4	Zwf	glucose 6-phosphate-1-dehydrogenase	DDB0231285	56,7	7,16
935	3	JC1V2_0_01541	ATP synthase beta-subunit	DDB0190669	71,0	5,62
951	3	DDB0229934		DDB0229934	62,1	7,12
985	1	vatB	vacuolar H+ ATPase B subunit	DDB0185207	55,0	5,53
989	6	cap	cyclase associated protein	DDB0191139	49,9	6,97
1010	3	DDB0231503	aldehyde dehydrogenase	DDB0231503	54,8	7,04
1045	5	argE	acetylornithine deacetylase	DDB0191165	49,4	5,28
1164	8c	aciA	actin-like protein	DDB0219936	47,0	5,72
1380	7b	capA	cAMP-binding protein	DDB0185022	31,4	5,67
1433	4	fba	fructose-bisphosphate aldolase	DDB0231387	39,1	7,01
1438	4	sevA	severin	DDB0232954	40,1	7,60
1447	3	BC4V2_0_00572		DDB0185816	40,8	6,28
1661	4	alrA	aldo-keto reductase	DDB0215363	33,8	5,95
1712	7a	JC1V2_0_00789		DDB0202301	33,8	8,28
1771	7b	dscA	Discoidin I, A chain	DDB0215400	28,7	6,2
1892	7a	act5	actin	DDB0220447	41,8	5,23
1938	8c	DDB0229909	putative O-methyltransferase	DDB0229909	25,9	5,57

Tab. 3.15: Identifizierte differentiell exprimierte Proteine des Experiments DIGE IV

An dieser Stelle wird nicht auf Proteine bzw. ihre Gene eingegangen, deren genaue Funktion zur Zeit nicht bekannt ist. Gleiches gilt für solche Proteine, die bereits an

früherer Stelle ausführlich beschrieben wurden (Spot Nr. 911, Nr. 1045, Nr. 1380, Nr. 1661, Nr. 1712, Nr. 1771, Nr. 1892 und Nr. 1938). Bei dem Protein DDB0229934 (Spot Nr. 951) handelt es sich höchst wahrscheinlich um eine Dehydrogenase, welche für die Umwandlung von Glutamat in 1-Pyrolin-5-Carboxylat verantwortlich ist und somit einen wichtigen Schritt bei der Synthese von Prolin und Ornithin katalysiert. Das Gen *vatB* (Spot Nr. 985) kodiert für die β -Untereinheit einer vakuolären H^+ -ATPase, welche für die Aufrechterhaltung eines elektrochemischen Gradienten zwischen der Zellmembran und dem Zellinneren verantwortlich ist. Die Expression des Gens kann abhängig von der Phagozytose-Aktivität der Zellen gesteigert werden. Sie erreicht ihr Maximum während der Wachstumsphase und sinkt innerhalb der ersten Stunden der Entwicklung wieder ab [BRACCO *et al.*, 1997]. Das Produkt des Gens *cap* (Spot Nr. 989) ist ein Zyklase-assoziiertes Protein, das für die Funktion des Endo-Lysosomalen-Systems von *D. discoideum* essentiell ist und nach neueren Untersuchungen mit der vakuolären H^+ -ATPase (vergleiche Spot Nr. 985) interagiert [SULTANA *et al.*, 2005]. Bei dem *actine like proteine* (Spot Nr. 1164) handelt es sich um ein Mitglied der ARP3 Familie. Die Expression des Gens erreicht ca. 2-4 Stunden nach Beginn der Entwicklung ihren Höhepunkt. Eine Kolokalisation mit Mitochondrien ist sehr häufig zu beobachten [MURGIA *et al.*, 1995]. Severin (Spot Nr. 1438) ist ein Ca^{2+} -abhängiges F-Aktin fragmentierendes Protein. Sein Phosphorylierungs-Status wird durch eine spezifische Severin-Kinase reguliert. Die Aktivität dieses *Ste20-like proteins* ist seinerseits abhängig von der Gesamtmenge an Ca^{2+} -Ionen und nimmt bei steigender Konzentration an Ca^{2+} -Ionen stark ab [EICHINGER *et al.*, 1998].

4 Diskussion

4.1 PkaC Expression in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2

4.1.1 Einfluß von CbfA auf die Etablierung des cAMP-Signalnetzwerkes

Beim Übergang der Wachstums- in die Entwicklungsphase spielen zwei Faktoren in *D. discoideum* eine entscheidende Rolle. Zum einen müssen die Zellen durch den Konzentrationsanstieg des *Pre-Starvation-Factors* (PSF) erkennen, daß eine Hungersituation vorliegt. In der dadurch ausgelösten Signalkaskade kommt es zu einer gesteigerten Transkription des *yakA*-Gens. YakA seinerseits aktiviert anschließend die Proteinkinase A. Letztlich führt das zur Expression entwicklungsrelevanter Gene, etwa *carA*, dem Gen für den membranständigen cAMP-Rezeptor CAR1, *acaA*, dem Gen für die Adenylat-Zyklase A, aber auch zu einer verstärkten Transkription des *pkaC*-Gens für die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PkaC) selbst. Gleichzeitig muß das cAMP-Signalnetzwerk in den Zellen etabliert werden, wobei die PKA ebenfalls von zentraler Bedeutung ist. So konnte in Zellen von *pkaC*⁻-Mutanten keine *acaA* Transkription nachgewiesen werden [MANN *et al.*, 1997]. Als direkte Folge einer verminderten Expression von CbfA wird in Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 eine Störung beim Übergang von Wachstum zur Entwicklung beobachtet [WINCKLER *et al.*, 2001]. Folglich muß CbfA, direkt oder indirekt, entweder an der Detektion des Hunger-Signals oder an der Etablierung des cAMP-Signalnetzwerkes beteiligt sein. Abhängig von der erreichten Populations-dichte wurde in den Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 im Anschluß an einen Nährstoffentzug eine gesteigerte Transkription des extrazellulären Matrix-Proteins Discoidin I detektiert [WINCKLER *et al.*, 2004]. Die Expression dieses Proteins wird in *D. discoideum* als Reaktion auf eine gestiegene Konzentration an PSF induziert [CLARKE *et al.*, 1987; CLARKE *et al.*, 1988]. Weiterhin konnte in JH.D2-Zellen zu einem Zeitpunkt zwei Stunden nach Beginn der Entwicklung, wenn auch in geringerem Ausmaß als in den Zellen des AX2 Wildtyp-Stamms, die Transkription entwicklungsrelevanter Gene wie etwa *carA* oder auch *csaA*, dem Gen für das Zell-Adhäsions-Protein CSA (gp80), nachgewiesen werden [WINCKLER *et al.*, 2004]. Dies bedeutet, daß die Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 keinen Defekt bezüglich des Erkennens einer Hungersituation aufweisen. Demnach scheint sich der Mangel an CbfA vor allem auf die Etablierung des cAMP-Signalnetzwerkes auszuwirken.

Gestützt wird diese Vermutung auch dadurch, daß in den Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2, ähnlich wie in Zellen von *pkaC⁻*-Mutanten, während der Entwicklung keine Transkription des *acaA*-Gens beobachtet werden kann [WINCKLER *et al.*, 2004]. Des weiteren wird in den JH.D2-Zellen das Gen für den membranständigen cAMP-Rezeptor, *carA*, nur auf einem sehr geringen Niveau transkribiert [WINCKLER *et al.*, 2004]. Die Initiierung des cAMP-Netzwerkes in den Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 kann allerdings durch die artifizielle Zugabe von extrazellulärem cAMP angeregt werden. Entsprechend konnte in solchen Zellen neben einer gesteigerten Transkription des Gens *carA* im Vergleich zu unbehandelten JH.D2-Zellen auch die Transkription des *acaA*-Gens wieder nachgewiesen werden. Die Akkumulation beider Genprodukte wies dabei allerdings eine Verzögerung von etwa vier Stunden gegenüber den Zellen des AX2 Wildtyp-Stamms auf [WINCKLER *et al.*, 2004]. Verglichen mit den Wildtyp-Zellen wird das *pkaC*-Gen in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 etwa auf normalem Niveau abgelesen. Die typische cAMP-vermittelte Zunahme der *pkaC*-Transkription etwa acht Stunden nach Beginn der Entwicklung konnte dabei jedoch in den Versuchen ohne artifizielle cAMP-Zugabe nicht festgestellt werden [WINCKLER *et al.*, 2004]. Aufgrund dieser Beobachtungen läßt sich an dieser Stelle zusammenfassen, daß CbfA anscheinend nur indirekt an der Etablierung des cAMP-Netzwerkes über die PKA beteiligt ist. Diese Vermutung wird auch durch neuere Untersuchungen gestützt, wonach CbfA als Transkriptionsfaktor für die Expression der Adenylat-Zyklase essentiell ist [SIOL *et al.*, 2006]. Der damit verbundene Mangel an cAMP führt in den Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 anscheinend dazu, daß die PKA in diesen nicht aktiviert wird. Als direkte Folge davon kommt es somit nicht zur Etablierung des PKA abhängigen cAMP-Signalnetzwerkes, da der Mangel an cAMP durch andere Zyklasen, z. B. durch die Adenylat-Zyklase R, nicht kompensiert werden kann [SÖDERBOM *et al.*, 1999].

4.1.2 Problem der Kontrolle der PkaC-Expression auf Translationsebene

Die Überprüfung der Proteinexpression der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PkaC) in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 durch eine Western-Blot-Analyse setzt die Verwendung eines entsprechenden Antikörpers voraus. Der erfolgreiche Einsatz solcher Antikörper ist zwar in der Literatur mehrfach beschrieben

[DAMMANN *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 1999; TAMINATO *et al.*, 2002]. Allerdings standen diese aus unterschiedlichen Gründen nicht zur Verfügung.

4.1.3 Zusammenhang zwischen CbfA und PKA Expression

Zwischen der Expression der PKA und des Proteins CbfA gibt es wahrscheinlich keinen direkten Zusammenhang. Zu Beginn der Entwicklung verläuft die Transkription des *pkaC*-Gens in den Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 völlig normal [WINCKLER *et al.*, 2004]. Da die Expression der PkaC jedoch auf der Ebene der Translation reguliert wird, sollte untersucht werden, ob die PkaC während der frühen Entwicklung auf einem meßbaren Niveau translatiert wird. Diese Frage konnte letztlich nicht geklärt werden, da auch in den Zellen des Wildtyp-Stamms AX2 zu diesem Zeitpunkt das Protein PkaC nicht nachweisbar war. Die Sensitivität von Western-Blots in Verbindung mit dem neuen monoklonalen Antikörper reicht leider nicht aus, um die PkaC während der ersten Stunden der Entwicklung zu detektieren. Während der Aggregation von *D. discoideum* etabliert sich in den einzelnen Zellen ein selbstverstärkendes cAMP-reguliertes Signalnetzwerk. Dieses führt letztlich zu der vollständigen Aktivierung der PKA, da sowohl die regulatorische als auch die katalytische Untereinheit der PKA durch cAMP-induziert werden [LOOMIS 1998]. Für die anschließende Expression der Postaggregations-Gene ist dies essentiell. Neue Daten, die parallel mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten erhoben wurden, haben gezeigt, daß CbfA für die Expression der Adenylat-Zyklase A (ACA) notwendig ist [SIOL *et al.*, 2006]. Das erklärt eindeutig, warum das gesamte cAMP-abhängige Genexpressionssystem in der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 nicht etabliert wird: sobald die cAMP-Produktion durch die ACA ausbleibt, kann eventuell in der frühen Phase der Entwicklung gebildete und durch YkaA zur Translation freigegebene PkaC nicht aktiviert werden, da die katalytische Untereinheit an die regulatorische Untereinheit gebunden bleibt. Gestützt wird diese Annahme dadurch, daß eine konstitutive Expression der katalytischen Untereinheit (PkaC), die cAMP-unabhängig aktiv ist, zu einer Revertierung des Entwicklungsphänotyps der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 führt [WINCKLER *et al.*, 2004]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Western-Blot Analysen zeigen, daß eine Expression der PkaC in den Zellen des Wildtyp-Stamms AX2 erst ab einem Zeitpunkt etwa acht bis zehn Stunden nach Beginn der Entwicklung detektiert werden kann (siehe Abb. 3.9). Dies entspricht in etwa dem Zeitpunkt, zu dem ein sprunghafter Anstieg der *pkaC* Transkription im Northern-Blot festgestellt werden konnte (siehe Abb. 3.1 und [WINCKLER *et al.*,

2004]). Demnach liegt in den Zellen eine Art basale Transkription des *pkaC*-Gens vor, die zunächst allerdings nicht zu einer detektierbaren Expression des Proteins führt. Erst nach der vollständigen Etablierung des cAMP-abhängigen Signalnetzwerkes und dem damit verbundenen Anstieg an intrazellulärem cAMP wird die Translationsblockade durchbrochen. Das Fehlen einer nachweisbaren Induktion der PkaC in den Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 während der Aggregationsphase kann dadurch erklärt werden, daß diese Induktion cAMP-abhängig ist und somit – wie die Expression aller cAMP-induzierter Gene in diesen Zellen – nicht stattfindet [WINCKLER *et al.*, 2004]. Aufgrund der oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen CbfA und der Expression der Adenylat-Zyklase kommt es in den JH.D2-Zellen in Folge der geringen cAMP-Konzentration zu keinem bzw. nur zu einem verzögerten Anstieg der *pkaC* Transkription in den Zellen. Zur Überprüfung dieser Theorie müßte zunächst untersucht werden, inwieweit sich die Konzentrationen an intrazellulärem cAMP zwischen den Zellen des Wildtyp-Stamms AX2 und denen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 unterscheiden und welchen Einfluß cAMP in *D. discoideum* auf die Translation der *pkaC* mRNA ausübt.

In einigen Experimenten konnte eine geringe Expression der PkaC in *Slugs* der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 beobachtet werden (siehe Abb. 3.8). Dies könnte damit erklärt werden, daß JH.D2-Zellen in verschiedenen Experimenten einen unterschiedlichen Grad an multizellulärer Entwicklung erreichen. Allerdings war die Entwicklung stets sowohl zeitlich als auch morphologisch hinter den Wildtyp-Zellen zurück. Auch in den Experimenten, in denen die PkaC in entwickelten JH.D2-Zellen gefunden wurde, war sie deutlich geringer als in Wildtyp-Zellen.

4.2 Qualität der 2D-gelelektrophoretischen Untersuchung

Aufgrund der geringen Möglichkeit zur Automatisierung ist der extrem arbeits- und zeitintensive manuelle Herstellungsprozeß von 2D-Gelen einer Fülle möglicher Fehlerquellen ausgesetzt. Diese wirken sich vor allem auf die Reproduzierbarkeit dieser Methode negativ aus (siehe Kapitel 3.2 und [RABILLOUD 2002]). Nach der erfolgreichen Etablierung einer 2D-gelelektrophoretischen Methode zur Auftrennung von *D. discoideum* und anschließender Überprüfung der Reproduzierbarkeit durch den Einsatz der Coomassiefärbung erfolgte daher eine Standardisierung der benötigten Arbeitsschritte. Bei der Suche nach differentiell exprimierten Proteinen

zwischen den untersuchten *D. discoideum*-Stämmen durch die Anwendung der DIGE-Technologie wurden die einzelnen Proben stets bei gleicher Temperatur und unter Einsatz eines identischen Fokussierprotokolls aufgetrennt. Die isoelektrische Fokussierung wurde ausschließlich unter Verwendung kommerziell erhältlicher IPG-Streifen (*Immobiline DryStrip* pH 3-10 NL, 18 cm) durchgeführt, deren gleichbleibende Qualität vorausgesetzt wurde. Die Herstellung der 2D-Gele erfolgte durch die strikte Einhaltung der zuvor erarbeiteten Protokolle unter besonderer Berücksichtigung einer konstanten Gießhöhe. Neben gleichbleibenden technischen Voraussetzungen ist ebenso die Probenvorbereitung im Bezug auf die Reproduzierbarkeit als kritisch zu erachten [GÖRG *et al.*, 2004]. Die einzelnen Proben wurden daher schnell und ausschließlich auf Eis jeweils strikt nach dem zuvor erarbeiteten Protokoll angefertigt. Die Bearbeitung der generierten Bild-Dateien aus den verschiedenen DIGE-Experimenten wurde ebenfalls nach standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Vorselektion detektierter Spots erfolgte jeweils durch Einstellung derselben Parameter. Bei der computergestützten Auswertung der digitalisierten 2D-Gele zeigte sich, daß die Summe der getroffenen Maßnahmen letztendlich zu einer extrem hohen Reproduzierbarkeit bei der Auftrennung der Proben geführt hat (siehe Abb. 3.16, Ausschnitt A). Im Anschluß an das *Spot-Matching* wurden offensichtlich fehlerhaft zugeordnete *Spots* manuell korrigiert. Generell wurde die Nachbehandlung auf ein Minimum reduziert. Einerseits wäre sie mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden. Viel wichtiger ist jedoch, daß sich eine manuelle Bearbeitung stets nach subjektiven Gesichtspunkten richtet. Selbst bei der Durchführung durch denselben Experimentator würde dadurch der Vergleich der erzielten Ergebnisse zwischen verschiedenen Experimenten unnötig erschwert. Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß aufgrund der getroffenen Maßnahmen sowohl bei der Herstellung als auch bei der Auswertung qualitativ hochwertige 2D-Gele angefertigt wurden, die Aussagen zu differentiell exprimierten Proteinen ermöglichten.

4.3 Qualität der massenspektrometrischen Untersuchung

4.3.1 Wo ist CbfA?

Die Analyse der massenspektrometrischen Ergebnisse wirft verschiedene Fragen auf. So konnte CbfA, obwohl es in Zellen der Mutante JH.D2 nur zu etwa 5%

verglichen mit dem Wildtyp-Stamm AX2 funktionell translatiert wird (siehe dazu Abb. 3.2 und [WINCKLER *et al.*, 2001]), in keinem der durchgeführten 2D-gelelektrophoretischen Experimente als differentiell exprimiertes Protein nachgewiesen werden. Aufgrund seiner DNA-bindenden Eigenschaften ist CbfA innerhalb der Zellen hauptsächlich in den Zellkernen lokalisiert [HENTSCHEL *et al.*, 2001]. Die Verwendung von Gesamtzellextrakten für die 2D-gelelektrophoretischen Untersuchungen anstelle eines möglichen Einsatzes von Kernextrakten stellte allerdings keine Alternative dar. Zum einen konnte CbfA im Western-Blot unter Verwendung von Gesamtzellextrakten nachgewiesen werden. Zum anderen führte der Einsatz von Kernextrakten in der 2D-Gelelektrophorese zu einer extremen Schlierenbildung, die eine Auswertung dieser Gele unmöglich machte (Daten nicht gezeigt). Vielmehr scheint CbfA, wie auch eine große Anzahl anderer Proteine, beim Transfer von der ersten zur zweiten Dimension verloren zu gehen. Einzelne Bestandteile der Proben adsorbieren beispielsweise an die Matrix des verwendeten IPG-Streifens und gehen somit aus diesem nicht in das für die zweite Dimension verwendete Polyacrylamid-Gel über. Andere werden durch den für die Äquilibrierung verwendeten Puffer ganz einfach aus dem IPG-Streifen herausgelöst [GÖRG *et al.*, 2004]. Untersuchungen mit radioaktiv markierten Proben haben gezeigt, daß im Verlauf der Äquilibrierung bis zu 20% der Proteine verloren gehen [ZUO & SPEICHER 2000; ZHOU *et al.*, 2004].

4.3.2 Identifizierung differentiell exprimierter Proteine

Als weitere Schwierigkeit bei massenspektrometrischen Analysen ist das schlechte Verhältnis von untersuchten zu identifizierten Proteinen zu nennen. Durchschnittlich konnten nur etwa 30% der verdauten Proteine tatsächlich identifiziert werden. Insgesamt war dabei die Identifizierung von Proben aus Silber- oder Coomassie-gefärbten Gelen effektiver als eine Identifizierung solcher Proben, die aus Fluoreszenz-gefärbten Gelen extrahiert wurden. Gleiches gilt auch für Proteine mit großen molekularen Massen verglichen mit solchen, die nur ein relativ geringes Molekulargewicht von weniger als 20 kDa aufwiesen. Generell ist anzumerken, daß die Methode des Peptid-Massen-Fingerabdrucks (PMF) neben der hohen Meßgeschwindigkeit und dem geringen Probenbedarf auch eine Reihe von Nachteilen aufweist. So lassen sich beispielsweise die Peptide im Anschluß an den In-Gel-Verdau nicht vollständig aus dem Gel eluieren. Insgesamt wird für den In-Gel-Verdau der Anteil identifizierbarer Proteine in der Literatur mit Werten zwischen

53% und 77% angegeben [SUCKAU *et al.*, 2003; GADE *et al.*, 2005]. Diese Werte sind jedoch direkt vom Umfang der bereits bekannten Genom- und Proteinsequenzdaten der jeweiligen Spezies abhängig. Die Fehlerraten dieser Sequenzdaten werden allerdings auf einen Anteil von 0,3% und höher geschätzt [MILLER *et al.*, 1999; SCHULTZ *et al.*, 2000].

4.3.2.1 Nachteil der DIGE-Technologie

Das angesprochene schlechte Resultat bei der Identifizierung Fluoreszenz-gefärbter Proteine läßt sich folgendermaßen erklären. Die Markierung der Proben mit den unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte nach der Methode des *Minimal-labeling*. Dabei wird nur soviel Farbstoff verwendet, daß durchschnittlich etwa 1 bis 3% der Lysin-Reste eines Proteins markiert werden [GADE *et al.*, 2003]. Die dabei hinzu addierte Masse beträgt pro Farbstoffmolekül je nach Farbstoff zwischen 434 Da und 466 Da. Dabei handelt es sich zwar nicht um eine drastische Zunahme der Gesamtmasse der markierten Proteine. Andererseits wirkt sich diese aber gerade auf Proteine mit einem geringen Molekulargewicht weitaus stärker aus als auf solche Proteine, die eine hohe molekulare Masse besitzen [SHAW *et al.*, 2003]. Die x- und y-Koordinaten zum Ausstanzen differentiell exprimierter Proteine erhält der *Spotpicker* aus der *DeCyder-Software* ausschließlich auf der Basis des markierten Anteils der aufgetrennten Proteine. Aufgrund der Differenz von fast 0,5 kDa ist daher die Wahrscheinlichkeit gerade bei Proteinen mit einer relativ geringen molekularen Masse verhältnismäßig groß, daß der *Spotpicker* beim Ausstanzen der Proteine regelrecht ins „Leere“ pickt. Das ausgestanzte Gelstück enthält somit nur einen minimalen Anteil des Proteins, auf dessen Grundlage keine Identifizierung möglich ist. Ein Weg diese Probleme zu umgehen liegt in der Verwendung zusätzlicher Gele. Die Proben dafür würden parallel mit den Fluoreszenz-markierten Proben sowohl fokussiert als auch anschließend in der zweiten Dimension elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei würde sich anbieten, die beiden untersuchten Proben (z. B. Wildtyp und Mutante) getrennt aufzutragen. Nachdem differentiell exprimierte Proteine durch die Auswertung der Fluoreszenz-markierten Proben detektiert sind, müßten die zusätzlich mitgeführten Gele mit einer alternativen Färbemethode visualisiert werden. Dafür bietet sich z. B. die Färbung mit SYPRO Ruby an, da diese eine ähnliche Sensitivität wie die Fluoreszenzmarkierung aufweist [GADE *et al.*, 2003]. Der Einsatz der Silberfärbung

ist angesichts der dürftigen Reproduzierbarkeit ungeeignet. Gleiches gilt für die Coomassiefärbung, deren Sensitivität für die eingesetzten Proteinmengen zu gering ist. Nach dem *Scannen* der SYPRO Ruby gefärbten Gele erfolgt dann die Auswahl der differentiell exprimierten Proteine. Dazu müßten die einzelnen *Spot*-Muster der DIGE-Gele allerdings visuell mit denen der ebenfalls digitalisierten SYPRO Ruby-markierten Gele verglichen werden. Eine 100%ige Übereinstimmung bei der Auswahl einzelner Proteine ist dabei aufgrund der Komplexität der 2D-Gele (> 2500 Spots) allerdings nicht zu gewährleisten. Somit könnte es zu einer falsch positiven Identifizierung vermeintlich differentiell exprimierter Proteine kommen.

4.3.2.2 PMF: kleine Massen, große Herausforderungen

Zu den oben erwähnten Nachteilen des PMFs kommt bei Proteinen mit einer Größe von unter 20 kDa ein weiteres hinzu. Generell ist die Anzahl der Peptidfragmente, die durch einen In-Gel-Verdau gewonnen werden, von der Größe des jeweiligen Proteins abhängig. Entsprechend dieser Annahme nimmt die absolute Anzahl der Peptidfragmente des Massenintervalls zwischen etwa 800 Da und 3500 Da, die zu einer gesicherten Identifizierung der verdauten Proteine benötigt werden, bei Proteinen immer weiter ab, je kleiner sie werden [SUCKAU *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2004]. Gleichzeitig steigt allerdings der prozentuale Anteil von Fragmenten mit Massen unter 1000 Da bei kleineren Proteinen an, was die Identifizierung zusätzlich erschwert. So gehen Peptidfragmente mit einer Masse unterhalb von 700 Da häufig in den Signalintensitäten der Matrixionen verloren [ZHU *et al.*, 2004]. Die Massenfragmente im Bereich zwischen 700 Da und 1000 Da lassen aufgrund der hohen Anzahl möglicher Übereinstimmungen in den meisten Fällen ohne die Verwendung weiterer Methoden wie z. B. der MS/MS-Technik keine gesicherte Identifizierung der verdauten Proteine zu.

4.4 Einfluß von CbfA auf die Proteinexpression

Die Untersuchungen zum Einfluß von CbfA auf die Proteinexpression in *D. discoideum* erstreckten sich über einen relativ kurzen Zeitraum während des Übergangs von der Wachstums- zur Entwicklungsphase. Bei der Analyse der durchgeführten Experimente fiel auf, daß innerhalb des beobachteten Zeitraums von zwei Stunden jeweils nur eine kleine Anzahl von Proteinen zwischen dem

Wildtyp-Stamm AX2 und der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 differentiell exprimiert wurden. So konnten durchschnittlich nicht mehr als 30 bis 40 unterschiedlich regulierte Proteine in den Proben detektiert werden (siehe Kapitel 3.3.1 und Kapitel 3.3.2.). Eine eindeutige Tendenz im Sinne einer verringerten Expression in den Zellen der JH.D2-Mutante konnte dabei nicht festgestellt werden. Vielmehr war die Anzahl der Proteine, die in JH.D2-Zellen, verglichen mit denen in AX2, hoch- bzw. runterreguliert waren, etwa gleich hoch.

Die massenspektrometrische Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine zeigte, daß hauptsächlich die Expression sogenannter *Housekeeping*-Gene von CbfA abzuhängen scheint. Diese sind für die Aufrechterhaltung bestimmter Zellfunktionen wie etwa des Metabolismus essentiell. Eine Vielzahl der identifizierten *Housekeeping*-Gene war in den Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 auf einem niedrigeren Niveau exprimiert als in den Zellen des Wildtyp-Stamms AX2. Dies würde erklären, warum die Versuche zur Herstellung einer *cbfA-knockout*-Mutante bislang gescheitert sind [HORN *et al.*, 1999]. Mit Hilfe der durchgeführten Experimente konnte nicht festgestellt werden, ob CbfA beim Übergang vom Wachstum zur Entwicklung mit einer Art „*Master-Regulator*“ interagiert und somit indirekten Einfluß auf die Proteinexpression in *D. discoideum* nimmt. Ein solcher Regulator ist zumindest nicht identifiziert worden. Die Erkenntnis, daß CbfA einen Transkriptionsfaktor für die Expression der Adenylat-Zyklase A darstellt [SIOL *et al.*, 2006] und somit maßgeblich am Aufbau des cAMP-abhängigen Signalnetzwerkes in *D. discoideum* beteiligt ist (siehe Kapitel 4.1.1) spricht jedoch dafür, daß CbfA einen Einfluß auf einen definierten Teil des Dictyostelium-Transkriptoms, nämlich den cAMP-induzierten Genen, ausübt.

4.4.1 Spezielle Auswirkungen des C-Terminus von CbfA

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu den genregulatorischen Eigenschaften des C-Terminus von CbfA (siehe Kapitel 3.3.3 und Kapitel 3.3.4) lassen vermuten, daß dieser neben seinem direkten Einfluß auf die Transkriptmenge des Retrotransposons TRE5-A [BECK 2003] zumindest auch während des Wachstums von *D. discoideum* direkt an der Regulation einzelner Proteine beteiligt ist.

Die in dieser Arbeit untersuchten Stämme AX2, JH.D2 und die Transformante JH.D2[PB1] unterscheiden sich jeweils in ihren Anteilen an CbfA-Gesamtprotein, N-Terminus und C-Terminus (Tab. 4.1).

	AX2	JH.D2	JH.D2[PB1]
CbfA-Gesamt	100%	ca. 5%	ca. 5%
N-Terminus	100%	100%	100%
C-Terminus	100%	ca. 5%	>>> 100%

Tab. 4.1: Übersicht über die unterschiedlichen CbfA Mengen in den untersuchten Stämmen

Die Tabelle zeigt die relativen Mengen an CbfA Gesamtprotein und die jeweils enthaltenen Mengen an N-terminalem und C-terminalem Anteil von CbfA in den Zellen.

So kann das Expressionsprofil der Gruppe 1 aus dem Experiment DIGE IV (siehe Abb. 3.24) insofern interpretiert werden, daß der C-Terminus von CbfA ab einem bestimmten Anteil als Repressor der Proteinexpression der β -Untereinheit der vakuolären H^+ -ATPase (*vatB*, siehe Tab. 3.15) fungiert. Zumindest dann, wenn der C-terminale Anteil von CbfA in einem extrem hohen Überschuß im Vergleich zu dem Gesamtprotein in den Zellen vorliegt wie es bei der Transformante JH.D2[PB1] der Fall ist (Tab. 4.1). Die Tatsache, daß sich die Expressionsprofile der Gruppen 1 und 2 aus dem Experiment DIGE IV wie Bild und Spiegelbild zueinander verhalten, (siehe Abb. 3.24) bedeutet gleichzeitig aber auch, daß der C-Terminus von CbfA auf die Expression anderer Proteine einen aktivierenden Effekt ausübt.

Neben dem C-Terminus von CbfA scheinen auch andere Domänen dieses Proteins regulatorisch auf die Expression unterschiedlicher Ziel-Proteine einzuwirken. Der Expressionsverlauf der Gruppe 3 aus dem Experiment DIGE IV (siehe Abb. 3.25) z. B. kann so erklärt werden, daß die Proteinexpression etwa des mitochondrialen Hsp70 Vorläuferproteins, der ATP Synthase β -Untereinheit oder auch der Aldehyd-Dehydrogenase (siehe Tab. 3.15) in erster Linie von der Gesamtmenge an CbfA in den Zellen abhängt (Tab. 4.1). Dabei scheint das Verhältnis von C-Terminus zu N-Terminus allerdings eine wesentliche Rolle zu spielen. Die identifizierten Proteine wurden in den Zellen der Transformante JH.D2[PB1] mit Abstand auf dem geringsten Niveau exprimiert. Demnach wirkt sich anscheinend die Überexpression des C-Terminus von CbfA zusätzlich reprimierend auf die Expression dieser Proteine aus.

Im Gegensatz dazu scheint jedoch bei den Proteinen der Gruppe 4 ein hoher Anteil an CbfA-Gesamtprotein einen inhibierenden Einfluß auf die Expression zu haben. Dies erklärt allerdings nicht die im Vergleich zu der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2 gesteigerte Expression dieser Proteine in den JH.D2[PB1]-Transformanten. Hier könnte folglich der höhere Anteil an C-Terminus einen zusätzlichen aktivierenden Effekt auf die Expression ausüben (siehe Abb. 3.25). Das beobachtete Protein wird

in den Zellen der Transformante JH.D2[PB1] mit Abstand am stärksten exprimiert. In dieser Gruppe konnten unter anderem Glucose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase, Fructose-bisphosphat Aldolase und Aldo-keto Reduktase identifiziert werden, welche alle am zellulären Glucose-Stoffwechsel beteiligt sind [EHRENMAN *et al.*, 2004]. Dies läßt vermuten, daß ein Mangel an CbfA in den Mutanten zu einer Veränderung im Glucose-Stoffwechsel führt, der durch ein erhöhtes Verhältnis von C- zu N-Terminus scheinbar noch zusätzlich verstärkt wird. Dies könnte eine Erklärung für das verlangsamte Wachstum der Mutanten liefern.

Die Expressionsprofile der Gruppen 5 und 6 des Experiments DIGE IV zeigen, daß der N-terminale Bereich von CbfA auch unabhängig vom Anteil an C-Terminus als Aktivator bzw. als Repressor fungieren kann. So wurde in Gruppe 5 eine deutlich gesteigerte Proteinexpression der Acetylornithin Deacetylase (siehe Tab. 3.15) in den Zellen des Wildtyp-Stamms AX2 gegenüber den beiden anderen Stämmen festgestellt (siehe Abb. 3.26). In diesen sind die Proteine der Gruppe 5 etwa gleich stark exprimiert, obwohl die Proben der Transformante JH.D2[PB1] eine deutlich höhere Konzentration des C-Terminus von CbfA aufweisen (Tab. 4.1). Das Beispiel der Gruppe 6 zeigt genau den umgekehrten Fall (siehe Abb. 3.26). Hier scheint CbfA, unabhängig vom Verhältnis von C- zu N-Terminus, reprimierend auf die Proteinexpression von z. B. dem Cyclase-assoziierten Protein einzuwirken (siehe Tab. 3.15).

Bei der Betrachtung des Expressionsprofils von Proteinen der Gruppe 7 des Experiments DIGE IV kann eine Revertierung des JH.D2 Phänotyps durch die gesteigerte Expression des C-Terminus in den Zellen der Transformante JH.D2[PB1] festgestellt werden (siehe Abb. 3.27). Die scheinbare Wiederherstellung des AX2 Phänotyps in der JH.D2[PB1] Transformante schwankt dabei in den Gruppen 7b und 7c von leicht unter- (7b) bis leicht oberhalb (7c) der in AX2 gemessenen Proteinmenge, wobei eine tendenzielle Ähnlichkeit der Gruppe 7b zur Gruppe 5 und eine tendenzielle Ähnlichkeit der Gruppe 7c zur Gruppe 2 erkennbar ist.

Im Beispiel der Gruppe 8 ist ebenfalls eine Revertierung zum Wildtyp durch die verstärkte Expression des C-Terminus von CbfA in der Transformante JH.D2[PB1] zu erkennen (siehe Abb. 3.28). Verglichen mit Gruppe 7 führt dies hier jedoch dazu, daß sowohl in den Zellen des Wildtyp-Stamms AX2 als auch in den Zellen der Transformante JH.D2[PB1] die Proteine auf geringerem Niveau exprimiert werden

als in den Zellen der *cbfA^{am}*-Mutante JH.D2. Entsprechend verhalten sich die einzelnen Expressionsprofile der Gruppen 7 und 8 in etwa wie Bild und Spiegelbild zueinander. Auch hier schwanken die Werte der Proteinexpression in der Transformante JH.D2[PB1] von leicht unter- (8b) bis leicht oberhalb (8c) der in AX2 gemessenen Proteinmenge. Dabei sind auch hier, vergleichbar den Gruppen 7b und 7c, entsprechende Tendenzen zu erkennen. So weist die Gruppe 8b Analogien zu der Gruppe 1 auf. Das Expressionsprofil der Gruppe 8c ähnelt dem der Gruppe 6.

Generell sollten die Aussagen zu differentiell exprimierten Proteinen allerdings kritisch betrachtet werden. Es existieren keine allgemein verbindlichen Regeln oder Richtlinien, nach denen bestimmt wird, ob ein Protein zwischen zwei unterschiedlichen Proben differentiell exprimiert ist oder nicht. Anders als etwa bei *DNA-Microarrays*, bei denen die technisch bedingte Variation weitestgehend untersucht ist, liegen zu der hier verwendeten DIGE-Technologie nur begrenzte Erfahrungen in Bezug auf das Ausmaß technischer Schwankungen vor. Dementsprechend können für die Analyse von *Microarray*-generierten Daten sogenannte Schwellenwerte (in der Regel zweifach, [GRILLS *et al.*, 2001]) empirisch eingesetzt werden, ab denen eine biologisch relevante Aussage zu differentiell exprimierten Transkripten möglich ist. Im Gegensatz dazu findet sich zur DIGE-Technologie eine Veröffentlichung, in der auch Proteine mit einem Expressionsunterschied von nur Faktor 1,1 oder kleiner als biologisch relevant diskutiert werden [YAN *et al.*, 2002]. Darüber hinaus sind Aussagen zu differentiell exprimierten Proteinen speziell aus *D. discoideum* momentan noch aus einem weiteren Grund problematisch. Zwar konnte das Genom von *D. discoideum* im Jahr 2005 aufgeklärt werden [EICHINGER *et al.*, 2005]. Allerdings sind in den entsprechenden Datenbanken zur Zeit oftmals automatisch generierte „offene Leserahmen“ als Gene eingetragen, zu deren genaueren Funktionen bzw. den Funktionen ihrer Proteine keine Aussagen getroffen werden können.

4.5 Alternativen zur 2D-Gelelektrophorese

Der Einsatz der 2D-Gelelektrophorese in der Proteomanalyse weist in der täglichen Anwendung eine Fülle von Nachteilen auf. Neben dem zu Beginn erwähnten Manko im Bezug auf die Auftrennung von Membranproteinen, extrem sauren oder basischen

Proteinen, bedarf es eines hohen Maßes an Geschick und handwerklichen Fähigkeiten, um gute und vor allem reproduzierbare Gele herzustellen. Des Weiteren sind einige für die Herstellung von 2D-Gelelektrophorese notwendigen Arbeitsschritte nur eingeschränkt automatisierbar. Für die industrielle Hochdurchsatzanalyse verschiedenster Proteingemische ist die 2D-Gelelektrophorese daher ungeeignet. In der Proteomforschung wird daher schon seit längerem nach Alternativen gesucht. Die Anwendung *Chip*-basierter Technologien, in Analogie zu DNA-*Microarrays*, stellt dabei eine Möglichkeit dar [HAAB *et al.*, 2001; JENKINS & PENNINGTON 2001]. Allerdings müssen dazu in der Praxis zunächst einige Hindernisse überwunden werden. So müssen die Proteine, im Gegensatz zur DNA, in ihrer natürlichen Konformation vorliegen. Die Anwendung bestimmter Reagenzien, z. B. für die Optimierung der benötigten Protein-Protein-Interaktion oder zum Abbau unspezifischer Verunreinigungen ist somit limitiert. Da es zur Zeit noch keine Möglichkeit gibt, unbekannte Proteine im Vorfeld einer Analyse zu vervielfältigen, müssen extrem sensitive Detektions-Methoden für eine zweifelsfreie Bestimmung in solch geringen Konzentrationen eingesetzt werden. Die zusätzliche Anwendung nachweisbarer Markierungen (*Tags*) wiederum könnte sich nachteilig auf die gewünschte Protein-Protein Interaktion auswirken. Verglichen mit Nukleinsäuren sind die Interaktionen zwischen einzelnen Proteinen wesentlich unspezifischer und um so variabler. Das Potential für Kreuzreaktionen wird damit erhöht und die Möglichkeit einer Quantifizierung zusätzlich erschwert.

Eine weitere Alternative zur 2D-Gelelektrophorese stellt die sogenannte Multidimensionale Protein-Identifikation (*Multidimensional Protein-Identification Technology*, MudPIT) dar [WASHBURN *et al.*, 2001]. Bei dieser Methode werden Proteinextrakte durch die Verwendung einer zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und anschließend identifiziert. Nachdem die Proteine durch einen proteolytischen Verdau in Peptide zerlegt sind, werden sie zunächst auf eine starke Kationenaustauscher-Säule (*Strong Cation Exchange*, SCX) geladen. Mittels eines Salzstufengradienten wird anschließend jeweils ein kleiner Teil der Peptide schrittweise auf eine nachgeschaltete *Reversed Phase*-Säule eluiert. Auf dieser werden die einzelnen Peptid-Fractionen entsalzt, bevor sie in Abhängigkeit ihrer Hydrophobizität in einem Acetonitrilgradienten getrennt und schließlich analysiert werden. Dabei erfolgt die Ionisierung der aufgetrennten Peptide mittels Elektrospray, da bei dieser Methode eine direkte Kopplung zwischen der

Flüssigkeitschromatographie und der Ionisierung aus einer Lösung heraus möglich ist. Das Potential zur Identifizierung ganzer Proteome durch die Verwendung der zweidimensionalen Chromatographie konnte am Beispiel von *S. cerevisiae* demonstriert werden [WASHBURN *et al.*, 2001]. Innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden wurden dabei parallel fast 1500 Proteine identifiziert, unabhängig davon, ob es sich um sogenannte *high-* oder *low-abundance* Proteine oder um Proteine mit extremen pI-Werten oder Molekulargewichten handelte. Fast 10% der identifizierten Proteine zählten zu integralen Membranproteinen, was das enorme Potential dieser Technik auch für *membrane proteomics* verdeutlicht. Ein weiterer Vorteil gegenüber der 2D-Gelelektrophorese liegt darin, daß sich diese Methode sehr gut automatisieren läßt [WOLTERS *et al.*, 2001]. Die Auswertung der Meßergebnisse erfordert jedoch eine extrem leistungsfähige Bioinformatik. Quantitative Aussagen, die einen Vergleich verschiedener zellulärer Zustände (z. B. Wildtyp vs. Mutante) erlauben, sind zur Zeit nur eingeschränkt möglich. Der Einsatz von metabolischen Markierungen wie etwa N^{14}/N^{15} könnte diesen Nachteil allerdings in Zukunft überwinden.

5 Zusammenfassung

Beim Übergang vom Wachstum zur Entwicklung entsteht in *Dictyostelium discoideum* aus einzelnen vegetativ wachsenden Zellen ein multizellulärer Organismus, der in der Lage ist ausdauernde Sporen zu bilden. Während der im multizellulären Verband stattfindenden morphologischen Veränderungen und Zelldifferenzierung nimmt die Proteinkinase A (PKA) eine Schlüsselfunktion ein. Der C-Modul bindende Faktor A (CbfA), ursprünglich aufgrund seiner spezifischen Bindung an eine regulatorische DNA-Sequenz des Non-LTR Retrotransposons TRE5-A.1 in *D. discoideum* entdeckt, ist für den Übergang vom Wachstum zur Differenzierungsphase essentiell. Zellen der CbfA-Mangelmutante JH.D2 weisen im Vergleich zu denen des Wildtyp-Stamms AX2 ein verlangsamtes Wachstum und eine verzögerte Einleitung der Aggregation und der Entwicklung auf. Charakteristisch für diese CbfA-Mutante ist die Unterexpression der mRNA für die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PkaC).

Da die Expression der PkaC sowohl auf der Transkriptions- als auch auf der Translationsebene reguliert ist, wurde in dieser Arbeit ein monoklonaler Antikörper gegen die katalytische Untereinheit hergestellt, um den Proteingehalt an PkaC in Zellen der CbfA-Mutante zu untersuchen. Dabei konnte eine starke Unterexpression der PkaC in den CbfA-depletierten Zellen nachgewiesen werden. Demnach scheint es einen mittelbaren Zusammenhang zwischen der Menge an CbfA und dem sich selbst verstärkenden cAMP-abhängigen Signaltransduktionssystem der Zellen zu geben, da ein Mangel an cAMP eine fehlende Aktivierung der sich selbst induzierenden PKA nach sich zieht.

Für *D. discoideum* konnte erstmals eine reproduzierbare 2D-gelelektrophoretische Trennmethode etabliert werden, mit der es gelang, differentiell exprimierte Proteine im Stadium der frühen Entwicklung zwischen den untersuchten *D. discoideum*-Stämmen AX2 und JH.D2 aufzufinden. Die Anwendung der DIGE-Technologie ermöglichte dabei die Detektion von ca. 30-40 differentiell exprimierten Proteinen. Durch die massenspektrometrische Untersuchung dieser Proteine unter Verwendung der MALDI-TOF Methode in Kombination mit dem Peptid-Massen-Fingerabdruck konnten insgesamt ca. 30% der differentiell exprimierten Proteine identifiziert werden.

Dabei stellte sich heraus, daß vor allem Proteine mit essentiellen Funktionen im zellulären Stoffwechsel in der CbfA-Mangelmutante JH.D2 auf geringerem Niveau exprimiert wurden als im Wildtyp-Stamm AX2. Dies könnte eine Erklärung für die letalen Auswirkungen eines vollständigen *knockouts* von CbfA in *D. discoideum* liefern.

Zusätzlich wurde mit Hilfe der DIGE-Technologie die Funktion der C-terminalen Domäne des CbfA-Proteins untersucht. Für diese Experimente wurde eine CbfA-Mutante verwendet, die den C-Terminus konstitutiv überexprimiert. Die daraus resultierenden Proteinmuster haben gezeigt, daß die C-terminale Domäne unabhängig vom Rest des Proteins sowohl induzierenden als auch reprimierenden Einfluß auf die Proteinexpression nimmt. Diese Ergebnisse zeigen eine unerwartet komplexe Funktion des Proteins CbfA in der Regulation von Genen während der untersuchten Lebensphasen von *D. discoideum*.

6 Literatur

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-95 (2000).

Aizawa, H., Sutoh, K., Tsubuki, S., Kawashima, S., Ishii, A. & Yahara, I. Identification, characterization, and intracellular distribution of cofilin in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* **270**, 10923-32 (1995).

Akaza, Y., Tsuji, A. & Yasukawa, H. Analysis of the gene encoding copper/zinc superoxide dismutase homolog in *Dictyostelium discoideum*. *Biol Pharm Bull* **25**, 1528-32 (2002).

Alban, A., David, S.O., Bjorkesten, L. et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* **3**, 36-44 (2003).

Alexander, S., Srinivasan, S. & Alexander, H. Proteomics opens doors to the mechanisms of developmentally regulated secretion. *Mol Cell Proteomics* **2**, 1156-63 (2003).

Anderson, L. & Seilhamer, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* **18**, 533-7 (1997).

Anderson, N.G. & Anderson, L. The Human Protein Index. *Clin Chem* **28**, 739-48 (1982).

Ashworth, J.M. & Watts, D.J. Metabolism of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* grown in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 175-182 (1970).

Aubry, L., Maeda, M., Insall, R., Devreotes, P.N. & Firtel, R.A. The *Dictyostelium* mitogen-activated protein kinase ERK2 is regulated by Ras and cAMP-dependent protein kinase (PKA) and mediates PKA function. *J Biol Chem* **272**, 3883-6 (1997).

Bain, G. & Tsang, A. Disruption of the gene encoding the p34/31 polypeptides affects growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Mol Gen Genet* **226**, 59-64 (1991).

Balciunas, D. & Ronne, H. Evidence of domain swapping within the jumonji family of transcription factors. *Trends Biochem Sci* **25**, 274-6 (2000).

Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I. & Doolittle, W.F. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**, 972-7 (2000).

Beck, P., Dingeremann, T. & Winckler, T. Transfer RNA gene-targeted retrotransposition of *Dictyostelium* TRE5-A into a chromosomal UMP synthase gene trap. *J Mol Biol* **318**, 273-85 (2002).

Beck, P. Etablierung eines *in vivo* Testsystems zur Untersuchung der Mobilität tRNA-Gen-gerichteter Retrotransposons in *Dictyostelium discoideum*. Dissertation (2003).

Berge-Lefranc, J.L., Jay, P., Massacrier, A. et al. Characterization of the human jumonji gene. *Hum Mol Genet* **5**, 1637-41 (1996).

Berthold, H., Frorath, B., Scanarini, M., Abney, C.C., Ernst, B. & Northemann, W. Plasmid pGEX-5T - An Alternative System for Expression and Purification of Recombinant Proteins. *Biotechnology Letters* **14**, 245-250 (1992).

- Biagini, A. & Puigserver, A.** Sequence analysis of the aminoacylase-1 family. A new proposed signature for metalloexopeptidases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **128**, 469-81 (2001).
- Bonner, J.T.** The migration stage of Dictyostelium: behavior without muscles or nerves. (minireview). *FEMS Microbiol. Lett.* **120**, 1-8 (1994).
- Bozzaro, S. & Ponte, E.** Cell adhesion in the life cycle of Dictyostelium. *Experientia* **51**, 1175-1188 (1995).
- Bracco, E., Peracino, B., Noegel, A.A. & Bozzaro, S.** Cloning and transcriptional regulation of the gene encoding the vacuolar/H⁺ ATPase B subunit of Dictyostelium discoideum. *FEBS Lett* **419**, 37-40 (1997).
- Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
- Brefeld, O.** Dictyostelium mucoroides. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft Frankfurt* **7**, 85-107 (1869).
- Brennand, D.M., Danson, M.J. & Hough, D.W.** A comparison of ELISA screening methods for the production of monoclonal antibodies against soluble protein antigens. *J Immunol Methods* **93**, 9-14 (1986).
- Chen, M.Y., Long, Y. & Devreotes, P.N.** A novel cytosolic regulator, Pianissimo, is required for chemoattractant receptor and G protein-mediated activation of the 12 transmembrane domain adenylyl cyclase in Dictyostelium. *Genes Dev* **11**, 3218-31 (1997).
- Clarke, M., Kayman, S.C. & Riley, K.** Density-dependent induction of discoidin-I synthesis in exponentially growing cells of Dictyostelium discoideum. *Differentiation* **34**, 79-87 (1987).
- Clarke, M., Yang, J. & Kayman, S.C.** Analysis of the prestarvation response in growing cells of Dictyostelium discoideum. *Dev Genet* **9**, 315-26 (1988).
- Clarke, M., Dominguez, N., Yuen, I.S. & Gomer, R.H.** Growing and starving Dictyostelium cells produce distinct density-sensing factors. *Dev Biol* **152**, 403-6 (1992).
- Clarke, M. & Gomer, R.H.** PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of Dictyostelium. *Experientia* **51**, 1124-34 (1995).
- Clissold, P.M. & Ponting, C.P.** JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta. *Trends Biochem Sci* **26**, 7-9 (2001).
- Corthals, G.L., Wasinger, V.C., Hochstrasser, D.F. & Sanchez, J.C.** The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* **21**, 1104-15 (2000).
- Cotter, D.A., Sands, T.W., Viridy, K.J., North, M.J., Klein, G. & Satre, M.** Patterning of development in Dictyostelium discoideum: factors regulating growth, differentiation, spore dormancy, and germination. *Biochem Cell Biol* **70**, 892-919 (1992).
- Coukell, B., Li, Y., Moniakis, J. & Cameron, A.** The Ca²⁺/calcineurin-regulated cup gene family in Dictyostelium discoideum and its possible involvement in development. *Eukaryot Cell* **3**, 61-71 (2004).

- Dammann, H., Traincard, F., Anjard, C., van Bemmelen, M.X., Reymond, C. & Veron, M.** Functional analysis of the catalytic subunit of Dictyostelium PKA in vivo. *Mech Dev* **72**, 149-57 (1998).
- de StGroth, S.F. & Scheidegger, D.** Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods* **35**, 1-21 (1980).
- Douillard, J.Y. & Hoffman, T.** Enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibody production using enzyme-labeled second antibody. *Methods Enzymol* **92**, 168-74 (1983).
- Dunne, P.W., Wang, S.W., Ashizawa, T., Perryman, M.B. & Epstein, H.F.** cDNA surveying of specific tissue expression of human chromosome 19 sequences. *Genomics* **14**, 263-9 (1992).
- Ehrenman, K., Yang, G., Hong, W.P. et al.** Disruption of aldehyde reductase increases group size in dictyostelium. *J Biol Chem* **279**, 837-47 (2004).
- Eichinger, L., Bahler, M., Dietz, M., Eckerskorn, C. & Schleicher, M.** Characterization and cloning of a Dictyostelium Ste20-like protein kinase that phosphorylates the actin-binding protein severin. *J Biol Chem* **273**, 12952-9 (1998).
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G. et al.** The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature* **435**, 43-57 (2005).
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. & Whitehouse, C.M.** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71 (1989).
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O. et al.** Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. *Science* **269**, 496-512 (1995).
- Francis, S.H. & Corbin, J.D.** Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* **56**, 237-72 (1994).
- Friedman, D.B., Hill, S., Keller, J.W. et al.** Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 793-811 (2004).
- Gade, D., Thiermann, J., Markowsky, D. & Rabus, R.** Evaluation of two-dimensional difference gel electrophoresis for protein profiling. Soluble proteins of the marine bacterium Pirellula sp. strain 1. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**, 240-51 (2003).
- Gade, D., Theiss, D., Lange, D. et al.** Towards the proteome of the marine bacterium Rhodospirillum rubrum: mapping the soluble proteins. *Proteomics* **5**, 3654-71 (2005).
- Geier, A., Horn, J., Dingermann, T. & Winckler, T.** A nuclear protein factor binds specifically to the 3'-regulatory module of the long-interspersed-nuclear-element-like Dictyostelium repetitive element. *Eur J Biochem* **241**, 70-6 (1996).
- Glöckner, G., Eichinger, L., Szafranski, K. et al.** Sequence and analysis of chromosome 2 of Dictyostelium discoideum. *Nature* **418**, 79-85 (2002).
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H. et al.** Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-7 (1996).
- Gomer, R.H.** Cell density sensing in a eukaryote. *ASM News* **65**, 23-29 (1999).

- Görg, A., Postel, W. & Gunther, S.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**, 531-46 (1988).
- Görg, A., Weiss, W. & Dunn, M.J.** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-85 (2004).
- Grills, G., Griffin, C., Massimi, A., Lilley, K., Knudtson, K. & VanEe, J.** A current profile of microarray laboratories: results of the 2000-2001 ABRF Microarray Research Group Survey of Laboratories using microarray technologies., presented at the ABRF Conference in San Diego, USA (2001).
- Gu, J., Stephenson, C.G. & Iadarola, M.J.** Recombinant proteins attached to a nickel-NTA column: use in affinity purification of antibodies. *Biotechniques* **17**, 257, 260, 262 (1994).
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R. & Aebersold, R.** Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19**, 1720-30 (1999).
- Haab, B.B., Dunham, M.J. & Brown, P.O.** Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0004 (2001).
- Hanahan, D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80 (1983).
- Hentschel, U., Zündorf, I., Dingermann, T. & Winckler, T.** On the problem of establishing the subcellular localization of Dictyostelium retrotransposon TRE5-A proteins by biochemical analysis of nuclear extracts. *Anal Biochem* **296**, 83-91 (2001).
- Higgins, R.C. & Dahmus, M.E.** Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **93**, 257-60 (1979).
- Hochuli, E.** Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. *Genet Eng (NY)* **12**, 87-98 (1990).
- Horn, J., Dietz-Schmidt, A., Zundorf, I., Garin, L., Dingermann, T. & Winckler, T.** A Dictyostelium protein binds to distinct oligo(dA).oligo(dT) DNA sequences in the C-module of the retrotransposable element DRE. *Eur. J. Biochem.* **265**, 441-448 (1999).
- Huber, L.A.** Is proteomics heading in the wrong direction? *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 74-80 (2003).
- Huth, J.R., Bewley, C.A., Nissen, M.S. et al.** The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol* **4**, 657-65 (1997).
- Insall, R.H., Soede, R.D., Schaap, P. & Devreotes, P.N.** Two cAMP receptors activate common signaling pathways in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* **5**, 703-11 (1994).
- Insall, R.H., Borleis, J. & Devreotes, P.N.** The aimless RasGEF is required for processing of chemotactic signals through G-protein-coupled receptors in Dictyostelium. *Curr Biol* **6**, 719-29 (1996).
- Iranfar, N., Fuller, D., Sasik, R., Hwa, T., Laub, M. & Loomis, W.F.** Expression patterns of cell-type-specific genes in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* **12**, 2590-600 (2001).
- Iranfar, N., Fuller, D. & Loomis, W.F.** Genome-wide expression analyses of gene regulation during early development of Dictyostelium discoideum. *Eukaryot Cell* **2**, 664-70 (2003).

- Jenkins, R.E. & Pennington, S.R.** Arrays for protein expression profiling: towards a viable alternative to two-dimensional gel electrophoresis? *Proteomics* **1**, 13-29 (2001).
- Jung, J., Mysliwiec, M.R. & Lee, Y.** Roles of JUMONJI in mouse embryonic development. *Dev Dyn* **232**, 21-32 (2005).
- Karas, M. & Hillenkamp, F.** Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**, 2299-301 (1988).
- Kay, R.R. & Williams, J.G.** The Dictyostelium genome project - an invitation to species hopping. *Trends Genet.* **15**, 294-297 (1999).
- Kim, J.M., Vanguri, S., Boeke, J.D., Gabriel, A. & Voytas, D.F.** Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res* **8**, 464-78 (1998).
- Kim, T.G., Kraus, J.C., Chen, J. & Lee, Y.** JUMONJI, a critical factor for cardiac development, functions as a transcriptional repressor. *J Biol Chem* **278**, 42247-55 (2003).
- Klose, J.** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231-43 (1975).
- Klose, J. & Kobalz, U.** Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **16**, 1034-59 (1995).
- Knecht, D.A., Fuller, D.L. & Loomis, W.F.** Surface glycoprotein, gp24, involved in early adhesion of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* **121**, 277-83 (1987).
- Knetsch, M.L., Epskamp, S.J., Schenk, P.W., Wang, Y., Segall, J.E. & Snaar-Jagalska, B.E.** Dual role of cAMP and involvement of both G-proteins and ras in regulation of ERK2 in *Dictyostelium discoideum*. *Embo J* **15**, 3361-8 (1996).
- Kolbinger, A., Gao, T., Brock, D. et al.** A cysteine-rich extracellular protein containing a PA14 domain mediates quorum sensing in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell* **4**, 991-8 (2005).
- Konijn, T.M., Van De Meene, J.G., Bonner, J.T. & Barkley, D.S.** The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 1152-4 (1967).
- Kumar, A. & Bennetzen, J.L.** Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet* **33**, 479-532 (1999).
- Kyhse-Andersen, J.** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-9 (1984).
- Laemmli, U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B. et al.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
- Lashkari, D.A., DeRisi, J.L., McCusker, J.H. et al.** Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13057-62 (1997).

- Lee, S., Parent, C.A., Insall, R. & Firtel, R.A.** A novel Ras-interacting protein required for chemotaxis and cyclic adenosine monophosphate signal relay in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* **10**, 2829-45 (1999).
- Leichtling, B.H., Majerfeld, I.H., Spitz, E. et al.** A cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase in Dictyostelium discoideum. II. Developmental regulation. *J Biol Chem* **259**, 662-8 (1984).
- Lilly, P.J. & Devreotes, P.N.** Identification of CRAC, a cytosolic regulator required for guanine nucleotide stimulation of adenylyl cyclase in Dictyostelium. *J Biol Chem* **269**, 14123-9 (1994).
- Lim, C.J., Spiegelman, G.B. & Weeks, G.** RasC is required for optimal activation of adenylyl cyclase and Akt/PKB during aggregation. *Embo J* **20**, 4490-9 (2001).
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C. et al.** Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **14**, 1675-80 (1996).
- Loomis, W.F.** *The development of Dictyostelium discoideum.*, 551 (Ac. Press, New York, 1982).
- Loomis, W.F.** Lateral inhibition and pattern formation in Dictyostelium. *Curr. Topics Dev. Biol.* **28**, 1-46 (1993).
- Loomis, W.F.** Role of PKA in the timing of developmental events in Dictyostelium cells. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 684-94 (1998).
- Løvborg, U.** *Monoclonal antibodies : production & maintenance*, (Heinemann Medical, London, 1982).
- Maeda, M., Aubry, L., Insall, R., Gaskins, C., Devreotes, P.N. & Firtel, R.A.** Seven helix chemoattractant receptors transiently stimulate mitogen-activated protein kinase in Dictyostelium. Role of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* **271**, 3351-4 (1996).
- Maeda, Y., Ohmori, T., Abe, T., Abe, F. & Amagai, A.** Transition of starving Dictyostelium cells to differentiation phase at a particular position of the cell cycle. *Differentiation* **41**, 169-175 (1989).
- Maier, E., Roest Crolius, H. & Lehrach, H.** Hybridisation techniques on gridded high density DNA and in situ colony filters based on fluorescence detection. *Nucleic Acids Res* **22**, 3423-4 (1994).
- Mandelkow, E. & Mandelkow, E.M.** Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 72-81 (1995).
- Mann, S.K., Brown, J.M., Briscoe, C. et al.** Role of cAMP-dependent protein kinase in controlling aggregation and postaggregative development in Dictyostelium. *Dev Biol* **183**, 208-21 (1997).
- Mann, S.K.O. & Firtel, R.A.** A developmentally regulated, putative serine/threonine protein kinase is essential for development in Dictyostelium. *Mech. Devel.* **35**, 89-101 (1991).
- Marouga, R., David, S. & Hawkins, E.** The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* **382**, 669-78 (2005).
- McClintock, B.** Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **16**, 13-47 (1951).

- Meima, M.E. & Schaap, P.** Fingerprinting of adenylyl cyclase activities during Dictyostelium development indicates a dominant role for adenylyl cyclase B in terminal differentiation. *Dev Biol* **212**, 182-90 (1999).
- Miller, C., Gurd, J. & Brass, A.** A RAPID algorithm for sequence database comparisons: application to the identification of vector contamination in the EMBL databases. *Bioinformatics* **15**, 111-21 (1999).
- Murgia, I., Maciver, S.K. & Morandini, P.** An actin-related protein from Dictyostelium discoideum is developmentally regulated and associated with mitochondria. *FEBS Lett* **360**, 235-41 (1995).
- Mutzel, R.** Cellular slime molds: why and how to become pluricellular. *Bull. Inst. Pasteur* **89**, 51-58 (1991).
- O'Farrell, P.H.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-21 (1975).
- Pan, P., Hall, E.M. & Bonner, J.T.** Folic acid as second chemotactic substance in the cellular slime moulds. *Nature New Biol.* **237**, 181-182 (1972).
- Pappin, D.J., Hojrup, P. & Bleasby, A.J.** Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* **3**, 327-32 (1993).
- Part, D., de Gunzburg, J. & Veron, M.** The regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from Dictyostelium discoideum: cellular localization and developmental regulation analyzed by immunoblotting. *Cell Differ* **17**, 221-7 (1985).
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. & Cottrell, J.S.** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-67 (1999).
- Rabilloud, T., Valette, C. & Lawrence, J.J.** Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* **15**, 1552-8 (1994).
- Rabilloud, T.** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**, 3-10 (2002).
- Raper, K.B.** Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**, 135-147 (1935).
- Rathi, A., Kayman, S.C. & Clarke, M.** Induction of gene expression in Dictyostelium by prestarvation factor, a factor secreted by growing cells. *Dev Genet* **12**, 82-7 (1991).
- Reeves, R. & Nissen, M.S.** The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* **265**, 8573-82 (1990).
- Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch, E.F.** *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3 v. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).
- Sanchez, J.C., Rouge, V., Pisteur, M. et al.** Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18**, 324-7 (1997).

- Santoni, V., Molloy, M. & Rabilloud, T.** Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21**, 1054-70 (2000).
- Schaller, K.L., Leichtling, B.H. & Rickenberg, H.V.** Isolation of a clone for the regulatory subunit of the cyclic cAMP-dependent protein kinase of *D. discoideum*. in *Molecular approaches to developmental biology* (eds. Firtel, R.A. & Davidson, E.H.) 351-360 (A.R. Liss, New York, 1987).
- Scheele, G.A.** Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J Biol Chem* **250**, 5375-85 (1975).
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. & Brown, P.O.** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-70 (1995).
- Schultz, J., Doerks, T., Ponting, C.P., Copley, R.R. & Bork, P.** More than 1,000 putative new human signalling proteins revealed by EST data mining. *Nat Genet* **25**, 201-4 (2000).
- Schumann, G., Zündorf, I., Hofmann, J., Marschalek, R. & Dingermann, T.** Internally located and oppositely oriented polymerase II promoters direct convergent transcription of a LINE-like retroelement, the Dictyostelium repetitive element, from Dictyostelium discoideum. *Mol Cell Biol* **14**, 3074-84 (1994).
- Secko, D.M., Insall, R.H., Spiegelman, G.B. & Weeks, G.** The identification of Dictyostelium phosphoproteins altered in response to the activation of RasG. *Proteomics* **4**, 2629-39 (2004).
- Segall, J.E., Kuspa, A., Shaulsky, G. et al.** A MAP kinase necessary for receptor-mediated activation of adenylyl cyclase in Dictyostelium. *J Cell Biol* **128**, 405-13 (1995).
- Shaulsky, G., Escalante, R. & Loomis, W.F.** Developmental signal transduction pathways uncovered by genetic suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15260-5 (1996).
- Shaulsky, G. & Loomis, W.F.** Initial cell type divergence in Dictyostelium is independent of DIF-1. *Dev Biol* **174**, 214-20 (1996).
- Shaulsky, G., Fuller, D. & Loomis, W.F.** A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation. *Development* **125**, 691-9 (1998).
- Shaw, J., Rowlinson, R., Nickson, J. et al.** Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* **3**, 1181-95 (2003).
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M.** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-8 (1996).
- Simon, M.N., Driscoll, D., Mutzel, R., Part, D., Williams, J. & Veron, M.** Overproduction of the regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase blocks the differentiation of Dictyostelium discoideum. *Embo J* **8**, 2039-43 (1989).
- Siol, O., Dingermann, T. & Winckler, T.** The C-Module DNA-Binding Factor Mediates Expression of the Dictyostelium Aggregation-Specific Adenylyl Cyclase ACA. *Eukaryot Cell* **5**, 658-64 (2006).
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T. et al.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85 (1985).
- Söderbom, F. & Loomis, W.F.** Cell-cell signaling during Dictyostelium development. *Trends Microbiol* **6**, 402-6 (1998).

- Söderbom, F., Anjard, C., Iranfar, N., Fuller, D. & Loomis, W.F.** An adenylyl cyclase that functions during late development of Dictyostelium. *Development* **126**, 5463-5471 (1999).
- Souza, G.M., Lu, S. & Kuspa, A.** YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in Dictyostelium. *Development* **125**, 2291-302 (1998).
- Souza, G.M., da Silva, A.M. & Kuspa, A.** Starvation promotes Dictyostelium development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway. *Development* **126**, 3263-74 (1999).
- Srinivasan, S., Traini, M., Herbert, B. et al.** Proteomic analysis of a developmentally regulated secretory vesicle. *Proteomics* **1**, 1119-27 (2001).
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W.** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89 (1990).
- Sucgang, R., Weijer, C.J., Siegert, F., Franke, J. & Kessin, R.H.** Null mutations of the Dictyostelium cyclic nucleotide phosphodiesterase gene block chemotactic cell movement in developing aggregates. *Dev Biol* **192**, 181-92 (1997).
- Sucgang, R., Chen, G., Liu, W. et al.** Sequence and structure of the extrachromosomal palindrome encoding the ribosomal RNA genes in Dictyostelium. *Nucleic Acids Res* **31**, 2361-8 (2003).
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J. & Holle, A.** A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* **376**, 952-65 (2003).
- Sultana, H., Rivero, F., Blau-Wasser, R. et al.** Cyclase-associated protein is essential for the functioning of the endo-lysosomal system and provides a link to the actin cytoskeleton. *Traffic* **6**, 930-46 (2005).
- Sussman, R. & Sussman, M.** Cultivation of Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**, 53-55 (1967).
- Szafranski, K., Glockner, G., Dingermann, T. et al.** Non-LTR retrotransposons with unique integration preferences downstream of Dictyostelium discoideum tRNA genes. *Mol Gen Genet* **262**, 772-80 (1999).
- Taminato, A., Bagattini, R., Gorjao, R., Chen, G., Kuspa, A. & Souza, G.M.** Role for YakA, cAMP, and protein kinase A in regulation of stress responses of Dictyostelium discoideum cells. *Mol Biol Cell* **13**, 2266-75 (2002).
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H. et al.** Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811-6 (2006).
- Ünlü, M., Morgan, M.E. & Minden, J.S.** Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-7 (1997).
- Urushihara, H.** Functional genomics of the social amoebae, Dictyostelium discoideum. *Mol Cells* **13**, 1-4 (2002).
- Van Driessche, N., Shaw, C., Katoh, M. et al.** A transcriptional profile of multicellular development in Dictyostelium discoideum. *Development* **129**, 1543-52 (2002).
- Van Driessche, N., Demsar, J., Booth, E.O. et al.** Epistasis analysis with global transcriptional phenotypes. *Nat Genet* **37**, 471-7 (2005).

- Van Es, S., Virdy, K.J., Pitt, G.S. et al.** Adenylyl cyclase G, an osmosensor controlling germination of Dictyostelium spores. *J Biol Chem* **271**, 23623-5 (1996).
- Van Haastert, P.J., Bishop, J.D. & Gomer, R.H.** The cell density factor CMF regulates the chemoattractant receptor cAR1 in Dictyostelium. *J Cell Biol* **134**, 1543-9 (1996).
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W. et al.** The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-51 (2001).
- Washburn, M.P., Wolters, D. & Yates, J.R., 3rd.** Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **19**, 242-7 (2001).
- Webster, J. & Oxley, D.** Peptide mass fingerprinting: protein identification using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol* **310**, 227-40 (2005).
- Westermeier, R. & Marouga, R.** Protein detection methods in proteomics research. *Biosci Rep* **25**, 19-32 (2005).
- White, E., Tolbert, E.M. & Katz, E.R.** Identification of tubulin in Dictyostelium discoideum: characterization of some unique properties. *J Cell Biol* **97**, 1011-9 (1983).
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A. et al.** Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* **13**, 19-50 (1996).
- Williams, J.G., Noegel, A.A. & Eichinger, L.** Manifestations of multicellularity: Dictyostelium reports in. *Trends Genet* **21**, 392-8 (2005).
- Winckler, T., Trautwein, C., Tschepke, C. et al.** Gene function analysis by amber stop codon suppression: CMBF is a nuclear protein that supports growth and development of Dictyostelium amoebae. *J. Mol. Biol.* **305**, 703-714 (2001).
- Winckler, T., Dingermann, T. & Glöckner, G.** Dictyostelium mobile elements: strategies to amplify in a compact genome. *Cell Mol Life Sci* **59**, 2097-111 (2002).
- Winckler, T., Iranfar, N., Beck, P. et al.** CbfA, the C-module DNA-binding factor, plays an essential role in the initiation of Dictyostelium discoideum development. *Eukaryot Cell* **3**, 1349-58 (2004).
- Witke, W., Nellen, W. & Noegel, A.** Homologous recombination in the Dictyostelium alpha-actinin gene leads to an altered mRNA and lack of the protein. *Embo J* **6**, 4143-8 (1987).
- Wolters, D.A., Washburn, M.P. & Yates, J.R., 3rd.** An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* **73**, 5683-90 (2001).
- Yan, J.X., Tonella, L., Sanchez, J.C. et al.** The Dictyostelium discoideum proteome--the SWISS-2DPAGE database of the multicellular aggregate (slug). *Electrophoresis* **18**, 491-7 (1997).
- Yan, J.X., Devenish, A.T., Wait, R., Stone, T., Lewis, S. & Fowler, S.** Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry based proteomic analysis of Escherichia coli. *Proteomics* **2**, 1682-98 (2002).
- Yuen, I.S., Jain, R., Bishop, J.D. et al.** A density-sensing factor regulates signal transduction in Dictyostelium. *J Cell Biol* **129**, 1251-62 (1995).

Zhou, S., Bailey, M.J., Dunn, M.J., Preedy, V.R. & Emery, P.W. A systematic investigation into the recovery of radioactively labeled proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **25**, 1-7 (2004).

Zhu, K., Miller, F.R., Barder, T.J. & Lubman, D.M. Identification of low molecular weight proteins isolated by 2-D liquid separations. *J Mass Spectrom* **39**, 770-80 (2004).

Zhukovskaya, N.V., Fukuzawa, M., Tsujioka, M. et al. Dd-STATb, a Dictyostelium STAT protein with a highly aberrant SH2 domain, functions as a regulator of gene expression during growth and early development. *Development* **131**, 447-58 (2004).

Zuo, X. & Speicher, D.W. Quantitative evaluation of protein recoveries in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 3035-47 (2000).

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ingo Wilhelm Matthias Jennes
Geburtstag: 26. April 1972
Geburtsort: Linnich
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1978-1982: Katholische Grundschule Linnich
1982-1988: Städtische Realschule Linnich
1988-1991: Städtisches Lessing-Gymnasium und
Städtische Lessing-Kollegschule Düsseldorf
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife; Staatlich geprüfter
Biologisch-technischer Assistent

Grundwehrdienst

07/1991-06/1992: zentraler Sanitätsbereich der Bundeswehr in München und Koblenz

Studium

10/1992-03/1994: Studium der Chemie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf
04/1994-03/2000: Studium der Pharmazie,
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
09/1998: Erstes Staatsexamen
04/2000: Zweites Staatsexamen

Praktische Ausbildung:

05/2000-10/2000: Struwwelpeter Apotheke, Frankfurt am Main
11/2000-04/2001 november AG, Erlangen; Abteilung: Molekulare Therapie
06/2001: Drittes Staatsexamen und Approbation als Apotheker

Promotion:

05/2001-08/2002: Promotion unter der Aufsicht von Prof. Dr. Andreas Zimmer und Prof. Dr. Theodor Dingermann, durchgeführt am Institut für Pharmazeutische Technologie und am Institut für Pharmazeutische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität.
09/2002-04/2006: Anfertigung der vorliegenden Promotion unter der Aufsicht von Prof. Dr. Thomas Winckler am Institut für Pharmazeutische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität.

Akademische Lehrer

Prof. Dr. Th. Dingermann, Prof. Dr. E. Ehlers, Prof. Dr. H. Hoffmann, Prof. Dr. J. Kreuter, PD. Dr. K. Langer, Prof. Dr. H. Linde, Prof. Dr. W. Müller, Prof. Dr. Ch. Noe, Prof. Dr. D. Steinhilber, Prof. Dr. O. Werz, Prof. Dr. Th. Winckler, Prof. Dr. A. Zimmer

8 Publikationen

Konferenzteilnahmen und Tagungsbeiträge

Ingo Jennes, Theodor Dingermann and Thomas Winckler (2005): "A proteomics approach to identify CbfA-regulated Dictyostelium proteins". Posterpräsentation bei der *International Dictyostelium Conference 2005*, Autrans; Frankreich

D. Lochmann, I. Jennes, V. Vogel, D. Schubert, A. Zimmer (2002): "Characterisation of protamine-oligonucleotide particles for antisense delivery into cells". Posterpräsentation bei dem *4th World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology*, Florenz, Italien

Jennes, I., Vogel, V., Schubert, D., Dingermann, Th., Zimmer, A. (2002): "Use of viral capsid proteins for antisense-oligonucleotide delivery". Posterpräsentation bei dem *4th European Graduate Student Meeting*, Frankfurt am Main, Deutschland

Veröffentlichungen

Thomas Winckler, Negin Iranfar, Peter Beck, Ingo Jennes, Oliver Siol, Unha Baik, William F. Loomis and Theodor Dingermann (2004): "CbfA, the C-Modul DNA-Binding Factor, Plays an Essential Role in the Initiation of Dictyostelium discoideum Development". *Eukaryotic Cell* 3, 1331-1348

Brinkman, M., Walter, J., Jennes, I., Neugebauer, M., Bertling, W., Grein, S., Thies, M., Weigand, M., Beyer, T., Hermann, M., Reiser, C. and Hess, J. (2004). "Recombinant murine polyoma virus-like-particles induce protective anti-tumour immunity". *Letters in Drug Design & Discovery*, 1, 137.

Deml A., Jennes I., Küster C., Preißmann M., Wingerter O. und Zimmer A. (2000): "Insulinpumpen - Technische und Pharmazeutische Anforderungen". *Deutsche Apoth. Ztg.* 140, 2278-2284.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt und dadurch zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Thomas Winckler für die Überlassung des interessanten und anspruchsvollen Themas. Für seine intensive und geduldige Betreuung, die vielen Tips und Ratschläge im Laboralltag, seine Diskussionsbereitschaft und seine maßgebliche Hilfe bei der Ausarbeitung der Posterpräsentation.

Herrn Prof. Dr. Michael Karas für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Theodor Dingermann und Herrn Prof. Dr. Rolf Marschalek für ihre manchmal kritischen, aber vor allem kreativen und innovativen Diskussionsbeiträge während zahlreicher Arbeitsseminare.

Frau Dr. Ilse Zündorf für ihre Unterstützung bei der Herstellung des monoklonalen Antikörpers und für die Organisation und den reibungslosen Ablauf des Bio I Praktikums.

Allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima sowie unvergessene Momente innerhalb und außerhalb des Biozentrums.

Dr. Peter Beck und Dr. Unha Monika Baik für die freundliche und hilfsbereite Aufnahme in das „Didi-Labor“ und Oliver Siol dafür, daß er in Frankreich nicht geschnarcht hat. Dr. Christian Klein und Anne Gaußmann für die witzigen Bio I Praktika (nein, wir machen keinen Schnitt durch die Testis und darüber sind der Christian und ich auch heilfroh). Den restlichen „alten Rolfis“ Dr. Adelheid Bursen, Dr. Sven Moritz, Sebastian Scharf, Ute Steiner und natürlich Zech, Dr. Jürgen dafür, daß man bei Euch immer etwas besorgen konnte, sowie den „neuen Rolfis“ Anne Benedikt, Clarissa Oehm und Karen Schley.

Frau Erika Lemmer sowie unseren TAs, weil durch sie der Alltag einfach leichter wird. Vor allem Frau Freia Pfeil für ihre Hilfe bei der Herstellung der 2D-Gele.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Thanh Chung (für „klaue Blone“) und bei Jens Rabenstein (dafür, daß die Welt bunt ist) bedanken, zu denen sich im Laufe der Jahre eine tiefe Freundschaft entwickelt hat, die weit über das Verhältnis zwischen Arbeitskollegen hinaus geht und die ich sehr zu schätzen weiß.

Sabrina Baltruschat, Tobias Beckhaus und Martin Hampel sowie den ehemaligen Kollegen Dr. Carsten Corvey und Dr. Isam Rais aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Karas für den Neuaufbau unserer Proteomics-Exklave in N 220 und der dortigen reibungslosen Zusammenarbeit. Dr. Michaelis Aivaliotis danke ich für so machen Trick bei der Herstellung von 2D-Gelen und für das Protokoll der Kolloidal Coomassiefärbung.

Tobias Beckhaus (zum zweiten), Jeremy Hack und Michael Hörnig, denen ich wohl mehr als einmal auf die Nerven gegangen bin, wenn ich mit meinen Kenntnissen über Computer, ihren Programmen oder Netzwerken mal wieder nicht weiter kam.

An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal besonders bei Tobias Beckhaus (...zum dritten und verkauft...) für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen meiner Proben und die Zusammenstellung der Spektren bedanken. Ohne dich wäre der Ergebnisteil wohl nur halb so umfangreich ausgefallen. Vielen Dank Tobi.

Danksagung

Den ehemaligen Kollegen Dr. Dirk Lochmann und Dr. Jörg Weyermann für die lustige Zeit, nicht nur im Institut für Pharmazeutische Technologie sowie meinem damaligen Betreuer, Herrn Prof. Dr. Andreas Zimmer für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Außerdem möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Klaus Langer bedanken, der mir meine Entscheidung, bei den Biologen „noch mal von vorne anzufangen“, um einiges erleichtert hat.

Herrn Dr. Jürgen Thiermann und Herrn Dr. Burghardt Scheibe von der Firma Amersham Biosciences (now part of GE Healthcare!) dafür, daß sie jederzeit mit Rat und Tat bei allen Fragen rund um den Typhoon, den Spotpicker oder der DeCyder-Software zur Seite standen sowie der Firma GE Healthcare für die Nutzung des Typhoons und der DeCyder-Software.

Dem Zentrum für Arzneimittelforschung, Entwicklung und Sicherheit (ZAFES) für die Finanzierung des Spotpickers und der damit verbundenen Möglichkeit, die DIGE-Technologie zu nutzen.

Meinen Eltern, die in allen Lebenslagen für mich da sind und die immer fest an mich geglaubt haben sowie meiner Schwester Ina und ihrem Mann Markus für ihren Rückhalt und für meine beiden aufgeweckten und sehr lebhaften Neffen Lennart und Fynn.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt Anke für ihre Liebe und ihr fast grenzenloses Verständnis das sie immer wieder für mich aufbringt. Außerdem möchte ich ihr für die kritische Durchsicht der Arbeit Danken und dafür, daß sie mir gezeigt hat wie schön es ist unter der Oberfläche zu schweben...