

***In situ*-Analysen des exocytosesensitiven Phosphoproteins
PP63/Parafusin in *Paramecium*-Zellen**

Diplomarbeit

Universität Konstanz

Sabine Zitzmann

Dezember 1998

Für meine Eltern und für Opa & Oma Berg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Paramecium</i>	1
1.1.1 Strukturelle Beschreibung	1
1.1.2 Genetische Aspekte	2
1.2 Exocytose /Endocytose	5
1.3 Das exocytosesensitive Phosphoprotein PP63/Parafusin	8
1.4 Zielsetzung, die <i>antisense</i> - und <i>gene silencing</i> -Strategie	12
2. Material	17
2.1 Paramecien-Stämme	17
2.2 Chemikalien	17
2.3 Geräte	19
3. Methoden	22
3.1 Autogamie	22
3.1.1 Induktion der Autogamie	22
3.1.2 Nachweis der Autogamie	22
3.1.3 Gewinnung autogamer Zellen	23
3.2 Mikroinjektion und Transformation der Zellen	24
3.2.1 Kapillaren	24
3.2.2 Silikonisierte Deckgläser	24
3.2.3 Immobilisierung und Vorbereitung der Zellen	24
3.2.4 Überprüfung einer erfolgreichen Injektion	25
3.3 Aufzucht der transformierten Zellen	25
3.3.1 Konditioniertes Medium	25
3.3.2 Aufzucht	26
3.4 Aufarbeitung der transformierten Zellen	27
3.4.1 Vorbereitung der transformierten Zellen	27
3.4.2 Herstellung des Zellhomogenats	27
3.4.3 Proteinbestimmung	28
3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
3.4.5 Western Blots	28
3.4.6 Immundetektion	29

3.4.7 Silberfärbung	29
3.5 Molekularbiologische Methoden	30
3.5.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	30
3.5.2 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	30
3.5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten	30
3.5.4 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisieren	31
3.5.5 Herstellung von glatten Enden aus DNA-Doppelstang-Überhängen	31
3.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten	31
3.5.7 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	31
3.5.8 DNA-Sequenzanalyse	32
3.5.9 Polymerase Chain Reaction (PCR)	32
3.5.10 Radioaktive Markierung von kurzen Oligonukleotiden	32
3.5.11 Isolierung von DNA für Southern Blot-Analysen	32
3.5.12 Southern Blot-Analyse von DNA	33
3.6 Plasmide	33
3.6.1 Konstruktion von pPXV-GFP3	33
3.6.2 Konstruktion von pPXV-36PP	34
3.6.3 Konstruktion von pBS-C4Sal	35
4. Ergebnisse	37
4.1 Autogamie	37
4.1.1 Bestehende Verfahren, um autogame Zellen herzustellen	38
4.1.2 Alternative Färbemethoden mit Syto 13 und Hoechst 33342	39
4.1.3 Etablierung eines neuen Protokolls zur Isolierung autogamer Zellen	42
4.2 Mikroinjektion in den Makronukleus und das Reportersystem	43
4.3 <i>Antisense</i> -Vektor pPXV-36PP	46
4.3.1 Injektion und Heranziehen der Klone	46
4.3.2 Proteinisolierung und Western Blots	47
4.3.3 DNA-Isolierung und Southern Blots	48
4.4 pPXV-PP63asko1 und 2	49
4.4.1 Konstruktion	49
4.4.2 Ergebnisse der Injektion	51
4.5 <i>Gene silencing</i>	52

4.5.1 Die <i>gene silencing</i> -Vektoren	52
4.5.2 Konstruktion von pBS-C456-SX14 Δ 8	52
4.5.3 Injektion der <i>gene silencing</i> -Vektoren	53
5. Diskussion	55
5.1 Autogamie	55
5.2 <i>Antisense</i> -Strategie	56
5.3 <i>Gene silencing</i> -Strategie	61
5.4 Mögliche Funktionen von PP63/Parafusin	62
6. Zusammenfassung	65
7. Literatur	66

 Abkürzungen

5'-UTR	<i>5'-untranslated region</i>
AED	Aminoethyl-dextran
AK	Antikörper
Amp	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
AZC	Azacytidin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
CAM	Calmodulin-Gen
CaN	Calcineurin
cDNA	<i>copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton (Einheit der molaren Masse)
DDT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EM	Elektronenmikroskop
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
I	Inosin
ICL	<i>infraciliary lattice</i>
IES	<i>internal eliminated sequences</i>
MALDI-MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry</i>
MIPs	membranintegrierte bzw. -assoziierte Partikel
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
nd	<i>non discharge-Stamm</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
P _i	anorganisches Phosphat
pI	isoelektrischer Punkt
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGM	Phosphoglucomutase
PP	Phosphoprotein
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
U	Uracil

1. Einleitung

1.1 *Paramecium*

1.1.1 Strukturelle Beschreibung

Paramecien sind einzellige eukaryotische Organismen, die aerob und nicht-photosynthetisch leben. Sie werden den Ciliaten zugeordnet und bewegen sich durch einen gleichmäßigen Cilienschlag, wobei sie um die eigene Längsachse rotieren. Wenn sie auf ein Hindernis treffen, schwimmen sie zunächst rückwärts (Cilienschlagumkehr), um dann in einem kleinen Bogen an dem Hindernis vorbeizuschwimmen.

Die *Paramecium*-Zelle ist von einer Zellmembran umgeben, die sich in bestimmten Regionen in verschiedene funktionelle Bereiche differenziert. So besitzt *Paramecium* einen Zellostom (Cytostom), über den die Zelle durch einen gerichteten Cilienschlag Nahrung in den Cytopharynx und schließlich in die Empfangsvakuole befördert, wo die Nahrung durch Nahrungsvakuolen internalisiert wird. Unverdaute Nahrungsreste werden durch den Zellafter (Cytopyge), ebenfalls ein spezieller Bereich der Zellmembran, ins umgebende Medium abgegeben. Für die Osmoregulation besitzen die Paramecien zwei kontraktile Vakuolen. Auffällig ist der große Makronukleus (näheres hierzu siehe 1.1.2)

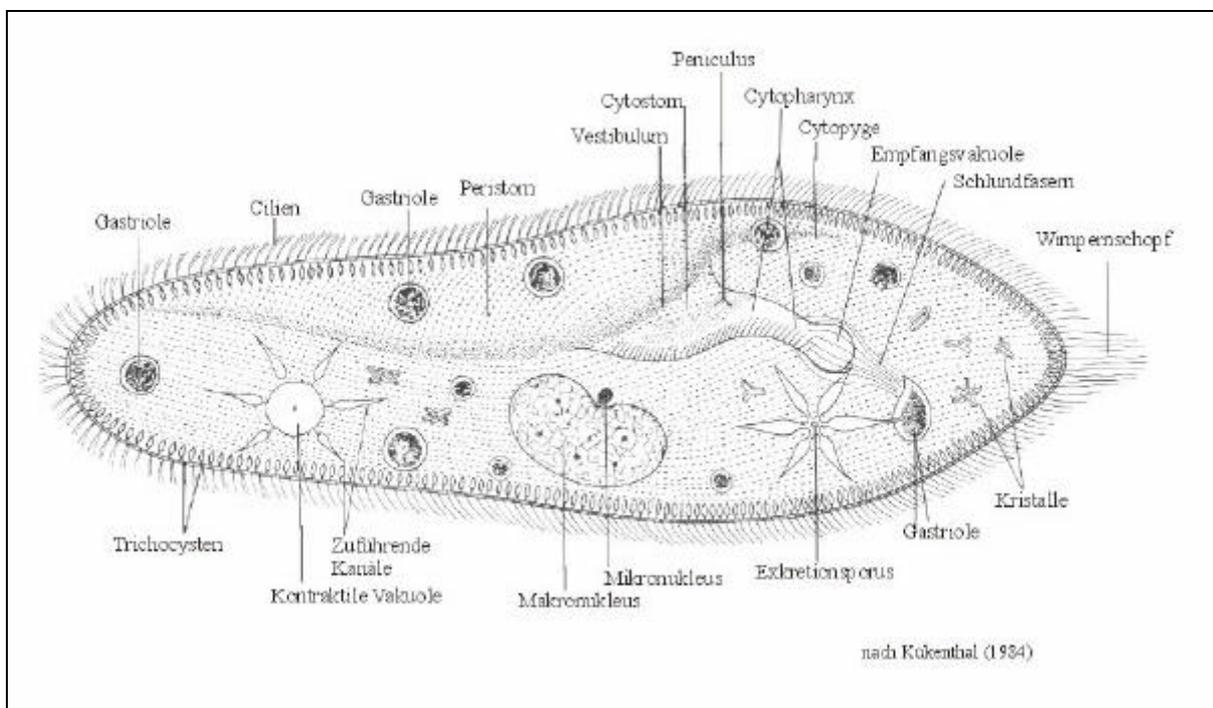


Fig 1 Schematische Zeichnung von *Paramecium* (aus Renner 1984)

Unterhalb der Plasmamembran befinden sich die Alveolarsäcke und das Epiplasma, die zusammen mit der Plasmamembran die halb-starre Hülle, Pellikula genannt, bilden. Das Epiplasma ist eine amorphe Lage entlang der inneren Alveolarsackmembran, die sich deutlich vom Cytoplasma unterscheidet. Die Alveolarmembranen umgeben die alveolaren Räume. Diese bilden als Alveolarsäcke ein extensives Membransystem, welches wahrscheinlich der Calciumspeicherung dient (Knoll *et al.*, 1993, Erxleben *et al.*, 1997).

Ein auffälliges Merkmal sind die Trichocysten, von denen *Paramecium* mehr als 1000 besitzt. Sie befinden sich abwechselnd mit einzelnen oder doppelten Basalkörpern unterhalb der Plasmamembran. Die Trichocysten machen bis zu 10% des totalen Zellvolumens aus (Wichterman 1986). Der Trichocystenkörper ist 3-4 μm lang und 0,5-1 μm breit; eine Trichocystenmembran umgibt den Körper und die Spitze und kommt dabei der Plasmamembran und den Alveolarsackmembranen sehr nahe. Auf einen extrazellulären Stimulus hin können die Trichocysten exocytiert werden. Der Inhalt der Trichocysten ist eine dicht kondensierte Proteinmatrix (Trichynine), die sich bei der Exocytose streckt. Wenn sie ausgestoßen wird, bilden sich so die im Mikroskop deutlich sichtbaren „Nadeln,“. Dieser Vorgang dient wahrscheinlich der Feindabwehr (Haacke-Bell *et al.*, 1990). Die Exocytose kann auch künstlich durch Stimulantien wie AED (Aminoethyl-dextran) ausgelöst werden (Plattner *et al.*, 1985).

1.1.2 Genetische Aspekte

Die Ciliaten haben sich evolutiv noch vor den Pilzen von der eukaryotischen Linie, aus der später Pflanzen und Tiere entstanden, abgespalten und besitzen Meiose und Befruchtung wie andere eukaryotische Organismen. Für die Ciliaten, die sich untereinander genetisch stark unterscheiden, gibt es zwei Charakteristika: den Besitz von Cilien und den nukleären Dimorphismus. Nukleärer Dimorphismus meint das Vorhandensein von mehreren generativen Kernen, den Mikronuklei, und einem somatischem Kern, dem Makronukleus, in einer Zelle. Paramecien enthalten, mit einigen Ausnahmen, zwei diploide Mikronuklei und einen Makronukleus (Prescott 1994).

Die Mikronuklei eines Organismus sind genetisch identisch. Sie sind sehr klein und enthalten den doppelten Chromosomensatz. Während der vegetativen Wachstumsphase teilen sie sich mitotisch. Diese Mitose geschieht allerdings intranukleär, d.h. ohne den Abbau der Zellkernmembran. Einzelne Chromosomen sind nicht unterscheidbar. Der genaue Mechanismus ist noch weitgehend unbekannt. Die Mikronuklei sind während des vegetativen Wachstums

transkriptionell fast inaktiv. Man kann nur in der kurzen Phase der mikronukleären DNA-Synthese RNA-Markierung detektieren (Prescott 1994). Im Gegensatz hierzu stehen Experimente, in denen der Mikronukleus aus Zellen entfernt wird und bei denen unmittelbar darauf eine reduzierte Teilungsrate oder sogar das Absterben der Zellen beobachtet werden kann. Diese Tatsache spricht dafür, dass die Mikronuklei doch einen Beitrag an mikronukleus-spezifischen Genen leisten, obwohl noch nichts über mögliche Kandidaten bekannt ist (Prescott 1994).

Die mikronukleäre DNA im vegetativen Mikronukleus besteht aus dicht gepacktem Chromatin, welches, wie im Makronukleus, um Histone gewickelt ist. Es gibt die typischen Poren in der mikronukleären Membran, aber keine Nukleoli. Ansonsten existieren keine mikroskopisch sichtbaren Merkmale.

Der Makronukleus ist im Gegensatz zum Mikronukleus sehr groß und enthält 800-1000 Kopien des Genoms. Er teilt sich amitotisch, jedoch ist über die Regulation dieser amitotischen Teilung ist bisher nichts bekannt. Da die amitotische Teilung sehr ungenau ist, geschieht es häufig, daß einer der neuen Makronuklei 10-15% mehr DNA erhält als der andere. Im sich teilenden Makronukleus sind keine Chromosomen erkennenbar. Der Makronukleus ist transkriptionell sehr aktiv. Wenn mikronukleäre Allele experimentell verändert werden und sich nun von den makronukleären Allelen unterscheiden, erzeugen trotzdem nur die makronukleären Allele den Phänotyp.

Es gibt sichtbare *chromatin-bodies* im Nukleoplasma verteilt, die eine hohe RNA-Syntheserate aufweisen. Außerdem existieren viele Nukleoli und viele Poren in der makronukleären Membran (Prescott 1994).

Die Mikronuklei werden bei sexuellen Vorgängen wie z.B. der Konjugation oder der Autogamie aktiv. Als Konjugation wird der Vorgang bezeichnet, bei dem sich zwei Paarungstypen begegnen und aneinanderlagern; dabei teilen sich die Mikronuklei meiotisch, es entstehen vier haploide Mikronuklei und es kommt zum Austausch eines haploiden Mikronukleus zwischen den Partnern. Jetzt fusioniert der alte Mikronukleus mit dem transferierten Mikronukleus und bildet einen neuen diploiden zygotischen Mikronukleus. Der alte Makronukleus wird vor der Konjugation abgebaut und ist nur noch in Fragmenten vorhanden. Der zygotische Mikronukleus teilt sich mitotisch, ein Tochterkern wird zum neuen Mikronukleus, der andere durchläuft DNA-Veränderungen und bildet den neuen Makronukleus.

Neben der Konjugation gibt es noch die Autogamie, den Prozeß der Selbstbefruchtung. Dieser kann durch das Hungern der Zellen induziert werden (Sonneborn 1970, Berger *et al.*, 1990). Bei

der Autogamie wird, wie bei der Konjugation, der Makronukleus abgebaut; der Mikronukleus durchläuft mehrere meiotische und mitotische Teilungsrunden, bevor zwei Mikronuklei miteinander verschmelzen und so den pseudo-zygotischen Mikronukleus bilden, aus dem dann wie bei der Konjugation ein vegetativer Makronukleus und ein generativer Mikronukleus entstehen. Eine Autogamie ist aber erst nach einer bestimmten Anzahl von Zellzyklen nach der letzten Autogamie oder Konjugation möglich. In *Paramecium tetraurelia* sind 20 - 25 Teilungen nötig, bevor die Zellen eine erneute Autogamie durchlaufen können.

Für Transformationsvorhaben sind Autogamie und Konjugation deshalb so wichtig, da bei beiden Vorgängen das gesamte makronukleäre Genom, ebenso wie alle darin enthaltenen exogenen Gene, abgebaut wird (siehe 1.4).

Es gibt zwei hauptsächliche Mechanismen der DNA-Veränderung, die während der Entwicklung des neuen Makronukleus ablaufen. Zum einen werden die Chromosomen fragmentiert und Telomere werden an die frischen Bruchstücke durch Telomerasen angehängt, so daß stabile subchromosomale lineare DNA-Moleküle entstehen, von denen jedes autonom repliziert werden kann. Zum anderen kommt es zu interstitiellen DNA-Deletionen. Hierbei werden sogenannte *internal eliminated sequences* (IES) entfernt und die Schnittstellen wieder zusammengefügt. Diese IES sind in der Regel AT-reich. Sie besitzen außer einer 5'-TA-3'-Flankierung keine besondere Sequenzen und sind 28 bis 882 Basenpaare lang (Klobutscher *et al.*, 1997, Meyer *et al.*, 1996).

Durch die oben angeführten DNA-Veränderungen entsteht ein neuer Makronukleus, dessen gesamte DNA aus den mikronukleären Sequenzen besteht, allerdings können diese anders angeordnet sein. Aber nicht alle mikronukleären Gene finden sich im Makronukleus, einige Gene kommen ausschließlich im Mikronukleus vor.

Die makronukleären Chromosomen sind kleiner als die mikronukleären Chromosomen, von denen sie abstammen, und haben eine durchschnittliche Größe von 300 und 600 kbp.

Anzumerken ist an dieser Stelle noch, daß *Paramecium*, wie die meisten Ciliaten, einen aberranten genetischen Code hat. So erkennt es das „universelle Stopcodon,, UAG ebenso wie UAA nicht als Stopcodon, sondern als Codon für die Aminosäure Glutamin. Das einzige Stopcodon in *Paramecium* ist UGA (Caron *et al.*, 1985, Preer *et al.*, 1985 und Schmidt, 1996).

1.2 Exocytose / Endocytose

Exocytose kann als die Fusion zweier Membranen, d.h. der Plasmamembran und der Vesikelmembran, definiert werden. Sie bietet der Zelle die Möglichkeit, den Inhalt eines Vesikels kontrolliert auszuschleusen, ohne dabei ein Loch in der Plasmamembran zu erzeugen, durch das Ionen und andere lösliche Moleküle in die Zelle hinein oder aus der Zelle hinaus gelangen könnten.

Man unterscheidet zwei Arten von Exocytose: zum einen die konstitutive Exocytose und zum anderen die stimulierte Exocytose. Die konstitutive Exocytose läuft ständig bei allen eukaryotischen Zelltypen ab und dient zur Erneuerung der Membranlipide und -proteine.

Zur stimulierten Exocytose sind nicht alle Zellen fähig. Zellen, die zur stimulierten Exocytose fähig sind, sind z.B. Neuronen und sekretorische Zellen (wie chromaffine Zellen) und auch Ciliaten (wie *Paramecium* oder *Tetrahymena*). Hierbei erfolgt auf einen bestimmten extrazellulären Stimulus hin die Verschmelzung von Vesikel- und Plasmamembran und erlaubt so die Freisetzung des Vesikelinhaltes. Wahrscheinlich basiert die stimulierte Exocytose bei allen Eukaryoten auf demselben Grundmechanismus (Morgan *et al.*, 1997) und es gibt nur geringfügige zelltypische Unterschiede.

Ein zur Zeit gängiges Modell der stimulierten Exocytose sieht einen wie folgend dargestellten Ablauf vor:

Exocytotische Vesikel, d.h. Vesikel, die mit dem zur Sekretion bestimmten Inhalt beladen sind, docken an bestimmten Stellen der Plasmamembran, den sogenannten *docking sites*, an. Dieser Andockprozeß ist spezifisch für die exocytotischen Vesikel und läuft, wie man heute annimmt, über die Erkennung und Bindung von Proteinen auf der Vesikel- und der Plasmamembran ab. Ein Beispiel für Proteine dieser Art sind die v-SNAREs (vesicle soluble NSF attachment protein receptor, in Neuronen z.B. Synaptobrevin und Synaptotagmin), die t-SNAREs (in Neuronen z.B. Syntaxin) oder SNAP 25 (soluble NSF attachment protein), wobei aber noch viele andere Proteine beteiligt sind (für einen Review: Martin 1997).

Durch eine Art Reifungsprozeß, *priming* genannt, wird die Interaktion zwischen Vesikel- und Plasmamembran derart verändert, daß die Vesikelmembran jetzt auf das Triggersignal hin mit der Plasmamembran verschmelzen kann. Der Vesikelinhalt wird in den extrazellulären Raum freigesetzt.

Worin dieses *priming* genau besteht, ist noch nicht geklärt, aber man nimmt an, daß ATP-abhängige Reaktionen wie die Phosphorylierung von Phospholipiden und Proteinen eine Rolle hierbei spielt.

Als Auslöser der Exocytose dienen Calcium-Ionen, die auf den extrazellulären Trigger hin an die Dockstellen gelangen und zur Aktivierung verschiedener Proteine führen. Als Calcium-Sensor scheinen das Calciumbindeprotein Synaptotagmin und seine Isoformen zu dienen. Das Verschmelzen der beiden Membranen wird durch bestimmte Proteine an der Dockstelle katalysiert. Einige von ihnen, wie Synaptotagmin, Syntaxin und SNAP-25, waren schon am Dockprozeß beteiligt. Jetzt kann der Inhalt des Vesikels freigesetzt werden.

Je nach Zelltyp kann die Vesikelmembran nach dem Verschmelzen in die Plasmamembran integrieren und später über konstitutive Endocytose internalisiert werden, oder sie wird direkt durch die exocytosegekoppelte Endocytose wieder abgeschnürt und im Inneren der Zelle entweder neu beladen oder abgebaut. Endocytose ist auf jeden Fall als Ausgleich zur Exocytose nötig, um das Zellvolumen und die Zelloberfläche annähernd konstant zu halten.

Ein universeller und gut bekannter Endocytosemechanismus wird über Clathrin, Adaptine und Dynamin gesteuert (Brodsky 1988). Hierbei lagern sich Clathrin-Adaptin-Komplexe unterhalb der Zellmembran an und bilden die sogenannten Clathrin-*coated pits*. Diese stülpen sich ein und schnüren sich mit Hilfe von Dynamin von der Plasmamembran ab. Dieser Vorgang läuft allerdings relativ langsam (im Subminutenbereich) ab (Henkel *et al.*, 1996).

Die exocytosegekoppelte Endocytose erfolgt sehr viel schneller, oft im Subminutenbereich. Hierbei spielt Clathrin keine Rolle, Dynamin dagegen ist auch hier wichtig. Ebenso gibt es Hinweise, daß Calcium ein wichtiges Signal für die Endocytose ist (Henkel *et al.*, 1996).

Paramecien werden schon seit vielen Jahren für die Untersuchung der Exocytose verwendet. Sie sind sehr gute Studienobjekte, da sie mehr als 1000 Trichocysten besitzen (es existieren Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen) (Plattner *et al.*, 1985).

Ein Großteil dieser Trichocysten wird durch Stimulation mit AED synchron exocytiert und erlaubt so quantitative und qualitative Studien (Plattner *et al.*, 1993).

Diese angedockten Trichocysten erkennt man im EM auf der Zelloberfläche an der für sie charakteristischen Doppelringstruktur aus MIPs (*membrane integrated particles*) mit einer zentralen Rosette aus MIPs. Schon 30 Millisekunden nach dem Trigger mit AED finden die ersten Membranfusionen statt. Hierbei entsteht eine Öffnung in der Plasmamembran, die von einem Ring MIPs umgeben ist. 80 Millisekunden nach der Triggerung sind die meisten Exocytosevorgänge in vollem Gang und danach beginnt die Endocytose mit dem Erscheinen von

resealing-Stadien. Nach etwa 350 Millisekunden erkennt man die ersten gefüllten Ringe (*filled rings*), die das Wiederverschließen der Membranöffnungen anzeigen. Ab 40 Sekunden nach dem Trigger sind Parenthesen sichtbar und die Trichocystenmembranen schnüren sich als *ghosts* ab und lösen sich von der Plasmamembran (Knoll *et al.*, 1991 und Plattner *et al.*, 1985).

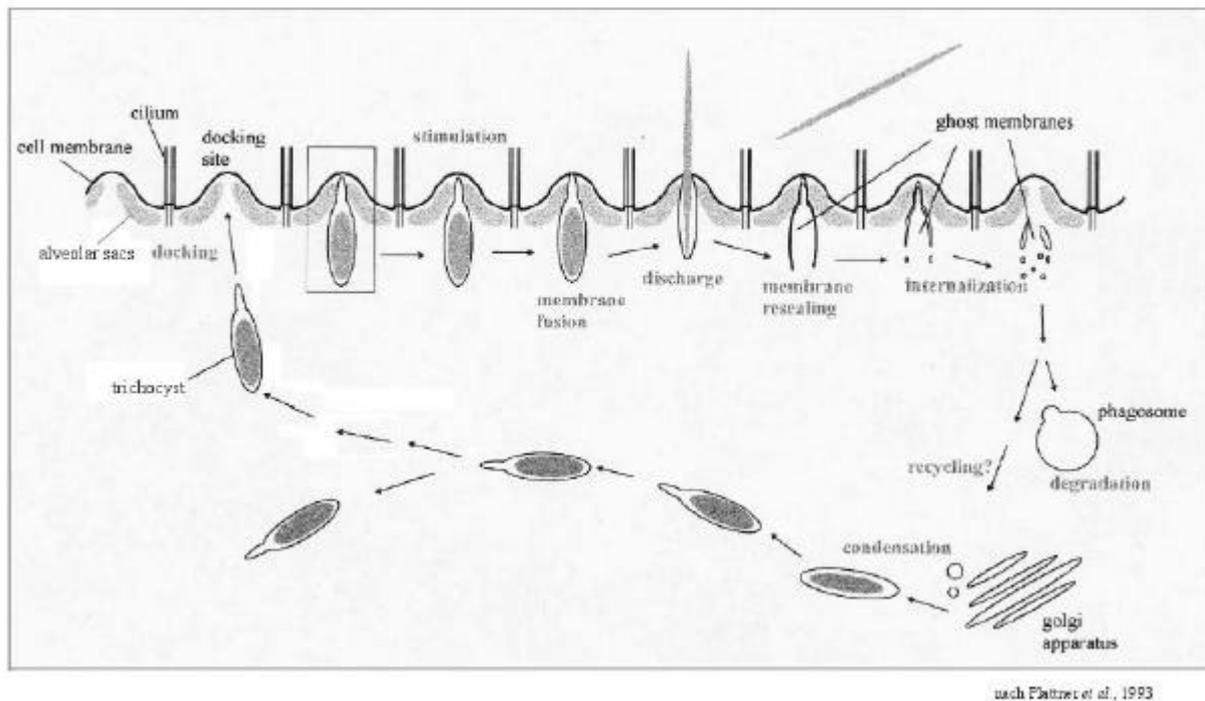


Fig 2 Schema der Exocytose/Endocytose bei *Paramecium*

Jetzt kann an derselben Dockstelle eine neue Trichocyste andocken. Es dauert etwa 6-8 Stunden, bis die Zelle nach einem massiven AED-Trigger wieder voll mit Trichocysten besetzt ist. Da die Zelle nur einen kleinen Pool (etwa 5%) frei im Cytosol schwimmender Trichocysten hat, müssen die restlichen Trichocysten neu synthetisiert werden.

Wenn auf einen Stimulus hin sehr viele Trichocysten exocytiert werden, ist die Zelle nicht in der Lage, die große Menge an Membran nach der Endocytose wiederzuverwenden, und so verschmelzen die *ghosts* mit Verdauungsvakuolen und werden abgebaut (Lütke *et al.*, 1986, Ramoino *et al.*, 1997).

Wenn dagegen nur wenige Trichocysten exocytiert werden, vermutet man, daß die *ghosts* in die Nähe des Golgi-Apparates gelangen und dort zur Neusynthese für Trichocysten verwendet werden (Plattner *et al.*, 1993).

1.3 Das exocytosesensitive Phosphoprotein PP63/Parafusin

1982 finden Gilligan *et al.* einen ersten Hinweis, daß auch in Paramecien eine Regulation der Exocytose durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung wichtig ist. Sie können zeigen, daß nach Inkubation von axenischen *Paramecium*-Kulturen mit $^{32}\text{P}_i$ zwar viele Proteine in *Paramecium* phosphoryliert sind, aber nur ein bestimmtes Protein, welches bei etwa 65 kDa in der SDS-PAGE läuft, nach der, allerdings letalen, Exocytosestimulation mit Picrinsäure spezifisch dephosphoryliert wird. Diese Dephosphorylierung scheint für die Exocytose wichtig zu sein: Die temperatursensitiven Mutante nd9 (Lefort-Tran *et al.*, 1981) zeigt im selben Versuch, daß die Mutante, wenn sie bei der permissiven Temperatur von 18°C inkubiert wird und zur normalen Exocytose fähig ist, das gleiche Dephosphorylierungsmuster wie der Wildtypstamm hat. Wenn nd9-Zellen allerdings bei der nicht-permissiven Temperatur von 28°C inkubiert werden, bei der sie nicht mehr zur Exocytose fähig sind, findet auch keine Dephosphorylierung des 65kDa Proteins statt (Gilligan *et al.*, 1982).

Diese Erkenntnis wird von Zieseniss *et al.*, 1985 bestätigt und erweitert, da sie feststellen, daß nach Stimulation der Exocytose durch AED dieses 65kDa Protein ebenfalls spezifisch dephosphoryliert wird. Die Triggerung mit AED (Plattner *et al.*, 1985) hat den Vorteil, daß sie nicht, wie Picrinsäure, letal für die Zellen ist und eine Beobachtung der Zellen auch nach der Exocytose erlaubt.

Zieseniss *et al.*, 1985 zeigen, daß die Dephosphorylierung des Proteins in weniger als 1s nach dem AED-Trigger erfolgt. Nach einer lag-Phase von etwa 5s wird dieses Protein wieder

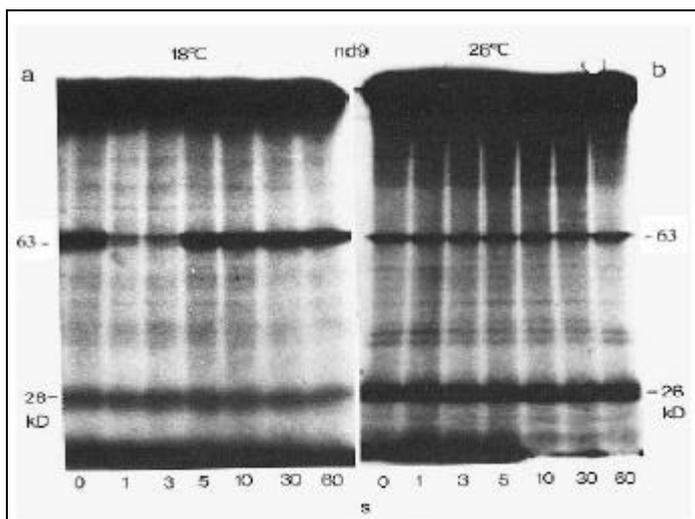


Fig 3 Autoradiogramm des Zeitverlaufs der De- und Rephosphorylierung PP63/Parafusins von nd9-Zellen, die (a) bei der permissiven Temperatur und (b) bei der nicht-permissiven Temperatur inkubiert wurden.

wieder rephosphoryliert und liegt nach etwa 20s wieder vollständig rephosphoryliert vor, wobei dieser Rephosphorylierungszeitraum sich von Stamm zu Stamm etwas unterscheidet. Diese Dephosphorylierung und Rephosphorylierung kann nur in exocytosefähigen Stämmen (wie nd9-18°C, nd6, nd7, tam 38, tl und ftA) festgestellt werden, wobei kein Unterschied zu Wildtypstämmen (7S und K401) besteht (Zieseniss *et al.*, 1985).

Bei der Mutante d4-500r (pawn), die keine ciliären Calcium-Kanäle besitzt und deshalb keine Cilienschlagumkehr (ciliary reversal) als Antwort auf den AED-Trigger machen kann, aber zur normalen Exocytose fähig ist (Plattner *et al.*, 1984), zeigt sich ebenfalls kein Unterschied zu dem Dephosphorylierungsmuster der Wildtypstämme. Dies deutet darauf hin, daß die Dephosphorylierung nichts mit der Cilienschlagumkehr zu tun hat, die eng mit der Exocytose korreliert ist.

Weitere Hinweise auf die Exocytoserelevanz dieses bis dahin unbekanntes Proteins gibt z.B. Neomycin. Neomycin verhindert nicht nur die Exocytose, sondern auch gleichzeitig die Dephosphorylierung dieses Proteins (Zieseniss *et al.*, 1985). Die zeitliche Korrelation der Dephosphorylierung mit der Exocytose bringt beide Ereignisse in unmittelbaren Zusammenhang. 1987 zeigt sich (Momayezzi *et al.*, 1987), daß die Injektion von Phosphatasen, wie der alkalischen Phosphatase, oder von Calcineurin/PP2B zusammen mit Calmodulin und Calcium, die Exocytose in exocytosekompetenten Stämmen induziert. Zum gleichen Ergebnis führten auch *in vitro* Studien an isolierten Cortices. Die Zugabe von Proteinphosphatasehemmern wie Heparin, Polyglutamat oder Polyaspartat verhindert hier ebenso die Exocytose nach dem AED-Trigger wie die Injektion von Calcineurin-Antikörpern.

Diese Studie (Momayezzi *et al.*, 1987) demonstriert die Beteiligung von Calcineurin an der Exocytose. Dies läßt die Vermutung zu, daß ein Zusammenhang zwischen der Dephosphorylierung der 65 kDa Proteins und der Proteinphosphatase Calcineurin besteht.

Weitere Hinweise auf die Beteiligung dieses Proteins an der Exocytose ergeben sich durch die Herstellung von Antikörpern gegen dieses 65 kDa Phosphoprotein (Stecher *et al.*, 1987, Murtaugh *et al.*, 1987 und Satir *et al.*, 1988), von dem inzwischen bekannt ist, daß es nur ein Molekulargewicht von 63 kDa hat. Mit diesen Antikörpern wird eine corticale Lokalisierung des 63 kDa-Proteins sowohl *in vivo* durch Immunofluoreszenz als auch *in vitro* durch Detektion in der Cortices-Fraktion (Plasmamembran zusammen mit Alveolarsäcken und Trichocysten) in der SDS-PAGE festgestellt. Ebenso kann gezeigt werden, daß die Injektion der Antikörper *in vivo* und *in vitro* die Exocytose und die Dephosphorylierung verhindert.

Untersucht werden auch verschiedene eukaryotische Zellen auf die Anwesenheit dieses 63 kDa-Proteins oder ähnlicher Proteine (Satir *et al.*, 1989). Dieses 63 kDa-Protein wird jetzt PP63/Parafusin genannt. Der polyklonale Antikörper erkennt Proteine ähnlichen Molekulargewichts in z.B. *Tetrahymena thermophila*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bufo marinus*, Ratten- Kalbs- und Menschenhirn.

Weitere Experimente (Satir *et al.*, 1989) *in vitro* zeigen, daß PP63/Parafusin als Akzeptor für UDP-Glucose dient, die von einer Glucosephosphotransferase angefügt wird. Diese Ergebnisse bringen Satir *et al.* zu der Hypothese, daß der Phosphozucker zyklisch zu regulatorischen Zwecken angeheftet und entfernt wird. Diese Hypothese kann bis jetzt nicht bestätigt werden.

Mit Hilfe der Quenched-flow-Apparatur (Knoll *et al.*, 1991 und Höhne-Zell *et al.*, 1992) kann ein genauerer Zeitverlauf der De- und Rephosphorylierung von PP63/Parafusin bestimmt werden. So kann gezeigt werden, daß die Dephosphorylierung schon 80 ms nach dem AED-Trigger stattgefunden hat. Sie erlaubt es, die Dephosphorylierung direkt mit der Exocytose in Verbindung zu bringen, da zu diesem Zeitpunkt noch kein Wiederverschließen der Membran (*resealing*) stattgefunden hat. Die Rephosphorylierung von PP63/Parafusin fällt in den Zeitraum der exocytosegekoppelten Endocytose (siehe Fig 4).

Es kann ebenfalls gezeigt werden, daß die Dephosphorylierung auch in Abwesenheit von extrazellulären Calcium stattfindet (Höhne-Zell *et al.*, 1992). Extrazelluläres Calcium ist nur für die Streckung (Dekondensation) der Trichocysten wichtig, nicht aber für die Einleitung der Exocytose oder für die Membranfusion. Diese Tatsache, zusammen mit dem Ergebnis, daß PP63/Parafusin kein Calciumbindeprotein ist, legt die Überlegung nahe, daß PP63/Parafusin nichts mit der Dekondensation des Trichocysteninhalts zu tun hat.

Durch 2D-Gelautoradiographie werden pI-Werte von 5.95 (Hauptpunkt), 5.85 und 6.05 gemessen.

1994 wird schließlich eine cDNA von PP63/Parafusin kloniert und sequenziert (Subramanian *et al.*, 1994). Die Sequenz zeigt über 50% Aminosäureidentität mit eukaryotischen Phosphoglucomutasen (PGM). Da die Autoren keine PGM-Aktivität messen können, nehmen sie zunächst an, daß es sich nicht um eine PGM handelt.

Unabhängig davon können Treptau *et al.*, 1995 eine PGM aus *Paramecium* isolieren und durch *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierungsstudien, Immunobindungsassays und Kinasenspezifität sehr starke Ähnlichkeit zwischen der PGM und PP63/Parafusin feststellen.

Diese Identität kann verifiziert werden, als es Hauser *et al.* 1997 gelingt, das noch fehlende 5'-Ende der PP63-Sequenz zu sequenzieren und das Protein rekombinant zu exprimieren. Das rekombinant in *E. coli* hergestellte PP63/Parafusin hat dieselbe spezifische Phospho-

glucomutaseaktivität wie käufliche PGM aus Kaninchen-Skelettmuskel oder aus Huhn. Man kennt bis jetzt zwei Isoformen von PP63/Parafusin, wobei PP63-2 eine wesentlich geringere spezifische Aktivität zeigt (M. Gößringer, Diplomarbeit 1997).

Zu dem Problem, ob es sich bei der exocytoserelevanten Phosphorylierung von PP63/Parafusin um eine Serin/Threonin-Phosphorylierung oder eine Glycophosphorylierung handelt, zeigen Kissmehl *et al.*, 1996, daß die De- und Rephosphorylierung durch endogene Kinasen und Phosphatasen erreicht werden kann. Durch Inhibitionsstudien wird gezeigt, daß eine Beteiligung von Proteinphosphatase 1 (serin-/threoninspezifisch) und Proteinphosphatase 2C unwahrscheinlich ist. Calcineurin (PP 2B) aus Rinderhirn ist in der Lage, PP63/Parafusin *in vitro* zu dephosphorylieren. Als Kinase scheidet eine endogene cAMP-abhängige Protein-kinase (PKA) ebenfalls aus. Endogene cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) und eine Caseinkinase (Kissmehl *et al.*, 1997) können P63/Parafusin *in vitro* phosphorylieren.

Ein Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierung von PP63/Parafusin durch MALDI-MS (Kussmann *et al.*, submitted) zeigt, daß die *in vitro* Phosphorylierung durch diese beiden Kinasen Ähnlichkeiten mit der *in vivo* Phosphorylierung von PP63/Parafusin hat und beide Kinasen vermutlich auch *in vivo* an der Phosphorylierung von PP63/Parafusin beteiligt sind. Allerdings ergibt diese Untersuchung auch, daß noch andere Kinasen an der Phosphorylierung beteiligt sind.

Eine genauere Analyse der Lokalisierung von PP63/Parafusin von Kissmehl *et al.*, 1998 durch biochemische und strukturelle Analysen bestätigt die corticale Lokalisierung. Es zeigt sich, daß PP63/Parafusin vor allem an den Dockstellen der Trichocysten und an den Teilen der Alveolarsäcke, die sich in der Nähe der Trichocysten befinden, lokalisiert ist. In Homogenaten erscheint PP63/Parafusin fast ausschließlich in der löslichen Fraktion. Bei Zellfraktionierungen findet man geringe Mengen auch in der Alveolarsackmembranfraktion und der Cilienfraktion, was die Immunlokalisierung bestätigt.

Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen:

PP63/Parafusin ist eine Phosphoglucomutase mit einem Molekulargewicht von 63 kDa. Es besitzt Phosphoglucomutaseaktivität, es läßt sich aber nicht sagen, ob diese Aktivität für die Funktion von PP63/Parafusin bei der Exocytose wichtig ist.

PP63/Parafusin ist ein lösliches Protein, welches durch einen unbekanntem Mechanismus, z.B. Protein-Proteininteraktion oder reversible Veränderungen wie z.B. eine Myristylierung, teilweise an bestimmten Stellen in der Zelle lokalisiert ist.

PP63/Parafusin liegt in der Zelle phosphoryliert vor, und bei AED- (oder Picrinsäure-) Triggerrung werden diese Phosphatreste in sehr enger zeitlicher Korrelation zur Exocytose entfernt und nach einem definierten Zeitraum wieder angehängt.

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von PP63/Parafusin bei der Exo- und Endocytose sind, daß die De- und Rephosphorylierung nur in exocytosefähigen Stämmen stattfindet, und daß diese De- und Rephosphorylierung sehr eng mit der Exo- und Endocytose korreliert ist (Fig 4).

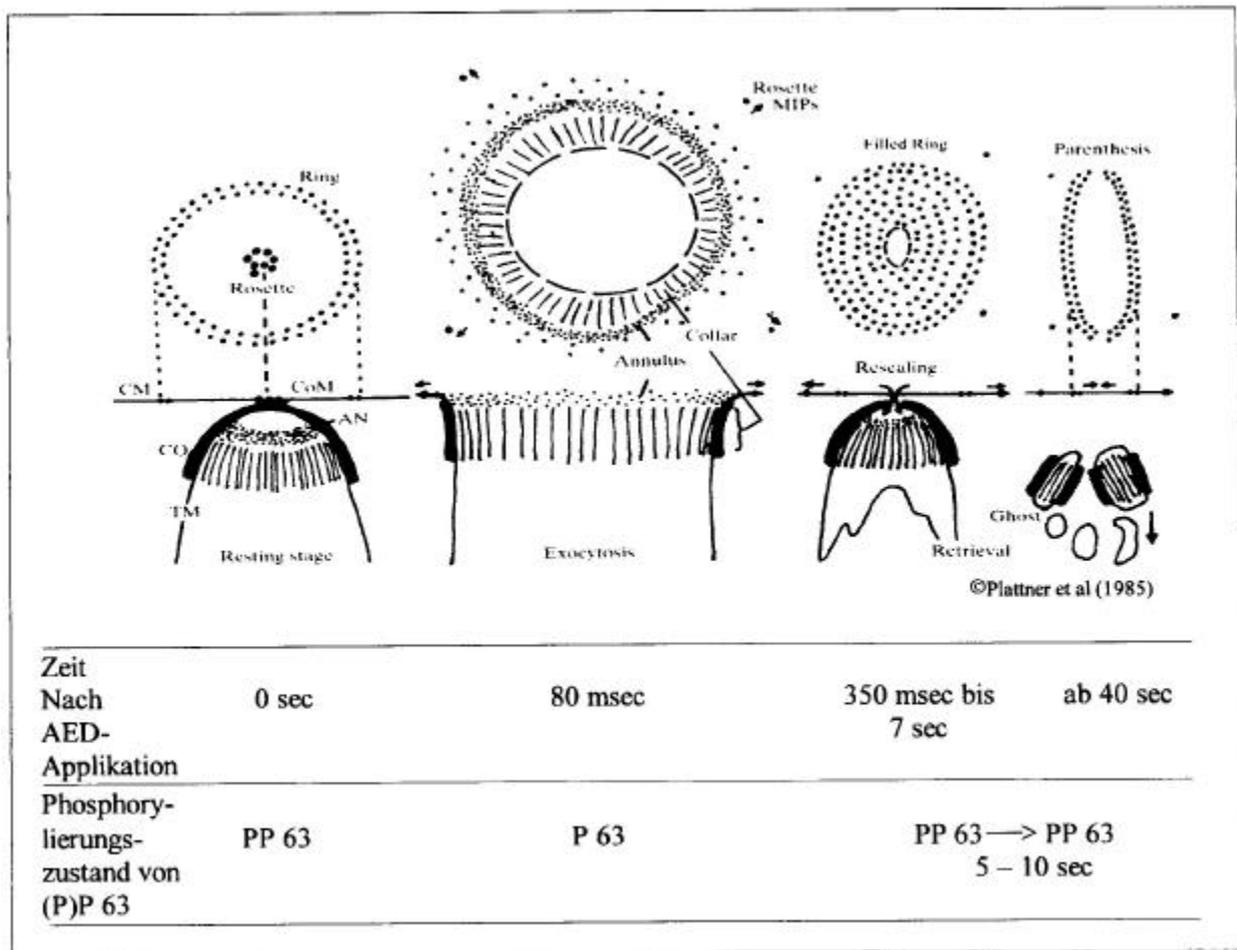


Fig 4 Zeitverlauf der Exo- und Endocytose bei *Paramecium* und die Korrelation zur De- und Rephosphorylierung von PP63/Parafusin. Die Dephosphorylierung findet zeitgleich mit der Exocytose statt, während die Rephosphorylierung in den Zeitraum der Endocytose fällt.

1.4 Zielsetzung, die antisense- und die gene silencing-Strategie

Nach all diesen im vorherigen Kapitel beschriebenen Erkenntnissen über PP63/Parafusin und die Mutmaßungen über seine Funktion, gibt es jedoch noch keine Experimente, die eindeutige Charakterisierung der Funktion von PP63/Parafusin erlauben.

Die Zielsetzung dieser Diplomarbeit ist die Herstellung über einige Generationen stabiler PP63/Parafusin *knock-out* Zellen, die dann auf einen Phänotyp hin untersucht werden können, der Aufschluß über die Funktion von PP63/Parafusin *in vivo* gibt. In Betracht kommen hierbei Untersuchungen über die Exocytose. So könnten Defekte, z.B. bei der Exocytosefähigkeit und dem damit verbundene Calciumgradient auftreten. In Betracht kommen auch *downstream* Vorgänge der Endocytose, wie das Abschnüren der *ghosts* oder die Synthese neuer Trichocysten nach massiver Exocytose.

Die einzige bis jetzt bekannte Möglichkeit, *Paramecium* gezielt genetisch zu transformieren, ist die Mikroinjektion von DNA in den Makronukleus (Godiska *et al.*, 1987). Diese Transformation ist bis zum nächsten sexuellen Vorgang, sei es Konjugation oder Autogamie, stabil. Massentransformationsmethoden, wie man sie z.B. für *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* kennt, stehen für *Paramecium* nicht zur Verfügung. Die exogene DNA wird im Makronukleus repliziert und exprimiert, analog den endogenen Genen. Nach der Injektion superhelicalen DNA wird diese in der Zelle zuerst linearisiert und dann werden Telomere angehängt. Die DNA-Moleküle bleiben als Pseudochromosomen erhalten, die sich ohne Replikationsursprungssequenzen eigenständig replizieren (Bourgain *et al.*, 1991). Wenn die Vektoren dagegen schon Telomere enthalten, werden eine Art von Concatemeren (End-zu-End verknüpfte DNAs) aus den Plasmid-DNAs gebildet, die in einer 15-30 mal höheren Kopienzahl im Makronukleus erhalten werden (Bourgain *et al.*, 1991).

Kanabrocki *et al.*, 1991 können mit dieser Methode durch Injektion eines Wildtyp-Calmodulingens calmodulindefiziente Mutanten funktionelle wiederherstellen. Hierbei stellen sie, wie andere Gruppen auch, eine Abhängigkeit der Transformationeffizienz von der Anzahl der vorhandenen Plasmidkopien fest. Je mehr Plasmide injiziert werden, desto besser funktioniert die Transformation. Eine Injektion ins Cytosplasma ist ebenso wirkungslos wie die Injektion von Kontrollplasmiden ohne das Gen, das für die Transformation nötig ist.

Ein anderes Beispiel ist die Mikroinjektion eines Plasmids, welches eine Antibiotikaresistenz enthält (Haynes *et al.*, 1995). Auch hier zeigt sich eine Dosisabhängigkeit: Je mehr Plasmide injiziert werden, desto resistenter sind die Zellen. Außerdem zeigt sich, daß den Plasmiden, obwohl sie Telomere enthalten, noch weitere Telomersequenzen angehängt werden und Concatemere entstehen. Die Plasmide werden auch ohne Selektionsdruck beibehalten. Durch Autogamie gehen die Plasmide jedes Mal verloren.

Diese Methode wollten wir uns in dieser Arbeit zu Nutze machen und *antisense*-DNA enthaltende Plasmide injizieren. Der von uns verwendete Vektor enthält Telomere von *Tetrahymena*, die dafür sorgen, daß die Plasmide als Pseudochromosomen erhalten bleiben.

Drei verschiedene Konstrukte kommen dabei zum Einsatz. Einer der verwendeten Vektoren ist der Vektor pPXV-36PP. Er hat das gesamte PP63/Parafusin-Gen in *antisense*-Orientierung direkt hinter dem Promotor für das Calmodulin-Gen (für eine genauere Beschreibung der Plasmide siehe Kapitel 3.6). Die anderen beiden Vektoren, pPXV-PP63asko1 und 2 enthalten jeweils ein Stück aus der 5'-UTR (5'-*untranslated region*) von PP63/Parafusin und den Anfang des Gens in *antisense*-Orientierung.

Unser Versuchsansatz basiert auf Erfahrungen mit anderen eukaryotischen Zelltypen, in denen die Transkription von *antisense*-mRNA zu einem Verschwinden des jeweiligen Proteins führt.

So haben Lallier *et al.*, 1996 in *Xenopus*-Embryonen durch die Expression von *antisense*-Transkripten das Protein $\alpha 6$ -Integrin zum größten Teil eliminiert, während die Expression verwandter Gene unbeeinflusst bleibt. Hier hängt die Stärke des durch die Transformation verursachten Phänotyps von der Menge der exprimierten *antisense*-RNA ab.

Vander Molen *et al.*, 1996 haben in osteoblastischen ROS-Zellen das Connexin 43, ein Bestandteil von *gap junction*-Kanälen, durch *antisense*-enthaltende Plasmide eliminiert. Sie können dabei zeigen, daß durch die Expression von *antisense*-mRNA die mRNA-Levels von Connexin 43 um bis zu 92% reduziert sind und daß die Menge an Protein Connexin 43 um mehr als 86% reduziert ist.

Den Mechanismus, über den die *antisense*-mRNA wirkt, erklärt man sich folgendermaßen: Die *antisense*-mRNA kann mit der *sense*-mRNA Basenpaarungen eingehen und so doppelsträngige RNA-Stränge bilden. Dadurch kommt es wahrscheinlich zu einer sterischen Behinderung von Translationsfaktoren und Ribosomen, deren Bindestellen durch die *antisense*-mRNA belegt sein können. Ebenso werden RNA-RNA-Doppelstränge in der Zelle durch eine dsRNase abgebaut, so daß keine Matrize für die Translation des Proteins mehr zur Verfügung steht (Meegan *et al.*, 1989).

Die andere Methode, mit der wir versuchen, einen *knock-out* von PP63/Parafusin zu erreichen, nennt sich *homology-dependent gene silencing* oder *co-suppression*. Worauf dieses Phänomen beruht, ist noch nicht eindeutig geklärt. Entdeckt hat man es in höheren Pflanzen (Napoli *et al.*, 1990). Bekannt ist es inzwischen aber auch in Pilzen (Cogoni *et al.*, 1997) und Insekten (Dorer *et al.*, 1994). Zellen, die mit Plasmiden transfiziert werden, die Sequenzen des Gens enthalten, das untersucht werden soll, zeigen in Anwesenheit einer hohen Kopienzahl des exogenen Gens, daß

das entsprechende endogene Gen oder die entsprechende endogene Genfamilie ausgeschaltet werden. Worauf dieser Mechanismus des Ausschaltens basiert, ist bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt, er ist jedoch auf jeden Fall reversibel. Es besteht auch die Möglichkeit, daß dafür verschiedene Mechanismen verantwortlich sind, die jedoch alle zu dem gleichen Ergebnis des *gene silencing* führen. So sind in diesem Zusammenhang RNA-abhängige DNA-Methylierung, Inhibition der transkriptionalen Aktivität oder post-transkriptionale Inaktivierung im Gespräch.

Ein Beispiel zeigen Schuurs *et al.*, 1997, die den Basidiomyceten *Schizophyllum commune* mit einem Plasmid für das exogene Gen für C3 transformieren. Sie zeigen, daß das Protein nicht mehr sezerniert wird und auch keine C3-mRNA mehr vorhanden ist. Bei der Inkubation der Transformanden mit 5-Azacytidin (AZC) (verhindert die DNA-Methylierung, indem es in die DNA integriert) können sie feststellen, daß bei Anwesenheit von AZC kein *gene silencing*-Effekt mehr vorhanden ist. Da es sich bei dem *gene silencing* nicht um das bloße Austitrieren von Transkriptionsfaktoren handelt, zeigt eine Transformation mit einem Plasmidkonstrukt, das nur die Promotorregion von C3 enthält (Schuurs *et al.*, 1997).

Einen anderen Mechanismus von *gene silencing* demonstrieren Metzloff *et al.*, 1997 in *Petunia*. Auch hier wurden Zellen durch exogene Genhomologe transformiert, und es kann eine Beeinflussung der endogenen Gene festgestellt werden. In den Pflanzen, in denen die Expression der Chalcon-Synthase A (*chsA*) verhindert wird, kann keine endogene und nur sehr wenig exogene *chsA*-mRNA mehr detektiert werden. Wie Metzloff *et al.*, 1997 dann auch zeigen, sind die noch vorhandenen *chsA*-mRNAs 3'-Fragmente des Genes und haben keinen oder nur einen sehr reduzierten Poly-A-Schwanz und sind sehr viel sensitiver gegenüber Degradation. Verursacht wird diese Fragmentierung durch eine spezifische 3'-Schnittstelle und eine zusätzliche 5'-Schnittstelle bei einigen RNAs für endogene RNAsen. Durch ein Sekundärstruktursimulationsprogramm zeigt sich eine ausgeprägte Sekundärstruktur des 3'-Endes, welche wahrscheinlich den Abbau durch dsRNA-spezifische Endonukleasen verhindert. Deshalb postulieren Metzloff *et al.*, 1997 eine Hypothese, in der die exogenen Gene für die Degradation der endogenen Gene sorgen, z.B. durch Aktivierung von endonukleolytischen Spaltungen und Beschleunigung des Poly-A-Schwanz-Abbaus.

Ruiz *et al.*, 1998 haben auch in *Paramecium* das Phänomen des *gene silencing* gefunden. Durch Mikroinjektion von Plasmiden in den Makronukleus zeigen sie zunächst, daß die Plasmide als Pseudochromosomen erhalten bleiben und erst durch Autogamie verloren gehen. Durch Injektion von Plasmiden, die die codierende Region eines Centriols, einem Bestandteil des *Infraciliary*

Lattice (ICL) enthalten, können die hochgeordnete Struktur des ICL zerstört werden. Ebenso, in aber etwas geringem Ausmaß, gelingt dies mit zwei 5'-Teilstücken des Genes. Die mRNA der Centrine ist nicht mehr detektierbar. Ebenso werden TMP1 und TMP4, Proteine der Trichocystenmatrix, ausgeschaltet. Auffällig ist, daß, obwohl die beiden Familien eng miteinander verwandt sind, immer nur die entsprechende Genfamilie, deren Genstück durch Plasmide eingeschleust worden ist, ausgeschaltet wird. Die mRNA der nicht reprimierten Proteinfamilie wird sogar beträchtlich hochreguliert. Beide *silencing*-Effekte werden durch Genstücke verursacht, die einem ganzen Gens oder einem Teilstück eines Gens entsprechen, die aber keine regulatorischen Elemente enthalten. Mit dem Gen ND7, welches kürzlich kloniert worden ist (Skouri *et al.*, 1997) und von dem gezeigt worden ist, daß es im Gegensatz zu den vorherigen Genen nicht zu einer Genfamilie gehört, sondern einzigartig in *Paramecium* ist, wurde ein weiterer Versuch unternommen. Mit einem Plasmid, welches das gesamte ND7-Gen, aber keine Promotorsequenzen und keinen Poly A-Schwanz enthält, konnte der gleiche Phänotyp wie bei *nd7* Mutanten erzeugt werden. Mit dem funktionellen ND7-Gen konnten diese Transformanten wiederhergestellt werden. Wenn aber das gleiche Experiment mit einem funktionellen ND7-Gen gemacht wird, d.h. einem Gen, welches Promotor und Terminationssequenzen wie auch den Poly A-Schwanz enthält, kann kein *gene silencing* beobachtet werden. Wie in Pflanzen, ist auch das *homology-dependent gene silencing* in Paramecien von Dosis und Homologie abhängig. Es sind etwa 25-mal mehr Kopien der exogenen DNA notwendig, um einen *silencing*-Effekt zu erzielen (Ruiz *et al.*, 1998), und je mehr Kopien exogener DNA existieren, desto besser das *silencing*. Die mRNA-Menge des entsprechenden Genes sind stark reduziert, während der RNA-Gehalt ähnlicher Genfamilien nicht betroffen ist. Auch sind regulatorische Sequenzen der Gene nicht notwendig. Dadurch kann vermutet werden, daß der Effekt des *gene silencing* posttranslational ist.

Diese Effekte des *gene silencing* wollten wir verwenden, um PP63/Parafusin auszuschalten. Hierfür haben wir zwei Vektoren, von denen einer das 5'-Ende des PP63/Parafusin-Genes enthält (pPS-C4Sal) und der andere das gesamte PP63/Parafusin-Gen, aber ohne den Poly-A-Schwanz (pBS-C456-SX14Δ8). Die Konstruktion dieser beiden Plasmide ist in Kapitel 3.6.3 und in 4.5.2 beschrieben.

2. Materialien

2.1 Paramecien-Stämme

Für alle Experimente wurde der Wildtyp-Stamm 7S verwendet. Die Zellen wuchsen monoxenisch mit *Enterobacter aerogenes* als Futterbakterium in Salatmedium bei 25°C.

Salatmedium: pro 1 Liter 2 g getrocknetes Salatpulver

5 mM Tris-HCl pH 7

5 mg Stigmasterol

2.2 Chemikalien

Ponceau S	Serva
TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamin)	Bio-Rad
SDS-Solution 10% (w/v) (Sodium-dodecylsulfat)	BioRad
Rotiphorese Gel 30	Roth
AP-conjugate substrate kit	Bio-Rad
Protein-Assay	Bio-Rad
Roti-Nanoquant	Roth
Parafin (flüssig)	Merck
Silicone solution	Serva
E64 (trans-Epoxy succinyl-l-leucylamido-(4-Guanidino)-butan)	Sigma
Pefabloc	Biomol
Leupeptin	Serva
Pepstatin	FMC/Biozym
LMP-Agarose (SeaPlaque)	Pharmacia
NA-Agarose	Schleicher & Schuell
Protean Nitrocellulose Transfer Membran (Porengröße 0,45µm)	

Diese und alle anderen Chemikalien wurden immer mit dem höchsten Reinheitsgrad verwendet.

Farbstoffe

Hoechst 33342	Molecular Probes
Syto 13	Molecular Probes

Antikörper

GAM-IgG-AP-Conjugate	Sigma
GAR-IgG-AP-Conjugate	Sigma

Enzyme

Soweit nicht anders erwähnt, stammen die Restriktionsenzyme und die anderen Enzyme von New England Biolabs.

Kits für DNA-Arbeiten

Wizard Plus Minipreps	Promega
GFX Micro Plasmid Prep Kit	Pharmacia Biotech
Wizard Midipreps	Promega
Qia Quick PCR Purification Kit	Qiagen
Qiaex II Gel Extraction Kit	Qiagen
DNA Ligation Kit Vers. 2	TaKaRa
T7 Sequencing Kit	Pharmacia Biotech
PCR Beads "Ready to go"	Pharmacia Biotech

Sonstige MaterialienMikroinjektion

SodaglasKapillaren mit und ohne Filament (Länge = 100 mm, $\varnothing_a = 1,2$ mm, $\varnothing_i = 0,96$ mm)	Hilgenberg
PVC-Schlauch für Mikroloader	Teichmann
Heizdraht für Mikroschmiede (Chrom-Nickel, $\varnothing = 4-5$ mm)	Bulton-Kanthar
Preßluft (gereinigt), zur Druckinjektion	Glaslager
Deckgläser 24 x 60 mm	Bender und Hobein

Zellaufzucht

abgesägte Glasröhrchen	Werkstatt
Gewebekulturschalen (17,8 x 16 mm)	Greiner Labortechnik

Dokumentation

U-matic- und S-VHS-Videobänder	Videoabteilung
Schwarz-Weiß-Negativfilme (AGFA, APX 25)	Fotoabteilung
AGFA HDC-Farbfilm (Iso 400)	Foto Reinhardt
Polaroidfilme (Iso 3000)	Polaroid

2.3 Geräte

Mikroskopie

Inversmikroskop ICM 405	Zeiss
Stereolupe Stemi SV8	Zeiss
Interferenzfilter	L.O.T.

Mikroinjektion

Mikroinjektor 5242	Eppendorf
Mikromanipulator „De Fonbrune,,	Bachofer
Mikromanipulator „Leitz,,	Leitz
Mikromanipulator M3301	WPI
Mikropositionierer D10/S10	Brindi
Kapillarenziehgerät „Livingston,,	Bachofer

Zentrifugen

Laborfuge M mit Schwenkbecherrotor 2150	Heraeus
Megafuge 1.0R	Heraeus
Biofuge B	Heraeus
Beckman J2-HS	Beckman
Sorvall Ultracentrifuge "OTD-Combi"	DuPont

Biofuge 13	Heraeus
Biofuge "fresco"	Heraeus
Minifuge RF	Heraeus

Gele und Blots

Mini-Protean II	Bio-Rad
Protean II xi cell	Bio-Rad
Heizblock Dri-Block DB 3	Techne
Semi-Dry Blot Apperatur	Werkstatt
2002 Power supply	LKB Bromma
Powersupply Desatronc 500/400	Desaga
Base Ace Sequencer	Stratagene
Mini Sub DNA Cell	Bio-Rad

Proteinbestimmung

Multiscan MCC/340	Titertek
Drucker Citizen	Citizen

Dokumentation

Panasonic „Moon Light,, Kamera WV-1900	AVT-Horn
Schwarz-Weiß-CCD-Kamera BC-2	AVT-Horn
Panasonic Time-Date-Generator WJ-810	AVT-Horn
Panasonic Videorecorder AC-7330	AVT-Horn
Sony Videorecorder VO-5800 PS	AVT-Horn
Sony Schwarz-Weiß-Monitor KX-14CP1	AVT-Horn
Nikon F-601 Kamera	Stober
DS 34 Direct Screen Instant Camera	Polaroid

Bildverarbeitung

Indy-Workstation (SGI) mit Framegrabber (Galilei- Board) Noran Instruments
Personalcomputer Ulead Systems
Bildverarbeitungsprogramm PhotoImpact

sonstige Geräte

Spectrophotometer Model 35 Beckman
Luftschüttler HAT Infors Infors
Vacuum Concentrator Bachofer
Fluo-Link FLX Biometra
Brutschrank Memmert

3. Methoden

3.1 Autogamie

3.1.1 Induktion der Autogamie

50ml gut angewachsene monoxenische 7S-Zellen, die etwa 4-5 Tage nach dem Überimpfen in Salatmedium gewachsen waren, wurden zweimal mit frischem Salatmedium gewaschen. Man verwendete dazu jedes Mal etwa 50 ml an frischem Medium und zentrifugierte die Zellen zwischen den einzelnen Waschschrritten zwei Minuten bei 600 rpm (Laborfuge M mit Schwenkbecherrotor 2150 von Heraeus).

Nach dem Waschen blieben die Zellen in etwa 3 ml Salatmedium ohne Futterbakterien (*Enterobacter aerogenes*) und sollten dann etwa zwei Tage bei 25°C im Brutschrank inkubieren, um Autogamie zu induzieren.

Eine Trübung des Mediums ließe auf das Vorhandensein von Bakterien schließen. Falls noch Bakterien nach dem Waschen vorhanden waren, konnte es bis zu vier Tage dauern, bis die Paramecien genug gehungert hatten, um Autogamie zu durchlaufen.

3.1.2 Nachweis der Autogamie

7S-Zellen, die vorher etwa zwei Tage gehungert hatten, wurden mit dem Hoechst-Farbstoff 33342, gelöst in 5 mM Pipes, angefärbt.

Die Qualität der Anfärbung war von der Inkubationszeit und der Konzentration abhängig. Je höher die Konzentration und je länger die Inkubationszeit, desto intensiver war die Färbung. Allerdings beeinträchtigte eine höhere Konzentration das Überleben der Zellen. Auch die Lichtausbeute des Mikroskops war ein wichtiger Faktor: Je besser die Lichtausbeute, desto geringere Farbstoffkonzentrationen konnten verwendet werden.

Für einen Überblick, ob Autogamie induziert wurde, verwendete man höhere Konzentrationen des Farbstoffes, die die Zellen nicht lange überlebten. Je nach Mikroskop lagen diese Konzentrationen bei 100-500 µM. Für das verwendete Zeiss-Mikroskop im Thermokonstantraum mit relativ schlechter Lichtausbeute verwendete ich 500 µM Endkonzentration von Hoechst 33342. Für diesen Überblick wurden 10 µl der Zellsuspension,

die vorher etwa 5 min mit dem Farbstoff inkubiert worden waren, auf einem nicht-silikonisierten Deckglas mit einem Deckglas bedeckt und unter UV-Licht (351 nm) ausgezählt.

Der Anteil der Zellen mit einem fragmentierten Makronukleus sollte bei mindesten 50% liegen, damit sich die Einzelzellbetrachtung lohnte.

3.1.3 Gewinnung autogamer Zellen

Dafür verwendete man Hoechst 33342 in Konzentrationen von 5-50 μM , die die Zellen sehr gut überlebten. (Ich verwendete meist 50 μM , da, wie vorher schon erwähnt, die Lichtausbeute am Zeiss-Mikroskop gering war.)

Hierbei war keine Beeinträchtigung der Zellen sichtbar, Schwimmverhalten und Exocytose waren selbst nach mehreren Stunden normal. Die Zellen überlebten und teilten sich unverändert. Die Zellen wurden hierzu mit Hoechst 33342 für etwa 30 Minuten inkubiert. Dann wurden sie auf einem silikonisierten Deckglas in einen Tropfen aus etwa 0,5 μl konditioniertem Medium (siehe 3.3.1) vereinzelt und mit Parafinöl überschichtet. Anschließend wurde der Tropfen unter dem Mikroskop abgesaugt und die Zelle bei UV-Anregung (351 nm) betrachtet. Eindeutig autogame Zellen hatten einen vielfach fragmentierten Makronukleus, der deutlich hellblau sichtbar war und sich von den autofluoreszierenden Vakuolen, die hellgrün oder orange erschienen, unterschied.

Wenn die Zelle einen fragmentierten Makronukleus besaß, wurde konditioniertes Medium durch eine Kapillare zugegeben, so daß die Zelle wieder im Tropfen schwamm. Jetzt wurde sie durch eine Vereinzlungskapillare aus dem kleinen Tropfen in einen großen Tropfen aus etwa 20 μl konditioniertem Medium auf einem neuen Deckglas ohne Parafinölüberschichtung überführt. Von hier aus konnte die autogame Zelle durch eine freibewegliche Vereinzlungskapillare (mit dem Mund ansaugbar) in ein kleines Glasröhrchen transferiert werden.

Möglichst steril wurden 200 μl konditioniertes Medium und ein Tropfen (etwa 50 μl) von gut angewachsenem *Enterobacter aerogenes* zugegeben und die Zelle wurde im Brutschrank bei 25°C so lange inkubiert, bis sie sich 4 bis 6-mal geteilt hatte. Jetzt konnten die Zellen zur Injektion verwendet werden.

3.2 Mikroinjektion und Transformation der Zellen

3.2.1 Kapillaren

- Injektionskapillare:** Ein Glasröhrchen mit Filament wurde bei 23 V gezogen. Nach einem Teilstrich des Pullers wurde unterbrochen, danach nochmal bei 23 V ausgezogen. Die Feder wurde immer 3 cm gespannt. Das feine Röhrchen an der Spitze der Kapillare sollte etwa 5 µm Durchmesser haben. Die Kapillare wurde dann über einem rotglühenden Wolframdraht um 70° abgewinkelt.
- Grobe Absaugkapillare:** Ein Glasröhrchen ohne Filament wurde bei 23 V gezogen. Nach dem ersten Teilstrich des Puller wurde unterbrochen, danach wurde bei 15 V erhitzt. Die Öffnung der Kapillare wurde unter Sichtkontrolle durchs Mikroskop auf 10 µm zugeschmolzen. Mit Hilfe eines rotglühenden Wolframdrahts wurde die Spitze zunächst um 70° abgebogen und dann um etwa 50° zurückgebogen, sodaß eine Z-förmige Spitze entstand.
- Vereinzelungskapillare:** Ein Glasröhrchen ohne Filament wurde wie die grobe Absaugkapillare gezogen, dann aber nicht zugeschmolzen, so daß die Öffnung etwa 100 µm groß blieb. Die Spitze wurde, wenn die Kapillare in einem Mikromanipulator verwendet werden sollte, um 70° abgewinkelt, ansonsten blieb die Kapillare gerade.

3.2.2 Silikonisierte Deckgläser

Deckgläser (24 mm x 120 mm) wurden mit einem Gemisch aus Silikon:Isopropanol = 1:20 benetzt und anschließend im Trockenschrank bei 120°C eine Stunde getrocknet.

3.2.3 Immobilisierung und Vorbereitung der Zellen

Wenn den Zellen Plasmiden injiziert werden sollten wurden die Zellen vor dem Vereinzeln mit 0,01% AED getriggert, damit sie während der Injektion nicht exocytieren und ruhiger lagen. Vor der Vereinzelung wurden die Zellen in Dryl`s Puffer für 5 Minuten inkubiert.

Dryl's Puffer: 2 mM Na-Citrat
1 mM NaH₂PO₄
1 mM Na₂HPO₄
1,5 mM CaCl₂
0,2 % BSA

Dafür wurden die Zellen im Salatmedium 1:1 mit dem Dryl's Puffer gemischt. Dann wurden die Zellen unter Sichtkontrolle durch ein Binocular mit der Vereinzlungskapillare eingefangen und einzeln in einen etwa 0,5 µl großen Tropfen aus Dryl's Puffer, der sich auf einem silikonisiertem Deckglas befand, transferiert. Die Tropfen, in der Regel 10 - 20 Stück auf einem Deckglas, wurden mit Parafinöl überschichtet, um die Austrocknung zu verhindern, gleichzeitig aber einen Luftaustausch erlauben.

Ein einzelner Tropfen war groß genug, daß das *Paramecium* frei schwimmen und auch mehrere Tage darin verbringen konnte. Für die Injektion wurde das überflüssige Medium so weit abgesaugt, bis nur noch ein dünner Flüssigkeitsfilm vorhanden war, in dem sich das *Paramecium* nicht mehr bewegen konnte.

Nach der Injektion wurde über eine Kapillare wieder konditioniertes Medium zugegeben, bis der Tropfen die Ausgangsgröße erreicht hatte.

3.2.4 Überprüfen einer erfolgreichen Injektion

Nach der Injektion wurden die Zellen über Nacht auf diesem Deckglas im Brutschrank bei 25°C aufbewahrt. Nach 8 - 12 Stunden wurden die Zellen auf durch GFP verursachte Fluoreszenz (siehe 4.2) überprüft. Dazu wurde das Medium wieder abgesaugt und die Zelle mit Licht von 490 nm beleuchtet. Wenn das gleichzeitig mit dem *antisense*-DNA enthaltenden Plasmid injizierte GFP-Expressionsplasmid in den Makronukleus gelangt war und GFP exprimiert wurde, fluoreszierte die Zelle gleichmäßig hell, und der Makronukleus war nicht als dunkler Fleck zu erkennen, da die GFP-Moleküle klein genug waren, um auch durch die Kernporen in den Kern zu gelangen. Die GFP-Fluoreszenz war in der Regel nur 2 bis 3-mal stärker als die Autofluoreszenz. Wenn also der Makronukleus auch hell war, war dies ein sicheres Anzeichen für die Expression von GFP, da der Makronukleus keine Autofluoreszenz zeigte.

3.3 Aufzucht der transformierten Zellen

3.3.1 Konditioniertes Medium

Paramecien konditionieren sich ihr Medium selber, indem sie verschiedene Substanzen in ihre Umgebung abgeben. Ein bestimmtes Volumen-Zellzahl-Verhältnis ist also wichtig, damit immer genügend Paramecien vorhanden waren, um das frische Medium zu konditionieren. Wenn einzelne Zellen in ein größeres Volumen transferiert wurden, konnten sie sich ihr Medium nicht genügend konditionieren und starben deshalb ab. Wenn sie aber in Medium transferiert wurden, welches schon vorher konditioniert war, überlebten sie. Deshalb wurde bei geringen Zellzahlen immer konditioniertes Salatmedium verwendet. Man gewann konditioniertes Medium dadurch, daß man logarithmisch wachsende monoxenische 7S Zellen abzentrifugierte und das Medium durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße filtrierte, welcher weder Paramecien noch Bakterien hindurch ließ. Jetzt wurde das sterile konditionierte Medium in sterile Röhrchen abgefüllt und kühl gelagert. Es war so einige Monate haltbar.

3.3.2 Aufzucht

Nachdem eine erfolgreiche Injektion festgestellt worden war, wurde der Zelle wieder genügend konditioniertes Medium zum Schwimmen gegeben.

Dann wurde die Zelle mit der Vereinzlungskapillare in einen größeren Tropfen (mind. 20 µl) überführt. Hieraus konnte sie mit der frei beweglichen Vereinzlungskapillare in ein kleines Glasröhrchen transferiert werden. Jetzt wurden 200 µl konditioniertes Medium und ein Tropfen *Enterobacter aerogenes* (etwa 50 µl) hinzugefügt und die Zelle im Brutschrank bei 25°C inkubiert. Nach 3-4 Tagen oder bei einer Zellzahl von etwa 50, wurden 400 µl frisches Salatmedium zugegeben. Weitere 1-2 Tage später wurde mit Salatmedium auf 1 ml aufgefüllt. Wenn die Zellen dicht angewachsen waren, wurden sie in ein Röhrchen mit 4 ml frischem Salatmedium überführt (dies sollte etwa 1 Woche nach der Injektion der Fall sein). 2-4 Tage später wurde das eine Röhrchen auf zwei neue, ebenfalls 4 ml Salatmedium enthaltende, Röhrchen verteilt und nach 2-4 Tagen nochmal auf insgesamt 4 Röhrchen. Wenn die Paramecien gut angewachsen waren, wurden alle 4 Röhrchen in einen kleinen Kolben (etwa 50 ml Salatmedium) überimpft. Der kleine Kolben wurde dann auf 2 mittlere Kolben (je etwa 250 ml Salatmedium) verteilt und diese wurden wieder auf z.B. 2 große Kolben (je etwa 500 ml Salatmedium) und 2 kleine Kolben oder ähnliche Volumina verteilt. Man erhielt so etwa 1,5 l

Medium mit logarithmisch wachsenden Paramecien, was einer Zellzahl von 1-2 Mio. Zellen entspricht.

3.4 Aufarbeitung der transformierten Zellen

3.4.1 Vorbereitung der transformierten Zellen

Das Kulturvolumen eines hochgewachsenen Klons wurde bestimmt. Die Zellen wurden über 8 Lagen dünnes Filterpapier filtriert. Dann wurden die Zellen bei 600 rpm für 2 Minuten eingengt und in 200ml Pipes-Puffer aufgenommen.

Pipes-Puffer: 5 mM Pipes
 1 mM KCl
 0,1 mM CaCl₂ pH 7

Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt, um die Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden die Paramecien 4-6 Stunden in Pipes-Puffer inkubiert, um ihnen Gelegenheit zu geben, die bereits aufgenommenen Bakterien zu verdauen, damit keine Verunreinigungen durch bakterielle Proteine und DNA entstanden.

Bestimmung der Zellzahl:

100µl der Zellsuspension wurden 1:1 mit Na-Acetat (0,2 M, pH 5) gemischt. Na-Acetat stellte die Zellen ruhig. Sie konnten nicht mehr schwimmen, überlebten aber bis zu 24 Stunden darin. Jetzt wurden 10 µl auf einen Zählobjektträger pipettiert und dort unter dem Mikroskop gezählt. Die Gesamtzellzahl und die Zellkonzentration im Pipes-Puffer konnte dann unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnungen berechnet werden.

3.4.2 Herstellung des Zellhomogenats

Je nach Anzahl der Zellen pro Klon wurden 250-500.000 Zellen abgenommen und in 1 ml PBS für DNA-Analysen aufgehoben.

Die restlichen Zellen (meist etwa 2 Mio. Zellen) wurden bis auf 1 ml in Puffer eingengt.

Folgende Protease-Inhibitoren wurden zugegeben:

Leupeptin 50 µg/ml
Pefabloc 50 µg/ml
E64 28 µg/ml
Pepstatin A 10 µg/ml

Die Zellen wurden dann auf Eis durch 50 bis 100-mal Pottern homogenisiert. Der Vorgang wurde von Kontrollen am Mikroskop begleitet. Die Zellen sollten gut homogenisiert sein. Das Homogenat wurde in der Ultrazentrifuge bei 100.000g für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand vom Pellet getrennt. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer resuspendiert.

3.4.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford entweder mit Bio-Rad- oder mit Roth-Proteinfärbelösungen durchgeführt.

3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Es wurden entweder Mini-Gele oder 1,5 mm x 14 cm x 16 cm Gele gefahren. Das Trenngel bestand aus 10% Acrylamid, das Sammelgel aus 5% Acrylamid. Auf Mini-Gele wurde pro Spur 10 µg Protein geladen und die großen Gele 50 µg Protein je Spur.

Behandlung der Proben:

Den 100.000g Überständen und Pellets wurde das der Proteinmenge entsprechende Volumen entnommen, 2 x Probenpuffer (0,4 M Tris (pH 8), 2% SDS, 20% Glycerin, 0,001% Bromphenolblau, 1% DTT) zugegeben und die Proben sofort in einen Heizblock mit 95°C gestellt. (Das sofortige Erhitzen sollte verhindern, daß eine DDT-aktivierte Protease die Proteine abbaut.). Nach dem Erhitzen wurden den Proben 1/10 Vol 20% Iodacetamid zugegeben und die Proben für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Jetzt konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden.

Die großen Gele wurden über Nacht bei 60 V laufen gelassen (dauert etwa 16 Stunden), die Mini-Gele liefen bei 150 V für etwa 2 Stunden.

3.4.5 Western Blots

Die großen Gele wurden *semi-dry* geblottet (Apparaturen siehe Materialien).

Die benötigten Puffer sind:

Anodenpuffer I	0,3 M Tris 20% MetOH
Anodenpuffer II	20 mM Tris 20% MetOH
Kathodenpuffer	40 mM Aminocapronsäure 0,01% SDS 20% MetOH

Das Gel wurde vor dem Blotten 15 Minuten im Kathodenpuffer inkubiert. Es wurde auf Nitrocellulosemembran der Porengröße 0,45 µm geblottet. Die Membran wurde zunächst in dest. Wasser und dann in Kathodenpuffer benetzt. Das Sandwich wurde wie folgt aufgebaut:

Auf die Anode: 6 Stück Whatmanpaper in Anodenpuffer I, 3 Stück Whatmanpaper in Anodenpuffer II, Membran, Gel, 6 Stück Whatmanpaper in Kathodenpuffer und darauf die Kathode.

Gebloftet wurde bei 230 mA für eine Stunde.

Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt.

Die Mini-Gele wurden in Tanks geblottet. Das Sandwich sah folgendermaßen aus:

Anode: Schwamm, 2 Stück Whatmanpaper in Transferpuffer, Membran, Gel, 2 Stück Whatmanpaper in Transferpuffer, Schwamm und jetzt die Kathode

Die Membran wurde erst in dH₂O und dann in Transferpuffer benetzt.

Der Transferpuffer bestand aus:

25 mM Tris
192 mM Glycin
20% MetOH

Gebloftet wurde eine Stunde bei 100 V und 4°C.

Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt.

3.4.6 Immundetektion

Die Nitrocellulosemembran wurde zunächst mit 5% Milchpulver in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Bindungsstellen für Proteine abzudecken.

TBS-Puffer: 20 mM Tris-HCl
500 mM NaCl pH 7,6

Dann wurde als primärer Antikörper anti-PP63 Ig (R537) , hergestellt gegen rekombinantes PP63/Parafusin (Hauser *et al.*, 1997) in einer 1:2000 Verdünnung in 0,25% Milchpulver/TBS verwendet. Die Inkubationsdauer betrug 1 ½ Stunden.

Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit TBS wurde *Goat-anti-Rabbit-IgG*, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase in einer 1:10.000 Verdünnung in 0,25% Milchpulver/TBS, als sekundärer Antikörper benutzt.

Anschließend wurde wieder 3 mal mit TBS gewaschen.

Für die Detektion wurde alkalischer Phosphatase-Puffer (Bio-Rad) 1:25 mit dH₂O verdünnt und je 1:100 Verdünnung von NBT(Nitroblau-Tetrazolium) und BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-

phosphat) zugegeben. Wenn die Banden gut sichtbar waren (nach etwa 10 Minuten) wurde die Reaktion mit dH₂O abgestoppt.

Der Blot wurde photographiert und dann zwischen zwei Whatmanpaper getrocknet.

3.4.7 Silberfärbung des Gels

Als eine empfindlicher Methode der Proteinfärbung (im Vergleich zur Färbung des Blots mit Ponceau S) wurden manche Gele nach dem Blotten mit der Silberfärbung, eine abgeänderte Methode nach Heukeskoven, angefärbt (Sambrock *et al.*, 1989).

Hierzu wurde das Gel für 3 Stunden oder über Nacht in 30% EtOH, 10% Essigsäure gelagert. Dann wurde es 30 Minuten in 30% EtOH, 0,5 M Natriumacetat, 0,5% Glutaraldehyd und 0,2% Natriumthiosulfat inkubiert und anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen (mindestens 3 x 10 Minuten). In 0,1% AgNO₃ und 0,02% Formaldehyd blieb das Gel für eine Stunde. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wurde das Gel durch Zugabe von 2,5% Na₂CO₃ und 0,01% Formaldehyd entwickelt. Nach Bedarf wurde die Reaktion mit 50 mM EDTA abgestoppt. Nach erneutem Waschen in destilliertem Wasser wurde das Gel in Cellophan-Folie aufgespannt und getrocknet.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Plasmid-DNA wurde entweder mit Wizard Plus Miniprep Kits von Promega (Madison, WI/USA) oder mit GFX Micro Plasmid Preps von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) präpariert. Um genügende Mengen von den Plasmiden zu erhalten, wurden jeweils 10 Ansätze parallel ausgeführt.

Die letzten Großpräparationen wurden folgendermaßen durchgeführt: Einer alkalischen Lyse, Neutralisation und Abzentrifugation der Zellreste folgte eine Ethanolfällung der Nukleinsäuren. Anschließend wurden die noch darin enthaltenen Ribonukleinsäuren durch RNase-Behandlung entfernt. Die Nukleinsäurekonzentration wurde entweder photometrisch bestimmt (1 A₂₆₀=50 µg/ml DNA) oder anhand der Intensität der Ethidiumbromidfärbung im Agarosegel im Vergleich zu einem bekannten Standard abgeschätzt.

3.5.2 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Analyse und zum Linearisieren rekombinanter DNA wurde die DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Reaktionsbedingungen wurden dabei wie vom Hersteller empfohlen gewählt. Bei Totalverdau in Großansätzen betrug die Reaktionszeit 3 Stunden, Partialverdau wurden durch Zugabe von nur geringen Mengen Enzym und einer Reaktionsdauer von 1 Stunde erreicht.

3.5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten

(A) aus LMP-Agarose: DNA-Fragmente wurden aus Low-Melting-Point-Agarosegelen durch Ausschmelzen isoliert. Von Agaroseblöckchen mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde das Volumen bestimmt. Anschließend wurde mit dH₂O eine Endkonzentration von 0,4% Agarose eingestellt, 1/10 Volumen des Gesamtvolumens 3M Na-Acetat (pH=4,8) zugegeben und der Ansatz bei 65°C geschmolzen. Die Lösung wurde zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol/TE (auf 37°C erwärmt) extrahiert. Anschließend wurde die H₂O-Phase mit demselben Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und dann die DNA mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol bei -20°C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (15 Minuten), Waschen und Trocknen des Pellets wurde dieses in 10 µl dH₂O aufgenommen.

(B) aus Normalagarose: DNA-Fragmente wurden mit dem QiaexII-Kit von Quiagen (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert und in 20 µl dH₂O aufgenommen.

3.5.4 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisieren

DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol, gesättigt mit TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=8) kräftig geschüttelt und zur Phasentrennung 2 Minuten zentrifugiert. Die wässrige (obere) Phase wurde dann dreimal mit demselben Volumen Chloroform extrahiert und anschließend die DNA mit Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl dH₂O aufgenommen.

3.5.5 Herstellung von glatten Enden aus DNA-Doppelstrang-Überhängen

Zum Auffüllen von 5'-Überhängen wurde das Klenow-Fragment (Pharmacia) der *E.coli* DNA-Polymerase I verwendet. Dabei wurde nach Sambrook *et al.*, 1989 vorgegangen und pro 1 µg DNA 2U Enzym eingesetzt.

Zum Abbau von 3'-Überhängen wurde die T4-DNA-Polymerase (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet.

3.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Es wurde für die Ligation der Ligationskit von TaKaRa verwendet und ein 3-6facher Überschuß an Insert gegenüber dem Plasmid verwendet.

3.5.7 Transformation von *Escherichia coli*

E.coli-Zellen (DH5 α) wurden mit der CaCl₂-Methode kompetent gemacht (Sambrook *et al.*, 1989 modifiziert):

500 μ l einer frischen Übernachtskultur der zu transformierenden Zellen wurden in 50 ml LB-Medium bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4 bis 0,8 wachsen gelassen, abzentrifugiert, mit 15 ml eiskaltem 100 mM MgCl₂ gewaschen und dann 30 Minuten in eiskaltem TC (10mM Tris pH=7,5, 75 mM CaCl₂) auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4°C wurde das Zellpellet in 3 ml eiskaltem TC resuspendiert und die Suspension auf Eis aufgehoben (bis zu mehreren Stunden, die Kompetenz der Zellen kann sich dabei noch verbessern).

Zur Transformation wurden je 150 μ l CaCl₂-Zellen zu der zu transformierenden DNA (in der Regel ein Ligationsansatz) gegeben, 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 2 Minuten bei 42°C hitzebehandelt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium zu den auf Raumtemperatur abgekühlten Zellen und 1-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen zu 1/10 und 9/10 auf Selektionsplatten plattiert und über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

3.5.8 DNA-Sequenzanalyse

DNA-Sequenzierung wurde mit dem T7 Sequencing Kit von Pharmacia (Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Er basiert auf dem Kettenabbruchverfahren durch Einbau von Didesoxynukleotiden nach Sanger *et al.*, 1977 und Smith, 1980. Als Primer wurden entweder die käuflichen M13/pUC-Primer (universal, reverse Primer, Pharmacia) oder synthetische Oligonukleotide verwendet. Zur Auftrennung wurde ein denaturierendes Polyacrylamidgel (6%) mit 6 M Harnstoff und die Sequenziereinheit von Stratagene verwendet.

3.5.9 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR wurde mit dem Uno-Thermoblock von Biometra durchgeführt. Eingesetzt wurden 15-20 ng „Mini-Prep-DNA,, je 25 pmol Primer und 2 U ExTaq-Polymerase. Die Ansätze wurden 5 Minuten auf 94°C erhitzt, dann ließ man sie durch folgendes Programm laufen: 8 Zyklen mit 30 Sekunden 94°C, 45 Sekunden 50°C, 60 Sekunden 72°C, dann 8 Zyklen mit 30 Sekunden 94°, 45 Sekunden 53°C, 60 Sekunden 72°C und schließlich 8 Zyklen mit 30 Sekunden 94°C, 45 Sekunden 56°C, 60 Sekunden 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurden die Ansätze noch 10 Minuten auf 72°C gehalten, dann auf 4°C abgekühlt. Die gesamten Ansätze wurden auf einem 0,8% LMP-Agarosegel oder normaler 0,8% Agarose aufgetrennt, die DNA aus den Gelen isoliert, Ethanol gefällt und dann für eine Ligation eingesetzt.

3.5.10 Radioaktive Markierung von kurzen Oligonukleotiden

PCR-Fragmente, die als Sonde verwendet wurden, wurden mit den Ready-to-Go-DNA-Labeling-Beads (Pharmacia Biotech) und [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP nach Anweisungen des Herstellers markiert.

3.5.11 Isolierung von DNA für Southern Blot Analysen

DNA-Isolierung wurde nach Godiska *et al.*, 1987 aus 250.000 bzw 500.000 *Paramecium*-Zellen in 0,5 ml bzw. 1ml PBS durchgeführt.

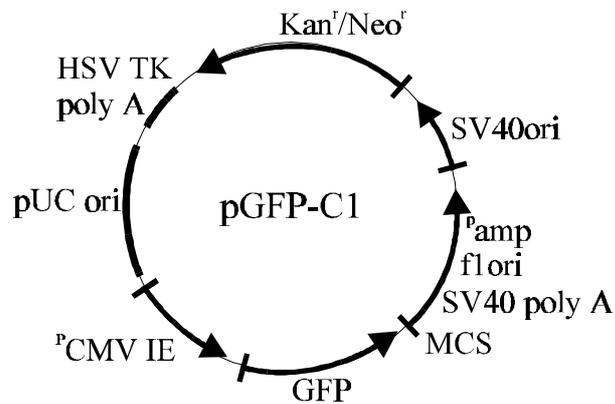
3.5.12 Southern Blot-Analyse von DNA

Southern Blot-Analysen wurden nach Sambrook *et al.*, 1989 durchgeführt. Pro Spur wurden je 10 μg genomische DNA (mit KpnI und XhoI geschnitten) aufgetragen. Als Sonde diente ein PCR-Fragment aus Primer 1 und 2 (Hauser *et al.*, 1997).

3.6 Plasmide

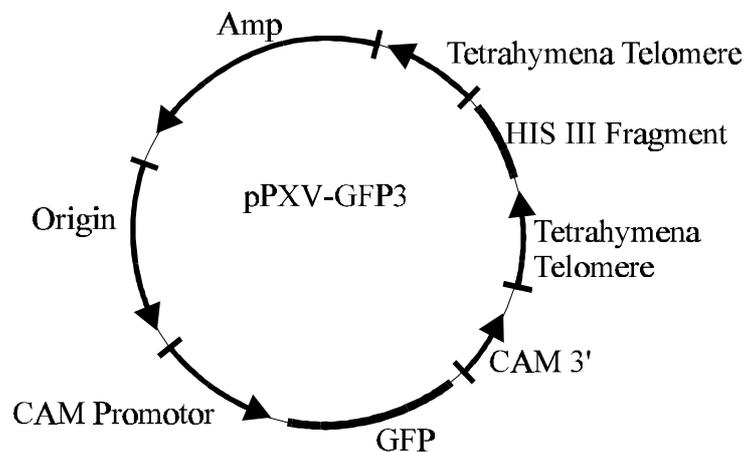
3.6.1 Konstruktion von pPXV-GFP3

Das GFP-Gen stammte aus dem pGFP-C1-Plasmid von Clontech (accession no U19280) und war das Wildtypgen.



Über PCR wurden Mutationen eingeführt, die zu einem Nukleotidaustausch von Phe₆₄ und Ser₆₅ zu Leu₆₄ und Thr₆₅ führten. Dieses GFPmut1 sollte eine 35fach stärkere Fluoreszenz haben (Cormack *et al.*, 1996). Gleichzeitig entstand eine neue HincII-Schnittstelle.

Ebenfalls über PCR wurde das Stopcodon so ausgetauscht, daß es von *Paramecium* erkannt wurde und eine neue StuI-Schnittstelle entstand.



Die verwendeten Oligos sind:

GFP-NheI: CCGTCAGATCCGCTAGCGC

L/T-Primer: CTTGTCACTACGTAACTTATGGTGTT

L/T-comp-Primer: AACACCATAAGTTAACGTTAGTGACAAG

StuI-comp-Primer:GCTTGAGCTCGAGATCTGAGGCCTCACTTGTATAG

Das PCR-Produkt wurde mit NheI und XhoI geschnitten und in das mit SpeI und XhoI geschnittene Plasmid pPXV ligiert. pPXV wurde von Haynes *et al.*, 1995 konstruiert.

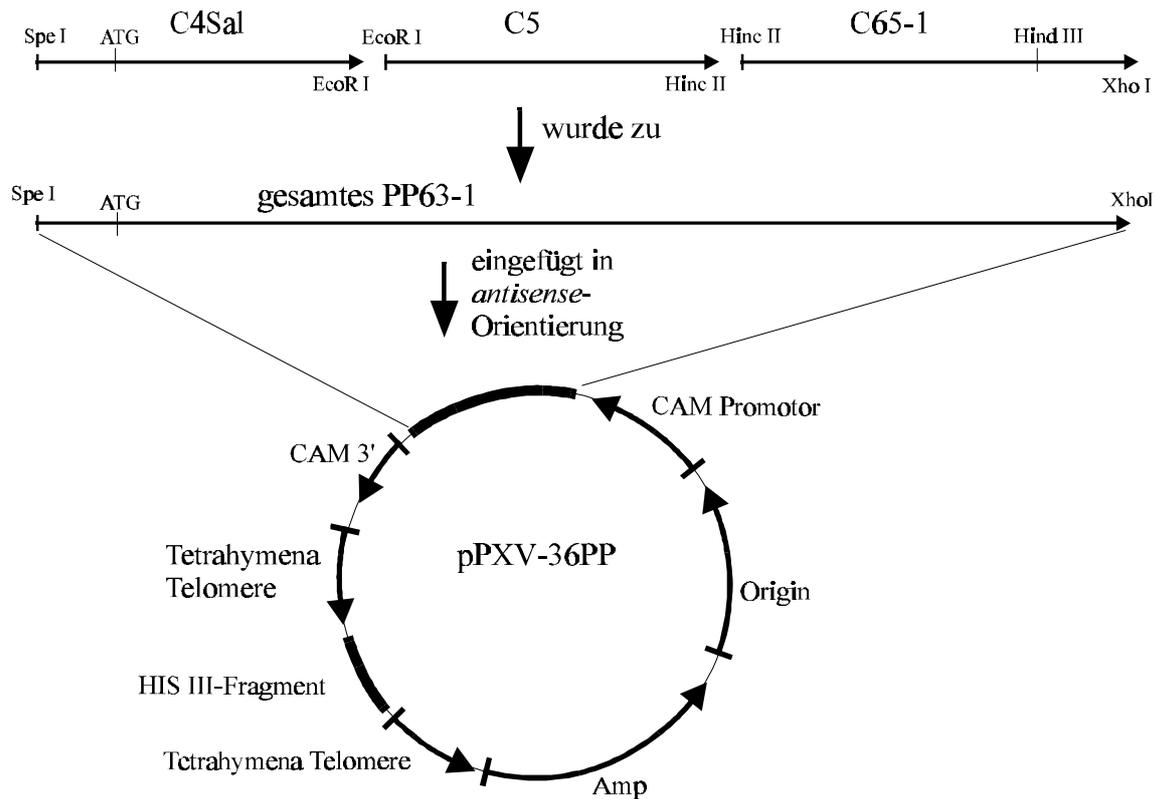
3.6.2 Konstruktion von pPXV-36PP

Das Gen von PP63/Parafusin wurde über eine cDNA-Bank von *Paramecium* isoliert (Hauser *et al.*, 1997) und in den Vektor PBK-CMV (Stratagene) über eine künstliche XhoI-Schnittstelle am 3'-Ende hinter dem PolyA-Schwanz und eine künstliche EcoRI-Schnittstelle am 5'-Ende eingefügt, und gab so den Klon 24, das Ausgangsprodukt für die Vektoren pPXV-36PP, pBS-C4Sal und pBS-C456-SX14 Δ 8. Das 5'-Ende ist nicht der Anfang des PP63/Parafusin-Genes, welcher erst durch den Vergleich mit einer genomischen Bank identifiziert werden konnte.

Durch bestimmte Endonuclease-Schnitte wurde das PP63/Parafusin-Gen aus Klon 24 in drei Teilstück unterteilt. Das 5'-Ende wurde über EcoRI geschnitten und in entsprechend geschnittenen pBS ligiert. Der neu entstandene Vektor hieß pBS-C4. Der mittlere Teil wurde mit EcoRI und HincII geschnitten, in mit EcoRI und HincII geschnittenen pBS ligiert und hieß pBS-C5. Das 3'-Ende wurde nach einem Schnitt mit HincII und XhoI zu pBS-C6 ligiert.

Um einen Vektor zu konstruieren, der das gesamte Wildtypgen PP63-1 (Isoform 1 von PP63/Parafusin) enthielt, wurde pBS-C456-SX14 hergestellt. Ausgangspunkt für die Konstruktion von pBS-C456-SX14 waren Modifikationen der drei Fragmente von PP63/Parafusin, die oben beschrieben sind. Diese Fragmente wurden aus ihren Vektoren ausgeschnitten. Das 5'-Ende von PP63/Parafusin stammt aus pBS-C4Sal (Konstruktion von pBS-C4Sal und die Herstellung des künstlichen 5'-Endes von PP63/Parafusin siehe 3.6.3) durch Schnitt mit SpeI und EcoRI, der mittlere Teil aus pBS-C5 mit EcoRI und HincII und das 3'-Ende aus pBS-C65-1 (ein modifizierter C6) mit HincII und XhoI herausgeschnitten, die drei Fragmente wurden ligiert und in einen durch SpeI und XhoI geschnittenen pBS (SK-) eingebaut, so daß pBS-C456-SX14 entstand.

Für pPXV-36PP wurde das gesamte Wildtyp PP63-1 mit XhoI und KpnI aus pBS-C456-SX14 herausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pPXV ligiert, so daß PP63-1 eine umgekehrte (*antisense*) Orientierung im Vektor enthalten war. pBS-C456-SX14 und pPXV-36PP wurden von K. Hauser und C. Feldbaum konstruiert. Für die Injektion wurde pPXV-36PP mit SfiI linearisiert.



3.6.3 Konstruktion von pBS-C4Sal

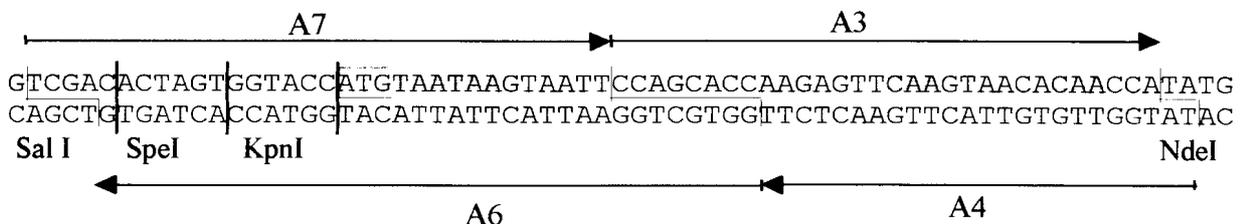
Für die Konstruktion von pBS-C4Sal wurde pBS-C4 (siehe 3.6.2) verwendet. Nachdem das richtige 5'-Ende des PP63/Parafusin-Genes bekannt war, wurde das 5'-Ende in pBS-C4 über Oligos künstlich hergestellt und eingefügt. Es wurden folgende Oligos verwendet:

A3: CCAGCACCAAGAGTTCAAGTAACACAACCA

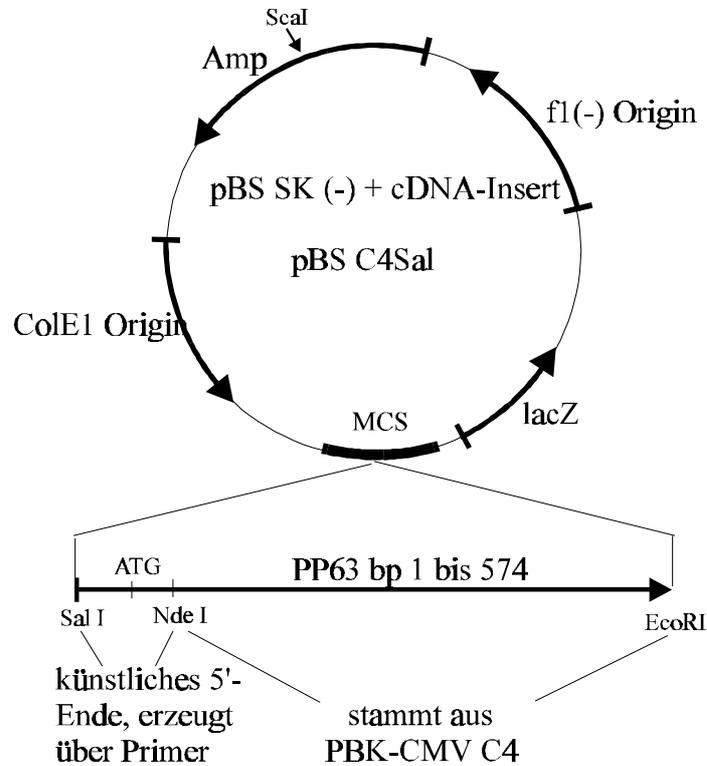
A7: TCGGACACTAGTGGTACCATGTAATAAGTAATT

A4: TATGGTTGTGTTACTTGA ACTCTT

A6: GGTGCTTGGAATTACTTATTACATGGTACCACTAGTG



Die Oligos überlappten mit den angrenzenden Enden des Inserts und so wurde durch Annealing der Oligos ein künstliches 5'-Ende des PP63/Parafusin-Genes erzeugt und in den entsprechend geschnittenen pBS-C4 ligiert, so daß pBS-C4Sal entstand. pBS-C4Sal wurde von K. Hauser und C. Feldbaum konstruiert. Für die Injektion wurde er mit ScaI linearisiert.



4. Ergebnisse

4.1 Autogamie

Um weitere Untersuchungen des exocytosesensitiven Phosphoproteins PP63/Parafusin vornehmen zu können, war es ein Ziel dieser Diplomarbeit, Mutanten herzustellen, die kein PP63/Parafusin exprimieren. Aufgrund der besonderen genetischen Voraussetzungen von *Paramecium* konnten dies nur temporäre Mutanten sein.

Nach einer Mikroinjektion in den Makronukleus blieb die injizierte DNA nur so lange erhalten, bis die Zelle Autogamie durchläuft. Da bekannt war, daß *Paramecium* frühestens 20-25 Teilungen nach einer Autogamie erneut in der Lage war, Autogamie zu durchlaufen, war es ein erstes Ziel, Zellen zu identifizieren, bei denen Autogamie unmittelbar zuvor stattgefunden hatte, damit die Transformation für mindestens 20-25 Generationen stabil blieb und so Klone hochgezogen werden konnten, die Untersuchungen auf Protein- und DNA-Ebene erlaubten.

Paramecium war zwar nach diesen 20-25 Teilungen wieder zur Autogamie fähig, sie erfolgt aber nicht zwangsläufig. Erst wenn Faktoren zu Induktion, wie z.B. das Hungern, gegeben waren, wurde Autogamie induziert. Dies hatte zur Folge, daß logarithmisch wachsende Kulturen sehr heterogen waren, d.h. einige Zellen hatten gerade Autogamie durchlaufen, andere hatten 10, andere 20 Teilung seit der letzten Autogamie hinter sich. Wenn jetzt Autogamie künstlich induziert wurde, durchliefen nur etwa 10% einer Kultur den Vorgang der Autogamie. Die anderen waren dazu nicht in der Lage, unabhängig davon, wie lange sie hungerten. Wenn man Zellen solcher Kulturen Plasmide injizierte, war die Wahrscheinlichkeit 90%, eine Zelle zu manipulieren, die sich seit der letzten Autogamie schon mehr als 25-mal geteilt hatte. Es war so sehr wahrscheinlich, daß diese Zelle nach der Injektion Autogamie machte und ihren Makronukleus abbaute, bevor aus ihr genug transformierte Zellen für eine Präparation entstanden waren.

Deshalb war es sehr wichtig, Plasmide nur in Zellen zu injizieren, die gerade eine Autogamie durchlaufen hatten, und die nächsten 20 Teilungen nicht dazu in der Lage waren, die injizierte DNA abzubauen.

4.1.1 Bestehende Verfahren, um autogame Zellen herzustellen

Man hatte keine Möglichkeit, durch Färbungen sichtbar zu machen, in welchem Stadium sich die Zellen befanden, d.h. ob sie gerade 2 Teilungen oder 20 Teilungen nach der letzten Autogamie hinter sich hatten.

Die bisher meist verwendete Färbemethode für Zellkerne war die Anfärbung nach Dippell (1955). Hierbei konnte man den Makronukleus anfärben und sehen, ob er fragmentiert war, d.h. ob die Zelle gerade Autogamie durchlief. Mit etwas Übung konnte man durch leichte Unterschiede in der Farbe auch erkennen, ob es sich um einen neugebildeten oder einen alten Makronukleus handelte, oder um einen alten. Leider hatte die Färbung nach Dippell den Nachteil, daß sie letal für die Zellen ist, da sie gleichzeitig die Zellen fixierte.

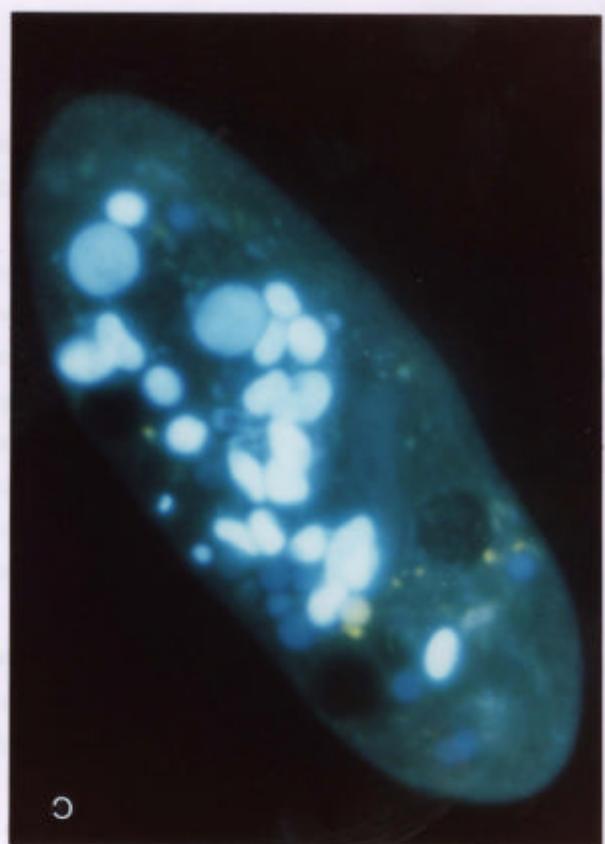
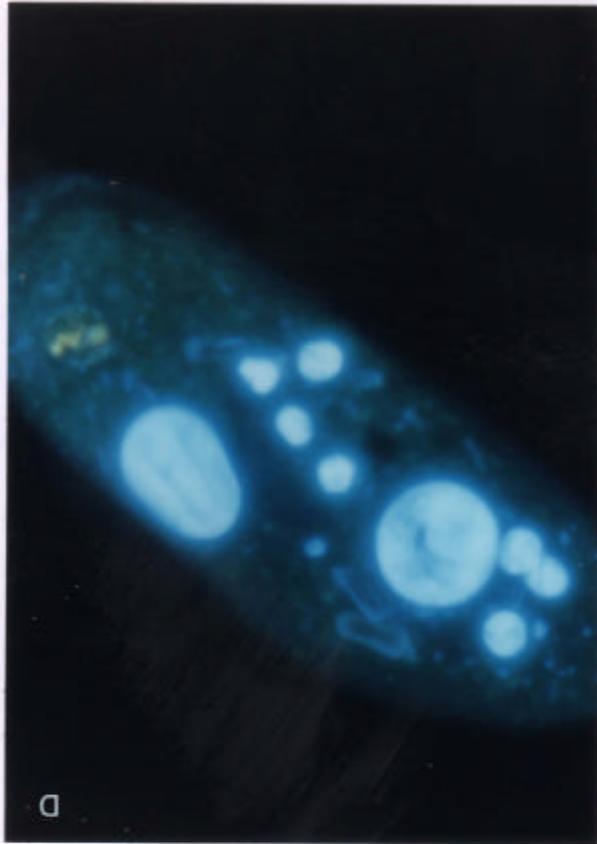
Um homogene Kulturen zu erhalten, wurden 6 Zellen parallel einzeln in kleine Glasröhrchen transferiert und dort mit konditioniertem Medium und *Enterobacter aerogenes* inkubiert. Jeden Tag wurden die Zellteilungen gezählt und dann eine der Zellen in ein neues Glasröhrchen mit Medium und *Enterobacter aerogenes* überführt, da es bei mehr als 20 frei schwimmenden Paramecien schwierig war, die Zellanzahl korrekt zu bestimmen. In der Regel waren es etwa 3 Teilungen pro Tag. Nach etwa 8 Tagen hatte man dann Zellen, die über mehr als 20 Teilungen beobachtet worden waren und eigentlich keine Autogamie durchlaufen haben sollten, da es keine induzierenden Faktoren gegeben hatte. Jetzt wurden die Zellen nochmals einzeln unter Überfluß von Futterbakterium (*Enterobacter aerogenes*) wachsen gelassen und, sobald eine Zellzahl von mehr als 100 erreicht war, wurde durch Hunger Autogamie induziert. Da es sich um Zellen handelte, die alle aus einer Zelle hervorgegangen waren, sollte die Kultur homogen sein und alle Zellen sollten Autogamie durchlaufen. Dies wurde anhand einer Färbung nach Dippell überprüft. In der Regel lag der Anteil der Zellen, die in einer solchen Kultur Autogamie durchlaufen hatten, bei 85%. Wenn nun Zellen dieser Kultur injiziert wurden, konnte man mit 85% Sicherheit davon ausgehen, daß sie bis zur Präparation des Klonen keine Autogamie mehr durchlaufen würden. Wegen dieses Unsicherheitsfaktors und der Aufwendigkeit von Mikroinjektionen war es für die weiteren Versuche sehr wichtig, daß die *Paramecium*-Zellen nicht zum Abbau ihrer makronukleären DNA in der Lage waren. Deshalb wurde nach Alternativen zu dem bestehenden Protokoll gesucht.

4.1.2 Alternative Färbemethoden mit Syto 13 und Hoechst 33342

Um eine andere, sicherere (100%ige) Methode zu finden, wurden zwei *in vivo*-Nukleinsäure-Fluoreszenz-Farbstoffe getestet: Syto 13 und Hoechst 33342 (beide von Molecular Probes).

Für Syto 13 wurden zwei Konzentrationen ausprobiert, 25 μM und 2,5 μM . Ein Nachteil von Syto 13 war die schlechte Löslichkeit, so daß er zunächst in DMSO gelöst und dann verdünnt werden mußte, da DMSO-Konzentrationen von über 1% toxisch für die Zellen sind. Das Ergebnis war sehr unbefriedigend. Bei der höheren Konzentration leuchtete die gesamte Zelle zunächst sehr hell, so daß kein Zellkern erkennbar war. Erst nachdem man die Zelle 2-3 Minuten mit Wellenlängen von 450-490 nm bestrahlte, verblaßte die Fluoreszenz im Cytoplasma, und der Makronukleus wurde sichtbar. Allerdings vertrugen die Zellen die hohe intensive Strahlenbelastung nicht und platzten. Bei der geringeren Konzentration war genau der gleiche Effekt sichtbar wie bei der hohen Konzentration, nämlich die hohe Fluoreszenz im Cytoplasma. Allerdings war die Gesamthelligkeit bei 2,5 μM Syto 13 etwas reduziert, dadurch war aber auch der Makronukleus weniger deutlich sichtbar. Bei 2,5 μM Syto 13 zeigte sich keine auffällige Beeinflussung der Zelle, Schwimmverhalten und Teilungsrate waren normal. Auch 24 Stunden nach Anfärbung mit Syto 13 waren keine Veränderungen erkennbar. Bei 25 μM Syto 13 zeigte sich schon nach 15 Minuten eine starke Beeinträchtigung des Schwimmverhaltens, und die Zellen starben ab. Syto 13 wurde deshalb für die weiteren Versuche nicht mehr verwendet.

Mit Hoechst 33342 wurden Konzentrationen zwischen 500 μM und 50 μM ausprobiert. Bei Konzentrationen um 500 μM reichten 2-3 Minuten Inkubationsdauer, um die Makronuklei deutlich sichtbar anzufärben. Allerdings zeigten die Zellen eine deutliche Beeinträchtigung im Schwimmverhalten, bei längerer Inkubationsdauer starben die Zellen. Bei Konzentrationen um die 50 μM war keine Beeinträchtigung der Zellen zu bemerken, sie schwammen normal und auch die Teilungsrate blieb unverändert. Allerdings mußten die Zellen etwa 30 Minuten mit Hoechst 33342 inkubiert werden, um eine deutliche Anfärbung des Makronukleus zu erhalten. Der Farbstoff war auswaschbar und spätestens nach 16 Stunden nicht mehr in den Zellen. (Nähere Angaben zu den Inkubationszeiten und eine ausführlichere Beschreibung siehe 3.1)



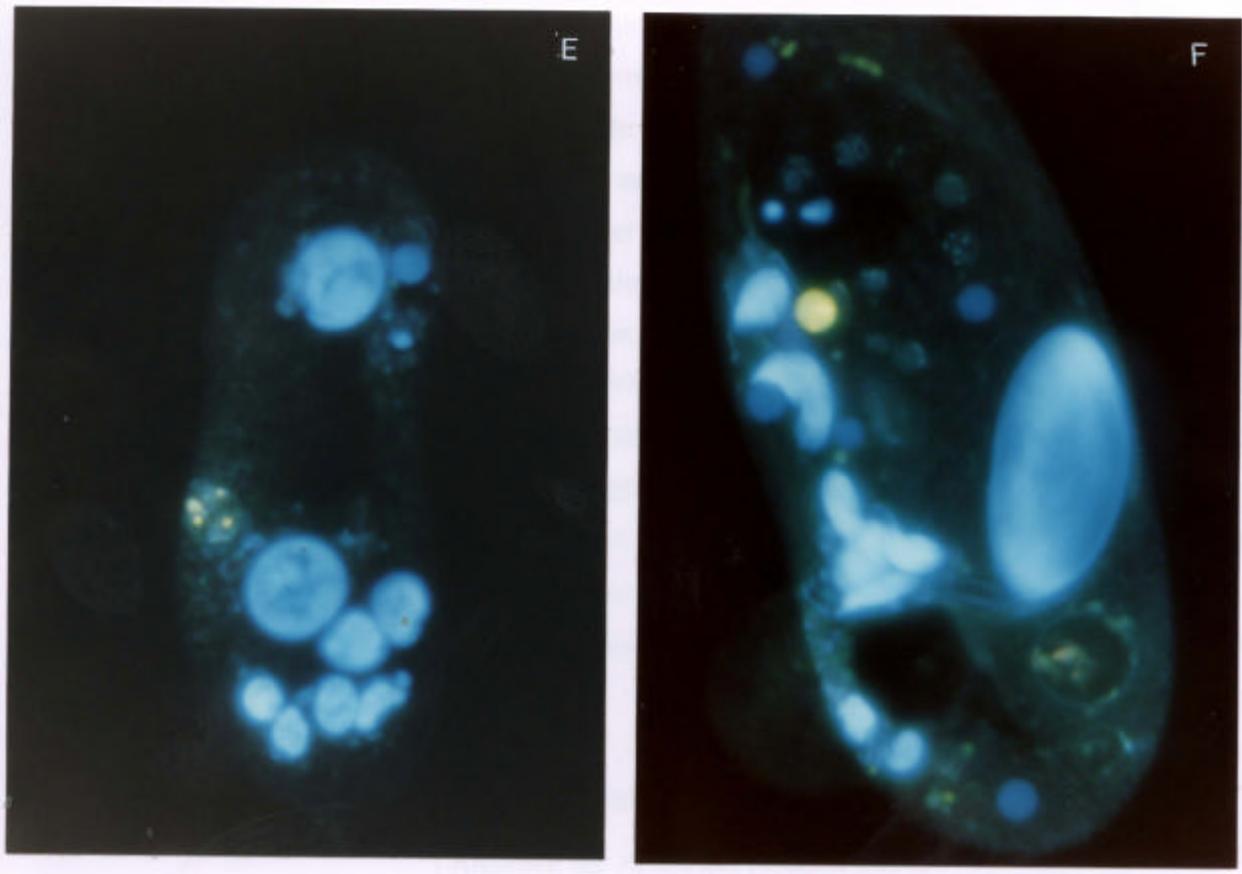


Fig 5 Hier sind *Paramecium*-Zellen gezeigt, die für zwei Tage ohne Futterbakterien inkubiert worden waren und bei denen durch dieses „Hungern“, Autogamie induziert worden war. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit Hoechst 33342 inkubiert und dann unter Bestrahlung mit UV-Anregungslicht unter 630facher Vergrößerung betrachtet.

A: Eine Zelle mit einem großen, unfragmentierten Makronukleus, die keine Autogamie durchlaufen hat.

B: Eine Zelle, die einen völlig fragmentierten Makronukleus besitzt. Es sind noch keine neuen Makronuklei zu erkennen, d.h. die Zelle muß sich erst sehr kurz in Autogamie befinden.

C: Eine Zelle, die einen völlig fragmentierten Makronukleus besitzt. Die zwei neuen makronukleären Anlagen sind als kreisrunde Strukturen sichtbar.

D: Eine Zelle mit zwei großen makronukleären Anlagen.

E: Die zwei neuen makronukleären Anlagen wandern in die entgegengesetzten Pole der Zelle, die erste Teilung der Zelle nach der Autogamie steht bevor. Die Fragmente des alten Makronukleus verteilen sich willkürlich in der Zelle.

F: Eine Zelle, deren neuer Makronukleus sich entwickelt und anfängt zur normalen Größe anzuwachsen. Fragmente des alten Makronukleus sind noch vorhanden.

4.1.3 Etablierung eines neuen Protokolls zur Isolierung autogamer Zellen

Da die Zellen den Farbstoff in niederen Konzentrationen unbeschadet überlebten, konnte man jetzt eine Zelle, die einen fragmentierten Zellkern besaßen und somit eindeutig Autogamie durchlaufen hatten, direkt verwenden. Man war nicht mehr darauf angewiesen, daß man vom Zustand einer Kultur auf den Zustand einer Zelle schließen mußte, sondern konnte direkt die Zelle verwenden, die sicher Autogamie durchlaufen hatte. Es war somit 100% Sicherheit gegeben, daß diese Zellen die nächsten 20-25 Teilungen keine makronukleäre DNA abbauen konnten.

Das neue Protokoll sah folgendermaßen aus: Bei *Paramecium*-Zellen wurde durch Hungern Autogamie induziert. Die Zellen wurden mit 50 µM Hoechst 33342 angefärbt und die Zellen, die einen eindeutig fragmentierten Makronukleus hatten, wurden einzeln in ein Glasröhrchen transferiert. Sie wurden dort für 4-5 Teilungen belassen, so daß nochmals eine Kontrolle dafür existierte, daß die Zellen sich in gutem Zustand befanden und sich der Makronukleus zu vollen Größe entwickelt hatte. An ihren Nachkommen wurden Mikroinjektion durchgeführt.

Einen Überblick über das Vorgehen, um Zellen zu isolieren, die gerade Autogamie durchlaufen hatten, zeigt das folgende Fließschema:

7 S-Zellen, die 2-3 Tage gehungert haben

| Anfärben der Zellen mit Hoechst 33342

Vereinzeln der Zellen auf silikonisiertem Deckglas

| Betrachten der Zellen unter UV-Licht

Zellen mit fragmentiertem Makronukleus werden durch Vereinzlungskapillaren in einen 20 µl großen Tropfen überführt

|
Transfer jeder Zelle in ein Glasröhrchen mit 200 µl konditioniertem Medium und 50 µl *Enterobacter aerogenes*

| wachsen im Brutschrank bei 25°C (4 - 6 Teilungen)

Zellen sind bereit zur Injektion

So behandelte Zellen bildeten den Ausgangspunkte für alle Injektionsexperimente.

4.2 Mikroinjektion in den Makronukleus und das Reportersystem

Die Zellen wurden auf einem silikonisiertem Deckglas in etwa 0,5 µl große Tropfen (Dryl's Puffer) vereinzelt und mit Parafinöl überschichtet. Unter Sichtkontrolle im Mikroskop wurde mit einer Absaugkapillare ein Großteil des Puffers entfernt, bis nur noch ein dünner Flüssigkeitsfilm die Zellen bedeckte und sie nicht mehr schwimmen konnten (N. Klauke, 1996).

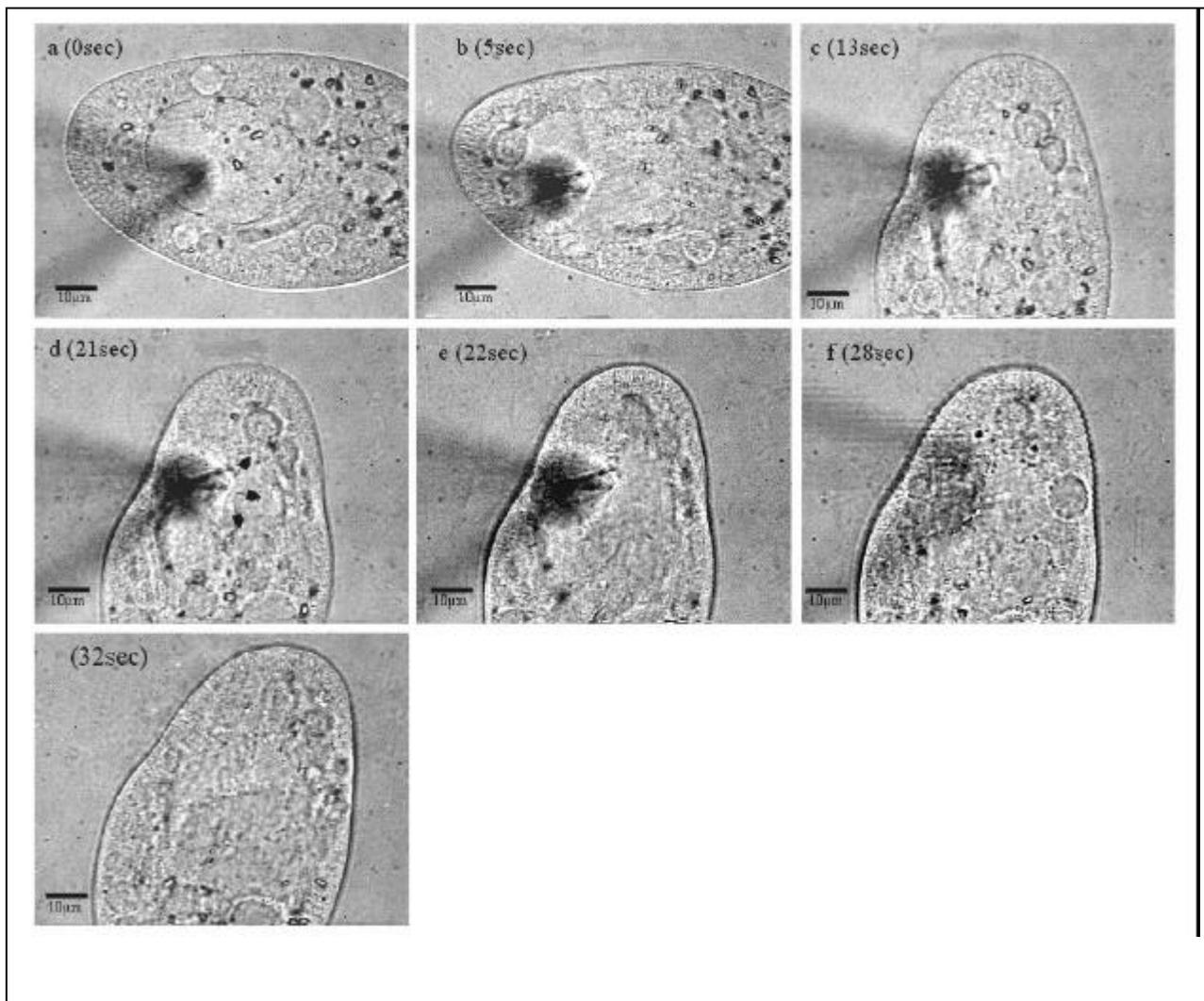


Fig 6 Zeitverlauf einer Mikroinjektion in den Makronukleus:

(a) wurde willkürlich als Zeitpunkt Null definiert, an dem die Kapillare anfängt, in die Zelle einzudringen (der Makronukleus ist zur Veranschaulichung gestrichelt umrissen), (b) zeigt 5 sek später die Kapillare im Makronucleus und bei (c) hat sich die Zelle 13 sek später als Reaktion auf den Einstich bewegt. 21 sek nach dem Einstich (d) beginnt die DNA- Suspension in den Makronukleus zu laufen (durch Pfeile angedeutet), wobei er (e) aufgrund der großen Menge platzt (22 sek) und die Kapillare wird (f) nach 28 sek zurückgezogen. Man sieht bei (g), 32 sek nach der Injektion keine Strukturen des Makronukleus mehr und man kann den, die DNA enthaltenden Puffer im Cytoplasma erkennen. (Dies zeigt eine Injektion von einem 1 : 1 Gemisch aus pBS-C4Sal und pPXV-GFP3. Der Injektionsvorgang ist für alle Plasmide gleich.)

Jetzt wurde mit einer Glaskapillare injiziert, die an ihrer Spitze einen Durchmesser von etwa 5 μm hatte. Das DNA-Gemisch befand sich in 10 mM Tris-Puffer (pH 7,6) und hatte eine Konzentration von ungefähr 8-12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Durch Druckluft wurde etwa ein Volumen von 10 μl (entspricht etwa 1/10 Zellvolumen) (Erxleben *et al.*, 1997) in den Makronukleus gepumpt, wobei dies einer Anzahl von etwa 10^6 Plasmidmolekülen entsprach, also einem deutlichen Kopienüberschuß gegenüber dem 800ploidem Genom im Makronukleus. Meistens wurde der Makronukleus dabei zerissen, assemblierte sich aber nach der Injektion wieder. Ein Beispiel für eine Injektion in den Makronukleus zeigt Fig 6. Es wurde immer der Vektor, von dem man sich ein Ausschalten von PP63/Parafusin erhoffte, zusammen mit dem Expressionsvektor für GFP (pPXV-GFP3, siehe 3.6.1) als Reportersystem injiziert. Hierbei wurden die beiden Plasmide meist im Verhältnis 1:1 gemischt und injiziert. Die Expression von GFP (Green Fluorescent Protein) diente dabei als Marker für eine erfolgreiche Injektion in den Makronukleus, da die Sichtkontrolle nicht immer eindeutig zeigte, ob die Injektion in den Makronukleus erfolgreich war und ob genug Plasmid injiziert worden war. Plasmide, die ins Cytoplasma injiziert wurden, wurden nicht exprimiert. GFP wurde aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert und kloniert (Prasher *et al.*, 1992). Wenn GFP in einer Zelle durch blaues Licht angeregt wurde, leuchtete es hellgrün. Es benötigte dazu keinerlei Kofaktoren oder Substrate (Niswender *et al.*, 1995). Wenn die Zelle eine durch GFP verursachte Fluoreszenz zeigte, konnte man davon ausgehen, daß sowohl das GFP-Expressionsplasmid, wie auch der andere Vektor, erfolgreich in den Makronukleus gelangt waren und exprimiert wurden. Ein Beispiel für erfolgreich injizierte Zellen zeigt Fig 7. Das Erkennen von GFP-leuchtenden Zellen war nicht immer sehr einfach, da die Zellen eine Autofluoreszenz (Andersson *et al.*, 1998) bei der gleichen Wellenlänge zeigten, die unterschiedlich stark sein konnte. Wodurch diese unterschiedlich starke Autofluoreszenz verursacht wurde, war nicht bekannt. Da sich alle Zellen einer Kultur in der Stärke der Autofluoreszenz sehr ähnlich waren, waren wahrscheinlich Faktoren wie Medium, Futterangebot oder ähnliches daran beteiligt, die geringfügige Unterschiede aufweisen könnten. Kriterien, anhand derer GFP-Fluoreszenz von Autofluoreszenz unterschieden werden konnte, waren die Helligkeit der Zellen, das gleichmäßige Leuchten der gesamten Zelle, wobei der Makronukleus nicht als dunkler Fleck zu erkennen war. Außerdem blüht die Autofluoreszenz nach wenigen Sekunden aus, wohingegen GFP-Leuchten eher noch stärker wurde. Nur Kristalle leuchteten heller als der Rest der Zelle und einige Vakuolen konnten dunkel sein.

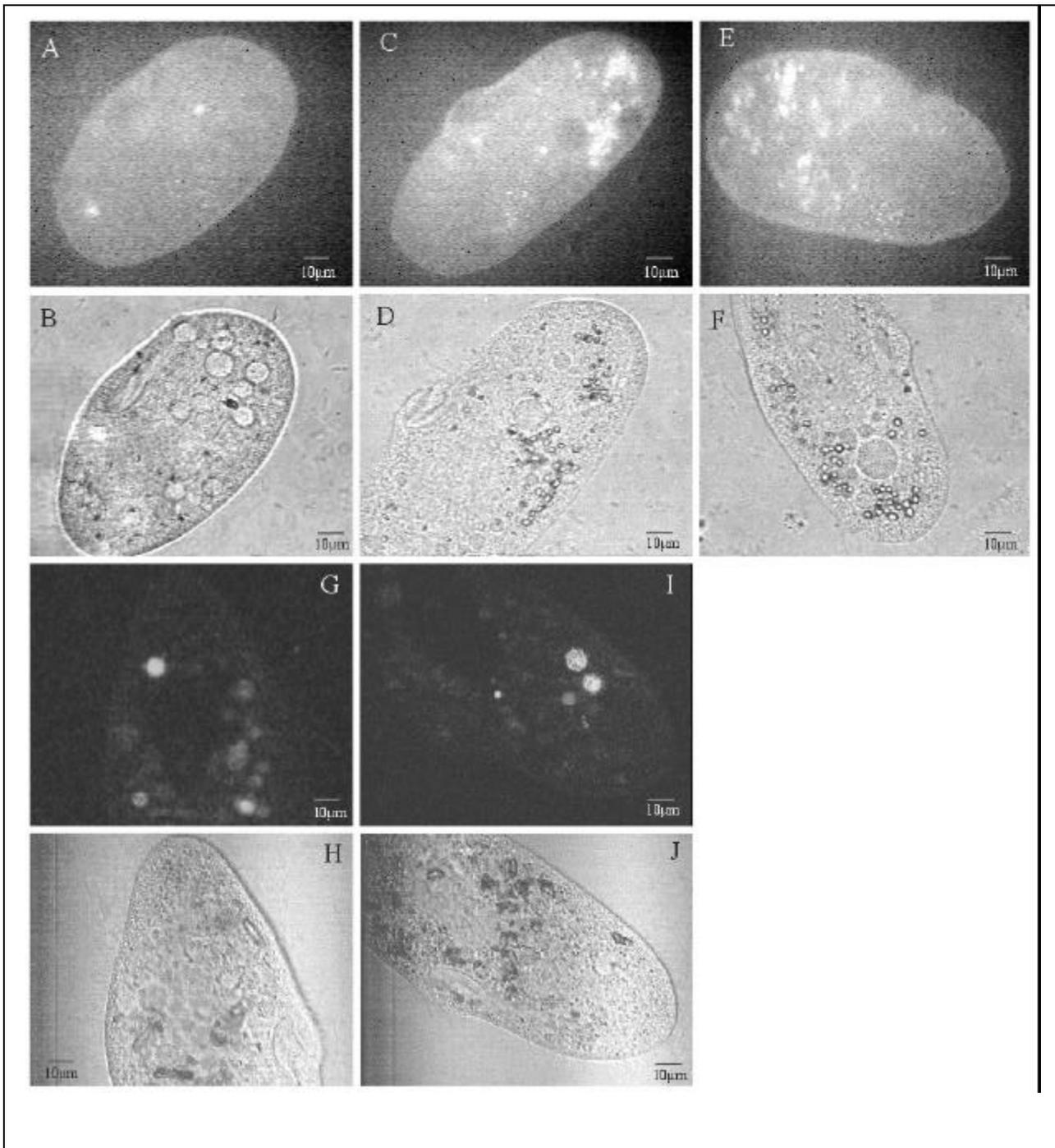


Fig 7 **A**, **C** und **E** zeigen *Paramecium*-Zellen, die mit einem 1:1 Gemisch aus pPXV-36PP und pPXV-GFP3 injiziert wurden. Einen Tag nach der Injektion zeigte sich eine durch GFP verursachte Fluoreszenz. Besonders auffällig das gleichmäßige Leuchten der Zellen, wobei auch kein Makronukleus erkennbar war. Die sehr hellen Flecken sind Kristalle in den Zellen. In **C** sind auch zwei dunkle Vakuolen erkennbar. **B**, **D** und **F** sind die entsprechenden Durchlichtbilder dazu. Als Vergleich zu der von GFP verursachten Fluoreszenz zeigen **G** und **I** *Paramecium*-Zellen, die nicht injiziert worden sind und nur Autofluoreszenz zeigen. Der Makronukleus ist jeweils als dunkler Schatten zu erkennen. In den Zellen sind fluoreszierende Vakuolen zu erkennen, die wahrscheinlich Bakterien enthalten. **H** und **J** sind die Durchlichtbilder dazu.

4.3 Antisense-Vektor pPXV-36PP

Der Versuchsansatz basierte darauf, daß dieser Vektor in den Makronukleus von *Paramecium*-Zellen injiziert und dort transkribiert werden sollte. Die so entstehende *antisense*-mRNA von PP63/Parafusin sollte mit der *sense*-mRNA von PP63/Parafusin hybridisieren und so zur raschen Degradation des RNA-RNA-Hybrids durch endogene RNAsen führen. Da kein PP63/Parafusin neu synthetisiert würde, würde durch den normalen *Protein-turnover* schließlich PP63/Parafusin austitriert werden.

4.3.1 Injektion und Heranziehen der Klone

Der erste Vektor, der im Gemisch mit dem GFP-Expressionsvektor injiziert wurde, war das Plasmid pPXV-36PP (Beschreibung der Konstruktion in 3.6.2), welches den kompletten ORF von PP63/Parafusin hinter dem *Paramecium*-Calmodulinpromotor in *antisense*-Orientierung enthält.

Es wurden insgesamt 12 Zellen pPXV-36PP erfolgreich injiziert. Klon 10 bis 12 wurden anstatt einer 1:1 Mischung aus dem GFP-Expressionsvektor und pPXV-36PP eine 1:2 Mischung injiziert, um zu untersuchen, ob vielleicht die Menge der injizierten pPXV-36PP-Plasmiden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen würde.

Jede dieser Zellen wurde nach der Injektion über Nacht auf einem silikonisiertem Deckglas unter Parafinöl inkubiert (siehe 3.2) und am nächsten Tag auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Nach einiger Zeit (und mit etwas Übung) zeigten etwa die Hälfte der Zellen, die die Injektion überlebt hatten, eine Fluoreszenz, die durch GFP verursacht wurde. Diese Zellen wurden in ein Glasröhrchen transferiert und zu einem Klon hochgezogen. Wenn sich die Zelle mehrmals geteilt hatte, so daß mehr als 1000 Zellen vorhanden waren, wurden verschiedene Untersuchungen an einzelnen Zellen vorgenommen, um einen eventuellen Phänotyp zu identifizieren.

So wurden die Zellen auch auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Hierbei wurde festgestellt, daß bei einigen Klonen im Laufe der Zeit die Fluoreszenz schwächer wurde. Da die Zellen nicht zur Autogamie oder Konjugation in der Lage waren und auch alle Zellen eines Klons die gleiche Stärke an GFP-Fluoreszenz aufwiesen, lag die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um einen Verlust der injizierten Plasmide durch die Teilung handelte. Da die GFP-Fluoreszenz nicht sehr intensiv ist, lagen diese Klone vielleicht nach der Injektion knapp oberhalb der Nachweisgrenze der GFP-Fluoreszenz.

Ebenso wurden diese Klone auf ihre Exocytosefähigkeit untersucht. Es zeigte sich aber keine Veränderung. Die Untersuchungen auf Exocytose nach AED-Stimulation oder mechanischer Reizung und das Wiederandocken der Trichocysten nach 8 Stunden zeigten keine Unterschiede zu nicht-transformierten Zellen. Um nachzuweisen, daß es sich bei den injizierten Klonen auch tatsächlich um einen vorläufigen *knock-out* von PP63/Parafusin handelt, wurden die Klone bis zu einer Anzahl von 1-2 Mio herangezogen (siehe 3.3).

4.3.2 Proteinisolierung und Western Blots

Um die Klone schließlich auf Protein- und DNA-Ebene zu untersuchen, wurden die Zellen geerntet, sobald ihr Anzahl 1 Mio. Zellen überstieg. Bei der Aufzucht wurde genau darauf geachtet, daß die Zellen immer genügend *Enterobacter aerogenes* zur Verfügung hatten. Vor der Präparation wurden sie zwei Mal mit Puffer gewaschen und 4-5 Stunden in Puffer inkubiert, damit sie alle noch in den Freßvakuolen befindlichen Bakterien verdauen konnten. So wurden Verunreinigungen durch bakterielle Proteine und DNA vermieden.

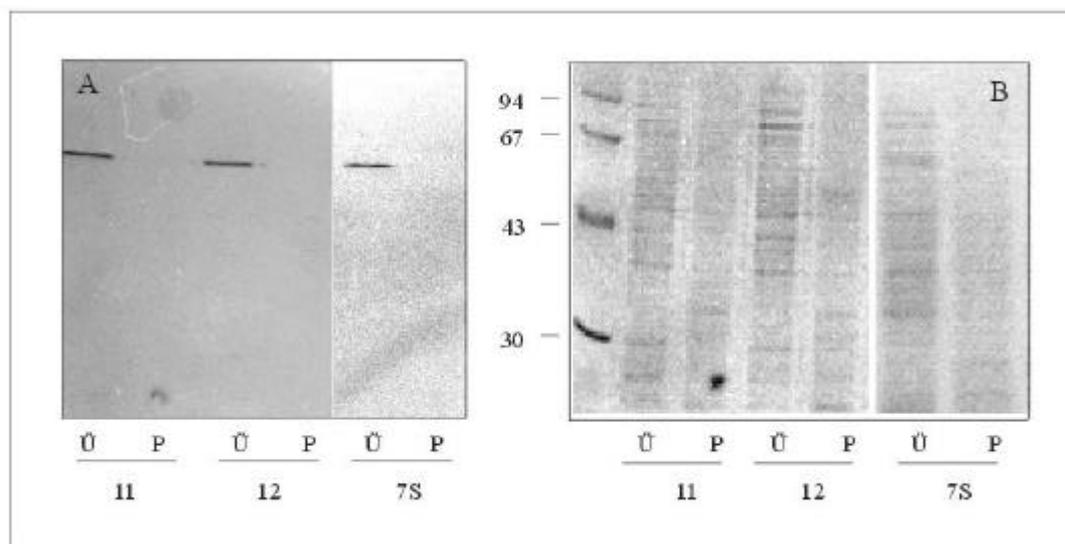


Fig 8 (A) Western Blot mit dem 100.000g-Überstand (Ü) und -Pellet (P) aus zwei mit pPXV-36PP und pPXV-GFP3 injizierten Klonen (11 und 12), zum Vergleich nicht-injizierte 7S-Zellen. (B) zeigt den Blot in Ponceauanfärbung.

Für die Proteinuntersuchungen wurden die Zellen durch Pottern homogenisiert und das Homogenat durch Zentrifugation in einen 100.000g Überstand und ein 100.000g Pellet getrennt. Als Kontrolle dienten hierbei Homogenate von Zellen, die nicht transformiert worden waren. Für die Western Blots wurden 10% SDS-PAGEs gefahren. Pro Spur wurde dabei jeweils die gleiche Menge an Protein geladen, und nach dem Blotten auf Nitrocellulose eine Immundetektion mit PP63/Parafusin-Antikörper (R537) durchgeführt. So konnte durch einen direkten Vergleich mit den nicht-transformierten Zellen die Menge an PP63/Parafusin bestimmt werden (Fig 8).

Im Western Blot zeigt sich bei allen 12 Klonen keine Reduktion der PP63/Parafusin-Menge im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen.

4.3.3 DNA-Isolierung und Southern Blots

Um zu untersuchen, ob die Plasmide überhaupt noch vorhanden waren, oder ob die Zellen die Plasmide nicht repliziert hatten und sie so austitriert worden waren, wurden DNA-Isolierungen vorgenommen. Die hierzu benötigten Zellen wurden nach der Inkubation im Puffer, bevor die Zellen homogenisiert wurden, abgenommen und die DNA daraus isoliert.

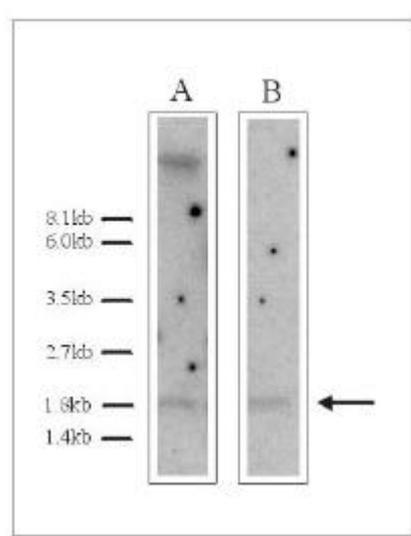


Fig 9 A: genomische DNA aus Klon 10 geschnitten mit KpnI/XhoI. Durch den Schnitt wird PP63/Parafusin als Fragment ausgeschnitten, welches 1,8kb groß ist.

B: pPXV-36PP geschnitten mit KpnI/XhoI als Vergleich. Der ganze Blot wurde mit einem PCR-Fragment hybridisiert, welches aus dem ersten Drittel des PP63-1 ORF amplifiziert wurde.

Die Southern Blots bestätigten die Anwesenheit des Plasmids. Ein Beispiel für einen Southern Blot zeigt Fig. 9. Hierfür wurde die gesamte genomische DNA von mit pPXV-36PP und pPXV-GFP3 transformierten Zellen mit KpnI und XhoI geschnitten. Die XhoI-Schnittstelle war künstlich eingefügt worden, so daß das beim Schneiden entstandene Fragment von 1,8kb nur aus dem Plasmid stammen konnte und nicht von endogenen PP63/Parafusin-Genen. Entsprechende Kontrollen mit nicht-transformierten Zellen waren negativ, d.h. sie gaben kein 1,8kb-Fragment, welches von der Sonde erkannt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Sonde war ein PCR-Fragment aus dem vorderen Drittel des PP63/Parafusin-Genes.

Da durch die Southern Blots gezeigt wurde, daß das *antisense*-Plasmid in den Zellen vorhanden war, aber sich trotzdem keine Auswirkungen auf die Expression von PP63/Parafusin zeigte, wurden zwei neue *antisense*-Vektoren konstruiert, mit denen erneute Versuche unternommen wurden, um PP63/Parafusin auszuschalten und *knock out*-Mutanten zu erhalten.

4.4 pPXV-PP63asko1 und 2

4.4.1 Konstruktion

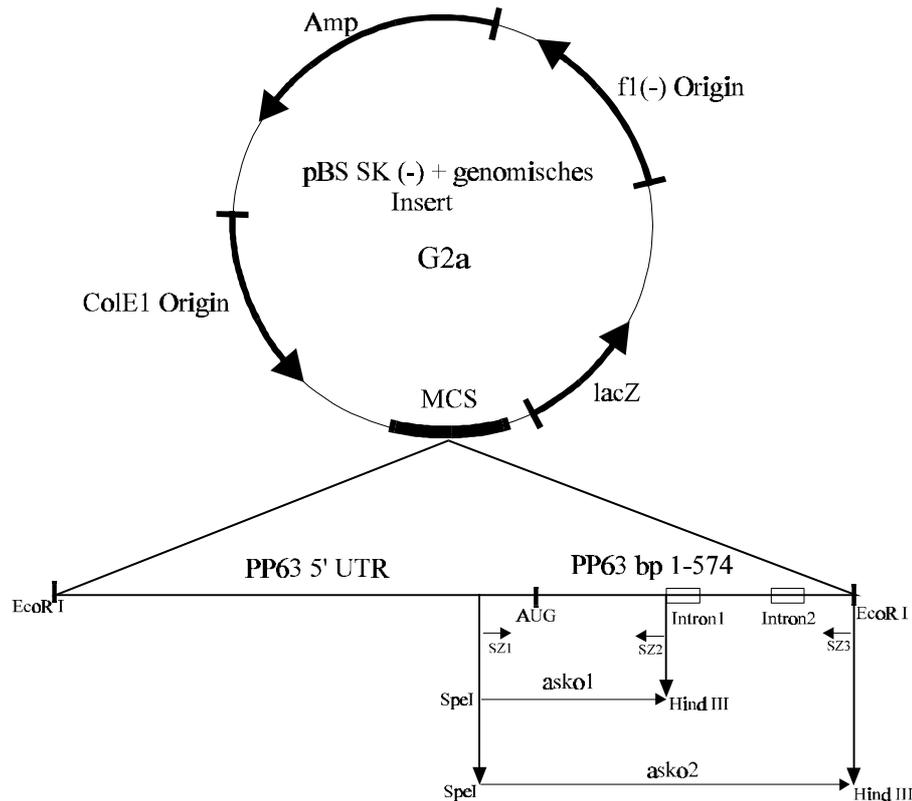
Für die Konstruktion von pPXV-PP63asko1 und 2 wurden zwei Vektoren, G2a und pPXV-PP63 verwendet. G2a ist ein pBlueskript(-), der als genomisches Insert die 5'-UTR und das 5'-Ende des PP63-1-Genes, über eine EcoRI-Schnittstelle ligiert, enthält. Mit Hilfe der beiden Primerpaare PP63SZ1/SZ2 und PP63SZ1/3 wurden über PCR aus dem offenen Leserahmens von PP63/Parafusin-1 (accession no Y09969, Hauser *et al.*, 1997) die beiden Fragmente asko1 und asko2 amplifiziert.

PP63SZ1: 5'-CCTTATCCTAAGCTTTATCCCTATTC-3' (Nukleotide -93 bis -67)

PP63SZ2: 5'-GGATACGCTACTAGTCATCCTTGCG-3' (Nukleotide 169 bis 150 +

6 Nukleotide aus dem 1. Intron)

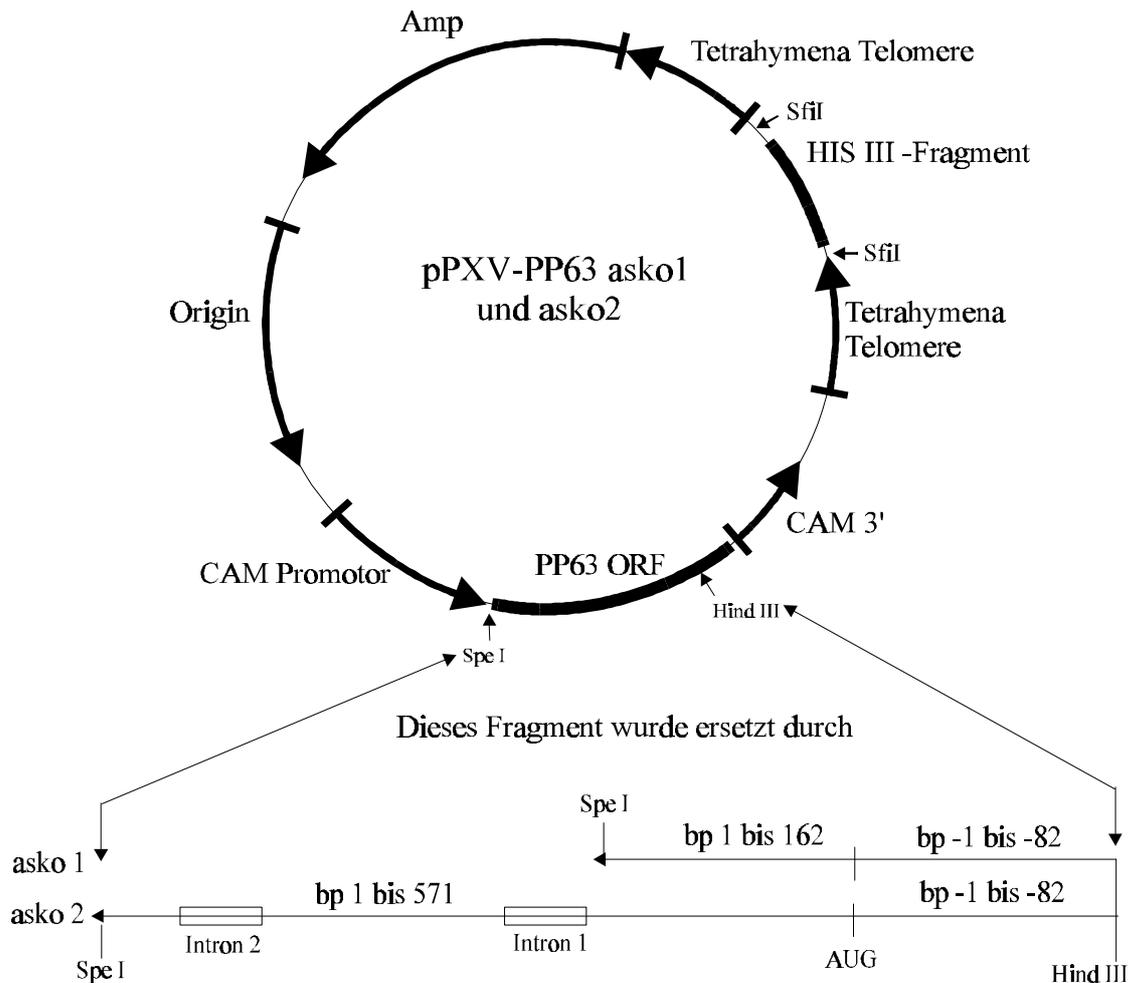
PP64SZ3: 5'-GAATTCATAAACTAGTGTTAAATATTC-3' (Nukleotide 522 bis 496)



Die Fragmente enthalten jeweils eine neu eingeführte Schnittstelle für SpeI und HindIII. Asko1 endet direkt vor dem ersten Intron und ist 244bp lang. Asko2 enthält beide bekannten Introns des ORF und hat eine Länge von 643bp. Die beiden amplifizierten Fragmente wurden über SpeI und HindIII geschnitten und in einen mit HindIII und SpeI geschnittenen Vektor pPXV-PP63 kloniert.

pPXV-PP63 ist ein Expressionsvektor für *Paramecium*, der aus pPXV-neo (Haynes *et al.*, 1995) konstruiert wurde und den offenen Leserahmen von PP63-1 enthält.

In diesem Vektor wird die Expression des Genes für PP63-1 durch den Promotor des Calmodulingenes von *Paramecium* getrieben. Die Termination erfolgt ebenfalls durch die entsprechenden Sequenzen des *Paramecium*-Calmodulingenes. Die Schnittstellenanordnung führt dazu, daß die Fragmente asko1 und 2 in den beiden neuen Vektoren pPXV-PP63asko1 und 2 in umgekehrter (*antisense*-) Orientierung, bezogen auf den ORF von PP63-1, eingebaut werden. Für die Injektion werden die Vektoren mit SfiI linearisiert, wodurch auch das HisIII-Fragment wegfällt.



4.4.2 Ergebnisse der Injektion

Ebenso wie pPXV-36PP wurden auch pPXV-asko1 und 2 in Zellen injiziert, die gerade Autogamie durchlaufen hatten. Es wurde wieder ein Gemisch mit pPXV-GFP3 injiziert und die Zellen auf GFP-Fluoreszenz selektiert und zu einem Klon hochgezogen, bis genug Zellen vorhanden waren, um Protein- und DNA-Untersuchungen zu machen. Für pPXV-PP63asko1 und 2 wurden jeweils 2 Klone, wie schon bei 4.3 beschrieben, hochgezogen und untersucht.

Untersuchungen der Exocytosefähigkeit zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp. Und auch in Western Blots konnte bestätigt werden, daß immer noch die gleiche Menge an PP63/Parafusin vorhanden war (siehe Fig 10).

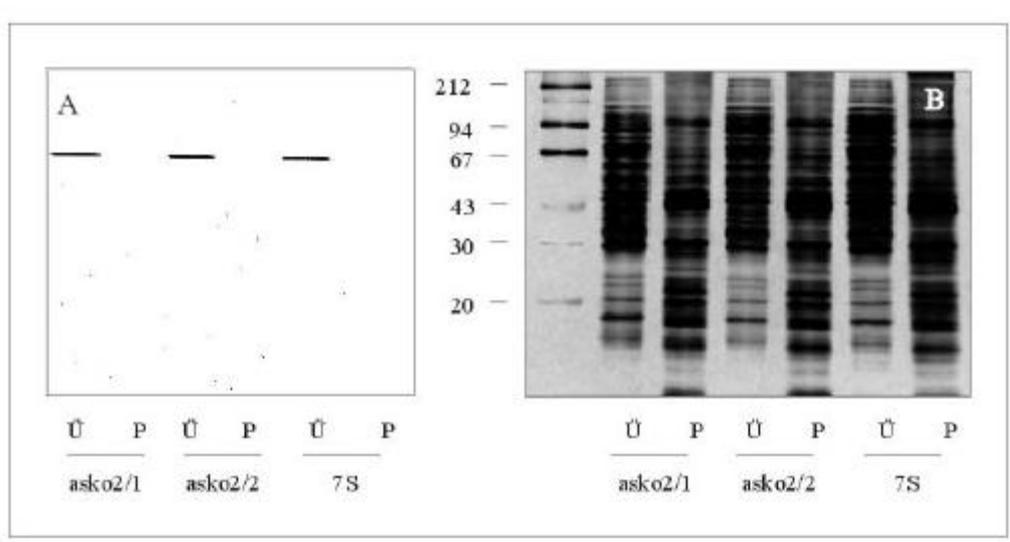


Fig 10 (A) Western Blot mit dem 100.000g-Überstand (Ü) und -Pellet (P) aus zwei mit pPXV-PP63asko2 und pPXV-GFP3 injizierten Klonen (asko2/1 und 2/2), zum Vergleich nicht-injizierte 7S-Zellen. (B) zeigt eine Silberfärbung des Gels nach dem Blotten.

Da es bis jetzt noch keine Erklärung gibt, warum die *antisense*-Konstrukte nicht in der Lage sind, PP63/Parafusin auszuschalten, wurde noch eine andere Methode versucht, die, im Gegensatz zu den *antisense*-Versuchen, in *Paramecium* schon einmal erfolgreich durchgeführt worden ist.

4.5 Gene silencing

Da sich mit den *antisense*-Konstrukten kein ausreichendes Ausschalten von PP63/Parafusin gezeigt hat, welches nötig ist, um einen Phänotyp zu erzielen, der eventuell Aufschluß über die Funktion von PP63/Parafusin gegeben hätte, versuchen wir über ein *gene silencing* die PP63/Parafusin-Expression zu verhindern.

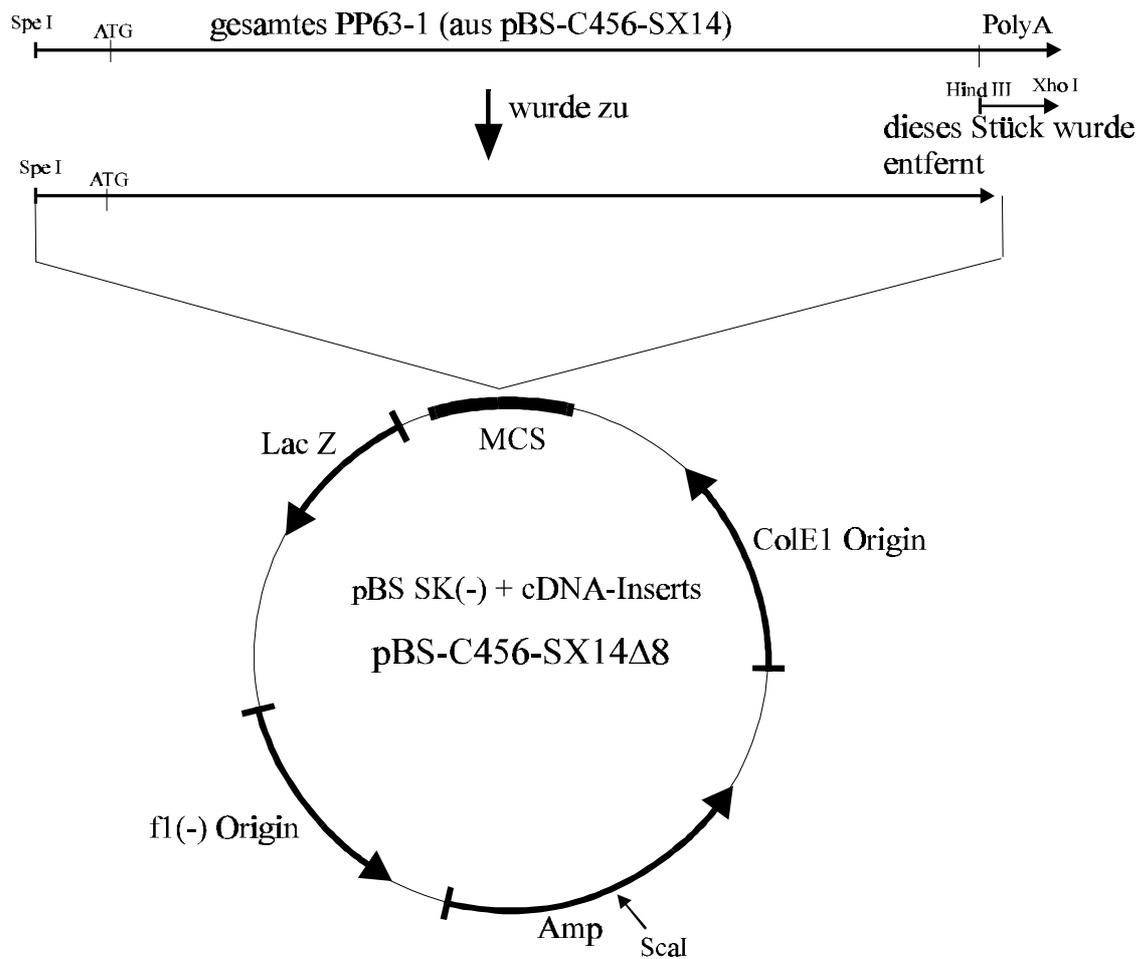
4.5.1 Die *gene silencing*-Vektoren

Da das Phänomen des *gene silencing* nur mit nicht-funktionellen Genstücken beobachtet wurde (Ruiz *et al.*, 1998), benutzen wir den Vektor pBS, einen Expressionsvektor von *E. coli*, der keinen Promotor enthält, der von *Paramecium* erkannt werden sollte. Als Vektoren dienen uns pBS-C4Sal, der nur das 5'-Ende des PP63-1 Genes enthält und pBS-C456-SX14Δ8, der das

gesamte PP63-1 Gen ohne Introns enthält, aber nicht den PolyA-Schwanz. Als Reportersystem für eine erfolgreiche Injektion diente wiederum der GFP-Expressionsvektor pPXV-GFP3.

4.5.2 Konstruktion von pBS-C456-SX14Δ8

Um pBS-C456-SX14Δ8 zu konstruieren, wurde bei pBS-C456-SX14 das 3'-Ende des Plasmids, welches auch den PolyA-Schwanz enthält, mit XhoI und HindIII herausgeschnitten und das Plasmid nach Auffüllen der überhängenden Enden mit der Klenow-Polymerase (Pharmacia) zurückligiert. Der neue Vektor ist pBS-C456-SX14Δ8. Für die Injektion wurde der Vektor mit ScaI linearisiert.



4.5.3 Injektion der *gene silencing*-Vektoren

Für die Injektion wurden wie üblich Zellen verwendet, die sich 4-5 mal nach der letzten Autogamie geteilt hatten. Insgesamt wurde 8 Zellen pBS-C4Sal, 12 Zellen pBS-C456-SX14Δ8 und 7 Zellen nur pBS als Kontrolle injiziert. Zuerst wurde den Zellen pBS-C4Sal injiziert. Von den 8 Zellen, die die Injektion gut überlebten, waren am nächsten Morgen, als die Zellen auf GFP-Fluoreszenz untersucht werden sollten, 4 Zellen abgestorben. Zwei weitere Zellen gingen während des Absaugvorgangs und dem Betrachten unter dem Fluoreszenzmikroskop zugrunde. Nur zwei Zellen überlebten und konnten in kleine Glasröhrchen transferiert werden, wo sie zu einem Klon hochwachsen sollten. Die Tatsache, daß so viele Zellen, die die Injektion gut überlebt hatten, zugrunde gegangen sind, ist sehr ungewöhnlich. Normalerweise überleben alle Zellen, sobald sie einmal die Injektion und das erneute Vergrößern des Tropfen überstanden haben. Auffällig war auch, daß sich die injizierten Zellen alle nicht geteilt hatten. Üblicherweise teilen sich die injizierten Zellen in den 16 Stunden in dem Tropfen auf dem Deckglas 1-2mal. Die injizierten Zellen, die unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden konnten, sahen auch seltsam verändert aus. Das Cytoplasma war im Durchlicht ungewöhnlich strukturiert. Die Fluoreszenz war ebenfalls ungewöhnlich. Das Leuchten war heller als jede bis jetzt beobachtete Autofluoreszenz, eher in der Größenordnung von durch GFP-verursachter Fluoreszenz. Allerdings schien auch die Fluoreszenz an Strukturen gebunden zu sein, was eher an Autofluoreszenz erinnerte. Es war keine eindeutig identifizierbarer Makronukleus erkennbar. Wenn Zellen sonst durch GFP-Fluoreszenz leuchteten, sah man keinen Makronukleus, da die GFP-Moleküle klein genug waren, auch durch die Kernporen in den Makronukleus zu gelangen. Deshalb fluoreszierte die ganze Zelle gleichmäßig hell, oder der Makronukleus war nur andeutungsweise zu sehen. In diesen Zellen war kein Makronukleus zu sehen, sondern eher dunklere Flecken, die verschieden geformt waren und etwa über eine Hälfte der Zelle verteilt waren (und deshalb an den Makronukleus erinnerten). Außerdem waren diese dunklen Flecken nicht rund, wie es manche Vakuolen sind. Auf jedem Deckglas zusammen mit den injizierten Zellen befanden sich Kontrollzellen, die nicht injiziert wurden. Diese zeigten keinen Unterschied zum normalen Verhalten und der üblichen Zellteilung. Es handelt sich also um ein Phänomen, welches nur durch die Injektion verursacht worden ist. Um zu untersuchen, ob es sich bei diesen Absonderlichkeiten vielleicht um den Phänotyp unserer *gene silencing*-Konstrukte handelte, wurde als Kontrolle das reine pBS-Plasmid injiziert sowie das zweite Konstrukt, pBS-C456-SX14Δ8.

Von den 7 Zellen, denen pBS injiziert und von den 12 Zellen, denen pBS-C456-SX14 Δ 8 injiziert worden waren, hatten jeweils 2 Zellen den Transfer in die Glasröhrchen überlebt. Hier gingen alle innerhalb der nächsten 24 Stunden zugrunde. Die Zellen, die unter dem Mikroskop betrachtet werden konnten, sahen alle wie die oben beschriebenen Zellen, denen pBS-C4Sal injiziert worden war, aus.

Nur die zwei Zellen, die mit pBS-C4Sal injiziert worden waren, konnten zu einem Klon hochgezogen und präpariert werden. Die Zellen wurden nach etlichen Teilungen wieder im Mikroskop betrachtet und wiesen nun eher ein normales Erscheinungsbild auf. Auch ein Makronukleus war zu erkennen. Im Western Blot zeigte sich aber keine Veränderung an der vorhandenen Menge an PP63/Parafusin.

5. Diskussion

5.1 Autogamie

Aufgrund der besonderen genetischen Disposition von *Paramecium* ist es, auch im Hinblick auf weitere Transformationsexperimente, sehr wichtig, zunächst eine Methode zu etablieren, die zuverlässig die Identifikation von Zellen erlaubt, die gerade Autogamie durchlaufen haben.

Die zunächst angewendete Methode, bei der man Zellen über 20 Generationen lang beobachtet hat und dann Autogamie durch Hungern induziert, zeigt keine befriedigenden Ergebnisse. Da hierbei nur 85% der Zellen einer Kultur Autogamie durchlaufen, ist die Wahrscheinlichkeit, eine Zelle zu manipulieren, die demnächst Autogamie durchlaufen und die gesamte injizierte DNA abbauen wird, zu groß.

Die Verwendung von *in vivo* Farbstoffen übertrifft diese Methode bei weitem. Meine Entdeckung, daß die Paramecien geringe Konzentrationen von Hoechst 33342 unbeschadet überleben und damit trotzdem eine ausgezeichnete Makronukleusanfärbung zu erreichen ist, stellt eine erhebliche Erleichterung da. Bis dahin ist es nicht möglich gewesen, den Makronukleus einer Zelle anzufärben und ihn somit auf eventuelle Fragmentierung, die ein sicheres Anzeichen für Konjugation oder Autogamie ist, zu untersuchen und die untersuchte Zelle für die Injektion weiterzuverwenden. Bis jetzt hat man immer vom Zustand anderer Zellen einer Kultur auf den Zustand der zu transformierenden Zelle schließen müssen, ohne eine direkte Kontrolle zu haben. Der Farbstoff Hoechst 33342 erlaubt eine Anfärbung der Makronuklei, wodurch man anschließend die Zellen, die einen fragmentierten Zellkern haben und somit eindeutig gerade Autogamie durchlaufen haben, isolieren kann und die Nachkommen dieser Zellen injizieren kann. Man hat also 100% Kontrolle über den Zustand der Zelle und ist sich sicher, daß die Zelle für die nächsten 20 Teilungen keine Autogamie oder Konjugation durchlaufen und somit auch die injizierte DNA nicht abbauen kann. Auf diese Weise können genug Zellen aus einer injizierten Zelle herangezogen werden, um Untersuchungen auf Protein- und DNA-Ebene zu erlauben.

5.2 Antisense-Strategie

Ein Ziel dieser Diplomarbeit war es, das Protein PP63/Parafusin auszuschalten, um so Rückschlüsse auf die Funktion von PP63/Parafusin ziehen zu können. Bis jetzt ist in *Paramecium* noch keine der herkömmlichen Methoden, wie homologe Rekombination, zum Ausschalten von bestimmten Genen im Makro- oder Mikronukleus etabliert. Da es noch keine Möglichkeit gibt, die mikronukleären Gene zu manipulieren, bietet sich für die transkriptionell aktiven Gene im Makronukleus eine *antisense*-Strategie an. Es wurde versucht, durch Injektion von Plasmiden in den Makronukleus, die das PP63/Parafusin-Gen oder Stücke davon in *antisense*-Orientierung enthalten, die Expression von PP63/Parafusin zu verhindern. Wenn kein PP63/Parafusin mehr gebildet werden würde, wird es austitriert werden, so daß sich schließlich ein neuer Phänotyp zeigen sollte.

Für das Ausschalten von PP63/Parafusin durch eine *antisense*-Strategie hätten verschiedene *antisense*-Techniken zur Verfügung gestanden (Murray 1992, Melton 1988, Crooke 1998, Raffa *et al.*, 1996). Weit verbreitet ist z.B. die Verwendung von *antisense*-DNA, d.h. die Verwendung von *antisense*-Oligodesoxynukleotiden (Pierga *et al.*, 1994, Tidd 1996, Scanlon *et al.*, 1995). Sie werden entweder extern appliziert und müssen von der Zelle aufgenommen werden, oder sie werden mikroinjiziert. *Antisense*-Oligodesoxynukleotide sind meist weniger als 30 Nukleotide lang, künstlich synthetisiert und gegen verschiedene Ziele in der Zelle gerichtet, oft gegen mRNA. Diese künstliche Synthese ist durchaus ein Vorteil, denn sie ermöglicht so eine Modifikation der *antisense*-Oligodesoxynukleotide. Eine Möglichkeit der Veränderung ist die Substitution eines der nicht-brückenbildenden Sauerstoffe des Phosphats durch z.B. eine Methylgruppe. Durch diese künstlichen Veränderungen gelang es, die Aufnahmeeffizienz und die Nukleaseresistenz zu vergrößern (Miller, 1992). Ein Nachteil dieser Methode, weswegen sie hier nicht verwendet wird, ist die kurzfristige Wirkung der *antisense*-Oligodesoxynukleotide, die nur eine bis wenige Generationen anhält. Da aber bei *Paramecium* noch keine Versuche mit *antisense*-Konstrukten bekannt sind, war eine Methode, die über viele Generationen konstant blieb, wichtig. So konnten genügend Zellen aus einer transfizierten Zelle herangezogen werden, um Untersuchungen auf Protein- und DNA-Ebene zu erlauben und zu demonstrieren, daß eventuelle Effekte wirklich auf einer spezifischen Wirkung der *antisense*-Konstrukte beruhen. Eine andere Methode ist die Verwendung von *antisense*-RNA. Hierbei gibt es verschiedene Anwendungsmöglichkeiten. Zum einen kann man *in vitro* transkribierte RNA durch

Wenn das Gen transkribiert wird, entsteht eine, zur Ziel-mRNA komplementäre, mRNA. Beide hybridisieren und die Expression der Ziel-mRNA wird behindert oder verhindert, z.B. durch den Abbau von doppelsträngiger RNA durch spezielle RNAsen oder dadurch, daß doppelsträngige RNA nicht aus dem Zellkern exportiert wird. Einen Überblick über die Möglichkeiten, die *antisense*-Nukleinsäuren haben, um in die Expression einzugreifen, gibt Fig. 11. Wo das einzelne Konstrukt wirkt, hängt von der angewandten Methode und seinen Sequenzen ab. Oftmals ist es nicht eindeutig zu bestimmen, an welchem Punkt eine *antisense*-Nukleinsäure angreift. Es besteht auch die Möglichkeit, daß sie an zwei Stellen eingreift (Cornelissen *et al.*, 1989).

Wir haben uns für Injektion von *antisense*-Genen in den Makronukleus entschieden, da die dazu nötigen Plasmide leicht in *E. coli* produziert werden können und die entstehenden Transformanten über mindestens 20 Generationen stabil sind. D.h. so haben wir genug Zeit, die Transformanten auf eine Phänotyp zu untersuchen und, wenn genug Zellen aus einer transformierten Zelle hervorgegangen sind, sind auch Untersuchungen auf Protein- und DNA-Ebene möglich.

Der erste injizierte Vektor pPXV-36PP enthielt das gesamte PP63/Parafusin-Gen in *antisense*-Orientierung unter Kontrolle des Calmodulin-Promotors von *Paramecium*. Der gleichzeitig mit dem *antisense*-Plasmid injizierte GFP-Expressionsvektor pPXV-GFP3 ermöglichte die Kontrolle einer erfolgreichen Injektion der Plasmidmoleküle in den Makronukleus. Wenn GFP exprimiert wurde, was durch die GFP-Fluoreszenz der Zellen erkennbar war, mußten auch die *antisense*-Plasmide in den Makronukleus gelangt sein und dort exprimiert werden. Eine weitere Kontrolle waren die Southern Blots, die die Anwesenheit der injizierten Plasmide und deren Replikation bestätigten. Obwohl die *antisense*-Plasmide vorhanden waren, konnte in keinem der 12 mit pPXV-36PP injizierten Zellen durch Western Blots eine Reduktion der Menge an PP63/Parafusin festgestellt werden.

Eine Bedingung, die für ein erfolgreiches Ausschalten wichtig ist, ist die Anzahl der *antisense*-mRNAs. So konnte z.B. von Daugherty *et al.*, 1989 in *E. coli* bei Untersuchungen durch verschiedene *antisense*-Konstrukte am LacZ-Gen gezeigt werden, daß ein 180facher Überschuß an *antisense*-mRNA nötig ist, um eine 100%ige Inhibition zu erreichen. Haynes *et al.*, 1995 haben in *Paramecium* diese Dosisabhängigkeit durch die Menge der injizierten Plasmide gezeigt. Da von uns das gleiche Plasmid wie von Haynes *et al.*, 1995 verwendet wird, und wir etwa 10^6 Plasmidmoleküle injizieren, kann davon ausgegangen werden, daß genug Plasmid für eine vollständige Inhibition injiziert wurde. Für einen endgültigen Beweis der Transkription der *antisense*-mDNAs wären z.B. Northern Blots nötig gewesen. Leider ist es uns bis jetzt noch

nicht möglich, durch Northern Blots zwischen *antisense*- und *sense*-mRNA zu unterscheiden. Auch Versuche eines differenzierten Nachweises über RT-PCR (reverse transcriptase PCR) sind bis jetzt gescheitert.

Was kann sonst der Grund sein, warum PP63/Parafusin nicht ausgeschaltet wird? Beim Vergleich mit Beispielen aus der Literatur über erfolgreiche *antisense*-Experimente fallen folgende Punkte auf, die vielleicht eine Antwort auf diese Frage liefern können:

(1) Da die *antisense*-mRNA erst mit dem Start-Codon AUG beginnt, liegt die 5'-UTR frei, und Ribosomen und Translationsfaktoren können ungehindert binden und lösen vielleicht den RNA-RNA-Doppelstrang genauso auf wie andere Sekundärstrukturen. (2) Die *antisense*-mRNA hat wahrscheinlich ein Poly T-Schwanz, der der *antisense*-mRNA vorne angehängt wird, da der gesamte ORF einfach in der Orientierung umgedreht worden war. Dieser Poly T-Schwanz kann mit allen Poly A-Schwänzen von mRNAs in der Zelle unspezifisch hybridisieren. (3) Vielleicht behindert dieser Poly T-Schwanz auch das Capping der *antisense*-mRNA und diese wird ohne Cap sofort wieder abgebaut. (4) Und schließlich ist es bei einer so langen *antisense*-mRNA nicht auszuschließen, daß sich Sekundärstrukturen bilden, die sich entweder auf die Hybridisierung mit der *sense*-mRNA oder auf die Stabilität der *antisense*-mRNA auswirken.

In Prokaryoten ist von Daugherty et al., 1989 in *E. coli* am LacZ-Gen gezeigt worden, daß verschiedene Konstrukte für verschieden starke Inhibition sorgen. Allgemein geht man in Prokaryoten davon aus, daß *antisense*-Konstrukte, die die Ribosomenbindestelle (RBS) blockieren, am effektivsten sind, aber man kennt auch genug Beispiele, in denen eine zum C-Terminus komplementäre *antisense*-RNA auch zu einer Inhibition führt. In Eukaryoten demonstrierten Kim et al., 1985, daß es gleichgültig ist, wo die *antisense*-mRNA bindet, da doppelsträngige RNA nicht den Zellkern verlassen kann. Hierbei ist es aber wichtig, daß die gesamte *sense*-mRNA schon im Zellkern von der *antisense*-mRNA gebunden wird, da im Cytoplasma eine *antisense*-mRNA, die die RBS bindet, erfolgreicher ist. Also kann auch hier man im Allgemeinen davon ausgegangen werden, daß *antisense*-RNAs, die die RBS, d.h. die 5'-UTR, und das Startcodon blockieren, eine bessere Inhibition zeigen (Melton et al., 1985).

Nach all diesen Überlegungen erschien ein weiterer Versuch mit einem anderen *antisense*-Konstrukt aussichtsreich. Hierzu wurden die zwei neuen Vektoren, pPXV-PP63asko1 und 2 unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte konstruiert. Beide enthielten fast 100 Nukleotide der 5'-UTR, um das Binden jeglicher Translationsfaktoren und Polymerasen zu verhindern. Beide waren sehr viel kürzer und hatten, weil ihnen das 3'-Ende fehlt, keinen Poly T-Schwanz. Da nicht bekannt war, wie sich Introns auf die Wirkung der *antisense*-mRNAs

auswirken könnten, wurde pPXV-PP63asko1 so konstruiert, daß es vor dem ersten Intron endete und pPXV-PP63asko2 so, daß es länger war, aber dafür auch die beiden bekannten Introns des PP63/Parafusin-Genes enthielt. Aber auch die Injektion dieser beiden *antisense*-Konstrukte zeigten keine Erfolg in Bezug auf die Reduktion der Menge an PP63/Parafusin.

Warum alle drei *antisense*-Konstrukte keine Inhibition der PP63/Parafusin-Expression erzielt haben, darüber kann nur spekuliert werden. Ein Unsicherheitsfaktor ist der Promotor, dessen Sequenzen in *Paramecium* gänzlich unbekannt sind. Der Calmodulin-Promotor des Expressionsvektor ist willkürlich ausgewählt worden. Da nichts über den Promotor bekannt war, wurden einfach etwa 1000 bp stromaufwärts des Startcodons verwendet, in der Hoffnung, daß diese Sequenzen als Promotor ausreichen. Da diese Sequenzen ausreichen, ist durch die Expression von GFP oder durch die Neomycin-Resistenz (Haynes *et al.*, 1995) gezeigt, was aber nicht heißt, daß es sich bei diesen 1000bp um die Minimalsequenz handelt. So ist z. B. in Hefe bekannt (Law *et al.*, 1988), daß ein *antisense*-Konstrukt, welches mit 400 bp der 5'-UTR den Promotor des Genes enthalten hatte, sowohl von dem eigenen Promotor als auch vom künstlichen Promotor aus abgelesen wurde. D.h. es wurde von dem *antisense*-Konstrukt sowohl *antisense*- als auch *sense*-mRNA gebildet. Erst als der Promotor aus der 5'-UTR entfernt worden war, wurde nur noch *antisense*-mRNA gebildet. Diese Möglichkeit ist bei unseren pPXV-PP63asko1 und 2 nicht auszuschließen.

Von *antisense*-Oligodesoxynukleotiden ist bekannt, daß die Struktur der Ziel-RNA einen starken Einfluß auf die Affinität und die Bindungsrate der *antisense*-Oligodesoxynukleotide hat (Freier, 1993).

Es gibt auch Organismen, in denen *antisense*-Strategien nicht funktionieren. In der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) gibt es kaum Experimente, in denen *antisense*-Konstrukte erfolgreich eingesetzt werden konnten. Hierbei wird eine dsRNA *unwinding/modifying* Aktivität diskutiert (Bass *et al.*, 1987). Diese Aktivität ist in *Xenopus laevis* entdeckt worden und wandelt bei doppelsträngiger RNA die Adeninreste in Inosinreste um. Da Inosin/Uracilpaare weniger stabil sind als Adenin/Uracilpaare, führt dieser Umbau dazu, daß die dsRNA wieder in Einzelstränge zerfällt. Obwohl zuerst angenommen wurde, daß diese Aktivität vielleicht dafür verantwortlich sein könnte, daß *antisense*-Experimente in verschiedenen Organismen nicht funktionieren, scheint doch eher das Gegenteil der Fall zu sein. Denn Inosine werden bei der Translation als Guanosine gelesen und dadurch werden nichtfunktionelle Proteine produziert. Und es besteht die Möglichkeit, daß diese dsRNA *unwinding/modifying* Aktivität vielleicht bei der Wirkung von *antisense*-Konstrukten eine Rolle spielt. Auffälligerweise fehlt diese dsRNA

unwinding/modifying Aktivität in Hefe; hier könnte die Ursache für das Fehlschlagen von *antisense*-Experimenten in Hefe liegen und vielleicht ist dies auch der Fall in *Paramecium*.

5.3 Gene silencing

Nachdem es bisher nicht möglich war, PP63/Parafusin mit *antisense*-Konstrukten auszuschalten, wurde eine andere Methode, das *gene silencing*, versucht (Meyer 1995). Hierbei handelt sich um ein noch nicht völlig geklärtes Phänomen, das bei den verschiedensten Organismen vorkommt: Höhere Pflanzen (Napoli *et al.*, 1990), Pilzen (Cogoni *et al.*, 1997), Insekten (Dorer *et al.*, 1994), *Paramecium* (Ruiz *et al.*, 1998). Durch exogene Gene werden endogene Genhomologe ausgeschaltet. Dieses Ausschalten geschieht anscheinend durch unterschiedliche Mechanismen wie z.B. RNA-abhängige DNA-Methylierung, Inhibition der transkriptionalen Aktivität oder post-transkriptionale Inaktivierung, wie in den zitierten Arbeiten diskutiert wird.

Hierfür wurden zwei Plasmide verwendet. Beides sind Plasmide, die nicht in *Paramecium* exprimiert werden. pBS-C4Sal enthält den 5'-Teil des PP63/Parafusin-Genes, pBS-C456-SX14 Δ 8 enthält das gesamte PP63/Parafusin-Gen, allerdings ohne den PolyA-Schwanz.

Die durch die Injektion erzielten Ergebnisse lassen sich schwer interpretieren. Das merkwürdige Aussehen der Zellen am Tag nach der Injektion ist bereits im Ergebnisteil beschrieben. Ob dieses hellere Leuchten, welches bei den injizierten Zellen beobachtet wurde, GFP-Fluoreszenz oder Autofluoreszenz ist, läßt sich nicht beurteilen. Über die dunklen Flecken, die statt eines Makronukleus auftauchen, kann man ebenfalls nur spekulieren. Eine Vermutung ist, daß es sich bei diesen Flecken vielleicht um Fragmente des Makronukleus handelt, die nach dem Aufplatzen durch die Injektion nicht mehr vollständig zusammengefügt worden ist. Alle Zellen, die betrachtet werden konnten, sahen gleich aus. Auch dies ist ungewöhnlich, da sonst die Zellen heterogener sind. Einige Zellen zeigen sonst normale Autofluoreszenz, was eine Injektion der DNA ins Cytoplasma bedeutet, während andere Zellen GFP-Fluoreszenz aufweisen. Daß diese Veränderungen durch den GFP-Expressionsvektor verursacht werden können, ist unwahrscheinlich, da es sich dabei um den gleichen Vektor handelt, der schon bei allen *antisense*-Versuchen injiziert worden war und bei über 40 injizierten Zellen nie eine Veränderung gezeigt hat.

Offensichtlich handelt es sich bei dem Absterben der Zellen nicht um einen Effekt, der durch *gene silencing* verursacht worden ist, da sich die gleichen Effekte auch bei Kontrollen zeigten, die nur mit pBS-Plasmid injiziert wurden. Weshalb allerdings ein bakterielles Expressionsplasmid solche Auswirkungen auf *Paramecium* haben sollte, ist ein Rätsel. Vor allem, weil Vektoren, die pBS sehr ähnlich sind, für die *gene silencing* Versuche von Ruiz *et al.*, 1998 verwendet wurden. Wahrscheinlicher ist es, daß es sich um eine saisonale Empfindlichkeit von *Paramecium* handelt. Es ist bekannt (persönliche Beobachtungen verschiedener Mitglieder der AG und mir selbst), daß im Frühjahr und im Herbst die Paramecien anders reagieren als im Sommer und im Winter. Oftmals äußert sich dies in besonderer Empfindlichkeit gegenüber jedweder Behandlung. Die Versuche mit diesen Plasmiden sollten auf jeden Fall wiederholt werden, sobald sich der Zustand der Paramecien-kulturen wieder stabilisiert hat. Dies war mir aufgrund der zeitlichen Begrenzung nicht möglich. Neben den beiden Vektoren sollte auf jeden Fall wieder pBS als Kontrolle injiziert werden. Eine weitere sinnvolle Kontrolle wäre eine Injektion nur mit Puffer, um eventuelle Empfindlichkeiten der Zellen gegen eine Injektion festzustellen. Der Vollständigkeit halber könnte auch eine Injektion nur mit dem Expressionsvektor für GFP gemacht werden.

5.4 Mögliche Funktionen von PP63/Parafusin

Schon bei der Entdeckung des Phosphoproteins PP63/Parafusin (Gilligan *et al.*, 1982, Ziesenis *et al.*, 1985) ist über eine Exocytosebeteiligung des Proteins spekuliert worden. Die sehr enge Korrelation der Dephosphorylierung von 80 msec (Knoll *et al.*, 1991 und Höhne-Zell *et al.*, 1992) scheint diese Vermutungen zu unterstützen und auch Lokalisierungsstudien weisen PP63/Parafusin an den Dockstellen der Trichocysten nach (Kissmehl *et al.*, 1998).

Die enge Korrelation zwischen Dephosphorylierung und Exocytose und die räumliche Nähe zu exocytoserelevanten Strukturen deuten darauf hin, daß PP63/Parafusin eine wesentliche Funktion bei der Exocytose von *Paramecium* besitzt. Aus diesem Grund wurde durch einen *knock-out* von PP63/Parafusin eine Beeinträchtigung der Exocytose erwartet.

Bedenken, daß es sich bei der PGM um ein essentielles Enzym handelt, was *knock-out* Versuche zunichte machen könnte, wurden durch Hinweise in letzter Zeit zerstreut. So wurde z.B. in *Saccharomyces cerevisiae* beide Phosphoglucomutasegene ausgeschaltet (Boles *et al.*, 1994). Der einzige Phänotyp, der gefunden worden ist, ist die Unfähigkeit der Doppelmutante,

Galactose zu verstoffwechseln. Man hat damals festgestellt, daß andere Mutasen, z.B. eine Phosphomannomutase, das Ausfallen der PGM kompensieren können.

Es gibt sogar Hinweise, daß PP63/Parafusin vielleicht doch nicht essentiell für die Exocytose ist. Ein wichtiges Beispiel ist das Ausschalten des einzigen PGM-Genes in *Tetrahymena thermophila* (Chilcoat *et al.*, 1998). *T. thermophila* ist, wie *Paramecium* ein Ciliat, der ebenfalls besondere Exocytoseorganellen (Mucocysten) besitzt, die auf einen Trigger hin synchron exocytiert werden können. Die genetische Manipulation ist in *T. thermophila* gut etabliert. Durch Vergleiche mit *Paramecium* und anderen PGMs ist es gelungen, das einzige makronukleäre Gen (PGM1) in *T. thermophila* zu identifizieren und auszuschalten. Obwohl das Ausschalten von PGM1 durch Southern und Northern Blots gezeigt worden ist, läßt sich kein Defekt im Wachstum oder der Morphologie feststellen. Auch bei der Synthese, dem Targeting, dem Andocken der Mucocysten und der Exocytose besteht kein Unterschied zu Wildtypzellen. Sowohl die Sensitivität der Zellen gegenüber dem Triggeragenz als auch die Menge der exocytierten Mucocysten ist unverändert.

Ein anderes Licht auf die Exocytosebeteiligung von PP63/Parafusin wirft die Untersuchung von Lee *et al.*, 1992. Sie isolierten ein 60 kDa Phosphoprotein, welches zuvor schon (Kim *et al.*, 1986) mit der Calciumregulation im sarcoplasmatischen Retikulum in Skelettmuskelzellen in Verbindung gebracht hatten. Dieses 60 kDa-Protein wird hauptsächlich, neben zwei anderen Proteinen, in der Gegenwart von Calcium und Calmodulin phosphoryliert. Kim *et al.*, 1986 konnten zeigen, daß die Ca^{2+} /CaM-abhängige Phosphorylierung dieses Proteins proportional zur Höhe der Inhibition der Calciumfreisetzung aus dem SR ist; und umgekehrt diese Inhibition durch die Dephosphorylierung dieses Proteins aufgehoben wird. Sie vermuteten deshalb eine Regulation der Calciumfreisetzung durch dieses 60 kDa-Phosphoprotein. Bei der Charakterisierung dieses 60 kDa Phosphoproteins durch Lee *et al.*, 1992 hat sich dann gezeigt, daß es sich bei diesem Phosphoprotein um eine Isoform der Phosphoglucomutase handelt. Die Membranassoziation dieser PGM führt zu einer beträchtlichen Einbuße ihrer Aktivität.

Ein Vergleich mit *Paramecium* liegt nahe, da die Alveolarsäcke, die sich unterhalb der Plasmamembran und in direkter Nähe zu den Trichocysten befinden ebenso wie das SR als Calciumspeicher dienen (Stelly *et al.*, 1991, Knoll *et al.*, 1993). Ebenso wie die PGM in den Skelettmuskelzellen, befindet sich PP63/Parafusin assoziiert mit den Membranen der Calciumspeicher, d.h. hier den Alveolarsäcken (Stecher *et al.*, 1987, Kissmehl *et al.*, 1998).

Übereinstimmend mit dieser Vermutung ist die Inhibition der Dephosphorylierung und somit auch die Inhibition der Exocytose durch Blockieren von Calcineurin (Momayezi *et al.*, 1987). Als Kinase, die PP63/Parafusin phosphoryliert und so an der Regulation beteiligt ist, wird eine

Caseinkinase diskutiert (Kissmehl *et al.*, 1997). Ein direkter Beweis für diese Beteiligung an der Exocytosebeteiligung wäre mit den *knock-out* Paramecien möglich gewesen. Da das Calcium-Imaging während der Exocytose gut etabliert ist, könnten mögliche Defekte dort *in situ* gezeigt werden (Klauke *et al.*, 1997).

Eine rein strukturelle Funktion von PP63/Parafusin bei der Exocytose wäre ebenfalls denkbar. Von vielen glykolytischen Enzymen ist bekannt, daß sie auch strukturelle Funktionen ausüben können (Smalheiser 1996). So weiß man z.B., daß das Strukturprotein ϵ -Crystallin der Augenlinse mit der Lactatdehydrogenase identisch ist und beide Proteine von demselben Gen codiert werden (Wistow *et al.*, 1987). Auch von PGM kennt man diese strukturelle Funktion. Belkin *et al.*, 1994 haben die PGM in Muskelzellen als einen Bestandteil von Adhärenz-Verbindungen identifiziert, wobei die PGM hier keine enzymatische Aktivität besitzt, sondern nur strukturelle Aufgaben erfüllt.

Welche Funktion PP63/Parafusin bei der Exocytose übernimmt, bleibt weiterhin ungeklärt. Weitere Untersuchungen z.B. in *knock-out* Zellen sind wichtig. Diese Zellen müssen dann auf Veränderungen der Membranfusion, des Wiederandocken der Trichocysten, des Calcium-Transienten, der Endocytose oder auch der Trichocysten-Neusynthese untersucht werden. Denn jeder Folgeschritt nach der Exocytose könnte relevant sein. Die fehlende Dephosphorylierung von PP63/Parafusin bei Mutanten kann diese Möglichkeit nicht ausschließen.

6. Zusammenfassung

PP63/Parafusin ist ein Phosphoprotein, welches schon seit vielen Jahren mit der Exocytose in *Paramecium* in Verbindung gebracht wird. Es existieren viele indirekte Hinweise, die einen Schluß auf solch eine mögliche Funktion erlauben. PP63/Parafusin ist nicht nur ein Protein, welches in sehr enger zeitlicher Korrelation mit der Exocytose dephosphoryliert wird, sondern es befindet sich auch in unmittelbarer Nähe des Ortes der Exocytose, den Trichocystendockstellen und den Alveolarsäcken.

Um direkte Hinweise auf die Funktion von PP63/Parafusin zu erhalten, sollte PP63/Parafusin zumindest vorübergehend ausgeschaltet werden.

Ein erster Schritt auf dem Weg, PP63/Parafusin auszuschalten, war das Erzeugen und Isolieren von Zellen, die gerade Autogamie durchlaufen hatten. Mit Hilfe des Farbstoffes Hoechst 33342 war es erstmals möglich, lebende Zellen zu identifizieren, die gerade Autogamie durchlaufen und die die Anfärbung durch den Farbstoff überleben.

Nun mußte, um eine erfolgreiche Injektion der *antisense*-Konstrukte in den Makronukleus überprüfen zu können, ein Reportersystem etabliert werden. Dabei wurde ein GFP-Expressionsplasmid mit den *antisense*-Plasmiden koinjiziert. Zellen, die nach 12 Stunden GFP-Fluoreszenz zeigten, wurden kultiviert.

Um PP63/Parafusin auszuschalten, wurden drei verschiedene *antisense*-Konstrukte injiziert. Allerdings gelang es mit keinem der Konstrukte, die Menge an PP63/Parafusin wesentlich zu reduzieren.

Als eine zweite Methode wurden Plasmide injiziert, die das PP63/Parafusin-Gen in der *sense*-Orientierung enthielten. Mit ihnen sollte PP63/Parafusin über *gene silencing* ausgeschaltet werden. Aufgrund von Problemen mit den Paramecien-Zellkulturen haben diese Versuche zu keinem Ergebnis geführt und müssen, wenn sich die Zellkulturen erholt haben, noch einmal durchgeführt werden.

7. Literatur

- Andersson H, Baechi T, Hoechl M, Richter C (1998) Autofluorescence of living cells. *J Microsc* 191: 1-7
- Bass BL, Weintraub H (1987) Antisense developmentally regulated activity that unwinds RNA duplexes. *Cell* 48: 607-613
- Belkin AM, Klimanskaya IV, Lukashev ME, Lilley K, Critchley DR, Koteleliansky VE (1994) A novel phosphoglucomuase-related protein is concentrated in adherens junctions of muscle and nonmuscle cells. *J Cell Sci* 107: 159-173
- Berger JD, Rahemtullah S (1990) Commitment to autogamy in *Paramecium* blocks mating reactivity: Implications for regulation of the sexual pathway and the breeding system. *Exp Cell Res* 187: 126-133
- Boles E, Liebetrau W, Hofmann M, Zimmermann FK (1994) A family of hexosephosphate mutases in *Saccaromyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 220: 83-96
- Bourgain FM, Katinka MD (1991) Telomeres inhibit end to end fusion and enhance maintenance of linear DNA molecules injected into the *Paramecium primaurelia* macronucleus. *Nucleic Acid Res* 19(7): 1542-1547
- Brodsky FM (1988) Living with clathrin: its role in intracellular membrane traffic. *Science* 242: 1396-1402
- Caron F, Meyer E (1985) Does *Paramecium primaurelia* use a different genetic code in its macronucleus? *Nature* 314: 185-188
- Chilcoat ND, Turkewitz AP (1998) In vivo analysis of the major exocytosis-sensitive phosphoprotein in *Tetrahymena*. *J Cell Biol* 139: 1197-1207
- Cogoni C, Macino G (1997) Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10233-10238
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38
- Cornelissen M, Vandewiele M (1989) Both RNA level and translation efficiency are reduced by antisense RNA in transgenic tobacco. *Nucleic Acid Res* 17: 833-843
- Crooke ST (ed) (1998) Antisense research and application. *Handbook of Experimental Pharmacology* 131, Springer Verlag Heidelberg
- Daugherty BL, Hotta K, Kumar C, Ahn YH, Zhu JC, Pestka S (1989) Antisense RNA: Effekt of ribosome binding sites, target location, size, and concentration on the translation of specific mRNA molecules. *Gene Anal Tech* 6: 1-16

-
- Dippell RV (1955) A temporary stain for *Paramecium* and other ciliate protozoa. *Stain Technol* 30: 69-71
- Dorer DR, Henikoff S (1994) Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 77: 993-1002
- Erxleben C, Klauke N, Flötenmeyer M, Blanchard MP, Braun C, Plattner H (1997) Microdomain Ca^{2+} activation during exocytosis in *Paramecium* cells. Superposition of local subplasmalemmal calcium store activation by local Ca^{2+} -influx. *J Cell Biol* 136: 597-607
- Freier G (ed) (1993) Antisense research and application. *Handbook of Experimental Pharmacology* 131, 67-82, Springer Verlag Heidelberg
- Gilligan DM, Satir B (1982) Protein Phosphorylation/Dephosphorylation and Stimulus-Secretion Coupling in Wild Type and Mutant *Paramecium*. *J Biol Chem* 257: 13903-13906
- Godiska R, (1987) Transformation of *Paramecium* by microinjection of a cloned serotyp gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7590-7594
- Haacke-Bell B, Hohenberger-Bregger R, Plattner H (1990) Trichocysts of *Paramecium* : secretory organelles in search of their function. *Eur J Protistol* 25: 289-305
- Hauser K, Kissmehl R, Linder J, Schultz JE, Lottspeich F, Plattner H (1997) Identification of isoforms of the exocytosis-sensitive phosphoprotein PP63/ parafusin in *Paramecium tetraurelia* and demonstration of phosphoglucomutase activity. *Biochem J* 323: 289-296
- Haynes WJ, Ling KY, Saimi Y, Kung C (1995) Induction of Antibiotic Resistance in *Paramecium tetraurelia* by the Bacterial Gene APH-3'-II. *J Euk Microbiol* 42(1): 83-91
- Henkel AW, Almers W (1996) Fast steps in exocytosis and endocytosis studied by capacitance measurements in endocrine cells. *Curr Op Neurobiol* 6: 350-357
- Höhne-Zell B, Knoll G, Riedel-Gras U, Hofer W, Plattner H (1992) A cortical phosphoprotein ('PP63') sensitive to exocytosis triggering in *Paramecium* cells. *Biochem J* 286: 843-49
- Kanabrocki JA, Saimi Y, Preston RR, Haynes WJ, King C (1991) Efficient transformation of *cam2*, a behavioral mutant of *Paramecium tetraurelia*, with the calmodulin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10845-10849
- Kim DH, Ikemoto N (1986) Involvement of 60-kilodalton phosphoprotein in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261: 11647-11679
- Kim SK, Wold BJ (1985) Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of antisense RNA. *Cell* 42: 129-138

-
- Kissmehl R, Hauser K, Gössringer M, Momayezi M, Klauke N, Plattner H (1998) Immunolocalization of the exocytosis-sensitive phosphoprotein, PP63/parafusin, in *Paramecium* cells using antibodies against rekombinant protein. *Histochem Cell Biol* 110: 1-8
- Kissmehl R, Treptau T, Hauser K, Plattner H (1997) A novel, calcium-inhibitable casein kinase in *Paramecium* cells. *FEBS Lett* 402: 227-235
- Kissmehl R, Treptau T, Hofer HW, Plattner H (1996) Protein phosphatase and kinase activities possible involved in exocytosis regulation in *Paramecium tetraurelia*. *Biochem J* 317: 65-76
- Klauke N, Plattner H (1997) Imaging of Ca²⁺ transients induced in *Paramecium* cells by a polyamine secretagogue. *J Cell Sci* 110: 975-983
- Klauke N (1995) Untersuchungen des transienten Anstiegs der intrazellulären Calciumionenkonzentration während der Trichocystenexocytose von *Paramecium*. Doktorarbeit Universität Konstanz
- Klobutcher LA, Herrick G (1997) Developmental genom reorganization in ciliated protozoa: The Transposon Link. *Progr Nucleic Acid Res*: 1-63
- Knoll G, Braun C, Plattner H (1991) Quenched flow analysis of exocytosis in *Paramecium* cells: Time course, changes in membrane structure, and calcium requirements revealed after rapid mixing and rapid freezing of intact cells. *J Cell Biol* 113: 1295-1304
- Knoll G, Grässle A, Braun C, Probst W, Höhne-Zell B, Plattner H (1993) A calcium influx is neither strictly associated with nor necessary for exocytotic membran fusion in *Paramecium* cells. *Cell Calcium* 14: 173-183
- Kussmann M, Hauser K, Kissmehl R, Breed J, Plattner H, Roepstorff (1999) Characterization of the phosphorylation of the exocytosis-sensitive phosphoprotein PP63/Parafusin by differential MALDI mass spectrometric peptide mapping. Submitted
- Lallier TE, Whittaker CA, DeSimone DW (1996) Integrin $\alpha 6$ expression is required for early nervous system development in *Xenopus laevis*. *Development* 122: 2539-2554
- Law RHP, Devenish RJ (1988) Expression in yeast of antisense RNA to ADE1 mRNA. *Biochem Int* 17: 673-679
- Lefort-Tran M, Aufderheide K, Pouphile M, Rossignol M, Beisson J (1981) Control of exocytotic processes: Cytological and physiological studies of trichocyst mutants in *Paramecium tetraurelia*. *J Cell Biol* 88: 301-311
- Lee YS, Marks AR, Gureckas N, Lacro R, Nadal-Ginard B, Kim DH (1992) Purification, characterisation and molecular cloning of a 60-kDa phosphoprotein in rabbit skeletal sarcoplasmic reticulum which is an isoform of phosphoglucomutase. *J Biol Chem* 267: 21080-21088

-
- Lüthe N, Plattner H, Haacke B, Walther P, Müller M (1986) Lectin binding sites in *Paramecium tetraurelia* cells. *Histochem* 85: 365-375
- Martin TFJ (1997) Stages of regulated exocytosis. *Trends Cell Biol* 7: 271-275
- Meegan JM, Marcus PI (1989) Double-stranded ribonuclease coinduced with interferon. *Science* 244: 1089-1091
- Melton DA (ed) (1988) Antisense RNA and DNA. *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Melton DA (1985) Injected antisense RNAs specifically block messenger RNA translation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 144-148
- Metzlaff M, O'Dell M, Cluster PD, Flavell RB (1997) RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in *Petunia*. *Cell* 88: 845-854
- Meyer E, Duhaucourt S (1996) Epigenetic programming of developmental genome rearrangements in ciliates. *Cell* 87: 9-12
- Meyer P (ed) (1995) Gene silencing in higher plants and related phenomena in other eukaryotes. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 197, Springer Verlag Heidelberg
- Miller PS (1992) Antisense oligonucleoside methylphosphonates. *Antisense RNA and DNA. Modern Cell Biology* 11: 241-253, Murray JAH (ed) Wiley-Liss Verlag, New York
- Momayezi M, Lumpert C, Kersken H, Gras U, Plattner H, Krinks MH, Klee C (1987) Exocytosis induction in *paramecium tetraurelia* cells by exogenous phosphoprotein phosphatase *in vivo* and *in vitro*: Possible involvement of calcineurin in exocytotic membrane fusion. *J Cell Biol* 105: 181-189
- Morgan A, Burgoyne RD (1997) Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cell and the Synapse. *Sem Cell Dev Biol* 8: 141-149
- Murray JAH (ed) (1992) *Antisense RNA and DNA. Modern Cell Biology* 11, Wiley-Liss Verlag, New York
- Murtaugh T, Gilligan D, Satir B (1987) Purification of and production of an antibody against a 63,000 M_r stimulus-sensitive phosphoprotein in *Paramecium*. *J Biol Chem* 262: 15734-15739
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* 2: 279-289
- Nellen W, Sczakiel G (1996) *In vitro* and *in vivo* action of antisense RNA. *Mol Biotech* 6: 7-15

-
- Niswender KD, Blackman SM, Rhode L, Magnuson MA, Piston DW (1995) Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: Comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *J Microsc* 180: 109-116
- Patel R, Jacobs-Lorena M (1992) Interference of gene expression by antisense RNAs in *Drosophila*. *Antisense RNA and DNA: Modern Cell Biology* 11: 77-86, Murray JAH (ed) Wiley-Liss Verlag, New York
- Pierga JY, Magdelenat H (1994) Applications of antisense-oligonucleotides in oncology. *Cell Mol Biol* 40: 237-261
- Plattner H, Matt H, Kersken H, Haacke B, Stürzl R (1984) Synchronous exocytosis in *Paramecium* cells. I. A novel approach. *Exp Cell Res* 151: 6-13
- Plattner H, Stürzl R, Matt H (1985) Synchronous exocytosis in *Paramecium* cells. IV. Polyamino compounds as potent trigger agents for repeatable trigger-redocking cycles. *Eur J Cell Biol* 36: 32-37
- Plattner H, Knoll G, Pape R (1993) Synchronization of different steps of the secretory cycle in *Paramecium tetraurelia*: Trichocyst exocytosis, exocytosis-coupled endocytosis, and intracellular transport. *Adv Cell Mol Biol Membr* 2A: 123-148
- Plattner H, Pape R, Haacke B, Olbricht K, Westphal C, Kersken H (1985) Synchronous exocytosis in *Paramecium* cells. IV. Ultrastructural analysis of membrane resealing and retrieval. *J Cell Sci* 77: 1-17
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233
- Preer Jr JR, Preer LB, Rudman BM, Barnett AJ (1985) Deviation from the universal code shown by the gene for surface protein 51A in *Paramecium*. *Nature* 314: 188-190
- Prescott DM (1994) The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol Rev*: 233-267
- Raffa RB (ed), Porreca F (1996) Antisense strategies for the study of receptor mechanisms. Neuroscience Intelligence Unit, Springer Verlag Heidelberg
- Ramoino P, Beltrame F, Diaspro A, Fato M (1997) Trichocyst membrane fate in living *Paramecium primaurelia* visualized by multimodal confocal imaging. *Eur J Cell Biol* 74: 79-84
- Renner M (ed) (1984) Kükenthal's Leitfaden für das zoologische Praktikum. Gustav-Fischer Verlag Stuttgart
- Ruiz F, Vayssié L, Klotz C, Sperling L, Madeddu L (1998) Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol Biol Cell* 9: 931-943
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

-
- Satir BH, Busch G, Vuoso A, Murtaugh T (1988) Aspects of signal transduction in stimulus exocytosis-coupling in *Paramecium*. J Cell Biochem 36: 429-443
- Satir BH, Hamasaki T, Reichman M, Murtaugh TJ (1989) Species distribution of a phosphoprotein (parafusin) involved in exocytosis. Proc Natl Acad Sci USA 86: 930-932
- Scanlon KJ, Ohta Y, Ishida H, Kijima H, Ohkawa T, Kaminski A, Tsai J Horng G, Kashani-Sabet M (1995) Oligonucleotide-mediated modulation of mammalian gene expression FASEB J 9: 1288-1296
- Schmidt HJ (1996) Molecular Biology of Ciliates. Ciliates: Cells as organisms: 325-353
- Schuurs TA, Schaeffer EAM, Wessel JGH (1997) Homology-dependent silencing of the SC3 gene in *Schizophyllum commune*. Genetics 147: 589-596
- Skouri F, Cohen J (1997) Genetic approach to regulated exocytosis using functional complementation in *Paramecium*: Identification of the ND7 gene required for membrane fusion. Mol Biol Cell 8: 1063-1071
- Smalheiser NR (1996) Proteins in unexpected locations. Mol Biol Cell: 1003-1014
- Sokol DL, Murray JD (1996) Antisense and ribozyme constructs in transgenic animals. Transgenic Res 5: 363-371
- Sonneborn TM (1970) Methods in Cell Physiology. Chapter 12: Methods in *Paramecium* research. Prescott DM (ed) Academic Press New York
- Stecher B, Höhne B, Gras U, Momayezi M, Glas-Albrecht R, Plattner H (1987) Involvement of a 65kDa phosphoprotein in the regulation of membrane fusion during exocytosis in *Paramecium* cells. FEBS Lett 223: 25-32
- Stelly N, Mauger JP, Kéryer G, Claret M, Adoutte A (1991) Cortical alveoli of *Paramecium*: A vast submembranous calcium compartment. J Cell Biol 113: 103-112
- Subramanian SV, Wyroba E, Andersen A, Satir B (1994) Cloning and sequencing of parafusin, a calcium-dependent exocytosis-related phosphoglycoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 91: 9832-9836
- Tidd DM (1996) Specificity of antisense oligonucleotides. Persp Drug Disc Design 4: 51-60
- Treptau T, Kissmehl R, Wissmann JD, Plattner H (1995) A 63 kDa phosphoprotein undergoing rapid dephosphorylation during exocytosis in *Paramecium* cells shares biochemical characteristics with phosphoglucomutase. Biochem J 309: 557-567
- Vander Molen MA, Rubin CT, McLeod KJ, McCauley LK, Donahue HJ (1996) Gap junctional intercellular communication contributes to hormonal responsiveness in osteoblastic networks. J Biol Chem 271: 12165-12171

Wichterman R (1986) The biology of *Paramecium*. Plenum Press New York

Wistow GJ, Piatigorsky J (1987) Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science* 236: 1554-1556

Zieseniss E, Plattner H (1985) Synchronous exocytosis in *Paramecium* cells involves very rapid (1s), reversible dephosphorylation of a 65-kD phosphoprotein in exocytosis-competent dtrains. *J Cell Biol* 101: 2028-2035

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Helmut Plattner für die Aufgabenstellung, sein reges Interesse an dieser Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Winfried Boos für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Bedanken möchte ich mich

-bei Karin Hauser für die vielen Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft, das positive Denken und besonders für ihre Korrektur und Hilfestellung bei dieser Arbeit (ich habe viel gelernt!).

-bei Norbert Klauke für seine fachmännische Betreuung an den Geräten und sein stetes Neuarrangement der Geräte in der FuBu, was mich immer vor neue Herausforderungen stellte.

-bei Ruth Hohenberger-Bregger für die Hilfe bei den Paramecien und ihr Bemühen, mich Diplomatie zu lehren.

-bei Brunhilde Kottwitz für die Hilfe mit den Gelen und die vielen Unterhaltungen (ohne Dich wäre es im Büro ziemlich langweilig gewesen!).

-bei Massoud Momayezi für seine Hilfe mit den Markierungsversuchen und seinen Optimismus.

-bei Claudia Braun für die „rätselhaften„ Stunden, die mir viel Kopfzerbrechen verursacht haben.

-bei Daniel und Nada für unsere „biologisch/wissenschaftlichen„ Gespräche, Nada für ihre super-kompetenten Zellen und Daniel besonders für seine Rettungsaktionen, wenn der Computer nicht das machte, was ich wollte.

-beim Rest der Arbeitsgruppe für das nette Arbeitsklima und die Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt außerdem

-meinem Neffen Sebastian und meinem Bruder für ihren Computer.

-Almut für die Korrektur dieser Arbeit.

-meinen Freunden für ihre Aufmunterungen.

-Stefan und Steffen für ihren unerschütterlichen Glauben an mich und die vorzeitigen „Doktorwürden„ (Steffen noch für die vielen Trainings am Samstag und Sonntag Abend).

-Familie Rudolf