

Sind Aquaporine an der Zellwanderung beteiligt?



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Julia von Bülow

Kiel 2011

Referent:
Korreferent:
Tag der mündlichen Prüfung:
Zum Druck genehmigt:

Prof. Dr. Eric Beitz
Prof. Dr. Matthias Leippe
31.08.2011

Prof. Dr. Lutz Kipp
(Dekan)

Für meine Familie, die immer für mich da ist.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Zellwanderung	1
1.2 Aquaporine	2
1.2.1 Struktur der Aquaporine	2
1.2.2 Aquaporine und Zellwanderung?	4
1.3 <i>Dictyostelium discoideum</i>	6
1.3.1 Lebenszyklus von <i>D. discoideum</i>	7
1.3.2 <i>D. discoideum</i> als Modellorganismus	8
1.3.3 Zellwanderung von <i>D. discoideum</i>	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit	10
2 Material	12
2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien und Material	12
2.2 Geräte	14
2.3 Plasmide	16
2.4 Oligonukleotide (Primer)	20
2.5 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	24
2.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	24
2.7 <i>D. discoideum</i> -Stämme	25
2.8 Verwendete Antikörper	25
2.9 Puffer und Lösungen	25
2.9.1 Molekularbiologie	26
2.9.2 Proteinchemie	28
2.9.3 <i>D. discoideum</i> Zellkultur	31
3 Methoden	33

3.1	Molekularbiologische Methoden	33
3.1.1	Agarose-Gelelektrophorese	33
3.1.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	34
3.1.3	Entsalzung von DNA	35
3.1.4	DNA Aufreinigung durch Ethanolfällung	35
3.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
3.1.6	Restriktionsverdau von DNA	35
3.1.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	36
3.1.8	Anlegen von Bakteriendauerkulturen	36
3.1.9	5'-DNA-Dephosphorylierung	36
3.1.10	Klenow-Behandlung und Phosphorylierung	36
3.1.11	Ligation von DNA	36
3.1.12	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
3.1.13	Standardtransformation von <i>E. coli</i>	38
3.1.14	Schnelltransformation von <i>E. coli</i>	38
3.1.15	DNA-Sequenzierung	38
3.1.16	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.1.17	<i>In vitro</i> Mutagenese	41
3.1.18	DEPC-Behandlung	42
3.1.19	RNA-Isolierung aus <i>D. discoideum</i>	42
3.1.20	cDNA Erststrangsynthese	42
3.1.21	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	42
3.2	Proteinchemische Methoden	43
3.2.1	<i>S. cerevisiae</i> Methylamin-Efflux-Assay	43
3.2.2	Bradford-Proteinbestimmung	45
3.2.3	SDS-PAGE: Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
3.2.4	Herstellung der Antikörperseren	46
3.2.5	Affinitätschromatographische Aufreinigung der Antikörperseren	47
3.2.6	Immundetektion	48
3.2.7	N-Glykosidase F Assay	49
3.2.8	Immunpräzipitation	50
3.3	Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oocyten	51
3.3.1	cRNA Synthese	51
3.3.2	Oocytenpräparation	52

3.3.3	Oocyten-Injektion	52
3.3.4	Oocyten-Schwelltests	52
3.3.5	Präparation von Membranproteinen aus <i>X. laevis</i> Oocyten	53
3.4	Zellkultur von <i>D. discoideum</i>	54
3.4.1	Passagieren von Zellen	54
3.4.2	Anlegen von Sporen-Dauerkulturen	54
3.4.3	Keimung von Sporen-Dauerkulturen	55
3.4.4	Bestimmung der Zellzahl	55
3.4.5	Mediumswechsel	55
3.4.6	Anlegen von Flüssig-Schüttelkulturen und Bestimmung der Generationszeit	55
3.4.7	Membranfraktionsgewinnung aus <i>D. discoideum</i>	56
3.4.8	Isolierung von genomischer DNA aus <i>D. discoideum</i>	56
3.4.9	Isolierung von genomischer DNA aus <i>D. discoideum</i> , <i>quick protocol</i>	57
3.5	Permeabilitätstests durch dynamische Lichtstreuung	57
3.5.1	Prinzip der dynamischen Lichtstreuungsmessung	57
3.5.2	Messung von <i>D. discoideum</i> -Zellen	58
3.6	<i>knockout</i> des <i>DdAQP2</i> -Gens in <i>D. discoideum</i>	58
3.6.1	Klonierung des <i>DdAQP2-knockout</i> -Konstruktes	58
3.6.2	Elektro-Transformation von <i>D. discoideum</i>	59
3.6.3	Calciumchlorid-Transformation von <i>D. discoideum</i>	60
3.6.4	Blasticidinselektion	60
3.6.5	Klone picken	60
3.7	Klonierungsarbeiten/ Mutationen	61
3.7.1	Übersicht über die klonierten Konstrukte	61
3.7.2	Klonierung der Schleife D Mutanten [M] und [N] mittels Fusions- PCRs	64
4	Ergebnisse	66
4.1	Klonierung von <i>DdAQP2</i>	66
4.1.1	Suche nach putativen AQP-Genen in der Genomdatenbank von <i>D. discoideum</i>	66
4.1.2	Topologie-Vorhersage von <i>DdAQP2</i>	67
4.1.3	Vergleich der aromatischen/Arginin-Region (ar/R) von <i>DdAQP2</i> mit der von <i>hAQP1</i>	69

4.1.4	Amplifikation von <i>DdAQP2</i> aus cDNA	69
4.2	Funktionelle Charakterisierung von <i>DdAQP2</i>	71
4.2.1	Expression von <i>DdAQP2</i> in <i>S. cerevisiae</i>	71
4.2.2	Charakterisierung von <i>DdAQP2</i> -Wildtyp in <i>X. laevis</i> Oocyten . .	72
4.2.3	Charakterisierung von <i>DdAQP2</i> -Mutanten in <i>X. laevis</i> Oocyten .	76
4.2.4	Dynamische Lichtstreuungsmessung zur Wasserleitfähigkeit von <i>DdAQP2</i> Δ 208-219	80
4.3	Charakterisierung von <i>DdAQP2</i> in <i>D. discoideum</i> -Amöben	81
4.3.1	Herstellung von affinitätsgereinigten Antikörpern (α N20-34 und α N2-17)	81
4.3.2	Nachweis von <i>DdAQP2</i> in <i>D. discoideum</i> -Amöben	87
4.3.3	Untersuchung einer möglichen Glykosylierung von <i>DdAQP2</i> . . .	89
4.3.4	Untersuchung weiterer Sekundärmodifikationen von <i>DdAQP2</i> . .	91
4.4	Lokalisation von GFP- <i>DdAQP2</i> -Fusionsproteinen in <i>Dictyostelium</i> -Amöben	94
4.5	<i>D. discoideum knockout</i>	95
4.5.1	Wachstumskurve von <i>Dictyostelium</i> -Amöben	95
4.5.2	Ermittlung der Transformationseffizienz	98
4.5.3	Klonierung des <i>knockout</i> -Konstruktes	99
4.5.4	PCRs zur Verifizierung des <i>knockouts</i>	99
4.6	Permeabilitätstests durch dynamische Lichtstreuungsmessung von <i>Dictyo-</i> <i>stelium</i> -Amöben	100
5	Diskussion	103
5.1	Theoretische Sequenz-Analysen: <i>DdAQP2</i> -ein wasserspezifisches Aqua- porin?	103
5.2	Funktionelle Charakterisierung von <i>DdAQP2</i>	105
5.3	<i>DdAQP2</i> - ein <i>gagatetes</i> Aquaporin?	106
5.4	Charakterisierung von <i>DdAQP2</i> in <i>D. discoideum</i> -Amöben	110
5.5	Physiologische Funktion von <i>DdAQP2</i> ?	112
5.6	Ausblick	117
6	Zusammenfassung	121
7	Summary	123
8	Literaturverzeichnis	125

Abkürzungsverzeichnis

<i>aqp</i>	Aquaporin-Gen
<i>DdAQP2</i>	<i>D. discoideum</i> Aquaporin 2-Gen
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
Aqua bidest.	gereinigtes Wasser
ar/R-Region	aromatische/Arginin-Region
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cARs	G-Protein-gekoppelte cAMP-Rezeptoren
DdAQP2	<i>D. discoideum</i> Aquaporin 2-Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
KO	<i>knockout</i>
LB	<i>Lysogenic Broth</i> , Nährmedium für <i>E. coli</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
Nonidet P-40	Octylphenolpoly(ethylenglykoether), Nicht-ionisches Tensid

Abkürzungsverzeichnis

OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PfAQP	Aquaglyceroporin aus <i>Plasmodium falciparum</i>
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Zellwanderung

Es gibt kaum eine Zelle, die nicht irgendwann im Laufe ihres Lebens wandert. So ist Zellwanderung für viele physiologische Prozesse von Bedeutung: Leukozyten jagen und phagozytieren Fremdstoffe oder bewegen sich zu Entzündungsherden [1], Neuroblasten wandern während der Embryogenese zu ihrem zukünftigen Wirkort [2] und die Wundheilung erfordert die Bewegung von Fibroblasten und Epithelzellen [3]. Pathophysiologisch spielt sie eine Rolle bei der Entwicklung und dem Voranschreiten von Atherosklerose, Asthma und Arthritis [4] sowie bei der Metastasierung von Krebszellen [5].

Die Vorgänge bei der eukaryotischen Zellwanderung können in vier Prozesse eingeteilt werden: Polarisierung, Zellausstülpung, Ziehen und Zusammenziehen. Wenn Zellen einen chemotaktischen Gradienten detektieren, polarisieren sie zunächst morphologisch wie funktionell entlang ihrer Bewegungsachse. Dabei kommt es, gesteuert über komplexe Signaltransduktionswege, zur Ausbildung eines dominierenden Vorderendes und eines sich zurückziehenden Hinterendes [6]. Die Fähigkeit, die Polarisierung aufrecht zu erhalten, ist eine Grundvoraussetzung von gerichteter Zellwanderung. Am Vorderende der Zelle bilden sich aktinabhängig Zellausstülpungen (Pseudopodien), die über Integrine an die Extrazellulärmatrix gebunden werden. Die Zelle baut so eine Kraft zur Vorwärtsbewegung auf und wird vorwärts gezogen. Das Hinterende zieht sich unter Beteiligung von Myosin II zusammen. An den vier Prozessen sind neben dem Zytoskelett und Zell-Matrix-Interaktionen auch Ionenkanäle und Transporter beteiligt [7].

So postulieren Verkman *et al.* -ausgehend von Ergebnissen, die sie mit Aquaporin-*knockout*-Mäusen erhielten- dass auch Aquaporine an der Zellwanderung beteiligt sein könnten [8].

1.2 Aquaporine

Aquaporine sind eine Familie von kleinen (ca. 30 kDa/Monomer) hydrophoben Membranproteinen, die entweder selektiv Wasser (orthodoxe Aquaporine) oder auch andere kleine, ungeladene Solute wie Glycerol, Harnstoff oder Ammoniak leiten (Aquaglyceroporine) [9] [10]. Das erste funktionelle Aquaporin (*hAQP1* aus Erythrozyten) wurde 1993 von Peter Agre *et al.* beschrieben [11]. Die Aquaporine kommen in allen Reichen des Lebens vor. Während in einzelligen Organismen wie in Archaea, Bakterien und Hefen nur wenige Aquaporin-Gene präsent sind, wurden in multizellulären Organismen viele Aquaporin-Gene gefunden: Im Menschen wurden 13 Aquaporine mit spezifischer Organ- und Zellverteilung gefunden [12]. Die Pflanze *Arabidopsis thaliana* enthält sogar 38 putative Aquaporin-Gene [13]. Insgesamt wurden bis heute mehr als 450 Aquaporine identifiziert, von denen viele strukturell und funktionell charakterisiert wurden.

1.2.1 Struktur der Aquaporine

Aquaporine liegen in der Membran als Tetramere vor [14], wobei jedes Monomer als eigenständige Wasserpore funktioniert. Jedes Monomer besteht aus sechs transmembranären Helices, die durch fünf Schleifen (A-E) miteinander verbunden sind. N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Die erste und zweite Aquaporinhälfte weisen starke Sequenzähnlichkeiten auf, so dass vermutet wird, dass das gesamte Aquaporin aus einer Genduplikation entstanden ist [15]. Jede Hälfte enthält ein für Aquaporine hochkonserviertes NPA (Asparagin-Prolin-Alanin)-Motiv an den Enden der Halbhelices B und E [16] [17]. Die NPA-Region bildet zusammen mit der weiter extrazellulär gelegenen aromatischen/Arginin-Region (ar/R) den Selektivitätsfilter der Aquaporine (s. Abb. 1.1). Die ar/R-Region besteht aus 3-4 Aminosäuren, wobei das Arginin bei fast allen Aquaporinen konserviert ist [18]. Es trägt mit seiner positiven Ladung zur Abstoßung von Hydroxoniumionen bei [19]. Die ar/R-Region der orthodoxen Aquaporine (z.B. *hAQP1* aus dem Menschen) entspricht mit 0,28 nm Durchmesser genau der Größe eines Wassermoleküls [20]. Ein bei physiologischem pH-Wert vermutlich positiv geladenes Histidin begrenzt den Radius. Aquaglyceroporine wie z.B. GlpF aus *E. coli* haben eine weitere (0,34 nm) und hydrophobere Pore. Anstelle des Histidins haben sie ein kleines Glycin. Die ar/R-Region ist somit sowohl ein Größen- als auch ein elektrostatischer Filter. Wasser gelangt in einer *single-file* Anordnung durch das Aquaporin, wobei eine Leiter von Carbonylsauerstoffen als Wasserstoffbrückenakzeptoren fungiert [21]. In der Mitte

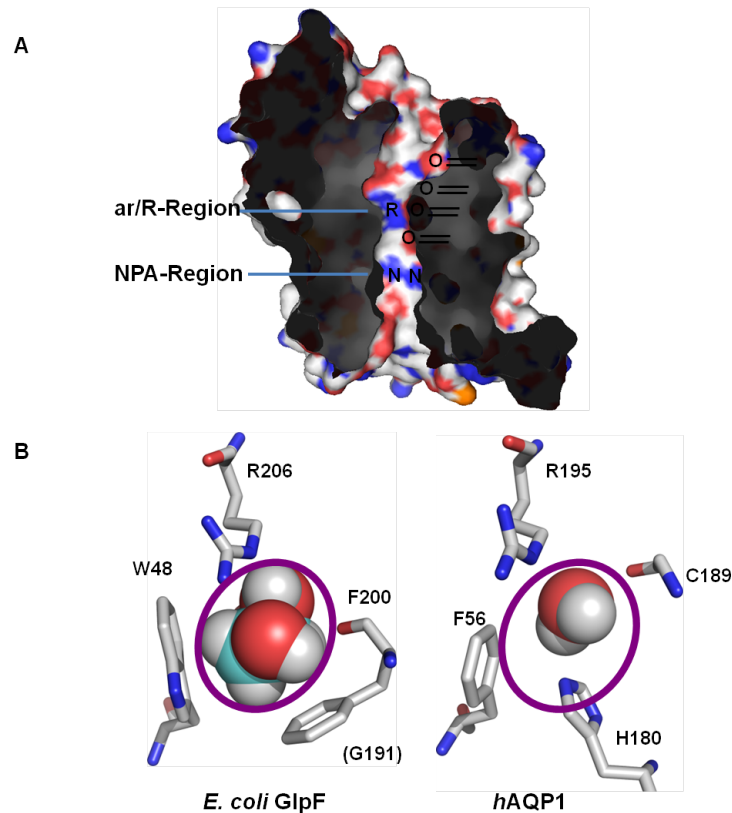


Abbildung 1.1: A: Querschnitt durch ein Aquaporin. Hervorgehoben sind die beiden als Selektivitätsfilter dienenden ar/R-Region und NPA-Region sowie die Carbonylsauerstoff-Leiter. B: Ar/R-Region des Aquaglyceroporins GlpF aus *E. coli* (0,34 nm) und des orthodoxen Aquaporins hAQP1 aus dem Menschen (0,28 nm). Die Positionsnummern der zur ar/R-Region beitragenden Aminosäuren sind mit angegeben.

des Kanals kommt es durch Wechselwirkung des Wassersauerstoffs mit den Asparaginwasserstoffen der NPA-Motive zu einer Drehung des Wassermoleküls um 180° [22], bevor es den Kanal wieder verlässt.

Einige Aquaporine weisen besondere Strukturmerkmale auf, die sie dazu befähigen den Kanal zu öffnen oder zu schließen (*gating*). So hat das Hefe-Aquaglyceroporin Fps1 einen auffällig langen N-Terminus, der eine Regulation des Kanals ermöglicht [23]. In Pflanzen-Aquaporinen gibt es konservierte Serine, deren Phosphorylierungszustand eine Konformationsänderung und damit ein Öffnen/Schließen des Aquaporins herbeiführt (z.B. SoPIP2;1 aus Spinat [24]). Aquaporine transportieren bis zu $3 \cdot 10^9$ Wassermoleküle pro Sekunde durch die Zellmembran. Die Richtung des Transportes wird dabei durch den osmotischen bzw. chemischen Gradienten bestimmt. Von den 13 im Men-

schen gefundenen Aquaporinen gehören AQP 0, 1, 2, 4, 5, 6 und 8 in die Gruppe der wasserspezifischen Aquaporine, AQP 3, 7, 9 und 10 in die der Aquaglycoporine [25]. AQP6 ist neben Wasser auch für Anionen permeabel [26]. Die als Superaquaporine gruppierten AQP 11 und 12 wurden bisher kaum charakterisiert [27]. Aquaporine haben vielfältige Funktionen: So sind sie verantwortlich für die Flüssigkeitshomöostase (Harnkonzentrierung, Blutosmolarität, Lungenbefeuchtung, Innenohr- und Augeninnendruck) und am Metabolitentransport beteiligt (Glycerol in Adipozyten und Leber, Ketonkörper in der Leber) [28]. In Pflanzen sind Aquaporine zuständig für die Aufrechterhaltung des Zellurgors, die Osmoregulation und wirken als Kälteschutz [29]. In Mikroorganismen dienen sie der Osmoregulation [30] [31] und der Nährstoffaufnahme [32]. In *Amoeba proteus* wurde ein Aquaporin in der Membran der kontraktilen Vakuole gefunden, wo es vermutlich auch an der Osmoregulation beteiligt ist [31].

Haben Aquaporine auch eine Funktion für die Zellwanderung?

1.2.2 Aquaporine und Zellwanderung?

Aquaporin-abhängige Zellwanderung wurde in verschiedenen Zelltypen *in vitro* und in Mäusen *in vivo* untersucht [6]. So führte eine Deletion von *aqp1* zu verminderter Endothelzellmigration, verminderter Tumorangiogenese und reduziertem Tumorwachstum. Auch die Migration von Nieren-Epithelzellen nahm ab [8]. Deletion von *aqp4* verminderte die Migration von reaktiven Astrozyten [33] und Deletion von *aqp3* verminderte die Migration von Cornea-Epithelzellen [34], Enterozyten [35] und Keratinozyten [36]. Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten Verkman *et al.* einen molekularen Mechanismus, nach dem Aquaporine für die Zellwanderung von Bedeutung sein könnten (s. Abb. 1.2): Zellen, die durch die Extrazellulärmatrix wandern, müssen ständig ihre Zellform und ihr Zellvolumen ändern. Aquaporine könnten diese Zellvolumenänderung durch den Transport von Wasser erleichtern. Wasserfluss über die Zellmembran könnte außerdem eine hydrostatische Kraft generieren, die die Zelle vorwärts bewegt. Ein möglicher Mechanismus, der berücksichtigt, dass Aquaporine während der Zellwanderung am Vorderende der Zelle polarisiert vorgefunden wurden [37], wird in der Literatur wie folgt beschrieben (s. Abb. 1.2): Ioneneinstrom (vermittelt durch die Ionenaustauscher Na^+/H^+ und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) [7] und Aktindepolymerisation [38] am Vorderende der Zelle führen zu einer lokalen Erhöhung der Osmolarität. Wasser strömt dem osmotischen Gradienten folgend durch Aquaporine in die Zelle. Dies führt zu einer lokalen Zellschwellung mit Erhöhung des hydrostatischen Drucks und zur Ausbildung eines Pseudopodiums, das nachfolgend

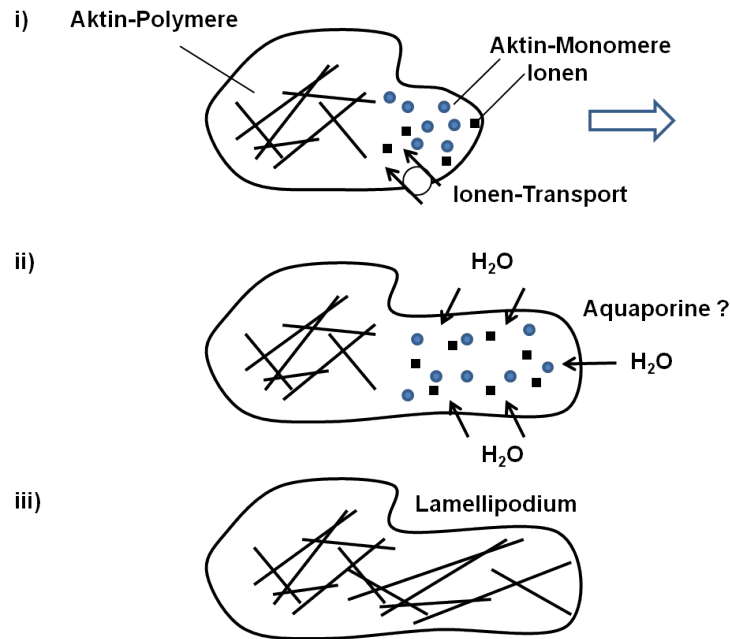


Abbildung 1.2: Vorhergesagter Mechanismus der Beteiligung von Aquaporinen an der Zellwanderung. i) Aktindepolymerisation und Ioneneinstrom erhöhen die Osmolarität am Vorderende der Zelle. ii) Wasser strömt dem osmotischen Gradienten folgend in die Zelle ein, was zur Ausbildung eines Lamellipodiums führt. Dabei polarisiert das Aquaporin ans Vorderende der Zelle. iii) Stabilisierung des Lamellipodiums durch Aktinrepolymerisation. Abbildung angelehnt an [6].

durch Aktinrepolymerisation stabilisiert wird.

Da Zellwanderung sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch relevant ist, besteht ein großes pharmazeutisches Interesse darin, neue beteiligte Komponenten zu identifizieren, um diese möglicherweise als Wirkstoffziele nutzen zu können.

Sind Aquaporine an der Zellwanderung beteiligt? Die Arbeiten von Verkman *et al.* legen dies nahe. Die beschriebenen Ergebnisse wurden von ihnen allerdings entweder in Säugerzellkultur oder in *knockout*-Mäusen erzielt. Ersteres ist ein sehr künstliches, letzteres ein sehr komplexes System. So stellte sich die Frage nach einem geeigneten Modellorganismus. Dieser sollte möglichst wenig komplex, aber trotzdem eukaryotisch sein, um menschlichen Zellen so nahe wie möglich zu bleiben. Der zelluläre Schleimpilz, *Dictyostelium discoideum* erfüllt diese Voraussetzungen und soll deshalb in dieser Arbeit als Modellorganismus dienen.

1.3 *Dictyostelium discoideum*

Im Jahre 1869 isolierte Oskar Brefeld *D. mucoroides*-Sporen aus Dung und legte damit den Grundstein für die Forschung über die *Dictyostelia* [39]. *Dictyostelium discoideum* wurde ca. 50 Jahre später (1933) von Kenneth Raper in einem Waldbodenisolat aus North Carolina entdeckt [40] und ist heute ein etablierter Modellorganismus. Neben *D. discoideum* gehören noch ca. 120 weitere bekannte Arten zu den *Dictyostelia* [41]. Die phylogenetische Einordnung von *D. discoideum* war lange umstritten. Die Sequenzierung des kompletten Genoms 2005 [42] sowie die Analyse von rRNA- und zahlreichen Proteinsequenzen führte zur Einordnung von *D. discoideum* ins Reich der Eukaryoten. Man nimmt heute eine Abzweigung der Amoebazoa, zu denen auch *D. discoideum* gehört, im phylogenetischen Baum zwischen Pflanzen und Pilzen [42] an. Die Entdeckung einer Genfusion kodierend für drei Pyrimidin-Biosynthese-Enzyme, die nur bei *Dictyostelium*, Pilzen und Metazoa vorkommt, weist auch darauf hin, dass die Amoebazoa eine echte Schwestergruppe der Pilze und Metazoa sind [43].

D. discoideum lebt natürlicherweise in humusreichen Waldböden und ernährt sich von Bakterien und Hefen. Diese spürt er chemotaktisch auf und phagozytiert sie. Dabei werden die Bakterien von Pseudopodien umschlossen, endozytotisch aufgenommen und in Lysosomen verdaut [44]. Laborstämme können sich auch durch Pinozytose von Flüssigmedium ernähren. Bei ausreichendem Nahrungsangebot leben die Zellen als amöboidale Einzeller mit einer durchschnittlichen Größe von 10-20 μm . Die Zellen können sich durch Ausbildung von Pseudopodien bewegen.

Das Genom von *D. discoideum* ist haploid und seit 2005, nach erfolgreichem Abschluss des internationalen Genomprojektes, komplett entschlüsselt [42]. Das 34 Mb große Genom verteilt sich auf insgesamt sechs Chromosomen mit einer Größe von 8,5 Mb (Chromosom 2) bis 3,5 Mb (Chromosom 6). 34 Mb entsprechen etwa 1% der Größe des menschlichen Genoms und mehr als dem Doppelten des Genoms von *S. cerevisiae*. Neben den Chromosomen enthält *D. discoideum* ca. 100 Kopien eines linearen 88 kb Palindroms, das die Gene für die ribosomale RNA trägt. Jede Zelle hat außerdem mehrere hundert Mitochondrien, die jeweils ein 57 kb Genom tragen. Das Genom ist gekennzeichnet durch einen außerordentlich hohen A/T-Gehalt von fast 78%, vergleichbar mit dem A/T-Gehalt des einzelligen Parasiten *Plasmodium falciparum* [45]. Ein A/T-reiches Genom kann die spezifische Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) erschweren. Die DNA kodiert für ca. 12500 vorhergesagte Proteine [42],

das entspricht etwa der Hälfte des menschlichen Proteoms [46]. Auffallend viele Gene scheinen für Polyketid-Synthasen und ABC-Transporter zu kodieren, was auf einen extensiven Sekundärmetabolismus mit Produktion und Export kleiner Moleküle schließen lässt [42]. Untersuchungen des Genoms haben viele Proteine und molekulare Prozesse in Schleimpilzen enthüllt, die vorher auf die Metazoa beschränkt schienen.

1.3.1 Lebenszyklus von *D. discoideum*

D. discoideum kann sich sowohl sexuell als auch vegetativ fortpflanzen. Bei der seltenen, sexuellen Fortpflanzung (induziert durch Dunkelheit und hohe Luftfeuchtigkeit) reifen die Amöben zunächst sexuell. Zwei Zellen unterschiedlichen Typs fusionieren daraufhin zu einer Zygote. Diese sezerniert zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP), was Amöben in der Umgebung anlockt, die von der Zygote als Nahrung kannibalistisch phagozytiert werden. Dadurch wird diese zum Makrozyten mit zellulosehaltiger Zellwand und teilt sich meiotisch [47].

Wenn genügend Nahrung vorhanden ist, befinden sich die *Dictyostelium*-Amöben in der vegetativen Vermehrungsphase (s. Abb. 1.3) und teilen sich alle 8-20 Stunden mitotisch. Sie bewegen sich chemotaktisch auf Folat zu, das von ihrer bakteriellen Nahrung sezerniert wird. Dabei überwachen sie ihre Zelldichte im Verhältnis zur Zelldichte ihrer Nahrung durch konstante Sekretion eines Glykoproteins, des *prestarvation factors*. Wenn das Verhältnis aus *prestarvation factor* zu Bakterien einen bestimmten Schwellenwert erreicht, hören die Zellen auf zu proliferieren und ändern ihre Genexpression [48]. Um den Folgen des Hungers zu entgehen beginnen die Amöben ein ca. 24 Stunden andauerndes Entwicklungsprogramm: sogenannte Schrittmacherzellen sezernieren als chemischen Lockstoff cAMP. Bei der Aggregation strömen bis zu 10^5 Amöben auf das cAMP-Signal hin zusammen und formen ein multizelluläres Aggregat. Jede Zelle sezerniert dabei in Wellen weiteres cAMP und lockt so entferntere Amöben an. Die Zellen fungieren auf komplexe Weise gleichzeitig als Sender und Empfänger, wobei sie das cAMP über G-Protein gekoppelte Rezeptoren detektieren. Das Amöben-Aggregat polarisiert, entwickelt eine Spitze (Conus) und fällt auf die Seite. Die Zellen entwickeln sich zu Prästiel- und Präsporenzellen. Der so entstandene *slug* bewegt sich photo- und thermotaktisch zur Erdoberfläche, wo der finale Schritt der Morphogenese, die Ausbildung eines Fruchtkörpers eingeleitet wird. Dieser besteht aus vakuolisierten Stielzellen und Sporenzellen im Verhältnis 20 : 80 [47]. Während die Stielzellen altruistisch einen programmierten Zelltod sterben (deswegen auch der Name „soziale Amöbe“ für *D. discoideum*), können

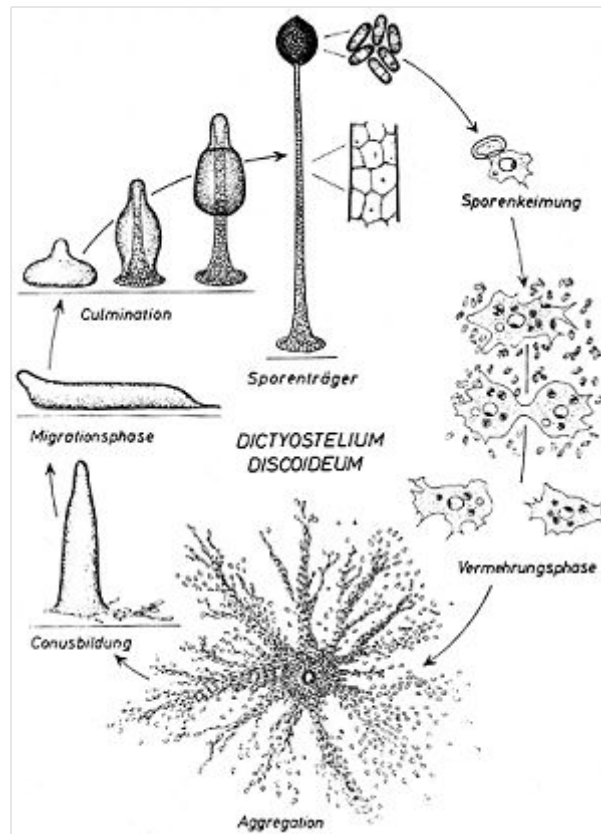


Abbildung 1.3: Vegetativer Entwicklungszyklus von *D. discoideum*. Bei Nahrungsmangel aggregieren mehrere Tausend Amöben, angezogen durch cAMP und bilden einen Conus. In der Migrationsphase wandert der entstandene *slug* bis an der Erdoberfläche die Kulmination stattfindet. Die Stielzellen opfern sich zu Gunsten der Sporenzellen, die unter günstigen Umwelt-Bedingungen wieder auskeimen. Abb. G. Gerisch, MPI Biochem, Martinsried.

die zelluloseumschlossenen Sporenzellen bei günstigen Umweltbedingungen wieder auskeimen und so überleben [49]. Mit diesem Entwicklungszyklus stellt *D. discoideum* ein Bindeglied zwischen Einzellern und multizellulären Lebensformen dar.

1.3.2 *D. discoideum* als Modellorganismus

Die Kombination aus zellulären, genetischen und molekularbiologischen Techniken, die für *Dictyostelium* zur Verfügung stehen, macht ihn für die Analyse von Problemen oft zugänglicher als Säugerzellkulturen. *D. discoideum* ist leicht und günstig im Labor zu kultivieren und hat als einfacher Eukaryot eine zelluläre Organisation wie sie für höhere

Eukaryoten typisch ist [50]. Dabei konnten schon einige in *Dictyostelium* gewonnenen Erkenntnisse auf Säugerzellen übertragen werden, was ihn zu einem wertvollen Modellsystem, auch zur Untersuchung von menschlichen Krankheiten, macht. Viele molekularbiologische Techniken sind verfügbar, wie die Erstellung von *knockout*- oder *knockin*-Mutanten durch homologe Rekombination [51], *Restriction Enzym-Mediated Integration Mutagenesis* [52] oder RNAi-Technologie [53]. Da das Genom haploid ist, sind Phänotypen sofort sichtbar. Des Weiteren stehen zellbiologische Assays, beispielsweise die Lokalisation von Fluoreszenz-markierten Proteinen mittels Mikroskopie, zur Verfügung. In den ca. 70 Jahren *Dictyostelium*-Forschung wurden vielfältige Themen untersucht wie beispielsweise die Phagozytose von Bakterien [54] [55]. Dieser Prozess ist evolutionär konserviert und wird von Immunzellen genutzt, um Mikroorganismen unschädlich zu machen. *D. discoideum*-Zellen phagozytieren auch human-pathogene Erreger wie *Legionella pneumophila* und dienen ihnen als Wirt. So können sie als Modell zur Untersuchung von Wirts-Proteinen, die das intrazelluläre Wachstum beeinflussen, dienen [56]. Des Weiteren wurden in *D. discoideum* Erkenntnisse über Zytoskelettproteine gewonnen, wie sie z.B. für die Erforschung der Lissenzephalie von Bedeutung sind [57]. Auch mitochondriale und neurologische Krankheiten wurden in *D. discoideum* untersucht [58] und die biochemischen Wege, wie neuroaktive Chemikalien wie Valproate und Lithium oder Chemotherapeutika wie Cisplatin wirken, wurden in *D. discoideum* entschlüsselt. Es ist bemerkenswert, dass ein Organismus ohne Gehirn zur Aufklärung dieser Fragestellungen beitragen kann [50].

D. discoideum eignet sich besonders gut, molekulare Mechanismen der Zellwanderung zu untersuchen. Schließlich beruht sein ganzes Leben auf Zellbewegung: Amöboidale Einzelzellen bewegen sich auf ihre Nahrung zu, während hungernde Zellen auf ein cAMP-Gradienten hinwandern.

1.3.3 Zellwanderung von *D. discoideum*

Das Zellwanderungs-Verhalten von aggregierenden *D. discoideum*-Amöben ähnelt stark dem von Leukozyten [59] [60]. Wenn hungernde *Dictyostelien* einem cAMP-Gradienten ausgesetzt werden, polarisieren sie und wandern mit Geschwindigkeiten von bis zu $15 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ [61] auf cAMP zu. Sie orten es dabei mittels G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, den sogenannten cAMP-Rezeptoren (cARs). Dabei erkennen sie schon einen Gradienten von 2% entlang der Zelle [61]. Bindung von cAMP an den Rezeptor führt zur Dissoziation eines heterotrimeren G-Proteins, dessen $G\beta\gamma$ -Untereinheit daraufhin

kleine GTP-bindende Proteine der Ras-Familie und eine oder mehrere Phosphoinositol-3-Kinasen, die am Vorderende der Zelle polarisieren, aktiviert. Diese Lipidkinasen konvertieren Phosphoinositoldiphosphat in Phosphoinositoltriphosphat. Dieses sorgt dafür, dass Proteine mit einer Pleckstrin-Homologie-Domäne zur Plasmamembran translokalisieren. Dort bewirken sie über Signaltransduktionskaskaden Aktinpolymerisation und so die Formierung von Pseudopodien am Vorderende der Zelle. An den Seiten und am Hinterende der Zelle muss die Bildung von Pseudopodien unterdrückt werden, damit es zu einer gerichteten Bewegung kommen kann. Dies geschieht unter Beteiligung von Myosin II und Phosphatasen, die an den Seiten und am Hinterende der Zelle polarisieren. Während die Funktion des Zytoskeletts und der Signaltransduktionswege schon gut untersucht sind (u.a. auch durch Gen-*knockouts* vieler beteiligter Komponenten), ist über die Beteiligung von Ionenkanälen und Transportern an der Zellwanderung noch relativ wenig bekannt. Ionenkanäle spielen eine entscheidende Rolle in der Volumenregulation der Zelle [62]. Dieses ist auch wichtig für die Zellwanderung: In der Literatur ist beschrieben, dass Zellschwellung zu Aktindepolymerisation führt, während Zellschrumpfung Aktinpolymerisation fördert [63]. So scheint für die Pseudopodienbildung aus Aktin eine Volumenregulation von Bedeutung. Am Hinterteil der Zelle wurden Calcium-sensitive Kaliumkanäle sowie Chloridkanäle gefunden. Am Vorderende von migrierenden Zellen wurden außerdem Kalium-Kanäle gefunden, die für die Aktivierung von β -Integrinen, die mit der Extrazellulärmatrix interagieren, wichtig sind. Desweiteren polarisieren der Na^+/H^+ - Austauscher NHE1 sowie der Anionenaustauscher AE2 ans Vorderende der [7]. Betrachtet man die Zellvolumenänderung, darf man aber nicht nur die Ionenkanäle betrachten, sondern muss auch den dazu nötigen Einstrom von Wasser berücksichtigen.

In der sozialen Amöbe *D. discoideum* wurden bis zum Beginn dieser Arbeit zwei Aquaporin-Gene identifiziert: *wacA* [64] und *aqpA* [65]. Die zugehörigen Proteine kommen nur in multizellulären Formen von *D. discoideum* vor. Für AqpA wurde eine Funktion in der Sporenruhe gefunden, wohingegen die Gendeletion von *wacA* keine phänotypischen Effekte zeigte. Funktionelle Wasserpermeabilitätsassays wurden nicht unternommen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit will Beiträge zum besseren Verständnis der Beteiligung von Aquaporinen an der Zellwanderung am Modellsystem des Schleimpilzes liefern. Den Ausgangs-

punkt der Arbeit bildet die Identifizierung von Aquaporinen in *Dictyostelium*-Amöben (es sind bisher noch keine beschrieben). Nach der Klonierung sollen diese zunächst funktionell in verschiedenen Expressionssystemen getestet und so charakterisiert werden. Für die Detektion *in vivo* soll die *Dictyostelium*-Zellkultur im Arbeitskreis etabliert werden und spezifische Antikörper gegen die neuen Aquaporine generiert werden. Mit fluoreszenzmarkierten Aquaporinen soll ihre intrazelluläre Lokalisation ermittelt werden. Um erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der neuen Aquaporine an der Zellwanderung in *Dictyostelien* zu erhalten, ist die Erstellung einer Aquaporin-Gen *knockout* Mutante geplant, wobei diese zunächst auf phänotypische Auffälligkeiten und in Chemotaxis-Versuchen untersucht werden soll.

2 Material

2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien und Material

Agfa-Gevaert, Mortelsen, Belgien

G153 developer, G354 fixer

Ambion, Austin, USA

mMESSAGEmMACHINE RNA[®] Transcription Kit

Amersham Biosciences, GE Healthcare, München

Hyperfilm ECL, ECL plus Western Blotting Detektion System, PVDF-Blotting-membran Hybond[™]-P, Thermo Sequenase[™] Primer Cycle Sequencing Kit

Becton Dickinson and Company, Heidelberg

Bacto[™] Agar, Bacto[™] Tryptone, Bacto[™] Proteose Peptone No. 3, Bacto[™] Yeast Extract, Bacto[™] Peptone, Difco[™] Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium

Biochrom, Berlin

Penicillin/Streptomycin, BSA

Biogenes, Berlin

Antikörperherstellung complete and easy

Bio-Rad, München

Bio-Rad Protein Assay-Reagenz

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Prof. Bleich

Xenopus laevis Froschweibchen zur Oocytenentnahme

Fermentas, St. Leon-Rot

λ-DNA, Restriktionsendonukleasen, RiboRuler[™] RNA Ladder, 2x RNA Loading

Dye Solution, First Strand cDNA Synthesis Kit, Klenow-Fragment (10 U/μl), T4 DNA Ligase (5 U/μl), T4 Polynukleotid Kinase (10 U/μl), Proteinase K (20 mg/ml)

Genaxxon BioScience, Ulm

dNTPs, 10x PCR-Puffer, *Taq*-Polymerase (5 U/μl), GenAgarose LE, Ampicillin-Natriumsalz, TEMED, SDS

Invitrogen, Darmstadt

Trizol[®], Blastidicin S HCl

Jackson Immuno Research Europe Ltd., Suffolk, UK

Goat Anti-Mouse IgG

Macherey-Nagel, Düren

Nucleotrap[®], Nucleobond[®] PC 500

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromidtabletten

National Diagnostics, Atlanta, USA

Sequagel[®] XR, Sequagel[®] Complete Buffer Reagent

New England Biolabs, Frankfurt am Main

Restriktionsendonukleasen

Oxoid, Basingstoke, USA

Oxoid-Agar

Peqlab, Erlangen

peqGOLD *Prestained* Protein-Marker

Promega, Mannheim

Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Kit

Roche, Mannheim

Collagenase A, *Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets*

Roth, Karlsruhe

Rotiphorese[®]-Gel 40, Rotiphorese[®] Blau R, Diethylpyrocarbonat, alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien, Roti[®]-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Schleicher & Schuell, Dassel

Whatman Chromatography Paper 3MM

Sigma-Aldrich, München

APS, Mineralöl, Urea, Protein A Sepharose CL-4B, Polyethylenglykol 3350, DNA-Natriumsalz Typ II vom Lachssperma

Stratagene, La Jolla, USA

PfuTurbo[®] DNA-Polymerase AD, QuickChange[™] Site-Directed Mutagenesis Kit

Südlaborbedarf, Gauting

High Yield[®] PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit

Thermo Scientific, Schwerte

SulfoLink Immobilization Trial Kit

2.2 Geräte

Beckmann Coulter, Krefeld

Optima[™] XL-80 K Ultrazentrifuge, Rotor 50.2 Ti

Bio-Rad, München

Transblot[®] SD semidry transfer cell, Gene Pulser[®] II Electroporation System

Clemens, Waldbüttelbrunn

Dualblock Primus *advanced* HT2X und Primus 25 mit *HT Manager Software*

Eppendorf, Hamburg

BioPhotometer, Kühlzentrifuge *Centrifuge* 5415R

Gonotec, Berlin

Osmomat[®]

Herolab, Wiesloch

UV-Transluminator UVT-20 S/M

Infors, Bottmingen, Schweiz

Brutschränke Infors HT

Jasco, Gross-Umstadt

Stopped-Flow BioLogic: BioKine Ver 4.42, Küvette FC-08, Lichtbox mit 150 W Xe(Hg)-Lampe, Microprozessor Unit MPS-60, Mischeinheit SFM-300, Modular UV/Vis- Fluoreszenzspektrometer MOS-200, Monochromator BH-10-61UV, Spannungsquelle ALX 250, Photomultiplier PMS 250

LI-COR Biosciences, Bad Homburg

DNA Sequencer 4200 mit Auswertsystem

Peqlab, Erlangen

SDS-PAGE-Kammer *PerfectBlue*[®] vertikales Doppelgelsystem Twin S

Savant Instruments, Farmingdale, USA

Vakuumentrifuge DNA *SpeedVac*[®] DNA 110

SCHOTT Instruments, Mainz

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850

Superior, Marienfeld

Zählkammer Fuchs-Rosenthal *Bright-Line*

World Precision Instruments, Berlin

Nanoliter-Injektor Nanoliter 2000, Glaskapillaren für Nanoliter 2000 (4878)

Zeiss, Jena

konfokales Laserscan-Mikroskop LSM 510

Zeitz-Instrumente, München

DMZ-Universal Puller

2.3 Plasmide

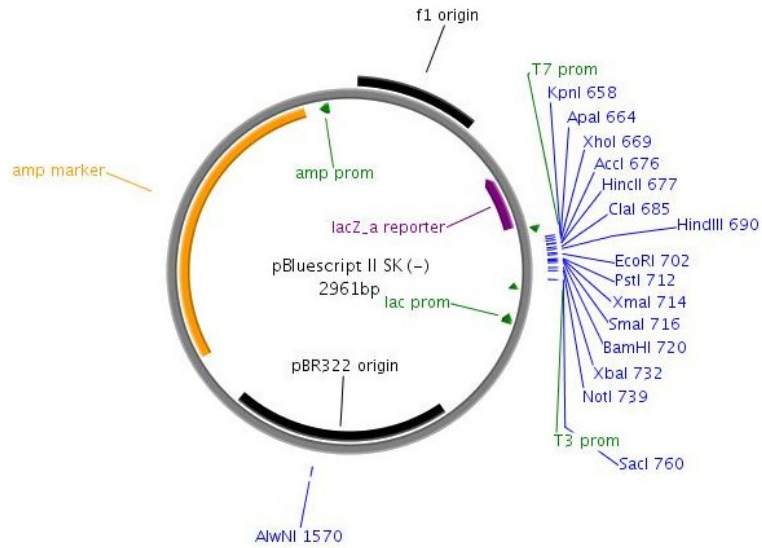


Abbildung 2.1: pBluescript II SK (-)

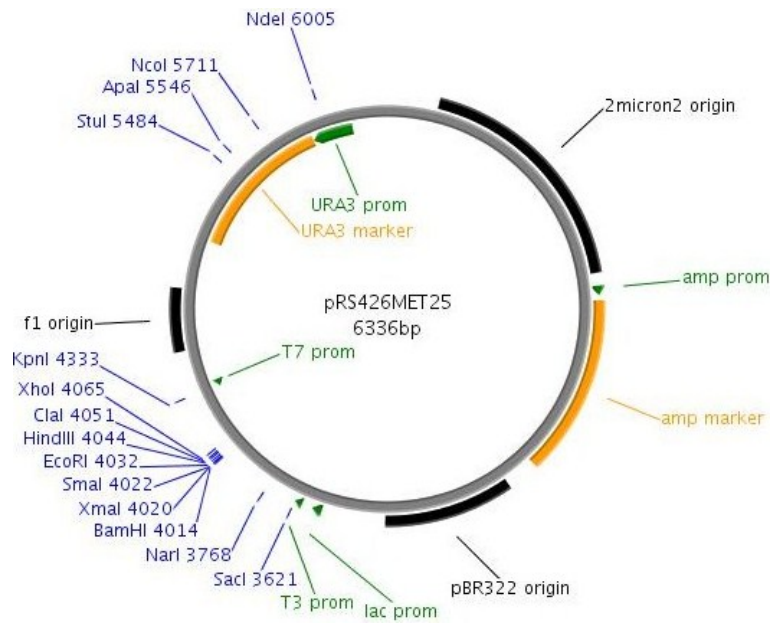


Abbildung 2.2: pRS426MET25

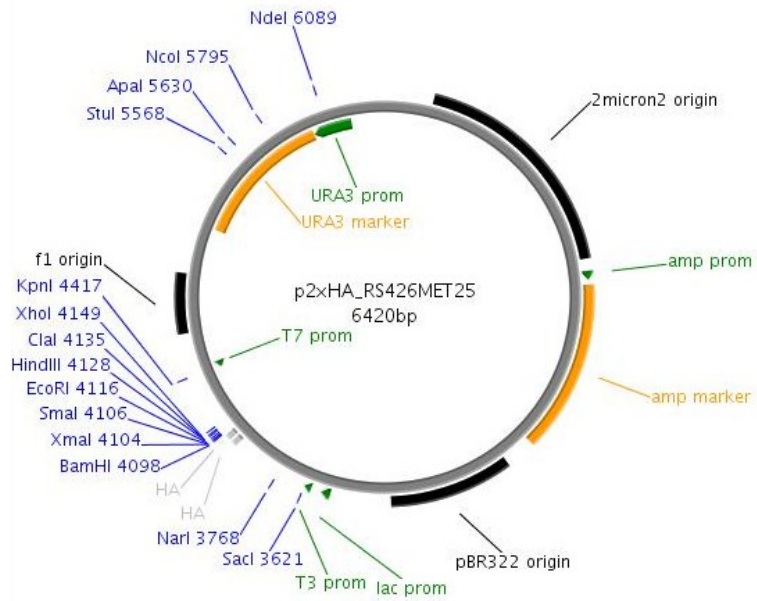


Abbildung 2.3: p2xHA_RS426MET25

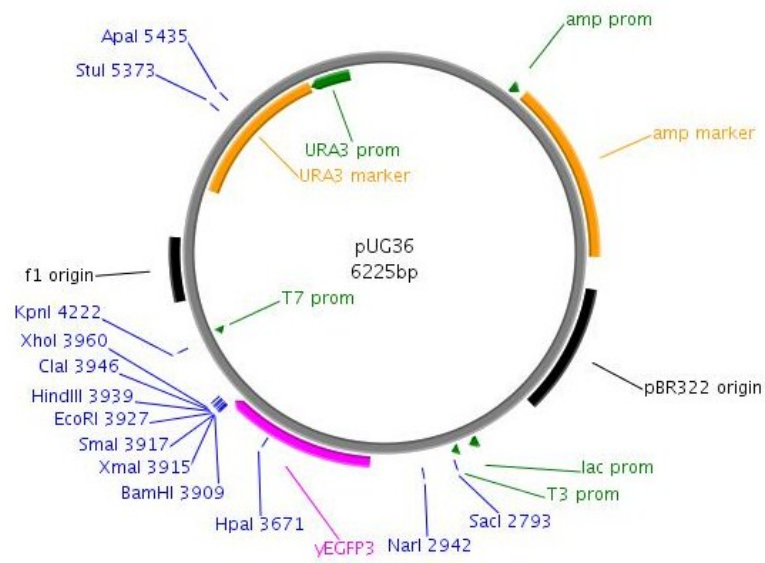


Abbildung 2.4: pUG36

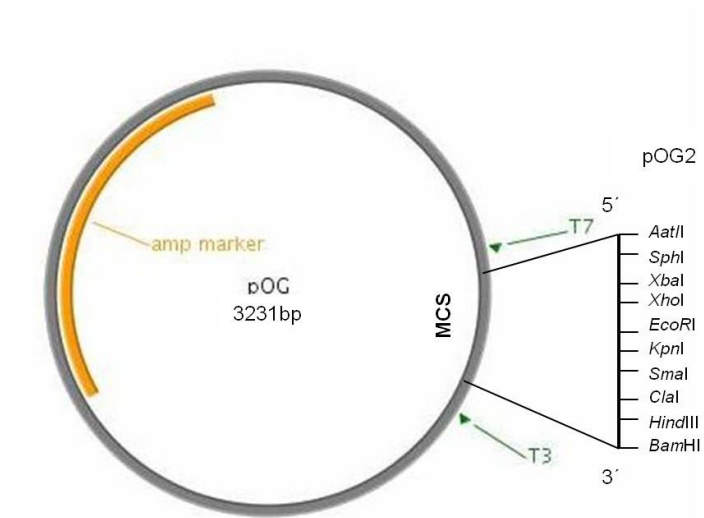


Abbildung 2.5: pOG2

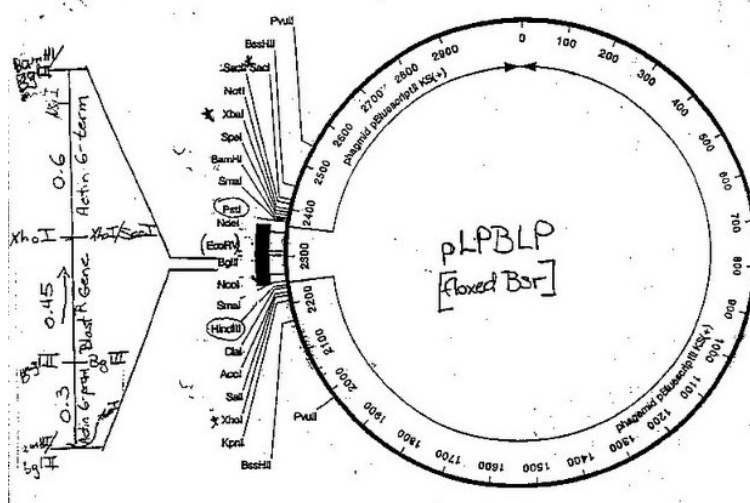


Abbildung 2.6: pLPBLP

2 Material

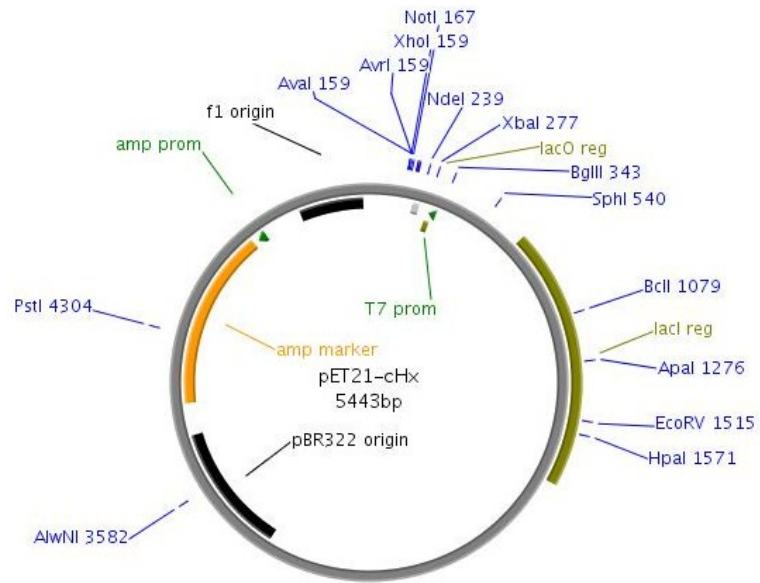


Abbildung 2.7: pET21-cHx

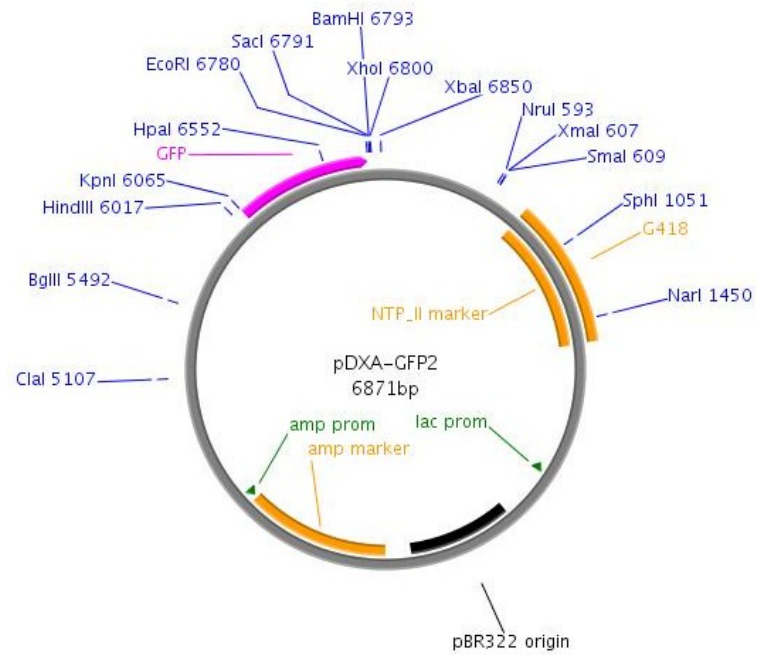


Abbildung 2.8: pDXA-GFP2

2.4 Oligonukleotide (Primer)

Sequenzierprimer

Die Sequenzierprimer sind am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert.

<i>Name</i>	<i>Sinn</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Beschreibung</i>
T7	s	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	pBluescript, pOG2, pLPBLP
T3	as	GTG TAA GTT GGT ATT ATG TAG	pBluescript, pOG2, pLPBLP
T3neu	as	GTG TAA GTT GGT ATT ATG TAG	pOG2
MET	s	AGT AAA GCG TCT GTT AGA AAG G	pRS426MET25, p2xHA_RS426-MET25, pUG36
CYC	as	ATA GGG ACC TAG ACT TCA G	pRS246MET25, p2xHA_RS426-MET25, pUG36
GFPs	s	CGAAAAGAGAGACCACAT	pDXA-GFP2

Mutageneseprimer

Das mutierte Codon ist fettgedruckt.

<i>Name</i>	<i>Sinn</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Kurzbezeichnung</i>
S120A	s	GTC ACC AGA AAG ACA GCC ATA ACC AAA GGT TTG	343-375	(1)
S120A	as	TGT CTT TCT GGT GAC ACA TGT TGC AAA GGT	357-328	(2)
S120D	s	GTC ACC AGA AAG ACA GAC ATA ACC AAA GGT TTG	343-375	(3)
S120D	as	TGT CTT TCT GGT GAC ACA TGT TGC AAA GGT	357-328	(4)

2 Material

<i>Name</i>	<i>Sinn</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Kurzbezeichnung</i>
D275A bzw. D275P <i>wobble primer</i>	s	ATG TAT TGG ATA GCT SCC TTT TTA GGT GCT GGT	808-834	(5)
D275A bzw. D275P	as	AGC TAT CCA ATA CAT CCA ATG ACG AGT CCA	822-793	(6)

Klonierungsprimer

Die Schnittstellen sind **fett** gedruckt. Die eingefügten Sequenzen sind *klein und kursiv* gedruckt.

<i>Name</i>	<i>Sinn</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Kurzbezeichnung</i>
pAQP2	s	GAA AGA AAT GTC ATT AAA AAG ATC AGA TG	-7-22	(7)
pAQP2as	as	GAA ATT TAT TTA TGA GTA GAT GAA AAG AAT	5 b + 885-861 (DdAQP2)	(8)
pAQP2s NEUHefe	s	GC GGA TCC ATG TCA TTA AAA AGA TC	8 b + 1-17 (DdAQP2)	(9)
pAQP2as NEUHefe	as	CGG AAG CTT TTA TTT ATG AGT AGA TG	9 b + 885-869 (DdAQP2)	(10)
M18 <i>BamH I</i>	s	GC GGA TCC ATG GAA GAT GGT	8 b + 52-63 (DdAQP2)	(11)
T3neu pOG	as	GTG TAA GTT GGT ATT ATG TAG		(12)
M35 <i>BamH I</i>	s	GC GGA TCC ATG GAA GAA CAA	11 b + 106- 114	(13)
T7 pOG	s	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG		(14)

2 Material

<i>Name</i>	<i>Sinn</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Kurzbezeichnung</i>
loopDswap 1.PCR	as	<i>acg acg atc cca aac att gaa</i> AGC GAA AAT GAC GTA TAC	21 b (loop- DAqpA) + 570-553	(15)
loopDswap 2.PCR	s	<i>ttc aat gtt tgg gat cgt cgt</i> AAA GCT GGT TTC GCA CCA	621-598	(16)
Δ208-219 1.PCR	as	TTT ACC TAC GAC CTT TGT TTT TAC	621-598	(17)
Δ208-219 2.PCR	s	GTA AAA ACA AAG GTC GTA GGT <i>AAA ggt caa act aaa gct ggt</i>	598-621 + 658-675	(18)
pET21- cHx <i>Bam</i> H I	s	GCG GGA TCC ATG TCA TTA AAA AGA T	9 + 1-16 (DdAQP2)	(19)
pET21- cHx <i>Xho</i> I	as	CGC CTC GAG TTT ATG AGT AGA TGA A	9 + 882-867 (DdAQP2)	(20)
DdAQP2- GFP <i>Hin</i> D III	s	AGC GC AAG CTT ATG TCA TTA AAA AGA TCA GA	11 + 1-20 (DdAQP2)	(21)
DdAQP2- GFP <i>Kpn</i> I	as	TGA GC GGT ACC ATC GAT AAG CTT TAA TTT ATGA GTA GA	11 + 883-871 (DdAQP2)	(22)
GFP- DdAQP2 <i>Bam</i> H I	s	AGC GC GGA TCC ATG TCA TTA AAA AGA TCA GA	11 + 1-20 (DdAQP2)	(23)
GFP- DdAQP2 <i>Xho</i> I	as	GAT GC CTC GAG TTA TTT ATG AGT AGA TGA AAA G	11 + 885- 864	(24)
KOvorne <i>Sal</i> I	s	TAT GTC GAC ATC ATC ACA AAT GTA TAT TTA CAA ATT ACC TA	3:2057594- 2057626 (Genom)	(25)

2 Material

<i>Name</i>	<i>Sinn</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Kurzbezeichnung</i>
KOvorne <i>HinD</i> III	as	GAC AAG CTT ATT ATT ACT ACT TTT GTG GGG ATT TAT TA	3:2058111- 2058140 (Genom)	(26)
KOhinten <i>Pst</i> I	s	GAG CTG CAG ATT CTT TTC ATC TAC TCA TAA ATA AAT TTC	3:2059063- 2059093 (Genom)	(27)
KOhinten <i>BamH</i> I	as	GAT GGA TCC AAT CAT AAA AAT TAT CCC AGG ACT TCA A	3:2059691- 2059719 (Genom)	(28)
KOhinten LANG <i>Pst</i> I	s	GAG CTC GAG ATA CCG TTG ATA ATA GTG TAA AAA CAA AGG T	3:2058202- 2059086 (Genom)	(29)
KOhinten LANG <i>BamH</i> I	as	GAT GGA TCC AAT CAT AAA AAT TAT CCC AGG ACT TCA A	3:2059691- 2059719 (Genom)	(30)
Δ208-212 1.PCR	as	TTT ACC TAC GAC CTT TGT TTT TAC	621-598	(31)
Δ208-212 2.PCR	s	GTA AAA ACA AAG GTC GTA GGT AAA CTC ACA ATC TAT ACT ACC TCT	598-621 + 637-657	(32)
wacA <i>Xba</i> I	s	GCG TCT AGA ATG CCT TTC TTA CAT TTA TTT ACA CC	1-26	(33)
wacA <i>HinD</i> III	as	GCG AAG CTT TTA TTT TGT TGC AGT ACC ATA AGT TG	825-800	(34)

Primer zur Verifizierung des Schleimpilz-*knockouts*

<i>Name</i>	<i>Sinn</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Kurzbezeichnung</i>
FP1	s	ACC ACC TTC CGT TCC AAA TG		(35)
RP1	as	CGC TTC AAT ATG TAC TGC CGA AAT G		(36)
RP2	as	TGT ACT GGT ATT GGT GGT CCG TAT		(37)
FP2	s	GAT GTA AAA CAG CCA AAG AGT ATG		(38)
FP3	s	AAA ACC TTA TTC AAA ACC ACC ACT A		(39)
RP3	as	ACC TTT GTT TTT ACA CTA TTA TCA ACG GTA T		(40)

2.5 *Escherichia coli*-Stämme

<i>Name</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Quelle</i>
DH5 α	F ⁻ φ 80lacZ Δ (lacZYA-argF)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i>	[66]
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac[F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene

2.6 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

<i>Name</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Quelle</i>
BY4742 Δ fps1	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, fps::KanMX4</i>	Euroscarf

2.7 *D. discoideum*-Stämme

Name	Genotyp	Quelle
AX2	214, axeA2, axeB2, axeC2	DBS0235534 <i>dictyBase</i>

2.8 Verwendete Antikörper

Primär-Antikörper	Beschreibung	eingesetzte Verdünnung
m α HA	monoklonaler Antikörper (Maus) gerichtet gegen die Aminosäure-Sequenz YPYDVPDYA (0,8 μ g/ μ l)	1:5000
r α N20-34	polyklonaler Antikörper (Hase) gerichtet gegen die Aminosäure-Sequenz EDGGNIKDEEEKPLD am N-Terminus von DdAQP2 (0,5 μ g/ μ l), Biogenes	1:1000- 1:10000
g α N2-17	polyklonaler Antikörper (Ziege) gerichtet gegen die Aminosäure-Sequenz SLKRSDDYQDLEEGIA am N-Terminus von DdAQP2 (0,5 μ g/ μ l), Biogenes	1:500
m α GFP	Mischung zweier monoklonaler Antikörper (Maus) gegen GFP (0,4 μ g/ μ l), Roche	1:1000
Sekundär-Antikörper	Beschreibung	eingesetzte Verdünnung
g α Maus	polyklonaler Antikörper POD-konjugiert (Ziege) (0,4 μ g/ μ l), Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK	1:2000
g α Hase	polyklonaler Antikörper POD-konjugiert (Ziege) (0,4 μ g/ μ l), Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK	1:10000
daZiege	polyklonaler Antikörper POD-konjugiert (Esel) (0,4 μ g/ μ l), Santacruz, CA, USA	1:5000

2.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Arbeiten, die Nährmedien für *E. coli*, *Xenopus laevis* Oocyten und die Zellkultur wurden sterilfiltriert (Porenweite 0,2 μ m) bzw. autoklaviert (121 °C, 20 min, 1 bar Überdruck).

2.9.1 Molekularbiologie

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

TAE Puffer

40 mM Tris/Acetat, pH 8,0
1 mM EDTA

Probenpuffer orange (10fach)

0,4% Orange G
30% Glycerol
100 mM EDTA

Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)

1 Tablette Ethidiumbromid
10 ml Aqua bidest.
lichtgeschützt bei 4 °C lagern

Agarose-Gelelektrophorese von RNA

MOPS-Puffer (10fach)

10 ml 1 M MOPS pH 7,0
0,83 ml 3 M Natriumacetat, pH 5,2
1,0 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
38 ml DEPC behandeltes Wasser

DEPC-behandeltes Wasser

0,1% DEPC in Wasser

E. coli Nährmedien

LB-Medium

10 g/l Trypton
10 g/l NaCl
5 g/l Hefeextrakt

LB-Amp-Plattenagar

100 µg Ampicillin/ml
Plattenagar

LB-Agarplatten (Lennox)

35 g/l LB-Agar
(Fertigpulver)

LB-Tet-Plattenagar

15 µg Tetracyclin/ml
Plattenagar

***S. cerevisiae* Nährmedien**

YPD-Medium

10 g/l Hefeextrakt
20 g/l Pepton
20 g/l Glucose

SD-Medium

1,7 g/l YNB
5 g/l Ammoniumsulfat
20 g/l D-Glucose
pH 5,6 mit NaOH

SD HLK-Medium

nach dem Autoklavieren
zu SD-Medium
hinzugeben:
20 mg/l L-Histidin-HCl
100 mg/l L-Leucin
20 mg/l L-Lysin-HCl

YPD-Plattenagar

20 g/l Oxoid-Agar
in YPD-Medium

SD HLK-Agarplatte

20 g/l Oxoid Agar in SD-Medium,
Zusatz der essentiellen
Aminosäuren nach
dem Autoklavieren:
20 mg/l L-Histidin-HCl
100 mg/l L-Leucin
20 mg/l L-Lysin-HCl

Transformation von *E. coli*

LB (1,5fach)

15 g/l Trypton
15 g/l NaCl
7,5 g/l Hefeextrakt
10 mM PIPES, pH 6,5

TSS-Lösung

15 ml LB (1,5fach)
4 ml PEG (MW 3350) 50%
0,4 ml 1 M MgCl₂
1 ml DMSO

CM-Lösung (10fach)

100 mM CaCl₂
100 mM MgCl₂

Sequenzierung von DNA

TBE-Puffer (10fach)

0,89 M Tris
0,89 M Borsäure
0,02 M Na₂EDTA
mit NaOH auf pH 8,3 einstellen

Transformation von *S. cerevisiae*

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

Single-stranded carrier DNA (2 mg/ml)

200 mg in 100 ml TE-Puffer

2.9.2 Proteinchemie

Membranproteinpräparation aus *S. cerevisiae*

Extraktionspuffer pH 8,0

20 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM EDTA
1 mM DTT
1 mM PMSF
5% Glycerol

Lagerungspuffer pH 7,5

20 mM Tris-HCl
100 mM KCl
0,1 mM EDTA
1 mM DTT
1 mM PMSF
10% Glycerol

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Sammelgelpuffer (4fach)

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
0,4% SDS

Kathodenpuffer

25 mM Tris-HCl, pH 8,3
192 mM Glycin
0,1% SDS

Trenngelpuffer (4fach)

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
0,4% SDS

SDS-Probenpuffer (4fach)

250 mM Tris-HCl, pH 6,8
400 mM DTT
0,02% Bromphenolblau
8% SDS
40% Glycerol

Entfärbelösung

10% Essigsäure
30% Ethanol

Rotiphorese[®]-Blau-R-Färbelösung

50% Rotiphorese[®] Blau R

Western Blot

Transferpuffer (5fach)

25 mM Tris-HCl, pH 8,3
192 mM Glycin
0,0375% SDS

TBS-T-Puffer

100 ml/l 10fach TBS-Puffer
1 ml/l Tween 20

Transferpuffer (1fach)

10 ml 5fach Transferpuffer
10 ml Methanol
30 ml Aqua bidest.

M-TBS-T-Puffer

3% Milchpulver in TBS-T-Puffer

TBS-Puffer (10fach)

1,35 M NaCl
0,2 M Tris-HCl, pH 7,6

Immunpräzipitation

Puffer A

0,02 M NaH_2PO_4
0,15 M NaCl
pH 8,0

Nonidet P-40 Lysispuffer

50 mM Tris-HCl pH 8,0
150 mM NaCl
1% Nonidet P-40

PBS

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na_2HPO_4
2 mM KH_2PO_4
mit HCl auf pH 7,4

Protease-Inhibitor-Mix (25fach)

1 Tablette
*Complete EDTA-free
protease inhibitor
cocktail tablets*

Xenopus laevis Oozyten-Medien

ND96-Puffer

96 mM NaCl
2 mM KCl
1,8 mM CaCl_2
1 mM MgCl_2
5 mM HEPES
pH 7,4

OR2-Puffer

82,5 mM NaCl
2 mM KCl
1 mM MgCl_2
5 mM HEPES
pH 7,4

Totalmembranisolierung aus Oocyten

hypotoner Phosphatpuffer

7,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$
pH 7,5

Dynamische Lichtstreuungs-Experimente

cAMP-Lösung (100 mM)

198 mg cAMP Lyophilisat in
3 ml Aqua bidest. lösen,
dazu pH mit 1 M NaOH
auf 8,0 einstellen,
ad 6 ml Aqua bidest.

2.9.3 *D. discoideum* Zellkultur

Schleimpilz-Nährmedien

Ax-Medium

2,5 g Bacto Trypton
2,5 g Pepton aus Casein
5,0 g Bacto Proteose Peptone No. 3
1,2 g KH_2PO_4
0,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
ad 963 ml ddH_2O
pH 6,7
nach dem Autoklavieren
27,6 ml 2 M sterilfiltrierte Glucose und
10 ml Penicillin/Streptomycin zugeben

Sörensen-Phosphatagar-Platten

15 g Agar-Agar
ad 1 l Sörensen-Phosphatpuffer

LB-Platten

7 g Agar Lennox
ad 200 ml ddH_2O

SPB

15 mM KH_2PO_4
2 mM Na_2HPO_4
pH 6,0

Isolierung von genomischer DNA

nuclear lysis buffer

50 mM HEPES, pH 7,5
 40 mM MgCl₂
 20 mM KCl
 5% Saccharose

SDS-Lysispuffer

1 ml 1 M Tris, pH 8,0
 0,2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
 ad 100 ml Aqua bidest.
 0,7 g SDS langsam lösen

Lysispuffer

50 mM KCl
 10 mM TRIS pH 8,3
 2,5 mM MgCl₂
 0,45% Nonidet P-40
 0,45% Tween 20

Transformation von *D. discoideum*

Elektroporationspuffer

10 mM KH₂PO₄
 50 mM Saccharose
 pH 6,1

2fach HBS

4 g NaCl
 0,18 g KCl
 0,05 g Na₂HPO₄
 2,5 g HEPES
 0,5 g Glucose

MES-Medium

10 g Bacto Pepton
 5 g Yeast Extract
 1,3 g MES
 ad 1 l Aqua bidest.
 mit 10 M NaOH auf pH 7,1 einstellen;
 nach dem Autoklavieren
 2,5 ml 40% Glucose/100 ml zusetzen

ad 250 ml Aqua bidest.
 pH 7,0 einstellen und
 sterilfiltrieren

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophorese von DNA

Tabelle 3.1: Agarose-Konzentrationen

> 800 bp	1%
500-1000 bp	2%
< 500 bp	4%

Die Agarose-Gelelektrophorese fand Verwendung zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten sowie zu deren Auftrennung nach Größe. Zum Aufreinigen der DNA wurden Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten und mittels *Nucleotrap*[®] eine Gelextraktion durchgeführt.

Zur Gelherstellung wurde Agarose in 50 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen und nach Abkühlen 1 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugegeben. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und bei 120 V 20-40 min mit TAE als Laufpuffer elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung erfolgte mittels UV-Licht bei 366 nm. Je nach Fragmentgröße wurden verschiedene Agarosekonzentrationen eingesetzt (s. Tab. 3.1). Zur Größenabschätzung dienten zwei verschiedene Marker: mit *EcoR* I/*HinD* III sowie mit *Pst* I verdaute λ -DNA (s. Abb. 3.1).

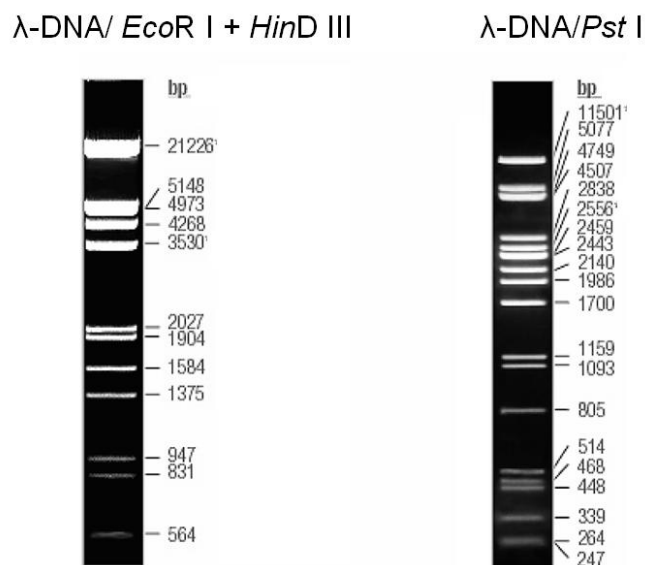


Abbildung 3.1: DNA-Größenmarker für die Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophorese von RNA

Die Gelelektrophorese von RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Sie wurde durchgeführt, um die Qualität der RNA vor der Injektion in *Xenopus laevis* Oocyten zu überprüfen. Dazu wurden 0,66% Agarose in DEPC-Wasser in der Mikrowelle geschmolzen. Nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C erfolgte die Zugabe von MOPS-Puffer (10fach) und 1,5 ml Formaldehydlösung (37%). Je 2 μ l RNA-Größenstandard (*RiboRuler*TM *RNA Ladder*, 200-6000 b) und RNA (100 ng/ μ l) wurden mit ethidiumbromid-haltigem Lade-puffer im Verhältnis 1:1 gemischt, für 10 min bei 70 °C denaturiert und dann 5 min auf Eis gehalten. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V über 2 h mit MOPS-Puffer als Laufpuffer. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht bei 366 nm.

3.1.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels *Nucleotrap*[®] nach Herstellerangaben extrahiert. Die Elution erfolgte mit 50 μ l gereinigtem Wasser. Später wurde auf das *High Yield*[®] *PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit* umgestellt, da dieses höhere Ausbeuten erbrachte. Wenn eine weitere Aufkonzentrierung nötig war, erfolgte diese mit der Vakuumzentrifuge für 5 min bei 42 °C.

3.1.3 Entsalzung von DNA

Die Entsalzung von DNA wurde nach Restriktionsverdauen und vor Ligationen statt Aufreinigung über ein Agarosegel durchgeführt, wenn eine höhere DNA Konzentration gebraucht wurde. Zunächst wurde das *Nucleotrap*[®] Kit, später das *High Yield*[®] *PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit* verwendet. Es wurde mit 25 µl Aqua bidest. eluiert.

3.1.4 DNA Aufreinigung durch Ethanolfällung

Zur Aufreinigung der DNA wurde das 2,5fache Volumen Ethanol zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 25 min bei $13000 \times g$ zentrifugiert. Zum Pellet wurden vorsichtig 250 µl 70% Ethanol pipettiert und für 5 min bei $13000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in der Vakuumzentrifuge bei 42 °C 5 min getrocknet und in 20 µl Aqua bidest. resuspendiert.

3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Beurteilung der Qualität und Quantität von Nukleinsäuren wurden diese auf ein Agarosegel aufgetragen und die Intensität der Banden mit denen des Markers verglichen. Alternativ wurden die Nukleinsäuren photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette vermessen. Die Nukleinsäurekonzentration ergab sich dabei wie folgt:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E_{260} \cdot f \cdot \text{Verdünnung} \quad (3.1)$$

f = 0,02 bei RNA, Einzelstrang-DNA, Oligonukleotiden

f = 0,04 bei Doppelstrang-DNA, Plasmiden

Mögliche Verunreinigungen durch Zucker ($E_{230\text{ nm}}$) oder Proteine ($E_{280\text{ nm}}$) konnten ebenfalls erfasst werden. Für ausreichend reine DNA liegt das Verhältnis $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ über 1,8 und für reine RNA über 2.

3.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsverdau wurden in 10-50 µl Volumen durchgeführt. Die DNA wurde mit 1 U Enzym/µg DNA bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur in entsprechendem Puffer inkubiert. Bei Doppelverdauen wurde bei Temperatur- oder Pufferinkompatibilitäten in mehreren Schritten verdaut.

3.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Dazu wurden *E. coli* Einzelklone in 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung erfolgte mittels *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Kit* gemäß Herstellerangaben. Änderungen vom Protokoll waren das Weglassen der alkalischen Protease und die Elution mit 50 µl gereinigtem Wasser. Für 50-100 ml Flüssigkultur wurde das *Nucleobond[®] PC500 Kit* verwendet.

3.1.8 Anlegen von Bakteriendauerkulturen

Zur Lagerung von *E. coli* wurden wie folgt Dauerkulturen angelegt: 500 µl 80% Glycerol und 1000 µl *E. coli* Übernachtskultur wurden durch Vortexen gründlich gemischt und sofort bei -80 °C eingefroren.

3.1.9 5´-DNA-Dephosphorylierung

Um bei *blunt end* Ligationen die Religation des Plasmids zu verhindern, wurde dieses dephosphoryliert. Dazu wurden 1-2 µg geschnittenes Plasmid im entsprechenden Puffer mit 1 U alkalischer Phosphatase in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 90 min bei 37 °C inkubiert.

3.1.10 Klenow-Behandlung und Phosphorylierung

Die *Taq*-Polymerase erzeugt bei der PCR immer eine überhängende Base. Um diese für *blunt end* Ligationen zu glätten, wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* verwendet. Die Phosphorylierung der DNA Enden erfolgte mit der T4 Polynukleotidkinase. Beide Reaktionen erfolgten in einem Schritt: 1-2 µg DNA, Klenow-Fragment (1 U/µg DNA), dNTP-Mix (je 10 pmol), Klenow-Puffer, Kinase-Puffer, 1 mM ATP und 8 U Kinase wurden gemischt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die mit dem *Nucleotrap[®]*-Kit aufgereinigte DNA wurde anschließend in die Ligation eingesetzt.

3.1.11 Ligation von DNA

Das Verhältnis von *insert* zu Vektor betrug 3:1. Es wurden pro Ligation 50-100 ng Vektor eingesetzt. Die Ligation erfolgte unter Einsatz der T4 DNA Ligase im entsprechenden Puffer für 20 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C.

3.1.12 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Calciumchlorid-Methode [67]

Bei Verwendung des DH5 α -Stammes wurde kein Selektionsantibiotikum, bei Verwendung des XL1-*Blue* Stammes 15 $\mu\text{g/l}$ Tetracyclin eingesetzt.

Der entsprechende *E. coli* Stamm wurde auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Kolonie in 5 ml LB Flüssigmedium überführt und bei 37 °C unter Schütteln wachsen gelassen. Diese Vorkultur wurde am Abend in 100 ml LB-Medium überführt und bei 20 °C unter Schütteln über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 weiterwachsen gelassen. Die Zellen wurden bei 2000 $\times g$ und 4 °C für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 15 ml 0,1 M kalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation erfolgte die Resuspension des Pellets in 10 ml kalter CaCl₂-Lösung und Inkubation auf Eis für 20 min. Nach weiterer Zentrifugation wurde das Pellet in 5 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 20% Glycerol resuspendiert und für mindestens vier Stunden auf Eis gehalten. 100 μl Aliquots wurden bei –80 °C gelagert.

Die Transformationseffizienz der hergestellten Zellen wurde mit 1 ng Plasmid-DNA bestimmt. Der Einsatz der Zellen erfolgte, wenn diese mindestens eine Effizienz von 10⁶ cfu/ μg DNA besaßen.

PEG-DMSO-Methode [68]

Die PEG-DMSO-Methode wurde im Verlauf der Arbeit an Stelle der CaCl₂-Methode eingeführt, da sie bei gleicher Qualität der kompetenten Zellen schneller und einfacher durchzuführen ist.

Dazu wurde eine Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (180 min⁻¹) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 1 ml der Übernachtskultur 1:100 verdünnt und weiter unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,3-0,4 (frühe log-Phase) erreicht war. Nach Lagerung auf Eis für 10 min wurden die Zellen bei 4 °C und 2000 $\times g$ für 10 min pelletiert und das Pellet einmal mit 10 ml kalter TSS-Lösung gewaschen. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 10 ml kalter TSS-Lösung. Nach Inkubation auf Eis für 10 min wurden 100 μl Aliquots bei –80 °C eingefroren.

3.1.13 Standardtransformation von *E. coli*

Calciumchlorid-Methode

Pro Transformation wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen (s. 3.1.12) auf Eis aufgetaut. Bis zu 100 ng DNA wurden mit 10 µl 10fach CM-Lösung versetzt, auf 100 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt und vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach Inkubation auf Eis für 30 min erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Mit 0,9 ml LB Medium wurde dann für 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden bei $13000 \times g$ 1 min zentrifugiert, in 0,1 ml LB resuspendiert und auf LB-Platten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

PEG-DMSO-Methode

Hier konnte der Ligationsansatz bzw. die Plasmid-DNA direkt zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gegeben werden. Das weitere Vorgehen erfolgte entsprechend der CaCl₂-Methode.

3.1.14 Schnelltransformation von *E. coli*

Es wurden 0,2 µl Miniprep (s. 3.1.7) auf 100 µl chemisch kompetente Zellen pipettiert. Diese wurden dann 15 min auf Eis gehalten und anschließend auf LB-Platten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.1.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode mit dem *Thermo SequenaseTM Primer Cycle Sequencing Kit*. Zu je 1,5 µl Reaktionsmix wurden 3 µl Mastermix, bestehend aus 1-2 pmol Plasmid-DNA, 2 pmol IRD 800 fluoreszenzmarkiertem Primer und Aqua bidest., pipettiert. Die Mischung wurde mit Mineralöl überschichtet und einem *thermo cycling* Programm (s. Tab. 3.2) unterzogen.

Tabelle 3.2: *thermo cycling*-Programm für die Sequenzierung von DNA

Denaturierung	95 °C	2 min
30 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	30 s
Primer-Anlagerung	55 °C	30 s
Extension	72 °C	60 s
Lagerung	4 °C	

Im Anschluss wurden die Proben mit je 5 µl Formamid-Puffer versetzt und 0,8 µl davon auf ein Polyacrylamidgel (6%) geladen (s. Tab. 3.3). Die Elektrophorese erfolgte mit Hilfe des Licor *DNA Sequencers* 4200 bei 1500 V mit TBE als Laufpuffer. Die Auswertung erfolgte mit der *BaseImagIR V.4.2*. Software.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Sequenziergels

30 ml	<i>SequaGel[®] XR 7,5%</i>
7,5 ml	<i>SequaGel[®] Complete Buffer Reagent</i>
400 µl	DMSO
300 µl	10% APS

3.1.16 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde eingesetzt zur Amplifikation von ausgewählten DNA-Sequenzen, zum Einfügen von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen für Klonierungen, zum Erstellen von Mutationen (s. 3.1.17) und zur Verifizierung des *DdAQP2-knockouts*. Dazu wurde *template* DNA (20-60 ng) mit 5 µl 10fach PCR-Puffer (mit 15 mM MgCl₂), 4 µl dNTPs (2,5 mM), je 0,5 µl sequenzspezifischen Primern (20 µM) sowie 0,25 µl DNA-Polymerase (5 U/µl) versetzt und auf ein Volumen von 50 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt. Das Temperaturprogramm wurde an die verwendeten Primer und die Länge des PCR-Produktes angepasst (s. Tab. 3.4 und Tab. 3.5).

Tabelle 3.4: Standard-PCR-Temperaturprogramm

Denaturierung	95 °C	5 min
20-30 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	30 s
Primer-Anlagerung	T_m	60 s
Extension	68-72 °C	t_{ex}
Extension	68-72 °C	20 min
Lagerung	4 °C	

Tabelle 3.5: *touchdown*-PCR-Temperaturprogramm

Denaturierung		95 °C	3 min
<i>Phase I: 10 Zyklen</i>			
Denaturierung		95 °C	30 s
Primer-Anlagerung	$T_m + 10$ °C, pro Zyklus	-1 °C	45 s
Extension		68 °C	2 min
<i>Phase II: 20 Zyklen</i>			
Denaturierung		95 °C	30 s
Primer-Anlagerung		T_m	45 s
Extension		68 °C	2 min
Extension		68 °C	5 min
Lagerung		4 °C	

Die Temperatur für die Primeranlagerung (T_m) in °C wurde mit folgender Formel errechnet:

$$T_m = 60 + 0,41(\%GC) - 600/N \quad (3.2)$$

Dabei entspricht %GC dem prozentualen GC-Gehalt und N der Anzahl der Basen des Primers. Die Extensionszeit wurde nach folgender Formel berechnet:

$$t_{ex} = 0,06 \cdot \text{Länge des Produktes [bp]} \quad (3.3)$$

Sie betrug mindestens 60 s.

3.1.17 *In vitro* Mutagenese

Um Punktmutationen in DNA einzuführen, wurden Mutagenese-PCRs durchgeführt. Dazu wurde das *QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis* Protokoll verwendet. Als *template* wurde Doppelstrang-Plasmid-DNA eingesetzt. Zwei synthetisierte Oligonukleotid-Primer enthielten die gewünschte Mutation. Für diese Methode wird standardmäßig die *PfuTurbo[®]* DNA-Polymerase eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert (s. Tab. 3.6) und in die PCR eingesetzt (s. Tab. 3.7).

Tabelle 3.6: Pipettierschema für die *in vitro* Mutagenese

0,5 µl	Plasmid-DNA (200 ng/µl)
5 µl	<i>Pfu</i> Puffer 10x (20 mM MgSO ₄)
4 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,5 µl	<i>sense</i> -Primer (25 µM)
1,5 µl	<i>antisense</i> -Primer (25 µM)
36,7 µl	Aqua bidest.
0,8 µl	<i>PfuTurbo[®]</i> DNA Polymerase

Tabelle 3.7: PCR-Programm für die *in vitro* Mutagenese

Denaturierung	95 °C	30 s
12-18 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	30 s
Primer-Anlagerung	T _m	1 min
Extension	68 °C	1 min/kb Plasmidlänge, mindestens 8 min
Extension	68 °C	20 min
Lagerung	4 °C	

Im Anschluß erfolgte ein Verdau mit *Dpn* I für mindestens 6 h, um methylierte Mutterstrang-DNA zu entfernen. *E. coli* wurde dann mit dem mutierten Vektor transformiert (s. 3.1.13) und die Mutation durch Sequenzierung (s. 3.1.15) von isolierter Plasmid-DNA überprüft.

3.1.18 DEPC-Behandlung

Um Gegenstände für RNA-Arbeiten RNase frei zu bekommen, wurden diese über Nacht in 0,1% DEPC-Wasser eingelegt, am nächsten Tag autoklaviert.

3.1.19 RNA-Isolierung aus *D. discoideum*

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden $1 \cdot 10^7$ *Dictyostelium*-Zellen in 1 ml Trizol[®] lysiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben: Nach Chloroformzugabe und Zentrifugation wurde die obere, wäßrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und in 10 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Nach Inkubation für 10 min bei 70 °C wurde die RNA direkt in die cDNA Erststrangsynthese eingesetzt (s. 3.1.20).

3.1.20 cDNA Erststrangsynthese

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* nach Herstellerangaben. Als *template* wurde isolierte Gesamt-RNA eingesetzt (s. 3.1.19). Es wurden zwei Parallelansätze pipettiert, wobei verschiedene im Kit enthaltene Primer verwendet wurden: Oligo(dT)₁₈-Primer sowie Zufallshexamer-Primer. Als Enzym diente *Moloney Murine Leukemia Virus* reverse Transkriptase. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden die Proben bei 37 °C für 60 min inkubiert (der Ansatz mit Zufallshexamerprimern bei 25 °C für 10 min, danach bei 37 °C für 60 min). Die Reaktion wurde durch Erhitzen für 10 min auf 70 °C gestoppt. Die Qualität der cDNA wurde auf einem Agarosegel (s. 3.1.1) überprüft.

3.1.21 Transformation von *S. cerevisiae*

Hefetransformationen wurden durchgeführt, um Methylamin-Efflux-Assays durchzuführen (s. 3.2.1).

Dazu wurde der Hefestamm BY4742Δ*fps1* auf einer YPD-Agarplatte ausgestrichen und bei 28 °C für 3-5 d inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Kolonie gepickt und in 10 ml YPD-Medium über Nacht unter Schütteln bei 200 min^{-1} und 28 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die OD₆₀₀ bestimmt, eine frische Kultur mit 50 ml YPD und einer Start OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und für 3-5 h bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 weiterwach-

sen gelassen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation im Reaktionsgefäß für 5 min bei $2500 \times g$. Das Pellet wurde einmal mit 25 ml Aqua bidest. gewaschen und in 1 ml Aqua bidest. resuspendiert. Die *Single-stranded carrier* DNA (Lachssperma) wurde unterdessen 5 min aufgekocht und dann auf Eis gelagert. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktions-Gefäß überführt, 30 s bei $13000 \times g$ zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Aqua bidest. resuspendiert. Für jede Transformation wurden 100 μ l Zellen zentrifugiert und zum Pellet mehrere Komponenten pipettiert (s. Tab. 3.8) und das Pellet resuspendiert. Dies erfolgte durch kräftiges Schaben der Gefäße über Reagenzglasständer, da das Pellet sehr fest war. Nach Inkubation bei 42°C für 45 min wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Aqua bidest. resuspendiert und 50 μ l Zellen auf eine SD HLK-Agarplatte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für 3-5 d bei 28°C , wobei die Agarplatten mit Parafilm verschlossen wurden.

Tabelle 3.8: Pipettierschema für die Hefe-Transformation

240 μ l	PEG 3500 50% m/V
36 μ l	1 M Lithiumacetat
50 μ l	<i>Single-stranded carrier</i> DNA
0,5 μ l	Plasmid-DNA
33,5 μ l	Aqua bidest.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 *S. cerevisiae* Methylamin-Efflux-Assay

Es wurde je eine Kolonie der zu testenden transformierten Hefen in 1,5 ml SD HLK-Medium über Nacht bei 28°C unter Schütteln bei 180 min^{-1} inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei $13000 \times g$ abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit 1 ml Aqua bidest. gewaschen und in 0,5 ml Aqua bidest. durch Vortexen resuspendiert. Es wurde eine OD_{600} von 1 eingestellt. Davon ausgehend wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe erstellt ($\text{OD}_{600} = 1/10^{-1}/10^{-2}/10^{-3}$).

Jeweils 10 μ l der Suspension wurden auf die vorbereiteten Agarplatten mit 50 mM Methylammoniumchlorid (s. Tab. 3.9 und Tab. 3.10) pipettiert und diese 30 min trocknen gelassen. Die Inkubation erfolgte für 3-5 d bei 28°C .

Mit dem Methylamin-Efflux-Assay kann die Methylaminleitfähigkeit von Aquaporinen

phänotypisch sichtbar gemacht werden [69]. Methylamin wirkt als toxisches Ammoniak-Analogon auf Hefe-Zellen proliferationshemmend. In dem verwendeten Hefestamm BY4742 Δ fps1 ist das endogene Aquaglyceroporin Fps1 deletiert, so dass die Zellen das toxische Methylamin nicht ausschleusen können [70]. Der Test wird bei drei verschiedenen pH-Werten durchgeführt: pH 5,5 sowie pH 6,5 und pH 7,5. In diesem pH-Bereich überwiegt die Konzentration an geladenem Methylammonium um den Faktor 1000-100000 ($pK_s = 10,64$). Die Konzentration an ungeladenem Methylamin ändert sich hingegen wenig. Methylammonium wird über die physiologischen Ammoniumtransporter Mep1-3 [71] aufgenommen und akkumuliert. Nur durch die heterologe Expression von Methylaminleitenden Aquaporinen kann die Hefe Methylamin ausschleusen und so überleben. Als Positivkontrolle wurde mit *E. coli* GlpF Aquaglyceroporin transformierte Hefe eingesetzt.

Herstellung der Agarplatten für den Methylamin-Efflux-Assay

Die angegebenen Mengen reichen für 4 Agarplatten.

Tabelle 3.9: Lösung 1

	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5
Pufferlösung	2,4 ml 1 M MES	2,4 ml 1 M MES	2,4 ml 1 M MOPS
Aqua bidest.	62 ml	62 ml	62 ml

Nach Einstellen des pH Wertes mit NaOH wurde jeweils 2,5 g Oxoid-Agar zugegeben und autoklaviert.

Tabelle 3.10: Lösung 2

		pH 5,5/ 6,5/ 7,5
0,85%	YNB	24 ml
15%	D-Glucose	24 ml
1 M	Methylamin	6 ml
5%	L-Prolin	2,4 ml
2%	L-Leucin	0,6 ml
2%	L-Lysin-HCl	0,2 ml
2%	L-Histidin-HCl	0,2 ml

Die Stammlösungen waren autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Lösung 2 wurde bei 50 °C im Wasserbad gehalten. Lösung 1 und 2 wurden bei 50 °C gemischt und pro Petrischale 30 ml ausgegossen.

3.2.2 Bradford-Proteinbestimmung

Das Bio-Rad Protein Assay-Reagenz wurde zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen gemäß Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden 0,8-8 µl Proteinprobe mit Wasser auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Reagenz versetzt. Nach kurzem Vortexen und Inkubation für 5 min erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm. Die Kalibriergerade wurde mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt.

3.2.3 SDS-PAGE: Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese eingesetzt. Die Gele wurden selbst gegossen, wobei 5% Sammelgele und 10-20% Trenngele hergestellt wurden. Die in Tabelle 3.11 angegebenen Mengen reichen für zwei Minigele. Pro Spur wurden 20-30 µg Gesamtprotein bzw. die Proteinmenge einer Oocyte entsprechend aufgetragen. Die Proben wurden vorher 30 min bei 37 °C in SDS-Probenpuffer inkubiert. Als Größenstandard diente peqGOLD *Prestained* Protein-Marker III. Die Elektrophorese wurde in Kathodenpuffer zunächst bei 100 V durchgeführt, um die Proben im Sammelgel aufzukonzentrieren. Im Trenngel erfolgte die Elektrophorese mit 200 V bis die Auftrennung des Markers gut zu sehen war. Die Gele wurden anschließend für Elektrobots verwendet oder mittels Coomassie-Brillant-Blau-Lösung (Rotiphorese[®] Blau R) für 1 h gefärbt. Die Entfärbung in Entfärbelösung

erfolgte über Nacht unter Schütteln.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung von SDS-Acrylamidgelen

	Trenngel 10%	Trenngel 12,5%	Trenngel 15%	Trenngel 20%	Sammelgel
H ₂ O	5 ml	4 ml	3 ml	1 ml	2,4 ml
Trenngelpuffer	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	
Sammelgelpuffer					1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	0,6 ml
10% APS	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	6 µl

3.2.4 Herstellung der Antikörperseren

Diese Arbeiten führte die Firma Biogenes durch. Zur Herstellung von polyklonalen Antikörperseren wurden Peptide in Auftrag gegeben. (15 Aminosäuren des N-Terminus von DdAQP2 EDGGNIKDEEEKPLD (α N20-34) bzw. 16 Aminosäuren des N-Terminus SL-KRSDDYQDLEEGIA (α N2-17)). Zur späteren Aufreinigung über eine Affinitätschromatographiesäule wurde C-terminal ein Cysteinrest eingefügt. Zur Steigerung der Immunogenität wurden die Peptide an LPH-Carrier (*Limulus polyphemus hemocyanin*-Carrier) gekoppelt.

Die Analyse der Reinheit der Peptide erfolgte durch HPLC und Massenspektrometrie. Mit dem jeweiligen Peptid wurden dann zwei Kaninchen bzw. eine Ziege immunisiert, um die Bildung von Antikörpern auszulösen. Es folgte eine sechsmalige Boosterinjektion über einen Zeitraum von 3 Monaten. Den Kaninchen wurde zum Zeitpunkt 0 (Präimmunserum), sowie nach 35, 63 und 91 Tagen Blut entnommen (20-50 ml), der Ziege zum Zeitpunkt 0 (Präimmunserum), sowie an Tag 35 (160 ml). Die Antikörpertiter wurden an Tag 35 mit einem ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) bestimmt. Es wurden pro Kaninchen vier und von der Ziege zwei polyklonale Antikörperseren geliefert.

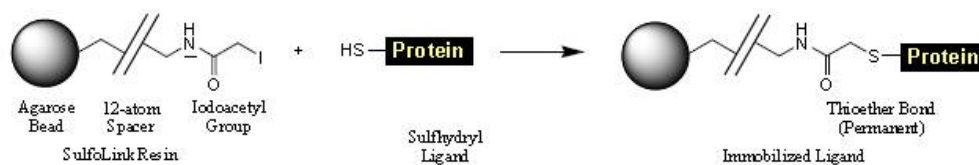


Abbildung 3.2: Generelle Struktur und Reaktionsschema des Säulenmaterials, Abbildung übernommen aus dem Thermo Scientific Protokoll

3.2.5 Affinitätschromatographische Aufreinigung der Antikörperseren

Zur Aufreinigung der Antikörper wurde das *Sulfolink[®] Immobilization Trial Kit* der Firma Thermo Scientific verwendet.

Vorbereitung der Säule

Im ersten Schritt wurde das Peptid, das auch zur Immunisierung der Tiere verwendet wurde, an der Affinitätschromatographiesäule immobilisiert. Die Immobilisierung erfolgt unter Ausbildung einer Thioetherbindung zwischen einer Jodoacetylgruppe des Säulenmaterial (Agarosebeads) und der Sulfhydrylgruppe des Cysteins am Peptid bei einem pH von 7,5-9 (s. Abb. 3.2).

Nach 30 min Inkubation der Säule mit Peptidlösung wurde die Kopplungseffizienz bestimmt. Wenn im Peptid keine aromatischen Aminosäuren vorhanden waren, konnte die Messung nicht photometrisch bei 280 nm erfolgen. Stattdessen wurden je 10 µl Ausgangs-peptidlösung sowie Peptidlösung nach der Inkubation auf eine DC-Platte aufgetragen, mit Ninhydrinlösung besprüht und anschließend 10 min bei 120 °C im Wärmeschrank getrocknet. Visuell wurde die Farbintensität der beiden Flecken verglichen. Diese nimmt umso stärker ab, je mehr Peptid an die Säule gebunden wird. Nach dem Waschen der Säule wurden freie Reaktionsstellen der Agarosebeads mit L-Cystein abgesättigt, um unspezifische kovalente Bindungen zu verhindern.

Bindung des Antikörpers an die Säule

Zunächst wurde die Absorption des Ausgangsserums photometrisch bei 280 nm bestimmt. Auf die vorbereitete Säule wurden dann 2 ml dieses Serums pipettiert und 30 min unter Schütteln inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 1 min bei $1000 \times g$ wurde der Durchlauf für photometrische Messungen gesammelt. Diese Schritte wurden dreimal mit

je 2 ml Serum wiederholt. Die photometrische Messung der Durchläufe erfolgt wieder photometrisch. Die Säule wurde solange mit Waschpuffer gewaschen bis der Durchlauf bei einer Wellenlänge von 280 nm eine Absorption von unter 0,005 aufwies.

Elution des Antikörpers

Zur Elution des Antikörpers wurde die Säule auf ein 15 ml Gefäß gesteckt, das mit 100 µl Neutralisationslösung (1 M Tris-HCl pH 8,5-9,0) gefüllt war. 2 ml Elutionspuffer (0,1-0,2 M Glycin-HCl pH 2,5-3,0) wurden auf die Säule pipettiert und der Antikörper so durch einen pH Sprung denaturiert und von der Säule eluiert. Die Neutralisationslösung renaturierte den Antikörper wieder. Diese Elution wurde zehnmal durchgeführt und die erhaltenen Antikörperlösungen photometrisch vermessen. Die Antikörperkonzentration wurde unter der Annahme, dass das enthaltene Protein zu 100% aus IgG besteht, nach folgender Gleichung berechnet:

$$A_{280} = 0,7143 \text{ mg/ml IgG} \quad (3.4)$$

Dialyse, Aufkonzentrierung und Lagerung

Die Dialyse erfolgte gegen 2l Phosphatpuffer zunächst für 2 h, nach Pufferwechsel über Nacht bei 4 °C. Zur Aufkonzentrierung wurde das Dialysat dreimal 10 min in Polyethylenglykol Pulver (PEG 6000) eingelegt und erneut gegen Phosphatpuffer dialysiert. Anschließend wurde die Absorption photometrisch vermessen.

Die Antikörperlösungen wurden mit Glycerol 80% 1:1 versetzt und bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Immundetektion

Elektro Blot

Zum immunchemischen Nachweis der Proteine wurden diese zunächst von einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran im *semi dry*-Verfahren übertragen. Dazu wurde folgender Aufbau vorgenommen: Auf der Anodenplatte wurden drei in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere gleicher Größe genau übereinandergelegt. Darauf folgten die in Methanol aktivierte PVDF-Membran, das Gel und weitere drei Whatmanpapiere. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 17 V für 60 min.

Western Blot

Die mit Proteinen beladene Membran wurde 1 h in M-TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit Erstantikörper (1:200-1:10000 in M-TBS-T) erfolgte unter Schütteln bei Raumtemperatur für 2 h oder über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in TBS-T-Puffer erfolgte die Inkubation mit Zweitantikörper (1:5000 in M-TBS-T) für 1 h. Es wurde erneut dreimal gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels *ECL plus Western Blotting Detection System* durch eine Peroxidase-katalysierte Chemoluminiszenzreaktion. Die Lumineszenz wurde durch Belichtung von *Hyperfilm ECL* für 5 s-15 min detektiert.

Dot Blot

Dot Blots wurden eingesetzt, um die Immunreaktivität von Seren und gereinigtem Antikörper gegen das Immunisierungspeptid zu testen. Dazu wurden je 10 ng-1 µg Immunisierungspeptid in wässriger Lösung auf eine PVDF-Membran aufgetragen und mit verschiedenen Serum- und Antikörperverdünnungen wie beim Western Blot (s. 3.2.6) entwickelt und detektiert.

Präblock

Um die Spezifität des gereinigten Antikörpers zu überprüfen, wurden Präblocks durchgeführt. Dazu wurde der Antikörper vor der Verwendung mit 1 µg/ml Immunisierungspeptid - dies entspricht einem ca. zehnfachen Überschuss der theoretisch benötigten Menge - für 30 min in M-TBS-T blockiert und dann wie beim Western Blot beschrieben (s. 3.2.6) eingesetzt. Banden, die nach dieser Behandlung im Western Blot nicht mehr erschienen, können als spezifische Antikörperbindepoteine angesehen werden.

3.2.7 N-Glykosidase F Assay

Das Enzym N-Glykosidase F (PNGaseF) wird aus dem Kulturfiltrat von *Flavobacterium meningosepticum* isoliert. Es spaltet alle Typen von Asparagin-gebundenen N-Glykanen. Für den Assay wurde die Membranproteinfraktion aus *Dicytsostelien* gewonnen (s. 3.4.7). Nach der Zentrifugation bei $10000 \times g$ bei 4 °C für 15 min wurde der Überstand bei $100000 \times g$ bei 4 °C für 45 min zentrifugiert. Das Pellet wurde Glykosidase-F behandelt: Es wurde in 9 µl Wasser und 1 µl *Glycoprotein Denaturation Buffer* resuspendiert und

für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde wie folgt durchgeführt (s. Tab. 3.12):

Tabelle 3.12: Pipettierschema für den Glykosidase-F Assay

2 µl	G7 Reaction Buffer
2 µl	10% NP40
2 µl	PNGaseF
4 µl	Aqua bidest.

Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden 60 µl SDS-Ladepuffer zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle diente unbehandelte Membranfraktion. Desweiteren wurde ein Parallelansatz chemisch deglykosyliert durch Inkubation mit 1 M NaOH für 1 h bei 37 °C. Die drei Proben wurden per SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.2.8 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) wurde zur Aufkonzentrierung von DdAQP2 eingesetzt. Ziel war es, posttranslationale Modifikationen des Proteins mittels 2D-SDS-PAGE und MALDI-TOF-MS weiter untersuchen zu können.

Bei der IP werden Proteine aus Zelllysaten selektiv durch Antikörper präzipitiert. Dies erfolgt in entsprechendem Lysis-Puffer durch Bildung eines Immunkomplexes zwischen dem Protein, einem spezifischen Antikörper und Protein A Sepharose. Protein A wird aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* gewonnen und hat vier hoch-affine Bindungsstellen für die Fc-Region von Immunglobulinen. Es wird an Sepharose-Kügelchen immobilisiert.

Lyse der Zellen

Es wurden zwei Schikanekolben mit 100 ml Ax-Medium mit je einer konfluenten Petri-schale *Dictyostelium*-Zellen angeimpft und unter Schütteln bei 150 min⁻¹ wachsen gelassen. Nach Zentrifugation von 4 · 10⁷ Zellen pro Ansatz (2000 × g, 10 min) wurden die Pellets dreimal mit PBS gewaschen und in 1 ml kaltem Nonidet P-40 Lysispuffer mit 40 µl Protease-Inhibitor-Mix resuspendiert. Unter mehrmaligem Schütteln wurden die Zellen 30 min auf Eis lysiert. Die Zentrifugation für 10 min auf 10000 × g diente dem Abtrennen von großen Zelltrümmern. Vom Überstand wurde die Gesamt-Protein-Konzentration

bestimmt (s. 3.2.2).

Pre-clearing

100 mg Protein A Sepharose wurden in 600 μ l Puffer A bei Raumtemperatur quellen gelassen (= *resin*). Protein A Sepharose *Resin* wurde dreimal mit PBS gewaschen und 1:1 in PBS resuspendiert (= *slurry*).

Um unspezifisch an Sepharose bindende Proteine zu eliminieren wurde mit den Zelllysaten ein *pre-clearing* durchgeführt. Dazu wurden 50 μ l *slurry* zweimal mit Nonidet P-40 Lysispuffer gewaschen und dann in diesem 1:1 resuspendiert. Es wurde Zelllysate (entsprechend $4 \cdot 10^7$ Zellen) zugegeben und für 60 min über Kopf schüttelnd bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei $10000 \times g$ wurde der geklärte Überstand vorsichtig in ein neues Gefäß überführt.

Präzipitation

Für die Fällung wurden zu dem geklärten Lysat 100 μ g Antikörper gegeben und 1 h bei 4 °C über Kopf schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 μ g *slurry* in Nonidet P-40 Lysispuffer. Dem Antikörper-Proteinkomplex wurde über Nacht bei 4 °C unter Schütteln Zeit gegeben, an die Sepharose zu binden. Nach Zentrifugation wurden die Sepharose-Kügelchen noch dreimal mit PBS gewaschen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Auf ein SDS-Gel wurde entweder die Lösung mit Kügelchen oder der Überstand nach Zentrifugation aufgetragen.

3.3 Expression in *Xenopus laevis* Oocyten

3.3.1 cRNA Synthese

Zur Expression in Oocyten des afrikanischen Krallenfrosches wurde die kodierende DNA zunächst mit Hilfe des *mMESSAGEmMACHINE RNA[®] Transcription Kit* in cRNA umgeschrieben. Dazu wurden 4 μ g pOG2 Plasmid, das die zu exprimierende DNA enthält, über Nacht mit *Not* I verdaut und gefällt (s. 3.1.4). Die cRNA Synthese erfolgte für 2 h bei 37 °C nach Herstellerangaben. Die DNA wurde nach Zugabe von 1 μ l Turbo-DNAse bei 37 °C für 15 min verdaut. Die cRNA wurde mit 30 μ l LiCl für 1 h oder über Nacht bei -20 °C ausgefällt und durch Zentrifugieren pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, für 5 min in der *SpeedVac[®]* bei 43 °C getrocknet

und in 25 μl DEPC-Wasser aufgenommen. Die Größe und Reinheit der RNA wurden auf einem denaturierendem Agarosegel (3.1.1) überprüft. Die Konzentration wurde im Photometer vermessen (s. 3.1.5) und auf 100 ng/ μl eingestellt. 5 μl Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

3.3.2 Oocytenpräparation

Zur Entnahme der Oocyten wurden *Xenopus laevis* Froschweibchen zunächst in 0,24% Tricainlösung anästhesiert und dann auf dem Rücken liegend auf Eis operiert. Diese Arbeiten konnten im Arbeitskreis von Prof. Bleich durchgeführt werden. Mit einer Schere wurde ein 1 cm breiter Hautschnitt am Bauch vorgenommen. Anschließend wurde auch die darunterliegende Bauchdecke durchtrennt. Mit einer Pinzette wurde ein Teil des Ovarialsacks entnommen. Bauchdecke und Haut wurden dann in zwei Schritten mit resorbierbarem Nahtmaterial wieder zugenäht und die Frösche bis zum Aufwachen unter fließendem Wasser gespült und beobachtet. Der entnommene Teil des Ovarialsacks wurde zunächst mechanisch mit der Pinzette zerkleinert. Um Bindegewebe und Follikelzellen zu entfernen wurden die Oocyten dreimal mit calciumfreiem OR2-Puffer gewaschen und für 30 min mit Kollagenase-A-Lösung (0,5 mg/ml in OR2-Puffer) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Oocyten fünfmal mit ND96-Puffer gewaschen. Die Auswahl der Reifeklassen V und VI erfolgte unter der Stereolupe. Die Oocyten wurden bis zur Injektion bei 4°C in ND96-Puffer gelagert.

3.3.3 Oocyten-Injektion

Die Injektion der synthetisierten cRNA erfolgte direkt nach der Oocytenpräparation. Dazu wurden die Injektionspipetten mit einem automatischen Pipettenziehgerät angefertigt. Die Injektion von 50 nl cRNA (100 ng/ μl) erfolgte unter der Stereolupe in den braun pigmentierten Pol der Oocyte. Als Negativkontrolle wurde 50 nl ND96-Puffer, als Positivkontrolle cRNA von *rat* AQP1 bzw. *Plasmodium falciparum* AQP (100 ng/ μl) injiziert. Bei Koinjektionen wurden die cRNA-Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Inkubation erfolgte dann in ND96-Puffer für 3-4 d bei 16°C .

3.3.4 Oocyten-Schwelltests

Die Oocyten wurden vor der Messung in frischem ND96-Puffer für 5 min äquilibriert. Die Messung der Wasserpermeabilität erfolgte nach Überführen einer Oocyte in 1:3 ver-

dünnten ND96-Puffer (140 mosm·kg⁻¹ einwärts gerichteter osmotischer Gradient). Für die Messung der Solutleitfähigkeit wurden 65 mM NaCl durch 130 mM Harnstoff bzw. Glycerol ersetzt. Die Isoosmolarität (+/- 5 mosm·kg⁻¹) in Bezug auf den ND96-Puffer wurde mittels Osmometer überprüft. Für die Schwelltests bei pH 5,2 wurden im ND96-Puffer 5 mM HEPES gegen 5 mM MES ersetzt. Die Oocyten wurden vor der Messung in diesem pH-Wert äquilibriert. Eine Schwellung der Oocyten wurde bei 2,5facher Vergrößerung unter dem Mikroskop mittels Videokamera aufgezeichnet. Das relative Volumen (V/V_0) wurde aus der Fläche, die die Oocyte bedeckte, bestimmt. Die osmotische Wasserpermeabilität (P_f -Wert in $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$P_f = \frac{V_0 \cdot \frac{d(V/V_0)}{dt}}{S_0 \cdot V_W \cdot (osm_{in} - osm_{out})} \quad (3.5)$$

Dabei ist das Oocytenanfangsvolumen $V_0 = 9 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3$, die relative Volumenzunahme im linearen Bereich $d(V/V_0)/dt$, die mittlere Oocytenoberfläche $S_0 = 0,045 \text{ cm}^2$, das molekulare Wasservolumen $V_W = 18 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ und der osmotische Gradient zwischen dem Oocyteninneren und der externen Lösung ($osm_{in} - osm_{out}$) = 140 mosm·kg⁻¹. Die isoosmotische Solutpermeabilität (P_{sol} in $1 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$P_{sol} = \frac{osm_{total} \cdot V_0 \cdot \frac{d(V/V_0)}{dt}}{S_0 \cdot (sol_{out} - sol_{in})} \quad (3.6)$$

Die totale Osmolarität des Systems osm_{total} betrug 210 mosm·kg⁻¹, der isoosmotische Solutgradient ($sol_{out} - sol_{in}$) 130 mM.

3.3.5 Präparation von Membranproteinen aus *X. laevis* Oocyten

Zur Anreicherung der Membranproteine wurden je fünf Oocyten in 0,5 ml hypotonem Phosphatpuffer auf Eis lysiert. Die Zentrifugation bei 4 °C für 5 min bei $500 \times g$ diente der Abtrennung großer Zellbestandteile. Der Überstand wurde erneut bei 4 °C für 30 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert und die oben schwimmende, gelbe Dotterschicht mit einem Tuch entfernt. Das Pellet mit den Membranproteinen wurde in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Auf die SDS-Gele wurde pro Spur die einer Oocyte entsprechende Proteinmenge aufgetragen.

3.4 Zellkultur von *D. discoideum*

Alle Arbeiten mit *Dictyostelium discoideum* wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen sowie die Plastikwaren waren steril.

Der *D. discoideum* AX2-Stamm stammt aus dem Arbeitskreis von Prof. Leippe in Kiel. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden bei 22 °C im Inkubator gehalten. Sie wuchsen dabei in Ax-Medium entweder adhärent auf Petrischalen oder wurden in Schüttelkultur in Schikanekolben kultiviert. Alle Medien und Puffer wurden vor ihrer Verwendung auf 22 °C gebracht. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase gehalten, was einer Zelldichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen/ml bis $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml entspricht. Dazu wurden die Zellen in Schüttelkultur nach spätestens 24 h gezählt (s. 3.4.4) und, wenn nötig, verdünnt. Auf Petrischalen adhärent wachsende Zellen wurden bei optischer Konfluenz passagiert (s. 3.4.1). Da die Gefahr besteht, dass *Dictyostelium*-Zellen sich genetisch verändern, wenn sie zu lange in Kultur gehalten werden, wurden alle vier Wochen neue Sporen aufgetaut und die alten Zellen verworfen.

3.4.1 Passagieren von Zellen

Die *Dictyostelium*-Zellen wachsen auf Petrischalen adhärent. Bei optischer Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und vorsichtig am Rand 2 ml Medium zugegeben. Die Schale wurde kurz umgeschwenkt, um tote, oben schwimmende Zellen zu entfernen. Nach erneutem Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 1 ml Medium von der Platte gespült und 900 µl der Zellsuspension verworfen. Es folgte die Zugabe von 9 ml Ax-Medium pro Platte.

3.4.2 Anlegen von Sporen-Dauerkulturen

$1 \cdot 10^8$ *D. discoideum*-Zellen wurden 5 min bei $1000 \times g$ pelletiert, einmal mit 20 ml kaltem SPB gewaschen und in 5 ml kaltem SPB resuspendiert. Diese 5 ml wurden dann auf einer Phosphatagarplatte ausgestrichen. Die Platten trockneten mindestens 30 min unter der Sterilbank. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Platten wurden bei 22 °C für 5-7 d inkubiert. Die Sporen waren mit dem bloßen Auge deutlich sichtbar. Sie wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte gekratzt, im Gefrierrohrchen in 500 µl 80% Glycerol durch Vortexen suspendiert und bei -80 °C eingefroren.

3.4.3 Keimung von Sporen-Dauerkulturen

Zum Aufkeimen der Sporen wurde mit einer Pipettenspitze ein wenig vom gefrorenen Glycerolstock (s. 3.4.2) abgekratzt und in 10 ml Ax-Medium in einer 10 mm Petrischale suspendiert. Nach leichtem Schwenken wurde diese für 4-7 d bei 22 °C inkubiert.

3.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Zählkammer

Zur Zellzählung wurden adhärent wachsende Zellen nach Absaugen des Mediums mit 2 ml Ax-Medium vorsichtig gespült, um tote, oben schwimmende Zellen zu entfernen. Die lebenden Zellen wurden dann mit 1 ml Ax-Medium von der Petrischale gespült und je nach Zelldichte 1:10-1:100 verdünnt ausgezählt. Schüttelkulturen wurden in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Zur Zählung wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Mikroskop verwendet. Die Zellzahl ergibt sich aus dem Mittelwert der Zellzahl von 10 Großquadraten unter Einbeziehung des Kammerfaktors (0,0002) und der Verdünnung der Zellen.

Photometrische Bestimmung

Zur schnellen Bestimmung der Zellzahl wurde die OD₆₀₀ mit dem Photometer vermessen.

3.4.5 Mediumswechsel

Nach Absaugen des alten Mediums wurden am Rand der Petrischale vorsichtig 2 ml Ax-Medium zugegeben und die Schalen geschwenkt. Das Medium wurde dann abgesaugt. So wurden tote, oben schwimmende Zellen entfernt. Am Rand der Schale wurde 10 ml frisches Medium zugegeben.

Wenn die Platten zu dicht bewachsen waren, wurden die Zellen fast komplett von der Platte gespült und die verbliebenen Zellen in Ax-Medium weiterkultiviert.

3.4.6 Anlegen von Flüssig-Schüttelkulturen und Bestimmung der Generationszeit

Wenn viele Zellen benötigt wurden, wurden die *Dictyostelien* in Schikanekolben kultiviert. Die Schikanen dienten der besseren Sauerstoffzufuhr. In 300 ml Kolben wurden

100 ml, in 1000 ml Kolben 300 ml Zellsuspension inkubiert. Pro Schikanekolben wurde eine konfluente 10 cm Petrischale angeimpft und bis zu einer Zelldichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen/ml bis $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml bei 22°C unter Schütteln (150 min^{-1}) wachsen gelassen.

Zur Ermittlung der Generationszeit wurden alle 8 h Proben gezogen und in der Zählkammer vermessen. Parallel die OD_{600} bestimmt (s. 3.4.4).

Die Generationszeit (t_g) konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$t_g = \frac{\log 2 \cdot dt}{(\log N - \log N_0)} \quad (3.7)$$

N ist die Endzellzahl, N_0 die Ausgangszellzahl und dt die Kulturzeit.

3.4.7 Membranfraktionsgewinnung aus *D. discoideum*

Je eine konfluente 10 cm Petrischale *Dictyostelium*-Zellen wurde in 300 ml Ax-Medium in 1000 ml Schikanekolben angeimpft und bis zu einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ bis $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml unter Schütteln bei 150 min^{-1} und 22°C wachsen gelassen (40-50 h). Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und $2000 \times g$ wurde das Pellet zweimal mit SPB gewaschen und in 1,5 ml SPB resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte nach der "freeze and thaw"-Methode: nach 8 min Einfrieren bei -80°C wurden die Zellen bei 37°C für 6 min wieder aufgetaut. Dieser Zyklus wurde mindestens viermal durchlaufen und die Gesamt-Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay (s. 3.2.2) bestimmt. Eine Probe der aufgeschlossenen Zellen wurde in SDS-Probenpuffer gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert und später als Kontrolle auf das SDS-PAGE aufgetragen.

Zum Abtrennen von großen Zelltrümmern erfolgte die Zentrifugation bei $10000 \times g$ für 15 min bei 4°C . Der Überstand wurde zur Gewinnung der Membranfraktion bei $100000 \times g$ für 45 min bei 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Membran-Pellet wurde in 40 μl SPB resuspendiert, 1:1 mit SDS-Ladepuffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert.

3.4.8 Isolierung von genomischer DNA aus *D. discoideum*

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden Schüttelkulturen angeimpft (s. 3.4.6) und bis zu einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ bis $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml wachsen gelassen. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C . $2 \cdot 10^8$ Zellen wurden bei $1600 \times g$ für 5 min abzentrifugiert, zweimal in kaltem Aqua bidest. gewaschen und das Pellet in 45 ml *nuclear lysis buffer* resuspendiert. Unter Umschwenken erfolgte die Zugabe von Nonidet P-40

bis die Lösung klar wurde (maximal 5 ml). Nach Zentrifugation für 15 min bei $4000 \times g$ wurde das Pellet in 5 ml SDS-Lysis-Puffer und 125 μl Proteinase K ($20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) resuspendiert und 1 h bei 60°C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Nach Überführen von je 1 ml Lösung in ein 15 ml Reaktionsgefäß erfolgte die Zugabe von je 5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol. Es wurde vorsichtig umgeschwenkt, bis eine homogene Lösung entstanden war, die sich nach Zentrifugation bei $8000 \times g$ für 15 min in zwei Phasen trennte. Unter Vermeidung der Interphase wurden die oberen Phasen in neue Gefäße überführt und noch dreimal ausgeschüttelt. Die klaren oberen Phasen wurden gesammelt und die DNA gefällt (s. 3.1.4). Das Pellet wurde für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 200 μl Aqua bidest. aufgenommen.

3.4.9 Isolierung von genomischer DNA aus *D. discoideum*, quick protocol

Dieses schnellere Verfahren wurde zur PCR-Verifizierung des *Dictyostelium discoideum* *knockout*-Stammes eingesetzt. Die Zellen einer konfluenten 10 cm Petrischale wurden mit 1 ml Ax-Medium abgespült. Die Zellyse von 100 μl Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Lysispuffer unter Zusatz von 1 μl Proteinase K ($20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) pro 25 μl . Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde das Enzym durch Erhitzen auf 95°C für 5 min inaktiviert und die gewonnene genomische DNA direkt in PCR-Reaktionen eingesetzt (s. 3.1.16) [72].

3.5 Permeabilitätstests durch dynamische Lichtstreuung

3.5.1 Prinzip der dynamischen Lichtstreuungsmessung

Mit Hilfe einer Stopped-Flow-Apparatur kann die Änderung der Lichtstreuung im ms-Bereich gemessen werden. Dazu wird eine Zellsuspension mit einer Lösung anderer Osmolarität sehr schnell in einer Küvette gemischt und sofort spektroskopisch vermessen. Die Messungen erfolgten mit einer Apparatur der Firma BioLogic mit der Mischeinheit SFM 300 und der Detektionseinheit MOS 200. Die Mischeinheit erlaubt das Aufsetzen von 2-3 10 ml Spritzen. Das zu messende Volumen, sowie die Flussrate wurde mit dem Bio-Kine Programm eingestellt. Die Küvette wurde mit monochromatischem Licht

($\lambda = 436 \text{ nm}$) einer Xenon/Quecksilber Bogenlampe beleuchtet. Die Messung der Streulichtintensität erfolgte im 90° Winkel mit einem Photomultiplier. Die Daten wurden mit der Bio-Kine Software ausgewertet.

3.5.2 Messung von *D. discoideum*-Zellen

Dictyostelium-Zellen wurden in Schüttelkultur gehalten, bis sie eine OD_{600} von 0,85 erreicht hatten. Sie wurden abzentrifugiert ($2000 \times g$, 10 min, 4°C) und entweder in PBS oder in frischem Ax-Medium (jeweils $300 \text{ mosm}\cdot\text{kg}^{-1}$) resuspendiert. Für die Messung wurden $600 \text{ mosm}\cdot\text{kg}^{-1}$ Lösungen von PBS bzw. Ax-Medium 1:1 zugemischt, so dass ein auswärtsgerichteter osmotischen Gradient von $300 \text{ mosm}\cdot\text{kg}^{-1}$ vorlag.

3.6 *knockout* des *DdAQP2*-Gens in *D. discoideum*

3.6.1 Klonierung des *DdAQP2-knockout*-Konstruktes

Der pLPBLP-Vektor wurde so designed, dass zwei *loxP* Stellen in gleicher Orientierung in das pBluescript Plasmid kloniert wurden. Sechs Stop-Codons wurden außerhalb der *loxP* Stellen eingefügt. Zwischen die *loxP* Stellen wurde dann die Blastocidin-S Resistenzkassette kloniert. Die transkriptionelle Regulation unterliegt dem *Dictyostelium actin* 15 Promotor und dem *Dictyostelium actin* 8 Terminator. Das ganze Fragment hat eine Länge von 1,5 kb [51]. Vorteil des Plasmids ist, dass durch transiente Expression der Cre-Rekombinase die Blastocidin-Resistenzkassette aus dem Genom nach erfolgter Gendeletion wieder entfernt werden kann und so für erneute *knockouts* zur Verfügung steht. Die sechs Stop-Codons bleiben dabei erhalten. Der pLPBLP Vektor wurde freundlicherweise von der *dictyBase* (www.dictybase.org) zur Verfügung gestellt.

Für das *knockout*-Konstrukt wurden PCRs aus genomische DNA durchgeführt. Es wurde ein 5'-Linkerarm mit 546 bp und ein 3'-Linkerarm mit 655 bp amplifiziert und in den pLPBLP-Vektor *upstream* (*Sal* I/*Hin*D III) bzw. *downstream* (*Pst* I/*Bam*H I) der Blastocidin-Resistenzkassette kloniert (s. 3.7.1 und Abb. 3.3). Nach ersten Versuchen wurde ein zweites *knockout*-Konstrukt mit einem verlängerten 3'-Arm (946 bp) erstellt, um die Spezifität der homologen Rekombination zu erhöhen.



Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des DdAQP2 *knockout*-Konstruktes, nach [51]. 5'- und 3'-Linkerarme wurden *up-* bzw. *downstream* der Blasticidin-Resistenzkassette (Bsr) mit dem *actin* 15 Promotor kloniert. Zwei loxP-Stellen ermöglichen das spätere Entfernen der Resistenzkassette durch die Cre-Rekombinase. Stopcodons sind in allen sechs ORFs zu finden.

Das fertige *knockout*-Konstrukt wurde auf zwei verschiedene Arten mit Restriktionsenzymen verdaut: Entweder erfolgte eine Linearisierung mit *Sal* I (s. 3.1.6) mit anschließender Enzyminaktivierung für 30 min bei 65 °C, oder es wurde mit *Bam*H I und *Sal* I die Kassette für die homologe Rekombination ausgeschnitten. Die Aufreinigung der verdauten DNA erfolgte über ein Agarosegel (s. 3.1.2) oder durch Fällen der DNA mit Ethanol (s. 3.1.4).

3.6.2 Elektro-Transformation von *D. discoideum*

Dictyostelium-Zellen wurden über Nacht in Schüttelkultur wachsen gelassen (s. 3.4.6). Pro Transformationsansatz wurde Lösung mit $4 \cdot 10^7$ Zellen in ein Falcontube überführt und bei $1000 \times g$ und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 20 ml kaltem SPB und einmal mit derselben Menge kaltem Elektroporationspuffer gewaschen und in 300 µl kaltem Elektroporationspuffer resuspendiert. Zunächst wurde mit 2 mm Elektroporationsküvetten gearbeitet, dann wurde auf 4 mm Elektroporationsküvetten umgestellt. Sie wurden mindestens 5 min auf Eis vorgekühlt und je 300 µl Zell-Suspension sowie 4, 6, 8, 16 oder 40 µg verdaute DNA (s. 3.6.1) hineinpipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit dem *Gene Pulser® II Electroporation System* (25 µF, 1 kV, 2 Impulse mit 5 s Abstand). Die *time constant* betrug 0,6-1 ms. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde die elektroporierten Zell-Suspension in eine Lösung aus je 3 µl 0,1 M CaCl₂ und 0,1 M MgCl₂ überführt und darin 15 min unter Schütteln (150 min^{-1}) inkubiert. Die Zellen wurden in 10 cm Petrischalen in 10 ml Ax-Medium überführt und kultiviert (s. 3.4). Nach 48 h erfolgte der Austausch gegen Selektionsmedium (s. 3.6.4).

3.6.3 Calciumchlorid-Transformation von *D. discoideum*

Pro Transformationsansatz wurde eine konfluente 10 cm Petrischale verwendet. Die Zellen wurden dazu in Ax-Medium ohne Antibiotikum kultiviert. Die Platten wurden an einer Stelle am Rand markiert, um immer an derselben Stelle Medium absaugen oder zugeben zu können. Das Medium wurde abgesaugt, vorsichtig 10 ml MES-Medium zugegeben und die Zellen darin mindestens 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden folgende Komponenten pro Ansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert: 300 μl 2fach HBS und 6 μg verdaute DNA (s. 3.6.1) wurden gemischt und mit Aqua bidest. auf 600 μl aufgefüllt. Das langsame Zutropfen von 38 μl 2 M CaCl_2 -Lösung erfolgte unter Vortexen. Nach weiteren 10 s Vortexen wurde für genau 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium wurde gründlich am markierten Rand abgesaugt, die DNA mit CaCl_2 vorsichtig in die Mitte der Platte getropft und umgeschwenkt. Nach genau 30 min wurde 10 ml MES-Medium zugegeben und die Platten für mindestens 3 h stehen gelassen. Das Medium wurde dann gründlich abgesaugt und 2 ml Schocklösung, bestehend aus 1 ml 2fach HBS, 0,4 ml Aqua bidest. und 0,6 ml 60% Glycerol, zugegeben. Nach genau 8 min wurde erneut abgesaugt und 10 ml Ax-Medium zugegeben. Nach 48 h Regenerationszeit wurde auf Medium mit Selektionsantibiotikum umgestellt.

3.6.4 Blastocidinselektion

Die Selektion der Blastocidin-resistenten Klone erfolgte mit Selektionsmedium von $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bis $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Das Selektionsmedium wurde das erste Mal nach sieben Tagen und dann alle zwei Tage ausgewechselt, wobei darauf geachtet wurde, immer an derselben markierten Stelle Medium abzusaugen und zuzugeben, um Zellen potentieller Klone nicht miteinander zu vermischen.

3.6.5 Klone picken

Die auf der Petrischale adhärent wachsenden Klone wurden unter dem Mikroskop gepickt, wenn sie einen Durchmesser von mindestens 1 mm erreicht hatten (nach 7-14 d). Dabei wurden die Zellen vorsichtig mit der Pipette von der Schale geschabt und gleichzeitig etwas Medium aufgezogen. Die Zellen wurden an den Rand von 24-well Platten pipettiert und mindestens 1 h ruhig stehen gelassen bevor 2 ml Blastocidin-Selektionsmedium ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) zupipettiert wurden.

3.7 Klonierungsarbeiten/ Mutationen

3.7.1 Übersicht über die klonierten Konstrukte

Alle hergestellten Konstrukte wurden sequenziert (s. 3.1.15). In der Tabelle sind die verwendeten Primer angegeben (s. 2.4).

<i>Konstrukt- Name</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Herstellung</i>	<i>Primer (s.2.4)</i>
DdAQP2pBlue- script	[A]	Klonierung: <i>insert</i> : PCR aus cDNA, Vektor: pBluescript, beides <i>EcoR</i> V ge- schnitten (<i>blunt end</i> -Klonierung)	(7)+(8)
DdAQP2 pRS426MET25	[B]	Klonierung: <i>insert</i> : PCR von [A], Vektor: pRS426MET, beides <i>BamH</i> I/ <i>HinD</i> III geschnitten	(9)+(10)
DdAQP2 pUG36	[C]	Klonierung: <i>insert</i> : [B], Vektor: pUG36, beides <i>BamH</i> I/ <i>HinD</i> III geschnitten	
	[C2]	zum Sequenzieren wurde Konstrukt [C] <i>Xba</i> I geschnitten und religiert	
DdAQP2 p2xHA_RS426 MET25	[D]	Klonierung: <i>insert</i> : [B], Vek- tor: p2xHARS426MET25, beides <i>BamH</i> I/ <i>HinD</i> III geschnitten	
DdAQP2 p2xHApOG2	[E]	Klonierung: <i>insert</i> : [D], Vektor: [F], beides <i>Xba</i> I/ <i>HinD</i> III geschnitten	
rAQP1 pOG2	[F]	AK Beitz, <i>Xba</i> I/ <i>EcoR</i> I kloniert	
DdAQP2 pOG2 ohne HA-tag	[G]	<i>insert</i> : [B], Vektor: [F], beides <i>Xba</i> I/ <i>HinD</i> III geschnitten	
DdAQP2 p2xHA pOG2 ohne <i>BamH</i> I hinten	[H]	<i>insert</i> : [D] <i>Xho</i> I geschnitten und <i>gebluntet</i> , dann <i>Xba</i> I geschnitten, Vektor: [E] <i>BamH</i> I geschnitten und <i>gebluntet</i> , dann <i>Xba</i> I geschnitten, Li- gation <i>Xba</i> I/ <i>blunt end</i>	

3 Methoden

<i>Konstrukt- Name</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Herstellung</i>	<i>Primer (s.2.4)</i>
M18	[I]	Klonierung: <i>insert</i> : PCR [E], Vektor: [H], beides <i>Bam</i> H I/ <i>Hin</i> D III geschnitten	(11)+(12)
M35	[J]	Klonierung: <i>insert</i> : PCR [E], Vektor: [H], beides <i>Bam</i> H I/ <i>Hin</i> D III geschnitten	(13)+(12)
S120A	[K]	Mutagenese: s. 3.1.17 <i>template</i> [E]	(1)+(2)
S120D	[L]	Mutagenese: s. 3.1.17 <i>template</i> [E]	(3)+(4)
loopDswap	[M]	1.+2. PCR: [E] als <i>template</i> , Pfu-Polymerase, 28 Zyklen; mit je 1 µl <i>Dpn</i> I 3 h bei 37 °C verdaut, 3. PCR: Produkt aus 1. und 2. PCR jeweils 1:100 verdünnt im Verhältnis 1:1 als <i>template</i> , Pfu-Polymerase, 20 Zyklen; Klonierung <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> D III in [E]	1.PCR: (14)+(15) 2.PCR: (16)+(12) 3.PCR: (14)+(12)
Δ208-219	[N]	1.+2. PCR: [E] als <i>template</i> , Pfu-Polymerase, 28 Zyklen; mit je 1 µl <i>Dpn</i> I 3 h bei 37 °C verdaut, 3. PCR: Produkt aus 1. und 2. PCR jeweils 1:100 verdünnt im Verhältnis 1:1 als <i>template</i> , Pfu-Polymerase, 20 Zyklen; Klonierung <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> D III in [E]	1.PCR: (14)+(17) 2.PCR: (18)+(12) 3.PCR: (14)+(12)
D275P	[O]	Mutagenese: s. 3.1.17 <i>template</i> [E]	(5)+(6)
D275A	[P]	Mutagenese: s. 3.1.17 <i>template</i> [E]	(5)+(6)
DdAQP2 ohne HA pOG2	[Q]	<i>insert</i> : [B], Vektor: [F], beides <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> D III geschnitten	
S120D + Δ208- 219	[R]	Mutagenese: s. 3.1.17 <i>template</i> [N]	(3)+(4)

3 Methoden

<i>Konstrukt- Name</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Herstellung</i>	<i>Primer (s.2.4)</i>
DdAQP2 ohne HA pOG2 ohne <i>Bam</i> H I hinten	[S]	<i>insert</i> : [B], Vektor: [H], beides <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> D III geschnitten	
Δ208-212	[T]	1.+2.PCR: [G] als <i>template</i> , Pfu- Polymerase, 28 Zyklen; mit je 1 μl <i>Dpn</i> I 3 h bei 37 °C verdaut, 3.PCR: Produkt aus 1. und 2. PCR jeweils 1:100 verdünnt im Verhältnis 1:1 als <i>template</i> , Pfu-Polymerase, 20 Zyklen; Klonierung <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> D III in [G]	1.PCR: (14)+(31) 2.PCR: (32)+(12) 3.PCR: (14)+(12)
Δ208-219 pBlue- script	[U]	<i>insert</i> : PCR von [N], Vektor: pBlues- cript, beides <i>Bam</i> H I/ <i>Xho</i> I geschnit- ten	(19)+(20)
Δ208-219 pET21-cHx	[V]	<i>insert</i> : [U], Vektor: pET21-cHx, beides <i>Bam</i> H I/ <i>Xho</i> I geschnitten	
C-terminales GFP DdAQP2 pDXA-GFP2	[W]	<i>insert</i> : PCR von [B], Vektor: pDXA- GFP2, beides <i>Hin</i> D III/ <i>Kpn</i> I geschnit- ten	(21)+(22)
N-terminales GFP DdAQP2 pDXA-GFP2	[X]	<i>insert</i> : PCR von [B], Vektor: pDXA- GFPs, beides <i>Bam</i> H I/ <i>Xho</i> I geschnit- ten	(23)+(24)
wacA pOG2	[Y]	<i>insert</i> : PCR aus genomischer DNA, Vektor: pOG2, beides <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> D III geschnitten	(33)+(34)
Δ208-219 pRS426MET25	[Z]	<i>insert</i> : [N], Vektor: pRS426MET25, beides <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> D III geschnitten	
KO Konstrukt in pLPBLP	[AA]	PCRvorne aus genomischer DNA, <i>Sal</i> I/ <i>Hin</i> D III in pLPBLP, dann PCRhinten aus genomischer DNA, <i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> H I darein	KOvorne: (25)+(26), KOhinten: (27)+(28)

<i>Konstrukt- Name</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Herstellung</i>	<i>Primer (s.2.4)</i>
KO Konstrukt- LANG in pLP- BLP	[BB]	<i>insert:</i> PCRhinten aus genomischer DNA, Vektor: [AA], <i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> H I geschnitten	(29)+(30)

3.7.2 Klonierung der Schleife D Mutanten [M] und [N] mittels Fusions-PCRs

Zur Deletion bzw. zum Austausch von mehreren Aminosäuren sind umfangreichere Klonierungsarbeiten nötig als zur Einführung von Punktmutationen mittels *in vitro* Mutagenese. Um zeit- und materialsparender die gewünschten Mutationen durchführen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Konzept der Fusions-PCRs im Arbeitskreis etabliert. Diese Fusions-PCRs wurden zur Klonierung der Schleife D Mutanten eingesetzt.

loopDswap [M]

Für die 1. PCR wurden Primer 14 und 15 eingesetzt (s. Tab. 2.4 und Abb. 3.4), für die 2. PCR 16 und 12. Primer 15 ist so konstruiert, dass am 5'-Ende die Sequenz der Schleife D von AqpA aus *D. discoideum* eingefügt ist. Primer 16 enthält dieselbe Sequenz am 5'-Ende. Der zweite Teil des Primers bindet an das Ende der Schleife D, so dass die 105 bp der Schleife D aus DdAQP2 durch 21 bp der Schleife D des AqpA ersetzt werden. Lediglich die letzten 9 bp der Schleife D von DdAQP2 bleiben erhalten. In der 3. Fusions-PCR überlappen dann die komplementären Primer. Durch Einsatz der äußeren Primer 14 und 12 wird der jeweils fehlende Gegenstrang aufgefüllt.

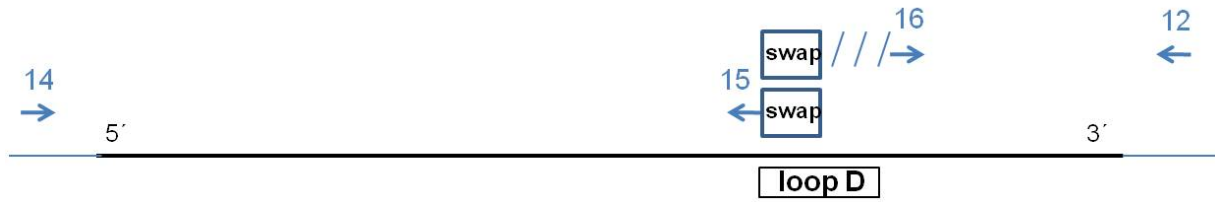


Abbildung 3.4: Primer Angriffspunkte des Konstruktes loopDswap

Δ208-219 [N]

Für die 1. PCR wurden Primer 14 und 17 eingesetzt (s. Tab. 2.4 und Abb. 3.5), für die 2. PCR 18 und 12. Primer 18 ist so konstruiert, dass er am 5'-Ende komplementär zu Primer 17 ist. Der zweite Teil des Primers bindet an den hinteren Teil der Schleife D, so dass 36 bp eliminiert werden. In der 3. Fusions-PCR überlappen dann die komplementären Primer. Durch Einsatz der äußeren Primer 14 und 12 wird der jeweils fehlende Gegenstrang aufgefüllt.



Abbildung 3.5: Primer Angriffspunkte des Konstruktes Δ208-219

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung von *DdAQP2*

4.1.1 Suche nach putativen AQP-Genen in der Genomdatenbank von *D. discoideum*

Zunächst wurde das Genom auf die Existenz weiterer möglicher Wasser- und Glycerolkanäle, neben *WacA* und *AqpA*, untersucht. Dazu wurden Aminosäure-Sequenzen bekannter Aquaporine (z.B. *hAQP1*), die Datenbank dictyBase (www.dictybase.org) und das *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) verwendet. Als Ergebnis der Suche wurden die beiden bereits bekannten, *wacA* und *aqpA*, sowie drei neue putative Aquaporinsequenzen gefunden (s. Abb. 4.1). Die Benennung der putativen Aquaporine erfolgte nach steigender Chromosomenzahl: *DdAQP1*, 2 und 3 (Chromosom 2, 3 und 5). Der *E-value* ($E = Expect$) gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass es sich bei den Treffern um Zufallstreffer handelt. Dieser Wert sollte möglichst klein bzw. nah dem Wert 0 sein. *WacA* und *aqpA* haben von den gefundenen DNA-Sequenzen die kleinsten *E-value*-Werte mit $5 \cdot 10^{-30}$ bzw. $4 \cdot 10^{-30}$. *DdAQP2* hat mit $2 \cdot 10^{-21}$ einen kleineren *E-value* Wert als *DdAQP1* und *DdAQP3*.

Die theoretische DNA-Sequenz für das *DdAQP2*-Gen enthält einen offenen Leserahmen (ORF) von 885 bp mit einem A/T-Anteil von 62%. Die an den offenen Leserahmen angrenzenden nicht-kodierenden Bereiche haben einen A/T-Gehalt von über 80% und grenzen so den Exonbereich ein. Im ORF sind an den Positionen 1 und 52 zwei mögliche Startcodons zu finden. Die auf der dictyBase unter der Gen-ID DDB_G0279443 hinterlegten *Expressed Sequence Tags* (ESTs) wurden bisher in der sexuellen und der *slug* Entwicklungsphase von *D. discoideum* gefunden. Sequenzvergleiche ergaben, dass *DdAQP2* eine auffällig große Ähnlichkeit einerseits mit *hAQP1* aus dem Menschen und andererseits mit dem pflanzlichen *Arabidopsis thaliana* TIP1-1 hat (48% ähnliche und 30 bzw. 32% identische Aminosäurereste). Beides sind wasserspezifische Aquaporine.

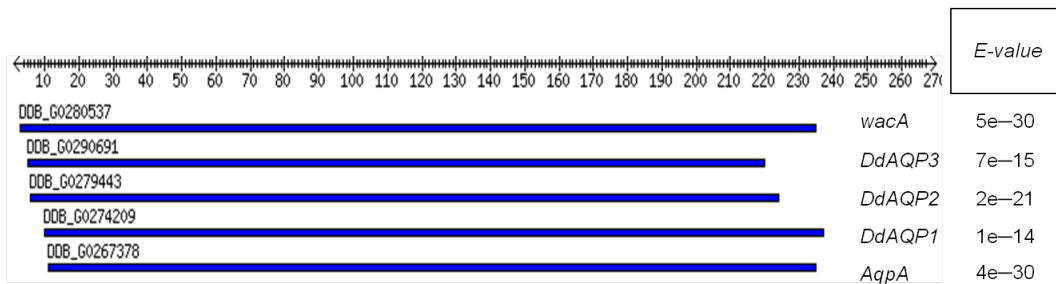


Abbildung 4.1: Ergebnis der BLAST-Suche in der dictyBase Datenbank. Als Vergleich wurde die Aminosäuresequenz von *hAQP1* verwendet. Die Abkürzungen über den Balken bezeichnen die Gen-Nummern, die in der dictyBase hinterlegt sind.

Da ein Wassertransport mit der Aufgabenstellung direkter verknüpft schien, wurde der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf das putativ wasserspezifische DdAQP2 gelegt.

4.1.2 Topologie-Vorhersage von DdAQP2

Die Topologie-Vorhersage (s. Abb. 4.2) beruht auf der Kristallstruktur von *hAQP1* [16]. Trotz der großen Sequenzähnlichkeit zwischen den beiden Proteinen gibt es auch herausragende Unterschiede: Die zwei möglichen Startmethionine im langen N-Terminus (42 bzw. 25 Aminosäuren gegenüber 8 Aminosäuren im *hAQP1*) sowie die außergewöhnlich lange Schleife D mit 35 Aminosäuren gegenüber 11 Aminosäuren im *hAQP1* fallen besonders auf. Innerhalb der Schleife D von DdAQP2 sind elf putative Phosphorylierungsstellen zu finden. Des Weiteren ergaben Sequenzvergleiche mit Pflanzen-Aquaporinen, dass DdAQP2 ein für eine Schalterfunktion in Pflanzen wichtiges Serin [24] (S120) aufweist. Der Vergleich mit über 200 anderen Aquaporinen zeigte, dass anstatt eines sonst hochkonservierten Prolins in DdAQP2 ein Aspartat (D275) vorkommt. DdAQP2 besitzt allerdings auch zwei klassische NPA-Motive (Position 106-108 und 251-253) und das für Aquaporine hochkonservierte Arginin (R254) nach dem zweiten NPA-Motiv.

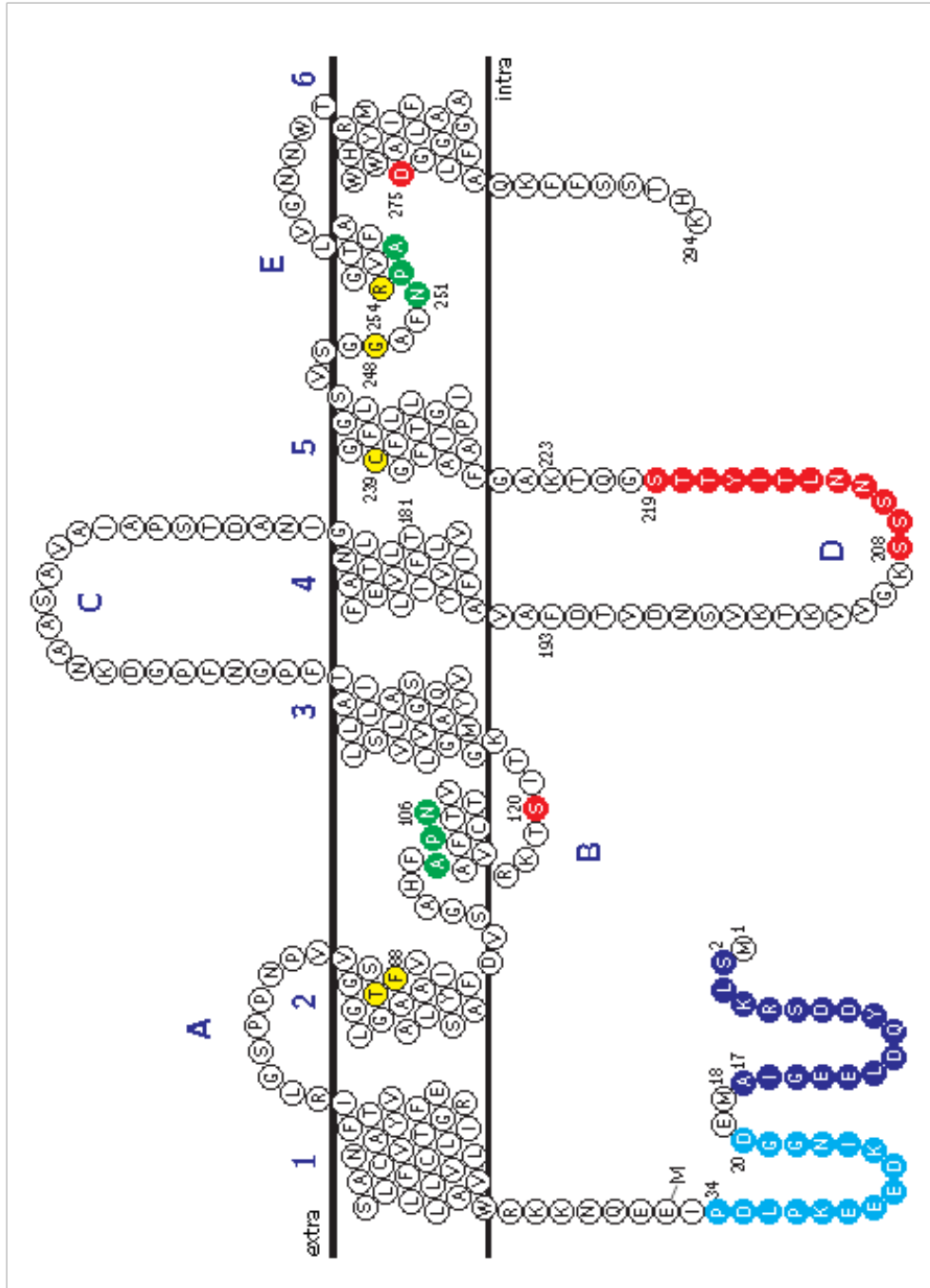


Abbildung 4.2: Topologie-Vorhersage von DdAQP2. Der N-Terminus sowie der C-Terminus des Proteins liegen intrazellulär. Grüne Kreise kennzeichnen die hochkonservierten NPA-Regionen: N106-108 und N251-253. Die gelben Kreise kennzeichnen die Aminosäuren, die vermutlich die aromatischen/Arginin-Region (T86/F88, C239, G248, R254) bilden. Gegen die beiden N-terminalen Peptide (blaue Kreise) von Position 2-17 sowie von Position 20-34 wurden polyklonale Antikörper hergestellt. Diese Grafik wurde mit dem TeXtopo Softwarepaket [73] erstellt.

4.1.3 Vergleich der aromatischen/Arginin-Region (ar/R) von DdAQP2 mit der von hAQP1

Der Durchmesser der ar/R-Region, der engsten Stelle der Pore, liegt für wasserspezifische Aquaporine bei 0,28 nm, was gerade der Größe eines Wassermoleküls entspricht [20]. Der Vergleich der putativen ar/R-Region von DdAQP2 mit der Kristallstruktur von hAQP1 ist in Abb. 4.3 dargestellt. Das hochkonservierte Arginin in der ar/R-Region ist auch im DdAQP2 zu finden, wohingegen die drei anderen Aminosäuren sich vermutlich unterscheiden. Aminosäure-Sequenzvergleiche ergeben, dass das C189 des hAQP1, welches mit seinem Carbonylsauerstoff zur Porenregion beiträgt, durch ein G248 ersetzt ist. Statt des geladenen H180 erscheint ein kleines, ungeladenes C239 im DdAQP2. Bei der Position des F56 im hAQP1 geben die Aminosäure-Sequenzvergleiche keine eindeutigen Ergebnisse: Es könnte sowohl ein hydrophobes F88 als auch ein polares Threonin T86 vorkommen.

Mit den C239 und dem G248 bilden eher kleine, ungeladene Aminosäuren die ar/R-Region von DdAQP2. So spricht die Analyse der Porenregion eher für das Vorliegen eines Aquaglyceroporins. Dies steht im Gegensatz zum Ergebnis des Vergleichs der gesamten Aminosäure-Sequenzen, bei denen DdAQP2 eine auffallend große Ähnlichkeit zu wasserspezifischen Aquaporinen zeigt.

Letztlich kann nur die funktionelle Charakterisierung von DdAQP2 dessen Permeabilitätseigenschaften eindeutig zeigen.

4.1.4 Amplifikation von *DdAQP2* aus cDNA

Um herauszufinden, ob das *DdAQP2*-Gen im Amöbenstadium exprimiert wird, wurde cDNA aus *Dictyostelium*-Amöben gewonnen. Dafür wurde zunächst Gesamt-RNA gewonnen (s. 3.1.19) und dann die mRNA mittels einer reversen Transkriptase in cDNA transkribiert (s. 3.1.20). Für die cDNA-Synthese wurden Oligo(dT)₁₈- bzw. Zufallshexamer-Primer verwendet. Beide Ansätze ergaben ein breites Spektrum an Signalen zwischen 800 und 3000 bp auf einem Agarosegel. Mit sequenzspezifischen Primern erfolgte die Amplifikation von *DdAQP2* aus der cDNA, wobei der gesamte theoretisch vorhergesagte offene Leserahmen von 885 bp erhalten wurde (s. Abb. 4.4). Das PCR-Produkt wurde *blunt end* in *EcoR* V-geschnittenen pBluescript Vektor ligiert und sequenziert (s. 3.1.15). Die Sequenzanalyse ergab eine Übereinstimmung mit der theoretisch vorhergesagten Sequenz von *DdAQP2*.

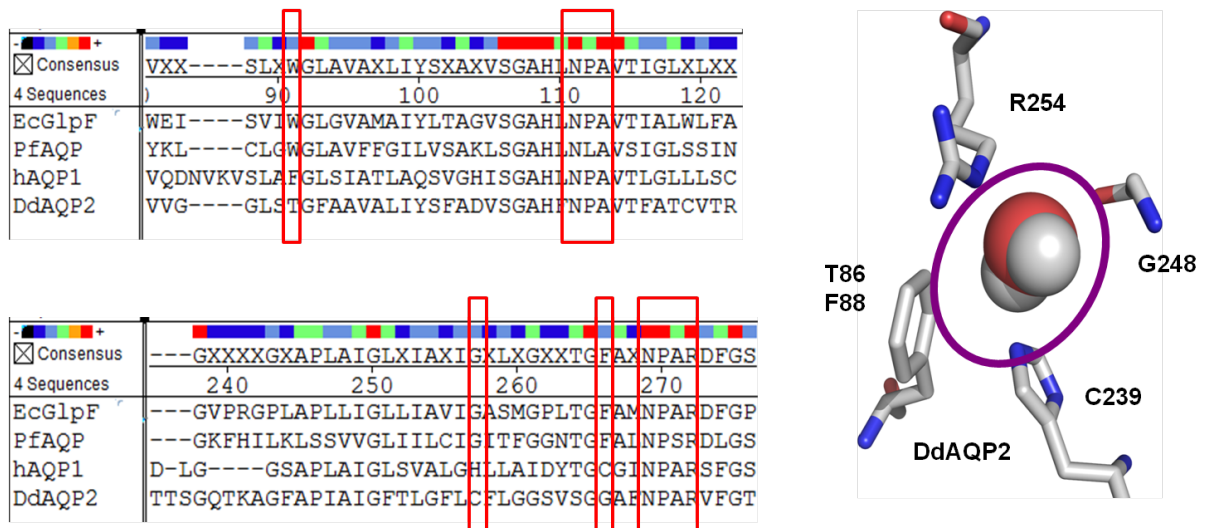


Abbildung 4.3: Aminosäure-Sequenzvergleich von DdAQP2 mit anderen Aquaporinen (links) und putative ar/R-Region von DdAQP2 (rechts). Links: Aminosäure-Sequenzvergleich von DdAQP2 mit dem wasserspezifischen hAQP1 sowie den Aquaglyceroporinen GlpF aus *E. coli* und PfAQP aus *Plasmodium falciparum*. Umrandet sind die beiden NPA-Motive sowie die vermutlich die Pore bildenden Aminosäuren. Rechts: Durch Sequenzvergleiche abgeleitete putative ar/R-Region von DdAQP2. Zum Vergleich sind die Aminosäuren der ar/R-Region von hAQP1 eingezeichnet.

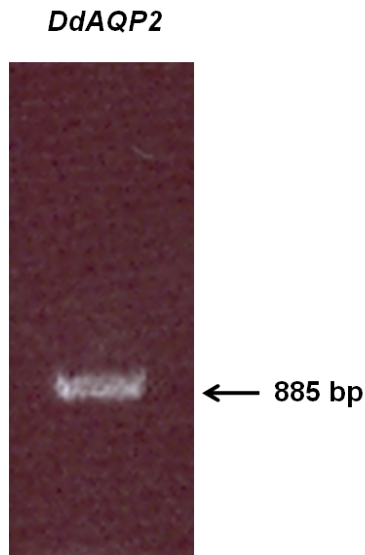


Abbildung 4.4: Agarosegel-Elektrophorese des PCR-Produktes für *DdAQP2*-DNA. Der ORF (885 bp) entspricht der theoretisch vorhergesagten Größe.

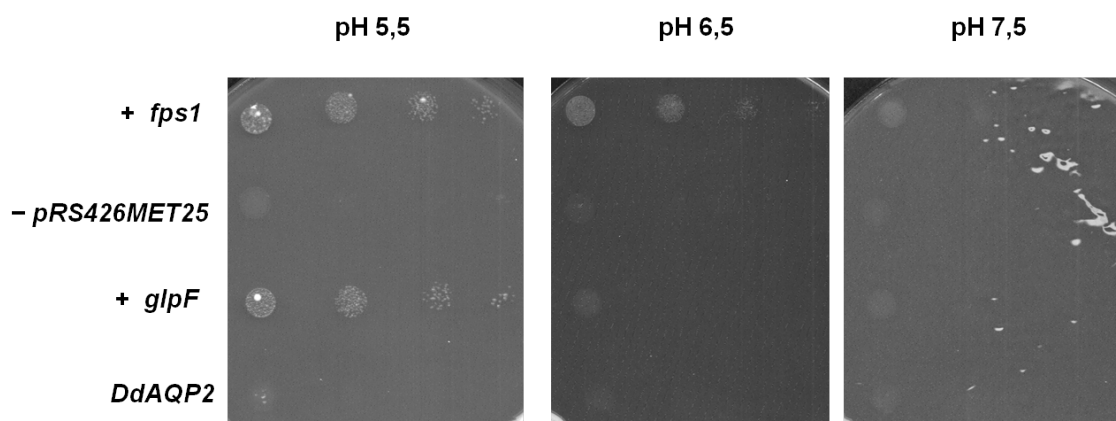


Abbildung 4.5: *DdAQP2* im Hefestamm BY4742 Δ *fps1* sowie mit Leerplasmid (Negativkontrolle) bzw. mit *fps1* sowie *glpF* (Positivkontrolle) transformierte Zellen wurden auf Agarplatten pH 5,5/6,5/7,5 mit 50 mM Methylamin/Methylammonium in 1:10 Verdünnungsreihen pipettiert. Die Agarplatten wurden nach 5 d Inkubation ausgewertet.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von *DdAQP2*

Nachdem die für *DdAQP2* kodierende DNA vorlag, wurde mit der funktionellen Charakterisierung dieses neuen putativen Aquaporins begonnen.

4.2.1 Expression von *DdAQP2* in *S. cerevisiae*

Zunächst wurde *DdAQP2* in Hefe exprimiert (s. 3.7.1 und 3.1.21).

In einem Methylamin-Efflux-Assay (s. 3.2.1) wurde auf mögliche Methylaminleitfähigkeit getestet. Die Zellen wachsen in diesem Assay nur, wenn sie z.B. durch ein heterolog exprimiertes Aquaporin das toxische Methylamin ausschleusen können (s. Abb. 4.5). Als Positivkontrolle diente eine mit *fps1* transformierte Hefe des Stammes BY4742 Δ *fps1*. Der vom Zytosol (pH 7,2) nach außen gerichtete Methylamingradient ist umso größer, je saurer das Medium ist. Bei pH 5,5 und 6,5 ist für die Positivkontrolle ein deutliches Wachstum in allen Verdünnungen erkennbar, bei pH 7,5 nur noch sehr schwach. Als zweite Positivkontrolle wurde eine mit dem Aquaglyceroporin *glpF* aus *E. coli* transformierte Hefe eingesetzt. Ein deutliches Wachstum ist bei pH 5,5 zu verzeichnen. Die mit Leerplasmid (pRS426MET25) transformierten Hefen zeigten bei keinem pH Überlebensfähigkeit. Auch die mit *DdAQP2* transformierte Hefe zeigte bei keinem pH Wachstum und deutet auf fehlende Methylaminleitfähigkeit hin.

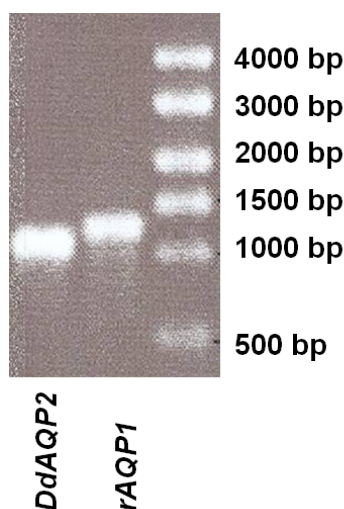


Abbildung 4.6: Qualitätskontrolle der cRNA auf einem denaturierenden Agarosegel. Pro Spur wurden 500 ng cRNA kodierend für DdAQP2 bzw. AQP1 der Ratte (*rAQP1*) aufgetragen. Als Größenstandard diente RNA-Marker (rechte Spur).

4.2.2 Charakterisierung von DdAQP2-Wildtyp in *X. laevis*

Oocyten

Ein klassischer Assay zur Messung der Wasser- und Solutpermeabilität von Aquaporinen ist der Oocyten-Schwelltest im entsprechenden osmotischen bzw. chemischen Gradienten [74] (s. 3.3.4). Dazu wurden die Oocyten des afrikanischen Krallenfrosches mit cRNA, die für DdAQP2 kodiert, injiziert und nach 3-4 d analysiert. Da Oocyten interindividuellen Schwankungen unterliegen, wurden pro Versuch mindestens sechs Oocyten vermessen. Um die Expression in Oocyten mittels Western Blot kontrollieren zu können, wurde bei der Klonierung 5' die für einen N-terminalen HA-*tag* kodierende DNA-Sequenz eingefügt.

Im Gegensatz zur Hefetransformation, wo Plasmid-DNA eingesetzt wurde, wurde für die Oocyten-Schwelltests *in vitro* hergestellte cRNA verwendet (s. 3.3.1). Die Qualität der cRNA wurde auf einem denaturierenden Agarosegel überprüft (s. 3.1.1 und Abb. 4.6).

Expressionskontrolle von DdAQP2-Wildtyp in *Xenopus laevis* Oocyten

Die Total-Membranproteinfraktion wurde aus Oocyten gewonnen (s. 3.3.5) und mittels SDS-Gelelektrophorese (s. 3.2.3) aufgetrennt. Nach Elektrobplot (s. 3.2.6) wurde DdAQP2

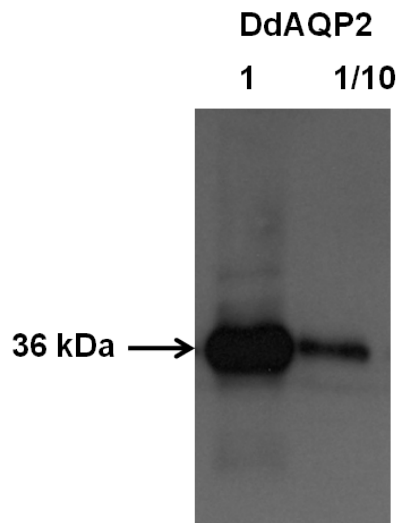


Abbildung 4.7: Western Blot der Oocyten Total-Membranproteinfraktion von DdAQP2 mit HA-tag. Pro Spur wurde die 1 bzw. 1/10 Oocyte (rechts) entsprechende Proteinmenge aufgetragen. Der α HA-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in M-TBS-T eingesetzt. Es wurde eine Bande bei 36 kDa detektiert.

indirekt über einen N-terminalen HA-tag nachgewiesen.

Abb. 4.7 zeigt den entsprechenden Western Blot.

Das Signal bei 36 kDa entspricht der theoretisch errechneten Proteinmasse des DdAQP2 mit HA-tag. Oocyten exprimieren folglich das *D. discoideum* Aquaporin-Gen *DdAQP2*.

Wasserpermeabilität von DdAQP2-Wildtyp

Die Oocyten wurden in 1:3 verdünnten ND96-Puffer überführt. Dies führte zu einem einwärts gerichteten osmotischen Gradienten von $140 \text{ mosm} \cdot \text{kg}^{-1}$. Die relative Volumenzunahme der Oocyten wurde mit einer Videokamera registriert. Abb. 4.8 zeigt die Schwellkurven von DdAQP2, *r*AQP1 und ND96-injizierten Oocyten nach 3 d Inkubation.

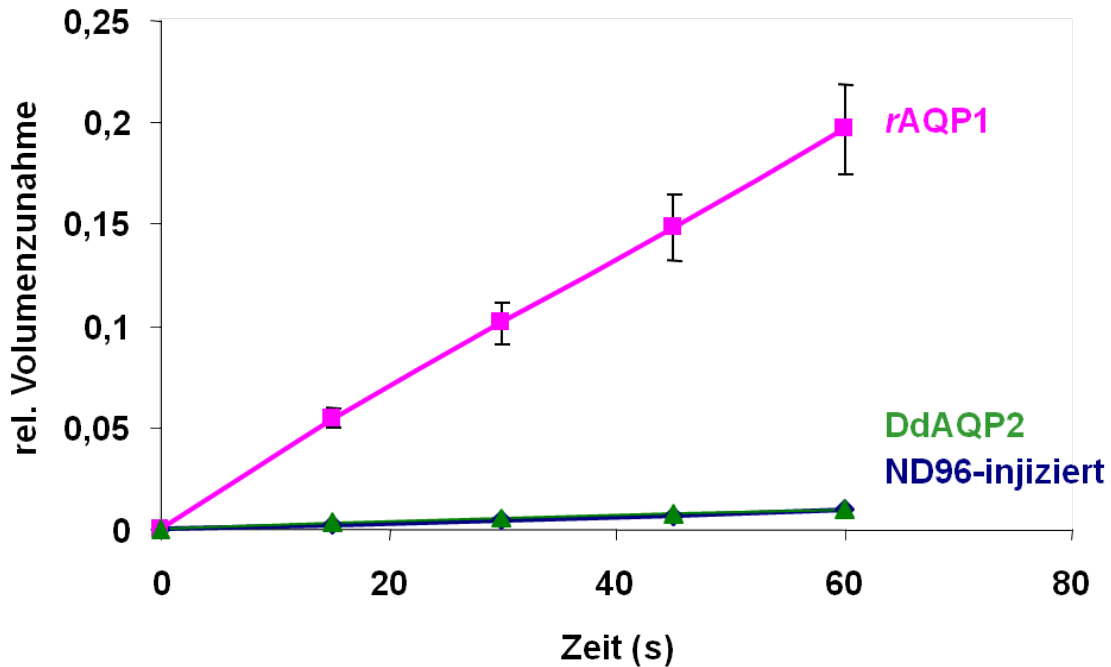


Abbildung 4.8: Schwellkurven erhalten aus dem Ooyten-Schwelltest zur Bestimmung der osmotischen Wasserpermeabilität. Aufgetragen ist die relative Volumenänderung in Abhängigkeit von der Zeit. Die Oocyten waren mit cRNA, die für DdAQP2 bzw. *rAQP1* (Positivkontrolle) kodiert oder mit ND96-Puffer (Negativkontrolle) injiziert. Die Messung erfolgte in 1:3 verdünntem ND96-Puffer. Die Standardfehler der Mittelwerte sind angegeben. $n = 7-10$.

Die relative Volumenzunahme betrug nach 60 s bei *rAQP1* 20%, bei DdAQP2 sowie den ND96-injizierten Oocyten etwa 1%.

Für die Berechnung des Wasser-Permeabilitätskoeffizienten (P_f -Wert) (s. 3.5) wurden die Werte nach 15 s verwendet (s. Abb. 4.9) und ergaben $289 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (*rAQP1*), $15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (DdAQP2) bzw. $11 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (ND96-injizierte Oocyten).

Von Pflanzen-Aquaporinen [24] sowie von *hAQP6* [26] ist bekannt, dass ihre Wasserleitfähigkeit sich in Abhängigkeit vom pH-Wert ändert. Eine Änderung des äußeren pH-Wertes auf pH 5,2 hatte jedoch keinen Einfluss auf die Wasserleitfähigkeit von DdAQP2 ($P_f = 14 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) (s. Abb. 4.9).

Um auszuschließen, dass der N-terminale HA-tag einen Einfluss auf die Wasserleitfähigkeit hat, wurde DdAQP2 ohne HA-tag in Oocyten getestet. Die Entfernung des

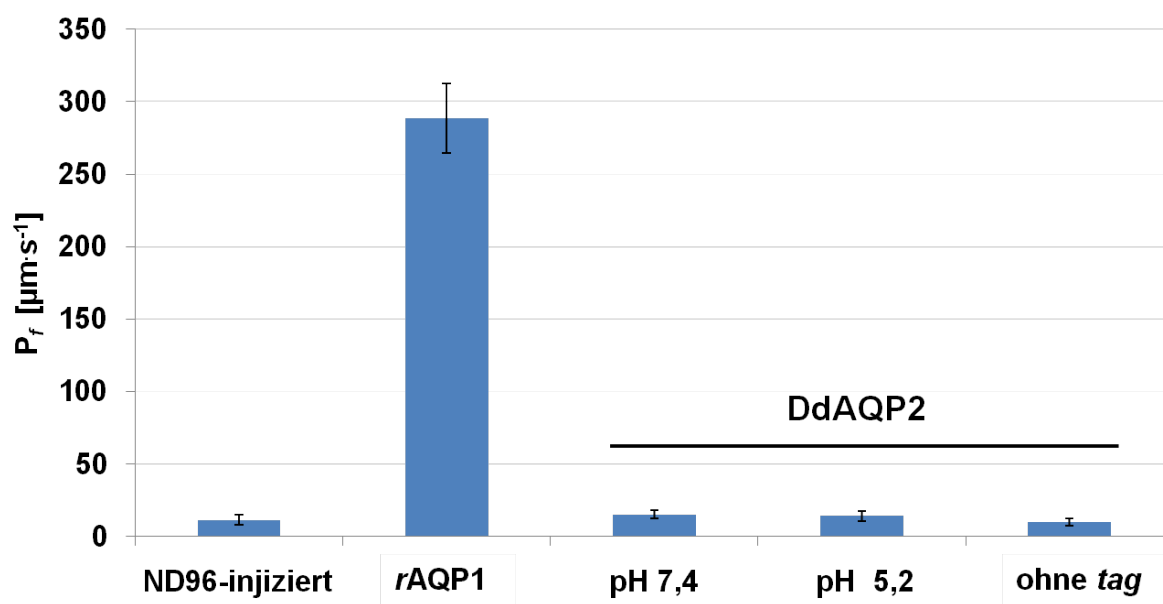


Abbildung 4.9: Osmotische Wasserpermeabilität. Die P_f -Werte wurden aus den Schwellraten nach 15 s berechnet. Die Standardfehler der Mittelwerte sind angegeben. $n = 7-10$.

tags konnte die Wasserleitfähigkeit des DdAQP2 nicht verbessern ($P_f = 10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) (s. Abb. 4.9).

Harnstoff- und Glycerolpermeabilität von DdAQP2-Wildtyp

Auf Permeabilität für Harnstoff und Glycerol wurde im einwärts gerichteten Solutgradienten von $130 \text{ mosm}\cdot\text{kg}^{-1}$ geprüft. Dazu wurden 65 mM NaCl des ND96-Puffers durch 130 mM Harnstoff- bzw. Glycerol isoton ersetzt. Die Solute dringen dem chemischen Gradienten folgend in die Oocyte ein. Aufgrund des entstehenden osmotischen Gradienten kommt es zu einem sekundären Wassereinstrom und damit zu einer Volumenänderung. Als Positivkontrolle für die Glycerol- und Harnstoffleitfähigkeit diente das bifunktionelle Aquaglyceroporin PfAQP aus *Plasmodium falciparum* [74].

Aus der Oocyten-Schwellrate wurden die Solut-Permeabilitätskoeffizienten (P_{sol} -Wert) berechnet (s. 3.6). Die isoosmolare Solutpermeabilität lag für PfAQP bei $0,35 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Harnstoff) bzw. $0,77 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Glycerol), mit DdAQP2 konnte keine Harnstoff- bzw. Glycerolleitfähigkeit festgestellt werden (s. Abb. 4.10).

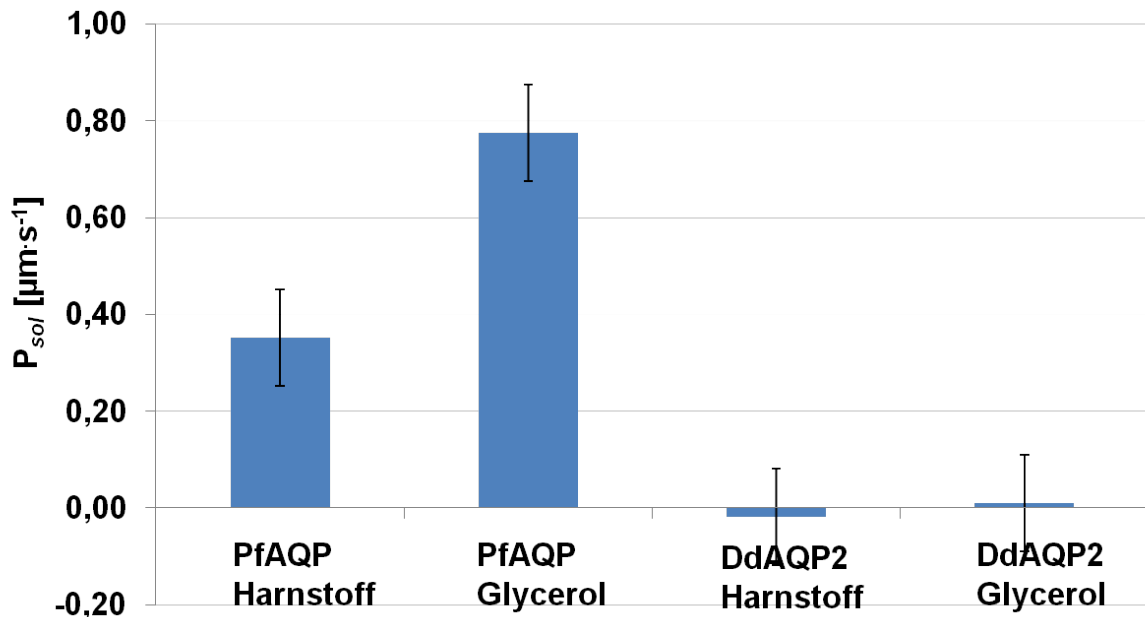


Abbildung 4.10: Isoosmolare Harnstoff- und Glycerolpermeabilität. Die P_{sol} -Werte wurden aus den Schwellraten nach 15 s berechnet. Die Standardfehler der Mittelwerte sind angegeben. $n = 3-8$.

4.2.3 Charakterisierung von DdAQP2-Mutanten in *X. laevis* Oocyten

Wie in Abb. 4.7 gezeigt, lässt sich DdAQP2 in Oocyten zwar exprimieren, leitet aber weder Wasser noch Solute (s. Abb. 4.10). Schon zu Beginn der Arbeit wurden nach theoretischen Analysen einige Auffälligkeiten in der Struktur von DdAQP2 offensichtlich (s. 4.1.2). Um zu überprüfen, ob diese strukturellen Besonderheiten einen Einfluss auf die Funktion von DdAQP2 haben, wurden die in Tabelle 4.1 aufgelisteten acht DdAQP2-Mutanten hergestellt, mittels Sequenzierung überprüft (s. 3.1.15) und in Oocyten-Schwelltests analysiert.

Herstellung der Mutanten

Zur Erstellung der Mutanten kamen verschiedene Techniken zum Einsatz (s. 3.7.1): Zur Einführung des künstlichen Proteinstarts (M35) zur Verkürzung des N-Terminus auf die Länge des N-Terminus von *rAQP1* und zur Verkürzung des N-Terminus um die Aminosäuren 1-17 (M18) wurden mit entsprechend modifizierten Primern PCRs durchgeführt (s. 3.1.16). Die Erzeugung der S120D und S120A Mutanten zur Vortäuschung

Tabelle 4.1: Tabellarische Übersicht über ungewöhnliche Topologieabschnitte von DdAQP2 und die hergestellten Mutanten

Topologie	Mutation	Name
langer Terminus	N- Verkürzung des N-Terminus durch Einführung eines künstlichen Proteinstartes an Position 35 auf die Länge des N-Terminus von <i>rAQP1</i> (= 8 Aminosäuren)	M35
zwei potentielle Proteinstarts im selben ORF	Verkürzung des N-Terminus um die Aminosäuren 1-17	M18
potentielle PKA-Phosphorylierungsstelle	Mimikry einer permanent phosphorylierten Form durch Mutation des Serin an Position 120 zu Aspartat bzw. einer permanent dephosphorylierten Form durch Mutation zu Alanin	S120D und S120A
außergewöhnlich lange intrazelluläre Verbindungsschleife D	Ersetzen der Schleife D durch die Schleife D eines anderen Schleimpilz-Aquaporins (<i>AqpA</i>) sowie Verkürzung der Schleife um zwölf Aminosäuren	<i>loopDswap</i> und $\Delta 208-219$
ungewöhnliches Aspartat an Position 275	Mutation des Aspartat 275 zu Prolin bzw. zu Alanin	D275P und D275A

bzw. Unterbindung einer Phosphorylierung sowie der Austausch des ungewöhnlichen D275 nach Prolin und Alanin erfolgte mittels *in vitro* Mutagenese (s. 3.1.17). Zur Verkürzung der Schleife D um zwölf Aminosäuren sowie zum Austausch gegen die Schleife D von *Dictyostelium AqpA* wurde im Rahmen dieser Arbeit die Technik der Fusions-PCRs im Arbeitskreis etabliert (s. 3.7.2).

Expressionskontrolle von DdAQP2-Mutanten in *Xenopus laevis* Oocyten

Abb. 4.11 zeigt den Western Blot der Oocyten Total-Membranproteinfraktion von DdAQP2-Mutanten.

Alle DdAQP2-Mutanten werden in Oocyten exprimiert. Die Molekulargewichte entsprechen den theoretisch errechneten: M18 erzeugt eine Bande bei 34 kDa, M35 eine bei 32 kDa. Für alle anderen Konstrukte werden zwei Banden detektiert (29 und 36 kDa). 36 kDa entsprechen DdAQP2 ab dem 1. Methionin mit *tag*, 29 kDa DdAQP2 ab dem

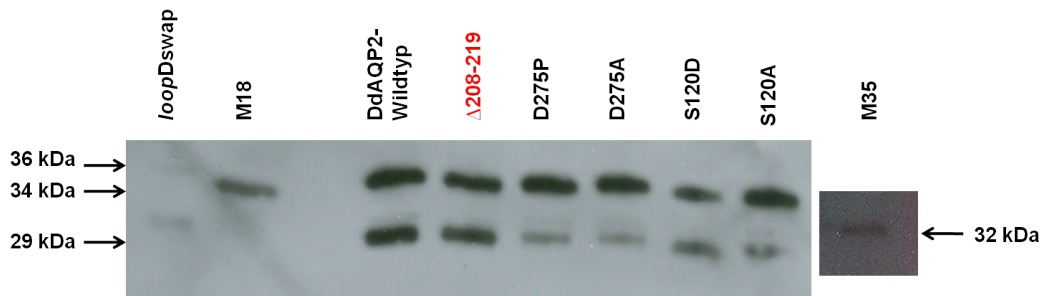


Abbildung 4.11: Western Blot der Oocyten-Membranproteinfraktion von DdAQP2-Mutanten mit HA-tag. Pro Spur wurde die einer Oocyte entsprechende Proteinmenge aufgetragen. Der α -N20-34-Antikörper (s. 4.3.1) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in M-TBS-T eingesetzt.

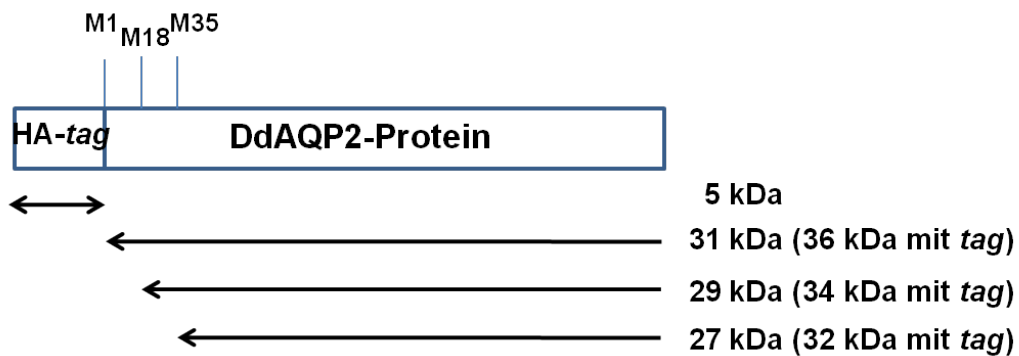


Abbildung 4.12: Schema der Proteingrößen von DdAQP2-Mutanten.

2. Methionin (s. Abb. 4.12). In Oocyten werden folglich beide möglichen Proteinstarts verwendet.

Wasserpermeabilität der DdAQP2-Mutanten

Die Wasserpermeabilität der DdAQP2-Mutanten wurde in Oocyten-Schwelltests ermittelt (s. 3.3.4). Abb. 4.13 zeigt die Schwellkurven der DdAQP2-Mutanten im Vergleich zu *rAQP1* und ND96-injizierten Oocyten nach 3 d.

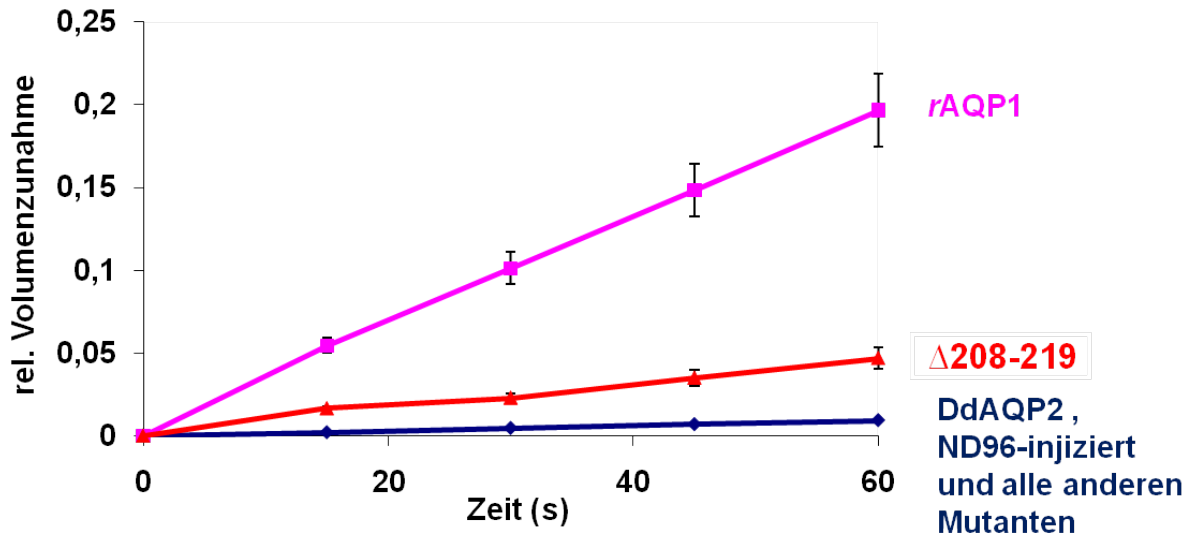


Abbildung 4.13: Oocyten-Schwelltest zur Bestimmung der osmotischen Wasserpermeabilität der DdAQP2-Mutanten. Aufgetragen ist die relative Volumenänderung in Abhängigkeit von der Zeit. Die Oocyten wurden mit cRNA, die für die hergestellten DdAQP2-Mutanten bzw. *rAQP1* (Positivkontrolle) kodiert oder mit ND96-Puffer (Negativkontrolle) injiziert. Die Messung erfolgte in 1:3 verdünntem ND96-Puffer. Die Standardfehler der Mittelwerte sind angegeben. $n = 7-9$.

Nur die DdAQP2-Mutante $\Delta 208-219$ führte zu einer fünffach erhöhten Schwellrate verglichen mit den Kontroll-oocyten (5% Volumenzunahme nach 60 s). Die Schwellrate betrug aber nur 1/5 der des *rAQP1*. Dies entspricht einem P_f -Wert von $61 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (s. Abb. 4.14). Alle übrigen Mutanten zeigten keine Wasserleitfähigkeit.

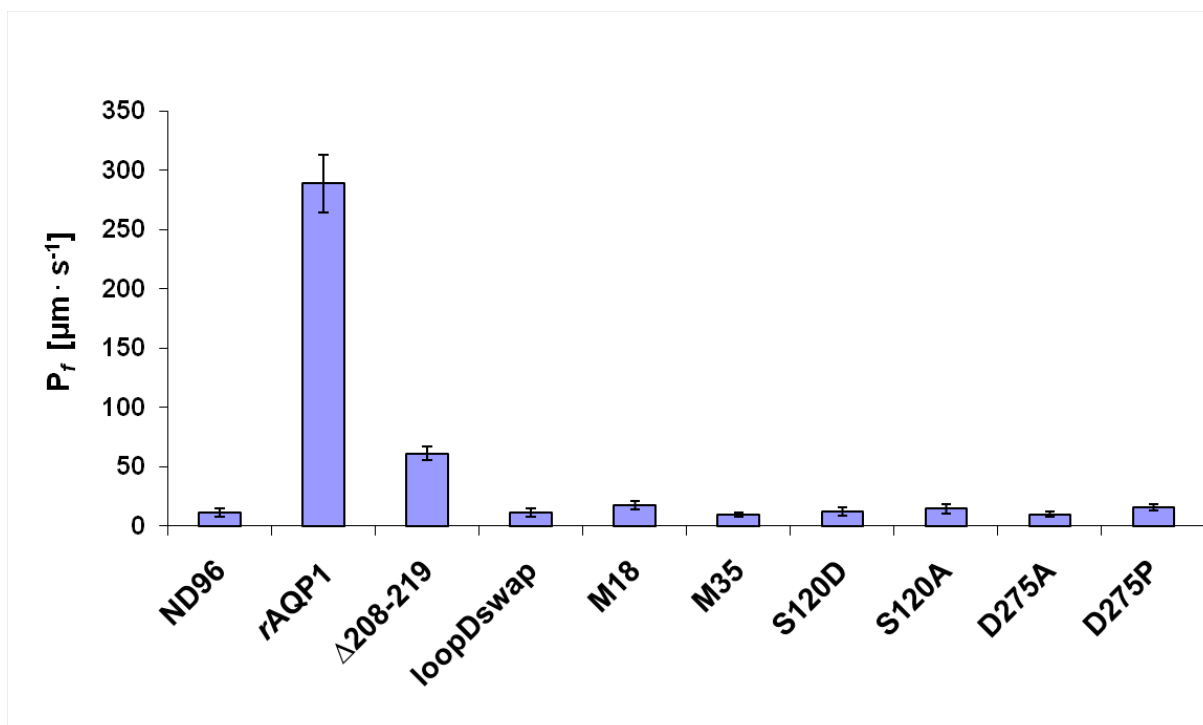


Abbildung 4.14: Osmotische Wasserpermeabilität. Die P_f -Werte wurden aus den Schwellraten nach 15 s berechnet (s. Abb. 4.13). Die Standardfehler der Mittelwerte sind angegeben. $n = 7-9$.

4.2.4 Dynamische Lichtstreuungsmessung zur Wasserleitfähigkeit von DdAQP2 $\Delta 208-219$

Die Arbeiten zur dynamischen Lichtstreuungsmessung wurden in Kooperation mit Frank Bernhard (Universität Frankfurt) durchgeführt. Ziel war es, die Funktion der im Oocyten-Schwelltest aktiven DdAQP2 Mutante ($\Delta 208-219$) in einem zweiten Expressionssystem zu testen. Dazu wurde DdAQP2 mittels zellfreier Synthese hergestellt [75]. Nach Rekonstitution in Liposomen [76] wurden diese in einer Stopped Flow-Apparatur vermessen. Abbildung 4.15 zeigt das Ergebnis der dynamischen Lichtstreuungsmessung.

Die Kurve von DdAQP2 $\Delta 208-219$ zeigt eine fünffache Steigerung der Wasserpermeabilität im Vergleich zu leeren Liposomen. Das Ergebnis der dynamischen Lichtstreuungsmessung bestätigt das in Oocyten-Schwelltests ermittelte Ergebnis (s. Abb. 4.13) und damit die Aktivität der Mutante.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass DdAQP2 ein aktiver Wasser-

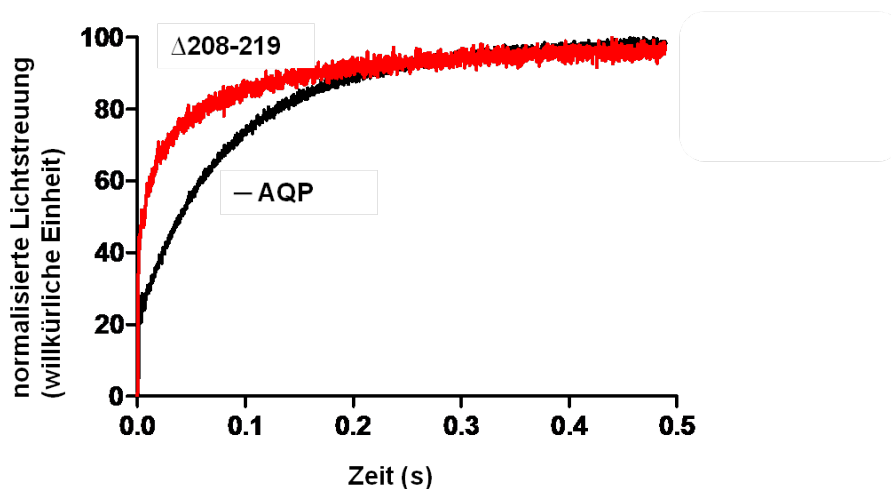


Abbildung 4.15: Dynamische Lichtstreuung von Liposomen mit DdAQP2 Δ 208-219 im Vergleich zu leeren Liposomen (– AQP). Die Wasser-Transportaktivität wurde in einem 200 mM hypertonen Saccharosegradienten in einer Stopped Flow-Apparatur vermessen.

kanal sein kann. Im Folgenden wurde DdAQP2 in *Dictyostelium*- Amöben *in vivo* untersucht.

4.3 Charakterisierung von DdAQP2 in *D. discoideum*-Amöben

4.3.1 Herstellung von affinitätsgereinigten Antikörpern (α N20-34 und α N2-17)

Um DdAQP2 zukünftig in Blots direkt detektieren zu können (ohne auf einen *tag* angewiesen zu sein) und um herauszufinden, welches der beiden potentiellen Startmethionine in *D. discoideum* verwendet wird, wurde die Herstellung zweier polyklonaler Antikörperseren in Auftrag gegeben (s. 3.2.4). Ein Immunisierungspeptid, gekoppelt an ein Trägerprotein, wurde in zwei Kaninchen bzw. in eine Ziege injiziert und so Antikörperseren (gerichtet gegen die Aminosäuren 20-34 bzw. 2-17 des N-Terminus) generiert. Im Folgenden sind die Daten der Aufreinigung des Antikörpers α N20-34 gezeigt. Der Antikörper α N2-17 wurde analog aufgereinigt (Daten nicht gezeigt).

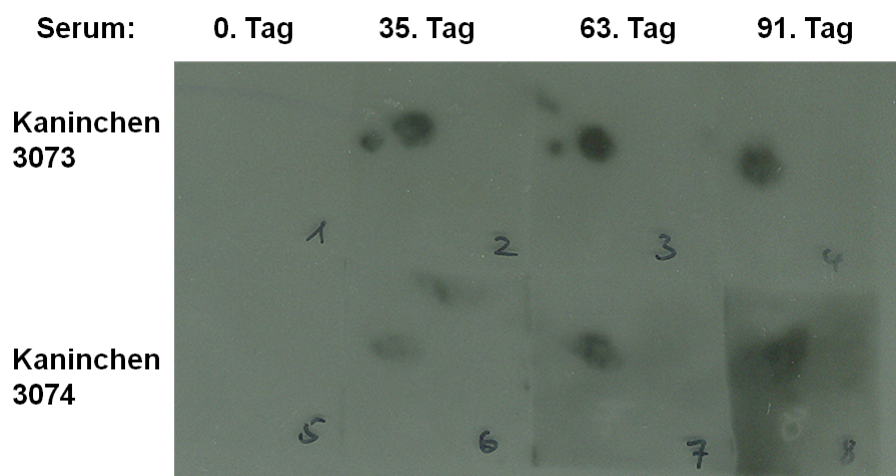


Abbildung 4.16: Kontrolle der gelieferten Seren im Dot Blot. Es wurde je Auftragspunkt 1 µg Immunisationspeptid aufgebracht. Die Seren (gewonnen am 0. bzw. 35., 63. und 91. Tag nach der Immunisierung) wurden in einer Verdünnung von 1:500 in M-TBS-T als Primärantikörper eingesetzt.

Zunächst wurden die acht gelieferten Seren (vier pro Kaninchen) getestet, ob sie Antikörper gegen das Immunisationspeptid enthalten. Dazu wurden mit allen Antikörperseren Dot Blots angefertigt (s. 3.2.6 und Abb. 4.16).

Unter Verwendung der Seren vom 0. Tag konnte kein Signal detektiert werden. Das Präimmunserum enthält also keine Antikörper gegen das Immunisationspeptid. Da kein Signal detektiert werden konnte, konnte auch eine direkte Immunreaktion des Sekundärantikörpers mit dem Immunisationspeptid ausgeschlossen werden. Alle anderen Seren enthalten Antikörper gegen das Immunisationspeptid. Im Folgenden wurde nur mit den Seren aus Kaninchen 3073 weitergearbeitet, da sie im Dot Blot ein intensiveres Signal erzeugten als die des Kaninchens 3074.

Als nächstes wurde getestet, ob und wie spezifisch die Seren DdAQP2 in Oocyten erkennen (s. Abb. 4.17).

Es wurden drei Banden im Western Blot detektiert (29, 36 und 80 kDa). Die 80 kDa Bande wurde auch vom Präimmunserum - das im Dot Blot (s. Abb. 4.16) keine Bindung an das Immunisationspeptid gezeigt hatte - erzeugt. Die Bande bei 80 kDa erscheint ebenso bei den mit ND96-Puffer injizierten Oocyten. Sie ist folglich unspezifisch.

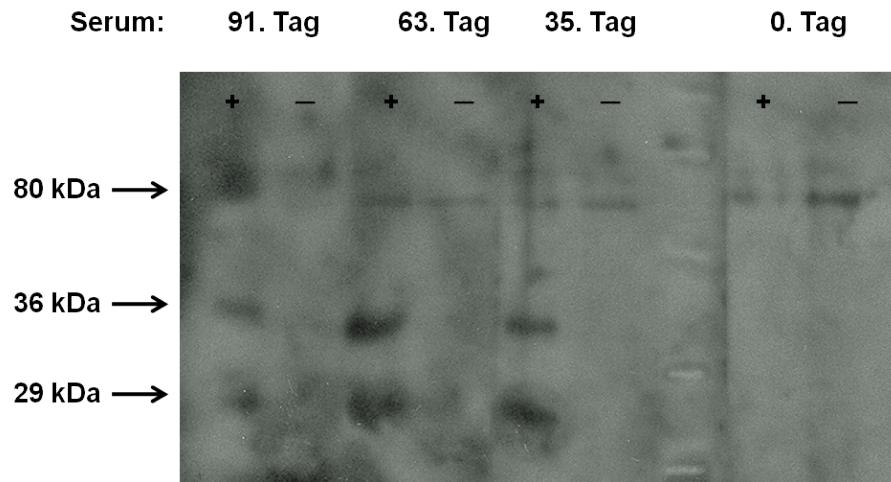


Abbildung 4.17: Western Blot, detektiert mit den vier Seren aus Kaninchen 3073. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:500 in M-TBS-T eingesetzt. Es wurde alternierend Membranproteinfraktion von DdAQP2 exprimierenden Oocyten (+) und von ND96-Puffer injizierten Oocyten (-) in einer Verdünnung 1:10 auf ein SDS-PAGE aufgetragen und ein Western Blot gemacht (s. 3.2.3 und 3.2.6.)

Affinitätschromatographische Aufreinigung

Um die Spezifität des Serums zu erhöhen (auch im Hinblick auf eine spätere Detektion von DdAQP2 in *Dictyostelium*-Zellen), wurde es mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (s. 3.2.5). Aufgrund der intensiven Signale des Serums vom 63. Tag (Kaninchen 3073) sowohl im Dot- als auch im Western Blot (s. Abb. 4.16 und Abb. 4.17) wurde dieses für die Aufreinigung ausgewählt.

Kopplung des Immunisierungspeptids an die Säule

Zunächst wurde das Immunisierungspeptid kovalent an die Affinitätschromatographiesäule gebunden. Mithilfe der Ninhydrinreaktion wurde ermittelt, wieviel Peptid dabei an die Säule gebunden hatte (s. 3.2.5). Der visuelle Vergleich der mit Ninhydrin umgesetzten Immunisierungspeptidlösung vor und nach Inkubation der Säule ergab eine deutlich stärkere Färbung der Ausgangslösung. Das Immunisierungspeptid wurde also zu einem großen Teil an die Säule gebunden. Es war nicht möglich, die Immunisierungspeptidlösungen photometrisch zu vermessen, da keine aromatischen Aminosäuren vorhanden sind.

Tabelle 4.2: Quantifizierung der Bindung des Antikörpers an das Immunisierungspeptid

Nr.	A_{280}
Ausgangslösung	0,309
Durchlaufösung 1	0,209
Durchlaufösung 2	0,216
Durchlaufösung 3	0,224
Durchlaufösung 4	0,268

Tabelle 4.3: Ermittlung der Elutionsfraktionen

Fraktion	A_{280}	Fraktion	A_{280}
1	0,158	6	0,085
2	0,636	7	0,054
3	0,577	8	0,047
4	0,280	9	0,031
5	0,148	10	0,028

Kopplung des Antikörpers an das Immunisierungspeptid

Die Bindung des Antikörpers an das Immunisierungspeptid wurde durch Messung der Absorption der Durchlaufösungen im Vergleich zur Ausgangslösung photometrisch bei 280 nm bestimmt (A_{280}) (s. Tab. 4.2).

Die Durchlaufösungen 1 bis 4 weisen eine geringere Absorption als die Ausgangslösung auf, es wurde also Protein an die Säule gebunden. Die Zunahme der Absorption von der ersten bis zur vierten Durchlaufösung zeigt, dass die Säule immer weniger Antikörper binden kann und die Kapazität der Bindungsstellen nahezu erschöpft ist. Deshalb wurde auf weitere Zugabe von Serum verzichtet. Um ungebundenes Serum zu entfernen wurde die Säule 30 mal mit PBS gewaschen bis die Absorption unter 0,005 lag.

Elution des Antikörpers von der Säule

Die Elution des Antikörpers erfolgte mittels pH-Sprung in zehn Fraktionen. Zur Untersuchung, mit welcher der zehn Fraktionen der Antikörper eluiert wurde, wurden diese photometrisch bei 280 nm vermessen:

Die Absorptionen der Fraktionen 2 mit $A_{280} = 0,636$ und 3 mit $A_{280} = 0,577$ sind mit Abstand am Größten (s. Tab. 4.3). Diese hohen Werte zeigen, dass in diesen Fraktionen

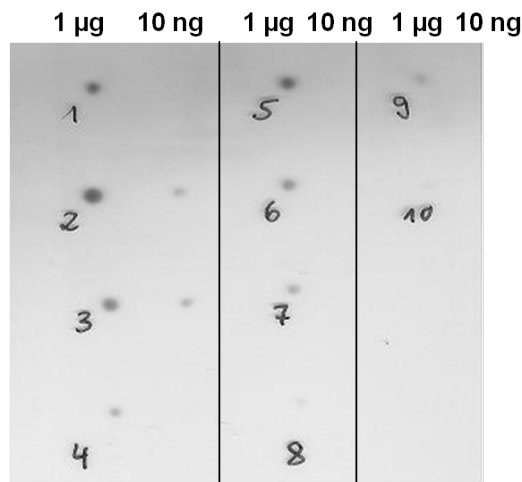


Abbildung 4.18: Dot Blot der Elutionsfraktionen 1 bis 10, pro Auftragspunkt wurden 1 µg bzw. 10 ng Immunisationspeptid aufgetragen. Die Antikörper Eluate wurden in einer Verdünnung von 1:2000 in M-TBS-T eingesetzt.

am meisten Protein enthalten ist.

Zur Kontrolle, ob die Eluatfraktionen mit der höchsten Absorption auch die beste Antigenerkennung haben, wurde ein Dot Blot durchgeführt. Es wurden je 10 ng bzw. 1 µg Immunisationspeptid aufgetragen und alle zehn Fraktionen getestet. In Abbildung 4.18 ist zu sehen, dass Fraktion 2, 3 und 5 gleichermaßen gute Antigenerkennung aufweisen. Sogar 10 ng Peptid werden noch erkannt. Aufgrund des hohen Proteingehaltes und der hohen Antigenerkennung wurden Fraktionen 2 und 3 vereinigt und gegen PBS dialysiert.

Testung des gereinigten Antikörpers

Um zu überprüfen, ob der Antikörper nach der Aufreinigung eine verbesserte Spezifität hat, wurden erneut Western Blots mit Oocytenmembranprotein angefertigt.

In Abbildung 4.19 erkennt man, dass die unspezifische oberste Bande bei 80 kDa nach der Aufreinigung des Antikörpers nicht mehr vorhanden ist. Der Antikörper detektiert nur noch die für DdAQP2 spezifischen Banden bei 29 und 36 kDa.

Um die Spezifität für die Peptidsequenzen zu überprüfen wurde ein Präblock durchgeführt (s. 3.2.6). Hierbei wurden die spezifischen Bindungsstellen des Antikörpers vor der Verwendung mit Immunisationspeptid abgesättigt. Es verschwinden auf dem Western Blot sowohl die 36 kDa als auch die 29 kDa Bande (s. Abb. 4.20).

Es steht somit erstmalig ein spezifischer Antikörper gegen DdAQP2 zur Verfügung.

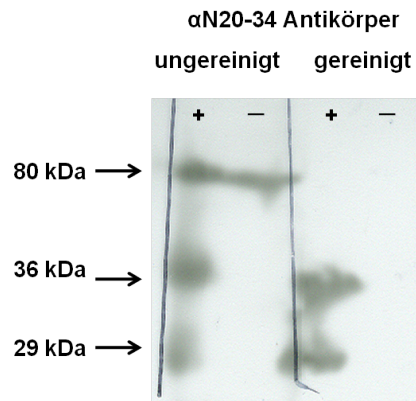


Abbildung 4.19: Western Blot zum Vergleich von unaufgereinigtem (links) und gereinigtem Antikörper (rechts), + = DdaQP2 exprimierende Oocyten, - = ND96 injizierte Oocyten; die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 in M-TBS-T eingesetzt.

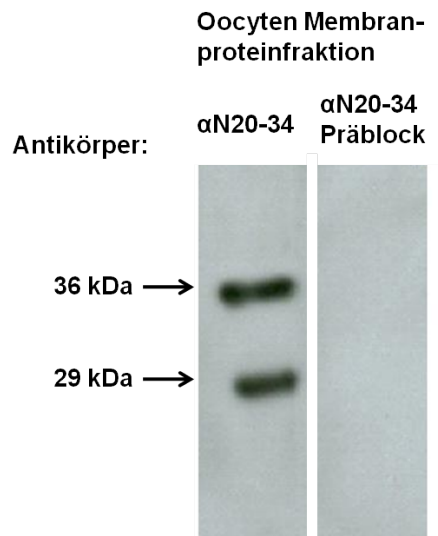


Abbildung 4.20: Präblock des Antikörpers mit einem Überschuss an Immunisationspeptid. Western Blot der Membranproteinfraction von DdaQP2 exprimierenden Oocyten. Es wurde die einer Oocyte entsprechende Proteinmenge aufgetragen. Der Antikörper α N20-34 wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in M-TBS-T eingesetzt. Links: unbehandelter Antikörper, rechts: Präblock.

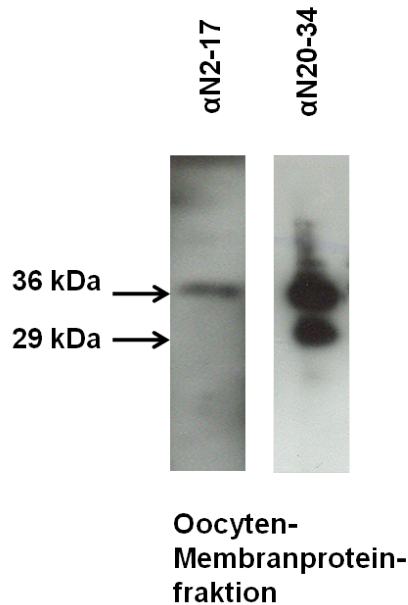


Abbildung 4.21: Western Blot zum Vergleich der Antikörper α N2-17 und α N20-34. Als Proteinproben wurden Oocyten, die DdAQP2 mit HA-tag exprimieren eingesetzt. Der Antikörper α N2-17 wurde in einer Verdünnung von 1:500 in M-TBS-T eingesetzt, der Antikörper α N20-34 in einer Verdünnung 1:1000 in M-TBS-T.

Vergleich der beiden Antikörper α N2-17 und α N20-34

In Western Blots wurden der Antikörper α N2-17 sowie der Antikörper α N20-34 zum Vergleich als Primärantikörper eingesetzt. Als Proteinproben wurden Oocyten, die DdAQP2 mit HA-tag exprimieren, eingesetzt. Abb. 4.21 zeigt den Western Blot.

Wie schon in Abb. 4.11 gezeigt werden konnte, werden in Oocyten beide möglichen Startmethionine verwendet. Der α N2-17 Antikörper kann nur die lange Form des Proteins erkennen (36 kDa), der α N20-34 Antikörper detektiert beide Produkte (29 und 36 kDa).

4.3.2 Nachweis von DdAQP2 in *D. discoideum*-Amöben

Mit dem spezifischen Antikörper α N20-34 wurde nun versucht, DdAQP2 in *Dictyostelium*-Amöben nachzuweisen. Dazu wurden *Dictyostelium*-Amöben kultiviert (s. 3.4), abzentrifugiert und mittels "freeze and thaw"-Methode aufgeschlossen (s. 3.4.7). Abb. 4.22 zeigt den entsprechenden Western Blot.

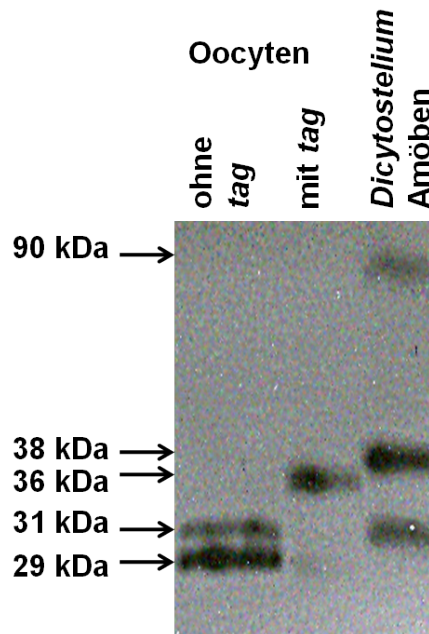


Abbildung 4.22: Western Blot der aufgeschlossenen *Dictyostelium*-Amöben. Zum Vergleich wurde die einer Oocyte entsprechende Proteinmenge von DdAQP2 ohne bzw. mit HA-tag aufgetragen. Der α N20-34-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in M-TBS-T eingesetzt.

Bei den *Dictyostelium*-Amöben erscheinen drei Banden im Western Blot: bei 31, 38 und 90 kDa. Die 31 kDa Bande erscheint auch, wenn DdAQP2 ohne tag in Oocyten nachgewiesen wird und entspricht der theoretischen Proteingröße von DdAQP2 ab dem ersten Startmethionin. *D. discoideum* exprimiert also das *DdAQP2*-Gen im Amöbenstadium und verwendet das erste Startcodon im ORF.

Präblock

Um zu überprüfen, ob auch alle drei mit *Dictyostelium*-Amöben erhaltenen Banden spezifisch sind, wurde erneut ein Präblock durchgeführt (s. 3.2.6). Es verschwinden auf dem Western Blot die 31 und 38 kDa Bande (s. Abb. 4.23). Die Bande bei 90 kDa bleibt erhalten. Letztere ist also unspezifisch.

Im Folgenden wurde versucht, die beiden Banden bei 31 und 38 kDa im Hinblick auf Sekundärmodifikationen zu charakterisieren.

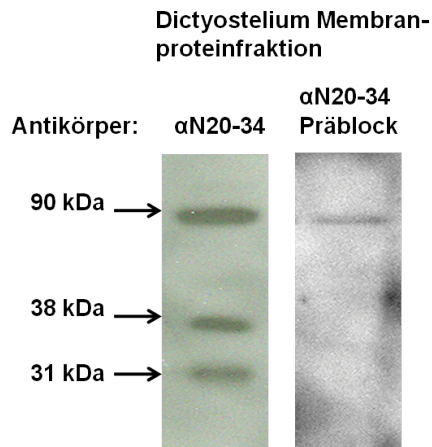


Abbildung 4.23: Präblock des Antikörpers mit einem Überschuss an Immunisationspeptid. Western Blot der Total-Membranproteinfraktion von *Dictyostelium*-Amöben. Es wurden 25 μ g Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Der Antikörper α N20-34 wurde in einer Konzentration von 1:1000 in M-TBS-T eingesetzt. Links: unbehandelter Antikörper, rechts: Präblock.

4.3.3 Untersuchung einer möglichen Glykosylierung von DdAQP2

Um zu überprüfen, ob die im Western Blot (s. Abb. 4.22) detektierte spezifische Bande bei 38 kDa glykosyliertem DdAQP2 entspricht, wurde die Total-Membranproteinfraktion von *Dictyostelium*-Zellen mit N-Glykosidase F behandelt (s. 3.2.7). Bei dieser enzymatischen Deglykosylierung werden nur N-Glykoside gespalten. Um auch O-Glykoside erkennen zu können, wurde alternativ eine chemische Deglykosylierung mit 1 M NaOH versucht. Abb. 4.24 zeigt den entsprechenden Western Blot.

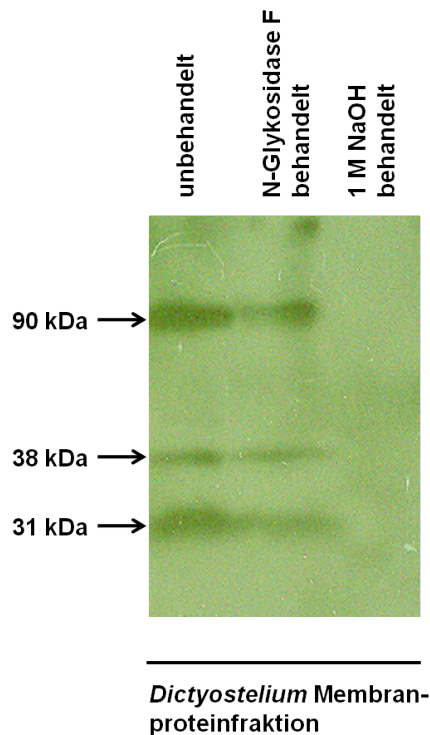


Abbildung 4.24: Western Blot von DdAQP2 nach N-Glykosidase F- und NaOH-Behandlung. Als Proteinproben wurde Total-Membranproteinfraktion aus *Dictyostelien* eingesetzt. Links: unbehandelte Zellen, Mitte: mit N-Glykosidase F behandelte; rechts: mit NaOH behandelte Zellen. Als Antikörper wurde α N20-34 in einer Verdünnung 1:1000 in M-TBS-T eingesetzt.

Es kommt durch Behandlung mit N-Glykosidase F nicht zu einem Banden-Schift. Die 38 kDa entsprechen folglich nicht N-glykosyliertem DdAQP2. Nach der Behandlung mit 1 M NaOH ist kein Protein mehr detektierbar. Das zeigt, dass die Reaktionsbedingungen weiter optimiert werden müssen, um eine Aussage über eine mögliche O-Glykosylierung treffen zu können.

In Kooperation mit Annika Müller-Lucks aus der Arbeitsgruppe wurde mittlerweile eine alternative chemische Deglykosylierung mit Trifluormethansulfonsäure durchgeführt. Im Western Blot verschwindet die 38 kDa Bande. DdAQP2 liegt folglich wahrscheinlich O-glykosyliert vor (Daten nicht gezeigt).

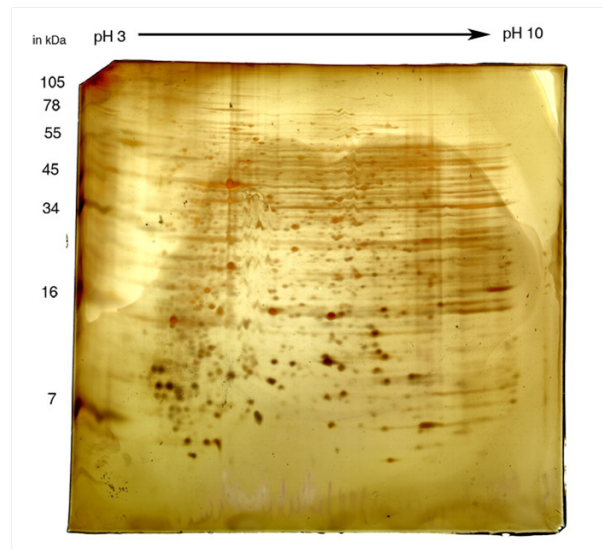


Abbildung 4.25: 2D-SDS-Gel von *Dictyostelium* Zellysat. Es wurden 500 μg Gesamtprotein aus Hanisch Extrakt aufgetragen. Auf der x-Achse ist der von links nach rechts steigende pH-Wert (3-10), auf der y-Achse das Molekulargewicht in kDa aufgetragen.

4.3.4 Untersuchung weiterer Sekundärmodifikationen von DdAQP2

Um den Proteinstart am ersten Methionin und die O-Glykosylierung zu bestätigen und um mögliche Phosphorylierungen erkennen zu können, wurde eine 2D-SDS-Gelelektrophorese mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse gemacht. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis um Prof. Leippe von Herrn Dr. Gelhaus und Herrn Bitzhenner durchgeführt. Als Proteinprobe wurde ein Hanisch-Extrakt verwendet [77]. Auf das Gel wurden 500 μg *D. discoideum* Gesamtprotein geladen. In der ersten Dimension erfolgte eine Isoelektrische Fokussierung (IEF) in einem 18 cm langen Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten bis 62887 Vh. In der zweiten Dimension wurde der Gelstreifen auf ein 13% Tricin Maxi-Gel gelegt [78] und die Proteine nach ihrer scheinbaren Größe getrennt. Es wurden zwei Gele parallel bearbeitet. Eins wurde silbergefärbt, das andere für einen Western Blot eingesetzt. Der Primärantikörper $\alpha\text{N20-34}$ wurde in einer Verdünnung von 1:7000 eingesetzt. Abb. 4.25 zeigt das 2D-SDS-Gel nach Silberfärbung.

Der Western Blot in Abb. 4.26 zeigt nach Behandlung mit dem spezifischen DdAQP2

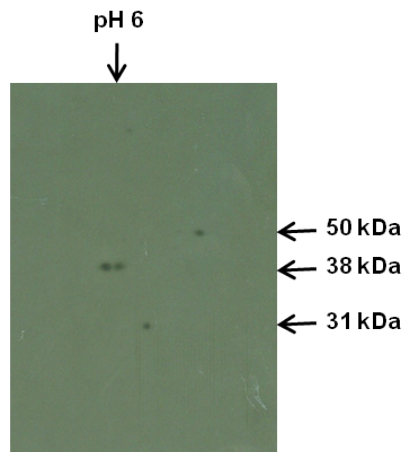


Abbildung 4.26: Western Blot des 2D-SDS-Gels von *Dictyostelium* Zelllysat. Es wurden 500 μg Gesamtprotein aus Hanisch Extrakt aufgetragen. Es sind die relevanten pH-Werte und Massen in kDa angegeben. Als Primärantikörper wurde $\alpha\text{N20-34}$ in einer Verdünnung von 1:7000 eingesetzt.

Antikörper $\alpha\text{N20-34}$ nur vier Signale. Der theoretisch ermittelte Isoelektrische Punkt von DdAQP2 liegt bei pH 6,6. Die erkannten Signale liegen um diesen pH-Wert gruppiert. Die detektierten Proteine haben folgende scheinbare Molekulargewichte: ca. 31, 38 und 50 kDa und liegen damit im Molekulargewichtsbereich von DdAQP2. Durch Aufeinanderlegen des Blots und des Vergleichsgels wurden vierzehn *spots* um diese vier Signale herum ermittelt und ausgestochen. Nach Verdau mit Protease wurden die Peptidfragmente massenspektrometrisch untersucht. Es konnten drei Proteine identifiziert werden: zwei *Heat Shock* Proteine und eine Aldolase. DdAQP2 konnte nicht identifiziert werden.

Um DdAQP2 weiter aufzukonzentrieren und erneut per 2D-SDS-PAGE zu untersuchen, wurde eine Immunpräzipitation (IP) gemacht.

Zunächst wurde getestet, ob der Antikörper $\alpha\text{N20-34}$ an die Protein A Sepharose bindet. Dazu wurden 50 μg Antikörper eingesetzt und über Nacht mit Protein A Sepharose unter Über-Kopf-Schütteln bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde bei $1000 \times g$ für 30 s bei 4 °C zentrifugiert. Sowohl der Überstand als auch das Pellet wurden in SDS-Ladepuffer aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Trennung der Proteine erfolgte per SDS-PAGE. Die Proteine wurden anschließend mittels Coomassiefärbung sichtbar gemacht (s. 3.2.3). Es wurde eine Doppelbestimmung gemacht (1 und 2).

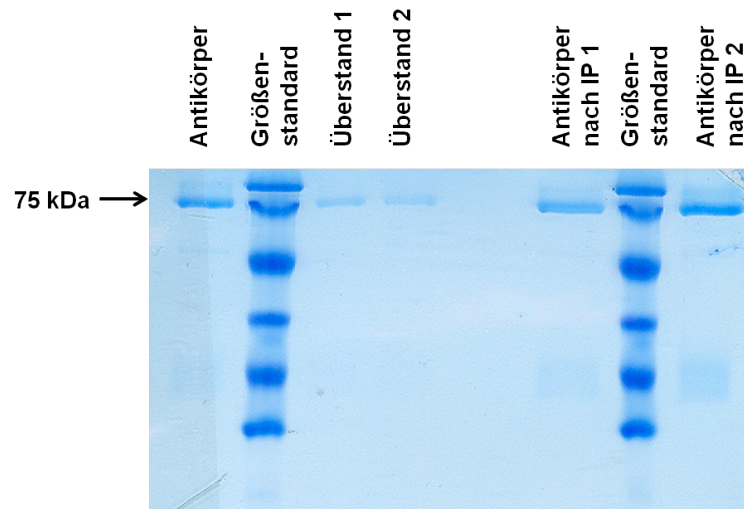


Abbildung 4.27: 12,5% SDS-PAGE zur Überprüfung der Bindung zwischen Antikörper und Protein A Sepharose. Als Proteinproben wurden 10 μg Antikörper, der Zentrifugationsüberstand sowie die theoretisch 14 μg Antikörper entsprechende Pelletmenge aufgetragen.

Wie in Abb. 4.27 zu sehen ist, bindet ein großer Teil des Antikörpers an die Sepharose. Auf dem SDS-PAGE wird eine scheinbare Größe von 75 kDa sichtbar. Die im Überstand verbliebene Menge Antikörper ist gering.

Da gezeigt werden konnte, dass der Antikörper in zufriedenstellenden Ausbeuten an die Protein A Sepharose bindet, wurde in den nächsten Versuchen gekläartes *Dictyostelium* Zelllysate zugegeben. So sollte eine spezifische Bindung von DdAQP2 an den Antikörper erreicht werden. Nach den Waschschrritten sollte im Überstand kein und im Rückstand aufkonzentriertes DdAQP2 auf dem SDS-PAGE zu sehen sein. Abb. 4.28 zeigt den Western Blot der IP. Zum Vergleich wurde Zelllysate vor der IP sowie der IP-Überstand mitaufgetragen. Es wurde eine Doppelbestimmung gemacht (1 und 2).

In den Zelllysaten 1 und 2 sind drei Banden erkennbar. Eine schwache bei 31 kDa, und zwei intensivere bei 38 und 90 kDa. Auch im Überstand kann DdAQP2 detektiert werden (38 kDa Bande). DdAQP2 ist nicht vollständig gebunden worden. Im IP Rückstand sieht man eine starke Bande bei 31 kDa. Die 38 kDa Bande ist nicht erkennbar. Stärkere Banden sind bei 50 und 90 kDa zu verzeichnen. DdAQP2 konnte also zwar mittels IP aufkonzentriert werden, die Banden sind allerdings nicht diskret, was auf eine Verunreinigung des Proteins hinweist. Die starke 50 kDa Bande könnte vom Primärantikörper (schwere Kette) stammen. Auf einem parallel angefertigten SDS-PAGE konnte nach Coomassie-

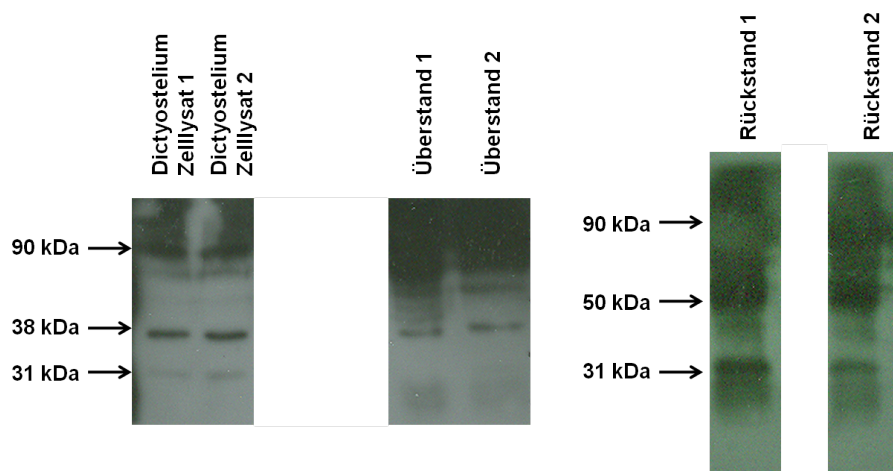


Abbildung 4.28: Western Blot der IP. *Dictyostelium* Zellysat vor der IP, der Überstand und das Ergebnis der IP (Rückstand) wurden aufgetragen. Als Primärantikörper wurde α N20-34 in einer Verdünnung von 1:1000 in M-TBS-T eingesetzt.

Färbung mit bloßem Auge kein Protein detektiert werden. Das zeigt, dass DdAQP2 für weitere 2D-SDS/Massenspektrometrie-Versuche noch nicht weit genug aufkonzentriert werden konnte. An der Optimierung soll im Anschluss an diese Arbeit weiter gearbeitet werden.

4.4 Lokalisation von GFP-DdAQP2-Fusionsproteinen in *Dictyostelium*-Amöben

Zur intrazellulären Lokalisation von DdAQP2 wurden GFP-DdAQP2-Fusionskonstrukte erstellt (s. 3.7.1). Es ist bekannt, dass sich die Lokalisation von N- und C-terminalen GFP-Fusionskonstrukten unterscheiden kann [79]. Deshalb wurden zwei Fusionskonstrukte kloniert: Für das C-terminale Konstrukt wurde die für DdAQP2 kodierende Sequenz 5' in das *Dictyostelium*-Expressionsplasmid pDXA-GFP2 kloniert. Dabei wurde das Stopcodon entfernt, damit der ORF kodierend für das Fusionsprotein durchgängig wird. Durch DNA-Sequenzierung (s. 3.1.15) konnte der gesamte ORF bestätigt werden. Für das N-terminale Konstrukt wurde die für DdAQP2 kodierende Sequenz 3' in das Plasmid kloniert und der ORF mittels Sequenzierung bestätigt. *Dictyostelium*-Zellen wurden mit je 6 μ g Plasmid-DNA elektroporiert (s. 3.6.2). Die Zellen wurden in 10 cm

Petrischalen, in denen Deckgläschen ausgelegt waren in 10 ml Ax-Medium überführt und kultiviert (s. 3.4). Die bewachsenen Deckgläschen wurden nachher zum Mikroskopieren verwendet, wobei die Zellen in SPB überführt wurden. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mittels Konfokaler Laserscanmikroskopie angefertigt. Die Aufnahmen erfolgten mit bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm.

Abb. 4.29 zeigt die intrazelluläre Lokalisation des C- bzw. N-terminalen GFP-Fusionsproteins. Abb. 4.29 A zeigt zwei verschiedene Zellen, die jeweils mit C-terminalem GFP-Fusionsprotein transformiert worden waren, B zwei verschiedene Zellen, die jeweils mit N-terminalem GFP-Fusionsprotein transformiert worden waren. Links sieht man die Fluoreszenzbilder und rechts die dazugehörigen Hellfeldaufnahmen. Die Lokalisation der beiden Konstrukte unterscheidet sich kaum. Eine Fluoreszenz wurde für beide Fusionsproteine in gleichem Maße in mehreren intrazellulären Foki festgestellt. Fluoreszenz zeigte sich ferner in der gesamten Plasmamembran (hingegen nur punktuell für das C-terminale DdAQP2-GFP) sowie in Pseudopodien-artigen Zellausstülpungen, die bei den Zellen des C-terminalen GFP-Fusionsproteines stärker ausgeprägt erscheinen.

4.5 *D. discoideum* knockout

4.5.1 Wachstumskurve von *Dictyostelium*-Amöben

Da im Arbeitskreis noch keine Erfahrungen mit *Dictyostelium*-Zellkultur bestand, wurden einige Vorversuche vor dem eigentlichen *knockout*-Experiment gemacht. Um das Wachstum von *Dictyostelium*-Amöben zu verfolgen, wurde eine Schüttelkultur angeimpft (s. 3.4.6) und alle 6-14 Stunden Proben gezogen (s. Abb. 4.30). Die Zellzahl wurde auf zwei Arten bestimmt: Die Zellen wurden in einer Zählkammer ausgezählt und die OD₆₀₀ photometrisch ermittelt (s. 3.4.4). Abb. 4.30 zeigt die Wachstumskurve der *Dictyostelium*-Amöben.

Unter diesen Kulturbedingungen befanden sich die Zellen bei einer Zelldichte von $6 \cdot 10^4$ bis $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml in der exponentiellen Wachstumsphase. Für alle Experimente wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt.

Um schneller die Zellzahl ermitteln zu können, wurde überprüft, ob die OD₆₀₀ mit den Zellzahlen korreliert, die mit der Zählkammer erhalten wurden. Dazu wurden die Zellen in den Proben parallel gezählt und vermessen. Abb. 4.31 zeigt die Korrelation.

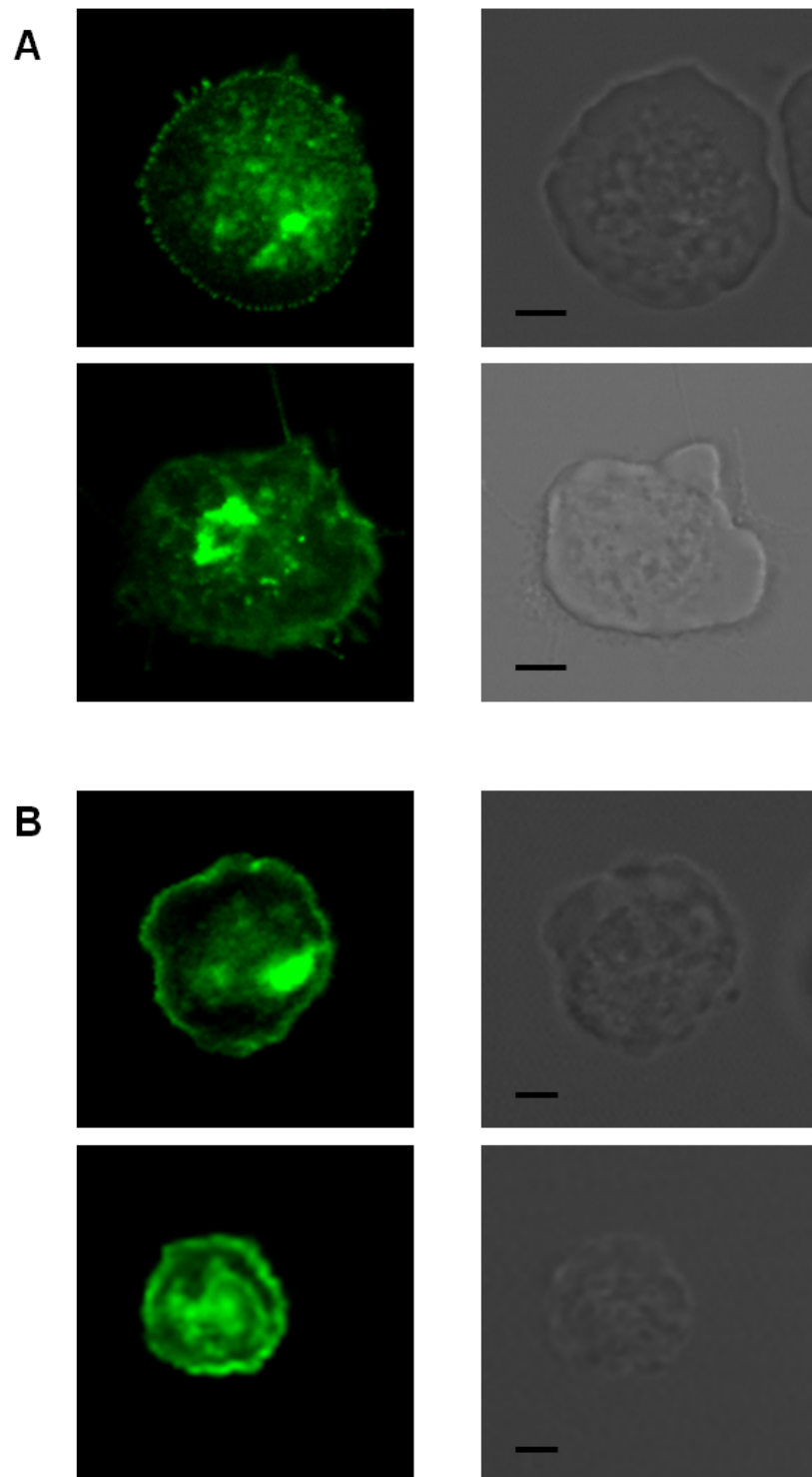


Abbildung 4.29: Intrazelluläre Lokalisation der DdAQP2-GFP Fusionsproteine in *Dictyostelium*-Amöben. Links: Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm, grün: DdAQP2-GFP. Rechts: Hellfeldaufnahmen derselben Zellen A: C-terminalem DdAQP2-GFP Fusionsprotein. B. N-terminales GFP-DdAQP2 Fusionsprotein. Bars = 5 μ m

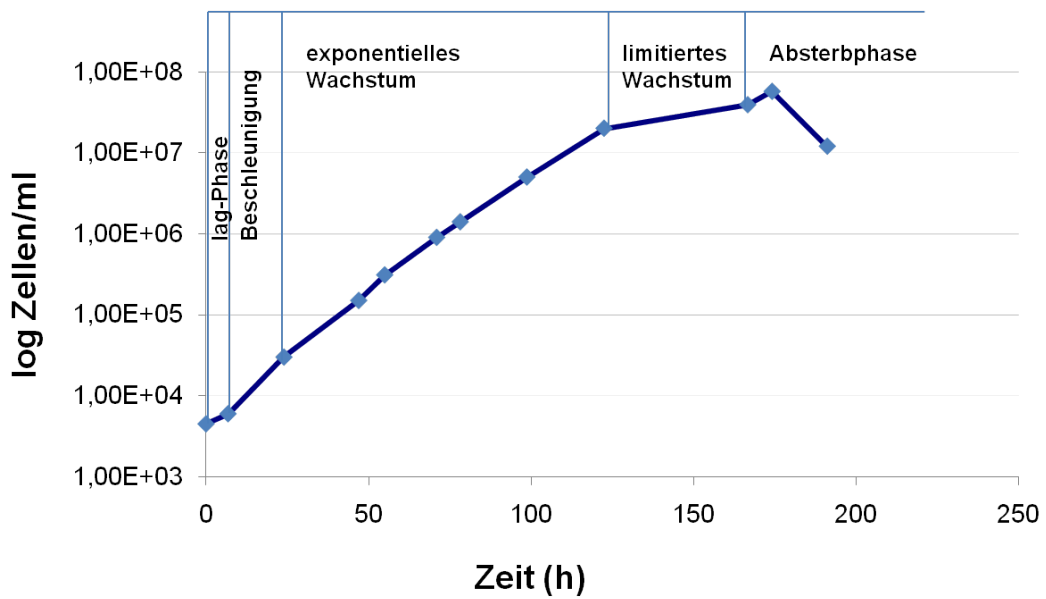


Abbildung 4.30: Wachstumskurve von *Dictyostelium*-Amöben. Diese wurden in Schüttelkultur gehalten und alle 6-14 Stunden Proben gezogen. Die Zellzahl wurde durch Zellzählung in einer Zählkammer ermittelt.

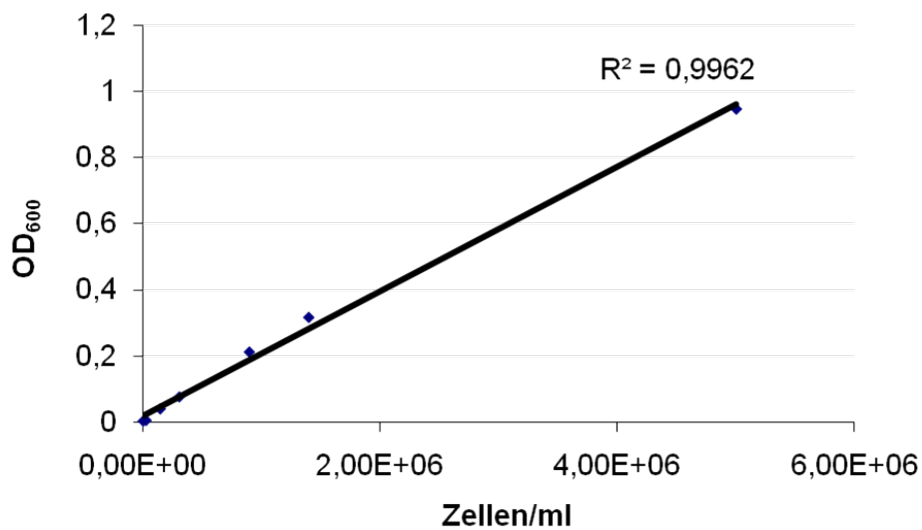


Abbildung 4.31: Ermittlung der Korrelation zwischen der Zellzahl, die mit der Zählkammer erhalten wurde und der OD_{600} . Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,9962.

Tabelle 4.4: Vorversuche zur Ermittlung der Transformationseffizienz bei der Elektroporation von *Dictyostelium*-Zellen

Versuchs-Nummer	Spannung (kV)	DNA	
		Name	Menge (μg)
1	1,85	pDXA-GFP2	10
2	1,85	pTX-GFP	10
3	1,25	pDXA-GFP2	10
4	1,25	pTX-GFP	10
5	1,7	pDXA-GFP2	4
6	1,7	pTX-GFP	4
7	1	pDXA-GFP2	6
8	1	pDXA-GFP2	4
9	1	pDXA-GFP2	2
10	1	pTX-GFP	6
11	1	pTX-GFP	4
12	1	pTX-GFP	2

Da das Bestimmtheitsmaß 0,9962 beträgt, kann davon ausgegangen werden, dass über die photometrische Messung (OD_{600}) die Zellzahl hinreichend genau bestimmt werden kann.

4.5.2 Ermittlung der Transformationseffizienz

Als weiterer Vorversuch wurde die Transformationseffizienz der Elektroporation ermittelt. Dazu wurden die *Dictyostelium*-Zellen wie beschrieben elektrokompent gemacht (s. 3.6.2) und verschiedene Elektroporationsbedingungen gewählt (s. Tab. 4.4).

Pro Transformation wurden $4 \cdot 10^7$ Zellen eingesetzt. Es wurden jeweils zwei Impulse mit einem Abstand von 5s ausgelöst. Die Kapazität des Kondensators betrug konstant $25 \mu\text{F}$. Die Plasmid-DNA, die zur Elektroporation verwendet wurde (pDXA-GFP2 und pTX-GFP) wurde freundlicherweise von der dictyBase zur Verfügung gestellt. Die Transformationseffizienz wurde nach 24 h durch GFP-Fluoreszenz detektiert. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden in der Zentralen Mikroskopie der CAU Kiel mit Hilfe von Christine Desel angefertigt. Abb. 4.32 zeigt beispielhaft die Fluoreszenzaufnahme der Elektroporation von Versuchs-Nummer 7 (s. Tab. 4.4). Die Transformationseffizienz errechnete sich durch Auszählen der fluoreszierenden Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl. Für

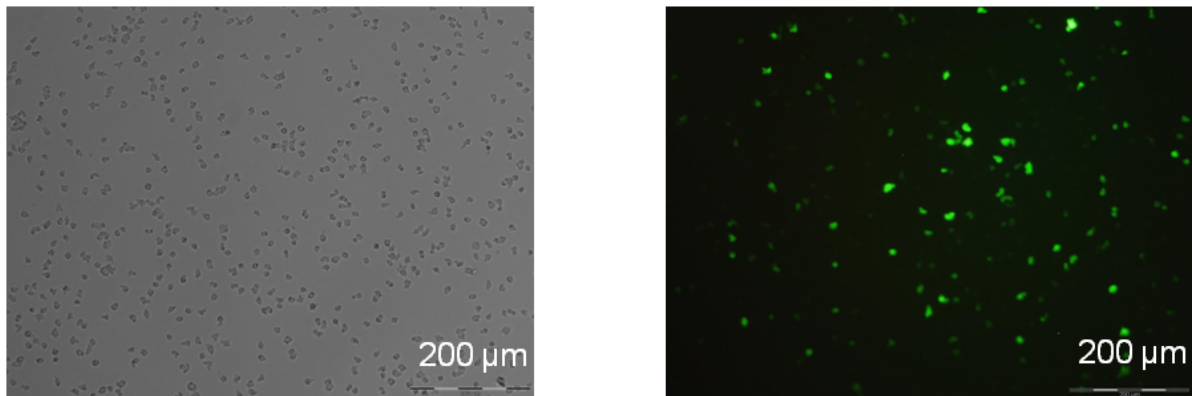


Abbildung 4.32: Ermittlung der Transformationseffizienz. Es wurden $4 \cdot 10^7$ *Dictyostelium*-Zellen mit 6 µg pDXA-GFP2 elektroporiert und die grün fluoreszierenden Zellen nach 24 Stunden gezählt. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica Epifluoreszenzmikroskop gemacht. Links: Durchlichtmikroskop, rechts: blaue Excitation: BP 450-490 nm, BSp 510; grüne Emission LP515.

Versuchs-Nummer 7 war die Transformationseffizienz mit 20% am Höchsten. Es wurde deshalb mit diesen Elektroporationsbedingungen gearbeitet.

4.5.3 Klonierung des *knockout*-Konstruktes

Ein *knockout*-Konstrukt basierend auf einer Blasticidin-Resistenzkassette (pLPBLP-Plasmid) wurde hergestellt. Zur Klonierung des Konstruktes siehe 3.6.1.

4.5.4 PCRs zur Verifizierung des *knockouts*

Dictyostelium-Zellen wurden mit dem fertigen *knockout*-Konstrukt transformiert. Nach homologer Rekombination wurden die Blasticidin-resistenten Klone selektiert. Zur weiteren Überprüfung des *knockouts* wurden verschiedene PCRs durchgeführt (s. Tab. 4.5 und Abb. 4.33). Dabei wurde ein *touchdown*-PCR Programm verwendet, was die Amplifikation großer Fragmente aus genomischer DNA ermöglicht (s. Tab. 3.5).

Die Zellen wurden zunächst auf das Vorhandensein des *DdAQP2*-Gens getestet. Dabei sollten nur die Wildtyp-Zellen oder Mischklone eine entsprechende 885 bp große Bande auf dem Agarosegel liefern. Des Weiteren wurde auf korrekte 5'-Insertion bzw. 3'-Insertion überprüft. Die *full-length* und die Linker-PCR bieten den Vorteil, dass diese sowohl im Wildtyp, als auch im *knockout*-Genom, binden und die Banden sich in ihrer



Abbildung 4.33: Schema des integrierten *knockout*-Konstruktes in die genomische DNA, die Primeranlagerungsstellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet

Tabelle 4.5: PCRs zur Überprüfung des *knockouts*

	Primer (s. 2.4)	Produkt	
		Wildtyp	knockout
5'-Insertion	(35)+(36)		1456 bp
3'-Insertion	(38)+(37)		1490 bp
<i>full length</i> PCR	(35)+(37)	2937 bp	3892 bp
DdAQP2	(7)+(8)	885 bp	
Linker-PCR	(39)+(40)	1120 bp	2075 bp

Größe hinlänglich unterscheiden.

Bisher wurden ca. 200 Klone auf die Deletion des *DdAQP2*-Gens hin untersucht. Alle waren Wildtypklone, obwohl per PCR das Vorhandensein der Blasticidin-Resistenzkassette nachgewiesen werden konnte. Das lässt darauf schließen, dass die homologe Rekombination stattfindet, aber nicht an der gewünschten Stelle im Genom. Die Suche nach einem *knockout*-Klon wird nach dem Abschluss der Arbeit fortgesetzt.

4.6 Permeabilitätstests durch dynamische Lichtstreuungsmessung von *Dictyostelium*-Amöben

Im Hinblick auf spätere Vergleichsmessungen der Wasserpermeabilität von *D. discoideum*-Wildtyp und *DdAQP2*-*knockout* Zellen wurden Messungen mit der Stopped-Flow-Apparatur etabliert. Für die Messung der Lichtstreuungsänderungen wurden *Dictyostelium*-Zellen einem auswärtsgerichteten osmotischen Gradienten von $300 \text{ mosm} \cdot \text{kg}^{-1}$ ausge-

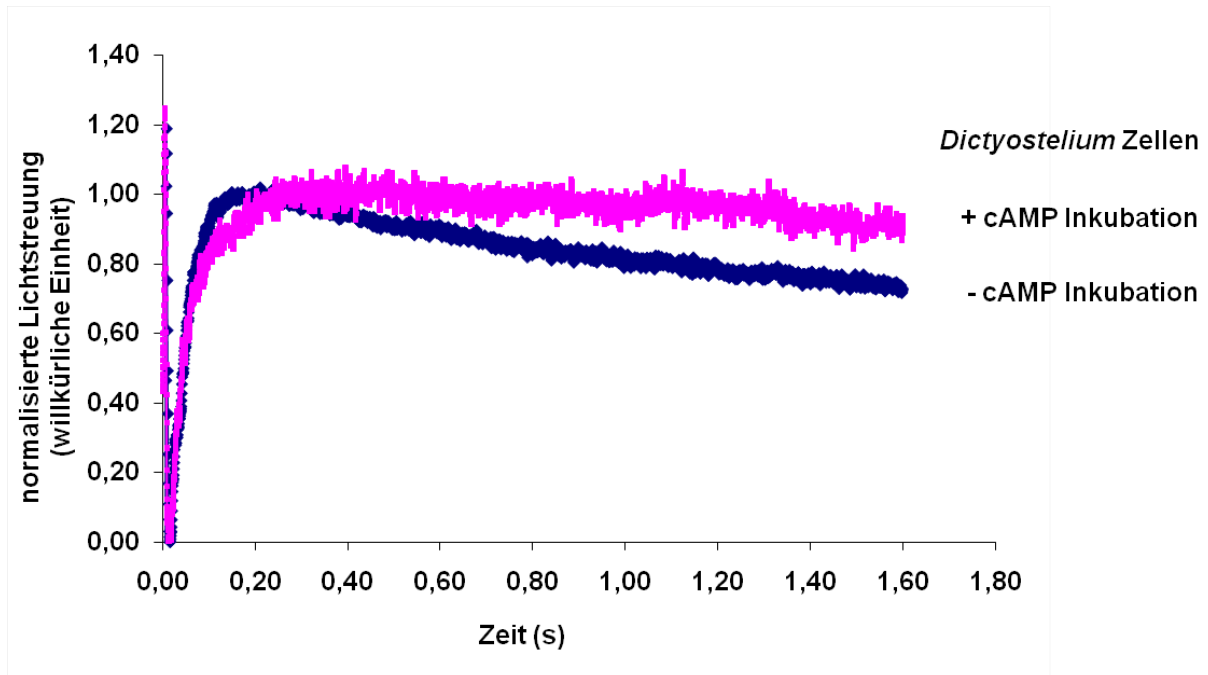


Abbildung 4.34: Wasserleitfähigkeit von unbehandelten im Vergleich zu cAMP behandelten *Dictyostelium*-Zellen bei 20 °C. Dargestellt sind die auf eins normierten Durchschnittskurven, die aus vier Einzelkurven bestehen. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 30 min mit 300 μ M cAMP.

setzt. Die Änderung der Lichtstreuung beruht auf der schnellen Volumenänderung der Zelle im Millisekunden-Bereich.

Gleichzeitig wurde mit dieser Methode untersucht, ob eine Präinkubation der Zellen mit cAMP die Wasserleitfähigkeit verändert. Es ist bekannt, dass cAMP über Bindung an die entsprechenden Rezeptoren (cAR1-4) extrazelluläre Signale über das Auslösen von Signalkaskaden ins Innere der Zelle überträgt. Ob diese Signalkaskaden Einfluss auf die Regulation des Wassertransportes haben, ist bisher unbekannt. So wurde die Wasserleitfähigkeit von *Dictyostelium*-Zellen im Vergleich zur Wasserleitfähigkeit von *Dictyostelium*-Zellen, die vorher mit cAMP behandelt wurden, ermittelt. Die Zellen wurden dazu vor dem Einbringen in die Stopped-Flow-Apparatur 15-60 min mit 10, 100 oder 300 μ M cAMP inkubiert und dann vermessen. In Abb. 4.34 sind exemplarisch die auf eins normierten Durchschnittskurven der mit 300 μ M cAMP für 30 min inkubierten Zellen dargestellt.

Die Relaxationszeit τ wurde aus den erhaltenen Kurven (s. Abb. 4.34) berechnet. Bei der Kurvenkinetik handelt es sich um eine e-abhängige Funktion. Der τ -Wert entspricht

dem Zeitpunkt, an dem 62,3% der Reaktion abgeschlossen sind ($= 1-1/e$).

Für beide Kurven ergibt sich derselbe τ -Wert von 0,05 s. Nach Inkubation der *Dictyostelium*-Zellen mit cAMP konnte folglich keine Änderung der Wasserpermeabilität festgestellt werden. Das Abfallen des zweiten Kurvenastes deutet allerdings auf eine Sorbitol-Leitfähigkeit der *Dictyostelium*-Zellen hin. Ein τ -Wert von 0,05 s deutet auf eine Wasserleitfähigkeit der Zellen hin, die über der von reinen Lipidmembranen ohne Kanalprotein liegt. So wird es in zukünftigen Experimenten spannend sein, zu sehen, wie gut Zellen mit deletiertem *DdAQP2*-Gen Wasser leiten können.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob Aquaporine an der Zellwanderung beteiligt sind. Dazu diente *Dictyostelium discoideum* im einzelligen Amöbenstadium als Modellsystem. In der dictyBase Datenbank wurden zu Beginn der Arbeit bioinformatisch drei neue putative Aquaporin-Sequenzen im Genom von *D. discoideum* gefunden, wobei der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit nach theoretischen Sequenzanalysen auf DdAQP2 gelegt wurde. Um die physiologische Funktion von DdAQP2 in *Dictyostelien* untersuchen zu können, musste das putative Aquaporin DdAQP2 sowie seine Permeabilitätseigenschaften zunächst charakterisiert werden.

5.1 Theoretische Sequenz-Analysen: DdAQP2 -ein wasserspezifisches Aquaporin?

Zunächst stellte sich die Frage, ob das bioinformatisch gefundene DdAQP2 überhaupt ein Aquaporin ist. Charakteristisches Strukturelement von Aquaporinen (s. 1.2) ist der Aufbau aus sechs Transmembranspannen, die über fünf Schleifen verbunden sind. Zwei Porenengstellen werden zum einen von der ar/R-Region und zum anderen von den zwei hochkonservierten NPA-Motiven der Halbhelices B und E gebildet. Weitere hochkonservierte Aminosäuren (Zahlen hier am Beispiel des *hAQP1*) sind die positiv geladenen Aminosäuren H74 in Schleife B und R195 in Schleife E, die möglicherweise Ionenpaare mit den konservierten Aminosäuren in Helix 1 und 4 (E17, T21, F24) bilden [80]. Sequenzvergleiche ergaben, dass DdAQP2 all diese Strukturmerkmale aufweist und somit in die Proteinfamilie der Aquaporine eingeordnet werden kann (s. 4.1.2). Ein gänzlich Fehlen von Aquaporinen in der einzelligen Wachstumsphase der *Dictyostelien* widerspricht auch den Erfahrungen, die in der Arbeitsgruppe mit anderen Einzellern wie *P. falciparum* oder *T. gondii* gewonnen wurden [74, 81–84]. All diese Mikroorganismen exprimieren Aquaporin-Gene.

Nach theoretischen Analysen war allerdings eine eindeutige Zuordnung von DdAQP2

Tabelle 5.1: Vergleich der für Wasserkanäle und Glycerolporen charakteristischen Aminosäuren der Positionen P1-P5 mit DdAQP2

Position	Wasserkanal	Glycerolkanal	DdAQP2
P1	nicht aromatisch	aromatisch	F146
P2	klein und ungeladen	D	V255
P3	klein und ungeladen	R oder K	A259
P4	aromatisch	P	Y271
P5	aromatisch	nicht aromatisch	W272

zur Gruppe der wasserspezifischen bzw. der Aquaglyceroporine nicht möglich (s. 4.1.3). Von theoretisch arbeitenden Gruppen konnte durch den Vergleich von AqpZ und GlpF (das wasserspezifische Aquaporin bzw. Aquaglyceroporin aus *E. coli*) gezeigt werden, dass wasserspezifische Aquaporine eine engere, hydrophilere Pore besitzen als Aquaglyceroporine [85]. Der Porendurchmesser der ar/R-Region beträgt nur 0,28 nm [20] im Vergleich zu 0,34 nm [86] für Aquaglyceroporine, vor allem bedingt durch die unterschiedliche Aminosäure-Zusammensetzung: Das Histidin der wasserspezifischen Aquaporine begrenzt den Porendurchmesser und besitzt bei neutralem pH vermutlich eine positive Ladung. Aquaglyceroporine haben an dieser Position meist ein kleines, unpolares Glycin. Das Arginin der ar/R-Region ist hochkonserviert [18]. Das unpolare, kleine C239 in DdAQP2 (statt Histidin) würde die Pore weiter und weniger hydrophil machen. G248 trägt wie C189 im *hAQP1* nur mit dem Carbonylsauerstoff zur Pore bei. Gegenüber angeordnet ist entweder T86 oder F88. F88 entspräche der Aminosäure in *hAQP1*, T86 würde die Pore durch seine Hydroxylgruppe hydrophiler machen. Das R254 ist konserviert. So lässt eine theoretische Betrachtung der ar/R-Region von DdAQP2 keine eindeutige Einordnung zu, zumal es auch noch keine Kristallstruktur von DdAQP2 gibt. Sequenzanalysen ergaben, dass es noch fünf weitere Positionen (P1-P5) in Aquaporinen gibt, die eine Unterscheidung in Wasser- und Glycerolporen ermöglichen [87]. In Tab. 5.1 ist zu sehen, dass bis auf P1 alle Aminosäuren für das Vorliegen einer Wasserpore sprechen.

Auch die von Heymann und Engel (2000) [9] durch Sequenzanalyse identifizierten zwei konservierten hydrophoben Aminosäuren in der Mitte von Helix 1 und Helix 4 sind typisch für Wasserkanäle (F59 und L184). So ist DdAQP2 vermutlich eher ein Wasserkanal als eine Glycerolpore.

Durchsucht man das *Dictyostelium*-Genom bioinformatisch mit bekannten Aquaporin-

Sequenzen, fällt auch auf, dass DdAQP2 eine auffällig große Ähnlichkeit sowohl mit pflanzlichen als auch mit tierischen wasserspezifischen Aquaporinen hat (s. 4.1.1). Die phylogenetische Einordnung von *D. discoideum* war lange umstritten: Morphologische Untersuchungen ermöglichten keine eindeutige Einordnung zu Pilzen oder Protozoen. Molekularbiologische Methoden führten zur Klassifizierung von *D. discoideum* als Amöbe. Nach Untersuchungen von über 100 Proteinen wurde *D. discoideum* schließlich phylogenetisch zwischen Pflanzen und Tieren eingeordnet [42]. Diese Zwischenstellung spiegelt sich auch in den gefundenen Sequenzähnlichkeiten wieder: DdAQP2 enthält sowohl einen mit 35 Aminosäuren vergleichsweise langen N-Terminus (wie es für Hefe-Aquaporine charakteristisch ist) als auch eine Schleife D Verlängerung (wie sie meist bei Pflanzen-Aquaporinen vorkommt).

5.2 Funktionelle Charakterisierung von DdAQP2

Nachdem *DdAQP2* erfolgreich aus *Dictyostelium*-Amöben cDNA amplifiziert werden konnte, wurde als erstes Expressionssystem *S. cerevisiae* ausgewählt. Mit diesem Testsystem wurden in unserem Arbeitskreis bereits erfolgreich Aquaporine getestet und die Expression gezeigt [19]. DdAQP2 zeigte im Methylaminefflux-Assay in *S. cerevisiae* kein Wachstum (s. 4.2.1). Methylamin, ein für die Hefe toxisches Ammoniak-Analogon, ist größer als dieses und so könnten sterische Effekte in den Porenengstellen den Transport verhindern -die Pore also zu eng für Methylamin sein, theoretisch aber Ammoniak passieren lassen. Es konnte im Verlauf der Arbeit gezeigt werden, dass *DdAQP2* in Hefe exprimiert wird, aber über den korrekten Einbau in die Membran oder die korrekte Faltung des Proteins können keine Aussagen getroffen werden. Des Weiteren könnte es sein, dass für die Funktion des *Dictyostelium*-Aquaporins DdAQP2 wichtige co- sowie posttranslationale Modifikationen wie z.B. spezielle Glykosylierungen in der Hefe nicht gemacht werden. Des Weiteren kann mit dem Methylaminefflux-Assay keine Aussage über eine mögliche Wasserleitfähigkeit getroffen werden.

Deshalb wurde die Verwendung von *X. laevis* Oocyten als weiteres Expressionssystem im Rahmen dieser Arbeit im Arbeitskreis etabliert. *X. laevis* Oocyten sind ein bewährtes Messsystem für die Wasserpermeabilität, da sie eine geringe eigene Membranwasserpermeabilität haben und die Wasserpermeabilität der Aquaporine durch direkte Messung des Zellvolumens ermittelt werden kann [88]. Das System erwies sich als robust und lieferte gut reproduzierbare Ergebnisse. *DdAQP2* konnte erfolgreich in *X. laevis* Oocyten

exprimiert werden (s. Abb. 4.7). Der Wildtyp zeigte allerdings weder Wasser- (s. 4.2.2) noch Solutpermeabilität (s. 4.2.2). In der Literatur ist bisher noch kein Wasserpermeabilitätstest für Aquaporine aus *Dictyostelien* beschrieben. So lag die Vermutung nahe, dass Oocyten für die Funktion von *Dictyostelien*-Aquaporinen wichtige Sekundärmodifikationen nicht machen. Sollte ein Kanal-*gating* vorliegen könnte in Oocyten-Schwelltests der zum Öffnen nötige Stimulus fehlen. Die Tatsache, dass die erstellte Schleife D Mutante $\Delta 208-219$ aber in Schwelltests aktiv war, zeigt, dass das Expressionssystem auch für *Dictyostelium*-Aquaporine geeignet ist.

Es wurden auch alle erstellten Mutanten in Oocyten exprimiert (s. 4.11). Im Western Blot der Totalmembranproteinfraktionen scheinen die Expressionslevel der Konstrukte verschieden hoch. Es konnte im Arbeitskreis bereits gezeigt werden, dass sich die in der Totalmembranproteinfraktion detektierte Proteinmenge von der in der Plasmamembran unterscheiden kann [89]. So kann hier nicht sicher festgestellt werden, ob die Proteine vollständig in die Plasmamembran eingebaut wurden oder Teile des Proteins z.B. im Endoplasmatischen Retikulum verbleiben. Da die Präparation der Plasmamembranpräparation von Oocyten einen für die Fragestellung nicht gerechtfertigten Aufwand darstellte, wurde darauf verzichtet. So können keine vergleichenden Aussagen über Expressionslevel der einzelnen Konstrukte getroffen werden. Die auf dem Western Blot erkennbaren scheinbaren Proteingrößen von 29 kDa bis 36 kDa entsprechen den theoretisch ermittelten Proteingrößen. Auffällig ist hier, dass die Oocyten beide möglichen Startcodons im ORF nutzen und so für jedes Konstrukt zwei Banden im Western Blot zu erkennen sind. In Schwelltests konnte mit der DdAQP2-Mutante $\Delta 208-219$ durch Verkürzung der Schleife D um 12 Aminosäuren gezeigt werden, dass DdAQP2 ein aktiver Wasserkanal sein kann (s. Abb. 4.14). Dieses Ergebnis konnte nach zellfreier Synthese und Rekonstitution in Liposomen mit der dynamischen Lichtstreuungsmessung in einem zweiten, unabhängigen Testsystem bestätigt werden (s. 4.2.4). Vorteile der Methode der Rekonstitution in Liposomen sind, dass sie dem natürlichen System nahe kommen und zelluläre Sekundäreinflüsse auf die Messung ausgeschlossen werden können.

5.3 DdAQP2- ein *gegatetes* Aquaporin?

Die Ergebnisse, dass DdAQP2 weder Wasser noch Solute leitet, einige strukturelle Besonderheiten aufweist und durch partielle Deletion der Schleife D aktiviert werden kann, legt die Vermutung nahe, dass es sich bei DdAQP2 um ein *gegatetes* Aquaporin handeln

könnte. Das könnte auch bedeuten, dass die Schleife D Mutante noch nicht die maximale Wasserleitfähigkeit zeigt. Aquaporin-*gating* ist in der Literatur für einige eukaryotische Aquaporine beschrieben. Die Regulation des Öffnens und Schließens von Aquaporinen kann z.B. durch Phosphorylierung [90], Änderung des pH-Wertes [91], der Konzentration zweiwertiger Kationen [91] oder der Osmolarität [23] erfolgen. Im Folgenden werden mögliche *gating*-Strategien für DdAQP2 diskutiert.

pH-gating

Da bereits einige Aquaporine als pH-sensitiv beschrieben worden sind (AQP0 [91], AQP3 [92], AQP6 [93] und SoPIP2;1 [94]), wurden Schwelltests mit Oocyten bei saurem externem pH-Wert gemacht. Dies führte nicht zu einer Aktivierung von DdAQP2 (s. Abb. 4.9). Für die Erhöhung der Wasserpermeabilität von AQP0 um den Faktor 3 ist vermutlich die Protonierung des H40 in der extrazellulären Schleife A verantwortlich [91]. Für AQP3 wird in der Literatur eine Reduktion der Wasserpermeabilität bei saurem externem pH beschrieben. Auch hier wird die Protonierung von Histidinen in extrazellulären Schleifen als Schalter vermutet [92]. Bei AQP6 steigt die Wasser- und vor allem die AQP6-spezifische Ionenpermeabilität bei Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes [93]. Bei SoPIP2;1 wird die Protonierung des H193 in der intrazellulären Schleife D angenommen, welche die Pore verschließt [94].

DdAQP2 hat zwar eine auffällig lange Schleife D, die Proteinsequenz von DdAQP2 enthält allerdings in keiner Schleife ein protonierbares Histidin. Bisher beschriebene pH-sensitive Aquaporine weisen dagegen charakteristische Histidine in intra- bzw. extrazellulären Schleifen auf, die an der Schalterfunktion beteiligt zu sein scheinen. Obwohl DdAQP2 bisher nur bei pH 5,2 und 7,4 getestet wurde (s. Abb. 4.9), erscheint folglich eine pH-Sensitivität von DdAQP2 eher unwahrscheinlich.

gating über den N-Terminus

DdAQP2 hat mit 35 Aminosäuren einen für AQPe vergleichsweise langen N-Terminus. Lange N-Termini sind charakteristisch für Hefe-Aquaporine. Das Aquaglyceroporin Fps1 aus *S. cerevisiae* kann über seinen extrem langen N-Terminus (255 Aminosäuren), vermutlich durch Eintauchen einer regulatorischen Domäne in die Pore, geöffnet und geschlossen werden [23]. Die Hefe nutzt diesen, durch osmotische Änderung aktivierten, Mechanismus zur Osmoregulation. Sequenzvergleiche ergaben, dass DdAQP2 die entsprechende Domäne nicht enthält und auch sonst keine große Sequenzähnlichkeit besteht.

Die Kristallstruktur des wasserspezifischen Hefe-Aquaporin Aqy1 aus *Pichia pastoris* zeigt eine geschlossene Konformation, wobei die Pore durch Y31, welches Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Wassermolekül in der Pore bildet, verschlossen wird [95]. Mutationsanalysen und Molekulardynamiksimulationen legen nahe, dass das *gating* aus einer Kombination aus Phosphorylierung und Mechanosensitivität reguliert wird. DdAQP2 enthält keine dem Y31 vergleichbare Struktur. Von *hAQP4*, dem dominierenden Wasserkanal im Gehirn, ist bekannt, dass zwei Spleißvarianten mit verschieden langem N-Terminus existieren (M1 und M23). Diese beiden Aquaporin-Varianten werden in der Plasmamembran verschieden angeordnet und führen vermutlich zu unterschiedlicher osmotischer Wasserpermeabilität. Phosphorylierung eines Serins in Schleife B durch Proteinkinase A führt zu einer vermehrten Anordnung in aktiver Form (der Variante mit verkürztem N-Terminus) [96]. Die Proteinsequenz von DdAQP2 enthält sowohl zwei potentielle Startmethionine (M1 und M18) als auch das Serin in Schleife B (S120), ebenfalls in einer Konsensussequenz für Proteinkinase A angeordnet. Um zu überprüfen, ob die Verkürzung des N-Terminus einen Einfluss auf die Funktion von DdAQP2 hat, wurden zwei Mutanten hergestellt: Die Mutante M18 repräsentiert das Protein ab dem zweiten möglichen Startmethionin; bei Mutante M35 wurde der N-Terminus künstlich auf die Länge von *rAQP1* (8 Aminosäuren) verkürzt. Für die erstellten Mutanten konnte keine Erhöhung der Wasserpermeabilität festgestellt werden (s. Abb. 4.13). Das legt nahe, dass der N-Terminus an einer Regulation nicht beteiligt ist, wobei der mögliche Einfluss einer Phosphorylierung von S120 hier nicht berücksichtigt wurde. Herstellung und Testung einer Doppelmutante (M18 und S120D) würde darüber Auskunft geben können. Ebenfalls gegen die Regulation über den N-Terminus nach Mechanismus des *hAQP4* spricht aber, dass im Western Blot von *Dictyostelien* Membranproteinfraktion nur eine M1 entsprechende Proteingröße gefunden wurde (s. Abb. 4.22) und eine zweite Spleißvariante *in vivo* nicht identifiziert werden konnte.

gating durch Phosphorylierung

Auffällige Strukturmerkmale von DdAQP2 sind das S120 und die außergewöhnlich lange Schleife D. Von SoPIP2;1 ist bekannt, dass für das *gating* mehrere Mechanismen synergistisch wirken: die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von zwei in PIPs hochkonservierten Serinresten (S115 in Schleife B und Serin274 in Schleife D), die Bindung von Calcium-Ionen, die Protonierung von H193 und eine Konformationsänderung von L197 (beide in Schleife D lokalisiert). Es ist postuliert, dass in geschlossenem Zustand

N-Terminus und Schleife D über Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden und so die Pore verschließen. Die Öffnung des Kanals erfolgt unter Anderem durch Phosphorylierung von S115, wobei die eben erwähnten Wasserstoffbrückenbindungen aufbrechen [94]. In DdAQP2 stellt das S120 der Schleife B zusammen mit den Aminosäuren R117 und K118 ein analoges, potentiell Proteinkinase A Phosphorylierungsmotiv dar (R-K-x-S). Weder Mutation des Serins zu Alanin (Vortäuschung einer permanent dephosphorylierten Variante) noch zu Aspartat (Vortäuschung einer permanent phosphorylierten Variante) führte jedoch zu einer Erhöhung der Wasserpermeabilität. Die Methode der Phosphorylierungs-Mimikry ist eine allgemein anerkannte und vielfach erprobte Methode zur Untersuchung von Auswirkungen von Phosphorylierungen auf die Aktivität von Proteinen [97]. Man muss allerdings berücksichtigen, dass es dabei zur Änderung der Primärsequenz des Proteins kommt und damit möglicherweise zu Konformationsänderungen. Wie eben beschrieben sind des Weiteren die Regulationsmechanismen in SoPIP2;1 sehr komplex und durch die Mutation einer einzelnen Aminosäure nicht vollständig imitierbar. Des Weiteren ist der C-Terminus von DdAQP2 mit neun Aminosäuren eher kurz und enthält so keine dem S274 des SoPIP2;1 entsprechende Aminosäure.

Auch *h*AQP4 wird durch Phosphorylierung von S111 (Schleife B) aktiviert, allerdings durch Phosphorylierung von S180 (Schleife D) inaktiviert. Sequenzvergleiche ergaben für DdAQP2 an denselben Positionen Serine (S120 und S199). S120D führte wie eben beschrieben zu keiner Aktivierung. Dabei wäre es interessant die Auswirkung von S199D und S199A Mutanten zu untersuchen.

Den wohl wichtigsten Hinweis auf einen Schalt-Mechanismus lieferte das Ergebnis der in zwei unabhängigen Testsystemen aktiven Schleife D Mutante Δ 208-219. Die Deletion von 12 Aminosäuren führt zu einer Verkürzung der Schleife. Gleichzeitig werden mit der Deletion auch acht putative Phosphorylierungsstellen (Serine, Threonine und Tyrosine) entfernt. Die in der Mutante deletierten 12 Aminosäuren fallen in jedem Sequenzvergleich sofort ins Auge, da sie eine ungewöhnliche Verlängerung dieser Schleife darstellen, die bisher für kein anderes Aquaporin beschrieben ist. Es wäre folglich möglich, dass die lange Schleife D den Kanal blockiert. Phosphorylierung einer Aminosäure dieser Schleife oder einer anderen Aminosäure im Protein (es sind noch 12 weitere Serine, Threonine oder Tyrosine intrazellulär lokalisiert) könnte zu seiner Konformationsänderung führen, die neue Wasserstoffbrücken oder ionische Wechselwirkungen schafft und die Pore so öffnet. Das Kinom von *D. discoideum* enthält 285 vorhergesagte Proteinkinasen, die

posttranslationale Schlüsselregulatoren in vielen zellulären Prozessen darstellen und als spezifische Schalter an der Regulation von DdAQP2 beteiligt sein könnten.

Ein Kanal-*gating* ist aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sehr wahrscheinlich, der Mechanismus scheint aber keinem bereits beschriebenen zu entsprechen. Die Komplexität der Schalter-Mechanismen (z.B. von SoPIP2;1 [94]) zeigt, dass für die genaue Aufklärung des Mechanismus für DdAQP2 noch viele weitere Versuche nötig sein werden und Faktoren wie die Beteiligung von zweiwertigen Kationen wie Calcium, Nickel, Zink und Kupfer, die Änderung des intrazellulären pH-Wertes, anderer putativer Phosphorylierungsstellen und des C-Terminus berücksichtigt werden müssen. Der C-Terminus ist zwar kurz, enthält aber ein protonierbares Histidin sowie drei putativ phosphorylierbare S/T. Des Weiteren sollten Überlegungen zur möglichen physiologischen Funktion eines *gatings* einbezogen werden (s. 5.5).

5.4 Charakterisierung von DdAQP2 in *D. discoideum*-Amöben

Um die Bedeutung von Aquaporinen für die Zellwanderung untersuchen zu können, wurde DdAQP2 nach erfolgreichen *in vitro* Funktionstests *in vivo* nachgewiesen. So konnte DdAQP2 im Rahmen dieser Arbeit erstmals in *D. discoideum*-Amöben mittels gereinigter spezifischer Antikörper (s. 4.3.1) auf Proteinebene detektiert werden (s. Abb. 4.22). Die Proteinsequenz von DdAQP2 enthält zwei mögliche Startmethionine (M1 und M18) (s. 4.1.2 und 5.3). In *X. laevis* Oocyten werden beide genutzt (s. Abb. 4.11), wohingegen in *Dictyostelien* M1 das verwendete Startmethionin zu sein scheint, wie der Western Blot (s. Abb. 4.22) zeigt. Es konnte weiter gezeigt werden, dass DdAQP2 nicht N-, aber wahrscheinlich O-glykosyliert vorliegt (s. 4.3.3). Das bedeutet, dass in *Dictyostelium*-Zellen, die in DdAQP2 vorkommende Konsensussequenz für die N-Glykosylierung (N262-Xaa-T264-Xaa [98]), die in Schleife E lokalisiert ist, nicht genutzt wird. O-Glykosylierungen finden an S und T im Protein statt, allerdings nicht an allen. Es gibt eine theoretische Studie, die künstliche neuronale Netzwerke verwendet, um O-Glykosylierungen vom N-Acetyl-Galaktosamin-Typ in *Dictyostelium*-Zellen vorherzusagen [99]. Demzufolge enthält die DdAQP2-Proteinsequenz zwei mögliche O-Glykosylierungsstellen: S244 liegt nach Topologievorhersage fast in der Membran, S75 ist in Schleife A lokalisiert und könnte so von Glykosyltransferasen gut erreicht werden. Eine spezielle Form der Gly-

kosylierung, die Phosphoglykosylierung, wurde für Proteine aus *D. discoideum*, *Trypanosoma cruzi* und *Leishmanien* beschrieben [100]. Hierbei ist N-Acetylglukosamin über einen Phosphatrest an Serin gekoppelt. Die physiologische Funktion dieser speziellen Glykosylierung ist bisher allerdings nicht bekannt. Bei der zukünftigen Untersuchung einer möglichen Phosphoglykosylierung von DdAQP2 würden nach Haynes [100] bei der Behandlung mit N-Glykosidase F keine Spaltprodukte entstehen (wie dies im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte (s. 4.3.3)), wohingegen milde saure Hydrolyse das Glykoprotein in Zucker und Phosphoaminosäure spaltet. Die Struktur der Spaltprodukte könnte dann z.B. mittels Massenspektrometrie weiter analysiert werden.

Glykosylierung dient sehr unterschiedlichen Funktionen: Post- oder cotranslationale Glykosylierung von DdAQP2 könnte das Protein vor proteolytischem Abbau schützen [101] oder wichtig für dessen korrekte Faltung sein. Weiterhin könnte die Glykosylierung entscheidend sein für das Protein-*targeting* zur Plasmamembran. Sollte Glykosylierung wirklich an einer extrazellulären Schleife stattfinden, könnten Zuckerreste als Signal für Zellwanderung wie für Leukozyten beschrieben [102] von Bedeutung sein.

Um Sekundärmodifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung von DdAQP2 näher zu untersuchen, wurden in Kooperation erste 2D-SDS-PAGE Versuche mit anschließender massenspektrometrischer Analyse unternommen. Bei der 2D-SDS-PAGE werden die Proteine in zwei Dimensionen getrennt. Die erste Dimension, die Isoelektrische Fokussierung, trennt die Proteine nach ihrem Isoelektrischen Punkt auf. In der zweiten Dimension erfolgt dann senkrecht zur ersten Dimension die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Im Western Blot sind mit dem spezifischen Antikörper α N20-34 nur vier Signale zu erkennen (s. Abb. 4.26). Diese liegen sowohl im Bereich des Isoelektrischen Punktes von DdAQP2 als auch im entsprechenden Molekulargewichtsbe- reich. Trotzdem konnte DdAQP2 massenspektrometrisch nicht identifiziert werden. Da das zugehörige 2D-SDS-PAGE eine Vielzahl von Signalen zeigte, kann es sein, dass nicht die richtigen *spots* ausgestochen werden konnten. Nachteil der 2D-SDS-PAGE ist auch, dass Proteine stark exprimierter Gene die schwach exprimierter Gene überlagern können. So könnte das Signal für DdAQP2 von einem anderen überlagert werden.

Um sicherzugehen, dass DdAQP2 in ausreichender Konzentration vorliegt, wurden deshalb Immunpräzipitationen durchgeführt. DdAQP2 konnte mittels IP aufkonzentriert werden. Im Western Blot zeigte sich allerdings, dass die Banden nicht diskret sind (s. Abb. 4.28). Dies könnte bedeuten, dass an DdAQP2 noch andere Proteine gebun-

den vorliegen, die beim Waschen nicht entfernt werden konnten. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass der für die IP verwendete Antikörper vom Sekundärantikörper erkannt wurde. So sieht man deutliche Signale bei 50 kDa und 25 kDa. Diese Molekulargewichte entsprechen den Molekulargewichten der schweren bzw. leichten Kette des Antikörpers. Das Ziel, Banden für DdAQP2 direkt auf dem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE zu sehen, ist bisher nicht erreicht worden. Zur Optimierung könnte man das SDS-PAGE mit kolloidaler Silberlösung färben, um die Empfindlichkeit zu erhöhen oder die Ansatzgröße vervielfachen, wobei der enorm hohe Antikörperverbrauch berücksichtigt werden muss. Die IP wäre auch eine geeignete Methode, um potentielle Phosphorylierungen von DdAQP2 weiter zu untersuchen, entweder durch Detektion mit phosphospezifischen Antikörpern oder durch Inkubation des Proteins mit rekombinanter Proteinkinase A und radioaktiv-markiertem Phosphat, welches dann autoradiographisch nachgewiesen werden kann. Die IP ist eine Methode, bei der es viele Variationsmöglichkeiten gibt und die optimalen Versuchsbedingungen an das jeweilige Protein angepasst werden müssen. Zur weiteren Optimierung der IP kann die Zellkonzentration bzw. das Volumen an Zelllysate variiert werden. Auch die Auswahl des Lysepuffers ist entscheidend. Er soll einerseits die Proteine in ihrer nativen Konformation belassen, so dass die Denaturierung der Antikörperbindungsstellen möglichst gering ist, andererseits aber auch ausreichend Protein freisetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Lysepuffer verwendet, der das nicht-ionische Detergenz Nonidet P-40 in einer Konzentration von 1% enthält. Dies sind die mildesten, am häufigst verwendeten Bedingungen. Sowohl die Auswahl des Detergenz als auch dessen Konzentration kann variiert werden, genauso wie die Konzentration an Salzen, zweiwertigen Kationen und der pH-Wert. Die Protein A Sepharose sollte weiterhin verwendet werden, da im Rahmen dieser Arbeit Vorversuche zeigten, dass der spezifische Antikörper α N20-34 in zufriedenstellender Ausbeute an diese bindet (s. Abb. 4.27).

5.5 Physiologische Funktion von DdAQP2?

Was ist nun aber die physiologische Funktion von DdAQP2? Das Protein wurde nach theoretischen Analysen (s. 5.1) und Funktionstests (s. 4.14) eindeutig der Sub-Familie der wasserspezifischen Aquaporine zugeordnet. Funktionstests legen weiter die starke Vermutung nahe, dass das Aquaporin *gated* ist. Eine Funktion des bereits in der Literatur beschriebenen *Dictyostelium*-Aquaporins AqpA liegt in der Sporenkeimung [65], für das

zweite beschriebene *Dictyostelium*-Aquaporin WacA ist keine Funktion beschrieben [64]. Beide Aquaporine wurden allerdings auch nur in vielzelligen Entwicklungsstadien (12-16 Stunden nach Induktion dieser) gefunden. In der Literatur ist bisher noch keine mögliche Funktion von Aquaporinen aus *Dictyostelium*-Amöben beschrieben worden.

Wichtige Hinweise auf die physiologische Funktion eines Proteins kann seine intrazelluläre Lokalisation liefern. Eine übliche Methode zur Lokalisation von Proteinen ist die Einführung eines GFP-*tags*. So wurden in *D. discoideum* Proteine wie Myosin lokalisiert [103]. Nachteile der Methode sind allerdings, dass der GFP-*tag* mit 27 kDa fast genauso groß wie DdAQP2 ist (31 kDa), C- und N-terminale *tags* verschiedene Auswirkungen auf die Lokalisation haben können [79] und für *Dictyostelium*-Zellen eine Autofluoreszenz im Bereich von 500-650 nm mit einem Maximum bei 510 nm beschrieben ist [104], welche mit den Messbedingungen bei der Fluoreszenzmikroskopie interferieren können.

In Vorversuchen wurde ermittelt, dass die Autofluoreszenz der auf Deckgläschen gezogenen *Dictyostelium*-Zellen in SPB weitestgehend verloren ging im Vergleich zu Zellen, die in Ax-Medium vermessen wurden. Die Lokalisation von N- und C-terminalem DdAQP2-GFP-Fusionsprotein unterschied sich nicht. Beide konnten in *Dictyostelium*-Amöben in mehreren Strukturen der Zelle lokalisiert werden (s. Abb. 4.29): In klar abgegrenzten intrazellulären Bereichen, punktuell in der Plasmamembran und in Pseudopodien-ähnlichen Zellausstülpungen.

Als hydrophobes Membranprotein kann DdAQP2 im Zytoplasma nicht frei vorkommen, sondern muss entweder in Vesikeln oder Membranen von Organellen lokalisiert sein. Von *hAQP2* ist bekannt, dass es in den Hauptzellen des Sammelrohres der Niere in subapicalen Bereichen der Zelle in Vesikeln gespeichert ist. Stimulation der Zellen mit Vasopressin führt zur Translokation von *hAQP2* in die apikale Membran und zur Rückresorption von Wasser [105]. So könnte das intrazellulär detektierte DdAQP2 in Vesikeln vorkommen. Diese Vesikel könnten entweder der Transportform vom Endoplasmatischen Retikulum via Golgi zur Zellmembran entsprechen oder eine Form von Speichervesikeln darstellen, die DdAQP2 aufnehmen und auf einen äußeren Stimulus hin in die Plasmamembran einbauen.

Auffällig ist allerdings, dass die DdAQP2-GFP-Fusionsproteine in verschieden großen Vesikeln gefunden wurden (s. Abb. 4.29). Acidocalcisomen sind intrazelluläre Organellen, die eine hohe Konzentration an Pyro- und Polyphosphat komplexiert mit Calcium und anderen Kationen beinhalten. Diese Organellen sind in *D. discoideum* sowie in *Trypano-*

soma cruzi mit kontraktilen Vakuolen in Verbindung gebracht worden, die der Osmoregulation dienen. Es ist postuliert, dass in *T. cruzi* eine Zellschwellung (bedingt durch eine hypoosmolare Umgebung) zur Aktivierung einer intrazellulären Adenylatzyklase führt. Diese erhöht die Konzentration an cAMP, was zu einer Aktivierung von Proteinkinase A, einer Freisetzung von basischen Aminosäuren und einer Mikrotubuli-abhängigen Fusion von Acidocalcisomen mit der kontraktilen Vakuole führt. Dabei translokalisiert das *Trypanosomen*-Aquaporin. Durch Steigerung der Ammoniakkonzentration dringt Ammoniak in Acidocalcisomen ein, wo es aufgrund des vorherrschenden pH-Wertes als Ammoniumion akkumuliert und eine Exopolyphosphatase aktiviert. Diese setzt anorganisches Phosphat und einige Phosphat-chelatierte Osmolyte frei. Dem osmotischen Gradienten folgend strömt Wasser durch das Aquaporin aus dem Zytoplasma in die Vakuole, die es dann nach außen über eine Pore abgibt [30]. Die intrazelluläre Lokalisation von DdAQP2-GFP-Fusionsproteinen ähnelt stark der Lokalisation der H⁺-PPase in Acidocalcisomen und der Blase der kontraktilen Vakuole (s. [106] Abb. 6A). Somit wäre eine Funktion von DdAQP2 in der Osmoregulation, z.B. nach oben beschriebenem Mechanismus, von *D. discoideum* denkbar. Die Erhöhung der Proteinkinase A Aktivität könnte dazu ein Stimulus für ein phosphorylierungsabhängiges *gating* darstellen.

Auch in *Amoeba proteus* wurde in den Acidocalcisomen und der kontraktilen Vakuole ein Aquaporin (ApAQP) lokalisiert. In der eben beschriebenen Literatur gilt es als erwiesen, dass das Vorhandensein eines Aquaporins existentiell wichtig für die Funktion der kontraktilen Vakuole ist. Gerade in diesem Zusammenhang wäre es also von dringendem Interesse zu untersuchen, ob noch andere Aquaporine (wie die zu Beginn der Arbeit bioinformatische gefundenen DdAQP1 und DdAQP3, s. 4.1.1) im Amöben-Stadium von *D. discoideum* vorkommen, die diese Funktion ausfüllen könnten. Um DdAQP2 intrazellulär besser lokalisieren zu können, ist geplant, in zukünftigen Versuchen Zellorganellen wie den Zellkern oder das Zytoskelett mit anzufärben. Des Weiteren ermöglicht eine immunchemische Calmodulin-Färbung die Lokalisation der Blase der kontraktilen Vakuole. Durch Übereinanderlegen dieser Bilder mit den Fluoreszenzbildern der DdAQP2-GFP-Fusionsproteine können Co-Lokalisationen farblich, durch Erzeugung einer Mischfarbe, visualisiert werden. Auch elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zelle wären denkbar, erfordern aber erheblichen technischen Aufwand. Um den Einfluss des großen GFP-tags auf die Lokalisation von DdAQP2 komplett auszuschließen, können Immunfluoreszenzversuche gemacht werden, wobei DdAQP2 in den Zellen immunchemisch mittels des spezifischen Antikörpers (s. 4.3.1) detektiert werden kann.

Die DdAQP2-GFP-Fusionsproteine wurden weiterhin in der Plasmamembran und in Zellausstülpungen detektiert. DdAQP2 könnte in der Plasmamembran lokalisiert verschiedene Funktionen haben, die im Folgenden diskutiert werden: DdAQP2 könnte eine osmoregulatorische Funktion haben und je nach äußerer Osmolarität geöffnet oder geschlossen vorliegen. Die kontraktile Vakuole ist ein Schutzmechanismus bei hypoosmolarem Stress. DdAQP2 könnte (über einen *gating*-Mechanismus) in der Plasmamembran bei hyperosmolarem Stress geschlossen werden, um zu große Wasserverluste zu vermeiden und so den Zellturgor aufrechtzuerhalten.

Eine weitere mögliche Funktion von DdAQP2 könnte eine Beteiligung an der Zellwanderung sein. Für *Dictyostelien*-Amöben sind in der Literatur zwei mögliche Bewegungsarten beschrieben: Zum einen ein amöboidaler Bewegungsstil durch Bildung von Blasen und zum anderen ein mesenchymaler Stil unter Ausbildung von Filopodien-Lamellipodien. Ersterer ist Gegenstand aktueller Forschung, da beschrieben wurde, dass metastasierende Krebszellen zwischen beiden Bewegungsarten hin- und herschalten können [107] [108]. Da von Charras *et al.* gezeigt werden konnte, dass das Volumen während der Blasenbildung konstant bleibt [109], diese also primär durch die Bewegung von Wasser in der Zelle und nicht durch die Membran beeinflusst wird, scheint eine Beteiligung von membranständigen Aquaporinen bei dieser Bewegungsart nicht gegeben. Für den mesenchymalen Bewegungsstil hingegen ist von Papadopoulos *et. al* [6] ein Modell postuliert worden, demzufolge Aquaporine an der Zellwanderung beteiligt sind. Sie vermuten, dass Aquaporine rasche Volumenänderungen, wie sie bei der Passage von Zellen durch die Extrazellulärmatrix erforderlich sind, erleichtern. Rasche Volumenänderungen sind aufgrund der schnellen Aus- und Rückbildung von Zellmembranausstülpungen wie Lamellipodien und Filopodien erforderlich. Zellen polarisieren während der Zellwanderung morphologisch und funktionell entlang ihrer Bewegungsachse [110]. Von einigen Aquaporinen wurde beschrieben, dass sie in migrierenden Zellen am Vorderende der Zelle lokalisiert sind, u.a. *hAQP1* in Endothelzellen [8], *hAQP3* in Fibroblasten [111] und *hAQP9* in neutrophilen Granulozyten [112]. Am Vorderende der Zelle sind auch einige Transporter, die in Zellmigrationsprozesse involviert sind, gefunden worden, wie der Na^+/H^+ und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher und der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Cotransporter [113]. So könnten Aktin-Depolymerisation und Ionenaufnahme zu einem lokalen osmotischen Gradienten am Vorderende der Zelle führen, dem folgend Wasser in die Zelle (durch Aquaporine) einströmt. Dies könnte einen lokalen Druckanstieg bewirken, der Raum schafft für die schnellere Dif-

fusion von G-Aktin und anderen Filopodien/Lamellipodien-bildenden Komponenten und die Polymerisation von F-Aktin, die die so entstandene Zellausstülpung stabilisieren [6]. Theoretische Analysen besagen, dass auch ohne den Einfluss von Aktin, alleine dadurch, dass Wasser in unterschiedlichem Maße vorne und hinten in die Zelle einströmt, wenn diese einem osmotischen Gradienten ausgesetzt wird, sich die Zelle in Richtung hypoosmolarer Umgebung vorwärts bewegen kann [114]. So hätten Aquaporine zwei wichtige Funktionen bei der Zellwanderung: zum einen, Zellvolumenänderungen zu erleichtern und zum anderen, die Zelle voran zu treiben.

DdAQP2-GFP-Fusionskonstrukte wurden in der gesamten Plasmamembran und in Pseudopodien-ähnlichen Zellausstülpungen gefunden. In der Literatur ist auch für andere Aquaporine beschrieben, dass sie in nicht-polarisierten Zellen gleichmäßig in der Plasmamembran verteilt sind. Für die Beteiligung von Aquaporinen an der Zellwanderung nach oben beschriebenem Mechanismus wäre ihre Polarisation aber essentiell. So konnte für *hAQP1* gezeigt werden, dass es hoch beweglich in der Plasmamembran ist [115] und so nach entsprechendem Stimulus leicht ans Vorderende der Zelle polarisieren könnte. *hAQP4* wurde *in vivo* in Astrozyten polarisiert gefunden [116], während es *in vitro* nicht-polarisiert vorliegt [117]. Der molekulare Mechanismus ist nicht bekannt, aber es wurde postuliert, dass an der Polarisation von *hAQP4* ein Komplex aus intrazellulären Proteinen, u.a. α -Syntrophin, beteiligt ist [118]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bisher allerdings nur *Dictyostelium*-Zellen untersucht, ohne dass chemotaktische Reize wie Folsäure oder cAMP zugegen waren. So könnte auch DdAQP2 in chemotaktischen Zellen ans Vorderende polarisieren. In zukünftigen Versuchen ist deshalb geplant, *Dictyostelium*-Zellen, die mit DdAQP2-GFP Fusionsproteinen transformiert wurden, einem cAMP/Folsäure-Gradienten auszusetzen und fluoreszenzmikroskopisch die Lokalisation zu verfolgen.

So spricht eine Lokalisation von DdAQP2 in der Plasmamembran dafür, dass DdAQP2 einen Kontaktpunkt zwischen Extra- und Intrazellularraum darstellt. Die Frage, ob DdAQP2 tatsächlich an der Zellwanderung beteiligt ist, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt aber noch nicht beantworten. Sollte DdAQP2 als Aquaporin an der Zellwanderung von *Dictyostelium*-Zellen beteiligt sein, macht eine Lokalisation in der gesamten Plasmamembran dann Sinn, wenn sich der postulierte *gating*-Mechanismus bestätigt. Extrazelluläres cAMP löst als *chemoattractant* eine Signalkaskade aus, bei der es unter Aktivierung von z.B. Proteinkinase A zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von DdAQP2 am Vorderende der Zelle kommen könnte, wohingegen DdAQP2 an

den Seiten und am Hinterende der Zelle geschlossen bliebe. Damit würde DdAQP2 die Bildung von frontalen Pseudopodien ermöglichen, von lateralen Pseudopodien dagegen aber verhindern und so wichtig für eine gerichtete Bewegung sein.

Zur Bestätigung der Lokalisation von DdAQP2 in der Plasmamembran sind Biotinylierungs-Assays geplant. Biotinylierte Antikörper die gegen extrazelluläre Bereiche des DdAQP2 gerichtet sind, können dieses in intakten Zellen nur erkennen, wenn es in die Membran eingebaut vorliegt. Die Detektion erfolgt dann aufgrund der hohen Affinität von Biotin zu Avidin bzw. Streptavidin unter Verwendung geeigneter Streptavidin-Enzym-Komplexe.

5.6 Ausblick

Nachdem es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, das erste Aquaporin aus *D. discoideum*-Amöben zu identifizieren und zu klonieren, seine Funktion in Form einer Mutante zu zeigen, es *in vivo* auf Proteinebene zu detektieren und als GFP-Fusionsprotein in der Zelle zu lokalisieren, ergeben sich daraus nun viele neue, spannende Fragestellungen:

1. Ist DdAQP2 wirklich *gated*?

Wie schon in 5.3 angedeutet, sind die Versuche, um dieser Frage nachzugehen, vielfältig: erfolgreiche IP mit nachfolgender 2D-SDS-PAGE und Massenspektrometrie kann Aussagen über mögliche Phosphorylierungen liefern, genau wie die Anwendung von phosphospezifischen Antikörpern auf das mittels IP isolierte DdAQP2. Auch Versuche in Oocyten mit Brom-substituierten cAMP-Analoga, die in die Zelle eindringen können und dort Kinasen aktivieren, sind denkbar. Ferner ist geplant die in Oocyten-Schwelltests aktive Schleife D Mutante $\Delta 208-219$ in *Dictyostelium*-Zellen überzuexprimieren und mögliche Auswirkungen zu beobachten. Auch eine Transformation von *Dictyostelien* mit DNA, die für *DdAQP2* mit *His-tag* kodiert und eine nachfolgende Aufreinigung erlaubt ist denkbar. So hätte man das isolierte Protein mit allen in *Dictyostelien* gemachten Sekundärmodifikationen zur weiteren Analyse vorliegen. Die Erstellung weiterer, ausgewählter Mutanten (z.B. S199D und A) sowie sinnvoller Doppel- und Tripelmutanten kann erfolgen. Hierbei sollte besonders der C-Terminus nicht außer Acht gelassen werden. Auch der Einfluss von Calcium sollte untersucht werden. Untersuchungen von abgewandelten Mutationen der im Oocyten-Schwelltest aktiven Schleife D Mutante wie z.B. $\Delta 208-212$

und $\Delta 213-219$ sind gerade in Arbeit. Sehr hilfreich zur Aufklärung der Struktur und eines möglichen *gating*-Mechanismus von DdAQP2 wäre sicherlich das Vorliegen einer Kristallstruktur. So konnten beispielsweise viele Aussagen über SoPIP2;1 anhand der Kristallstruktur gemacht werden [119]. Da die Erstellung einer solchen aber Jahre dauern kann und viel Fachwissen erforderlich ist, liegt diese Vorstellung wohl noch in weiter Ferne.

2. Was ist die physiologische Funktion von DdAQP2?

Mit den GFP-Fusionskonstrukten wurde bereits begonnen, DdAQP2 in Zellen zu lokalisieren. Optimierte Fluoreszenzaufnahmen durch z.B. angefärbten Zellkern, das Zytoskelett oder die kontraktile Vakuole könnten die Lokalisation noch genauer machen. Des Weiteren sind Immunfluoreszenzversuche mit dem spezifischen Antikörper geplant. Auch Untersuchungen, ob DdAQP2 noch in anderen Entwicklungsstadien von *D. discoideum* vorkommt, sind geplant.

Ein wichtiges Werkzeug zur weiteren Analyse der physiologischen Funktion von DdAQP2 ist die *DdAQP2-knockout* Mutante. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits ein *knockout*-Konstrukt kloniert, in *Dictyostelium*-Zellen transformiert und nach Selektion mit Blasticidin auf das Vorhandensein der *DdAQP2*-Gendeletion mittels PCR getestet. Bisher konnte allerdings noch kein *DdAQP2-knockout*-Klon identifiziert werden. Der erste kritische Parameter des *knockout*-Experimentes ist sicher die Auswahl der Linker-Arme für das *knockout*-Konstrukt. Da das *Dictyostelium*-Genom mit 77,6% (Quelle: dictyBase) sehr AT-reich ist, sind ausreichend lange Linker-Arme wichtig für eine spezifische homologe Rekombination. Gleichzeitig muß bei der Auswahl berücksichtigt werden, dass die Linker-Arme mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert werden und so geeignete Primer-Bindungsstellen gefunden werden müssen. Für den *DdAQP2-knockout* wurden die längsten möglichen Linker-Arme gewählt (546 und 946 bp), ohne dass dabei Nachbar-gene deletiert werden. Nach Transformation wachsen unter Selektionsdruck ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) nur auf den mit *knockout*-Konstrukt DNA transformierten Platten Klone, nicht auf den Platten mit leer transformierten Zellen. Dies spricht für eine erfolgreiche Transformation (wie auch in Vorexperimenten mit *GFP*-transformierten Zellen gezeigt werden konnte, s. Abb. 4.32). So wird weiter nach einem *knockout*-Klon gesucht.

Mit Vorhandensein des *DdAQP2-knockouts* können viele weitere *in vivo* Versuche erfolgen: Zunächst werden die Zellen auf phänotypische Änderungen hin untersucht werden: Wie sehen die Zellen aus? Wie lang ist die Generationszeit? Verläuft die morphologi-

sche Entwicklung bis zur Ausbildung von Sporen nach Induktion des Hungerstadiums wie bei Wildtyp-Zellen? Hat die Gendeletion ferner einen Einfluss auf die Reaktion der Zellen auf hypo- oder hyperosmolaren Stress? Funktioniert die kontraktile Vakuole einwandfrei? Des Weiteren sind mit dem *knockout*-Stamm vergleichende Chemotaxisassays geplant. In der Literatur sind viele qualitative und quantitative Assays zur Untersuchung von Chemotaxis beschrieben, sowohl für Einzelzellen-Wanderung im Folsäuregradienten als auch für Gruppenzell-Wanderung im cAMP-Gradienten. Zwei-Kammer Testsysteme, bei denen die Kammern durch Filter entsprechender Porengröße getrennt sind und Zellen und Lockstoff sich in unterschiedlichen Kammern befinden, sind weit verbreitet: Die Zigmond-Kammer erlaubt die direkte Observation von Einzelzellen in einem stabilen räumlichen *chemoattractant* Gradienten. Die Zellen werden mittels Lichtmikroskopie detektiert und können quantifiziert werden. Als nachteilig wird für diesen Assay aber beschrieben, dass der Gradient nur sehr kurze Zeit aufrechterhalten werden kann und erschwerig zu etablieren ist. Der Boyden-Filter Assay ist ebenfalls ein quantitativer Assay. Die Zellen wandern durch die Poren des Filters und können im Plattenleser gefärbt und analysiert werden. Nachteilig ist, dass die Zellen nicht direkt beobachtet werden können und der Gradient auch hier nicht lange anhält. Für Chemotaxisversuche mit *Dictyostelium* besonders günstig erscheint die Chemotaxis unter/in Agarose. Auf einer Agaroseplatte können im in-Agarose Assay in bestimmtem Abstand Zellen und Lockstoff pipettiert und die Bewegungen registriert werden. Es ist allerdings schwierig, so Einzelzellen zu beobachten. Der unter-Agarose Folat Chemotaxis-Assay [120] hat dagegen für die Untersuchung des Einflusses von *DdAQP2* auf die Zellwanderung viele Vorteile: Die Zellen polarisieren in dem Folat-Gradienten und so können z.B. mittels Fluoreszenzmikroskopie Proteine während der Wanderung lokalisiert werden. Da die Zellen ihren Weg durch die Agarose finden müssen, werden Defizite in der Kraftgeneration und Zellbewegung offenkundig. Die Fähigkeit der *knockout*-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen ihren Weg durch die Agarose zu finden und die Geschwindigkeit mit der sie dies tun, kann gemessen werden. Mit entsprechenden Mikroskopen und Vergrößerungen kann jede Zelle bei der Wanderung einzeln beobachtet und analysiert werden.

Als weiterer vergleichender Assay zwischen Wildtyp- und *knockout*-Zellen wurden schon erste Experimente mit der *Stopped-Flow*-Apparatur durchgeführt. Durch Messung der dynamischen Lichtstreuung konnte im hypertonen Solutgradienten eine gute Wasserleitfähigkeit der Wildtyp-Zellen gezeigt werden. So wird es interessant sein zu sehen, ob diese sich bei Fehlen von *DdAQP2* ändert. In diesem Zusammenhang dürfen auch die

anderen beiden theoretisch gefundenen putativen Aquaporine, DdAQP1 und DdAQP3, nicht vergessen werden. Diese werden zur Zeit im Arbeitskreis kloniert und Antikörper generiert. Ob diese beiden auch in *Dictyostelium*-Amöben vorkommen, oder nur in multizellulären Entwicklungsstadien vorkommen, wird noch herauszufinden sein.

6 Zusammenfassung

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob Aquaporine an der Zellwanderung beteiligt sind, wurde in dieser Arbeit *D. discoideum* als Modellorganismus verwendet. Ausgangspunkt war die Identifizierung von drei neuen putativen Aquaporin-Genen im Genom von *D. discoideum*. Der Schwerpunkt der Arbeit wurde auf *DdAQP2* gelegt, welches aus cDNA von *D. discoideum*-Amöben erfolgreich amplifiziert werden konnte. Erste phänotypische Wachstumstests mit *S. cerevisiae* deuteten auf fehlende Methylaminleitfähigkeit hin. In *X. laevis*-Oocyten Schwelltests konnte trotz erfolgreicher cRNA-Synthese und Expression von *DdAQP2* weder Wasser- noch Harnstoff- oder Glyceroleitfähigkeit festgestellt werden. Auch eine Änderung des externen pH-Wertes und das Abschneiden des zur Detektion verwendeten HA-tags führte zu keiner Aktivierung. Nachdem in Protein-Sequenzvergleichen strukturelle Besonderheiten von DdAQP2 aufgefallen waren, wurden acht Mutanten hergestellt und mit Hilfe von Oocyten-Schwelltests analysiert. Nur die Mutante $\Delta 208-219$ führte zu einer fünffach erhöhten Schwellrate gegenüber Kontroll-Oocyten. Es konnte damit gezeigt werden, dass DdAQP2 ein aktiver Wasserkanal sein kann. In Kooperation durchgeführte dynamische Lichtstreuungsmessungen bestätigten dies. Die Ergebnisse legen einen *gating*-Mechanismus nahe, an dem die Schleife D, aber nicht der N-Terminus beteiligt zu sein scheint. Des Weiteren konnte DdAQP2 in *D. discoideum*-Amöben auf Proteinebene mit einem im Rahmen dieser Arbeit affinitätsgereinigten Antikörpers nachgewiesen werden. Für DdAQP2 wurden drei Banden im Western Blot detektiert. Die 31 kDa zeigte, dass in *D. discoideum* das erste Methionin das verwendete Startcodon ist. Zur Erklärung der 38 kDa Bande konnte gezeigt werden, dass keine N-Glykosylierung vorliegt. In Kooperation innerhalb der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass DdAQP2 vermutlich O-glykosyliert vorliegt. Die 90 kDa Bande konnte im Präblock als unspezifisch identifiziert werden. In in Kooperation durchgeführten 2D-SDS-PAGE/Massenspektrometrie-Versuchen zur Aufklärung weiterer Sekundärmodifikationen konnte DdAQP2 nicht identifiziert werden. Die dafür wichtige Immunpräzipitation erfordert noch Optimierung, wobei in Vorversuchen eine ausreichend gute Bindung

des spezifischen Antikörpers an das Säulenmaterial gezeigt worden war. Zur intrazellulären Lokalisation von DdAQP2 wurden Fusionsproteine mit C- bzw. N-terminalem GFP verwendet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen minimale Lokalisationsunterschiede der beiden Konstrukte. Beide zeigten Fluoreszenz in intrazellulären Foki, in der Plasmamembran und in Pseudopodien-artigen Zellausstülpungen. Neben den Oocyten-Schwelltests wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die *Dictyostelium*-Zellkultur im Arbeitskreis etabliert. Es wurde ein *DdAQP2-knockout*-Konstrukt kloniert und damit erfolgreich *Dictyostelium*-Amöben transformiert. Bisher konnte nur unspezifische Integration festgestellt werden. Im Hinblick auf spätere Vergleichsmessungen der Wasserpermeabilität von *D. discoideum*-Wildtyp und *DdAQP2-knockout* Zellen wurden Messungen mit der Stopped-Flow-Apparatur etabliert. Ein τ -Wert von 0,05s deutet auf eine Wasserleitfähigkeit der Zellen hin, die über der von reinen Lipidmembranen liegt. So wird es in zukünftigen Experimenten spannend sein, zu sehen, wie gut Zellen mit deletiertem *DdAQP2*-Gen Wasser leiten können.

7 Summary

To elucidate the role of aquaporins in cell migration, *Dictyostelium discoideum* was used as a model in the present work. Starting point was the identification of three new putative aquaporin-genes in the genome of *D. discoideum*. The focus is mainly on *DdAQP2* which could be successfully amplified from cDNA of *D. discoideum* amoeba. Initial phenotypic growth assays with *S. cerevisiae* indicate absent methylammonia permeability. In swelling assays with *X. laevis* oocytes neither water nor urea or glycerol permeability was detected. Changes in external pH and cutting-off of an HA-tag, that had been used for detection, could not activate the channel. After determination of structural specific features of DdAQP2 by protein sequence comparisons eight mutants were prepared and analysed in oocyte swelling assays. Solely mutant $\Delta 208-219$ yielded water permeability 5-fold above background. It was therefore shown that DdAQP2 could be an active water channel. Dynamic light scattering analysis carried out in collaboration confirmed the results obtained from swelling assays. These results hint at a gating mechanism involving loop D but probably not the N-terminus. In addition, DdAQP2 could be detected with an antibody that had been purified by affinity-chromatography. For DdAQP2 three bands could be detected in Western blot analysis. 31 kDa indicate that the first methionine is the protein start in DdAQP2. It could be shown that DdAQP2 is not N-glycosylated. In cooperation within the group it was shown, that DdAQP2 is presumably O-glycosylated. The band at 90 kDa could be identified as unspecific in preblocks. 2D-SDS/mass spectrometry experiments could not identify DdAQP2. Immunoprecipitation needs to be optimised, although binding of the specific antibody to the column beads was sufficient. To localize DdAQP2 within the cell, C-/ N-terminal fusionproteins were used. Fluorescent microscopy pictures show minimal differences in the distribution of the constructs. Both show fluorescence in intracellular foci, within the plasma membrane and in pseudopodia-like protrusions. In addition to oocyte swelling assays, *Dictyostelium* cell culture was established in the group. To prepare a DdAQP2-knockout mutant a knockout construct had been cloned and *Dictyostelium* was successfully trans-

formed. So far only unspecific integration was found. In terms of subsequent comparative measurements of water permeability of *D. discoideum* wildtype and DdAQP2-knockout cells, Stopped-Flow measurements were established. A τ value of 0.05 s indicates water permeability. It will be exciting to determine how well cells with *DdAQP2* gene deletion are able to transport water.

8 Literaturverzeichnis

- [1] C. A. Parent. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and Dictyostelium. *Curr Opin Cell Biol*, 16(1):4–13, Feb 2004.
- [2] H. Komuro and P. Rakic. Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations. *J Neurobiol*, 37(1):110–130, Oct 1998.
- [3] A. U. Dignass. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm Bowel Dis*, 7(1):68–77, Feb 2001.
- [4] I. F. Charo and M. B. Taubman. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*, 95(9):858–866, Oct 2004.
- [5] L. Trusolino and P. M. Comoglio. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer*, 2(4):289–300, Apr 2002.
- [6] M. C. Papadopoulos, S. Saadoun, and A. S. Verkman. Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch*, 456(4):693–700, Jul 2008.
- [7] A. Schwab, V. Nechyporuk-Zloy, A. Fabian, and C. Stock. Cells move when ions and water flow. *Pflugers Arch*, 453(4):421–432, Jan 2007.
- [8] S. Saadoun, M. C. Papadopoulos, M. Hara-Chikuma, and A. S. Verkman. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature*, 434(7034):786–792, Apr 2005.
- [9] J. B. Heymann and A. Engel. Structural clues in the sequences of the aquaporins. *J Mol Biol*, 295(4):1039–1053, Jan 2000.
- [10] R. Zardoya. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell*, 97(6):397–414, Jun 2005.

- [11] P. Agre, S. Sasaki, and M. J. Chrispeels. Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am J Physiol*, 265(3 Pt 2):F461, Sep 1993.
- [12] F. Magni, C. Sarto, D. Ticozzi, M. Soldi, N. Bosso, P. Mocarelli, and M. G. Kienle. Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics*, 6(20):5637–5649, Oct 2006.
- [13] C. Maurel. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Lett*, 581(12):2227–2236, May 2007.
- [14] T. Walz, B. L. Smith, P. Agre, and A. Engel. The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP. *EMBO J*, 13(13):2985–2993, Jul 1994.
- [15] J. H. Park and M. H. Saier. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol*, 153(3):171–180, Oct 1996.
- [16] H. Sui, B. G. Han, J. K. Lee, P. Walian, and B. K. Jap. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, 414(6866):872–878, 2001.
- [17] D. Wree, B. Wu, T. Zeuthen, and E. Beitz. Requirement for asparagine in the aquaporin NPA sequence signature motifs for cation exclusion. *FEBS J*, 278(5):740–748, Mar 2011.
- [18] D. Kozono, M. Yasui, L. S. King, and P. Agre. Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. *J Clin Invest*, 109(11):1395–1399, Jun 2002.
- [19] E. Beitz, B. Wu, L. M. Holm, J. E. Schultz, and T. Zeuthen. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(2):269–274, Jan 2006.
- [20] P. Agre and D. Kozono. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett*, 555(1):72–78, Nov 2003.
- [21] B. Wu and E. Beitz. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cell Mol Life Sci*, 64(18):2413–2421, Sep 2007.

- [22] E. Tajkhorshid, P. Nollert, M. Ø. Jensen, L. J. W. Miercke, J. O'Connell, R. M. Stroud, and K. Schulten. Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science*, 296(5567):525–530, Apr 2002.
- [23] M. J. Tamás, S. Karlgren, R. M. Bill, K. Hedfalk, L. Allegri, M. Ferreira, J. M. Thevelein, J. Rydström, J. G. L. Mullins, and S. Hohmann. A short regulatory domain restricts glycerol transport through yeast Fps1p. *J Biol Chem*, 278(8):6337–6345, Feb 2003.
- [24] S. Törnroth-Horsefield, Y. Wang, K. Hedfalk, U. Johanson, M. Karlsson, E. Tajkhorshid, R. Neutze, and P. Kjellbom. Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439(7077):688–694, Feb 2006.
- [25] T. Gonen and T. Walz. The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys*, 39(4):361–396, Nov 2006.
- [26] M. Yasui. pH regulated anion permeability of aquaporin-6. *Handb Exp Pharmacol*, (190):299–308, 2009.
- [27] K. Ishibashi. Aquaporin superfamily with unusual npa boxes: S-aquaporins (superfamily, sip-like and subcellular-aquaporins). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 52(7):20–27, 2006.
- [28] A. S. Verkman. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci*, 118(Pt 15):3225–3232, Aug 2005.
- [29] C. Maurel, L. Verdoucq, D.-T. Luu, and V. Santoni. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol*, 59:595–624, 2008.
- [30] P. Rohloff and R. Docampo. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*, 118(1):17–24, Jan 2008.
- [31] E. Nishihara, E. Yokota, A. Tazaki, H. Orii, M. Katsuhara, K. Kataoka, H. Igarashi, Y. Moriyama, T. Shimmen, and S. Sonobe. Presence of aquaporin and V-ATPase on the contractile vacuole of *Amoeba proteus*. *Biol Cell*, 100(3):179–188, Mar 2008.
- [32] E. Beitz. Jammed traffic impedes parasite growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(35):13855–13856, Aug 2007.

- [33] S. Saadoun, M. C. Papadopoulos, H. Watanabe, D. Yan, G. T. Manley, and A. S. Verkman. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci*, 118(Pt 24):5691–5698, Dec 2005.
- [34] M. H. Levin and A. S. Verkman. Aquaporin-3-dependent cell migration and proliferation during corneal re-epithelialization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(10):4365–4372, Oct 2006.
- [35] J. R. Thiagarajah, D. Zhao, and A. S. Verkman. Impaired enterocyte proliferation in aquaporin-3 deficiency in mouse models of colitis. *Gut*, 56(11):1529–1535, Nov 2007.
- [36] M. Hara-Chikuma and A. S. Verkman. Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J Mol Med*, 86(2):221–231, Feb 2008.
- [37] J. E. Rash, T. Yasumura, C. S. Hudson, P. Agre, and S. Nielsen. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20):11981–11986, Sep 1998.
- [38] S. Diez, G. Gerisch, K. Anderson, A. Müller-Taubenberger, and T. Bretschneider. Subsecond reorganization of the actin network in cell motility and chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(21):7601–7606, May 2005.
- [39] O. Brefeld. Dictyostelium mucoroides. Ein neuer Organsimus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft Frankfurt*, 7:85–107, 1869.
- [40] K. B. Raper. Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.*, 50:135–147, 1935.
- [41] P. Schaap. Evolutionary crossroads in developmental biology: Dictyostelium discoideum. *Development*, 138(3):387–396, Feb 2011.
- [42] L. Eichinger, J. A. Pachebat, G. Glöckner, M-A. Rajandream, R. Sucgang, M. Berri-man, J. Song, R. Olsen, K. Szafranski, Q. Xu, B. Tunggal, S. Kummerfeld, M. Madera, B. A. Konfortov, F. Rivero, A. T. Bankier, R. Lehmann, N. Hamlin, R. Davies, P. Gaudet, P. Fey, K. Pilcher, G. Chen, D. Saunders, E. Sodergren,

- P. Davis, A. Kerhornou, X. Nie, N. Hall, C. Anjard, L. Hemphill, N. Bason, P. Farbrother, B. Desany, E. Just, T. Morio, R. Rost, C. Churcher, J. Cooper, S. Haydock, N. van Driessche, A. Cronin, I. Goodhead, D. Muzny, T. Mourier, A. Pain, M. Lu, D. Harper, R. Lindsay, H. Hauser, K. James, M. Quiles, M. Madan Babu, T. Saito, C. Buchrieser, A. Wardroper, M. Felder, M. Thangavelu, D. Johnson, A. Knights, H. Loulseged, K. Mungall, K. Oliver, C. Price, M. A. Quail, H. Urushihara, J. Hernandez, E. Rabbinowitsch, D. Steffen, M. Sanders, J. Ma, Y. Kohara, S. Sharp, M. Simmonds, S. Spiegler, A. Tivey, S. Sugano, B. White, D. Walker, J. Woodward, T. Winckler, Y. Tanaka, G. Shaulsky, M. Schleicher, G. Weinstock, A. Rosenthal, E. C. Cox, R. L. Chisholm, R. Gibbs, W. F. Loomis, M. Platzer, R. R. Kay, J. Williams, P. H. Dear, A. A. Noegel, B. Barrell, and A. Kuspa. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 435(7038):43–57, May 2005.
- [43] T. Nara, T. Hshimoto, and T. Aoki. Evolutionary implications of the mosaic pyrimidine-biosynthetic pathway in eukaryotes. *Gene*, 257(2):209–222, Oct 2000.
- [44] S. Bozzaro and E. Ponte. Cell adhesion in the life cycle of *Dictyostelium*. *Experientia*, 51(12):1175–1188, Dec 1995.
- [45] M. J. Gardner, N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, I. T. Paulsen, K. James, J. A. Eisen, K. Rutherford, S. L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M.-S. Chan, V. Nene, S. J. Shalloom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. W. Mather, A. B. Vaidya, D. M. A. Martin, A. H. Fairlamb, M. J. Fraunholz, D. S. Roos, S. A. Ralph, G. I. McFadden, L. M. Cummings, G. M. Subramanian, C. Mungall, J. C. Venter, D. J. Carucci, S. L. Hoffman, C. Newbold, R. W. Davis, C. M. Fraser, and B. Barrell. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906):498–511, Oct 2002.
- [46] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck,

D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissole, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blöcker, K. Hornischer, G. Nord-siek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Honkamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong,

- J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y. J. Chen, J. Szustakowki, and International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921, Feb 2001.
- [47] G. Shaulsky and R. H. Kessin. The cold war of the social amoebae. *Curr Biol*, 17(16):R684–R692, Aug 2007.
- [48] M. Clarke and R. H. Gomer. PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of Dictyostelium. *Experientia*, 51(12):1124–1134, Dec 1995.
- [49] S. J. Annesley and P. R. Fisher. Dictyostelium discoideum—a model for many reasons. *Mol Cell Biochem*, 329(1-2):73–91, Sep 2009.
- [50] R. S. B. Williams, K. Boeckeler, R. Gräf, A. Müller-Taubenberger, Z. Li, R. R. Isberg, D. Wessels, D. R. Soll, H. Alexander, and S. Alexander. Towards a molecular understanding of human diseases using Dictyostelium discoideum. *Trends Mol Med*, 12(9):415–424, Sep 2006.
- [51] A. R. Kimmel and J. Faix. Generation of multiple knockout mutants using the Cre-loxP system. *Methods Mol Biol*, 346:187–199, 2006.
- [52] A. Kuspa. Restriction enzyme-mediated integration (REMI) mutagenesis. *Methods Mol Biol*, 346:201–209, 2006.
- [53] M. Kuhlmann, B. Popova, and W. Nellen. RNA interference and antisense-mediated gene silencing in Dictyostelium. *Methods Mol Biol*, 346:211–226, 2006.
- [54] M. Maniak. Conserved features of endocytosis in Dictyostelium. *Int Rev Cytol*, 221:257–287, 2002.
- [55] D. Duhon and J. Cardelli. The regulation of phagosome maturation in Dictyostelium. *J Muscle Res Cell Motil*, 23(7-8):803–808, 2002.
- [56] S. Hägele, R. Köhler, H. Merkert, M. Schleicher, J. Hacker, and M. Steinert. Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus Legionella. *Cell Microbiol*, 2(2):165–171, Apr 2000.
- [57] M. Rehberg, J. Kleylein-Sohn, J. Faix, T.-H. Ho, I. Schulz, and R. Gräf. Dictyostelium LIS1 is a centrosomal protein required for microtubule/cell cortex interactions,

- nucleus/centrosome linkage, and actin dynamics. *Mol Biol Cell*, 16(6):2759–2771, Jun 2005.
- [58] C. Barth, P. Le, and P. R. Fisher. Mitochondrial biology and disease in Dictyostelium. *Int Rev Cytol*, 263:207–252, 2007.
- [59] T. Jin, X. Xu, J. Fang, N. Isik, J. Yan, J. A. Brzostowski, and D. Hereld. How human leukocytes track down and destroy pathogens: lessons learned from the model organism Dictyostelium discoideum. *Immunol Res*, 43(1-3):118–127, 2009.
- [60] T. Jin, X. Xu, and D. Hereld. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine*, 44(1):1–8, Oct 2008.
- [61] A. R. Kimmel and C. A. Parent. The signal to move: D. discoideum go orienteering. *Science*, 300(5625):1525–1527, Jun 2003.
- [62] F. Lang, G. L. Busch, M. Ritter, H. Völkl, S. Waldegger, E. Gulbins, and D. Häussinger. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev*, 78(1):247–306, Jan 1998.
- [63] S. F. Pedersen, E. K. Hoffmann, and J. W. Mills. The cytoskeleton and cell volume regulation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 130(3):385–399, Oct 2001.
- [64] K. M. Flick, G. Shaulsky, and W. F. Loomis. The *wacA* gene of Dictyostelium discoideum is a developmentally regulated member of the MIP family. *Gene*, 195(2):127–130, Aug 1997.
- [65] B. N. Mitra, R. Yoshino, T. Morio, M. Yokoyama, M. Maeda, H. Urushihara, and Y. Tanaka. Loss of a member of the aquaporin gene family, *aqpa* affects spore dormancy in Dictyostelium. *Gene*, 251(2):131–139, Jun 2000.
- [66] D. Hanahan. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4):557–580, Jun 1983.
- [67] S. N. Cohen, A. C. Chang, and L. Hsu. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(8):2110–2114, Aug 1972.

- [68] C. T. Chung, S. L. Niemela, and R. H. Miller. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7):2172–2175, Apr 1989.
- [69] B. Wu, K. Altmann, I. Barzel, S. Krehan, and E. Beitz. A yeast-based phenotypic screen for aquaporin inhibitors. *Pflugers Arch*, 456(4):717–720, Jul 2008.
- [70] K. Luyten, J. Albertyn, W. F. Skibbe, B. A. Prior, J. Ramos, J. M. Thevelein, and S. Hohmann. Fps1, a yeast member of the mip family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J*, 14(7):1360–1371, Apr 1995.
- [71] A. M. Marini, S. Vissers, A. Urrestarazu, and B. André. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 13(15):3456–3463, Aug 1994.
- [72] S. J. Charette and P. Cosson. Preparation of genomic DNA from *Dictyostelium discoideum* for PCR analysis. *Biotechniques*, 36(4):574–575, Apr 2004.
- [73] E. Beitz. Texshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics*, 16(2):135–139, Feb 2000.
- [74] M. Hansen, J. F. J. Kun, J. E. Schultz, and E. Beitz. A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Biol Chem*, 277(7):4874–4882, Feb 2002.
- [75] D. Schwarz, F. Junge, F. Durst, N. Frölich, B. Schneider, S. Reckel, S. Sobhanifar, V. Dötsch, and F. Bernhard. Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat Protoc*, 2(11):2945–2957, 2007.
- [76] L. Kai, R. Kaldenhoff, J. Lian, X. Zhu, V. Dötsch, F. Bernhard, P. Cen, and Z. Xu. Preparative scale production of functional mouse aquaporin 4 using different cell-free expression modes. *PLoS One*, 5(9):e12972, 2010.
- [77] U. Roth, S. Müller, and F.-G. Hanisch. Proteomic analysis of *Dictyostelium discoideum*. *Methods Mol Biol*, 346:95–109, 2006.

- [78] H. Schägger and G. von Jagow. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166(2):368–379, Nov 1987.
- [79] C. E. Gustafson, S. Levine, T. Katsura, M. McLaughlin, M. D. Aleixo, B. K. Tamarappoo, A. S. Verkman, and D. Brown. Vasopressin regulated trafficking of a green fluorescent protein-aquaporin 2 chimera in LLC-PK1 cells. *Histochem Cell Biol*, 110(4):377–386, Oct 1998.
- [80] A. Engel, Y. Fujiyoshi, and P. Agre. The importance of aquaporin water channel protein structures. *EMBO J*, 19(5):800–806, Mar 2000.
- [81] S. Pavlovic-Djuranovic, J. E. Schultz, and E. Beitz. A single aquaporin gene encodes a water/glycerol/urea facilitator in *Toxoplasma gondii* with similarity to plant tonoplast intrinsic proteins. *FEBS Lett*, 555(3):500–504, Dec 2003.
- [82] E. Beitz, S. Pavlovic-Djuranovic, M. Yasui, P. Agre, and J. E. Schultz. Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* by mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(5):1153–1158, Feb 2004.
- [83] N. L. Uzcategui, A. Szallies, S. Pavlovic-Djuranovic, M. Palmada, K. Figarella, C. Boehmer, F. Lang, . Beitz, and M. Duszenko. Cloning, heterologous expression, and characterization of three aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, 279(41):42669–42676, Oct 2004.
- [84] T. Zeuthen, B. Wu, S. Pavlovic-Djuranovic, L. M. Holm, N. L. Uzcategui, M. D., J. F.J. Kun, J. E. Schultz, and E. Beitz. Ammonia permeability of the aquaglyceroporins from *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, 61(6):1598–1608, Sep 2006.
- [85] Y. Wang, K. Schulten, and E. Tajkhorshid. What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure*, 13(8):1107–1118, Aug 2005.
- [86] R. M. Stroud, D. Savage, L. J. W. Miercke, J. K. Lee, S. Khademi, and W. Harries. Selectivity and conductance among the glycerol and water conducting aquaporin family of channels. *FEBS Lett*, 555(1):79–84, Nov 2003.

- [87] A. Froger, B. Tallur, D. Thomas, and C. Delamarche. Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Sci*, 7(6):1458–1468, Jun 1998.
- [88] G. M. Preston, T. P. Carroll, W. B. Guggino, and P. Agre. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 256(5055):385–387, Apr 1992.
- [89] B. Wu, C. Steinbronn, M. Alsterfjord, T. Zeuthen, and E. Beitz. Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *EMBO J*, 28(15):2188–2194, Aug 2009.
- [90] I. Johansson, M. Karlsson, V. K. Shukla, M. J. Chrispeels, C. Larsson, and P. Kjellbom. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*, 10(3):451–459, Mar 1998.
- [91] K. L. Németh-Cahalan and J. E. Hall. pH and calcium regulate the water permeability of aquaporin 0. *J Biol Chem*, 275(10):6777–6782, Mar 2000.
- [92] T. Zeuthen and D. A. Klaerke. Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H(+). *J Biol Chem*, 274(31):21631–21636, Jul 1999.
- [93] M. Yasui, A. Hazama, T. H. Kwon, S. Nielsen, W. B. Guggino, and P. Agre. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature*, 402(6758):184–187, Nov 1999.
- [94] K. Hedfalk, S. Törnroth-Horsefield, M. Nyblom, U. Johanson, P. Kjellbom, and R. Neutze. Aquaporin gating. *Curr Opin Struct Biol*, 16(4):447–456, Aug 2006.
- [95] G. Fischer, U. Kosinska-Eriksson, C. Aponte-Santamaría, M. Palmgren, C. Geijer, K. Hedfalk, S. Hohmann, B. L. de Groot, R. Neutze, and K. Lindkvist-Petersson. Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 angstrom reveals a novel gating mechanism. *PLoS Biol*, 7(6):e1000130, Jun 2009.
- [96] C. Silberstein, R. Bouley, Y. Huang, P. Fang, N. Pastor-Soler, D. Brown, and A. N. Van Hoek. Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287(3):F501–F511, Sep 2004.

- [97] G. Tamma, J. H. Robben, C. Trimpert, M. Boone, and P. M. T. Deen. Regulation of AQP2 localization by S256 and S261 phosphorylation and ubiquitination. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300(3):C636–C646, Mar 2011.
- [98] E. Bause. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J*, 209(2):331–336, Feb 1983.
- [99] R. Gupta, E. Jung, A. A. Gooley, K. L. Williams, S. Brunak, and J. Hansen. Scanning the available Dictyostelium discoideum proteome for O-linked GlcNAc glycosylation sites using neural networks. *Glycobiology*, 9(10):1009–1022, Oct 1999.
- [100] P. A. Haynes. Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology*, 8(1):1–5, Jan 1998.
- [101] Nasir ud Din, D. C. Hoessli, E. Rungger-Brändle, S. A. Hussain, and E. Walker-Nasir. Role of sialic acid and sulfate groups in cervical mucus physiological functions: study of *Macaca radiata* glycoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1623(2-3):53–61, Oct 2003.
- [102] M. Sperandio, C. A. Gleissner, and K. Ley. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol Rev*, 230(1):97–113, Jul 2009.
- [103] J. H. Sabry, S. L. Moores, S. Ryan, J. H. Zang, and J. A. Spudich. Myosin heavy chain phosphorylation sites regulate myosin localization during cytokinesis in live cells. *Mol Biol Cell*, 8(12):2605–2615, Dec 1997.
- [104] R. Engel, P. J. M. Van Haastert, and A. J. W. G. Visser. Spectral characterization of Dictyostelium autofluorescence. *Microsc Res Tech*, 69(3):168–174, Mar 2006.
- [105] S. Nielsen, C. L. Chou, D. Marples, E. I. Christensen, B. K. Kishore, and M. A. Knepper. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(4):1013–1017, Feb 1995.
- [106] N. Marchesini, F. A. Ruiz, M. Vieira, and R. Docampo. Acidocalcisomes are functionally linked to the contractile vacuole of Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem*, 277(10):8146–8153, Mar 2002.

- [107] E. Sahai and C. J. Marshall. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*, 5(8):711–719, Aug 2003.
- [108] P. Friedl and K. Wolf. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3(5):362–374, May 2003.
- [109] G. T. Charras, J. C. Yarrow, M. A. Horton, L. Mahadevan, and T. J. Mitchison. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature*, 435(7040):365–369, May 2005.
- [110] S. Mañes, C. Gómez-Moutón, R. A. Lacalle, S. Jiménez-Baranda, E. Mira, and C. Martínez-A. Mastering time and space: immune cell polarization and chemotaxis. *Semin Immunol*, 17(1):77–86, Feb 2005.
- [111] C. Cao, Y. Sun, S. Healey, Z. Bi, G. Hu, S. Wan, N. Kouttab, W. Chu, and Y. Wan. Egrf-mediated expression of aquaporin-3 is involved in human skin fibroblast migration. *Biochem J*, 400(2):225–234, Dec 2006.
- [112] V.-M. Loitto, T. Forslund, T. Sundqvist, K.-E. Magnusson, and M. Gustafsson. Neutrophil leukocyte motility requires directed water influx. *J Leukoc Biol*, 71(2):212–222, Feb 2002.
- [113] A. Schwab. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280(5):F739–F747, May 2001.
- [114] M. Jaeger, M. Carin, M. Medale, and G. Tryggvason. The osmotic migration of cells in a solute gradient. *Biophys J*, 77(3):1257–1267, Sep 1999.
- [115] J. M. Crane and A. S. Verkman. Long-range nonanomalous diffusion of quantum dot-labeled aquaporin-1 water channels in the cell plasma membrane. *Biophys J*, 94(2):702–713, Jan 2008.
- [116] S. Nielsen, E. A. Nagelhus, M. Amiry-Moghaddam, C. Bourque, P. Agre, and O. P. Ottersen. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*, 17(1):171–180, Jan 1997.

- [117] E. Solenov, H. Watanabe, G. T. Manley, and A. S. Verkman. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(2):C426–C432, Feb 2004.
- [118] J. D. Neely, M. Amiry-Moghaddam, O. P. Ottersen, S. C. Froehner, P. Agre, and M. E. Adams. Syntrophin-dependent expression and localization of aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24):14108–14113, Nov 2001.
- [119] W. Kukulski, A. D. Schenk, U. Johanson, T. Braun, B. L. de Groot, D. Fotiadis, P. Kjellbom, and A. Engel. The 5A structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1. *J Mol Biol*, 350(4):611–616, Jul 2005.
- [120] D. Woznica and D. A. Knecht. Under-agarose chemotaxis of *Dictyostelium discoideum*. *Methods Mol Biol*, 346:311–325, 2006.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die Abhandlung, abgesehen von der Betrachtung durch den Betreuer, nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Die Arbeit ist entstanden unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Julia von Bülow

Kiel, Juni 2011

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Eric Beitz. Ich möchte ihm herzlich für die Überlassung des spannenden Themas (wobei er damit meine sicher noch lang anhaltende Faszination für Schleimpilze geweckt hat), die vielen inspirierenden Gespräche und seine Förderung danken.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Matthias Leippe und Ranjani für die ersten Schleimpilzzellen und ihre große Hilfe bei der Zellkultur.

Herrn Prof. Dr. Markus Bleich und Thomas danke ich für ihre große Hilfe mit den *Xenopus* Frosch-Weibchen.

Bedanken möchte ich mich bei allen Kollegen und Angehörigen des Instituts und meinem Arbeitskreis für das nette Arbeitsklima und die Unterstützung. Doro und Nadine sei nicht nur für viele Diskussionen im Labor, sondern vor allem auch für ihren Zuspruch in privat schweren Zeiten herzlich gedankt. Danke an die Büro-Mädels für die schöne Zeit und an Dawid und Sinja, die mich oft dazu bringen, Dinge von einer ganz anderen Seite zu betrachten.

Heyka, Björn, Momme, Helen und Meike sei herzlich für die gute und lustige (wenn auch teils chaotische ;-)) Zusammenarbeit bei der Betreuung des achten Semesters gedankt.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Schwester, Eri und Josef und meinen Freunden, besonders Kathrin, Kathrin und Nadine. Ein riesiges Dankeschön gilt meinen Eltern für die Liebe und Hilfe zu jeder Zeit. Besonders meine Mutter hat mich immer dazu ermutigt, meinen Träumen zu folgen.

Vielen lieben Dank Euch allen!

Lebenslauf

persönliche Daten

Name	Julia von Bülow
geboren im	Dezember 1979
Geburtsort	Reinbek
Nationalität	Deutsch

Schule und Studium

1999	Abitur am Sachsenwaldgymnasium Reinbek
2005	3. Staatsexamen in Pharmazie an der CAU zu Kiel, Approbation als Apothekerin

Promotion

seit 2007	Promotion zum Thema: „Sind Aquaporine an der Zellwanderung beteiligt?“ am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der CAU zu Kiel (Prof. Dr. Eric Beitz), wissenschaftliche Mitarbeiterin, Betreuung des 8. Fachsemesters Pharmazie (Arzneistoffanalytik)
-----------	--

Vorträge

Vortrag „Are aquaporin water channels required for cell migration“ auf dem DPhG-Doktorandenkongress in Heringsdorf (2011)

Publikationen

E. Beitz, D. Becker, J. von Bülow, C. Conrad, F. Fricke, N. Geadkaew, D. Krenc, H. Long, J. Song, D. Wree, B. Wu. In vitro analysis and modification of aquaporin pore selectivity. *Handb Exp Pharmacol*, 190: 77-92, 2009

A. Geadkaew, J. von Bülow, E. Beitz, S.V. Grams, V. Viyanant, R. Grams. Functional analysis of novel aquaporins from *Fasciola gigantica*. *Mol Biochem Parasitol*, 175: 144-53, 2010

S. Dietz, J. von Bülow, E. Beitz, U. Nehls. The aquaporin gene family of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: lessons for symbiotic functions. *New Phytol*, 190: 927-40, 2011